



中华人民共和国国家标准

GB/T 28080—2011

小麦印度腥黑穗病菌检疫鉴定方法

Detection and identification of *Tilletia indica* Mitra

2011-12-30 发布

2012-06-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 小麦印度腥黑穗病菌基本信息	1
4 方法原理	1
5 检疫鉴定流程	1
6 取样方法	3
6.1 未经加工小麦取样方法	3
6.2 加工小麦取样方法	3
6.3 袋装面粉抽样比例	3
7 主要仪器设备和试剂	3
7.1 主要仪器设备	3
7.2 主要试剂	4
8 检测与鉴定	4
8.1 样品前处理	4
8.2 形态学鉴定	5
8.3 单个冬孢子直接分子检测	5
8.4 孢子培养物的分子检测	5
8.5 序列测定与比对	5
9 结果判断与表述	5
9.1 形态学鉴定结果判断和表述	5
9.2 单个孢子直接分子检测结果判断和表述	5
9.3 孢子培养物分子检测结果判断和表述	6
9.4 序列测定与比对	6
10 样品和原始数据保存	6
10.1 样品保存	6
10.2 原始数据保存	6
附录 A (资料性附录) 小麦印度腥黑穗病菌其他信息	7
附录 B (规范性附录) 形态学鉴定	9
附录 C (资料性附录) 小麦印度腥黑穗病菌与近似种的孢子显微形态图和扫描形态图	10
附录 D (规范性附录) 单个冬孢子直接分子检测	12
附录 E (规范性附录) 孢子培养物常规 PCR 检测	14
附录 F (规范性附录) 孢子培养物实时荧光 PCR 检测	16
附录 G (规范性附录) 序列测定与比对	18

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人:章桂明、程颖慧、王颖、陆清、凌杏元、龙海、陈枝楠、向才玉、杨伟东、缪建锟。

小麦印度腥黑穗病菌检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了小麦印度腥黑穗病菌的检疫鉴定方法,包括形态学方法和分子生物学检测方法,规定了小麦印度腥黑穗病菌检疫鉴定流程,明确了取样和样品保存方法。

本标准适用于小麦及其加工产品传带的小麦印度腥黑穗病菌的检测。

本标准也适用于除小麦以外的该病菌其他寄主传带小麦印度腥黑穗病菌的检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

GB/T 18085 植物检疫 小麦矮化腥黑穗病菌检疫鉴定方法

GB/T 19495.2 转基因产品检测 实验室技术要求

3 小麦印度腥黑穗病菌基本信息

中文名:小麦印度腥黑穗病菌。

学名:*Tilletia indica* Mitra。

异名:*Neovossia indica* (Mitra) Mundkur。

病害英文名:karnal bunt of wheat(简称 KB),partial bunt of wheat。

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 Tilletiaceae、腥黑粉菌属 *Tilletia*。

小麦印度腥黑穗病菌主要通过发病种子和附着于健康种子表面的冬孢子进行远距离传播,也可随土壤及其他农具进行传播。

小麦印度腥黑穗病菌的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

根据小麦印度腥黑穗病菌的生物学和形态学特征以及分子生物学特征,应用相关仪器,包括显微镜和 PCR 仪等对小麦印度腥黑穗病菌进行鉴定。

5 检疫鉴定流程

检疫鉴定流程见图 1。

6 取样方法

6.1 未经加工小麦取样方法

按照 GB/T 18085 取样方法进行取样。

6.2 加工小麦取样方法

实施堆垛抽样时,在堆垛四周按正弦曲线从上、中、下层随机确定抽样点。

实施船舱内货物抽样时,以 50 m² 为一个抽样区,每区设中心及四角(距边缘 1 m 处)五个抽样点,每增加一个抽样区,增加三个抽样点。集装箱或车厢装载的麦麸、面粉抽样参照船舱抽样方法进行。

6.3 袋装面粉抽样比例

10 袋以下,逐袋抽样。

10~100 袋,随机取 10 件。

100 袋以上,按一批货物总袋数的平方根数抽取见式(1)。

$$n = \sqrt{N} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

N ——一批货物的总袋数;

n ——应抽取件数(n 值取整数,小数部分向上修约)。

7 主要仪器设备和试剂

7.1 主要仪器设备

- 7.1.1 摇床。
- 7.1.2 显微镜。
- 7.1.3 纯水器。
- 7.1.4 测序仪。
- 7.1.5 电泳仪。
- 7.1.6 低温冰箱。
- 7.1.7 显微操作仪。
- 7.1.8 超净工作台。
- 7.1.9 高压灭菌锅。
- 7.1.10 光照培养箱。
- 7.1.11 旋涡振荡器。
- 7.1.12 普通离心机。
- 7.1.13 冷冻干燥机。
- 7.1.14 凝胶成像仪。
- 7.1.15 核酸蛋白分析仪。
- 7.1.16 PCR 仪(常规 PCR 仪、实时荧光 PCR 仪)。
- 7.1.17 破壁针(具有平截切面的针,能将孢子压碎)。
- 7.1.18 培养皿(9 cm)。

