SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 2126—2008

黑麦草腥黑穗病菌检疫鉴定方法

Identification of *Tilletia walkeri* Castlebury and Carris

2008-09-04 发布　　2009-03-16 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

本标准的附录C和附录D为规范性附录，附录A和附录B为资料性附录。

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：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：易建平、周国梁、黄国明、印丽萍。

本标准系首次发布的出入境检验检疫行业标准。

黑麦草腥黑穗病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了进出境植物检疫中黑麦草腥黑穗病菌(*Tilletia walkeri*)的检测和鉴定方法。

本标准适用于进出境禾本科草种和粮谷类产品中黑麦草腥黑穗病菌的鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 18085—2000 植物检疫 小麦矮化腥黑穗病菌检疫鉴定方法

3 缩略语

下列缩略语适用于本标准。

3.1

PCR Polymerase Chain Reaction

聚合酶链式反应。

3.2

DNA Deoxyribonucleic acid

脱氧核糖核酸。

3.3

dNTP Deoxyribonucleoside triphosphate

脱氧核苷三磷酸。

3.4

bp base pair

碱基对。

3.5

***Taq* 酶**

DNA 聚合酶。

3.6

EB

溴化乙锭。

4 原理

黑麦草腥黑穗病菌(*Tilletia walkeri* Castlebury and Carris)属真菌界(Fungi),担子菌门(Basidiomycota),黑粉菌纲(Ustomycetes),黑粉菌目(Ustilaginales),腥黑粉菌科(Filletiaceae),腥黑粉菌属(*Tilletia*)。被侵染的植株结实时,种子被病菌冬孢子侵占,形成菌瘿。冬孢子形态学特征和 PCR 反应特性是鉴定该种病原菌的依据。地理分布和寄主范围参见附录 A。

5 仪器设备

5.1 多功能显微镜。

5.2 体视显微镜。
5.3 低速离心机。
5.4 往复式振荡器。
5.5 干热灭菌器。
5.6 高压灭菌器。
5.7 PCR 仪。
5.8 凝胶成像系统。
5.9 实时荧光 PCR 仪。
5.10 生物培养箱。
5.11 可调微量加样器(2.5 μL～200 μL)。
5.12 载玻片(长×宽为 25.4 mm×76.2 mm,厚 0.8 mm)。
5.13 盖玻片(18 mm×18 mm)。
5.14 网筛(孔径 100 μm 和 20 μm)。

6 药品试剂

6.1 次氯酸钠溶液或漂白粉精片(化学纯)。
6.2 吐温-20(Tween-20)。
6.3 席尔氏浮载剂(见 GB/T 18085—2000 附录 A)。
6.4 无荧光显微镜物镜镜头浸泡油(Nd=1.516)。
6.5 溴化乙锭(EB)。
6.6 封片剂:指甲油或阿拉伯树胶。
6.7 琼脂糖。
6.8 蛋白酶 K。
6.9 RNA 酶。
6.10 EDTA(0.5 mol/L,pH8.0)。
6.11 TE(pH 8.0)。
6.12 DNA Marker。
6.13 无水乙醇。
6.14 酚。
6.15 三氯甲烷。
6.16 异丙醇。
6.17 异戊醇。
6.18 *Taq* DNA 聚合酶。

7 实验室检验

7.1 样品接收

接收待检样品时,应核对记录,报检号、品名、批号、原产地、样品编号、送样员姓名、接样员姓名和接样日期。

7.2 制备平均样品

在样品预备室内将待检样品在样品袋内充分混匀,制成平均样品,每样 1 kg。

7.3 样品洗涤检验

7.3.1 取样

从平均样品中称取 50 g 作为试验样品。

7.3.2 洗涤离心

试验样品倒入灭菌三角瓶内，加蒸馏水 100 mL，再加吐温-20 1 滴～2 滴，用铝铂纸或 Parafilm 膜封住三角烧瓶瓶口。将三角瓶放在往复式振荡器上振荡 5 min，洗涤液经过孔径 100 μm 和 20 μm 网筛过滤，用灭菌水冲洗孔径 20 μm 网筛上的截留物，洗涤三次后将截留物转移至离心管内，1 000 r/min 离心 5 min，弃上清，取沉淀物。

7.3.3 定容

沉淀物中加入席尔氏浮载剂，定容至 1 mL～3 mL。

7.3.4 镜检

用微量加样器吸取沉淀物悬浮液 15 μL～20 μL 至载玻片上，加盖玻片制片。在 100×显微镜下镜检，检查是否有表面呈疣状突起的腥黑穗病菌冬孢子。每份试验样品的离心沉淀物至少检查 5 张玻片，每片按视野依次全部检查。

