



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2729—2010

马铃薯炭疽病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of
Colletotrichum coccodes (Wallr.) Hughes

2010-11-01 发布

2011-05-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国山东出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：刘伟、刘会梅、封立平、王秀芬、姜丽、王有福、董薇。

马铃薯炭疽病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进境马铃薯块茎以及携带土壤中马铃薯炭疽病菌的检疫和鉴定方法。

本标准适用于马铃薯块茎以及携带土壤中马铃薯炭疽病菌的检疫和鉴定。

2 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

2.1

块茎 tuber

地下茎末端肥大成块状,适应储藏和越冬的变态茎。

2.2

分生孢子盘 acervulus

由基质表面突起的盘状菌丝块结构,其上生出密集的短分生孢子梗,分生孢子梗之间常生有刚毛。

2.3

刚毛 setae

一种较坚硬的毛状物,常壁厚,且颜色较暗。

2.4

菌核 sclerotium

菌核是由菌丝紧密交织而成的休眠体,内层是疏丝组织,外层是拟薄壁组织,表皮细胞壁厚、色深、较坚硬。菌核的功能主要是抵抗不良环境。但当条件适宜时,菌核能萌发产生新的营养菌丝或从上面形成新的繁殖体。

2.5

附着孢 appressorium

植物病原真菌孢子萌发形成的芽管或菌丝顶端的膨大部分,可以牢固地附着在寄主体表面,其下方产生侵入钉穿透寄主角质层和表层细胞壁。

3 原理

3.1 马铃薯炭疽病菌的分类地位

马铃薯炭疽病菌 *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hughes 的中文名称为“墨色刺盘孢”。*Colletotrichum* 为子囊菌、小丛赤壳属 (*Glomerella*) 的无性型。根据《Dictionary of Fungi》第 9 版, *Colletotrichum* 分类地位为真菌界,有丝分裂孢真菌 Mitosporic fungi。

3.2 检疫和鉴定原理

马铃薯块茎被马铃薯炭疽病菌侵染后出现圆形的病斑,在马铃薯块茎、匍匐茎、根、地上及地下茎变色的部位都能形成大量黑色的小菌核。本标准以该病菌在马铃薯块茎上的主要危害症状、形态学特征以及 PCR 反应特性为鉴定马铃薯炭疽病菌的主要依据。马铃薯炭疽病菌的形态特征及背景资料参见

附录 A。

4 仪器设备和用具

4.1 仪器设备

超净工作台、高压灭菌锅、光照培养箱、体式显微镜、生物显微镜、冰箱、PCR 仪、凝胶电泳仪、台式冷冻离心机、台式小型离心机、Mini 离心机、水浴培养箱、制冰机、旋涡振荡器、电泳仪、恒温水浴锅、紫外反射透射仪、低温冰箱(—80℃)、凝胶成像系统、研磨珠均质器、空层析柱、天平(感量 0.001 g)。

4.2 用具

白瓷盘和尖头镊子、可调微量加样器、液氮罐、PCR 反应管、研钵、玻璃珠、螺帽管、培养皿、离心管、酒精灯、三角瓶(50 mL, 100 mL)、量筒(500 mL)、载玻片(25.3 mm×76.2 mm)、盖玻片(18 mm×18 mm)、手术刀、手术剪、镊子、pH 计、塑料袋、离心管等。

5 试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂,次氯酸钠、吐温-20(Tween-20)、三氨基甲烷、EDTA、酚、异戊醇、氯化钾、4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP)、溴化乙锭(EB)、RNase 酶、蛋白酶 K、BSA、PVPP、PVP、异丙醇、三氯甲烷、饱和酚、巯基乙醇、山梨糖、溴酚蓝、硫酸氨、CTAB、Biolase Diamond、SDS、葡萄糖凝胶 Sephadex G-75、多聚半乳糖醛酸 PGA、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、山梨糖。抗菌剂:五氯硝基苯 PCNB、苯菌灵、硫酸链霉素、四环素盐酸、氯霉素、红霉素、硫酸新霉素、扑海因、氯苯密醇、乙烯菌核利。

