李痘病毒实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立及应用

邢 飞[1] 夏思丹[1] 金烟宏[1] 邹国臣[1] 淳长品[1] 李世访[2*]

（1. 西南大学柑桔研究所，国家柑桔工程技术研究中心，重庆 400712；2. 中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193）

摘要：为高效检测检疫性植物病毒李痘病毒（plum pox virus，PPV），根据其外壳蛋白（coat protein，CP）基因的保守序列设计特异性引物与荧光探针，建立基于*Taq*Man荧光探针的PPV实时荧光定量反转录-PCR（reverse transcription PCR，RT-PCR）检测技术，并分析其重复性、灵敏性、特异性和实际应用效果。结果表明：当引物浓度为0.6 μmol/L、*Taq*Man探针浓度为0.2 μmol/L时，所建实时荧光定量RT-PCR技术体系的扩增信号较好；重复性试验的变异系数较小，为0.61%~1.59%，重复性较好；该方法对PPV的检测灵敏度是常规RT-PCR方法的100倍，且与目前已知侵染李属*Prunus*植物的主要病毒没有交叉反应，说明特异性良好。利用所建方法检测了30份梅*P. mume*和80份脆李*P. salicina*叶片样品中PPV侵染情况，其中在28份表现典型李痘病症状的梅样品中均检出PPV，在无明显李痘病症状的梅和脆李样品中均没有检出PPV。表明本研究建立的实时荧光定量RT-PCR技术体系适用于PPV的快速、高效检测，可用于田间该病毒的有效检测。

关键词：李痘病毒；实时荧光定量RT-PCR；*Taq*Man探针；梅；脆李

Establishment and application of reverse transcription-real-time fluorescence quantitative PCR detection system for plum pox virus

Xing Fei[1] Xia Sidan[1] Jin Tianhong[1] Zou Guochen[1] Chun Changpin[1] Li Shifang[2*]

（1. National Citrus Engineering Research Center, Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China）

Abstract: To achieve efficient detection of plum pox virus (PPV), a quarantine plant virus, we developed a reverse transcription-real-time fluorescence quantitative PCR (RT-qPCR) assay based on the *Taq*Man probe. Specific primers and the fluorescent probe were designed based on the conserved region of the coat protein (CP) gene of PPV. The repeatability, sensitivity, specificity, and practical application performance of the assay were evaluated. The results showed that optimal amplification signal was obtained when the primer and the *Taq*Man probe concentrations were 0.6 μmol/L and 0.2 μmol/L, respectively. Repeatability analysis indicated that the coefficients of variation ranged from 0.61% to 1.59%, demonstrating low variability and high reproducibility. The sensitivity of this method for PPV detection was 100-fold higher than that of conventional RT-PCR, and no cross-reactivity was observed with other major viruses known to infect the *Prunus* plants, confirming its high specificity. The established method was subsequently applied to detect PPV infection in 30 Japanese apricot (*Prunus mume*) leaf samples and 80 Chinese plum (*Prunus salicina*) leaf samples. PPV was detected in all 28 Japanese apricot leaf samples with typical plum pox symptoms, but none of the asymptomatic Japanese apricot

基金项目：国家自然科学基金面上项目（32272515），重庆市自然科学基金面上项目（CSTB2023NSCQ-MSX0942）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：sfli@ippcaas.cn

收稿日期：2026-04-23

samples and all Chinese plum leaf samples tested positive for PPV. These results suggest that the developed RT-qPCR system in this study is suitable for the rapid and efficient detection of PPV and could be employed for field surveillance of this virus.

Key words: plum pox virus; real-time fluorescence quantitative RT-PCR; *Taq*Man probe; *Prunus mume*; *Prunus salicina*

李痘病毒(plum pox virus,PPV)是引起李痘病的重要检疫性病原,属马铃薯Y病毒科*Potyviridae*马铃薯Y病毒属*Potyvirus*成员,为全球核果类果树生产中最具经济重要性的植物病毒,也是分子植物病原学中最值得研究的10种植物病毒之一(Barba et al.,2011;Scholthof et al.,2011;García et al.,2014;Jones,2021)。李痘病于1917—1918年在保加利亚被首次发现,1932年第1次被官方描述,后经确定是由PPV引起(Barba et al.,2011;2015;García et al.,2025)。PPV侵染核果类果树后常引起宿主叶片、花、果实及果核出现明显症状,如叶片褪绿、黄化、环斑,花碎色、散斑,果实变形、变小,果面和果核出现萎黄环斑等,造成品质下降,未成熟果实提前脱落,导致大幅减产(Barba et al.,2011)。PPV主要依靠带毒繁殖材料和蚜虫传播,日本绣线菊蚜*Aphis spiraecola*和桃蚜*Myzus persicae*是最主要的传毒介体,具有较高的传毒效率(García et al.,2025)。随着全球贸易往来日益频繁及气候变化的影响,PPV跨境传播与定殖的风险持续增加。截至目前,已有超过50个国家报道了PPV,在过去的28年中由PPV引起的经济损失已超过24亿欧元,累计全球损失应超过130亿欧元(Cambra et al.,2024;García et al.,2025)。

中国是最大的核果类果树种植国家,种植面积广,产量高,在全球核果类果树产业中占据重要地位。其中,桃*Amygdalus persica*、李*Prunus salicina*栽培面积更是超过全球总栽培面积的一半。一旦PPV在中国蔓延传播,将会对核果类生产造成重大损失。早在2005年,Navratil et al.(2005)就首次从我国杏*Prunus armeniaca*叶片中检测到PPV;Zhou et al.(2021)进一步研究发现我国部分地区的梅*Prunus mume*也被PPV侵染。此外,有研究人员从PPV发生情况、宿主规模和传毒介体蚜虫等方面评估了其在我国发生的风险,暗示PPV暴发风险对我国核果类果树产业构成巨大的潜在威胁(林司曦等,2016;Xing et al.,2017)。

