

Настоящий диагностический протокол был принят Комитетом по стандартам от лица Комиссии по фитосанитарным мерам в январе 2014 г.

Настоящее приложение является предписывающей частью МСФМ 27:2006.



МСФМ 27
Приложение 4

МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ПО ФИТОСАНИТАРНЫМ МЕРАМ

МСФМ 27 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ

ДП 4: *Tilletia indica* Mitra

(2014 год)

СОДЕРЖАНИЕ

1. Информация о вредном организме	3
2. Таксономическая информация	3
3. Выявление	3
3.1 Проверка семян/зерна.....	4
3.2 Выделение телиоспор из семян/зерна, тест-промывание через сита с отверстиями определенного диаметра.....	5
4. Идентификация.....	6
4.1 Морфология телиоспор	6
4.1.1 Морфологическая идентификация.....	6
4.1.2 Морфологическое сравнение с другими видами <i>Tilletia</i>	7
4.2 Выделение и проращивание телиоспор.....	7
4.2.1 Проращивание телиоспор	7
4.2.2 Проращивание видов подобных <i>Tilletia</i>	11
4.2.3 Восстановление отдельных телиоспор	11
4.3 Молекулярная идентификация.....	11
4.3.1 Анализ рестриктазы области ITS1	12
4.3.2 Обычный ПЦР-анализ с использованием видоспецифичных праймеров.....	13
4.3.3 ПЦР-анализ с использованием видоспецифических праймеров и флуоресцентного зонда	14
4.3.4 Прямая ПЦР в реальном времени на телиоспорах	15
4.3.4.1 Амплификация ДНК <i>Tilletia</i> до проведения ПЦР в реальном времени	15
4.3.4.2 Пятифрагментарный флуоресцентный ПЦР-анализ в реальном времени для идентификации видов	15

5. Данные	17
6. Контактные адреса для дополнительной информации	18
7. Благодарность	18
8. Справочные материалы.....	18
9. Рисунки.....	21

1. Информация о вредном организме

Tilletia indica Mitra вызывает карнальскую головню пшеницы, также известную как индийская головня пшеницы (*Triticum* spp.). Карнальская головня была впервые описана в городе Карнал в Индии в 1931 году. Патоген широко распространен в некоторых частях Южной Азии и Юго-Западной Азии (USDA, 2007; Wiese, 1987). Кроме того, он также был выявлен в некоторых районах США и Мексики и в Южной Африке (Crous *et al.*, 2001; Fuentes-Davila, 1996).

Растения-хозяева включают *Triticum aestivum*, *Triticum durum* и *Triticum aestivum* × *Secale cereale*. Оповещение о выявлении на *Triticum aestivum* × *Secale cereale* редки, однако *Secale* spp. может потенциально быть растением-хозяином (Sansford *et al.*, 2008). Были случаи заражения *T. indica* других видов трав в тепличных условиях, но он никогда не выявлялся в полях на этих альтернативных растениях-хозяевах (Inman *et al.*, 2003).

T. indica является патогеном, заражающим головней соцветия. Семена инфицируются через зародышевую часть ядра, гриб развивается внутри перикарпия, где он образует порошкообразную коричневатую-черную массу телиоспор. Свежие массы со спорами производят зловонный запах (триметиламин), похожий на запах гниющей рыбы. В отличие от системной головни, обычно инфицируются не все семена колоска растения-хозяина, и колосья с зараженными семенами не отличаются по внешнему виду от здоровых колосьев (рис. 1). Семена обычно лишь частично колонизированы, на них проявляются заражения различной степени (рис. 2). Поэтому очень трудно выявить болезнь в полевых условиях. Симптомы обычно не видны до сбора урожая, если только уровень заражения невысок.

T. indica снижает качество зерна, что связано с обесцвечиванием и приданием зерну и продуктам из него нежелательного запаха. Он также вызывает небольшое снижение урожайности. Как правило, *Triticum aestivum*, в которой содержится более 3% ядер с головней, считается не подходящей для потребления в пищу. (Fuentes-Davila, 1996).

Есть и другие виды *Tilletia*, которые можно перепутать с *T. Indica*, они обычно встречаются в собранном урожае зерна или в семенах. Среди них *Tilletia walkeri* (патоген *Lolium perenne* и *Lolium multiflorum*), *T. horrida* (патоген *Oryza* spp.) и *T. ehrhartae* (патоген *Ehrharta calycina*). В Австралии *T. walkeri* и *T. ehrhartae* выявлены как засоряющие вредные организмы на собранном урожае семян *Triticum aestivum*. *T. walkeri* и *T. horrida* присутствуют в США и выявлены на собранном урожае семян *Triticum aestivum*, особенно там, где *Oryza* spp. и *Lolium* spp. выращиваются по очереди с *Triticum aestivum* (Castlebury, 1998; Castlebury and Carris, 1999; Pascoe *et al.*, 2005). В связи с морфологическим сходством этих патогенов важна точная идентификация.

2. Таксономическая информация

Название:	<i>Tilletia indica</i> Mitra, 1931 год
Синонимы:	<i>Neovossia indica</i> (Mitra) Mundkur, 1941 год
Таксономическая позиция:	Eukaryota, Fungi, Basidiomycota, Ustilaginomycotina, Exobasidiomycetes, Exobasidiomycetidae, Tilletiales, Tilletiaceae
Обычное название:	Карнальская головня или индийская головня
Референтный материал:	Mycobank 267835

3. Выявление

Диагностическая схема *T. Indica*, представленная на рисунке 3, описывает процедуры для выявления телиоспор в семенах или зерне растений-хозяев. Образцы семян или зерна подлежат внешней проверке на наличие ядер с головней (раздел 3.1). Если выявляются ядра с головней, телиоспоры можно удалить и идентифицировать *T. indica* по морфологическим признакам (раздел 4.1).

Если ядра с головней не выявлены в образце, образец можно проверить на наличие телиоспор, используя тест-промывание через сита с отверстиями определенного диаметра на трех навесках (раздел 3.2). Тем не менее такое тестирование может не отличить зараженное зерно от зерна, засоренного телиоспорами на поверхности семян. Если телиоспоры не выявлены после теста-промывания через сита с отверстиями определенного диаметра, диагностический результат выборки является отрицательным. Если выявлены телиоспоры, по количеству выявленных телиоспор определяют, какой метод может быть использован для идентификации:

- Если выявлено 10 или более телиоспор, первым шагом является идентификация видов телиоспор (раздел 4.1) по морфологическим признакам. Если требуется дальнейшее подтверждение, следующим шагом будет *либо* выделение и проращивание телиоспор (раздел 4.2.1), а затем молекулярные протоколы, описанные в разделах 4.3.1-4.3.3, *либо* удаление отдельных телиоспор (раздел 4.2.3), а затем проведение прямой полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени на отдельных телиоспорах (раздел 4.3.4) (см. А, В и С на рис. 3).
- Если выявлено менее 10 телиоспор, для надежного установления различий между *T. Indica* и аналогичными видами настоятельно рекомендуется повторить тест-промывание через сита с отверстиями определенного диаметра на новых навесках. Предел выявления может быть равен регламентационному пределу или отличаться от него.

В этом диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия брендов) описываются в порядке их опубликования, поскольку они определили изначальный полученный уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости.

3.1 Проверка семян/зерна

Непосредственная визуальная проверка либо на наличие ядер с головней, либо телиоспор, засоряющих семена или поверхности зерна, не считается надежным методом в фитосанитарных целях. Тем не менее, ядра с головней могут быть выявлены при визуальной проверке невооруженным глазом в сочетании с изучением под микроскопом с малым увеличением (10-40-кратное увеличение). Настоящий протокол основан на проверке образца семян или зерна объемом 1 кг; весь образец должен быть проверен на наличие ядер с головней (рис. 2) или других семян злаковых (Poaceae, например *Lolium* spp.). Симптомы наблюдают и записывают наличие других семян Poaceae.

Если ядра с головней присутствуют, положительный диагноз может быть поставлен на основе морфологии телиоспор. Следует подготовить предметные стекла с телиоспорами и описать морфологию этих телиоспор. Если морфология телиоспор соответствует признакам *T. Indica* (см. раздел 4.1 и рис. 4-8), может быть поставлен положительный диагноз.

Чтобы помочь визуализировать симптомы, ядра можно замочить в 0,2% NaOH в течение 24 ч при температуре 20°C, что мягко отбеливает эндосперм и контрастно выделяет почерневшие зараженные участки. Этот процесс особенно полезен для химически обработанных партий семян, на которых цветные красители могут скрывать симптомы (Agarwal and Mathur, 1992; Mathur and Cunfer, 1993). При тяжелом заражении и засорении телиоспоры можно увидеть на поверхности семян (Mathur and Cunfer, 1993).

При отсутствии ядер с головней можно использовать тест-промывание через сита с отверстиями определенного диаметра (раздел 3.2) для определения того, присутствует или не присутствует *T. indica* в образце. Кроме того, при отсутствии ядер с головней можно считать, что *T. Indica* отсутствует. Если выявлено засоряющее образец семя *Lolium* spp., существует высокая вероятность того, что *T. walkeri* будет выявлен в образце.

3.2 Выделение телиоспор из семян/зерна, тест-промывание через сита с отверстиями определенного диаметра

Тест-промывание через сита с отверстиями определенного диаметра является надежным методом выявления телиоспор *T. Indica* в необработанном образце *Triticum aestivum*, *Triticum durum* или *Triticum aestivum* × *Secale cereale*. Важно проверить, как минимум, три повторные навески, каждая объемом 50 г, чтобы гарантировать выявление телиоспор, если они присутствуют в образце (см. таблицу 1 для числа выборок, необходимых для выявления различного числа телиоспор). Этот метод в среднем имеет 82%-ную эффективность восстановления, и для исследования под микроскопом обычно требуются только несколько предметных стекол на 50 г образца. Метод описан ниже, более подробная информация приведена в работах Инмана и др. (Inman *et al.*, 2003), Петесона и др. (Peterson *et al.*, 2000) и Райта и др. (Wright *et al.*, (2003). Предел выявления может быть равен регламентационному пределу или отличаться от него.

Важно замочить перед использованием все оборудование в течение 15 мин. в дезинфицирующем растворе (1,6% гипохлорита натрия (NaOCl) активного ингредиента), чтобы исключить риск ложных срабатываний при перекрестном засорении от предыдущих образцов. Дезинфицирующий раствор убивает телиоспоры и делает их прозрачными по сравнению с их обычным темным, окрашенным пигментом внешним видом. После замачивания все оборудование промывают водопроводной водой.

50-граммовый образец необработанных семян помещают в колбу Эрленмейера (250 мл) со 100 мл водного раствора 0,01% Tween 20. Образец помещают на шейкер на 3 мин. при 200 оборотах в минуту, чтобы выделить телиоспоры, затем переливают через сито с отверстиями диаметром 53 мкм в сито с отверстиями диаметром 20 мкм, которое размещено внутри воронки в верхней части другой колбы (500 мл). Колбу, в которой был образец, затем дважды промывают стерильной водопроводной водой, приблизительно 50 мл каждый раз: промывную воду выливают на образец через сито. После этого образец промывают стерильной водопроводной водой (200-300 мл), используя отсосную склянку, чтобы обеспечить хорошее удаление телиоспор из семян. Образец и сито с отверстиями диаметром 53 мкм удаляют. Сито с отверстиями диаметром 20 мкм наклоняют под углом 45° и с помощью отсосной склянки со стерильной водопроводной водой промывают остатки семян на сите сверху вниз широким движением в сторону, двигая сито назад и вперед. Этот процесс вымывает из образца все телиоспоры, оставшиеся в нижней части сита. Затем телиоспоры и остатки семян промывают в конической пробирке для центрифуги объемом 15 мл. Важно использовать полипропиленовые пробирки, так как телиоспоры прилипают к стенкам пробирки из поликарбоната, что приводит к ложным результатам. Эти действия повторяют, пока сито с отверстиями 20 мкм не станет чистым. Итоговый объем пробирки – примерно 8 мл. Если необходимо, сито с отверстиями 20 мкм можно рассмотреть под микроскопом с малым увеличением для проверки на наличие остаточных телиоспор.