7.4 菌瘿检查

镜检发现每个玻片超过 10 个具疣状突起孢壁纹饰的腥黑穗病菌冬孢子，将剩余平均样品倒入白瓷盘内，在充足光线下仔细检查有无菌瘿。受腥黑穗病菌侵染的种子被病菌穗状冬孢子代替而成为菌瘿，菌瘿位于子房内，外被一层不明显致密的寄主种皮，通常是部分受害，感染部分多数局限于种子的内稃一侧，外观症状不明显。冬孢子堆暗褐色(茶褐色，咖啡色)，无明显气味。

7.5 冬孢子形态测量

发现腥黑穗病菌菌瘿，直接挑取少许冬孢子加适量席尔氏液制片，封片剂封片。未发现腥黑穗病菌菌瘿，显微镜或解剖镜下从洗涤液中挑取冬孢子加适量席尔氏液制片，封片剂封片。显微镜下观察冬孢子形态特征并随机测量 30 个冬孢子的直径。每个成熟冬胞子按长短轴方向测量冬孢子直径大小，两者平均值为该冬孢子直径，并计算出 30 个冬孢子的平均直径。

7.6 冬孢子转移和萌发

如发现菌瘿，直接用菌瘿孢子萌发，从菌瘿中取少许冬孢子萌发，加入 100 μL 灭菌水，制成孢子悬浮液，用移液器将水和其中的冬孢子一起转移至 3%水琼脂平板上，22 ℃连续光照条件下培养，培养 3 d 后每天检查有无冬孢子萌发。

如未发现菌瘿，7.3.4 中镜检发现有孢壁纹饰为疣状突起的腥黑穗病菌冬孢子，重新取样按 7.3.1 和 7.3.2 洗涤，用灭菌水悬浮沉淀物，取 50 μL～100 μL 沉淀物悬浮液在载玻片涂片，置显微镜 50×或解剖镜 30×下用细的挑针将冬孢子转移至无菌的塑料培养皿内的灭菌水中，挑取 30 个以上的冬孢子，然后在解剖镜下用 0.25%的次氯酸钠溶液 100 μL 表面消毒 1 min，用移液器吸去次氯酸钠溶液，再用灭菌水洗涤三次，最后加入 100 μL～200 μL 灭菌水，用移液器将水和其中的冬孢子一起转移至 3%水琼脂平板上，培养和检查方法同前。

7.7 菌丝培养

萌发的冬孢子转移至 PDA 培养基上 22 ℃连续光照条件下培养，7 d～10 d 后收集菌丝。

7.8 DNA 提取

菌丝液氮研磨后取 50 mg～100 mg 提取 DNA，提取方法可以参见附录 B，也可用提取真菌或植物组织的 DNA 提取试剂盒。

7.9 PCR 检测

7.9.1 菌丝培养物的 PCR 检测

7.9.1.1 引物和扩增

扩增引物为 W1/W4，引物序列见附录 C，PCR 反应体系为：PCR 反应总体积为 30 μL，包含：10 mmol/L Tris-HCl；50 mmol/L KCl(pH 8.3)；1.5 mmol/L $MgCl_2$；dATP，dGTP，dCTP，dTTP 浓度为 100 μmol/L；引物浓度 100 nmol/L(引物 U2/U10 为 160 nmol/L)；10 ng～20 ng 模板 DNA；0.5 U*Taq* DNA 聚合酶，设阳性、阴性和空白对照，阳性为黑麦草腥黑穗病菌菌丝 DNA，阴性为小麦印

变腥黑穗病菌菌丝 DNA，空白对照为灭菌双蒸水代替 DNA 膜板。加双蒸水至终体积为 30 μL，混匀离心，置于 PCR 仪进行扩增。

反应循环参数为 94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，35 个循环；最后 2 ℃ 3 min。

7.9.1.2 琼脂糖凝胶电泳

取扩增产物 10 μL，加入 3 μL 上样缓冲液[0.25%溴酚蓝，40%(质量浓度)蔗糖水溶液]，混匀，1.5%琼脂糖凝胶电泳。电泳，EB 染色(或类似染料，比如 goldview)后于凝胶成像仪中成像存盘。

7.9.2 冬孢子的 PCR 检测

7.9.2.1 冬孢子的扩增前处理

解剖镜 20×～30×下将单个冬孢子挑至已灭菌的盖玻片小块(1 mm^2～2 mm^2)上，用另一块小玻片盖住冬孢子，用小镊子轻轻按压小玻片使孢子破裂，将两块小玻片连同破的孢子一起转移进 PCR 反应管中，加入 PCR 混和液，进行扩增。每个样品至少处理 12 个完整冬孢子，每个处理一个冬孢子。