加强PPV监测和检疫是保证我国核果类果树产业健康、长效、安全发展的重要措施。实时荧光定量反转录PCR(reverse transcription PCR,RT-PCR)是常规RT-PCR与荧光信号相结合的核酸检测技术,具有操作简便、灵敏度高、特异性强、检测快速等优点,结合*Taq*Man探针,通过建立标准曲线能够实现对扩增产物的定量检测,目前已在果树病毒检测中得到广泛应用(秦子禹等,2015;王瑛丽等,2019;郗娜娜等,2020)。基于此,本研究拟建立能高效检测PPV的实时荧光定量RT-PCR技术体系,实现对PPV的高效诊断,以期为及时发现PPV并采取相应的控制措施提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品和载体:2024年4—6月分别于北京市、南京市、武汉市各采集梅叶片样品10份,其中仅北京市有两份叶片样品无明显症状,其余叶片样品均表现典型PPV侵染症状,如褪绿、环斑等(图1-A~B);同期在重庆市渝北区、合川区、南川区、梁平区、万州区、开州区、巫溪县和巫山县各采集10份脆李叶片样品,其中,在开州区、巫溪县、巫山县分别采集到5份具有疑似病毒病症状的样品(图1-C~D),其余样品无明显症状。将采集的样品低温保存,带回实验室后经液氮冷冻,于−80 ℃保存供试。体外转录载体pGEM-T、经测序验证确系PPV侵染的阳性梅叶片样品和无明显症状的健康样品均由本实验室保存并提供,克隆载体来自零背景pTOPO-TA/Blunt通用克隆试剂盒,购自北京艾德莱生物科技有限公司。

供试毒源:感染了啤酒花矮化类病毒(hop stunt viroid,HSVd)、樱桃小果病毒2(little cherry virus 2,LChV2)、李树皮坏死茎痘伴随病毒(plum bark necrosis stem pitting-associated virus,PBNSPaV)、桃叶痘伴随病毒(peach leaf pitting-associated virus,PLPAV)的脆李叶片样品RNA,以及李属坏死环斑病毒(Prunus necrotic ringspot virus,PNRSV)和苹果花叶病毒(apple mosaic virus,ApMV)的质粒样品,均由本实验室保存并提供。

培养基:Luria-Bertani(LB)液体培养基成分为酵母提取物5 g、胰蛋白胨10 g、氯化钠10 g,无菌水

定容至1 L；LB固体培养基则需在LB液体培养基中加入15 g琼脂粉。



图1 PPV引起的梅（A~B）和疑似病毒病引起的脆李（C~D）叶片症状

Fig. 1 Symptoms induced by PPV on the Japanese apricot (A−B) and virus-like pathogens on Chinese plum (C−D) leaves

试剂和仪器：RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒，天根生化科技（北京）有限公司；M-MLV Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、T7 RNA Polymerase，美国Promega公司；Phusion High-fidelity DNA Polymerase，美国Thermo Fisher Scientific公司；2×*Taq* Mix、琼脂糖，北京冰达生物科技有限公司；AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒、AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit，美国Axygen公司；大肠杆菌*Escherichia coli*感受态细胞DH5*α*，北京擎科生物科技股份有限公司；限制性内切酶、T4 DNA连接酶和One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit，宝日医生物技术（北京）有限公司；其余试剂均为国产分析纯。T100普通PCR仪和CFX Connect™实时荧光定量PCR仪，美国Bio-Rad公司；NanoDrop 2000超微量紫外−可见分光光度计，美国Thermo Fisher Scientific公司；DYY-6B型稳压电泳仪，北京六一生物科技有限公司；SH520凝胶成像系统，杭州申花科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 实时荧光定量RT-PCR反应引物和探针浓度优化

为避免实时荧光定量RT-PCR反应中引物浓度和探针浓度不适宜造成的竞争性抑制反应，以反应的最低定量循环数（quantification cycle，Cq）值和最大荧光信号强度增加值为标准，筛选引物和探针的最适浓度。取确认感染PPV的阳性梅叶片样品，参照RNAprep Pure多糖多酚植物总RNA提取试剂盒说明书进行总RNA提取。以其总RNA为模板，使用PPV特异性引物PPV-F9234（5′-AACGTGGCTGAAGCGTATATT-3′）/PPV-R9336（5′-CATATCTGGCGAGGCTGTAGTC-3′）和探针PPV-pbF（6-FAM-5′-AGGTATGGAATTCAGCGCAACCTGAC-3′-TAMRA-N）进行不同引物与探针浓度组合的扩增反应。本研究所有引物和探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司设计和合成。实时荧光定量RT-PCR反应体系和程序参照One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit说明书进行，其中引物浓度设为0.2、0.4、0.6和0.8 μmol/L，探针浓度设为0.1、0.2、0.3和0.4 μmol/L。每个组合设3个重复。利用实时荧光定量PCR仪自带软件获得每个组合反应的Cq值，并利用Excel 2019软件计算其标准差和变异系数。

1.2.2 PPV外壳蛋白重组质粒构建及体外转录

为获得PPV外壳蛋白（coat protein，CP）体外转录RNA，需构建体外转录重组质粒。通过在PPV的CP保守区设计引物ppv-nco9018F（5′-CATGCCATGGCAAACTTGGTATGAAGGAGT-3′）/ppv-spe9463R（5′-GGACTAGTACGTTTCCATCCAAGCCA-3′），划线部分分别为限制性内切酶*Nco* I和*Spe* I保护碱基和酶切位点。以1.2.1制备的感染PPV阳性梅叶片样品的RNA为模板，参照邢飞（2018）方法反转录合成cDNA。以合成的cDNA为模板进行PPV *CP*基因的PCR扩增，预期目的片段大小为446 bp。20 μL PCR反应体系：cDNA 1 μL、10 mmol/L dNTP Mix 0.4 μL、5×Phusion HF Buffer 4 μL、上游引物ppv-nco9018F 0.8 μL、下游引物ppv-spe9463R 0.8 μL、Phusion High-fidelity DNA Polymerase 0.25 μL，用灭菌ddH_2O补足至20 μL。反应程序：98 ℃预变性30 s；98 ℃变性10 s，69 ℃退火30 s，72 ℃延伸30 s，循环35次；72 ℃终延伸10 min，4 ℃保存。将PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳、成像分析后，使用AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒纯化回收目的片段。

