

植检委建议：高通量测序技术用作植物检疫诊断工具

状态框

本部分不是植检委建议的正式内容，在建议获得通过之后，国际植保公约秘书处将作修改。	
文件日期	2018年12月6日
文件类型	植检委建议草案
文件当前阶段	提交植检委第十四届会议（2019年）
主要阶段	2018年3月 澳大利亚、欧地植保组织和新西兰提议将题为“下一代测序技术用作植物检疫诊断工具”的主题纳入《国际植保公约》工作计划，作为一项植检委建议。 2018年4月 植检委第十三届会议将该主题加入《国际植保公约》工作计划，作为植检委建议。 2018年5月 植检委第十三届会议结束以后调整。 2018年5月 磋商（2018年5月15日-8月15日）。 2018年9月 磋商结束以后修订。 2018年10月 植检委主席团审议。 2018年12月 植检委主席团审议。
说明	本文件为草稿，仅以英文提交磋商。 2018年8月 根据磋商结果，修改标题（“下一代测序”改为“高通量测序”）。 2018年10月 编辑。 2018年12月 编辑（部分）。

背景

植物检疫措施委员会（植检委）承认，准确而迅速的有害生物诊断，为出口认证、进口检验和应用适当植物检疫措施奠定基础¹。普遍认为，检测和鉴定植物有害生物的能力，因检测工具的准确性、重现性和特异性而异。

高通量测序技术，又称下一代测序或深度测序技术，是一种强大的工具，可以替代传统的诊断方法，用于检测和鉴定生物（例如细菌、真菌、植原体、病毒和类病毒）。不过，高通量测序的诊断结果可能无法证明携带活体有害生物，也无法证明这类生物对植物或植物产品有害。因此，在检测和鉴定有害生物方面，应谨慎解释高通量测序之类高灵敏度技术的结果。特别是在采取植物检疫措施时，应充分考虑应用高通量测序诊断结果带来的风险和后果。此外，由于平台成本和其他运营费用较高，高通量测序技术可能不适合所有国家植物保护机构（国家植保机构）。也应注意到，每家国家植保机构可能采用不同的高通量测序平台。

高通量测序技术的介绍详见附录 1。

¹ 另见植检委建议 R-07：有害生物诊断的重要性（<https://www.ippc.int/en/publications/84234/>）

建议的对象

缔约方和区域植物保护组织。

建议的内容

植检委注意到当前面临挑战，同时有必要继续开展工作，利用高通量测序技术进行有害生物的检测和鉴定，为应用植物检疫规定提供依据。有必要进一步调查某种未知微生物的高通量测序技术诊断结果，以便证实该微生物是否可能为有害生物，并可以视作限定性有害生物。

鉴于有缔约方提议，利用高通量测序技术及其结果，作为适当植物检疫规定的依据，植检委鼓励缔约方：

- (a) 制定准则，说明在检测出植物材料中未知生物（例如真菌、细菌或病毒）或无活性生物后，应采取哪些行动；
- (b) 确保安排到位适当的信息技术和生物信息学基础设施和投资，以及生物信息学教育培训，以便保障数据的适当存储和测试结果的适当解释，并确保这种技术得到有效实施；
- (c) 统一应用高通量测序方面的最佳实践操作准则，包括适当解释结果和采取质量控制措施（例如程序控制），确保高通量测序数据的输出可靠精确，在植物检疫中有生物学意义，得到协调一致的实施；
- (d) 验证高通量测序的可靠性和准确性，为此试验比较高通量测序与其他现有诊断平台；
- (e) 向出口国国家植保机构通报高通量测序结果的解释信息，特别是有关检测到的生物植物检疫风险的结论；
- (f) 实施高通量测序培训计划，包括在网上开办实验室最佳做法课程，并协调国际能力测试，对实验室能力进行独立评估；
- (g) 发布高通量测序规程（针对相应高通量测序平台的规程），并分享准则和培训材料，提高透明度；
- (h) 公布高通量测序意外发现的植物和植物产品中检疫性生物的生物学联系。

上述建议取代的建议

无。

本附录仅供参考，不是植检委建议的规定内容。

附录 1

背景

2017 年 12 月，植物检疫措施委员会（植检委）主席团审议了标准委员会（标准委）编写的一份文件，文件反映了《国际植保公约》诊断规程技术小组对高通量测序技术用作植物检疫诊断工具方面机遇和挑战的讨论情况。标准委请主席团同意向植检委第十三届会议提交这份背景文件，并请植检委注意，高通量测序技术的利用方面存在挑战，同时有必要继续开展工作，利用高通量测序技术进行有害生物的检测和鉴定。

标准委根据《国际植保公约》诊断规程技术小组对高通量测序方面机遇和挑战的讨论情况，就高通量测序技术用作植物检疫诊断工具编写了一份文件。

2017 年 12 月，提请植检委主席团同意向植检委第十三届会议提交这份背景文件，并请植检委注意，高通量测序技术的利用方面存在挑战，同时有必要继续开展工作，利用高通量测序技术进行有害生物的检测和鉴定。