- 7.1.19 筛网(53 μm 、20 μm)。
- 7.1.20 孔径 100 μm 的毛细管。
- 7.1.21 锥形瓶(250 mL、500 mL)。
- 7.1.22 盖玻片(18 mm \times 18 mm)。
- 7.1.23 PCR 反应管(0.2 mL、0.5 mL)。
- 7.1.24 载玻片(25 mm \times 76 mm,厚(0.8 mm \sim 1.0 mm))。
- 7.1.25 Tip 头(0.1 μL \sim 10 μL ,5 μL \sim 200 μL ,100 μL \sim 1 000 μL)。
- 7.1.26 可调微量移液器(2 μL ,10 μL ,20 μL ,100 μL ,200 μL ,1 000 μL)。

7.2 主要试剂

- 7.2.1 三氯甲烷。
- 7.2.2 异戊醇。
- 7.2.3 异丙醇。
- 7.2.4 醋酸钠。
- 7.2.5 甲酰胺。
- 7.2.6 70%乙醇。
- 7.2.7 无水乙醇。
- 7.2.8 Tris 饱和酚。
- 7.2.9 *Taq* 酶。
- 7.2.10 Gelatin。
- 7.2.11 溴化乙锭。
- 7.2.12 DNA Marker。
- 7.2.13 PDA 培养基。
- 7.2.14 水琼脂培养基。
- 7.2.15 SDS 提取液。
- 7.2.16 PCR 缓冲液。
- 7.2.17 电泳缓冲液。
- 7.2.18 上样缓冲液。
- 7.2.19 Bigdye 试剂盒。
- 7.2.20 *TaqMan* Universal PCR Master Mix。
- 7.2.21 席尔氏浮载剂,见 GB/T 18085。
- 7.2.22 dNTPs (dATP、dGTP、dCTP、dTTP)。

注:除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

8 检测与鉴定

8.1 样品前处理

8.1.1 实验室器皿和筛网的前处理

将所有实验器皿和筛网浸泡于 1.6% 的次氯酸钠中 15 min,然后用无菌水冲洗 5 次。

8.1.2 面粉中孢子的获取

将面粉样品充分混匀,称取 50 g 置于 250 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 无菌水,搅拌均匀后倒入直径

为 9 cm 的玻璃培养皿中,使面粉溶液在培养皿中均匀成一薄层,再将培养皿置于解剖镜下镜检,用解剖针挑取深色冬孢子用于形态学鉴定或分子生物学检测。

8.2 形态学鉴定

对查找到菌瘿,或通过洗涤检验获得冬孢子的,先进行形态学鉴定。对菌瘿采用解剖针挑取菌瘿的冬孢子,置于席尔氏液中制片,对洗涤检验采用滴管吸取冬孢子悬浮液制片,待冬孢子胶质鞘充分展开后,进行封片,观察冬孢子的大小、形状、颜色、外孢壁结构,在 100×油镜下测量冬孢子的大小,每个样品测量 100 个冬孢子。

形态学鉴定的具体操作过程见附录 B,KB 与近似种的形态学图参照附录 C。

8.3 单个冬孢子直接分子检测

对未查找到菌瘿,但通过洗涤检验发现疑似小麦印度腥黑穗病菌冬孢子的,要进行单个孢子分子方法检测。每个 PCR 反应检测 1 个冬孢子,共检测 5 个冬孢子。每次 PCR 检测应设立相应的阳性对照、阴性对照和空白对照。

单个冬孢子直接分子检测具体操作过程见附录 D。

8.4 孢子培养物的分子检测

对未查找到菌瘿,但通过洗涤检验发现疑似小麦印度腥黑穗病菌,而这些疑似小麦印度腥黑穗病菌通过形态学和单个孢子检测无法获得准确结果时,则要对孢子进行培养(培养方法见 E.1),用培养物进行分子检测。每次 PCR 检测须设立相应的阳性对照、阴性对照和空白对照。