Собранную суспензию центрифугируют при 1000 *g* в течение 3 мин., чтобы собрать телиоспоры, так как они плотнее, чем большая часть остатков семян, собранных в ходе теста-промывания. Уравнение для расчета относительной центробежной силы (RCF (*g*)) в оборотах в минуту – $RCF = 1.12 r_{\max} (r.p.m./100)^2$, где r_{\max} – максимальный радиус (мм) от центра вращения до нижней части центрифужной пробирки. Супернатант осторожно удаляют, не нарушая осадок в пробирке, используя новые одноразовые пипетки Пастера. Осадок затем можно рассмотреть под микроскопом. Если осадок слишком густой, для разбавления суспензии можно добавить воду, перед исследованием под микроскопом осадок перемешивают наконечником пипетки, чтобы суспензия стала однородной.

Весь осадок суспензии наносится на предметное стекло микроскопа каплями объемом 20 мкл и накрывается покровным стеклом. Слайды изучают при помощи микроскопа по методу светлого поля при 20-40-кратном увеличении. Важно изучить на наличие телиоспор каждый квадратный миллиметр суспензии на предметном стекле. Если найдены телиоспоры, записывают

морфологические характеристики (например размер, цвет и орнамент) и количество телиоспор, найденных на каждом предметном стекле.

Таблица 1. Количество повторных навесок объемом 50 г, необходимых для выявления различных уровней засорения с заданным уровнем достоверности, с допущением равномерного распределения телиоспор (Peterson *et al.*, 2000)

Уровень засорения (количество телиоспор на 50 г образца)	Кол-во повторных навесок, необходимое для выявления в соответствии с уровнем достоверности (%)		
	99%	99,9%	99,99%
1	3	5	6
2	2	3	4
5	1	1	1

4. Идентификация

Идентификация *T. Indica* основывается либо (а) на симптомах на ядрах и морфологии телиоспор, или (б) на морфологии телиоспор и выявлении уникальной последовательности ДНК с помощью одного из методов ПЦР (см. рис. 3).

4.1 Морфология телиоспор

Когда при тесте-промыывании через сита находят подозрительные телиоспоры, ядра как из промытых навесок, так и из основного образца могут быть повторно проверены на наличие симптомов. Если симптомы найдены, их следует подтвердить путем изучения телиоспор под микроскопом. Любые семена трав, найденные в образце, также должны быть проверены на наличие признаков заражения головней и, если они найдены, соответствующие телиоспоры следует рассмотреть под микроскопом. Если телиоспоры, найденные при тесте-промыывании через сита, такие же, как и на ядрах с головней, можно поставить диагноз. Если, однако, ядра с головней не выявлены в выборке большего размера, для идентификации рекомендуется провести анализ одним из молекулярных методов (разделы 4.3.1-4.3.4).

В таблице 2 приведены морфологические характеристики телиоспор *T. indica*, а также телиоспор общего вида *Tilletia*, которые можно найти в семенах или партиях зерна и спутать с *T. Indica*.

4.1.1 Морфологическая идентификация

Телиоспоры *T. indica* шаровидные или округлые, иногда с небольшим фрагментом, имеющим гифы (более распространен на незрелых телиоспорах, но иногда выявляется и на зрелых телиоспорах), в основном 22-47 мкм в диаметре, иногда больше, до 64 мкм (средний 35-41 мкм); от бледного оранжево-коричневого до темно-красновато-коричневого цвета; зрелые телиоспоры черные и непрозрачные (рис. 4 и 5); с плотным орнаментом, имеющим четкое указание в направлении усеченного шипа, иногда с изогнутыми верхушками, 1,4-5,0 (-7,0) мкм в высоту, что при рассмотрении со стороны поверхности выглядит либо как отдельные шипы (плотно окруженные короткими шипами), либо как близко расположенные узкие хребты (четко имеющие сходство с рельефом коры головного мозга) (рис. 4 и 5); шипы покрыты тонкой гиалиновой мембраной (Carris *et al.*, 2006; СМІ, 1983).

Стерильные клетки *T. Indica* шаровидные или округлые, иногда каплевидной формы, желтовато-коричневые, 10-28 мкм×48 мкм, с маленьким острием (короткая ножка) или без

него, с гладкими стенками до 7 мкм, многослойные. Стерильные клетки чаще всего не встречаются после промывания через сито (Carris *et al.*, 2006; СМІ, 1983).

Если после теста-промывания через сито выявлено 10 или более телиоспор, можно подтвердить морфологическую идентификацию. Если выявлено менее 10 телиоспор, морфологические характеристики не считаются абсолютно надежными для достоверной идентификации (EPPO, 2007). В этом случае рекомендуется повторный отбор проб из образца путем подготовки новых навесок из первоначального образца объемом 1 кг и их проверки.

4.1.2 Морфологическое сравнение с другими видами *Tilletia*

Наиболее важные морфологические характеристики, которые различают *T. indica*, *T. walkeri*, *T. horrida* и *T. ehrhartae*, – это размер телиоспор (диапазон и значение), орнамент и цвет (табл. 2; рис. 4-8). В опубликованных отчетах часто приводятся различные значения размера спор. Размер спор зависит от заливочной среды и тепловой обработки. Паскоэ и др. (Pascoe *et al.*, 2005) показал, что в Австралии *T. walkeri* и *T. ehrhartae* часто засоряют собранный урожай *Triticum aestivum*. В Соединенных Штатах морфологически и генетически схожий грибок *T. walkeri*, а также *T. horrida* известны как засорители собранного урожая *Triticum aestivum* (Castlebury and Carris, 1999; Cunfer and Castlebury, 1999; Smith *et al.*, 1996). Кроме видов *Tilletia*, указанных в таблице 2, другие виды *Tilletia* с бугорковидными спорами можно спутать с *T. indica* (Durán, 1987; Durán and Fischer, 1961; Pimentel *et al.*, 1998). Выявление этих видов как засоряющих *Triticum aestivum* менее вероятно. Они включают *Tilletia barclayana sensu lato* (головня различных видов Poaceae, напр. *Panicum* и *Paspalum*), *Tilletia eragrostidis* (на *Eragrostis*), *Tilletia inolens* (на *Lachnagrostis filiformis*), *Tilletia rugispora* (на *Paspalum*) и *Tilletia boutelouae* (на *Bouteloua gracilis*). Не было выявлено, чтобы какой-либо из этих морфологически схожих видов инфицировал *Triticum aestivum* естественным путем.

Профили шипов срединных телиоспор можно улучшить путем отбеливания телиоспор в 10%-м NaOCl в течение 15-20 мин. При необходимости телиоспоры затем можно промыть дважды в воде и окрасить, например, в трипановый синий или синий для хлопка цвет при помощи глицерина-лакто (рис. 8).

4.2 Выделение и проращивание телиоспор

В настоящее время существуют два метода подтверждения идентификации телиоспор, выявленных в ходе теста-промывания через сита (раздел 3.2). Существует стандартная процедура восстановления телиоспор с предметного стекла и стимулирования их проращивания (раздел 4.2.1), а также новая процедура, разработанная Таном и др. (Tan *et al.*, 2009), которая позволяет провести ПЦР непосредственно на одной телиоспоре, восстановленной с предметного стекла (раздел 4.2.3).

4.2.1 Проращивание телиоспор

T. indica является условным биотрофом. Для получения культур телиоспоры замачивают в воде, быстро стерилизуют поверхность, а затем проращивают на чашках с водяным агаром.

Телиоспоры могут быть восстановлены с предметных и покровных стекол путем промывания их дистиллированной водой через сито с отверстиями диаметром 20 мкм в чистую стерильную коническую пробирку для центрифуги (как в разделе 3.2). Объем должен быть приблизительно 3-5 мл. Пробирки инкубируют в течение ночи при температуре 21°C для увлажнения телиоспор, а также для того, чтобы сделать грибковые и бактериальные засорители более восприимчивыми к последующей поверхностной стерилизации. После инкубации в течение ночи телиоспоры осаждают центрифугированием при 1200 g в течение 3 мин.

Супернатант удаляют, а телиоспоры стерилизуют путем суспендирования осадка в 5 мл раствора гипохлорита кальция (0,3-0,5% NaOCl активного ингредиента), быстрого переворачивания пробирки три раза и центрифугирования при 1200 g в течение 1 мин. Некоторые телиоспоры могут быть уничтожены, если время воздействия гипохлорита кальция

превысит 2 мин. В качестве альтернативы обработке гипохлоритом кальция телиоспоры можно поверхностно стерилизовать в течение 30 мин в 5-10 мл окисленной электролизованной воде (АЕВ). АЕВ эффективно стерилизует поверхность телиоспор, но, по сравнению с обработкой гипохлоритом кальция в течение 1-2 мин, стимулирует, а не снижает прорастание телиоспоры (Bonde *et al.*, 1999). Телиоспоры затем промывают дважды, удаляя супернатант, ресуспендируя осадок в 1 мл стерильной дистиллированной воды (SDW) и центрифугируя при 1200 g в течение 5 мин.

Осадок ресуспендируют в 1 мл стерильной дистиллированной воды, 200 мкл суспензии телиоспор помещают в асептических условиях в чашки с 2%-м водяным агаром с антибиотиками (WA + A) и рассеивают с помощью стерильного рассеивателя. Используемые антибиотики: 60 мг пенициллин-G (натриевая соль) и 200 мг стрептомицина сульфата на литр агара (EPPO, 2007). Чашки с WA+A инкубируют при температуре 21 °C при 12-часовой продолжительности светового дня. Чашки выдерживают приблизительно в течение 5 дней до герметизации или упаковки в прозрачные полиэтиленовые пакеты.

Через 7-14 дней не находящиеся в состоянии покоя телиоспоры производят промицелий, несущий 32-128 или более базидиоспор (первичный споридий) на своей верхушке. Эти колонии обычно производят вторичные споридии двух типов: нитевидные и аллантоидные. Их можно культивировать непосредственно на твердой среде (рис. 9) или на жидкой питательной среде, например, на картофельно-декстрозном бульоне. Вырезают небольшие блоки агара (1 см×1 см) с пророщенными телиоспорами или колониями и затем прикрепляют их на нижнюю сторону крышки чашки Петри таким образом, чтобы пророщенная телиоспора была обращена к поверхности бульона. Это позволяет выпустить споридии на поверхность бульона. Чашки инкубируют при температуре 21 °C при 12-часовой продолжительности светового дня. Через 2-3 дня базидиоспоры, нанесенные на поверхность бульона, производят небольшую пленку мицелия диаметром примерно 0,5-1,0 см. Каждая пленка мицелия удаляется стерильной препаровальной иглой и прикладывается к стерильной фильтровальной бумаге, чтобы удалить излишний бульон. Мицелий помещается в подходящие пробирки (например микроцентрифужные пробирки объемом 1,5-2,0 мл) для непосредственного выделения ДНК или хранится при температуре -80 °C для последующего выделения ДНК.

