

本诊断规程于2018年8月由标准委代表植物检疫措施委员会通过。

本附件为第27号国际植检标准规定的一部分。

第27号国际植物检疫措施标准

限定有害生物诊断规程

DP2：李痘病毒 (*Plum pox virus*)

2018年通过；2020年出台

目 录

1. 有害生物信息	2
2. 分类学信息	3
3. 检测与鉴定	3
3.1 寄主范围	4
3.2 症 状	4
3.3 生物学检测	5
3.4 血清学和分子检测取样	5
3.5 血清学检测与鉴定	6
3.5.1 双抗体夹心间接酶联免疫吸附分析	6
3.5.2 双抗体夹心酶联免疫吸附分析	7
3.6 分子检测与鉴定	7
3.6.1 RNA 纯化、免疫捕获和 cDNA 合成	7
3.6.2 反转录聚合酶链式反应	8
3.6.3 免疫捕获反转录聚合酶链反应	9
3.6.4 协同反转录聚合酶链反应	9
3.6.5 实时反转录聚合酶链反应	10
4. 株系鉴定	12
4.1 株系的血清学鉴定	13
4.2 株系的分子鉴定	14
4.2.1 反转录聚合酶链反应	14
4.2.2 免疫捕获反转录聚合酶链反应	15
4.2.3 协同反转录聚合酶链反应	15
4.2.4 实时反转录聚合酶链反应	15
5. 分子生物学检测对照	16
6. 记 录	17
7. 获取进一步信息的联系点	18
8. 致 谢	19
9. 参考文献	19

1. 有害生物信息

李痘病毒病是核果类果树上为害最严重的病毒病之一。该病害最早于1917-1918年报道见于保加利亚欧洲李（*Prunus domestica*），并在1932年被描述为病毒病。此后，该病毒逐渐传播到欧洲大部分地区，包括环地中海盆地以及近东地区。在南美、北美和亚洲局部地区也发现了该病毒的分布（EPPO, 2006; CABI, 2018）。

李痘病毒病由 *Plum pox virus*（李痘病毒，简写名PPV）引起，为害李属植物。特别是可对杏（*P. armeniaca*）、欧洲李（*P. domestica*）、桃（*P. persica*）和李（*P. salicina*）造成毁灭性危害，因为它会降低果实品质并导致提前落果。据估计，自1970年以来世界范围内防治李痘病毒病的费用已超过100亿欧元（Cambra等，2006b）。

李痘病毒是马铃薯Y病毒科马铃薯Y病毒属的一个成员。病毒粒子为约700nm×11nm的线状体，包含一条单链的RNA分子，该RNA分子由近10000个核苷酸组成，并包被在由多达2000个亚基构成的单一衣壳蛋白中（García等，2014）。PPV在田间由蚜虫以非持久性方式传播，感染了病毒的植物繁殖材料的调运是PPV远距离传播的主要途径。通过种子和花粉的传播尚未得到证实（Pasquini和Barba, 2006; Ilardi和Tavazza, 2015）。在实验条件下，PPV可机械传播至众多李属植物和几种草本植物如拟南芥（*Arabidopsis thaliana*），菊叶香藜（*Chenopodium foetidum*），本氏烟（*Nicotiana benthamiana*），克利夫兰烟（*Nicotiana clevelandii*），心叶烟（*Nicotiana glutinosa*）和豌豆（*Pisum sativum*）（Barba等，2011）。

李痘病毒的分离物目前可分为9个单源株系：D（Dideron）、M（Marcus）、C（樱桃）、EA（ElAmar）、W（Winona）、Rec（重组）、T（土耳其）、CR（俄罗斯樱桃）和An（始祖Marcus）等（James等，2013）。不同株系具有特定的基因组序列，其症状特征、致病性、寄主范围、流行病学和蚜虫的传播性可能存在差异。大多数PPV的分离物均属于D和M株系。PPV的D和M株系都很容易侵染杏和欧洲李，但是它们对桃栽培品种的侵染能力不同。这两个株系致病力也有所不同，一般情况下，M株系在侵染杏、欧洲李、李和桃时比D株系分离物引起的病害流行速度更快、症状更严重。EA株系分离物仅在埃及有分布，有关其流行病学和生物学特性的信息较少。一些欧洲国家已经鉴定出了侵染甜樱桃（*P. avium*）和酸樱桃（*P. cerasus*）的PPV的分离物。这些分离物来源于两个被定义为PPV-C和PPV-CR的不同株系。从加拿大的欧洲李上分离出了一种非典型的PPV（PPV-W），代表了一种独特的PPV株系。此外，已经将PPV的D和M株系自然重组形成的重组型描述为PPV-Rec，该重组型表现出与D株系类似的病害流行病学行为。最近，土耳其报道了第二种重组株系分离物并定义为T株系（Ulubaş Serçe等，2009）。一种单分离物PPV-An

被报道并被推测可能是PPV-M的一个先祖（Palmisano等，2012）。此外，还提出了一个新的酸樱桃适应性假定株系（Tat），既非C株系也非CR株系（Chirkov等，2016）。

关于PPV的更多信息，包括对其病害症状的描述，可参考Barba等（2011）、CABI（2018）、EPPO（2004，2006，2018b）、García等（2014）和PaDIL（2018）等文献。

2. 分类学信息

名称： *Plum pox virus*（简称PPV）
别名： 莎卡（*Sharka*）病毒
分类学地位： 马铃薯Y病毒科，马铃薯Y病毒属
通用名： 李痘病毒病，莎卡（*Sharka*）

3. 检测与鉴定

可通过生物学、血清学和分子方法来检测PPV，然而必须通过血清学或分子方法来进行PPV的鉴定。使用血清学或分子方法进行的试验是PPV检测鉴定的最低要求，特别是在已知该有害生物在一个国家已经广泛分布的常规诊断中。当国家植保组织（NPPO）要求对PPV的鉴定具有更高的可信度时（例如在该病毒的未知发生地区或对来自宣称没有该有害生物发生国家的货物进行检测时），可能需要进行进一步的检测。在使用分子方法进行最初鉴定的情况下，后续确认最好使用具有较高分析灵敏度的方法，或者，如果可能的话，使用针对不同基因组区域或序列分析的分子方法进行确认。进一步的检测也可以使用包括以蛋白质元素为靶标的血清学方法或现行PPV株系鉴定方法。可作进一步的检测以鉴定检测出的PPV的株系。在任何情况下，检测中均须包括阳性和阴性对照。推荐的检测技术将在下面的章节进行描述。

本诊断规程描述了用于PPV检测鉴定的成熟方法。一些新的先进的技术已被用于检测PPV，如环介导等温扩增（Varga和James，2006b）和新一代测序技术（Rodamilans等，2014）。然而，由于新一代测序和环介导等温扩增（LAMP）¹尚未被充分验证为PPV的常规检测工具，没有已发表的操作规程，这些技术没有包括在本诊断规程中。

在本诊断规程中，各种方法（包含引用的商标名）均按出版要求加以说明，因为它们决定了可获得的灵敏度、特异性和可重复性的最初水平。本规程提供的实验室

¹ 当在日本（专利号 3,313,358，3,974,441 和 4,139,424）、美国（US6,410,278，US6,974,670 和 US7,494,790）、欧盟（1,020,534，1,873,260，2,045,337 和 2,287,338 号）、中国（ZL008818262）、韩国（专利号 10-0612551）、澳大利亚（779160 号）和俄罗斯（2,252,964 号）等有专利体系的地区常规使用 LAMP 时，使用者需在使用前取得荣研化学公司的许可。