1×TBE 缓冲液、上样缓冲液、TE 缓冲液、菌丝体 DNA 提取缓冲液、均质缓冲液、土壤和块茎 DNA 提取缓冲液 SPCB、1×PCR 反应缓冲液。

6 现场检疫

6.1 抽样

6.1.1 抽样方法

以批为抽样单位,无批号的以品种为抽样单位。每份样品的抽样点不少于 5 个,随机抽取。单位包装只能有一个抽样点。

6.1.2 抽样数量

500 粒以下取一份;501 粒~2 000 粒取两份;2 001 粒~5 000 粒取三份;5 001 粒~10 000 粒取四份;10 001 粒以上,每增加 10 000 粒增取一份,不足 10 000 粒的余量,计取一份。

每份样品 20 粒块茎。

6.2 查验

按进口马铃薯块茎总件数的 5%~20%随机抽检,最低抽检数量不少于 10 件,且不少于 1 000 粒。

根据马铃薯炭疽病在马铃薯块茎上的特有症状特点进行视觉检验(必要时使用放大镜观察),在光线充足处进行。将有典型病症以及有怀疑症状的块茎用塑料袋装好,加贴标识后送实验室进行进一步的分离和病原鉴定,并做好现场检疫记录。

6.3 土壤样品的收集

如果发现马铃薯块茎表面携带土壤,则用毛刷轻轻刷下粘在块茎表面以及芽眼上的土壤;如果携带土壤较少,则用水洗并收集土壤;注意收集散落在包装内外的土壤。收集的土壤用塑料袋装好并加贴标识带回实验室检测。

7 实验室检验

7.1 土壤中病原菌分离

收集到的土壤随机取 10 g 置于 100 mL 灭菌水中充分振荡,微量移液器取 0.5 mL 后玻棒均匀涂布在半选择性培养基或选择性培养基上(见附录 B),18℃~24℃培养 14 d 后在体视显微镜下观察。发现菌落后,将菌落的边缘或产生的分生孢子转移到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(见附录 B)上继续培养,产孢后进行形态鉴定。

7.2 块茎上病菌分离

7.2.1 将现场抽取的马铃薯块茎样品混匀,从中随机抽取 100 个块茎进行检验。逐个检查块茎表面是否有典型的病斑或带有黑色的小菌核,按 7.2.2、7.2.3 及 7.4 进行分离鉴定。

7.2.2 块茎表面病斑的分离:将表面产生典型病斑以及有怀疑症状的块茎,在流水下冲洗去除表面的杂物后,切下病健交界处的小块组织(3 mm 厚,直径 1 cm),表面用 1% 的次氯酸钠消毒 3 min~5 min,无菌水冲洗 2 次~3 次,置于 PDA 培养基上,21℃~25℃下分离培养,10 d~14 d 后体视显微镜下观察。出现菌落后,将菌落的边缘或分生孢子转移到 PDA 上继续纯化培养,产孢后进行形态鉴定或利用菌丝体直接进行 PCR 检测(见附录 C.1)。

7.2.3 块茎表面菌核的分离:对表面发现黑色小菌核的块茎,将表面用 1% 的次氯酸钠消毒 10 min,无菌水冲洗 2 次~3 次,取下小菌核置于 PDA 培养基上,黑暗中 27℃下培养 7 d 促进产孢。

7.3 培养物菌丝体的 PCR 检测

见附录 C.1。

7.4 块茎以及土壤中病原菌的巢式 PCR 检测

见附录 C.2。

8 鉴定特征

8.1 马铃薯块茎上的特征

马铃薯块茎上形成银色至褐色的病斑,边缘界限不明显,上面常具球形或不规则的黑色菌核,菌核直径约 100 μm~0.5 mm。分生孢子盘黑褐色,圆形或长形,直径 200 μm~350 μm。刚毛聚生在分生孢子盘中央或散生于孢子盘中,刚毛黑褐色,顶端较尖,1 隔~3 隔,(80 μm~350 μm)×(4 μm~6 μm)。分生孢子梗圆筒形,偶有隔膜,无色至淡褐色,直;分生孢子圆柱形,下尖上圆,单胞,无色,直,有时稍弯,(17.5 μm~22 μm)×(3.0 μm~7.5 μm)。

8.2 培养特征

马铃薯炭疽病菌在 PDA 培养基上,菌落平展,白色,背面深褐色。菌落中常密布黑色的小菌核,菌核

球形,直径 $100\ \mu\text{m}\sim 500\ \mu\text{m}$,菌核呈同心环状排列,菌核上产生分生孢子盘,分生孢子盘上产生大量的分生孢子和刚毛。刚毛变化很大,长 $80\ \mu\text{m}\sim 350\ \mu\text{m}$,具分隔,顶部很尖。分生孢子自由生长或呈木栅栏状,分生孢子半透明,圆柱形或一端变细的棍棒形, $(17.5\ \mu\text{m}\sim 22\ \mu\text{m})\times(3.0\ \mu\text{m}\sim 7.5\ \mu\text{m})$,含 1 个~3 个油球。常见附着孢,长棍棒状,有时形状不规则,边缘锯齿状,中度褐色, $(11\ \mu\text{m}\sim 16.5\ \mu\text{m})\times(6\ \mu\text{m}\sim 9\ \mu\text{m})$,有时会形成复杂的结构。

