



我国植物检疫性菌物数据库平台的建设及应用

赵鹏¹, 段维军^{2,3}, 刘芳¹, 周欣¹, 范国梅⁴, 马紫英¹, 蔡磊^{1*}

¹中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101

²宁波检验检疫科学技术研究院, 浙江 宁波 315012

³中华人民共和国宁波海关, 浙江 宁波 315012

⁴中国科学院微生物研究所微生物资源与大数据中心, 北京 100101

摘要:近年来,随着我国对外贸易的不断增长,口岸检测样品量巨大,外来检疫性有害生物尤其是病原菌物传入我国的风险日趋增加,正成为我国国门生物安全的重要威胁。加强外来入侵菌物的防御能力建设,有效防范其造成的生物安全威胁迫在眉睫。由于外来入侵菌物各类群的基础研究薄弱,标准参比物质缺乏、基础数据和可检索数据库缺失,大部分物种缺乏准确、高效的鉴定手段,使得现有口岸菌物检疫存在准确性较低、速度较慢、误检漏检率较高等问题。针对上述问题,以我国进境检疫对象及主要进口农林作物上的高频检出但鉴定困难、误检率高的菌物类群为对象,建立了其标准参比物质库、形态特征信息库、多基因序列数据库,并通过整合多个信息库资源实现从检疫样品中初筛到物种精准鉴定的多模块服务平台 www.casbrc.org/pqfungi,并开放共享。该数据库平台的应用有望促进我国口岸检疫部门的检测便利化水平大幅提升,在“智能海关”建设、维护国门生物安全及促进农林产品安全贸易中发挥重要作用。

关键词:植物检疫性菌物,标准库,多目标筛查,国门安全

随着我国农产品贸易活动的大幅增长、国际合作交流的日益频繁以及旅游业的迅猛发展,一些危害性极大的外来微生物相继传入我国^[1]。由于微生物形体微小,容易利用各种途径入侵和扩散,

对生物多样性、人类健康、经济发展、社会稳定及国家生态安全造成巨大威胁^[2]。我国是遭受外来生物入侵最严重的国家,尤其加入WTO后国际贸易呈暴发式增长,外来入侵生物的数量不断增加。

基金项目:中国科学院战略生物资源服务网络计划-生物资源衍生库建设项目(KFJ-BRP-009);中国科学院战略生物资源能力建设项目(KFJ-BRP-017-24);国家重点研发计划(2016YFF0203201);中国科学院A类战略性先导科技专项(XDA19050303);国家自然科学基金(NSFC31770009);浙江省公益技术研究项目(LGF20C140001)

*通信作者。Tel: +86-10-64806123; E-mail: cail@im.ac.cn

收稿日期: 2021-01-12; 修回日期: 2021-06-07; 网络出版日期: 2021-10-27

迄今为止, 全国已发现 660 多种外来入侵物种, 其中 215 种已入侵我国一些国家级自然保护区, 48 种外来入侵物种被列入《中国外来入侵物种名单》, 这些外来物种每年在我国造成的直接和间接经济损失高达 2000 亿元^[3]。这些跨境有害生物主要包括菌物、细菌、昆虫、病毒以及媒介生物等, 其中菌物所占比重较大, 正成为威胁我国农林牧业生产、生物多样性与生态环境的重要因素, 由此引发的生物安全问题已上升为关系国家安全的重大问题^[1]。其中, 依据《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》记载, 我国进境植物检疫性菌物有 130 种^[4]。这些菌物随着进出口贸易的持续增长检出频率也逐年增多, 尤其在一些进口粮食作物(大豆、小麦、油菜和玉米)、经济作物及种苗上检出次数最多^[5]。外来检疫性菌物对环境、农林生产和人类健康危害极大, 我国曾因此蒙受巨大的经济、生态损失。例如大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)自 1935 年由美国传入我国后, 常年都造成棉花黄萎病广泛发生, 尤其在 1993 年暴发成灾, 发病面积高达 18 hm², 损失皮棉约 15 万 t 以上, 其中冀鲁豫 3 省发病面积超过 70%, 因病减产 5%–15%, 造成经济损失约 20–60 亿元^[6]。此外, 向日葵黑茎病菌(*Plenodomus lindquistii*)自 2005 年以来入侵我国后对新疆伊犁的向日葵生产造成严重危害, 仅 2007 年该地受害面积达 13000 hm², 其中重病田发病率 100%, 死亡率达 50% 以上, 造成向日葵含油率大幅降低^[7]。检疫性菌物茶藨生柱锈菌(*Cronartium ribicola*)也已入侵我国并对松树造成了巨大的危害, 林业部门根据其危害面积认定为二级外来有害生物^[8]。因此, 加强进境植物检疫性有害菌物的监测工作, 防范检疫性病害的扩散和危害, 对保护我国农林

业生产安全意义重大。

目前, 我国外来入侵生物检疫鉴定工作存在很多困难, 其中菌物类群的检测是检疫工作的热点和难点问题。尽管检疫性有害生物名录是植物检疫的重要执法依据和工作指南, 但我国现有检疫名录存在部分物种名称使用不准确、不正确或不规范的问题, 仍有一些物种界限不明确、分类鉴定困难的情况^[4]。此外, 海关检疫部门主要依据传统的形态学观察鉴定多数检疫性菌物, 该方法所需的专业技能能力很高且难以标准化, 经验不足容易错误鉴定, 人才培养所需投入大, 检测鉴定周期长。加之基础研究薄弱和大部分材料都在国外尤其是菌株资源, 大部分检疫性物种尚未建立物种水平的标准参比物质作为鉴定依据。在分子检测方面, 常规 PCR 检测技术(多重 PCR、反向 PCR、PCR-ELISA 和实时荧光 PCR 等)及传统的单基因检测技术——核酸标记检测技术已应用于口岸检疫性物种的日常检测, 但这些方法存在针对目标单一、鉴定不准确等缺陷^[9–10]。尽管 DNA 条形码检测技术具有检测快速、灵敏、信息化程度高及易于标准化等优点受到检疫部门的关注, 但该技术多以 GenBank 等公共数据库内的 DNA 登录序列为参考依据, 而公共数据库内的错误信息常导致条形码技术在实际应用中无法实现物种准确鉴定^[11]。近年来, 一些新的技术方法, 如 Padlock 探针技术、数字 PCR 技术、基因芯片技术、微流控芯片技术以及高通量测序技术, 不仅满足检疫样品中多个检疫目标的检测工作^[12–13], 还可以应用于物种的准确鉴定^[6,9,14]。这些新技术方法具有操作简单、高通量、自动化、速度快、效率高等优势, 但这些技术都是基于不同物种间基因序列差异来进行物种鉴定, 因此, 搭建检疫性菌物基准序列数据

