



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105368977 B

(45)授权公告日 2019.05.10

(21)申请号 201510967853.7

C12Q 1/04(2006.01)

(22)申请日 2015.12.21

C12N 15/11(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105368977 A

(43)申请公布日 2016.03.02

(73)专利权人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(56)对比文件

CN 103589660 A,2014.02.19,

CN 101050436 A,2007.10.10,

CN 102732443 A,2012.10.17,

CN 101177667 A,2008.05.14,

审查员 宋梦

(72)发明人 赵玲玲 刁英 胡小虎 胡中立

(74)专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 常海涛

(51)Int.Cl.

C12Q 1/689(2018.01)

C12Q 1/686(2018.01)

权利要求书1页 说明书2页

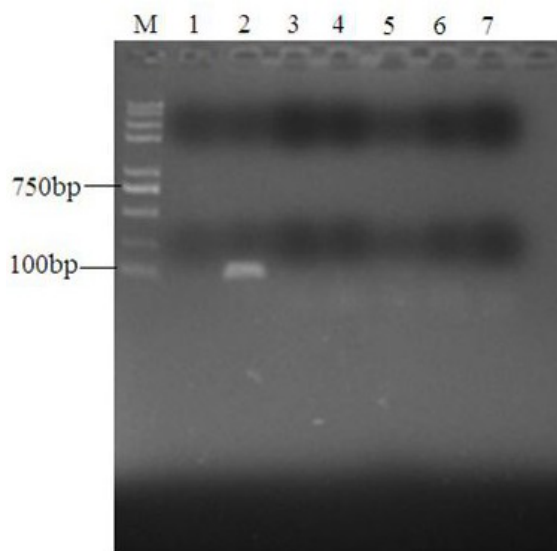
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种芒草白斑病的分子检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种芒草白斑病的分子检测方法,属于植物病虫害检疫领域。本发明的分子检测方法为PCR法,所用引物为:上游引物:CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG,下游引物:TTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCA。通过提取待检植株的基因组DNA进行PCR反应,PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,根据是否扩增到目的片段来判定测试样品是否为白斑病患病植株。本发明利用PCR高效扩增技术的特异性强及方便快捷的特点,为芒草白斑病致病菌的检测、防治提供了有效手段。



1. 一种芒草白斑病的分子检测方法,其特征在于:所述的分子检测方法为PCR法,所用引物序列如下:

上游引物:CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG,

下游引物:TTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCA。

2. 根据权利要求1所述的芒草白斑病的分子检测方法,其特征在于:包括如下步骤:

(1) 设计一对检测芒草白斑病的特异性引物,序列如下:

上游引物:CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG,

下游引物:TTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCA;

(2) 提取芒草基因组DNA作为PCR的模板;

(3) 配制50 μ L PCR反应体系:2U/ μ L DNA聚合酶2 μ L,10 $\times$ DNA聚合酶Buffer 5 μ L,20mM MgCl₂ 4 μ L,10mM dNTPs 3 μ L,20 μ M上下游引物各2 μ L,10ng/ μ L DNA模板2 μ L,ddH₂O 30 μ L;

(4) 按如下程序进行PCR反应:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,65 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 10s,30个循环;72 $^{\circ}$ C 5min;

(5) PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,若凝胶电泳结果有100bp条带,表明测试样品为白斑病患病植株,判为阳性;若凝胶电泳结果无100bp条带,表明测试样品为健康植株,判为阴性。

3. 权利要求1中所用引物在检测芒草白斑病中的应用。

一种芒草白斑病的分子检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于植物病虫害检疫领域,具体涉及一种芒草白斑病的分子检测方法。

背景技术

[0002] 芒草(*Miscanthus*)是禾本科、C4多年生草本植物,由于芒草具有高光和效率、低CO₂排放、富含纤维质等优良特质,被认为是最具潜在价值的生物能源植物。近年来,随着芒草在生物质能源方面的逐步应用,使大规模生产成为现实。但因其常年无性繁殖,使一些疾病积累,产量和品质无法得到保证。白斑病是禾本科植物中的常见疾病,在其它禾本科植物中玉米、水稻和高粱均有白斑病的相关报道,白斑病导致作物减产,危害巨大。因此,提早发现致病菌病原并提前预防能够减少损失。

发明内容

[0003] 本发明发现了泛生菌属(*Pantoea*)可以感染芒草使芒草患白斑病,本发明的目的在于提供一种芒草白斑病的分子检测方法。该方法操作简便、快速、准确,为芒草白斑病的防治、检测提供有效手段。

[0004] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0005] 一种芒草白斑病的分子检测方法,该方法利用聚合酶链式反应(PCR)对芒草中白斑病进行快速检测,所用引物序列如下:

[0006] 上游引物:CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG,

[0007] 下游引物:TTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCA。

[0008] 优选的,所述的芒草白斑病的分子检测方法包括如下步骤:

[0009] (1)设计一对检测芒草白斑病的特异性引物,序列如下:

[0010] 上游引物:CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG,

[0011] 下游引物:TTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCA。

[0012] (2)提取芒草基因组DNA作为PCR的模板。

[0013] (3)配制50μL PCR反应体系:DNA聚合酶(2U/μL)2μL,10×DNA聚合酶Buffer 5μL,20mM MgCl₂ 4μL,10mM dNTPs 3μL,上下游引物各(20μM)2μL,DNA模板(10ng/μL)2μL,ddH₂O 30μL。

