



## МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ПО ФИТОСАНИТАРНЫМ МЕРАМ

### МСФМ 27 ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ПРОТОКОЛЫ

#### ДП 7:

#### ***Вирус веретеновидности клубней картофеля***

(Принят в 2016 году; опубликован в 2016 году)

#### Содержание

1.	Информация о вредном организме .....	3
2.	Таксономическая информация .....	4
3.	Выявление .....	4
3.1	Отбор образцов.....	6
3.2	Выявление с использованием биологических методов .....	7
3.3	Выявление с использованием молекулярных методов.....	7
3.3.1	Подготовка образцов .....	7
3.3.2	Выделение нуклеиновых кислот.....	8
3.3.3	Стандартные молекулярные методы выявления посивироидов.....	10
3.3.3.1	R-PAGE .....	10
3.3.3.2	Гибридизация с DIG-меченой кРНК-пробой.....	11
3.3.3.3	Стандартная ОТ-ПЦР с использованием праймеров, разработанных Verhoeven <i>et al.</i> (2004).....	11
3.3.3.4	ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием метода GenPospi (Botermans <i>et al.</i> , 2013).....	12
3.3.4	Высокоспецифичные молекулярные методы обнаружения ВВКК.....	13
3.3.4.1	Стандартная ОТ-ПЦР с использованием праймеров, разработанных Shamloul <i>et al.</i> (1997).....	13
3.3.4.2	ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров, разработанных Voornham <i>et al.</i> (2004).....	14
3.3.4.3	ОТ-ПЦР в режиме реального времени (тест-система Plant Print Diagnostics)...	15
3.4	Контроли молекулярных анализов.....	15

---

3.5	Интерпретация результатов стандартной ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени .....	17
3.5.1	Стандартная ОТ-ПЦР.....	17
3.5.2	ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	17
4.	Идентификация.....	17
4.1	Секвенирование и анализ последовательности.....	18
5.	Данные.....	19
6.	Контактные лица для получения дополнительной информации .....	19
7.	Благодарности.....	20
8.	Справочные материалы.....	20

## 1. Информация о вредном организме

Вироиды – лишенные белковой оболочки, ковалентно замкнутые кольцевые одноцепочечные молекулы РНК, от 239 до 401 нуклеотида в длину, которые реплицируются за счет ферментов клетки-хозяина (Hammond & Owens, 2006). Длина вириоида веретеновидности клубней картофеля (ВВКК; род *Pospiviroid*) обычно составляет 359 нуклеотидов, но имеются сообщения об изолятах ВВКК, состоящих из 341–364 нуклеотидов (Wassenegger *et al.*, 1994; Shamloul *et al.*, 1997; Jeffries, 1998). На основании выраженности симптомов, вызванных у чувствительных сортов томатов, например сорта *Rutgers* (Fernow, 1967), говорят о т.н. "мягком" и "суровом" штаммах.

Спектр естественных хозяев ВВКК относительно узок. Основными естественными хозяевами являются столоно- и клубнеобразующие виды *Solanum*, например, *Solanum tuberosum* L. (картофель) и *S. lycopersicum* (томат). ВВКК был обнаружен также в *Capsicum annuum*, *Persea americana* и *S. muricatum*. ВВКК обнаруживается главным образом в размножающихся вегетативно видах декоративных растений семейства Solanaceae, а именно, *Brugmansia* spp., *Cestrum* spp., *Datura* sp., *Lycianthes rantonetti*, *Petunia* spp., *Physalis peruviana*, *Solanum* spp. и *Streptosolen jamesonii*, но также и в *Chrysanthemum* sp. и *Dahlia × hybrida* в семействе Asteraceae (подробную информацию по естественным хозяевам см. САБИ (n.d.)). Спектр экспериментальных хозяев ВВКК широк и включает виды семейства Solanaceae, а также ряд видов по меньшей мере из девяти других семейств. Большинство хозяев не проявляют симптомов болезни либо проявляют их в незначительной степени (Singh, 1973; Singh *et al.*, 2003).

Заражение *S. tuberosum* ВВКК отмечено в ряде стран/штатов Африки, Азии, Восточной Европы, Северной Америки (ЕОКЗР/САБИ, 1997), Центральной Америки (Badilla *et al.*, 1999), Южной Америки и Ближнего Востока (Hadidi *et al.*, 2003). Однако географическое распространение ВВКК шире за счет декоративных культур и других хозяев (см. данные САБИ (n.d.) о географическом распространении).

Основным путем распространения ВВКК у *Solanum tuberosum* является вегетативное размножение. Кроме того, ВВКК распространяется контактно-механическим путем при работе сельскохозяйственной техники на полях и делении на части клубней семенного картофеля (Hammond & Owens, 2006). ВВКК распространяется в истинных (ботанических) семенах картофеля – зараженными могут быть до 100% семян (Fernow *et al.*, 1970; Singh, 1970) – а также в пыльце (Grasmick & Slack, 1985; Singh *et al.*, 1992). De Bokx and Pirone (1981) сообщают о низкой эффективности переноса ВВКК тлей *Macrosiphum euphorbiae*, при этом возможность переноса тлей *Myzus persicae* и *Aulacorthum solani* первоначально отрицалась. Тем не менее описано экспериментальное приобретение и перенос ВВКК тлей *M. persicae* с растений, зараженных одновременно ВВКК и вирусом скручивания листьев картофеля (ВСЛК) (Salazar *et al.*, 1995; Singh & Kurz, 1997), и впоследствии было продемонстрировано гетерологичное капсулирование ВВКК в капсид вируса (Querci *et al.*, 1997) – феномен, который может играть важную роль в эпидемиологии и распространении ВВКК в полевых условиях.

*Solanum lycopersicum* легко инфицируется ВВКК при контакте; продемонстрировано, что ВВКК переносится с пыльцой и семенами (Kruczynski *et al.*, 1988; Singh, 1970). Доказано, что распространение через семена томата содействует международному распространению ВВКК (van Brunshot *et al.*, 2014). Возможно также, что ВВКК распространяется в зараженных семенах стручкового перца (Lebas *et al.*, 2005).

Зараженные растения декоративных культур могут послужить источником заражения, если их обработку проводили перед обработкой других восприимчивых растений; роль декоративных растений в международном распространении ВВКК описана у ряда авторов (Navarro *et al.*, 2009; Verhoeven *et al.*, 2010). Передача ВВКК с *Apis mellifera*, *Bombus terrestris*, *Frankliniella occidentalis* или *Thrips tabaci* не описана (Nielsen *et al.*, 2012).

ВВКК – единственный вириод, о котором известно, что он в естественных условиях заражает культивируемые виды *Solanum*. Однако мексиканский вириод папиты (MPVd) заражает дикие

виды *S. cardiophyllum* (Martinez-Soriano *et al.*, 1996). В условиях эксперимента другие виды виридов рода *Pospiviroid* заражают *S. tuberosum* (Verhoeven *et al.*, 2004).

Обнаружено, что *S. lycopersicum* в естественных условиях заражают, помимо ВВКК, другие посивироиды, в числе которых вириод экзокортиса цитрусовых (CEVd; Mishra *et al.*, 1991), латентный вириод колумнеи (CLVd; Verhoeven *et al.*, 2004), мексиканский вириод папиты (паслена сердцелистного) (MPVd; Ling & Bledsoe, 2009), вириод мелкоплодности перца (PCFVd; Reanwarakorn *et al.*, 2011), вириод апикальной карликовости томата (TASVd; Walter, 1987), вириод хлоротичной карликовости томата (TCDVd; Singh *et al.*, 1999) и вириод "планта мачо" томата (TPMVd; Galindo *et al.*, 1982).

## 2. Таксономическая информация

<b>Название:</b>	вириод веретенovidности клубней картофеля (ВВКК)
<b>Синонимы:</b>	вирус веретенovidности клубней картофеля, вирус готики картофеля, вирус кустистости верхушки томата
<b>Таксономическое положение:</b>	Pospiviroidae, <i>Pospiviroid</i>
<b>Обычные названия:</b>	веретенovidность клубней картофеля

## 3. Выявление

Проявление и выраженность симптомов зависят от штамма ВВКК, вида и сорта пораженного растения и условий окружающей среды. Заражение *S. tuberosum* может проходить бессимптомно либо проявляться в симптомах от умеренных до резко выраженных (уменьшение размера растения и отходящие под острым углом от стебля листья, филотаксия (концевая доля листьев верхнего яруса поворачивается вокруг своей оси), темно-зеленые и морщинистые листья). Клубни могут быть уменьшенными, деформированными, веретенообразной или гантелеобразной формы, с заметными выпуклыми глазками, равномерно распределенными по клубню (ЕОКЗР, 2004). У *S. lycopersicum* симптомы включают карликовость, эпинастию, складчатость и скручивание молодых листьев по краям, хлороз, покраснение, хрупкость листьев, некроз, уменьшение размера и неполное вызревание плодов (Mackie *et al.*, 2002; Hailstones *et al.*, 2003; Lebas *et al.*, 2005). У *S. annuum* симптомы малозаметны, у листьев у верхушки растения края гофрированные (Lebas *et al.*, 2005). Все декоративные растения, обследованные на сегодняшний день, признаков заражения не проявляют (Verhoeven, 2010).

Поскольку заражение ВВКК может протекать бессимптомно, для обнаружения и идентификации вириода требуется проведение анализов. Для обнаружения ВВКК можно использовать биологические и молекулярные анализы, приводимые на рис. 1 в качестве вариантов, но для идентификации продукт полимеразной цепной реакции (ПЦР) должен быть подвергнут секвенированию, поскольку эти анализы не являются специфическими для ВВКК и выявят и другие вириды. Кроме того, секвенирование снижает риск получения ложноположительных результатов. Если патогенность расценивается как существенная, может быть проведена биологическая идентификация. Если по результатам лабораторного анализа ВВКК выявляется в стране впервые, может потребоваться подтверждение диагноза другой лабораторией.

Для минимизации риска получения ложноположительных или ложноотрицательных результатов во все анализы должны включаться контроли качества.



**Рис. 1.** Минимальные требования к обнаружению и идентификации вириода веретеновидности клубней картофеля (ВВКК).

\* В определенных обстоятельствах, например во время вспышки ВВКК, идентификация для каждого вириод-положительного образца может не требоваться.