库是开发检疫性菌物多目标、高精度检测技术的基础和关键。基于口岸菌物检疫存在“检不到、检不准、手段落后、目标单一、周期长”等技术缺陷，针对性地开展植物检疫性菌物数据平台的建设工作，不仅满足我国现阶段入侵菌物的快速、准确、智能检测的要求，同时解决口岸检测标准化、多目标化存在的技术缺陷，具有重要意义。

1 检疫性菌物数据库的组成及功能

检疫性菌物数据库平台主要包括以下几部分：(1) 检疫性菌物标准物数据库，其中包含标准及参考样本库、标准参比物质库、表观性状库及多基因序列基准数据库；(2) 检疫样本高通量初筛平台；(3) 检疫性菌物物种鉴定平台，包括单基因、多基因谱系分型筛查鉴定平台；(4) 检疫性及重要农林作物有害菌物溯源平台；(5) 中国进境检疫性菌物鉴定标准文本库；(6) 用户管理系统及后台管理系统(图 1)。

其中，检疫性菌物标准物数据库是收集检疫性菌物及近缘物种的凭证样本相关信息的数据

库，通过对检疫性有害生物及近缘物种形态观察和相关文献的整理、收集显微、超微特征信息，并开展数字化管理，进而建立检疫性菌物的标准参比物质及相关性状数据库。此外，进一步收集模式或凭证标本的核糖体内转录间隔区(ITS rRNA 基因，ITS)和核糖体大亚基序列(LSU rRNA 基因，LSU)、翻译延伸因子(translation elongation factor-1 alpha, EF-1 α)、 β 微管蛋白基因(β -tubulin, TUB2)等多个常用序列片段，构建多基因基准序列数据库，辅助检疫性菌物的形态鉴定并促进分子检测的标准化。

现有的检测平台包含检疫样品高通量初筛平台、物种鉴定平台及溯源平台 3 个部分。其中，检疫样品高通量初筛平台主要是基于二代测序技术，以检疫性物种及其近缘种标准序列的 ITS2 区段序列为基础，建立本地的参考核心数据库，利用生物信息学软件进行初级信息分析，并建立本地的标准及参考样本的基准序列核心数据库，通过将待检样品中获取的高通量数据与核心数据库比对，分析待检样品中存在检疫性物种的可能性。

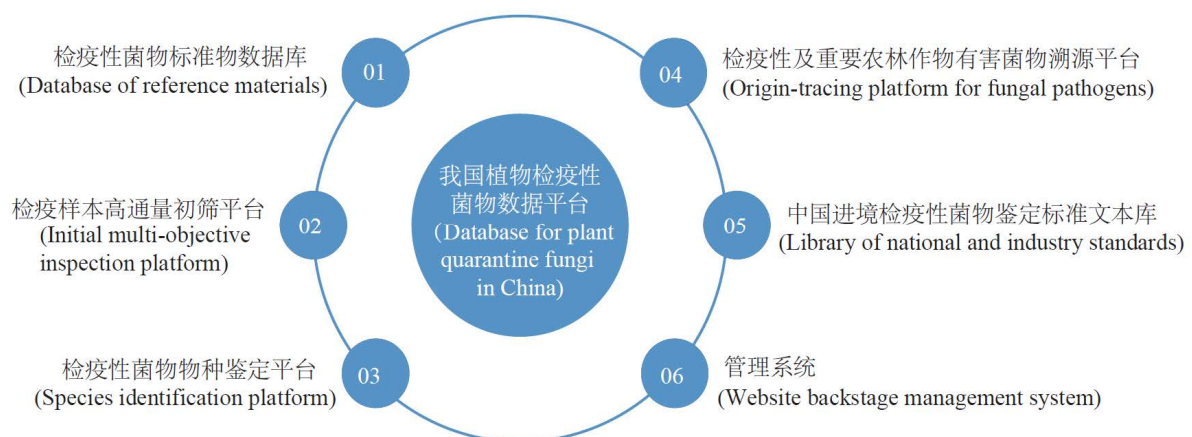


图 1. 我国检疫性菌物数据库的基本组成

Figure 1. Formation of database for plant quarantine fungi in China.

检疫性菌物物种鉴定平台是基于多基因谱系分型筛查技术，以多基因序列基准数据库为核心，通过整合序列联配软件、系统发育分析软件及遗传距离分析模块，并设计多个查询功能模块，如序列输入、序列联配、系统发育树构建、物种确认等功能模块，对多个基因进行自动化的系统发育分析，建立“一站式”的多基因谱系分型鉴定系统，最终实现物种的精准、快速及实时鉴定。检疫性及重要农林作物病原菌物溯源平台选取部分检疫性物种或重要的农林业跨境有害菌物，建

立溯源基准数据库，实现检疫性物种的溯源技术体系(图 2)。

除了上述主要功能模块之外，数据库平台还建立了中国进境检疫性菌物鉴定标准文本库，收集了迄今为止发布的植物检疫性菌物的国家标准、行业标准、地方标准的文本共计 114 份，便于用户进行搜索和查看。

