

本诊断规程于 2015 年 1 月由标准委代表植检委通过。

本附件是 ISPM 27 号标准规定的一部分。

# ISPM 27 号标准 限定有害生物诊断规程

## DP 7: 马铃薯纺锤形块茎类病毒 (*spindle tuber viroid*)

2016 年通过；2016 年出版

### 目录

1. 有害生物信息 .....	2
2. 分类信息 .....	3
3. 检测 .....	3
3.1 抽样 .....	6
3.2 生物学检测 .....	6
3.3 分子检测 .....	7
3.3.1 样品制备 .....	7
3.3.2 核酸提取 .....	8
3.3.3 马铃薯纺锤形块茎类病毒属的通用分子检测方法 .....	10
3.3.3.1 R-PAGE .....	10
3.3.3.2 用 DIG 标记的 cRNA 探针杂交 .....	10
3.3.3.3 使用 Verhoeven 等 (2004) 引物的常规 RT-PCR .....	11
3.3.3.4 使用 GenPospi 检测的实时 RT-PCR (Botermans 等, 2013) .....	12
3.3.4 具有较高特异性的 PSTVd 分子检测方法 .....	14
3.3.4.1 使用 Shamloul 等 (1997) 引物的常规 RT-PCR .....	14
3.3.4.2 使用 Boonham 等 (2004) 引物的实时 RT-PCR .....	14
3.3.4.3 实时 RT-PCR (Plant Print Diagnostics kit) .....	15
3.4 分子检测的对照 .....	16
3.5 常规和实时 RT-PCR 结果的解释 .....	18
3.5.1 常规 RT-PCR .....	18
3.5.2 实时 RT-PCR .....	18
4. 鉴定 .....	18
4.1 测序与序列分析 .....	19
5. 记录 .....	20
6. 获取进一步信息的联系点 .....	20
7. 致谢 .....	21
8. 参考文献 .....	21

## 1. 有害生物信息

类病毒是没有蛋白质外壳，共价闭合的单链环状 RNA 分子，长度为 239—401 个碱基对，由寄主酶复制 (Hammond & Owens, 2006)。马铃薯纺锤形块茎类病毒 (PSTVd; 马铃薯纺锤形块茎类病毒属 (*Pospiviroid*)) 通常长 359 个碱基对，但有报道称有的 PSTVd 分离物含有 341—364 个碱基对 (Wassenegger 等, 1994; Shamloul 等, 1997; Jeffries, 1998)。根据易感病的番茄品种产生的症状，例如番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 的卢特格 (*Rutgers*) 品种 (Fernow, 1967)，人们对其弱系和强系进行了描述。

PSTVd 的自然寄主范围相对较窄。主要的自然寄主是产生匍匐茎和块茎的茄属植物；例如马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 和番茄 (*S. lycopersicum*)。PSTVd 在辣椒 (*Capsicum annuum*)、鳄梨 (*Persea americana*) 和香瓜茄 (*S. muricatum*) 中也有发现。PSTVd 主要在无性繁殖的茄科观赏植物种类中发现—即木曼陀罗属 (*Brugmansia* spp.)、夜香树属 (*Cestrum* spp.)、曼陀罗属 (*Datura* sp.)、蓝花茄 (*Lycianthes rantonetti*)、矮牵牛属 (*Petunia* spp.)、灯笼果 (*Physalis peruviana*)、茄属 (*Solanum* spp.) 和果酱木 (*Streptosolen jamesonii*)，也见于菊科 (Asteraceae) 的茼蒿属 (*Chrysanthemum* sp.) 和大丽花 (*Dahlia* × *hybrida*) (有关自然寄主的详细情况，见 CABI (n.d.))。PSTVd 的实验寄主范围很宽，包含茄科的各个种，以及至少其他 9 个科的部分种。多数寄主很少表现或不表现病害症状 (Singh, 1973; Singh 等, 2003)。

已发现 PSTVd 在非洲、亚洲、东欧、北美洲 (EPPO/CABI, 1997)，中美洲 (Badilla 等, 1999)，南美洲和中东 (Hadidi 等, 2003) 一些国家侵染马铃薯。然而，它在观赏植物和其他寄主植物上有更广泛的地理分布 (地理分布见 CABI (n.d.))。

在马铃薯中，PSTVd 的主要传播方式是无性繁殖。它也通过接触传播，主要是田间机械和种薯块茎切分 (Hammond & Owens, 2006)。PSTVd 可以通过真正的马铃薯种子传播—多达 100% 的种子可被侵染 (Fernow 等, 1970; Singh, 1970)—也可以通过花粉传播 (Grasmick & Slack, 1985; Singh 等, 1992)。De Bokx 和 Pirone (1981) 报道马铃薯长管蚜 (*Macrosiphum euphorbiae*) 低比率传播 PSTVd，但桃蚜 (*Myzus persicae*) 和茄沟无网蚜 (*Aulacorthum solani*) 不会传播。然而，有报道称，实验条件下桃蚜可从受 PSTVd 和马铃薯卷叶病毒 (*Potato leafroll virus* (PLRV)) 联合侵染的植株中获得并传播 PSTVd (Salazar 等, 1995; Singh & Kurz, 1997)。随后发现 PSTVd 被异源包被在马铃薯卷叶病毒颗粒中 (Querci 等, 1997)，这一现象可能对田间条件下 PSTVd 的流行病学和传播具有重要意义。

在番茄中，PSTVd 易于通过接触传播，且已证明可经花粉和种子传播（Kryczynski 等，1988；Singh，1970）。已证明通过番茄种子传播加速了 PSTVd 在国际上的扩散（van Brunschot 等，2014）。PSTVd 也可能随受侵染的辣椒种子传播（Lebas 等，2005）。

如果在接触其他感病植物前对其进行过处理，受侵染的观赏植物可以起到接种源的作用，已证明它们是 PSTVd 国际传播的一个路径（Navarro 等，2009；Verhoeven 等，2010）。尚未发现 PSTVd 随西蜂（*Apis mellifera*）、熊蜂（*Bombus terrestris*）、西花蓟马（*Frankliniella occidentalis*）或烟蓟马（*Thrips tabaci*）传播（Nielsen 等，2012）。

PSTVd 是唯一已知可自然侵染茄属栽培种的类病毒。然而，墨西哥心叶茄类病毒（*Mexican papita viroid* (MPVd)）侵染野生种马铃薯（*S. cardiophyllum*）（Martinez-Soriano 等，1996）。在实验条件下，马铃薯纺锤形块茎类病毒属中的其他类病毒可侵染马铃薯（Verhoeven 等，2004）。

除 PSTVd 外，已证明其他马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒可自然侵染番茄，包含柑橘裂皮病类病毒（*Citrus exocortis viroid* (CEVd)；Mishra 等，1991）、金鱼花潜隐类病毒（*Columnea latent viroid* (CLVd)；Verhoeven 等，2004）、墨西哥心叶茄类病毒（Ling & Bledsoe，2009）、辣椒小果类病毒（*Pepper chat fruit viroid* (PCFVd)；Reanwarakorn et al.，2011）、番茄顶缩类病毒（*Tomato apical stunt viroid* (TASVd)；Walter，1987）、番茄萎黄矮化类病毒（*Tomato chlorotic dwarf viroid* (TCDVd)；Singh 等，1999），以及番茄整株结节类病毒（TPMVd；Galindo 等，1982）。

## 2. 分类信息

**学名：**Potato spindle tuber viroid（简称 PSTVd）

**异名：**potato spindle tuber virus, potato gothic virus, tomato bunchy top virus

**分类地位：**马铃薯纺锤形块茎类病毒科（Pospiviroidae），马铃薯纺锤形块茎类病毒属（*Pospiviroid*）

**通用名：**马铃薯纺锤块茎病

## 3. 检测

PSTVd 的症状表现和严重程度取决于其株系、栽培品种和环境。在马铃薯中，侵染可能不表现症状，或产生轻微到严重的症状（植株变小，从上部看叶片直立且叶序呈顺时针方向；叶片呈暗绿色且皱缩）。块茎可能变小、畸形，呈纺锤形或哑铃

形，带有均匀分布且明显突出的芽眼（EPPO, 2004）。在番茄中，症状包括矮化、新叶有明显的偏上性、皱缩且边缘扭曲、叶片黄化、变红、变脆、坏死，果实变小且不能完全成熟（Mackie 等, 2002; Hailstones 等, 2003; Lebas 等, 2005）。在辣椒上，症状轻微，植株近顶部叶片表现出波浪状边缘（Lebas 等, 2005）。到目前为止，调查过的各种观赏植物均不表现症状（Verhoeven, 2010）。

因为 PSTVd 侵染可能不显症，需要通过检验来检测和鉴定该类病毒。可选用图 1 提供的生物学和分子检验方法来检测 PSTVd，但鉴定时必须对多聚酶链式反应（PCR）产物进行测序，这是由于这些检验方法对 PSTVd 不具特异性，可能检测出其他类病毒。测序还有助于防止报告假阳性。如果认为致病性很重要，可使用生物学指示法。如果 PSTVd 的鉴定代表的是在一个国家首次发现，鉴定实验室可请另一个实验室对其诊断结果予以确认。

所有检验均应包含适宜的对照，以尽可能减少出现假阳性或假阴性结果的风险。

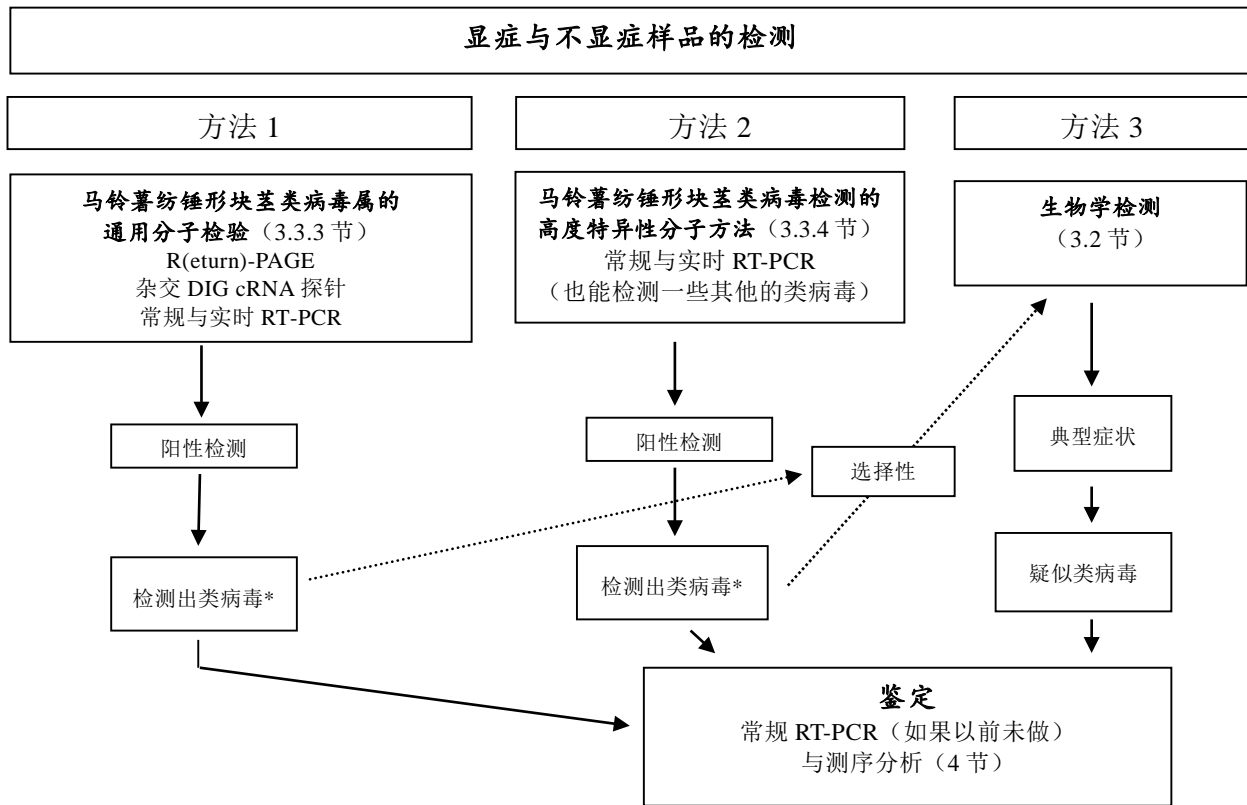


图 1. 马铃薯纺锤形块茎类病毒 (PSTVd) 检测和鉴定的最低要求

\* 在某些情况下，鉴定对每一个类病毒阳性样品可能并非必须；例如，在应对 PSTVd 突发时。

注：如果怀疑一个样品中有一种类病毒（即存在典型症状），但检验给出了阴性结果，需进行另一种检测以验证该结果。

本附件用于检测 PSTVd；它的制定并非为了检测和鉴定马铃薯纺锤形块茎类病毒属其他种类的类病毒。然而，在选定检测和鉴定方法时，需要考虑可能存在其他类病毒。因此，本附件描述了能检测出所有已知类病毒的非特异性检测方法；其中包含马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒，例如 PSTVd。为了鉴定，PCR 产物需要测序。

