

葡萄病毒分子检测技术研究进展

范旭东, 董雅凤*, 张尊平, 任芳, 胡国君, 朱红娟

(中国农业科学院果树研究所国家落叶果树脱毒中心, 辽宁兴城 125100)

摘要: 简述了葡萄病毒 RT-PCR、分子杂交、基因芯片、RT-LAMP 以及高通量测序等分子检测技术的原理和特点, 综述了近年来葡萄病毒分子检测所取得的进展, 展望了今后研究的主要方向。

关键词: 葡萄; 病毒; 分子检测; 研究进展

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 05-1009-11

Progress on Molecular Detection of Grapevine Viruses

FAN Xu-dong, DONG Ya-feng*, ZHANG Zun-ping, REN Fang, HU Guo-jun, and ZHU Hong-juan

(National Center for Eliminating Viruses from Deciduous Fruit Tree, Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng, Liaoning 125100, China)

Abstract: In this paper, the molecular detection technologies used for grapevine viruses in recent years are outlined, which include RT-PCR, molecular hybridization, gene microarray, RT-LAMP and high-through sequence, and the achievements of those technologies in the detection of grapevine virus are summarized. Furthermore, the further research directions of molecular detection of grapevine viruses are also discussed.

Key words: grapevine; virus; molecular detection; research advance

葡萄病毒病是影响葡萄正常生长发育, 导致产量下降和品质降低的重要因素之一。目前已发现能够侵染葡萄的病毒多达 63 种 (Martelli, 2012), 中国已报道了 11 种 (范旭东 等, 2012), 包括 6 种葡萄卷叶伴随病毒 *Grapevine leafroll-associated virus 1~5, 7* (GLRaV-1~5, 7), 3 种皱木复合相关病毒 *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV)、*Grapevine virus A* (GVA)、*Grapevine virus B*, (GVB), 1 种线虫传多面体病毒 *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) 和葡萄斑点病毒 *Grapevine fleck virus* (GFkV)。

葡萄病毒的检测工作不仅是无病毒苗木认证中的一项基础工作, 也是防控葡萄病毒病的根本保障。传统的生物学鉴定方法需要将待检样品嫁接到指示植物上, 根据指示植物的症状表现来鉴定病毒, 该方法耗时过长, 一般需要几个月到几年的时间 (张尊平 等, 2010), 不能及时取得检测结果, 而且仅根据症状表现难以区分具体的病毒种类 (如葡萄卷叶病毒等)。酶联免疫吸附法利用病毒抗体与抗原特异性结合, 通过化学显色来判断样品是否携带病毒, 该方法需制备或购买病毒特异性抗体, 可用于检测大量样品, 但其灵敏度低于分子检测方法 (Ling et al., 2001)。近些年, 葡萄病毒

收稿日期: 2013-11-20; 修回日期: 2014-04-10

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-30-bc-3)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yfdong@163.com)

的分子检测技术发展迅速,逐渐成为主流的检测方法。其中 PCR 法简便,快速,灵敏,是最常用的方法,目前病毒的序列确定一般需要通过 PCR 扩增和测序来完成。为了进一步提高 PCR 的检测效率和检测灵敏度,许多研究者建立了多重 PCR 和荧光定量 PCR 等方法。分子杂交在葡萄病毒检测方面的应用不如 RT-PCR 法广泛,有少数葡萄病毒建立了分子杂交的方法,为分子杂交技术的进一步应用打下基础。新的方法,包括基因芯片方法 (Boonham et al., 2003) 和反转录环介导恒温扩增 (Notomi et al., 2000), 近几年也逐渐用于葡萄病毒的检测中。另外,高通量测序在病害诊断方面的重要性日益凸显,不仅仅针对某种病原的检测,而是通过序列分析来发现所有潜在病原,在葡萄病毒鉴定和发现新病毒方面已经得到一些应用 (Giampetruzzi et al., 2012)。本文中就近年来葡萄病毒分子检测技术方法的研究进展进行了综述,并展望了未来的发展方向。

1 PCR 检测

1.1 反转录 PCR (RT-PCR)

反转录聚合酶链式反应 (Reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 是一项常规的检测技术,发明至今已有 30 多年。该方法以 RNA 为模板,在反转录酶的作用下合成 cDNA,再将 cDNA 与特异引物、dNTPs、DNA 聚合酶等试剂混合,经过若干个加热变性、退火及延伸循环,最后完成 PCR 反应。由于 RT-PCR 法具有快速、灵敏的特点,已成为目前应用最广泛的分子检测手段。然而,常规的 RT-PCR 检测效率及检测灵敏度还有进一步提高的空间,而且 PCR 产物需要开盖进行电泳分析,在一定程度上增加了污染的可能性。

目前,葡萄病毒最常用的分子检测方法仍是 RT-PCR 法。中国已报道的 11 种葡萄病毒都利用了该法进行了检测 (刘永清, 2003; 牛建新 等, 2003; 董雅凤 等, 2007; 杨发恒, 2007; 王建辉 等, 2008; 杨相昆 等, 2010; 裴光前 等, 2011), 这些病毒均是通过 RT-PCR 法首次在国内发现并通过 PCR 产物克隆测序确定的。RNA 提取和引物的选择是决定葡萄病毒 RT-PCR 检测效果的两个重要因素。由于葡萄组织富含多糖、多酚,不易提取到浓度和纯度较高的核酸,为此一些研究者建立了针对葡萄组织特点的核酸提取方法,如改良 CTAB 法 (Gambino et al., 2008)、二氧化硅吸附法 (Foissac et al., 2001), 商品化的 Qiagen RNeasy method 吸附柱法 (MacKenzie et al., 1997) 等,这些方法的建立为 RT-PCR 等分子检测技术奠定了基础。另外,一些研究者采用探针或者杂交膜吸附 RNA 的方式来代替 RNA 提取。例如, Fattouch 等 (2001) 利用固定在膜上的特异性探针来捕获葡萄扇叶病毒 RNA, 然后进行 RT-PCR, 其检测灵敏度是免疫捕获 RT-PCR 的 10 倍; Osman 和 Rowhani (2006) 直接将葡萄粗提汁液点在尼龙膜和 FAT 膜上,简单处理之后进行 RT-PCR, 可对一些葡萄病毒进行有效地检测,并且印在膜上的核酸可在室温或者 4 °C 保存较长时间,不用担心样品采集地到实验室的运输问题。一些葡萄病毒基因序列变异较大,仅采用 1 对引物有时不能检测到病毒的所有变种,为此,研究者需要设计多条引物或简并引物来解决这一问题。例如, Nolasco 等 (2000) 设计了用于检测 GRSPaV 的 5 套引物,从中筛选出较好的引物,并指出所设计的引物中没有 1 对能够用于检测到 GRSPaV 所有变种。Terlizzi 等 (2011) 设计的一套 GRSPaV 简并引物与 Nolasco 设计的 1 对引物相比,具有更好的检测效果,能够检测到沙地葡萄茎痘病毒的新变种。最近,为了减少由于序列变异而导致假阴性结果, Chooi 等 (2013) 设计了 GLRaV-3 不同变种的特异性引物,对这些引物进行组合建立了多重 PCR 检测体系,可同时检测 GLRaV-3 的几个变种。另外,一些研究者根据同一病毒属的基因保守区域设计简并引物,可用于检测同一类的葡萄病毒 (Saldarelli et al., 1998; Digiaro et al., 2007)。Dovas 和 Katis (2003) 针对葡萄病毒属、凹陷病毒属、长线性病毒属的基因特点分

