

本诊断规程于 2016 年 8 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 15: 柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*)

2016 年通过; 2019 年出台

## 目录

1. 有害生物信息 .....	3
2. 分类学信息 .....	4
3. 检测和鉴定 .....	4
3.1 寄主范围 .....	5
3.2 症状 .....	5
3.3 生物学检测 .....	6
3.4 取样以及用于血清学和分子检测的样品制备 .....	7
3.4.1 取样 .....	7
3.4.2 制备组织印迹样品 .....	8
3.4.2.1 制备血清学检测的组织印迹样品 .....	8
3.4.2.2 制备用于分子扩增检测的组织印迹样品和蚜虫压片样品 .....	8
3.4.3 制备用于血清学检测及分子扩增检测的植物提取物 .....	9
3.5 血清学检测 .....	9
3.5.1 直接组织印迹 - ELISA .....	9
3.5.2 双抗夹心 (DAS) - ELISA .....	10
3.6 分子检测 .....	11
3.6.1 RNA 纯化、免疫捕获和 cDNA 合成 .....	11
3.6.1.1 RNA 纯化 .....	11
3.6.1.2 免疫捕获 .....	12
3.6.1.3 cDNA 合成 .....	12

3.6.2	IC-RT-PCR .....	12
3.6.3	独立封闭的离心管内进行免疫捕获巢式 RT-PCR.....	13
3.6.4	RT-PCR 和巢式 RT-PCR 的一般注意事项 .....	13
3.6.5	实时 RT-PCR.....	14
3.6.7	常规和实时 RT-PCR 结果分析 .....	15
3.6.1	分子试验的对照.....	15
3.6.7.1	常规 RT-PCR 和 IC-RT-PCR.....	15
3.6.7.2	实时 RT-PCR .....	16
3.7	通过实验效果研究加以确认 .....	16
4.	强毒力 CTV 株系鉴定 .....	17
4.1	生物学检测 .....	18
4.2	基于使用 MCA13 的血清学检测.....	18
4.2.1	直接组织印迹 ELISA .....	18
4.2.2	DAS-ELISA .....	18
5.	记录.....	18
6.	获取进一步信息的联系点.....	19
7.	致谢 .....	19
8.	参考文献.....	19
9.	图 .....	24

## 1. 有害生物信息

柑橘衰退病毒（*Citrus tristeza virus*, CTV）所引起的衰退病是柑橘生产中危害最为严重的病害之一，该病害的毁灭性流行曾一度改变了柑橘产业的发展进程（Moreno 等，2008）。“tristeza”这一词汇在葡萄牙语中意为悲哀或者忧郁，意指许多柑橘属植物在嫁接到酸橙（*Citrus aurantium*）或柠檬（*Citrus limon*）等砧木上之后所显现的衰退现象。尽管柑橘衰退病主要是一种芽接位病害，但 CTV 某些株系可诱发其它综合症，如引起许多商业栽培品种的茎痘（陷）、矮化、果品产量和质量下降，即便是将这些商业品种嫁接到耐衰退病的砧木上也无法避免。

CTV 可能起源于马来西亚和其它东南亚国家，同时这些地区可能也是柑橘的发源地，之后 CTV 随着带病苗木的运输传播到几乎所有柑橘种植国。最终，蚜虫介体对 CTV 在当地的传播造成了柑橘衰退病的流行。

20 世纪早期，南非首次报道了酸橙砧木的衰退；1930 年代，阿根廷和巴西也发现了此现象，而这可能是由于引入了被橘蚜（*Toxoptera citricida* Kirkaldy, CTV 最有效的传播介体）侵害并携带有 CTV 的苗木所致。CTV 诱发的衰退病已经导致了嫁接在酸橙砧木上的柑橘树的死亡或不结实（Bar-Joseph 等，1989；Cambra 等，2000a）。CTV 曾在美国及一些加勒比海国家或某些地中海沿岸国家（尤其是意大利和摩洛哥）爆发流行。迄今为止，受 CTV 侵染为害的柑橘已超过 1 亿株，其中美洲约为 3800 万株（主要分布于阿根廷、巴西、委内瑞拉和美国的加利福尼亚州）地中海盆地约为 6 000 万株（尤其是西班牙，受损约 5000 万株），其它地区约受损 500 万株。柑橘衰退病可使用耐病砧木进行防控，即便如此，CTV 的某些强毒株系仍可引起一些柑橘品种的茎痘症状。目前，除地中海盆地尚未发现 CTV 强毒株系或强毒株系占主导地位外，CTV 强毒株系存在于全世界大多数柑橘产区，它们的侵染严重损害果品质量和产量。为了防控茎痘病害，一些柑橘生产商采用 CTV 弱毒株系对树木进行预防接种的策略以达到抵御强毒株系侵染的效果，这种方法被称之为交叉保护（Broadbent 等，1991；da Graça and van Vuuren, 2010）。

CTV 是长线形病毒属中基因组最大最复杂的病毒（Moreno 等，2008）。其病毒粒体呈弯曲丝状，长约 2000 纳米、直径约 11 纳米，其中包含一条未分节的正义单链 RNA 基因组。CTV 基因组包含 12 个开放读框（ORFs）和两个非翻译区（UTRs），编码至少 17 个蛋白质。CTV 的两种外壳蛋白为 P27（分子量为 27.4kDa）和 P25（分子量为 24.9kDa），分别由 ORF 7 和 ORF 8 编码。CTV 的多样性远超预估，新基因型产生于祖先群体的分化或者已有株系的重组（Harper 等，2008）。CTV 群体在柑橘树中实际是以准种（quasi-species）的性质存在，它们是由病毒优势基因型和来自于苗木嫁接过程中长期无性增殖的病毒

分离物和蚜传病毒分离物所形成的复杂混合物群体。这就导致了包含序列变异群体的 CTV 分离物的形成，而它们也是 CTV 的主要存在形式（Moreno 等，2008）。

CTV 很容易在实验条件下通过嫁接从带毒植株传播到无毒健康柑橘植株。在自然条件下，CTV 主要通过某些蚜虫以半持久性方式进行传播。最有效的 CTV 传播介体是橘蚜，其主要存在于亚洲、澳大利亚、撒哈拉沙漠南部非洲地区、美洲中部和南部、加勒比海地区、佛罗里达（美国）、西班牙和葡萄牙北部大陆以及马德拉群岛（Ilharco 等，2005；Moreno 等，2008）。然而，在西班牙、以色列和美国加利福尼亚州的部分柑橘种植区以及其它所有没有橘蚜的地区，棉蚜（*Aphis gossypii* Glover）是传播 CTV 的主要介体（Yokomi 等，1989；Cambra 等，2000a；Marroquín 等，2004）。Gottwald 等报道了不同蚜虫种类对于 CTV 传播的影响（Gottwald 等，1997）。除上述两种蚜虫外，其它一些蚜虫种类也可传播 CTV，包括梨绿蚜（*Aphis spiraecola* Patch）、橘二叉蚜（*Toxoptera aurantii*）、桃蚜（*Myzus persicae*）、豆蚜（*Aphis craccivora* Koch）和矢车菊蚜（*Uroleucon jaceae*），尽管它们传播 CTV 的效率在实验条件下不及橘蚜和棉蚜，但充足的群体数量弥补了它们在传播效率上的劣势，使其成为某些地区传播 CTV 的主要蚜虫种类（Marroquín 等，2004）。世界上不同地区都研究了 CTV 在柑橘园中的时空传播模式（Gottwald 等，2002）。这些研究提供的证据解释了从 CTV 初侵染源的引入到柑橘衰退病流行需要较长一段时间的这件事实的原因（Garnsey 和 Lee，1988）

## 2. 分类学信息

- 名称：**柑橘衰退病毒（*Citrus tristeza virus*，英文缩写为 CTV）
- 别名：**衰退病毒（*Tristeza virus*）
- 分类学地位：**长线形病毒科（*Closteroviridae*），长线形病毒属（*Closterovirus*）
- 通用名：**衰退病毒，柑橘衰退病毒

## 3. 检测和鉴定

CTV 的检测可通过生物学、血清学或分子扩增方法来实现（图 1 和图 2）。检测和鉴定 CTV 至少需要用到上述方法之一（例如在 CTV 广泛存在的国家进行有害生物的常规检测）。而在国家植物保护组织（NPPO）需要明确鉴定 CTV 是否存在时（如在衰退病未曾发生的地区或申明来自于不存在 CTV 传播介体的地区的苗木中检测 CTV 时），则需要使用多种方法检测。当用分子扩增方法初步鉴定了 CTV 之后，需要再用血清学方法进行确认，反之亦然。进一步地检测可能需要鉴定所存在的 CTV 株系，在这种情况下，可能需要将聚合酶链式反应（PCR）扩增子进行测序。在所有的

情况下，为使检测结果有效，检测时务必同时加入阳性对照和阴性对照。以上提到的生物学、血清学和分子扩增技术会在下文详细介绍。关于 CTV 株系鉴定的具体流程见于图 2。

在本诊断规程中，根据已发表的文献描述了具体检测方法（包括提到的商品名称）并限定了检测敏感性、特异性和/或者可重复性的原始标准）。在诊断方案中所提到试剂、化学试剂或实验设备的名称并不意味着同意排斥采用其他同样适用的试剂、化学试剂或实验设备等。在经过充分验证的前提下，本规程中的实验室操作步骤也可以调整为独立实验室的标准。