程序可根据个别实验室的标准进行调整，前提是它们经过了充分验证。

3.1 寄主范围

在自然条件下，PPV很容易侵染用于商品品种或砧木的李属（蔷薇科）果树：主要寄主包括杏（*Prunus armeniaca*）、红叶李（*P. cerasifera*）、山桃（*P. davidiana*）、欧洲李（*P. domestica*）、圆叶樱桃（*P. mahaleb*）、*marianna*李（*P. Marianna*）、梅（*P. mume*）、碧桃（*P. persica*）、中国李（*P. salicina*）及其种间杂交种。PPV的樱桃适应型株系可自然侵染甜樱桃（*P. avium*）和酸樱桃（*P. cerasus*）（James等，2013）。扁桃（*P. dulcis*）偶尔也可能被PPV侵染（Llácer和Cambra, 2006）。这种病毒还可侵染许多野生和园艺李属植物，如西方沙樱桃（*P. besseyi*）、紫色沙樱桃（*P. cistena*）、麦李（*P. glandulosa*）、布拉斯李（*P. insititia*）、月桂樱桃（*P. laurocerasus*）、黑刺李（*P. spinosa*）、毛樱桃（*P. tomentosa*）和榆叶梅（*P. triloba*）（James和Thompson, 2006）。在实验条件下，PPV可以通过机械接种传播到许多李属植物和一些草本植物上（见第一节）。

3.2 症状

李痘病毒引起的症状可能在田间植株的叶、枝条、树皮、花瓣、果实和果核上出现。叶部的症状在生产季节早期一般很明显，包括中度至浅绿色的褪绿；褪绿斑、条带或环；明脉或黄化；或者叶片变为畸形。某些叶部症状与其他病毒如美洲李线纹病毒（*American plum line pattern virus*）引起的相似。红叶李的GF 31栽培品种树皮表现出锈棕色栓皮和裂纹。

花部症状可包括花瓣变色（粉色条斑）和花朵破裂症状（Barba等，2011）。当某些品种的桃感染M株系或麦李感染D株系PPV时，可能出现这些花部症状。

受感染的果实出现褪绿斑或轻度环斑或线状条纹。果实可能会变形，呈不规则状并在其褪色环内形成褐色或坏死区域。一些果实，特别是杏和欧洲李子果实的畸形症状和苹果褪绿叶斑病毒（*Apple chlorotic leaf spot virus*）引起的症状相似。染病果实可能出现内部褐色和果肉的胶质化并降低品质。在严重情况下，染病果实在成熟前就会从树上掉落。一般早熟品种的果实表现的症状比那些晚熟品种的更显著。染病杏果实的果核会表现出典型的浅色的环或斑。这些染病果实中产生了酒精或其他的刺激物，导致果实异味而丧失市场价值。

症状发展和严重程度主要取决于寄主植物和气候条件。该病毒在寒冷气候下可潜隐数年。

不同寄主植物症状可见于如EPPO（欧洲和地中海植物保护组织）全球数据库网站（<https://gd.eppo.int/taxon/PPV000>）。

3.3 生物学检测

用于检测PPV的主要指示植物是红叶李GF31、桃GF305、桃×山桃的Nemaguard, 或毛樱桃的幼苗。用种子培育指示植物, 将种子播种于透水良好的土壤混合物中, 并在18℃和25℃之间的防虫温室中培育, 直到植株足够大时(通常直径为3—4mm, 高度为25—30cm)进行嫁接。其他李属种类的幼苗也可用作指示植物接穗进行嫁接。指示植物必须按照常规嫁接方法如芽接进行嫁接接种(Desvignes, 1999), 每一指示植物至少需四次重复。将嫁接的指示植物放置于同上所述的环境中培育, 三周后在其最上部接穗的上端进行几厘米的修剪(Gentit, 2006)。嫁接的植物至少在6周内都要检查症状。修剪后的植株在生长3—4周后, 观察新生部分是否出现病毒病症状-特别是褪绿条带和条纹, 并与阳性和阴性健康对照进行比较。PPV在指示植物上引起的症状的图解可参看Damsteegt等(1997; 2007)和Gentit(2006)。

关于嫁接(检测方法)的专一性、灵敏性和可靠性方面尚未见定量数据的报道。该方法广泛应用于认证检测程序中, 并被认为是灵敏的检测方法。但是, 该方法不是一个快速检测方法(接种后症状的出现需要几周时间), 该方法只可用于检测接芽, 且需要专门的设施一如可控制温度的温室, 而且观察到的症状可能会与那些通过嫁接传播的其他病原菌的症状相混淆。另外, 有些不显症的株系不会引发症状, 因此在指示植物上检测不到。

草本植物也可用于PPV的生物学检测(Barba等, 2011)。PPV可被机械传播于多种草本植物种(见第一节)。

3.4 血清学和分子检测取样

ISPM 31《货物抽样方法》提供了抽样方法的一般性指导。在一些情况下(例如在一个国家中对一种广泛分布的有害生物的常规诊断)可使用采自许多植物的大样本对多种植物同时进行检测。对一种还是多种植物进行检测取决于植株中的病毒浓度和NPPO要求的置信水平。李属繁殖材料通常以休眠插条的形式运输。在这种情况下, 只有芽和韧皮部组织(树皮碎屑)可直接用于检测。

适当的样本选择对于PPV的检测很关键。抽样应考虑病毒生物学和当地气候条件, 特别是生长季节的天气情况。如果出现了典型症状, 可采集表现症状的花、叶片或果实作为样本。对于没有显示症状的植物, 必须从植株每一个分叉的中部采集至少一年生以上的带有成熟叶片或完全展开叶片的老枝条(生长1年以下嫩枝的检测结果不可靠)。至少应从每株植物的4个不同的位置(例如4根枝条或4片树叶)采样。这一点至关重要, 因为PPV的分布不均匀。不能在最高温度的月份进行采样。对秋季采集样品的检测不如春季采集样品的检测结果可信。最好从果树植株冠盖的内部采样。在春季, 可采集花、带有完全伸展叶片的新发枝条或果实。在夏、秋季, 从田间或包装室内采集的成熟叶片或者成熟果实的果皮可用于分析。在夏季, 休眠插条的芽可以

用于反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）或实时荧光PCR，这也是成熟叶片检测的首选方法。分析处理前，采集的花、枝条和果皮在4℃下保存不能超过10天。果实处理前可以在4℃保存1个月。冬天可采集分叉、枝条和细条基部的休眠芽或树皮组织，或者完整的芽体用于检测。

3.5 血清学检测与鉴定

对于大样本的筛选检测，强烈推荐采用酶联免疫吸附检测方法（ELISA）。

对于样品的处理，将0.2-0.5克左右的新鲜植物材料切成小块并放入大小合适的试管或塑料袋中。使用电动捣碎机、手工研磨棒、锤子或类似工具在4-10mL（1:20重量/容积）提取液中（或按照ELISA试剂盒制造商的推荐）将样品捣碎成匀浆。提取缓冲液是pH7.2—7.4的磷酸盐缓冲液（PBS），含有2%的聚乙烯基吡咯烷酮和0.2%二甲基二硫代氨基甲酸钠盐（Cambra等，1994）或其他适当的替代缓冲液。植物材料必须充分捣匀并立即用于检测。

3.5.1 双抗体夹心间接酶联免疫吸附分析

双抗体夹心间接酶联免疫吸附检测（DASI-ELISA），也称之为三抗体夹心酶联免疫吸附检测（TAS）-ELISA。根据Cambra等（1994），应该按照试剂盒制造商的实验指南采用特异性的5B-IVIA单克隆抗体来进行检测。

单克隆抗体（MAb）5B-IVIA可用于检测绝大多数PPV株系（Cambra等，2006a）。MAb 5B-IVIA也将用于检测CR株系的分离物，但用于分析的提取物需调节到pH6.0以提高5B-IVIA的结合性（Glaser等，2013；Chirkov等，2013）。推测的樱桃适应株系（Tat）也可使用5B-IVIA检测（Chirkov等，2016）。然而，没有使用MAb 5B-IVIA检测PPV-An的报道（Palmisano等，2012）。

