

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4876.2—2017

DNA 条形码方法 第 2 部分：检疫性断眼天牛

Method for DNA barcode—Part 2: Quarantine *Tetropium* spp.

2017-11-07 发布

2018-06-01 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 4876《DNA 条形码方法》共分为 5 个部分：

- 第 1 部分：检疫性乳白蚁；
- 第 2 部分：检疫性断眼天牛；
- 第 3 部分：检疫性卷蛾；
- 第 4 部分：检疫性高粱属；
- 第 5 部分：曼陀罗属；

本部分为 SN/T 4876 的第 2 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：中华人民共和国江苏出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：徐梅、钱路、吴晶、禹海鑫、叶兼菱、季琴琴、朱林娟、杨晓军、郑斯竹、安榆林。

DNA 条形码方法

第 2 部分:检疫性断眼天牛

1 范围

SN/T 4876 的本部分规定了我国检疫性断眼天牛的 DNA 条形码检测鉴定方法。

本部分适用于我国进境植物检疫性断眼天牛 DNA 条形码的测定、结果的比对分析与判定。

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 2013 暗褐断眼天牛检疫鉴定方法

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

一段短的、标准化的基因片段,用于区分不同的物种。该片段在种间存在明显的遗传变异和分化并容易进行 PCR 扩增。DNA 条形码技术主要用于物种识别和新种发现。

3.2

凭证标本 voucher specimen

DNA 条形码的实物参考凭证,凭证标本信息包括馆藏信息、采集信息、鉴定信息,用于复核。模式标本是用于分类学研究的凭证标本。

3.3

CO I 基因

CO I gene 线粒体基因组的蛋白质编码基因,全称为细胞色素 c 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I),由于该基因进化速率较快,常用于分析亲缘关系密切的种、亚种及地理种群之间的系统关系。

4 检疫性断眼天牛基本信息

中文名:断眼天牛

学名:*Tetropium* spp.

分类地位:鞘翅目 Coleoptera,叶甲总科 Chrysomeloidea,天牛科 Cerambycidae,断眼天牛属 *Tetropium*

断眼天牛是一类重要的蛀干害虫,该属中的绝大多数种类均严重危害针叶木,偶尔也可危害阔叶木。其主要分布于欧亚大陆及美洲,在古北区分布有 7 种,北美有 6 种。我国检疫性断眼天牛种类主要有暗褐断眼天牛(*T. fuscum*)、棕翅断眼天牛(*T. cinnamopterum*)、落叶松断眼天牛(*T. gabrieli*)、施氏

断眼天牛(*T.schwarzianum*)、铁杉断眼天牛(*T.velutinum*)、小红棕断眼天牛(*T.parvulum*)等。

5 方法原理

根据断眼天牛的 CO I 序列特征,应用 DNA 条形码技术对检疫性断眼天牛进行鉴定。

6 仪器用具和试剂

6.1 仪器

常规 PCR 仪、微量分光光度仪、电泳仪、凝胶成像系统、测序仪、高速冷冻离心机、生物安全柜、烘箱、高压灭菌锅、显微镜、解剖镜、天平(感量 1/10 000)、研钵、摇床、水浴锅、制冰机、纯水仪、旋涡振荡器、冰箱、微量移液器(2 μ L,10 μ L,20 μ L,100 μ L,200 μ L,1 000 μ L)、PCR 管(0.2 mL,0.5 mL)。

6.2 主要试剂

除另有规定外,所有试剂均为分析纯或生化试剂。

提取液 A(含 1% SDS,50 mmol/L 提取液 B 3 mmol/L KAc,Tris · Cl,25 mmol/L NaCl,25 mmol/L EDTA)、5 mol/L 醋酸钾(KAc)、Tris 饱和酚、蛋白酶 K、氯仿、异戊醇、异丙醇、75%乙醇、95%乙醇、液氮、10×PCR 缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTPs)、ExTaq 聚合酶、引物(见表 1)、DL2000 Marker、琼脂糖、溴化乙锭(EB)。

