



# 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4877.9—2017

## 基因条形码筛查方法 第9部分：检疫性腥黑粉菌

DNA barcoding screening method—Part 9: Quarantine Tilletia

2017-08-29 发布

2018-04-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

## 前 言

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 9 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：中华人民共和国深圳出入境检验检疫局、深圳市检验检疫科学研究院。

本部分主要起草人：程颖慧、章桂明、王颖、高瑞芳、汪莹、潘广、向才玉、冯建军、史亚千、王红英、谢晓露。



基因条形码筛查方法  
第 9 部分：检疫性腥黑粉菌

1 范围

SN/T 4877 的本部分规定了小麦印度腥黑穗病菌 *Tilletia indica* 和小麦矮化腥黑穗病菌 *Tilletia controversa* 的 DNA 条形码筛查中序列的扩增、分析及结果判定等。  
本部分适用于小麦印度腥黑穗病菌和小麦矮化腥黑穗病菌的筛查。

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。  
GB/T 18085 植物检疫 小麦矮化腥黑穗病菌检疫鉴定方法  
GB/T 28080 小麦印度腥黑穗病菌检疫鉴定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。  
3.1  
**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。

3.2  
**内部间隔转录区序列 internal transcribed spacer; ITS**  
在真核生物中,核糖体 DNA 是由核糖体基因及与之相邻的间隔区组成,其基因组序列从 5'到 3'依次为:外部转录间隔区、18 S 基因、内部转录间隔区 1(ITS1)、5.8 S 基因、内部转录间隔区 2(ITS2)、28 S 基因和基因间隔序列。内转录间隔区是存在于 18S rDNA、5.8 S rDNA 和 28 S rDNA 之间的区域,ITS1 和 ITS2 作为非编码区,受外界环境因素的影响较小,与编码区域相比具有进化速度快的特点,在种内的不同菌株之间高度保守,而在真菌种间存在极大的变化,表现出极大的序列多态性,能够提供详尽的系统学分析所需的可遗传性状。

4 检疫性腥黑粉菌的基本信息

英文名:Quarantine Bunt  
学名:*Tilletia indica*  
中文名:小麦印度腥黑穗病菌  
学名:*Tilletia controversa*  
中文名:小麦矮化腥黑穗病菌  
分类学地位:真菌界(Fungi)、担子菌门(Basidiomycota)、黑粉菌纲(Ustomycetes)、黑粉菌目(Ustilaginales)、腥黑粉菌科(Tilletiaceae)、腥黑粉菌属(*Tilletia*)



5 方法原理

利用 ITS 片段作为检疫性病菌的条形码基因,通过对检测对象的 DNA 进行 PCR 扩增及产物测序后,利用生物条形码数据(BOLD)或中国检疫性有害生物 DNA 条形码数据库比对,根据序列相似度筛查物种。

6 仪器设备和试剂

6.1 仪器设备

超净工作台、摇床、烘箱、高压灭菌锅、-20℃低温冰箱、PCR 扩增仪、冷冻离心机、核酸蛋白分析仪、琼脂糖电泳仪、凝胶成像系统、纯水器。

6.2 试剂

氯仿、异戊醇、异丙醇、醋酸钠、甲酰胺、70%乙醇、无水乙醇、Tris 饱和酚、*Taq* DNA 聚合酶、明胶、溴化乙锭、DNA 片段标记物、DNA 裂解液、PCR 缓冲液、电泳缓冲液、上样缓冲液、dNTPs(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)、全基因组扩增试剂盒。

7 筛查鉴定方法

7.1 DNA 制备

DNA 制备方法见附录 A。

7.2 DNA 条形码基因片段扩增

利用通用引物进行 ITS 片段序列扩增,具体步骤见附录 B。

7.3 序列分析

测序结果利用序列拼接软件进行拼接编辑,比对峰图,判断序列方向,去除测序引物序列,去除两段测序质量 Q 值小于 20 的序列,然后在生物条形码数据(BOLD)数据库或中国检疫性有害生物 DNA 条形码数据库中比对分析。