本规程描述了叶片、块茎和植物学（真正的）种子组织中 PSTVd 的检测方法，然而对种子组织进行可靠的检测特别具有挑战性。

在本诊断规整中，各种方法（包含引用的商标名）的描述和发表时一样，因为它们决定了最初获得的灵敏度、特异性和/或再现性水平。本诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用，并不意味对它们的认可，而排斥可能同样适用的其他品牌。只要经过充分验证，本规程提供的实验室程序可根据各个实验室的标准进行调整。有关植物诊断学方法验证的建议由 EPPO（2014）提供。

分子检验的效果由待检验的基质和选定的后续样品制备、核酸提取，以及检测与鉴定方法共同决定。表 1 概述了不同基质和方法组合可以使用的验证数据。这些方法在相应段落或引用的参考文献中有详细描述。

### 3.1 抽样

ISPM 31 号标准（货物抽样方法）提供了有关抽样方法的一般性指导。

**马铃薯微型植株与温室栽培的马铃薯植株** 对微型植株而言，整个植株应用作样品，或在无菌条件下对植株上部 2/3 的部位进行取样，以确保植株的其他部分可继续生长。微型植株应是 4 至 6 周大小，茎长约 5cm，有发育良好的叶片。对温室栽培的植株而言，每一植株应采集一片完全展开的嫩叶。类病毒浓度在低温和低光照水平下较低，因此植物应在最低为 18℃ 的温度和至少为 14h 的光周期下生长。微型植株或叶片可混合使用，但混合比例取决于所使用的检验方法，且必须经过验证。

**大田栽培的马铃薯植株** 应在每一植株顶部采集一片完全展开但未衰老的嫩叶。叶片可混合用于检测；混合比例取决于所使用的检测方法，且必须经过验证。

**马铃薯块茎 PSTVd** 在受侵染的马铃薯块茎中系统分布（Shamloul 等，1997）。在初次侵染和再次侵染块茎中，不同部位的发生数量都近乎相同（Roehorst 等，2006）。发现刚收获时浓度最高。块茎在 4℃ 下储藏时，浓度在长达 3 个月的时间内不会显著下降，但储藏 6 个月后，它可能下降  $10^4$  倍以上。块茎任何部位的一块中心组织都可以用作一个样品，也可以混合使用；混合比例取决于所使用的检测方法，且必须经过验证。

**其他作物和观赏植物叶片** 使用完全展开的嫩叶。叶片可混合用于检测；混合比例取决于所使用的检测方法，且必须经过验证。需注意的是，类病毒浓度会受植株年龄/成熟度影响，而且通常有季节性波动。另外，一些种类含有生物物质，可能抑制受检植物（例如木曼陀罗属）的接种或逆转录 PCR（RT-PCR）（例如小矮牵牛花属（*Calibrachoa* spp.）、素馨叶白英（*Solanum jasminoides*）和果酱木。

**种子** 类病毒浓度在种子间变化很大，侵染水平也可能在不足 1% 到 100% 之间变化。这导致很难建议样本大小和混合比例（EUPHRESCO，2010）。对番茄而言，单一检测曾用过 100—1 000 的混合比例。混合比例取决于所使用的检测方法，且必须经过验证。

马铃薯种子可种植在装有栽培介质（例如堆肥）的托盘中，而且可以采用针对温室栽培植株所描述的另一程序对幼苗/植株进行非毁灭性检测（EPPO，2006）。

### 3.2 生物学检测

对番茄（卢特格、moneymaker 或 Sheyenne 栽培品种）植株进行接种，可以检测多种但非所有类病毒（例如番茄不是血苋类病毒 1 号（*Iresine viroid 1*, rVd-1）的寄主（Spieker，1996；Verhoeven 等，2010）），并产生可见的致病性症状。然而，由

于缺少症状，一些分离物可能无法检测。另外，症状可能不足以诊断 PSTVd。生物指示可能需要大量的温室空间，要付出大量劳动，而且在检测完成前可能需要几个星期甚至更多时间。尚未对本方法和本规程描述的其他方法的灵敏度做过比较研究。如果它的灵敏度比分子学方法低，它可能就不太适合用于检测种子。然而，类病毒可能在生物指示过程中得到扩增，从而达到可以采用其他方法进行检测的水平。

将大约 200—500 mg 叶片、根或块茎组织放在含金刚砂（400 目）的少量 0.1 M 磷酸盐接种缓冲液（1:1 稀释即可）中研磨。磷酸盐缓冲液（pH 7.4）使用 80.2 ml 1 M  $K_2HPO_4$  和 19.8 ml 1 M  $KH_2PO_4$  混合制备，并用蒸馏水调配至 1 升。

对有 1 或 2 片完全展开的叶片的番茄幼株进行接种。将带手套的手指、棉签或棉棒浸入接种液，沾上接种液后轻轻擦拭叶片表面，然后立即用清水冲洗叶片，直至金刚砂被全部清除。植株在 24—39°C 周日温度变化和约 650  $\mu E/m^2/s$  蒸汽照明补光的 14h 光周期下生长（Grassmick & Slack, 1985）。较低温度和较少光照可能降低本检测方法的灵敏度。接种后每周调查植株症状，持续 6 周。PSTVd 侵染的症状包括矮化、新叶具偏上性、皱缩且边缘扭曲，叶片黄化、变红、变脆、坏死。

番茄的生物检测可以检测出很多种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒（除 IrVd-1 外，见上文）；因此应从显症的指示植物中提取核酸，对其实施 RT-PCR，并对 PCR 产物进行测序和鉴定。

### 3.3 分子检测

#### 3.3.1 样品制备

**微型植株、叶片材料和根** 已成功使用研钵研杵或匀浆器（例如 Homex 6 (Bioreba)）和提取袋（Bioreba）对材料进行研磨。加入少量水或裂解缓冲液（其成分取决于用于所采用的核酸提取方法），或对样品进行冷冻（例如在液氮中）有助于匀浆。

以下程序已和使用磁珠提取法 2 进行核酸提取，以及本附件描述的实时 RT-PCR GenPospi 检测一起经过了验证（见表 1）。将约 1 g 组织和 3.5 ml（范围 1:2—1:5 (w/v)）GH plus 裂解缓冲液（6 M 盐酸胍；0.2 M 乙酸钠，pH 5.2；25 mM 乙二胺四乙酸 (EDTA)；2.5% 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) -10）一起放进提取袋中，使用 Homex 6 或手持匀浆器（Bioreba）匀浆。核酸提取前，将样品放在恒温混匀仪中，65°C 下以 850 r.p.m. 培养 10 min（或通过摇晃（倒置试管 3 次），并以 16 000 g 离心 2 min）。

**马铃薯块茎** 块茎中心组织在水或裂解缓冲液（其成分取决于所采用的核酸提取方法；每 g 块茎中心组织用 1 ml）中充分匀浆。Homex 6 等研磨器和提取袋已成功应用于此。在加水或裂解缓冲液之前，对中心组织进行冷冻（例如在 -20°C 下）有助于匀浆。

**种子** 少量种子 (<100) 可使用组织研磨仪 (例如 RetschTissueLyse (Qiagen))。大量种子可使用一种桨式搅拌器 (例如 MiniMix (Interscience)) 或匀浆器 (例如 Homex 6), 以及尽可能少的裂解缓冲液 (其成分取决于所采用的核酸提取方法)。种子也可以用锤子 (Bertolini 等, 2014b) 或研钵研杵粉碎。由于交叉污染可能难以控制, 后者可能并不适于日常使用。另外, 也可以使用液氮对样品进行冷冻, 随后在细胞研磨器中研磨 (此方法也可用于其它类型的植物组织)。

以下程序已和使用磁珠提取法 2 进行核酸提取, 以及本附件描述的 Boonham 等 (2004) 的实时 RT-PCR 检测一起经过了验证 (见表 1)。核酸提取前, 将 3 个各含 1 000 粒种子的子样品分别放进一个 100 ml BagPage 均质袋 (Interscience) 中, 室温下用 20 ml GH plus 裂解缓冲液浸泡 30—60 min, 使用一个 BagMixer 均质器 (Interscience) 均质 90 s 并进行培养 (或采用针对微型植株、叶片材料和根所描述的方法进行摇晃和离心)。

**组织挤压** 将叶柄或离体嫩芽挤压在尼龙膜上。根据 Bertolini 等 (2008, 2014a), 在大约为 0.5 cm<sup>2</sup> 的尼龙膜上可以挤压来自不同叶片和/或离体嫩芽的几个部分重叠的挤压物。切下附有固定样品的薄膜, 装入微型管中。固定样品应使用干净的镊子处理。室温下组织挤压样品可以在黑暗和干燥的环境中至少保存 3 个月。为了从薄膜上提取目标 RNA, 在每个装有一个固定样品的微型管中加入 100 μl 甘氨酸缓冲液, 随后进行涡旋混合并放在冰块上, 保存至 PCR 扩增。

### 3.3.2 核酸提取

有很多核酸提取方法可供使用, 包括商业化试剂盒和科学期刊发表的一些方法。以下核酸提取试剂盒、缓冲液和程序已成功用于 PSTVd 检测。

**商业化试剂盒** 可按照生产商的说明使用 RNeasy (Qiagen)、MasterPure (Epicentre) 和 Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) 等商业化试剂盒。作为欧洲植物检疫研究与协调网络 (EUPHRESKO) 马铃薯纺锤形块茎类病毒属检测与流行病学 (DEP) 项目的一个部分, 已对 RNeasy 从不同基质中提取 PSTVd RNA 的情况进行了评估 (EUPHRESKO, 2010)。

