ICS 65.020.01
B 16

GB

中华人民共和国国家标准

GB/T 36816—2018

马铃薯 Y 病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Potato virus Y*

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由全国植物检疫标准化技术委员会(SAC/TC 271)提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局、浙江大学、中国检验检疫科学研究院、黑龙江省农业科学院脱毒苗木研究所。

本标准主要起草人:刘洪义、刘忠梅、梁五生、张永江、张星哲、魏梅生、李桂芬、袁建江、范国权、封立平、杨立群。

马铃薯 Y 病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了马铃薯 Y 病毒的检疫鉴定方法。

本标准适用于可能带有马铃薯 Y 病毒的马铃薯植株、繁殖材料及其他寄主植物的检疫鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 7331 马铃薯种薯产地检疫规程

SN/T 1840 植物病毒免疫电镜检测方法

SN/T 2122 进出境植物及植物产品检疫抽样方法

3 马铃薯 Y 病毒基本信息

中文名:马铃薯 Y 病毒

学名:*Potato virus Y*

缩写:PVY

异名:Potato severe mosaic virus,Potato acropetal necrosisvirus,Solanum virus 2,Tobacco vein-banding virus,Potato leafdrop streak virus,Tobacco veinal necrosis virus,Potato virus 20

分类地位:马铃薯 Y 病毒科(*Potyviridae*),马铃薯 Y 病毒属(*Potyvirus*)。

传播途径:马铃薯种薯等无性繁殖材料传毒,机械接种可传毒,多种蚜虫以非持久性方式传播该病毒。远距离传播通过种薯等无性繁殖材料的贸易完成。据资料,马铃薯实生种子可传带该病毒,但在生产上意义不大;未见其他茄科作物种子传带该病毒的报道。

马铃薯 Y 病毒的其他信息参见附录 A。

4 方法原理

PVY 的基因组特征、免疫原性和在寄主植物上的症状特征是该病毒检疫鉴定的依据。依据 PVY 及主要株系的基因组特征建立反转录 PCR(RT-PCR)、实时荧光反转录 PCR(Real-time RT-PCR)检测方法;依据 PVY 及主要株系的免疫原性建立酶联免疫吸附测定(ELISA)方法、免疫层析试纸条检测方法和免疫电镜检测方法;依据 PVY 及主要株系在不同寄主植物上的症状特征建立鉴别寄主诊断法;依据 PVY 的基因组序列建立焦磷酸测序法鉴别株系群。通过这些方法的有效组合,判断样品是否带有 PVY 及主要株系。

5 仪器设备、用具及试剂

5.1 仪器设备

酶标仪、PCR 仪、实时荧光 PCR 仪、电泳系统、生物安全柜、小型离心机、台式冷冻离心机、水浴锅、

pH 计、凝胶成像系统、常规冰箱、电子天平(0.001 g)、涡旋振荡器、组织捣碎机、超净工作台、低温冰箱、高压灭菌锅、制冰机、微波炉、恒温培养箱、紫外-可见分光光度计、焦磷酸测序仪等。

5.2 用具

可调移液器(2.5 μL、10 μL、20 μL、100 μL、1 000 μL)、吸头、离心管、研钵、微型磨杵等。

5.3 试剂

除有特殊说明外,所有实验用试剂均为分析纯或生化试剂。

双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA)所需试剂见附录 B,免疫层析试纸条检测所需试剂见附录 C,RT-PCR 检测所需试剂见附录 D,Real-time RT-PCR 检测所需试剂见附录 E,焦磷酸测序法鉴别株系群所需试剂见附录 F。

6 样品的抽取及制备

6.1 抽样

马铃薯贸易商品或科研用薯材料或国际间种质交流材料等现场抽样按照 SN/T 2122 的规定执行,田间调查采样按照 GB 7331 的规定执行。

6.2 马铃薯组培苗、微型薯、块茎等样品的制备

将马铃薯组培苗、微型薯、块茎播于非土介质或灭菌土中,于 25 ℃左右生长并进行症状观察。待长出 3 片～4 片真叶后将表现症状的植株单独编号,未表现症状的植株分组(10 株为 1 组)并编号。表现坏死环斑等可疑症状的块茎、组培苗、微型薯,可直接用于检测,必要时再进行栽培生长实验。

