



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1617—2017
代替 SN/T 1617—2005

可可肿枝病毒检疫鉴定方法

Detection and identification of *Cacao swollen shoot virus*

2017-07-21 发布

2018-03-01 实施

中 华 人 民 共 和 国 发 布
国家质量监督检验检疫总局

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 SN/T 1617—2005《可可肿枝病毒检测方法》，与 SN/T 1617—2005 相比，主要技术变化如下：

- 完善了原标准的检测方法，增加实时荧光 PCR 检测方法；
- 完善了原标准的基因组内容；
- 删除了原标准中的免疫诱捕 PCR 方法，增加了 PCR 方法；
- 修改了原标准中结果判断；
- 修改了原标准中附录。

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。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国中山出入境检验检疫局、中华人民共和国江苏出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：魏梅生、陈定虎、相宁、李桂芬、吴翠萍、郭京泽。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- SN/T 1617—2005。

可可肿枝病毒检疫鉴定方法

1 范围

本标准规定了可可肿枝病毒的检测方法。

本标准适用于进境植物材料中可可肿枝病毒的检疫检测。

2 可可肿枝病毒基本信息

学名:*Cacao swollen shootvirus*

缩写:CSSV

中文名:可可肿枝病毒

异名:*Theobroma virus* 1;*Marmor theobromae*;*Theobromavirus inflans*。

分类地位:花椰菜花叶病毒科(*Caulimoviridae*);杆状 DNA 病毒属(*Badnavirus*)。

CSSV 的其他信息参见附录 A。

3 方法原理

CSSV 的蛋白和基因组特征是该病毒检疫鉴定的依据。根据 CSSV 与抗体之间的特异性反应,对植物样品进行双抗体夹心酶联免疫吸附测定(DAS-ELISA);依据 CSSV 的基因组特征建立 PCR、实时荧光 PCR;通过这些方法的有效组合,判断样品是否带有 CSSV。

4 仪器、用具及试剂

4.1 仪器设备

酶联检测仪、天平(感量 0.001 g)、PCR 仪、电泳仪、实时荧光 PCR 仪、电泳槽、紫外透射仪、隔离温室、榨汁机、水浴锅等。

4.2 用具

可调移液器(200 μ L、20 μ L、2 μ L)、可调移液器头、酶联板、离心管、指型管、研钵等。

4.3 试剂

酶联测定试剂(见附录 B)、聚合酶链式反应检测试剂(见附录 C)。

5 检测方法

5.1 双抗体夹心酶联免疫吸附测定

见附录 B。

5.2 聚合酶链式反应(PCR)检测

见附录 C。

5.3 实时荧光 PCR 检测

见附录 D。

5.4 生物学测定

参见附录 E。

6 结果判定

样品检测流程及结果判定按下述原则进行。

——若 DAS-ELISA 检测结果为阳性时：

PCR 的检测结果为阳性，则判定样品携带 CSSV；

或采用实时荧光 PCR 进行检测，若检测结果为阳性，则判定样品携带 CSSV。

——若 DAS-ELISA 检测结果为阴性时：

PCR 的检测结果为阴性，则判定样品不携带 CSSV；

检测结果为阳性，则对产物进行测序，测定的序列为 CSSV 序列，则判定样品携带 CSSV。

必要时可进行生物学传毒测定，并进行复验。

7 样品保存与复核

7.1 样品保存

鉴于可可肿枝病毒为检疫性有害生物，应做好以下准备，并在一周内接受复核。

病毒要有活体样品存在，其他样品应妥善保存于 -80°C 冰箱中，以备复核。

7.2 结果记录与资料保存

完整的实验记录包括：样品的来源、种类、时间，实验的时间、地点、方法和结果等，并要有经手人和实验人员的签字。生物学测定需有鉴别寄主的症状照片，酶联测定需有酶联板反应的照片和原始数据，PCR 检测需有电泳结果照片，实时荧光 PCR 检测应有荧光曲线图。

7.3 复核

由指定的单位或人员负责。主要考察实验记录、照片等资料的完整性和真实性，必要时进行复核实验。

附 录 A
(资料性附录)
可可肿枝病毒其他信息

A.1 寄主范围

重要的自然寄主有可可(*Theobroma cacao*)、厚皮可乐果(*Cola chlamydantha*)、吉贝(*Ceiba pentandra*)大可乐果变近无毛变种(*Cola gigantean* var. *glabrescens*)和一种苹婆属植物 *Sterculia tragacantha*。人工接种还可侵染木棉科(Bombacaceae)、椴树科(Tiliaceae)、梧桐科(Sterculiaceae)、锦葵科(Malvaceae)等 30 种植物,其中猴面包树(*Adansonia digitata*)和 *Cola cordifolia* 易感病。