17个实验室采用一组10个样品进行了一个DIAGPRO成环试验（Harju等，2000），样品包括采集自法国和西班牙的受PPV（PPV-D、PPV-M与PPV-D+M）侵染的样品和健康样品对照，结果表明使用5B-IVIA单克隆抗体进行DASI-ELISA检测精确度为95%（采用该技术检测出的真实阴性数和真实阳性数除以检测的样本数）。该精确度比使用免疫捕获RT-PCR（IC-RT-PCR）82%或协同RT-PCR（Co-RT-PCR）94%的精确度更高（Olmos等，2007；Cambra等，2008）。与使用纯核酸或点样品进行实时RT-PCR的检测率（分别为89.2%和98.0%）及IC-RT-PCR的检测率（96.1%）相比，使用单克隆抗体5B-IVIA进行DASI-ELISA检测的真实阴性率（采用该技术检测出的真实阴性数除以健康植株的个数）是99%。Capote等（2009）也报道在冬季使用单克隆抗体5B-IVIA进行DASI-ELISA检测出的某一个阳性结果具有98.8%的概率是真实阳性。不同批次的抗体之间可能存在差异，因此常规检测前应进行性能验证。

5B-IVIA单克隆抗体可专一、灵敏和可靠地检测所有待测PPV株系（Cambra等，1994；Cambra等，2006a；Glasa等，2013；Chirkov等，2013；Chirkov等，2016）。一些具有验证数据的多克隆抗体试剂盒是可用的（Gougherty等，2015；EPPO, 2018a），但已被证明精确性较低且在不同的批次间缺乏一致性（Cambra等，2006a），因此在使用前应经过验证。在使用多克隆抗体进行检测，且国家植保组织对PPV鉴定有更高的可信度要求时，建议进一步采用其他的检测方法。

3.5.2 双抗体夹心酶联免疫吸附分析

常规或生物链霉素亲合双抗体夹心酶联免疫吸附检测（DAS-ELISA）使用基于5B-IVIA单克隆抗体或多克隆抗体的试剂盒，该检测已证明可检测PPV大多数株系，包括了分布最广的株系D、M和Rec，且不会与其他病毒或健康植物材料产生交叉反应（Cambra等，2006a；Capote等，2009）。应该按照试剂盒制造商的实验方法来进行检测。

3.6 分子检测与鉴定

与血清学方法相比，使用分子检测方法（如RT-PCR）可能更加昂贵，特别是在进行大规模检测时。然而，分子检测方法特别是实时RT-PCR一般比血清学方法要灵敏得多。使用实时RT-PCR还减少了扩增反应后的处理过程（例如：凝胶电泳），因而与传统PCR相比更快且不易受到目标DNA的污染。

除了IC-RT-PCR（该检测不需要提取RNA），应使用合适的有效程序来进行RNA提取。样品应分置于单个塑料袋中，以免在提取过程中交叉污染。而对于实时RT-PCR，可将点印植物提取液、组织印压汁液或挤压出的植物组织汁液移到吸水纸或尼龙膜上进行分析（Olmos等，2005；Osman和Rowhani，2006；Capote等，2009）。推荐使用检测灵敏度较高的实时RT-PCR而非常规RT-PCR检测点印的或挤压的植物汁液样本。

下列各方法给出了用作一个模板的提取物的数量。取决于方法的灵敏度，检测PPV所要求的模板的最低浓度变化如下：RT-PCR，100 fg RNA模板/mL；Co-RT-PCR，1 fg RNA模板/mL；实时RT-PCR，2 fg RNA模板/mL。

3.6.1 RNA 纯化、免疫捕获和 cDNA 合成

3.6.1.1 RNA 纯化

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

3.6.1.2 免疫捕获

免疫捕获是纯化RNA的另一种可供选择的替代方法。在实验时，先准备好稀释的抗体混合液并用其包被用于反转录反应的离心管。详细操作流程见3.6.2节。

3.6.1.3 cDNA 合成

由于RNA在贮存中存在保存问题，建议合成互补（c）DNA进行保存，因为相比于RNA，cDNA对温度的要求低，能够保存较长时间。

3.6.2 反转录聚合酶链式反应

尽管可能存在其他广谱引物（Olmos等，2006），下列RT-PCR方法中使用的引物已经得到了很好的验证，并可以作为一般PPV检测的参考。在描述这些方法开发和验证的研究中没有发现假阳性结果（Wetzel等，1991；Levy和Hadidi，1994）。Wetzel等（1991）引物还有一个好处，结合对243个碱基对（bp）产物进行限制性片段长度多态性分析，它们可以识别PPV的两种最常见株系。

在该检测中采用的RT-PCR引物可以是Wetzel等（1991）发表的引物：

P1反向引物（5' -ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3' ）

P2正向引物（5' -CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3' ）

也可以是Levy和Hadidi（1994）发表的引物：

3' NCR正向（5' -GTA GTG GTC TCG GTA TCT ATC ATA-3' ）

3' NCR反向（5' -GTC TCT TGC ACA AGA ACT ATA ACC-3' ）

25μL的反应混合物组成如下：1μM的每对引物（P1和P2或3' NCR引物对）、250μM dNTPs、1单位的禽成髓细胞瘤病毒（AMV）反转录酶²、0.5单位的Taq DNA聚合酶、2.5 μL 10× Taq聚合酶缓冲液、1.5 mM MgCl₂、0.3% Triton X-100和5μL RNA模板。使用如下热循环参数进行反应：42℃ 45分钟；94℃ 2分钟；94℃ 30秒、60℃ 30秒（P1和P2引物）或62℃ 30秒（3' NCR引物）、72℃ 60秒，40个循环；72℃延伸10分钟。对PCR产物进行凝胶电泳分析。P1/P2引物对产物为一个243个碱基对的扩增片段，3' NCR引物产物为一个220个碱基对的扩增片段。

通过检测来源于地中海地区（塞浦路斯、埃及、法国、希腊、西班牙和土耳其）的PPV分离物对Wetzel等（1991）的检测方法进行了评估。该检测方法可以检测出10 fg的病毒RNA，相当于2 000个病毒粒子（Wetzel等，1991）。Levy和Hadidi（1994）通过检测来源于埃及、法国、德国、希腊、匈牙利、意大利、西班牙和罗马尼亚的PPV分离物对其检测方法进行了评估。

² 本诊断规程使用的试剂、化学品和设备名称并不意味着批准这些产品而将其它适用产品排除在外。

3.6.3 免疫捕获反转录聚合酶链反应

可按照Wetzel等（1992）的方法进行免疫捕获阶段的反应，即采用在3.5节中所描述的植物汁液提取液，并使用单独的试管或塑料袋以避免污染。可以使用任何经过适当验证的抗体。本检测仅针对分布广泛的D和M株系的分离物进行了验证。

用pH 9.6的碳酸盐缓冲液制备多克隆抗体或某PPV特异性单克隆抗体(如5B-IVIA)稀释液（1g/mL）。将100 μ L稀释抗体液等量分装入PCR管中并在37℃孵育3小时。用150 mL无菌PBS-Tween（洗涤缓冲液）冲洗离心管两次，并使用无核酸酶水洗涤两次。将植物提取液（100 μ L；见3.5节）离心（15 500 g，5分钟）获得上清，将上清液加入已包被的PCR管中。PCR管在冰上或37℃孵育2小时后用150 μ L无菌PBS-Tween液将离心管清洗3次。使用Wetzel等。（1991）发表的引物，根据3.6.2节所述制备RT-PCR反应混悬液并直接加入已包被的PCR管中。按照3.6.2节所述进行扩增反应。

一般来说，IC-RT-PCR要求使用特异性抗体，尽管直接结合的方法可以取消这一要求。使用DIAGPRO成环检测，对5B-IVIA单克隆抗体免疫捕获RT-PCR进行验证，结果表明该方法对PPV的检测准确率为82%（Olmos等，2007；Cambra等，2008）。Capote等（2009）报道在冬季使用5B-IVIA单克隆抗体进行免疫捕获RT-PCR检测出的阳性结果是真实阳性的概率为95.8%。

3.6.4 协同反转录聚合酶链反应

在协同（Co）-RT-PCR检测中使用的RT-PCR引物是Wetzel等（1991；P1和P2）和Olmos等（2002；P10和P20）提出的：

内部引物P1（5′ -ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′ ）

内部引物P2（5′ -CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3′ ）

外部引物P10（5′ -GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA-3′ ）

外部引物P20（5′ -AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA-3′ ）

25 μ L的反应混合物组成如下：P1和P2引物各0.1 μ M、P10和P20引物各0.05 μ M、400 μ M dNTPs、2单位的AMV反转录酶、1单位的Taq DNA聚合酶、2.5 μ L 10×反应缓冲液、3 mM MgCl₂、5%二甲基亚砷、0.3%Triton X-100和5 μ L RNA模板。使用如下的热循环参数进行RT-PCR反应：42℃ 45分钟；94℃ 2分钟；94℃ 15秒、50℃ 15秒、72℃ 30秒，60个循环；72℃延伸10分钟。