[0014] (4)按如下程序进行PCR反应:94℃ 5min;94℃ 30s,65℃ 30s,72℃ 10s,30个循环;72℃ 5min。

[0015] (5)PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,若凝胶电泳结果有100bp电泳条带,表明测试样品为白斑病患植株,判为阳性;若凝胶电泳结果无100bp的电泳条带,表明测试样品为健康植株,判为阴性。

[0016] 一对检测芒草白斑病的特异性引物,序列如下:

[0017] 上游引物:CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG,

[0018] 下游引物:TTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCA。

[0019] 本发明利用PCR高效扩增技术的特异性强及方便快捷的特点,为芒草白斑病致病菌的检测、防治提供了有效手段。本发明具有以下优点和效果:

[0020] (1)首次发明芒草白斑病的快速检测方法。

[0021] (2)检测方法简便、灵敏、引物针对性和特异性高而且成本低。

附图说明

[0022] 图1是不同样品PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图,M为DNA Marker,泳道1-7的DNA模板分别为健康芒草、致病菌感染的芒草、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、土壤芽孢杆菌、乳酸菌、假单胞菌的基因组DNA。

具体实施方式

[0023] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均在常规生化试剂商店购买。

[0024] 实施例1

[0025] 选取健康芒草植株、泛生菌属感染的芒草植株作为检测样品,并以枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、土壤芽孢杆菌、乳酸菌、假单胞菌等基因组DNA作为对照。

[0026] (1)针对芒草白斑病致病菌泛生菌属的16SrDNA中间部分核心核酸序列的特殊位点设计引物,序列如下:

[0027] 上游引物:CGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGG,

[0028] 下游引物:TTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCA。

[0029] (2)取芒草叶片,采用植物DNA提取试剂盒提取芒草的基因组DNA。

[0030] (3)采用鼎国生物技术有限公司的PCR试剂配制50 μ L PCR反应体系:DNA聚合酶(2U/ μ L) 2 μ L,10 $\times$ DNA聚合酶Buffer 5 μ L,20mM MgCl₂ 4 μ L,10mM dNTPs 3 μ L,上下游引物各(20 μ M) 2 μ L,DNA模板(10ng/ μ L) 2 μ L,ddH₂O 30 μ L。

[0031] (4)按如下程序进行PCR反应:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,65 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 10s,30个循环;72 $^{\circ}$ C 5min。

[0032] (5)PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果见图1。图1中,M为DNA Marker,泳道1-7的DNA模板分别为健康芒草、致病菌感染的芒草、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、土壤芽孢杆菌、乳酸菌、假单胞菌的基因组DNA。从图中可以看出,只有致病菌感染的芒草扩增出100bp左右的条带(泳道2),检测结果为阳性,健康芒草及其它菌株的检测结果为阴性。由此可见,本发明的引物针对性和特异性极高,能够快速、精准的检测出染病植株。

[0033] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 武汉大学

<120> 一种芒草白斑病的分子检测方法

<130> 1

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 上游引物

<400> 1

cgcggtgtatg aagaaggcct tcgg

24

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 下游引物

<400> 2

ttctttctgcg ggtaacgtca atca

24

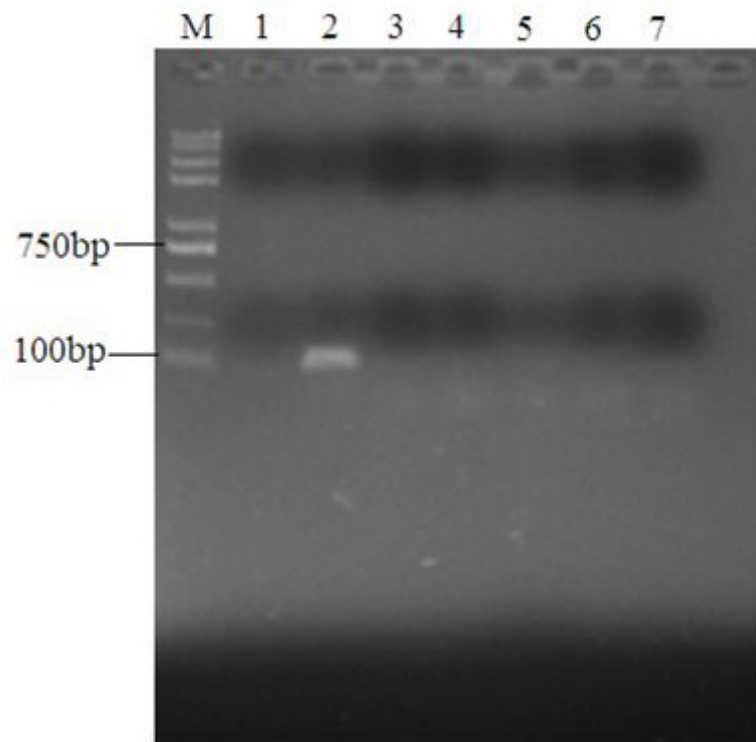


图1