A.2 病害症状

A.2.1 肿枝

生长较快的枝条节、节间和末梢发生肿大,一些分离物还能使根部,特别是根尖产生肿大,有时侧根坏死。肿茎和肿根症状中,次生木质部和韧皮部都有所增加,但木质部不发生坏死。

A.2.2 叶片

叶片上的症状最初表现出明脉,形成网纹状,接着沿叶脉变红,随着叶片变绿而坚硬,红脉逐渐消失,有的叶片则产生褪绿,叶片褪绿斑部分组织不分化,其中有小型退化的叶绿体,细胞间隙缩小。

A.2.3 果实

幼嫩的果荚,形成墨绿或浅绿的斑驳,后期则发展成深红色大理石状纹。受侵果荚呈圆形比正常的果荚小,其中可可豆的重量只有健康的一半,可可豆比正常的要扁平,子叶呈灰白色。

A.3 分布

分布于加纳、科特迪瓦、尼日利亚、多哥、塞拉利昂、斯里兰卡、印度尼西亚。

A.4 传播途径

可可肿枝病毒可通过嫁接、机械接种和多种粉蚧传播。在自然状况下,CSSV 主要通过粉蚧来传播,粉蚧传播最主要的种有尼兰粉蚧(*Planococcoides njalensis*)、肯尼亚咖啡粉蚧(*Planococcus kenyae*)、橘粉蚧(*Planococcus citri*)和热带弗氏粉蚧(*Ferrisia virgata*)。若虫和雌成虫是有效的传毒介体,但雄成虫不传播病毒,粉蚧的传毒机制比较接近于半持久性,但尼兰粉蚧若虫在饲毒后蜕皮仍有保毒能力。

A.5 粒体形态

可可肿枝病毒粒体杆菌状,长度为 121 nm~130 nm,宽为 28 nm。

A.6 基因组

病毒基因组为双链环状 DNA,有 2 个不连续区,基因组全序列为 7 006 bp~7 297 bp。具有 5 个开放式阅读框架(ORF),分别为 ORF1、ORF2、ORF3、ORFX 和 ORFY。它们分别编码 16.7 kDa 蛋白、14.4 kDa 核酸结合蛋白、211 kDa 多聚蛋白(细胞间移动蛋白、外壳蛋白的 RNA 结合区域、天冬氨酰蛋白酶、反转录酶、核糖核酸酶 H)、13 kDa 和 14 kDa 蛋白。

附 录 B
(规范性附录)
双抗体夹心酶联免疫吸附测定

B.1 试材

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

特异性的可可肿枝病毒抗体。

B.1.3 酶标抗体

碱性磷酸酯酶标记的可可肿枝病毒抗体。

B.1.4 底物

对硝基苯磷酸二钠(pNPP)。

B.1.5 样品抽提缓冲液(pH 7.4)

PBST	1 L
亚硫酸钠(Na_2SO_3)	1.3 g
聚乙烯吡咯烷酮(PVP, MW 24 000~40 000)	20 g
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
4 °C 储存。	

B.1.6 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
叠氮化钠(NaN_3)	0.2 g
蒸馏水定容至 1 L, 4 °C 储存。	

B.1.7 PBST 缓冲液(洗条缓冲液 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。	

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
聚乙烯吡咯烷酮(PVP,MW 24 000~40 000)	20.0 g
叠氮化钠(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
叠氮化钠(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 r/min 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、阴性对照、阳性对照,100 μL /孔,加盖,4℃冰箱孵育过夜,取出的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 OD₄₀₅ 值(缓冲液孔、阴性对照及阳性对照孔),应该在质量控制范围内,即:

缓冲液孔和阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值<0.15,当阴性对照孔的 OD₄₀₅ 值<0.05 时,按 0.05 计算;阳性对照 OD₄₀₅ 值/阴性对照 OD₄₀₅ 值>5~10;孔的重复性基本一致。

B.3.2 在满足了 B.3.1 质量要求后,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} 值在阈值附近,判为可疑样品,需重新做一次,或用其他方法加以验证;样品 OD_{405} 值/阴性对照 OD_{405} 值 <2 , 判为阴性。

B.3.3 若满足不了 B.3.1 质量要求,则不能进行结果判断。

附 录 C
(规范性附录)
PCR 检测

C.1 试剂

C.1.1 核酸提取试剂

商品化的植物 DNA 提取试剂盒。

C.1.2 3 mol/L 醋酸钠(pH 5.2)