此外，平台还包括用户管理系统及后台管理系统，分别在用户、管理员的层面开展平台的日常维护、数据更新等工作。

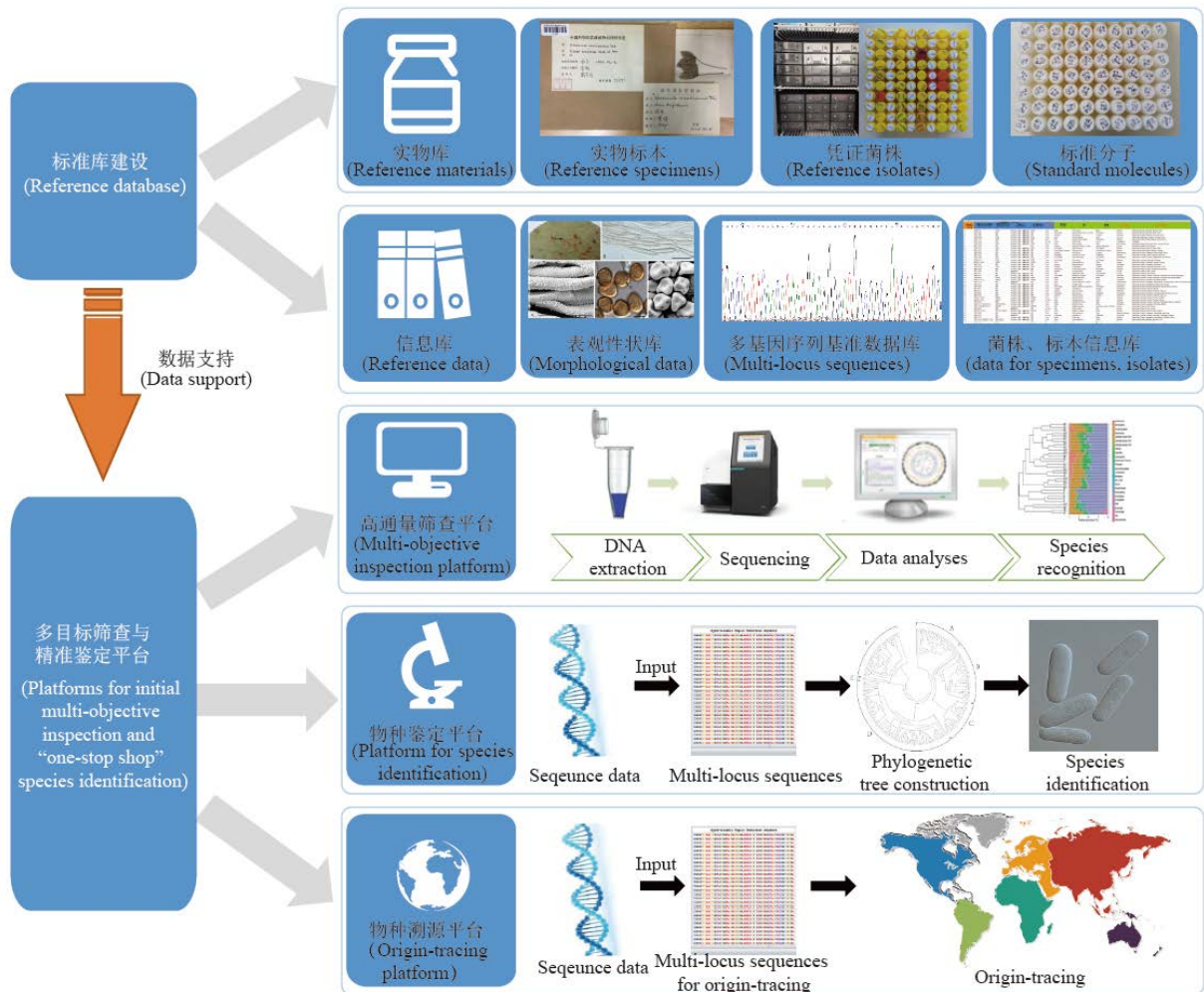


图 2. 我国检疫性菌物数据库标准库及检测平台的功能示意图

Figure 2. Function of reference materials and detection platform in database for plant quarantine fungi in China.

检疫性菌物数据库平台由数据标准库集群、数据访问模块及应用服务模块等部分组成，主要在实体菌株资源收集、鉴定标准化、检疫样品初筛及物种准确鉴定等方面进行功能设计及开发，通过整合多个信息库资源实现从检疫样品初筛到物种精准鉴定的“一站式”检测服务。相关标准库和检测筛查

平台的建设开发实现了相互衔接，标准库的建设对最终检测平台中的检测技术方法的开发提供核心数据集。目前，检疫对象及高频入侵物种的标准及参比物质库、形态特征信息库、多基因序列数据库及其他相关资源、信息、程序和模块集成在数据库平台 www.casbrc.org/pqfungi 上并开放共享(图 3)。