Не всегда возможно провести прорастание телиоспор для молекулярного анализа, например, если семена обработаны NaOH, как в случае с зерном, обработанным фунгицидами. Увеличение количества просеянных навесок может увеличить количество восстановленных телиоспор и, следовательно, количество телиоспор, которые могут быть пророщены. Телиоспоры могут быть в состоянии покоя, что может негативно отразиться на прорастании (Carris *et al.*, 2006). Эту проблему можно решить путем проведения прямой ПЦР в реальном времени на отдельных телиоспорах (см. раздел 4.3.4).

Таблица 2. Морфологические характеристики телиоспор *Tilletia Indica*, *Tilletia walkeri*, *Tilletia horrida* и *Tilletia ehrhartae* и растения-хозяева, связанные с этими четырьмя видами

Вид	Размер телиоспоры (мкм)	Размер телиоспоры (средний) (мкм)	Цвет телиоспоры	Форма телиоспоры	Оболочка телиоспоры	Шипы телиоспоры	Растения-хозяева
<i>T. indica</i> ^a	22-64	35-41	Бледно оранжево-коричневая или темно-красно-коричневая, зрелые споры черные или непрозрачные	Шаровидная или округлая	Присутствует	1,4-5(-7) мкм Сверху плотно окружены короткими шипами или выглядят как близко расположенные узкие хребты (четко имеющие сходство с рельефом коры головного мозга). Сбоку более гладкие, более полный контур из-за шипов, которые плотно расположены, иногда с изогнутыми концами.	<i>Triticum</i> spp.
<i>T. walkeri</i> ^b	28-35	30-31	От бледно-желтого до темного красновато-коричневого цвета (не бывает ни черной, ни непрозрачной)	Шаровидная	Присутствует, распространяется до верхушек проекций, гиалиновая или желтовато-коричневая	3-6 мкм Грубые + / - имеющие сходство с рельефом коры головного мозга. Широкие неполные хребты, имеющие сверху сходство с рельефом коры головного мозга. Сбоку профиль нерегулярный, с зазорами между шипами.	<i>Lolium perenne</i> и <i>Lolium multiflorum</i>
<i>T. horrida</i> ^c	14-36 (зрелые <25)	24-28	Светлая или темно-каштановая, может быть полупрозрачной	Шаровидная или округлая	Присутствует, распространяется до конца шипов, гиалиновая или тонированная	1,5-4 мкм Часто изогнутые, сверху выглядят как ломаные чешуйки.	<i>Oryza</i> spp.
<i>T. ehrhartae</i> ^d	17-25	Нет данных	Очень темная, оливково-коричневая, когда зрелая. Может быть непрозрачной	Шаровидная или округлая	Присутствует, распространяется до конца шипов или немного	1-2,5 мкм Цилиндрические или слегка конические шипы. Сверху редко напоминают рельеф	<i>Ehrharta calycina</i>

Вид	Размер телиоспоры (мкм)	Размер телиоспоры (средний) (мкм)	Цвет телиоспоры	Форма телиоспоры	Оболочка телиоспоры	Шипы телиоспоры	Растения-хозяева
			из-за меланизации чешуек.		дальше	коры головного мозга. Большие, острые полигональные шипы. Сбоку широко усеченные, вплоть до слегка закругленных на верхушке.	

Примечания: ^aНа основе работы Инмана и др. (Inman *et al.*, 2003). ^bНа основе работ Castlebury, 1998; Milbrath *et al.*, 1998; Castlebury and Carris, 1999; Cunfer and Castlebury, 1999. ^cAs *T. barclayana*: Durán and Fischer, 1961; CMI, 1965; Durán, 1987; Castlebury and Carris, 1999. Как *T. horrida*: Khanna and Payak, 1968; Aggarwal *et al.*, 1990; Castlebury, 1998. ^dPascoe *et al.*, 2005.

4.2.2 Проращивание видов подобных *Tilletia*

На культуре *T. walkeri* и *T. indica* образуют очень похожие колонии. На картофельно-декстрозном агаре (КДА) через 14 дней при температуре 19°C и 12-часовой продолжительностью светового дня оба вида обычно производят медленно растущие нерегулярные колонии от белого до кремового цвета, имеющие твердый покров, примерно 4-6 мм в диаметре (рис. 9). В отличие от этого, сопоставимые культуры *T. horrida* растут значительно медленнее (колонии только 2-3 мм в диаметре) из-за более высокой оптимальной для них температуры. Изоляты *T. horrida* могут также производить красновато-фиолетовый пигмент (рис. 9), как на КДА, так и на картофельно-декстрозном бульоне.

4.2.3 Восстановление отдельных телиоспор

После того, как телиоспоры изучены и записаны их морфологические характеристики, можно высушить предметное стекло, либо вместе с покровным стеклом, либо без него. Когда покровное стекло удаляется, его помещают на предметное стекло обратной стороной, чтобы его можно было проверить на наличие телиоспор, прилипших к нему.

На другое предметное стекло помещают один кусочек покровного стекла, полученного путем разрезания на мелкие кусочки (1×1 мм²), который был стерилизован (в автоклаве при температуре 121°C в течение 15 мин или в печи при температуре 170°C в течение 2 ч). Каплю буферного раствора, состоящего из 1 мкл Трис-этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) (TE), помещают на этот кусочек покровного стекла. Либо под биологическим микроскопом, либо при помощи препаровальной лупы одну телиоспору поддевают очень тонкой иглой и помещают в каплю буферного раствора TE. Телиоспора перейдет в каплю. При помощи щипцов другой стерилизованной небольшой кусочек покровного стекла кладут сверху, чтобы получился "сэндвич". Телиоспора измельчается путем надавливания щипцами на покровное стекло, а затем "сэндвич" из стекла переносят в ПЦР-пробирку объемом 0,2 мл. Далее покровное стекло дробится кончиком пипетки (Tan *et al.*, 2009).

Следующая затем процедура описана в разделе 4.3.4.1.

4.3 Молекулярная идентификация

Есть целый ряд молекулярных методов, доступных для идентификации *T. indica*. Можно использовать любой из способов, описанных ниже, однако важно, чтобы справочный материал (положительный контроль) был получен от специалистов в этой области (см. раздел 6).

Первые три протокола, описанные ниже, хорошо работают, но полагаются на проращивание телиоспоры, при которой может быть получено достаточно материала ДНК из образовавшейся пленки мицелия. Проращивание телиоспоры может занять до трех недель. Петерсон и др. (Peterson *et al.*, 2000) определили, что средняя норма проращивания телиоспор составляет 55%, что значительно снижает шансы идентификации телиоспор этими тремя молекулярными методами. Затем описывается четвертый молекулярный протокол, который не полагается на проращивание телиоспор.

Существуют диагностически значимые различия ядерной и митохондриальной (мт) ДНК между *T. Indica*, *T. walkeri* и *T. horrida*. Межвидовые полиморфизмы были определены с помощью различных методов ПЦР, в том числе случайной амплификации полиморфной ДНК (RAPD), полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP) и амплифицированного полиморфизма длины фрагмента (AFLP) (Laroche *et al.*, 1998; Pimentel *et al.*, 1998). В первой и второй областях внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS) ядерной рибосомной (г) ДНК более 98% сходства между последовательностями *T. walkeri* и *T. indica* (Levy *et al.*, 2001). Однако, в пределах области ITS1, *T. walkeri* имеет диагностически значимый участок рестриктазы (*Scal*), который отсутствует у *T. Indica*, *T. horrida* или других близкородственных видов (Levy *et al.*, 2001; Pimentel *et al.*, 1998). Различия в последовательностях мтДНК позволили разработать видоспецифичные праймеры для *T. indica* и *T. walkeri* (Frederick *et al.*,

2000). Эти праймеры могут быть использованы в обычных ПЦР-анализах, в системе TaqMan® в сочетании с зондом (Frederick *et al.*, 2000) или при мультиплексном анализе в реальном времени с пятью зондами (Tan *et al.* 2009).

4.3.1 Анализ рестриктазы области ITS1

Целевой областью гена является ITS область ядерного гена рРНК (Pimentel *et al.*, 1998). Производимый ПЦР-ампликон включает в себя как ITS1 и ITS2, так и консервативный фрагмент 5.8S. Этот ампликон содержит примерно 670 пар оснований (п.о.), включая последовательности праймеров. Олигонуклеотиды, используемые для *T. indica*:

Прямой праймер ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

Обратный праймер ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White *et al.*, 1990).

ДНК выделяют из мицелия. Это делается либо путем измельчения мицелия с помощью ступки и пестика, либо путем помещения примерно 0,1 г мицелия в стерильную микроцентрифужную пробирку объемом 2 мл, наполненную на одну треть стерильными стеклянными шариками диаметром 0,5 мм и 1 мл воды для молекулярной биологии (MGW). Пробирка плотно закрывается ввинчивающейся крышкой с уплотнительным кольцом и подвергается колебаниям в гомогенизаторе типа beadbeater или типа tissue lyser на четверть мощности в течение 5 мин. Измельченную пробу оставляют на 30 с, затем ее ДНК выделяют при помощи специального набора для выделения ДНК грибов. Очистка ДНК не требуется. Выделенную ДНК можно использовать немедленно, хранить при температуре 4°C в течение ночи или при температуре – 20 °C в течение более длительного периода времени.

ПЦР для получения рестрикционного ампликона использует следующий мастер-микс (концентрация на одну реакцию объемом 50 мкл): 1×ПЦР-буфер (содержащий 1,5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems))¹, 0,2 mM каждого dNTP, 1,25 мкл AmpliTaq (5 ед/мкл) (Applied Biosystems)¹, 0,5 мкМ каждого праймера и 1 мкл выделенной ДНК. Параметры цикла ПЦР: денатурация при температуре 94°C в течение 2 мин; 30 циклов при температуре 94°C в течение 1 мин, при температуре 54°C в течение 1 мин и при температуре 72°C в течение 1 мин. и этап элонгации при температуре 72°C в течение 10 мин.

Рестрикция ПЦР-ампликона делается следующим образом. Рестрикционная смесь (концентрация на одну реакцию объемом 20 мкл): 7,3 мкл MGW, 2,0 мкл рестрикционного буфера (Promega)², 0,2 мкл бычьего сывороточного альбумина (10 мкг/мкл), 0,5 мкл рестриктазы (либо TaqI, либо ScaI при 10 ед/мкл (Promega))² и 10,0 мкл чистого раствора ДНК-ампликона, полученного согласно описанию выше (> 50 нг/мкл ДНК). Эту смесь инкубируют в течение 3 ч при температуре 37°C, реакционную смесь осторожно перемешивают методом инверсии в процессе инкубации. Рестрикционные продукты хранят при температуре 4°C перед визуализацией на геле. При необходимости 10 мкл реакционного продукта загружается с подходящим маркером и прогоняется на 2%-м геле.

Анализ положителен для *T. indica*, если амплифицированные испытательные образцы с сокращениями рестриктазой TaqI дают пять продуктов (происходящих на 60, 70, 110, 170 и 260 п.о.) и нет сокращений ScaI. Положительный результат для *T. walkeri* получается, если в

¹ Использование в этом диагностическом протоколе продуктов бренда Applied Biosystems не требует их утверждения и не исключает применения других продуктов, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не представляет собой утверждение КФМ названных веществ, реагентов и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет доказано, что они дают такой же результат.

² Использование в этом диагностическом протоколе продуктов бренда Promega не требует их утверждения и не исключает применения других продуктов, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не представляет собой утверждение КФМ названных веществ, реагентов и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет доказано, что они дают такой же результат.