称取 408.1 g 含 3 个分子结晶水的乙酸钠,溶于 800 mL 水中,用冰乙酸调至 pH 5.2,定容至 1 L,分装高压灭菌。

C.1.3 50×TAE

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	242 g
冰醋酸	52.1 mL
乙二胺四乙酸二钠($\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	37.2 g

加蒸馏水至 1 L。用时加蒸馏水稀释至 1×TAE。

C.1.4 6×加样缓冲液

- 0.25% 溴酚蓝。
- 40% 蔗糖蒸馏水溶液。

C.2 实验步骤

C.2.1 核酸提取

按商品化的试剂盒说明书操作。

C.2.2 引物

- 正向引物(CSSV-f):5'-AACCTTGAGTACCTTGACCT-3'
- 反向引物(CSSV-r):5'-TCATTGACCAACCCACTGGTCAAG-3'
- PCR 产物大小为 375 bp。

C.2.3 PCR 反应

反应体系:20 μL ;在 0.2 mL PCR 管中加入 10×PCR 缓冲液(含 Mg^{2+})2 μL ,dNTPs(10 mmol/L)0.6 μL ,CSSV 正向及反向引物(均为 20 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ,*Taq* DNA 聚合酶(2 U/ μL)1 μL ,模板 2 μL 和灭菌的 ddH₂O 13.4 μL 。设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 15 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,35 个循环;60 $^{\circ}\text{C}$ 30 min。反应结束后,取 5 μL PCR 产物进行琼脂糖电泳。

C.2.4 琼脂糖电泳

C.2.4.1 制备凝胶

将 TAE 和电泳级琼脂糖按 1.5% 配好,在微波炉中熔化混匀,冷却至 55 ℃ 左右。

C.2.4.2 加溴化乙锭

加入溴化乙锭浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,混匀,倒入已封好的凝胶平台上,插上样品梳。待凝胶凝固后,从制胶平台上除去封带,拔出梳子,加入足够量的 TAE(缓冲液没过凝胶表面约 1 mm)。

C.2.4.3 加样

用适量的(约 1 μL ~2 μL)6 \times 加样缓冲液分别与 5 μL 样品混合,然后将其和适合的 DNA 分子量标准物分别加入到样品孔中。

C.2.4.4 电泳

接通电源使 DNA 向阳极移动。当加样缓冲液中的溴酚蓝迁移至足够分离 DNA 片段时,关闭电源。将整个胶置于紫外透射仪上观察。

C.3 结果判断

通过观察,若有相应大小的产物带出现,即可判定为阳性。

附 录 D
(规范性附录)
实时荧光 PCR 检测

D.1 试剂

核酸提取试剂同 C.1.1。

D.2 引物探针

上游引物(CSSV-F):5'-CCTTAAGAGGCTAACCAAGC-3'
下游引物(CSSV-R):5'-GGGCTATCTCTTCTACTAGTC-3'
TaqMan 探针(CSSV-Probe):5'-FAM-TTCCGAGAAAACAAACCACTGTCTGAA-TAMRA-3'

D.3 核酸提取

方法同 C.2.1。

D.4 实时荧光 PCR 反应

反应体系:0.2 mL 离心管中加入 10×PCR 缓冲液(含有 Mg^{2+})2.5 μ L,dNTP(10 mmol/L)1 μ L,
Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)0.4 μ L,CSSV-F(10 μ mol/L)0.4 μ L,CSSV-R(10 μ mol/L)0.4 μ L,CSSV-
Probe(10 μ mol/L)0.6 μ L,ROX Reference Dye II 0.4 μ L,模板 DNA 2 μ L,补灭菌的 ddH₂O 至 20 μ L。
设置阳性对照、阴性对照及空白对照。

反应程序:95 $^{\circ}$ C 10 s,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,共 40 个循环。

D.5 结果判定

在空白对照及阴性对照无 Ct 值且无扩增曲线、阳性对照 Ct 值 ≤ 30 并出现典型扩增曲线的条件下:

待测样品的 Ct 值 ≥ 40 时,判定 CSSV 阴性。

待测样品的 Ct 值 ≤ 35 时,判定 CSSV 阳性。

待测样品的 Ct 值小于 40 而大于 35 时,应重新进行测试;如果重新测试的 Ct 值 ≥ 40 ,判定 CSSV 阴性;如果重新测试的 Ct 值小于 40 而大于 35,且分离曲线明显时,则判定结果为阳性。

附 录 E

(资料性附录)

