

本植物检疫处理由标准委员会代表植物检疫措施委员会于 2014 年通过。

本附件是 ISPM 27:2006 标准规定的一部分。



ISPM 27

附件 4

国际植物检疫措施标准

第 27 号标准：诊断规程

DP 4:

小麦印度腥黑穗病菌 (*Tilletia indica* Mitra)

(2014 年)

目录

1.	有害生物信息	3
2.	分类信息	3
3.	检测	4
3.1	种子/谷物检验	4
3.2	从种子/谷物中分离冬孢子, 分级过筛洗涤检验	5
4.	鉴定	6
4.1	冬孢子形态	6
4.1.1	形态学鉴定	7
4.1.2	与其他几种腥黑粉菌的形态学比较	7
4.2	冬孢子的分离与萌发	8
4.2.1	冬孢子萌发	8
4.2.2	几种相似的腥黑粉菌的萌发	11
4.2.3	单个冬孢子的回收	11
4.3	分子鉴定	11
4.3.1	ITS1 区域限制性酶切分析	12
4.3.2	使用种特异性引物的常规 PCR 检测	13
4.3.3	使用种特异性引物和荧光探针的 PCR 检测	14
4.3.4	冬孢子直接实时 PCR	15
4.3.4.1	进行实时 PCR 前腥黑粉菌 DNA 的扩增	15
4.3.4.2	鉴定到种的实时五重荧光 PCR 检测	16
5.	记录	18
6.	获取进一步信息的联系点	18
7.	致谢	19
8.	参考文献	20
9.	图	23

1. 有害生物信息

小麦印度腥黑穗病菌 (*Tilletia indica* Mitra) 引起小麦 (*Triticum* spp.) 印度腥黑穗病, 也称为小麦局部腥黑穗病。小麦印度腥黑穗病于 1931 年在印度卡纳尔邦首次报道。病原广泛分布于南亚和西南亚部分地区 (USDA, 2007; Wiese, 1987)。在美国、墨西哥和南非某些地区也有发生 (Crous 等, 2001; Fuentes-Davila, 1996)。

寄主包括普通小麦 (*Triticum aestivum*)、硬粒小麦 (*Triticum durum*) 以及普通小麦与黑麦的杂交种 (*Triticum aestivum* × *Secale cereale*)。有关普通小麦与黑麦杂交种的报道很少; 然而, 已证明黑麦属有可能成为寄主 (Sansford 等, 2008)。已证明小麦印度腥黑穗病菌可在温室条件下侵染其他草类, 但在田间从未在这些替代寄主上发现过该病菌 (Inman 等, 2003)。

小麦印度腥黑穗病菌是一种侵染花器的黑粉病原菌。种子通过籽粒的胚芽端被侵染, 真菌在果皮内发育并产生粉状、褐黑色冬孢子堆。新鲜时, 孢子堆产生有恶臭、烂鱼似的气味 (三甲胺)。和系统性黑穗病不同, 很少有寄主果穗上所有种子都被印度腥黑穗病菌侵染, 带有被侵染种子的果穗在外表上与健康果穗没有差别 (图 1)。种子通常只有部分被寄生, 表现出不同程度的侵染 (图 2)。因此, 田间很难发现该病害。除非侵染水平很高, 否则只有在收获后才常能看见症状。

小麦印度腥黑穗病菌降低谷物质量, 使颜色发生变化, 并使谷物及其加工产品发出难闻的气味。它还会造成小幅减产。一般而言, 普通小麦如含有超过 3% 的黑粉化籽粒, 则被认为不适于人类消费 (Fuentes-Davila, 1996)。

还有其他腥黑粉菌属 (*Tilletia*) 病菌可能与印度腥黑穗病菌相混淆, 它们常见于收获的谷物或种子中。其中包括黑麦草腥黑穗病菌 (*Tilletia walkeri*) (黑麦草 (*Lolium perenne*) 和多花黑麦草 (*Lolium multiflorum*) 的一种病原)、水稻腥黑粉病菌 (*T. horrida*) (稻属的一种病原), 以及沙地牧草腥黑粉病菌 (*T. ehrhartae*) (沙地牧草的一种病原)。在澳大利亚, 人们发现黑麦草腥黑穗病菌和沙地牧草腥黑粉病菌会污染收获后的普通小麦种子。黑麦草腥黑穗病菌和水稻腥黑粉病菌在美国有分布, 可见于收获的普通小麦种子中, 在稻属和黑麦草属与普通小麦轮作的地区更为常见 (Castlebury, 1998; Castlebury 和 Carris, 1999; Pascoe 等, 2005)。由于这些病原菌在形态上类似, 其准确鉴定至为重要。

2. 分类信息

学名: *Tilletia indica* Mitra, 1931 年

异名: *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur, 1941 年

分类地位： 真核域、真菌界、担子菌门、黑粉菌亚门、外担子菌纲、外担子菌亚纲、腥黑粉菌目、腥黑粉菌科

通用名： 印度腥黑穗病或局部腥黑穗病

序列号： MycoBank 267835

3. 检测

如图 3 所示，小麦印度腥黑穗病菌诊断方案描述了在寄主植物种子或谷物中检测冬孢子的程序。通过目视检查种子或谷物样品中是否带有黑粉化籽粒（3.1 节）。如果发现一粒黑粉化籽粒，可取出冬孢子，并通过形态学鉴定印度腥黑穗病菌（4.1 节）。

如果在样品中未发现黑粉化籽粒，可使用分级过筛洗涤法检验三个分样品（3.2 节），检查样品是否带有冬孢子。然而，该检验方法可能无法区分受侵染的谷物与籽粒表面受冬孢子污染的谷物。如果分级过筛洗涤检验未发现冬孢子，样品的诊断结果即为阴性。如果发现了冬孢子，则检测到的冬孢子数量将决定用何种方法进行鉴定：

- 如果检测到 10 个以上冬孢子，第一步是通过形态学鉴定冬孢子的种类（4.1 节）。如果需要进一步确认，下一步或是分离冬孢子并使其萌发（4.2.1 节），继而采用 4.3.1—4.3.3 节描述的分子方法，或是分离出单个冬孢子（4.2.3 节），继而对单个冬孢子进行直接实时聚合酶链式反应（PCR）（4.3.4 节）。（参看图 3 中的 A、B、C）
- 如果检测到的冬孢子不足 10 个，为可靠区分小麦印度腥黑穗病菌与相似种类，强烈建议用新的分样品重新进行分级过筛洗涤检验。该检测极限与监管极限可能相同，也可能不同。

在本诊断规程中，各种方法（包括商标名的引用）的描述均和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏性、特异性和可重复性水平。

3.1 种子/谷物检验

对黑粉化籽粒或受污染的种子或谷物表面的冬孢子进行直接的目视检查，就植物检疫目的而言并不是一种可靠的方法。然而，可裸眼结合低倍显微镜（放大 10—40x），对黑粉化籽粒进行目视检验。本规程基于对 1 kg 种子或谷物样品的检验；整个样品需要检验黑粉化籽粒（图 2）或其他禾本科种子（例如黑麦草属）。记录观察到的症状和发现的其他禾本科种子。

如果有黑粉化籽粒，基于冬孢子的形态可作出阳性诊断。必须制作冬孢子显微镜玻片，描述这些冬孢子的形态。如果冬孢子的形态与小麦印度腥黑穗病菌的一致（参看 4.1 节和图 4—8），可作出阳性诊断。

为便于观察症状，可在 20℃ 下将籽粒在 0.2% NaOH 中浸泡 24 h，略微漂白内胚乳，使变黑的被侵染部位形成鲜明的对比。这一方法对经过化学处理的种子批次尤其有用，否则有色染料可能使症状模糊不清（Agarwal 和 Mathur, 1992；Mathur 和 Cunfer, 1993）。在严重侵染和污染的情况下，种子表面就可以看见冬孢子（Mathur 和 Cunfer, 1993）。

在没有黑粉化籽粒的情况下，可使用分级过筛洗涤检验（3.2 节）确定样品中是否有小麦印度腥黑穗病菌。或者，在没有黑粉化籽粒的情况下，可认为没有小麦印度腥黑穗病菌。如果发现黑麦草属种子污染了样品，就很可能在样品中检测到黑麦草腥黑穗病菌。

3.2 从种子/谷物中分离冬孢子，分级过筛洗涤检验

分级过筛洗涤检验是在未处理的普通小麦、硬粒小麦和普通小麦与黑麦杂交种样品中检测小麦印度腥黑穗病菌冬孢子的一种可靠方法。重要的是，要用每份为 50 g 的分样品重复检测至少 3 次，以确保在样品中有冬孢子时一定能检测到（检测不同数量冬孢子所需的样品数量参看表 1）。本方法的平均回收率达 82%，每 50 g 样品镜检一般只要求少量玻片。下文将对本办法进行阐述，详细信息可参阅 Inman 等（2003）、Peterson 等（2000）和 Wright 等（2003）。该检测极限与监管极限可能相同，也可能不同。

重要的是，使用前要将所有设备在漂白剂（有效成分为 1.6% 次氯酸钠(NaOCl)）中浸泡 15 分钟，以排除以往样品交叉污染造成的假阳性风险。漂白粉杀死冬孢子，使其与它们正常的黑色外表相比显得透明。浸泡后，所有设备要用自来水洗涤。