6.3 茄科等寄主植物种子样品的制备

将种子(重点挑取畸形、不成熟的种子)播于灭菌土中,于 25 ℃左右生长并进行症状观察。待长出 3 片～4 片真叶后将表现症状的植株单独编号,未表现症状的植株分组(10 株为 1 组)并编号。

7 检疫鉴定方法

7.1 DAS-ELISA 检测

见附录 B。如选用合格的试剂盒,按试剂盒说明操作。

7.2 免疫层析试纸条检测

见附录 C。如选用不同生产商的合格产品,按其操作说明操作。

7.3 RT-PCR 检测

见附录 D。

7.4 Real-time RT-PCR 检测

见附录 E。

7.5 免疫电镜检测

按照 SN/T 1840 的规定执行。

7.6 焦磷酸测序法鉴别株系群

见附录F。如果没有焦磷酸测序设备，亦可采用达到相同效果的其他测序方法，结果判断不受影响。

7.7 鉴别寄主检测

见附录G。

8 结果判定

8.1 无可疑症状的样品，经PVY特异性的血清学检测(7.1、7.2任选一种)或分子检测(7.3、7.4任选一种)后，任意一项结果为阴性时，则判定样品不带有PVY；有可疑症状的样品，经PVY特异性的血清学检测(7.1、7.2任选一种)和分子检测(7.3、7.4任选一种)后，两项结果均为阴性时则判定样品不带有PVY。

8.2 PVY特异性的血清学检测结果(7.1、7.2任选一种)、分子检测结果(7.3、7.4任选一种)、免疫电镜检测结果(7.5)中任意两项为阳性时，则判定样品带有PVY。

8.3 PVY特异性的血清学检测(7.1、7.2、7.5任选一种)、分子检测(7.3、7.4任选一种)任一结果为阳性，并经鉴别寄主检测(7.7)在烟草上产生叶脉坏死症状，则判定样品带有PVY并属于N株系群。焦磷酸测序法(7.6)两个测序引物的测序结果都符合的，则判定样品带有PVY并属于N株系群；只有一个符合的，若经鉴别寄主检测(7.7)在烟草上产生叶脉坏死症状，亦判定样品带有PVY并属于N株系群。

9 样品保存与结果记录

9.1 样品保存

样品直接放于−80 ℃冰箱或冷冻干燥后放于−20 ℃或−80 ℃冰箱保存1年，保存的样品要做好标记和登记工作，以备复验、谈判和仲裁。保存期满后，应经灭活处理。

9.2 结果记录

完整的实验记录要包括样品的来源、种类、时间、实验检测时间、地点、方法和结果，并有实验人员的签字；酶联免疫吸附方法应有酶联反应的原始数据，免疫层析试纸条检测应有结果图片，RT-PCR检测应有电泳结果图片，Real-time RT-PCR检测应有扩增曲线结果图片，免疫电镜检测和焦磷酸测序应有结果图片。

附 录 A
（资料性附录）
马铃薯 Y 病毒背景资料

A.1 寄主范围

马铃薯 Y 病毒的自然寄主非常广泛，包括多达 9 个科的植物，其中涉及重要的作物，如辣椒（*Capsicum* spp.）、马铃薯（*Solanum tuberosum* ssp.*tuberosum*）、烟草（*Nicotiana* spp.）、番茄（*Lycopersicon esculentum*），还涉及一些园艺作物（*Dahlia* spp.和 *Petunia* spp.）及很多杂草（*Datura* spp.，*Physalis* spp.，*Solanum dulcamara* 和 *S. nigrum*）。在新西兰已记录了新的自然侵染寄主：南方山芫荽（*Cotula australis*）和荠菜（*Capsella bursa-pastoris*）。