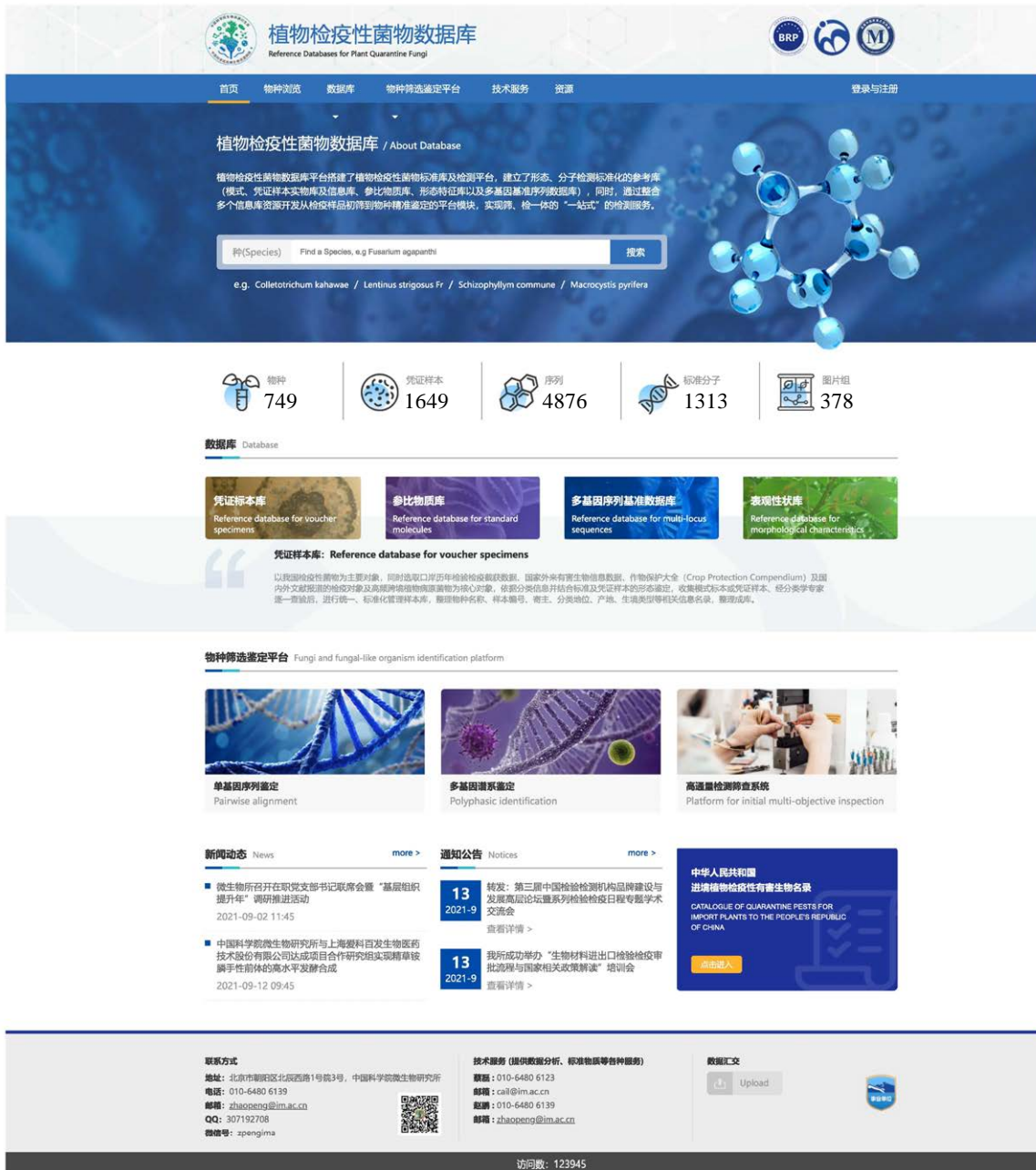


图 3. 我国检疫性菌物数据平台的主页

Figure 3. Homepage of databases for plant quarantine fungi in China.

2 数据库平台建设方案

检疫性菌物数据库平台由数据库系统、后台数据库管理系统、前端显示与查询系统 3 个主要部分组成。其中数据库系统用 MySQL 数据库作为数据库平台, 后台采用 JAVA 等语言构建数据管理系统平台, 保证数据库安全及稳定。整个平台开发环境为 struts2 + mybatis + spring, 网站前台应用主要是利用 Linux (ubuntu) 系统, 前端显示和查询可以在 Win XP/7/8/10 等中用 IE、Chrome 等浏览器打开应用。

3 平台建设进展

3.1 基础数据

平台的基础数据主要采集标准及凭证样本、参比物质、特征性状、多基因序列等。目前涉及的植物检疫及高频跨境菌物共计 19 科 53 属 901 种, 其中包含我国进口的主要农林作物上高频检出但鉴定困难、误检率高的刺盘孢属(*Colletotrichum*)、间座壳属(*Diaporthe*)、亚隔孢壳属(*Didymella*)、茎点霉属(*Phoma*)、轮枝菌属(*Verticillium*)等, 也包含危害严重、分布扩张却在我国口岸未检出的检疫性菌物, 如柱锈菌属(*Cronartium*)、胶锈菌属(*Gymnosporangium*)、栅锈菌属(*Melampsora*)、柄锈菌属(*Puccinia*)等。具体科、属及相关形态、分子等信息见表 1。

3.1.1 标准及凭证样本库数据: 以我国检疫性菌物为主要对象, 同时选取口岸历年检验检疫截获数据、国家外来有害生物信息数据、作物保护大全(crop protection compendium)及国内外文献报道的检疫对象及高频跨境植物病原菌物为核心对象, 依据分类信息并结合标准及凭证样本的形态

鉴定, 收集模式标本或凭证样本, 经分类学专家逐一查验后, 进行统一、标准化管理样本库, 整理物种名称、样本编号、寄主、分类地位、产地、生境类型等相关信息名录, 整理成库。目前已收集并信息化的样本数为 2485 份, 涉及 19 个科、53 个属的 901 个物种, 其中包含模式标本 543 份。

3.1.2 参比物质库建设: 依据凭证样本的信息及物种描述相关分类文献, 在凭证样本中选取参比物质, 建立标准参比物质库, 实现检疫性物种的日常溯源与检测中的质量控制。通过结合 DNA 条形码及质粒标准分子构建技术, 构建检疫对象及高频跨境菌物的物种特征性标准分子, 作为检疫性菌物分子鉴定和溯源的标准阳性对照。目前已构建口岸检测中 182 个重要菌物物种的标准分子, 建立了相应的信息库, 其中包含标准分子来源凭证标本的基本信息、基因片段名称、标准分子长度、引物及 PCR 条件等相关信息, 并提供相关标准分子构建的基本步骤, 实现溯源及相关检测中的质量控制。

3.1.3 表观性状库建设: 开展模式及凭证样本的形态特征观察, 收集相关显微、超微特征图片, 对标本的形态特征进行数字化存储, 结合病害特征、产地、寄主、生物学特征等相关信息, 建立表观性状数据库。开发相关信息查询、图像对比、更新等模块, 实现形态特征的在线查询。用户通过登录主界面的“表观性状库”一栏, 进入后可以浏览所有物种的注释信息, 包括其物种的基本信息、分类地位、模式标本的基本情况、寄主范围、地理分布以及形态特征图片等。目前收集了 499 个物种的 3493 份显微、超微特征图片, 整合并信息化为表观性状数据库。此外, 通过物种其他相关信息的数据化, 实现在线查询相关物种的形态特征及其他寄主、地理分布等信息的功能模块。