将 50 g 未处理的种子样品放入加有 100 ml 0.01% 吐温 20 水溶液的三角瓶中（250 ml）。将样品置于振荡器中，在 200 r.p.m 下震荡 3 min，释放出冬孢子，然后将其倒入置于 20 μm 筛子上的 53 μm 筛子中，筛子安装在置于另一个三角瓶（500 ml）上部的漏斗中。随后用无菌自来水洗涤装过样品的三角瓶两次，每次约 50 ml：将洗涤用水倒在放在筛子中的样品上。用吸气瓶和无菌自来水（200—300 ml）进一步洗涤样品，以确保从种子中很好地分离出冬孢子。移走样品和 53 μm 筛子。将 20 μm 筛子倾斜到 45°角，使用装有无菌自来水的吸气瓶侧向来回移动，将碎屑从筛子顶部冲到底部。这一方法将从样品中收集到的所有冬孢子冲到筛子下部。然后将冬孢子和碎屑冲入 15 ml 锥形离心管中。重要的是，要用聚丙烯离心管，

因为冬孢子会附着聚碳酸酯离心管壁上，从而导致错误结论。一直重复这些步骤，直至 20 μm 筛子看起来已经很干净。离心管中最终体积约为 8 ml。如有必要，可将 20 μm 筛子放在低倍显微镜下检查是否有残留的冬孢子。

因为冬孢子比洗涤检验中收集到的多数碎屑要重，将收集到的悬浮液以 1 000 g 离心 3 min，以收集冬孢子。从 r.p.m. 计算相对离心力 (RCF(g)) 的公式为 $RCF = 1.12 r_{\max} (r.p.m./100)^2$ ，其中 r_{\max} 是从旋转中心到离心管底部的最大半径 (mm)。使用一个新的一次性巴斯德吸管小心移出上清液，别扰动沉淀物。然后在显微镜下检验沉淀物。如果沉淀物太浓，可在镜检前加水稀释成悬浮液，并用吸管尖搅动沉淀物，以确保获得均匀的悬浮液。

将所有沉淀物悬浮液分成 20 μl 等份，置于显微镜载玻片上，盖上盖玻片。使用亮视野显微镜在 20–40×放大率下检验玻片。重要的是，要检查玻片上每一平方毫米悬浮液是否有冬孢子。如果找到了冬孢子，记录下每一玻片上发现的冬孢子的形态特征（例如大小、颜色和纹饰）和数量。

表 1. 假设在冬孢子均匀分布的条件下，在特定置信水平下检测到不同污染水平所要求的 50 g 分样品的重复数量 (Peterson 等, 2000)

污染水平 (每 50 g 样品所含的冬孢子数量)	根据置信水平 (%) 进行检测所要求的样品的重复数量		
	99%	99.9%	99.99%
1	3	5	6
2	2	3	4
5	1	1	1

4. 鉴定

小麦印度腥黑穗病菌的鉴定基于(a) 籽粒症状和冬孢子形态，或(b) 冬孢子形态和通过一种 PCR 技术检测特异性 DNA 序列 (见图 3)。

4.1 冬孢子形态

分级过筛洗涤检验发现疑似冬孢子时，可再次检查冲洗后的分样品和母样品中的籽粒的症状。如果发现症状，应对冬孢子进行镜检加以确认。也应检查样品中发现的任何草籽是否有腥黑粉菌侵染的迹象，如有，则相关冬孢子应接受镜检。如果在分级过筛洗涤检验中发现的冬孢子与黑粉化籽粒中发现的那些一样，即可作出

诊断。然而，如果在较大样品中未找到黑粉化籽粒，建议使用一种分子检测方法（4.3.1—4.3.4 节）进行检验鉴定。

表 2 列出小麦印度腥黑穗病菌冬孢子，以及可在种子或谷物货运中发现的易与小麦印度腥黑穗病菌相混淆的几种常见腥黑粉菌冬孢子的形态特征。

4.1.1 形态学鉴定

小麦印度腥黑穗病菌冬孢子为球形至半球形，有时带有小的菌丝片段（常见于未成熟冬孢子，偶尔可见于成熟冬孢子）；多数直径 22—47 μm ，偶尔更大，可达 64 μm （平均 35-41 μm ）；浅橙褐色至深红褐色；成熟冬孢子黑色，不透明（图 4 和 5）。密布尖锐至截形突起形成的纹饰，偶尔具弧形顶端，高 1.4-5.0 (-7.0) μm ，表面观看似一个个独立的突起（浓密毛刺状）或密集分布的窄脊（很像脑形）（图 4 和 5）；突起上覆有一薄层透明膜（Carris 等，2006；CMI，1983）。

小麦印度腥黑穗病菌的不孕细胞为球形、半球形至泪滴形，黄褐色，10-28 μm \times 48 μm ，具或不具一个小突起（孢柄），光滑外壁厚 7 μm ，分层。不孕细胞在分级过筛洗涤过程中可能并不常见（Carris 等，2006；CMI，1983）。

如果在分级过筛洗涤检验中发现 10 个或更多冬孢子，形态学鉴定即可得以确认。如果检测到的冬孢子不足 10 个，则形态特征对作出可信的鉴定并不完全可靠（EPPO，2007）。在此情况下，建议重新取样，从最初的 1 kg 样品中制备新的分样品，并进行检验。

4.1.2 与其他几种腥黑粉菌的形态学比较

区分小麦印度腥黑穗病菌、黑麦草腥黑穗病菌、水稻腥黑粉病菌，以及沙地牧草腥黑粉病菌的最重要的形态特征是冬孢子大小（范围和平均值），纹饰及颜色（表 2；图 4—8）。公开报道的孢子大小经常不同。孢子大小常受封片剂和热处理影响。Pascoe 等（2005）报道，在澳大利亚黑麦草腥黑穗病菌和沙地牧草腥黑粉病菌是收获的普通小麦中常见的污染物。在美国，形态学和遗传学相似的黑麦草腥黑穗病菌与水稻腥黑粉病菌是收获的普通小麦中已知的污染物（Castlebury 和 Carris，1999；Cunfer 和 Castlebury，1999；Smith 等，1996）。在表 2 列出的几种腥黑粉菌之外，还有其他几种产生具有瘤状纹饰的孢子的腥黑粉菌可能和小麦印度腥黑穗病菌相混淆（Durán，1987；Durán 和 Fischer，1961；Pimentel 等，1998）。这些种类不太可能发现是普通小麦的污染物。它们包括广义的狼尾草腥黑粉菌（*Tilletia barclayana sensu lato*）（各种禾本科植物黑粉病，例如黍属(*Panicum*)和雀稗属(*Paspalum*)）、画眉草黑粉病菌（*Tilletia eragrostidis*）（在画眉草属(*Eragrostis*)上）、*Tilletia inolens*（在 *Lachnagrostis filiformis* 上）、山地腥黑粉

病菌 (*Tilletia rugispora*) (在雀稗属(*Paspalum*)上), 以及 *Tilletia boutelouae* (在格兰马草(*Bouteloua gracilis*)上)。这些形态学相似的种类中尚无一种被发现能自然侵染普通小麦。

将冬孢子置于 10% 次氯酸钠中漂白 15–20 min 可以使其截面观突起轮廓更加清晰。如有必要, 可用水洗涤冬孢子两次并染色, 例如使用溶于乳化甘油中的锥虫蓝或棉花蓝 (图 8)。

4.2 冬孢子的分离与萌发

有两种方法可以对分级过筛洗涤检验中检测到的冬孢子的鉴定加以确认 (3.2 节)。已有标准的程序从玻片上回收冬孢子并诱导其萌发 (4.2.1), Tan 等 (2009) 建立了一种新方法, 可直接对从玻片上回收的单个冬孢子做 PCR 检测 (4.2.3 节)。

4.2.1 冬孢子萌发

小麦矮腥黑穗病菌是兼性活体寄生物。为了培养菌落, 将冬孢子浸入水中, 快速进行表面消毒, 然后放在水琼脂平板上萌发。

可用蒸馏水在 20 μ m 筛子上洗涤载玻片和盖玻片来回收冬孢子, 然后将其洗入干净的无菌锥形离心管中 (如 3.2 节)。其体积应约为 3–5ml。离心管在 21 $^{\circ}$ C 下培育过夜, 使冬孢子吸足水分, 并使真菌和细菌污染物对随后的表面消毒更为敏感。经过隔夜培育, 冬孢子以 1 200 g 离心 3 min, 形成沉淀物。

倒掉上清液, 将沉淀物悬浮在 5 ml 漂白剂 (活性成分为 0.3–0.5% 次氯酸钠) 中对冬孢子进行消毒, 快速倒置离心管 3 次, 并以 1 200 g 离心 1 min。如果在漂白剂中浸泡的总时间超过 2 min, 一些冬孢子会被杀死。作为漂白剂处理的替代措施, 冬孢子可在 5–10 ml 酸性电解水 (AEW) 中进行 30 min 表面消毒。酸性电解水可有效对冬孢子进行表面消毒, 但相对于 1–2 min 漂白剂处理, 会刺激而不是抑制冬孢子萌发 (Bonde *et al.*, 1999)。然后将冬孢子冲洗两次, 倒掉上清液, 将沉淀物重新悬浮在 1 ml 无菌蒸馏水 (SDW) 中, 以 1 200 g 离心 5 min。

沉淀物悬浮在 1 ml 无菌蒸馏水中, 以无菌操作将 200 μ l 冬孢子悬浮液加到添加有抗生素的 2% 水琼脂 (WA + A) 平板上, 用无菌刮刀涂抹。所用抗生素每升琼脂 60 mg 青霉素-G (EPP) 和 200 mg 硫酸链霉素 (EPPO, 2007)。将 WA + A 平板置于 21 $^{\circ}$ C、12 h 光周期下培养。平板放置 5 天, 然后密封或装入干燥的聚乙烯袋中。