8.3 PCR 检测

马铃薯炭疽病菌经菌丝体的 PCR 检测,应在 349 bp 处有特异性条带(见附录 C.1);经块茎和土壤中病原菌巢式 PCR 检测,在 349 bp 处有特异性条带(见附录 C.2)。

9 结果判定

9.1 病菌在马铃薯块茎上引起 8.1 特征,并经培养鉴定符合 8.2 的培养特征,可以判定为马铃薯炭疽病菌。

9.2 利用 7.2.2 培养所获得的菌丝体经 PCR 检测,在 349 bp 处有特异性条带,阴性对照无条带产生,阳性对照亦产生 349 bp 条带的,可判定该病菌为马铃薯炭疽病菌。

9.3 块茎、土壤中病原菌经巢式 PCR 检测后,在 349 bp 处有特异性条带,阴性对照无条带产生,阳性对照亦产生 349 bp 条带的,可判定该病菌为马铃薯炭疽病菌。

10 标本和样品保存

分离并鉴定为马铃薯炭疽病菌的菌株要转移到斜面上,连同被马铃薯炭疽病菌侵染的块茎及土壤样品于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中保存至少 6 个月,以备复检、谈判和仲裁,保存期满后应进行灭活处理。

11 复核

由国家质量监督检验检疫总局指定单位和人员对检测结果进行复核,主要考核实验记录、照片等资料的完整性和真实性,必要时进行复核实验。

附录 A

(资料性附录)

马铃薯炭疽病菌的形态特征及背景资料

A.1 马铃薯炭疽病菌的形态特征

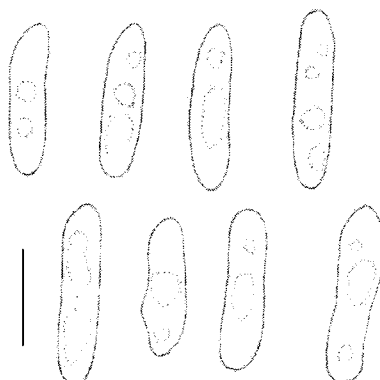


图 A.1 马铃薯炭疽病菌的分生孢子(bar = 10 μm) [仿 B. C. Sutton(1980)]

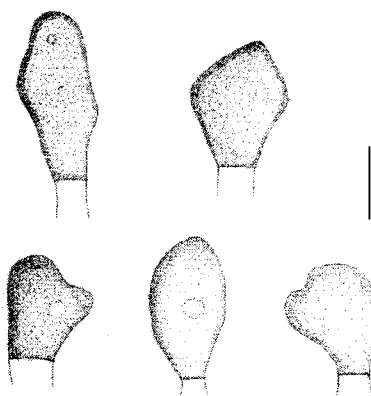


图 A.2 马铃薯炭疽病菌的附着孢(bar = 10 μm) [仿 B. C. Sutton(1980)]

A.2 马铃薯炭疽病菌背景资料

A.2.1 马铃薯炭疽病菌分布

非洲：埃塞俄比亚、肯尼亚、摩洛哥、尼日利亚、津巴布韦、南非、苏丹、坦桑尼亚、乌干达。

亚洲：阿富汗、缅甸、中国(吉林和山东)、印度、印度尼西亚、伊朗、以色列、约旦、日本、朝鲜、黎巴嫩、马来西亚、巴基斯坦、叙利亚、土耳其、高加索(前苏联)。

大洋洲和太平洋岛屿：澳大利亚、新西兰。

欧洲：奥地利、比利时、英国、北爱尔兰、保加利亚、塞浦路斯、捷克斯洛伐克、丹麦、法国、德国、希腊、匈牙利、爱尔兰、意大利、荷兰、波兰、葡萄牙、罗马尼亚、西班牙、瑞士。

