



Продовольственная и
сельскохозяйственная организация
Объединенных Наций



Международная
конвенция по карантину
и защите растений

МСФМ 27
ПРИЛОЖЕНИЕ 2

RUS

МЕЖДУНАРОДНЫЕ СТАНДАРТЫ ПО ФИТОСАНИТАРНЫМ МЕРАМ 27

ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ ПРОТОКОЛ

ДП 2: *Plum pox virus*

Подготовлен Секретариатом
Международной конвенции по карантину и защите растений (Мккзр)

Эта страница намеренно оставлена пустой

МСФМ 27

Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов

ДП 2: *Plum pox virus*

Принят в 2018 году; опубликован в 2021 году

СОДЕРЖАНИЕ

1.	Информация о вредном организме	2
2.	Таксономическая информация	3
3.	Выявление и идентификация.....	3
3.1	Спектр хозяев	3
3.2	Симптомы	4
3.3	Выявление с использованием биологических методов	4
3.4	Взятие проб для серологических и молекулярных исследований.....	5
3.5	Выявление и идентификация с использованием серологических методов	6
3.5.1	Непрямой твердофазный сэндвич-иммуноферментный анализ	6
3.5.2	Твердофазный сэндвич-иммуноферментный анализ.....	7
3.6	Выявление и идентификация с использованием молекулярных методов	7
3.6.1	Выделение РНК, иммунозахват и синтез кДНК.....	7
3.6.2	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.....	8
3.6.3	Иммуноспецифическая полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.....	9
3.6.4	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией с совместной амплификацией.....	9
3.6.5	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени.....	10
4.	Идентификация штаммов	12
4.1	Серологическая идентификация штаммов	13
4.2	Идентификация штаммов с использованием молекулярных методов.....	13
4.2.1	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.....	13
4.2.2	Иммуноспецифическая полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.....	14
4.2.3	Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с совместной амплификацией.....	14
4.2.4	Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени.....	14
5.	Контроль молекулярных исследований	15
6.	Данные	16
7.	Контактные лица для получения дальнейшей информации.....	17
8.	Выражение признательности.....	17
9.	Справочные материалы.....	18

1. Информация о вредном организме

Шарка (оспа сливы) является одной из наиболее серьезных вирусных болезней косточковых плодов. Впервые это заболевание было зафиксировано на сливе европейской (*Prunus domestica*) в Болгарии в 1917–1918 годах и описано как вирусная болезнь в 1932 году. С тех пор вирус прогрессирующе распространился на значительной части Европы, на территории вокруг бассейна Средиземного моря и на Ближнем Востоке. Он был обнаружен с ограниченным распространением в Южной и Северной Америках и в Азии (ЕОКЗР, 2006; CABI, 2018).

Шарка, вызываемая вирусом *Plum pox virus* (PPV), поражает растения рода *Prunus* (семейство Rosaceae). Особый ущерб оно наносит абрикосу (*Prunus armeniaca*), сливе европейской (*P. domestica*), персику (*P. persicae*) и сливе китайской (*P. salicina*), поскольку снижает качество и вызывает преждевременное опадение плодов. Затраты на борьбу с шаркой в мире с 1970-х годов превысили 10 миллиардов евро (Cambra *et al.*, 2006b).

Plum pox virus – вид рода *Potyvirus* семейства *Potyviridae*. Вирусные частицы представляют собой изогнутые палочки размером 700 нм × 11 нм, состоящие из одонитевой молекулы РНК примерно из 10 000 нуклеотидов, покрытой 2000 субъединиц единственного белка оболочки (García *et al.*, 2014). PPV переносится в полевых условиях тлями непersistентным способом, однако перевозка инфицированного растительного посадочного материала является главным способом распространения PPV на большие расстояния. Факты переноса семенами и пылью не получили подтверждения (Pasquini and Barba, 2006; Iardi and Tavazza, 2015). В экспериментальных условиях PPV может переноситься механическим способом на многочисленные виды *Prunus*, такие как *Arabidopsis thaliana*, *Chenopodium foetidum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, *Nicotiana glutinosa* и *Pisum sativum* (Barba *et al.*, 2011).

Изоляты *Plum pox virus* можно сгруппировать в девять монофилетических штаммов: D (Dideron), M (Marcus), C (Cherry), EA (El Amar), W (Winona), Rec (Recombinant), T (Turkish), CR (Cherry Russian) and An (Ancestor Marcus) (James *et al.*, 2013). Эти штаммы характеризуются специфическими геномными последовательностями и могут варьироваться по симптоматике, патогенезу, спектру хозяев, эпидемиологическим характеристикам и способности переноситься тлей. Большинство изолятов PPV относятся к штаммам D и M. Штаммы D и M могут легко заражать абрикос (*P. armeniaca*) и сливу (*P. domestica*), но различаются по своей способности инфицировать сорта персика (*P. persica*). Эти два штамма также различаются по патогенности; например, изоляты штамма M вызывают более быстрое развитие болезни и ее более серьезные симптомы, чем изоляты штамма D на абрикосе (*P. armeniaca*), сливе (*P. domestica*), персике (*P. persica*) и сливе китайской (*P. salicina*). Изоляты EA географически ограничены территорией Египта, и по их эпидемиологии и биологическим свойствам имеется очень мало информации. В нескольких европейских странах недавно были идентифицированы изоляты PPV, заражающие черешню (*Prunus avium*) и вишню (*Prunus cerasus*). Эти изоляты образуют два отдельных штамма, которые были названы PPV-C и PPV-CR. В Канаде на растении сливы европейской (*P. domestica*) был обнаружен атипичный PPV, представляющий собой отличный от других штамм PPV. Штамм PPV-W был после этого обнаружен в нескольких европейских странах (James *et al.*, 2013). Кроме того, естественные рекомбинанты между штаммами D и M были описаны как штамм PPV-Rec; эти рекомбинанты обладают эпидемиологическими свойствами, сходными со штаммом D. Второй тип рекомбинантного штамма был обнаружен в Турции и назван штамм T (Ulubaş Serçe *et al.*, 2009). Одиночный изолят PPV-An был описан и предложен в качестве потенциального предка штамма PPV-M (Palmisano *et al.*, 2012). Был также предложен новый адаптированный к вишне штамм (Tat), не являющийся ни штаммом C, ни штаммом CR (Chirkov *et al.*, 2016).

Подробные данные относительно PPV, включая иллюстрации симптомов болезни, можно найти в Barba *et al.* (2011), CABI (2018), ЕОКЗР (2004, 2006, 2018b), García *et al.* (2014) и PaDIL (2018).

2. Таксономическая информация

Научное название: *Plum pox virus* (PPV)

Синоним: *Вирус шарки*

Таксономическая позиция: *Potyviridae, Potyvirus*

Общепотребительные названия: "оспа" сливы, шарка

3. Выявление и идентификация

Выявление PPV может осуществляться с использованием биологических, серологических или молекулярных методов исследования; идентификация же требует проведения серологического или молекулярного исследования. Исследование с использованием какого-либо серологического или молекулярного метода – это минимальное требование для обнаружения и идентификации PPV, особенно при проведении стандартной диагностики, если известно, что данный вредный организм акклиматизировался в странах с его широким распространением. В тех случаях, когда национальной организации по карантину и защите растений (НОКЗР) потребуется дополнительное подтверждение достоверности идентификации PPV (например, выявление в зоне, где вирус не встречается, или выявление в грузе, происходящем из страны, где вредный организм значится как отсутствующий), могут быть проведены дополнительные исследования. Если первоначальное выявление проводилось с использованием молекулярного метода, то при подтверждении предпочтительно использовать метод исследования, обеспечивающий более высокую чувствительность, или, если это возможно, молекулярный метод, нацеленный на другой участок генома или на анализ последовательности. Могут проводиться дополнительные исследования, включая применение серологических методов выявления элементов белка или методов, применяемых для идентификации штамма выявленного изолята PPV. В любом случае, в исследования должны быть включены методы как положительного, так и отрицательного контроля. Рекомендуемые методики описаны в следующих разделах.