孢子培养物分子检测具体操作过程见附录 E、附录 F。

8.5 序列测定与比对

将 PCR 产物纯化后,进行测序,或由生物公司完成。把测序所得到的核苷酸序列与已知的小麦印度腥黑穗病菌相应序列进行比对。

序列比对具体操作过程见附录 G。

9 结果判断与表述

9.1 形态学鉴定结果判断和表述

对查找到的菌瘿中的冬孢子或通过洗涤检验获取的冬孢子,所观察的症状和形态学特征与小麦印度腥黑穗病菌冬孢子的一致,且对其 100 个孢子大小测量平均值大于 35 μm ,则判定该样品含有小麦印度腥黑穗病菌;对其 100 个孢子大小测量平均值小于 25 μm ,则判定该样品不含有小麦印度腥黑穗病菌;对其 100 个孢子大小测量平均值介于 25 μm ~35 μm ,则判定该样品含有疑似小麦印度腥黑穗病菌,应进行进一步分子检测。

9.2 单个孢子直接分子检测结果判断和表述

9.2.1 常规 PCR 检测结果判断和表述

对单个孢子进行 PCR 检测,在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下,如通过电泳获取 260 bp 条带,且测序比对与小麦印度腥黑穗病菌一致的判定为该样品含有小麦印度腥黑穗病菌;如没有 PCR 扩增条带的则应挑取孢子进行萌发,进行分子检测。

9.2.2 实时荧光 PCR 检测结果判断和表述

对单个孢子进行 MGB 探针实时荧光 PCR 检测,在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下,则:

- 检测 Ct 值小于或等于 36,判定小麦印度腥黑穗病菌检测结果呈阳性;
- 检测 Ct 值大于 36,应重做实时荧光 PCR,如再次扩增后,Ct 值小于或等于 36,判定同上,如 Ct 值大于 36,则需要挑取冬孢子进行萌发,用孢子培养物进行分子检测。

9.3 孢子培养物分子检测结果判断和表述

9.3.1 常规 PCR 检测结果判断和表述

对孢子培养物进行常规 PCR 检测,在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下,如样品扩增产生 414 bp(引物 Tin3/Tin4)或 260 bp(引物 P12)的特异性条带,则初步判定小麦印度腥黑穗病菌检测结果呈阳性,但需进一步进行实时荧光 PCR 检测或序列测定与比对进行结果验证,按照实时荧光 PCR 检测或序列测定与比对结果进行最后结果判定;如样品无特异性扩增条带,则判定小麦印度腥黑穗病菌检测结果呈阴性。

9.3.2 实时荧光 PCR 检测结果判断和表述

9.3.2.1 普通探针实时荧光 PCR 检测结果判断和表述

普通探针的实时荧光 PCR 检测,在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下,则:

- 检测 Ct 值小于 34,判定小麦印度腥黑穗病菌检测结果呈阳性;
- 检测 Ct 值大于或等于 34,判定小麦印度腥黑穗病菌检测结果呈阴性。

9.3.2.2 MGB 探针实时荧光 PCR 检测结果判断和表述

MGB 探针实时荧光 PCR 检测,在阳性对照、阴性对照和空白对照结果均正常的情况下,则:

- 检测 Ct 值小于或等于 36,判定小麦印度腥黑穗病菌检测结果呈阳性;
- 检测 Ct 值大于或等于 40,判定小麦印度腥黑穗病菌检测结果呈阴性;
- 检测 Ct 值在 36~40 之间,应重做实时荧光 PCR,再次扩增后,如 Ct 值小于或等于 36 或者 Ct 值大于或等于 40,判定同上。

9.4 序列测定与比对

把测序所得到的核苷酸序列与已知的小麦印度腥黑穗病菌相应序列进行比对,如果与已知的小麦印度腥黑穗病菌序列完全一致,则判定小麦印度腥黑穗病菌检测结果呈阳性,不一致则判定小麦印度腥黑穗病菌检测结果呈阴性。

10 样品和原始数据保存

10.1 样品保存

存查样品应视样品的状态采用相应的保存方式,妥善保存 6 个月。如发现小麦印度腥黑穗病菌,该样品应保存 1 年,以备复验,如涉及到贸易纠纷则应保存到纠纷解决完毕。保存期满后,需经灭菌处理。

10.2 原始数据保存

样品检测结束后,其原始记录单和检验报告或证书应归档,妥善保管,以备复验、谈判和仲裁。

附录 A

(资料性附录)

