



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4877.5—2017

基因条形码筛查方法 第5部分：检疫性拟茎点霉

DNA barcoding screening method—Part5: Quarantine *Phomopsis* spp.

2017-08-29 发布

2018-04-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

SN/T 4877《基因条形码筛查方法》分为 10 个部分：

- 第 1 部分：检疫性棒形杆菌；
- 第 2 部分：检疫性黄单胞菌；
- 第 3 部分：检疫性植原体；
- 第 4 部分：检疫性茎点霉；
- 第 5 部分：检疫性拟茎点霉；
- 第 6 部分：检疫性嗜酸菌；
- 第 7 部分：检疫性轮枝菌；
- 第 8 部分：检疫性炭疽菌；
- 第 9 部分：检疫性腥黑粉菌；
- 第 10 部分：检疫性疫霉。

本部分为 SN/T 4877 的第 5 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国天津出入境检验检疫局、中国检验检疫科学技术研究院、中华人民共和国宁波出入境检验检疫局、中国科学院微生物研究所。

本部分起草人：黄国明、胡佳续、段维军、赵文军、蔡磊、高雅惠、廖芳、罗加风、张莹。

基因条形码筛查方法
第 5 部分：检疫性拟茎点霉

1 范围

SN/T 4877 的本部分规定了大豆北方茎溃疡病菌、大豆南方茎溃疡病菌、向日葵茎溃疡病菌、黄瓜黑色根腐病菌等 4 种检疫性拟茎点霉 DNA 条形码筛查方法。

本部分适用于进境植物及其产品中大豆北方茎溃疡病菌、大豆南方茎溃疡病菌、向日葵茎溃疡病菌、黄瓜黑色根腐病菌等 4 种检疫性拟茎点霉的筛查。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- SN/T 1899 大豆茎溃疡病菌检疫鉴定方法
- SN/T 2589 植物病原真菌检测规范
- SN/T 3423 黄瓜黑色根腐病菌检疫鉴定方法
- SN/T 3432 向日葵茎溃疡病菌检疫鉴定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

凭证标本 voucher specimen

为鉴定或研究提供实物依据并具有足够存档信息(采集及鉴定信息等)而长期保存的标本，它可以是完整的生物个体或其一部分，也可以是生物体的遗传物质。凭证标本的保存非常重要，需要有详细的标本编号、存放地点等详细信息，以便于日后查证。

3.2

DNA 条形码 DNA barcode

生物体内能够代表该物种的，标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的 DNA 片段。

3.3

内部间隔转录区序列 Internal transcribed spacer; ITS

用于鉴定拟茎点霉属病原真菌的 DNA 条形码：内部间隔转录区序列(Internal transcribed spacer, 简称 ITS)，在 rDNA 基因中，18S rDNA 和 28S rDNA 基因间隔序列称为(ITS)，它的长度和序列变化较大，将其扩增物进行序列分析，可用于对植物病原真菌的属、种、甚至种下阶元进行分类鉴定。

4 检疫性拟茎点霉基本信息

农业部和国家质检总局 2007 年 5 月 29 日发布的第 862 号公告《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》中将植物病原真菌拟茎点霉属(*Phomopsis*)中的大豆北方茎溃疡病菌 *Diaporthe*

phaseolorum (Cooke et Ell.) Sacc. var. *caulivora* Athow et Caldwell (无性态为 *Phomopsis phaseoli*)、大豆南方茎溃疡菌 *Diaporthe phaseolorum* (Cooke et Ell.) Sacc. var. *meridionalis* F.A. Fernandez (无性态为 *Phomopsis phaseoli*)、向日葵茎溃疡病菌 *Diaporthe helianthi* Muntanola—Cvetkovic Mihaljcevic et petrov (无性态为 *Phomopsis helianthi* Munt.-Cvetk., Mihaljc. & M. Petrov)、黄瓜黑色根腐病菌 *Phomopsis sclerotoides* van Kesteren、蓝莓果腐病菌 *Diaporthe vaccinii* Shear (无性态为 *Phomopsis vaccinii* Shear N.E. Stevens & H.F. Bain)、苹果果腐病菌 *Diaporthe pernicioso* É.J. Marchal (无性态为 *Phomopsis prunorum* (Cooke) Grove)、列为我国禁止进境检疫性有害生物。

