

### 马铃薯黑痣病菌 PCR 检测方法

Detection of pathogenic fungus for potato black scurf by PCR method

地方标准信息服务平台

2023-04-26 发布

2023-05-26 实施



## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件 .....	1
3 术语和定义 .....	1
4 原理 .....	1
5 试剂与仪器 .....	1
5.1 试剂 .....	1
5.2 溶液配制 .....	2
5.3 仪器 .....	2
6 操作步骤 .....	2
6.1 对照的设立 .....	2
6.2 样品制备 .....	2
6.3 马铃薯组织样品 DNA 提取 .....	2
6.4 PCR 扩增 .....	2
7 琼脂糖凝胶电泳 .....	3
8 结果 .....	3
8.1 试验成立的条件 .....	3
8.2 结果判定 .....	3

地方标准信息服务平台

## 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。

本文件由内蒙古自治区农牧厅提出。

本文件由内蒙古自治区马铃薯标准化技术委员会（SAM/TC 40）归口。

本文件起草单位：内蒙古自治区产品质量检验研究院、内蒙古中加农业生物科技有限公司、乌兰察布市检验检测中心、内蒙古朱日和镇综合保障和技术推广中心。

本文件主要起草人：刘广晶、刘晓权、张之为、高晓娟、包美丽、赵莉、高俊、吕文霞、孙翠翠、王斌、齐桂敏、任玮、孙辉远、侯晓云、赵欣、姜涛、常青、李建青、王勐、徐晓、张利萍、李艺凡、姚婷、梁敏。

地方标准信息服务平台

# 马铃薯黑痣病菌 PCR 检测方法

## 1 范围

本文件规定了马铃薯黑痣病菌PCR检测方法。

本文件适用于马铃薯植株茎秆、块茎等组织中黑痣病菌的检测。

## 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

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**马铃薯黑痣病** potato black scurf disease

由丝核菌属立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* Kühn) 引起，可通过病薯上或留在土壤中的菌核越冬，带病种薯是远距离传播的主要载体。马铃薯生长期病菌从土壤中根系或茎基部伤口侵入，引起发病。主要危害马铃薯幼芽、茎基部及块茎，会造成马铃薯缺苗断垄，发病严重时将导致植株死亡。该病菌既可侵染马铃薯植株地上茎基部又可侵染地下块茎。在地上茎基部可形成白色霉层，而在地下块茎上则可形成大小数量不等的黑色菌核，严重影响马铃薯块茎品质和商品价值。

## 4 原理

本文件采用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 方法检测马铃薯黑痣病菌。其原理是：以马铃薯黑痣病菌ITS序列区设计特异性引物，以基因组 DNA 为模板，在Taq DNA聚合酶的作用下进行PCR扩增，根据PCR扩增结果判断该样品中是否含有目的片段，从而达到鉴定马铃薯黑痣病菌的目的。

## 5 试剂与仪器

### 5.1 试剂

5.1.1 以下所有试剂，除另有规定外，均使用分析纯试剂；水为符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

5.1.2 植物基因组提取试剂盒、50×TAE 电泳缓冲液、2×Taq PCR Master Mix、无水乙醇、溴化乙锭、DNA Marker、6×DNA Loading Buffer 等均从试剂公司购买。

## 5.2 溶液配制

### 5.2.1 溴化乙锭溶液（10 mg/mL）

称取溴化乙锭100 mg，加水溶解，定容至10 mL。

### 5.2.2 1×TAE 电泳缓冲液

量取50×TAE电泳缓冲液20 mL，加水定容至1 L。

### 5.2.3 1.5%琼脂糖凝胶

称取1.5 g琼脂糖，加入100 mL的1×TAE电泳缓冲液，微波炉加热至琼脂糖融化，待溶液冷却至50 ℃左右时，加入5 μL溴化乙锭溶液，摇匀，倒入制胶板中均匀铺板，凝固后取下梳子，备用。

## 5.3 仪器

PCR仪、台式高速离心机（离心力1180 g~12470 g）、电泳仪、水平电泳槽、凝胶成像仪、水浴锅、移液器，高压蒸汽灭菌锅、4 ℃冰箱、普通天平（感量0.01 g）。

## 6 操作步骤

### 6.1 对照的设置

检测体系以马铃薯黑痣病菌的DNA作为阳性对照，以不添加DNA模板的反应体系作为阴性对照。

### 6.2 样品制备

一块地取发病马铃薯茎秆或块茎组织，将样品保存于4 ℃冰箱中，DNA提取时取马铃薯茎秆或块茎组织0.1 g，样品需用现取。

### 6.3 马铃薯组织样品 DNA 提取

将样品置于灭过菌的研钵中，加液氮研磨成粉末，转至1.5 mL离心管，利用植物基因组DNA提取试剂盒提取。

### 6.4 PCR 扩增

#### 6.4.1 PCR 扩增引物

以核糖体5.8S rDNA和28S rDNA基因的间隔序列ITS: (Intergenic Transcribed Spacer) 设计引物，引物序列如下：

上游引物：5' -TTGTTGTAGCTGGTCTATTT-3'。

下游引物：5' -TATCACGCTGAGTGGAACCA-3'。

扩增片段大小为500 bp。

用水将上、下游引物分别配制成工作浓度为10 ng/μL的溶液。

#### 6.4.2 PCR 反应体系

马铃薯黑痣病菌PCR扩增反应体系如表1所示，按照以下顺序加入相应试剂到PCR管中，混匀并离心10 s，使混合液都沉降到PCR管底。详见表1。

表1 PCR 扩增反应体系

PCR反应物	加入PCR反应体系的体积 uL
ddH <sub>2</sub> O	17.25 (2倍Mix)
2×Taq PCR Master Mix	4.75
上游引物 (10 ng/uL)	1.00
下游引物 (10 ng/uL)	1.00
模板 DNA	1.00
总体积	25.00

### 6.4.3 PCR 反应程序

第1步：94 °C，90 s。

第2步：95 °C，35 s；55 °C，30 s；72 °C，60 s；35个循环。

第3步：72 °C，5 min。

PCR产物置于4 °C冰箱保存备用。

## 7 琼脂糖凝胶电泳

使用1.5%的琼脂糖凝胶，取5 μL PCR扩增产物，加到1 μL 6×DNA Loading Buffer中混匀、上样，用DNA Marker作为分子量标记，进行凝胶电泳。电泳结束后在凝胶成像仪的紫外透射光下观察，凝胶上是否出现预期大小的特异性DNA条带，并拍照记录。

## 8 结果

### 8.1 试验成立的条件

阳性对照检测到预期大小的特异性扩增条带，阴性对照没有条带，表明试验有效。

### 8.2 结果判定

若待检样品在500 bp对应位置出现特异性条带，则判定样品为阳性；若待检样品没有出现条带，则判定为阴性。