

调查 研究

Investigations

侵染肥城桃的病毒和类病毒的分子检测与鉴定

冯佳¹, 李刚², 竺晓平^{1*}, 宋红日³,
陈文玉³, 彭福田⁴, 李世访⁵, 刘会香^{1*}

(1. 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018; 2. 广西农业厅植物保护总站, 南宁 530022;
3. 山东肥城桃研究所, 肥城 271600; 4. 山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018;
5. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要 为明确山东肥城桃种植区桃树上主要存在的病毒和类病毒及其发生情况, 采集具有花叶、斑驳和皱缩典型症状的肥城桃样品, 提取叶片总 RNA 后, 分别选用桃树上已报道的啤酒花矮化类病毒 *Hop stunt viroid* (HSVd)、桃潜隐花叶类病毒 *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd)、苹果褪绿叶斑病毒 *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV)、樱桃锉叶病毒 *Cherry rasp leaf virus* (CRLV)、桃花叶病毒 *Peach mosaic virus* (PMV)、李属坏死环斑病毒 *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV)、李痘病毒 *Plum pox virus* (PPV)、李矮缩病毒 *Prunus dwarf virus* (PDV)、樱桃绿环斑驳病毒 *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV)、杏假褪绿叶斑病毒 *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* (APCLSV)、李树皮坏死茎纹孔伴随病毒 *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV) 和小樱桃病毒 1 号 *Little cherry virus 1* (LchV1) 的特异性引物进行 RT-PCR 检测。PCR 结果显示仅 HSVd、PLMVd、ACLSV、PNRSV 和 PBNSPaV 的扩增产物中得到了预期大小的目的片段, 将目的片段克隆测序后, 经 NCBI BLAST 比对发现, 山东肥城桃分离物 HSVd、PLMVd、ACLSV、PNRSV 和 PBNSPaV 与 GenBank 已报道分离物序列一致性均达 90% 以上。表明山东肥城桃已感染 HSVd、PLMVd 2 种类病毒和 ACLSV、PNRSV、PBNSPaV 3 种病毒。

关键词 肥城桃; 病毒; 类病毒; RT-PCR; 序列分析

中图分类号: S432.41 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.025

Molecular detection and identification of viruses and viroids infecting Feicheng peach

Feng Jia¹, Li Gang², Zhu Xiaoping¹, Song Hongri³, Chen Wenyu³,
Peng Futian⁴, Li Shifang⁵, Liu Huixiang¹

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Guangxi Plant Protection Station, Nanning 530022, China; 3. Shandong Feicheng Peach Research Institute, Feicheng 271600, China; 4. College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 5. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract To investigate field occurrence and causing agents of virus and viroid diseases on Feicheng peach in the main planting areas in Shandong Province, peach leaf samples with typical symptoms of mosaic, mottled and shrinking reminiscent of virus and viroid infection were collected from Feicheng peach orchard. After extracting total RNA, specific primers of *Hop stunt viroid* (HSVd), *Peach latent mosaic viroid* (PLMVd), *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV), *Cherry rasp leaf virus* (CRLV), *Peach mosaic virus* (PMV), *Prunus necrotic ringspot virus* (PNRSV), *Plum pox virus* (PPV), *Prunus dwarf virus* (PDV), *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV), *Apricot pseudo-chlorotic leaf spot virus* (APCLSV), *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNSPaV) and *Little cherry virus 1* (LchV1) were applied for RT-PCR detection. Only five expected segments specific to

收稿日期: 2016-03-24 修订日期: 2016-04-30

基金项目: 国家现代农业产业技术体系(CARS-31-3-03); 山东省高校优秀科研创新团队计划项目; 泰安市科技局项目

* 通信作者 E-mail: zhuxp@dau.edu.cn; hxlou@sdau.edu.cn

HSVd, PLMVd, ACLSV, PNRSV and PBNPaV were obtained. PCR products were cloned and sequenced. BLAST analysis showed that sequences of Feicheng peach isolates of HSVd, PLMVd, ACLSV, PNRSV and PBNPaV shared similarities higher than 90% with those of the corresponding domestic isolates deposited in GenBank. Our results demonstrated that Feicheng peach trees were infected by HSVd, PLMVd, ACLSV, PBNPaV and PNRSV.