将回收产物及体外转录载体pGEM-T分别进行*Nco* I和*Spe* I双酶切，经电泳、回收后，通过T4 DNA连接酶连接获得重组质粒，并转化大肠杆菌感受态细胞DH5*α*中，加入800 μL LB液体培养基，于37 ℃、180 r/min条件下摇培40~60 min，取培养液均匀涂

布在含100 mg/L氨苄青霉素的LB固体平板上，37 ℃培养过夜，挑选单克隆进行测序验证。委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。将测序正确的菌液扩大培养后，使用AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit提取重组质粒。以*Spe* I进行酶切，并用氯仿纯化、回收线性化重组载体；按照T7 RNA Polymerase说明书体外转录合成目的RNA，具体步骤参考邢飞（2018）。经纯化后，使用超微量紫外–可见分光光度计测定回收产物浓度，并计算体外转录RNA拷贝数，拷贝数=阿伏加德罗常数×浓度/（碱基长度×碱基平均分子量）。其中，阿伏加德罗常数为6.02×10^{23}分子数/mol；碱基长度为446 nt；碱基平均分子量为340 g/mol。

1.2.3 *实时荧光定量RT-PCR标准曲线的制作*

将1.2.2所得体外转录产物以10倍浓度梯度进行稀释，获得拷贝数数量级分别为10^{10}、10^{9}、10^{8}、10^{7}、10^{6}、10^{5}、10^{4}、10^{3}、10^{2}和10的10个梯度浓度RNA，以此为模板，按照1.2.1优化的引物和探针浓度进行实时荧光定量RT-PCR，反应体系和程序参照One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit说明书进行，并使用实时荧光定量PCR仪自带软件Bio-Rad CFX Manager 3.1进行数据分析，制作标准曲线，计算引物扩增效率。

1.2.4 *所建实时荧光定量RT-PCR方法的重复性检测*

以1.2.1制备的感染PPV阳性梅叶片样品的RNA作为模板，对建立的实时荧光定量RT-PCR方法进行重复性分析。以1.2.1中优化后的引物和探针浓度，按照One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit说明书的反应体系和程序进行扩增，试验分别单独进行3次，每次4个重复，利用实时荧光定量PCR仪进行扩增，收集Cq值，并利用Excel 2019软件计算其标准差和组间及组内变异系数。

1.2.5 *所建实时荧光定量RT-PCR方法的灵敏性检测*

以1.2.1制备的感染PPV阳性梅叶片样品的RNA作为模板，以10倍浓度梯度稀释至1、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}和10^{-10}作为反应体系模板，以1.2.1中优化后的引物和探针浓度，按照One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit说明书中的反应体系和程序，利用实时荧光定量PCR仪进行扩增，收集Cq值，通过仪器自带软件分析扩增曲线。同时，以常规RT-PCR方法检测结果作为对照。以1.2.1制备的感染PPV阳性梅叶片样品的RNA，参考邢飞（2018）方法合成cDNA并将其作为模板，参照Zhou et al.（2021）报道合成PPV特异性引物PPV-558F（5′-AGAACCGCCAAGTCAGTA-3′）/PPV-558R（5′-CATCCAAGTGCCGAACAT-3′）进行常规RT-PCR检测。15 μL反应体系：cDNA 1 μL、2×*Taq* Mix 7.5 μL、上游引物PPV-558F 0.6 μL、下游引物PPV-558R 0.6 μL，用灭菌ddH_2O补足至15 μL。反应程序：94 ℃预变性4 min；94 ℃变性30 s，51 ℃退火30 s，72 ℃延伸40 s，循环35次；72 ℃延伸10 min，4 ℃保存，预期目的片段大小为558 bp。以感染PPV的梅叶片样品cDNA为阳性对照，以健康梅叶片样品cDNA为阴性对照。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳、成像分析。

1.2.6 *所建实时荧光定量RT-PCR方法的特异性检测*

分别以实验室保存的6种核果类果树病毒HSVd、LChV2、PBNSPaV、PLPAV、PNRSV和ApMV的RNA和质粒样品为对象，对本研究建立的实时荧光定量RT-PCR方法进行特异性检测。以感染PPV的阳性梅叶片RNA为阳性对照。分别以上述样品为模板，以1.2.1中优化后的反应引物和探针浓度，按照One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit说明书中的反应体系和程序，利用实时荧光定量PCR仪进行扩增，收集Cq值，通过仪器自带软件分析扩增曲线，分析试验结果。

1.2.7 *所建实时荧光定量RT-PCR体系的应用*

为验证建立的PPV实时荧光定量RT-PCR体系的实际应用效果以及明确PPV在重庆市脆李产区的发生情况，对采集自北京、南京和武汉市的30份梅叶片样品，以及采集自重庆市的80份脆李叶片样品进行检测。所有样品参照1.2.1方法提取总RNA，其中，脆李叶片两两混合成1个样品提取总RNA。实时荧光定量RT-PCR反应体系和程序按照One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit说明书进行。同时，使用常规RT-PCR方法确认上述样品中PPV发生情况，反应体系和程序同1.2.5。

2 结果与分析

2.1 实时荧光定量RT-PCR引物与探针的浓度优化

当探针浓度为0.4 μmol/L，引物浓度分别为0.4、0.6、0.8 μmol/L时，反应的Cq值最低，但其标准差（0.41、0.33、0.48）和变异系数（2.90%、2.31%、3.40%）较大，说明在此探针和引物浓度组合下，反应体系的稳定性较差；当引物浓度为0.6 μmol/L、探针浓度为0.2 μmol/L时，反应的Cq值较低，荧光信号强度增加值较大，且标准差（0.11）和变异系数（0.77%）最低（表1），表明该组合为扩增反应引物和探针浓度的最优组合。