8 结果判定

ITS 序列长度约为 600 bp。如果测定的序列与美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中比对(AF399890.1,序列参见附录 C)相似度大于 99%时,可初步判定为小麦印度腥黑穗病菌,进一步鉴定按照标准 GB/T 28080 进行;如果测定的序列与条码数据库中(AF398449.1,序列参见附录 C)比对相似度大于 99%时,可初步判定为小麦矮化腥黑穗病菌,进一步鉴定按照标准 GB/T 18085 进行。

9 菌种或标本保存

9.1 样品保存

分离到的检疫性腥黑粉菌菌种,转入马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)试管斜面培养基上,置于 4℃黑暗

条件下保存至少 12 个月,以备复验、谈判和仲裁。获取的菌瘿或菌瘿碎片等标本,密封保存,保存至少 12 个月,以备复验、谈判和仲裁。

## 9.2 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、地点、方法和结果等,并要有实验人员和审核人员签字。PCR 凝胶电泳检测需有电泳结果照片,序列需要保存电子文件。



附录 A  
(规范性附录)  
DNA 制备

A.1 单个孢子 DNA 获取

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

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

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

用全基因组扩增试剂盒对单个孢子 DNA 进行扩增,扩增产物作为原始 DNA。

A.2 孢子培养物 DNA 提取

A.2.1 孢子萌发

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

A.2.2 孢子培养物的核酸制备

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

立即转移到 2 mL 的离心管中,加入 65 $^{\circ}\text{C}$ 预热的 DNA 裂解液(SDS)提取液 700  $\mu\text{L}$ ,置于水浴锅中 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,期间不断混匀。

加入 5  $\mu\text{L}$  10 mg/mL RNA 酶,充分混匀,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 30 min。

加入等体积的 Tris 饱和酚,充分摇匀,在 12 000 r/min 下离心 15 min。

取上清液,加入 1:1 氯仿-异戊醇(24:1),在 12 000 r/min 下离心 15 min。

再取上清液,加入 1:1 氯仿-异戊醇(24:1),在 12 000 r/min 下离心 15 min。

加入等体积预冷的异丙醇,轻轻摇晃,置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱静置 30 min,在 12 000 r/min 下离心 15 min。

弃上清,加入 70%乙醇 500  $\mu\text{L}$ ,12 000 r/min 下离心 3 min,去上清,重复 2 次。

得到 DNA 沉淀,用冷冻干燥仪进行干燥,加入 30  $\mu\text{L}$ ~50  $\mu\text{L}$  TE 或无菌去离子水,充分溶解后,测量 DNA 的纯度和浓度后置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

注:该核酸制备也可采用 DNA 提取试剂盒法。

A.3 DNA 纯度与浓度的测定

用核酸蛋白分析仪测定 DNA 的纯度与浓度,分别取得 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  $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$  比值为 1.7~1.9。

附 录 B  
(规范性附录)  
扩增程序

B.1 ITS 片段引物序列

ITS1:TCCGTAGGTGAACCTGCGG  
ITS4:TCCTCCGCTTATTGATATGC

B.2 扩增体系及条件

扩增反应的组成成分为:10×PCR 缓冲液 5 μL,25 mmol/L 氯化镁 5 μL,10 mmol/L dNTPS 0.25 μL,10 μmol/L 前后向引物各 2.5 μL,5 U/μL *Taq* 酶 0.25 μL,模板 DNA 5 μL,补充去离子水至 50 μL。将反应体系混匀后置于 PCR 仪中进行反应。

反应用双蒸水作空白对照,阳性对照采用含有小麦印度腥黑穗病菌的 DNA 作为模板,阴性对照以不含有小麦印度腥黑穗病菌的 DNA 作为模板,每个样品重复 2 次。

ITS 扩增反应程序为:95℃预热 5 min,进入循环反应;95℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 60 s,共循环 35 次,循环后 72℃延伸 10 min。

B.3 琼脂糖凝胶电泳

每个样品取 3 μL 的 PCR 产物与 1 μL 的 6×上样缓冲液混合均匀,并加到含有溴化乙锭(0.5 μg/mL)的 1.2%琼脂糖凝胶的点样孔中,在 120 V 下进行电泳。电泳结束后在凝胶成像系统中观察、拍照,并保存照片。