植检委主席团同意，鉴于这是一个缔约方会感兴趣的新问题，应起草一份植检委建议，就高通量测序技术用作植物检疫诊断工具向缔约方和区域植物保护组织（区域植保组织）提供政策建议和指导。

澳大利亚、新西兰和欧洲和地中海植物保护组织（欧地植保组织）在植检委第十三届会议期间提交了一份植检委建议草案，会上同意将该主题纳入《国际植保公约》工作计划，作为题为“高通量测序技术用作植物检疫诊断工具”的植检委建议。

何为高通量测序？与其他测试方法有何不同？

高通量测序，又称下一代测序或深度测序技术，使全基因组测序成为可能，可以用于特别关注的各类生物，从而检测非可培养生物（例如病毒和类病毒以及一些细菌、卵菌和真菌）。高通量测序技术能够用于定向检测限定性有害生物，还能检测未知生物（即没有先验知识）。高通量测序技术使遗传材料测序成为可能，可以用于鉴定植物检疫领域关心的但目前利用传统技术无法鉴定的微生物基因组。近来，这种技术的应用发现了先前没检测到的微生物，例如真菌、细菌和植原体，特别是一些病毒，比起其他病原体，这种技术的利用程度更加超前（本文件以病毒和类病毒为例）。借助高通量测序技术，研究和诊断人员可以不断从大量尚未发现的生物中鉴定和描述新的分类群，对于这类生物，国家植物保护机构（国家植保机构）

必须迎难而上，根据非常有限的信息和没有准确评价的潜在植物检疫风险，快速进行决策（Olmos 等，2018）。因此，这种技术提供了一种新颖、全面的方法，检测和鉴定生物样本中的潜在有害生物。

目前，植物和植物产品的病毒和类病毒植物检疫测试结合了特定（分子学和血清学）方法和通用（视检、电镜以及生物学指标或生物测定）方法。这些方法是目前可用的最佳方法，并广泛用于植物有害生物诊断实验室，但仍有一些内在的不足。特定测试通常要求事先了解病毒性病原体，每项测试都要专门设计和验证（包括验证针对不同有害生物与寄主组合的测试），在资源上对国家植保机构提出了要求。此外，这类特定测试也能检测出崩解的病原体颗粒的微量核酸或蛋白质，造成估算的实际病原体含量过高。很多病原体的寄主范围没有确切界定，新的有害生物与寄主组合中可能检测不到外源病毒和类病毒。虽然传统上利用生物测定检测未知病毒，但观察到病害症状时，往往还需要进一步的分子学或血清学测试来确认病原身份。生物测定非常依赖症状表现的环境条件，得出的结果往往模棱两可，例如假阳性和假阴性。

生物测定耗时过长，意味着植物必须长期滞留入境后植物检疫站，大大增加了进口商的成本和延误。生物测定还有一处不足，如指示寄主没有菌株症状，则有可能检测不出菌株。目前进行的研究证明，在检测严重影响农艺的病毒和类病毒方面，高通量测序等效于或优于生物学标引测定（Barrero 等，2017；Mackie 等，2017；Rott 等，2017；Rwahnih 等，2015）。最重要的是，研究证明，高通量测序得出结果的速度显著快于生物测定。不过，高通量测序技术也与其他现有测试配合使用，不应取代确认检测到的生物学的生物学意义。

考虑到传统诊断方法的局限性，必须采用新的、扎实可靠、具有成本效益的方法，快速和可靠地筛查植物和植物产品，查明是否携带病毒和类病毒与其他非可培养或难培养有害生物，而高通量测序技术则使之成为可能。用于某个 DNA 条形码区段的聚合酶链反应扩增子的宏条形码或高通量测序技术也能在植物检疫中用于诊断。除病毒外，上述用于植物检疫的诊断应用可能是最有可能用于诊断的高通量测序方法。

在常规诊断中，可能使用高通量测序技术的一些领域如下：（1）通过监测计划，了解某地有害生物状况；（2）认证核储备和植物繁殖材料；（3）（入境后）植物检疫测试；（4）监测进口商品是否携带新的潜在有害生物风险。高通量测序的上述所有应用都能提供各种方便（Al Rwahnih 等，2015；Hadidi 等，2016；Rott 等，2017）。不过，这种技术的实施也面临挑战，例如会对实验室基础设施、生物信息学、数据共享和数据验证提出要求（Olmos 等，2018）。