### 3.1 寄主范围

在自然条件下，CTV 容易侵染柑橘属 (*Citrus*) 和金橘属 (*Fortunella*) 的大多数种；此外，芸香科 (*Rutaceae*) 柑橘近缘属中的一些种也是 CTV 的感病寄主，如木橘属 (*Aegle*)、拟硬皮橘属 (*Aeglopsis*)、*Afraegle*、酒饼簕属 (*Atalantia*)、樱桃橘属 (*Citropsis*)、黄皮属 (*Clausena*)、沙橘属 (*Eremocitrus*)、*Hespertusa*、美莉橘属 (*Merrillia*)、指橘属 (*Microcitrus*)、单叶藤橘属 (*Pamburus*)、榆橘属 (*Pleiospermium*) 及菲律宾木桔属 (*Swinglea*) (Duran-Vila and Moreno, 2000; Timmer 等, 2000)。而枳 (*Poncirus trifoliata*) 的大多数无性繁殖苗木和杂交种、金弹 (金橘属) (*Fortunella crassifolia*) 和葡萄柚 (柚子) (*Citrus grandis*) 对很多 CTV 株系都表现出抗性 (Moreno 等, 2008)。因此，在这些植物种中，CTV 的病毒浓度很低甚至完全不能侵染。在自然侵染的条件下，柑橘 (*Citrus reticulata*)、甜橙 (*Citrus sinensis*) 和莱檬 (*Citrus latifolia*) 都属于最易感 CTV 的品种，其次是葡萄柚 (*Citrus paradisi*)、温州蜜柑 (*Citrus unshiu*) 和莱檬的栽培品种。在用作砧木的柑橘品种中，大翼莱檬 (*Citrus macrophylla*)、伏尔卡默 柠檬 (*Citrus volkameriana*)、印度酸橘 (*Citrus reshni*) 和中国柠檬 (黎檬) (*Citrus limonia*) 在自然条件下极易受到 CTV 的侵染，然而卡里佐 (Carrizo) 和 特洛伊 (Troyer) 枳橙 (甜橙和枳的杂交种) 及酸橙 (*C. aurantium*) 却很少受到侵染。枳和枳柚 (*C. paradise* × *P. trifoliata*) 砧木对大多数 CTV 株系表现抗性。细柱西番莲 (*Passiflora gracilis*) 和西番莲 (*Passiflora coerulea*) 在实验条件下可感染 CTV 的非柑橘类寄主植物。

### 3.2 症状

CTV 侵染柑橘属寄主植物后所表现出的症状高度变异，受环境条件、寄主品种以及 CTV 毒力的影响而有很大差异，且可以潜隐多年。CTV 的一些弱毒株系对大多数商品化的柑橘品种及以酸橙为砧木的嫁接柑橘没有明显影响。通常情况下，柑橘对 CTV 的侵染表现出很强的耐受性，甜橙 (*C. sinensis*)、酸橙

（*C. aurantium*）（作为实生苗而非嫁接用的砧木）、粗柠檬（*Citrus jambhiri*）以及藜檬（*C. limonia*）被 CTV 侵染后通常不表现出症状，但可能对一些强毒株系有症状表现。可能有症状表现的柑橘属植物包括酸橙、葡萄柚、一些柚子栽培品种、大翼莱檬、甜橙以及一些柑橘属杂交种和 3.1 中提到的芸香科柑橘属的近缘属种。

依据 CTV 的株系、寄主品种以及接穗-砧木搭配类型的不同，CTV 在寄主植物上不引起症状或者引起三种综合症状中的一种：衰退（*tristeza*）、茎痘（陷点）（*stem pitting*）或实生苗黄化，这三种症状常见于温室培养条件下，下文将对其加以详细描述。图 1 列出了 CTV 引起的主要症状。

CTV 侵染在经济上造成最显著的产量影响之一是衰退（一种芽接病害），表现为嫁接到酸橙或者柠檬上的树势衰退，以酸橙或者柠檬为砧木的甜橙、柑橘和葡萄柚的接穗上也会表现出矮化、褪绿，通常在数月或数年之后死亡（缓慢衰退），有些接穗则在症状显现几天后快速衰退或者坏死。衰退症状的产生是由于 CTV 的侵染影响了嫁接口下部感病砧木韧皮部的生理功能。缓慢衰退的植株通常在嫁接口上方有个凸起，靠近嫁接口的芽上有棕色线条，在酸橙砧木茎皮的内表面有反向针孔陷点（蜂窝裂）。感病寄主上常见的症状包括矮化、杯状叶（*leaf cupping*）、明脉、叶片褪绿、茎痘以及果实变小。但一些病毒分离物侵染多年才可能引起衰退症状，即使在嫁接到酸橙的植株上也是如此，这种现象在地中海沿岸盆地柑橘产业中尤其明显。

强毒 CTV 株系对树木造成严重影响，可引起酸橙、葡萄柚以及甜橙树干和枝条上的茎痘。茎痘有时表现为成年树木树干和主枝上凹凸不平或者有粘稠物，树皮扁平处有深度凹陷，造成果实品质和产量降低。大多数 CTV 株系会对大翼莱檬砧木造成严重影响，砧木上产生茎痘导致树势衰弱。

实生苗黄化症状主要表现是在温室条件（20—26℃）下以酸橙、葡萄柚以及柠檬实生苗为砧木的植株矮化、叶片褪绿或发白、根系受损及生长缓慢。

### 3.3 生物学检测

生物学检测目的是检测引进的植物、选择的植物或者抽样的待检疫植物上是否含有 CTV，以及用墨西哥莱檬（*Citrus aurantifolia*, Mexican）、大翼莱檬（*C. macrophylla*）、葡萄柚（*Citrus paradisi*）（邓肯葡萄柚）的实生苗作为指示植物评估 CTV 分离物的毒力。根据传统方法在标准条件下（Roistacher, 1991）将指示植物嫁接到 4-6 株待检植株上（若没有较多的待测样本，2-3 株亦可）。敏感指示植物上的幼嫩叶片出现明脉、杯状叶或叶片畸形、节间缩短、茎痘或实生苗黄化等症状都是嫁接后被 CTV 侵染的表现。症状表现可与指示植物嫁接到

CTV 阳性和阴性对照植株上的表现作比较。CTV 在指示植物上引起的症状图可参考 Roistacher (1991) 及 Moreno 等 (2008)。

生物学检测广泛应用于认证体系中，据认为是检测病毒新株系或者异常株系灵敏而可靠的方法。但是，该方法也有一些缺点：该方法不是一种快速检测方法（症状在接种后三至六个月的时间才显现），仅用于检测接穗（budwood）；也需要专门的设备条件如可控温和防虫的温室；同时需要专业人员种植能够表现适宜症状、健康而有活力的指示植物，也需要有经验的工作人员能够准确说明观察到的病害症状，与其他一些同样可以通过嫁接传播的病原物所产生的类似症状区分开来。此外，不诱导症状产生的 CTV 株系（潜隐株系）在指示植物上检测不到（例如 Albertini 等 (1988) 描述的 CTV K 株系）。

关于嫁接指示植物（鉴定）进行 CTV 检测、诊断或者鉴定的生物学试验方法的特异性、灵敏度、其它诊断指标以及可信度方面，已有一些发表的数据资料。Cambra 等 (2002) 在欧洲诊断标准项目 (DIAGPRO) 中以及 Vidal 等 (2012) 都比较了直接组织印迹—酶联免疫吸附测定 (ELISA) (3.5.1 节)（使用 3DF1+3CA5 单克隆抗体）和组织印迹—实时反转录 (RT)-PCR (3.6.5 节) 对墨西哥酸橙的生物学检测，结果发现两者都能准确地替代传统生物学检测方法对酸橙上 CTV 的检测。

### 3.4 取样以及用于血清学和分子检测的样品制备

#### 3.4.1 取样

取样方法的通用说明在 ISPM 31（装运货物的取样方法）中有描述，针对 CTV 的取样，在 Cambra 等 (2002) 中也有说明。无论是用生物学、血清学还是分子扩增的方法进行 CTV 的检测和鉴定，正确的取样方法都是至关重要的。改变已接受的取样方法可能会导致在一个有效的诊断规程中产生假阳性和假阴性的结果。成年树木的采样标准是五个嫩枝或者果实-的果梗，或 10 片完全展开叶，或从每棵树树冠周围伸展出的不同枝条上取得的 5 个花或果实。生长在温带地中海气候的甜橙、柑橘、柠檬和葡萄柚（嫩枝或者完全展开叶和花梗）在一年中的任何时段都可以取样，但在热带和亚热带气候，春季和秋季是取样的最适季节，这两个季节取样可以获得高滴度的 CTV。在这样的气候条件下，夏季（温州）蜜橘上 CTV 的滴度下降；因此，建议取样时间是夏季炎热时期（35-40℃）以外的全部生长季。但如有需要，可在炎热时期采集根部样品。花和果实（若可获得）也是合适的取样材料（Cambra 等，2002）。果梗与果实连接处内果皮区域的果梗组织或者轴柱（columela）组织是最适宜的果实样品。苗期植物的标准取样要求是从每棵植株上采集两个嫩枝或者四片叶子。在一年中的任意季节（最好在生长季），可从 CTV 侵染的植株上采集至少一年生的嫩枝或树枝，切取其非芽部位（不带芽的一小部分茎皮）甚至叶片，用于检测的嫩枝或树枝的选择请参考

Roistacher (1991)。

嫩枝、叶柄、果梗和花处理前最多可在 4℃ 保存七天，果实可在 4℃ 保存一个月。如果超过保存期限会导致诊断中 CTV 滴度下降，产生假阴性结果的可能性增加。

作为单一样本检测的混合样品可以一起收集（通常包括取自 1-10 株苗圃植物上的两片叶子或一个嫩枝或者取自每棵成年树木树冠周围的 10 片叶子或者 5 个嫩枝）用于血清学和分子扩增检测。在某些情况下（如在一个国家或者地区已广泛定殖的 CTV 的常规筛检），多株植物的同时检测可用采集自若干植株上的混合样品进行。用血清学或者分子扩增的方法检测单株植物还是混合植物样品取决于待检植物中病毒的浓度，该地区预期的 CTV 发病率（Vidal 等，2012），所用检测方法的检测限点，以及国家植物保护组织所需的置信水平。