别设计了简并引物，这些简并引物含有与其他 4 种核苷配对的脱氧次黄苷 (dI)，该法可同时检测到同一属的葡萄病毒基因。Maliogka 等 (2008) 基于 HSP70h 设计了葡萄卷叶病毒属的简并引物，该方法先利用简并引物进行扩增，再采用特异引物进行巢式扩增，可检测该属所有的葡萄病毒。

由于大部分葡萄病毒基因组存在较大的变异，为了防止漏检，针对某些病毒基因组的特点，设计能够检测所有变种的特异引物、通用引物或者简并引物往往都是必要的。

1.2 多重 RT-PCR

多重 RT-PCR 是在单一 RT-PCR 基础上，将扩增多个基因的引物加入到同一反应体系中，同时进行多个目的基因扩增的一种检测手段。此方法的建立，不仅需要反应体系（包括试剂、PCR 程序）进行优化，且更需要对引物组合进行优化 (Henegariu et al., 1997)。多重 RT-PCR 引物的设计需要借助电脑软件分析引物本身理论上的特异性以及可能的交叉反应，并且需要在实际的扩增反应中加以验证。与单一 RT-PCR 相比，多重 RT-PCR 大大提高了工作效率，且节约了用工和材料成本，但是多条引物之间竞争反应和交叉反应会导致扩增失败或者产生非特异条带，这是限制该法发展的重要原因。目前，在植物病毒检测的运用上，一些研究者已建立了多重检测方法 (Dai et al., 2012; Yu et al., 2013)，但是这些方法绝大部分只能检测 5 种或 5 种以下的病毒，能扩增 5 种病毒以上的多重 RT-PCR 方法仍然很少见。

葡萄病毒种类多，复合侵染普遍，多重 RT-PCR 是一个重要的检测方法。已有许多研究者利用多重 RT-PCR 同时检测 2 种、3 种或者 4 种葡萄病毒 (Minafra & Hadidi, 1994; La Notte et al., 1997; Nassuth et al., 2000; 牛建新 等, 2004; 裴光前 等, 2010; 王建辉 等, 2011; 范旭东 等, 2012)。能够同时检测更多的葡萄病毒一直是多重 RT-PCR 追求的目标之一，目前已有能够同时检测 8 种和 9 种葡萄病毒的多重 RT-PCR 的报道。Faggioli 和 La Starza (2006) 研究建立了一管式同时检测 GLRaV-1、GLRaV-2、GLRaV-3、GFLV、ArMV、GFkV、GVA 和 GVB 等 8 种葡萄病毒的多重 RT-PCR 方法，且与 ELASA 方法相比有更高的灵敏度，被运用于大规模田间样品检测和苗木筛选检测。Gambino 和 Gnbaudo (2006) 首先对商业化的柱式提取 RNA 的方法进行了改进，增加了苯酚—氯仿—异戊醇抽提步骤，建立了能同时检测 ArMV、GFLV、GVA、GVB、GRSPaV、GFkV、GLRaV-1 ~ 3 等 9 种葡萄病毒和内参基因 18S rRNA 的多重 RT-PCR 方法，主要对 PCR 试剂浓度、引物、PCR 程序进行了优化，虽然与单一 PCR 相比灵敏度稍低，但大大提高了检测效率。采用多重 RT-PCR 和单一 RT-PCR 对大量田间样品的检测结果表明该法与单一 RT-PCR 结果一致，有较高的可靠性。

目前，NEB、QIAGEN、TaKaRa 等许多公司均有多重 PCR 试剂盒，只需对引物进行优化即可建立多重 RT-PCR 方法，但其在葡萄病毒检测中的应用还需要进一步研究开发，除了保证试剂和引物适合于多重反应体系外，RNA 质量也不容忽视。

1.3 荧光定量 PCR

近年来实时定量 PCR 作为一种快速、敏感、简便的检测技术已广泛应用于生物学研究领域。最为常见的两种方法为 TaqMan 探针法和 SYBR Green I 染料法，另有分子信标 (molecular beacon) 探针 (Tyagi & Krame, 1996) 和蝎型 (Scorpion) 探针 (Thelwell et al., 2000)。基于 TaqMan 探针的实时荧光 RT-PCR 是将 PCR 技术与荧光检测相结合的方法，其原理是使用能够特异结合 PCR 产物并标记了荧光物质的探针，利用 Taq DNA 聚合酶 5' 外切核酸酶活性在反应过程中将其降解，荧光基团与淬灭基团远离发出荧光，从而实现对整个过程的监测 (Heid et al., 1996)。使用探针法具有特异性高，定量精准的特点，但其缺点是探针需要针对不同的模板特别设计和定制。SYBR Green I 是一种只与双链 DNA 小沟结合的染料。当它与 DNA 双链结合时发出绿色荧光，当 DNA 解链成为单