已报道的人工接种可侵染的实验寄主包括 31 个科 72 个属的 495 种植物，其中包括茄科（Solanaceae）14 个属 287 种植物（这其中含 141 种茄属植物和 70 种烟草属植物）、苋科 28 种、豆科 25 种、藜科 20 种、菊科 11 种。

A.2 株系

目前大家普遍接受的株系划分方法是根据该病毒在烟草（*Nicotiana tabacum* cvs. White Burley and Samsun NN）、洋酸浆（*Physalis floridana*）及不同马铃薯品种上的症状表现，将马铃薯 Y 病毒划分为普通株系（PVY^{O}）、烟草脉坏死株系（PVY^{N}）、PVY^{C} 三个主要株系群，随着研究的深入，有学者依据该病毒与具有不同基因型背景的马铃薯品种互作的病理效应，并结合在烟草上的症状将 PVY 分为 O、N、C、Z、E 等多个不同株系类群，其中类群 N 又可分为 PVY^{N}、PVY^{NTN}、$PVY^{N\text{-}Wi}$ 等多个株系。

A.3 地理分布

马铃薯 Y 病毒在世界马铃薯种植区范围内广泛分布。在马铃薯作物上，PVY^{O} 株系世界范围内发生。PVY^{N} 株系已经在南美、欧洲、非洲、亚洲以及新西兰有报道，但在加拿大和美国却是检疫性有害生物，在那里局部发生。据目前所知 PVY^{C} 株系在欧洲、北美洲、印度、南非、澳大利亚、新西兰和厄瓜多尔有发生。PVY^{NTN} 株系在世界大多数马铃薯种植区已鉴定，包括美国、日本、秘鲁。PVY^{N}-W 株系在波兰已成为流行株系，并在其他国家已经报道，包括法国、西班牙、德国和俄罗斯。$PVY^{N;O}$ 株系在加拿大和美国有报道。

A.4 基因组特征

病毒粒子为弯曲线状，无包膜，长 680 nm～900 nm，直径 11 nm～13 nm。为单分子线形正义 ssRNA，长约 9.7 kb，编码的多聚蛋白切割产生 10 个蛋白。

A.5 寄主症状

PVY 侵染马铃薯引起的症状表现与病毒株系、栽培品种品系及环境条件有关，而且与是初侵染（介体蚜虫接种）还是再侵染（种薯感染）有关，地上植株的症状包括轻微到严重的叶片斑驳，常伴有皱缩畸

形。较下部的叶片常发生黄化和坏死(叶脉坏死和坏死斑点)。症状还包括中间叶片的坏死干枯并下垂(垂叶),可见垂叶依附于植株的主茎。再侵染植株矮化脆弱,叶片扭曲皱缩。很多品种的块茎可能发生坏死症状,1984 年发现的马铃薯块茎坏死环斑病是由 PVY^{NTN} 株系引起的,现已在世界范围内扩散。

PVY 常引起烟草、番茄、辣椒的轻微斑驳,然而常可以观察到很多不同症状,而且很多株系引起坏死。烟草叶脉坏死病是由 PVY^{N} 株系引起的,以前认为该株系是烟草叶脉坏死病毒。PVY 在辣椒上常引起叶片斑驳、沿脉变色和皱缩,有时叶片畸形脱落,植株矮化枯死。在茄子上,PVY^{C} 株系引起系统花叶,较低部的叶片可产生坏死环。

附　录　B
（规范性附录）
DAS-ELISA 检测

B.1　试剂和材料

B.1.1　酶联板的要求

使用质量有保证厂商生产的酶联板。

B.1.2　包被抗体

特异性的马铃薯 Y 病毒或其株系抗体。

B.1.3　酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的马铃薯 Y 病毒或其株系抗体。

B.1.4　底物

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)

B.1.5　PBST 缓冲液(洗涤缓冲液 pH 7.4)

氯化钠(NaCl)	8.0 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.15 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.2 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
吐温-20(Tween-20)	0.5 mL

蒸馏水定容至 1 L,4 ℃储存。

B.1.6　样品抽提缓冲液(pH 7.4)

PBST	1 L
亚硫酸钠(Na_2SO_3)	1.3 g
PVP (MW24 000～40 000)	20 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g