Примечание: в случае подозрения на вириод (например, типичные симптомы у образца), но при отрицательном результате анализа для подтверждения результата следует провести другой анализ.

Настоящее приложение предназначено для выявления ВВКК и не разрабатывалось для выявления и идентификации других поспивиридов. Тем не менее при выборе метода выявления и идентификации необходимо принимать во внимание присутствие других виридов, и поэтому в настоящем приложении описываются неспецифические методы, которые выявят все известные вириды, включая такие поспивириды, как ВВКК. Для идентификации вириода продукт ПЦР необходимо секвенировать.

Описываются протоколы для обнаружения ВВКК в ткани листьев, клубней и ботанических (истинных) семян. Следует учитывать, что надежное выявление ВВКК в ткани семян представляет особую сложность.

В настоящем диагностическом протоколе методы (включая ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначально достигнутый уровень чувствительности, специфичности и/или воспроизводимости. Использование названий химических реагентов или оборудования в данных диагностических протоколах не подразумевает их предпочтение и исключение других, которые так же могут быть подходящими. Представленные в протоколах процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий, при условии, что они должным образом прошли процедуру валидации. Рекомендации по валидации методов в фитодиагностике предоставлены ЕОКЗР (2014).

Результативность молекулярного анализа определяется как анализируемой матрицей, так и последующим выбором методов подготовки образцов, выделения нуклеиновых кислот и

выявления и идентификации. В таблице на рис. 1 представлен обзор данных валидации, доступных для различных матриц и сочетаний методов. Более подробная информация об указанных методах либо ссылки на источники приведены в соответствующих разделах.

### 3.1 Отбор образцов

Общие рекомендации по методикам отбора образцов содержатся в МСФМ 31 (*Методики отбора образцов от грузов*).

#### **Микрорастения *S. tuberosum* и выращенные в лабораторной теплице растения *S. tuberosum*.**

У микрорастений в качестве образца следует использовать все растение либо верхние две трети растения, отделив их с соблюдением стерильности, чтобы растение продолжало развиваться. Используются микрорастения возрастом 4-6 недель, со стеблем около 5 см длиной и хорошо сформировавшимися листьями. У тепличных растений используется по одному полностью развернувшемуся молодому листу от каждого растения. При низких температурах и низких уровнях освещенности концентрация вириода снижается, поэтому растения должны выращиваться при температуре не менее 18 °C и фотопериоде не менее 14 часов. Микрорастения или листья можно объединять в одну сборную пробу для анализа; требования к размеру сборных проб зависят от метода анализа и должны быть валидированы.

**Полевые растения *S. tuberosum*.** Используются полностью развернувшиеся молодые листья без признаков биологического старения, по одному с верхушки каждого растения. Листья можно объединять в одну сборную пробу для анализа; требования к размеру сборных проб зависят от метода анализа и должны быть валидированы.

**Клубни *S. tuberosum*.** ВВКК системно распределен в инфицированных клубнях *S. tuberosum* (Shamloul *et al.*, 1997) и почти в равных количествах присутствует в различных частях растений с клубнями как с первичной, так и с вторичной инфекцией (Roenhorst *et al.*, 2006). Наивысшая концентрация вириода обнаруживается сразу после сбора урожая. В клубнях, хранившихся при температуре 4 °C, в течение трех месяцев хранения концентрация вириода существенно не снижается, но после шести месяцев хранения может упасть более чем в 10<sup>4</sup> раз. В качестве образца может использоваться вырезанный из любой части клубня образец мякоти. Образцы можно объединять в одну сборную пробу для анализа; требования к размеру сборных проб зависят от метода анализа и должны быть валидированы.

**Листья других сельскохозяйственных культур и декоративных растений.** Используются полностью развернувшиеся молодые листья. Листья можно объединять в одну пробу для анализа; требования к размеру сборных проб зависят от метода анализа и должны быть валидированы. Необходимо учитывать, что концентрация вириода зависит от возраста/зрелости растения и часто подвержена сезонным колебаниям. Кроме того, некоторые виды содержат биохимические вещества, которые могут подавлять передачу вириода подопытным растениям (например, *Brugmansia* spp.) либо подавлять ОТ-ПЦР (например, *Calibrachoa* spp., *Solanum jasminoides* и *S. jamesonii*).

**Семена.** Концентрация вириода в семенах может варьировать в широких пределах, с уровнем инфицирования от <1 до 100%. В связи с этим крайне затруднительно рекомендовать размер образца и размер сборной пробы (EUPHRESCO, 2010). Для одного анализа с *S. lycopersicum* рекомендуются размеры сборных проб в 100–1000 семян. Требования к размеру сборных проб зависят от метода анализа и должны быть валидированы.

Семена картофеля можно высевать в среду выращивания (например, компост) в лотках; сеянцы/растения исследуются неразрушающим образом по методике, описанной для выращенных в лабораторной теплице растений (ЕОКЗР, 2006).

### 3.2 Выявление с использованием биологических методов

Инокуляция растений *S. lycopersicum* (сорта Rutgers, Moneymaker или Sheyenne) позволит обнаружить многие, хотя и не все, виroidы (например, томат не является хозяином для поспивириода *Iresine 1* (IrVd-1; Spieker, 1996; Verhoeven *et al.*, 2010)) и обеспечит визуальное подтверждение патогенности. Однако некоторые изоляты могут не обнаруживаться в связи с отсутствием симптомов. Кроме того, симптомы могут быть недиагностическими для ВВКК. Метод биологической индикации может потребовать значительных тепличных площадей, является трудоемким и осложняется продолжительностью анализа, который может занять несколько недель и более. Сравнение чувствительности данного метода с другими методами, описанными в настоящем протоколе, не проводилось. Если он менее чувствителен, чем молекулярные методы, он может менее подходить для анализа семян. Однако, используя биологические методы, можно амплифицировать вириод до уровня, позволяющего выявление другими методами.

Двести-пятьсот мг ткани листьев, корней или клубней измельчают в небольшом количестве 0,1 М фосфатного буфера для инокуляции (адекватное разведение 1:1), содержащего карборунд (400 меш). Фосфатный буфер (рН 7,4) готовится смешиванием 80,2 мл 1 М  $K_2HPO_4$  с 19,8 мл 1 М  $KH_2PO_4$  и доведением дистиллированной водой объемом до 1 литра.

Инокулируют молодые растения томата с одним или двумя полностью развернутыми листьями. Палец в перчатке, ватную палочку или турунду смачивают в инокулюме и мягко протирают поверхность листа, после чего листья сразу промывают водой до полного удаления карборунда. Растения выращивают в условиях суточного колебания температуры 24–39 °С и светового дня в 14 часов, с дополнительным подсвечиванием паросветной натриевой лампой приблизительно в 650  $\mu E/m^2/s$  (Grassmick & Slack, 1985). Более низкие температуры и освещенность могут снизить чувствительность данной пробы. После инокуляции растения еженедельно (до шести недель) осматривают на наличие симптомов заражения. Симптомы заражения ВВКК включают карликовость, эпинастию, морщинистость листьев, скручивание молодых листьев по краям, хлороз листьев, покраснение, хрупкость и некроз.

Биопроба на томате позволит определить многие поспивириоды (за исключением IrVd-1, см. выше); соответственно ОТ-ПЦР проводится на нуклеиновой кислоте, выделенной из растений-индикаторов с симптомами заражения, продукт ПЦР секвенируется для идентификации.

### 3.3 Выявление с использованием молекулярных методов

#### 3.3.1 Подготовка образцов

**Микрорастения, листовая материал и корни.** Для измельчения материала хорошо зарекомендовали себя ступки и пестики или гомогенизаторы (например, Nomex 6 (Bioreba)) с пакетами для гомогенизации (Bioreba). Гомогенизацию можно облегчить добавлением небольшого количества воды или лизирующего буфера (состав которого зависит от метода, использовавшегося для выделения нуклеиновой кислоты) или замораживанием образца (например, в жидком азоте).

Следующая процедура была валидирована (см. таблицу 1) в комбинации с выделением нуклеиновой кислоты методом магнитной сепарации 2 и анализом GenPospi для ОТ-ПЦР в режиме реального времени, описанных в настоящем приложении. Около 1 г ткани гомогенизируют в пакете для гомогенизации с использованием Nomex 6 или портативного гомогенизатора (Bioreba) с 3,5 мл (1:2–1:5 (в отношении веса к объему)) гидрохина гидрохлорида с добавлением лизирующего буфера (6 М гуанидина гидрохлорида; 0,2 М ацетата натрия, рН 5,2; 25 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА); 2,5% поливинилпирролидона (PVP)-10). Затем образцы инкубируются в течение 10 мин при 65 °С при вращении на 850 об/мин в термомиксере (или при встряхивании (перевернуть пробирку 3 раза)) и дополнительном центрифугировании (2 мин, 16 000 g) перед выделением нуклеиновой кислоты.

**Клубни *S. tuberosum*.** Высечки из клубней тщательно гомогенизируют с водой или лизирующим буфером (состав которого зависит от метода, использовавшегося для выделения нуклеиновой кислоты; 1 мл на грамм ткани). Хорошо зарекомендовали себя такие гомогенизаторы, как Homex 6 с пакетами для гомогенизации. Замораживание ткани (например, при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) перед добавлением воды или лизирующего буфера облегчает гомогенизацию.

**Семена.** Для небольших количеств семян ( $<100$ ) можно использовать гомогенизатор, работающий по принципу шаровой мельницы (например, Retsch TissueLyser (Qiagen)). Для большего количества семян можно использовать лопаточный блендер (например, MiniMix (Interscience)) или гомогенизатор (например, Homex 6) с минимальным количеством лизирующего буфера (состав которого зависит от метода, использовавшегося для выделения нуклеиновой кислоты). Семена также можно измельчать молотком (Bertolini *et al.*, 2014b) или пестиком в ступке. Последний способ из-за возможного перекрестного заражения, которое трудно контролировать, может быть непригодным для постоянного использования. В качестве альтернативы можно использовать жидкий азот для замораживания образца, который затем измельчают в секционной мельнице (этот метод может использоваться также и с другими типами тканей).