7.9.2.2 引物和扩增

第一轮扩增引物为 U2/U10 和 Ti11/Ti14，引物序列见附录 C，引物比例为 U2/U10 和 Ti11/Ti14=1.6∶1.6∶1∶1，PCR 反应体系和反应循环参数同 7.9.1.1，反应循环数为 25。设阳性、阴性和空白对照，阳性为黑麦草腥黑穗病菌菌丝 DNA，阴性为小麦印度腥黑穗病菌菌丝 DNA，空白对照为灭菌双蒸水。取第一轮扩增产物 1 μL 为第二轮 PCR 反应的模板进行扩增，W1/W4 为第二轮 PCR 引物，PCR 反应体系和反应循环参数同 7.9.1.1。

7.9.2.3 实时荧光 PCR 扩增

同时取第一轮扩增产物 1 μL 为实时荧光 PCR 反应的模板进行扩增，引物和探针序列见附录 C，实时荧光 PCR 扩增体系 25 μL：5×real time PCR 缓冲液(Mg^{2+} free)5 μL，Mg^{2+} 溶液(250 mmol/L)0.5 μL，dNTP mixture(各 10 mmol/L)0.75 μL，*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.25 μL，上、下游引物(D-FP 和 T-RP)(10 μmol/L)各 0.5 μL，探针 TWAL(5 μmol/L)0.6 μL，DNA 模板 1.0 μL，超纯水补至 25 μL，设阳性、阴性和空白对照。实时荧光 PCR 扩增在 ABI PRISM 7700 定量 PCR 扩增仪或其他实时荧光 PCR 扩增仪上进行。两步法扩增反应程序：50 ℃ 2 min，预变性 95 ℃ 10 min；然后 95 ℃ 15 s，65 ℃ 1 min 循环 40 次。

7.9.2.4 琼脂糖凝胶电泳

电泳和观察结果同 7.9.1.2。

8 鉴定特征

8.1 冬孢子形态学特征

冬孢子球形至近球形，浅黄至暗红褐色，不透明至半透明，23.7 μm～44.0 μm(平均 34.0 μm)。外胞壁具锥形至平截状突起，3 μm～6 μm 高，表面观为粗糙，不完全脑纹状至珊瑚状，外被透明至微黄褐色胶质鞘，延伸至突起顶部。黑麦草腥黑穗病菌和近似种冬孢子的形态特征比较见附录 D。

8.2 冬孢子萌发生理特性

冬孢子 20 ℃～25 ℃下培养 2 d～5 d 以后萌发，冬孢子萌发长出先菌丝，先菌丝上产生末端稍卷曲的丝状初生担孢子，数量 60～150，大小(38 μm～75 μm)×(1.3 μm～1.8 μm)，平均(44.3 μm～67.8 μm)×(1.3 μm～1.7 μm)，初生担孢子在 24 h 内萌发，强力弹射出腊肠状次生担孢子，次生担孢子可以萌发产生次生担孢子或菌丝，菌丝又可以产生丝状次生担孢子，在初生担孢子和次生担孢子彼此之间没有融合现象。腊肠状次生担孢子大小(10.6 μm～17.6 μm)×(1.8 μm～3.1 μm)，丝状次生担孢子大小(26 μm～57.2 μm)×(1.8 μm～2.6 μm)。

9 结果评定

9.1 发现菌瘿

发现菌瘿，寄主为黑麦草属，冬孢子形态特征与 8.1 相符合，判定为黑麦草腥黑穗病菌。

9.2 未发现菌瘿

根据冬孢子形态特征不能鉴定以 PCR 扩增结果为准，菌丝的 PCR、孢子的巢式 PCR(nested PCR)和实时荧光 PCR 试验中任何一个扩增试验为阳性者可以判定为黑麦草腥黑穗病菌。

未发现菌瘿，根据冬孢子形态特征不能鉴定的视 PCR 扩增结果，菌丝的 PCR、孢子的套式 PCR(nested PCR)和实时荧光 PCR 试验中任何一个扩增试验为阳性者可以判定为黑麦草腥黑穗病菌。

10 样品保存

保存样品应按报检号、品种、批号分别存放，每样 1 kg。保存样品经登记和经手人签字后置低温干燥、防虫防鼠处妥善保存 3 个月。如发现病菌冬孢子，该样品至少保存 12 个月，以备复验、谈判和仲裁。保存期满后，需经灭菌处理。