将RT-PCR反应与采用3′ digoxigenin（DIG）—标记的PPV广谱探针（5′ -TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-DIG-3′ ）检测扩增片段的色谱检测仪相连接。将扩增的cDNA 95℃处理5分钟并迅速置于冰上进行变性。取一份1 μ L的等分样品于尼龙膜上。室温下干燥尼龙膜并在导光透明器中245 nm处理4分钟进行紫外

杂交连接。预杂交：将尼龙膜放入使用标准杂交缓冲液的杂交试管中，60℃下孵育1小时。倒掉溶液后，使用3' DIG-标记的探针与最终浓度为10 pmol/mL的标准杂交混合液进行杂交，60℃下孵育2小时。在室温下，用2×清洗液清洗尼龙膜2次15分钟，并用0.5×清洗液再清洗尼龙膜2次15分钟。在采用1%（1 g封闭剂溶解于100 mL马来酸缓冲液中）的无菌封闭液封闭30分钟前，将尼龙膜放入清洗缓冲液中平衡2分钟。用含有1:5 000抗-DIG-碱性磷酸酶标记抗体的1%封闭混合液（重量/容积）室温下孵育尼龙膜30分钟。用清洗液洗尼龙膜15分钟两次，并用检测缓冲液（100 mM Tris-HCl、100 mM氯化钠，pH 9.5）平衡2分钟。通过将45 μL NBT溶液（75 mg/mL硝基蓝四唑盐溶于70%（容积/容积）二甲基甲酰胺）和35 μL BCIP溶液（50 mg/mL 5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸甲苯胺盐溶于100%二甲基甲酰胺）混合在10 mL的检测缓冲液中而制备反应底物。与底物孵育1小时后，用清水清洗来停止反应。

该检测方法比Wetzel等（1991）的RT-PCR方法要灵敏100倍以上（Olmos等，2002）。对该检测方法进行了一个DIAGPRO成环检测评估，结果表明检测准确率为94%（Olmos等，2007；Cambra等，2008）。

3.6.5 实时反转录聚合酶链反应

可以使用TaqMan或SYBR Green I2（试剂盒）来进行实时RT-PCR。已有两种TaqMan方法用于常规检测PPV（Schneider等，2004；Olmos等，2005）。第一种方法中应用的引物和TaqMan探针是由Schneider等（2004）报道的：

正向引物（5' -CCA ATA AAG CCA TTG TTG GAT C-3' ）

反向引物（5' -TGA ATT CCA TAC CTT GGC ATG T-3' ）

TaqMan探针（5' -FAM-CTT CAG CCA CGT TAC TGA AAT GTG CCA-TAMRA-3' ）。

25 μL的反应混合物组成如下：1×反应混合液（每种dNTP0.2 mM和1.2 mM MgSO₄）、正向和反向引物各200nM、100nM TaqMan探针、4.8 mM MgSO₄、0.5 μL RT/Platinum Taq混合液（Superscript One-Step RT-PCR与Platinum Taq DNA聚合酶Invitrogen）2和5μLRNA模板。按照以下的热循环参数进行RT-PCR反应：52℃ 15分钟；95℃ 5分钟；95℃ 15秒、60℃ 30秒，60个循环。根据设备制造商的实验指南对PCR产物进行实时分析。

通过检测来源于美国的PPV D分离物，C，D，EA 和M株系分离物以及8个其他病毒对Schneider等（2004）报道的检测方法进行了评估。该检测方法具有专一性并可稳定地检测出10-20 fg的病毒RNA（Schneider等，2004）。该方法还可检测出几种寄主中以及桃的叶子、茎部、芽和根部的PPV。

第二种检测方法的引物和TaqMan探针是由Olmos等（2005）等报道的：

P241引物（5′ -CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3′）

P316D引物（5′ -GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3′）

P316M引物（5′ -GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3′）

PPV-DM探针（5′ -FAM-CGT CGG AAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-TAMRA-3′）。

25 μL的反应混合物组成如下：1 μM的P241引物、0.5 μM各种P316D和P316M引物、200 nM TaqMan探针、1×TaqMan广谱PCR Master混合液（Applied Biosystems）²、1×MultiScribe和RNase抑制混合液（Applied Biosystems）²和5 μL的RNA模板。按照以下的热循环条参数进行RT-PCR反应：48℃ 30分钟；95℃ 10分钟；95℃ 15秒、60℃ 60秒，40个循环。根据设备制造商的实验指南对PCR产物进行实时分析。

Olmos等（2005）通过检测PPV-D和PPV-M的每个株系的3个分离物对该检测方法进行了评估，该检测方法的灵敏度比采用5B-IVIA单克隆抗体的DASI-ELISA检测法要高1000倍以上。与使用点印取样的实时RT-PCR检测率（93.6%）、IC-RT-PCR的检测率（91.5%）或使用5B-IVIA单克隆抗体的DASI-ELISA的检测率（86.6%）（Capote等，2009）相比，采用实时TaqMan和提纯核酸进行实时RT-PCR检测的真实阳性率（由该技术检测出的真实阳性数除以受PPV侵染的植株数）为97.5%（Olmos等，2005）。

Varga和James（2005）描述了一种快速检测PPV和鉴定D和M株系的SYBR Green I²（试剂盒）检测方法：

P1（5′ -ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′）

PPV-U（5′ -TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3′）

PPV-FD（5′ -TCA ACG ACA CCC GTA CGG GC-3′）

PPV-FM（5′ -GGT GCA TCG AAA ACG GAA CG-3′）

PPV-RR（5′ -CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3′）。

可能需要下列内参对照引物（Menzel等，2002）来保证检测结果的有效性：

Nad5-正向（5′ -GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3′）

Nad5-反向（5′ -CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3′）。

该方法采用的是一种两步RT-PCR的程序。反转录（RT）反应混合物组成如下：2 μL的10 μM P1引物、2 μL的10 μM Nad5-R引物、4 μg总RNA和5 μL水。72℃孵育5分钟后放在冰块中。加入4 μL 5×第一链缓冲液（Invitrogen）²，2 μL 0.1 M二硫苏糖醇（DTT），1 μL 10 mM dNTPs，0.5 μL RNaseOUT（40单位/μL）（Invitrogen）²，1 μL Superscript II（Invitrogen）²和2.5 μL水。混合物置于42℃孵育60分钟后99℃孵育

5分钟。24 μ L的反应混合物组成如下：400 nM PPV-U引物，350 nM PPV-FM引物，150 nM PPV-FD引物，200nMPPV-RR引物，100nMNad5-F引物，100nMNad5-R引物，200 μ M dNTPs，2 mM $MgCl_2$ ，1 $\times$ Karsai缓冲液（Karsai等，2002），1:42 000 SYBR GreenI 2和0.1 μ L Platinum Taq DNA高纯度聚合酶（Invitrogen）²。将反应混合液和1 μ L的cDNA（1:4）加入无菌PCR管中。按照以下的热循环参数进行PCR反应：95 $^{\circ}C$ 2分钟；95 $^{\circ}C$ 15秒、60 $^{\circ}C$ 60秒，39个循环。熔点曲线分析在60 $^{\circ}C$ 至95 $^{\circ}C$ 以0.1 $^{\circ}C$ /s的熔化速率进行，从而得到平均为1点的平滑曲线。在Varga和James（2005）确定的条件下，每个产物的熔解温度为：

广谱PPV检测（74 bp片段）：80.08–81.52 $^{\circ}C$

D株系（114 bp片段）：84.3–84.43 $^{\circ}C$

M株系（380 bp片段）：85.34–86.11 $^{\circ}C$

内参对照（181 bp片段）：82.45–82.63 $^{\circ}C$

Varga和James（2005）通过对烟草属（*Nicotiana*）和李属（*Prunus*）植物上的PPV-C、PPV-D、PPV-EA、PPV-M型以及一个未鉴定株系的分离物进行检测，对其检测方法进行了评估。