7–14 天后, 非休眠的冬孢子产生先菌丝, 顶端生 32–128 或更多担孢子 (初生孢子)。这些菌落产生的次生孢子一般有两种类型: 丝状和腊肠状。随后可以直接

在固体培养基（图 9）或马铃薯葡萄糖肉汤等营养液中培养。切下带有萌发冬孢子或菌落的小块琼脂（1 cm × 1 cm），然后将其粘在培养皿盖的下表面上，使萌发的冬孢子朝向肉汤表面。这使得担孢子被释放到肉汤表面上。培养皿在 21°C、12 h 光周期下培养。2—3 天后，落在肉汤表面的担孢子产生直径约 0.5—1.0 cm 的小菌丝垫。用无菌解剖针挑起每一个菌丝垫，接触无菌滤纸以去掉多余的肉汤。将菌丝放入适宜的小瓶中（例如 1.5—2.0 ml 离心管），直接用于提取 DNA，或在 -80°C 下储存，供将来提取 DNA。

使冬孢子萌发，用于分子检测可能并非总是可行；例如，如果像用杀菌剂处理过的谷物一样，种子用 NaOH 处理过。增加过筛的重复数，可增加回收到的冬孢子数量，因而增加可用于萌发的冬孢子数量。冬孢子可能有一个休眠期，会影响到萌发（Carris 等，2006）。可对单个冬孢子进行直接实时 PCR 来解决这一问题（见 4.3.4 节）。

表 2. 小麦印度腥黑穗病菌 (*Tilletia indica*)、黑麦草腥黑穗病菌 (*Tilletia walkeri*)、水稻腥黑粉病菌 (*Tilletia horrida*) 与沙地牧草腥黑粉病菌 (*Tilletia ehrhartae*) 的冬孢子形态特征以及与这四种病菌相关的寄主

种	冬孢子大小 (μm)	冬孢子大小 (平均) (μm)	冬孢子颜色	冬孢子形状	冬孢子鞘	冬孢子突起	寄主
小麦印度腥黑穗病菌 ^a	22-64	35-41	浅橘褐色至深红褐色, 成熟孢子黑色, 不透明	球形至半球形	有	1.4-5 (-7) μm 表面观, 浓密的毛刺状或密集分布的窄脊 (很像脑形)。截面观, 由于突起紧密排列, 偶有弧形顶端, 轮廓更为平滑完整。	小麦属
黑麦草腥黑穗病菌 ^b	28-35	30-31	浅黄色至深红褐色 (从不呈黑色或不透明)	球形	有, 延伸至突起的顶端, 透明至黄褐色	3-6 μm 随意排列 +/- 脑形 表面观, 宽且不完整的脑形脊 截面观, 轮廓不规则, 突起间有缝隙。	黑麦草和多花黑麦草
水稻腥黑粉病菌 ^c	14-36 (成熟<25)	24-28	浅至深栗褐色, 可能半透明	球形至半球形	有, 延伸至突起顶端, 透明至有色	1.5-4 μm 常弧形, 表面观看似多边形鳞片	稻属
沙地牧草腥黑粉病菌 ^d	17-25	无资料	成熟时呈很深的橄榄褐色。因鳞片的黑化作用可能不透明。	球形至半球形	有, 延伸至或略超过突起顶端	1-2.5 μm 突起圆柱形或端部略变细。 表面观, 很少呈脑形。 具有较大、锐角多边形鳞片。 截面观, 端部明显截形至略圆形。	<i>Ehrharta calycina</i>

注: ^a基于 Inman 等 (2003)。^b基于 Castlebury, 1998; Milbrath 等, 1998; Castlebury 与 Carris, 1999; Cunfer 与 Castlebury, 1999。^c作为狼尾草腥黑粉病菌: Durán 与 Fischer, 1961; CMI, 1965; Durán, 1987; Castlebury 与 Carris, 1999。作为水稻腥黑粉病菌: Khanna 与 Payak, 1968; Aggarwal 等, 1990; Castlebury, 1998。^dPascoe 等, 2005。

4.2.2 几种相似的腥黑粉菌的萌发

在培养过程中，黑麦草腥黑穗病菌和小麦印度腥黑穗病菌产生非常相似的菌落。在马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基上，以 19℃、12 h 光周期培养 14 天后，两种病菌一般都产生白色至米黄色缓慢生长的不规则壳状菌落，直径约 4—6 mm（图 9）。相反的是，因为最适温度更高，相同条件下水稻腥黑粉病菌培养物的生长要显著缓慢得多（菌落直径仅 2—3 mm）。在 PDA 和马铃薯葡萄糖肉汤中，水稻腥黑粉病菌分离物也可产生粉红色色素（图 9）。

4.2.3 单个冬孢子的回收

冬孢子经过检验并记录其形态后，在有或没有盖玻片的情况下使载玻片干燥。移走盖玻片时，将其翻过来放在载玻片上，以便检查其上附着的冬孢子。

在另一张载玻片上，放上经过消毒（121℃ 高压消毒 15 min 或在 170℃ 下烤 2 h）的一小片切开的盖玻片（1 × 1 mm²）。在这片盖玻片上滴上 1 μl Tris-乙二胺四乙酸（EDTA）（TE）缓冲液。在复式显微镜或解剖镜下，用很细的解剖针挑出一个冬孢子，置于 TE 缓冲液滴中。冬孢子会转移进液滴。用镊子放上另一小片经过消毒的盖玻片，形成一个夹层。使用镊子往下挤压盖玻片，压破冬孢子，然后将盖玻片夹层转移进 0.2 ml PCR 管中。进一步用移液管尖端压破盖玻片（Tan 等，2009）。

4.3.4.1 节描述了随后的步骤。

4.3 分子鉴定

有几种用于鉴定小麦印度腥黑穗病菌的分子方法。可以使用以下描述的任何一种方法，然而至关重要的是，要从本领域的专家处获得参考材料（阳性对照）（参看 6 节）。

以下描述的前三种方法运用良好，但依赖于冬孢子的萌发，以便能从产生的菌丝垫中提取到足够多的 DNA。冬孢子萌发需要 3 周时间。Peterson 等（2000）发现冬孢子的萌发率平均为 55%，这显著降低了使用这三种分子方法鉴定冬孢子的概率。随后描述的第四种分子方法不依赖于冬孢子的萌发。

就诊断而言，小麦印度腥黑穗病菌、黑麦草腥黑穗病菌和水稻腥黑粉病菌在细胞核和线粒体（mt）DNA 上存在着显著差异。已使用不同的 PCR 方法鉴定种间多态性，包括多态 DNA 随机扩增（RAPD）、限制性片段长度多态性（RFLP）和扩增片段长度多态性（AFLP）（Laroche 等，1998；Pimentel 等，1998）。在细胞核核糖体（r）DNA 内转录间隔区（ITS）1 和 2 区域，黑麦草腥黑穗病菌和小麦印度腥黑穗病菌的序列相似度 >98%（Levy 等，2001）。然而，在 ITS1 区域，黑麦

草腥黑穗病菌有一个具有诊断意义的重要的限制性酶切位点 (*Sca1*)，该位点在小麦印度腥黑穗病菌、水稻腥黑粉病菌或其他密切相关的病菌中都不存在 (Levy 等, 2001; Pimentel 等, 1998)。线粒体 DNA 序列的差异已促使设计出小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌的种间特异性引物 (Frederick 等, 2000)。这些引物可用于常规 PCR 检测，在 TaqMan®系统中和一个探针一起使用 (Frederick 等, 2000)，或在实时多重分析中和五个探针一起使用 (Tan 等, 2009)。

4.3.1 ITS1 区域限制性酶切分析

目标基因是细胞核 rRNA 基因的 ITS 区域 (Pimentel 等, 1998)。所制备的 PCR 扩增子包括 ITS1 和 ITS2，以及保守区片段 5.8S。该扩增子包括引物序列在内约有 670 个碱基对 (bp)。用于小麦印度腥黑穗病菌的寡聚核苷酸为：

正向引物 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')

反向引物 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White 等, 1990)。

DNA 提取自菌丝。这可以使用研钵和研杵研磨菌丝完成，或将大约 0.1 g 菌丝加入无菌的 2 ml 微型离心管中，管内三分之一的容积装有无菌的 0.5 mm 玻璃珠和 1 ml 分子级水 (MGW)。离心管用含有 O 型密封圈的螺纹盖密封，在珠磨机中振荡或在组织研磨仪中以四分之一功率研磨 5 min。研磨样品放置 30 s，然后用真菌专用 DNA 提取试剂盒提取 DNA。不需要清洗 DNA。提取到的 DNA 立即使用，在 4°C 下隔夜保存，或在 -20°C 下储存更长时间。

制备限制性扩增子的 PCR 使用以下混合液 (每 50 µl 单一反应浓度)：1 × PCR 缓冲液 (含 1.5 mM MgCl₂ (Applied Biosystems))¹，0.2 mM 各 dNTP，1.25 µl AmpliTaq (5 U/µl) (Applied Biosystems)¹，0.5 µM 各引物，以及 1 µl 提取到的 DNA。PCR 循环参数为：94°C 变性 2 min；94°C 1 min，54°C 1 min，72°C 1 min，30 个循环；以及 72°C 延伸 10 min。

PCR 扩增子的限制性酶切通过以下方法完成。限制性酶切混合物 (每 20 µl 单一反应浓度)：7.3 µl MGW，2.0 µl 限制性酶切缓冲液 (Promega)²，0.2 µl 牛血清白蛋白 (10 µg/µl)、0.5 µl 限制性内切酶 (10 U/µl *Taq1* 或 *Sca1* (Promega))²，以及前面制备的 10.0 µl 未加水的 DNA 扩增子溶液 (>50 ng/µl DNA)。该混合物