7 DNA 条形码鉴定

7.1 核酸的制备

采用磁珠法提取基因组 DNA。提取步骤为:将酒精浸泡的虫体,选择适当大小的肌肉组织,用双蒸水进行冲洗,去除残余的酒精,冲洗干净后,将组织进行研磨,加入 180 μ L 裂解液及 20 μ L 蛋白酶 K,55 $^{\circ}$ C 温浴,使得组织完全裂解。再加入 200 μ L 缓冲液、200 μ L 无水乙醇及 20 μ L 磁珠,使 DNA 吸附到磁珠上,使用 500 μ L Wash Buffer 进行除杂,之后加入 20 μ L 的 Elution Buffer 将 DNA 溶解,得到基因组 DNA 溶液,于-20 $^{\circ}$ C 保存。

7.2 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:

DNA 纯度=OD₂₆₀/OD₂₈₀

DNA 浓度=50×OD₂₆₀ μ g/mL

PCR 级 DNA 溶液的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7~1.9。

7.3 PCR 检测

7.3.1 PCR 扩增引物

PCR 扩增推荐使用巢式引物:J173/N1331 为第 1 轮引物,J1718/N2191 为第 2 轮引物。见表 1。

表 1 扩增引物

目标基因	引物序列	扩增片段
CO I	J173(5'-TAACAGCACATGCTTTTGTA-3')	1 000 bp
	N1331(5'-GGATAGTCTGAGTATCGTCG-3')	
	J1718(5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3')	470 bp
	N2191(5'-CCCGGTAAAATTAATAAATAAACTTC-3')	

7.3.2 PCR 扩增体系和反应条件

PCR 扩增采用 25 μ L 标准反应体系:10 \times 反应缓冲液 2.5 μ L,25 mmol/L 的 MgCl₂ 2 μ L 10 mmol/L 的 dNTPs 2 μ L,Taq DNA 聚合酶 1 U,上游引物为 0.5 μ L,下游引物为 0.5 μ L,DNA 模板 1 μ L,后加 ddH₂O 至终体积 25 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;进入循环,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,第 1 轮引物退火温度为 55 $^{\circ}$ C/第 2 轮引物退火温度为 47 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

7.3.3 琼脂凝胶电泳

反应结束后取扩增产物 5 μ L,采用 1.5% 的琼脂糖凝胶,1X 电泳缓冲液 TAE,在稳压 150 V 下电泳约 30 min,EB 染色,凝胶成像系统观察、拍照。

7.3.4 测序

使用 DNA 测序仪对目的条带进行双向测序,PCR 扩增引物作为测序引物,测序原理同 Sanger 测序法。为确保测序结果的可靠性,需对测序质量进行评估,去除测序结果两端的低质量序列,质量评估以碱基的 Q 值为依据。应用软件进行序列拼接,去除引物区,获得相应的 DNA 序列,序列方向应与 PCR 扩增正向引物方向一致。

8 结果判定

8.1 中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统判定

登录中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统 <http://www.qbol.org.cn>,点击“物种识别”导航条,进入物种识别页面。在鉴定框内输入 FASTA 格式(或纯文本格式)序列后,点击“提交鉴定”,系统进行 BLAST 后,自动生成鉴定结果。相似度最高的 10 条序列为相同物种,且最大相似度在 98% 以上,可明确判定为该物种(参见附录 A);否则辅以 SN/T 2013 等其他鉴定方法。

8.2 国际通用数据库判定

登录 GenBank 数据库 BLAST 鉴定系统(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),在 BLAST 结果中查看序列相似性最高的物种,CO I 基因序列结果与已知卷蛾种类基因序列相似性最高,相似度最高的 10 条序列为相同物种,且最大相似度在 98% 以上,可明确判定检出相应的断眼天牛种类。常见的检疫性卷蛾种类 CO I 基因序列表信息参见附录 B。

8.3 植物有害生物检疫鉴定系统判定

登陆植物有害生物检疫鉴定系统(<http://www.exoticorganism.com/>),使用基因条码分析软件对查询序列进行分析比对,通过比对数据库中的鉴定特征,将符合该类群鉴定特征的且相似度为 100% 的