Key words Feicheng peach; virus; viroid; RT-PCR; sequence analysis

桃树被病毒侵染后, 症状表现为叶片出现褪绿斑、斑驳、环斑、皱缩、花叶, 枝条节间缩短变粗和茎穴等^[1], 且症状会随病毒株系、寄主感病性、气候条件等的变化而变化, 可导致嫁接不亲和、发芽率低、开花延迟、树势衰退、产量下降、品质变劣甚至死亡^[2]。类病毒是一类无外壳蛋白包裹、能够进行自我复制的单链闭环状 RNA 分子, 由 Diener 于 1971 年首次发现, 是迄今为止发现的最小病原体^[3]。据报道, 目前侵染桃树的类病毒主要有啤酒花矮化类病毒(HSVd)和桃潜隐花叶类病毒(PLMVd)^[4-8], 分别首次发现于日本和法国^[9-10]。

中国是一个桃树病毒病发生较严重的国家^[11-13], 但关于桃树病毒病在我国的地理分布以及侵染情况研究的相关报道较少。山东肥城是我国的桃主产区之一, 但山东肥城桃树是否被报道的两种类病毒和其他病毒侵染, 及病害发生危害情况如何至今尚未见报道。桃树感染病毒后, 植株症状表现不明显、潜伏期长、危害性大, 并可通过嫁接、修剪等田间农事操作进行传播。植株一旦感病, 就会加快病毒传播蔓延的速度, 防治难度大大增加^[14]。

自 2013 年以来, 山东肥城桃园中发现了花叶、斑驳和皱缩等症状的桃叶, 为明确具有上述症状的桃树中可能存在的病毒或类病毒种类, 本研究在调查侵染山东肥城桃树的病毒种类及发生分布的同时, 采用分子生物学方法, 将分离得到的类病毒、病毒进行克隆、测序及序列分析, 为了解肥城桃病毒病害的多样性、检测和防治奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

2013 年 4 月—2015 年 4 月, 在山东肥城市新城办事处中央桃行和仪阳乡刘台村两个肥城桃主产区采集具有花叶、皱缩、斑驳症状的肥城桃样品共 236 份, 其中中央桃行 120 份, 仪阳乡刘台村 116 份, 将采集的样品保存于 -20℃ 冰箱, 以未感病的健康肥城桃叶片作为阴性对照。

1.1.2 菌株、载体及试验试剂

大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 α 菌株由山东省蔬菜病虫生物学重点实验室提供; RNase Inhibitor、RTase M-MLV(RNase H⁻)、T4 DNA 连接酶和克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司; DNA 回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; Easy Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子量标准 *Trans2K Plus* 购自北京全式金生物技术有限公司; 特异性引物交由上海博尚生物技术有限公司合成; 其余生化试剂和普通化学试剂为进口或国产分析纯。

1.1.3 仪器

台式高速冷冻离心机(5417R 德国 Eppendorf)、PCR 扩增仪(美国伯乐)、电子天平(瑞士普利赛斯 Precisa)、EC250-90 核酸电泳仪(E-Apparatus Corporation)DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)、JY04S-3E 型凝胶成像系统(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)检测

称取待测样品叶片 0.1 g, 加液氮后迅速研磨成粉末状, 用 TRIzol 法提取叶片总 RNA, 用于后续试验及 cDNA 的合成。

为初步判断所采集的桃树样品中是否携带类病毒, 利用二维聚丙烯酰胺凝胶电泳检测提取的纯总 RNA。首先用 1×TAE 进行 5% 丙烯酰胺非变性凝胶电泳, 将含类病毒泳道胶切下, 转移至新制的 5% 丙烯酰胺变性凝胶(含尿素)底部, 在变性条件下继续电泳, 当二甲苯腈到达距顶端约 1/4 时停止电泳, 取出凝胶, 用银染法染色。