4. 株系鉴定

本节描述了用于PPV株系鉴定的其他步骤（使用DASI-ELISA，RT-PCR，Co-RT-PCR和实时RT-PCR）（见图1）。PPV鉴定并非一定要分辨出该病毒的株系，但是国家植物保护组织可能希望对该病毒的株系进行鉴定，以有利于预测该病毒的流行病学行为。

考虑到PPV的变异性，除了基因序列测定或某些以PCR为基础的检测技术外（见下文）的其他方法对小部分分离物的检测有可能产生错误结果。但是，根据下面所描述的血清学或分子检测方法，一般情况下可以鉴定出D和M株系的PPV（Candresse和Cambra，2006；Capote等，2006）。没有提供鉴定株系如An和T的技术，因为其鉴定方法尚未得到验证和发表，且到目前为止，已鉴定确认的株系太少。

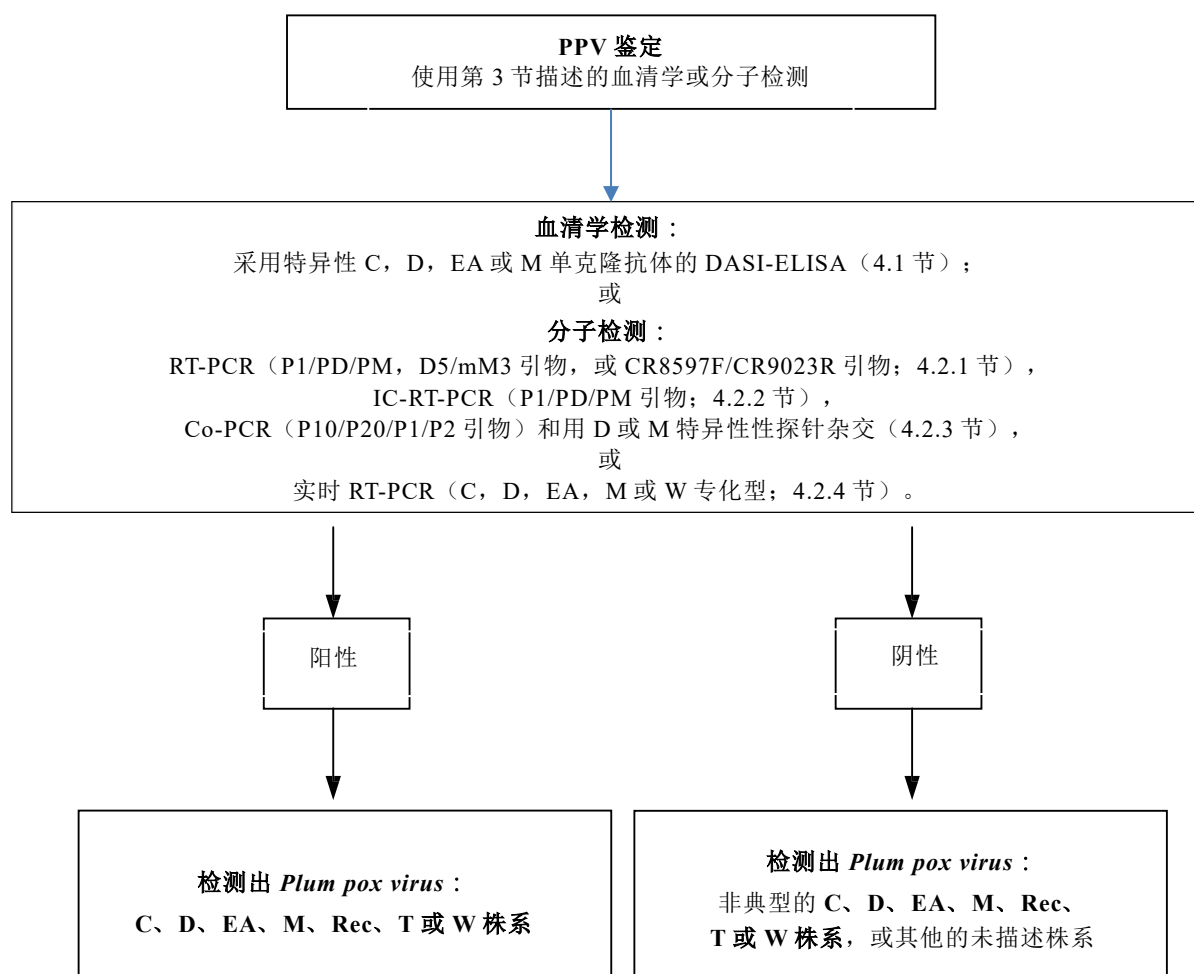


图1：Plum pox virus株系鉴定方法流程图

当国家植物保护组织对鉴定PPV的株系有更高可信度的要求时，可能需要进行进一步的检测。在检测非典型或未描述株系时，可测定PPV基因组的全序列或衣壳蛋白、P3-6K1和细胞质内含蛋白基因的全序列或部分序列。

4.1 株系的血清学鉴定

应根据Cambra等（1994）的检测方法，采用D和M株系的单克隆抗体（Cambra等，1994；Boscia等，1997），按照试剂盒制造商的实验指南应用DASI-ELISA来区分PPV的两种主要株系（D和M）。

通过DIAGPRO成环检测程序对该检测方法进行了评估，结果表明：对PPV-D型的检测鉴定精确度是84%、M型的是89%（Olmos等，2007；Cambra等，2008）。4D单克隆抗体是PPV-D型专化型的，但并非与所有的PPV-D型分离物都有反应。此外，由于这几个组具有相同的外壳蛋白基因序列，用于检测PPV-M型的AL单克隆抗体与属于PPV的M、Rec和T型的分离物均有反应。因此，需要再使用一个M株系专化型的单克隆抗体通过分子检测来区分M、Rec和T株系。

使用EA或C特异性单克隆进行DASI-ELISA，对PPV的EA和C组分离物的血清学鉴定已由Myrta等（1998；2000）报道过。然而，这些方法需要得到验证。

4.2 株系的分子鉴定

4.2.1 反转录聚合酶链反应

采用Olmos等（1997）报道的引物鉴定PPV-D和PPV-M型：

P1（5' -ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3'）

PD（5' -CTT CAA CGA CAC CCG TAC GG-3'）

PM（5' -CTT CAA CAA CGC CTG TGC GT -3'）

25 μ L的反应混合物组成如下：1 μ M的P1引物、1 μ M的PD或PM引物、250 μ M dNTPs、1单位AMV反转录酶（10单位/ μ L）、0.5单位Taq DNA聚合酶（5单位/ μ L）、2.5 μ L10 $\times$ Taq聚合酶缓冲液、1.5 mM MgCl₂、0.3% Triton X-100、2% formamide和5 μ L RNA模板。按照以下的热循环条件下进行RT-PCR反应：42 $^{\circ}$ C 45分钟；94 $^{\circ}$ C 2分钟；94 $^{\circ}$ C 30秒、60 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 60秒，40个循环；72 $^{\circ}$ C延伸10分钟。通过凝胶电泳对PCR产物进行分析。P1/PD和P1/PM引物对均会产生一个198碱基对的扩增片段。Olmos等（1997）通过检测6个PPV-D型分离物和4个PPV-M型分离物对其检测方法进行了评估。

由Varga和James（2005）报到的使用SYBR Green I²的实时RT-PCR方法也适用于鉴定PPVM和D株系，详细描述见3.6.5节。

采用Šubr等（2004）报道的mD5和mM3 Rec-特异性引物鉴定PPV-Rec型：

mD5（5' -TAT GTC ACA TAA AGG CGT TCT C-3'）

mM3（5' -CAT TTC CAT AAA CTC CAA AAG AC-3'）

25 μ L的反应混合物组成如下（根据Šubr等，2004修订）：1 μ M的各种引物、250 μ M dNTPs、1单位AMV反转录酶（10单位/ μ L）、0.5单位Taq DNA聚合酶（5单位/ μ L）、2.5 μ L 10 $\times$ Taq聚合酶缓冲液、2.5mM MgCl₂、0.3%Triton X-100和5 μ L RNA提取液（见3.6节）。反转录是使用随机的六核苷酸引物在42 $^{\circ}$ C 45分钟的条件下去进行的（Glaser等，2002）。PCR的参数为预变性94 $^{\circ}$ C 3分钟；94 $^{\circ}$ C 45秒、60 $^{\circ}$ C 30秒、72 $^{\circ}$ C 60秒，35个循环；72 $^{\circ}$ C延伸7分钟（Šubr等，2004）。通过凝胶电泳分析检测PCR产生的605碱基对的扩增片段。