小麦印度腥黑穗病菌其他信息

A.1 分布

小麦印度腥黑穗病菌大多分布于亚洲、北美洲、南美洲和非洲等少数几个国家。

亚洲：印度、阿富汗、巴基斯坦、伊拉克、尼泊尔。

北美洲：墨西哥、美国。

南美洲：巴西。

非洲：南非。

A.2 形态特征

病菌冬孢子堆(spore mass)粉状,褐黑色,由冬孢子及不孕细胞组成,新鲜时有恶臭。不孕细胞球形至长椭圆形,常呈泪珠状,淡黄色至淡黄褐色,具有光滑而厚的裂片状的胞壁,并常有一个菌丝附属丝。冬孢子无鞘,有时具有一个菌丝附属丝,球形或近球形,红褐色(几乎不透光),直径 $25\ \mu\text{m}\sim 43\ \mu\text{m}$ (平均 $35\ \mu\text{m}$),孢壁疣刺状,疣突截形, $1.5\ \mu\text{m}\sim 5\ \mu\text{m}$ 。

A.3 寄主范围及症状

小麦印度腥黑穗病菌自然寄主为小麦(*Triticum aestivum*)、硬粒小麦(*Triticum durum*)及小黑麦(*Triticum aestivum* × *Secale cereale*)。在人工接种条件下,尚可感染下列寄主植物:耐酸草(*Bromus ciliatus*)、旱雀麦(*B. tectorum*)、加那利黑麦草(*Lolium canariense*)、意大利黑麦草(*L. multiflorum*)、黑麦草(*L. perenne*)、波斯黑麦草(*L. persicum*)、一粒小麦(*Triticum monococcum*)、野生一粒小麦(*Triticum boeoticum*)、提莫非氏小麦(*Triticum timopheevi*)、*Triticum opheeri*、黑麦(*Secale cereale*);山羊草属(*Aegilops*):二角山羊草(*A. bicornis*)、尾状山羊草(*A. caudata*)、顶芒山羊草(*A. comosa*)、*A. mutica*、*A. searsii*、沙伦山羊草(*A. sharonensis*)、粗山羊草(*A. tauschii*)、*A. triaristana*、*A. triunciale*等。

小麦印度腥黑穗病菌主要为害小麦穗部。其症状特点是对寄主穗部的局部侵染,当感病小麦进入糊熟期时,开始出现症状,在有的品种上,病穗一般较健穗短,感病麦株通常表现为部分麦穗发病,感病麦穗也常表现为部分小穗受到感染,病穗通常局部黑粉化。成熟时在受害籽粒的腹沟处果皮形成黑粉菌腔。感病轻微的,腹沟症状不明显,仅在子粒表面形成暗褐色疱斑,种子发芽率不受影响;感病严重时则病粒全部或大部分形成黑粉腔,外表由菌体化果皮包被,病菌损伤胚及毗邻的胚乳,种子不发芽或虽发芽只形成畸形弱苗;病粒中的黑粉由于病原菌产生三甲胺而散发出腐鱼腥臭味。病菌孢子堆形成于子房中,轻微膨胀或不膨胀,几乎完全为颖片所覆盖。

A.4 传播途径

病粒及附着于健康种子表面的冬孢子是病原菌进行远距离传播的主要途径,由于该病局部侵染的

特性,在收获期间很难有效的清除混杂于健康种子中的病粒,因而病粒可随同贸易性小麦或资源性引种或科研性引种而进行远距离传播。

在小麦收获期间,散落到土壤中的菌瘿或从破碎菌瘿中落入土壤中的小麦印度腥黑穗病菌冬孢子,随同土壤进行传播。带有孢子的病土也可通过黏附在人、牲畜和农用收获机械等表面进行传播。

附录 B
(规范性附录)
形态学鉴定

B.1 菌瘿查找

在体视显微镜下,检查小麦种子中是否有菌瘿。感病较重的种子,菌瘿颜色多呈暗紫褐色,不同于健康种子,感病种子因腥黑粉菌孢子而散发出三甲胺气味。感病轻微的种子,可采用将小麦种子浸泡在水中检查菌瘿,即将待检种子浸泡在水中,沿种子腹面对内稃进行观察。

B.2 洗涤检验

B.2.1 取 50 g 样品放入 250 mL 锥形瓶中,加入 100 mL 无菌双蒸水(含 0.01% Tween-20),放于摇床 200 r/min 振荡 3 min 以便释放孢子。

B.2.2 将洗涤液倒在上层的 53 μm 的筛网上,20 μm 筛网在下层,进行抽滤,用 500 mL 的锥形瓶接收滤液。

B.2.3 用 100 mL 无菌双蒸水冲洗 250 mL 锥形瓶中样品 2 次,然后将洗涤液倒在 53 μm 的筛网上,再用 200 mL~300 mL 无菌双蒸水冲洗 53 μm 筛网,确保孢子从样品上分离。