链时荧光信号也随之减弱。SYBR Green I 的优点是不需要设计特异性探针, 具有简单、便宜、通用性好的特点, 缺点主要是由引物二聚体、单链二级结构以及错误的扩增产物引起的假阳性会影响定量的精确性。总之, 荧光定量 PCR 具有灵敏度高、可定量、能够实时监控、防污染等优点, 克服了 RT-PCR 法存在的一些问题。但同时荧光定量 PCR 需要昂贵的仪器和耗材。而且荧光定量 PCR 在进行较多个基因同时检测时有一定的难度, 因为需要采用不同的荧光染料标记不同的探针, 染料之间会发生相互干扰。

对于葡萄病毒的检测, 只有少数研究者采用了染料法。例如, Beuve 等 (2007) 设计了扩增 GLRaV-2 的通用引物, 并利用此引物建立了一步法 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 法, 灵敏度是普通一步 RT-PCR 法的 125 倍。Stewart 等 (2007) 也设计了番茄环斑病毒 (*Tomato ringspot virus*, ToRSV) 的新引物并建立了一步法 SYBR Green I 实时定量 RT-PCR 法。而更多的研究者采用了 TaqMan 探针法, 例如, Osman 等 (2007) 建立分别检测 GLRaV-1 ~ 5 和 9 的一步法 TaqMan 实时荧光 RT-PCR 法, 结果表明纯化的 RNA 和粗提液均能运用于实时 RT-PCR 检测, 其检测灵敏度高于普通的一步 RT-PCR。Osman 和 Rowhani (2008) 又用同样的方法建立了分别检测 GRSPaV、GVA、GVB 和 GVD 的 TaqMan 实时荧光 RT-PCR。卓娜等 (2011) 将纳米磁珠法提取 RNA 技术与实时荧光 TaqMan 探针法相结合, 建立了快速、准确、灵敏的检测 GFkV 的方法。Al Rwahnih 等 (2012) 建立了葡萄卷叶病毒 7 的 TaqMan 法的实时荧光 RT-PCR 检测方法, 基于 HSP70 基因设计的引物和探针比基于 CP 基因的检测灵敏度更高。最近已有利用实时荧光 PCR 法进行多重葡萄病毒检测的报道, López-Fabuel 等 (2013) 建立了一种可以同时检测 5 种葡萄病毒 (GFLV、ArMV、GLRaV-1、GLRaV-3 和 GFkV) 的多重实时荧光定量 PCR 方法, 该方法对每个特异性探针的 5'端采用不同染料标记, 可以在荧光定量 PCR 仪获得不同的检测信号, 使同时检测多种病毒基因成为可能, 而且具有较高的灵敏度。

目前, 荧光定量 PCR 方法更多地用来进行单一病毒基因的检测。虽然已建立了同时检测 5 种葡萄病毒的实时荧光 PCR 的方法, 但体系的优化和探针染料的设计仍是难点, 而且价格比较贵。

2 分子杂交技术

分子杂交技术是将核酸固定于固相支持物 (一般为尼龙膜) 上, 通过与标记的特异性探针杂交, 洗去未结合的探针, 通过结合探针上标记物的显色反应来判断检测结果。探针分为 RNA 探针和 DNA 探针。非同位素标记方法代替同位素标记方法, 使得分子杂交技术有利于常规的病毒检测。非同位素标记方法主要有生物素标记和地高辛标记。目前这两种方法在植物病毒检测中都比较常用。由于大部分植物病毒的核酸组成为 RNA, 而且 RNA 和 RNA 的结合比较稳定, 增加了杂交的特异性和灵敏度, 因此在植物病毒检测上采用 RNA 探针比 DNA 探针效果更好 (Zhang et al., 2011b)。RNA 探针的缺点是探针容易降解, 对实验操作的要求较高。探针制备以及杂交过程操作较为复杂可能是制约分子杂交技术在病毒检测中运用的主要原因。

葡萄病毒检测上, 早期一些研究者采用放射性的同位素制备的 cDNA 探针检测葡萄扇叶病毒 (Fuchs et al., 1991) 和葡萄卷叶病毒 - 3 (Saldarelli et al., 1994b; Habili et al., 1995)。后来, Saldarelli 等 (1994a) 采用地高辛标记探针检测 GLRaV、GVA 和 GVB, 与以前的放射性同位素标记的方法相比, 检测效率一致, 且避免了放射性的危害, 但不能对葡萄的粗提汁液进行直接检测。Sabanadzovic 等 (1996) 建立了葡萄斑点病毒的 RNA 地高辛标记探针检测方法, 尝试了用葡萄组织粗提液或组织直接印迹到杂交膜上进行杂交, 获得了成功。Kominck 和 Bryxiova (2005) 利用建立的地高辛标记 RNA 探针法检测了样品中的葡萄卷叶病毒 - 1, 与酶联免疫吸附法和 RT-PCR 法相比, 具有更高

的检出率。Kominek 等（2008）建立了葡萄病毒 A 的 RNA 探针杂交检测的方法，该方法同样是用地高辛标记，对来源于样品的 RNA，粗提液及组织印迹都能进行有效检测。

分子杂交技术在葡萄病毒检测上应用较少，但也取得一定的进展，例如上述一些葡萄病毒 RNA 探针的制备，以及对粗提液直接印迹的检测方法的建立。另外，一些研究者利用分子杂交技术检测离体梨植株的病毒分布（Wang et al., 2010），还有人利用通用的多聚探针来检测葡萄上的 4 种类病毒（Zhang et al., 2011b），为分子杂交技术在葡萄病毒检测中的应用展示了更广泛的研究空间。

3 基因芯片

基因芯片（又称 DNA 微阵列）的原型是 20 世纪 80 年代中期提出的，自它被运用于基因表达研究以来（Schena et al., 1995），也逐渐用于病原的检测。基因芯片由包含多个探针的固体支持物构成，这些固相支持物主要有杂交膜、玻片等。探针与标记的 DNA 或者 RNA 样品进行杂交，通过检测杂交信号的强度及分布进行分析。探针的质量决定了检测效果，探针有寡核苷酸探针（20~70 nt）和 cDNA 探针（100~500 nt）两种，cDNA 探针优点是合成简单便宜，灵敏度高，但是需要纯化，且容易产生非特异反应；而寡聚核苷酸探针使微阵列检测具有更大的灵活性和特异性。目前这两种探针均已用于植物病毒（Boonham et al., 2003）和类病毒（Zhang et al., 2013）的检测上。基因芯片能够同时对多种病毒及其变种进行检测，具有强大的检测能力，但是目前芯片制作较为复杂，一般不能重复使用，且价格相对较贵，其作为常规检测的应用并不常见。

