

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4524—2025

三七种子种苗腐皮镰刀菌检测方法

Detection method for *Fusarium solani* in *Panax notoginseng* seeds and seedlings

2025-01-09 发布

中华人民共和国农业农村部 发布





## 前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部种植业管理司提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院植物保护研究所、文山七麟三七科技有限公司。

本文件主要起草人：李园、曹坳程、王秋霞、颜冬冬、方文生、刘晓漫、张敏、吴佳佳、朱佳红、王麟猛。

# 三七种子种苗腐皮镰刀菌检测方法

## 1 范围

本文件规定了三七(*Panax notoginseng*)种子和种苗中腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)的检测方法,包括形态学检测方法(第一章)、PCR检测方法(第二章)和实时荧光定量PCR检测方法(第三章)。

本文件适用于三七种子和种苗中腐皮镰刀菌的检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

bp:碱基对(Base Pair)

dNTP:脱氧核苷三磷酸(Deoxyribonucleoside Triphosphates)

PCR:聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction)

CTAB:十六烷基三甲基溴化铵(Cetyltrimethyl Ammonium Bromide)

Taq 酶:DNA 聚合酶(*Taq* DNA Polymerase)

qPCR:实时荧光定量PCR(Quantitative Real Time PCR)

Ct:循环阈值(Cycle Threshold)

## 5 腐皮镰刀菌基本信息

腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)属于瘤座孢科 *Tuberculariaceae* 镰刀菌属 *Fusarium* 成员,菌落呈白色、细密绒毛状,菌丝有隔,分枝。分生孢子梗分枝或不分枝。分生孢子有2种形态,小型分生孢子卵圆形至柱形,有1个~2个隔膜;大型分生孢子镰刀形或长柱形,有较多的横隔。腐皮镰刀菌其他信息见附录A。

## 6 样品

### 6.1 种子

种子外部检测,需随机选取100粒待检种子,放入灭菌的250 mL三角瓶中,加入50 mL无菌水后置于120 r/min的摇床上,室温下充分振荡30 min。吸取10 mL悬浮液,于2 000 r/min的离心机中离心10 min,弃去上清液。加入5 mL无菌水,充分振荡后吸取1 mL悬浮液,用无菌水进行10倍系列梯度稀释至1 000倍。种子内部检测,需随机选取100粒待检种子,在1%次氯酸钠溶液中浸泡10 min,取出种子,用无菌水冲洗3次,在培养皿底部铺上两层灭菌滤纸,将种子倒入其中,用滤纸吸干种子表面的水分。如果进行PCR及qPCR检测,则将表面消毒后的上述种子置于灭菌后的研钵中,加入等质量无菌水,充分研磨制成组织研磨液。如果种子样品不能及时检测,保存温度应为15℃~18℃。

### 6.2 种苗

送检三七种苗样品应为新鲜采集。称取根茎组织2 g~3 g,用75%乙醇浸泡30 s,或者用1%次氯酸

钠溶液浸泡 5 min,进行表面消毒,取出后在无菌水中清洗干净,晾干,置于灭菌后的研钵中,加入等质量无菌水,充分研磨制成组织研磨液。如果种苗样品不能及时检测,应放置于 4 ℃ 保存。

## 第一章 形态学检测方法

### 7 仪器与设备

除微生物实验室常规灭菌及培养设备外,其他主要仪器与设备如下:

- a) 超净工作台:高效滤膜可除去 99.99% 以上的 0.3  $\mu\text{m}$  粒子。
- b) 恒温培养箱。
- c) 全温摇瓶柜:40 r/min~280 r/min,5 ℃~60 ℃;
- d) 高速台式离心机:最大转速 $\geq$ 10 000 r/min;
- e) 显微镜:20 $\times$ ~100 $\times$ ;
- f) 微量移液器:100  $\mu\text{L}$ 、1 mL、5 mL、10 mL,并配备与移液器匹配的枪头。

### 8 培养基

#### 8.1 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)

称取马铃薯 200 g,去皮切成小块,加入 1 000 mL 去离子水中煮沸 5 min~10 min,用纱布将马铃薯残渣滤去,往滤液中加入葡萄糖 20 g、琼脂粉 15 g,再添加工蒸馏水定容至 1 000 mL,灭菌倒平板备用。

#### 8.2 Komada 培养基

A 组分的配制:氯化钾 KCl 1 g、硫酸镁  $\text{MgSO}_4$  1 g、磷酸氢二钾  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2 g、L-天冬碱 L-Asparagine 4 g、D-半乳糖 D-Galactose 40 g、琼脂 Agar 30 g,加入 1 900 mL 蒸馏水,煮沸,分装于 100 mL 三角瓶,灭菌。