¹ 本诊断规程使用 Applied Biosystems 牌产品，并非意味着批准这些产品，而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委 (CPM) 认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

² 本诊断规程使用 Promega 牌产品，并非意味着批准这些产品，而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户，并不表示植检委 (CPM) 认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

在 37℃ 下培育 3 h，通过培育过程中的倒置轻轻混合反应液。在凝胶上进行观察前，将限制性酶切产物储存在 4℃ 下。需要时，将 10 μl 反应产物和一种适宜的标记物一起加样，在 2% 凝胶上进行电泳。

如果扩增后的被检测样品被限制性内切酶 *Taq1* 切成 5 个片段（60、70、110、170 和 260 bp），而 *Sca1* 未能切割，则检测为小麦印度腥黑穗病菌阳性。如果扩增后的被检测样品被 *Taq1* 限制性酶切产生与小麦印度腥黑穗病菌同样的 5 个片段，但 *Sca1* 限制性酶切扩增产品产生两个片段：140 bp 和 520 bp，则为黑麦草腥黑穗病菌阳性。如果扩增产物来自水稻腥黑粉病菌，*Taq1* 产生 4 个 DNA 片段（60、110、150 和 335 bp），*Sca1* 不能切割。其他腥黑粉菌对这些酶及其他酶会产生不同的限制性酶切模式（Pimentel 等，1998）。

4.3.2 使用种特异性引物的常规 PCR 检测

本检测方法由 Frederick 等（2000）使用线粒体 DNA³ 设计，产生一个 414 bp 的扩增子。用于小麦印度腥黑穗病菌的寡聚核苷酸为：

正向引物 Tin 3（5'-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3'）

反向引物 Tin 4（5'-CAA CTC CAG TGA TGG CTC CG-3'）。

DNA 从菌丝中提取。将 0.5—1.0 g 菌丝加入装有 75 μl 细胞裂解缓冲液的 1.5 ml 微型离心管中研磨，随后用安装在电动钻头上的无菌杵进一步研磨。再次加入 75 μl 细胞裂解缓冲液，然后使用真菌专用的 DNA 提取试剂盒提取 DNA。不需要清洗 DNA。提取到的 DNA 立即使用，在 4℃ 下隔夜保存，或在 -20℃ 下储存更长时间。

本检测的 PCR 使用以下混合液（每 25 μl 单一反应浓度）：1 x PCR 缓冲液（含 10 mM Tris-HCl，50 mM KCl（pH 8.3），1.5 mM MgCl₂ 和 0.001%（w/v）明胶）；dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP，各自浓度均为 0.1 μM；各引物浓度 0.1 μM；0.5 U *AmpliTaq* DNA 聚合酶；以及 1.0 μl 按照上述方法提取到的 DNA。

PCR 循环参数为：94℃ 变性 1 min；94℃ 15 s，65℃ 15 s，72℃ 15 s，25 个循环；以及 72℃ 延伸 6 min。

³ Ferreira 及其同事提交了 GenBank 序列号 AF218058、AF218059 和 AF218060。该线粒体序列与序列号为 DQ993184 的小麦印度腥黑穗病菌线粒体 DNA 序列同源性很低：BLAST 结果显示只有约 30% 的同源性。线粒体 DNA 中的 AT 碱基的含量比 GC 含量高，一般为 30—40%（Kurtzman, 1985），然而，Ferreira 及其同事提交给 GenBank 的三个序列中的 AT 含量为 43.5%，比 GC 含量低（56.55%）。（C）当其来源于提取并纯化的小麦印度腥黑穗病菌线粒体 DNA 时，引物 TIN3/Tin4 不能扩增线粒体 DNA，产生理想的扩增子；因此，所提交的三个序列属于基因组 DNA。

按照要求，将 10 μ l 反应产物和适宜的标记物一起加样，在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。

检测黑麦草腥黑穗病菌时，用 0.1 μ l 正向引物 Tin 11 (5'-TAA TGT TGG CGT GGC AT-3') (25 μ M) 替换 Tin 3 引物，产生一个 414 bp 的扩增子。

阳性反应对小麦印度腥黑穗病菌 (引物 Tin 3/Tin 4) 和黑麦草腥黑穗病菌 (引物 Tin 11/Tin 4) 均产生 414 bp 的单个扩增子。如果黑麦草腥黑穗病菌和小麦印度腥黑穗病菌特异性引物对被检测样品不产生阳性结果 (但阳性对照 DNA 样品为阳性)，则样品提取物为其他腥黑粉菌，例如水稻腥黑粉病菌。如有要求，限制性内切酶分析可进一步将这些样品鉴定到种 (4.3.1 节)。

还有另一种情况，质量差的 DNA 会导致无法扩增。这一点可以用 4.3.1 节描述的通用引物 (ITS1 和 ITS4) 对提取物进行检测来加以验证。如果那些样品含有高质量 DNA，则被检测样品不是小麦印度腥黑穗病菌或黑麦草腥黑穗病菌，而是另一种腥黑粉菌，将 PCR 扩增子在琼脂糖凝胶上进行电泳会产生单一条带 (约 670 bp)。如果仍然无法进行扩增，应提取新鲜的 DNA，并重新进行检测。

4.3.3 使用种特异性引物和荧光探针的 PCR 检测

本检测方法由 Frederick 等 (2000) 使用基因组 DNA 设计，产生一个 212 bp 的扩增子。用于小麦印度腥黑穗病菌的寡聚核苷酸为：

正向引物 Tin 3 (5'-CAA TGT TGG CGT GGC GC-3')

反向引物 Tin 10 (5'-AGCTCCGCCTCAAGTTCCTC-3')

RT 探针：TaqMan® 探针 (10 μ M) (Applied Biosystems¹)：5'- (FAM label) -ATT CCC GGC TTC GGC GTC ACT- (TAMRA quencher) -3'。

DNA 按照 4.3.2 节描述的方法从菌丝组织中提取。

本方法的 PCR 使用以下混合液 (25 μ l 反应度)：1 \times TaqMan® Universal Master Mix, 0.4 μ M Tin3/Tin10 或 Tin11/Tin10 引物和 4 μ M 探针，用于小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌特异性引物的基因 DNA 均 12.5 ng (按照 4.3.2 节的方法取)。PCR 循环参数：50°C 2 min；95°C 10 min；95°C 15 s, 60°C 1 min, 34 个循环。

应使用光学级反应管和管盖，以便对实时扩增进行监测。

在检测黑麦草腥黑穗病菌时，使用 1.0 μ l 正向引物 Tin 11 (5'-TAA TGT TGG CGT GGC AT-3') (25 μ M) 替换 Tin 3，产生一个 212 bp 的扩增子。

小麦印度腥黑穗病菌用引物 Tin 3/Tin 10，黑麦草腥黑穗病菌用引物 Tin 11/Tin 10 会产生扩增。如没有一对引物产生扩增，但对照样品产生了预期的反应，则样品提取物为另一种腥黑粉菌，如水稻腥黑粉病菌。在检测小麦印度腥黑穗病菌，且样品的循环阈值 (Ct) >33 时，该结果表明是小麦印度腥黑穗病菌阴性，且很有可能是另一种腥黑粉菌。同样，在检测黑麦草腥黑穗病菌且 Ct>33 时，该结果表明是黑麦草腥黑穗病菌阴性，且很有可能是另一种腥黑粉菌。如有要求，限制性内切酶分析可进一步将这些样品鉴定到种 (4.3.1 节)。

质量差的 DNA 会导致无法扩增。这一点可以用 4.3.1 节描述的通用引物 (ITS1 和 ITS4) 对提取物进行检测来加以验证。如果那些样品含有高质量 DNA，则被检测样品不是小麦印度腥黑穗病菌或黑麦草腥黑穗病菌，而是另一种腥黑粉菌，将 PCR 扩增子在琼脂糖凝胶上进行电泳会产生单一条带 (约 670 bp)。如果仍然无法进行扩增，应提取新鲜的 DNA 并重新进行检测。

研究发现，小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌检测的灵敏度极限都是 5 pg 总 DNA。该浓度产生了可以检测到的荧光水平 (Frederick 等, 2000)。使用从狼尾草黑粉病菌、小麦网腥黑穗病菌 (*Tilletia tritici*)、小麦光腥黑穗病菌 (*Tilletia laevis*)、小麦矮腥黑穗病菌 (*Tilletia controversa*) 和禾草腥黑穗病菌 (*Tilletia fusca*) 中提取到的 DNA 验证了本检测方法的种特异性。这些分离物没有一种在小麦印度腥黑穗病菌或黑麦草腥黑穗病菌特异性检测中获得了扩增 (Frederick 等, 2000)。

4.3.4 冬孢子直接实时 PCR

本检测方法由 Tan 等 (2009) 设计，使用了细胞核小亚基和大亚基核糖体 DNA 之间的 ITS 区域。发现腥黑粉菌有两个不同的区域 (ITS1 和 ITS2)，由保守的 5.8S 核糖体 RNA 基因隔开 (Levy 等, 2001; Tan 和 Murray, 2006)。本方法的设计是先扩增腥黑粉菌属特异性 DNA，然后用实时 PCR 和荧光探针将腥黑粉菌鉴定到种。本研究以核糖体 DNA 的 ITS1 区域为目标来设计多重检测方法，即一种用于鉴定在谷物中发现的密切相关的腥黑粉菌的五重荧光 PCR 检测方法。