амплифицируемые анализируемые образцы добавлена рестриктаза TaqI для того, чтобы получить те же пять фрагментов, как и у *T. indica*, но при добавлении в амплифицируемых продукты рестриктазы ScalI получают два фрагмента: при 140 п.о. и 520 п.о. Если амплифицированные продукты получены из *T. horrida*, TaqI производит четыре фрагмента ДНК (60, 110, 150 и 335 п.о.), а ScalI не производит сокращений. Другие виды *Tilletia* выдают различные рестрикционные схемы с этими и другими ферментами (Pimentel *et al.*, 1998).

4.3.2 Обычный ПЦР-анализ с использованием видоспецифичных праймеров

Этот анализ был разработан Фредериком и др. (Frederick *et al.*, 2000) при использовании мтДНК³, производящей ампликон из 414 п.о. Олигонуклеотиды, используемые для *T. indica*:

Прямой праймер Tin 3 (5'-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3')

Обратный праймер Tin 4 (5'-CAA CTC CAG TGA TGG CTC CG-3').

ДНК выделяют из мицелия. Это делается путем измельчения 0,5-1,0 г мицелия в микроцентрифужной пробирке объемом 1,5 мл с 75 мкл лизирующего буфера и последующего измельчения стерильным пестиком, прикрепленным к дрели. До выделения ДНК специальным набором для выделения ДНК грибов дополнительно добавляют 75 мкл лизирующего буфера. Очистка ДНК не требуется. Выделенную ДНК можно использовать немедленно, хранить при температуре 4°C в течение ночи или при температуре -20 °C в течение более длительного периода времени.

ПЦР для этого анализа использует следующий мастер-микс (концентрация на одну реакцию объемом 25 мкл): 1x ПЦР-буфера (содержащего 10 mM Трис-НCl, 50 mM KCl (pH 8,3), 1,5 mM MgCl₂ и 0,001% (вес / объем) желатина), дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ, каждый в концентрации 0,1 мкМ; каждый праймер в концентрации 0,1 мкМ; 0,5 ед ДНК полимеразы AmpliTaq; и 1,0 мкл выделенной ДНК, полученной, как описано выше.

Параметры цикла ПЦР: Денатурация при температуре 94°C в течение 1 мин; 25 циклов при температуре 94 °C в течение 15 с, при температуре 65 °C в течение 15 с и при температуре 72°C в течение 15 с; а также этап элонгации при температуре 72°C в течение 6 мин.

При необходимости 10 мкл реакционного продукта загружается с подходящим маркером и прогоняется на 2%-м агарозном геле.

При анализе *T. walkeri*, Tin 3 праймер замещается 0,1 мкл прямого праймера Tin 11 (5'-ТАА TGT TGG CGT GGC AT-3') (25 мкМ). Это приводит к ампликону 414 п.о..

Положительные реакции производят единичный ампликон из 414 п.о., как для *T. indica* (праймеры Tin 3/Tin 4), так и для *T. walkeri* (праймеры Tin 11/Tin 4). Если праймеры, специфичные для *T. walkeri* и *T. indica*, не приводят к положительным результатам на анализируемых образцах (но образцы положительного контроля ДНК положительны), то навески образца принадлежат к другому виду *Tilletia*, например, к *T. horrida*. Рестрикционный анализ может способствовать дальнейшей идентификации видов этих образцов в случае необходимости (п. 4.3.1).

³ Феррейра и его коллеги представили в генетический банк GenBank регистрационные номера AF218058, AF218059 и AF218060. Эти митохондриальные последовательности делят низкую гомологию с митохондриальной последовательностью ДНК *T. indica* с инвентарным номером DQ993184: Результаты BLAST показывают только приблизительно 30% гомологии. Базовая композиция доли АТ в митохондриальной ДНК выше, чем доли GC, которая обычно составляет 30-40% (Kurtzman, 1985), однако, доля АТ в трех последовательностях в GenBank, представленных Феррейра и его коллегами, составляет 43,5%, то есть ниже, чем доля GC (56,55%). (С) Праймеры TIN3/Tin4 не могут митохондриальную ДНК для того, чтобы произвести желаемый ампликон, когда праймеры получены из выделенной и очищенной митохондриальной ДНК *T. indica*; поэтому три представленные последовательности относятся к геномной ДНК.

Кроме того, отсутствие амплификации может быть вызвано ДНК низкого качества. Это можно проверить путем тестирования экстрактов универсальных праймеров (ITS1 и ITS4), описанных в разделе 4.3.1. Если образцы содержат ДНК хорошего качества и, следовательно, анализируемые образцы относятся не к *T. indica* или *T. walkeri*, а к другому виду *Tilletia*, тогда только одна полоса (приблизительно 670 п.о.) будет производиться при работе ПЦР-ампликонов на агарозном геле. Если амплификация так и не происходит, следует выделить новую ДНК и повторно провести анализ.

4.3.3 ПЦР-анализ с использованием видоспецифических праймеров и флуоресцентного зонда

Этот анализ был разработан Фредериком и др. (Frederick *et al.*, 2000) при использовании геномной ДНК, производящей ампликон из 212 п.о.. Олигонуклеотиды, используемые для *T. indica*:

Прямой праймер Tin 3 (5'-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3')

Обратный праймер Tin 10 (5'-AGCTCCGCCTCAAGTTCCTC-3')

RT зонд: TaqMan® зонд (10 мкМ) (Applied Biosystems1): 5'-(FAM label)-ATT CCC GGC TTC GGC GTC ACT-(TAMRA quencher)-3'.

ДНК выделяют из ткани мицелия, как описано в разделе 4.3.2.

ПЦР для этого анализа использует следующий мастер-микс (концентрация на одну реакцию объемом 25 мкл): 1×TaqMan® универсальный мастер-микс, 0,4 мкМ праймеров либо Tin3/Tin10, либо Tin11/Tin10 и 4 мкМ зонда, 12,5 нг геномной ДНК для обоих анализов, специфичных для *T. indica* и *T. walker*, (полученной, как описано в разделе 4.3.2). Параметры цикла ПЦР: при температуре 50°C в течение 2 мин, при температуре 95°C в течение 10 мин и 34 циклов при температуре 95°C в течение 15 с и при температуре 60°C в течение 1 мин.

Следует использовать оптические реакционные пробирки и крышки для контроля амплификации в реальном времени.

При анализе *T. walkeri*, Tin 3 заменяют 1,0 мкл прямого праймера Tin 11 (5'-TAA TGT TGG CGT GGC AT-3') (25 мкМ), который производит ампликон из 212 п.о.

T. indica производит амплификацию с праймерами Tin 3/Tin 10, а *T. walkeri* с праймерами Tin 11/Tin 10. Если ни один из наборов праймеров не производит амплификацию, но контрольные образцы реагируют согласно ожиданиям, то выделенная из образца ДНК принадлежит к другому виду *Tilletia*, например, к *T. horrida*. При анализе на *T. indica* если пороговый цикл (Ct) образца больше 33, этот результат означает отрицательную реакцию для *T. indica*, и очень вероятно, образец относится к другому виду *Tilletia*. Кроме того, при анализе на *T. walkeri*, если Ct больше 33, этот результат означает отрицательную реакцию для *T. walkeri*, и очень вероятно, образец относится к другому виду *Tilletia*. Рестрикционный анализ может способствовать дальнейшей идентификации видов этих образцов в случае необходимости (п. 4.3.1).

Отсутствие амплификации может быть вызвано ДНК низкого качества. Это можно проверить путем тестирования экстрактов универсальных праймеров (ITS1 и ITS4), описанных в разделе 4.3.1. Если образцы содержат ДНК хорошего качества и, следовательно, анализируемые образцы относятся не к *T. indica* или *T. walkeri*, а к другому виду *Tilletia*, тогда только одна полоса (приблизительно 670 п.о.) будет производиться при работе ПЦР-ампликонов на агарозном геле. Если амплификация так и не происходит, следует выделить новую ДНК и повторно провести анализ.

Пределы чувствительности анализов как *T. indica*, так и *T. walkeri* были определены на уровне 5 пг общей ДНК. Эта концентрация производила выявляемые уровни флуоресценции (Frederick *et al.*, 2000). Видовая специфичность анализов была протестирована в отношении ДНК, выделенной из *T. barclayana*, *Tilletia tritici*, *Tilletia laevis*, *Tilletia controversa* и *Tilletia fusca*. Ни

один из этих изолятов не был амплифицирован специфичными для *T. indica* или *T. walkeri* методами (Frederick *et al.*, 2000).

4.3.4 Прямая ПЦР в реальном времени на телиоспорах

Этот анализ был разработан Таном и др. (Tan *et al.*, 2009) для использования области ITS, которая возникает между ядерной малой и большой субъединицами рДНК. Было установлено, что виды *Tilletia* имеют две вариабельные области (ITS1 и ITS2), разделенные сохраненным геном 5,8S рРНК (Levy *et al.*, 2001; Tan and Murray, 2006). Протокол предназначен для первоначальной амплификации ДНК, специфичной для *Tilletia*, и дальнейшего использования ПЦР в реальном времени и флуоресцентных зондов для идентификации видов *Tilletia*. ITS1 область в рДНК была использована в данном исследовании для проектирования мультиплексного анализа; пятифрагментарный флуоресцентный ПЦР-анализ для идентификации близких видов *Tilletia*, выявленных в зерне.

Аликвоту реакционной смеси добавляют в ПЦР-пробирку (из раздела 4.2.3) и, используя тот же конец пипетки, стеклянный "сэндвич" измельчают на куски, чтобы освободить материал спор. Важно следить за тем, чтобы ПЦР-пробирка не повредилась во время дробления.

4.3.4.1 Амплификация ДНК *Tilletia* до проведения ПЦР в реальном времени

Амплификация специфической для *Tilletia* ДНК различных видов *Tilletia* выполняется с использованием праймеров MK56 (5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3') (Tan *et al.*, 1996) и Tilletia-R (5'-CAA GAG ATC CGT TGT CAA AAG TTG-3') (Tan and Murray, 2006). Каждую ПЦР проводят в 20 мкл (одна реакция), содержащих 1,5 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ, 0,5 мкМ каждой пары праймеров и 0,5 единиц Taq ДНК-полимераз (Invitrogen⁴) в 1 × буферном растворе (50 mM Tris (pH 9,0), 20 mM NaCl, 1% Triton X-100 и 0,1% желатина).

Температурные параметры цикла: начальный цикл при температуре 95°C в течение 3 мин; 20 циклов при температуре 94°C в течение 20 с, при температуре 63°C в течение 30 сек и при температуре 72°C в течение 30 с, при снижении температуры отжига на 1°C за цикл в течение 5 циклов до температуры 59°C и, наконец, инкубация в течение 10 мин и 1 мин при температуре 72°C и 4°C, соответственно.

Продукты рестрикции можно хранить при температуре 4 °C. При визуализации на геле, 10 мкл продукта реакции загружается с подходящим маркером и прогоняется на 2%-м агарозном геле. Ожидаемый размер фрагмента составляет 260 п.о. Тем не менее, этот фрагмент не будет виден, если ПЦР выполняется на одной телиоспоре, так как будет недостаточно материала ДНК.

4.3.4.2 Пятифрагментарный флуоресцентный ПЦР-анализ в реальном времени для идентификации видов

Анализ ПЦР в реальном времени с двусторонне помеченными зондами и олигонуклеотидными праймерами (табл. 3) в 20 мкл реакции в микроцентрифужных пробирках объемом 0,1 мл выполняется в инструменте Rotor-Gene 6000 (Qiagen⁵). Пятифрагментарная

⁴ Использование в этом диагностическом протоколе продуктов бренда Invitrogen не требует их утверждения и не исключает применения других продуктов, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не представляет собой утверждение КФМ названных веществ, реагентов и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет доказано, что они дают такой же результат.