**Mackenzie 等 (1997) 描述的方法** 植物组织在裂解缓冲液 (使用前加入 4 M 异硫氰酸胍、0.2 M 乙酸钠、25 mM EDTA、2.5% PVP-40 (w/v) 和 1% 2-巯基乙醇 (v/v)) 中均质 (1:10 (w/v))。取 1 ml 均质物, 与 100 μl 20% 十二烷基肌氨酸钠 (w/v) 混合, 在恒温混匀仪中以 70 °C、1 200 r.p.m. 震荡培养 10 min。本方法可用于从很多种植物中提取高质量 RNA。

**使用 EDTA 缓冲液的方法** 植物组织可以在一种简单的裂解缓冲液 (50 mM NaOH、2.5 mM EDTA) 中均质 (1:4 (w/v)), 随后进行培养 (约 25 °C 下 15 分钟) 或离心



(4°C下 12 000 g 15 min)。取决于所要求的灵敏度，随后可将上清液直接用于 RT-PCR（较低灵敏度），或点到硝化纤维素膜上并用无菌蒸馏水洗脱（较高灵敏度）（Singh 等，2006）。尽管 EDTA 法提取到的类病毒浓度比描述的其他提取方法低，但当本方法和 RT-PCR 或异羟基洋地黄毒甙元（DIG）探针一起使用时，这不应成为一个限制因素。本方法已用于番茄、马铃薯和很多种观赏植物。

**苯酚-氯仿和两步 PEG 提取法** 按照 EPPO（2004）描述的方法对植物组织进行均质并提取核酸。本方法已和本诊断规程描述的双向往返聚丙烯酰胺凝胶电泳（R-PAGE）、DIG-RNA 探针及常规 RT-PCR 等方法一起用于多种植物和组织类型（例如叶片和马铃薯块茎）。

**CTAB 提取法** 按照 EPPO（2004）描述的方法对植物组织进行均质并提取核酸。十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法已和实时 RT-PCR 一起用于多种植物和组织类型（例如叶片和番茄种子；EUPHRESCO，2010）。

**磁珠提取法 1** 以下自动化程序基于 KingFisher mL 磁珠提取仪（Thermo Scientific）。对容量进行适当调整后，也可使用 KingFisher 其他型号。

对每一样品而言，至少要浸软 200 mg 叶片或块茎组织，或 100 粒种子，随后按照 1 g 叶片或块茎组织对 10 ml 缓冲液和 1 g 种子对 20 ml 缓冲液的比例，立即加入提取缓冲液。持续浸软，直至获取尽可能没有完整组织碎屑的清澈细胞裂解物。提取缓冲液含 200 μl 8.39%（w/v）焦磷酸钠（TNaPP）溶液（pH 10.0–10.9）、100 μl B 型消泡剂乳液（Sigma）和 9.8 ml 胍裂解缓冲液（GLB）。GLB 含：764.2 g 盐酸胍、7.4 g 脱水 EDTA 二钠、30.0 g PVP-10、5.25 g 一水柠檬酸、0.3 g 柠檬酸三钠、5 ml 聚乙二醇辛基苯基醚（Triton X-100）、250 ml 无水乙醇和 750 ml 水。

将大约 2ml 裂解物倒入一个新微量离心管中，约 5 000 g 离心 1 min。取 1 ml 上清液，加入 KingFisher mL 托架上第一个离心管（A）中，同时加入 50 μl 涡旋震荡的 MAP 溶液 A 磁珠（Invitek）。离心管 B 加入 1 ml GLB；离心管 C 和 D 加入 1 ml 70% 乙醇；离心管 E 加入 200 μl 水或 1× Tris-EDTA 缓冲液。

将排管放入 KingFisher mL 磁珠提取仪并运行程序（见图 2）。20 分钟后，暂停提取仪运行，实施加热步骤。将排管移入烘箱，65–70°C 保持 5 min，然后放回 KingFisher mL 磁珠提取仪，恢复程序运行。其他型号可能有内置的加热或控制蒸发步骤。完成后，将洗脱的核酸移入一个新的微型离心管。

本方法已用于很多种植物，以及马铃薯块茎和番茄种子。本方法和本附件描述的两种实时 RT-PCR 检测一起使用（见 3.3.3.4 和 3.3.4.2 节）。使用磁珠提取方法 1 时，循环阈值（Ct）可能比本附件描述的其他提取方法要多几个循环，但样品处理数量的增加使其成为一种有价值的提取方法（Roehorst 等，2005）。

```

Plate layout Default: Plate type = KingFisher tubestrip 1000 µl; Plate change message = Change Default
A: volume = 1000, name = Cell lysate or tissue homogenate; volume = 50, name = Magnetic particles;
B: volume = 1000, name = Washing buffer 1 (Various); C: volume = 1000, name = Washing buffer 2 (Various);
D: volume = 1000, name = Washing buffer 3 (Various); E: volume = 200, name = Elution buffer (Various)
STEPS COLLECT BEADS Step parameters: Name = Collect Beads; Well = A, Default; Beginning of step:
Premix = No; Collect parameters: Collect count = 1. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default;
Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time = 4min
0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A, Default;
Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix Bind; Bind parameters: Bind time =
4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = No. BIND Step parameters: Name = Lysing, Well = A,
Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 1min 0s, speed = Fast dual mix; Bind parameters: Bind time
= 4min 0s, speed = Slow; End of step: Collect beads = Yes, count = 4. WASH Step parameters: Name =
Washing, Well = B, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast; Wash parameters:
Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3. WASH Step
parameters: Name = Washing, Well = C, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s, speed = Fast;
Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads = Yes, count = 3.
WASH Step parameters: Name = Washing, Well = D, Default; Beginning of step: Release = Yes, time = 0s,
speed = Fast; Wash parameters: Wash time = 3min 0s, speed = Fast dual mix; End of step: Collect beads =
Yes, count = 3. ELUTION Step parameters; Name = Elution, Well = E, Default; Beginning of step: Release =
Yes, time = 10s, speed = Fast; Elution parameters: Elution time = 20s, speed = Bottom very fast; Pause
parameters: Pause for manual handling = Yes, message = Heating, Post mix time = 30s, speed = Bottom very
fast; Remove beads: Remove beads = Yes, collect count = 4, disposal well = D

```

图 2. KingFisher mL 磁珠提取仪 (Thermo Scientific) 程序

**磁珠提取方法 2** 本自动程序使用 Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) 和 KingFisher 96 系统 (Thermo Scientific)。除使用 GH plus 裂解缓冲液代替试剂盒中的 PN 裂解缓冲液外，应按照生产商的说明进行操作。

### 3.3.3 马铃薯纺锤形块茎类病毒属的通用分子检测方法

#### 3.3.3.1 R-PAGE

R-PAGE 被推荐作为侵染马铃薯叶片的 PSTVd 的一种检测方法 (EPPO, 2004)，但其在以 DIG 标记的 cRNA 探针、用 Shamloul 等 (1997) 引物的两步常规 RT-PCR 和 Boonham 等 (2004) 的实时方法所做的环形试验中，灵敏度 (检测极限 (LOD) 87 893 pg PSTVd) 比接受评估的其他分子方法 (LOD 至少为 17 pg PSTVd) 低 (Jeffries & James, 2005; 同样见表 1)。

本方法已成功用于其他寄主植物；例如辣椒、马铃薯 (块茎) 和番茄。由于其灵敏度低，需要混合样品来进行验证。

R-PAGE 能检测出所有已知的马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒；因此，为了鉴定 PSTVd，必须对核酸进行 RT-PCR，并对 PCR 产物进行测序。

#### 3.3.3.2 用 DIG 标记的 cRNA 探针杂交

本方法被推荐用于检测侵染马铃薯叶片的 PSTVd (EPPO, 2004)。对马铃薯叶片中 PSTVd 的检测灵敏度至少为 17 pg PSTVd (Jeffries & James, 2005)。还成功检测过其他寄主，包含矮牵牛属、素馨叶白英、番茄和马铃薯 (块茎)。

该探针基于 Agdia, Inc.<sup>9</sup>生产的一个 PSTVd 全长度单体（编号 DLP 08000/0001）。探针应按照生产商的说明使用，或参考 EPPO（2004）有关本方法的详细信息。除 Ames 缓冲液（EPPO，2004）外，聚乙二醇（PEG）和其他提取缓冲液也可用于核酸提取。

本 DIG 标记的 cRNA 探针法可检测所有已知的马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒，因此，为鉴定 PSTVd，必须对核酸进行 RT-PCR，并对 PCR 产物进行测序。

### 3.3.3.3 使用 Verhoeven 等（2004）引物的常规 RT-PCR

本检测所用引物是 Verhoeven 等（2004）的 Posp1 和 Vid 引物。Posp1 引物可检测 CEVd、菊矮化类病毒（*Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd)）、IrVd-1、MPVd、PCFVd、PSTVd、TASVd、TCDVd 和 TPMVd。Vid 引物可检测 PSTVd、TCDVd，以及 CLVd。在两个独立的反应中使用 Posp1 和 Vid 引物可检测出所有马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒。然而，引物目标区关键位点的序列匹配错误可能会妨碍对一些马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒分离物的检测（例如，用这些引物未能检测出一个 CLVd 分离物；Steyer 等，2010），因而要使用其他引物来检测这些分离物。计算机模拟研究显示，因为关键位点的引物序列匹配错误，可能无法检测以下 PSTVd 分离物：Posp1 引物：EU879925、EU273604、EF459697、AJ007489、AY372398、AY372394、FM998551、DQ308555、E00278；Vid 引物：EU273604<sup>2</sup>。Posp1 引物在检测 PSTVd 时要比 Vid 引物灵敏得多。

#### 引物

Posp1-正向：5'-GGG ATC CCC GGG GAA AC-3'（核苷酸（nt）86—102）

Posp1-反向：5'-AGC TTC AGT TGT (T/A) TC CAC CGG GT-3'（nt 283—261）

Vid-正向：5'-TTC CTC GGA ACT AAA CTC GTG-3'（nt 355—16）

Vid-反向：5'-CCA ACT GCG GTT CCA AGG G-3'（nt 354—336）

#### 反应条件

已证明 1 步法 RT-PCR 试剂盒（Qiagen）能可靠用于检测单个样品中的 PSTVd、CEVd、CLVd、CSVd、TASVd 和 TCDVd（EUPHRESCO，2010），以及本节起首部分列出的其他马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒。没有必要使用 EUPHRESCO（2010）描述的 Q-溶液。尽管可以采用不同的 RT-PCR 试剂盒和反应条件，还是应使用所有拟检测的相关马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒对其进行验证，以确认它们适用于预期目的。

取 2 ml 模板，加入 23  $\mu$ l 反应混合母液，其中含正向和反向引物（10  $\mu$ M）各 1.0  $\mu$ l、5  $\mu$ l 5 $\times$ 一步法 RT-PCR 缓冲液、1.0  $\mu$ l 一步法 RT-PCR 酶混合液、1.0  $\mu$ l 脱氧

核糖核苷三磷酸 (dNTPs) (每种 dNTP 各 10 mM), 以及 14  $\mu$ l 水。热循环程序如下: 50°C 30 min; 95°C 15 min; 94°C 30 s, 62°C 60 s 和 72°C 60 s, 35 个循环; 以及最后一步 72°C 延伸 7 min。

### 凝胶电泳

RT-PCR 后, PCR 产物 (Pospil 和 Vid 引物分别约为 197 bp 和 359 bp) 应用凝胶电泳 (2% 琼脂糖凝胶) 进行分析, 并对大小正确的 PCR 扩增子进行测序, 以确定类病毒种类。在实际工作中, 对 197 bp 产物进行测序总会获得与类病毒全基因测序相同的鉴定结果。