PPV-CR是由Glaser等（2013）描述的CR8597F和CR9023R引物鉴定的：

CR8597F（5' -ATG ATG TGA CGT TAG TGG AC-3'）

CR9023R（5' -TCG TGT GTT AGA CAG GTC AAC-3'）

该方法采用了一个两步 RT-PCR 规程用于 PPV-CR 分离物的特异性鉴定 (Glasa 等, 2013)。由总 RNA 提取物 (NucleoSpin RNA 植物试剂盒, Macherey-Nagel)² 利用随机六聚体引物和 AMV 逆转录酶合成互补(c)DNA。然后将一等份 cDNA 加入含有 EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa Bio Inc.)² 的 PCR 反应混合物中。PCR 反应根据以下热循环参数进行: 98℃ 60 秒; 98℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 分钟。PCR 产物经凝胶电泳分析。CR 株系特异性引物扩增产物为 427 bp, 目标为 5' 端 CP 编码区。CR 引物的特异性经由 PPVD、M、Rec、T、W、EA、和 C 验证 (Glasa 等, 2013)。

4.2.2 免疫捕获反转录聚合酶链反应

按照 3.6.3 节所描述的方法进行免疫捕获。将 PCR 反应混合液直接加入已包被的 PCR 管中。按照 4.2.1 节所描述的方法进行 PPV-D 型和 PPV-M 型的检测鉴定。

4.2.3 协同反转录聚合酶链反应

采用 PPV-D 和 PPV-M 型株系特异性的 3' DIG-标记探针, 按照 3.6.4 节所描述的检测方法可以鉴定 PPV-D 和 PPV-M 株系 (Olmos 等, 2002):

PPV-D 特异性探针: 5' -CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-DIG-3'

PPV-M 特异性探针: 5' -AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3'

采用标准预杂交和杂交缓冲液 + 30% 甲酰胺 (用于 PPV-D 株系的鉴定) 或 + 50% 甲酰胺 (PPV-M 株系的鉴定) 在 50℃ 完成预杂交和杂交步骤。采用 2% (w/v) 的封闭液。

4.2.4 实时反转录聚合酶链反应

采用 SYBR Green I² 试剂盒按照 Varga 和 James (2005) 的方法 (见 3.6.5 节) 或 Capote 等 (2006) 所描述的 TaqMan 法可以特异性鉴定 PPV-D 和 PPV-M 株系。

在 Capote 等 (2006) 的检测方法中使用的引物和 TaqMan 探针是:

PPV-MGB-正向引物 (5' -CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

PPV-MGB-反向引物 (5' -CTC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3')

MGB-D 探针 (5' -FAM-TTC AAC GAC ACC CGT A-MGB-3')

MGB-M 探针 (5' -FAM-TTC AAC AAC GCC TGT G-MGB-3')

25 μL 的反应混合物组成如下: 1 μM 的各种引物、150nM MGB-D 或 MGB-MFAM 探针、1×TaqMan 广谱 PCR Master 混合液 (Applied Biosystems)²、1×MultiScribe 和 RNase 抑制剂混合液 (Applied Biosystems)² 和 5 μL RNA 模板 (见 3.6 节)。按照以下的热循环参数进行 RT-PCR 反应: 48℃ 30 分钟; 95℃ 10 分钟; 95℃ 15 秒、60℃ 60 秒,

40个循环。按照试剂盒制造商提供的实验指南对PCR产物进行实时分析。Capote等（2006）通过对分别来源于PPV-D和PPV-M株系的12个分离物和这两个株系混合侵染的14个样本的检测试验对该检测方法进行了评估。

采用SYBR Green I²化学公司试剂盒，按照Varga和James（2006a）的方法可特异性地鉴定PPV-C、PPV-EA和PPV-W株系。该方法采用的引物是：

P1（5′ -ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3′ ）

PPV-U（5′ -TGA AGG CAG CAG CAT TGA GA-3′ ）

PPV-RR（5′ -CTC TTC TTG TGT TCC GAC GTT TC-3′ ）

可以添加以下的内参对照引物（Menzel等，2002）以确保检测反应的正确进行：

Nad5-正向（5′ -GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3′ ）

Nad5-反向（5′ -CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3′ ）

25μL的反应混合物组成如下：2.5 μL的1：10（容积/容积）水稀释的RNA提取液（见3.6节）和22.5 μL的主混合液。主混合液包括以下成分：2.5 μL的Karsai缓冲液（Karsai等，2002）；各5 μM引物PPV-U，PPV-R R，Nad5R和Nad5F 0.5 μL；0.5 μL的10 mM dNTPs；1 μL的50 mM MgCl₂；0.2 μL的RNaseOUT（40单位/μL；Invitrogen）²；0.1 μL的Superscript III（200单位/μL；Invitrogen）²；0.1 μL的Platinum Taq DNA高纯度聚合酶（5单位/μL，Invitrogen）²；和1 μL的1:5 000（Tris-EDTA缓冲液(TE)，pH7.5）SYBR Green I²溶于16.1 μL的水中。按照以下的热循环参数进行反应：50℃ 10分钟；95℃ 2分钟；95℃ 15秒、60℃ 60秒，29个循环。熔点曲线分析通过在60℃至95℃以0.1℃/s的速度进行孵育而进行的，从而得到平均为1点的平滑曲线。在Varga和James（2006a）确定的条件下，每个（PCR）产物熔解温度是：

C株系（74 bp片段）：79.84℃

EA株系（74 bp片段）：81.27℃

W株系（74 bp片段）：80.68℃。

Varga和James（2006a）采用PPV-C、PPV-D、PPV-EA和PPV-W株系的各一种分离物对其检测方法进行了评估。

5. 分子生物学检测对照

为了获得可靠的检测结果，取决于所使用的检测类型和所要求的确定性水平，应考虑为每一组核酸分离物、目标有害生物或目标核酸扩增物设置适宜的对照。对RT-PCR而言，最少应使用一个阳性核酸对照、一个内对照，以及一个阴性扩增对照（无模板对照）。

阳性核酸对照。本对照用于监测检测方法（不包括提取）的效率以及RT-PCR的扩增效率。总植物或病毒RNA，或PPV感染植物组织尼龙膜印记可能会被用到。贮存的RNA或PPV制剂应定期进行验证，以确定对照的质量随着贮存时间的增加得到有效控制。

内参对照。对实时RT-PCR而言，线粒体基因*NADH*脱氢酶5（*nad5*，Menzel等，2002）的mRNA可用作内参对照纳入RT-PCR规程中，以消除由于核酸提取失败或降解或存在RT-PCR抑制剂而导致RT-PCR假阴性的可能。

阴性扩增对照（无模板对照）。常规和实时RT-PCR有必要设置本对照，以排除反应混合液制备过程中受到（目标DNA）污染引起的假阳性。在扩增阶段加入用于制备反应混合液所使用的无核糖核酸酶PCR级水作为阴性扩增对照。

阳性提取对照。本对照用于确保所提取的目标核酸的数量和质量可以满足RT-PCR的需要，从而能检测到目标病毒。核酸提取自受PPV侵染的寄主组织或用PPV接种过的健康植物或昆虫组织。

对RT-PCR而言，应注意避免由阳性对照或阳性样品的气溶胶引起的交叉污染。

阴性提取对照。本对照用于监测核酸提取过程中的污染和与寄主组织的交叉反应。本对照包含提取自未受侵染的寄主组织并随后进行过扩增的核酸。预期有大量阳性样品时，建议以随机顺序引入多重对照。