葡萄病毒的种类很多，且存在较多的变种，这可能是研究者考虑采用基因芯片进行葡萄病毒检测的一个重要的原因。Osman 等（2008）基于 TaqMan 荧光定量技术建立了一种低密度阵列，可以特异检测 13 种葡萄病毒和葡萄内参基因，具体方法是先将扩增病毒和内参基因的引物与 TaqMan 探针混合点于 384 孔板的塑料表面并干化制成阵列，然后再对其进行荧光 PCR 扩增分析。该法在保留了实时荧光定量 PCR 的灵敏度的同时，还具有一次快速检测多种病毒的特点。Abdullahi 和 Rott（2009）建立了一种用于检测 6 种葡萄和其他果树病毒的抗体微阵列，该方法将抗体固定在膜上或玻璃基片形成微阵列，然后将微阵列与包含抗原的样品进行结合，通过荧光信号扫描或者显色基质的颜色观察判断结果，与常规的 ELISA 方法相比具有相似的灵敏性和特异性，在同时检测多种病毒时有明显优势。Engel 等（2010）根据 44 种葡萄病毒基因组高度保守序列，以及同属病毒的特异区域设计了 570 个探针，制成 DNA 微阵列。对葡萄样品中双链 RNA 进行随机引物 RT-PCR 和荧光染料标记后，与该微阵列杂交，根据扫描信号判断该样品的带毒情况。利用该方法和常规 RT-PCR 法同时对 10 种葡萄病毒进行检测，其检测结果一致，并且利用该微阵列首次在智利检测到葡萄卷叶病毒 -4、-7、-9。Abdullahi 等（2011）建立了无需 PCR 扩增而直接将 cDNA 标记便可与微阵列进行杂交检测的方法，利用 Cy3 染料来标记胺修饰后的 cDNA 的方法可以很好地用来检测线虫传多面体病毒属的一些葡萄病毒，但对其他病毒的检测需要用更灵敏的“3DNA”的标记方法。最近，Thompson 等（2012）报道了检测葡萄卷叶病毒微阵列方法，该方法先对总 RNA 进行随机引物 RT-PCR 扩增，然后进行染料标记、杂交。

DNA 微阵列在同时检测大量病毒基因方面具有很大的应用潜力，但目前存在操作繁琐、费用过高、芯片不能重复利用、污染等问题。这些问题的进一步解决，DNA 微阵列将发挥它的巨大作用。

4 逆转录环介导恒温扩增技术

逆转录环介导恒温扩增技术 (RT-Loop-Mediated Isothermal Amplification, RT-LAMP) 是 Notomi 等 (2000) 创立的一种新颖恒温核酸扩增方法, 该方法利用特异识别靶序列上 6 个区域的 4 条引物及具有链置换活性的 *Bst* DNA 聚合酶, 在 60 ~ 65 °C 进行核酸的指数级扩增, 其扩增效率可达到 $10^9 \sim 10^{10}$ 个拷贝数量级, 整个反应仅需 1 h (Notomi et al., 2000)。由于扩增产生的 DNA 量大且易挥发, 在检测时能够造成污染, 因此可使用专用于 LAMP 的实时浊度仪或者试验过程进行严格分区来避免。检测结果可以通过肉眼观察, 琼脂糖电泳分析, 也可直接加入 SYBR Green I 染料观察。为避免污染, 研究者开发了不开盖的染料显色方法, 如把 SYBR Green I 加入 80[#]微晶石蜡内, 反应后溶解石蜡释放染料的方法 (Tao et al., 2011), 或者把 SYBR Green I 反应前点于盖内, 反应后离心使之与反应后试剂接触显色的方法 (Peng et al., 2012)。另外, 一些研究者建立了反应前加入染料的方法, 即反应前加入钙黄绿素 (Tomita et al., 2008), 或者羟基萘酚蓝 (HNB) 染料 (Goto et al., 2009)。这些方法的建立使得 RT-LAMP 技术进一步得到了应用。许多植物病毒研究者已有研究表明 RT-LAMP 法具有高特异性、高灵敏度、操作简单等特点, 与 RT-PCR 等其他检测方法相比, 具有一定的优越性 (Liu et al., 2010; Zhao et al., 2010)。但该方法目前仅限于单一病毒或单一病毒变种的检测, 虽已建立多种防止污染的方法, 但对扩增产物的处理仍需小心, 因为一旦造成污染, 其检测结果将不可靠。

关于葡萄病毒 RT-LAMP 检测技术的研究报道较少。Pietersen 和 Walsh 等 (2012) 建立了葡萄卷叶相关病毒 3 的 RT-LAMP 方法, 该法以总 RNA 为模板, 将反应试剂在 42 °C 孵育 10 min, 然后在 60 °C 恒温孵育 1 h, 肉眼直接观察浊度判断反应结果, 或者反应前加入 HNB 染料观察颜色变化来直接判断结果。检测结果与巢式 PCR 结果相同, 且具有简单、快速的特点, 因此可以替代酶联检测方法作为大量淘汰带毒植株的一种可行的方法。国内已建立了一种能够检测沙地葡萄茎痘相关病毒的 RT-LAMP 方法, 该法将提取的 RNA 加入到 LAMP 反应体系中, 水浴 1 h, 加入 SYBR GREEN I 染料, 便可根据颜色反应, 观察样品中是否带有沙地葡萄茎痘病毒 (范旭东 等, 2013)。

RT-LAMP 方法是一种新兴起的方法, 优点比较明显, 但是也存在一定局限性, 比如很难用来做多重检测, 易污染等。但随着对葡萄 RNA 前处理的简化, 该法不失为一种快速检测单一病毒的方法。