物种判定为该未知种。“植物有害生物检疫鉴定系统”操作方法参见附录 C。

9 标本与原始数据保存

9.1 标本保存

采集到的标本应无水乙醇浸渍低温保存,并注明货物来源,寄主,采集时间、地点及采集者,保存期为 1 年,以备复验,如涉及贸易纠纷则须保存到纠纷解决完毕。保存期满后,按后期用途长久保存或处理。

9.2 原始数据保存

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

附录 A
(资料性附录)

中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统操作方法

中国检疫性有害生物 DNA 条形码鉴定系统操作方法见图 A.1 和图 A.2。

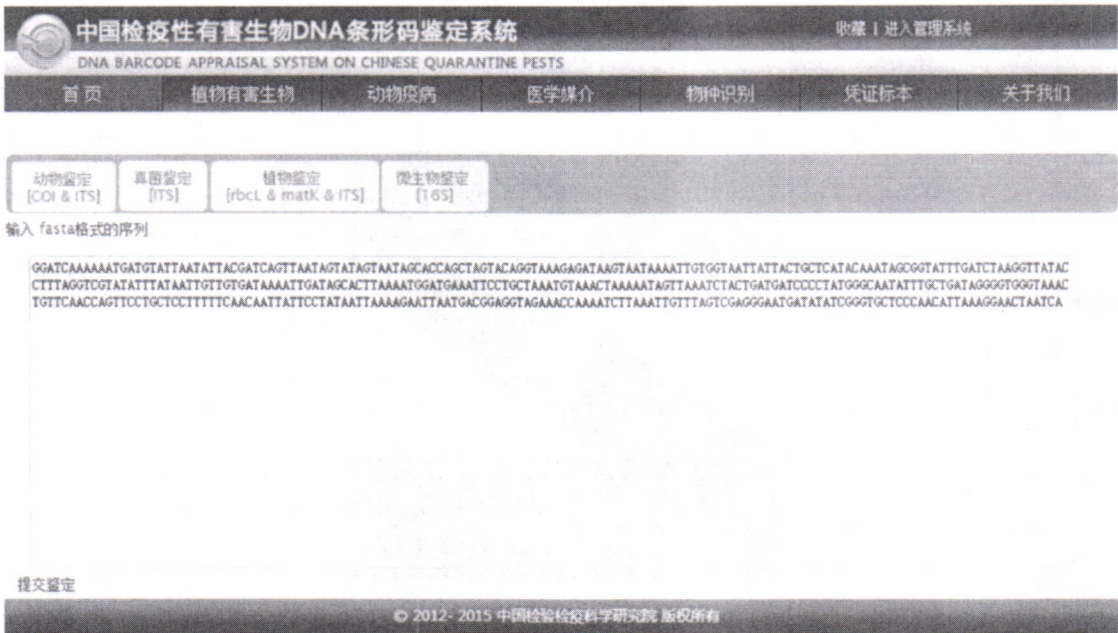


图 A.1 物种识别页面

中国检疫性有害生物DNA条形码鉴定系统

DNA BARCODE APPRAISAL SYSTEM ON CHINESE QUARANTINE PESTS

收藏 | 进入管理系统

首页

植物有害生物

动物疫病

医学媒介

物种识别

凭证标本

关于我们

相似样本鉴定结果

序列编码	门	纲	目	科	属	种	相似度	遗传标记	E-value
PSFOR166-13	Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Cerambycidae	Tetropium	Tetropium castaneum	100.00%	COI-5P	0
PSFOR432-13	Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Cerambycidae	Tetropium	Tetropium castaneum	100.00%	COI-5P	0
COLFF288-13	Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Cerambycidae	Tetropium	Tetropium aquilonium	95.53%	COI-5P	0
COLFE640-13	Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Cerambycidae	Tetropium	Tetropium castaneum	92.24%	COI-5P	3.32477e-164
GBCOU2933-13	Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Cerambycidae	Tetropium	Tetropium castaneum	92.24%	COI-5P	3.32477e-164
COLFE086-12	Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Cerambycidae	Tetropium	Tetropium castaneum	91.92%	COI-5P	5.00032e-160
LIAMIC1091-13	Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Cerambycidae	Tetropium	Tetropium parvulum	90.12%	COI-5P	2.55825e-143