Следующая процедура была валидирована (см. таблицу 1) вместе с выделением нуклеиновых кислот по методу магнитной сепарации 2 и анализом ОТ-ПЦР в реальном времени по Boonham *et al.* (2004), описанным в настоящем приложении. Перед выделением нуклеиновых кислот каждую из трех подвыборок из 1000 семян замачивают в 20 мл гуанидина гидрохлорида плюс лизирующий буфер в 100-миллитровом BagPage (Interscience) на 30–60 мин при комнатной температуре, гомогенизируют в течение 90 с в BagMixer (Interscience) и инкубируют (или взбалтывают и центрифугируют, как описано для микрорастений, листового материала и корней).

**Отпечаток растительной ткани и/или метод давленных препаратов.** Листья с черешками или отдельные побеги прижимают к нейлоновым мембранам. По данным, приведенным Bertolini *et al.* (2008, 2014a), на нейлоновой мембране  $0,5\text{ см}^2$  можно сделать несколько частично перекрывающихся отпечатков. Мембрану с иммобилизованным образцом вырезают и помещают в микропробирку. Манипуляции с иммобилизованными образцами необходимо проводить стерильным пинцетом. Образцы отпечатков ткани или давленных препаратов можно хранить при комнатной температуре в темном и сухом месте не менее трех месяцев. Для выделения РНК-мишени из мембран в каждую микропробирку с иммобилизованным образцом добавляют по 100 мкл глицинового буфера, затем содержимое перемешивают в вортексе и пробирку помещают на лед до проведения ПЦР.

### 3.3.2 Выделение нуклеиновых кислот

Существует широкий спектр методов, которые можно использовать для выделения нуклеиновых кислот, от коммерческих тест-систем до методов, опубликованных в научных журналах. Хорошо зарекомендовали себя для выявления ВВКК следующие методики и наборы реактивов.

**Коммерческие наборы.** Коммерческие наборы RNeasy (Qiagen), MasterPure (Epicentre) и Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) могут использоваться в соответствии с инструкциями производителя. RNeasy оценивался как набор для выделения РНК вируса веретенообразности клубней картофеля из разных матриц в рамках проекта EUPHRESO "Выявление и эпидемиология поспивироидов" (DEP) (EUPHRESO, 2010).

**Метод, описанный Mackenzie *et al.* (1997).** Растительную ткань гомогенизируют (1:10 (в отношении веса к объему)) в лизирующем буфере (4 М гуанидин изотиоцианата, 0,2 М ацетата натрия, 25 mM ЭДТА, 2,5% PVP-40 (в отношении веса к объему) и 1% 2-меркаптоэтанол (в объемном отношении), добавленный непосредственно перед использованием). Затем 1 мл гомогената смешивают со 100 мкл 20-процентного раствора саркозила (в отношении веса к объему) и инкубируют при температуре  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  в течение 10 мин в термомиксере, при

перемешивании на 1200 об/мин. Данный метод может использоваться для выделения РНК из широкого спектра растительных тканей.

**Метод с использованием ЭДТА-буфера.** Растительную ткань гомогенизируют (1:4 (в отношении веса к объему)) в простом лизирующем буфере (50 mM NaOH, 2,5 mM ЭДТА) и затем инкубируют (при температуре около 25°С в течение 15 мин) или центрифугируют (12 000 g при температуре 4 °С в течение 15 мин). После этого супернатант, в зависимости от требуемого уровня чувствительности, используют непосредственно для ОТ-ПЦР (менее высокий уровень чувствительности) либо наносят на нитроцеллюлозную мембрану и элюируют, используя стерильную дистиллированную воду (более высокий уровень чувствительности) (Singh *et al.*, 2006). Хотя концентрация вириона для ЭДТА-метода ниже, чем для других описанных методов выделения, это не должно стать ограничивающим фактором при его использовании с ОТ-ПЦР или дигоксигениновой (DIG) меткой. Данный метод использовался с *S. lycopersicum* и *S. tuberosum* и рядом декоративных растений.

**Фенол-хлороформный метод выделения с двухэтапной обработкой ПЭГ.** Растительную ткань гомогенизируют, нуклеиновую кислоту выделяют, как описано ЕОКЗР (2004). Данный метод используется в сочетании с возвратным полиакриламидным гель-электрофорезом (R-PAGE), DIG-РНК-пробой и обычными методами ОТ-ПЦР, описанными в настоящем диагностическом протоколе для широкого спектра видов растений и типов тканей (например, листья и клубни картофеля).

**Выделение с использованием СТАВ.** Растительную ткань гомогенизируют, нуклеиновую кислоту выделяют, как описано ЕОКЗР (2004). Метод выделения с использованием СТАВ (бромистого цетилтриметиламмония) использовался с ОТ-ПЦР в режиме реального времени для широкого спектра видов растений и типов тканей (например, листья и семена томата; EUPHRESO, 2010).

**Метод магнитной сепарации 1.** Описанная ниже автоматическая процедура основана на использовании KingFisher mL Magnetic Particle Processor (Thermo Scientific). При соответствующей корректировке объемов возможно использование других моделей KingFisher.

Анализируемый образец (не менее 200 мг ткани листьев или клубней либо до 100 штук семян) мацерируют, после чего к нему сразу добавляют экстракционный буфер в соотношении 1 г ткани листьев или клубней на 10 мл буфера и 1 г семян на 20 мл буфера. Мацерацию продолжают до получения чистого клеточного лизата с минимальным содержанием остатков интактной ткани. Экстракционный буфер состоит из 200 мкл 8,39-процентного (в отношении веса к объему) раствора пирогосфата натрия (TNaPP) (pH 10,0–10,9) и 100 мкл противопенной эмульсии Antifoam B Emulsion (Sigma), добавленных к 9,8 мл гуанидинового лизирующего буфера (ГЛБ). ГЛБ состоит из 764,2 г гидрохлорида гуанидина, 7,4 г дигидрата динатриевой соли ЭДТА, 30,0 г ПВП-10, 5,25 г моногидрата лимонной кислоты, 0,3 г тринатрия цитрата, 5мл Triton X-100, 250 мл абсолютного этилового спирта и 750 мл воды.

Два мл лизата переливают в свежую микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 5000 g в течение 1 мин. Один мл супернатанта отбирают и помещают в первую пробирку (А) стрипа KingFisher mL с 50 мкл MAP Solution A, перемешанного в вортексе с магнитными частицами (Invitek). В пробирку В добавляют 1 мл ГЛБ; в пробирки С и D добавляют 1 мл 70-процентного этанола, в пробирку Е – 200 мкл воды или 1× трис-ЭДТА буфера.

Стрип с пробирками помещают в установку KingFisher mL и запускают программу (см. рис. 2). Через 20 мин, установка делает паузу для этапа нагревания. Стрип с пробирками на 5 мин помещают в сушильный шкаф с температурой 65–70 °С, после чего вновь помещают в установку и возобновляют программу. В других моделях этап нагревания или испарения может быть встроен в программу. После завершения программы элюированные нуклеиновые кислоты переносят в новую микроцентрифужную пробирку.