B.2.4 移去 53 μm 筛网,将 20 μm 筛网倾斜成 45°,用无菌双蒸水冲洗将筛网上的孢子冲洗下来,然后将孢子洗涤液倒入离心管中,1 000 g 离心 3 min。

B.2.5 用移液管将上清液缓缓吸出,最后加入席尔氏液,定容至 100 μL ~500 μL ,混匀,镜检。

B.3 形态学鉴定

用解剖针挑起孢子,置于席尔氏液中制片,在显微镜下观察孢子的大小、形状、颜色和孢壁结构,在 100 \times 油镜下测量 100 个孢子的尺寸。

B.4 结果判定

形态学鉴定结果判定见 9.1。

附录 C

(资料性附录)

小麦印度腥黑穗病菌与近似种的孢子显微形态图和扫描形态图

C.1 小麦印度腥黑穗病菌孢子显微形态图(章桂明等,2005)参见图 C.1。

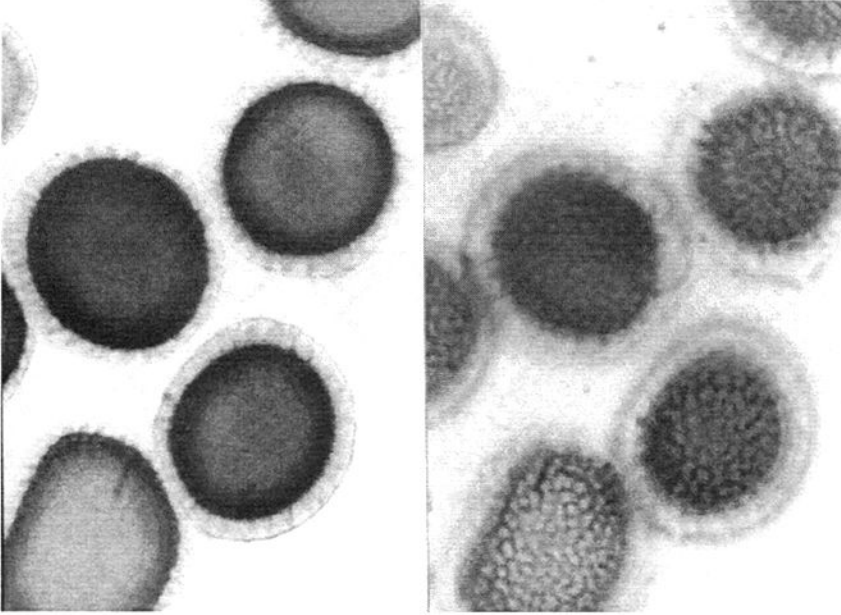


图 C.1 小麦印度腥黑穗病菌孢子显微形态图

C.2 小麦印度腥黑穗病菌孢子电镜扫描形态图(章桂明等,2005)参见图 C.2。

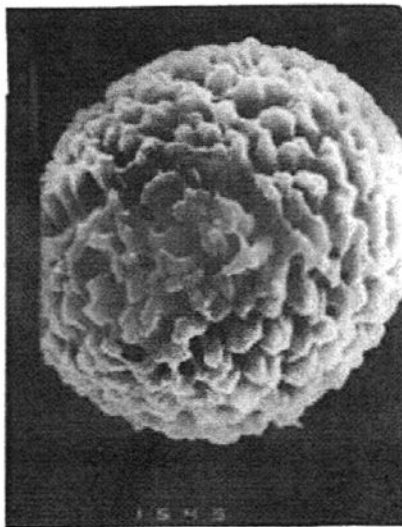


图 C.2 小麦印度腥黑穗病菌孢子电镜扫描形态图

C.3 黑麦草腥黑穗病菌孢子显微形态图(EPP0,2004)参见图 C.3。

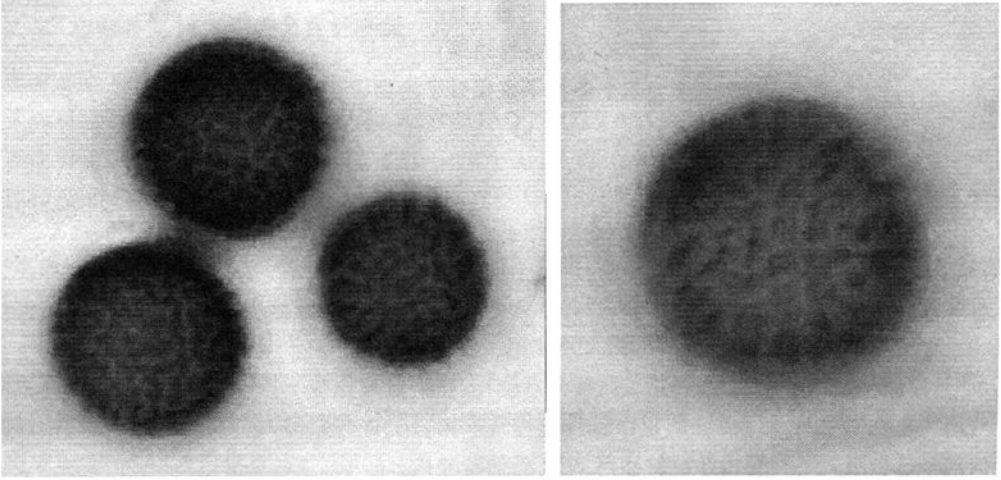


图 C.3 黑麦草腥黑穗病菌孢子显微形态图

C.4 黑麦草腥黑穗病菌孢子电镜扫描形态图(Jim Plaskowitz,2006)参见图 C.4。

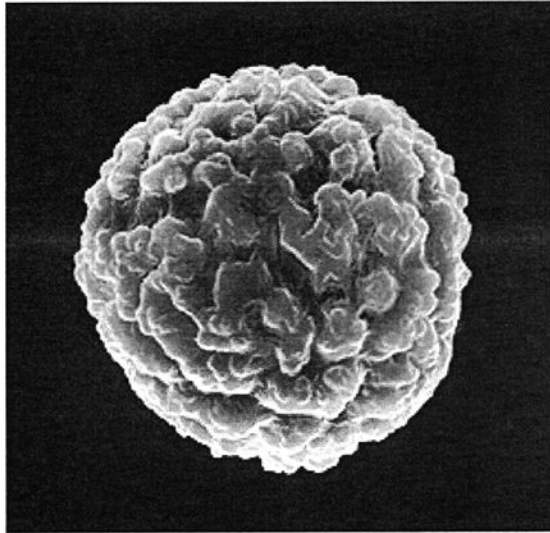


图 C.4 黑麦草腥黑穗病菌孢子电镜扫描形态图

附录 D

(规范性附录)

单个冬孢子直接分子检测

D.1 单个孢子核酸制备

菌瘿中冬孢子获取方法:用针刺破菌瘿,挑取不带植物组织的少许孢子,将这些孢子轻轻展布于载玻片上,在低倍镜下观察孢子是否分散开,再将单个孢子挑起,直接转移到 PCR 管的管盖中,在低倍镜下确认孢子是否已被成功放置。

孢子悬浮液中冬孢子获取方法:用显微操作系统(或在倒置显微镜下人工操作)从孢子悬浮液中吸取孢子,所用毛细管孔径为 100 μm ,整个操作过程在检测器上进行监控,也可在显微镜下直接进行观察,确认孢子已被吸入毛细管内并被转移到 PCR 管的管盖内。