表1 不同浓度引物和探针组合下实时荧光定量RT-PCR检测PPV的Cq值

Table 1 The Cq value of PPV in the real-time fluorescence quantitative RT-PCR assay using different primer and probe concentration

引物浓度 Primer concentration/(μmol/L)	探针浓度 Probe concentration/(μmol/L)			
	0.1	0.2	0.3	0.4
0.2	14.81±0.36	14.70±0.23	16.12±3.24	14.25±0.12
0.4	15.08±0.25	14.74±0.45	14.30±0.24	14.04±0.41
0.6	14.90±0.34	14.19±0.11	14.85±0.40	14.13±0.33
0.8	14.86±0.29	14.60±0.66	14.69±0.66	14.13±0.48

表中数据为平均数±标准差。Data are mean±SD.

2.2 实时荧光定量RT-PCR标准曲线

经纯化回收，获得体外转录RNA产物浓度约为500 ng/μL，即1.99×10^{12}拷贝数/μL。以10倍浓度梯度稀释成1.99×10^{1}~1.99×10^{10}拷贝数/μL共10个梯度浓度，为其为模板进行扩增。除拷贝数数量级为1.99×10^{10}、1.99×10^{9}、1.99×10^{1}三个浓度扩增曲线外，其他各浓度扩增曲线达到阈值时，扩增循环数在3个重复间基本一致，且扩增循环数随着浓度升高呈依次递增趋势，扩增曲线达到平台期，结果良好（图2-A）。循环数Cq值与浓度q的对数值呈线性关系，曲线斜率为−3.334，截距为40.915，获得PPV标准曲线线性方程：Cq=−3.334log$_{10}$(q)+40.915，相关系数为0.999，表明结果非常可靠，扩增效率E达99.5%（图2-B）。总体来看，利用该方法制作的标准曲线可信度高，检测下线为10^{2}拷贝数数量级，即1.99×10^{2}拷贝数/μL，可基于此对样品中PPV进行定量分析。

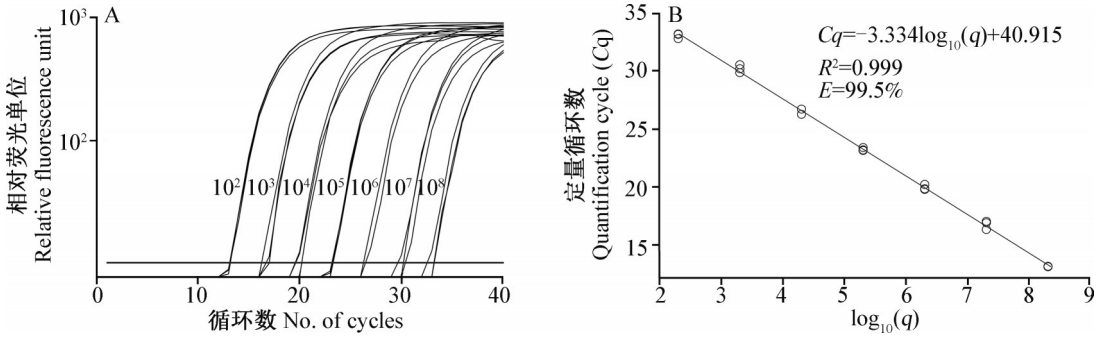


图2 PPV RNA的实时荧光定量RT-PCR扩增曲线（A）和标准曲线（B）

Fig. 2 Amplification (A) and standard (B) curves obtained for PPV RNA quantification by real-time fluorescence quantitative RT-PCR

2.3 所建实时荧光定量RT-PCR方法的重复性分析

12个阳性梅叶样品的Cq值介于15.28~16.10之间，总体差异较小；组内变异系数为0.61%~1.00%，组间变异系数为1.59%（表2），变异系数较小，说明结果可靠，表明本研究建立的实时荧光定量RT-PCR方法重复性较好。

表2 实时荧光定量RT-PCR方法检测PPV的重复性分析

Table 2 Evaluation of the repeatability of the real-time fluorescence quantitative RT-PCR assay for the detection of PPV

组 Group	Cq值 Cq value				组内 Intra-group		组间 Inter-group	
	1	2	3	4	平均数±标准差 Mean±SD	变异系数 Coefficient of variation/%	平均数±标准差 Mean±SD	变异系数 Coefficient of variation/%
1	16.10	15.97	15.83	15.97	15.97±0.10	0.61		
2	15.72	15.72	15.39	15.85	15.65±0.16	1.00	15.67±0.25	1.59
3	15.42	15.28	15.49	15.69	15.45±0.14	0.93		

2.4 所建实时荧光定量RT-PCR方法的灵敏性分析

本研究建立的PPV实时荧光定量RT-PCR检测方法最低能检测出稀释10^{6}倍数的模板（Cq值为34.0），而常规RT-PCR仅能检测到稀释10^{4}倍数的模板（图3），表明本研究建立的实时荧光定量RT-PCR检测方法的灵敏度是常规RT-PCR方法的100倍。