В настоящем диагностическом протоколе описаны хорошо известные методы выявления и идентификации PPV. Для выявления PPV применялись некоторые новые и перспективные методики, такие как изотермическая амплификация с формированием петель (Varga and James, 2006b) и секвенирование следующего поколения (Rodamilans *et al.*, 2014). Однако, поскольку секвенирование следующего поколения и изотермическая амплификация с формированием петель (LAMP)¹ еще не прошли в полном объеме валидацию в качестве стандартных инструментов выявления PPV с публикацией протоколов с описанием, эти методики не были включены в настоящий диагностический протокол.

В настоящем диагностическом протоколе методы (в том числе ссылки на названия торговых марок) описаны так, как они опубликованы, поскольку по ним определяется первоначальный уровень чувствительности, специфичности и достигнутой воспроизводимости. Представленные в протоколах лабораторные процедуры могут быть адаптированы к стандартам отдельных лабораторий, при условии, что они прошли надлежащую валидацию.

3.1 Спектр хозяев

В естественных условиях PPV легко заражает плодовые деревья рода *Prunus* (семейство Rosaceae), которые используются в качестве товарных сортов или подвоев. В первую очередь,

¹ При регулярном применении методики LAMP на территории, где существует патентная система, например в Японии (патенты №№ 3313358, 3974441 и 4139424), Соединенных Штатах Америки (US6410278, US6974670 и US7494790), Европейском союзе (№№ 1020534, 1873260, 2045337 и 2287338), Китае (ZL008818262), Республике Корея (патент № 10-0612551), Австралии (№ 779160) и в Российской Федерации (№ 2252964), пользователи обязаны до начала применения получить лицензию от компании Eiken Chemical Co., Ltd.

это такие хозяева, как абрикос (*P. armeniaca*), алыча культурная (*P. cerasifera*), дикий китайский персик (*P. davidiana*), европейская слива (*P. domestica*), вишня антипка (*P. mahaleb*), слива Мариана (*P. mariana*), слива японская (*P. mume*), персик (*P. persica*) и слива китайская (*P. salicina*), а также их межвидовые гибриды. Существуют адаптировавшиеся к вишне штаммы PPV (C и CR), которые естественно поражают черешню (*P. avium*) и вишню (*P. cerasus*) (James *et al.*, 2013). Иногда PPV поражает миндальный орех (*P. dulcis*) (Llácer and Cambra, 2006). Вирус поражает также многие дикорастущие и декоративные виды рода *Prunus*, такие как западная песчаная вишня (*P. besseyi*), пурпурнолистная песчаная вишня (*P. cistena*), карликовый японский миндаль (*P. glandulosa*), слива Дамсона (*P. insititia*), лавровишня лекарственная (*P. laurocerasus*), терн (*P. spinosa*), вишня войлочная (*P. tomentosa*) и миндаль трёхлопастной (*P. triloba*) (James and Thompson, 2006). В условиях эксперимента PPV можно механически перенести на различные виды *Prunus* и на различные травянистые растения (см. раздел 1).

3.2 Симптомы

Симптомы шарки могут проявляться на листьях, побегах, коре, лепестках, плодах и косточках в полевых условиях. На листьях они особенно чётко видны в весенний период и выражаются в умеренном изменении цвета листовой пластинки на светло-зелёный, появлении хлоротических пятен, полос и колец, посветлении или пожелтении жилок и даже в деформации листьев. Некоторые из этих симптомов на листьях схожи с симптомами других вирусов, таких как вирус Американского линейного узора сливы (*American plum line pattern virus*). На *P. cerasifera* "GF 31" видны ржаво-коричневые уплотнения и растрескивание коры.

На цветках могут появляться такие симптомы, как изменение цвета лепестков (розовые прожилки) и опадание цветков (Barba *et al.*, 2011). Такие симптомы на цветках могут наблюдаться на некоторых сортах *P. persica* при заражении PPV-M или на *P. glandulosa* при заражении PPV-D.

На заражённых плодах появляются хлоротические пятна или слабопигментированные жёлтые кольца или линии. Плоды могут быть деформированы или иметь неправильную форму, и на них под обесцвеченными кольцами могут развиваться бурые или некротические участки. Некоторые виды деформации плодов, особенно у *P. armeniaca* и *P. domestica*, похожи на деформации, вызываемые вирусом хлоротической пятнистости листьев яблони. Зараженные плоды характеризуются коричневой или гнилой мякотью и низким качеством. При сильной степени заражения инфицированные плоды преждевременно опадают. Как правило, на плодах ранних сортов развиваются более отчетливые симптомы, чем на поздних сортах. На косточках заражённых растений абрикоса (*P. armeniaca*) развиваются типичные светлые кольца или пятна. Алкоголь и спиртные напитки из зараженных плодов непригодны для продажи из-за нежелательного запаха.

Развитие и интенсивность симптомов сильно зависят от растения-хозяина и климатических условий. В холодном климате вирус может оставаться латентным в течение нескольких лет.

С симптомами различных хозяев можно познакомиться, например, на веб-сайте "Глобальная база данных ЕОКЗР" (Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений) (<https://gd.eppo.int/taxon/PPV000>).

3.3 Выявление с использованием биологических методов

В качестве основных индикаторных растений для индексирования PPV используются сеянцы *P. cerasifera* 'GF 31', *P. persica* 'GF 305', *P. persica* × *P. davidiana* 'Nemaguard' или *P. tomentosa*. Растения-индикаторы выращивают из семян, которые высаживаются в почвенную смесь с хорошим дренажем, и содержат в непроницаемой для насекомых теплице при температуре от 18 °C до 25 °C до тех пор, пока они не станут пригодными для прививки (обычно 25–30 см высотой и 3–4 мм в диаметре). В качестве альтернативы могут быть привиты сеянцы других видов *Prunus* с индикаторными-отростками растений. Растения-индикаторы должны быть

инокулированы прививкой общепринятыми методами, например, окулировкой (Desvignes, 1999), с использованием, как минимум, четырех повторов для каждого растения-индикатора. Привитые растения-индикаторы содержатся в тех же условиях и по истечении трех недель подрезаются на несколько сантиметров выше прививки (Gentit, 2006). Привитые растения следует осматривать на симптомы в течение не менее 6 недель. Симптомы, в частности хлоротические полосы и рисунок, наблюдаемые на отросших побегах через 3–4 недели, должны сравниваться с позитивными и здоровыми контрольными образцами. Иллюстрации симптомов, вызванных PPV на растениях-индикаторах, можно найти в работах Damsteegt *et al.* (1997, 2007) и Gentit (2006).

Количественные данные относительно специфичности, восприимчивости или надёжности прививания не опубликованы. Данный метод широко применяется в системах сертификации и считается одним из точных методов выявления. Однако, это не быстрый тест (для развития симптомов требуется несколько недель после инокуляции): он может использоваться только для тестирования черенков, для его проведения нужны специальные помещения, такие как тепличные пространства с контролем температуры, а наблюдаемые симптомы можно перепутать с симптомами присутствия других агентов, передающихся прививкой. Кроме того, существуют бессимптомные штаммы, которые не вызывают симптомов и не обнаруживаются на растениях-индикаторах.

Для биологического выявления PPV могут использоваться также травянистые растения (Barba *et al.*, 2011). PPV может механическим способом переноситься на некоторые виды травянистых растений (см. раздел 1).

3.4 Взятие проб для серологических и молекулярных исследований

Общее руководство по методике отбора проб приводится в МСФМ 31 (*Методики отбора образцов от грузов*). В некоторых ситуациях (например, во время стандартной диагностики вредного организма в странах с его широким распространением) можно одновременно тестировать несколько растений с использованием средней пробы, полученной от нескольких растений. Решение о проведении тестирования по одному или нескольким растениям зависит от концентрации вируса в растениях и уровня достоверности, требуемого НОКЗР. Посадочный материал *Prunus* часто отправляется в виде одревесневших черенков. В этом случае непосредственно для исследований могут использоваться лишь почки или ткань луба (соскобы с коры).