4 ℃储存。

B.1.7　包被缓冲液(pH 9.6)

碳酸钠(Na_2CO_3)	1.59 g
碳酸氢钠($NaHCO_3$)	2.93 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g

蒸馏水定容至 1 L,4 ℃储存。

B.1.8　酶标抗体稀释缓冲液(pH 7.4)

PBST	1 L

牛血清白蛋白(BSA)或脱脂奶粉	2.0 g
PVP(MW24 000～40 000)	20.0 g
NaN_3	0.2 g

4 ℃储存。

B.1.9 底物(pNPP)缓冲液(pH 9.8)

氯化镁($MgCl_2$)	0.1 g
叠氮钠(NaN_3)	0.2 g
二乙醇胺	97 mL

溶于 800 mL 蒸馏水中,用 HCl 调 pH 值至 9.8,蒸馏水定容至 1 L,4 ℃储存。

B.2 程序

B.2.1 包被抗体

用包被缓冲液将抗体按说明稀释,加入酶联板的孔中,100 μL/孔,加盖,37 ℃孵育 2 h,清空孔中溶液,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.2 样品制备

待测样品按 1∶10(质量:体积)加入抽提缓冲液,用研钵研磨成浆,2 000 *g* 离心 10 min,上清液即为制备好的检测样品。阴性对照、阳性对照作相应的处理或按照说明书进行。

B.2.3 加样

加入制备好的检测样品、缓冲溶液、阴性对照、阳性对照,100 μL/孔,每一样品设一重复。加盖后于 4 ℃冰箱孵育过夜或 37 ℃孵育 4 h,酶联板用自来水彻底冲洗,再用蒸馏水洗涤 1 次,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.4 加酶标抗体

用酶标抗体稀释缓冲液按说明将酶标抗体稀释至工作浓度,并加入到酶联板中,100 μL/孔,加盖,37 ℃孵育 4 h,酶联板用自来水彻底冲洗,再用蒸馏水洗涤 1 次,PBST 洗涤 3 次,每次 3 min。

B.2.5 加底物

将底物 pNPP 加入到底物缓冲液中使终浓度为 1 mg/mL(现配现用),按 100 μL/孔,加入到酶联板中,室温避光孵育。

B.2.6 读数

在不同的时间内如 30 min、1 h、2 h 或更长时间,用酶联仪在 405 nm 处读 OD 值,或用肉眼观察显色情况。

B.3 结果判断

B.3.1 对照孔的 OD_{405} 值(缓冲溶液孔、阴性对照及阳性对照孔),应在质量控制范围内,即:缓冲液孔和阴性对照孔的 OD_{405} 值＜0.15,当阴性对照孔的 OD_{405} 值＜0.05 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD_{405} 值/阴

性对照 OD_{405} 值＞5～10；同一样品的重复性基本一致。

B.3.2 若满足 B.3.1 的质量要求，结果原则上可判断如下：

——样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值≥2，判为阳性；

——样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值＜2，判为阴性。

B.3.3 若不满足 B.3.1 质量要求，则不能进行结果判断。

附　录　C
（规范性附录）
免疫层析试纸条检测

C.1　试剂

样品抽提缓冲液，配制方法见B.1.5。

C.2　检测样品的制备

测试的样品按1∶10(质量∶体积)加缓冲液，经研磨后，低速离心取上清液(未离心的样品在测试时，一些大颗粒物质的存在，易影响液流的上行，从而使得检测效果不佳)，每一样品取约250 μL～1.5 mL的离心管中，以能走完试纸条为宜，测试样品体积过多，可稀释胶体金，使得测试效果不好。

C.3　操作步骤

测试前将试纸条恢复至室温。

将试纸条含胶体金复合物的一端插入到样品中，样品液不要超过胶体金试纸条上的MAX线。测试观察的时间以10 min～20 min为好。对于病毒浓度低的样品时间可适当延长。