#### 3.3.3.4 使用 GenPospil 检测的实时 RT-PCR (Botermans 等, 2013)

GenPospil 检测使用 TaqMan 实时 RT-PCR 来检测马铃薯纺锤形块茎类病毒属各种已知类病毒。它包含平行运行的两个反应: 第一个 (反应混合液 1) 以除 CLVd 之外的所有马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒为目标 (Botermans 等, 2013); 第二个 (反应混合液 2) 则专门以 CLVd 为目标 (Monger 等, 2010)。为了监测 RNA 提取, 引入了一个以 Menzel 等 (2002) 设计的引物为基础的 *nad5* 内对照, 来扩增植物线粒体 mRNA (线粒体 *NADH* 脱氢酶基因)。对番茄叶片的方法验证 (见表 1) 显示, GenPospil 检测能在相对侵染率仅为 0.13% 的情况下 (相当于 1: 770 的稀释比例) 检测出各种已知的马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒分离物。由于未观察到它与其他类病毒、病毒或寄主植物核酸间有交叉反应, 本分析具有特异性。在一项实验室间比较中, 重复性和再现性达 100%, 本分析表现得非常可靠。已证明 GenPospil 检测是对马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒进行大规模筛选的一个适宜工具。对番茄叶片以外的其他基质而言, 本分析仍然需要经过验证。

### 引物

TCR-正向 1-1: 5'-TTC CTG TGG TTC ACA CCT GAC C-3' (Botermans 等, 2013)

TCR-正向 1-3: 5'-CCT GTG GTG CTC ACC TGA CC-3' (Botermans 等, 2013)

TCR-正向 1-4: 5'-CCT GTG GTG CAC TCC TGA CC-3' (Botermans 等, 2013)

TCR-正向 PCFVd: 5'-TGG TGC CTC CCC CGA A-3' (Botermans 等, 2013)

TCR-正向 IrVd: 5'-AAT GGT TGC ACC CCT GAC C-3' (Botermans 等, 2013)

TR-反向 1: 5'-GGA AGG GTG AAA ACC CTG TTT-3' (Botermans 等, 2013)

TR-反向 CEVd: 5'-AGG AAG GAG ACG AGC TCC TGT T-3' (Botermans 等, 2013)

TR-反向 6: 5'-GAA AGG AAG GAT GAA AAT CCT GTT TC-3' (Botermans 等, 2013)

CLVd-正向: 5'-GGT TCA CAC CTG ACC CTG CAG-3' (Monger 等, 2010)

CLVd-正向 2: 5'-AAA CTC GTG GTT CCT GTG GTT-3' (Monger 等, 2010)

CLVd-反向: 5'-CGC TCG GTC TGA GTT GCC-3' (Monger 等, 2010)

*nad5*-正向: 5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3' (Menzel 等, 2002)

*nad5*-反向: 5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3' (Menzel 等, 2002)

### 探针

pUCCR: 6FAM-5'-CCG GGG AAA CCT GGA-3'-MGB (Botermans 等, 2013)

CLVd-P: 6FAM-5'-AGC GGT CTC AGG AGC CCC GG-3'-BHQ1 (Monger 等, 2010)

*nad5*-P: VICr-5'-AGG ATC CGC ATA GCC CTC GAT TTA TGT G-3'-BHQ1 (Botermans 等, 2013)

两种反应混合液均基于 TaqMan RNA to Ct 1 步法试剂盒 (Applied Biosystems)。

### 反应混合液 1 (除 CLVd 外所有马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒+ *nad5*)

反应混合液含 12.5  $\mu$ l 2 $\times$  TaqMan RT-PCR 混合液、0.6  $\mu$ l 1 $\times$  TaqMan RT 酶混合液、0.75  $\mu$ l (10  $\mu$ M) 正向引物 (TCR-正向 1-1、TCR-正向 1-3、TCR-正向 1-4、TCR-正向 IrVd、TCR-正向 PCFVd 和 *nad5*-正向) 与反向引物 (TR-反向 1、TR-反向 CEVd、TR-反向 6 和 *nad5*-反向) (最终浓度分别为 0.3  $\mu$ M), 0.25  $\mu$ l (10  $\mu$ M) TaqMan 探针 pUCCR (最终浓度为 0.1  $\mu$ M), 以及 0.5  $\mu$ l (10  $\mu$ M) TaqMan 探针 *nad5*-P (最终浓度为 0.2  $\mu$ M)。加入分子级水和 2  $\mu$ l RNA 模板, 形成最终容量 25  $\mu$ l。

### 反应混合液 2 (CLVd + *nad5*)

反应混合液含 12.5  $\mu$ l 2 $\times$  TaqMan RT-PCR 混合液、0.6  $\mu$ l of 1 $\times$  TaqMan RT 酶混合液、0.75  $\mu$ l (10  $\mu$ M) 正向引物 (CLVd-正向、CLVd-正向 2 和 *nad5*-正向) 与反向引物 (CLVd-反向和 *nad5*-反向) (最终浓度分别为 0.3  $\mu$ M)、0.25  $\mu$ l (10  $\mu$ M) TaqMan 探针 CLVd-P (最终浓度为 0.1  $\mu$ M), 以及 0.5  $\mu$ l (10  $\mu$ M) TaqMan 探针 *nad5*-P (最终浓度为 0.2  $\mu$ M)。加入分子级水和 2  $\mu$ l RNA 模板, 形成最终容量 25  $\mu$ l。

两种反应混合液的热循环条件均为 48 $^{\circ}$ C 15 min, 95 $^{\circ}$ C 10 min, 继以 40 个循环 (95 $^{\circ}$ C 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 1 min)。

关于本方法, Botermans 等 (2013) 认为 Ct 值 <32 为阳性; 介于 32 和 37 之间为不确定, 需要进一步确认;  $\geq$ 37 为阴性。然而, 这些值可能检测不出一些组织中的低水平感染, 因而需要由各个实验室自行确定。

### 3.3.4 具有较高特异性的 PSTVd 分子检测方法

#### 3.3.4.1 使用 Shamloul 等 (1997) 引物的常规 RT-PCR

本检测所用 RT-PCR 引物由 Shamloul 等 (1997) 设计, Weidemann 和 Buchta (1998) 也做过描述。这些引物可以检测 MPVd、PSTVd、TCDVd 和 TPMVd。计算机模拟研究显示, 因为关键位点的引物序列匹配错误, 可能无法检测以下 PSTVd 分离物: 反向引物时 AY372394、DQ308555、EF459698。如果 RNA 不是使用这些引物进行扩增, 则可使用 Vid 引物。

#### 引物

3H1-正向: 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3' (nt 89-113)

2H1-反向: 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3' (nt 88-69)

#### 方法 1 (使用 *Platinum Taq (Invitrogen)* 的 *SuperScript* 一步法 RT-PCR)

每一反应, 取 1  $\mu$ l 模板 RNA 加入 24  $\mu$ l 反应混合母液, 其中含正向和反向引物 (15  $\mu$ M) 各 1.7  $\mu$ l、12.5  $\mu$ l 2 $\times$ 反应缓冲液、0.5  $\mu$ l RT/Platinum Taq, 以及 7.6  $\mu$ l 水。热循环程序如下: 43 $^{\circ}$ C 30 min; 94 $^{\circ}$ C 2 min; 随后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 90 s 和 72 $^{\circ}$ C 45 s, 10 个循环; 继以 94 $^{\circ}$ C 30 s, 64 $^{\circ}$ C 90 s 和 72 $^{\circ}$ C 45 s, 20 个循环; 以及最后 72 $^{\circ}$ C 10 min 和 20 $^{\circ}$ C 1 min 延伸。

#### 方法 2 (二步法 RT-PCR)

使用二步法 RT-PCR, 对马铃薯中 PSTVd 的检测灵敏度至少为 17 pg PSTVd—可检测的最低浓度, 但不同实验室可达到的灵敏度并不相同, 大多数实验室至少可以检测出 89 pg PSTVd (Jeffries & James, 2005)。有关方法 2 的描述见 EPPO (2004)。

RT-PCR 后, 应按说明对 PCR 产物 (约 360 bp) 进行凝胶电泳分析, 并对大小正确的 PCR 扩增子进行测序, 以确定类病毒种类。

已在一个单一 (独立) 反应中和本方法配合使用过一种以 *nad5* 为引物的内对照分析 (Menzel 等, 2002)。所用引物的最终浓度为 0.2  $\mu$ M。扩增子为 181 bp。

*nad5* 正义链: 5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3' (nt 968-987 和 1836-1838)

*nad5* 反义链: 5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3' (nt 1973-1995)

#### 3.3.4.2 使用 Boonham 等 (2004) 引物的实时 RT-PCR

本检测所用引物和探针由 Boonham 等 (2004) 描述。然而, 本检测方法或其他任何已经发表的实时检测方法都不能对 PSTVd 进行特异性鉴定。如果实时 RT-PCR 获得阳性结果, 还需要通过常规 RT-PCR 和测序来确定类病毒种类。

本检测法可检测 PSTVd、MPVd、TCDVd 和 TPMVd。用 CTAB 提取法从马铃薯中提取时，对 PSTVd 的检测灵敏度最低为 17 pg PSTVd，即检测出的最低浓度（Jeffries & James, 2005）。通过检测 PSTVd 变异株和合成寡核苷酸，已证明本检测方法可检测出所有已知的序列变异。这些变异由计算机模拟研究确定，其引物序列匹配错误可能导致检测失败（Boonham 等，2005）。然而，由于探针结合位点插入了（一个）多余的碱基，可能无法检测出 Owens 等（2009）最近描述的异常分离物 VIR-06/7L 和 VIR-06/10L（W. Monger, 个人通讯，2011）<sup>1</sup>。

### 引物

PSTV-231-正向：5'-GCC CCC TTT GCGCTG T-3'（nt 232—247）

PSTV-296-反向：5'-AAG CGG TTC TCG GGA GCT T-3'（nt 297—279）

PSTV-251T：FAM-5'-CAG TTG TTT CCA CCG GGT AGTAGC CGA-3' TAMRA  
（nt 278—252）

内对照 COX 引物扩增植物线粒体细胞色素氧化酶 1 基因（Weller 等，2000）。

COX-正向：5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'

COX-反向：5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR ACC TG-3'

COXsol-1511T：VIC-5'-AGG GCA TTC CAT CCA GCG TAA GCA-3' TAMRA

反应混合液适用于 96 孔板，是对 EPPO 方法（EPPO，2004）的一个修订，其中包含了可检测 PSTVd 和 COX 的一个复合反应，以及检测 PSTVd 的一个单一反应（Roehorst 等，2005）。

反应混合液含 13.75  $\mu$ l 水、25  $\mu$ l 2 $\times$  反应混合母液（Applied Biosystems）、1.25  $\mu$ l 40 $\times$  MultiScribe 逆转录酶（Applied Biosystems）、PSTV-231-F 和 PSTV-296-R 引物（10  $\mu$ M）各 1.5  $\mu$ l，以及 1.0  $\mu$ l PSTV-251T 探针（5  $\mu$ M）。反应混合液均匀分为容量为 22  $\mu$ l 的两等份，即 A 和 B。A 中加入 2  $\mu$ l 水，B 中加入每种 COX 引物（10  $\mu$ M）各 0.75  $\mu$ l 和 0.5  $\mu$ l COXsol-1511T 探针（5  $\mu$ M）。A 和 B 中各加入 1  $\mu$ l 目标 RNA，使反应板每个孔中的反应混合液最终均为 25  $\mu$ l。使用反应混合液 A 可以检测出 PSTVd，使用反应混合液 B 则可以在一个复合反应中同时检测出 PSTVd 和 COX。