生物学测定

E.1 嫁接

将具有肿枝症状的芽作为接穗,接于健康的砧木上,在出芽后的 6 周到 2 个月的时间内,叶部症状为褪绿。芽上的嫩叫萎蔫,只剩下具托叶的绿色枝条。茎上的腋芽常抽出 2 根~3 根枝条,多数枯死,枝条基部肿大,最终症状为主茎肿大。上述症状在芽接后的 5 个月~8 个月内出现,并常引起顶死。

E.2 机械接种

由尼兰粉蚧接毒的猴面包树和 *Bombax brevicuspe* 幼苗分别在接种后 2 周~10 周和 20 周~30 周收获,在收获前将苗放在弱光下处理 24 h~48 h,收获后的病叶,除去叶脉,用含有磷酸盐、半胱氨酸、乙二胺四乙酸盐溶液真空浸透,第一次浸透后将溶液倒掉,叶片在新鲜溶液中再浸透一次,取出叶片在预冷的研钵中研磨,所得的粘液涂于半粒可可豆的内表和胚部,冲洗后,次日种植。

E.3 介体传播

E.3.1 饲毒

出现症状的幼嫩病叶是给粉蚧饲毒的最好毒源。饲毒前的禁食有利于提高传毒效率,但不要超过 10 h。最短饲毒时间为 20 min,最适为 50 min,或 2 d~4 d。最短接毒时间为 15 min,通常最大的传毒效率发生在 2 h~10 h 内。

E.3.2 接毒

E.3.2.1 测试植物

10 个月龄~12 个月龄的可可树、发芽可可幼苗或可可豆可作为测试植物。10 个月龄~12 个月龄的可可树接种后潜伏期为 17 d~49 d。3 周~5 周的幼苗潜伏期平均为 31 d,可可豆则为 17 d~25 d。可可豆的子叶是测试接毒效果的最好材料,对可可树或幼苗来说,每株接 5 头粉蚧可望能获得 30% 的传毒率,而可可豆传毒效率能达 100%。

E.3.2.2 可可豆的接种方法

白成熟果荚中取出可可豆,去壳将其中一子叶解剖开,暴露出另一子叶的内面,将饲毒后的昆虫小心地刷到在玻璃罩内放置的可可豆上,用滤纸保湿,当接毒试验完成后用尼古丁溶液杀死昆虫。可可豆种于防虫的消毒砂子中。传毒试验常在 29 ℃~36 ℃ 条件下进行。可可豆刚发芽时无症状,待第一、第二、第三对真叶出现时,就陆续显现症状。

E.4 症状

可可 Amelonado 品种对 CSSV 很敏感,可可豆经粉蚧传毒或机械接种,幼苗在 20 d~30 d 内,叶部

出现沿脉变红及褪绿症状,2周~12周后肿大,根变成水龙头状。

黄麻属植物(*Corchorus* spp.)对多数毒株敏感,很快死亡。

有些毒株引起吉贝、厚皮可乐果、大可乐果暂时沿叶脉褪绿症状,猴面包树发生明显的长期褪绿和严重矮化。

参 考 文 献

- [1] Muller E, Sackey S. Molecular variability analysis of five new complete cacao swollen shoot virus genomic sequences[J]. Archives of virology, 2005, 150(1): 53-66.
- [2] Oro F, Mississso E, Okassa M, et al. Geographical differentiation of the molecular diversity of cacao swollen shoot virus in Togo[J]. Archives of virology, 2012, 157(3): 509-514.
- [3] Quainoo, A K. Real-time quantitative PCR assay analysis, evaluation and optimization for the cacao swollen shoot virus[J]. Research in Biotechnology, 2014, 5(5): 7-13.
- [4] Kenten, R H, Woods, R D. A virus of the cacao swollen shoot group infecting cocoa in North Sumatra[J]. PANS, 1976, 22(4): 488-490.
- [5] Quainoo, AK, Wetten, AC, Allainguillaume J. The effectiveness of somatic embryogenesis in eliminating the cacao swollen shoot virus from infected cocoa trees[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 149: 91-96.
- [6] Muller E, Jacquot E, Yot P. Early detection of cacao swollen shoot virus using the polymerase chain reaction[J]. Journal of Virological Methods, 2001, 93: 15-22.
- [7] Quainoo, A K, Wetten, AC, Allainguillaume J. Transmission of cacao swollen shoot virus by seeds[J]. Journal of Virological Methods, 2008, 150: 45-49.
- [8] Ameyaw G A, Wetten A, Dzahini-Obiatey H, et al. Investigation on Cacao swollen shoot virus (CSSV) pollen transmission through cross-pollination[J]. Plant Pathology, 2013, 62: 421-427.