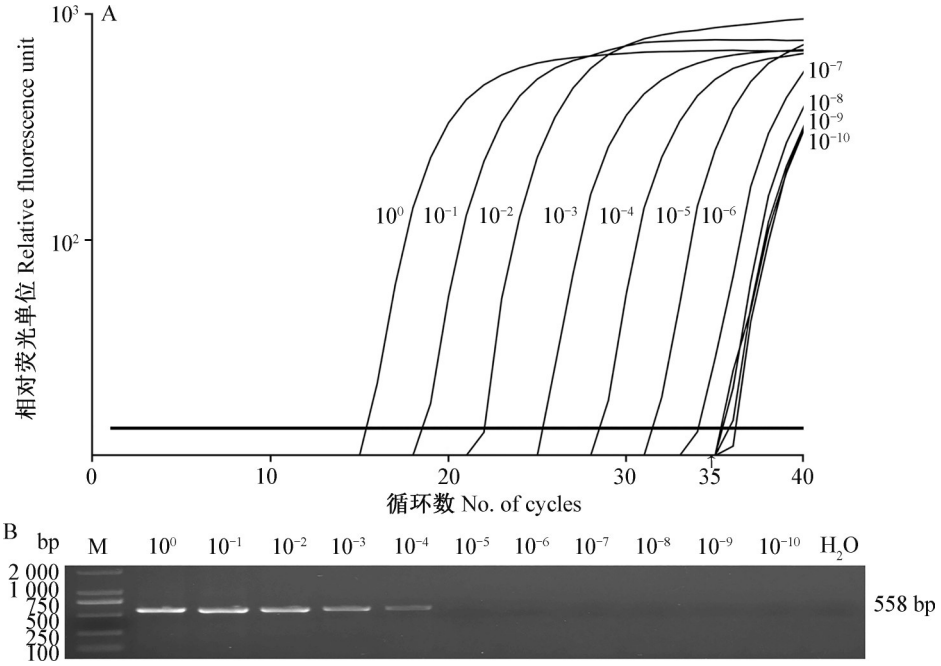


图3 实时荧光定量RT-PCR(A)和常规RT-PCR(B)方法检测PPV时的灵敏性比较

Fig. 3 Sensitivity evaluation between real-time fluorescence quantitative RT-PCR (A) and RT-PCR (B) for the detection of PPV

2.5 所建实时荧光定量RT-PCR方法的特异性分析

检测结果显示,仅感染了PPV的梅叶片样品有明显的扩增曲线(Cq值为13.0),对PNRSV质粒有轻微反应,Cq值为35.2,可判断为阴性;对分别感染了HSVd、LChV2、PBNSPaV、PLPAV的脆李叶片样品的RNA及ApMV质粒样品的检测结果均为阴性(图4),表明本研究建立的PPV实时荧光定量RT-PCR检测体系特异性良好。