5 高通量测序

高通量测序技术 (High-throughput sequencing) 能一次并行对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测定, 相对于 Sanger 测序方法, 能将基因组测序时间缩短 1/100 ~ 1/1 000, 且大大减少了基因组测序的成本 (Kircher & Kelso, 2010), 是对传统 Sanger 测序法一次革命性改变, 因此在有些文献中称其为下一代测序技术 (next generation sequencing)。该技术使得对一个物种的转录组和基因组进行全面细致的分析成为可能, 所以又被称为深度测序 (deep sequencing)。对植物组织进行高通量测序, 能够快速详细地获得其侵染的病原信息 (Kreuze et al., 2009; Wu et al., 2010), 因此逐渐用于发现植物中可能造成危害的潜在病毒。具体方法为提取组织的总 RNA 或者病毒双链 RNA 进行深度测序, 分析来源于病毒的基因 (Al Rwahnih et al., 2009; Coetzee et al., 2010), 或者提取样品中的小 RNA 进行高通量测序, 分析其中来源于病毒的小 RNA 序列 (Kreuze et al., 2009)。但目前该技术的检测费用较高, 获得数据的后续分析有一定难度, 需要专门技术人员来进行, 因此高通量测序目前并不适合作为病毒常规的检测方法。

近几年,高通量测序在分析和发现葡萄危害的潜在病毒上得到一定的应用。Al Rwahnih 等(2009)通过 454 测序平台对表现西拉衰退症状的葡萄分别提取双链 RNA 和总 RNA 进行高通量测序,结果发现提取双链 RNA 测序得到的病毒 RNA 序列远多于提取总 RNA 测序获得的,随后的分析发现了与衰退相关的 1 种新的病毒,命名为葡萄西拉病毒 1 (*Grapevine syrah virus 1*)。Zhang 等(2011a)通过 Solexa-Illumina 测序平台对表现脉明和衰退症状的葡萄中的 dsRNA 后进行高通量测序,发现了侵染葡萄的 DNA 病毒,命名为葡萄明脉病毒 (*Grapevine vein clearing virus, GVCV*)。Giampetruzzi 等(2012)对表现褪绿斑、叶片畸形的灰比诺葡萄样品提取总的小 RNA 进行高通量测序,经过序列拼接比对,除了发现一些常见病毒和类病毒外,还发现了 1 种新的病毒,命名为灰比诺葡萄病毒 (*Grapevine pinot gris virus, GPGV*)。Al Rwahnih 等(2013)通过 Illumina Genome Analyzer Iix 平台对表现红斑症状的葡萄中的双链 RNA 进行高通量测序,结果发现了 1 种双生病毒,命名为葡萄红斑病毒 (*Grapevine red blotch-associated virus, GRBaV*)。最近, Poojari 等(2013)通过对样品总 RNA 高通量测序,发现 1 个可经过叶蝉传播的双生病毒,命名为葡萄红叶相关病毒 (*Grapevine redleaf-associated virus, GRLaV*),该病毒与 GRBaV 具有较高的同源性。

近几年,高通量测序技术之所以受到葡萄病毒专家的青睐,因为它可以对造成某一病害的所有微生物信息进行分析,从而找出相关的致病因子,这对病害诊断来说无疑是一次革命,随着该技术得普及,有望发现更多侵染葡萄的病毒。

6 展望

近几年葡萄病毒分子检测技术快速发展,无论是对常规方法的改进,还是新方法的创立,其最终目标都是为建立准确、快速、灵敏、高效的检测方法。综上所述,葡萄病毒的检测主要采用普通的 RT-PCR 法,在对大量样品进行检测时显得费时费力,效率不高,而且有些病毒基因变异较大,针对不同的病毒基因序列特点,往往需要设计不同的特异引物,使得检测工作更加繁重。虽有研究者建立了几种病毒的多重 RT-PCR 方法,但由于葡萄病毒种类较多,其检测能力仍很有限。一些研究者已开展研究能够提高灵敏度和检测通量的方法,包括荧光定量多重 PCR 法、RT-LAMP 法、基因芯片及高通量测序。目前国内也仅建立葡萄斑点病毒的荧光定量 PCR 和沙地葡萄茎痘病毒的 RT-LAMP 法,而基因芯片和高通量测序技术在国内葡萄病毒研究中尚未见报道。因此,为进一步提高葡萄病毒检测水平,今后可以从以下几个方面进行研究:(1)针对每种葡萄病毒的分子特性设计出多条用于 RT-PCR 检测的引物,以便能够检测病毒所有的分离物。在单一 RT-PCR 的基础上,对多个病毒引物进行组合,建立能够采用一步法检测更多病毒及其变种基因的多重 RT-PCR 检测体系,从而提高对葡萄病毒检测效率。(2)为进一步提高检测的灵敏度,应完善葡萄病毒的荧光定量 PCR 检测方法。并且在单一病毒荧光定量 PCR 检测的基础上,研究建立能同时检测多种病毒的荧光定量多重 PCR 检测方法。(3)分子杂交由于操作麻烦,在葡萄病毒检测中并不常用,但该法在同时对大量样品检测时仍有一定的优势,且不需要 PCR 仪,随着研究的深入,杂交步骤的进一步简化可能使得该法更好地运用。另外,葡萄病毒种类多,今后可以尝试设计 RNA 通用探针对同一类病毒进行杂交检测。(4)针对许多基层单位缺乏 PCR 等专门的检测仪器,采用 RT-LAMP 法进行病毒的检测可以弥补这一不足,而且 LAMP 方法对 RNA 纯度和浓度要求不高,在对单一病毒检测时,其速度、灵敏度方法优于 PCR 方法。今后对 RT-LAMP 的研究,可以尝试建立以葡萄组织粗提液为模板的 RT-LAMP 法,以实现简单、快速的目的。(5)应展开基因芯片和高通量测序的相关研究。基因芯片可以同时多个基因进行检测,这样的能力是以往的任何检测技术很难做到的,非常适合样品中葡萄病毒及其变种的全面检测。研制简便、便宜、可重复使用的基因芯片是今后芯片研究的努力方向。

另外, 对于表现明显病毒病症状且未知其病原的葡萄样品, 可以采用高通量测序技术对这些样品进行测序分析, 从而发现其潜在的危害病毒。最后, 应根据具体的实验的目的、实验条件及样品情况, 来选择合适的方法对样品进行病毒检测。