热循环条件为 48 $^{\circ}$ C 30 min；95 $^{\circ}$ C 2 min；95 $^{\circ}$ C 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 1 min，40 个循环。

#### 3.3.4.3 实时 RT-PCR（Plant Print Diagnostics kit）

本检测所用引物和探针由 Bertolini 等（2010）描述，它们作为一个试剂盒可从 Plant Print Diagnostics 购得（编号 PSTVd/100）。本检测可检测 CLVd、PSTVd 和

<sup>1</sup> 截至 2010 年 3 月 1 日（W. Monger, 个人通讯，2011）

TCDVd。计算机模拟研究表明，所有引物序列匹配错误都发生在非关键位点，因此 GenBank 中保存的所有 327 份 PSTVd 分离物应该都可以进行检测（N. Duran-Vila, 个人通讯，2014）。

表 1 提供了验证数据。

### 引物

PSTVd-正向：5'-CCT TGG AAC CGC AGT TGG T-3' (nt 339–357)

PSTVd-反向：5'-TTT CCC CGG GGA TCC C-3' (nt 87–102)

PSTVdP: FAM-5'-TCCTGTGGTTCACACCTGACCTCCTGA-3' TAMRA (nt 19–45)

PCR组合包含冻干的引物和探针（试剂盒中提供），其中可加入任何商业化RT-PCR 反应混合母液。每一反应，取 3  $\mu$ l 模板 RNA，加入 9  $\mu$ l PCR 混合物中，其中含 6  $\mu$ l 商业化 2 $\times$  RT-PCR 缓冲液、正向和反向引物（10  $\mu$ M）各 0.6  $\mu$ l、0.36  $\mu$ l TaqMan 探针（5  $\mu$ M）、0.5  $\mu$ l 25 $\times$  RT-PCR 酶混合液，以及 0.94  $\mu$ l 水，形成最终反应容量 12  $\mu$ l。

热循环条件为 45 $^{\circ}$ C 10 min；95 $^{\circ}$ C 10 min；95 $^{\circ}$ C 15 s 和 60 $^{\circ}$ C 1 min，40 个循环。

使用本方法产生的 Ct 值 $<$ 40 且阴性对照为阴性（无扩增）时，样品可视为阳性。产生的 Ct 值 $\geq$ 40 且阳性对照有扩增时，样品可视为阴性。

### 3.4 分子检测的对照

为了获得可靠的检测结果，取决于所使用的检测类型和所要求的确定性水平，应考虑为每一组核酸分离物、目标有害生物或目标核酸扩增物设置适宜的对照。对 RT-PCR 而言，最少应使用一个阳性核酸对照、一个内对照，以及一个阴性扩增对照（无模板对照）。

**阳性核酸对照** 本对照用于监测检测方法（不包括提取）的效率。可使用预先制备（储存）的类病毒核酸、全基因扩增 DNA，或使用与检测所用引物相同的引物对生成一个合成对照（例如克隆的 PCR 产物）。也可使用一个检测对照限量（非必须）。

**内对照** 对常规和实时 RT-PCR 而言，RT-PCR 规程应包含诸如 COX 或 NAD 的一个植物管家基因（HKG），以排除因核酸提取失败或降解，或存在 PCR 抑制剂而可能引起的假阴性。内对照引物最好应在一个复合反应中和马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒/PSTVd 引物一起使用。然而，由于可能难以在不降低类病毒检测灵敏度的情况下做到这一点，建议在可行的情况下运行马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒/PSTVd 引物和 HKG 引物的复合反应，以及只有马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒/PSTVd 引物的单一反应。

已证明 *nad5* 线粒体 NADH 脱氢酶 5 基因片段是判断提取程序和常规 RT-PCR 的 RT 步骤的效果的可靠指标（Menzel 等，2002）。这一点已经很多种植物测试，包含



马铃薯和其他多种茄属植物 (*S. bonariensis*、欧白英 (*S. dulcamara*)、素馨叶白英、龙葵 (*S. nigrum*)、珊瑚樱 (*S. pseudocapsicum*)、蓝花茄 (*S. rantonnetii*) 和拟刺茄 (*S. sisymbriifolium*))、巴西野烟 (*Acnistus arborescens*)、颠茄 (*Atropa belladonna*)、木曼陀罗属、辣椒属 (*Capsicum* spp.)、夜香树属、*Lochroma cyanea*、烟草属 (*Nicotiana* spp.) 和酸浆属 (*Physalis* spp.) (Seigner 等, 2008)。nad5 引物含有一个内含子, 因此不能从 DNA 扩增。内含子切除后就可以扩增出 RNA。

尽管 COX 在本规程中被用作一个内对照, 但 COX 引物可以扩增 RNA 和 DNA。因此, 它只能作为可扩增的 DNA 而非仅仅是 RNA 的质量指标, 因此不能控制 RT 步骤。

当一种 PCR 方法的说明未提及内对照 COX 或 nad5 时, 实验室应选择一种内对照并对其进行验证。

**阴性扩增对照 (无模板对照)** 常规和实时 RT-PCR 有必要设置本对照, 以排除反应混合液制备过程中污染引起的假阳性。在扩增阶段加入制备反应混合液所使用的 PCR 级水。

**阳性提取对照** 本对照用于确保所提取的目标类病毒核酸的数量和质量可以满足 RT-PCR 的需要, 从而能检测到目标类病毒。类病毒核酸提取自受侵染的寄主组织或用类病毒接种过的健康植物组织。

阳性对照应约为每株植物用于 RNA 提取的叶片组织数量的 1/10。如果对样品进行了混合, 应相应调整阳性对照的数量 (例如 10 批次 20 mg 的样品混合用于提取 RNA, 2 mg 受侵染叶片+ 198 mg 健康马铃薯组织)。如果这种情况下未能检测到, 应重新进行检测或降低混合比例, 直至获得可靠的检测。

对 RT-PCR 而言, 应注意避免由阳性对照或阳性样品的气雾引起的交叉污染。应对实验室所用的阳性对照进行测序, 以便对该序列和从大小正确的 PCR 扩增子获取的序列作出比较。或者, 可以合成已知序列的阳性对照, 该对照同样可以与大小正确的 PCR 扩增子进行比较。

**阴性提取对照** 本对照用于监测核酸提取过程中的污染和/或与寄主组织的交叉反应。本对照包含提取自未受侵染的寄主组织, 并随后进行扩增的核酸。预期有大量阳性样品时, 建议引入多重对照。

### 3.5 常规和实时 RT-PCR 结果的解释

#### 3.5.1 常规 RT-PCR

类病毒特异性 PCR 可判为有效，如果：

- 阳性核酸对照产生该类病毒大小正确的产物；且
- 阴性提取物对照和阴性扩增对照中未产生该类病毒大小正确的扩增子。

如同时使用了 COX 和/或 *nad5* 内对照引物，则阴性（健康植物组织）对照（如有使用）、阳性核酸对照，以及每个检测样品都要产生一个 181 bp 的条带（*nad5*）。样品使用内对照引物不能扩增样品则说明，例如，核酸提取失败、反应混合液不含核酸、RT 步骤失败、核酸提取物中有抑制 PCR 的化合物存在，或核酸已经降解。

一个样品可判为阳性，如果它产生大小正确的扩增子。为鉴定类病毒种类，必须对 PCR 产物测序。

#### 3.5.2 实时 RT-PCR

实时 RT-PCR 可判为有效，如果：

- 阳性核酸对照可使用类病毒特异性引物产生一条扩增曲线；且
- 阴性提取物对照和阴性扩增对照未见扩增曲线（即 Ct 值为 40 或实验室验证后确定的其他 Ct 值）。

如果同时使用了 COX 和 *nad5* 内对照引物，则阴性对照（如有使用）、阳性核酸对照，以及每个检测样品都要产生一条扩增曲线。样品使用内对照引物不能产生一条扩增曲线则说明，例如，核酸提取失败、反应混合液不含核酸、核酸提取物中有抑制 PCR 的化合物存在，或核酸已经降解。

一个样品可判为阳性，如果它产生一条典型的扩增曲线。3.3.3.4 和 3.3.4.3 节提供了有关两种方法 Ct 临界值的具体信息。

## 4. 鉴定

根据 3.3.4.1 和 3.3.3.3 节的描述，通过使用 Shamloul 或 Vid 引物的常规 RT-PCR 方法获得的产物应分别进行测序，并在公开的基因序列数据库中找到一个匹配序列来鉴定 PSTVd。可能需要由序列分析专家来协助鉴定。如果 PCR 产物扩增得很少，或者样品被一种以上马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒侵染，对 PCR 产物进行克隆可有效保证能够获得一个序列。

如需确认，一个由实时 RT-PCR 检测出的阳性样品应使用常规 RT-PCR 重新进行检测，以确保对产物进行测序和鉴定。实时 RT-PCR 产物直接测序产生的序列信息不能保证作出可靠的鉴定。它可将 PCR 产物鉴定为一种类病毒，但不能鉴定到种，

也不能与所用的阳性对照相区分。然而，由于实时 RT-PCR 的灵敏度越来越高，一种产物可能无需通过常规 RT-PCR 获得。在对样品进行混合的情况下，重新检测更小的子样品可能会提高常规 RT-PCR 扩增的可靠性。或者，可以将样品接种到番茄植株上，使叶片中类病毒的浓度提高到常规 RT-PCR 可以检测到的水平。然而，该方法尚未经过评估，如果结果不具确定性，则可能需要重新进行取样和检测。

#### 4.1 测序与序列分析

序列分析只能由富有经验的人员来完成。如果没有进行内部测序的设备，应使用一个商业化公司。该公司会明确提出他们对 PCR 产物进行测序的要求。将纯化后的产物（以及必要的正向和反向引物）交由公司测序。如有要求，一些公司也可能对产物进行纯化。

如果测序在内部进行，则应建立并遵循测序方法。应使用 PCR 引物作为测序引物，对 PCR 产物的每一单链进行测序。两个独立测序的 DNA 单链（来自正向和反向引物）应组装成一个整体，以确认对每一个核苷酸位点的识别。最好使用基因组组装软件（例如 Geneious、CLC Genomics Workbench 或 Lasergene 软件）对电泳图谱（跟踪文件）进行分析。两条单链间不一致的部分应在序列编辑时标记为不确定的碱基对。编辑后的一致序列（通过比较两条单链来确定）随后可以与相关数据库中马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒的序列进行比对。在复合侵染的情况下，色谱可能无法读取，需对 PCR 产物进行克隆和测序。

在只有少数几个核苷酸差异对将类病毒鉴定为限定或非限定有害生物具有关键作用的情况下，需要对马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒进行认真的比较。对 PSTVd 进行最初鉴定时，可以保留一致序列中的引物序列（Shamloul 或 Vid 引物），这是由于这些引物位于类病毒基因组中最保守的区域，不太可能影响鉴定。如有发现，就必须切割掉延伸阶段通过聚合酶植入的 A-悬垂片段。为了鉴定，建议使用始于类病毒基因组位点 1 的编辑后的一致序列，与一个综合性核酸数据库进行比较。应使用基本的局部相似性比对搜索工具（BLAST），在国家生物技术信息中心（NCBI）网站的 GenBank 去冗余核苷酸数据库或欧洲分子生物学实验室（EMBL）的欧洲核苷酸档案中进行搜索。另外，鉴定应基于树状视图中特异性簇状 BLAST 相似性片段（邻接法）。