附 录 A
（资料性附录）
黑麦草腥黑穗病菌地理分布和寄主范围

A.1 地理分布

美国、澳大利亚和新西兰等。

A.2 寄主范围

黑麦草腥黑穗病菌只侵染黑麦草属。

附 录 B
（资料性附录）
菌丝 DNA 提取方法

B.1 离心收集菌丝，转移菌丝至研钵中，液氮冷冻，磨碎菌丝。

B.2 取 50 mg～100 mg 粉状菌丝转入小管，加 500 μL TES(100 mmol Tris，pH 8.0，10 mmol EDTA，2% SDS)，加 50 μg～100 μg 蛋白酶 K，55 ℃～60 ℃孵育 1 h，期间轻轻摇动混匀。

B.3 调节盐浓度至 1.4 mol/L，加 1/10 体积 10%CTAB，65 ℃ 10 min。

B.4 1 体积 SEVAG(三氯甲烷：异戊醇＝24：1)，轻摇混匀，0 ℃孵育 30 min，4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。

B.5 取上清液至 1.5 mL 离心管，加 225 μL 5 mol NH_4Ac，轻摇混匀，0 ℃置 30 min，4 ℃ 12 000 r/min离心 10 min。

B.6 取上清液，加 3 μL RNA 酶，37 ℃孵育 15 min，4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min。

B.7 取上清液，加 0.55 体积异丙醇沉淀 DNA，立即 12 000 r/min 离心 5 min，如无 DNA 团出现，立即 0 ℃置 30 min。

B.8 弃上清液，冷 70%乙醇洗 2 次，干燥后溶解于 50 μL TE 中。

附 录 C
（规范性附录）
扩增试验引物和探针

引物编号	核苷酸序列 5’-3’	位置	产物/bp
W1[a]	cagcaaatgactcgaacagca	198～219[c]	760
W4[b]	ctcaagtcagatctttcaat	938～957[c]	
U2[a]	gtgatcctagctgagctaac	103～122[c]	1 341
U10[b]	gccatgaaaacacgcagtcc	1 424～1 443[c]	
Ti11[a]	aaggtttctgtaggtgaacct	10～30[d]	679
Ti14[b]	gatatgcttaagttcagcggg	668～688[d]	
D-FP[a]	ttctcttttatcccaacaccaaact	53～77[e]	236
T-RP[b]	cttatcgcatttcgctgcg	270～288[e]	
TWAL	(FAM)-cggaaggaacaaggc(MGB)	79～93[f]	

[a] 正义引物 forward primer。

[b] 反义引物 reverse primer。

[c] Nucleotide location in AF218063。

[d] Nucleotide location in AF398434。

[e] Nucleotide location in AF135434。

[f] Nucleotide location in AF135435。

SN/T 2126—2008

附 录 D
（规范性附录）
黑麦草腥黑穗病菌和近似种冬孢子的形态特征比较

种名	大小/μm	颜色	形状	刺状突起	寄主
T. walkeri 黑麦草腥黑穗病菌	26～44 平均 34	淡褐色至暗褐色，但不会呈不透明的黑色	很规则球形	剖面观常呈钝圆，表面观为脊状突起，有时和印腥相似	黑麦草
T. indica 小麦印度腥黑穗病菌	22～61 平均 35～39	褐色至黑色，不透明	球形至亚球形	浓密，1.5 μm～7.0 μm，表面观为疣状纹饰	小麦
T. horrida 水稻腥黑穗病菌	17～36 平均 25	褐色至黑色，不透明	球形至亚球形	可能弯曲，顶端常为较大的钝圆	水稻
T. ehrhartae 沙地牧草腥黑穗病菌	22～24 平均 23	浅褐色至深褐色	球形至亚球形	剖面观呈钝圆，表面观为脊状突起，排列规则	沙地牧草
T. barclayana 狼尾草腥黑穗病菌	17.6～32.3 平均 24.7	浅褐色至深褐色	球形至亚球形	疣状突起短，垂直或略为倾斜着生，基部呈不大规则多角形	狼尾草
T. setariae 狗尾草腥黑穗病菌	18.5～32.1 平均 22.5	浅褐色至深褐色	球形至亚球形	疣状突起低矮，垂直着生，基部呈规则五角或六角形，排列紧密	狗尾草
T. opaca	18.6～29.4 平均 23.3	浅褐色至深褐色	球形至亚球形	疣状突起低矮，垂直着生，基部呈规则五角或六角形，排列紧密	*Spmifex littoreeus*
T. sumatii 苏玛特腥黑穗病菌	21.6～34.3 平均 25.3	浅褐色至深褐色	球形至亚球形	疣状突起低矮，不明显，垂直或略为倾斜着生，基部呈多角形，排列紧密	*Colx lacry-jobi*
T. savilei	17.6～26.5 平均 22.1	浅褐色至深褐色	球形至亚球形	疣状突起明显，垂直着生，基部呈规则五角或六角形，排列紧密	*Tripogon jacquemontil*