Для обнаружения PPV критически важен правильный отбор проб. При отборе проб важно учитывать биологию вируса и местные климатические условия, в частности погодные условия в период выращивания. Если присутствуют типичные симптомы, следует брать пробы соцветий, листьев или плодов с симптомами. На бессимптомных растениях пробы следует отбирать с побегов возрастом не менее одного года на середине каждой из основных ветвей, имеющих зрелые или полностью распустившиеся листья (выявление ненадежно на побегах до одного года). Пробы следует отбирать как минимум с четырех различных участков (например, четыре ветки или четыре листа) каждого растения; это критически важно в связи с неравномерным распределением PPV. Отбор проб не должен проводиться в месяцы с наиболее высокими температурами. Результаты исследования проб, собранных осенью, менее достоверны, чем анализы образцов, отобранных ранней весной. Растительный материал предпочтительно собирать с внутренних частей кроны дерева. В весенний сезон в качестве образцов могут быть использованы цветки, молодые побеги с полностью распустившимися листьями или плоды. Летом и осенью для проведения анализа могут быть использованы зрелые листья и кожица зрелых плодов, которые отбирают в поле или на упаковочном предприятии. Летом для тестирования почек с одревесневших черенков можно воспользоваться полимеразной цепной реакцией с обратной транскрипцией (RT-PCR) или PCR в режиме реального времени, которые считаются наиболее предпочтительными при тестировании зрелых листьев. Цветки, листья, побеги и кожицу плодов можно хранить при температуре 4 °C в течение не более 10 дней перед

тестированием. Плоды могут храниться при температуре 4 °C в течение месяца перед тестированием. Зимой можно отбирать спящие почки или кусочки коры с базальной части побегов, веточек или ветвей, или целые участки отростков.

3.5 Выявление и идентификация с использованием серологических методов

Для скрининга большого количества образцов настоятельно рекомендуется твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

При пробоподготовке примерно 0,2–0,5 г свежего растительного материала измельчают на мелкие кусочки и помещают в подходящую пробирку или пластиковый пакет. Образцы гомогенизируют приблизительно в 4–10 мл (1:20 w/v) в экстракционном буфере (или в соответствии с рекомендациями предприятия-изготовителя набора для проведения анализа ELISA) с применением электрического гомогенизатора тканей, либо же ручного валика, молотка или похожего инструмента. В качестве экстракционного буфера используется натрий-фосфатный буфер (PBS) pH 7,2–7,4, содержащий 2% поливинилпирролидона и 0,2% диэтилдитиокарбамата натрия (Cambra *et al.*, 1994,) или иной пригодный для этой цели буфер. Растительный материал необходимо тщательно гомогенизировать и сразу же использовать.

3.5.1 Непрямой твердофазный сэндвич-иммуноферментный анализ

Непрямой твердофазный сэндвич-иммуноферментный анализ (DASI-ELISA), который также называется методом тройных антител (TAS)-ELISA, следует проводить по методике Cambra *et al.* (1994), используя специальные моноклональные антитела такие, как 5B-IVIA, в соответствии с инструкциями производителей.

Моноклональное антитело (MAb) 5B-IVIA позволяет, как показала практика, выявлять практически все штаммы PPV (Cambra *et al.*, 2006a). MAb 5B-IVIA позволяет выявлять изоляты штамма CR, однако показатель pH экстрактов для анализа следует доводить до 6,0 для повышения эффективности распознавания MAb 5B-IVIA (Glasa *et al.*, 2013; Chirkov *et al.*, 2013). С помощью MAb 5B-IVIA (Chirkov *et al.*, 2016) можно также выявлять предполагаемый адаптировавшийся к вишне штамм (Tat). Однако нет никаких сведений о том, что с помощью метода MAb 5B-IVIA (Palmisano *et al.*, 2012) удалось выявить штамм PPV-An.

В сличительном исследовании DIAGPRO (Harju *et al.*, 2000) с участием 17 лабораторий был использован набор из 10 образцов, как заражённых PPV (PPV-D, PPV-M и PPV-D+M), так и здоровых из Франции и Испании, и методика DASI-ELISA с применением MAb 5B-IVIA дала точность 95% (количество истинно отрицательных и истинно положительных результатов, деленное на общее число исследованных образцов). Точность этого метода оказалась выше, чем при применении метода иммуноспецифической обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции (IC-RT-PCR), дающего точность 82%, и метода обратной транскрипции-полимеразной цепной реакции с совместной амплификацией (Co-RT-PCR), дающего точность 94% (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). Соотношение истинно отрицательных результатов деленное на общее число тестируемых здоровых растений), выявленных в тесте DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA, составило 99,0%, в сравнении с методами RT-PCR в режиме реального времени с использованием очищенных нуклеиновых кислот (89,2%), отпечатка тканей (98,0%) или иммуноспецифической RT-PCR (96,1%). В работе Capote *et al.* (2009) сообщалось также, что с вероятностью 98,8% серопозитивные результаты, полученные в зимний период в тесте DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA, были истинно положительными. Перед каждым стандартным применением следует проверять эффективность антител, поскольку она может варьироваться в зависимости от партии.

Моноклональные антитела 5B-IVIA с высокой степенью точности, чувствительности и надёжности выявляют все штаммы PPV, (Cambra *et al.*, 1994; Cambra *et al.*, 2006a; Glasa *et al.*,

2013; Chirkov *et al.*, 2013; Chirkov *et al.*, 2016). Существует несколько коммерческих наборов с использованием поликлональных антител, а также некоторые данные по валидации (Gougherty *et al.*, 2015; ЕОКЗР, 2018а). Однако они оказались менее точными, а различные партии были недостаточно однородными (Cambra *et al.*, 2006а), в связи с чем перед применением они должны проходить валидацию. Дополнительные методы рекомендуется использовать в случаях, когда в исследовании применялись поликлональные антитела и НОКЗР требует дополнительного подтверждения идентификации PPV.

3.5.2 Твердофазный сэндвич-иммуноферментный анализ

Обычные или биотин/стрептавидиновые системы DAS-ELISA следует применять с использованием наборов на основе специфичных моноклональных антител 5В-IVIA или поликлональных антител, для которых установлена способность выявлять все штаммы PPV, включая наиболее распространенные штаммы D, М и Rec, без перекрестной реакции с другими вирусами и здоровым растительным материалом (Cambra *et al.*, 2006а; Capote *et al.*, 2009). Исследование следует проводить в соответствии с инструкциями производителя.

3.6 Выявление и идентификация с использованием молекулярных методов

Молекулярные методы с использованием обратной транскрипции полимеразной цепной реакции (RT-PCR) могут требовать больше затрат и времени, нежели серологические, особенно при обширных исследованиях. Тем не менее, молекулярные методы, в особенности RT-PCR в режиме реального времени, как правило, являются более чувствительными, чем серологические. Применение RT-PCR в режиме реального времени позволяет также избежать необходимости использования какой-либо процедуры после амплификации (например, гель-электрофореза), и поэтому данный метод быстрее и меньше подвержен засорению (с ДНК-мишенью), чем обычный PCR.

За исключением IC-RT-PCR (для которой выделение РНК не требуется), выделение РНК должно осуществляться при применении должным образом утвержденных протоколов. Образцы следует размещать в индивидуальные пластиковые пакеты для предотвращения перекрестного засорения при инкубировании. В качестве альтернативы стандартного RT-PCR в режиме реального времени, срезы тканей или размягченную массу растительного материала можно иммобилизовать для анализа на промокательной бумаге или нейлоновых мембранах (Olmos *et al.*, 2005; Osman and Rowhani, 2006; Capote *et al.*, 2009). Рекомендуется исследовать отпечатки растительных экстрактов или срезов тканей не с помощью обычного метода PCR, а с помощью метода RT-PCR в режиме реального времени ввиду его более высокой чувствительности.

В каждом из указанных ниже методов описан объем забираемой пробы, который должен быть использован в качестве матрицы. В зависимости от чувствительности метода, минимальная концентрация матрицы, необходимая для выявления PPV, составляет: для RT-PCR – 100 фг на 1 мл матрицы РНК; для RT-PCR с совместной амплификацией – 1 фг на 1 мл матрицы РНК; и для RT-PCR в реальном времени, 2 фг на 1 мл матрицы РНК.

3.6.1 Выделение РНК, иммунозахват и синтез кДНК

3.6.1.1 Выделение РНК

Выделение РНК должно производиться в соответствии с надлежащим образом утвержденными протоколами или с использованием набора для выделения РНК согласно инструкциям изготовителя. Выделенную РНК следует хранить при температуре -70°C (предпочтительно) или при температуре -20°C до использования в качестве матрицы в течение не более одного года. Хранить РНК следует в малых количествах, с тем чтобы не допустить ее разложения в результате неоднократного проведения циклов замораживания-размораживания.