对于不涉及核算提取的IC-RT-PCR，应使用已知PPV阳性的植物汁液作为阳性对照，健康植物汁液作为阴性对照。也可包括一个阴性扩增对照，用于排除反应混合物制备过程中由于污染而产生的假阳性。在扩增阶段加入用于制备反应混合液所使用的无核糖核酸酶PCR级水作为阴性扩增对照。

6. 记录

记录和证据应根据ISPM 27《限定有害生物诊断规程》2.5节描述予以保存。

在其他缔约方可能受检测结果影响的情况下，特别是出现违规（ISPM 13《不遵守和紧急行动通知准则》）和在某一地区首次发现该病毒时，以下附加材料应当以确保可追溯的方式保存至少一年：

- 将原始样本（正确标记）冷冻保存，如果可能，存于-80℃或冷冻干燥后室温保存。
- 如有必要，RNA提取物应保存在-80℃，并将点样的植物提取物或印好的植物组织切片（纸膜或尼龙膜）室温保存。
- 如有必要，可将RT-PCR扩增产物保存在-20℃。

7. 获取进一步信息的联系点

有关本诊断规程的进一步信息可获自：

美国农业部（USDA）动植物检疫局（APHIS），植物保护及检疫部门（PPQ），Beltsville科学技术实验室，BARC东大厦580号，Powder Mill路，Beltsville，马里兰州，美国，20705（Vessela Mavrodieva；email: vessela.a.mavrodieva@aphis.usda.gov；电话：+1 3013139208；传真：+1 3023139232）。

国家农业研究院病毒系（INRA），波尔多中心，UMR GD2P, IBVM, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, 法国（Thierry Candresse, email: tc@bordeaux.inra.fr；电话：+33 557122389；传真：+33 557122384）。

科温纽斯大学（Corvinus University）植物病理系园艺科学组，Villányi út 29-43, H-1118布达佩斯，匈牙利（Laszlo Palkovics, email: laszlo.palkovics@uni-corvinus.hu；电话：+36 14825438；传真：+36 14825023）。

斯洛伐克科学院病毒研究所，Dúbravská, 84505 Bratislava, 斯洛伐克（Miroslav Glasa, email: virumig@savba.sk；电话：+421 259302447；传真：+421 254774284）。

Valenciano农业调查研究所（IVIA）植物保护与生物技术中心，Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia)，西班牙（Antonio Olmos, email: aolmos@ivia.es；电话：+34 963424000；传真：+34 963424001）。

CNR植物病毒学研究所，巴里分部，via Amendola 165/A, I-70126巴里，意大利（Donato Boscia, email: d.boscia@ba.ivv.cnr.it；电话：+39 0805443067；传真：+39 0805442911）。

加拿大食品检验局（CFIA）Sidney实验室，不列颠哥伦比亚，V8L 1H3 Sidney，加拿大（Delano James, email: Delano.James@inspection.gc.ca；电话：+1 250 3636650；传真：+1 250 3636661）。

诊断规程的修订要求可由国家植物保护机构（NPPOs）、区域植物保护组织（RPPO）或植物检疫措施委员会（CPM）附属机构通过《国际植保公约》秘书处（ippc@fao.org）提出，《国际植保公约》秘书处会将相关要求转给诊断规程技术小组（TPDP）。

8. 致谢

本诊断规程由M. Cambra、A. Olmos和N. Capote (IVIA, 西班牙 (见上节)), N. L. Africander (南非农林渔业部, Stellenbosch), L. Levy (美国农业部 (见上节)), S. L. Lenardon (植物病理和生理学研究所-国家农业技术研究所 (IFFIVE-INTA), Córdoba, 阿根廷), G. Clover (植物健康与环境实验室, 第一产业部, Auckland, 新西兰) 和D. Wright (植物健康组, 中央科学实验室, Sand Hutton, 约克郡, 英国) 起草。

9. 参考文献

本附件引用了ISPMs。ISPMs可通过国际植物检疫门户网站 (IPP) <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>获取。

Barba, M., Hadidi, A., Candresse, T. & Cambra, M. 2011. *Plum pox virus*. In: A. Hadidi, M. Barba, T. Candresse & W. Jelkmann, eds. *Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits*, Chapter 36. St. Paul, MN, APS Press. 428 pp.

Boscia, D., Zeramini, H., Cambra, M., Potere, O., Gorris, M.T., Myrta, A., Di Terlizzi, B. & Savino, V. 1997. Production and characterization of a monoclonal antibody specific to the M serotype of *Plum pox potyvirus*. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 477–480.

CABI. 2018. Crop Protection Compendium. Wallingford, UK, CABI. Available at <http://www.cabi.org/cpc/> (last accessed 14 February 2018).

Cambra, M., Asensio, M., Gorris, M.T., Pérez, E., Camarasa, E., García, J.A., Moya, J.J., López-Abella, D., Vela, C. & Sanz, A. 1994. Detection of *Plum pox potyvirus* using monoclonal antibodies to structural and non-structural proteins. *EPPO Bulletin*, 24: 569–577.

Cambra, M., Boscia, D., Myrta, A., Palkovics, L., Navrátil, M., Barba, M., Gorris, M.T. & Capote, N. 2006a. Detection and characterization of *Plum pox virus*: Serological methods. *EPPO Bulletin*, 36: 254–261.

Cambra, M., Capote, N., Myrta, A. & Llácer, G. 2006b. *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bulletin*, 36: 202–204.

Cambra, M., Capote, N., Olmos, A., Bertolini, E., Gorris, M.T., Africander, N.L., Levy, L., Lenardon, S.L., Clover, G. & Wright, D. 2008. Proposal for a new international protocol for detection and identification of *Plum pox virus*. Validation of the techniques. *Acta Horticulturae*, 781: 181–192.

Candresse, T. & Cambra, M. 2006. Causal agent of sharka disease: Historical perspective and current status of *Plum pox virus* strains. *EPPO Bulletin*, 36: 239–246.

- Capote, N., Bertolini, E., Olmos, A., Vidal, E., Martínez, M.C. & Cambra, M.** 2009. Direct sample preparation methods for the detection of *Plum pox virus* by real-time RT-PCR. *International Microbiology*, 12: 1–6.
- Capote, N., Gorris, M.T., Martínez, M.C., Asensio, M., Olmos, A. & Cambra, M.** 2006. Interference between D and M types of *Plum pox virus* in Japanese plum assessed by specific monoclonal antibodies and quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 96: 320–325.
- Chirkov, S., Ivanov, P. & Sheveleva, A.** 2013. Detection and partial molecular characterization of atypical *Plum pox virus* isolates from naturally infected sour cherry. *Archives of Virology*, 158: 1383–1387.
- Chirkov, S., Ivanov, P., Sheveleva, A., Zakubanskiy, A. & Osipov, G.** 2016. New highly divergent *Plum pox virus* isolates infecting sour cherry in Russia. *Virology*, 502: 56–62.
- Damsteegt, V.D., Scorza, R., Stone, A.L., Schneider, W.L., Webb, K., Demuth, M. & Gildow, F.E.** 2007. *Prunus* host range of *Plum pox virus* (PPV) in the United States by aphid and graft inoculation. *Plant Disease*, 91: 18–23.
- Damsteegt, V.D., Waterworth, H.E., Mink, G.I., Howell, W.E. & Levy, L.** 1997. *Prunus tomentosa* as a diagnostic host for detection of *Plum pox virus* and other *Prunus* viruses. *Plant Disease*, 81: 329–332.
- Desvignes, J.C.** 1999. *Virus diseases of fruit trees*. Paris, Centre Technique Interprofessionnel des Fruits et Légumes (CTIFL) Centr'imprint. 202 pp.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2004. Diagnostic protocol for regulated pests: *Plum pox potyvirus*. PM 7/32(1). *EPPO Bulletin*, 34: 247–256.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *EPPO Bulletin*, 36: 205–218.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2018a. EPPO Database on Diagnostic Expertise. List of validation data. Available at <http://dc.eppo.int/validationlist.php> (last accessed 19 March 2018).
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization).** 2018b. EPPO Global Database. *Plum pox virus* (PPV000). Available at <https://gd.eppo.int/taxon/PPV000> (last accessed 14 February 2018).
- García, J.A., Glasa, M., Cambra, M. & Candresse, T.** 2014. *Plum pox virus* and sharka: A model potyvirus and a major disease. *Molecular Plant Pathology*, 15: 226–241.
- Gentit, P.** 2006. Detection of *Plum pox virus*: Biological methods. *EPPO Bulletin*, 36: 251–253.