蚜虫（新鲜的或者保存于 70% 乙醇中的）可用来单独检测是否含有 CTV。蚜虫可直接从已定殖的种群中收集或诱捕：推荐使用吸入式诱捕器、经典的默里克黄水诱捕器和粘虫板。收集的样本最好用压片（squash）实时 RT-PCR（Bertolini 等，2008）或其它分子扩增方法检测（Marroquín 等，2004）。

### 3.4.2 制备组织印迹样品

#### 3.4.2.1 制备血清学检测的组织印迹样品

将嫩梢、叶柄、果梗和花的子房干净地切下，仔细将新鲜的切片压印在硝酸纤维素膜或者纤维素酯膜（0.45 mm）上，印迹需要干燥 2-5 分钟。对于常规的血清学检测，选择的每个嫩梢（每个枝条的末端）、花梗、每片叶子的叶柄以及花的子房，都需要制备至少两个组织印迹样品。印迹膜可在干燥、黑暗环境中保存数月。

#### 3.4.2.2 制备用于分子扩增检测的组织印迹样品和蚜虫压片样品

采集植物样品时建议用手而非剪刀以避免交叉污染。在树冠周围收集具有完全展开叶或成熟叶的嫩芽。将两片叶或芽的叶柄直接压印在厚 3 mm 的硝酸纤维素膜或 Whatman<sup>1</sup> 3MM 纸（0.45 mm）上或带正电荷的尼龙膜上。按照 Bertolini 等（2008）介绍的方法，在大约 0.5 cm<sup>2</sup> 的滤纸或膜上制备来自不同叶的几个部分重叠的印迹。压印完成后需要将痕迹或印迹干燥 2-5 min。对于常规的分子扩增检测，应对选择的每个叶柄做一个印迹。对于蚜虫则是借助于圆底 Eppendorf 管将单个蚜虫直接压在 Whatman<sup>1</sup> 3MM 纸（0.45 mm）上或带正电荷的尼龙膜上，以使样本（蚜虫）完全破碎（Bertolini 等，2008）。含有印迹或压片的膜可以在干燥、黑暗的环境中保存数月。

---

<sup>1</sup> 在本诊断规程中，各种方法（包括引用的商品名）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/或重现性水平。本诊断规程对试剂、化学品或设备名称的使用，并不意味着对它们的认可，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。



无需制备提取物的，直接的样品制备方法（组织印迹或压片）是简便的样品处理方法，可以作为一种替代传统样品制备方法加以应用（Vidal 等，2012）。

### 3.4.3 制备用于血清学检测及分子扩增检测的植物提取物

为避免样品间的交叉污染，用一次性刀片或消毒处理的剪刀将每份 0.2—0.5 g 的新鲜植物样品切碎，装入合适的管或塑料袋中。用于血清学检测的样品可以置于管或塑料袋中，而用于分子扩增检测的样品则只能放于单独的塑料袋中避免样品间污染。使用电组织匀质器、手动研磨辊、研磨棒或类似的工具，在 4-10 mL (1:20 w/v, 除非仪器制造商另有说明) 提取缓冲液中将样品彻底研磨成匀浆。提取缓冲液为磷酸盐缓冲液 PBS (pH 7.2—7.4; NaCl<sub>2</sub>, 8 g; KCl, 0.2 g; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 2.9 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g; 蒸馏水定容至 1L)，使用前需加入 0.2%的二乙基二硫代氨基甲酸钠 (DIECA) 或 0.2%的巯基乙醇，或其他合适的有效缓冲液。

## 3.5 血清学检测

强烈推荐使用已经验证过的单克隆抗体或多克隆抗体进行 ELISA，以便对大批量的样本进行 CTV 筛选检测和鉴定。针对于 CTV (Vela 等，1986; Permar 等，1990) 和其他一些病毒 (Nikolaeva 等，1996) 所制备的单克隆抗体解决了多克隆抗体在检测过程中出现的非特异性问题 (Cambra 等，2011)，从而增加了血清学检测的灵敏度。两个单克隆抗体 3DF1 和 3CA5 或其重组抗体 (Terrada 等，2000) 的混合物，能够识别来自不同国家地区的样品上所有的 CTV 分离物 (Cambra 等，1990)。这些单克隆抗体的详细说明、特征和验证可参考 Cambra 等 (2000a)。据报道摩洛哥制造的单克隆抗体 4C1 和 1D12 的混合物，可检测广谱的 CTV 株系 (Zebzami 等，1999)，但目前还没有相关的验证数据。

### 3.5.1 直接组织印迹 - ELISA

直接组织印迹—ELISA，也称为免疫印迹 ELISA 或直接组织印迹免疫测定 (DTBIA)，可通过下述方法来完成 (Garnsey 等，1993; Cambra 等，2000b)。基于 CTV 特异性单克隆抗体 3DF1+3CA5 的整套试剂盒 (已在一些性能测试报告和发表的研究中得以验证) (Vela 等，1986)，包括一些阳性和阴性对照的印染膜、试剂、缓冲液和底物，可以从 Plant Print Diagnostics SL<sup>1</sup> 公司购得。另外一个类似的但未经验证的试剂盒是基于 Zebzami 等 (1999) 描述的 C1 和 1D12 抗体制备的 (Zebzami 等，1999)，可以从 Agdia<sup>1</sup> 公司购得。

将已含有组织印迹的膜 (推荐尺寸：约 7×13 cm) 放置在一个合适的容器中 (托盘、密封容器或塑料袋)，加 1%的牛血清白蛋白 (BSA) 在室温条件下孵育 1 h 或在 4℃条件下过夜孵育 (约 16 h) (更推荐后者)，在孵育过程中加以温和振

荡效果更好。之后弃掉 BSA 溶液，将膜保留。准备等浓度的碱性磷酸酯酶标记的 CTV 特异性单克隆抗体 3DF1 和 3 CA5（每种单克隆抗体在 PBS 中的浓度约为 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ）或等浓度的在大肠杆菌（*E. coli*）中表达的 3 DF1 scFv-AP/S 和 3CA5 scFv-AP/S 融合蛋白（在 PBS 中适当稀释）（Terrada 等，2000）作为结合液。之后将结合液加到膜上，将膜覆盖，在室温下将膜于摇床上孵育 3 h。然后弃掉结合液。用洗涤缓冲液（PBS，pH 7.2—7.4，0.05% Tween 20）对膜和容器振荡（手动或机械）洗涤 5 min，弃掉洗涤缓冲液，洗涤过程重复两次。之后将碱性磷酸酶底物（Sigma<sup>1</sup>Fast 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium (BCIP/NBT) 缓冲液（终浓度分别至 0.33 mg/mL 和 0.175 mg/mL））加到膜上进行孵育，直到阳性对照中出现紫色（约 10—15 min）。用自来水洗膜终止反应，将膜铺展到吸水纸上进行干燥。低倍显微镜放大（10 $\times$ ~20 $\times$ ）检测印迹。若在检测的植物材料维管系统中出现紫色，则说明存在 CTV。

### 3.5.2 双抗夹心 (DAS) - ELISA

双抗体夹心（DAS）—ELISA 可通过 Garnsey 和 Cambra（1991）所描述的操作步骤完成。基于已经验证过的 CTV 特异性单克隆抗体 3DF1+3CA5（Plant Print Diagnostcs SL 公司<sup>1</sup>）和各种不同的多克隆抗体完整试剂盒（Agdia<sup>1</sup>、AgriTest<sup>1</sup>、Bioreba<sup>1</sup>、Loewe<sup>1</sup>、或 Sediag<sup>1</sup> 公司产品）均已商品化。

每个样本需要使用酶联板中的两个孔，并且还至少有两个孔分别作为阳性和阴性对照。首先需要对多克隆或单克隆抗体（3DF1+3CA5）在 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液（Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1.59 g; NaHCO<sub>3</sub>, 2.93 g; 蒸馏水定容至 1L）中进行适当的稀释（免疫球蛋白终浓度通常为 1—2 $\mu\text{g/mL}$ ），每孔加 200 $\mu\text{l}$ 。之后将酶联板置于 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 4 h 或 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜（约 16 h）。孵育完成后，用洗涤缓冲液（PBS，pH 7.2-7.4，

加 0.05% 的 Tween 20）洗板三次。之后向每孔中加入 200 $\mu\text{l}$  植物提取液（3.4.3 节），4 $^{\circ}\text{C}$  条件下继续孵育 16 h，之后按照直接组织印迹—ELISA（3.5.1 节）中的描述洗板三次。将带有碱性磷酸酯酶标记的特异性多克隆抗体或单克隆抗体（3DF1+3CA5）混合物在 PBS 中稀释到合适浓度（约 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ，含 0.5% BSA），之后向每孔加 200 $\mu\text{l}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 3 h。孵育完成后按照直接组织印迹—ELISA（3.5.1 节）中的描述再次洗板三次。制备 1mg/mL 的碱性磷酸酯酶[磷酸对硝基苯酯（p-nitrophenyl phosphate）]底物缓冲液（向 800 mL ddH<sub>2</sub>O 中加 97mL 二乙醇胺，用浓盐酸调 pH 值到 9.8，之后用蒸馏水定容至 1000 mL），向每个样品孔中加 200  $\mu\text{L}$ 。最后将酶联板置于室温条件下，在 405 nm 波长下 120 min 内间隔读数，或参照多克隆抗体生产厂家给出的说明进行检测。