图 A.2 鉴定结果页面

附 录 B

(资料性附录)

检疫性断眼天牛种类 CO I 序列

表 B.1 给出常见断眼天牛种类 CO I 序列信息。

表 B.1 常见断眼天牛种类 CO I 序列信息

中文名	学名	GenBank 登录号
光胸断眼天牛	<i>Tetropium castaneum</i>	KM286215, KM286148, KM442637, KJ966635, KJ966041, KJ964598, KJ964513, JQ015116, KJ159167, GU003935, AY389470, AY389469
棕翅断眼天牛	<i>Tetropium cinnamopterum</i>	KR123277, KM846734, KF247308, AY389471, AY389472, AY389473, AY389474
暗褐断眼天牛	<i>Tetropium fuscum</i>	KJ965130, KJ964282, KJ962552, KF247309, GU003936, AY389481, AY389480, AY389479, AY389478, AY389477, AY389476, AY389475
落叶松断眼天牛	<i>Tetropium gabrieli</i>	KM451264, KF247310, EU883937, EU883936, EU883935, AY389483, AY389482
凹胸断眼天牛	<i>Tetropium staudingeri</i>	AY389489, AY389488
施氏断眼天牛	<i>Tetropium schwarzianum</i>	EU883940, AY389487, AY389486
铁杉断眼天牛	<i>Tetropium velutinum</i>	KF247311, AY389491, AY389490, KF247248
小红棕断眼天牛	<i>Tetropium parvulum</i>	AY389485, AY389484
云杉断眼天牛	<i>Tetropium gracilicorne</i>	EU883938

附 录 C
(资料性附录)

植物有害生物检疫鉴定系统操作方法

登录植物有害生物检疫鉴定系统(<http://www.exoticorganism.com/>), 首页选择“基因条码”模块, 在“输入比对的序列”窗口中粘贴查询序列。点击“比对”, 软件会在数据库范围内比对, 输出物种鉴定结果。结果中相似性最高的条码序列对应分类阶元为查询序列所属分类阶元。在“更多比对结果”里, 点击“开始对比”, 将符合该类群鉴定特征的且相似度为 100% 的物种判定为该未知种。

以光胸断眼天牛 *Tetropium castaneum* 为例, 在“输入比对的序列”窗口中粘贴 CO I 基因片段, 点击“比对”, 结果见图 C.1, 相似性最高的条码序列对应分类阶元为断眼天牛属 *Tetropium*, 相似性为 100%。在这一栏点击“开始对比”, 结果见图 C.2, 相似度为 100% 的序列对应物种为光胸断眼天牛 *T. castaneum*, 即可判定查询序列为该物种。

植物有害生物检疫鉴定系统

设为首页

电子邮箱

收藏网站

数字标本 | 辅助鉴定平台 | 基因条码 | 基因库 | 标本库 | 有害生物查询 | 在线留言 | 系统管理

最新公告: 请先注册或登陆“我的平台”, 在“数字标本

输入比对的序列:

GGATCAAAAAATGATGATTAAATTACGATCAGTTAATAGTATAGTAATAGCACCAGCTAGTACAGGTAAAGAGATAAGTAATAAAATGTGGTAATTACTGCTCATACA
AATAGCGGTATTGATCTAAGGTTATACCTTAAAGTGTATATTATAATTGTTGTGATAAAATGATAGCACTTAAATGGATGAAATTCCTGCTAAATGTAACATAAAAAATA
GTTAAATCTACTGATGATCCCTATGCGCAATATTGCTGATAGGGGTGGGTAAGCTGTTCACACGTTCTCTGCTCTTTTTCACCAATTATCTCTATAATTAAGGAATTAAT
GACGGAGGTAGAAACCAAAATCTTAAATTTGTTAGTCGAGGGATGATATATCGGGTGCTCCCAACATTAAAGGAACATAATCA