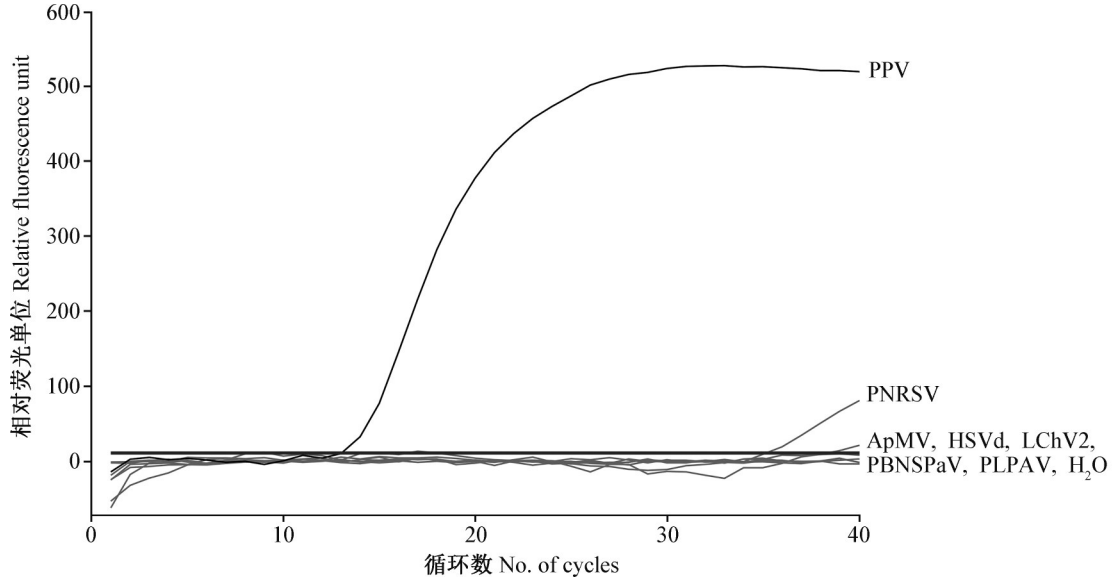


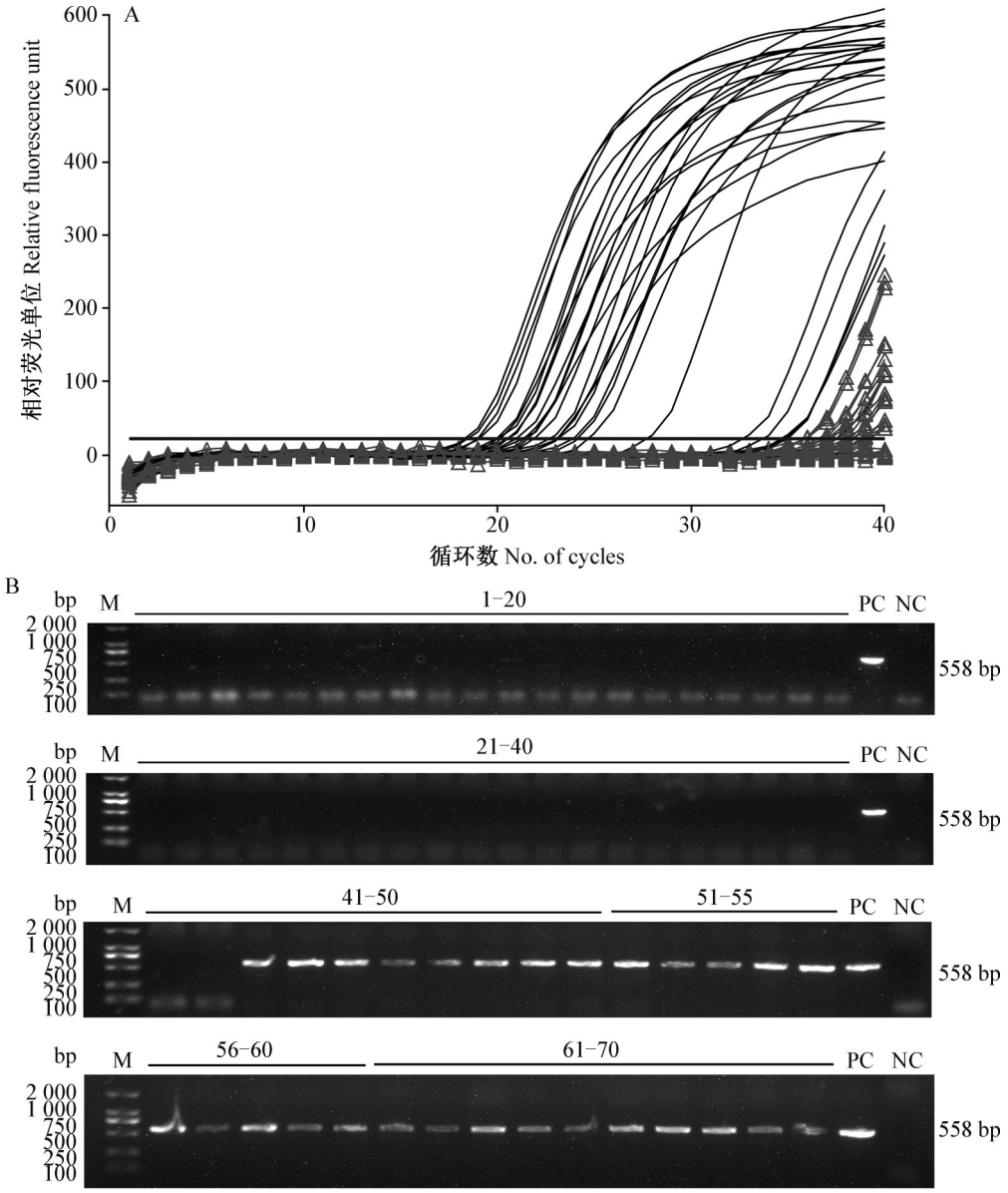
图4 实时荧光定量RT-PCR方法检测PPV的特异性分析

Fig. 4 Evaluation of the specificity of real-time fluorescence quantitative RT-PCR assay for the detection of PPV

2.6 所建实时荧光定量RT-PCR检测体系的应用效果

在检测的30份梅叶片样品中,仅2份表现无明显症状的样品呈PPV阴性,其余28份表现典型PPV侵染症状的样品均呈阳性,PPV浓度范围为3.00×10^{2}~6.04×10^{6}拷贝数/μL(图5-A),样品中PPV最高含量是最低含量的20 133倍,这可能与品种抗性、树龄、取样部位、环境因子等有关。在检测的所有脆李样品中均没有检测到PPV,这也与RT-PCR检测结果一致(图5-B)。表明本研究建立的实时荧光定量RT-PCR方法能够高效、快速诊断PPV,也说明了目

前重庆市脆李主产区暂无PPV发生。



A：光滑黑色曲线为梅样品，带△标注为脆李样品，阴性水对照没有扩增曲线。B：M为M2000 DNA Marker，1~40为重庆市脆李叶片样品（共80个叶片样品，两个混合成1个样品进行PPV检测），41~50、51~60、61~70分别为采集自北京市、南京市和武汉市的梅叶片样品，PC为感PPV梅叶阳性对照，NC为健康梅叶阴性对照。A: Japanese apricot leaves were marked in the smooth black curves, Chinese plum leaves in the curves marked with triangles, and the negative water control showed no amplification. B: M is M2000 DNA marker; 1−40 are the Chinese leaf plum samples collected from Chongqing (total 80 samples are tested PPV as pooled samples, with two leaf samples mixed together per pool); 41−50 are the Japanese apricot leaf samples from Beijing while 51−60 and 61−70 from Nanjing and Wuhan, respectively; a Japanese apricot leaf infected with PPV served as the positive control (PC), and a healthy PPV-free leaf served as the negative control (NC).

图5 供试脆李和梅叶片样品中PPV的实时荧光定量RT-PCR（A）和RT-PCR（B）检测结果

Fig. 5 PPV detection of the collected Chinese plum and Japanese apricot leaves by real-time fluorescence quantitative RT-PCR (A) and RT-PCR (B)

3 讨论

桃、李、杏、樱桃、梅等核果类果树是我国重要的园艺作物，已发展成为乡村振兴战略和农业供给侧结构性改革的重要支柱产业，PPV是威胁核果类果树产业健康发展的重要病毒（Cambra et al.，2006）。

防控PPV的前提是对该病毒进行准确检测，鉴于传统病毒检测方法的局限性，本研究通过优化反应体系的引物与探针浓度组合，建立了PPV的实时荧光定量RT-PCR检测方法，对其重复性、灵敏性、特异性进行评估，并用于梅和脆李样品的检测，最终验证了该方法适用于PPV的高效检测。

目前，国内已经建立了多种基于血清学的PPV检测技术，如Western-blot、酶联免疫吸附测定（enzyme-linked immunosorbent assay，ELISA）法、斑点印记杂交法、胶体金免疫检测技术等（马洁等，2012；郭萌萌，2023；李帅等，2025）。虽然建立的血清学方法适用于大规模PPV筛查，但是多克隆抗体易与非靶标蛋白发生交叉反应，可能导致假阳性结果，特异性较低；单克隆抗体生产过程复杂，成本高，只能识别单一表位，结合能力有限，信号可能较弱，如果抗原上的单一表位发生变异，单克隆抗体可能失效，导致假阴性结果。血清学方法更适用于病毒的初步筛查，一般需要结合其他技术来综合判定检测结果。另外，木本植物病毒在植株体内分布不均，且浓度通常较低，常规ELISA法可能会出现漏检（谷大军和张琪静，2013）。与血清学方法相比，本研究建立的实时荧光定量RT-PCR检测体系中引物和探针是基于GenBank（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/）中已登录的PPV基因组序列保守区设计，尽可能避免了病毒株系变异造成的假阴性结果；同时，引物、探针共3条序列与目标模板的结合能提高样品中PPV检测的特异性，避免出现假阳性结果。此外，该方法能对样品中PPV进行高效定量检测，从RNA抽提到检测完成，时间可控制在2 h以内。