根据国际病毒分类委员会（ICTV）规则，种鉴定的主要标准是序列一致性要在 90% 以上（Owens 等，2011）。然而，如果所获得的序列表现出接近 90% 的一致性，则应考虑生物学特性等更多参数。ICTV 类病毒研究组目前正在讨论类病毒分类和界定种的标准。

当要求 100% 的序列准确度时，例如一个序列要提交到数据库或怀疑是一个类病毒新种时，有必要进行第二次 PCR。此 PCR 应涵盖首次 PCR 所用引物序列的区域，以及首次 PCR 中任何不确定的碱基对。为此目的，可能需要设计从最初序列开始的一对新引物，但使用 Shamloul 和 Vid 引物对也可能能够满足需要。

## 5. 记录

应按照 ISPM 27（限定有害生物诊断规程）的要求保存记录和证据。

在其他缔约方可能受到诊断结果影响的情况下，特别是在违规或一个地区首次发现 PSTVd 时，应妥善保存以下其他材料，以保持完整的可追溯性：

- 最初的样品（如果仍然存在）应在  $-80^{\circ}\text{C}$  下冷冻保存，或冻干后在室温下保存。
- 如有必要，RNA 提取物应在  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存
- 如有必要，RT-PCR 扩增产物应在  $-20^{\circ}\text{C}$  至  $-80^{\circ}\text{C}$  下保存
- 用于生成样品鉴定所用一致序列的 DNA 序列跟踪文件。

如果分离物表现出与此前已有记录的分离物不同的分子或生物学特性，应将其提交给一个公认的植物有害生物库/档案（例如 Q-bank（检疫性植物有害生物综合数据库 (Comprehensive Database on Quarantine Plant Pests and Diseases)）、DSMZ (Leibniz 研究所—德国微生物与细胞培养物保藏中心 (Leibniz Institute-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) ) )。

如有证据表明任何所描述的检测方法不能检测出一种 PSTVd 分离物，应将该分离物的详细情况（最好有 GenBank 序列号）提交给国际植物保护公约秘书处。

## 6. 获取进一步信息的联系点

有关本诊断规程的进一步信息可获自：

苏格兰农业科学与咨询研究院（SASA），英国苏格兰爱丁堡 EH12 9FJ，Roddinglaw 路（C.J. Jeffries 博士，电子邮件：[colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk](mailto:colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk)）。

国家植物保护机构，荷兰瓦赫宁根 6700 HC，邮政信箱 9102（J.W. Roenhorst 博士，电子邮件：[j.w.roenhorst@nvwa.nl](mailto:j.w.roenhorst@nvwa.nl)；J.Th.J. Verhoeven 博士，电子邮件：[j.th.j.verhoeven@nvwa.nl](mailto:j.th.j.verhoeven@nvwa.nl)）。

环境与初级产业部生物科学研究处农业生物组，澳大利亚维多利亚州 3083，Bundoora 区 La Trobe 大学 5 Ring 路（B. Rodoni 博士，电子邮件：[brendan.rodoni@depi.vic.gov.au](mailto:brendan.rodoni@depi.vic.gov.au)）。

加拿大食品检验局（CFIA）夏洛特镇实验室，加拿大 C1A 5T1，爱德华王子岛夏洛特镇 Mt Edward 路 93 号（H. Xu 博士，电子邮件：[huimin.xu@inspection.gc.ca](mailto:huimin.xu@inspection.gc.ca)）。

Conselleria de Agricultura de la Generalitat Valenciana, Centro de Proteccion Vegetal y Biotecnologia (IVIA), 46113 Moncada (Valencia), Spain (N. Duran-Vila 博士，电子邮件：[duran\\_nur@gva.es](mailto:duran_nur@gva.es))。

美国农业部动植物检疫局 (USDA-APHIS) 植物种质资源检疫项目 BARC-E, 美国马里兰州 20705, Beltsville 市 Powder Mill 路 580 号楼 (J.A. Abad 博士, 电子邮件: [jorge.a.abad@aphis.usda.gov](mailto:jorge.a.abad@aphis.usda.gov))。

Laboratorios Biológicos, Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Millán 4703, Montevideo, Uruguay (A. Etchevers 博士, 电子邮件: [anitaetchevers@hotmail.com](mailto:anitaetchevers@hotmail.com))。

国家植物保护机构 (NPPOs)、区域植物保护组织 (RPPOs) 或植物检疫措施委员会 (CPM) 附属机构可通过国际植物保护公约秘书处 ([ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)) 提出对诊断规程进行修订的申请, 此类申请会被转交给诊断规程技术小组 (TPDP)。

## 7. 致谢

本规程第一稿由 C.J. Jeffries (英国苏格兰农业科学与咨询研究院)、J.W. Roenhorst (荷兰国家植物保护机构)、B. Rodoni (澳大利亚环境与初级产业部)、H. Xu (加拿大食品检验局)、N. Duran-Vila (西班牙 IVIA)、A. Etchevers (乌拉圭 Laboratorios Biológicos) 和 J.A. Abad (美国农业部动植物检疫局) 起草 (详细的联系信息见 6 节)。另外, J.Th.J. Verhoeven (荷兰国家植物保护机构) 深度参与了本规程的制订工作。

感谢 S.L. Nielsen (丹麦), L. Seigner、S. Winter 与 M. Wassenegger (德国), H. Koenraad (荷兰), 以及 A. Fox, T. James、W. Monger 和 V. Mulholland (英国) 在本规程制订过程中提出了建设性建议。

## 8. 参考文献

本标准同时引用了其他国际植物检疫措施标准 (ISPMs)。ISPMs 可从国际植物检疫门户网站 (IPP) 获取: <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispm>。

**Badilla, R., Hammond, R. & Rivera, C.** 1999. First report of Potato spindle tuber viroid in Costa Rica. *Plant Disease*, 83: 1072.

**Bertolini, E., Cambra, M., Serra, P., López, M.M., Lopes, S., Durán-Vila, N., Ayres, J., Bové, J.** 2010. Procedimiento directo de detección específica de los viroides *Potato spindle tuber viroid* y *Citrus exocortis viroid* mediante dianas inmovilizadas y RT-PCR a tiempo real y kit para su detección. Spanish Patent N° 2.387.172.

**Bertolini, E., Felipe, R.T.A., Sauer, A.V., Lopes, S., Arilla, A., Vidal, E., Mourão-Filho, F.A.A., Nunes, W.M.C., Bové, J.M., López, M.M. & Cambra, M.** 2014a. Tissue-print and squash real-time polymerase chain reaction for direct detection of 'Candidatus Liberibacter' species in citrus plants and psyllid vectors. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12197.

**Bertolini, E., Moreno, A., Capote, N., Olmos, A., De Luis, A., Vidal, E., Pérez-Panadés, J. & Cambra, M.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in plant tissues and single aphids by real-time PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177–188.

- Bertolini, E., Teresani, G.R., Loiseau, M., Tanaka, F.A.O., Barbé, S., Martínez, C., Gentit, P., López, M.M. & Cambra, M.** 2014b. Transmission of ‘*Candidatus Liberibacter solanacearum*’ in carrot seeds. *Plant Pathology*, doi:10.1111/ppa.12245.
- Boonham, N., Fisher, T. & Mumford R.A.** 2005. Investigating the specificity of real-time PCR assays using synthetic oligonucleotides. *Journal of Virological Methods*, 130: 30–35.
- Boonham, N., González, L., Lilia Peralta, E., Blockley, A., Walsh, K., Barker, I. & Mumford, R.A.** 2004. Development of a real-time RT-PCR assay for the detection of *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd). *Journal of Virological Methods*, 116: 139–146.
- Botermans, M., van de Vossenbergh, B.T.L.H., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hoofman, M., Dekter, R. & Meekes, E.T.M.** 2013. Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 187: 43–50.
- CABI.** n.d. Invasive species compendium. Datasheet for Potato spindle tuber viroid. Wallingford, UK, CABI. Available at <http://www.cabi.org/isc/datasheet/43659> (last accessed 18 August 2014).
- De Bokx, J.A. & Pirone, P.G.** 1981. Transmission of Potato spindle tuber viroid by aphids. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 87: 31–34.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization).2004. Diagnostic protocols for regulated pests. PM 7/33. Potato spindle tuber viroid. *EPPO Bulletin*.
- EPPO** (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2006. Phytosanitary procedures. PM 3/21 (2). Post-entry quarantine for potato. *EPPO Bulletin*, 34: 443-454.
- EPPO.** (European and Mediterranean Plant Protection Organization).2014. PM 7/98 (2) Specific requirements for laboratories preparing accreditation for a plant pest diagnostic activity. *EPPO Bulletin*, 44: 117-147.
- EPPO/CABI** (I.M. Smith, D.G. McNamara, P.R. Scott & M. Holderness, eds).1997. *Quarantine pests for Europe*, 2nd edn. Wallingford, UK, CABI. 1425 pp.
- EUPHRESKO.** 2010.*Detection and epidemiology of pospiviroids (DEP)*. EUPHRESKO Final Report. York, UK, EUPHRESKO. Available at <http://www.euphresco.org/downloadFile.cfm?id=536> (last accessed 15 May 2013).
- Fernow, K.H.** 1967. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus. *Phytopathology*, 57: 1347–1352.
- Fernow, K.H., Peterson, L.C. & Plaisted, R.L.** 1970. Spindle tuber virus in seeds and pollen of infected plants. *American Potato Journal*,47: 75–80.
- Galindo, J., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1982. Etiology of planta macho, a viroid disease of tomato. *Phytopathology*, 72: 49–54.
- Grasmick, M.E. & Slack, S.A.** 1985. Symptom expression enhanced and low concentrations of potato spindle tuber viroid amplified in tomato with high light intensity and temperature. *Plant Disease*, 69: 49–51.
- Hadidi, A., Mazyad, H.M., Madkour, M.A. & Bar-Joseph, M.** 2003. Viroids in the Middle East. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 275–278. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.

- Hailstones, D.L., Tesoriero, L.A., Terras, M.A. & Dephoff, C.** 2003. Detection and eradication of *Potato spindle tuber viroid* in tomatoes in commercial production in New South Wales, Australia. *Australasian Plant Pathology*, 32: 317–318.
- Hammond, R.W. & Owens, R.A.** 2006. Viroids: New and continuing risks for horticultural and agricultural crops. APSnet. St Paul, MN, American Phytopathological Society (APS). Available at <http://www.apsnet.org/publications/apsnetfeatures/Pages/Viroids.aspx> (last accessed 20 December 2012).
- Jeffries, C.** 1998. *Technical guidelines for the safe movement of germplasm*. No.19. Potato. Rome, FAO/IPGRI. 177 pp.
- Jeffries, C. & James, C.** 2005. Development of an EU protocol for the detection and diagnosis of *Potato spindle tuber pospiviroid*. *EPPO Bulletin*, 35:125–132.
- Kryczynski, S., Paduch-cichal, E. & Skrzeczkowski, L.J.** 1988. Transmission of three viroids by seed and pollen of tomato plants. *Journal of Phytopathology*, 121: 51–57.
- Lebas, B.S.M., Clover, G.R.G., Ochoa-Corona, F.M., Elliott, D.R., Tang, Z. & Alexander, B.J.R.** 2005. Distribution of *Potato spindle tuber viroid* in New Zealand glasshouse crops of capsicum and tomato. *Australian Plant Pathology*, 34: 129–133.
- Ling, K.S. & Bledsoe, M.E.** 2009. First report of Mexican papita viroid infecting greenhouse tomato in Canada. *Plant Disease*, 93: 839.
- Mackenzie, D.J., McLean, M.A., Mukerji, S. & Green, M.** 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81: 222–226.
- Mackie, A.E., McKirdy, S.J., Rodoni, B. & Kumar, S.** 2002. Potato spindle tuber viroid eradicated in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, 31: 311–312.
- Martinez-Soriano, J.P., Galindo-Alonso, J., Maroon, C.J.M., Yucel, I., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1996. Mexican papita viroid: Putative ancestor of crop viroids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93: 9397–9401.
- Menzel, W., Jelkmann, W. & Maiss, E.** 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with co-amplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81–92.
- Mishra, M.D., Hammond, R.W., Owens, R.A., Smith, D.R. & Diener, T.O.** 1991. Indian bunchy top disease of tomato plants is caused by a distinct strain of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology*, 72: 1781–1785.
- Monger, W., Tomlinson, J., Boonham, N., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I., Molinero-Demilly, V., Tassus, X., Meekes, E., Toonen, M. & Papayiannis, L.** 2010. Development and inter-laboratory evaluation of real-time PCR assays for the detection of pospiviroids. *Journal of Virological Methods*, 169: 207–210.
- Murcia, N., Serra, P., Olmos, A. & Duran-Vila, N.** 2009. A novel hybridization approach for detection of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, 23: 95–102.
- NAK (Dutch General Inspection Service).** 2011. *Pospiviroid: Detection of pospiviroid in potato leaves by real-time RT-PCR*. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).