C.4　结果判断

C.4.1　质控点(线)显粉红色，测试点(线)也显粉红色，检测结果为阳性。

C.4.2　质控点(线)显粉红色，测试点(线)未显色，检测结果为阴性。

C.4.3　质控点(线)和测试点(线)均未显色，说明试纸条失效，检测结果无效。

C.5　贮存

试纸条应在2 ℃～8 ℃冰箱内密封干燥保存。

C.6　试纸条有效性的判断方法：

C.6.1　用阳性对照进行测试，测试点(线)显色，质控点(线)也显色，说明整个系统工作正常。

C.6.2　用阳性对照进行测试，测试点(线)显色，而质控点(线)未显色，说明羊抗兔失效。

C.6.3　用阳性对照进行测试，测试点(线)未显色，而质控点(线)显色，说明测试点(线)的特异性抗体失效。测试纸条失效不能用。

C.6.4　用阳性对照进行测试，若测试点(线)未显色，质控点(线)也未显色，说明整个测试纸条失效，不能用。

附 录 D
（规范性附录）
RT-PCR 检测

D.1 试剂

D.1.1 TrizoL。

D.1.2 50×TAE：

Tris	242 g
冰醋酸	57.1 mL
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	37.2 g

加去离子水定容至 1 L。用时加水稀释至 1×TAE。

D.1.3 6×加样缓冲液：

0.25% 溴酚蓝

0.4 g/mL 蔗糖水溶液

D.2 实验步骤

D.2.1 总 RNA 提取

称取 0.1 g 植物组织加液氮研磨成粉末状，迅速将其移入灭菌的 1.5 mL 离心管中，加入 1 mL 的 TrizoL，剧烈震荡摇匀 3 min；4 ℃，12 000 *g* 离心 10 min，取上清液；加入饱和苯酚-三氯甲烷-异戊醇（25∶24∶1），500 μL，上下颠倒混匀；4 ℃，12 000 *g* 离心 10 min，取上清液；重复饱和苯酚-三氯甲烷-异戊醇抽提步骤 1 次；加 0.6 倍体积的异丙醇，颠倒混匀；4 ℃，12 000 *g* 离心 10 min，弃上清液；加 75% 的乙醇洗涤沉淀，4 ℃，7 500 *g* 离心 2 min，弃乙醇；沉淀于室温下充分干燥后，溶于 30 μL ddH_2O（DEPC 处理）中，−20 ℃保存备用。

也可采用其他有效的 RNA 提取方法。

D.2.2 RT-PCR 反应

D.2.2.1 引物合成

引物序列见表 D.1。

表 D.1 RT-PCR 检测的引物序列

试剂名称	引物序列
PVY-al-F420	5′-CGATACAAGACTGATGYCCAGAT-3′
PVY-al-R1200	5′-TAYTGTTGRGCACAGGTRGGG-3′

D.2.2.2 反转录合成 cDNA

反转录体系见表 D.2。

表 D.2 反转录体系

试剂名称	加样体积/μL
RNA	2
20 μmol/L PVY-al-R1200	1
在 70 ℃温育 5 min,然后立即置于冰上;放置 5 min	
5×反转录反应缓冲液	4
10 mmol/L dNTPs	1
40 U/μL RNA 酶抑制剂	0.5
200 U/μL M-MLV 反转录酶	1
DEPC-H_2O 补足至	20

反应参数:42 ℃,45 min;95 ℃,10 min。合成的 cDNA 置于−20 ℃保存备用。也可采用 RT-PCR 一步法试剂盒,操作步骤按使用说明进行。

D.2.2.3 PCR 反应

PCR 反应体系见表 D.3。反应参数:95 ℃ 4 min ; 95 ℃ 30 s, 62 ℃ 45 s, 72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 3min。

表 D.3 PCR 反应体系

试剂名称	加样体积/μL
10×PCR 反应缓冲液	2.5
25 mmol/L $MgCl_2$(反应缓冲液中已含有的可不加入)	2.5
10 mmol/L dNTPs	1
20 μmol/L PVY-RT-F	1
20 μmol/L PVY-RT-R	1
5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶	0.2
cDNA 模板	2
ddH_2O 补足至	25