监管和科学挑战

新技术出现的同时，也会随之带来挑战。高通量测序技术与其他分子检测或序列检测技术面临着相似的挑战。不过，基于高通量测序技术的研究结果对植物检疫意义重大。例如，植物材料的运输会因疑似携带某种（先前未知的）微生物而受限制，而后者不可能是这种植物材料的病原。植物携带的生物不都是有害生物，相反，都是植物微生物组的组成部分；一些可能是共生生物，对寄主植物有利，一些则可能是共生媒介。确保监管决策针对有害生物而非共生生物或共生媒介，是采用全基因组测序作为诊断方法的一个关键标准。还有一个问题，与其他间接方法一样，高通量测序技术可能检测出无活性生物。

从全基因组序列中正确鉴定或预测有害生物，是在利用这种技术中面临的两项不同却又重大的挑战。结果的正确解释是在利用高通量测序技术中面临的另一大挑战。必须建立非常庞大、精心编排的已知有害生物和微生物的全基因组或条形码数据库，据此与高通量测序生成的序列数据进行比较。由于发现新微生物的速度越来越快，因此国家植保机构将面临挑战，不得不在没有完整信息（甚或没有任何信息）的情况下，根据核酸数据分析，确定某项结果的生物学意义，例如某种微生物感染植物或植物产品的能力。这种确定所涉生物是否是有害生物的决策进程，使诊断结果不同于任何致病性分析结果，并在确定数据是否表明实际携带作为检疫性有害生物的活性致病性生物实体方面提出质疑。不过，同样的挑战也见于分子学和第一代测序方法，特别是对“科学界新发现的”病毒而言，因此这不是个新问题。利用高通量测序进行监管方面的其他挑战在 Martin 等（2016）、Massart 等（2017）和 Olmos 等（2018）中有所提及。

为了让国家植保机构有信心采用高通量测序技术进行有害生物诊断，必须采取国际统一的方法，例如制定操作准则，可靠地、重复地进行高通量测序，包括进行质量控制和数据验证，解释高通量测序结果（Boonham 等，2014）。还有必要对照同时考虑到了现行程序局限的现有方法，对这种技术进行验证。有必要针对每种目标有害生物和组合，仔细验证高通量测序技术，以便证明这种技术“胜任其职”。有必要制定实验室规程，同时说明样本制备方法、数据分析流程和待用数据库。

全球协作

全球各地正在采取若干举措，探索如何利用高通量测序技术，作为植物检疫诊断工具（如在澳大利亚、欧洲和北美洲），其中包括对可能制定的相关政策展开讨论。必须协调这些举措取得的成果，从而推进及时地制定国际统一的标准，促进在监管中利用高通量测序。

参考文献

- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Islas, C.和 Rowhani, A.。2015。为葡萄病毒性病原体最优检测比较下一代测序与生物学标引。 *Phytopathology*, 105 (6): 758 - 763。
- Barrero, R.A., Napier, K.R., Cunnington, J., Liewing, L., Keenan, S., Frampton, R.A., Szabo, T.等。2017。病毒和类病毒的植物生物安全诊断和监视的互联网生物信息学工具箱。 *BMC Bioinformatics*, 18: 26。
- Boonham, N., Kreuze, J., Winter, S., van der Vlugt, R., Bergervoet, J., Tomlinson, J.和 Mumford, R.。2014。病毒诊断方法：从酶联免疫吸附法到下一代测序。 *Virus Research*, 186: 20-31。
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T.和 Barba, M.。2016。植物病毒学中的下一代测序和基因组编辑。 *Frontiers in Microbiology*, 7: 1325。
- Mackie, J., Liewing, L., Barrero, R.A., Dinsdale, A., Napier, K.R., Blouin, A.G., Woodward, L.等。2017。使用现有入境后植物检疫和小分子 RNA 下一代测序方法并行试验的病毒性病原体比较诊断。植物生物安全合作研究中心“科学保护植物健康”会议摘要，澳大利亚布里斯班，2017年9月23-28日。参见 <http://apps-2017.p.yrd.currinda.com/days/2017-09-26/abstract/4017> (上次访问: 2018年10月21日)。
- Martin, R.R., Constable, F.和 Tzanetakis, I.E.。2016。检疫规定和现代检测方法的影响。 *Annual Review of Phytopathology*, 54: 189-205。
- Massart, S., Candresse, T., Gil, J., Lacomme, C., Predajna, L., Ravnikar, M., Reynard, J.-S.等。2017。下一代测序技术鉴定的植物病毒和类病毒的生物安全、商业、监管和科学影响评价框架。 *Frontiers in Microbiology*, 8: 45。
- Olmos, A., Boonham, N., Candresse, T., Gentit, P., Giovani, B., Kutnjak, D., Liewing, L.等。2018。高通量测序技术用于植物有害生物诊断：挑战和机遇。 *EPPO Bulletin*, 48: 219-224。
- Rott, M., Xiang, Y., Boyes, I., Belton, M., Saeed, H., Kesanakurti, P., Hayes, S.等。2017。下一代测序用于木本水果病毒和类病毒诊断测试。 *Plant Disease*, 101: 1489-1499。