1.2.2 RT-PCR 扩增

cDNA 的合成: 反转录体系(10 μ L)包括模板 RNA 3.0 μ L, 特异性下游引物(表 1)各 1.0 μ L, RNase-Free H₂O 2.0 μ L, 70℃ 变性 10 min, 冰上急冷 2 min 后, 加入下列试剂: 5×M-MLV Buffer 2 μ L, dNTP mixture (各 10 mmol/L) 和 RNase M-MLV (RNase H⁻, 200 U/ μ L) 各 0.5 μ L, RNase Inhibitor

(40 U/ μ L) 0.25 μ L, 总体系至 10 μ L。42 $^{\circ}$ C 保温 60 min, 再 70 $^{\circ}$ C 保温 15 min。

PCR 扩增: 以上述不同引物合成的 cDNA 为模板, 分别进行 PCR 扩增, 扩增体系如下: 10 \times Buffer 2.5 μ L, dNTPs 1.0 μ L, HSVd、PLMVd、ACLSV、CRLV、PMV、PNRSV、PPV、PDV、CGRMV、AP-

CLSV、PBNSPaV 和 LchV1 的特异性上下游引物各 1.0 μ L, cDNA 1.0 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L, ddH₂O 补足总体积至 25 μ L。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 53 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 循环 25 次; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照记录结果。

表 1 用于检测山东肥城桃病毒病的引物

Table 1 Primers used for detecting the peach viral diseases in Feicheng, Shandong

病毒名称 Virus name	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	参考文献 Reference
HSVd	HSVdP2f	AACCCGGGGCTCCTTTCTCA	[15]
	HSVdP3r	AACCCGGGGCAACCTTCTC	
PLMVd	PLMVdP13	TAAGTGCAGTGCTCCGAATA	[15]
	PLMVdP14	TCCCGATAGAAAGGCTAAGC	
ACLSV	ACLSV-5	GAGAGTTTCAGTTTGCTAGACA	[16]
	ACLSV-3	GCAAATTCAGTCTGTAAAAG	
CRLV	CRLV-F	TGACTTTCCCAAGGATGAGA	[17]
	CRLV-R	GTGACATACCATAGATCC	
PMV	PMI6AFF	CAAACATGGCTTTCACCTTCTGCA	[18]
	PMI6AFR	TCTTGCCCCACCTTCAACAAATG	
PBNSPaV	PBNSPa-3fc	CTTCGGCACTACTTTCAGCAGT	[19]
	PBNSPa-2rc	AGTCGCACCACCAGTCTTCT	
CGRMV	CGRMV-S	TAAACCCCTGCAATTCCTACTC	[20]
	CGRMV-A	CTCTAAGGAACTGAAGGAAAA	
PNRSV	PNRSV-F	GATGGTTTGCCGAATTTGCAATC	[21]
	PNRSV-R	CTAGATCTCAAGCAGGTCTCT	
PPV	PPV-F	ACCGAGACCACTACACTCCC	[21]
	PPV-R	CAGACTACAGCCTCGCCAGA	
PDV	P1	AGGATCCATGTCTGGGAAAGCCATT	[22]
	P2	GGAGCTCTCATCCACTGACTATTT	
APCLSV	APCLSV-F	ACATCTGCCCTCCACACAA	[23]
	APCLSV-R	TCTGAGTAAGCTGATCCAGC	
LchV1	Leh1	TAGCTGTGGCGCTGACTCTAG	[24]
	Leh3	CTTCTACCGCGACGTGGTCCC	

1.2.3 PCR 产物回收、测序及序列分析

按照试剂盒说明纯化目的片段。纯化后的 PCR 产物连接至 pMD18-T 并转化 DH5 α , 用含氨苄青霉素 (Amp) 的培养基进行筛选。经 PCR 验证为阳性的克隆, 取其菌液进行序列测定。将获得的序列与 GenBank 中的序列进行 BLAST 比对, 同时下载 NCBI 上典型分离物序列, 采用 MEGA 4 软件的邻接法 (neighbor-joining, NJ), 对选定的序列进行系统进化树构建, 并将其中的各分支置信度 (bootstrap) 进行 1 000 次重复分析。