若每个样本的两个孔的平均 OD 值  $< 0.1$  或  $< 2 \times$  阴性对照即为健康植物提取物的 OD 值，则推定酶联免疫检测结果为阴性。若每个样本两孔重复的平均 OD 值  $\geq 2 \times$  阴性对照的 OD 值，则检测结果为阳性。当使用多克隆抗体时，关键是要尽可能的将阴性对照与待测样品置于同一个酶联板中。

DIAGPRO 成环试验验证了使用 3DF1+3CA5 单克隆抗体的这种方法（Cambra 等，2002）。关于该方法与其他检测技术的对比及相应的诊断参数参见 3.7 节内容。

尽管一些单克隆抗体的混合物可以特异、灵敏、可靠地检测所有的 CTV 株系，但一些多克隆抗体的检测并不特异且灵敏度有限（Cambra 等，2011）。因此，在 CTV 鉴定中如果用了多克隆抗体并且国家植物保护组织需要额外的置信度的情况下，建议同时使用一些其他方法进行检测。

### 3.6 分子检测

在获得 CTV 基因组 RNA 的核苷酸全序列之后，许多基于病毒 RNA 特异性检测的诊断程序已经建立起来，包括用互补 DNA（cDNA）或 cRNA 为探针进行分子杂交以及基于 RT-PCR 的一些方法（Moreno 等，2008）。这些基于 RT-PCR 的方法显著提高了检测的灵敏度，从而能够在感染病毒的柑橘组织或携带 CTV 的蚜虫中定量检测病毒 RNA 的拷贝数量（Bertolini 等，2008）。使用高通量技术，例如实时反转录 PCR，可以不再需要采用扩增后的处理步骤（例如：凝胶电泳），因而比常规 PCR 更快速并且可降低交叉污染的几率。

除了免疫捕获 (IC) RT-PCR（不需要提取 RNA）以外，都需使用合适的已得到验证的方法提取 RNA。在提取过程中，不同样品需在塑料袋里单独保存以避免提取过程中的交叉污染。此外，对于点印迹植物提取物、组织印迹切片或植物材料压片，则可以将其固定在印迹纸或尼龙膜上并通过实时 RT-PCR 进行分析。不推荐用常规 PCR 来检测点印或组织印迹的样品，因为相比实时 RT-PCR，常规 PCR 灵敏度较低，可能会导致假阴性检测结果。

#### 3.6.1 RNA 纯化、免疫捕获和 cDNA 合成

##### 3.6.1.1 RNA 纯化

RNA 纯化应当采用切实可行的已得到验证的实验方案，或者使用 RNA 纯化试剂盒并根据厂家说明书操作。所提取的 RNA 在作为检测样本使用之前应保存于  $-70^{\circ}\text{C}$ （较好）或  $-20^{\circ}\text{C}$  且不应超过一年。为避免反复冻融所导致的 RNA 降解，应当将其分装成小份保存。

### 3.6.1.2 免疫捕获

免疫捕获是纯化 RNA 的另一种可供选择的替代方法。在实验时，先准备好稀释的抗体混合液，包括 1  $\mu\text{g/ml}$  的 CTV 特异性多克隆抗体或单克隆抗体（3DF1 + 3CA5，0.5  $\mu\text{g/ml}$  + 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ）稀释在 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液中（碳酸盐缓冲液的组分请参考 3.5.2 节）。然后将抗体混合液分装到小离心管中（100  $\mu\text{l}$  每管），于 37°C 孵育 3 h。接着将抗体包被后的离心管用 150  $\mu\text{l}$  无菌洗涤缓冲液（PBS，pH 7.2–7.4，含有 0.05% Tween 20；PBS 的组分参照 3.4.3 节）洗涤 2 次。然后将植物粗提液（100  $\mu\text{l}$ ）等量分装到包被有抗体的离心管中，也可将提取液离心或用滤纸过滤至澄清后再行分装。将离心管置于冰上孵育 2 h 以上或者于 37°C 中孵育 2 h。完成免疫捕获阶段后，用 150  $\mu\text{l}$  无菌洗涤缓冲液将离心管洗涤三次。之后，这些离心管就可以用来进行 cDNA 合成和 PCR 扩增。

### 3.6.1.3 cDNA 合成

由于在贮存中保存 RNA 存在问题（RNA 在存储中容易降解），因此建议合成 cDNA 进行保存，因为相比于 RNA，cDNA 对温度的要求不苛刻，能够在低温下进行长时间保存。有多个商业化试剂盒可用于 cDNA 的合成。

### 3.6.2 IC-RT-PCR

根据 Olmos 等（1999），引物是：

PIN1: 5'-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3'

PIN2: 5'-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA -3'

RT-PCR 反应体系：ddH<sub>2</sub>O，14.3  $\mu\text{l}$ ；10  $\times$  *Taq* DNA 聚合酶缓冲液，2.5  $\mu\text{l}$ ；25 mM MgCl<sub>2</sub>，1.5  $\mu\text{l}$ ；5 mM dNTPs，1.25  $\mu\text{l}$ ；4% Triton X-100，2  $\mu\text{l}$ ；25  $\mu\text{M}$  引物 PIN1，1  $\mu\text{l}$ ；25  $\mu\text{M}$  引物 PIN2，1  $\mu\text{l}$ ；DMSO，1.25  $\mu\text{l}$ ；10 U/ $\mu\text{l}$  AMV 反转录酶，0.1  $\mu\text{l}$ ；和 5 U/ $\mu\text{l}$  *Taq* DNA 聚合酶，0.1  $\mu\text{l}$ 。反应混合物（25  $\mu\text{l}$ ）直接加到洗涤过的包被有抗体的离心管中。

RT-PCT 的反应参数：42°C，45 min；92°C，2 min；之后 40 个循环（92°C，30 s；60°C，30 s；72°C，1 min）；最后延伸 72°C，10 min；8°C 冷却。预期的扩增子片段大小是 131 bp。

此方法在 DIAGPRO 成环试验中得到了验证（Cambra 等，2002）。与其它技术的比较和检测参数见 3.7 节。

### 3.6.3 独立封闭的离心管内进行免疫捕获巢式 RT-PCR

根据 Olmos 等（1999），引物是：

PEX1: 5'-TAA ACA ACA CAC ACT CTA AGG-3'

PEX2: 5'-CAT CTG ATT GAA GTG GAC-3'

PIN1: 5'-GGT TCA CGC ATA CGT TAA GCC TCA CTT-3'

PIN2: 5'-TAT CAC TAG ACA ATA ACC GGA TGG GTA-3'

将 0.5 ml 的微离心管分区的装置需根据 Olmos 等（1999）的报道，微离心管用于在独立的密闭离心管中进行的巢式 RT-PCR 反应。RT-PCR 母液包含两个反应混合物：

A（置于微离心管底部）：蒸馏水，15.8  $\mu\text{l}$ ；10  $\times$  *Taq* DNA 聚合酶缓冲液，3  $\mu\text{l}$ ；25 mM  $\text{MgCl}_2$ ，3.6  $\mu\text{l}$ ；5 mM dNTPs，2  $\mu\text{l}$ ；4% Triton X-100，2.2  $\mu\text{l}$ ；25  $\mu\text{M}$  引物 PEX1，0.6  $\mu\text{l}$ ；25  $\mu\text{M}$  引物 PEX2，0.6  $\mu\text{l}$ ；DMSO，1.5  $\mu\text{l}$ ；10 U/ $\mu\text{l}$  AMV 反转录酶，0.2  $\mu\text{l}$ ；5 U/ $\mu\text{l}$  *Taq* DNA 聚合酶，0.5  $\mu\text{l}$ 。

B（置于微离心管盖的圆锥型孔（cone）中）：蒸馏水，2.6  $\mu\text{l}$ ；10 $\times$ *Taq* DNA 聚合酶缓冲液，1  $\mu\text{l}$ ；25  $\mu\text{M}$  引物 PIN1，3.2  $\mu\text{l}$ ；25  $\mu\text{M}$  引物 PIN2，3.2  $\mu\text{l}$ 。

RT-PCR 的反应条件：42 $^{\circ}\text{C}$ ，45 min；92 $^{\circ}\text{C}$ ，2 min；之后 25 个循环（92 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s；45 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s；72 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min）。完成这第一步反应之后，将离心管涡旋振荡后离心（6 000 rpm，5s）来使混合液 B 与第一次的扩增子混合。然后将离心管再次置于热循环仪中继续反应：40 个循环（92 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s；60 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s；72 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min），最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min，8 $^{\circ}\text{C}$  冷却。预期扩增子大小为 131 bp。

此方法在 DIAGPRO 成环试验中得到了验证（Cambra 等，2002）。与其他技术的比较和诊断参数见 3.7 节。

### 3.6.4 RT-PCR 和巢式 RT-PCR 的一般注意事项

在使用不同的试剂和 PCR 仪时，RT-PCR 实验方案可能需要改进和优化。

若使用常规 RT-PCR 检测 CTV，推荐使用 IC-RT-PCR。常规 RT-PCR 并不灵敏，可能会产生假阴性结果。这可能是由于抑制剂的存在而影响常规 RT-PCR 的灵敏度。

若在某个待检样品中检测不到预期大小的 CTV 特异性扩增产物，但在阳性对照中可以检测到时，说明此样品是阴性。而如果在待检样品中检测到预期大小的 CTV 特异性扩增子，且阴性对照中没有扩增到时，说明样品为阳性。

### 3.6.5 实时 RT-PCR

Bertolini 等（2008）和 Saponari 等（2008）分别描述了两类实时 RT-PCR 试验。

根据 Bertolini 等（2008）报道，引物和探针如下：

3'UTR1: 5'-CGT ATC CTC TCG TTG GTC TAA GC-3'