3.6.1.2 Иммунозахват

Иммунозахват применяется как альтернатива выделению РНК. Для этой процедуры приготавливается разбавленная смесь антител, которой покрываются микротрубки, используемые для реакции с обратной транскрипцией. Подробная информация по этой процедуре приводится в разделе 3.6.2.

3.6.1.3 Синтез кДНК

Поскольку обеспечение сохранности РНК во время хранения является проблематичной, рекомендуется синтезировать дополнительно кДНК, поскольку ее можно сохранять в течение длительного времени и при менее строгом соблюдении температурных режимов, чем при хранении РНК.

3.6.2 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Описанные ниже праймеры, используемые в методах RT-PCR, прошли надлежащую валидацию и считаются эталонными для общего обнаружения PPV, несмотря на наличие других праймеров широкого спектра действия (Olmos *et al.*, 2006). В научных трудах с описанием разработки и валидации этих методов нет никаких данных относительно ложноположительных результатов (Wetzel *et al.*, 1991; Levy and Hadidi, 1994). Еще одним преимуществом праймеров, описанных в работе Wetzel *et al.* (1991), является то, что они позволяют идентифицировать два наиболее распространенных штамма PPV, если их сочетать с анализом продукта из 243 пар оснований (п.о.) с использованием полиморфизма длин рестрикционных фрагментов.

В этом методе (RT-PCR) используются праймеры, описанные Wetzel *et al.* (1991):

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

смысловой P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

или праймеры, разработанные Levy and Hadidi (1994):

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

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

Реакционная смесь (25 мкл) имеет следующий состав: по 1 мкм каждого праймера (P1 и P2 или пары праймеров 3'NCR), 250 мкм dNTPs, 1 единица вируса миелобластома птиц (AMV) обратной транскрипции², 0,5 единицы ДНК-полимеразы Taq, 2,5 мкл 10× буфера для Taq полимеразы, 1,5 мМоль MgCl₂, 0,3% Triton X-100 и 5 мкл матрицы РНК. Реакцию проводят при следующих термоциклических условиях: 45 минут при 42 °С, 2 минуты при 94 °С, 40 циклов по 30 секунд при 94 °С, 30 секунд либо при 60 °С (праймеры P1 и P2), либо при 62 °С (праймеры 3'NCR), 60 секунд при 72 °С, с окончательным инкубированием в течение 10 минут при 72 °С. Анализ результатов PCR проводится с применением гель-электрофореза. Пара праймеров P1/P2 и 3'NCR продуцирует ампликон из 243 пар оснований (п.о.), а 3'NCR-ампликон из 220 п.о.

Методика, описанная в работе Wetzel *et al.* (1991), была апробирована путём исследования изолятов PPV из Средиземноморского региона (Кипр, Египет, Франция, Греция, Испания и Турция). Она позволяет выявлять 10 фг вирусной РНК, что соответствует 2 000 вирусных частиц (Wetzel *et al.*, 1991). Levy & Hadidi (1994) апробировали эту методику на изолятах PPV из Египта, Франции, Германии, Греции, Венгрии, Италии, Испании и Румынии.

² Использование названий реагентов, химикатов и оборудования в этих диагностических протоколах не подразумевает предпочтение их и исключение других, которые также могут быть пригодными.

3.6.3 Иммуноспецифическая полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Фаза иммунозахвата может проходить в соответствии с Wetzel *et al.* (1992) с использованием экстрактов соков растений, как описано в разделе 3.5, и с использованием индивидуальных пробирок или пластиковых пакетов для предотвращения засорения. Могут применять любые должным образом валидированные антитела. Данная методика исследований была валидирована только для изолятов широко распространенных штаммов D и M.

Раствор (1 мкг/мл) приготавливается из поликлональных антител или характерного для PPV моноклонального антитела (например, 5B-IVIA) в карбонатном буфере pH 9,6. Аликвоты 100 мкл раствора антител помещаются в пробирки для PCR и выдерживаются при температуре 37 °C в течение 3 часов. Пробирки дважды промываются 150 мкл стерильного PBS-Tween-буфера (промывочный буфер) и дважды ополаскиваются водой, свободной от РНК-аз. Растительный экстракт (100 мкл, см. раздел 3.5) осветляется в центрифуге (5 минут при 15 500×g), после чего надосадочная жидкость добавляется в пробирки для PCR, покрытые антителами. Пробирки для PCR выдерживаются в течение двух часов на льду или при температуре 37 °C, а затем трижды промываются 150 мкл стерильного PBS-Tween-буфера (промывочный буфер). Реакционная смесь RT-PCR приготавливается в соответствии с положениями раздела 3.6.2, с использованием праймеров Wetzel *et al.* (1991) и непосредственно вносится в покрытые антителами пробирки для PCR. Амплификация проводится в соответствии с положениями раздела 3.6.2.

Как правило, для проведения IC-RT-PCR требуются конкретные антитела, хотя применение методик с прямым связыванием позволяет устранить это требование. IC-RT-PCR с использованием моноклональных антител 5B-IVIA был валидирован в ходе сличительных исследований DIAGPRO, показав точность выявления PPV на уровне 82% (Cambra *et al.*, 2006с; Olmos *et al.*, 2008). В работе Capote *et al.* (2009) сообщается, что 95,8% положительных результатов, полученных в зимний период с использованием метода IC-RT-PCR с моноклональными антителами 5B-IVIA, были истинно положительными.

3.6.4 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией с совместной амплификацией

В этом методе (RT-PCR) используются праймеры, разработанные Wetzel *et al.* (1991; P1 и P2), а также Olmos *et al.* (2002; P10 и P20):

Внутренний праймер P1 (5'-ACC GAG ACC ACT ACA CTC CC-3')

Внутренний праймер P2 (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

Внешний праймер P10 (5'-GAG AAA AGG ATG CTA ACA GGA-3')

Внешний праймер P20 (5'-AAA GCA TAC ATG CCA AGG TA-3')

Реакционная смесь (25 мкл) имеет следующий состав: по 0,1 мкм праймеров P1 и P2, по 0,05 мкм праймеров P10 и P20, 400 мкм dNTPs, 2 единицы обратной транскрипции AMV, 1 единица ДНК Taq полимеразы, 2 мкл 10× реакционного буфера, 3 мМоль MgCl₂, 5% диметилсульфоксида и 0,3% Triton X-100 и 5 мкл матрицы РНК. RT-PCR осуществляется при следующих термоциклических условиях: 45 минут при 42 °C, 2 минуты при 94 °C, 60 циклов по 15 секунд при 94 °C, 15 секунд при 50 °C, 30 секунд при 72 °C с последующим инкубированием в течение 10 минут при 72 °C.

Реакция RT-PCR совмещается с колориметрическим обнаружением ампликонов, используя универсальный зонд к PPV, меченый 3' дигоксигенином (5'-TCG TTT ATT TGG CTT GGA TGG AA-Digoxigenin-3'; Roche Molecular Biochemicals), как изложено ниже. Амплифицированная кДНК денатурируется при 95 °C в течение 5 минут и немедленно помещается на лёд. Аликвота пробы в объеме 1 мкл помещается на нейлоновую мембрану. Мембрана высушивается при комнатной температуре и облучается проходящим ультрафиолетовым излучением на

транс-иллюминатор в течение 4 минут при длине волны 254 нм. Для прегибридизации мембрана помещается в пробирку для гибридизации при 60 °C на 1 час, используя стандартный буфер для гибридизации. Раствор сливается и гибридизация проводится путем смешивания зонда, меченого 3'DIG, со стандартным буфером для гибридизации при конечной концентрации 10 пкмоль/мл перед инкубированием в течение 2 часов при 60 °C. Мембрана дважды промывается в течение 15 минут при комнатной температуре 2× промывочным раствором и 15 минут при комнатной температуре 0.5× промывочным раствором. Затем мембрана выдерживается 2 минуты в промывочном буфере и вымачивается в течение 30 минут в 1% стерилизованном блокирующем растворе (1 гр блокирующего реагента, растворенного в 100 мл буфера малеиновой кислоты). Затем мембрана инкубируется при комнатной температуре с конъюгатом антител к антидигоксигенину с щелочной фосфатазой в рабочей концентрации 1:5 000 в 1% блокирующем растворе (масса/объем) в течение 30 минут. После этого мембрана дважды промывается промывочным раствором в течение 15 минут и выдерживается в течение 2 минут в детектирующем буфере (100 мМоль Tris-HCl, 100 мМоль NaCl, pH 9,5). Субстратный раствор готовят путем смешивания 45 мкл раствора NBT (75 мг/мл соли нитросинего тетразолия в 70%-м (объем/объем) растворе диметилформамида) и 35 мкл раствора BCIP (50 мг/мл соли толуидин 5 бром-4хлоро-3индолилфосфата и 100% диметилформамида) в 10 мл детектирующего буфера. После инкубирования с субстратом реакция прекращается путем промывки мембраны водой.