表 1. 标准库数据采集列表

Table 1. Detailed information of data involved in reference databases

Families	Genera	No. of species (No. of quarantine fungi)	No. of specimens (No. of type specimen)	Plates of morphology	No. of DNA sequence	References
<i>Didymellaceae</i>	<i>Allophoma</i> , <i>Ascochyta</i> , <i>Boeremia</i> , <i>Calophoma</i> , <i>Didymella</i> , <i>Heterophoma</i> , <i>Neoascochyta</i> , <i>Neodidymelliopsis</i> , <i>Nothophoma</i> , <i>Paraboeremia</i> , <i>Phoma</i> , <i>Phomatodes</i> , <i>Stagonosporopsis</i> , <i>Xenodidymella</i>	64	155(57)	32	523	[15–16]
<i>Cladosporiaceae</i>	<i>Cladosporium</i>	49	49 (47)	48	149	[17–18]
<i>Clavicipitaceae</i>	<i>Metacordyceps</i>	1	2	6	13	[19]
<i>Coleosporiaceae</i>	<i>Chrysomyxa</i> , <i>Coleosporium</i> , <i>Quasipucciniastrum</i>	22 (1)	45	5	86	[20–22]
<i>Cordycipitaceae</i>	<i>Lecanicillium</i>	1	2	8	26	[16]
<i>Cronartiaceae</i>	<i>Cronartium</i>	16 (5)	170	0	361	[21–22]
<i>Diaporthaceae</i>	<i>Diaporthe</i>	131 (10)	266 (130)	82	1131	[23–24]
<i>Eurotiomycetidae</i>	<i>Penicillium</i>	18	18	0	54	[25]
<i>Glomerellaceae</i>	<i>Colletotrichum</i>	191 (1)	196 (190)	113	2056	[26–27]
<i>Gymnosporangiaceae</i>	<i>Gymnosporangium</i>	29 (4)	247 (9)	21	524	[22]
<i>Leptosphaeriaceae</i>	<i>Plenodomus</i>	3	6	0	9	[16]
<i>Melampsoraceae</i>	<i>Melampsora</i>	32 (1)	265 (15)	32	863	[28]
<i>Nectriaceae</i>	<i>Fusarium</i>	28 (4)	441 (2)	22	793	[29]
<i>Plectosphaerellaceae</i>	<i>Gibellulopsis</i> , <i>Verticillium</i>	19 (2)	207 (3)	10	574	[30]
<i>Pleosporaceae</i>	<i>Curvularia</i>	48	48 (47)	48	138	[31]
<i>Pucciniaceae</i>	<i>Puccinia</i>	145 (1)	195	6	363	[32]
<i>Pucciniastraceae</i>	<i>Hyalopsora</i> , <i>Melampsoridium</i> , <i>Milesina</i> , <i>Naohidemyces</i> , <i>Pucciniastrum</i> , <i>Thekopsora</i> , <i>Uredinopsis</i>	32	53	0	93	[21,32]
<i>Stachybotryaceae</i>	<i>Albifimbria</i> , <i>Alfaria</i> , <i>Capitofimbria</i> , <i>Digitiseta</i> , <i>Dimorphiseta</i> , <i>Gregatothecium</i> , <i>Inaequalispora</i> , <i>Myxospora</i> , <i>Paramyrothecium</i> , <i>Striaticonidium</i> , <i>Tangerinosporium</i> , <i>Xepicula</i>	58	58 (43)	51	214	[33]
<i>Ustilaginaceae</i>	<i>Macalpinomyces</i> , <i>Tranzscheliella</i>	14	62	15	124	[34–35]

3.1.4 多基因基准序列数据库建设: 通过基因测序收集模式或凭证样本的多基因序列, 构建多基因序列基准数据库。同时, 数据库中镶嵌测序图谱的质量控制模块, 可以直接读取原始数据序列, 方便查看。此外, 序列数据与标准参比物质库和表观性状库关联, 可以检索基准序列的其他相关信息。目前整理并筛选了 ITS、LSU、EF-1 α 、TUB2 等多基因序列共计 8094 条, 构建了基于模式及凭证标本的多基因序列基准数据库。

目前, 整个数据库平台设计了基础数据的统计后台, 并对基础数据中凭证样本及多基因基准序列相关的信息进行了数据统计, 通过对物种名称、样本编号、寄主、分类地位、产地、生境类型、馆藏信息、基因序列类型等相关信息归类, 并设计了图形化输出模块, 建立了物种组成信息、样品地理来源、菌株及标本的保藏单位信息和相关基因序列类型的统计图表。网站用户可以通过查阅相关可视化图表来明确平台基础数据涉及的物种情况、样本地理来源及其他相关数据的现状, 增强网站的用户体验。

3.2 检疫样本高通量初筛平台建设

高通量初筛平台建立了从检疫样品中快速筛查相关物种的检测方法。通过对检疫样品进行总 DNA 提取, 对其 ITS2 区段扩增并进行二代测序, 利用本平台嵌合的生物信息学软件模块进行初级信息分析, 确定待检样品中是否存在多种检疫性物种的可能性(基于三代 ITS 全长的模块处于构建中)。平台选取了口岸历年检验检疫截获数据、国家外来有害生物数据信息、作物保护大全及国内外文献报道的检疫和高频跨境菌物为检测对象, 建立了检疫样品中筛查检疫及高频入侵有害菌物的高通量筛查基准数据库。同时, 整合了高通量

数据分析流程中涉及的相关软件模块, 通过将数据分析流程包装成脚本形式的方式, 实现了高通量数据原始序列的合并去头、数据质控、聚类分析、OTUs 注释等一系列分析过程的自动化, 简化了数据分析过程。目前, 相关软件模块及核心筛查数据库已经整合到在线鉴定网站内, 并设计了高通量数据上传、分析、输出等相关功能模块(图 4), 基本实现在线自动分析检疫样品中高通量数据, 实现检疫样品中检疫性物种的多目标筛查鉴定。

3.3 检疫性菌物物种鉴定平台建设

物种鉴定平台构建了基于多基因谱系分型筛查技术的检测模块。该技术主要基于多基因基准数据库, 通过整合序列联配软件、系统发育分析软件及遗传距离分析软件模块, 并设计多个查询功能模块, 如序列输入、序列联配、系统发育树构建、物种确认等一系列功能模块(图 5), 建立“一站式”的多基因谱系分型筛查系统, 实现基于单个 DNA 条形码或者多个基因序列的精准、快速的物种鉴定。该平台的优势在于核心数据库中的数据是源于模式或经过各类群分类专家研究和认证的可靠数据。

3.4 检疫性及重要农林作物有害菌物溯源平台建设

目前完成了检疫对象咖啡浆果刺盘孢 (*Colletotrichum kahawae*) 的溯源筛查平台, 通过对刺盘孢属的多基因序列分析, 明确该菌与近缘物种的亲缘关系, 选取咖啡浆果刺盘孢编码核糖体的 ITS、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(GAPDH)、几丁质合成酶基因(CHS-1)、钙调蛋白基因(CAL)、 β -微管蛋白基因(TUB2)、超氧化物歧化酶基因(SOD2)等多个片段, 筛选不同地理起源的菌株中多基因序列的差异, 建立溯源基准数据库, 实现



图 4. 检疫样本高通量筛查数据分析流程及平台使用步骤流程图

Figure 4. Pipeline of high-throughput sequence analyses and identification platforms for quarantine samples.