B 组分的配制:乙二胺四乙酸铁钠 Fe-Na EDTA 0.02 g、十水合四硼酸钠  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  2 g、牛胆汁粉 Oxgall 1 g、五氯硝基苯 Pentachloronitrobenzene 1.5 g、硫酸链霉素 Steptomycin sulfate 1 g,加入 100 mL 灭菌水,摇匀。

在无菌操作台中,向 47.5 mL A 组分内加入 2.5 mL B 组分,摇匀后均分倒入 3 个培养皿内。

### 9 检测

#### 9.1 种子

##### 9.1.1 种子外部

吸取 100  $\mu\text{L}$  6.1 制得的悬浮液,均匀涂布于直径为 9 cm 的 PDA 平板上,每个浓度梯度 3 次重复,相同条件下设无菌水空白对照。将涂布好的平板置于 25 ℃ 恒温箱,黑暗条件下培养,3 d~5 d 后观察。

##### 9.1.2 种子内部

将按 6.1 处理后的种子均匀摆放在直径为 9 cm 的 PDA 平板上,每皿 10 粒,共 10 皿,置于 25 ℃ 恒温箱,黑暗条件下培养,5 d~7 d 后观察。

#### 9.2 种苗

在无菌条件下,用灭菌接种环蘸取 6.2 方法制备的组织研磨液涂布在 Komada 培养基上,每个样品 3 次重复。同时,涂板腐皮镰刀菌标准菌株菌悬液作为阳性对照。将涂布好的平板置于 28 ℃ 恒温箱,黑暗条件下培养,3 d~5 d 后观察有无菌落形成及菌落特征。

### 10 结果与判定

将分离到的真菌转移到 PDA 培养基进行纯化、镜检、转管保存。根据真菌培养性状和形态特征,参照《真菌鉴定手册》《真菌学》《植病研究方法》等工具书,通过观察菌株的菌落形态、菌丝和孢子形态特征进行菌株鉴定,真菌形态特征与 5 相符,可判定样品中存在腐皮镰刀菌。

## 第二章 PCR 检测方法

### 11 原理

基于腐皮镰刀菌中 *TEF-1 $\alpha$*  基因的核苷酸序列,设计特异性 PCR 检测引物,对样品进行 PCR 扩增,根据 PCR 电泳结果,确定样品中是否含有腐皮镰刀菌。

### 12 仪器与设备

除采用第一章中 7 所用的仪器与设备外,其他主要仪器与设备如下:

- 12.1 电子天平:感量 0.01 g。
- 12.2 高通量组织研磨仪。
- 12.3 冰箱:−80 °C、−20 °C、2°C~4 °C。
- 12.4 PCR 扩增仪:温度范围 4 °C~99 °C,控温精度±0.25 °C。
- 12.5 电泳仪:输出电压 5 V~600 V,输出电流 2 mA~200 mA。
- 12.6 凝胶成像系统:包括 302 nm 紫外透照仪、顶置白光光源、白光转换板、UV 干涉滤光片、机载头像捕捉软件、图像分析软件。

### 13 试剂与耗材

除非另有规定外,在分析中仅使用分析纯试剂,实验用水符合 GB/T 6682 的二级水指标,其中涉及 PCR 的用水要求达到一级水指标。

- 13.1 CTAB 裂解液:取 2 g CTAB、8.18 g NaCl、0.74 g 乙二胺四乙酸二钠二水合物 EDTA·Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O,加入 10 mL 1 mol/L 的 Tris-HCl (pH=8.0)、0.2 mL 巯基乙醇,加水定容到 100 mL。高温高压灭菌后,室温保存。
- 13.2 石英砂。
- 13.3 乙酸钠:3 mol/L (pH=5.2)。称量 40.8 g 三水合乙酸钠 CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O 置于 100 mL~200 mL 烧杯中加入约 80 mL 的去离子水搅拌溶解。加入冰醋酸调节 pH 至 5.2,加去离子水将溶液定容至 100 mL。高温高压灭菌后,室温保存。
- 13.4 dNTPs:dATP、dTTP、dGTP、dCTP。
- 13.5 10×PCR 缓冲液。
- 13.6 *Taq* 酶。
- 13.7 琼脂糖。
- 13.8 核酸染料(凝胶绿)。
- 13.9 DL2000 DNA 分子量标准。
- 13.10 氯化镁:25 mmol/L。
- 13.11 酚-三氯甲烷-异戊醇混合液(25:24:1)。
- 13.12 三氯甲烷-异戊醇混合液(24:1)。
- 13.13 10 mg/mL RNA 酶。
- 13.14 基因组 DNA 提取试剂盒。
- 13.15 检测引物:
  - 841-2F:5'-GCTTCTCCCGAGTCCCAAAA-3'。
  - 841-2R:5'-ATTGTTGGACCGGTTAGCGT-3'。
 扩增片段大小:175 bp。
- 13.16 离心管:1.5 mL、2 mL。
- 13.17 PCR 反应管。

