

国家标准《苜蓿黄萎病菌溯源检测方法》编制说明

1. 目的和意义

苜蓿黄萎病菌 *Verticillium albo-atrum* 是威胁苜蓿、大豆、马铃薯、草莓等种植的毁灭性病害，为种传病害。中国每年进口大量大豆、苜蓿、饲草及其种子，如果传入，极有可能在几年之内袭击国内主要产区，造成重大损失，被明确列入检疫性有害生物名录。控制该病害进入我国，对保护我国的苜蓿、大豆等种植产业，保证为种植、畜牧提供稳定的饲料供给有着重要意义。

微生物不同来源、寄主及自身变异都会对其致病能力产生影响，这就决定了对其溯源研究的必要性。该病菌寄主广泛，有报道的寄主有 37 种，在 141 个国家都有广泛分布，对该病菌寄主和来源地信息进行溯源，总结物种遗传信息与之的相关性和规律性，更精准明确的评估其跨境传播风险，区别性的制定监管处理措施，有利于将病原菌的防控向源头延伸，提高生物安全风险预警和监测能力。

2. 标准编制的主要工作过程

2.1 任务来源

本标准“十三五”国家重点研发计划专项“国家质量基础的共性技术研究与应用（NQI）”中《高频跨境生物多目标高精度检测技术研究》项目（2016YFF0203200）的输出标准。

2.2 立项研究阶段

筛选研究适用于苜蓿黄萎病菌寄主、来源地等溯源信息的核酸基因片段，通过生物信息学、统计学、群体遗传学等研究技术和方法构建溯源信息的系统进化和网络进化关系对物种归类鉴定。

2.3 起草阶段

对建立标准方法，并进行准确性和重复性验证；确定检测程序标准，建立文本化标准格式，同时起草国家标准。

2.4 征求意见阶段

征询意见和补充相关的验证资料，准备结题。

2.5 标准的主要起草人及承担的工作

标准的主要起草人及承担的相关工作如下：

姓名	单位	职务/职称	专业特长	任务、分工
高瑞芳	深圳海关	高级农艺师	植物病原真菌检测	主持人
章桂明	深圳海关	研究员	植物病原真菌检测	参与
王颖	深圳海关	研究员	植物病原真菌检测	参与
黄河清	深圳海关	农艺师	显微成像技术	参与
向才玉	深圳海关	高级农艺师	显微成像技术	参与

3. 标准主要内容的依据

3.1 范围

本标准规定了应用生物信息学分析方法对苜蓿黄萎病菌进行溯源检测的方法。

本标准适用于苜蓿黄萎病菌相关寄主中携带的苜蓿黄萎病菌的溯源检测。

3.2 病菌的基本信息

中文名：苜蓿黄萎病菌

学名：*Verticillium albo-atrum* Reinke & Berthold

分类地位：真菌界（Fungi），无性型真菌（Anamorphic fungi），丝孢纲（Hyphomycetes），丝孢目（Hyphomycetales），丛梗孢科（Moniliaceae），轮枝孢属（*Verticillium*）。

3.3 方法原理

溯源是利用对物种有进化和溯源价值的基因片段将核酸序列信息与来源地、寄主等来源信息进行相关性归类。

检测过程是应用生物信息学的分析手段筛选有效区分种内差异并且有效归类的基因片段或分子标记，获得这些基因片段或分子标记的核酸序列，应用统计学手段完成核酸序列与来源地、寄主信息的主成分分析，完成不同来源地、寄主个体的群体分子系统进化关系和群体结构分析，构建网络进化图。

溯源检测的原理是通过对物种具有溯源价值和意义的基因片段的扩增，利用已完成的核酸序列与系统进化和网络进化图对物种进行归类鉴定。

3.4 仪器用具

3.4.1 仪器用具

保湿培养箱、超净工作台、灭菌箱、-80℃低温冰箱、PCR 扩增仪、冷冻离心机、核酸蛋白分析仪、电泳仪、凝胶成像系统、高压灭菌锅。

3.4.2 试剂盒培养基

试剂：4%次氯酸钠、70%酒精、CTAB、PCR *Taq* 酶、PCR *Taq* 缓冲液、dNTP、DNA 标记、无菌超纯水。

3.4.3 培养基：马铃薯葡萄糖培养基（PDA）

3.4.4 试验用具

解剖刀、离心管、镊子、移液器、冻存管、培养皿、酒精灯、接种针

3.5 溯源检测方法

3.5.1 DNA 提取与纯化

对真菌进行液体培养或平板培养,CTAB法对基因组DNA的提取,测定DNA浓度及纯度后,保存于-20℃冰箱备用。

3.5.2 基因片段或分子标记的扩增与测序

对适用于作为溯源分析的基因片段或分子片段进行 PCR 扩增, Sanger 测序。测序结果利用 BioEdit 等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,