检疫性物种的溯源技术体系。目前部分数据分析功能仍在完善过程中。未来在现有数据库框架基础上，利用二代、三代测序技术获取检疫对象的基因组数据，在基因组水平分析相关数据，建立重要检疫性菌物的快速、有效的溯源方法，并整合相关在线鉴定工具及数据分析平台，逐步完善溯源平台的功能。

4 我国检疫性菌物数据库示范应用

检疫对象的识别很大程度依赖于凭证样本及标准参比物质的利用，建立海关口岸共享、共用的凭证样本及参比物质库是解决目前口岸检疫性菌物“检不准”的重要基础。我国现行植物检疫性菌物名录自 2007 年颁布后经历过 2 次增补，但菌物分类系统较 2007 年发生了巨大的变化，很



图 5. 检疫性菌物多基因分型筛查检测流程

Figure 5. Multi-locus sequence identification platform for plant quarantine fungi.

多检疫性物种的种、属概念都发生了很大变动，相关的物种界限也发生了变化并在不同系统中存在不一致性^[4]。因此，检疫性菌物标准库(实物库+信息库)的建设工作对提升口岸物种准确识别提供了基础保障。借助检疫性菌物标准物质及数据库的示范服务，全国一些重要的口岸在检疫性物种的截获方面有了显著的增加，如首次从进境植物产品中截获向日葵茎溃疡病菌、杜鹃花枯萎病菌、山茶叶杯菌、亚洲胶孢锈菌等重要的检疫性菌物^[36-39]。此外，依据标准库内相关物种的数据，一些新植物病原菌物也被有效截获。如 2018 年宁波海关首次从源自澳大利亚、美国、意大利及日本的进境植物货物中截获病原菌物新物种 6 个^[40-41]。这是我国口岸自设立植物检疫部门以来首次截获

的菌物新物种，相关成果在国内主流媒体引起很大关注。

随着我国对农产品需求的急剧增加，植物检疫性菌物的检测防控任务繁重，目前口岸检疫鉴定方法以形态和分子检测方法为主，但检测工作存在目标单一、检测周期长等缺陷，无法实现检疫性菌物的全覆盖。随着经济全球化及我国粮食及其他农林作物进口量的不断增加，对大批量样品开展快速高通量、多目标筛查的需求非常迫切。通过检疫性菌物检测平台的建设，初步建立了高通量筛查数据库及网站在线服务功能，并应用于美国和澳大利亚等国进境的高粱种子检疫性菌物的筛查工作^[42]。通过利用自主搭建的高频入侵有害菌物物种高通量筛查基准数据库，可以一次性

检出多种重要的高粱病原菌物,显著提高检测效率和准确性,为口岸科学评估进境农作物检疫风险提供技术保障。此外,利用检疫样品筛查技术平台可以实时开展多目标检测的特点,有效提高口岸对检疫性菌物及高频跨境物种的筛查工作。由于该平台具有自动化处理高通量数据的功能模块,降低了数据分析的技术壁垒,为口岸人员利用高通量测序来筛查检疫样品中的入侵菌物提供了检测平台。

5 讨论及展望

国门生物安全是国家安全体系中的重要组成部分。外来检疫性有害生物正成为国门生物安全的重要威胁。其中,检疫性菌物类有害生物在外来入侵微生物中所占比重较大,但现有检测手段存在“检不到、检不准、手段落后、目标单一、周期长”等缺陷,检疫性菌物的检测和防控技术的缺失正成为我国国门生物安全体系中的短板之一。为此,我们搭建了植物检疫性菌物标准库及检测平台,建立了形态、分子检测标准化的参考库(模式、凭证样本实物库及信息库、参比物质库、形态特征库以及多基因基准序列数据库),同时,通过整合多个信息库资源开发从检疫样品初筛到物种精准鉴定的平台模块,实现筛、检一体的“一站式”的检测服务。通过标准库及信息库的建设,形成一系列具有自主知识产权的检疫性菌物的技术标准、标准参比物质、高效检测技术方法以及相关发明专利及标准数据库等,可有效协助我国口岸一线检疫人员对检疫性菌物开展识别和检测,为补齐我国国门安全体系中的短板、减少跨境生物对我国的安全威胁起到科技支撑作用。此外,该标准库及检测平台对重要的植物病原菌物的基础信息进行了有效的数据化管理,可为

病原物起源、分布、传播、入侵、扩散、预警、监测等不同阶段的风险评估、损失评估等提供基础科学数据,同时为全社会和公众了解外来有害生物危害、增强国门生物安全意识提供科普教育平台。

标准库和数据平台目前已初具规模,并逐步开始免费共享,并在部分口岸中起到了很好的示范作用。未来,在标准库的建设中需要进一步扩大病原菌物的凭证样本、参比物质、酶、毒素等衍生资源的收集范围,并研制国家标准样品,建立国家级的检疫性菌物标准库及特色主题库,在此基础上,进一步完善网站的用户体验,提升查询模块的智能化搜索功能,并针对口岸一线人员的日常检测环境所需,实现人机智能化的交互,为我国检验检疫、农林部门及相关产业人员提供专业、准确的参考,促进我国生物安全防御体系的完善。在检测平台的建设方面,逐步加强检测平台的技术创新工作,针对口岸目前鉴定难度较大的检疫性菌物,在菌物传入、定殖、潜伏、扩散暴发等关键环节针对性地开发相关检测技术方法,结合大数据分析及二代、三代测序新技术方法,开发跨境微生物多目标、高精度的鉴定及溯源平台,开发针对我国进出口主要农作物微生物的多目标检测技术体系,实现环境(混合)样品中一步筛查千种微生物的目标。未来几年,通过检疫性菌物标准库及检测平台的建设,进一步提升该平台在生物疫情的预警、检测及溯源过程中的作用,从而为提升国门生物安全的检测能力及智慧海关的建设提供帮助。

致谢

感谢中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室陈倩博士、梁俊敏博士、王蒙蒙博士等人在数据收集过程中给予的帮助。