将一等份反应混合物加入 PCR 管 (来自 4.2.3 节)，使用同一移液管尖端将盖玻片夹层挤压成碎片，释放出孢子材料。重要的是，在挤压过程中要确保 PCR 管不破裂。

4.3.4.1 进行实时 PCR 前腥黑粉菌 DNA 的扩增

各种腥黑粉菌的腥黑粉菌属特异性 DNA 扩增使用引物 MK56 (5'-GTA GGT GAA CCT GCG GAA GGA TCA TT-3') (Tan 等, 1996) 和 *Tilletia*-R (

5'-CAA GAG ATC CGT TGT CAA AAG TTG-3') (Tan 和 Murray, 2006) 来完成。每一 PCR 在 20 μ l (单一反应) 混合液中完成, 具体为 1 \times 缓冲液 (50 mM Tris (pH 9.0), 20 mM NaCl, 1% Triton X-100 和 0.1% 明胶) 中含: 1.5 mM MgCl₂, 四种脱氧核苷酸 dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 各 200 μ M, 一对引物各 0.5 μ M 和 0.5 U Taq DNA 聚合酶 (Invitrogen⁴)。

热循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 1 个初循环; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 63 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 20 个循环, 退火温度每循环降低 1 $^{\circ}$ C, 经过 5 个循环降至 59 $^{\circ}$ C; 最后在 72 $^{\circ}$ C 和 4 $^{\circ}$ C 下各培育 10 min 和 1 min。

限制性产物可在 4 $^{\circ}$ C 下保存。如果在凝胶上观察, 将 10 μ l 反应产物和适宜的标记物一起加样, 在 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳。预期的片段大小为 260 bp。然而, 如果 PCR 用单个冬孢子完成, 由于没有足够多的 DNA 存在, 无法看见该片段。

4.3.4.2 鉴定到种的实时五重荧光 PCR 检测

将含有双标记探针和寡聚核苷酸引物 (表 3) 的 20 μ l 反应液装在 0.1 ml 的微型离心管中, 在 Rotor-Gene 6000 instrument (Qiagen⁵) 中进行实时 PCR 检测。五重反应混合物包含: 1 \times ImmoBuffer (Bioline⁶, 5 mM MgCl₂, 四种脱氧核苷酸 dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 各 200 μ M, 1 U ImmolaseTM DNA 聚合酶 (Bioline⁶) 和双标记探针、四种正向引物、四种反向引物之一各 0.2 μ M、0.4 μ M 和 0.9 μ M (表 3)。模板 DNA 是 1 μ l 腥黑粉菌属特异性 DNA 的 PCR 扩增产物 (4.3.4.1 节)。

热循环参数为: 95 $^{\circ}$ C 10 min, 一个始循环; 继以 94 $^{\circ}$ C 15 s, 65 $^{\circ}$ C 60 s, 40 个循环, 退火温度每循环降低 1 $^{\circ}$ C, 经过 6 个循环降至 60 $^{\circ}$ C。动态管正常化选项被用来确定每个样品扩增之前的平均背景。荧光数据记录在五个通道: 绿、黄、橙、红、紫。

本检测对单个孢子的灵敏度是 10—40% (即已知为阳性的小麦印度腥黑穗病菌孢子中只有 10—40% 产生阳性 PCR 结果) (Tan 和 Wright, 2009)。该灵敏度来源于几个原因, 其中包含一个事实, 即所有小麦印度腥黑穗病菌孢子和黑粉化谷物

⁴ 本诊断规程使用 Invitrogen 牌产品, 并非意味着批准这些产品, 而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户, 并不表示植检委 (CPM) 认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

⁵ 本诊断规程使用 Qiagen 牌产品, 并非意味着批准这些产品, 而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户, 并不表示植检委 (CPM) 认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

⁶ 本诊断规程使用 Bioline 牌产品, 并非意味着批准这些产品, 而将可能也适用的其它产品排除在外。提供这种信息是为了便利本规程的用户, 并不表示植检委 (CPM) 认可提到的化学品、试剂和/或设备。可以使用表明能够产生相同结果的等同产品。

都要进行两次高压消毒，因此可能对遗传物质造成了损害。以 1:0.1 pg 和 0.1:1 pg 的比例（单孢分析显示出的适宜的浓度范围）配制小麦印度腥黑穗病菌：黑麦草腥黑穗病菌，或沙地牧草腥黑粉菌，或小麦网星黑穗病菌（*T. caries*）的 DNA 混合物，研究小麦印度腥黑穗病菌探针的特异性。也检测了引物的特异性，发现它们不能与其他腥黑粉菌发生反应。

应按照 Tan 等（2009）描述的方法，使用已知浓度的腥黑粉菌 DNA 生成每一种病菌每一次检测的标准曲线。用获得的 Ct 值（扩增曲线与阈值线交叉处的循环值）建立被检测的腥黑粉菌的阈值。一般而言，大于本步骤确定的阈值的 Ct 值可视为阴性结果。

表 3. 小麦印度腥黑穗病菌和其他相关腥黑粉菌五重荧光 PCR 诊断检测中所用引物和探针的序列与修饰

引物对（序列 5'-3'）	探针 （修饰 5', 3'）	通道	目标
KB-DL-For: CTTCGGAAGAGTCTCCTT (nt. 64–81 ^a)	ACGGAAGGAACGAGGC (nt. 105–120) (6-FAM, BHQ1)	绿	小麦印度腥黑穗病菌
KB-DL- Rev: CCGGACAGGTACTCAG (nt. 127–142)	ACGGAAGGAACAAGGC (nt. 67–82 ^b) (JOE, BHQ1)	黄	黑麦草腥黑穗病菌
Hor-DL-For GGCCAATCTTCTCTACTATC (nt. 40–59 ^c) Hor-DL-Rev: CCGGACAGGATCACTA (nt. 87–102)	CAACCCAGACTACGGAGGGTGA (nt. 60–81) (CAL Fluor Red 610, BHQ2)	橙	水稻腥黑粉病菌 (一些株系未能检测到)
Tri-DL-For: ATTGCCGTA CTCTCTCTC (nt. 56–73 ^d) Tri-DL-Rev: GTAGTCTTGTGTTGGATAATAG (nt. 99–112)	AGAGGTCGGCTCTAATCCCATCA (nt. 75–97) (Quasar 670, BHQ2)	红	大范围*
Ehr-DL-For: CGCATTCTTATGCTTCTTG (nt. 72–90 ^e) Ehr-DL-Rev: GTTAGGAACCAAAGCCATC (nt. 128–146)	CAGAGTCATTGGTTCTTCGGAGC (nt. 104–126) (Quasar 705, BHQ2)	紫	沙地牧草腥黑粉病菌

注：GenBank 序列号是 ^aAF398434、^bAF310180、^cAF310171、^dAF398447 和 ^eAY770433。所用参考材料和出处清单见 Tan 等（2009），材料保存在澳大利亚新南威尔士州初级产业部伊丽莎白·麦克阿瑟农业研究所（EMAI）（见 6 节，联系点）。nt.，核苷酸。

* 包括小麦网星黑穗病菌、小麦光腥黑粉病菌、小麦矮腥黑穗病菌、禾草腥黑粉病菌、雀麦腥黑粉病菌、角腥黑粉菌 (*T. goloskokovii*)。

5. 记录

参看 ISPM 第 27 号 (2006 年) 2.5 节获取需要记录和保存的信息清单。

诊断报告应包括阳性分样品数量和每个阳性分样品中检测到的冬孢子估计数量。如果获取了用于分子检测的培养物，则应描述菌落形态，特别是色素产生情况，以及特定条件下的生长速度。应保存好培养物（在-80℃下冷冻保存来自肉汤的菌丝体或来自琼脂平板的菌丝垫）。

6. 获取进一步信息的联系点

有关本微生物的进一步信息可从以下渠道获：

西澳大利亚州政府农业与食品部，澳大利亚南珀斯，WA 6151（Dominie Wright 女士；电子邮箱：dominie.wright@agric.wa.gov.au；电话：+61 8 9368 3875；传真：+ 61 8 474 2658）。

新南威尔士州初级产业部伊丽莎白·麦克阿瑟农业研究所（EMAI），澳大利亚卡姆登，NSW 2570（Mui-Keng 博士，电子邮箱：mui-keng.tan@idpi.nsw.gov.au）。

深圳出入境检验检疫局植物检验检疫实验室，中国广东省深圳市，518045（Guiming Zhang 博士；电子邮箱：zgm2001cn@yahoo.com.cn；电话：+86 755 8211 1148；传真：+86 755 2558 8630）。

美国农业部（USDA）农业研究局（ARS），美国北大西洋地区（NAA）德特里克堡（Fort Detrick），MD 21702（Gary Peterson 先生；电子邮箱：gary.peterson@ars.usda.gov）。

美国农业部动植物检疫局（APHIS），美国 Riverdale, MD（Mary Palm 博士；电子邮箱：Mary.E.Palm@aphis.usda.gov）。

美国农业部动植物检疫局，美国 Beltsville, MD（John McKemy 博士；电子邮箱：John.M.McKemy@aphis.usda.gov）。

英国食品与环境研究局，英国约克，YO41 1LZ（Kelvin Hughes 博士；电子邮箱：Kelvin.Hughes@fera.gsi.gov.uk）。

7. 致谢

本规程的主要内容最初由英国食品与环境研究局（英国约克）的 A.J. Inman、K.J.D. Hughes 和 R.J. Bowyer 于 2003 年起草。该规程在一些欧洲实验室⁷通过了环测试（Riccioni 等，2002），构成了 EPPO 规程 PM 7/29（2）的基础（EPPO，2007）。