大豆北方茎溃疡病菌、大豆南方基溃疡病菌、向日葵茎溃疡病菌、黄瓜黑色根腐病菌相关分类地位、传播途径等信息分别见 SN/T 1899、SN/T 3432、SN/T 3423。

5 方法原理

根据拟茎点霉属真菌的核糖体转录间隔区(ITS)序列特征,将序列在 DNA 条码数据库和 NCBI 数据库中拟茎点霉属 ITS 序列进行同源性比对,应用 DNA 条形码技术对检疫性拟茎点霉进行种类筛查。

本标准建立的方法不应完全取代形态学和其他分子生物学等鉴定方法,而应作为形态学和其他分子生物学鉴定方法的一种补充,相互佐证。

6 仪器设备和主要试剂

6.1 仪器设备

生物显微镜、高压灭菌锅、超净工作台、组织破碎仪、恒温水浴锅、台式冷冻离心机、微量分光光度仪、电子天平、超纯水仪、漩涡振荡器、冰箱、常规 PCR 仪、核酸电泳仪、凝胶成像系统、测序仪、全自动 DNA 提取仪。

6.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯。应购置如下试剂或者相应的真菌基因组提取试剂盒:二水合乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、氢氧化钠(NaOH)、Tris 碱、浓盐酸(HCl)、溴化十六烷基三甲铵(CTAB)、氯化钠(NaCl)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、冰醋酸(CH_3COOH)、蒸馏水、氯仿(CHCl_3)、异戊醇、70%乙醇。

PCR 和电泳检测所需试剂:10×PCR 缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)、*ExTaq* DNA 聚合酶、引物(表 B.1)、超纯水、DNA 标记物、琼脂糖、GelRed 核酸凝胶染料。

7 DNA 条形码鉴定

7.1 样品的采集与处理

样品的采集、分离、纯化和培养按照 SN/T 2589 植物病原真菌检疫鉴定方法进行。

7.2 核酸的制备

采用市售基因组提取试剂盒制备 DNA,或采用改良的 CTAB 提取法(参见附录 A)。

7.3 DNA 纯度与浓度的测定

用微量紫外分光光度计测定 DNA 的纯度与浓度,分别取得 260 nm 和 280 nm 处的吸收值,计算核

酸的纯度和浓度,计算公式如下:

$$\text{DNA 纯度} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

$$\text{DNA 浓度} = 50 \times \text{OD}_{260} (\mu\text{g/mL})$$

PCR 级 DNA 溶液的 $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 比值应为 1.7~1.9。

7.4 PCR 检测

7.4.1 PCR 扩增

引物序列、PCR 扩增体系、PCR 反应程序参见附录 B。

7.4.2 PCR 产物的检测和测序

5 μL 的 PCR 产物与 1 μL 的 6 \times 上样缓冲液混合,120 V 下电泳,染色后在凝胶成像系统中观察目的片段并成像留存,对扩增产物进行序列测定,测序引物为通用测序引物 M13F-47 和 M13R-48,或者直接将 PCR 扩增产物直接送专业测序公司测序。

7.5 序列分析

测序结果利用生物信息学软件进行剪接编辑,比对峰图和正反向测序结果是否有误,去掉两端引物部分序列。利用 NCBI 在线数据库和 BOLD 在线数据库中比对 ITS 片段序列。

8 结果判定

ITS 序列长度约为 700 bp,若与 DNA 条码数据库和 NCBI 数据库中拟茎点霉属 ITS 序列同源性大于 99%,且菌落特征、寄主等与相关行业标准相符,即可判定为该物种。

9 样品保存

9.1 样品保存与处理

样品经登记和经手人签字后妥善保存。对检出检疫性拟茎点霉的样品应保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,以备复核。该类样品保存期满后须经高压灭菌后方可处理。