Было установлено, что эта методика в 100 раз чувствительнее, чем метод RT-PCR, описанный Wetzal *et al.* (1991) (Olmos *et al.*, 2002). Этот метод был валидирован в ходе сличительного исследования DIAGPRO и показал точность 94% (Cambra *et al.*, 2006c; Olmos *et al.*, 2008).

3.6.5 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени

При RT-PCR используются либо TaqMan, либо SYBR Green I². Для универсального обнаружения PPV разработаны две методики с использованием TaqMan (Schneider *et al.*, 2004; Olmos *et al.*, 2005). Праймеры и зонд TaqMan, использованные в первой реакции, описаны в работе Schneider *et al.* (2004):

прямой праймер (5'-CCA ATA AAG CCA TTG TTG GAT C-3')

обратный праймер (5'-TGA ATT CCA TAC CTT GGC ATG T-3')

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

Реакционная смесь (25 мкл) имеет следующий состав: 1×реакционная смесь (по 0,2 мМоль каждого dNTP и 1,2 мМоль MgSO₄), по 200 наноМоль прямого и обратного праймеров, 100 наноМоль зонда TaqMan, 4,8 мМоль MgSO₄ и 0,5 мкл смеси RT и Platinum Taq (SuperscriptTM One-Step RT-PCR с ДНК-полимеразой Platinum Taq; Invitrogen)² и 5 мкл матрицы РНК. RT-PCR проводится при следующих термоциклических параметрах: 15 минут при 52 °C, 5 минут при 95 °C, 60 циклов по 15 секунд при 95 °C и 30 секунд при 60 °C. Результаты PCR анализируются в режиме реального времени в соответствии с инструкциями производителей.

Метод Schneider *et al.* (2004) был апробирован путём исследования изолятов PPV D из Соединённых Штатов Америки, изолятов штаммов PPV-C, PPV-D, PPV-EA и PPV-M и восьми других видов вирусов. Метод оказался специфичным и позволял стабильно выявлять 10–20 фг вирусной РНК (Schneider *et al.*, 2004). PPV выявлялся этим методом на различных растениях-хозяевах, а также в листьях, побегах, почках и корнях *Prunus persica*.

Праймеры и зонд TaqMan, использованные во втором исследовании, описаны в работе Olmos *et al.* (2005):

праймер P241 (5'-CGT TTA TTT GGC TTG GAT GGA A-3')

праймер P316Dr (5'-GAT TAA CAT CAC CAG CGG TGT G-3')

праймер P316M (5'-GAT TCA CGT CAC CAG CGG TGT G-3')

Зонд PPV-DM (5'-FAM-CGT CGG AAC ACA AGA AGA GGA CAC AGA-TAMRA-3')

Реакционная смесь (25 мкл) имеет следующий состав: 1 мкм праймера P241, по 0,5 мкм праймеров P316D и P316M, 200 наноМолей зонда TaqMan, 1×TaqMan Universal PCR Master Mix², 1×MultiScribe и ингибиторная смесь RNase (Applied Biosystems)² и 5 мкл матрицы РНК. RT-PCR проводится при следующих термоциклических параметрах: 30 минут при 48 °С, 10 минут при 95 °С, 40 циклов по 15 секунд при 95 °С и 60 секунд при 60 °С. Результаты PCR анализируются в режиме реального времени в соответствии с инструкциями производителей.

Эта методика была апробирована (Olmos *et al.* (2005)) с использованием трех изолятов каждого из штаммов PPV-D и PPV-M, и оказалась в 1 000 раз более чувствительной, чем метод DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA. Доля истинно положительных результатов (отношение числа истинно положительных результатов к числу зараженных PPV растений), правильно определённых методом RT-PCR в режиме реального времени с использованием зонда TaqMan (Olmos *et al.*, 2005) и очищенных нуклеиновых кислот, составила 97,5%, что превышает эффективность метода RT-PCR в режиме реального времени с использованием меченых проб (93,6%), метода IC-RT-PCR (91,5%) и метода DASI-ELISA с использованием моноклональных антител 5B-IVIA (86,6%) (Capote *et al.*, 2009).

Varga & James (2005) описали метод SYBR Green I² для одновременного выявления PPV и идентификации штаммов D и M:

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')

Для валидации результатов исследований рекомендуется использовать следующие праймеры внутреннего контроля:

Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')
Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3')

Используется протокол двухэтапной RT-PCR. Реакционная смесь RT имеет следующий состав: 2 мкл от 10 мкм раствора праймера P1, 2 мкл от 10 мкм раствора праймера Nad5-R, 4 мкг всего РНК и 5 мкл воды. Инкубирование при 72 °С в течение 5 минут, затем на льду. Затем в состав смеси добавляются: 4 мкл 5×буфера для синтеза первой цепи (Invitrogen)², 2 мкл 0,1 Моль (DTT), 1 мкл 10 мМоль dNTPs, 0,5 мкл RNaseOUT (40 единиц/мкл) (Invitrogen)², 1 мкл обратной Superscript II (Invitrogen)² и 2,5 мкл воды. Смесь инкубируется при 42 °С в течение 60 минут, а затем при 99 °С в течение 5 минут. Реакционная смесь (24 мкл) имеет следующий состав: 400 наноМолей праймера PPV-U, 350 наноМолей праймера PPV-FM, 150 наноМолей праймера PPV-FD, 200 наноМолей праймера PPV-RR, 100 наноМолей праймера Nad5-F, 100 наноМолей праймера Nad5-R, 200 мкм dNTPs, 2 мМоль MgCl₂, 1× Karsai буфер (Karsai *et al.*, 2002), 1:42 000 SYBR Green I (Sigma)² и 0,1 мкл высококачественной полимеразы ДНК Platinum® Taq (Invitrogen)². Реакционную смесь и 1 мкл разбавленной кДНК (1:4) помещают в стерильную пробирку PCR. PCR проводится при следующих термоциклических параметрах: 2 минуты при 95 °С, 39 циклов по 15 секунд при 95 °С и 60 секунд при 60 °С. Анализ кривой плавления производится путём выдерживания при температуре от 60 °С до 95 °С с шагом 0,1 °С/s с усреднённым показателем сглаживания кривой равным 1 единице. В соответствии с условиями Varga & James (2005), продукты имеют следующую температуру плавления:

универсальная детекция PPV (фрагмент 74 bp): 80,08–81,52 °С
штамм D (фрагмент 114 bp): 84,3–84,43 °С
штамм M (фрагмент 380 bp): 85,34–86,11 °С
внутренний контроль (фрагмент 181 bp): 82,45–82,63 °С.

Метод Varga & James (2005) был апробирован с использованием изолятов PPV-C, PPV-D, PPV-EA и PPV-M, а также неохарактеризованного штамма PPV с видов *Nicotiana* и *Prunus*.

4. Идентификация штаммов

В этом разделе описаны дополнительные методы (с использованием DASI-ELISA, RT-PCR, Co-RT-PCR и RT-PCR в реальном времени) идентификации штаммов PPV (см. Схему 1). При идентификации PPV установление штамма не является обязательным, однако НОКЗР могут изъявить желание провести идентификацию штамма, например, для прогноза его эпидемиологических свойств.

Учитывая вариабельность PPV, используемые методы, за исключением секвенирования или некоторых исследований на основе PCR (см. ниже), при небольшом количестве изолятов могут дать ошибочные результаты. Однако, как правило, описанные ниже серологический и молекулярный методы позволяют надежно дифференцировать штаммы PPV-D и PPV-M (Cambra *et al.*, 2006a; Candresse & Cambra, 2006; Capote *et al.*, 2006). Способы идентификации таких штаммов, как An и T не приводятся, поскольку соответствующие методики не прошли валидацию и не были опубликованы, или же было апробировано на недостаточном количестве изолятов.