3.5.3 分子系统进化分析

将拼接的序列导入 Mega 软件, 同时导入苜蓿黄萎病菌溯源序列排列文件 mas 格式或 meg 格式, 对全部序列进行排列。

对排列后的 mas 格式文件,基于 Neighbor-joining Tree 构建分子系统进化树。Phylogeny Test 选择 Bootstrap 1000 replicates, 其他参数选择默认参数。

3.5.4 网络进化分析

将拼接的序列导入 DnaSP 软件或者 Network 软件, 同时导入苜蓿黄萎病菌溯源序列排列文件, 将全部序列进行网络构建, 选择系统默认参数。

3.6 结果判断

根据待分析序列在系统进化树上与已溯源苜蓿黄萎病菌的分支聚集结果进行判定。

----如果序列与已溯源菌株序列聚为一支, 且重复率为 100%, 即可判定该物种序列与已知溯源信息序列具有相同的来源地、宿主信息。

----如果序列与已溯源菌株序列未与任一物种序列聚为一支, 需结合网络进化图做出判定。

在构建的网络进化图中寻找待分析序列的进化分支起源点和方向，确认突变衍化历史，如同一分支起源点的其他方向分支信息具有相关性，则可判定待分析个体与同一起源点不同个体的来源地和寄主信息具有相关性。

3.7 样品与原始数据集保存

3.7.1 样品保存

分离得到的菌种转移到马铃薯葡萄糖斜面培养基上，置于 4℃ 黑暗条件下保存至少 12 个月，以备复验、谈判和仲裁。

3.7.2 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。

4. 技术经济论证

苜蓿黄萎病菌是我国对外公布的检疫性有害生物，其溯源检测对评估其广泛分布的寄主和来源地的进境寄主植物和植物产品的风险，制定监管政策和疫情防控有着重要的价值。防治苜蓿黄萎病菌对我国农业生产安全、生态效益的发挥至关重要。本标准的实施，可以确认我们进口苜蓿黄萎病菌的溯源信息，减少该病菌对我国农作物种植的危害。

5. 采标情况

本标准在起草中参阅了国内外相关的最新资料，采用国内外最新、最权威的技术指标。本标准与国内外同类国家标准的水平相当。

6. 与现行法律的关系

植物检疫通常由国家设置出入境检验检疫机构，对出入境的植物及其产品等进行检疫，以植物安全卫生。植物检疫有关法律法规主要包括《中华人民共和国进出境动植物检疫法》等。标准是对重复性事物和概念所做的统一规定，它以科学、技术和实践经验的综合为基础，经过有关方面协商一致，由主管机构批准，以特定的形式发布，作为共同遵守的准则和依据。本标准的制定符合相关法律法规要求，有助于相关法律法规的落实和执行，是重要的执法抓手。

7. 重大分歧意见的处理和依据

无重大分歧。

8. 作为国家推荐性标准的建议

本标准的实施,可以快速、准确、简便的对苜蓿黄萎病菌溯源信息进行检测;本标准的实施可以为苜蓿黄萎病菌寄主植物及植物产品的进境和管理提供技术保障。

9. 贯彻国家标准的要求和措施建议

按照一般推荐性标准执行。

10. 废止现行有关标准的建议

无。

11. 其它应予以说明的事项

无。

12. 主要参考文献

林仁卫, 叶菊莲, 罗芸,等. 浙江省丽水市首起非 O1 群霍乱弧菌食物中毒分子生物学溯源分析[J]. 疾病监测, 2007, 22(9):582-584.

王秋艳. 三种基因分型技术在病原微生物溯源方面的应用[D]. 华南理工大学, 2010.

梁雅洁. 发酵乳中微生物溯源技术的研究与应用[D]. 大连工业大学, 2014.

王陌桑. 中国对虾增殖放流群体溯源分析及迁徙动态研究[D]. 上海海洋大学, 2016.

Innerebner G, Knapp B, Vasara T, et al. Traceability of ammonia-oxidising bacteria in compost-treated soils. Soil Biol Biochem[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38(5):1092-1100.

Bonizzi I, Feligini M, Aleandri R, et al. Genetic traceability of the geographical origin of typical Italian water buffalo Mozzarella cheese: a preliminary approach[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 102(3):667-73.