序号	比对结果 (%)	分类阶元	标准条码名称	上游引物	下游引物	查看序列图	更多对比结果
1	100	断眼天牛属 <i>Tetropium</i>	<i>Tetropium</i>	J1718	K2191	点击查看	开始对比
2	89.43	墨天牛属 <i>Monochamus</i>	墨天牛属 <i>Monochamus</i> COI	J1718 (5' - GGAGGATTGGAAATGATTAGTTTC-3')	K2191 (3' - CCCGGTAAAAATAAAAATAAACTTC-3')	点击查看	开始对比
3	38.6	小蠹属 <i>Scolytus</i>	小蠹属 <i>Scolytus</i> COI-1	GF (5'-TCTGTATGCTGCTTCCC-3')	GR (5'-ATAGCTAGTGATTGCTCC-3')	点击查看	开始对比
4	38.31	毛小蠹属 <i>Dryocoetes</i>	毛小蠹属 <i>Dryocoetes</i> COI	GR1 (5' -AGGACATCTGTGACTT-3')	DT1 (5' -ATAACTTCTGGGTGTCC-3')	点击查看	开始对比
5	38.04	树蜂科 <i>Siricidae</i>	树蜂科 <i>Siricidae</i> COI	21882 (5' -TAAATGTGACACCGAAGCT-3')	21883 (5' -AGTTAGCTCTCGGAAG-3')	点击查看	开始对比
6	37.67	大小蠹属 <i>Dendroctonus</i>	大小蠹属 <i>Dendroctonus</i> COI	Monoc-al (5' -AGATGTAGATAGTGACCTT-3')	Monoc-ac (5' -AATGTTGGGGAAGGATG-3')	点击查看	开始对比
7	37.5	墨天牛属 <i>Monochamus</i>	墨天牛属 <i>Monochamus</i> COI1	TOV152	21882	点击查看	开始对比
8	36.65	树蜂属 <i>Sirex</i>	树蜂属 <i>Sirex</i> COI	J1718	K2191	点击查看	开始对比
9	36.16	梗天牛属 <i>Arhopalus</i>	梗天牛属 <i>Arhopalus</i> COI	GF (5'-TCTGTATGCTGCTTCCC-3')	GR (5'-ATAGCTAGTGATTGCTCC-3')	点击查看	开始对比
10	35.84	干小蠹属 <i>Hylurgops</i>	干小蠹属 <i>Hylurgops</i> COI	J1718 (5' - GGAGGATTGGAAATGATTAGTTTC-3')	K2191 (5' - CCCGGTAAAAATAAAAATAAACTTC-3')	点击查看	开始对比
11	35.69	弗天牛属 <i>Phoracantha</i>	弗天牛属 <i>Phoracantha</i> COI	GF (5'-TCTGTATGCTGCTTCCC-3')	K2191 (5' - CCCGGTAAAAATAAAAATAAACTTC-3')	点击查看	开始对比
12	35.69	墨天牛属 <i>Monochamus</i>	墨天牛属 <i>Monochamus</i> COI	J1718	K2191	点击查看	开始对比
13	35.67	木蠹象属 <i>Pissodes</i>	木蠹象属 <i>Pissodes</i> COI	PF46 (5' -ACTATCAATCAAGACGAGG-3')	PF416 (5' -ACATAATGGGAAGTGGGTAC-3')	点击查看	开始对比