References

- Abdullahi I, Rott M. 2009. Microarray immunoassay for the detection of grapevine and tree fruit viruses. *J Virol Methods*, 160: 90 - 100.
- Abdullahi I, Gryshan Y, Rott M. 2011. Amplification-free detection of grapevine viruses using an oligonucleotide microarray. *J Virol Methods*, 178: 1 - 15.
- Al Rwahnih M, Daubert S, Golino D, Rowhani A. 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology*, 387: 395 - 401.
- Al Rwahnih M, Dave A, Anderson M M, Rowhani A, Uyemoto J K, Sudarshana M. 2013. Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. *Phytopathology*. (<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-10-12-0253-R>)
- Al Rwahnih M, Osman F, Sudarshana M, Uyemoto J, Minafra A, Saldarelli P, Martelli G, Rowhani A. 2012. Detection of *Grapevine leafroll-associated virus 7* using real time qRT-PCR and conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 179: 383 - 389.
- Beuve M, Sempe L, Lemaire O. 2007. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. *J Virol Methods*, 141: 117 - 124.
- Boonham N, Walsh K, Smith P, Madagan K, Graham I, Barker I. 2003. Detection of potato viruses using microarray technology: Towards a generic method for plant viral disease diagnosis. *J Virol Methods*, 108: 181 - 187.
- Chooi K M, Cohen D, Pearson M N. 2013. Generic and sequence-variant specific molecular assays for the detection of the highly variable *Grapevine leafroll-associated virus 3*. *J Virol Methods*, 189: 20 - 29.
- Coetzee B, Freeborough M J, Maree H J, Celton J M, Rees D J, Burger J T. 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology*, 400: 157 - 163.
- Dai J, Chen J L, Huang T, Zhen X, Wu Y F. 2012. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of five tobacco viruses in tobacco plants. *J Virol Methods*, 183: 57 - 62.
- Digiario M, Elbeaino T, Martelli G P. 2007. Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting Nepoviruses of subgroups A, B and C. *J Virol Methods*, 141: 34 - 40.
- Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Liu Feng-zhi, Wang Bao-liang, Zhang Shao-yu. 2007. Detection of *Grapevine rupestris stem pitting associated virus* by RT-PCR method. *Journal of Fruit Science*, 24 (5): 705 - 708. (in Chinese)
- 董雅凤, 张尊平, 刘凤之, 王宝亮, 张少瑜. 2007. 沙地葡萄茎痘相关病毒 RT-PCR 检测. *果树学报*, 24 (5): 705 - 708.
- Dovas C I, Katis N I. 2003. A spot multiplex nested RT-PCR for the simultaneous and generic detection of viruses involved in the aetiology of grapevine leafroll and rugose wood of grapevine. *J Virol Methods*, 109: 217 - 226.
- Engel E A, Escobar P F, Rojas L A, Rivera P A, Fiore N, Valenzuela P D. 2010. A diagnostic oligonucleotide microarray for simultaneous detection of grapevine viruses. *J Virol Methods*, 163 (2): 445 - 451.
- Faggioli F, La Starza S. 2006. One-step multiplex RT-PCR for simultaneous detection of eight grapevine viruses and its application in a sanitary selection program//Proceedings of the 15th ICVG Meeting, Ext. Abstr. Stellenbosch (South Africa), 120 - 121.
- Fan Xu-dong, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Ren Fang, Hu Guo-jun, Zhu Hong-juan. 2012. Multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four grapevine viruses. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (5): 949 - 956. (in Chinese)
- 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 任芳, 胡国君, 朱红娟. 2012. 葡萄 4 种病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立. *园艺学报*, 39 (5): 949 - 956.
- Fan Xu-dong, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Ren Fang, Hu Guo-jun, Zhu Hong-juan. 2013. RT-LAMP assay for detection of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 43 (3): 286 - 293. (in Chinese)
- 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 任芳, 胡国军, 朱红娟. 2013. 沙地葡萄茎痘相关病毒的 RT-LAMP 检测方法. *植物病理学报*, 43 (3): 286 - 293.
- Fattouch S, M'hirsi S, Acheche H, Marrakchi M, Marzouki N. 2001. RNA oligoprobe capture RT-PCR, a sensitive method for the detection of *grapevine fanleaf virus* in Tunisian grapevines. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 235 - 244.

- Foissac X, Svanella-Dumas L, Dulucq M J, Candresse T, Gentil P. 2001. Polyvalent detection of fruit tree tricho, capillo and foveaviruses by nested RT-PCR using degenerate and inosine containing primers (DOP RT-PCR). *Acta Horticulturae*, 550: 37 - 44.
- Fuchs M, Pinck M, Etienne L, Pinck L, Walter B. 1991. Characterization and detection of *Grapevine fanleaf virus* by using cDNA probes. *Phytopathology*, 81: 559 - 565.
- Gambino G, Gnbaudo I. 2006. Simultaneous detection of nine grapevine viruses by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction with coamplification of a plant RNA as internal control. *Virology*, 96 (11): 1223 - 1229.
- Gambino G, Perrone I, Gribaudo I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochem Anal*, 19: 520 - 525.
- Giampetruzzi A, Roumi V, Roberto R, Malossini U, Yoshikawac N, Notte P L, Terlizzi F, Credi R, Saldarelli P. 2012. A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in Cv Pinot gris. *Virus Research*, 163: 262 - 268.
- Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *Biotechniques*, 46 (3): 167 - 172.
- Habili N, Fazeli C F, Ewart A, Hamilton R, Cirami R, Saldarelli P, Minafra A, Rezaian M A. 1995. Natural spread and molecular analysis of *Grapevine leafroll-associated virus-3* in Australia. *Phytopathology*, 85: 1418 - 1422
- Heid C A, Stevens J, Livak K J, Williams P M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res*, 6: 986 - 994.
- Henegariu O, Heerema N A, Dlouhy S R, Vance G H, Vogt P H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23 (3): 504 - 511.
- Kircher M, Kelso J. 2010. High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. *Bioessays*, 32 (6): 524 - 536.
- Kominek P, Bryxiova A. 2005. Comparison of three techniques for detection of *Grapevine leafroll-associated virus 1*. *Acta Virol*, 49: 37 - 43.
- Kominek P, Kominkova-Bryxiova M, Jandurova O M, Holleinoval V. 2008. An RNA probe for the detection of *Grapevine virus A*. *J Phytopathol*, 156: 762 - 764
- Kreuze J F, Perez A, Untiveros M, Quispe D, Fuentes S, Barker I, Simon R. 2009. Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology*, 388, 1 - 7.
- La Notte P, Minafra A, Saldarelli P. 1997. A spot-PCR technique for the detection of phloem limited grapevine viruses. *J Virol Methods*, 66: 103 - 108.
- Ling K S, Zhu H Y, Petrovic N, Gonsalves D. 2001. Comparative effectiveness of ELISA and RT-PCR for detecting *Grapevine leafroll-associated closterovirus-3* in field samples. *Am J Enol Vitic*, 52: 21 - 27.
- Liu Y H, Wang Z D, Qian Y M, Shen L, Wang F, Yang J. 2010. Rapid detection of tobacco mosaic virus using the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Arch Virol*, 155: 1681 - 1685.
- Liu Yong-qing. 2003. Investigation on the kinds of grapevine virus and the detection of grapevine fleck virus [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 刘永清. 2003. 葡萄病毒种类调查及葡萄斑点病毒检测 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- López-Fabuel I, Wetzels T, Bertolini E, Bassler A, Vidal E, Torres L B, Yuste A, Olmosa A. 2013. Real-time multiplex RT-PCR for the simultaneous detection of the five main grapevine viruses. *J Virol Methods*, 188 : 21 - 24.
- MacKenzie D J, McLean M A, Mukerji S, Green M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81 (2): 222 - 226.
- Maliogka V I, Dovas C I, Katis N I. 2008. Generic and species-specific detection of viruses belonging to an evolutionary distinct lineage within the *Ampelovirus* genus. *J Virol Methods*, 154: 41 - 47.
- Martelli G P. 2012. Grapevine virology highlights: 2010 - 2012//Proceedings of the 17th Congress of ICVG. Davis, California, USA: 13 - 31.
- Minafra A, Hadidi A. 1994. Sensitive detection of grapevine virus A, B, or leafroll-associated III from viruliferous mealybugs and infected tissue by cDNA amplification. *J Virol Methods*, 47: 175 - 188.
- Nassuth A, Pollari E, Helmecky K, Stewart S, Kofalvi S A. 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J Virol Methods*, 90: 37 - 49.
- Nolasco G, Mansinho A, Santos M T, Soares C, Sequeira Z, Sequeira C, Correia P K, Sequeira O A. 2000. Large scale evaluation of primers for