本规程由西澳州政府农业与食品部（澳大利亚珀斯）D.G. Wright、英国食品与环境研究局（英国约克）K.J.D Hughes，以及中国深圳植物检验检疫实验室 G. Zhang 修改完善。苏格兰农业科学与咨询研究院（英国爱丁堡）的 V. Cockerell 审阅了本规程。

⁷ A. Radova, 国家植物检疫局, 捷克共和国奥洛穆茨; I. Vloutoglou, 贝纳基植物病原研究所, 希腊雅典; A. Porta-Puglia, 植物病原研究所, 意大利罗马; C. Montuschi, 区域植物检疫局, 意大利博洛尼亚; I. van Brouwershaven, 国家植保组织, 荷兰瓦格宁根; M. de Jesus Gomes, E. Diogo 和 M.R. Malheiros, 植物保护总署, 葡萄牙里斯本; V. Cockerell, 苏格兰农业科学与咨询研究院, 英国爱丁堡; A. Barnes, 食品与环境研究局 (FERA), 英国约克。

8. 参考文献

- 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.
- 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).
- ISPM 27.** 2006. *Diagnostic protocols for regulated pests*. Rome, IPPC, FAO.
- 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. 图



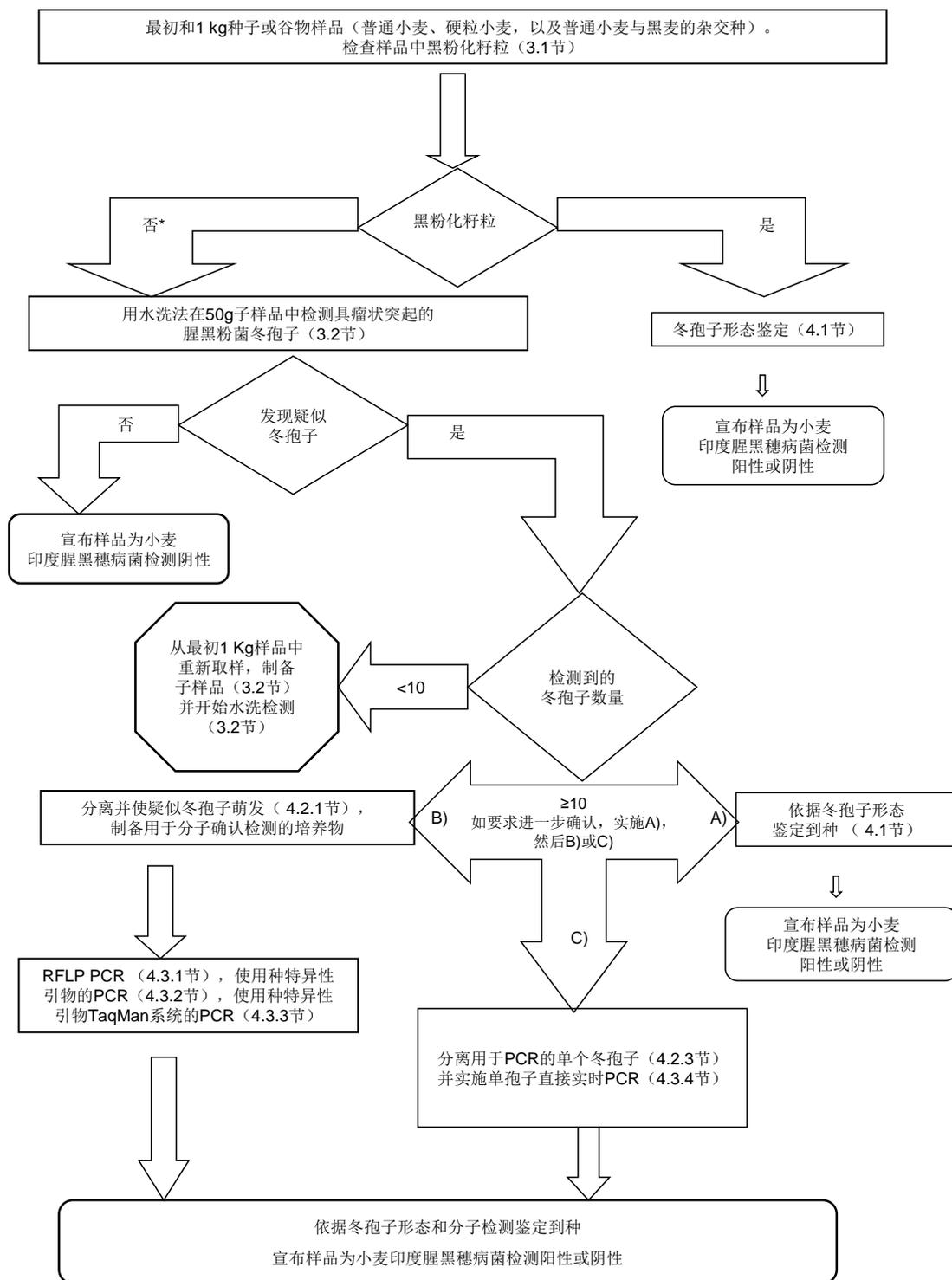
图 1. 显示小麦印度腥黑穗病症状的被侵染的麦穗。

照片由西澳大利亚州政府农业与食品部提供。