用破壁针对放置在 PCR 管盖中的孢子实施破壁:在 10 \times 低倍镜下用破壁针头轻轻挤压孢子,促使孢子壁破裂,使孢子中的核酸释放出来,在显微镜下检测孢子壁是否已经被压破。快速将 PCR 反应混合液加到 PCR 管盖中,振荡混匀,然后离心,置于冰上,振荡后离心。

D.2 分子生物学检测

D.2.1 常规 PCR 检测

D.2.1.1 常规 PCR 引物序列

常规 PCR 引物序列为:

正向引物 P12-1:5'-GTAATAGCCCTGTGCAGAAG-3'

反向引物 P12-2:5'-CGGCGAAGAAAGTCGGATTT-3'

D.2.1.2 常规 PCR 扩增体系及条件

反应体系总体积为 25 μL ,各成分为:2.5 μL 10 \times PCR 缓冲液 [Tris-HCl (pH8.0)10 mmol/L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, KCl 50 mmol/L], 2 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 0.25 μL 各引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.3 μL *Taq* 酶 (5 U/ μL), 2.5 μL Gelatin [0.01% (wt/vol)], 无菌双蒸水 17.2 μL 。将反应体系混匀,离心后置于 PCR 仪中进行反应,每个 PCR 反应检测 1 个冬孢子,共检测 5 个冬孢子。用无菌双蒸水作空白对照,阳性对照采用含有小麦印度腥黑穗病菌的 DNA 作为模板,阴性对照以其他腥黑穗病菌 DNA 作为模板。

反应条件为 96 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,然后进入循环反应:96 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 57.5 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 70 次循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