3'UTR2: 5'-ACA ACA CAC ACT CTA AGG AGA ACT TCT T-3'

181T: FAM-TGG TTC ACG CAT ACG TTA AGC CTC ACT TG-TAMRA

反应体系（25  $\mu$ l）：蒸馏水，0.95  $\mu$ l；2 $\times$ AgPath-ID 一步法 RT-PCR 母液混合物（Applied Biosystems<sup>1</sup>），12.5  $\mu$ l；25  $\times$  RT-PCR 酶混合物，1  $\mu$ l；10  $\mu$ M 引物 3'-UTR1，2.4  $\mu$ l；10  $\mu$ M 引物 3'-UTR2，2.4  $\mu$ l；5  $\mu$ M FAM 标记的探针 181T，0.75  $\mu$ l；然后将 5  $\mu$ l 从膜中提取或释放的 RNA 加入到 20  $\mu$ l 的实时 RT-PCR 混合液中。反应条件是：45 $^{\circ}$ C，10 min；95 $^{\circ}$ C，10 min；然后 45 个循环（95 $^{\circ}$ C，15 s；60 $^{\circ}$ C，1 min）。预期扩增产物大小为 95 bp。

对于组织印迹实时 RT-PCR，预计其诊断灵敏度为 0.98，特异性为 0.85，且阳性和阴性的概率比分别为 6.63 和 0.021（Vidal 等，2012）。这些诊断参数显示，相比于直接组织印迹 ELISA，组织印迹实时 RT-PCR 是最灵敏的技术，其用于常规 CTV 检测和诊断十分有效，且强烈推荐其用于检测评估任何没有携带 CTV 的植物材料。该技术的高灵敏度使得在一年中的任何季节都可以像检测单个样本那样对混合样品（多达十组树木或苗圃植物）进行精确分析，并且其还可以用来检测蚜虫所携带的低浓度 CTV。有关组织印迹实时 RT-PCR 验证的其它检测参数，请参考 3.7 节。

根据 Saponari 等（2008）报道，所用的引物和探针如下：

P25F: 5'-AGC RGT TAA GAG TTC ATC ATT RC-3'

P25R: 5'-TCR GTC CAA AGT TTG TCA GA-3'

CTV-CY5: CY5-CRC CAC GGG YAT AAC GTA CAC TCG G

反应体系（25  $\mu$ l）：2 $\times$  iScript 一步法 RT-PCR 探针试剂盒（Bio-Rad<sup>1</sup>），12.5  $\mu$ l；iScript 反转录酶混液，0.5  $\mu$ l；10  $\mu$ M 引物 P25F，1  $\mu$ l；10  $\mu$ M 引物 P25R，2  $\mu$ l；5  $\mu$ M 探针 CTV-CY5，0.4  $\mu$ l；然后将 2  $\mu$ l 从膜中提取或释放的 RNA 加入到 23  $\mu$ l 的实时定量 RT-PCR 混合液中。反应循环条件是：55 $^{\circ}$ C，2 min；95 $^{\circ}$ C，5 min；然后 40 个循环（95 $^{\circ}$ C，15 s；59 $^{\circ}$ C，30 s）。预期扩增产物大小为 101 bp。该实时 RT-PCR 方案的诊断参数（即灵敏度，特异性，准确性，阳性和阴性概率比和测试后发病率）均未见报道。

### 3.6.7 常规和实时 RT-PCR 结果分析

#### 3.6.1 分子试验的对照

考虑到实验结果的可靠性，靶标害虫或者目标核酸的核酸分离和扩增都需设置合适的对照，对照的设计取决于试验类型和所需确定性水平。对于 RT-PCR，至少需要设置含有核酸模板的阳性对照和阴性对照（没有核酸模板）等两种以上的对照。

**阳性核酸对照。**这个对照主要是用来检测试验方法的效率（提取除外）以及 RT-PCR 的扩增效果。该对照可使用前期准备（存储）的 RNA 或者已经压印到膜上的受 CTV 侵染的植物材料。对这些存储的 RNA 或者 CTV 材料应该随着储存时间的延长，定期检测用作对照的样品的质量。

**内参对照。**根据 Saponari 等（2008）描述的 RT-PCR 的实验方法，将线粒体中的 NADH 脱氢酶 5 基因（*nad5*）的 mRNA 作为 RT-PCR 体系中的内参对照，主要目的是减少由于核酸提取失败、或者由于核酸降解、或者存在 RT-PCR 抑制剂所造成的 RT-PCR 检测的假阴性。因为该基因是寄主基因，所以要特别小心 *nad5* DNA 对实验室的污染，否则会导致我们对内参对照反应的盲目自信。

**阴性扩增对照（无模板对照）。**该对照无论对于常规 RT-PCR 还是实时 RT-PCR 都是必不可少的，它可以排除在配制反应体系的过程中因污染所造成的假阳性。用于制备反应体系所需的无 RNA 酶的 PCR 级别的水在扩增阶段加入。

**阳性提取对照。**该对照主要是用来确认目标核酸的提取无论是质还是量都能够达到病毒 RT-PCR 检测的要求，同时确保目标病毒能被检测到。核酸从 CTV 侵染的寄主组织，携带 CTV 的植物或是介体昆虫组织中提取。

RT-PCR 过程中需特别小心，避免阳性对照或者阳性样品中气溶胶分子所造成的交叉污染。

**阴性提取对照。**该对照用于监测在核酸提取过程中的污染或/和与寄主组织的交叉污染。该对照从未感染病毒的寄主组织中提取核酸然后进行扩增。当预测会有大量阳性样品时建议设置多组阴性对照。

#### 3.6.7.1 常规 RT-PCR 和 IC-RT-PCR

病原物特异性 RT-PCR 结果的可信度仅取决于以下两个条件：

- (1) 在阳性对照组中扩增到大小正确的病毒序列片段；
- (2) 在阴性提取对照和阴性扩增对照中没有扩增到与病毒序列片段大小一致的片段。

如果使用根据线粒体 NADH 脱氢酶基因（*nad5*）mRNA 设计的内参引物（正向引物：5' -GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3'，反向引物：5' -CTC

CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3'；产物大小：181 bp）进行扩增，在阴性提取对照（健康植物组织），阳性对照以及每一个测试样品中都会扩增出一个 115 bp 大小的扩增产物。如果样品用这对内参对照引物没有扩增出目的条带，那就表明 RNA 提取失败、或体系中没有 RNA 模板、或 RNA 提取过程中混入的抑制剂使得 RNA 被降解了。

如果检测样品中扩增出大小正确的扩增产物，可认为该样品是阳性。

### 3.6.7.2 实时 RT-PCR

病原体特异性实时 RT-PCR 结果的可信度将取决于以下两个条件：

- (1) 使用病毒特异引物扩增的阳性对照中有一个扩增曲线；以及
- (2) 使用病毒特异性引物扩增的阴性提取对照和阴性扩增对照中没有扩增曲线。

如果检测样品中有典型的指数型扩增曲线，就认为该样品是阳性，当每个实验室首次使用实时 RT-PCR 时要对循环阈值进行实验确认。

## 3.7 通过实验效果研究加以确认

在 DIAGPRO 由 10 个实验室完成的成环试验中，使用 3DF1+3CA5 单克隆抗体的直接组织印迹 ELISA 方法的精确度可达 99%（技术诊断确定的实际阳性样品和阴性样品的数量与检测样品数量的比值），该试验使用每组 10 个已编号的样品，这些样品由巴伦西亚农业研究所收集，包含了受 CTV 侵染的和健康的组织。该方法的精确度要优于 DAS-ELISA（98%）、IC-RT-PCR（IC-RT-PCR）（94%）以及在闭合单管中进行的免疫捕获巢式 RT-PCR（89%）。直接组织印迹 ELISA 的灵敏度是 0.98，而上面提到的其它技术的灵敏度分别是 0.96、0.96 和 0.93（Vidal 等，2012）。直接组织印迹 ELISA 的诊断特异度（specificity）是 1.0，上述其它技术的特异度分别是 1.0、0.91 和 0.82。直接组织印迹 ELISA 的阳性预测值（确实发生了该病害的阳性测试，Sackett 等，1991）是 1.0，其它技术分别是 1.0、0.94 和 0.89。直接组织印迹 ELISA 的阴性预测值是 0.97，其他技术分别是 0.95、0.94 和 0.88。

与墨西哥酸橙生物学鉴定、ELISA、IC-RT-PCR 和免疫捕获巢式 RT-PCR 相比，使用 3DF1+3CA52 单克隆抗体的直接组织印迹 ELISA 对 CTV 侵染的常规植物材料的检测更加可靠、简单和经济（Cambra 等，2002）。Ruiz-García 等（2005）经过分析也证实了直接组织印迹 ELISA 和 DAS-ELISA（用阳性植株的四个叶柄进行检测，灵敏度可达 97%）在灵敏度方面是相当的，但直接组织印迹更易使用，成本更低。将使用 3DF1+3CA52 单克隆抗体的直接组织印迹 ELISA 与墨西哥酸橙生物学鉴定和组织印迹实时 RT-PCR 对 CTV 的检测进行比较（Vidal 等，2012），对多个不同的诊断参数评估后发现，直接组织印迹 ELISA 是最特异、最准确的检测方法，