图 2. 显示小麦印度腥黑穗病症状的被侵染的麦粒。

照片由西澳大利亚州政府农业与食品部提供。



* 如果没有黑粉化籽粒, 可认为不存在小麦印度腥黑穗

图 3. 说明用于检测和鉴定种子及谷物样品中小麦印度腥黑穗病菌的方法的流程图。

PCR, 聚合酶链式反应; RFLP, 限制性片段长度多态性。

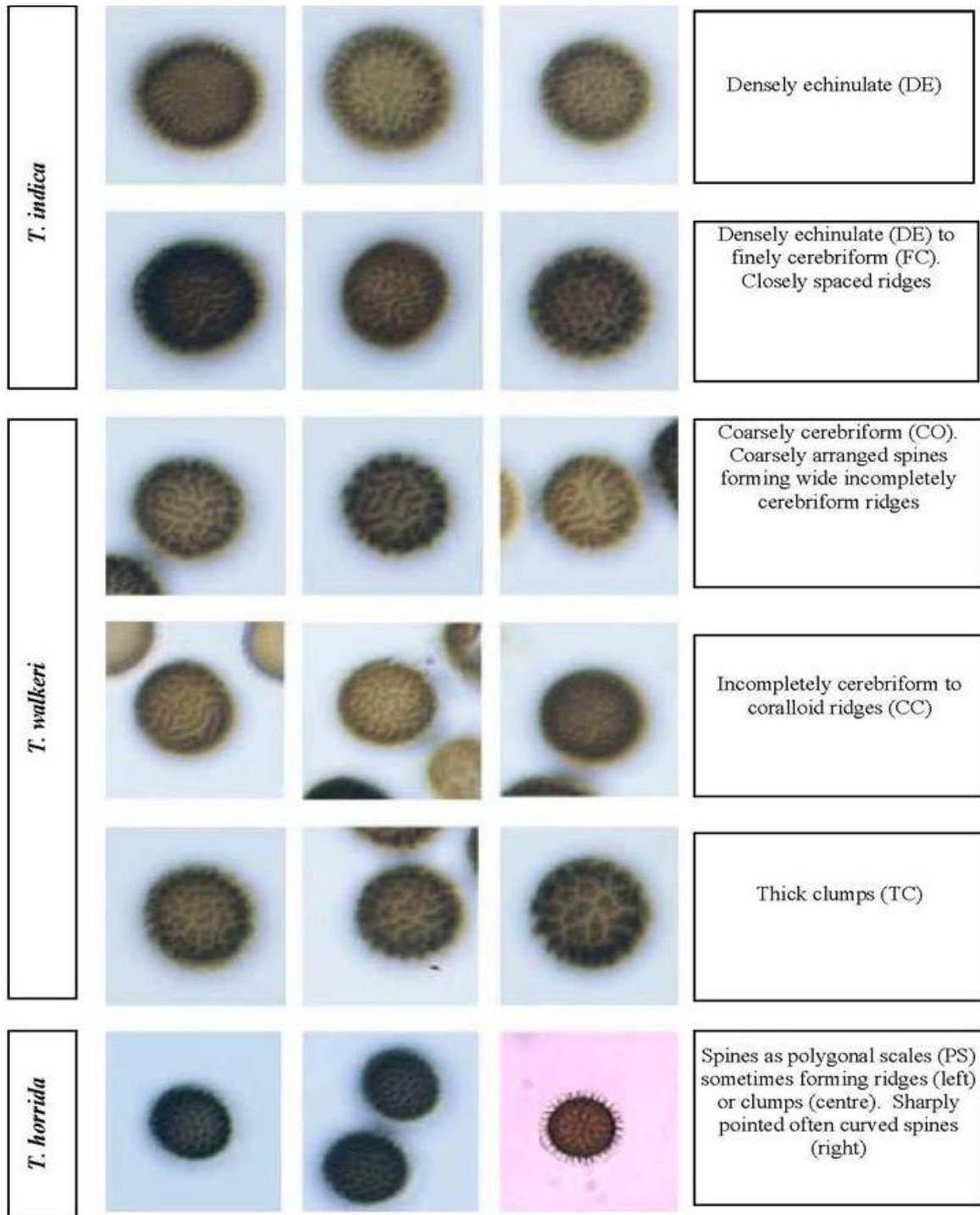


图 4. 腥黑粉菌属冬孢子纹饰的图示检索，和表 2 结合使用（4.1 节）。

照片由中央科学实验室（英国约克）的 A. Inman 提供。

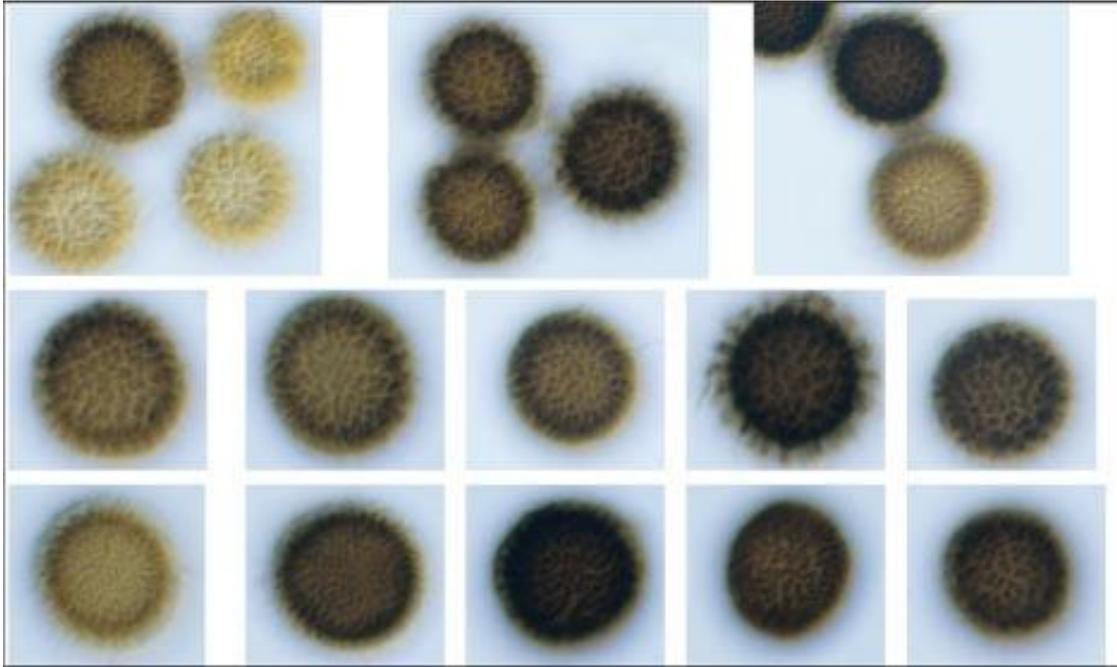


图 5. 小麦印度腥黑穗病菌冬孢子，显示表面纹饰模式。突起密集分布，单独（浓密刺状）或密集分布的窄脊（很像脑状）。比例：10 mm = 17 μm。

照片由中央科学实验室（英国约克）A. Inman 提供。

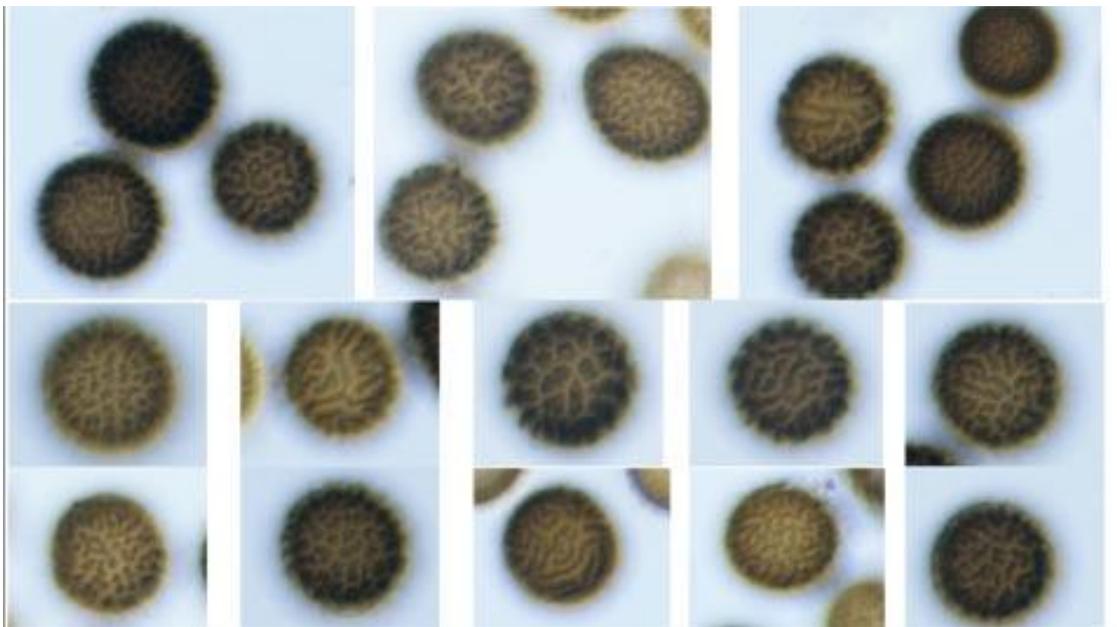


图 6. 黑麦草腥黑穗病菌冬孢子，显示表面纹饰模式。突起随意排列，形成宽的、不完整的脑形至珊瑚状脊或浓密丛簇。比例：10 mm = 17 μm。

照片由中央科学实验室（英国约克）A. Inman 提供。

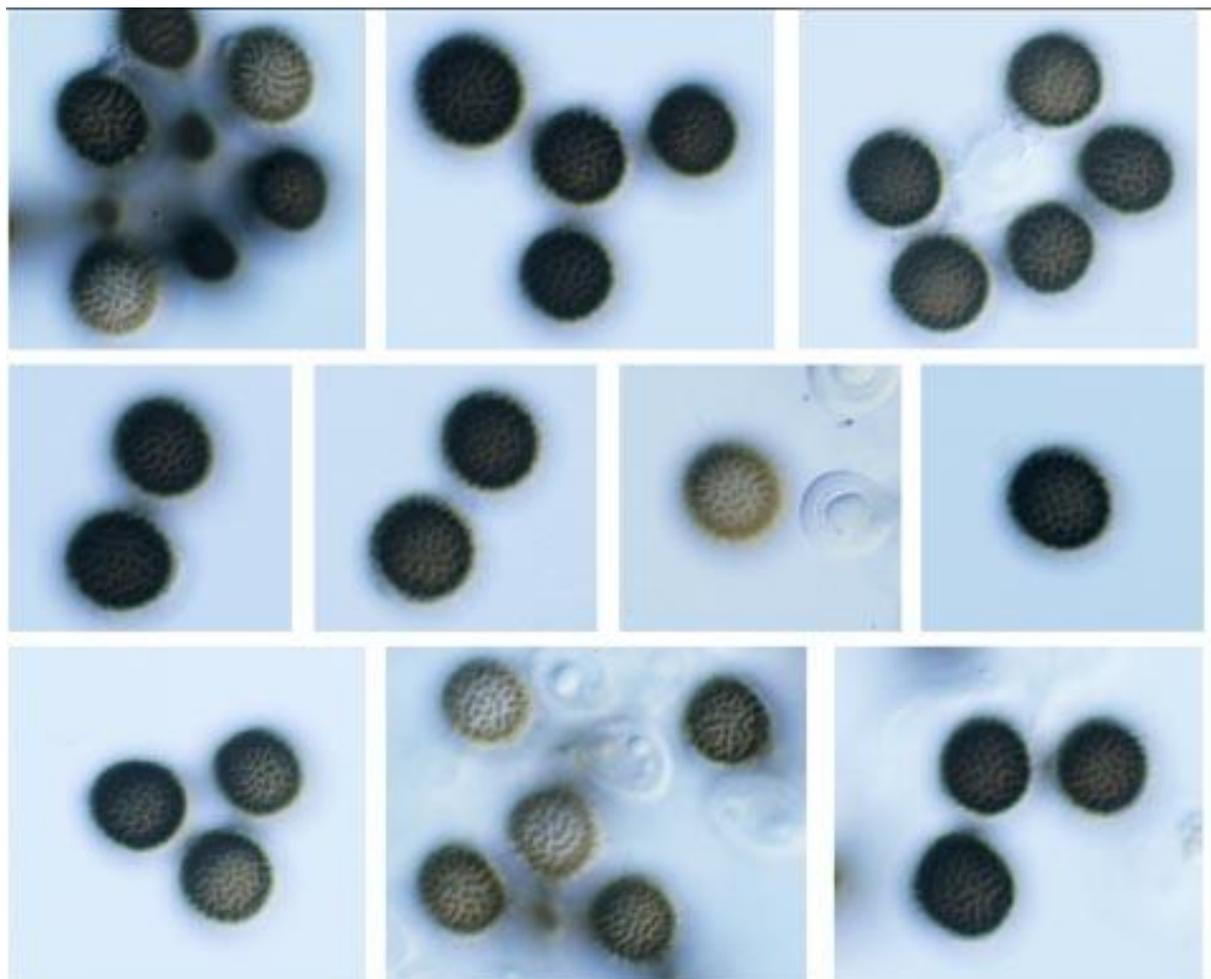


图 7. 水稻腥黑粉病菌冬孢子，显示表面纹饰模式。突起呈多边形鳞状排列，或偶尔为脑状脊。比例：10 mm=17 μ m。

照片由中央科学实验室（英国约克）A. Inman 提供。

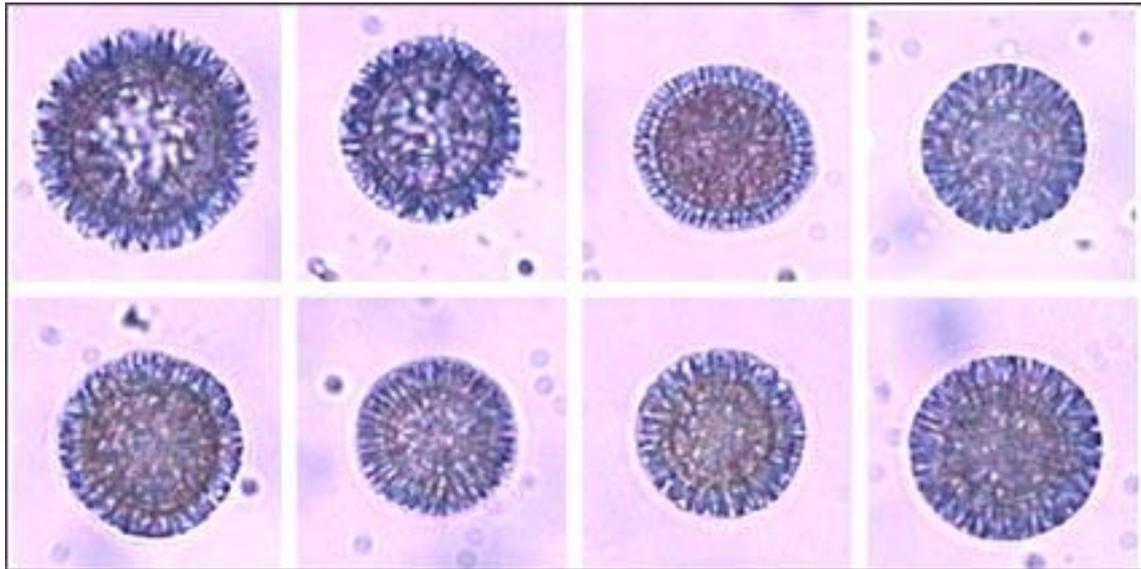
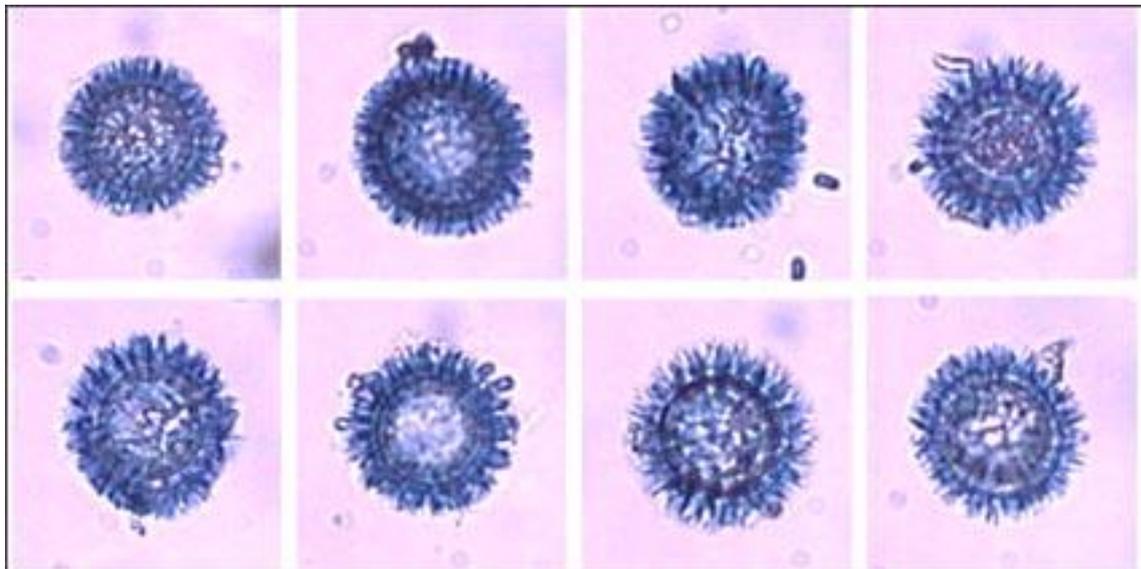