Данный метод, помимо клубней картофеля и семян томата, использовали для широкого спектра видов растений и применяли с двумя анализами ОТ-ПЦР из описанных в настоящем приложении (см. разделы 3.3.3.4 и 3.3.4.2). При использовании метода магнитной сепарации 1 можно ожидать, что значения порогового цикла (Ct) будут на несколько циклов выше, чем для других методов выделения, описанных в настоящем приложении, но возможность обрабатывать большое количество проб делает его ценным методом выделения (Roehorst *et al.*, 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

```

**Рис. 2.** Программа для автоматизированного процессора магнитных частиц KingFisher mL Magnetic Particle Processor (Thermo Scientific).

**Метод магнитной сепарации 2.** В данной автоматизированной процедуре используется Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) и система KingFisher 96 (Thermo Scientific). Следует соблюдать инструкции производителя, за исключением того, что вместо входящего в тест-набор лизирующего буфера PN используется гуанидина гидрохлорид плюс лизирующий буфер.

### 3.3.3 Стандартные молекулярные методы выявления поспивиридов

#### 3.3.3.1 R-PAGE

Метод R-PAGE рекомендован как один из методов выявления ВВКК, инфицирующего листья *S. tuberosum* (ЕОКЗР, 2004), но оказался менее чувствительным (предел определения (LOD) 87 893 пг ВВКК), чем другие оценивавшиеся молекулярные методы (LOD не ниже 17 пг ВВКК) в кольцевом тестировании с дигоксигенин-меченой (DIG-меченой) кРНК-пробой для двухшаговой стандартной ОТ-ПЦР с использованием праймеров, разработанных Shamloul *et al.* (1997), и метод ОТ-ПЦР в режиме реального времени Boonham *et al.* (2004) (Jeffries & James, 2005; см. также таблицу 1).

Данный метод также с успехом использовался с другими растениями-хозяевами, например, *S. annuum*, *S. tuberosum* (клубни) и *S. lycopersicum*. В связи с его низкой чувствительностью требования к размеру сборных проб необходимо валидировать.

R-PAGE выявляет все известные поспивириды; в связи с этим для идентификации ВВКК должна быть проведена ОТ-ПЦР нуклеиновой кислоты с последующим секвенированием продукта ПЦР.

### 3.3.3.2 Гибридизация с DIG-меченой кРНК-пробой

Данный метод рекомендован для выявления ВВКК, инфицирующего листья *S. tuberosum* (ЕОККЗР, 2004). Чувствительность метода к ВВКК в листьях *S. tuberosum* составила по меньшей мере 17 пг ВВКК (Jeffries & James, 2005). Метод успешно был испытан на других хозяевах, включая *Petunia* spp., *S. jasminoides*, *S. lycopersicum* и *S. tuberosum* (клубни).

Используемая проба основана на полноразмерном мономере ВВКК производства компании Agdia, Inc. (номер в каталоге DLP 08000/0001). Данную пробу следует использовать согласно инструкциям производителя либо обратиться к ЕОККЗР (2004) за описанием метода. Помимо буфера Ames (ЕОККЗР, 2004), для выделения нуклеиновой кислоты могут использоваться полиэтиленгликоль (ПЭГ) и другие экстракционные буферы.

Данный метод с DIG-меченой кРНК пробой выявляет все известные поспивириды; поэтому для идентификации ВВКК должна быть проведена ОТ-ПЦР с последующим секвенированием продукта ПЦР.

### 3.3.3.3 Стандартная ОТ-ПЦР с использованием праймеров, разработанных Verhoeven *et al.* (2004)

В данном анализе используются праймеры Posp1 и Vid, разработанные Verhoeven *et al.* (2004). Праймеры Posp1 выявляют CEVd, вириод карликовости хризантем (CSVd), IrVd-1, MPVd, PCFVd, ВВКК, TASVd, TCDVd и TPMVd. Праймеры Vid выявляют ВВКК, TCDVd и, помимо этого, CLVd. Использование праймеров Posp1 и Vid в двух отдельных реакциях позволяет идентифицировать все известные поспивириды. Однако частичная некомплементарность в критических точках праймера и сайта-мишени может помешать выявлению некоторых изолятов поспивиридов (например, изолят CLVd при использовании этих праймеров не обнаруживается; Steyer *et al.*, 2010), и потребуются дополнительные праймеры для выявления -таких изолятов. Исследования *in silico* показали, что из-за некомплементарности праймера и сайта-мишени следующие изоляты ВВКК могут не идентифицироваться: праймеры Posp1 – EU879925, EU273604, EF459697, AJ007489, AY372398, AY372394, FM998551, DQ308555, E00278; праймеры Vid – EU273604<sup>2</sup>. Для выявления ВВКК праймеры Posp1 намного чувствительнее, чем праймеры Vid.

#### Праймеры

Posp1-FW: 5'-GGG ATC CCC GGG GAA AC-3' (нуклеотид (нт) 86–102)

Posp1-RE: 5'-AGC TTC AGT TGT (T/A)TC CAC CGG GT-3' (нт) 283–261)

VidFW: 5'-TTC CTC GGA ACT AAA CTC GTG-3' (нт 355–16)

Vid-RE: 5'-CCA ACT GCG GTT CCA AGG G-3' (нт *Условия реакции*)

Тест-система One-Step RT-PCR Kit (Qiagen) зарекомендовала свою надежность при использовании для выявления ВВКК, CEVd, CLVd, CSVd, TASVd и TCDVd в отдельных пробах (EUPHRESO, 2010), а также других поспивиридов, перечисленных в начале этого раздела. Использование Q-раствора, описанного EUPHRESO (2010), не является необходимым. Возможно использование различных наборов для ОТ-ПЦР и условий реакции, но при условии прохождения ими процедуры валидации, подтверждающей их соответствие поставленной задаче, с выявлением всех соответствующих поспивиридов. 354–336)

Два мкл матрицы добавляют к 23 мкл мастер-микса, содержащего по 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 мкМ), 5 мкл 5× One-Step RT-PCR буфера, 1,0 мкл смеси ферментов One-Step RT-PCR, 1,0 мкл смеси дНТФ (по 10 мМ каждого) и 14 мкл воды. Условия термоциклирования: 30 мин при 50 °С; 15 мин при 95 °С; 35 циклов по 30 с при 94 °С, 60 с при 62 °С и 60 с при 72 °С; завершающий этап элонгации: 7 мин при 72 °С.

### **Гель-электрофорез**

После ОТ-ПЦР продукты ПЦР (приблизительно 197 п.н. и 359 п.н. для праймеров *Pospi1* и *Vid* соответственно) должны быть проанализированы с использованием гель-электрофореза (2-процентный агарозный гель) и ПЦР-ампликонов соответствующего размера, секвенированных для идентификации вида вириоида. На практике секвенирование ампликона длиной 197 п.н. всегда приводило к такому же результату, как секвенирование полного генома вириоида.

### **3.3.3.4 ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием метода GenPospi (Botermans *et al.*, 2013)**

В методе GenPospi используется ОТ-ПЦР в режиме реального времени с зондом TaqMan, что позволяет выявлять все известные виды рода *Pospiviroid*. Анализ состоит из двух проходящих параллельно реакций: первая (реакционная смесь 1) идентифицирует все поспивироиды, за исключением CLVd (Botermans *et al.*, 2013); вторая (реакционная смесь 2) специфично идентифицирует CLVd (Monger *et al.*, 2010). Для контроля выделения РНК в анализ включен внутренний контроль *nad5*, основанный на праймерах, разработанных Menzel *et al.* (2002) для амплификации мРНК из митохондрий растений (митохондриальный ген NADH-дегидрогеназы). Валидация метода (см. таблицу 1) на листьях томата показала, что с помощью GenPospi можно определять изоляты из всех известных видов поспивироидов с относительной чувствительностью 0,13% (что соответствует разведению 1:770). Данный метод является специфичным, поскольку перекрестной реакции с другими вириоидами, вирусами или нуклеиновыми кислотами растений-хозяев не отмечено. Повторяемость и воспроизводимость этого метода в межлабораторном сравнении составила 100%. Метод GenPospi зарекомендовал себя как хороший инструмент для крупномасштабного скрининга поспивироидов. Для других образцов (помимо листьев томата) данный анализ необходимо валидировать.

### **Праймеры**

TCR-F 1-1: 5'-TTC CTG TGG TTC ACA CCT GAC C-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TCR-F 1-3: 5'-CCT GTG GTG CTC ACC TGA CC-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TCR-F 1-4: 5'-CCT GTG GTG CAC TCC TGA CC-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TCR-F PCFVd: 5'-TGG TGC CTC CCC CGA A-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TCR-F IrVd: 5'-AAT GGT TGC ACC CCT GAC C-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TR-R1: 5'-GGA AGG GTG AAA ACC CTG TTT-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TR-R CEVd: 5'-AGG AAG GAG ACG AGC TCC TGT T-3' (Botermans *et al.*, 2013)

TR-R6: 5'-GAA AGG AAG GAT GAA AAT CCT GTT TC-3' (Botermans *et al.*, 2013)

CLVd-F: 5'-GGT TCA CAC CTG ACC CTG CAG-3' (Monger *et al.*, 2010)

CLVd-F2: 5'-AAA CTC GTG GTT CCT GTG GTT-3' (Monger *et al.*, 2010)

CLVd-R: 5'-CGC TCG GTC TGA GTT GCC-3' (Monger *et al.*, 2010)

*nad5*-F: 5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3' (Menzel *et al.*, 2002)

*nad5*-R: 5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3' (Menzel *et al.*, 2002)

### **Зонды**

pUCCR: 6FAM-5'-CCG GGG AAA CCT GGA-3'-MGB (Botermans *et al.*, 2013)

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

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

Обе реакционные смеси основываются на TaqMan RNA-to-Ct 1-Step Kit (Applied Biosystems).

**Реакционная смесь 1 (все поспивироиды, кроме CLVd + nad5)**

Данная реакционная смесь состоит из 12,5 мкл смеси 2× TaqMan RT-PCR, 0,6 мкл смеси ферментов 1× TaqMan RT, 0,75 мкл (10 мкМ) прямых праймеров (TCR-F 1-1, TCR-F 1-3, TCR-F 1-4, TCR-F IrVd, TCR-F PCFVd и *nad5-F*) и обратных праймеров (TR-R1, TR-R CEVd, TR-R6 и *nad5-R*) (итоговая концентрация каждого 0,3 мкМ), 0,25 мкл (10 мкМ) TaqMan-зонда pUCCR (итоговая концентрация 0,1 мкМ) и 0,5 мкл (10 мкМ) TaqMan-зонда *nad5-P* (итоговая концентрация 0,2 мкМ). Воду молекулярно-биологического качества и 2 мкл РНК-матрицы добавляют для доведения окончательного объема до 25 мкл.

**Реакционная смесь 2 (CLVd + nad5)**

Данная реакционная смесь состоит из 12,5 мкл смеси 2× TaqMan RT-PCR, 0,6 мкл смеси ферментов 1× TaqMan RT, 0,75 мкл (10 мкМ) прямых праймеров (CLVd-F, CLVd-F2 и *nad5-F*) и обратных праймеров (CLVd-R и *nad5-R*) (итоговая концентрация каждого 0,3 мкМ), 0,25 мкл (10 мкМ) TaqMan-зонда CLVd-P (итоговая концентрация 0,1 мкМ) и 0,5 мкл (10 мкМ) TaqMan-зонда *nad5-P* (итоговая концентрация 0,2 мкМ). Воду молекулярно-биологического качества и 2 мкл РНК-матрицы добавляют для доведения окончательного объема до 25 мкл.

Условия термоциклирования для обеих реакционных смесей: 15 мин при 48 °С, 10 мин при 95 °С, 40 циклов по 15 с при 95 °С и 1 мин при 60 °С.