该方法在任何 CTV 流行水平下对病害的检测率都是最高的。

#### 4. 强毒力 CTV 株系鉴定

CTV 株系的鉴定需要进行生物学、血清学或者分子扩增试验。

因为 CTV 的毒力是根据其表型进行描述的，所以还没有基于核酸的，能根据 CTV 的毒力准确鉴定 CTV 株系的方法。CTV 高丰度生物学变异的遗传基础很大程度上仍然未知（Moreno 等，2008）。对其多样性的生物学意义尤其是重组的影响也知之甚少。此外，CTV 基因型的分组也没有标准化（Harper，2013）。多种不同的分子方法已被用于区分 CTV 株系，包括分子杂交、双链 RNA 模式、扩增 CTV cDNA 的限制性片段分析、基因组不同区域的 PCR 扩增、实时 PCR（Moreno 等，2008；Yokomi 等，2010）、基因组测序和再测序微阵列芯片。更近的时期内，酶免疫测定法和毛细管电泳单链构型多态性已相继得以试用。然而，这些技术还没有实际应用于对自然条件下传播的 CTV 株系进行可靠地分类，也没有被证实可以应用，目前这些技术仅限于研究的目的。

鉴于 CTV 的遗传和生物学变异，除了测序外，用其他技术来试图鉴定 CTV 株系时都有可能得到错误的结果。采用深度测序技术，也称之为下一代测序技术，可以快速提供有关基因组序列的信息。但是，CTV 的核酸序列仍不能与其株系的生物学特性和行为相联系起来（侵染性和传播性）。尽管通过 CTV 侵染植物产生的表型、病毒的毒力、寄主范围、抗原表位的组成，以及更近的时期内的一个或者多个基因序列鉴定（Moreno 等，2008），对 CTV 株系进行了分类和分组，但是还没有发现这与其生物学行为有明显的相关性（Harper，2013）。

建议参照以下方法获得某个具体 CTV 株系生物学特性相关的信息（图 2）。

- (1) 使用一定范围内的指示植物进行生物学鉴定，如采用莱檬、山槐、山茶、葡萄柚（邓肯栽培品种）进行茎杆的茎痘评估，采用酸橙和柠檬的实生苗进行种苗的黄化检测评估（Roistacher，1991；Ballester-Olmos 等，1993）。
- (2) 针对单克隆抗体 MCA13 的免疫反应（Permar 等，1990），它能很好地识别存在于强毒 CTV 株系中的保守抗原决定簇，弱毒株系缺乏这类抗原决定簇（Pappu 等，1993）。与 MCA13 强烈反应的病毒株系能够诱导嫁接在酸橙或者柠檬砧木上的柑橘树的衰退。大多数在葡萄柚或者甜橙上引起茎痘的 CTV 株系都能被 MCA13 识别为阳性。

## 4.1 生物学检测

对 CTV 强毒性株系的生物学鉴定步骤已在 3.3 节详述。

## 4.2 基于使用 MCA13 的血清学检测

### 4.2.1 直接组织印迹 ELISA

全套试剂盒可用 Plant Print Diagnostics SL<sup>1</sup> 的产品，该试剂盒是基于对 CTV—特异的 MCA13 单克隆抗体研发出来的。一套完整的检测试剂盒包括阳性对照和阴性对照试验预制膜、全部试剂、缓冲液和反应底物。其使用方法如下：

将预印膜按照 3.5.1 节所述的方法进行组织印迹处理并封闭，将提前准备好的偶联有碱性磷酸酯酶、CTV 特异性的 MCA13 单克隆抗体的 PBS 溶液（浓度约为 0.1 µg/ml）倒在膜上，使之覆盖该膜。之后将该膜在室温下轻微振荡孵育 3 小时，按照 3.5.1 节的描述进行洗膜、显影、读取结果。通常植物材料维管区域产生了小型紫色沉淀物，这就表明该植物材料中的 CTV 是强侵染性株系。

### 4.2.2 DAS-ELISA

DAS-ELISA 的操作根据下文中提到的 Garnsey 和 Cambra（1991）所述的方法，基于 CTV—特异的 MCA13 单克隆抗体的试剂盒可从 Plant Print D Diagnostics SL<sup>1</sup> 公司购买。

包埋过程按照 3.5.2 节的描述进行操作。偶联碱性磷酸酯酶的 CTV 特异性的 MCA13 单克隆抗体稀释到合适的比例使用（PBS 中大约 0.1 µg/ml 抗体和 0.5% BSA）。孵育，洗涤，底物加入，结果分析参考 3.5.2 节提到的方法。

## 5. 记录

应按照 ISPM 27（限定有害生物诊断规程）2.5 节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，特别是在违规或在一个地区首次发现该病毒的情况下，下述相关附加材料应当予以妥善保存以确保可追溯性。

- 原始样品材料应当在 -80℃ 下保存，或者冷冻干燥后应在室温保存。
- RNA 提取物应当于 -80℃ 状态下保存，植物组织印迹部分、纸膜上或者尼龙膜上的点印、植物提取物应在室温保存。
- RT-PCR 扩增产物应该在 -20℃ 保存。

## 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：

西班牙植物保护与生物技术中心瓦伦西亚农业研究所（IVIA），Moncada (Valencia) 市 Carretera Moncada-Náquera km 4.5, 46113（Mariano Cambra；电子邮箱：[mcambra@ivia.es](mailto:mcambra@ivia.es) or [mcambra@mcambra.es](mailto:mcambra@mcambra.es)）。

巴西南大河州联邦大学（UFRGS）农学院植物保护系，Avenida Bento Gonçalves 7712, 91540-000 Porto Alegre（Edson Bertolini；电子邮箱：[edson.bertolini@ufrgs.br](mailto:edson.bertolini@ufrgs.br)；电话：+55 (51) 3308 8100）。

美国农业部动植物检疫局植物保护及检疫处-CPHST 实验室，4700 River Road, Riverdale, MD 20737（Laurene Levy；电子邮箱：[laurene.levy@aphis.usda.gov](mailto:laurene.levy@aphis.usda.gov)；电话：+1 301 851 2078；传真：+1 301 734 8724）。

南非国际柑橘研究所（CRI），PO Box 28, 1200 Nelspruit, Mpumalanga（S.P. Fanie van Vuuren；电子邮箱：[faniev@cri.co.za](mailto:faniev@cri.co.za)）。

美国 Alico, Inc., Suite 100, 10070 Daniels Interstate Court, Fort Myers, FL 33913（Marta Isabel Francis；电子邮箱：[mfrancis@alicoinc.com](mailto:mfrancis@alicoinc.com)；电话：+1 863 673 4774）。

国家植物保护组织（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，此类申请会转交至诊断规程技术小组（TPDP）。

## 7. 致谢

本规程初稿由 M. Cambra（西班牙 IVIA，参看前节）、E. Bertolini（西班牙 IVIA，参看前节；现地址为 UFRGS）、L. Levy（美国农业部动植物检疫局，参看前节）、S.P.F. van Vuuren（南非 CRI，参看前节）及 M.I. Francis（乌拉圭国家农业研究所，参看前节；现地址为 Alico, Inc.）起草。

所描述的多数技术均在由欧盟资助的 DIAGPRO 项目中进行过成环试验，或者在 INIA 和西班牙农业、食品和环境部资助的项目中得到评估。

## 8. 参考文献

本附件同时引用了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>。

Albertini, D., Vogel, R., Bové, C. & Bové, J.M. 1988. Transmission and preliminary characterization of *Citrus tristeza virus* strain K. In L.W. Timmer, S.M. Garnsey & L. Navarro, eds. *Proceedings of the 10th Conference of the International*

- Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 17–21. Riverside, CA. ([www.iocv.org/proceedings.html](http://www.iocv.org/proceedings.html)).
- Ballester-Olmos, J.F., Pina, J.A., Carbonell, E., Moreno, P., Hermoso de Mendoza, A., Cambra, M. & Navarro, L.** 1993. Biological diversity of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates in Spain. *Plant Pathology*, 42: 219–229.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R. & Lee, R.F.** 1989. The continuous challenge of *Citrus tristeza virus* control. *Annual Review of Phytopathology*, 27: 291–316.
- 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 RT-PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 120: 177–188.
- Broadbent, P., Bevington, K.R. & Coote, B.G.** 1991. Control of stem pitting of grapefruit in Australia by mild strain protection. In R.H. Brlansky, R.F. Lee & L.W. Timmer, eds. *Proceedings of the 11th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 64–70. Riverside, CA ([www.iocv.org/proceedings.html](http://www.iocv.org/proceedings.html)).
- Cambra, M., Boscia, D., Gil, M., Bertolini, E. & Olmos, A.** 2011. Immunology and immunological assays applied to the detection, diagnosis and control of fruit tree viruses. In A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse & W. Jelkmann, eds. *Virus and virus-like disease of pome and stone fruits*, pp. 303–313. St Paul, MN, APS Press. 429 pp.
- Cambra, M., Garnsey, S.M., Permar, T.A., Henderson, C.T., Gumph, D. & Vela, C.** 1990. Detection of *Citrus tristeza virus* (CTV) with a mixture of monoclonal antibodies. *Phytopathology*, 80: 103.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Marroquín, C., Román, M.P., Olmos, A., Martínez, M.C., Hermoso de Mendoza, A., López, A. & Navarro, L.** 2000a. Incidence and epidemiology of *Citrus tristeza virus* in the Valencian Community of Spain. *Virus Research*, 71: 85–95.
- Cambra, M., Gorris, M.T., Román, M.P., Terrada, E., Garnsey, S.M., Camarasa, E., Olmos, A. & Colomer, M.** 2000b. Routine detection of *Citrus tristeza virus* by direct Immunoprinting-ELISA method using specific monoclonal and recombinant antibodies. In J. da Graça, R.F. Lee & R.K. Yokomi, eds. *Proceedings of the 14th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*, pp. 34–41. Riverside, CA. ([www.iocv.org/proceedings.html](http://www.iocv.org/proceedings.html)).
- Cambra, M., Gorris, M.T., Olmos, A., Martínez, M.C., Román, M.P., Bertolini, E., López, A. & Carbonell, E.A.** 2002. European Diagnostic Protocols (DIAGPRO) for *Citrus tristeza virus* in adult trees. In J. da Graça, R. Milne & L.W. Timmer, eds. *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 69–77. Riverside, CA, ([www.iocv.org/proceedings.html](http://www.iocv.org/proceedings.html))