2 结果与分析

2.1 肥城桃叶样品携带类病毒的检测

经 2D-PAGE 检测, 观察到前后两条带较为清晰, 并且条带亮度明显不同 (图 1)。表明被检测样品中含有分

子量大小不同的两种类病毒, 且在寄主体内的含量也不相同。根据已报道的啤酒花矮化类病毒 (HSVd) 和桃潜隐花叶类病毒 (PLMVd) 序列大小不同这一信息, 可以初步判断肥桃叶片中含有 HSVd 和 PLMVd 两种类病毒, 为明确其具体发生情况, 进一步采用 RT-PCR 进行鉴定。

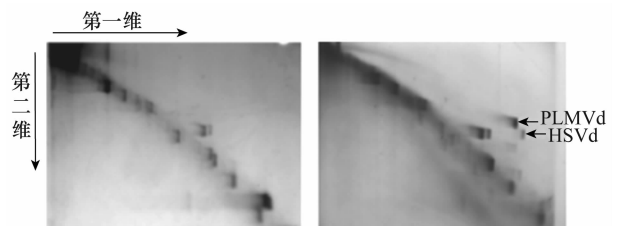


图 1 健康样品与感病样品 RNA 二维电泳检测结果
Fig. 1 2D-PAGE analysis results of RNA extracted from the healthy and diseased peach

2.2 肥城桃叶片病毒、类病毒的 RT-PCR 检测

从山东肥城市新城办事处中央桃行和仪阳乡刘台村两个肥城桃主产区肥城桃叶片上共检测到了 HSVd、PLMVd 两种类病毒, ACLSV、PBNSPaV 和 PNRSV 3 种病毒(表 2), 两种类病毒在中央桃行桃产区分布多于刘台产区, 其中 PLMVd 的阳性样品数量

大于 HSVd。PLMVd、HSVd、ACLSV 和 PBNSPaV 带毒率分别为 23.3%、9.3%、23.3%、5.5% 和 6.8%, 其中 HSVd、PLMVd 和 ACLSV 3 种病毒伴有复合侵染现象, 以 PLMVd 与 HSVd 复合侵染较多, PLMVd 与 ACLSV、HSVd 与 ACLSV 复合侵染次之, PBNSPaV 和 PNRSV 无复合侵染现象。

表 2 山东肥城桃病毒、类病毒的 RT-PCR 检测结果

Table 2 RT-PCR detected results of viruses and viroid in samples of Feicheng peach

采样地点 Collection site	样品数/个 No. of samples	检出数(个)/检出率(%) Detection numbers/rate of samples							
		PLMVd	HSVd	ACLSV	PNRSV	PBNSPaV	PLMVd+ ACLSV	HSVd+ ACLSV	PLMVd+ HSVd
肥城中央桃行 Central orchard, Feicheng City	120	30/25	12/10	25/20.8	8/6.7	10/8.3	24/20	15/12.5	35/29.2
肥城刘台桃园 Liutai orchard, Feicheng City	116	25/21.6	10/8.6	30/25.9	5/4.3	6/5.2	20/17.2	16/13.8	38/32.8