Для данного метода Botermans *et al.* (2013) интерпретировали значения  $C_t < 32$  как положительные, значения в диапазоне между 32 и 37 как недостаточные, требующие подтверждения, и значения  $\geq 37$  как отрицательные. Однако эти значения могут исключать низкие уровни инфицирования в некоторых тканях и потребуют определения в каждой лаборатории.

**3.3.4 Высокоспецифичные молекулярные методы обнаружения ВВКК****3.3.4.1 Стандартная ОТ-ПЦР с использованием праймеров, разработанных Shamloul *et al.* (1997)**

Праймеры для ОТ-ПЦР, использованные в этом анализе, разработаны Shamloul *et al.* (1997) и описаны также Weidemann and Bucht (1998). Данные праймеры выявляют MPVd, ВВКК, TCDVd и TRPVd. Исследования *in silico* показали, что следующие изоляты ВВКК могут не детектироваться из-за ошибочного спаривания праймер-последовательностей в критических точках: AY372394, DQ308555, EF459698 для обратного праймера. Если при использовании этих праймеров РНК не была амплифицирована, можно использовать праймеры Vid.

**Праймеры**

3Н1-F: 5'-ATC CCC GGG GAA ACC TGG AGC GAA C-3' (нт 89–113)

2Н1-R: 5'-CCC TGA AGC GCT CCT CCG AG-3' (нт 88–69)

**Метод 1 (SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen))**

Для каждой реакции 1 мкл матричной РНК добавляют к 24 мкл мастер-смеси, в которую входят по 1,7 мкл каждого из прямых и обратных праймеров (15 мкМ), 12,5 мкл 2× Reaction Buffer, 0,5 мкл RT/Platinum Taq и 7,6 мкл воды. Условия термоциклирования: 30 мин при 43 °С, 2 мин при 94 °С, затем 10 циклов 30 с при 94 °С, 90 с при 68 °С и 45 с при 72 °С, затем 20 циклов 30 с при 94 °С, 90 с при 64 °С и 45 с при 72 °С, завершающий этап элонгации: 10 мин при 72 °С и 1 мин при 20 °С.

**Метод 2 (ОТ-ПЦР в два этапа)**

При проведении данного анализа чувствительность к выявлению ВВКК в *S. tuberosum* составляет не менее 17 пг ВВКК – самая низкая из испытывавшихся концентраций. Однако достигаемая чувствительность в разных лабораториях различна, и в большинстве лабораторий ВВКК

обнаруживают при концентрации не менее 89 пг (Jeffries & James, 2005). Описание метода 2 см.: ЕОКЗР (2004).

После ОТ-ПЦР продукты ПЦР (приблизительно 360 п.н.) анализируют с помощью геле-электрофореза, как описано, и ампликоны нужного размера секвенируют, чтобы идентифицировать вид вириода.

Внутренний контроль с использованием праймеров *nad5* (Menzel *et al.*, 2002) проводился с этим методом в симплексной (отдельной) реакции (Seigner *et al.*, 2008). Праймеры используются в конечной концентрации 0,2 мМ. Длина ампликона – 181 п.н.

*nad5* sense: 5'-GATGCTTCTTGGGGCTTCTTGTT-3' (нт 968–987 и 1836–1838)

*nad5* antisense: 5'-CTCCAGTCACCAACATTGGCATAA-3' (нт 1973–1995)

### 3.3.4.2 ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров, разработанных Boonham *et al.* (2004)

Праймеры и зонд, используемые в этом анализе, разработаны Boonham *et al.* (2004). Однако ни этот анализ, ни любой другой из опубликованных количественных анализов в реальном времени не идентифицируют ВВКК специфически. Если ОТ-ПЦР в режиме реального времени дает положительный результат, вириод необходимо будет идентифицировать, используя стандартную ОТ-ПЦР и секвенирование.

Данный анализ выявляет ВВКК, MPVd, TCDVd и TPMVd. Чувствительность к выявлению ВВКК в *S. tuberosum* при использовании СТАВ-метода выделения составила минимум 17 пг ВВКК – самая низкая исследованная концентрация (Jeffries & James, 2005). Тесты с вариантами ВВКК и синтетическими олигонуклеотидами показали, что данный анализ идентифицирует все известные варианты последовательностей (Boonham *et al.*, 2005). Однако дивергентные изоляты VIR-06/7L и VIR-06/10L, недавно описанные Owens *et al.* (2009), могут не идентифицироваться из-за встраивания дополнительного основания (дополнительных оснований) на участке связывания зонда (W. Monger, личное сообщение, 2011 г.)<sup>1</sup>.

#### Праймеры

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

PSTV-296-R: 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)

Праймеры СОХ внутреннего контроля амплифицируют ген цитохромоксидазы 1, обнаруженный в митохондриях растений (Weller *et al.*, 2000).

СОХ-F: 5'-CGT CGC ATT CCA GAT TAT CCA-3'

СОХ-R: 5'-CAA CTA CGG ATA TAT AAG RRC CRR ACC TG-3'

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

Реакционная смесь рассчитана на 96-луночный планшет и представляет собой модификацию метода ЕОКЗР (ЕОКЗР, 2004), включающего дуплексную реакцию для обнаружения ВВКК и СОХ и симплексную реакцию для обнаружения ВВКК (Roehorst *et al.*, 2005).

Реакционная смесь состоит из 13,75 мкл воды, 25 мкл 2× Master Mix (Applied Biosystems), 1,25 мкл 40× MultiScribe Reverse Transcriptase (Applied Biosystems), по 1,5 мкл каждого из праймеров PSTV-231-F и PSTV-296-R (10 мМ) и 1,0 мкл зонда PSTV-251T (5 мМ). Смесь разделяют на две равные части объемом по 22 мкл, А и В. В часть А добавляют 2 мкл воды, в часть В добавляют по 0,75 мкл каждого праймера СОХ (10 мМ) и 0,5 мкл зонда СОХsol-1511T (5 мМ). По 1 мкл РНК-мишени добавляют к частям А и В, доводя окончательный объем

<sup>1</sup> Данные на 1 марта 2010 года (W. Monger, в личном сообщении, 2011 год).

реакционной смеси до 25 мкл на лунку реакционного планшета. Реакционная смесь А обеспечит идентификацию ВВКК, реакционная смесь В – идентификацию ВВКК и СОХ в дуплексной реакции.

Условия термоциклирования: 30 мин при 48 °С, 2 мин при 95 °С и 40 циклов по 15 с при 95 °С и 1 мин при 60 °С.

### 3.3.4.3 ОТ-ПЦР в режиме реального времени (тест-система Plant Print Diagnostics)

В данном анализе используются праймеры и зонд, разработанные Bertolini *et al.* (2010) и доступные в комплекте производства Plant Print Diagnostics (Ref. PSTVd/100). Анализ выявляет CLVd, ВВКК и TCDVd. Должны идентифицироваться все 327 изолятов ВВКК, представленных в базе данных GenBank, поскольку исследования *in silico* продемонстрировали, что все ошибочные спаривания праймер-последовательностей находились не в критических точках (N. Duran-Vila, личное сообщение, 2014).

Данные по валидации представлены в Таблице 1.

#### Праймеры

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

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

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

ПЦР-коктейль содержит лиофилизированные праймеры и зонд (поставляются в тест-наборе), к которым можно добавить любую коммерческую мастер-смесь для ОТ-ПЦР. Для каждой реакции 3 мкл матричной РНК добавляют к 9 мкл ПЦР-коктейля, состоящего из 6 мкл коммерческого 2× ОТ-ПЦР буфера, по 0,6 мкл прямого и обратного праймеров (10 μМ), 0,36 мкл зонда TaqMan (5 μМ), 0,5 мкл 25× ОТ-ПЦР смеси ферментов и 0,94 мкл воды для доведения окончательного объема реакции до 12 мкл.

Условия термоциклирования: 10 мин при 45 °С, 10 мин при 95 °С и 40 циклов (15 с при 95 °С и 1 мин при 60 °С).

При использовании этого метода образец считается положительным, если величина  $C_t < 40$  и отрицательные контроли отрицательны (амплификация отсутствует). Образец является отрицательным, когда величина  $C_t \geq 40$  и положительные контроли показывают амплификацию.

## 3.4 Контроли молекулярных анализов

Чтобы результат анализа считался надежным, каждая серия выделения нуклеиновых кислот и амплификации нуклеиновой кислоты вириоида-мишени должна сопровождаться постановкой надлежащих контролей, выбор которых зависит от типа использованного анализа и требуемого уровня достоверности. Для ОТ-ПЦР положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты, внутренний контроль и отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы) являются тем минимумом, который следует использовать.

**Положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты.** Данный контроль используется для отслеживания продуктивности анализа. В качестве контроля могут использоваться предварительно подготовленная (сохраненная) нуклеиновая кислота вириоида, ДНК после полногеномной амплификации или синтетический контроль (например, клонированный продукт ПЦР) с использованием той же пары праймеров, что использовалась для детекции. Также может использоваться контроль предела обнаружения (не является обязательным).

**Внутренний контроль.** Для стандартной ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени конститутивный ген (КГ) растения, например СОХ или NAD, включают в протокол ОТ-ПЦР, чтобы исключить возможность ложноотрицательных результатов в связи с неудачей при

выделении нуклеиновой кислоты либо деградации или присутствия ингибиторов ПЦР. Предпочтительным является использование праймеров внутреннего контроля в дуплексной реакции с поспивиридами/ВВКК-праймерами. Однако, поскольку добиться этого без снижения чувствительности анализа к вириду может быть затруднительно, рекомендуется, когда это целесообразно, проводить дуплексную реакцию поспивиридов/ВВКК-праймеров с КГ-праймерами, а также симплексную реакцию только с поспивиридами/ВВКК-праймерами.

Митохондриальный ген *nad5* субъединицы 5 NADH-дегидрогеназы показал себя надежным индикатором качества процедуры выделения и этапа обратной транскрипции для стандартной ОТ-ПЦР (Menzel *et al.*, 2002). Он прошел испытания со многими видами растений, включая *S. tuberosum* и другие виды *Solanum* (*S. bonariensis*, *S. dulcamara*, *S. jasminoides*, *S. nigrum*, *S. pseudocapsicum*, *S. rantonnetii* и *S. sisymbirifolium*), *Acnistus arborescens*, *Atropa belladonna*, *Brugmansia* spp., *Capsicum* spp., *Cestrum* spp., *Lochroma cyanea*, *Nicotiana* spp. и *Physalis* spp. (Seigner *et al.*, 2008). Праймеры *nad5* перекрывают интрон и, следовательно, не амплифицируют ДНК. РНК амплифицируется после удаления интрона.

Хотя в качестве внутреннего контроля в этом протоколе используется ген COX, праймеры COX амплифицируют РНК и ДНК, соответственно данный контроль свидетельствует о качестве амплифицируемой ДНК, а не одной РНК и не контролирует этап ОТ.

Если в описании метода ПЦР не упоминается внутренний контроль COX или *nad5*, лаборатория должна выбрать внутренний контроль и валидировать его.