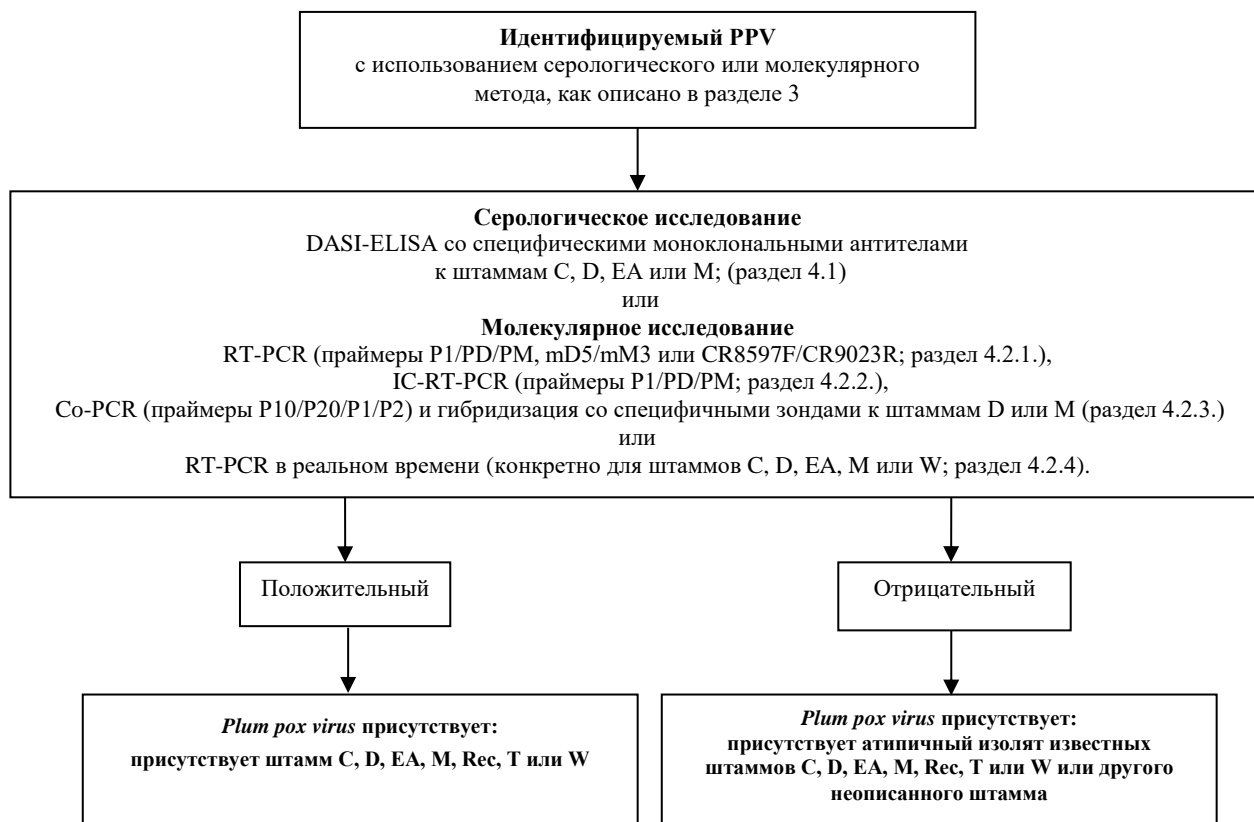


Рисунок 1. Методические этапы идентификации штаммов *Plum pox virus*.

Если НОКЗР требует дополнительного подтверждения идентификации штамма PPV могут проводиться и другие исследования. Также должно быть произведено полное секвенирование гена PPV или полное или частичное секвенирование белка оболочки, P3-6K1 и цитоплазматическое включение генов белка в случае присутствия атипичных или неописанных штаммов.

4.1 Серологическая идентификация штаммов

Для дифференциации двух основных штаммов PPV (М и D) исследование DASI-ELISA должно проводиться согласно Cambra *et al.* (1994) с использованием моноклональных антител, специфичных к штаммам D и М (Cambra *et al.*, 1994; Boscia *et al.*, 1997) в соответствии с инструкциями производителей.

Данный метод был валидирован в сличительном исследовании DIAGPRO, продемонстрировав точность 84% при обнаружении штамма PPV-D и 89% – штамма PPV-M (Olmos *et al.*, 2007; Cambra *et al.*, 2008). Моноклональные антитела 4D являются специфичными к штамму PPV-D, однако они не реагируют со всеми изолятами штамма PPV-D. Кроме того, моноклональные антитела AL, используемые для выявления PPV-M, реагируют с изолятами, относящихся к штаммам М, Res и Т, так как у этих штаммов аналогичная последовательность нуклеотидов в гене белка оболочки. Поэтому для дифференциации штаммов М, Res и Т, выявленных моноклональными антителами, специфичными к штамму PPV-M, необходимы молекулярные методы.

Серологическая идентификация изолятов PPV штаммов групп ЕА и С может осуществляться методом DASI-ELISA с использованием моноклональных антител специфичных к штаммам ЕА или С, описанных Myrta *et al.* (1998, 2000) Однако эти методики следует валидировать.

4.2 Идентификация штаммов с использованием молекулярных методов

4.2.1 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Штаммы PPV-D и PPV-M идентифицируются с использованием праймеров, описанных Olmos *et al.* (1997):

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')

Реакционная смесь (25 мкл) имеет следующий состав: 1 мкм праймера P1, 1 мкм праймеров PD или PM, 250 мкм dNTPs, 1 единица обратной транскрипции AMV (10 единиц/ мкл), 0,5 единицы ДНК Taq полимеразы (5 единиц/мкл), 2,5 мкл 10× буфера для Taq полимеразы, 1,5 мМоль MgCl₂, 0,3% Triton X-100, 2% формамида и 5 мкл матрицы РНК. RT-PCR проводится при следующих термоциклических параметрах: 45 минут при 42 °С, 2 минуты при 94 °С, 40 циклов по 30 секунд при 94 °С, 30 секунд при 60 °С, 60 секунд при 72 °С с последующим инкубированием в течение 10 минут при 72 °С. Результаты PCR анализируются с помощью гель-электрофореза. Пара праймеров P1/PD и пара праймеров P1/PM образуют ампликон 198 bp. Olmos *et al.* (1997) апробировали свою методику с использованием шести изолятов PPV-D и четырёх изолятов PPV-M.

RT-PCR в режиме реального времени с YBR Green I², введенная в практику Varga и James (2005) и подробно описанная в разделе 3.6.5., также пригодна для идентификации штаммов D и М PPV.

Штамм PPV-Res идентифицируется с использованием праймеров mD5 и mM3, специфичных к штамму PPV-Res и описанных Šubr *et al.* (2004):

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

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

Реакционная смесь (25 мкл) имеет следующий состав: (модифицированный вариант состава, описанного Šubr *et al.*, 2004): по 1 мкм каждого праймера, 250 мкм dNTPs, 1 единица обратной транскрипции AMV (10 единиц/мкл), 0,5 единицы ДНК Taq полимеразы (5 единиц/мкл), 2,5 мкл 10× буфера для Taq полимеразы, 2,5 мМ MgCl₂, 0,3% Triton X-100 и 5 мкл выделенной РНК (см. Раздел 3.6). Обратная транскрипция производится с применением случайных

гексануклеотидных праймеров при температуре 42 °C в течение 45 минут (Glasa *et al.*, 2002). PCR проводится с исходным денатурированием при 94 °C в течение 3 минут, после чего проводится 35 циклов при температуре 94 °C по 45 секунд, при 60 °C по 30 секунд и при 72 °C по 60 секунд, и заключительная элонгация при 72 °C в течение 7 минут (Šubr *et al.*, 2004). Продукт PCR величиной 605 bp анализируется с помощью гель-электрофореза.