2.2.1 肥城桃类病毒 RT-PCR 检测

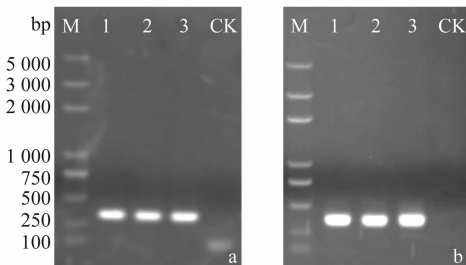
以桃树叶片总 RNA 为模板, 分别用 HSVd 特异引物 HSVdP2f/P3r 和 PLMVd 特异性引物 PLMVdP13/P14 进行 RT-PCR 扩增。结果显示, 在部分样品中可分别扩增出大小为 306 bp(KJ754184) 和 341 bp(KJ754183) 的 HSVd 和 PLMVd 特异条带(图 2a~b)。HSVd 山东肥城桃分离物 SDH1(KJ754184) 与 GenBank 中登录的其他 HSVd 分离物相似性在 93.4%~97.8% 之间, 其中与 HSVd 法国分离物 F1(KF712280) 相似性最高, 为 97.8%; PLMVd 山东肥城桃分离物 SDP2(KJ754183) 与 GenBank 已报道的 PLMVd 典型分离物之间的相似性为 96.3%~98.4%, 其中与 PLMVd 北京分离物 BJ1(JF898787) 相似性最高, 为 98.4%。

2.2.2 肥城桃病毒 RT-PCR 检测

采用 ACLSV、PBNSPaV 和 PNRSV 特异引物 ACLSV-5/3、PBNSPa-3fc/2rc 和 PNRSV-F/R 分别进行 RT-PCR 扩增。结果显示, 在部分样品中分别得到大小为 566 bp(KJ754185)、531 bp(KU204711) 和 675 bp(KU179193) 的特异性条带(图 3a~c), 与 GenBank 已报道的 ACLSV、PBNSPaV 和 PNRSV 的典型分离物之间相似性达到 90% 以上, 其中 ACLSV 山东肥城桃 SDA3 分离物与北京分离物 ST4(JN848995) 相似性最高, 达 94.4%, PBNSPaV 山东肥城桃分离物 SD-PBNSPaV 与湖北武汉分离物 Pch-LN-2-1(KJ792838) 相似性最高, 为 94.5%, PNRSV 山东肥城桃分离物 SD-PNRSV 与智利分离物 NctCl. ear1(EF565252) 相似性最高, 为 99.9%。

2.3 序列分析

为了更好地分析肥城桃叶携带病毒或类病毒的系统进化关系, 选择 GenBank 中不同地区有代表性的 HSVd、PLMVd、ACLSV、PBNSPaV 和 PNRSV 分离物序列, 构建系统进化树(图 4)。结果表明, HSVd 山东肥城桃分离物 SDH1 与法国分离物 F1(KF712280) 亲缘关系最近(图 4a); PLMVd 山东肥城桃分离物 SDP2 与北京分离物 BJ1(JF898787) 亲缘关系最近(图 4b); ACLSV 山东肥城桃分离物 SDA3 与北京分离物 ST4(JN848995) 亲缘关系最近(图 4c); PBNSPaV 山东肥城桃分离物 SD-PBNSPaV 与湖北武汉分离物 Pch-LN-2-1(KJ792838) 亲缘关系最近(图 4d); PNRSV 山东肥城桃分离物 SD-PNRSV 与智利分离物 NctCl. ear1(EF565252) 亲缘关系最近(图 4e)。

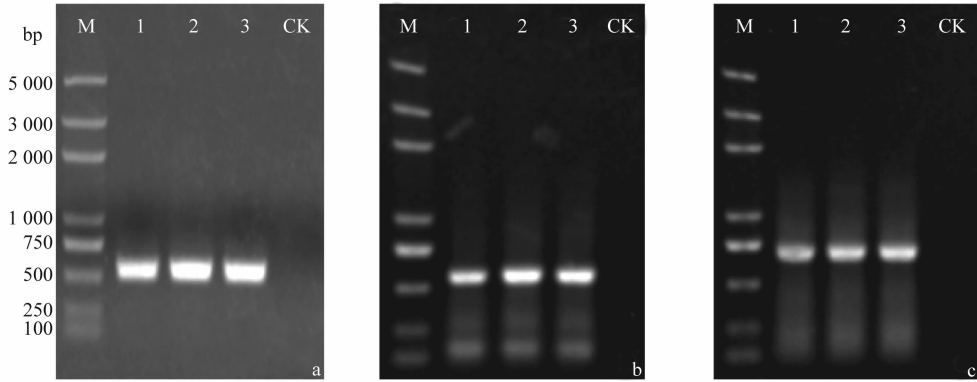


M: *Trans2K Plus* DNA Marker; a: 1~3 为引物 HSVdP2f/P3r 扩增部分桃叶片样品结果; b: 1~3 为引物 PLMVdP13/P14 扩增部分桃叶片样品结果; CK: 阴性对照