参考文献

- [1] Wan FH, Zhang GF. Current status and development strategy for agricultural pest quarantine in China. *Plant Protection*, 2010, 36(4): 6–9. (in Chinese)
万方浩, 张桂芬. 我国农业有害生物检疫的研究现状及发展策略. *植物保护*, 2010, 36(4): 6–9.
- [2] Ju RT, Li H, Shi ZR, Li B. Progress of biological invasions research in China over the last decade. *Biodiversity Science*, 2012, 20(5): 581–611. (in Chinese)
鞠瑞亭, 李慧, 石正人, 李博. 近十年中国生物入侵研究进展. *生物多样性*, 2012, 20(5): 581–611.
- [3] 中华人民共和国生态环境部. 2019 中国生态环境状况公报. 2020 年 5 月 18 日.
- [4] Duan WJ, Yan J, Liu F, Cai L, Zhu SF. The list of Chinese quarantine fungi is in need of revision and renewal. *Mycosystema*, 2015, 34(5): 942–960. (in Chinese)
段维军, 严进, 刘芳, 蔡磊, 朱水芳. 我国进境检疫性菌物名录亟待修订完善. *菌物学报*, 2015, 34(5): 942–960.
- [5] Wang Y, Cheng YH, Wang Y, Gao RF, Lou DF. Information analysis of quarantine fungus in entry plant and plant product. *Plant Quarantine*, 2016, 30(1): 74–76. (in Chinese)
汪莹, 程颖慧, 王颖, 高瑞芳, 娄定风. 全国进境植物及植物产品截获检疫性真菌疫情分析. *植物检疫*, 2016, 30(1): 74–76.
- [6] 庞莉. 棉花黄萎病菌的快速分子检测技术的分析. 中国农业科学院硕士学位论文, 2015.
- [7] 中华人民共和国农业部公告第 862 号, 2007. 中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录. 2007 年 5 月 29 日.
- [8] 中华人民共和国国家林业和草原局公告第 20 号, 2019. 我国主要外来林业有害生物名单. 2019 年 12 月 18 日.
- [9] Ji R, Wang JS, Liao TL, Li BS, Zhang ZG, Zheng XB. Rapid molecular detection of *Phytophthora lateralis* by PCR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2014, 44(2): 113–120. (in Chinese)
纪睿, 王健生, 廖太林, 李百胜, 张正光, 郑小波. 雪松疫霉(*Phytophthora lateralis*)的快速分子检测. *植物病理学报*, 2014, 44(2): 113–120.
- [10] 陶兆雪. 几种检疫性有害生物分子检测技术研究. 南京林业大学硕士学位论文, 2014.
- [11] Cai L, Hyde KD, Taylor PWJ, Weir BS, Waller JM, Abang MM, Zhang JZ, Yang YL, Phoulivong S, Liu ZY, Prihastuti H, Shivas RG, McKenzie EHC, Johnston PR. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 2009, 39: 183–204.
- [12] Rosen GL, Reichenberger ER, Rosenfeld AM. NBC: the Naïve Bayes Classification tool webserver for taxonomic classification of metagenomic reads. *Bioinformatics*, 2011, 27(1): 127–129.
- [13] Hou T, Liu F, Liu Y, Zou QY, Zhang X, Wang K. Classification of metagenomics data at lower taxonomic level using a robust supervised classifier. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2015, 11: 3–10.
- [14] Chalupová J, Raus M, Sedlářová M, Šebela M. Identification of fungal microorganisms by MALDI-TOF mass spectrometry. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(1): 230–241.
- [15] de Gruyter J, Woudenberg JHC, Aveskamp MM, Verkley GJM, Groenewald JZ, Crous PW. Redisposition of *Phoma*-like anamorphs in Pleosporales. *Studies in Mycology*, 2013, 75: 1–36.
- [16] Chen Q, Hou LW, Duan WJ, Crous PW, Cai L. Didymellaceae revisited. *Studies in Mycology*, 2017, 87: 105–159.
- [17] Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemse M, Andersen B, Summerell BA, Shin HD, Dugan FM, Schroers HJ, Braun U, Crous PW. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 2010, 67: 1–94.
- [18] Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW. The genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology*, 2012, 72: 1–401.
- [19] Ma R, Chen Q, Fan YL, Wang Q, Chen SF, Liu XZ, Cai L, Yao B. Six new soil-inhabiting *Cladosporium* species from plateaus in China. *Mycologia*, 2017, 109(2): 244–260.
- [20] Feau N, Vialle A, Allaire M, Maier W, Hamelin RC. DNA barcoding in the rust genus *Chrysomyxa* and its implications for the phylogeny of the genus. *Mycologia*, 2011, 103(6): 1250–1266.
- [21] Qi XH, Cai L, Zhao P. *Quasipucciniastrum agrimoniae*, gen. et sp. nov. on *Agrimonia* (*Rosaceae*) from China. *Mycology*, 2019, 10(3): 141–150.
- [22] Zhao P, Qi XH, Crous PW, Duan WJ, Cai L. *Gymnosporangium* species on *Malus*: species delineation, diversity and host alternation. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2020, 45(1): 68–100.
- [23] Gomes RR, Glienke C, Videira SIR, Lombard L, Groenewald JZ, Crous PW. *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 2013, 31: 1–41.
- [24] Gao YH, Liu F, Cai L. Unravelling *Diaporthe* species associated with *Camellia*. *Systematics and Biodiversity*, 2016, 14(1): 102–117.
- [25] Visagie CM, Renaud JB, Burgess KMN, Malloch DW, Clark D, Ketch L, Urb M, Louis-Seize G, Assabgui R, Sumarah MW, Seifert KA. Fifteen new species of *Penicillium*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2016, 36(1): 247–280.
- [26] Liu F, Cai L, Crous PW, Damm U. The *Colletotrichum*