**A****B**

图 8. 小麦印度腥黑穗病菌（A）和黑麦草腥黑穗病菌（B）冬孢子，显示漂白并用乳化甘油-锥虫蓝染色后的截面观冬孢子轮廓。注意小麦印度腥黑穗病菌冬孢子轮廓更加光滑，与黑麦草腥黑穗病菌冬孢子较不规则的轮廓形成对比，后者突起间有更为明显的缝隙。

照片由中央科学实验室（英国约克）A. Inman 提供。

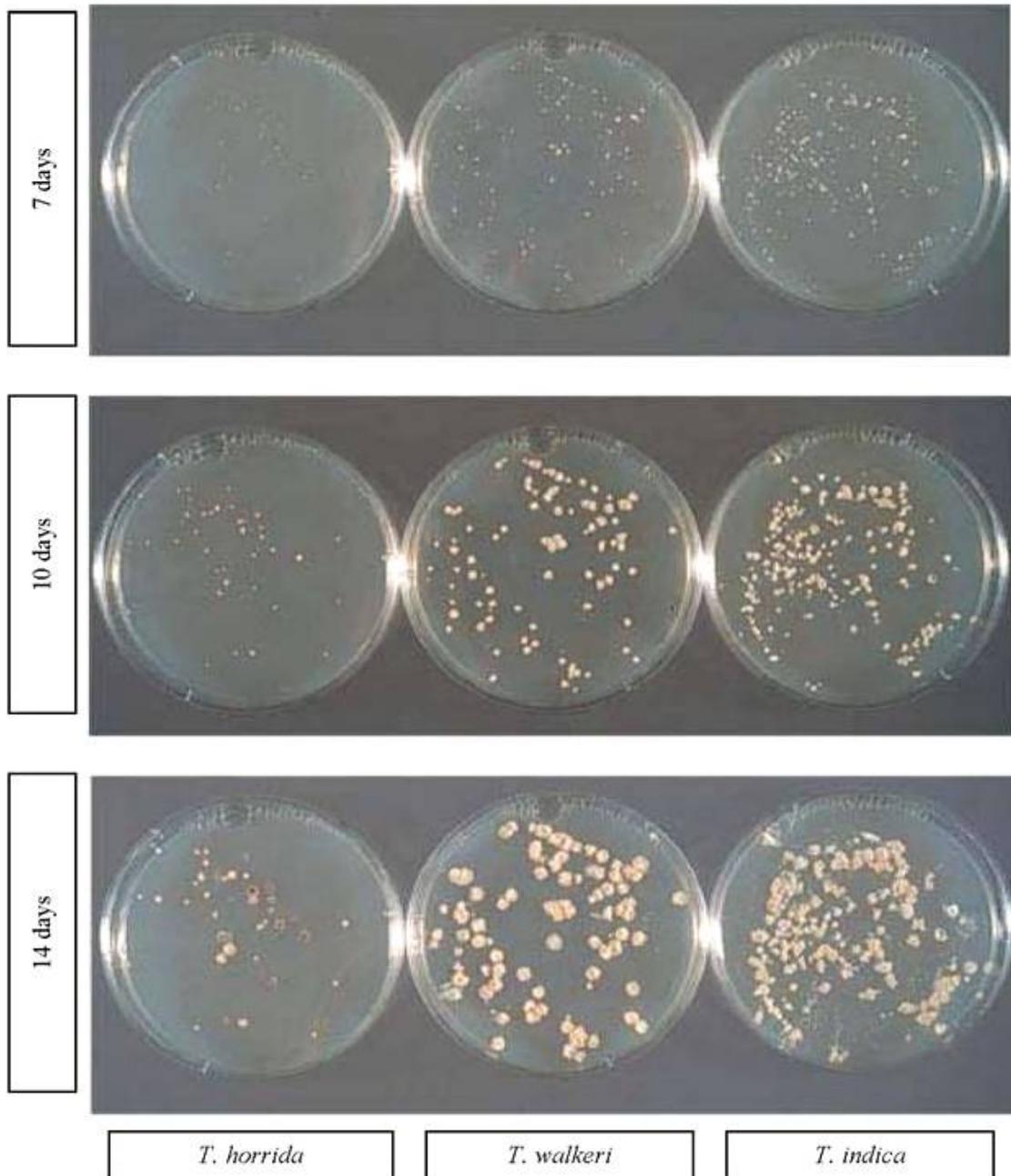


图 9. 在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基上以 19°C、12 h 暗/光周期培养 7 天 (顶部)、10 天 (中部) 和 14 天 (底部) 后的小麦印度腥黑穗病菌 (右)、黑麦草腥黑穗病菌 (中) 和水稻腥黑粉病菌 (左) 菌落。注意水稻腥黑粉病菌培养 14 天后生长比较缓慢, 并产生粉红色色素。

照片由中央科学实验室 (英国约克) A. Inman 提供。

出台背景说明

这部分不属于本标准的正式内容

2006年3月 植检委在“真菌和类真菌生物”这一主题下增列小麦印度腥黑穗病菌/小麦矮腥黑穗病菌（2004-014）

2012年11月 标准委以电子决定方式批准了该草案供成员磋商

2012年7月 成员磋商

2013年5月 标准委以电子决定方式批准供通过（退回诊断规程技术小组）

2013年6月 诊断规程技术小组进行修订

2013年10月 提交标准委以电子决定方式批准供通过

2013年10月 标准委以电子决定方式批准了该草案，使其进入45天通知期

2013年12月 45天通知期

2014年1月 标准委代表植检委通过了诊断规程

ISPM 27.2006: 附件 4 小麦印度腥黑穗病菌（2014年）

出台背景最后修订时间：2014年3月