Штамм PPV-CR идентифицируется с использованием праймеров CR8597F и CR9023R описанных Glasa *et al.* (2013):

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

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

Для выявления конкретно изолятов PPV-CR применяется протокол двухэтапной RT-PCR (Glasa *et al.*, 2013). Дополнительная (к)ДНК синтезируется из всех экстрактов РНК (NucleoSpin RNA Plant Kit, Macherey-Nagel)² с использованием случайных гексануклеотидных праймеров и обратной транскриптазы AMV. Затем в реакционную смесь PCR, содержащую EmeraldAmp GT PCR Master Mix (TaKaRa Bio Inc.)², добавляется аликвота кДНК. PCR проводится при следующих термоциклических параметрах: 60 секунд при 98 °C, 35 циклов при 98 °C по 30 секунд, при 55 °C по 30 секунд и при 72 °C по 30 секунд с заключительной элонгацией при 72 °C в течение 5 минут. Результаты PCR анализируются с помощью гель-электрофореза. CR-специфичные праймеры амплифицируют продукт размером 427 bp, а мишенью является конечный кодирующий участок CP 5'. Специфичность праймеров CR была валидирована с использованием изолятов штаммов PPV D, M, Rec, T, W, EA и C (Glasa *et al.*, 2013).

4.2.2 Иммуноспецифическая полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

Фаза иммунозахвата должна проходить, как описано в разделе 3.6.3. Реакционная смесь для PCR добавляется непосредственно в покрытые антителами пробирки PCR. Идентификация штаммов PPV-D и PPV-M проводится в соответствии с описанием в разделе 4.2.1.

4.2.3 Метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией с совместной амплификацией

Идентификация штаммов PPV-D или PPV-M производится в соответствии с описанием в разделе 3.3.4, с использованием зондов, меченых 3'DIG, специфичных для штаммов D и M (Olmos *et al.*, 2002):

Зонд, специфичный к штамму PPV-D: 5'-CTT CAA CGA CAC CCG TAC GGG CA-DIG-3'

Зонд, специфичный к штамму PPV-M: 5'-AAC GCC TGT GCG TGC ACG T-DIG-3'

Этапы прегибридизации и гибридизации выполняются при 50 °C со стандартными буферами для прегибридизации и гибридизации + 30% формамид (для обнаружения штамма PPV-D) и + 50% формамид (для идентификации штамма PPV-M). Используется 2% блокирующий раствор (масса/объем).

4.2.4 Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени

Штаммы PPV-D и PPV-M специфически идентифицируются с использованием красителя SYBR Green I согласно методике Varga & James (2005) (см. Раздел 3.6.5) или методике с красителем TaqMan, описанной Capote *et al.* (2006)

В методе Capote *et al.* (2006) используются следующие праймеры и зонды TaqMan:

PPV-MGB-F праймер (5'-CAG ACT ACA GCC TCG CCA GA-3')

PPV-MGB-R праймер (5'-CTC AAT GCT GCT GCC TTC AT-3')

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

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

Реакционная смесь (25 мкл) имеет следующий состав: 1 мкМоль каждого праймера, 150 наноМоль FAM зонда MGB-D или MGB-M, 1× TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems)², 1× MultiScribe и RNase Inhibitor Mix (Applied Biosystems)² и 5 мкл матрицы РНК (см. раздел 3.6). RT-PCR проводится при следующих термоциклических параметрах: 30 минут при 48 °C, 10 минут при 95 °C и 40 циклов по 15 секунд при 95 °C и 60 секунд при 60 °C. Результаты PCR анализируются в режиме реального времени в соответствии с инструкциями производителей. В работе Capote *et al.* описана методика с использованием по 12 изолятов PPV-D и PPV-M, а также 14 проб, зараженных обоими штаммами.

Штаммы PPV-C, PPV-EA и PPV-W специфически идентифицируются с использованием красителя SYBR Green I² согласно методу Varga & James (2006): Для этой методики применяются следующие праймеры:

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')

Для валидации результатов исследований рекомендуется использовать следующие праймеры внутреннего контроля (Menzel *et al.*, 2002):

Nad5-F (5'-GAT GCT TCT TGG GGC TTC TTG TT-3')

Nad5-R (5'-CTC CAG TCA CCA ACA TTG GCA TAA-3')

Реакционная смесь (25 мкл) имеет следующий состав: 2,5 мкл 1:10 (объем/объем) разведенной в воде выделенной РНК (см. раздел 3.6) и 22,5 мкл мастер-микса. Мастер-микс имеет следующий состав: 2,5 мкл буфера Karsai buffer (Karsai *et al.*, 2002); по 0,5 мкл праймеров 5 мкМоль PPV-U, PPV-RR, Nad5R и Nad5F; 0,5 мкл 10 мМоль dNTPs; 1 мкл 50 мМоль MgCl₂; 0,2 мкл RNaseOUT (40 ед./мкл; Invitrogen)²; 0,1 мкл обратной транскриптазы Superscript III (200 ед./мкл; Invitrogen)²; 0,1 мкл высокоточной полимеразы Platinum Taq DNA (5 ед./мкл, Invitrogen)²; и 1 мкл 1:5 000 (в три-этилендиаминтетрауксусной кислоте (TE), pH 7,5) SYBR Green I² в 16,1 мкл воды. Реакцию проводят при следующих термоциклических условиях: 10 минут при 50 °C, 2 минуты при 95 °C и 29 циклов по 15 секунд при 95 °C и 60 секунд при 60 °C. Анализ кривой плавления производится путём выдерживания при температуре от 60 °C до 95 °C с шагом 0,1 °C/s с усреднённым показателем сглаживания кривой равным 1 единице. По условиям, установленным Varga и James (2006a), продукты имеют следующую температуру плавления:

штамм С (фрагмент 74 bp): 79,84 °C

штамм EA (фрагмент 74 bp): 81,27 °C

штамм W (фрагмент 74 bp): 80,68 °C

Данный метод был апробирован Varga и James (2006a) с использованием изолятов штаммов PPV-C, PPV-D, PPV-EA и PPV-W.

5. Контроль молекулярных исследований

Для того, чтобы результат исследования считался достоверным, для каждой серии выделения нуклеиновой кислоты и амплификации целевого вредного организма или целевой нуклеиновой кислоты предусматриваются меры контроля, которые зависят от типа исследования и от требуемого уровня определенности. Для RT-PCR минимальными являются позитивный результат контроля нуклеиновой кислоты и отрицательный результат по амплификации (без контроля матрицы).

Положительный результат контроля нуклеиновой кислоты. Эта мера контроля применяется для мониторинга эффективности данного метода исследования (помимо выделения), а в RT-PCR

и амплификации. Может использоваться общее число РНК растения или вируса, или же инфицированный PPV растительный материал, отпечатавшийся на мембране. Находящиеся на хранении препараты РНК или PPV следует периодически проверять на предмет сохранения качества контроля при продолжительном хранении.

Внутренний контроль. При проведении RT-PCR в протокол реакции для внутреннего контроля может вводиться мРНК митохондриального гена, – субъединица 5 дегидрогеназы *NADH* (*nad5*, Menzel *et al.*, 2002), – с тем чтобы исключить ложноотрицательные результаты, обусловленные невыделением или деградацией нуклеиновой кислоты, или же присутствием ингибиторов RT-PCR.

Отрицательный контроль амплификации (без контроля матрицы). Этот контроль необходим при проведении обычной RT-PCR или RT-PCR в реальном времени, чтобы исключить ложноположительные результаты, обусловленные засорением (ДНК-мишенью) при подготовке реакционной смеси. На стадии амплификации добавляется вода для PCR, не содержащая рибонуклеазу.

Положительный контроль выделения. Этот контроль призван обеспечить, чтобы количество и качество выделяемой нуклеиновой кислоты-мишени были достаточными для проведения RT-PCR и установления вируса-мишени. Нуклеиновая кислота, выделяемая из ткани хозяина, инфицированного PPV, или из ткани здорового растения, или из насекомого, зараженного PPV.

При проведении RT-PCR необходимо следить за тем, чтобы не допустить перекрестного аэрозольного засорения взвешенными в воздухе частицами материала, давшего положительный результат, или положительных проб.

Отрицательный контроль выделения. Этот контроль применяется и для мониторинга засорения в процессе выделения нуклеиновой кислоты, и для мониторинга перекрестной реакции с тканью хозяина. Контроль проводится с нуклеиновой кислотой, выделенной из ткани неинфицированного хозяина и затем амплифицированной. В тех случаях, когда ожидается большое количество положительных проб, рекомендуется в случайном порядке применять различные виды контроля.