D.2.3 琼脂糖凝胶电泳检测

将制胶板同制好的琼脂糖凝胶一并放入水平电泳槽,取 5 μL 扩增反应物加 1 μL 的 6×溴酚蓝上样缓冲液混匀,以及 5 μL DNA Marker 作为分子量标准物分别点入样孔内。电泳缓冲液 1×TAE 适量,100 V,电泳 30 min。电泳结束后,放入 0.5 μg/mL 溴化乙锭(或其替代物)溶液中染色 10 min,将整个凝胶置于凝胶成像系统上拍照,记录结果。

D.3 结果判断

D.3.1 阳性对照在 823 bp 处有扩增片段,阴性对照和空白对照无特异性扩增,待测样品出现与阳性对

照一致的扩增条带,可判定为阳性。

D.3.2 阳性对照在823 bp处有扩增片段,且阴性对照、空白对照和样品在该处无扩增条带,判定结果为阴性。

附 录 E
（规范性附录）
Real-time RT-PCR 检测

E.1 Real-time RT-PCR 试剂

一步法 RT-PCR 反应混合液（TaqMan One-step RT-PCR Mixture）。

E.2 实验步骤

E.2.1 核酸提取

核酸提取见 D.2.1。

E.2.2 引物合成

引物序列见表 E.1。

表 E.1 Real-time RT-PCR 检测的引物序列

引物名称	序列（5′-3′）
PVY-105F	5′-GGGTTTAGCGCGTTATGCC-3′
PVY-105R	5′-TCTTGTGTACTGATGCCACCG-3′
PVY-Probe	5′-HEX-CAGTGAGGGCTAGGGAAGCGCACA-BHQ1-3′

E.2.3 实时荧光 RT-PCR 反应

反应体系：0.2 mL 离心管中加入 2×一步法 RT-PCR 缓冲液Ⅲ（One Step RT-PCR Buffer Ⅲ）10 μL，*Ex Taq*HS(5 U/ μL)0.4 μL，PrimeScript RT 酶混合液Ⅱ（PrimeScript RT Enzyme Mix Ⅱ）0.4 μL，PVY-105F 10 μmol/L)0.4 μL，PVY-105R（10 μmol/L）0.4 μL，PVY-Probe（10 μmol/L）0.6 μL，ROX 参比染料 II(ROX Reference Dye II)0.4 μL，模板 RNA 2 μL，补 DEPC-H_2O 至 20 μL。设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应程序：42 ℃ 10 min；95 ℃ 10 s；95 ℃ 5 s，62 ℃ 34 s，45 个循环。

PCR 反应体系中各种试剂的量可根据具体情况进行适当调整，也可采用商业化试剂盒。

E.3 结果判定

E.3.1 基线的设置

Real-time RT-PCR 反应结束并分析结果后，应设置无效基线范围。基线范围选择在 3 个～15 个循环，如果有强阳性样本，应根据实际情况调整基线范围。

E.3.2 检测结果的判定

在阳性对照、阴性对照和空白对照正确的前提下：

——检测样品的 Ct 值小于 35，且出现特定的扩增曲线，判定结果为阳性。Ct 值介于 35～40 时为疑似阳性，需要重新进行测试，或采用其他方法进行验证。

——检测样品的 Ct 值大于 40，或未出现特定的扩增曲线，判定结果为阴性。

附 录 F
（规范性附录）
焦磷酸测序法鉴别株系群

F.1 试剂

F.1.1 TrizoL。

F.1.2 50×TAE

见 D.1.2。

F.1.3 6×加样缓冲液

见 D.1.3。

F.2 实验步骤

F.2.1 总 RNA 提取

操作方法见 D.2.1。

F.2.2 反转录合成 cDNA

反转录体系见表 F.1。

表 F.1 反转录体系

试剂名称	加样体积/μL
RNA	2
20 μmol/L 反转录引物	1
在 70 ℃温育 5 min,然后立即置于冰上;放置 5 min	
5×反转录反应缓冲液	4
10 mmol/L dNTPs	1
40 U/μL RNA 酶抑制剂	0.5
200 U/μL M-MLV 反转录酶	1
DEPC-H_2O 补足至	20