闻伟刚等（2009）和高雅红等（2011）早期建立了基于探针法的PPV实时荧光定量RT-PCR检测方法，其灵敏度是基于血清学的双抗体夹心ELISA（double antibody sandwich-ELISA，DAS-ELISA）法的1 000倍，是常规RT-PCR方法的100倍，这说明探针法的灵敏度更高，针对复杂样本中低含量病毒的检测有一定优势。本研究建立的基于*Taq*Man探针的PPV实时荧光定量RT-PCR检测体系的灵敏度是常规RT-PCR的100倍，与高雅红等（2011）报道结果一致，进一步验证了实时荧光定量PCR检测的灵敏度普遍是常规PCR的100倍及以上（Chen et al.，2016；周俊等，2016；任芳等，2018）。相比于前二者建立的PPV探针法检测技术，本研究建立的PPV检测体系有两个优势：一是病毒检测过程中的反转录和扩增均在同一微型离心管中完成，能有效避免多次开盖造成的PPV交叉污染；二是PPV属于单链正义RNA病毒，本研究中利用体外转录合成PPV *CP*的RNA，基于RNA建立的标准曲线较基于DNA重组质粒建立的标准曲线更能模拟真实样品的检测情况，更能反映试验体系中RNA提取、反转录效率和扩增反应的综合效果，可避免因DNA重组质粒与病毒RNA序列存在差异而导致的偏差，提高定量的准确性。

本研究利用建立的PPV技术体系检测了北京、南京、武汉市的梅叶片样品和重庆市脆李叶片样品中的PPV发生情况。在检测的所有梅叶片样品中，只要表现有典型PPV侵染症状的叶片均被检测出PPV；无明显症状的梅叶片样品则未检测出PPV。这与Zhou et al.（2021）研究结果一致，进一步佐证了PPV在我国多地梅园已经发生，值得引起重视；另一方面也说明梅对PPV比较敏感，被PPV侵染后容易表现明显症状，可以借助叶片典型症状作为李痘病害初步诊断的指标。脆李作为重庆市具有竞争力的特色果树，在乡村振兴和区域经济发展中占据重要地位，为市重点支持和发展的第二大果树产业。PPV在国内的发生给重庆市脆李的发展带来了潜在威胁。前期本研究团队在重庆市8个脆李主产区县（渝北区、合川区、南川区、梁平区、万州区、开州区、巫溪县和巫山县）实地调查了近15 000株脆李树的李痘病发生情况，均没有发现疑似PPV侵染症状样品，结合本研究检测结果，表明目前重庆市脆李主要产区尚无PPV发生，这对于重庆市脆李产业安全发展具有重要的指导意义。

然而，同常规RT-PCR方法及ELISA法一样，实时荧光定量RT-PCR方法也受样品类型、样品质量、病毒浓度、采样时间等因素的影响。因此，应结合多种方法对PPV进行检测，并优化取样、检测等条件，防止漏检、误检。总体上，本研究建立了一种快速便捷、重复性好、特异性强、灵敏度高的PPV实时荧光定量RT-PCR检测方法，实现了对PPV的高效检测，能及时满足试验、市场需求，有利于PPV的快速诊断和监测，可为我国核果类果树产业中李痘病害的发生提供预警性信息，以便及时制订科学合理的防控技术手段。

参 考 文 献（References）

Barba M, Hadidi A, Candresse T, Cambra M, 2011. Plum pox virus[M]// Hadidi A, Barba M, Candresse T, Jelkmann W. Virus and virus-like diseases of pome and stone fruits. St. Paul, MN, USA: APS Press, pp. 185–197

Barba M, Ilardi V, Pasquini G, 2015. Control of pome and stone fruit virus diseases[J]. Advances in Virus Research, 91: 47−83

Cambra M, Capote N, Myrta A, Llácer G, 2006. Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease[J]. EPPO Bulletin, 36(2): 202−204

Cambra M, Madariaga M, Varveri C, Çağlayan K, Morca AF, Chirkov S, Glasa M, 2024. Estimated costs of plum pox virus and management of sharka, the disease it causes[J]. Phytopathologia Mediterranea, 63(3): 343−365

Chen HM, Zhou Y, Wang XF, Zhou CY, Yang XY, Li ZA, 2016. Detection of citrus yellow vein clearing virus by quantitative real-time RT-PCR[J]. Horticultural Plant Journal, 2(4): 188−192

Gao YH, Wang JZ, Li MF, Li GF, 2011. Development of a real-time fluorescent quantitative RT-PCR method for the detection of plum pox virus[J]. Letters in Biotechnology, 22(1): 77−80 (in Chinese) [高雅红, 王进忠, 李明福, 李桂芬, 2011. 李痘病毒实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J]. 生物技术通讯, 22(1): 77−80]

García JA, Glasa M, Cambra M, Candresse T, 2014. Plum pox virus and sharka: a model potyvirus and a major disease[J]. Molecular Plant Pathology, 15(3): 226−241

García JA, Rodamilans B, Martínez-Turiño S, Valli AA, Simón-Mateo C, Cambra M, 2025. Plum pox virus: an overview of the potyvirus behind sharka, a harmful stone fruit disease[J]. Annals of Applied Biology, 186(1): 49−75