- gigasporum* species complex. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2014, 33(1): 83–97.
- [27] Damm U, O'Connell RJ, Groenewald JZ, Crous PW. The *Colletotrichum destructivum* species complex-hemibiotrophic pathogens of forage and field crops. *Studies in Mycology*, 2014, 79: 49–84.
- [28] Zhao P, Kakishima M, Wang Q, Cai L. Resolving the *Melampsora epitea* complex. *Mycologia*, 2017, 109(3): 391–407.
- [29] Wang MM, Chen Q, Diao YZ, Duan WJ, Cai L. *Fusarium incarnatum-equiseti* complex from China. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2019, 43(1): 70–89.
- [30] Inderbitzin P, Bostock RM, Davis RM, Usami T, Platt HW, Subbarao KV. Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PLoS ONE*, 2011, 6(12): e28341.
- [31] Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA, Chukeatirote E, Hyde K. A taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (*Pleosporaceae*): human and plant pathogens. *Phytotaxa*, 2015, 212(3): 175.
- [32] Aime MC, Bell CD, Wilson AW. Deconstructing the evolutionary complexity between rust fungi (*Pucciniales*) and their plant hosts. *Studies in Mycology*, 2018, 89: 143–152.
- [33] Lombard L, Houbraken J, Decock C, Samson RA, Meijer M, Réblová M, Groenewald JZ, Crous PW. Generic hyper-diversity in *Stachybotriaceae*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2016, 36(1): 156–246.
- [34] Li YM, Shivas RG, Cai L. Cryptic diversity in *Tranzscheliella* spp. (*Ustilaginales*) is driven by host switches. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1–13.
- [35] Li YM, Shivas RG, McTaggart AR, Zhao P, Cai L. Ten new species of Macalpinomyces on *Eriachne* in northern Australia. *Mycologia*, 2017, 109(3): 408–421.
- [36] Duan WJ, Duan LJ, Chen XF, Cai L. Identification of the quarantine fungus *Diaporthe helianthi* from the corn seeds imported from Ukraine. *Mycosystema*, 2016, 35(12): 1503–1513 (in Chinese)
- 段维军, 段丽君, 陈先锋, 蔡磊. 进境乌克兰玉米中夹杂向日葵间座壳菌的鉴定. 菌物学报, 2016, 35(12): 1503–1513
- [37] Duan WJ, Duan LJ, Li XL, Zhang HL, Chen XF. Quarantine identification of *Ovulinia azaleae* Weiss from the *Azalea* of Japan. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 49(3): 289–295. (in Chinese)
- 段维军, 段丽君, 李雪莲, 张慧丽, 陈先锋. 进境日本杜鹃中杜鹃花枯萎病菌的检疫鉴定. 植物病理学报, 2019, 49(3): 289–295.
- [38] Duan WJ, Duan LJ, Liu F, Lü Y, Zhao P, Cai L. Quarantine identification of *Ciborinia camelliae* from the *Camellia sasanqua* imported from Japan. *Forest Pest and Disease*, 2020, 39(6): 1–9. (in Chinese)
- 段维军, 段丽君, 刘芳, 吕燕, 赵鹏, 蔡磊. 进境茶梅中山茶叶杯菌的检疫鉴定. 中国森林病虫, 2020, 39(6): 1–9.
- [39] Duan WJ, Cai L, Lü Y, Zhao P. Quarantine identification of *Gymnosporangium asiaticum* from *Juniperus chinensis* imported from Japan. *Plant Quarantine*, 2020, 34(4): 31–35. (in Chinese)
- 段维军, 蔡磊, 吕燕, 赵鹏. 进境日本圆柏上亚洲胶孢锈病菌的检疫鉴定. 植物检疫, 2020, 34(4): 31–35.
- [40] Chen Q, Hou LW, Duan WJ, Crous PW, Cai L. *Didymellaceae* revisited. *Studies in Mycology*, 2017, 87: 105–159.
- [41] Gao YH, Liu F, Duan WJ, Crous PW, Cai L. *Diaporthe* is paraphyletic. *IMA Fungus*, 2017, 8(1): 153–187.
- [42] Zhou MM, Zhou X, Sun MQ, Li B, Wu CP, Cai L. Fungal diversity in imported *Sorghum* by high-throughput sequencing technology. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2019, 42(4): 665–671. (in Chinese)
- 周密密, 周欣, 孙民琴, 李彬, 吴翠萍, 蔡磊. 高通量测序技术分析进境高粱种子的真菌多样性. 南京农业大学学报, 2019, 42(4): 665–671.

Construction and application of reference databases for plant quarantine fungi in China

Peng Zhao¹, Weijun Duan^{2,3}, Fang Liu¹, Xin Zhou¹, Guomei Fan⁴, Ziyang Ma¹, Lei Cai^{1*}

¹ State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

² Ningbo Academy of Inspection and Quarantine, Ningbo 315012, Zhejiang Province, China

³ Ningbo Customs District P.R. China, Ningbo 315012, Zhejiang Province, China

⁴ The Center for Microbial Resource and Big Data, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: In recent years, quarantine pests, especially phytopathogenic fungi, posed serious threats to the biological security of China. Thus, the reinforcement of defense systems for those invasive fungal species is essential to prevent alien biological threats. Due to the lack of reference materials and basic databases related to those phytopathogenic fungi, the identifications of these quarantine fungi remain ineffective, posing high risks of biological invasion that may lead to significant economic losses and ecological damages. In view of the shortcomings in the inspection and quarantine of important invasive fungal species, we established a reference database, which includes reference information from the voucher specimens, including the standard molecules, morphological characteristics, and multi-locus reference sequences. An integrative online identification and inspection platform was established by integrating multiple computer packages, including platform for initial multi-objective inspection of fungal species from quarantine samples, and the “one-stop shop” identification package of fungal species based on multi-locus sequences. The database can be freely accessed at website: www.casbrc.org/pqfungi. Construction of the reference databases and inspection platforms may greatly enhance the inspection efficiency of alien fungal pathogens, and have been playing increasingly important role in the construction of “intelligent customs” of China.

Keywords: plant quarantine fungi, standard databases, multi-objective screening, national biosafety

(本文责编: 李磊)

Supported by the Biological Resources Programme (BRP), Chinese Academy of Sciences (KFJ-BRP-009), by the BRP Capacity Building Project (KFJ-BRP-017-24), by the National Key Research and Development Program of China (2016YFF0203201), by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA19050303), by the National Natural Science Foundation of China (NSFC31770009) and by the Public Projects of Zhejiang Province (LGF20C140001)

*Corresponding author. Tel: +86-10-64806123; E-mail: cail@im.ac.cn

Received: 12 January 2021; Revised: 7 June 2021; Published online: 27 October 2021



赵鹏, 男, 博士, 主要从事植物病原真菌分类与系统学研究以及服务于生物安全、海关检疫的真菌检测技术的研发工作, 发表学术文章 31 篇, 其中以第一作者和通讯作者发表论文 18 篇, 相关研究成果发表于 *Fungal Diversity*、*Persoonia*、*Environmental Research*、*Mycologia*、《微生物学报》、《植物检疫》等国内外学术期刊。此外, 参与制定国家标准 4 项, 行业标准 4 项, 申请了发明专利 5 项, 开发条形码鉴定软件 3 个, 获得相关软件著作权。在项目方面, 曾主持国家自然科学基金面上项目 1 项、中科院项目 1 项, 作为研究骨干参与国家科技部重点研发计划、中国科学院重点部署项目、中国科学院先导专项、国家自然科学基金等科研项目 9 项。