反转录引物分别为 R003 和 R004,它们的序列分别为(括号中的碱基表示简并碱基):

R003:5′-TCCATCATG(A)GTTGGCCAG(T)GTTCC-3′

R004:5′- TCAC(T)TCTTC(T)TCT(A)ATCTGCATCAAC(T)TC-3′

反应体系中各试剂的量可根据具体情况或不同的反应总体积进行适当调整。反应参数:42 ℃,45 min;95 ℃,10 min。合成的 cDNA 置于−20 ℃保存备用。

也可采用商业试剂盒,操作步骤按使用说明进行。

F.2.3 PCR 扩增

取反转录产物进行 PCR 扩增,PCR 反应体系见表 F.2。反转录引物 R003 的反转录产物用 PCR 引

物 HC-PRO-F1 和 HC-PRO-R-biotin 进行 PCR 扩增,PCR 产物长度为 175 bp。反转录引物 R004 的反转录产物用 PCR 引物 P3-F1 和 P3-R-biotin 进行 PCR 扩增,PCR 产物长度为 195 bp。反应参数:95 ℃ 4 min; 95 ℃ 15 s, 63 ℃ 30 s, 72 ℃ 18 s,45 个循环;72 ℃ 5 min。

表 F.2 PCR 反应体系

试剂名称	加样体积/μL
10×PCR 反应缓冲液	5
25 mmol/L $MgCl_2$(反应缓冲液中已含有的可不加入)	5
10 mmol/L dNTPs	4
20 μmol/L 上游引物	1
20 μmol/L 下游引物	1
5 U/μL *Taq*DNA 聚合酶	0.4
cDNA 模板	4
ddH_2O 补足至	50

引物 HC-PRO-F1、HC-PRO-R-biotin、P3-F1 和 P3-R-biotin 的序列分别为(括号中的碱基表示简并碱基,“5′-biotin-”表示 5′端用生物素标记):

HC-PRO-F1:5′-TTGTA(C/T)CCACTT(C/G)GATC(T)TG(A)GCTG(C)AG(A)TTTA-3′

HC-PRO-R-biotin:5′-biotin-TTA(G)GTTGGT(C)GGA(G)TAG(A)AATGTTGATTC-3′

P3-F1:5′-CATATCACCA(G)CAAGCA(G/C)TTCTTGGG-3′

P3-R-biotin:5′-biotin-GTT(C)AA(G)CATACT(C)AATA(G)ACTAA(C)TAATGAG(A)TT-3′

F.2.4 琼脂糖凝胶电泳检测

取 PCR 扩增产物用 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳,方法参照 D.2.3。出现清晰条带且长度符合预期的 PCR 产物用于焦磷酸测序。

F.2.5 焦磷酸测序

测序试剂从与所用焦磷酸测序仪配套的试剂公司购买。按焦磷酸测序仪说明书的程序抓取单链 PCR 模板,并进行焦磷酸自动测序。从引物 HC-PRO-F1 和 HC-PRO-R-biotin 扩增的产物中抓取的单链 PCR 模板,用引物 HC-PRO-F1 作为测序引物进行测序。从引物 P3-F1 和 P3-R-biotin 扩增的产物中抓取的单链 PCR 模板,用引物 P3-F1 作为测序引物进行测序。

F.2.6 结果判定

利用以引物 HC-PRO-F1 作为测序引物进行测序所得测序结果的前 50 个碱基参照表 F.3 判定是否属于 N 株系群。利用以引物 P3-F1 作为测序引物进行测序所得测序结果的前 50 个碱基参照表 F.4 判定是否属于 N 株系群。两个测序引物的测序结果都符合的,可判定为 N 株系群;只有一个测序结果符合的,若经鉴别寄主检测(7.7)在烟草上产生叶脉坏死症状,则判定为 N 株系群。

表 F.3　用测序引物 HC-PRO-F1 测序时 N、O、C 株系群可能出现的序列(前 50 个碱基)