- Glasa, M., Marie-Jeanne, V., Labonne, G., Šubr, Z., Kúdela, O. & Quiot, J-B.** 2002. A natural population of recombinant *Plum pox virus* is viable and competitive under field conditions. *European Journal of Plant Pathology*, 108: 843–853.
- Glasa, M., Prikhodko, Y., Predajňa, L., Nagyová, A., Shneyder, Y., Zhivaeva, T., Šubr, Z., Cambra, M. & Candresse, T.** 2013. Characterization of sour cherry isolates of *Plum pox virus* from the Volga basin in Russia reveals a new cherry strain of the virus. *Phytopathology*, 103: 972–979.
- Gougherty A.V., Pazdernik K.T., Kaiser M.S. & Nutter Jr, F.W.** 2015. Evaluation of sampling and testing efficiencies of *Plum pox virus* eradication programs in Pennsylvania and Ontario. *Plant Disease*, 99(9): 1247–1253.
- Harju, V.A., Henry, C.M., Cambra, M., Janse, J. & Jeffries, C.** 2000. Diagnostic protocols for organisms harmful to plants – DIAGPRO*. *EPPO Bulletin*, 30: 365–366.
- Ilardi, V. & Tavazza, M.** 2015. Biotechnological strategies and tools for *Plum pox virus* resistance: Trans-, intra-, cis-genesis, and beyond. *Frontiers in Plant Science*, 6: 379.
- James, D. & Thompson, D.** 2006. Hosts and symptoms of *Plum pox virus*: Ornamental and wild *Prunus* species. *EPPO Bulletin* 36: 222–224.
- James, D., Varga, A. & Sanderson, D.** 2013. Genetic diversity of *Plum pox virus*: Strains, disease and related challenges for control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 35: 431–441.
- Karsai, A., Müller, S., Platz, S. & Hauser, M.T.** 2002. Evaluation of a homemade SYBR[®] Green I reaction mixture for real-time PCR quantification of gene expression. *Biotechniques*, 32: 790–796.
- Levy, L. & Hadidi, A.** 1994. A simple and rapid method for processing tissue infected with *Plum pox potyvirus* for use with specific 3' non-coding region RT-PCR assays. *EPPO Bulletin*, 24: 595–604.
- Llácer, G. & Cambra, M.** 2006. Hosts and symptoms of Plum pox virus: Fruiting *Prunus* species. *EPPO Bulletin*, 36: 219–221.
- Menzel, W., Jelkmann, W. & Maiss E.** 2002. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, 99: 81–92.
- Myrta, A., Potere, O., Boscia, D., Candresse, T., Cambra, M. & Savino, V.** 1998. Production of a monoclonal antibody specific to the El Amar strain of *Plum pox virus*. *Acta Virologica*, 42: 248–250.
- Myrta, A., Potere, O., Crescenzi, A., Nuzzaci, M. & Boscia, D.** 2000. Properties of two monoclonal antibodies specific to cherry strain of *Plum pox virus*. *Journal of Plant Pathology*, 82 (suppl. 2): 95–101.

- Olmos, A., Bertolini, E. & Cambra, M.** 2002. Simultaneous and co-operational amplification (Co-PCR): A new concept for detection of plant viruses. *Journal of Virological Methods*, 106: 51–59.
- Olmos, A., Bertolini, E., Gil, M. & Cambra, M.** 2005. Real-time assay for quantitative detection of non-persistently transmitted *Plum pox virus* RNA targets in single aphids. *Journal of Virological Methods*, 128: 151–155.
- Olmos, A., Cambra, M., Dasi, M.A., Candresse, T., Esteban, O., Gorris, M.T. & Asensio, M.** 1997. Simultaneous detection and typing of *Plum pox potyvirus* (PPV) isolates by heminested-PCR and PCR-ELISA. *Journal of Virological Methods*, 68: 127–137.
- Olmos, A., Capote, N., Bertolini, E. & Cambra, M.** 2007. Molecular diagnostic methods for plant viruses. In: Z.K. Punja, S. De Boer & H. Sanfaçon, eds. *Biotechnology and plant disease management*, pp. 227–249. Wallingford, UK and Cambridge, USA, CABI. 574 pp.
- Olmos, A., Capote, N. & Candresse, T.** 2006. Detection and characterization of Plum pox virus: Molecular methods. *EPPO Bulletin*, 36: 262–266.
- Osman, F. & Rowhani, A.** 2006. Application of a spotting sample preparation technique for the detection of pathogens in woody plants by RT-PCR and real-time PCR (TaqMan). *Journal of Virological Methods*, 133: 130–136.
- PaDIL.** (Pests and Diseases Image Library). 2018. Plant Biosecurity Toolbox. Available at <http://pbt.padil.gov.au/index.php?q=node/20&pbtID=136> (last accessed 27 February 2018).
- Palmisano, F., Boscia, D., Minafra, A., Myrta, A. & Candresse, T.** 2012. An atypical Albanian isolate of *Plum pox virus* could be the progenitor of the Marcus strain. *Petria*, 22(3): 224.
- Pasquini, G. & Barba, M.** 2006. The question of seed transmissibility of *Plum pox virus*. *EPPO Bulletin*, 36: 287–292.
- Rodamilans, B., León, D.S., Mühlberger, L., Candresse, T., Neumüller, M., Oliveros, J.C. & García, J.A.** 2014. Transcriptomic analysis of *Prunus domestica* undergoing hypersensitive response to *Plum pox virus* infection. *PLOS One*, 9(6): e100477.
- Schneider, W.L., Sherman, D.J., Stone, A.L., Damsteegt, V.D. & Frederick, R.D.** 2004. Specific detection and quantification of *Plum pox virus* by real-time fluorescent reverse transcription-PCR. *Journal of Virological Methods*, 120: 97–105.
- Šubr, Z., Pittnerova, S. & Glasa, M.** 2004. A simplified RT-PCR-based detection of recombinant *Plum pox virus* isolates. *Acta Virologica*, 48: 173–176.

- Ulubaş Serçe, Ç., Candresse, T., Svanella-Dumas, L., Krizbai, L., Gazel, M. & Çağlayan, K. 2009. Further characterization of a new recombinant group of *Plum pox virus* isolates, PPV-T, found in the Ankara province of Turkey. *Virus Research*, 142: 121–126.
- Varga, A. & James, D. 2005. Detection and differentiation of *Plum pox virus* using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: A rapid method for strain typing. *Journal of Virological Methods*, 123: 213–220.
- Varga, A. & James, D. 2006a. Real-time RT-PCR and SYBR Green I melting curve analysis for the identification of *Plum pox virus* strains C, EA, and W: Effect of amplicon size, melt rate, and dye translocation. *Journal of Virological Methods*, 132: 146–153.
- Varga, A. & James, D. 2006b. Use of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Plum pox virus*. *Journal of Virological Methods*, 138: 184–190.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. & Dunez, J. 1992. A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*, 39: 27–37.
- Wetzel, T., Candresse, T., Ravelonandro, M. & Dunez, J. 1991. A polymerase chain reaction assay adapted to *Plum pox potyvirus* detection. *Journal of Virological Methods*, 33: 355–365.

出台背景说明

此部分不属于本标准的正式内容

出版物仅指该语言版本。出台背景的完整说明参见本标准的英文版。

2018年8月，标准委代表植检委通过了该诊断规程。

国际植检措施标准第 27 号。附件 2。李痘病毒 (*Plum pox virus*)
(2018)。罗马，国际植保公约，粮农组织。

2020年1月，中文语言审核小组审议了这一附件，国际植物保护公约秘书处据此吸纳了相关修改。

发布背景最后更新：2020年1月