Gu DJ, Zhang QJ, 2013. Research progress of plum pox virus in stone fruit trees[J]. China Fruits(5): 65−68 (in Chinese) [谷大军, 张琪静, 2013. 核果类果树李痘病毒研究进展[J]. 中国果树(5): 65−68]

Guo MM, 2023. Development of colloidal gold immunochromatographic test strips for detection of maize chlorotic mottle virus and plum pox virus[D]. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese) [郭萌萌, 2023. 玉米褪绿斑驳病毒和李痘病毒胶体金免疫层析试纸条的研制[D]. 杭州: 浙江大学]

Jones RAC, 2021. Global plant virus disease pandemics and epidemics[J]. Plants, 10 (2): 233

Li S, Ding SW, Cao Y, Tan XY, Wang ZL, Liu BS, Fang JC, He Z, Ji R, 2025. Preparation of antiserum against plum pox virus and detection in susceptible fruit trees[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 52(5): 851−856 (in Chinese) [李帅, 丁诗文, 曹烨, 谭心阳, 王智磊, 刘宝生, 方继朝, 贺振, 纪锐, 2025. 李痘病毒的抗血清制备与感病果树的检测[J]. 安徽农业大学学报, 52(5): 851−856]

Lin SX, Ding XL, Ye JR, Zhao Q, 2016. Invasion risk analysis of plum pox virus to China[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 40(6): 187−192 (in Chinese) [林司曦, 丁晓磊, 叶建仁, 赵琪, 2016. 李痘病毒在中国的入侵风险评估[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 40 (6): 187−192]

Ma J, Wei MS, Su ZP, Li GF, 2012. Preparation of the monoclonal antibody against plum pox virus and TAS-ELISA kit[J]. Plant Quarantine, 26(2): 9−12 (in Chinese) [马洁, 魏梅生, 粟智平, 李桂芬, 2012. 李痘病毒单克隆抗体及TAS-ELISA试剂盒的研制[J]. 植物检疫, 26(2): 9−12]

Navratil M, Safarova D, Karesova R, Petrzik K, 2005. First incidence of plum pox virus on apricot trees in China[J]. Plant Disease, 89(3): 338

Qin ZY, Sun JS, Wang N, Shao JZ, 2015. An efficient *Taq*Man real-time RT-PCR assay for detecting apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV)[J]. Journal of Plant Protection, 42(4): 551−556 (in Chinese) [秦子禹, 孙建设, 王娜, 邵建柱, 2015. 一种高效的苹果褪绿叶斑病毒*Taq*Man探针实时荧光定量RT-PCR检测方法[J]. 植物保护学报, 42(4): 551−556]

Ren F, Zhang ZP, Fan XD, Hu GJ, Li ZN, Dong YF, 2018. Progress on real-time fluorescent quantitative PCR detection technology for major fruit tree viruses[J]. Acta Horticulturae Sinica, 45(9): 1688−1700 (in Chinese) [任芳, 张尊平, 范旭东, 胡国君, 李正男, 董雅凤, 2018. 主要果树病毒实时荧光定量PCR检测技术研究进展[J]. 园艺学报, 45(9): 1688−1700]

Scholthof KB, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, et al., 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 12(9): 938−954

Wang YL, Wang Q, Liu YJ, Yang Z, Li XY, Zhou Y, 2019. Establishment and application of a quantitative PCR assay for the detection of citrus chlorotic dwarf-associated virus[J]. Journal of Plant Protection, 46(4): 931−932 (in Chinese) [王瑛丽, 王琴, 刘莹洁, 杨真, 李雪燕, 周彦, 2019. 柑橘褪绿矮缩病毒实时荧光定量PCR检测体系的建立与应用[J]. 植物保护学报, 46(4): 931−932]

Wen WG, Tan Z, Zhang Y, 2009. Molecular detection of plum pox virus based on *Taq*Man MGB probe[J]. Journal of Fruit Science, 26(4): 581−584 (in Chinese) [闻伟刚, 谭钟, 张颖, 2009. 基于*Taq*Man MGB探针的李痘病毒分子检测[J]. 果树学报, 26(4): 581−584]

Xi NN, Li ZT, Zhang JY, Meng XL, Wang YN, Cao KQ, 2020. Detection of apple scar skin viroid by real-time fluorescence quantitative reverse transcription PCR and its movement in an apple tree[J]. Journal of Plant Protection, 47(6): 1304−1312 (in Chinese) [郗娜娜, 李紫腾, 张静怡, 孟祥龙, 王亚南, 曹克强, 2020. 苹果锈果类病毒实时荧光定量反转录PCR检测及其在苹果树体内的扩散转移规律[J]. 植物保护学报, 47(6): 1304−1312]

Xing F, 2018. Identification, detection techniques and pathogenicity of viral pathogen associated with mosaic disease of apple trees in China[D]. Beijing: China Agricultural University (in Chinese) [邢飞, 2018. 我国苹果花叶病病原的鉴定、检测体系建立及其致病性分析[D]. 北京: 中国农业大学]

Xing F, Wang HQ, Li SF, 2017. Risk assessment of plum pox virus in China[J]. Acta Horticulturae, 1163: 141−146

Zhou J, Fan XD, Dong YF, Zhang ZP, Hu GJ, Ren F, Li ZN, 2016. Development and application of a quantitative RT-PCR approach for quantification of grapevine fanleaf virus[J]. Acta Horticulturae Sinica, 43(3): 538−548 (in Chinese) [周俊, 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 胡国君, 任芳, 李正男, 2016. 葡萄扇叶病毒实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立及应用[J]. 园艺学报, 43(3): 538−548]

Zhou J, Xing F, Wang HQ, Li SF, 2021. Occurrence, distribution, and genomic characteristics of plum pox virus isolates from common apricot (*Prunus armeniaca*) and Japanese apricot (*Prunus mume*) in China[J]. Plant Disease, 105(11): 3474−3480

（责任编辑：李美娟）