⁵ Использование в этом диагностическом протоколе продуктов бренда Qiagen не требует их утверждения и не исключает применения других продуктов, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не представляет собой утверждение КФМ названных веществ, реагентов и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет доказано, что они дают такой же результат.

реакционная смесь состоит из 1×ImmoBuffer (Bioline⁶, 5 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов дАТФ, дТТФ, дЦТФ и дГТФ, 1 единица Immolase™ ДНК-полимеразы (Bioline⁶) и 0,2 мкМ, 0,4 мкМ и 0,9 мкМ каждого из двусторонне помеченных зондов, четырех прямых праймеров и четырех обратных праймеров, соответственно (табл. 3). ДНК-матрица – 1 мкл продукта ПЦР, полученного при ПЦР-амплификации ДНК, специфичной для *Tilletia* (раздел 4.3.4.1).

Температурные параметры цикла: начальный цикл при температуре 95 °С в течение 10 мин, затем 40 циклов при температуре 94 °С в течение 15 с и при температуре 65 °С в течение 60 с, при снижении температуры отжига 1 °С в течение 6 циклов до температуры 60 °С. Параметр нормализации ламп в динамическом режиме используется для определения среднего окружения для каждого отдельного образца до начала амплификации. Данные флуоресценции регистрируются по пяти каналам: зеленому, желтому, оранжевому, красному и малиновому.

Чувствительность анализа для одиночных спор составляла 10-40% (т.е. из известных положительных спор *T. indica* только 10-40% дали положительные результаты в ходе ПЦР) (Tan and Wright, 2009). Эта чувствительность возникает из ряда причин, включая тот факт, что все споры и ядра с головней *T. indica* подвергались автоклавированию дважды, что, возможно, привело к повреждению генетического материала. Специфичность зонда для *T. indica* была исследована в смеси ДНК *T. indica*:*T. walkeri* или *T. ehrhartae* или *T. caries*, в соотношениях 1:0,1 пг и 0,1:1 пг (соответствующий диапазон концентрации указан исходя из анализа одной споры). Специфичность праймеров была проверена, и было выявлено, что они не вступают в реакцию с другими видами *Tilletia*.

Стандартные кривые для каждого выявления каждого вида следует генерировать согласно описанию Тана и др. (Tan *et al.*, 2009), используя известные концентрации ДНК *Tilletia* spp. Полученное значение Ct (значение цикла, где кривая амплификации пересекает пороговую линию) используется для определения порога для этого анализируемого вида *Tilletia*. В целом, значение Ct, более высокое, чем определенное на этом этапе, рассматривается как отрицательный результат.

⁶ Использование в этом диагностическом протоколе продуктов бренда Bioline не требует их утверждения и не исключает применения других продуктов, которые также могут быть подходящими. Эта информация приводится для удобства пользователей этого протокола и не представляет собой утверждение КФМ названных веществ, реагентов и/или оборудования. Эквивалентные продукты могут использоваться, если будет доказано, что они дают такой же результат.

Таблица 3. Последовательности и модификации праймеров и зондов, используемых в пятифрагментарном флуоресцентном диагностическом анализе ПЦР *T. indica* и других близких видов *Tilletia* spp.

Пары праймеров (последовательность 5'-3')	Зонды (модификации 5', 3')	Канал	Цель
KB-DL-For: CTTCGGAAGAGTCTCCTT (nt. 64–81 ^a) KB-DL-Rev: CCGGACAGGTA CT CAG (nt. 127–142)	ACGGAAGGAACGAGGC (nt. 105–120) (6-FAM, BHQ1)	Зелены й	<i>T. indica</i>
	ACGGAAGGAACAAGGC (nt. 67–82 ^b) (JOE, BHQ1)	Желтый	<i>T. walkeri</i>
Hor-DL-For: GGCCAATCTTCTCTACTATC (nt. 40–59 ^c) Hor-DL-Rev: CCGGACAGGATCACTA (nt. 87–102)	CAACCCAGACTACGGAGGGTGA (nt. 60–81) (CAL Fluor Red 610, BHQ2)	Оранже вый	<i>T. horrida</i> (некоторые штаммы не выявлены)
Tri-DL-For: ATTGCCGTACTTCTCTTC (nt. 56–73 ^d) Tri-DL-Rev: GTAGTCTTGTGTTTGGATAATAG (nt. 99–112)	AGAGGTCGGCTCTAATCCCATC A (nt. 75–97) (Quasar 670, BHQ2)	Красный	Широкий спектр*
Ehr-DL-For: CGCATTCTTATGCTTCTTG (nt. 72–90 ^e) Ehr-DL-Rev: GTTAGGAACCAAAGCCATC (nt. 128–146)	CAGAGTCATTGGTTCTTCGGAG C (nt. 104–126) (Quasar 705, BHQ2)	Малино вый	<i>T. ehrhartae</i>

Примечания: Регистрационные номера генетического банка: ^aAF398434, ^bAF310180, ^cAF310171, ^dAF398447 и ^eAY770433. Используемый перечень справочных материалов и место происхождения приведены в работе Тана и др. (Tan *et al.*, 2009), материал хранится в Elizabeth Macarthur Agricultural Institute (EMAI), NSW Dept. of Primary Industries in Australia (см. раздел 6, контактные лица. нт., нуклеотид).

*Включает *T. caries*, *T. laevis*, *T. controversa*, *T. fusca*, *T. bromi*, *T. goloskokovii*.

5. Данные

Перечень информации, которая должна быть записана и сохранена, приведена в разделе 2.5 в МСФМ 27:2006.

Отчет о диагностике должен включать число положительных навесках и приблизительное количество телиоспор, выявленных в каждой положительной навеске. Если культуры были получены для молекулярного анализа, следует описать морфологию колоний, особенно какую-либо пигментацию, а также темпы роста в заданных условиях. Культуры следует хранить (мицелий из бульонов или мицелиальный пробки из чашек с агаром можно хранить в замороженном виде при -80 °C).

6. Контактные адреса для дополнительной информации

Дополнительную информацию по этому организму могут быть получены в:

Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia, South Perth, WA 6151, Australia (Ms Dominie Wright; e-mail: dominie.wright@agric.wa.gov.au; tel: +61 8 9368 3875; fax: + 61 8 474 2658).

Elizabeth Macarthur Agricultural Institute (EMAI), New South Wales Department of Primary Industries, Camden, NSW 2570, Australia (Dr Mui-Keng; email: mui-keng.tan@idpi.nsw.gov.au).

Laboratory of Plant Inspection and Quarantine, Shenzhen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shenzhen, 518045 Guangdong Province, China (Dr Guiming Zhang; email: zgm2001cn@yahoo.com.cn; tel: +86 755 8211 1148; fax: +86 755 2558 8630).

United States Department of Agriculture (USDA) Agricultural Research Service (ARS), North Atlantic Area (NAA), Fort Detrick, MD 21702, USA (Mr Gary Peterson; email: gary.peterson@ars.usda.gov).

USDA Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Riverdale, MD, USA (Dr Mary Palm; email: Mary.E.Palm@aphis.usda.gov).

USDA APHIS, Beltsville, MD, USA (Dr John McKemy; email: John.M.McKemy@aphis.usda.gov)

Food and Environment Research Agency, York YO41 1LZ, United Kingdom (Dr Kelvin Hughes; email: Kelvin.Hughes@fera.gsi.gov.uk).

7. Благодарность

Основа этого протокола была первоначально разработана A.J. Inman, K.J.D. Hughes and R.J. Bowyer, Food and Environment Agency, York, United Kingdom, in 2003. Этот протокол был проверен в европейских лабораториях⁷ (Riccioni *et al.*, 2002) и лег в основу протокола ЕОКЗР РМ 7/29(2) (EPPO, 2007).

Дополнительные материалы были представлены: D.G. Wright, Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia, Perth, Australia; K.J.D Hughes, Food and Environment Agency, York, United Kingdom; and G. Zhang, Laboratory of Plant Inspection and Quarantine, Shenzhen, China. V. Cockerell, Science and Advice for Scottish Agriculture, Edinburgh, United Kingdom.

8. Справочные материалы

Agarwal, V.K. & Mathur, S.B. 1992. Detection of karnal bunt in wheat seed samples treated with fungicides. *FAO Plant Protection Bulletin*, 40: 148–153.

Aggarwal, R., Joshi, L.M. & Singh, D.V. 1990. Morphological differences between teliospores of *Neovossia indica* and *N. horrida*. *Indian Phytopathology*, 43: 439–442.

Bonde, M.R., Nester, S.E., Khayat, A., Smilanick, J.L., Frederick, R.D. & Schaad, N.W. 1999. Comparison of effects of acidic electrolyzed water and NaOCl on *Tilletia indica* teliospore germination. *Plant Disease*, 83: 627–632.

Carris, L.M., Castlebury, L.A. & Goates, B.J. 2006. Nonsystemic bunt fungi – *Tilletia indica* and *T. horrida*: A review of history, systematics, and biology. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 113–133.

⁷ A. Radova, State Phytosanitary Administration, Olomouc, Czech Republic; I. Vloutoglou, Benaki Phytopathological Institute, Athens, Greece; A. Porta-Puglia, Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome, Italy; C. Montuschi, Servizio Fitosanitario Regionale, Bologna, Italy; I. van Brouwershaven, NPPO, Wageningen, The Netherlands; M. de Jesus Gomes, E. Diogo and M.R. Malheiros, Direcção-Geral de Protecção das Culturas, Lisbon, Portugal; V. Cockerell, Science and Advice for Scottish Agriculture, Edinburgh, United Kingdom; A. Barnes, Food and Environment Research Agency (FERA), York, United Kingdom.