北美洲：百慕大、加拿大、美国。

南非：巴西、秘鲁、委内瑞拉。

中美洲和西印度群岛：巴巴多斯岛、牙买加。

A.2.2 寄主

马铃薯炭疽病菌的寄主较广，目前已有报道的涉及 13 个科的 36 种，主要有：马铃薯、西红柿、洋葱、草莓、红辣椒、南瓜、茄子、冬樱桃、胡椒、甘蓝、水芹、莴苣、菊花、白芥菜、灯笼果、珊瑚豆、曼陀罗等。

附录 B
(规范性附录)
培养基配方

B.1 基础培养基

B.1.1 PDA 培养基(或选用市售 PDA 培养基)

马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

将马铃薯去皮, 洗净, 称取 200 g, 切成小块, 放入 1 000 mL 水中煮沸 20 min, 用双层纱布过滤, 得到马铃薯汁, 补足水分, 再加入 20 g 葡萄糖和琼脂不断搅拌至琼脂完全溶化, 补充水量至 1 000 mL, 再加热至沸腾, 灭菌后使用。

B.1.2 PD 培养基

马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

将马铃薯去皮, 洗净, 称取 200 g, 切成小块, 放入 1 000 mL 水中煮沸 20 min, 用双层纱布过滤, 得到马铃薯汁, 补足水分, 再加入 20 g 葡萄糖不断搅拌, 补充水量至 1 000 mL 再加热至沸腾, 灭菌后使用。

B.2 选择性培养基

10 g 多聚半乳糖醛酸, 1.5 g 磷酸二氢钾, 4 g 磷酸氢二钾, 25 mL 土壤浸出液加入 1 000 mL 水中, 加热至沸腾后加入 17 g 琼脂不断搅拌至完全溶化, 灭菌前调节 pH5.0。使用前, 添加以下抗菌剂: 0.1 g 五氯硝基苯(PCNB), 0.1 g 苯菌灵, 0.1 g 硫酸链霉素, 0.1 g 盐酸四环素, 0.1 g 氯霉素, 基础培养基灭菌冷却至 50 ℃左右时加入。

土壤浸出液的制作方法: 500 g 田园土加 500 mL 蒸馏水, 充分搅拌后静置 24 h, 上清液用双层普通滤纸过滤, 有条件的可以用孔径 0.22 μm 的滤膜过滤 2 次除菌, 或直接置于 4 ℃冰箱中保存备用。

B.3 半选择性培养基

10 g PDA 培养基和 15 g 琼脂加在 1 L 蒸馏水中, 121 ℃灭菌 20 min。为了抑制细菌, 当培养基在灭菌冷却至 50 ℃左右时加入: 氯霉素和红霉素各 6.5 μg/mL, 硫酸新霉素 20 μg/mL, 盐酸四环素 25 μg/mL。为了抑制其他属真菌的生长, 通过 0.2 μm 的尼龙膜加入: 扑海因 15 μg/mL, 氯苯密醇 15 μg/mL 和乙烯菌核利 5 μg/mL。

附录 C
(规范性附录)

马铃薯炭疽病菌的 PCR 检测方法

C.1 菌丝体的 PCR 检测

C.1.1 试剂

C.1.1.1 提取缓冲液

7%CTAB,1%PVP,0.1 mol/L Tris-HCl,1.4 mol/L 氯化钠,20 mmol/L EDTA,pH8.0。

C.1.1.2 TE 缓冲液

10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA,pH8.0。

C.1.1.3 1×TBE 缓冲液

89 mmol/L Tris base,89 mmol/L 硼酸,2 mmol/L EDTA,pH8.0。

C.1.1.4 上样缓冲液

0.25%溴酚蓝,40%(质量浓度)蔗糖。

C.1.1.5 均质缓冲液

0.1 mol/L Tris-HCl,1.4 mol/L 氯化钠,20 mmol/L EDTA,pH8.0。

C.1.2 菌丝体 DNA 的提取(改良的 CTAB 法)