**Отрицательный контроль амплификации (контроль без матрицы).** Данный контроль необходим для стандартной ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени, чтобы исключить ложноположительные результаты, обусловленные загрязнением во время приготовления реакционной смеси. Используемая при подготовке реакционной смеси вода для ПЦР добавлена на этапе амплификации.

**Положительный контроль выделения.** Данный контроль используется для подтверждения того, что нуклеиновая кислота вирида-мишени выделена в достаточном количестве и достаточного качества для ОТ-ПЦР и что вириод-мишень поддается обнаружению. Нуклеиновую кислоту вирида выделяют из ткани инфицированного растения-хозяина или из ткани здорового растения, в которую внесли вириод.

Положительный контроль составляет примерно 1/10 количества ткани листьев одного растения, использованного для выделения РНК. Если образцы объединяли в сборную пробу, количество положительного контроля следует соответственно корректировать (например, 10 серий образцов по 20 мг, объединенных для выделения РНК, 2 мг инфицированных листьев + 198 мг ткани здоровых листьев картофеля). Если РНК не выделена, анализ повторяют либо уменьшают норму объединения до тех пор, пока не будет достигнуто достоверное выделение.

При контроле ОТ-ПЦР следует принять меры для предотвращения аэрозольного перекрестного загрязнения от положительного контроля или положительных образцов. Используемый в лаборатории контроль следует секвенировать так, чтобы полученную последовательность можно было легко сравнить с последовательностью, полученной от ПЦР-ампликонов нужного размера. Другим способом является изготовление синтетических позитивных контролей с известной последовательностью, которую можно сравнить с ПЦР-ампликонами нужного размера.

**Отрицательный контроль выделения.** Данный контроль ставится для отслеживания загрязнения в процессе выделения нуклеиновой кислоты и/или перекрестной реакции с тканью растения-хозяина. Контроль включает нуклеиновую кислоту, выделенную из неинфицированной ткани растения-хозяина и амплифицированную. Рекомендуется ставить несколько контролей в тех случаях, когда ожидаются большие количества положительных образцов.

### 3.5 Интерпретация результатов стандартной ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в режиме реального времени

#### 3.5.1 Стандартная ОТ-ПЦР

Вироид-специфическая ПЦР будет считаться действительной только если:

- положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты производит правильный размер ПЦР-продукта для вириода;
- в отрицательном контроле качества выделения и отрицательном контроле амплификации не производится ампликонов правильного размера для вириода.

Если используются также COX и/или *nad5* праймеры внутреннего контроля, то отрицательный (ткань здорового растения) контроль (в случае использования), положительный контроль и каждая из проб должны производить ампликон длиной в 181 п.н. (*nad5*). Отказ проб амплифицироваться с праймерами внутреннего контроля может свидетельствовать, например, о том, что выделение нуклеиновой кислоты не удалось, нуклеиновая кислота не была включена в реакционную смесь, этап ОТ не удался, в выделенной нуклеиновой кислоте присутствуют соединения, подавляющие ПЦР, либо нуклеиновая кислота деградировала.

Образец будет считаться положительным, если он производит ампликон правильного размера. Для идентификации вида вириода ПЦР-продукт необходимо секвенировать.

#### 3.5.2 ОТ-ПЦР в режиме реального времени

ОТ-ПЦР в режиме реального времени будет считаться действительной только если:

- положительный контроль выделения нуклеиновой кислоты производит амплификационную кривую с вириод-специфическими праймерами; и
- амплификационная кривая не наблюдается (т.е.  $C_t = 40$  либо иному значению  $C_t$ , определенному лабораторией после валидации) с отрицательным контролем выделения и отрицательным контролем амплификации.

Если используются также COX и *nad5* праймеры внутреннего контроля, то отрицательный контроль (в случае использования), положительный контроль и каждая из проб должны производить амплификационную кривую. Отказ проб производить амплификационную кривую с праймерами внутреннего контроля может свидетельствовать, например, о том, что выделение нуклеиновой кислоты не удалось, нуклеиновая кислота не была включена в реакционную смесь, в выделенной нуклеиновой кислоте присутствуют соединения, подавляющие ПЦР, либо нуклеиновая кислота деградировала.

Образец будет считаться положительным, если он производит типичную амплификационную кривую. Конкретная информация по пороговой величине  $C_t$  для двух методов приводится в разделах 3.3.3.4 и 3.3.4.3.

## 4. Идентификация

Идентификация производится путем секвенирования продукта, полученного традиционными методами ОТ-ПЦР с использованием праймеров Shamloul или Vid, описанных в разделах 3.3.4.1 и 3.3.3.3 соответственно, и поиском совпадающей последовательности в открытых базах данных нуклеотидных последовательностей. Для идентификации может потребоваться помощь специалистов по секвенированию. Если продукт ПЦР слабо амплифицирован или образец заражен более чем одним посивироидом, получить секвенцию можно, клонировав продукт ПЦР.

Положительный образец, выявленный ОТ-ПЦР в режиме реального времени, должен, если это требуется для подтверждения, пройти повторный анализ с использованием стандартной ОТ-ПЦР, которая позволит секвенировать и идентифицировать продукт. Секвенирование непосредственно продукта ПЦР в режиме реального времени не обеспечит информацию, которая

позволила бы надежную идентификацию. Такое секвенирование позволит определить продукт как вирион, но не идентифицировать вид или дифференцировать продукт от использовавшегося положительного контроля. Поскольку чувствительность ОТ-ПЦР в режиме реального времени выше, существует вероятность того, что получить продукт путем стандартной ОТ-ПЦР не удастся. В случае со сборными пробами повторный анализ меньших выборок может повысить надежность амплификации путем стандартной ОТ-ПЦР. В качестве альтернативы можно повысить концентрацию вириона до уровней, которые могут быть обнаружены стандартной ОТ-ПЦР, инокулировав растения томатов. Однако оценка этого подхода не проводилась, и если результаты будут неубедительными, может потребоваться повторный отбор проб и анализ.

#### 4.1 Секвенирование и анализ последовательности

Анализ последовательности должен проводить только опытный специалист. Если лабораторное оборудование не позволяет провести секвенирование своими силами, привлекают коммерческую компанию. Очищенный ПЦР-продукт (и, при необходимости, прямой и обратный праймеры) отправляют в компанию для проведения секвенирования. Некоторые компании могут, если потребуется, также провести очистку продукта.

Если секвенирование проводится своими силами, методы проведения должны быть установленными и их соблюдение должно обеспечиваться. Каждая цепь продукта ПЦР должна быть секвенирована с использованием ПЦР-праймеров в качестве секвенирующих. Две независимо секвенированные цепи ДНК (от использования прямого и обратного праймеров) должны быть соединены в один контиг, подтверждая тождественность каждого нуклеотидного сайта. Предпочтительнее использовать ассемблеры (например, программное обеспечение Geneious, CLC Genomics Workbench или Lasergene), которые используют для анализа электрофореграмм. Расхождения между двумя цепями в обработанной последовательности маркируют как сомнительные основания. Обработанную консенсусную (обобщенную) последовательность, определенную сравнением двух цепей, затем можно сравнить с последовательностями посивироидов в релевантной базе данных. В случае смешанного инфицирования хроматограмма может оказаться нечитаемой, в таком случае продукт ПЦР следует клонировать и секвенировать.

В случае с посивироидами требуется тщательное выравнивание последовательностей, поскольку разница в несколько нуклеотидов может играть решающую роль при отнесении вириона к регулируемым или нерегулируемым вредным организмам. Для первичной идентификации PSTVd последовательности праймеров (праймеры Shamloul или Vid) в консенсусной последовательности могут сохраняться, поскольку эти праймеры находятся в наиболее консервативных участках генома вириона, и маловероятно, что они повлияют на идентификацию. Добавленные полимеразой в процессе элонгации 3'-выступающие нуклеотиды в случае обнаружения удаляются. Для идентификации рекомендуется использовать обработанную консенсусную последовательность, начинающуюся с позиции 1 генома вириона, для сравнения с одной из комплексных баз данных последовательностей нуклеотидов. Поиск проводится в базе данных GenBank на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (NCBI) или в Европейском нуклеотидном архиве на веб-сайте Европейской молекулярно-биологической лаборатории (EMBL) с использованием программы логического сравнения аминокислотных и нуклеотидных последовательностей Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Кроме того, идентификация должна основываться на специфической кластеризации результатов поиска в BLAST в построенном методом присоединения соседей (Neighbour Joining) филогенетическом дереве.

Согласно Международному комитету по таксономии вирусов (ICTV), главным критерием для идентификации вида является идентичность последовательности нуклеотидов свыше 90% (Owens *et al.*, 2011). Тем не менее, если полученная последовательность показывает идентичность близкую к 90%, необходимо включать дополнительные параметры, такие как биологические свойства. Группа по изучению вирионов ICTV в настоящее время обсуждает классификацию вирионов и критерии разграничения видов.

В тех случаях, когда требуется 100-процентная точность последовательности, например, если последовательность должна вноситься в базу данных или предполагается новый вид вириоида, необходимо провести вторую ПЦР. Вторая ПЦР будет охватывать, помимо участка последовательности праймеров, использовавшегося для первой ПЦР, любые вызывающие сомнения основания. Для этой цели может потребоваться разработка нового набора праймеров от исходной секвенции, но может оказаться достаточным и пар-праймеров, разработанных Shamloul и Vid.

## 5. Данные

Данные и результаты исследований должны храниться, как описано в МСФМ 27 (*Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов*).