- diagnosis of rupestris stem pitting associated virus-1. *European Journal of Plant Pathology*, 106: 311 - 318.
- Niu Jian-xin, Chen Ping, Ma Bing-gang. 2004. Studies on complete RT-PCR detection technology of viral disease in grapevine. *Journal of Fruit Science*, 21 (2): 120 - 123. (in Chinese)
- 牛建新, 陈萍, 马兵钢. 2004. 葡萄病毒病多重 RT-PCR 检测技术体系优化分析. *果树学报*, 21 (2): 120 - 123.
- Niu Jian-xin, Lu Xiao-yan, Chen Ping. 2003. Studies on RT-PCR Detection technology of *Grapevine fan leaf virus*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 12 (3): 81 - 85. (in Chinese)
- 牛建新, 鲁晓燕, 陈萍. 2003. 葡萄扇叶病毒 RT-PCR 检测技术研究. *西北农业学报*, 12 (3): 81 - 85
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*, 28 (12): e63
- 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). *J Virol Methods*, 133: 130 - 136.
- Osman F, Rowhani A. 2008. Real-time RT-PCR (TaqMan[®]) assays for the detection of viruses associated with Rugosa wood complex of grapevine. *J Virol Methods*, 154: 69 - 75.
- Osman F, Leutenegger C, Golino D, Rowhani A. 2007. Real-time RT-PCR (TaqMan[®]) assays for the detection of *Grapevine Leafroll associated viruses 1 - 5 and 9*. *J Virol Methods*, 141: 22 - 29.
- Osman F, Leutenegger C, Golino D, Rowhani A. 2008. Comparison of low-density arrays, RT-PCR and real-time TaqMan[®] RT-PCR in detection of grapevine viruses. *J Virol Methods*, 149: 292 - 299
- Pei Guang-qian, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Fan Xu-dong, Li Li-li. 2010. Detection of 4 *Grapevine leafroll-associated viruses* by multiplex RT-PCR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40 (1): 21 - 26. (in Chinese)
- 裴光前, 董雅凤, 张尊平, 范旭东, 李丽丽. 2010. 四种葡萄卷叶病毒多重 RT-PCR 检测. *植物病理学报*, 40 (1): 21 - 26.
- Pei Guang-qian, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Fan Xu-dong, Ren Fang. 2011. Study of *Grapevine leafroll-associated viruses* in China. *Journal of Fruit Science*, 28 (3): 463 - 468. (in Chinese)
- 裴光前, 董雅凤, 张尊平, 范旭东, 任芳. 2011. 我国葡萄主栽区卷叶病相关病毒种类的检测分析. *果树学报*, 28 (3): 463 - 468.
- Peng J, Zhang J F, Xia Z H, Li Y Q, Huang J S, Fan Z F. 2012. Rapid and sensitive detection of *Banana bunchy top virus* by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*, 185: 254 - 258.
- Pietersen G, Walsh H. 2012. Development of a LAMP technique for control of *Grapevine leafroll-associated virus type 3* (GLRaV-3) in infected white cultivar vines by rouging. *Bioessays/Proceedings of the 17th Congress of ICVG*. Davis, California, USA: 50 - 51.
- Poojari S, Alabi O J, Fofanov V Y, Naidu R A. 2013. A leafhopper-transmissible DNA virus with novel evolutionary lineage in the family geminiviridae implicated in grapevine redleaf disease by next-generation sequencing. *PLoS One*, 8 (6): E64194.
- Sabanadzovic S, Saldarelli P, Savino V. 1996. Molecular diagnosis of *Grapevine fleck virus*. *Vitis*, 35: 137 - 140.
- Saldarelli P, Guglielmi M H, Martelli G P. 1994a. Non-radioactive molecular probes for the detection of three filamentous viruses of the grapevine. *Vitis*, 33: 157 - 160.
- Saldarelli P, Minafra A, Martelli G P, Walter B. 1994b. Detection of *Grapevine leafroll-associated closterovirus-III* by molecular hybridization. *Plant Pathol*, 43: 1 - 96.
- Saldarelli P, Rowhani A, Routh G, Minafra A, Digiario M. 1998. Use of degenerate primers in a RT-PCR assay for the identification and analysis of some filamentous viruses, with special reference to clostero- and vitiviruses of the grapevine. *Eur J Plant Pathol*, 104: 945 - 950.
- Schena M, Shalon D, Davis R W, Brown P O. 1995. Quantitative monitoring of gene-expression patterns with a complementary-DNA microarray. *Science*, 270: 467 - 470.
- Stewart E L, Qu X S, Overton B E, Gildow F E, Wenner N G, Grove D S. 2007. Development of a real-time RT-PCR SYBR green assay for tomato ring spot virus in grape. *Plant Disease*, 91: 1083 - 1088.
- Tao Z Y, Zhou H Y, Xia H, Xu S, Zhu H W, Culleton R L, Han E T, Lu F, Fang Q, Gu Y P, Liu Y B, Zhu G D, Wang W M, Li J L, Cao J, Gao Q. 2011. Adaptation of a visualized loop-mediated isothermal amplification technique for field detection of *Plasmodium vivax* infection. *Parasites & Vectors*, 4: 115.
- Terlizzi F, Li C, Ratti C, Qiu W, Credi R, Meng B. 2011. Detection of multiple sequence variants of *Grapevine rupestris stem pitting-associated*