M: *Trans2K Plus* DNA Marker; a: Lane 1-3 were the amplification results of partial peach leaves samples with primers HSVdP2f/P3r; b: Lane 1-3 were the amplification results of partial peach leaves samples with primers PLMVdP13/P14; CK: Negative control

图 2 侵染肥城桃类病毒 RT-PCR 扩增结果

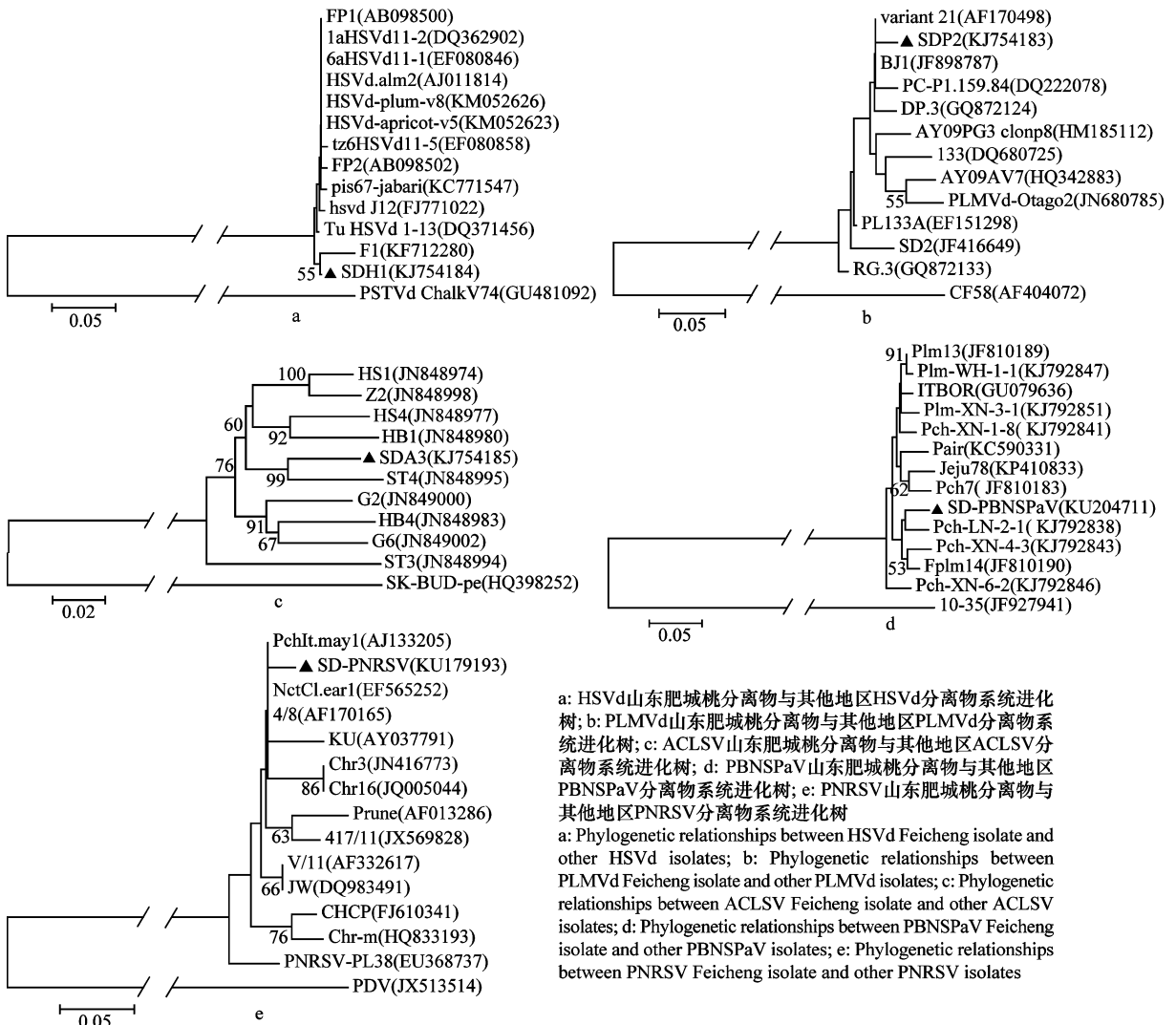
Fig. 2 RT-PCR amplification results of Feicheng peach samples infected by viroid