- Castlebury, L.A.** 1998. Morphological characterisation of *Tilletia indica* and similar fungi. In V.S. Malik & D.E. Mathre, eds. *Bunts and smuts of wheat: An international symposium*, pp. 97–105. Ottawa, North American Plant Protection Organization. 445 + xv pp.
- Castlebury, L.A. & Carris, L.M.** 1999. *Tilletia walkeri*, a new species on *Lolium multiflorum* and *L. perenne*. *Mycologia*, 91: 121–131.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute).** 1965. *Tilletia barclayana*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 75. Wallingford, UK, CAB International.
- CMI (Commonwealth Mycological Institute).** 1983. *Tilletia indica*. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 748. Wallingford, UK, CAB International.
- Crous, P.W., Jaarsveld, A.B. van, Castlebury, L.A., Carris, L.M., Frederick, R.D. & Pretorius, Z.A.** 2001. Karnal bunt of wheat newly reported from the African continent. *Plant Disease*, 85: 561.
- Cunfer, B.M. & Castlebury, L.A.** 1999. *Tilletia walkeri* on annual ryegrass in wheat fields in the southeastern United States. *Plant Disease*, 83: 685–689.
- Durán, R.** 1987. Ustilaginales of Mexico: Taxonomy, symptomatology, spore germination, and basidial cytology. Seattle, Washington State University. 331 + xvi pp.
- Durán, R. & Fischer, G.W.** 1961. *The genus Tilletia*. Seattle, WA, Washington State University. 138 pp.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2007. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/29(2). *Tilletia indica*. *OEPP/EPPO Bulletin*, 37: 503–520.
- Frederick, R.D., Snyder, K.E., Tooley, P.W., Berthier-Schaad, Y., Peterson, G.L., Bonde, M.R., Schaad, N.W. & Knorr, D.A.** 2000. Identification and differentiation of *Tilletia indica* and *T. walkeri* using the polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90: 951–960.
- Fuentes-Davila, G.** 1996. Karnal bunt. In R.D. Wilcoxson & E.E. Saari, eds. *Bunt and smut diseases of wheat: Concepts and methods of disease management*, pp. 26–32. Mexico, DF, International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). 74 pp.
- Inman, A.J., Hughes, K.J.D. & Bowyer, R.** 2003. Protocol for extracting teliospores from untreated seed or grain by size-selective sieving. In: *EU recommended protocol for the diagnosis of a quarantine organism: Tilletia indica*, pp. 21–26. UK Department for Environment, Food and Rural Affairs, DIAGPRO (EU Project on Diagnostic Protocols). 38 pp. Available at <http://www.fera.defra.gov.uk/plants/planthealth/pestsdiseases/documents/protocols/tipro.pdf> (accessed on 03 October 2010).
- МСФМ 27.** 2006. *Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов*. Рим, МККЗР, ФАО.
- Khanna, A. & Payak, M.M.** 1968. Teliospore morphology of some smut fungi. II. Light microscopy. *Mycologia*, 60: 655–662.
- Kurtzman, C.P.** 1985. Molecular taxonomy of the fungi. pp 35–63. In W. Bennett & L.L. Lasure, eds. *Gene manipulations in fungi*. Orlando, FL, Academic Press, Inc. 558 pp.
- Laroche, A., Gaudet, D.A., Despins, T., Lee, A. & Kristjansson, G.** 1998. Distinction between strains of Karnal bunt and grass bunt using amplified fragment length polymorphism (AFLP). In V.S. Malik & D.E. Mathre, eds. *Bunts and smuts of wheat: An international symposium*, p. 127. Ottawa, North American Plant Protection Organization. 445 + xv pp.
- Levy, L., Castlebury, L.A., Carris, L.M., Meyer, R.J., Pimentel, G.** 2001. Internal transcribed spacer sequence-based phylogeny and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism differentiation of *Tilletia walkeri* and *T. indica*. *Phytopathology*, 91: 935–940.
- Mathur, S.B. & Cunfer, B.M.** 1993. Karnal bunt. In S.B. Mathur and B.M. Cunfer, eds. *Seed-borne diseases and seed health testing of wheat*, pp. 31–43. Frederiksberg, Denmark, Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. 168 pp.

- Milbrath, G.M., Pakdel, R. & Hilburn, D.** 1998. Karnal bunt spores in ryegrass (*Lolium* spp.). In V.S. Malik & D.E. Mathre, eds. *Bunts and smuts of wheat: An international symposium*, pp. 113-116. Ottawa, North American Plant Protection Organization. 445 + xv pp.
- Pascoe, I.G., Priest, M.J., Shivas, R.G., Cunnington, J.H.** 2005. Ustilospores of *Tilletia ehrhartae*, a smut of *Ehrharta calycina*, are common contaminants of Australian wheat grain, and a potential source of confusion with *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt of wheat. *Plant Pathology*, 54: 161–168.
- Peterson, G.L., Bonde, M.R. & Phillips, J.G.** 2000. Size-selective sieving for detecting teliospores of *Tilletia indica* in wheat seed samples. *Plant Disease*, 84: 999–1007.
- Pimentel, G., Carris, L.M., Levy, L. & Meyer, R.** 1998. Genetic variability among isolates of *Tilletia barclayana*, *T. indica* and allied species. *Mycologia*, 90: 1017–1027.
- Riccioni, L., Valvassori, M., Inman, A.J., Hughes, K.J., Bowyer, R.J., Barnes, A.V., Montuschi, C.** 2002. International validation of a diagnosis protocol for *Tilletia indica* [*Triticum* - *Secale* - × *Triticosecale*]. Internal report. Istituto Sperimentale per la Patologia Vegetale, Rome.
- Sansford, C.E., Baker, R.H.A., Brennan, J.P., Ewert, F., Gioli, B., Inman, A.J., Kinsella, A., Magnus, H., Miglietta, F., Murray, G.M., Porta-Puglia, A., Porter, J.R., Rafoss, T., Riccioni, L. & Thorne, F.** 2008. The new pest risk analysis for *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt of wheat, continues to support the quarantine status of the pathogen in Europe. *Plant Pathology*, 57: 603–611.
- Smith, O.P., Peterson, G.L., Beck, R.J., Schaad, N.W. & Bonde, M.R.** 1996. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of Karnal bunt of wheat. *Phytopathology*, 86: 115–122.
- Tan, M.-K. & Murray, G.M.** 2006. A molecular protocol using quenched FRET probes for the quarantine surveillance of *Tilletia indica*, the causal agent of Karnal bunt of wheat. *Mycological Research*, 110: 203–210.
- Tan, M.-K., Timmer, L.W., Broadbent, P., Priest, M. & Cain, P.** 1996. Differentiation by Molecular Analysis of *Elsinoe* spp. Causing Scab Diseases of Citrus and Its Epidemiological Implications. *Phytopathology* 86:1039–1044.
- Tan, M.-K. & Wright, D.G.** 2009. *Enhancing the detection of Tilletia indica, the cause of Karnal bunt. Final report.* CRC20004: Karnal bunt detection. Canberra, CRC National Plant Biosecurity. 63 pp.
- Tan, M.-K., Ghalayini, A., Sharma, I., Yi J., Shivas, R., Priest, M. & Wright, D.** 2009. A one-tube fluorescent assay for the quarantine detection and identification of *Tilletia indica* and other grass bunts in wheat. *Australasian Plant Pathology*, 38: 101–109.
- USDA (United States Department of Agriculture).** 2007. *Karnal bunt manual*. Frederick, MD, USDA. 160 pp. Available at http://www.aphis.usda.gov/import_export/plants/manuals/online_manuals.shtml (accessed February 2012).
- White, T.J., Bruns, T., Lee S. & Taylor, J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White, eds. *PCR protocol: A guide to methods and applications*, pp. 315–322. London, Academic Press. 482 pp.
- Wiese, M.V., ed.** 1987. *Compendium of wheat diseases*, 2nd ed. Saint Paul, MN, APS Press. 112 pp.
- Wright, D., Murray, G. & Tan, M.-K.** 2003. National diagnostic protocol for the identification of *Tilletia indica*, the cause of Karnal bunt. Perth, Australia, Department of Agriculture and Food, Government of Western Australia.

9. Рисунки



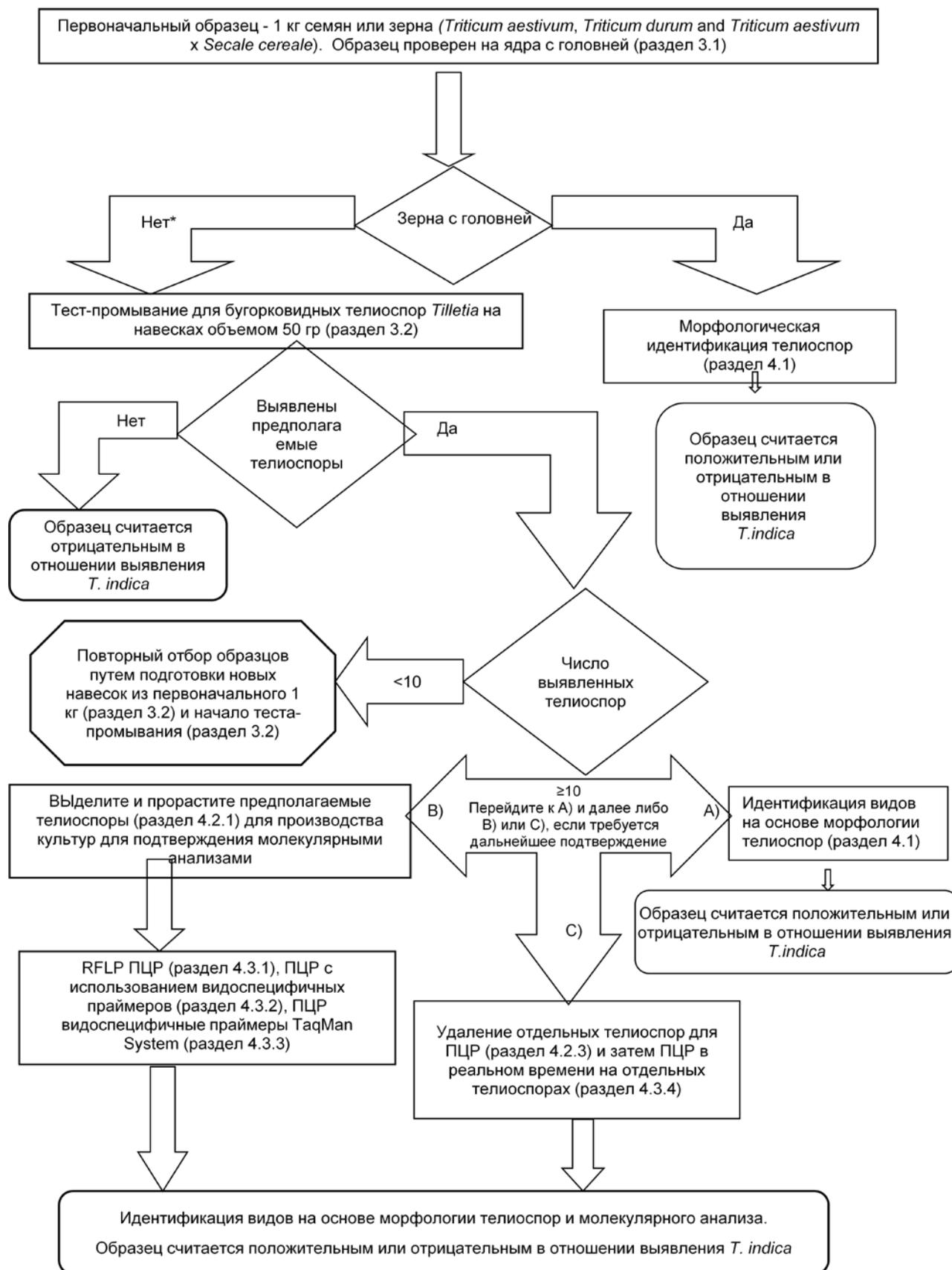
Рисунок 1: Зараженный колос пшеницы с симптомами карнальской головни.

Фотография любезно предоставлена Департаментом сельского хозяйства и пищевой продукции, Правительство Западной Австралии.



Рисунок 2: Зараженные зерна пшеницы с симптомами карнальской головни.

Фотография любезно предоставлена Департаментом сельского хозяйства и пищевой продукции, Правительство Западной Австралии.



* При отсутствии ядер с головней можно считать, что *T. Indica* отсутствует.

Рисунок 3: Структурная схема, иллюстрирующая процесс, используемый для выявления и идентификации *Tilletia indica* в образцах семян и зерна.