В тех случаях, когда результаты диагностики могут отразиться на других договаривающихся сторонах, данные и свидетельства, в особенности в случаях несоответствия, а также если ВВКК выявлен в стране или области впервые, следующие дополнительные материалы должны храниться способом, обеспечивающим полную отслеживаемость:

- исходный образец (если он сохранился) следует хранить замороженным при  $-80^{\circ}\text{C}$  либо лиофилизировать и хранить при комнатной температуре;
- если это применимо к данному случаю, образцы РНК следует хранить при  $-80^{\circ}\text{C}$ ;
- если это применимо к данному случаю, продукты ОТ-ПЦР следует хранить при температуре от  $-20^{\circ}\text{C}$  до  $-80^{\circ}\text{C}$ ;
- следует сохранять файлы трассировки последовательности ДНК, использовавшиеся для создания консенсусной последовательности для идентификации образцов.

Если изолят демонстрирует молекулярные или биологические характеристики, отличные от характеристик ранее описанных изолятов, его следует представить в авторитетную коллекцию вредителей растений/архив (например, Q-bank (комплексная база данных по карантинным вредителям растений и болезням), DSMZ (Немецкая коллекция микроорганизмов и клеточных культур при Институте Лейбница)).

Если есть свидетельства того, что любой из описанных методов анализа не может выявить изолят ВВКК, информацию об изоляте (предпочтительно уникальный номер последовательности в базе данных GenBank) следует отослать в Секретариат МККЗР.

## 6. Контактные лица для получения дополнительной информации

Дополнительную информацию по данному протоколу можно получить в:

Science and Advice for Scottish Agriculture (SASA), Roddinglaw Road, Edinburgh EH12 9FJ, Scotland, UK (Dr C.J. Jeffries, e-mail: [colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk](mailto:colin.jeffries@sasa.gsi.gov.uk)).

National Plant Protection Organization, PO Box 9102, 6700 HC Wageningen, The Netherlands (Dr J.W. Roenhorst, e-mail: [j.w.roenhorst@nvwa.nl](mailto:j.w.roenhorst@nvwa.nl); Dr J.Th.J. Verhoeven, e-mail: [j.th.j.verhoeven@nvwa.nl](mailto:j.th.j.verhoeven@nvwa.nl)).

Department of Environment and Primary Industries, Biosciences Research Division, AgriBio, 5 Ring Road, La Trobe University, Bundoora, Victoria 3083, Australia (Dr B. Rodoni, e-mail: [brendan.rodoni@depi.vic.gov.au](mailto:brendan.rodoni@depi.vic.gov.au)).

Canadian Food Inspection Agency (CFIA), Charlottetown Laboratory, 93 Mt Edward Road, Charlottetown, PE, C1A 5T1, Canada (Dr H. Xu, e-mail: [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 (Dr N. Duran-Vila, e-mail: [duran\\_nur@gva.es](mailto:duran_nur@gva.es)).

USDA-APHIS, Plant Germplasm Quarantine Program BARC-E, BLD 580, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705, USA (Dr J.A. Abad, e-mail: [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 (Dr A. Etchevers, e-mail: [anitaetchevers@hotmail.com](mailto:anitaetchevers@hotmail.com)).

Запрос на пересмотр диагностического протокола может быть направлен национальными организациями по карантину и защите растений (НОКЗР), региональными организациями по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам (КФМ) через Секретариат МККЗР ([ippc@fao.org](mailto:ippc@fao.org)), который направит его в Техническую группу экспертов по диагностическим протоколам (ТГЭДП).

## 7. Выражение признательности

Первый проект настоящего протокола был написан C.J. Jeffries (SASA, UK), J.W. Roenhorst (National Plant Protection Organization, the Netherlands), B. Rodoni (Department of Environment and Primary Industries, Australia), H. Xu (CFIA, Canada), N. Duran-Vila (IVIA, Spain), A. Etchevers (Laboratorios Biológicos, Uruguay) и J.A. Abad (USDA-APHIS, USA) (см. контактную информацию в разделе 6). Также в работу над протоколом внес значительный вклад J.Th.J. Verhoeven (National Plant Protection Organization, the Netherlands).

Выражаем благодарность также S.L. Nielsen (Denmark); L. Seigner, S. Winter и M. Wassenegger (Germany), H. Koenraadt (the Netherlands) и A. Fox, T. James, W. Monger и V. Mulholland (UK) за их ценные замечания и комментарии, содействовавшие работе над протоколом.

## 8. Справочные материалы

Настоящий стандарт ссылается также на другие международные стандарты по фитосанитарным мерам (МСФМ). МСФМ размещены на Международном фитосанитарном портале (МФП): <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

- 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 Vossen, B.T.L.H., Verhoeven, J.Th.J., Roenhorst, J.W., Hooftman, 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. Walingford, UK, CABI. Размещено по адресу: <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. Размещено по адресу: <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). Размещено по адресу: <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. Размещено по адресу: <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. Размещено по адресу: <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. Размещено по адресу: <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. Размещено по адресу: <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. Размещено по адресу:

- <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. Размещено по адресу: <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. Размещено по адресу: <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. Размещено по адресу: <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.
- Roehorst, 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).
- Roehorst, 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 *Columnnea* latent viroid. *Archives of Virology*, 141: 1823–1832.
- Steyer, S., Olivier, T., Skelton, A., Nixon, T. & Hobden, E.** 2010. *Columnnea* 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) Размещено по адресу: <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, *Columnnea* 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. & Sängler, 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.

**Таблица 1.** Обзор протоколов, использующихся для выявления вириода веретеновидности клубней картофеля в различных матрицах, и валидации этих протоколов

Матрица	Размер образца	Подготовка образца	Выделение нуклеиновых кислот	Метод выявления	Примечания по валидации метода
Листья томата	1 г	3,5 мл (1:2–1:5 (вес/объем)) гуанидина гидрохлорида + лизирующий буфер; гомогенизатор Homex 6 (Bioreba)	RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) или Sbeadex maxi plant kit (LGC Genomics) на установке KingFisher 96 system (Thermo Scientific)	ОТ-ПЦР в режиме реального времени: метод GenPospi, Botermans <i>et al.</i> (2013)	<b>Предел обнаружения:</b> обнаружение всех известных видов поспивиридов до относительного уровня зараженности <sup>1</sup> в 0,13% (соответствует разведению в 770 раз: предельное разведение, при котором сохраняется инфекционность) с 99,7% определенностью <b>Аналитическая специфичность:</b> высокоспецифичен <b>Селективность:</b> листья томата <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> 100% (Naktuinbouw, 2012a; Botermans <i>et al.</i> , 2013; NPPO-NL, 2013d)
Листья томата	1 г	3,5 мл (1:2–1:5 (вес/объем)) гуанидина гидрохлорида + лизирующий буфер; гомогенизатор Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	ОТ-ПЦР в режиме реального времени: Boonham <i>et al.</i> (2004)	<b>Предел обнаружения:</b> выявляет патоген до уровня соотношения здоровых листьев томата к зараженным в 10 000:1 (предельное разведение, при котором сохраняется инфекционность) <b>Аналитическая специфичность:</b> выявляет MPVd, BBKK, TCDVd, TPMVd (некоторые изоляты) <b>Селективность:</b> листья томата <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> 100% (Naktuinbouw, 2012b)
Листья томата	1 г	3,5 мл (1:2–1:5 (вес/объем)) гуанидина гидрохлорида + лизирующий буфер; гомогенизатор Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	ОТ-ПЦР: праймеры Pospi1-FW и Pospi1-RE, Verhoeven <i>et al.</i> (2004)	<b>Предел обнаружения:</b> выявляет все виды поспивиридов (кроме CLVd) до относительного уровня зараженности в 2,5% <b>Аналитическая специфичность:</b> выявление латентного вириода хмеля (HrLVd, род <i>Cocadviroid</i> ) и BBKK <b>Селективность:</b> листья томата <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> 100% (NPPO-NL, 2013a)
Листья томата	1 г	3,5 мл (1:2–1:5 (вес/объем)) гуанидина гидрохлорида + лизирующий буфер; гомогенизатор Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	ОТ-ПЦР: праймеры Vid-FW/Vid-RE, Verhoeven <i>et al.</i> (2004)	<b>Предел обнаружения:</b> выявляет CLVd, BBKK и TCDVd до относительного уровня зараженности в 100% (10% для CLVd*) * Праймеры изначально созданы для выявления CLVd комплементарного к праймерам Pospi1-FW/Pospi1-RE RT-PCR (Verhoeven <i>et al.</i> , 2004) <b>Аналитическая специфичность:</b> выявляет CLVd, BBKK и TCDVd <b>Селективность:</b> листья томата <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> 100% (NPPO-NL, 2013b)
Листья томата	1 г	3,5 мл (1:2–1:5 (вес/объем)) гуанидина гидрохлорида + лизирующий буфер; гомогенизатор Homex 6	RNeasy Plant Mini Kit	ОТ-ПЦР: Shamloul <i>et al.</i> (1997)	<b>Предел обнаружения:</b> выявление до относительного уровня зараженности минимум 10% <b>Аналитическая специфичность:</b> выявляет MPVd, BBKK, TCDVd, TPMVd (некоторые изоляты) <b>Селективность:</b> листья томата <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> 100% (NPPO-NL, 2013c)

Матрица	Размер образца	Подготовка образца	Выделение нуклеиновых кислот	Метод выявления	Примечания по валидации метода
Семена томата	3000 семян (три субпробы по 1000)	20 мл (1:2–1:5 (вес/объем)) гуанидина гидрохлорида + лизирующий буфер; BagMixer (Interscience)	Sbeadex maxi plant kit на установке KingFisher 96	ОТ-ПЦР в реальном времени: Boonham <i>et al.</i> (2004)	Рабочие характеристики метода такие же, как для листьев томата Вероятность обнаружения одного зараженного семени в пробе из 1000 семян >95% при анализе трех субпроб по 1000 семян. Из-за быстрого перекрестного заражения здоровых семян ВВКК из зараженных плодов во время обработки семян (с использованием ферментации и обработки пектиназой) велика вероятность того, что в пробе будет присутствовать больше зараженных семян (Naktuinbouw, 2012c).