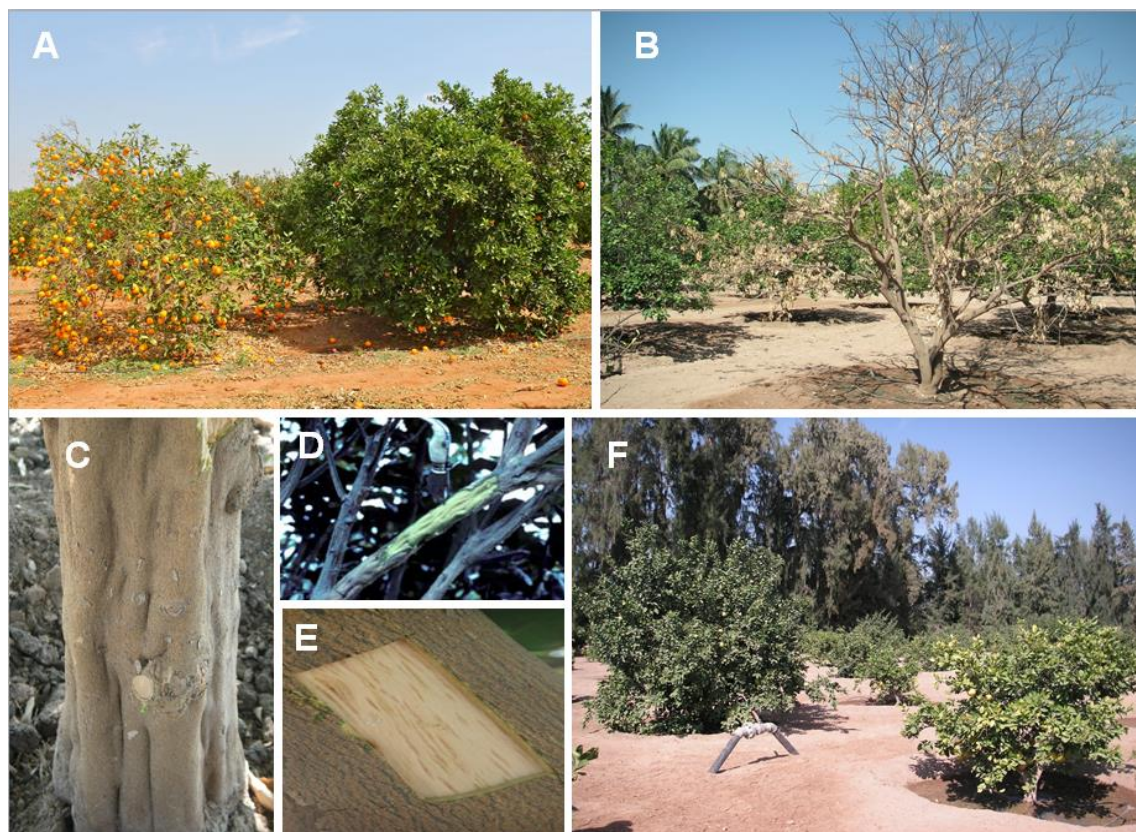
- Duran-Vila, N. & Moreno, P.** 2000. *Enfermedades de los cítricos*. Monografías de la Sociedad Española de Fitopatología (SEF) N° 2. Madrid, Ediciones Mundi-Prensa Libros and SEF ([www.sef.es](http://www.sef.es)). 165 pp.
- Garnsey, S.M. & Cambra, M.** 1991. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for citrus pathogens. In C.N. Roistacher, ed. *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis*, pp. 193–216. Rome, FAO. 286 pp.
- Garnsey, S.M. & Lee, R.F.** 1988. Tristeza. In J.O. Whiteside, S.M. Garnsey & L.W. Timmer, eds. *Compendium of citrus diseases*, pp. 48–50. APS Press. St. Paul, MN. 80 pp.
- Garnsey, S.M., Permar, T.A., Cambra, M. & Henderson, C.T.** 1993. Direct tissue blot immunoassay (DTBIA) for detection of *Citrus tristeza virus* (CTV). In P. Moreno, J. da Graça and L.W. Timmer, eds. *Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 39–50. Riverside, CA. ([www.iocv.org/proceedings.html](http://www.iocv.org/proceedings.html)).
- Gottwald, T.R., Garnsey, S.M., Cambra, M., Moreno, P., Irey, M. & Borbón, J.** 1997. Comparative effects of aphid vector species on increase and spread of *Citrus tristeza virus*. *Fruits*, 52: 397–404.
- Gottwald, T.R., Polek, M.L. & Riley, K.** 2002. History, present incidence, and spatial distribution of *Citrus tristeza virus* in the California Central Valley. In N. Duran-Vila, R. G. Milne & J.V. da Graça, eds. *Proceedings of the 15th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 83–94. Riverside, CA, ([www.iocv.org/proceedings.html](http://www.iocv.org/proceedings.html)).
- da Graça, J.V. & van Vuuren, S.P.** 2010. Managing *Citrus tristeza virus* losses using cross protection. In A.V. Karasev & M.E. Hilf, eds. *Citrus tristeza virus complex and tristeza diseases*, pp. 247–260. Eagan, MN, APS Press. 304 pp.
- Harju, V.A., Henry, C.M., Cambra, M., Janse, J. & Jeffries, C.** 2000. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants-DIAGPRO. *EPPO Bulletin*, 30: 365–366.
- Harper, S.J.** 2013. *Citrus tristeza virus*: Evolution of complex and varied genotypic groups. *Frontiers in Microbiology*, doi:10.3389/fmicb.2013.00093.
- Harper, S.J., Dawson, T.E. & Pearson, M.N.** 2008. Molecular analysis of the coat protein and minor coat protein genes of New Zealand *Citrus tristeza virus* isolates that overcome the resistance of *Poncirus trifoliata* (L.) Raf. *Australian Plant Pathology*, 37: 379–386.
- Ilharco, F.A., Sousa-Silva, C.R. & Alvarez-Alvarez, A.** 2005. First report on *Toxoptera citricidus* (Kirkaldy) in Spain and continental Portugal. *Agronomia Lusitana*, 51: 19–21.
- Licciardello, G., Raspagliesi, D., Bar-Joseph, M. & Catara, A.** 2012. Characterization of isolates of *Citrus tristeza virus* by sequential analyses of enzyme immunoassays and capillary electrophoresis-single-strand conformation polymorphisms. *Journal of Virological Methods*, 181: 139–147.

- Marroquín, C., Olmos, A., Gorris, M.T., Bertolini, E., Martínez, M.C., Carbonell, E.A., Hermoso de Mendoza, A.H. & Cambra, M.** 2004. Estimation of the number of aphids carrying *Citrus tristeza virus* that visit adult citrus trees. *Virus Research*, 100: 101–108.
- Moreno, P., Ambros, S., Albiach-Martí, M.R., Guerri, J. & Peña, L.** 2008. *Citrus tristeza virus*: A pathogen that changed the course of the citrus industry. *Molecular Plant Pathology*, doi:10.1111/J.1364-3703.2007.00455.X.
- Nikolaeva, O.V., Karasev, A.V., Powell, C.A., Gumpf, D.J., Garnsey, S.M. & Lee, R.F.** 1996. Mapping of epitopes for *Citrus tristeza virus*-specific monoclonal antibodies using bacterially expressed coat protein fragments. *Phytopathology*, 86: 974–979.
- Olmos, A., Cambra, M., Esteban, O., Gorris, M.T. & Terrada, E.** 1999. New device and method for capture, reverse transcription and nested PCR in a single closed tube. *Nucleic Acids Research*, 27: 1564–1565.
- Pappu, H.R., Manjunath, K.L., Lee, R.F. & Niblett, C.L.** 1993. Molecular characterization of a structural epitope that is largely conserved among severe isolates of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 3641–3644.
- Permar, T.A., Garnsey, S.M., Gumpf, D.J. & Lee, R.** 1990. A monoclonal antibody that discriminates strains of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 80: 224–228.
- Roistacher, C.N.** 1991. *Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis*. Rome, FAO. 286 pp.
- Román, M.P., Cambra, M., Juárez, J., Moreno, P., Durán-Vila, N., Tanaka, F.A.O., Alves, E., Kitajima, E.W., Yamamoto, P.T., Bassanezi, R.B., Teixeira, D.C., Jesús Jr, W.C., Ayres, J.A., Gimenes-Fernandes, N., Rabenstein, F., Girotto, L.F. & Bové, J.M.** 2004. Sudden death of citrus in Brazil: A graft transmissible, bud union disease. *Plant Disease*, 88: 453–467.
- Ruiz-García, N., Mora-Aguilera, G., Rivas-Valencia, P., Ochoa-Martínez, D., Góngora-Canul, C., Loeza-Kuk, E.M., Gutiérrez-E, A., Ramírez-Valverde, G. & Álvarez-Ramos, R.** 2005. Probability model of *Citrus tristeza virus* detection in the tree canopy and reliability and efficiency of direct immunoprinting-ELISA. In M.E. Hilf, N. Duran-Vila & M. A. Rocha-Peña, eds. *Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV)*. pp. 196–204. Riverside, CA. ([www.iocv.org/proceedings.html](http://www.iocv.org/proceedings.html)).
- Sackett, D.L., Haynes, R.B., Guyatt, G.H. & Tugwell, P.** 1991. *Clinical epidemiology: A basic science for clinical medicine*, 2nd edn. Boston, MA, Little Brown and Co. 441 pp.
- Saponari, M., Manjunath, K. & Yokomi, R.K.** 2008. Quantitative detection of *Citrus tristeza virus* in citrus and aphids by real-time reverse transcription-PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 147: 43–53.