- virus* using primers targeting the polymerase domain and partial genome sequencing of a novel variant. *Ann Appl Biol*, 159: 478 - 490.
- Thelwell N, Millington S, Solinas A, Booth J, Brown T. 2000. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res*, 28 (19): 3752 - 3761.
- Thompson J R, Fuchs M, Fischer K F, Perry K L. 2012. Macroarray detection of *Grapevine leafroll-associated viruses*. *J Virol Methods*, 183 (2): 161 - 169.
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*, 3 (5): 877 - 882.
- Tyagi S, Kramer F R. 1996. Molecular beacons: Probes that fluoresce upon hybridization. *National Biotechnology*, 14 (3): 303 - 308.
- Wang Jian-hui, Liu Jian-jun, Chen Ke-ling, Li Hong-wen, Xi De-hui, Lin Hong-hui. 2011. Optimizing multiple detection and phylogenetic studies on *Grapevine leafroll associated virus-3* and *Grapevine virus A*. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (12): 2401 - 2410. (in Chinese)
- 王建辉, 刘建军, 陈克玲, 李洪雯, 席德慧, 林宏辉. 2011. 葡萄卷叶伴随 3 型病毒和葡萄 A 病毒的多重检测及其系统进化分析. *园艺学报*, 38 (12): 2401 - 2410.
- Wang Jian-hui, Liu Xiao, Xi De-hui, Yuan Shu, Jiang Yu, Yang Hui, Du Jun-bo, Zhang Zhong-wei, Chen Ke-ling, Lin Hong-hui. 2008. Cloning and prokaryotic expression of *CP* gene of *Grapevine virus A* Sichuan isolate. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (7): 967 - 972. (in Chinese)
- 王建辉, 刘 晓, 席德惠, 袁 澍, 蒋 彧, 杨 辉, 杜俊波, 张中伟, 陈克玲, 林宏辉. 2008. 葡萄 A 病毒四川分离物的外壳蛋白基因克隆与原核表达. *园艺学报*, 35 (7): 967 - 972.
- Wang L P, Hong N, Wang G P, Xu W X, Michelutti R, Wang A M. 2010. Distribution of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* in infected *in vitro* pear shoots. *Crop Protection*, 29: 1447 - 1451.
- Wu Q F, Luo Y J, Lu R, Lau N, Lai E C, Li W X, Ding S W. 2010. Virus discovery by deep sequencing and assembly of virus-derived small silencing RNAs. *PNAS*, 107 (4): 1606 - 1611.
- Yang Fa-heng. 2007. Identification of four etiological virus causing *Grapevine leafroll* by RT-PCR in China [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 杨发恒. 2007. 引起我国葡萄卷叶病的四种病原病毒的 RT-PCR 鉴定 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Yang Xiang-kun, Tian Hai-yan, Niu Jian-xin, Wang Lin, Dai Yong-xin. 2010. Study on the detection of grapevine virus B by RT-PCR. *Biotechnology Bulletin*, (5): 97 - 106. (in Chinese)
- 杨相昆, 田海燕, 牛建新, 王 林, 代永欣. 2010. 葡萄病毒 B 的 RT-PCR 检测技术研究. *生物技术通讯*, (5): 97 - 106.
- Yu Y, Zhao Z, Jiang D M, Wu Z J, Li S F. 2013. A one-step multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of four viruses that infect peach. *Letters in Applied Microbiology*, 57, 350 - 355.
- Zhang Y, Singh K, Kaur R, Qiu W P. 2011a. Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology*, 101: 1081 - 1090.
- Zhang Y J, Yin J, Jiang D M, Xin Y Y, Ding F, Deng Z I, Wang G P, Ma X F, Li F, Li G F, Li M F, Li S F, Zhu S F. 2013. A universal oligonucleotide microarray with a minimal number of probes for the detection and identification of viroids at the genus level. *PLoS One*, 8 (5): e64474. doi: 10.1371/journal.pone.006447.
- Zhang Z X, Peng S, Jiang D M, Pan S, Wang H Q, Li S F. 2011b. Development of a polyprobe for the simultaneous detection of four grapevine viroids in grapevine plants. *European Journal of Plant Pathology*, 132: 9 - 16.
- Zhang Zun-ping, Dong Ya-feng, Fan Xu-dong, Pei Guang-qian. 2010. Preliminary report on indexing of grapevine virus and virus-like diseases. *Sino-overseas Grapevine & Wine*, (1): 22 - 24. (in Chinese)
- 张尊平, 董雅凤, 范旭东, 裴光前. 2010. 葡萄病毒及类似病害指示植物鉴定初报. *中外葡萄与葡萄酒*, (1): 22 - 24.
- Zhao K, Liu Y, Wang X F. 2010. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of *Barley yellow dwarf viruses* in China. *J Virol Methods*, 169: 211 - 214.
- Zhuo Na, Wang Guo-ping, Deng Cong-liang, Hong Ni. 2011. RT-PCR detection of *Grapevien fleck virus*. *Journal of Fruit Science*, 28 (4): 717 - 720. (in Chinese)
- 卓 娜, 王国平, 邓从良, 洪 霓. 2011. 葡萄斑点病毒的 RT-PCR 检测. *果树学报*, 28 (4): 717 - 720. (in Chinese)