9.2 菌株保存与处理

从检测样品中分离并鉴定为检疫性拟茎点霉的菌株,应按照相应行业标准的保存方法妥善保存。对不需要长期保存的菌株应及时高压灭菌处理。

9.3 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括:样品的来源、种类、时间,实验的时间、方法和结果等,并要有实验人员和复核人员签字。PCR 凝胶电泳检测需有电泳结果照片。

附 录 A
(资料性附录)
DNA 提取方法

- A.1 取适量菌丝体(500 mg)和灭菌的玻璃珠放在 2 mL 离心管中,加入 500 μ L 2 \times CTAB(60 $^{\circ}$ C),置于组织破碎仪上破碎组织细胞壁,水浴保温 30 min~60 min,偶尔震荡混匀。
- A.2 加入 500 μ L(1:1,等体积)氯仿-异戊醇(24:1),混合均匀后(3 min),12 000 r/min,离心 15 min。
- A.3 提取上清液,加入 250 μ L(1:1,等体积)氯仿-异戊醇(24:1),12 000 r/min,离心 15 min,重复此步骤一次。
- A.4 提取上清液,加入等体积异丙醇,混匀,沉淀 30 min。
- A.5 出现沉淀后,12 000 r/min 离心 10 min;
- A.6 弃去液相,加入 400 μ L 70%乙醇,震荡洗涤,再 12 000 r/min 离心 5 min 重复此步骤一次。
- A.7 弃去液相,超净工作台中干燥 DNA,约 20 min。
- A.8 加入 50 μ L 或 100 μ L 双蒸水(视情况而定)溶解 DNA 样品,将样品于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。或采用全自动 DNA 提取仪根据仪器和试剂盒使用说明进行操作提取 DNA。

附 录 B
(资料性附录)
DNA 条形码引物和反应条件

扩增引物见表 B.1。
PCR 反应体系(30 μL)见表 B.2。
PCR 反应程序(ITS)见表 B.3。

表 B.1 扩增引物

| 名称 | 序 列 | 目的基因 |
|--|---|------|
| ITS4 | 5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGATCCTCCGCTTATTGATATGC-3' | ITS |
| ITS5 | 5'-CGCCA6GGTTTTTCCCA6TCACGACGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' | |
| 注:下划线部分为通用测序引物 M13F-47 和 M13R-48,全部序列都要合成。 | | |

表 B.2 PCR 反应体系(30 μL)

| 试剂名称 | 加样量/μL |
|---------------------------|--------|
| 10×PCR 缓冲液 | 3.0 |
| 2.5 mmol/L dNTP | 2.0 |
| 10 μmol/L primer F | 1.0 |
| 10 μmol/L primer R | 1.0 |
| 5 U/μL <i>Taq</i> DNA 聚合酶 | 0.4 |
| 10 ng/μL 模板 DNA | 2.0 |
| 加双蒸水至 | 30 |

表 B.3 PCR 反应程序(ITS)

| 步骤 | 反应温度/℃ | 时间 | 循环数 |
|-----|--------|-------|-----|
| 预变性 | 94 | 4 min | — |
| 变性 | 94 | 30 s | 35 |
| 退火 | 58 | 30 s | |
| 延伸 | 72 | 45 s | |
| 延伸 | 72 | 7 min | — |

参 考 文 献

- [1] Udayanga D, Liu XZ, McKenzie EHC, et al. Tile genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens[J].Fungal Diversity, 2011, 50(1):189-225.
 - [2] Botella L, Diez JJ. Phylogenic diversity of fungal endophytes in Spanish stands of *Pinus halepensis*[J].Fungal Diversity, 2011, 47(1):9-18.
 - [3] Iriart X, Binois R, Flor A, et al. Eumycetoma caused by *Diaporthe phaseolorum* (*Phomopsis phaseoli*): a case report and a mini-review of *Diaporthe/Phomopsis spp* invasive infections in humans.Clinical Microbiology and Infection, 2011, 17(10):1492-1494.
 - [4] Wang JY, Xu XH, Mao L J, et al. Endophytic *Diaporthe* from southeast China are genetically diverse based on multi-locus phylogeny analyses. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014,30(1):237-243.
-