- Terrada, E., Kerschbaumer, R.J., Giunta, G., Galeffi, P., Himmler, G. & Cambra, M.** 2000. Fully “Recombinant enzyme-linked immunosorbent assays” using genetically engineered single-chain antibody fusion proteins for detection of *Citrus tristeza virus*. *Phytopathology*, 90: 1337–1344.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M. & Graham, J.H.** 2000. *Compendium of citrus diseases*. St Paul, MN, APS Press. 92 pp.
- Vela, C., Cambra, M., Cortés, E., Moreno, P., Miguet, J., Pérez de San Román, C. & Sanz, A.** 1986. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for *Citrus tristeza virus* and their use for diagnosis. *Journal of General Virology*, 67: 91–96.
- Vidal, E., Yokomi, R.K., Moreno, A., Bertolini, E. & Cambra, M.** 2012. Calculation of diagnostic parameters of advanced serological and molecular tissue-print methods for detection of *Citrus tristeza virus*. A model for other plant pathogens. *Phytopathology*, 102: 611–619.
- Yokomi, R.K., Garnsey, S.M., Civerolo, E.L. & Gumpf, D.** 1989. Transmission of exotic citrus tristeza isolates by a Florida colony of *Aphis gossypii*. *Plant Disease*, 73: 552–556.
- Yokomi, R.K., Saponari, M. & Sieburth, P.J.** 2010. Rapid differentiation and identification of potential severe strains of *Citrus tristeza virus* by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assays. *Phytopathology*, 100: 319–327.
- Zebzami, M., Garnsey, S.M., Nadori, E.B. & Hill, J.H.** 1999. Biological and serological characterization of *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates from Morocco. *Phytopathologia Mediterranea*, 38: 95–100.



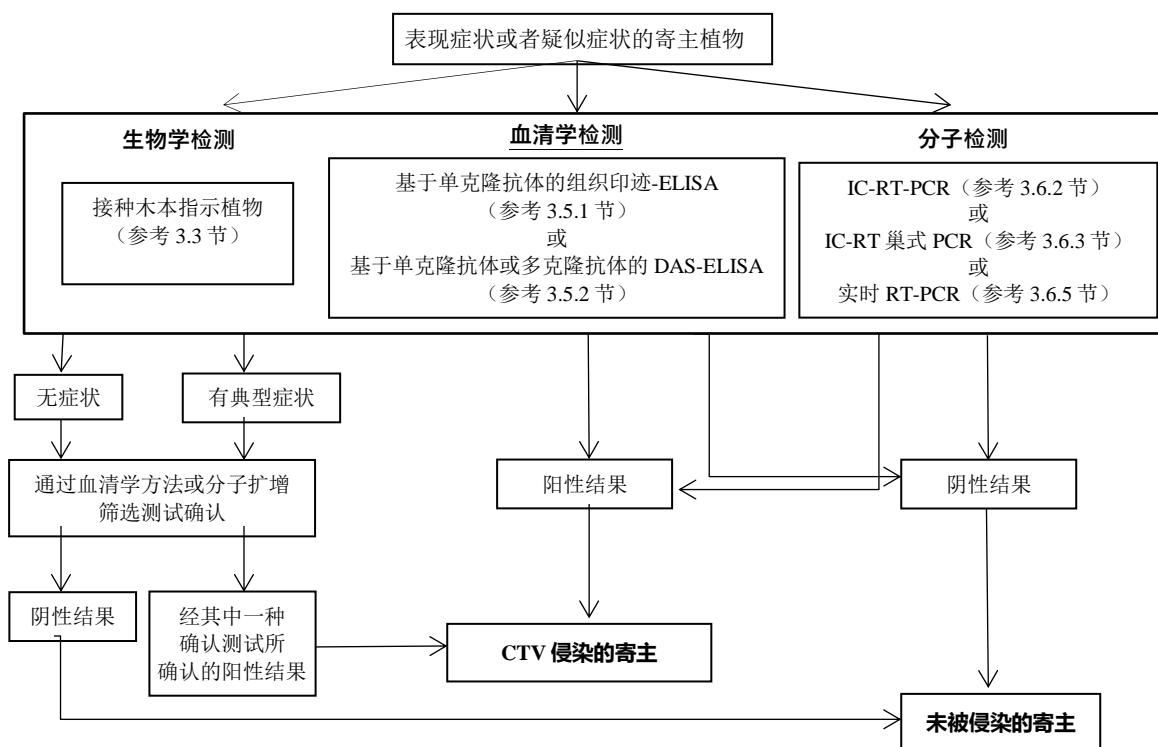
## 9. 图



**图 1.** 柑橘衰退病毒（CTV）侵染的症状：（A）衰退综合征、嫁接于 CTV 侵染的酸橙上的甜橙衰退症状（左）以及无症状的树（右）；（B）嫁接于酸橙上的西柚衰亡及快速衰退症状；（C）嫁接于特洛亚枳橙上的西柚茎杆上由于 CTV 强侵染性株系引致的茎痘；（D）在西柚枝干上的严重茎痘；（E）嫁接于卡里佐枳橙上的甜橙茎杆上的茎痘；（F）嫁接于卡里佐枳橙（Carrizo citrange）上的甜橙树由于 CTV 的侵染严重发育不良（右）；健康树（左）。

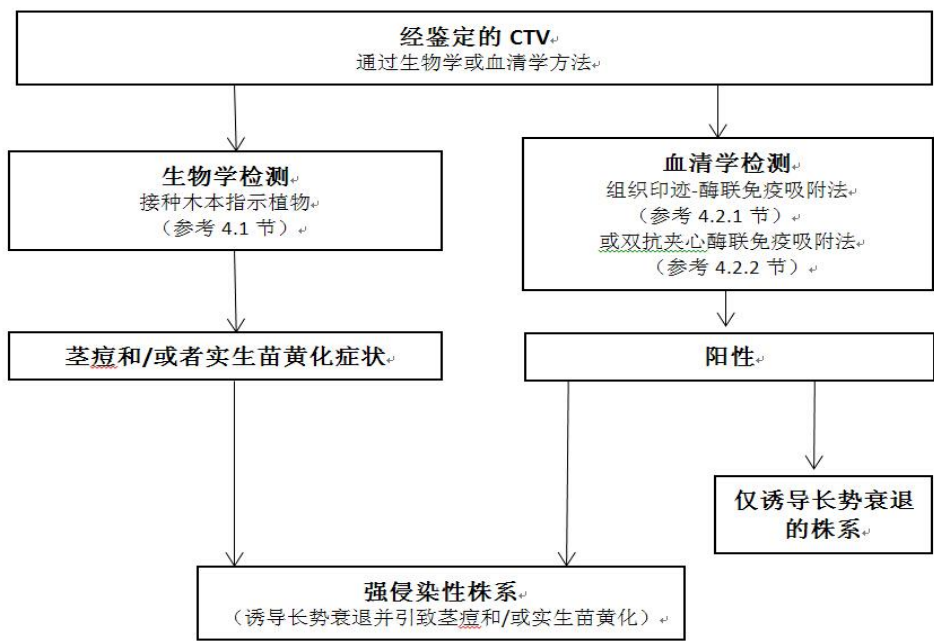
此处图片由下列人士惠赠：(A) P. Moreno； (B、C、E) M. Cambra； (D) L. Navarro； (F) M. Cambra 和 J.A. Pina；他们均来自位于西班牙蒙卡达地区的巴伦西亚农业研究院（IVIA）。





**图 2.** 柑橘衰退病毒（CTV）检测鉴定流程图。

DAS：双抗夹心；ELISA：酶联免疫吸附测定；IC：免疫捕获；PCR：聚合酶链式反应；RT：反转录。



**图 3.** 柑橘衰退病毒（CTV）强侵染性株系鉴定流程图。  
DAS：双抗夹心；ELISA：酶联免疫吸附测定。

出台背景

这部分不属于本标准的正式内容

- 2004 年 11 月，标准委提出最初的主题：柑橘衰退病毒（2004-021）。
- 2006 年 4 月，植检委第一届会议在工作计划（病毒和植原体）中增列主题（2006-009）。
- 2006 年 4 月，植检委第一届会议（2006）增列主题：线虫（2006-008）。
- 2014 年 4 月，专家磋商。
- 2015 年 1 月，标准委批准提交成员磋商（2015\_eSC\_May\_02）。
- 2015 年 2 月，成员磋商。
- 2015 年 12 月，诊断规程起草小组审查草案并对成员评论进行答复。
- 2015 年 11 月，将诊断规程提交标准委申请批准通报（2016\_eTPDP\_Feb\_02）。
- 2016 年 3 月，标准委通过电子决策批准进入 45 天的诊断规程通报期（2016\_eSC\_May\_10）。
- 2016 年 8 月，标准委代表植检委批准诊断规程（未收到反对意见）。

**ISPM 27 附件 15.** 柑橘衰退病毒（*Citrus tristeza virus*）(2016)。  
罗马，国际植保公约，粮农组织。  
2018 年 1 月，中文语言审核小组和联合国粮农组织翻译服务审议了这项 DP，国际植物保护公约秘书处合并了相应的修改。  
2018 年 4 月，植物检疫措施委员会第 13 届会议（2018）指出中文语言审查小组已经审查了此附件。

发布背景最后更新：2019 年 01 月。