附录 C  
(资料性附录)  
参考序列片段

C.1 小麦印度腥黑穗病菌 ITS 片段参考序列

AF399890.1 *Tilletia indica* strain S001

CGTAACAAGGTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTAGTGAATTACGGAGCTCTT  
CTTCGGAAGAGTCTCCTTCTCTTTTATCCCAACACCAAACCTACGGAAGGAACGAGGCCTTG  
CGCTGAGTACCTGTCCGGATGGAACAGAGTTGCTAGTACTTCGGTATTGGCAGCGCTGCTC  
CAACCCTTTTAAACACTTAAGAATTAAAGAATGTTAAAACTATTGTCTTCGGACATAAAC  
TAATATACAACCTTTTGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTG  
CGCCCTTGGGTATTCTCAAGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATAATACTCTCAACTCTCAAT  
CTTTTTGTAAAGAGAAGATTGCTTGGAGTTGGTGATGGGCGCTTGCCAGATGTAACAGTCT  
TGCTCGCCTTAAATTAATCAGTGGATCTCTTCGAGTCCGGTCTGACTATGTGTGATAATTT  
GATCACATAGAATGTGCTTGTCACAACCGGATTCTGTATAGAGGCTCTGCTTCCAACACGG  
AATGATTCTTCGGAATCATCGATAGCTTTGTAGCTTGACCTCA

C.2 小麦矮化腥黑穗病菌 ITS 片段参考序列

AF398449.1 *Tilletia controversa* strain S022

AGTCGTACCAAGGTTTCTGTAGGTGAACCTGCAGAAGGATCATTAGTGAATCTTTATTGC  
CGTACTTCTCTTCGAGAGGTCGGCTCTAATCCCATCATCTATTATCCAAACACAAGACTAC  
GGAGGGGTGGCTGCGTTGGTGGCCCCCTGCTCCGGATTGGTTCTGGGTCAGATCATTAACA  
CTGGCTGGCTCGGTTCTTACAACCTTTTCAACTCATGAATCATAGAATGTTAAACCCATTG  
TCTTCGGACATGAAACTAAATACAACCTTTTGACAACGGATCTCTTGGTTCTCCCATCGATG  
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATC  
TTTGAACGCACCTTGCGCCCTTGGGTATTCTCAAGGGCATGCCTGTTTGAGTGTCATAACA  
TGTTTCAGCTCCCAGCCTTTTTTGAAAGAGAAGGTTGCTTGGAGTTGGTGATGGACGTTTTT  
TGCCAGACCTTACCGTCTTGCTCGTCTTAAATCGATCAGTGGAATCATCTTTTGAGTCCGG  
TCTGACTATGTGTGATAATTTGATCACATAGAATGTGGGCTTGCCCTACAACCGCATCTTG  
AAGGACTCTGCTTCCAACACGGAATGGTCTTGGACCATCGTTAGCCTTTTAATGCTTGACC  
TCAAATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATC



## 参 考 文 献

- [1] Tan, M., A.Ghalayini, I.Sharma, J.Yi, R.Shivas, M.Priest, and D.Wright, 2009, A one-tube fluorescent assay for the quarantine detection and identification of *Tilletia indica* and other grass bunts in wheat; Australasian Plant Pathology, v.38, p.101-109.
- [2] Hajibabaei, M., G.A.Singer, P.D.Hebert, and D.A.Hickey, 2007, DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics; TRENDS in Genetics, v.23, p.167-172.
- [3] Hebert, P.D., M.Y.Stoeckle, T.S.Zemlak, and C.M.Francis, 2004, Identification of birds through DNA barcodes; PLoS biology, v.2, p.e312.
- [4] Hebert, P.D., E.H.Penton, J.M.Burns, D.H.Janzen, and W.Hallwachs, 2004, Ten species in one; DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*; Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, p.14812-14817.
- [5] Nilsson, R.H., E.Kristiansson, M.Ryberg, N.Hallenberg, and K.Larsson, 2008, Intraspecific ITS variability in the kingdom Fungi as expressed in the international sequence databases and its implications for molecular species identification; Evolutionary bioinformatics online, v.4, p.193.
-