株系群	序列(5′-3′)
N	GGCGGAAGATGAAAGGTGATTATAAAAGACAGCCAGGGGTGAGTAAGAAG
	GGCGGAAGATGAAAGGTGATTATAAAAGACAGCCAGGGGTGAGCAAGAAG
	GGCAGAAGATGAAAGGTGACTATAGGAAACAACCAGGGGTCAGCAAAAAG
O	GGCAGAAGATGAAAGGTGATTATAGGAAACAACCAGGAGTCAGCAGAAAA
	GGCAGAAGATGAAAGGTGACTATAGGAAACAACCAGGAGTTAGCAGAAAG
C	GGCAGAAGATGAAAGGTGATTATAGGAGACGACCAGGGGTCAGCAAAAAG
	GACAGAAGATGAAAGGTGACTATAGGAAGCAACCAGGGGTCAGCAAAAGG

表 F.4　用测序引物 P3-F1 测序时 N、O、C 株系群可能出现的序列(前 50 个碱基)

株系群	序列(5′-3′)
N	CCGAGGCGCCCAGGTGGTCAAAGGCACTGCCTCAGGATTGAGCGAGCGAT
	CCGAAGCGCCCAGATGGTCAAAGGTACTGCCTTAGGATTGAGCGAGCGAT
	CCGAAGCGCCCAGGTGGTCAAAGGCACTGCCTCAGGATTGAGCGAGCGAT
	TCAGGGCGTACAGAGAGTCAAAGGCACCGCCTCAGGGTTGAATGAGCGAC
	TCAGGGCGTACAGAGAGTCAAAGGCACCGCCTCAGGGTTAAATGAGCGAC
O	CCGAAGCGCCCAGGTGGTCAAAGGTACTGCCTCAGGATTGAGCGAGCGAT
	CCGAAGCGCCCAGGTGGTCAAAGGTACTGCCTCAGGATTGAGTGAGCGAT
	TCGAAGTGCCCAGGTAGTCAAAGGTACTGCCTCAGGATTGAGCGAGCGAT
C	TCAAAGCGTTCAGAGGGTCAAGGGCACTGCTTCAGGATTGAGCGATAGAT
	TCAAAGCGTCCAGAGGGTCAAAGGCACTGCTTCAGGGTTGAGCGAGCGAT

附 录 G
（规范性附录）
N 株系群的鉴别寄主测试

G.1 试剂

磷酸盐缓冲液(PBS)pH 7.2,PBS 为不含有吐温-20 的 PBST,参照附录 B 中 PBST 的配制方法。

G.2 鉴别寄主种类

三生烟(*Nicotiana tabacum* cv.Sumsun)、白肋烟(*Nicotiana tabacum* cv.White burely)、黄苗榆烟(*Nicotiana tabacum*)、*Nicotiana tabacum* cv. Xan thi。

G.3 接种

经 7.1～7.5 任一方法检测为阳性的病叶加 1∶1(质量∶体积)的磷酸盐缓冲液于研钵中充分研碎,在待接种植物叶片表面均匀洒上金刚砂或硅藻土,用软毛笔或手指蘸取研磨好的汁液轻轻涂抹于叶片表面,接种后立即洒水冲洗叶面几秒钟,然后放置于防虫环境中,温度保持在 25 ℃左右,正常光照条件。

G.4 N 株系群在鉴别寄主上的症状

三生烟(*Nicotiana tabacum* cv. Sumsun):叶脉坏死。

白肋烟(*Nicotiana tabacum* cv. White burely):叶脉坏死,可产生系统的沿脉变色。

黄苗榆烟(*Nicotiana tabacum*):叶脉坏死。

Nicotiana tabacum cv. Xan thi:叶脉坏死,叶片畸形(向下卷曲),植株矮化。

GB/T 36816—2018

中 华 人 民 共 和 国

国 家 标 准

马铃薯Y病毒检疫鉴定方法

GB/T 36816—2018

*

中国标准出版社出版发行

北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)

北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 38 千字

2018年9月第一版 2018年9月第一次印刷

*

书号:155066·1-61266 定价 24.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话:(010)68510107

GB/T 36816-2018