- Naktuinbouw.** 2012a. *Pospiviroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for pospiviroids in leaves of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Naktuinbouw.** 2012b. *Potato spindle tuber viroid: Real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR) for Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) in leaf material of horticultural crops.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Naktuinbouw.** 2012c. *Potato spindle tuber viroid: Detection of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) and/or Tomato chlorotic dwarf viroid (TCDVd) in tomato seed with real-time RT-PCR (TaqMan RT-PCR).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Navarro B, Silletti M.R, Trisciuzzi, V.N. & Di Serio, F.** 2009. Characterization of Potato spindle tuber viroid infecting tomato in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 91: 723–726.
- Nielsen, S.L., Enkegaard, A., Nicolaisen, M., Kryger, P., Marn, M.V., Pleško, I.M., Kahrer, A. & Gottsberger, R.A.** 2012. No transmission of Potato spindle tuber viroid shown in experiments with thrips (*Frankliniella occidentalis*, *Thrips tabaci*), honey bees (*Apis mellifera*) and bumblebees (*Bombus terrestris*). *European Journal of Plant Pathology*, 133: 505–509.
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013a. *Pospiviroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and preliminary identification of pospiviroids (expect [sic] CLVd) by Posp1-FW/Posp1-RE.* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013b. *Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR assay for detection and identification of CLVd, PSTVd and TCDVd using primers Vid-FW/RE (Verhoeven et al. 2004).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013c. *Potato spindle tuber viroid: Validation of a conventional RT-PCR test for detection and identification of PSTVd, TCDVd, MPVd and TPMVd using primers 2H1/3H1 described by Shamoul et al. (1997).* European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).



- NPPO-NL** (National Reference Centre, National Plant Protection Organization). 2013d. *Pospiviroid: Development and validation of a real-time RT-PCR assay for generic detection of Pospiviroids*. European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO) Database on Diagnostic Expertise. Paris, EPPO. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php?action=filter&taxonomic=Virus&organism=&validationprocess=&method> (last accessed 18 August 2014).
- Owens, R. A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J. W., Sano, T. & Vidalakis, G.** 2011. Viroids. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens & E. J. Lefkowitz, eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 1221–1234. London, Elsevier Academic Press. 1259 pp.
- Owens, R.A., Girsova, N.V., Kromina, K.A., Lee, I.M., Mozhaeva, K.A. & Kastalyeva, T.B.** 2009. Russian isolates of *Potato spindle tuber viroid* exhibit low sequence diversity. *Plant Disease*, 93: 752–759.
- Querci, M., Owens, R.A., Bartolini, I., Lazarte, V. & Salazar, L.F.** 1997. Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *Journal of General Virology*, 78: 1207–1211.
- Reanwarakorn, K., Klinkong, S. & Porsoongnurn, J.** 2011. First report of natural infection of *Pepper chat fruit viroid* in tomato plants in Thailand. *New Disease Reports*, 24: 6.
- Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., De Haan, E.G. & Van den Bovenkamp, G.W.** 2006. Real-time RT-PCR voor grootschalige toetsing van aardappel op het aardappelspindelknolviroïde. *Gewasbescherming*, 37: 198–203 (in Dutch).
- Roenhorst, J.W., Jansen, C.C.C., Kox, L.F.F., de Haan, E.G., van den Bovenkamp, G.W., Boonham, N., Fisher, T. & Mumford, R.A.** 2005. Application of real-time RT-PCR for large-scale testing of potato for Potato spindle tuber pospiviroid. *EPPO Bulletin*, 35: 133–140.
- Salazar, L.F., Querci, M., Bartolini, I. & Lazarte, V.** 1995. Aphid transmission of potato spindle tuber viroid assisted by potato leafroll virus. *Fitopatologia*, 30: 56–58.
- Seigner, L., Kappen, M., Huber, C., Kistler, M. & Köhler, D.** 2008. First trials for transmission of Potato spindle tuber viroid from ornamental Solanaceae to tomato using RT-PCR and an mRNA based internal positive control for detection. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 115: 97–101.
- Shamloul, A.M., Hadidi, A., Zhu, S.F., Singh, R.P. & Sagredo, B.** 1997. Sensitive detection of potato spindle tuber viroid using RT-PCR and identification of a viroid variant naturally infecting pepino plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 89–96.
- Singh, R.P.** 1970. Seed transmission of potato spindle tuber virus in tomato and potato. *American Potato Journal*, 47: 225–227.
- Singh, R.P.** 1973. Experimental host range of the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, 50: 111–123.
- Singh, R.P., Boucher, A. & Somerville, T.H.** 1992. Detection of potato spindle tuber viroid in the pollen and various parts of potato plant pollinated with viroid-infected pollen. *Plant Disease*, 76: 951–953.
- Singh, R.P., Dilworth, A.D., Singh, M. & Babcock, K.M.** 2006. An alkaline solution simplifies nucleic acid preparation for RT-PCR and infectivity assays of viroids from crude sap and spotted membrane. *Journal of Virological Methods*, 132: 204–211.

- Singh, R.P. & Kurz, J.** 1997. RT-PCR analysis of PSTVd aphid transmission in association with PLRV. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 19: 418–424.
- Singh, R.P., Nie, X. & Singh, M.** 1999. Tomato chlorotic dwarf viroid: An evolutionary link in the origin of pospiviroids. *Journal of General Virology*, 80: 2823–2828.
- Singh, R.P., Ready, K.F.M. & Nie, X.** 2003. Viroids on solanaceous species. In A. Hadidi, R. Flores, J.W. Randles & J. Semancik, eds. *Viroids*, pp. 125–133. Melbourne, Australia, CSIRO Publishing. 392 pp.
- Spieker, R. L.** 1996. A viroid from *Brunfelsia undulata* closely related to the *Columnea* latent viroid. *Archives of Virology*, 141: 1823–1832.
- Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T. & Hobden, E.** 2010. *Columnea* latent viroid (CLVd): First report in tomato in France. *Plant Pathology*, 59: 794.
- van Brunshot, S.L., Verhoeven, J.Th.J., Persley, D.M., Geering, A.D.W., Drenth, A. & Thomas, J.E.** 2014. An outbreak of Potato spindle tuber viroid in tomato is linked to imported seed. *European Journal of Plant Pathology*, doi:10.1007/s10658-014-0379-8.
- Verhoeven, J.Th.J.** 2010. *Identification and epidemiology of pospiviroids*. Wageningen University, Wageningen, Netherlands. (Thesis) Available at <http://edepot.wur.nl/137571> (last accessed 20 December 2012).
- Verhoeven, J.Th.J., Hüner, L., Virscek Marn, M., Mavric Plesko, I. & Roenhorst, J.W.** 2010. Mechanical transmission of Potato spindle tuber viroid between plants of *Brugmansia suaveolens*, *Solanum jasminoides*, potatoes and tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 128: 417–421.
- Verhoeven, J.Th.J., Jansen, C.C.C., Willemen, T.M., Kox, L.F.F., Owens, R.A. & Roenhorst, J.W.** 2004. Natural infections of tomato by *Citrus exocortis* viroid, *Columnea* latent viroid, *Potato spindle tuber viroid* and *Tomato chlorotic dwarf viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 823–831.
- Walter, B.** 1987. Tomato apical stunt. In T.O. Diener, ed. *The viroids*, pp. 321–328. New York, Plenum Press. 365 pp.
- Wassenegger, M., Heimes, S. & Sänger, H.L.** 1994. An infectious viroid RNA replicon evolved from an *in vitro*-generated non-infectious viroid deletion mutant via a complementary deletion *in vivo*. *EMBO Journal*, 13: 6172–6177.
- Weidemann, H.L. & Buchta, U.** 1998. A simple and rapid method for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by RT-PCR. *Potato Research*, 41: 1–8.
- Weller, S.A., Elphinstone, J.G., Smith, N.C., Boonham, N. & Stead, D.E.** 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2853–2858.

表 1. 用于检测不同类型寄主材料中马铃薯纺锤形块茎类病毒的规程的验证资料概述

基质	样品量	样品制备	核酸提取	检测方法	验证情况
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6 (Bioreba)	在 96 孔 KingFisher 系统 (Thermo Scientific) 上使用 RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) 或 Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics)	实时逆转录多聚酶链式反应 (RT-PCR): GenPospi 检测, Botermans 等 (2013)	<b>检测极限:</b> 在99.7%的确定性下, 对用健康番茄稀释后的受侵染番茄叶片中各种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒的检测可达到 0.13%的相对侵染率 <sup>1</sup> (等于 770 倍稀释) <b>分析特异性:</b> 对各种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒具有高度特异性 <b>选择性:</b> 番茄叶片无影响 <b>重复性和再现性:</b> 100% (Naktuinbouw, 2012a; Botermans 等, 2013; NPPO-NL, 2013d)
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	实时 RT-PCR: Boonham 等 (2004)	<b>检测极限:</b> 可检测用健康番茄稀释 10 000 倍的受侵染番茄叶片 <b>分析特异性:</b> 可检测墨西哥心叶茄类病毒 (MPVd)、马铃薯纺锤形块茎类病毒 (PSTVd)、番茄萎黄矮化类病毒 (TCDVd)、番茄整株结节类病毒 (TPMVd) (部分分离物) <b>选择性:</b> 番茄叶片无影响 <b>重复性和再现性:</b> 100% (Naktuinbouw, 2012b)
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Posp11–正向/Pospi1–反向引物, Verhoeven 等 (2004)	<b>检测极限:</b> 对用健康番茄稀释后的受侵染番茄叶片中各种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒 (金鱼花潜隐类病毒 (CLVd) 除外) 的检测最低可达到 2.5%的相对侵染率 <b>分析特异性:</b> 可检测啤酒花潜隐类病毒 ( <i>Hop latent viroid</i> (HpLVd)), 椰子死亡类病毒属 ( <i>Cocadviroid</i> ) 和 PSTVd <b>选择性:</b> 番茄叶片无影响 <b>重复性和再现性:</b> 100% (NPPO-NL, 2013a)
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Vid-正向/Vid-反向引物, Verhoeven 等 (2004)	<b>检测极限:</b> 对用健康番茄稀释后的受侵染番茄叶片中 CLVd、PSTVd 和 TCDVd 的检测最低可达到 100%的相对侵染率 (CLVd*为 10%) * 引物最初设计用于和 Posp11–正向/Pospi1–反向 RT-PCR 配套用于检测 CLVd (Verhoeven 等, 2004) <b>分析特异性:</b> 可检测 CLVd、PSTVd 和 TCDVd <b>选择性:</b> 番茄叶片无影响 <b>重复性和再现性:</b> 100% (NPPO-NL, 2013b)