## 14 检测

### 14.1 样品收集

按照 6 的方法获取样品提取液,5 000 r/min 的离心机中离心 10 min 收集沉淀。

### 14.2 样品 DNA 提取

#### 14.2.1 CTAB 法提取

细胞破壁:取 0.1 g 沉淀加入 2 mL 离心管中,加 500  $\mu$ L CTAB 裂解液,加入石英砂 100 mg,采用高通量组织研磨仪(设置频率 65 Hz)研磨 5 min。

细胞破膜:将破壁的 CTAB 裂解液涡旋振荡充分混匀,置于 65  $^{\circ}$ C 水浴 30 min。

去蛋白质:加入等体积酚-三氯甲烷-异戊醇混合液后剧烈振荡 1 min,4  $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 10 min。收集上清液并转移至 2 mL 无菌塑料离心管,加入等体积三氯甲烷-异戊醇混合液混合均匀后,4  $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 10 min。

DNA 沉淀:取上清液转移至 2 mL 无菌塑料离心管,加入 0.1 体积乙酸钠 3 mol/L(pH=5.2)、2.5 倍体积无水乙醇,颠倒混匀后置于-20  $^{\circ}$ C 冰箱 1 h。4  $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀。

DNA 溶解:用 600  $\mu$ L 的 75%乙醇洗涤后至自然干燥。最后用 200  $\mu$ L 双重蒸馏水溶解,置于-20  $^{\circ}$ C 保存备用。

#### 14.2.2 商品化提取试剂盒

按照基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行操作。

### 14.3 PCR 扩增

采用 25  $\mu$ L 反应体系,其中 DNA 模板 2  $\mu$ L、2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 841-2F 1  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 841-2R 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu$ L。PCR 扩增条件为 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95  $^{\circ}$ C 变性 1 min,60  $^{\circ}$ C 退火 1 min,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。检测过程中分别设空白对照、阴性对照、阳性对照。空白对照设为以水代替 DNA 模板;阴性对照采用非目标菌的 DNA 作为 PCR 反应模板;阳性对照采用腐皮镰刀菌 DNA 作为 PCR 反应的模板。

### 14.4 琼脂糖凝胶电泳检测

PCR 产物使用 1.5%~2%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。吸取 10  $\mu$ L PCR 扩增产物加入样品孔中,用 DNA Marker 做分子量标记,进行电泳分析。电泳结束后,在凝胶成像分析仪下观察电泳条带并保存图片。

## 15 结果与判定

根据电泳条带判定 PCR 结果,引物扩增目标条带为 175 bp,阳性对照出现目标条带且阴性对照未出现目标条带情况下,进行如下判定:检测样品有且只有一条 175 bp 条带,判定样品检出腐皮镰刀菌,结果判定见附录 B。无条带或条带大小不正确则表明检测样品为阴性,重复检测 1 次,2 次检测均为阴性时,待测样品判定为阴性。

## 第三章 实时荧光定量 PCR 检测方法

## 16 原理

在常规 PCR 基础上加入相应的荧光染料,随着 PCR 反应的进行,扩增产物不断累积,荧光信号强度不断增加。通过荧光强度变化实时监测 PCR 反应中扩增产物量的变化,最终确定样品中是否存在腐皮镰刀菌。

## 17 仪器与设备

除采用第二章中 12 所用的仪器与设备外,其他主要仪器与设备为实时荧光定量 PCR 仪:温度范围

4℃~99.9℃,控温精度±0.25℃。

## 18 试剂与耗材

除采用第二章中 13 所用的试剂与耗材外,其他主要耗材为实时荧光定量 PCR 反应管。

## 19 检测

### 19.1 样品收集

按照 14.1 的方法收集样品。

### 19.2 样品 DNA 提取

按照 14.2 方法提取样品 DNA。

### 19.3 实时荧光定量 PCR 扩增

实时荧光定量 PCR 采用 20 μL 体系,包含 DNA 模板 1 μL、2×qPCR mix 10 μL、10 μmol/L 841-2F 0.6 μL、10 μmol/L 841-2R 0.6 μL、ddH<sub>2</sub>O 7.8 μL。实时荧光定量 PCR 反应参数为:初始阶段 95℃ 预变性 60 s,95℃ 变性 15 s,60℃ 退火 15 s,72℃ 延伸 30 s,共进行 40 个循环。