ПЦР, полимеразная цепная реакция; ПДРФ, полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

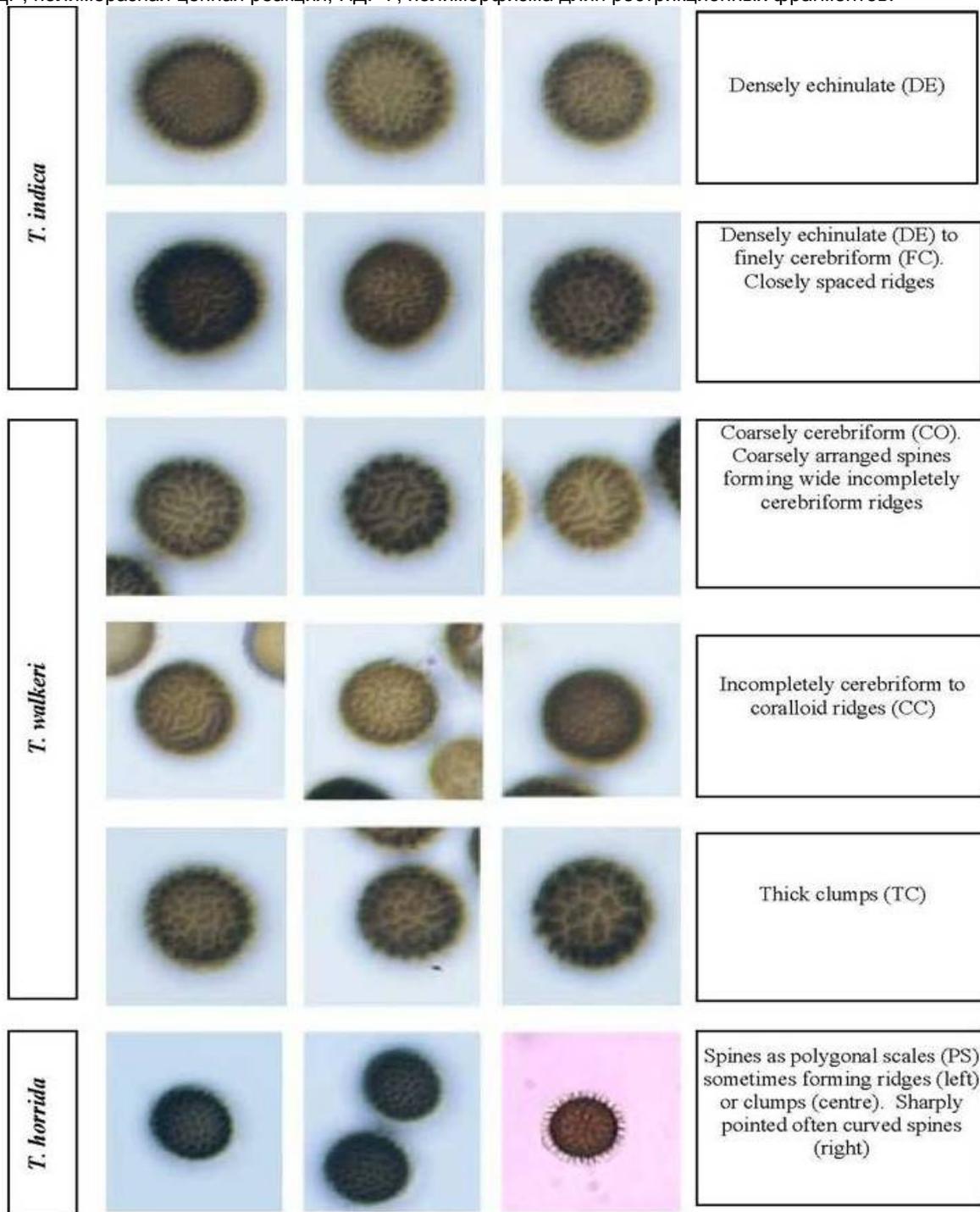


Рисунок 4: Иллюстрированный ключ орнамента телиоспор *Tilletia*. Используется в сочетании с таблицей 2 (раздел 4.1).

Фотографии любезно предоставлены А. Inman, Central Science Laboratory, York, United Kingdom.

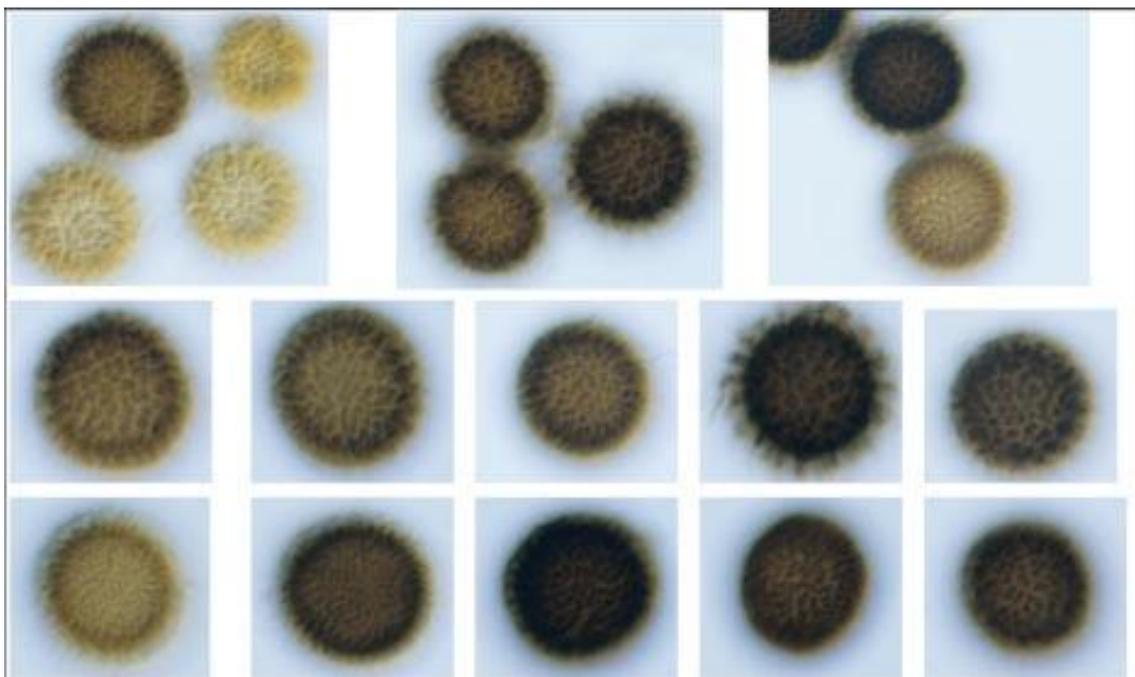


Рисунок 5: Телиоспоры *Tilletia indica*, структура орнамента поверхности. Шипы плотно расположены, либо по отдельности (плотно окруженные короткими шипами), либо как близко расположенные узкие хребты (четко имеющие сходство с рельефом коры головного мозга). Масштаб: 10 мм = 17 мкм.

Фотографии любезно предоставлены A. Inman, Central Science Laboratory, York, United Kingdom.

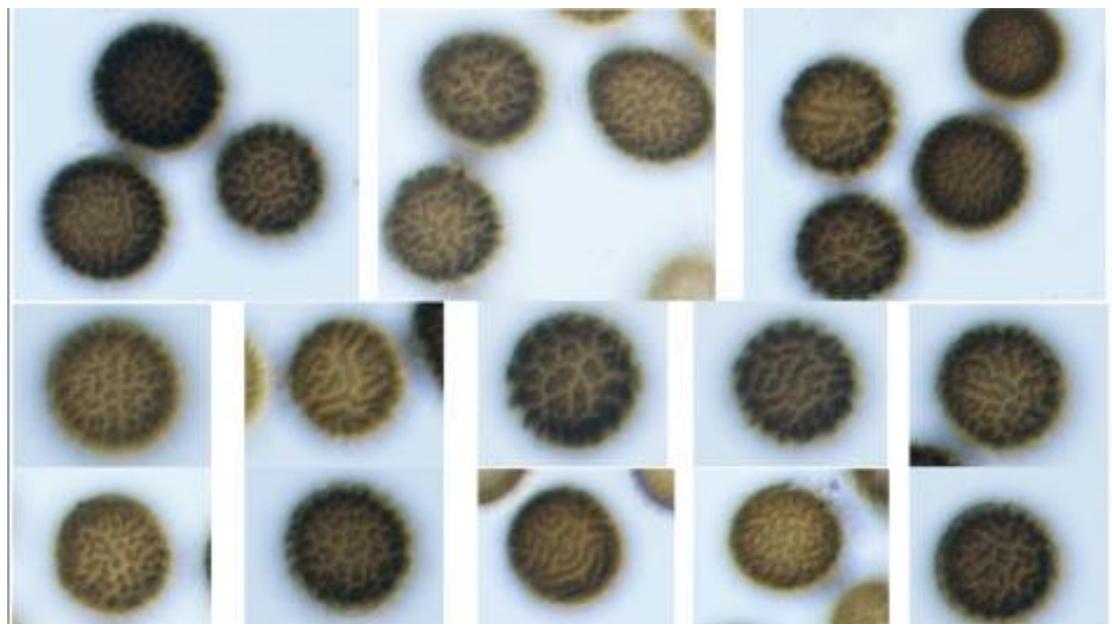


Рисунок 6: Телиоспоры *Tilletia walkeri*, структура орнамента поверхности. Шипы небрежно расположены и образуют широкие, полностью имеющие сходство с рельефом коры головного мозга или коралловидные хребты или густые комки. Масштаб: 10 мм = 17 мкм.

Фотографии любезно предоставлены A. Inman, Central Science Laboratory, York, United Kingdom.