菌落在 PDA 培养基上 21℃~25℃培养 7 d 后,从菌落的边缘切下一小块大约 6 mm² 置入 50 mL 的 PD 培养基黑暗中摇床振荡培养 7 d~14 d(100 r/min)。取过滤获得的菌丝体,冷冻保藏;将菌丝体于液氮中研磨成粉末,迅速转入离心管中,加入 2 mL 的均质缓冲液,上下轻轻颠倒数次使之混合均匀,37℃温浴 15 min 解冻,然后加入 1 mL 提取缓冲液、300 μL 20%的 SDS、0.5%巯基乙醇,使之充分混合。65℃下温浴 1 h 后,加入等体积的酚:三氯甲烷:异戊醇 25:24:1,连续抽提 2 次,上清液中加入 RNaseA 酶 100 mg/mL 和蛋白酶 K 10 mg/mL,在 37℃温浴 15 min。最后再用三氯甲烷:异戊醇 24:1 抽提,上清液中加入 0.6 倍体积的异丙醇沉淀,冰上放置 30 min。离心 30 min(1 000g),得到 DNA 后加入 2.5 倍体积 70%冰乙醇和 0.5 倍体积 7.5 mol/L 硫酸氨进一步纯化,23℃下放置 30 min 后再次离心 20 min(1 000g)后,沉淀用 70%的乙醇清洗 2 次,干燥后溶于 100 μL TE 缓冲液中备用。

注:也可使用市售 DNA 提取试剂盒。

C.1.3 PCR 扩增

C.1.3.1 马铃薯炭疽病菌专化引物

Cc1NF1/Cc2NR1: TGCCGCCTGCGGACCCCCCT/GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA(5'-3')

C.1.3.2 PCR 反应

将以下各组分依次加入离心管(0.5 mL)内混合均匀:

- 10×PCR 反应缓冲液；
- dNTPs, 每种 0.2 mmol/L；
- 氯化镁 5.0 mmol/L；
- BSA 250 μg/L；
- Biolase Diamond 1U；
- 引物 0.3 μmol/L；
- 1 μL 未稀释的 DNA(10 ng~100 ng)为模板；
- 加灭菌水至终体积 25 μL。

总体积为 25 μL(或参照 PCR 反应试剂盒提供的条件)。置于 PCR 仪中,进行 PCR 反应。反应条件为:95 ℃变性 2 min,然后在 95 ℃变性 45 s、72 ℃退火 135 s、72 ℃延伸 135 s 条件下循环重复 35 次,最后 72 ℃延伸 5 min。

C. 1.3.3 对照

阳性对照:以马铃薯炭疽病菌菌株的基因组 DNA(10 ng)代替待鉴定菌株的基因组 DNA,其他条件相同。

阴性对照:为 1 μLdH₂O 代替鉴定病原菌的基因组 DNA,其他条件相同。

C. 1.3.4 产物分析

制备 2.0%琼脂糖凝胶,移液器取 10 μL 扩增产物和 2 μL 上样缓冲液混合,点样到凝胶上的样品孔中,用 DNA Marker 作为分子量标记,1 V/cm~5 V/cm 电压下电泳。电泳结束经 EB 染色后在凝胶成像系统观察、照相并记录。

C. 1.4 结果判断

巢式 PCR 后,阴性对照扩增条带产生,而阳性对照能得到 349 bp 的条带,若 PCR 产物在 349 bp 处有特异性条带,表明带有马铃薯炭疽病菌,否则表明无马铃薯炭疽病菌。

C. 2 块茎和土壤中病原菌巢式 PCR 检测

C. 2.1 试剂

块茎和土壤中 DNA 提取缓冲液 SPCB:120 mmol/L 磷酸钠,2%CTAB,1.5 mol/L 氯化钠,pH8.0。

1×PCR 反应缓冲液:16 mmol/L[NH₄]₂SO₄,67 mmol/LTris-HCl,pH8.8,0.1%吐温-20。

C. 2.2 块茎 DNA 的提取

挑选带有明显马铃薯炭疽病菌症状的马铃薯块茎,灭菌水洗去多余的杂质,从块茎的匍匐茎端至端部切片,2 mm 厚,切片通过滚压机收集汁液于 30 mL 的包含抗氧化剂的管中,滚压机用 1 mol/L 的氢氧化钠和 70%乙醇清洗,然后灭菌水清洗,以避免混合污染。提取液在-80 ℃冷藏。0.5 mL 的汁液转移至 2 mL 的螺帽管中。研磨珠均质器内,5 000 r/min,60 s 搅匀。然后将样品离心 5 min(2 460g),上清液采用等体积的三氯甲烷抽提,再离心 5 min(11 550g)。上清液采用 0.3 mol/L 的乙酸钠和等体积的异丙醇在室温下沉淀 1 h,离心 5 min(11 550g),沉淀用 70%的乙醇清洗后,75 μL 的 TE 缓冲液中溶解,必要时保存在-80 ℃冰箱内。利用空层析柱纯化包含高浓度腐殖质的 DNA,程序如下:0.8 mL 葡萄糖凝胶 SephadexG-75 添加到柱上,PVPP 粉添加到柱的顶端。柱经过两次连续的添加 100 μL 的

dH₂O,每次都跟随一次 3 min 的离心(350g)。75 μL 的 DNA 添加到 PVPP 粉的顶端,离心 1 min (350g),然后停留 2 min 允许 DNA 渗透到 Sephadex 孔中,随后两次连续离心 5 min 和 3 min(350g)。纯化的洗出液保存在新的无菌管中。