### 19.4 标准曲线和熔解曲线

从腐皮镰刀菌 10<sup>5</sup>~10<sup>1</sup> copies/μL 一系列模板特异性克隆的 qPCR 反应荧光曲线可见,在 10<sup>5</sup>~10<sup>1</sup> copies/μL 浓度范围内荧光曲线呈 S 形。以线性范围内 6 个浓度(10<sup>5</sup>~10<sup>1</sup> copies/μL)的特异性克隆为模板在同样条件下进行 qPCR 反应,得到标准曲线和熔解曲线。

### 19.5 反应体系中对照的设定与基线调整

检测过程中要设阳性对照、阴性对照和空白对照。以含有扩增片段的质粒作为阳性对照、非目标菌株 DNA 作为阴性对照,用配制反应体系的超纯水设置空白对照。

基线调整取 6 个~15 个循环的荧光信号,阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照的检测荧光曲线的最高点,也可以超过 3~5 个循环的荧光信号值标准偏差的 10 倍为参考。

## 20 结果与判定

### 20.1 结果

基本原则:在对结果进行最终判定前,应首先检查阴性和阳性对照结果。为保证试验有效,结果应符合以下要求,有一项不符合者,应重新做实时荧光定量 PCR 扩增:

空白对照:无扩增曲线或者 *C<sub>t</sub>* 值大于或等于 40;

阴性对照:无扩增曲线或者 *C<sub>t</sub>* 值大于或等于 40;

阳性对照:出现典型扩增曲线且 *C<sub>t</sub>* 值小于或等于 35。

### 20.2 判定

待测样品至少有 1 个平行样检测结果 28<*C<sub>t</sub>*<30,并且出现典型扩增曲线,同时试验对照结果正常,此时应适当增加 DNA 模板量后重新实时荧光定量 PCR 检测。再次检测结果 *C<sub>t</sub>*<30 并出现典型扩增曲线,同时试验对照结果正常,表示样品中含有腐皮镰刀菌 DNA;再次检测结果 *C<sub>t</sub>*≥30,同时试验对照结果正常,可以判定该样品中无腐皮镰刀菌 DNA。结果判定见附录 C。

附录 A  
(资料性)  
腐皮镰刀菌其他信息

A.1 病原菌形态特征

腐皮镰刀菌在 PDA 培养基上的菌落形态及显微镜下的菌体形态如图 A.1 所示。



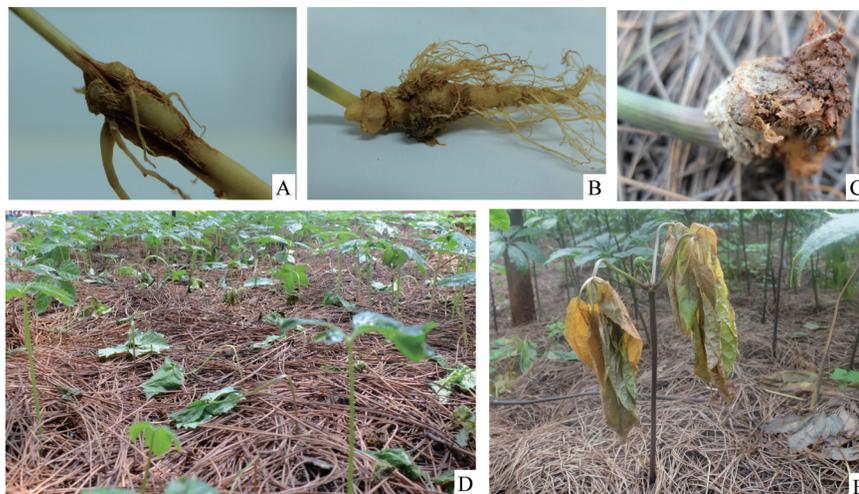
图 A.1 腐皮镰刀菌菌落形态及菌体形态

A.2 寄主范围

世界范围内广泛存在的病原菌,可以在作物种子、病残体及土壤中潜伏,侵染多种植物,主要危害豌豆、葫芦、马铃薯、花生、辣椒、甘薯、蝴蝶兰、甘草、三七等。

A.3 症状特征

三七种子和种苗携带腐皮镰刀菌,导致幼苗根部发病,长出浓密的白色菌丝体,菌丝体周围变成黑褐色,剖开种苗内部观察到维管束变褐色,严重病部内部腐烂成豆腐渣状,呈黄绿色,引起根腐病,植株逐渐腐烂、萎蔫、死亡(图 A.2),严重影响产量和品质。