При проведении IC-RT-PCR без выделения нуклеиновой кислоты, в качестве положительного контроля следует использовать сок зараженного PPV растения, а сок здорового растения следует использовать для отрицательного контроля. Можно также включить отрицательный контроль амплификации. Этот вид контроля используется для того, чтобы исключить ложноположительные результаты, обусловленные засорением при подготовке реакционной смеси. На стадии амплификации в качестве отрицательного контроля амплификации добавляется вода для PCR, не содержащая рибонуклеазу.

6. Данные

Данные и результаты исследований должны храниться, как описано в разделе 2.5 МСФМ 27 (*Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов*).

В тех случаях, когда результаты диагностики могут отразиться на других договаривающихся сторонах, в особенности в случаях несоответствия (МСФМ 13 (*Руководство по нотификации о несоответствии и экстренном действии*)), а также если вредный организм обнаружен на территории впервые, следующие данные и свидетельства и дополнительные материалы должны храниться в течение по меньшей мере одного года способом, обеспечивающим отслеживаемость:

- исходный образец (маркированный надлежащим образом) необходимо хранить в замороженном виде по возможности при температуре -80°C или в лиофилизированном состоянии при комнатной температуре;

- в соответствующих случаях образцы РНК следует хранить при температуре -80°C , а отпечатки растительных экстрактов или срезов тканей (на бумаге или нейлоновых мембранах) – при комнатной температуре;
- в соответствующих случаях продукты амплификации RT-PCR следует хранить при температуре -20°C .

7. Контактные лица для получения дальнейшей информации

Ниже приводится контактная информация для получения дополнительной информации:

United States Department of Agriculture (USDA), Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS), Plant Protection and Quarantine (PPQ), Science and Technology Beltsville Laboratory, Building 580 BARC-East, Powder Mill Road, Beltsville, MD 20705, United States of America (Vessela Mavrodieva; email: vessela.a.mavrodieva@aphis.usda.gov; tel.: +1 3013139208; fax: +1 3023139232).

Equipe de Virologie Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Centre de Bordeaux, UMR GD2P, IBVM, BP 81, F-33883 Villenave d'Ornon Cedex, France (Thierry Candresse; email: tc@bordeaux.inra.fr; tel.: +33 557122389; fax: +33 557122384).

Faculty of Horticultural Science, Department of Plant Pathology, Corvinus University, Villányi út 29-43, H-1118 Budapest, Hungary (Laszlo Palkovics, email: laszlo.palkovics@uni-corvinus.hu; tel.: +36 14825438; fax: +36 14825023).

Institute of Virology, Slovak Academy of Sciences, Dúbravská, 84505 Bratislava, Slovakia (Miroslav Glasa; email: virumig@savba.sk; tel.: +421 259302447; fax: +421 254774284).

Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias (IVIA), Plant Protection and Biotechnology Centre, Carretera Moncada-Náquera km 5, 46113 Moncada (Valencia), Spain (Antonio Olmos; email: aolmos@ivia.es; tel.: +34 963424000; fax: +34 963424001).

Istituto di Virologia Vegetale del CNR, sezione di Bari, via Amendola 165/A, I-70126 Bari, Italy (Donato Boscia; email: d.boscia@ba.ivv.cnr.it; tel.: +39 0805443067; fax: +39 0805442911).

Sidney Laboratory, Canadian Food Inspection Agency (CFIA), British Columbia, V8L 1H3 Sidney, Canada (Delano James; email: Delano.James@inspection.gc.ca; tel.: +1 250 3636650; fax: +1 250 3636661).

Заявка на пересмотр диагностического протокола может быть представлена национальной организацией по карантину и защите растений (НОКЗР), региональной организацией по карантину и защите растений (РОКЗР) или вспомогательными органами Комиссии по фитосанитарным мерам через Секретариат МККЗР (ippc@fao.org), который передает ее Технической группе экспертов по разработке диагностических протоколов (ТГДП).

8. Выражение признательности

В разработке настоящего диагностического протокола принимали участие: М. Cambra, А. Olmos и N. Capote (IVIA, Испания (см. предыдущий раздел)), N.L. Africander (Кафедра сельского, лесного и рыбного хозяйства, Университет Стелленбош, ЮАР), L. Levy (Министерство сельского хозяйства, США (см. предыдущий раздел)), S.L. Lenardon (Институт фитопатологии и физиологии растений – Национальный институт сельскохозяйственных технологий (IFFIVE-INTA), Кордоба, Аргентина), G. Clover (Лаборатория здоровья растений и экологии, Министерство базовых отраслей экономики, Окленд, Новая Зеландия) и D. Wright (Группа по вопросам здоровья растений, Центральная научная лаборатория, Сэнд Хаттон, Йорк, Соединенное Королевство).

9. Справочные материалы

В настоящем приложении могут встречаться ссылки на МСФМ. МСФМ размещены на Международном фитосанитарном портале (МФП) по адресу: <https://www.ippc.int/core-activities/standards-setting/ispms>.

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., Zeramdini, 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. Размещено по адресу <http://www.cabi.org/cpc/> (по состоянию на 14 февраля 2018 года).

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.

ЕОКЗР (Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений). 2004. Диагностические протоколы для регулируемых вредных организмов *Plum pox virus*. PM 7/32(1). *EPPO Bulletin*, 34: 247–256.

- ЕОКЗР** (Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений). 2006. Current status of *Plum pox virus* and sharka disease worldwide. *EPPO Bulletin*, 36: 205–218.
- ЕОКЗР** (Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений). 2018a. База данных ЕОКЗР по экспертной диагностике. Перечень данных о валидации. Размещено по адресу: <http://dc.eppo.int/validationlist.php> (по состоянию на 19 марта 2018 года).
- ЕОКЗР** (Европейская и средиземноморская организация по карантину и защите растений). 2018b. Глобальная база данных ЕОКЗР. *Plum pox virus* (PPV000). Размещено по адресу: <https://gd.eppo.int/taxon/PPV000> (по состоянию на 14 февраля 2018 года).
- 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.
- Candresse, T. & 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. 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. Размещено по адресу <http://pbt.padil.gov.au/index.php?q=node/20&pbtID=136> (по состоянию на 27 февраля 2018 года).
- 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., Svanelle-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.

История публикации

История публикации не является официальным разделом стандарта.

Настоящая история публикации относится только к версии на русском языке
Полную историю публикации см. в английской версии стандарта.

2018-08 КС утвердил ДП от имени КФМ.

МСФМ 27. Приложение 2. *Plum pox virus* (2018). Рим, МККЗР, ФАО.

2020-01 ГЛА для Русского языка и Служба письменного перевода ФАО
пересмотрели данный приложение и Секретариат МККЗР внес
соответствующие изменения.

2021-03 СРМ-15 Принято к сведению, что группа по проверке русских
переводов пересмотрела это приложение.

История публикации последний раз обновлена: 2021-04

МККЗР

Международная конвенция по карантину и защите растений (МККЗР) – это международное соглашение по здоровью растений, направленное на защиту глобальных растительных ресурсов и содействие безопасной торговле. Стратегическая концепция МККЗР заключается в том, что все страны располагают потенциалом применять гармонизированные меры по предотвращению интродукции и распространения вредных организмов, а также сводить к минимуму воздействие вредных организмов на продовольственную безопасность, торговлю, экономический рост и окружающую среду.

Организация

- ◆ Более 180 договаривающихся сторон МККЗР.
- ◆ Каждая договаривающаяся сторона имеет свою национальную организацию по карантину и защите растений (НОКЗР) и официальное контактное лицо по линии МККЗР.
- ◆ 10 Региональных организаций по карантину и защите растений (РОКЗР) было создано для координации деятельности НОКЗР в различных регионах мира.
- ◆ Секретариат МККЗР взаимодействует с соответствующими международными организациями в целях содействия наращиванию регионального и национального потенциала.
- ◆ Секретариат обеспечивается Продовольственной и сельскохозяйственной организацией Объединенных Наций (ФАО).

Секретариат Международной конвенции по карантину и защите растений
ippc@fao.org | www.ippc.int

**Продовольственной и сельскохозяйственной организацией
Объединенных Наций**
Рим, Италия