C.2.3 土壤中病菌 DNA 的提取

10 g 土壤在 20 mL 的提取缓冲液中混合,声波降解 15 min,在装有灭菌玻璃珠的烧瓶内摇动 5 min。1.5 mL 土壤悬浮液转移到 2 mL 的螺帽管中(内有硅石珠或氧化铝珠和玻璃珠),研磨珠均质器内,5 000 r/min,60 s 搅匀。然后将样品离心 5 min(2 460g),上清液用等体积的三氯甲烷抽提,再离心 5 min(11 550g)。上清液用 0.3 mol/L 的乙酸钠和等体积的异丙醇在室温下沉淀 1 h,离心 5 min (11 550g),沉淀用 70% 的乙醇清洗后,在 75 μL 的 TE 缓冲液中溶解,必要时保存在 -80 °C 冰箱内。利用空层析柱纯化包含高浓度腐殖质的 DNA,程序如下:0.8 mL 葡萄糖凝胶 SephadexG-75 添加到柱上,PVPP 粉添加到柱的顶端。柱经过两次连续的添加 100 μL dH₂O,每次都跟随一次 3 min 的离心 (350g)。75 μL DNA 添加到 PVPP 粉的顶端,离心 1 min(350g)然后停留 2 min 允许 DNA 渗透到 Sephadex 孔中,随后两次连续离心 5 min 和 3 min(350g)。纯化的洗出液保存在新的无菌管中。

C.2.4 PCR 扩增

C.2.4.1 引物

第一对引物 Cc1F1/Cc2R1(属的专化性引物):

ACCTAACTGTTGCTTCGGCC/AAATTTGGGGGTTTTACGGC(5'-3')

第二对引物 Cc1NF1/Cc2NR1(种的专化性引物):

TGCCGCCTGCGGACCCCCCT/GGCTCCGAGAGGGTCCGCCA(5'-3')

C.2.4.2 反应体系

将以下各组份依次加入离心管(0.5 mL)内混合均匀:

- 10×PCR 反应缓冲液;
- dNTPs,每种 0.2 mmol/L;
- 氯化镁 5.0 mmol/L;
- BSA 250 μg/L;
- Biolase Diamond 2U;
- 引物 0.3 μmol/L;
- 1 μLDNA 为模板;
- 加灭菌水至终体积 25 μL。

置于 PCR 仪中,进行 PCR 反应。第一对引物 PCR 扩增:95 °C 变性 2 min,然后在 95 °C 变性 45 s、61 °C 退火 1 min、72 °C 延长 90 s 条件下循环 35 次,最后 72 °C 延伸 5 min。

取 1 μL 第一轮 PCR 反应产物,用作第二对引物 PCR 反应的模板,进行第二轮 PCR 反应,反应参数为:95 °C 变性 2 min,然后在 95 °C 变性 45 s、72 °C 退火 135 s、72 °C 延伸 135 s 条件下循环重复 35 次,最后 72 °C 延伸 5 min。

C.2.4.3 对照

阳性对照:以马铃薯炭疽病菌菌株的基因组 DNA(10 ng)代替待鉴定菌株的基因组 DNA,其他条件相同。

阴性对照:为 1 μL dH₂O 代替鉴定病原菌的基因组 DNA,其他条件相同。

C.2.4.4 产物分析

制备 2.0% 琼脂糖凝胶, 移液器取 10 μL 扩增产物和 2 μL 上样缓冲液混合, 点样到凝胶上的样品孔中, 用 DNA Marker 作为分子量标记, 1 V/cm~5 V/cm 电压下电泳。电泳结束经 EB 染色后在凝胶成像系统观察、照相并记录。

C.2.5 结果判断

阴性对照无条带产生, 阳性对照在 349 bp 产生条带, PCR 产物在 349 bp 处有特异性条带, 则带有马铃薯炭疽病菌。若在 349 bp 处无特异性条带, 则表示未感染马铃薯炭疽病菌。