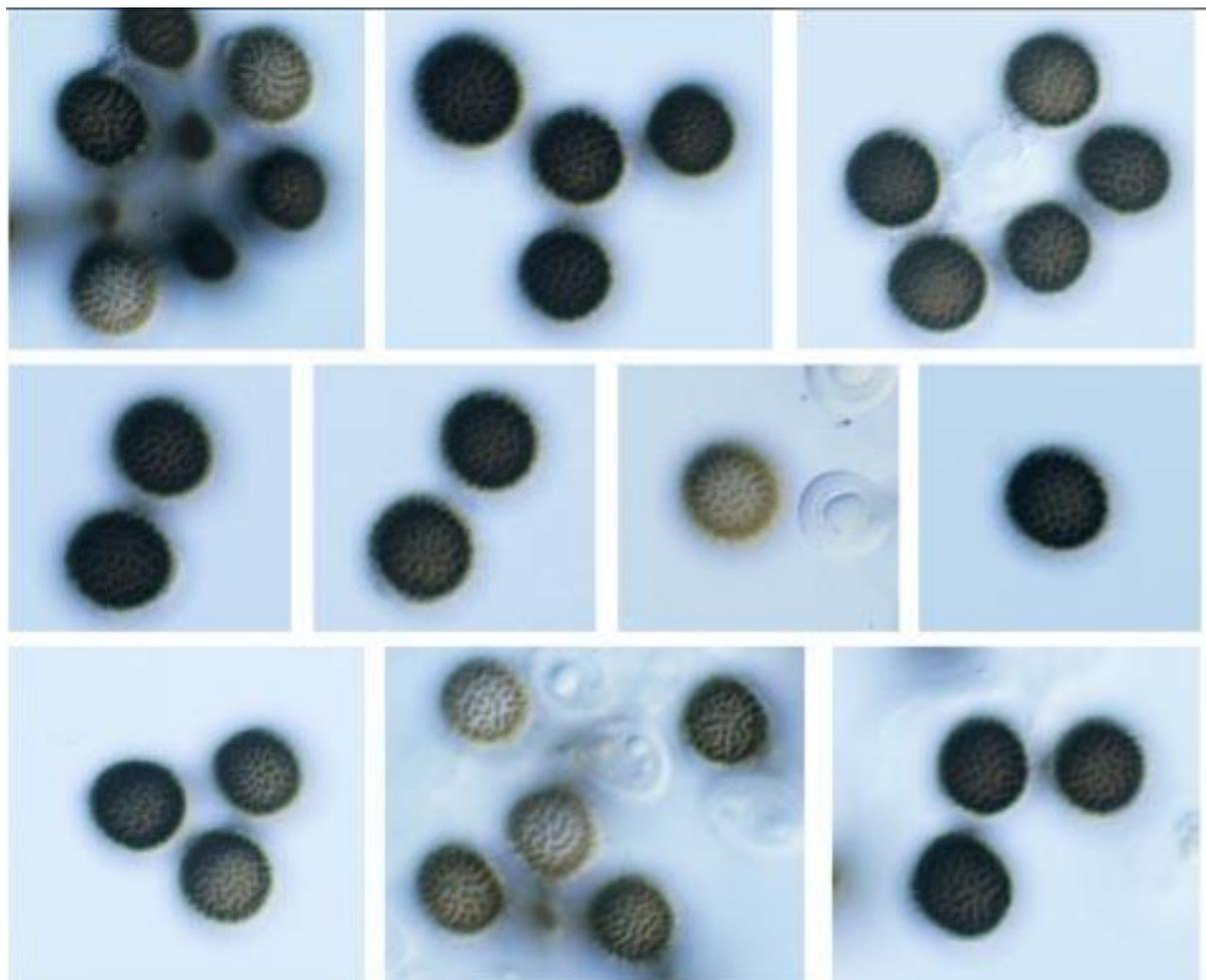
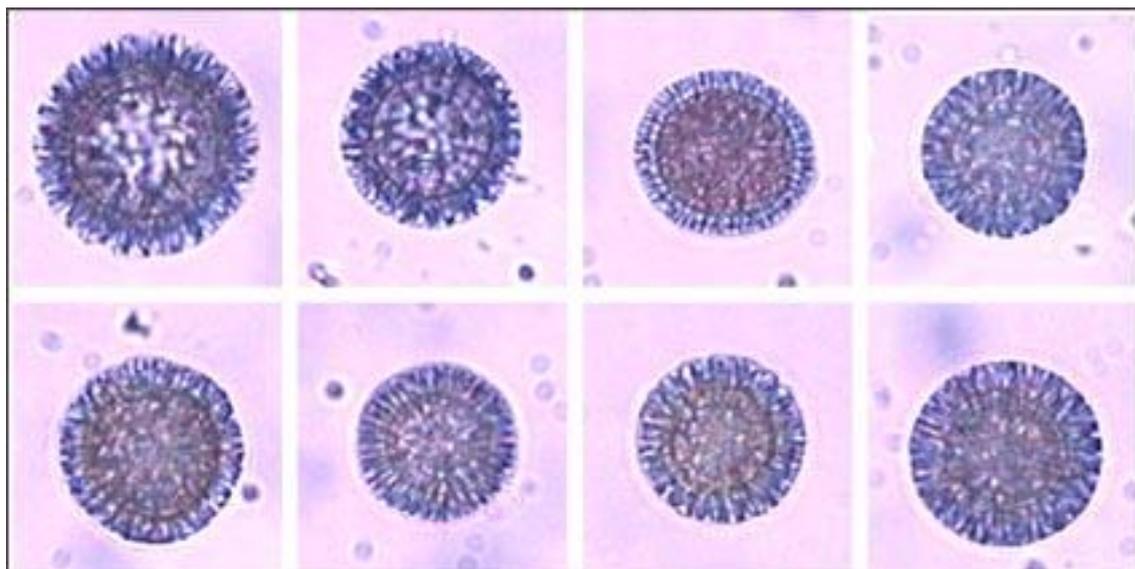
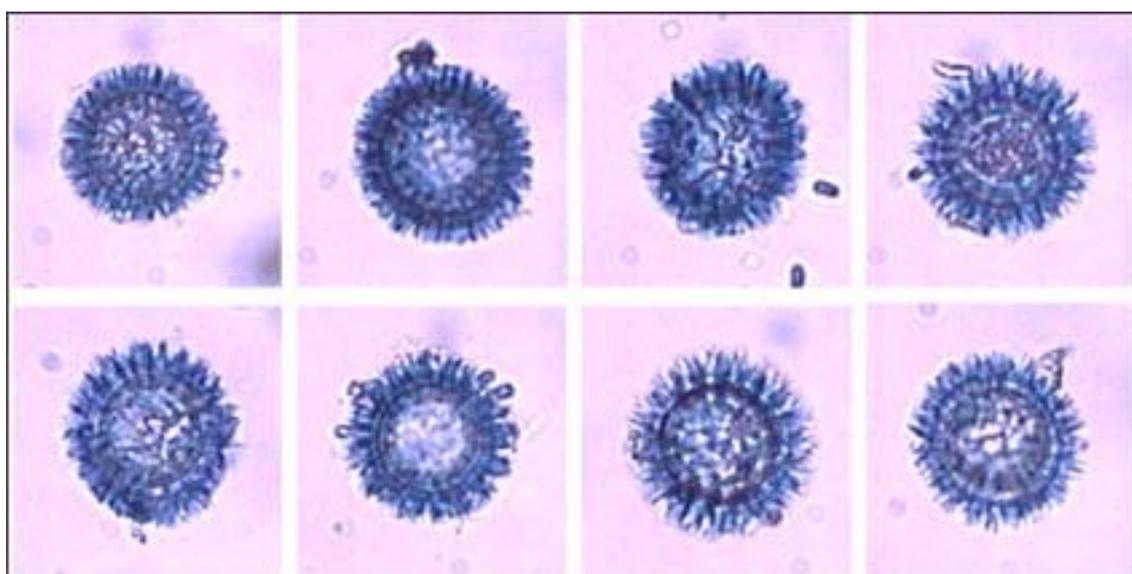


Рисунок 7: Телиоспоры *Tilletia horrida*, структура орнамента поверхности. Шипы собраны в полигональные чешуйки или иногда в имеющие сходство с рельефом коры головного мозга хребты. Масштаб: 10 мм = 17 мкм.

Фотографии любезно предоставлены A. Inman, Central Science Laboratory, York, United Kingdom.



А



В

Рисунок 8: Телиоспоры *Tilletia indica* (А) и *Tilletia walkeri* (В), показывающие профили телиоспор сбоку после отбеливания и затем окрашивания глицерином-лакто в трипановый синий цвет. Обратите внимание на плавные очертания телиоспор *T. indica* по сравнению с более неправильными очертаниями признаков телиоспор *T. walkeri*, которые имеют более очевидные пробелы между шипами.

Фотографии любезно предоставлены A. Inman, Central Science Laboratory, York, United Kingdom.

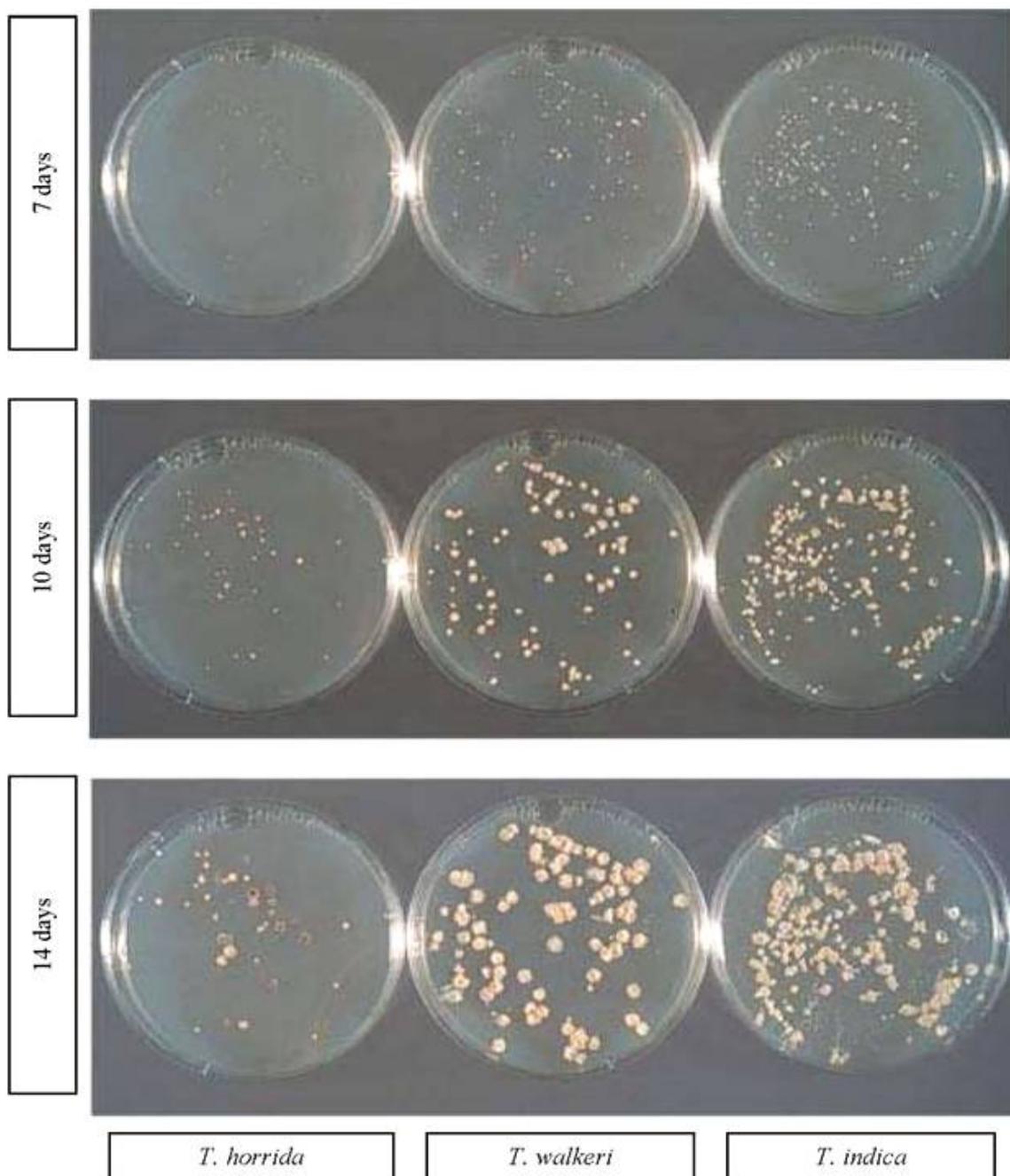


Рисунок 9: Колонии *Tilletia indica* (справа), *Tilletia walkeri* (в центре) и *Tilletia horrida* (слева) через 7 дней (наверху), 10 дней (в центре) и 14 дней (внизу) на картофельно-декстрозном агаре (КДА) при температуре 19 °С и при 12-часовом цикле дня/ночи. Обратите внимание на более медленный рост и фиолетовую пигментацию через 14 дней для колоний *T. horrida*.

Фотографии любезно предоставлены A. Inman, Central Science Laboratory, York, United Kingdom.

История публикации

История публикации не является официальной частью стандарта.

2006-03 КФМ-1 добавила тему *Tilletia indica* / *T. controversa* (2004-014) под темой: Грибы и грибоподобные организмы

2012-11 КС утвердил проект для КЧ путем электронного принятия решений

2012-07 консультация членов

2013-05 утверждение КС для принятия путем электронного принятия решений (возвращен ТГЭДП)

2013-06 ТГЭДП пересмотрела проект

2013-10 Направлен в КС для утверждения к принятию путем электронного принятия решений

2013-10 КС утвердил проект для 45-дневного периода направления нотификаций путем электронного принятия решений

2013-12 45-дневный период нотификаций

2014-01 КС утвердил ДП от лица КФМ

МСФМ 27. 2006: Приложение 4 *Tilletia indica* Mitra (2014 год)

История публикации последний раз обновлена: 2014-09-11