D.2.1.3 琼脂糖凝胶电泳

每个样品取 5 μL 的 PCR 产物与 1 μL 的 6 \times 上样缓冲液混合均匀,并加到含有溴化乙锭 (0.5 $\mu\text{g/mL}$) 的 1.2% 琼脂糖凝胶的点样孔中,在 120 V 下进行电泳。电泳结束后在凝胶成像系统中观察、拍照,并保存照片。

D.2.2 实时荧光 PCR 检测

D.2.2.1 实时荧光 PCR 引物及探针序列

实时荧光 PCR 引物及探针序列为:

正向引物 SZFP254-1;5'-AGCCATCACTGGAGTTGTCATG-3'

反向引物 SZFP254-2;5'-CCCAGCAAGGTCACCTTTGA-3'

探针序列 SZFPb255;5'-FAM-CCGACCGTATCGGTCT-MGB-3'

D.2.2.2 实时荧光 PCR 反应体系及条件

反应体系总体积为 5 μL ,各成分为:实时荧光反应混合液 2.5 μL TaqMan Universal PCR Master Mix,0.45 μL 各引物(10 $\mu\text{mol/L}$),0.1 μL 探针(10 $\mu\text{mol/L}$),无菌双蒸水 1.5 μL 。将反应体系混匀,离心后置于实时荧光 PCR 仪中进行反应,每个实时荧光 PCR 反应检测 1 个冬孢子,共检测 5 个冬孢子。用无菌双蒸水作空白对照,阳性对照采用含有小麦印度腥黑穗病菌的 DNA 作为模板,阴性对照以其他腥黑穗病菌 DNA 作为模板。

反应条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ 预热 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,然后进入循环反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 40 次循环。

对实时荧光 PCR 仪的程序进行设置,使仪器能进行 FAM 荧光的检测。

D.3 结果判定

结果判定见 9.2。

附 录 E
(规范性附录)
孢子培养物常规 PCR 检测

E.1 孢子萌发

挑取冬孢子,置于2%水琼脂培养基上,18℃~20℃、每日连续光照12h条件下培养10d,解剖镜下检查萌发情况。对萌发的孢子用接种针挑取置于PDA培养基上,20℃~22℃培养20d。

E.2 孢子培养物的核酸制备

E.2.1 称取0.1g培养物,放在无菌的多层滤纸上,吸去水分,置于无菌的研钵中,用液氮冷冻,用研磨棒将它们研成粉末。

E.2.2 立即转移到2mL的离心管中,加入65℃预热的SDS提取液700μL,置于水浴锅中65℃水浴30min,期间不断混匀。

E.2.3 加入5μL 10mg/mL RNA酶,充分混匀,在37℃放置30min。

E.2.4 加入等体积的Tris饱和酚,充分摇匀,在12000r/min下离心15min。

E.2.5 取上清液,加入1:1三氯甲烷/异戊醇(24:1),在12000r/min下离心15min。

E.2.6 再取上清液,加入1:1三氯甲烷/异戊醇(24:1),在12000r/min下离心15min。

E.2.7 加入等体积预冷的异丙醇,轻轻摇晃,置于-20℃冰箱静置30min,在12000r/min下离心15min。

E.2.8 弃上清液,加入70%乙醇500μL,12000r/min下离心3min,去上清液,重复2次。

E.2.9 得到DNA沉淀,用冷冻干燥仪进行干燥,加入30μL~50μL TE或无菌去离子水,充分溶解后,测量DNA的纯度和浓度后置于-20℃冰箱中保存。

注:该核酸制备也可采用DNA提取试剂盒法。

E.3 DNA纯度与浓度的测定

用核酸蛋白分析仪测定DNA的纯度与浓度,分别取得260nm和280nm处的吸收值,计算核酸的纯度和浓度,计算见式(E.1)和式(E.2):

$$\text{DNA 纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280} \quad \dots\dots\dots(\text{E.1})$$

$$\text{DNA 浓度}(\mu\text{g/mL}) = 50 \times \text{OD}_{260} \quad \dots\dots\dots(\text{E.2})$$

PCR级DNA溶液的OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为1.7~1.9。

E.4 常规PCR

E.4.1 引物序列

引物序列为:

正向引物 Tin 3:5'-CAATGTTGGCGTGGCGGCGC-3'

反向引物 Tin 4:5'-CAACTCCAGTGATGGCTCCG-3'