图 C.1 光胸断眼天牛 *Tetropium castaneum* 在条码数据库分类阶元中的比对结果

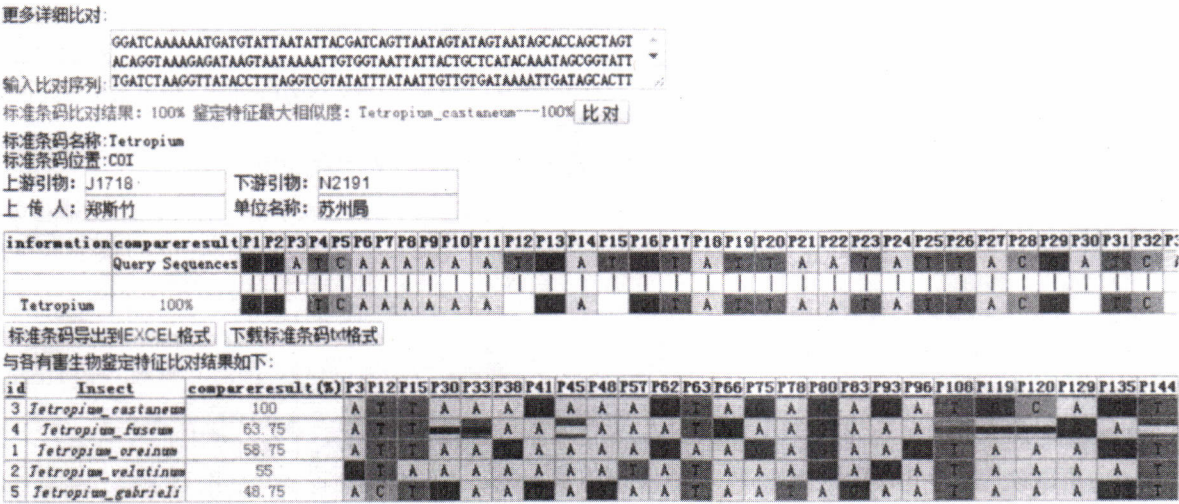


图 C.2 光胸断眼天牛 *Tetropium castaneum* 在断眼天牛属条码数据库中的比对结果

参 考 文 献

- [1] 安榆林.外来森林有害生物检疫.北京:科学出版社,2012:1-695.
- [2] 安榆林,杨晓军,林晓佳,师丽敏,黄晓明,陈建东.光肩星天牛 mtDNACO I 基因遗传差异的研究.林业科学,2006,42(05):77-83.
- [3] 常虹,郝德君,肖荣堂,刘勇,钱路,安榆林,杨晓军.基于线粒体 CO I 基因的齿小蠹属昆虫 DNA 条形码研究.昆虫学报,2012,55(09):1075-1081.
- [4] 陈梦义,徐梅,钱路,安榆林,王焱,郝德君.断眼天牛 DNA 条码试剂盒的研制.应用昆虫学报,2015,04:1-8.
- [5] 陈士林.中药 DNA 条形码分子鉴定.北京:人民卫生出版社,2012:1—510.
- [6] 杨聪慧,金倩,陈付强,武春生,张爱兵.基于进化树、距离和特征的 DNA 条形码方法研究—以百花山地区草螟科为例.应用昆虫学报,2013,50(1):61-70.
- [7] 郑斯竹,安榆林,徐梅,杨晓军,常虹,嵇保中,天牛幼虫保存与 DNA 提取方法比较研究.中南林业科技大学学报,2012,05:144-148.
- [8] Folmer O, Black M, Hoeh W. DNA primes for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotech.*, 1994, 3 (5): 294-299.
- [9] Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 2003a, 270(1512): 313-321.
- [10] Hebert PDN, Gregory TR. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 2005, 54(5): 852-859.
- [11] Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase I divergence among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 2003b, 270(Suppl. 1): S96-S99.
- [12] Hebert PDN, Penton EH, Burns JM, Janzen DH, Hallwachs W. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *PNAS*, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [13] Neil Sarkar I, Thornton JW, Planet PJ, Figurski DH, Schierwater B, DeSalle R. An automated phylogenetic key for classifying homeoboxes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2002, 24(3): 388-399.
- [14] Rach J, DeSalle R, Sarkar IN, Schierwater B, Hadrys H. Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2008, 275(1632): 237-247.
- [15] Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequence and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 1994, 87(6): 651-701.

中华人民共和国出入境检验检疫

行 业 标 准

DNA 条形码方法

第 2 部分:检疫性断眼天牛

SN/T 4876.2—2017

*

中国标准出版社出版

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)

北京市西城区三里河北街 16 号(100045)

总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 20 千字

2018 年 8 月第一版 2018 年 8 月第一次印刷

印数 1—500

*

书号: 155066 · 2-44555 定价 18.00 元



SN/T 4876.2—2017