基质	样品量	样品制备	核酸提取	检测方法	验证情况
番茄叶片	1 g	3.5 ml (1:2–1:5(w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	RT-PCR: Shamloul 等 (1997)	<b>检测极限:</b> 对用健康番茄稀释后的受感染番茄叶片的检测最低可达到 10% 的相对感染率 <b>分析特异性:</b> 可检测 MPVd、PSTVd、TCDVd、TPMVd (部分分离物) <b>选择性:</b> 番茄叶片无影响 <b>重复性和再现性:</b> 100% (NPPO-NL, 2013c)
番茄种子	3 000 粒种子 (1 000 粒检测 3 次)	20 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 BagMixer (Interscience)	在 96 孔 KingFisher 系统上使用 Sbeadex maxi plant kit	实时 RT-PCR: Boonham 等 (2004)	效果特性分析同番茄叶片 对各含 1 000 粒种子的 3 个子样品进行检测时, 在 1 个 1 000 粒种子的样品中检测出 1 粒受感染种子的概率 >95%。由于在种子处理过程 (使用发酵和果胶酶处理) 中 PSTVd 可很快从受感染果实对健康种子产生交叉污染, 一个样品中很可能存在更多的受污染种子 (Naktuinbouw, 2012c)
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管植株	200 mg	20 μL 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS)、180 μL 氯化锂提取缓冲液、400 μL 苯酚-氯仿, 以及研钵研杵	苯酚-氯仿和两步法聚乙二醇 (PEG) 提取	双向往返 (R) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) <sup>2</sup>	<b>检测极限:</b> 2 465 pg PSTVd; 这是本分子方法在一项国际环形试验中的最低灵敏度 <b>分析特异性:</b> 可检测已知各种马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒 <b>选择性:</b> 马铃薯品种、马铃薯叶片或试管植株无影响 <b>重复性和再现性:</b> 再现性在 87 893 pg PSTVd (检测的最高 PSTVd 浓度) 时为 51%, 在检测极限时为 42%
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管植株	200 mg	1:1.5 (w/v) Ames 缓冲液 (EPPO, 2004) 和研钵研杵	薄膜 (Agdia, Inc.) 固定苯酚-氯仿和两步法聚乙二醇 (PEG) 提取	Digoxigenin (DIG) 探针 <sup>2</sup>	<b>检测极限:</b> 最少 17 pg PSTVd (检测的最低浓度) <b>分析特异性:</b> 可检测各种已知的马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒 <b>选择性:</b> 马铃薯品种、马铃薯叶片或试管植株无影响 <b>重复性和再现性:</b> 再现性在 87 893 pg PSTVd 时为 100%, 在 17 pg PSTVd 时为 23%
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管植株	50–500 mg	1:9 (w/v) RH 缓冲液 (Qiagen)、微型离心管, 以及微型小杵或 Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	使用 Shamloul 等 (1997) 引物的两步法 <sup>2</sup> 常规 RT-PCR	<b>检测极限:</b> 最少 17 pg PSTVd <b>分析特异性:</b> 可检测 MPVd、PSTVd、TCDVd 和 TPMVd <b>选择性:</b> 马铃薯品种、马铃薯叶片或试管植株无影响 <b>重复性和再现性:</b> 再现性在 87 893 pg PSTVd (检测的最高 PSTVd 浓度) 时为 78%, 在 17 pg PSTVd 时为 44%
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管植株	1 g	3.5 ml (1:2–1:5(w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	在 96 孔 KingFisher 系统上使用 Sbeadex maxi plant kit	实时 RT-PCR: GenPospi 检测, Botermans 等 (2013)	效果特性分析同番茄叶片 <b>分析特异性:</b> 和马铃薯中常发生的病毒没有交叉反应 <b>选择性:</b> 马铃薯叶片和试管植株无影响 对高达 100 的混合比例进行过验证 (在 1 片受感染叶片和 99 片健康叶片构成的样品中检出率达 100%; NAK, 2011)

基质	样品量	样品制备	核酸提取	检测方法	验证情况
马铃薯叶片 (生长室生长) 及马铃薯试管 植株	1.5 g 叶片或 5 g 块茎	叶片使用约 600 µl 缓冲液, 块茎使用约 3 ml 缓冲液 (缓冲液的 选择取决于所使用的 提取方法)	RNeasy Plant Mini Kit, 十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 提取, 或 Purescript RNA 分离试剂 盒 (Gentra Systems; 注 意本试剂盒不再有售)	实时 RT-PCR: Boonham 等 (2004)	<b>检测极限:</b> 可检测用健康组织稀释 10 000 倍的受感染组织 <b>分析特异性:</b> 可检测 MPVd、PSTVd、TCDVd、TPMVd (部分分离物); 和马铃薯 中常发生的病毒无交叉反应 <b>选择性:</b> 马铃薯叶片、试管植株或块茎无影响 <b>重复性和再现性:</b> 100% (四个实验室的环形试验) 对高达 100 的混合比例进行过验证 (在 1 片受感染叶片和 99 片健康叶片构成的样 品中检出率达 100%; Roenhorst 等, 2005, 2006)
各种观赏植物 (叶片)	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	在 96 孔 KingFisher 系统 上使用 RNeasy Plant Mini Kit 或 Sbeadex maxi plant kit	实时 RT-PCR: GenPospi 检测, Botermans 等 (2013)	效果特性分析同番茄叶片 <b>分析灵敏度:</b> 叶片汁液中马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒的浓度和选择性 (抑制 性化合物) 取决于植物种类 混合比例达 25 时对木曼陀罗属、小矮牵牛花属、夜香树属、大丽花属 ( <i>Dahlia</i> )、 金鱼草属 ( <i>Nematanthus</i> )、矮牵牛属、素馨叶白英和果酱木进行过验证。值得注意的是, 对小矮牵牛花属、素馨叶白英和果酱木而言, 稀释倍数超过 100 时仍能 观察到效果。对一些作物而言, 例如大丽花属, 似乎只有夏季适于进行 (可靠) 检 测 (Naktuinbouw, 2012a)。
各种观赏植物 (叶片)	1 g	3.5 ml (1:2–1:5 (w/v)) GH plus 裂解缓冲液和 Homex 6	在 96 孔 KingFisher 系统 上使用 RNeasy Plant Mini Kit 或 Sbeadex maxi plant kit	实时 RT-PCR: Boonham 等 (2004)	效果特性分析同番茄叶片 <b>分析灵敏度:</b> 叶片汁液中马铃薯纺锤形块茎类病毒属类病毒的浓度和选择性 (抑制 性化合物) 取决于植物种类 混合比例达 25 时对木曼陀罗属、小矮牵牛花属、大丽花属、矮牵牛属、素馨叶白 英和果酱木进行过验证。值得注意的是, 对小矮牵牛花属、素馨叶白英和果酱木基 质而言, 稀释倍数超过 100 时仍能观察到效果。对一些作物而言, 例如大丽花属, 似乎只有夏季适于进行 (可靠) 检测 (Naktuinbouw, 2012b)。

基质	样品量	样品制备	核酸提取	检测方法	验证情况
番茄叶片, 马铃薯叶片、块茎和种子, 以及各种观赏植物 (叶片)	1 g 叶片, 或尼龙薄膜上马铃薯块茎或叶片挤压物	10 ml (1:10 (w/v)) 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和 Homex 6	直接方法 (组织挤压), RNeasy Plant Mini Kit 或 PowerPlant RNA 提取试剂盒 (Mo Bio)	实时 RT-PCR: Bertolini 等 (2010)	<p><b>检测极限:</b> 可检测用素馨叶白英和番茄健康叶片稀释 10 000 倍的受感染素馨叶白英叶片</p> <p><b>分析特异性:</b> 可检测 CLVd、PSTVd 和 TCDVd</p> <p><b>选择性:</b> 马铃薯叶片、块茎或番茄种子无影响</p> <p><b>重复性和再现性:</b> 100% (3 个实验室的环形试验)</p> <p>检测灵敏度为 100%, 检测特异性为 100%, 和一种分子杂交方法 (Murcia <i>et al.</i>, 2009) 相比的相对准确度为 100%。对 208 个素馨叶白英、木曼陀罗属、曼陀罗属、矮牵牛属、菊属 (<i>Dendrathera</i> spp.)、马铃薯和番茄的大田样品进行过检测验证。在 208 个样品中, 两种技术均是 43 个真阳性, 150 个真阴性。使用杂交方法时, 有 15 个样品为假阳性, 其中检测出番茄顶缩类病毒 (TASVd) 和柑橘裂皮病类病毒 (CEVd)。没有样品为假阴性。</p>

<sup>1</sup> 由于最初检测材料中类病毒浓度未知, 一些检测方法的检测极限 (灵敏度) 以相对值表示。未稀释的叶片汁液视为 100 受感染 (以 1 g 叶片材料: 3 ml 缓冲液的比例)。通过检测健康叶片汁液对受感染叶片汁液的 8 个系列稀释比例的稀释物来确定相对检测极限。相对检测极限定义为可检测出的每个分离物的平均最低相对感染率 (循环阈值 (Ct) <32), 而且增加了 3 个标准差, 以获得确定性达 99.7% 的保守测算 (Botermans 等, 2013)。

<sup>2</sup> R-PAGE、DIG 探针和使用 Shamloul 等 (1997) 引物的两步法常规 RT-PCR 等三种方法在一项国际环形试验中进行过比较 (Jeffries 和 James, 2005)。

### 出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

2007年3月，植检委第二届会议在工作计划中增列了主题（2006-002）

2012年11月，诊断规程技术小组修改了规程草案

2013年3月，标准委通过电子表决程序批准提交成员磋商  
(2013\_eSC\_May\_10)

2013年7月，成员磋商

2014年7月，诊断规程技术小组审查了规程草案

2014年9月，诊断规程技术小组通过电子表决程序批准提交给标准委审议通过（2014\_eTPDP\_September\_01）

2014年11月，标准委通过电子表决程序批准进入诊断规程通报期  
(2014\_eSC\_Nov\_13)

2014年12月，通报期

2015年1月，标准委代表植检委批准诊断规程（未收到正式反对意见）

**ISPM 27, 2006: 附件 7. 马铃薯纺锤形块茎类病毒（2016）。**罗马，国际植物保护公约，粮农组织。

2015年7月，植保公约秘书处整合纳入编辑性修订并依据植检委第十届会议（2015年）的标准撤销程序重新调整了标准格式。

2016年5月，依据所提供的文献参考（Weller等，2000）（“3.3.4.2 使用 Boonham 等（2004）引物的实时 RT-PCR”章节），标准委通过对本诊断规程 COX-F 引物序列内对照的技术修正

（2016\_eSC\_May\_15）。诊断规程技术小组注意到，本诊断规程上一版本的序列以及依据 Weller 等（2000）的当前序列，均有效。

出台背景最后更新：2016年5月。