Листья картофеля (выращенного в лабораторной теплице) и растений картофеля <i>in vitro</i>	200 мг	20 мкл 10% додецилсульфата натрия, 180 мкл LiCl экстракционного буфера, 400 мкл фенол-хлороформа для экстракции в ступке с пестиком	Фенол-хлороформ и двухэтапная экстракция полиэтиленгликолем (ПЭГ)	Возвратный электрофорез в полиакриламидном геле (R-PAGE) <sup>2</sup>	<b>Предел обнаружения:</b> 2465 пг ВВКК; наименее чувствительный из молекулярных методов, оценивавшихся в кольцевом международном тестировании <b>Аналитическая специфичность:</b> выявляет все известные поспивириды <b>Селективность:</b> любой сорт картофеля, листья картофеля или растения <i>in vitro</i> <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> воспроизводимость 51% на 87 893 пг ВВКК (самая высокая концентрация ВВКК из тестируемых) и 42% на пределе обнаружения
Листья картофеля (выращенного в лабораторной теплице) и растений картофеля <i>in vitro</i>	200 мг	1:1,5 (вес/объем) буфера Ames (ЕОКЗР, 2004) для экстракции в ступке с пестиком	Иммобилизация на мембране (Agdia, Inc.), фенол-хлороформ и двухэтапная экстракция ПЭГ	Дигоксигенин-меченая (DIG) проба <sup>2</sup>	<b>Предел обнаружения:</b> минимум 17 пг ВВКК (самая низкая концентрация из тестируемых) <b>Аналитическая специфичность:</b> выявляет все известные поспивириды <b>Селективность:</b> любой сорт картофеля, листья картофеля или растения <i>in vitro</i> <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> воспроизводимость 100% на 87 893 пг ВВКК и 23% на 17 пг ВВКК
Листья картофеля (выращенного в лабораторной теплице) и растений картофеля <i>in vitro</i>	50–500 мг	1:9 (вес/объем) буфер RH (Qiagen) с микроцентрифужной пробиркой и микропестик или Nometex 6	RNeasy Plant Mini Kit	Стандартная двухэтапная <sup>2</sup> ОТ-ПЦР с праймерами Shamloul <i>et al.</i> (1997)	<b>Предел обнаружения:</b> минимум 17 пг ВВКК <b>Аналитическая специфичность:</b> обнаружение MPVd, PSTVd, TCDVd и TRPVd <b>Селективность:</b> любой сорт картофеля, листья картофеля или растения <i>in vitro</i> <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> воспроизводимость 78% на 87 893 пг ВВКК (самая высокая концентрация ВВКК из тестируемых) и 44% на 17 пг ВВКК

Матрица	Размер образца	Подготовка образца	Выделение нуклеиновых кислот	Метод выявления	Примечания по валидации метода
Листья картофеля (выращенного в лабораторной теплице) и растений картофеля <i>in vitro</i>	1 г	3,5 мл (1:2–1:5 (вес/объем)) гуанидина гидрохлорида + лизирующий буфер с Nutex 6	Sbeadex maxi plant kit на установке KingFisher 96	ОТ-ПЦР в реальном времени: метод GenPospi, Botermans <i>et al.</i> (2013)	Рабочие характеристики метода такие же, как для листьев томата <b>Аналитическая специфичность:</b> перекрестной реакции с вирусами, обычно встречающимися в картофеле, нет <b>Селективность:</b> листья картофеля и растения <i>in vitro</i> Валидирован для объединения проб до 100 (100-процентное выявление в образце из 1 зараженного и 99 здоровых листьев; NAK, 2011)
Листья картофеля (выращенного в лабораторной теплице) и листья и клубни картофеля <i>in vitro</i>	1,5 г листьев или 5 г клубней	Приблизительно 600 мкл буфера для листьев или приблизительно 3 мл буфера для клубней (выбор буфера зависит от метода экстракции)	RNeasy Plant Mini Kit, бромистый цетилтриметиламмоний (СТАВ) буфер или набор для выделения РНК или Purescript (Gentra Systems; NB! этот набор больше не производится)	ОТ-ПЦР в реальном времени: Boonham <i>et al.</i> (2004)	<b>Предел обнаружения:</b> выявление патогена при разведении зараженной ткани в здоровой в соотношении до 10 000 раз <b>Аналитическая специфичность:</b> выявляет MPVd, BVKK, TCDVd, TPMVd (некоторые изоляты); перекрестной реакции с вирусами, обычно встречающимися в картофеле, нет <b>Селективность:</b> листья картофеля, растения <i>in vitro</i> или клубни <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> 100% (ринг-тест в четырех лабораториях) Валидирован для объединения проб до 100 (100-процентное выявление в образце из 1 зараженного и 99 здоровых листьев; Roenhorst <i>et al.</i> , 2005, 2006)
Декоративные культуры (листья)	1 г	3,5 мл (1:2–1:5 (вес/объем)) гуанидина гидрохлорида + лизирующий буфер; гомогенизатор Nutex 6	RNeasy Plant Mini Kit или Sbeadex maxi plant kit для установки KingFisher 96	ОТ-ПЦР в реальном времени: GenPospi анализ, Botermans <i>et al.</i> (2013)	Рабочие характеристики метода такие же, как для листьев томата <b>Аналитическая специфичность:</b> концентрация поспивироидов и селективность (ингибирующие компоненты) в соке листьев зависят от вида растений Валидирован для объединения проб до 25 для <i>Brugmansia</i> , <i>Calibrachoa</i> , <i>Cestrum</i> , <i>Dahlia</i> , <i>Nematanthus</i> , <i>Petunia</i> , <i>Solanum jasminoides</i> и <i>Streptosolen jamesonii</i> . NB: у <i>Calibrachoa</i> , <i>S. jasminoides</i> и <i>S. jamesonii</i> матричные эффекты наблюдались при разведении более чем в 100 раз. По-видимому, для некоторых культур, например <i>Dahlia</i> , единственным периодом, подходящим для (надежного) тестирования, является летний период.
Декоративные культуры (листья)	1 г	3,5 мл (1:2–1:5 (вес/объем)) гуанидина гидрохлорида + лизирующий буфер; гомогенизатор Nutex 6	RNeasy Plant Mini Kit или Sbeadex maxi plant kit для установки KingFisher 96	ОТ-ПЦР в реальном времени: Boonham <i>et al.</i> (2004)	Рабочие характеристики метода такие же, как для листьев томата <b>Аналитическая специфичность:</b> концентрация поспивироидов и селективность (ингибирующие компоненты) в соке листьев зависят от вида растений Валидирован для объединения проб до 25 для <i>Brugmansia</i> , <i>Calibrachoa</i> , <i>Dahlia</i> , <i>Petunia</i> , <i>S. jasminoides</i> и <i>S. jamesonii</i> . NB: у <i>Calibrachoa</i> , <i>S. jasminoides</i> и <i>S. jamesonii</i> матричные эффекты наблюдались при разведении более чем в 100 раз. По-видимому, для некоторых культур, например <i>Dahlia</i> , единственным периодом, подходящим для (надежного) тестирования, является летний период (Naktuinbouw, 2012b).

Матрица	Размер образца	Подготовка образца	Выделение нуклеиновых кислот	Метод выявления	Примечания по валидации метода
Листья томата, клубни и семена картофеля, декоративные культуры (листья)	1 г листьев томата или клубней картофеля или отпечатков листьев на нейлоновых мембранах	10 мл (1:10 (вес/объем)) натрий-фосфатного буфера с Nometex 6	Отпечаток ткани, RNeasy Plant Mini Kit или PowerPlant RNA Isolation Kit (Mo Bio)	ОТ-ПЦР в реальном времени: Bertolini <i>et al.</i> (2010)	<b>Предел обнаружения:</b> выявление патогена при соотношении зараженных листьев <i>S. jasminoides</i> к здоровым листьям <i>S. jasminoides</i> и томата до 1:10 000 <b>Аналитическая специфичность:</b> выявляет CLVd, BBKK и TCDVd <b>Селективность:</b> листья картофеля, клубни или семена томата <b>Повторяемость и воспроизводимость:</b> 100% (ринг-тест в трех лабораториях) Диагностическая чувствительность составила 100%, специфичность диагностики составила 100% и относительная точность в сравнении с методом молекулярной гибридизации (Murcia <i>et al.</i> , 2009) составила 100%. Валидация анализа проводилась с 208 полевыми образцами <i>S. jasminoides</i> , <i>Brugmansia</i> spp., <i>Datura</i> spp., <i>Petunia</i> spp., <i>Dendrothema</i> spp., картофеля и томата. Из 208 образцов 43 были истинноположительными и 150 – истинноотрицательными по результатам анализов, проведенных обоими методами. Анализ методом гибридизации дал ложноположительный результат по 15 образцам (выявив TASVd и CEVd). Ложноотрицательных образцов не было обнаружено.

<sup>1</sup> Поскольку концентрация вириона в оригинальном исследуемом материале неизвестна, для некоторых анализов предел обнаружения (чувствительность) выражен в относительном значении. Неразведенный зараженный сок листьев считается 100% инфицированным (в соотношении 1 г листового материала : 3 мл буфера). Относительный предел обнаружения определялся анализом восьми серийных разведений инфицированного сока листьев в здоровом соке. Относительный предел обнаружения определен как среднее самой низкой относительной зараженности каждого изолята, которую еще можно определить (пороговый цикл (Ct) <32), к которому добавили три среднеквадратических отклонения, чтобы полученная оценка была консервативной с 99,7% уверенностью (Botermans *et al.*, 2013).

<sup>2</sup> Три метода – R-PAGE, гибридизация с DIG-меченой пробой и двухэтапная стандартная ОТ-ПЦР с праймерами Shamloul *et al.* (1997) – сравнивались в международном ринг-тесте (Jeffries and James, 2005).

**История публикации**

*Не является официальной частью стандарта*

2007-03 КФМ-2 добавила тему в программу работы (2006-002)

2012-11 ТГЭДП пересмотрела проект протокола

2013-03 КС в электронном решении одобрил текст для проведения консультации с членами (2013\_eSC\_May\_10)

2013-07 Консультация с членами

2014-07 ТГЭДП рассмотрела проект протокола

2014-09 ТГЭДП в электронном решении одобрила текст для передачи КС для утверждения на принятие (2014\_eTPDP\_September\_01)

2014-11 КС в электронном решении утвердил период нотификации проекта протокола (2014\_eSC\_Nov\_13)

2014-12 Период нотификации

2015-01 КС утвердил ДП от лица КФМ (формальных возражений не высказывалось)

**МСФМ 27. Приложение 7 Вирус веретеновидности клубней картофеля** (2016). Рим, МККЗР, ФАО.

2015-07 Секретариат МККЗР включил редакционные поправки и изменил формат стандартов после процедуры отзыва стандартов, установленной КФМ-10 (2015).

2016-05 КС утвердил технический пересмотр настоящего ДП в части, относящейся к праймеру COX-F внутреннего контроля, согласно представленному источнику (Weller *et al.* 2000) (раздел “3.3.4.2 ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием праймеров, разработанных Voornham *et al.* (2004)”) (2016\_eSC\_May\_15). ТГЭДП приняла к сведению, что обе последовательности – приведенная в предыдущей версии ДП и последовательность, описанная в Weller *et al.* 2000, – являются рабочими.

История публикации последний раз обновлена: 2016-05