也可以使用D.2.1中的P12引物。

E.4.2 扩增体系及条件

引物 Tin 3/Tin 4 的反应体系总体积为 25 μL ,各成分为:2.5 μL 10 \times PCR 缓冲液[Tris-HCl (pH8.0)10 mmol/L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L,KCl 50 mmol/L],1 μL dNTPs(10 mmol/L),0.1 μL 各引物 (25 $\mu\text{mol/L}$),0.1 μL *AmpliTaq* (5 U/ μL),1 μL DNA(10 ng/ μL),无菌双蒸水 20.2 μL 。将反应体系混匀,离心后置于 PCR 仪中进行反应,每个反应重复 2 次。用无菌双蒸水作空白对照,阳性对照采用含有小麦印度腥黑穗病菌的 DNA 作为模板,阴性对照以其他腥黑穗病菌 DNA 作为模板。

反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min,然后进入循环反应:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,共 25 次循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min。

引物 P12 的扩增体系和反应条件见 D.2.1.2。

E.5 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳见 D.2.1.3。

E.6 结果判定

结果判定见 9.3.1。

附录 F
(规范性附录)

孢子培养物实时荧光 PCR 检测

F.1 孢子萌发

孢子萌发见 E.1。

F.2 孢子培养物的核酸制备

孢子培养物的核酸制备见 E.2。

F.3 DNA 纯度与浓度的测定

DNA 纯度与浓度的测定见 E.3。

F.4 普通探针实时荧光 PCR 检测

F.4.1 引物及探针序列

引物及探针序列为：

引物序列同 E.4.1。

探针序列为：5'-FAM-ATTCCCGGCTTCGGCGTCACT-TAMRA-3'

F.4.2 反应体系及条件

反应体系总体积为 25 μL ，各成分为：实时荧光反应混合液 12.5 μL *TaqMan Universal PCR Master Mix*，1 μL 各引物 (10 $\mu\text{mol/L}$)，1 μL 探针 (10 $\mu\text{mol/L}$)，1 μL DNA (10 $\text{ng}/\mu\text{L}$)，无菌双蒸水 8.5 μL 。将反应体系混匀，离心后置于实时荧光 PCR 仪中进行反应，每个反应重复 2 次。用无菌双蒸水作空白对照，阳性对照采用含有小麦印度腥黑穗病菌的 DNA 作为模板，阴性对照以其他腥黑穗病菌 DNA 作为模板。

反应条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ 预热 2 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min，然后进入循环反应：95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s，60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，共 34 次循环。

对实时荧光 PCR 仪的程序进行设置，使仪器能进行 FAM 荧光的检测。

F.5 MGB 探针实时荧光 PCR 检测

F.5.1 引物及探针序列

引物及探针序列同 D.2.2.1。

F.5.2 反应体系及条件

反应体系总体积为 5 μL ，各成分分别为：实时荧光反应混合液 2.5 μL *TaqMan Universal PCR*

Master Mix, 0.45 μL 各引物(10 $\mu\text{mol/L}$), 0.1 μL 探针(10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL DNA(10 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 无菌双蒸水 0.5 μL 。将反应体系混匀, 离心后置于实时荧光 PCR 仪中进行反应, 每个反应重复 2 次。用无菌双蒸水作空白对照, 阳性对照采用含有小麦印度腥黑穗病菌的 DNA 作为模板, 阴性对照以其他腥黑穗病菌 DNA 作为模板。

反应条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ 预热 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 然后进入循环反应: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 40 次循环。

对实时荧光 PCR 仪的程序进行设置, 使仪器能进行 FAM 荧光的检测。

F.6 实时荧光 PCR 检测结果判定和表述

实时荧光 PCR 检测结果判定和表述见 9.3.2。

附录 G
(规范性附录)
序列测定与比对

G.1 PCR 扩增

用 rDNA ITS 片段 PCR 扩增方法如下:

ITS4 引物序列:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITS5 引物序列:5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

反应体系总体积为 25 μL ,各成分为:2.5 μL 10 \times PCR 缓冲液[Tris-HCl (pH8.0)10 mmol/L, Mg^{2+} 1.5 mmol/L, KCl 50 mmol/L],2 μL dNTPs (2.5 mmol/L),1.25 μL 各引物(10 $\mu\text{mol/L}$),0.3 μL *Taq* 酶(5 U/ μL),1 μL DNA (10 ng/ μL),无菌双蒸水 16.7 μL 。

反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min,然后进入循环反应:95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 35 次循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。

电泳检测见 D.2.1.3。对符合条件的 PCR 产物进行纯化,直接测序,具体操作步骤见相关试剂盒说明书。也可将 PCR 产物送到生物公司进行测序。

也可以用附录 D、附录 E 中的常规 PCR 引物进行 PCR 扩增。

G.2 序列比对

把测序所得的核苷酸序列与已知的小麦印度腥黑穗病菌的相对应的序列进行比对。

G.3 结果判定

结果判定见 9.4。