注:A 为一年生三七种苗发病症状;B 为二年生三七发病症状;C 为三年生三七发病症状;D 为三七苗期发病田间症状;E 为三七花期发病田间症状。

图 A.2 三七种苗感染腐皮镰刀菌症状

附录 B  
(资料性)  
PCR 扩增

PCR 产物电泳结果见图 B.1、图 B.2。

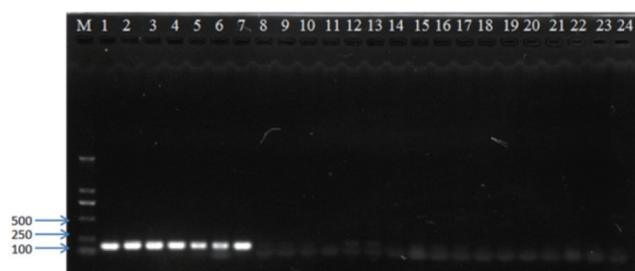


图 B.1 腐皮镰刀菌、非目的菌株的普通 PCR 电泳图

注:M 为 DNA Marker;1-7 为 *F. solani* 菌株;8~24 为非目的菌株。

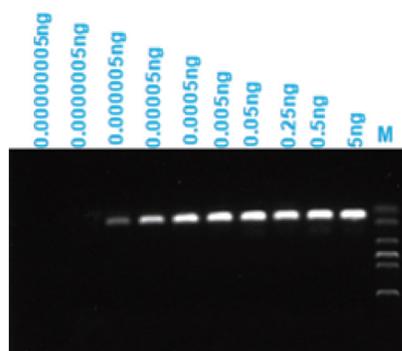


图 B.2 普通 PCR 检测不同浓度腐皮镰刀菌基因组 DNA 的电泳图

附 录 C  
(资料性)  
实时荧光定量 PCR 扩增

C.1 实时荧光定量 PCR 熔解曲线

在实时荧光定量 PCR 检测中,12 个 *F. solani* 菌株的熔解曲线都获得了单一的峰值,  $T_m$  值为 85.5 °C。而空白对照、其他镰刀菌和其他种的真菌都不能获得熔解曲线或出现不同的  $T_m$  值,这表明该引物在实时荧光定量 PCR 中也具有较高的特异性(见图 C.1)。

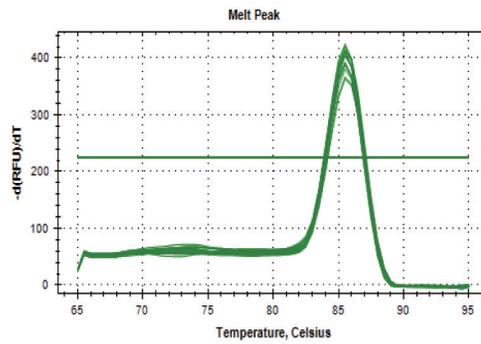


图 C.1 腐皮镰刀菌的实时荧光定量 PCR 熔解曲线

C.2 标准曲线的建立

实时荧光定量 PCR 的标准曲线是利用 DNA 浓度的对数值对应相应的  $C_q$  值构建的。将腐皮镰刀菌基因组 DNA 浓度的对数值作为横坐标,以其相对应的  $C_q$  值作为纵坐标作图,即可获得一条基于  $C_q$  值和 DNA 浓度的回归曲线,两者呈现线性关系(图 C.2),其线性回归方程为  $Y = -3.361X + 41.971$  其中  $Y$  表示  $C_q$  值,  $X$  表示 DNA 浓度的对数值,其相对应的相关系数( $R^2$ )为 0.992,扩增效率  $E$  值为 98.4%。根据实时荧光定量 PCR 获得的  $C_q$  值,通过回归方程可以计算样品中目标 DNA 的浓度,再根据公式计算可以得到相应的拷贝数。

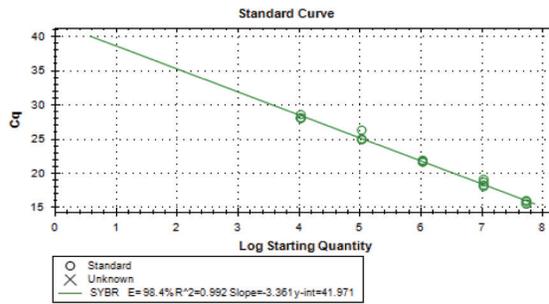


图 C.2 腐皮镰刀菌的实时荧光定量 PCR 标准曲线