M: *Trans2K Plus* DNA Marker; CK: 阴性对照; a: 1~3为引物ACLSV-5/3扩增部分桃叶片样品结果; b: 1~3为引物PBNSPa-3fc/2rc扩增部分桃叶片样品结果; c: 1~3为引物PNRSV-F/R扩增部分桃叶片样品结果
M: *Trans2K Plus* DNA Marker; CK: Negative control a: Lane 1-3 were the amplification results of partial peach leaves samples with primers ACLSV-5/3; b: Lane 1-3 were the amplification results of partial peach leaves samples with primers PBNSPa-3fc/2rc; c: Lane 1-3 were the amplification results of partial peach leaves samples with primers PNRSV-F/R

图3 侵染肥城桃病毒 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 RT-PCR amplification results of Feicheng peach samples infected by virus



a: HSVd山东肥城桃分离物与其他地区HSVd分离物系统进化树; b: PLMVd山东肥城桃分离物与其他地区PLMVd分离物系统进化树; c: ACLSV山东肥城桃分离物与其他地区ACLSV分离物系统进化树; d: PBNSPaV山东肥城桃分离物与其他地区PBNSPaV分离物系统进化树; e: PNRSV山东肥城桃分离物与其他地区PNRSV分离物系统进化树
a: Phylogenetic relationships between HSVd Feicheng isolate and other HSVd isolates; b: Phylogenetic relationships between PLMVd Feicheng isolate and other PLMVd isolates; c: Phylogenetic relationships between ACLSV Feicheng isolate and other ACLSV isolates; d: Phylogenetic relationships between PBNSPaV Feicheng isolate and other PBNSPaV isolates; e: Phylogenetic relationships between PNRSV Feicheng isolate and other PNRSV isolates

图4 HSVd、PLMVd、ACLSV、PBNSPaV 和 PNRSV 系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic relationships based on sequences of HSVd, PLMVd, ACLSV, PBNSPaV and PNRSV

3 结论与讨论

目前桃树上已发现的病毒主要有李属坏死环斑病毒(PNRSV)、李痘病毒(PPV)、李矮缩病毒(PDV)、樱桃绿环斑驳病毒(CGRMV)、杏假褪绿叶斑病毒(APCLSV)、李树皮坏死茎纹孔伴随病毒(PBNPaV)、小樱桃病毒 1 号(LchV1)、苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)、樱桃锉叶病毒(CRLV)、桃花叶病毒等(PMV)。侵染桃树的类病毒主要有两种,分别为桃潜隐花叶类病毒(PLMVd)和啤酒花矮化类病毒(HSVd)^[12,25-28]。2011—2012 年于云^[23]在山东省检测到侵染桃树的病毒主要有樱桃绿环斑驳病毒(CGRMV)、杏假褪绿叶斑病毒(APCLSV)和苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)3 种,但是未对山东肥城桃主产区的病毒病进行系统检测;2007 年周莹^[15]在山东省桃树上仅检测到桃潜隐花叶类病毒(PLMVd)一种类病毒。本研究在前人的基础上,对山东肥城桃树上可能存在的、目前侵染桃树的 2 种类病毒和 10 种病毒进行全面系统的检测,为了解肥城桃病毒病害的多样性及病原检测和防治奠定基础。

山东肥城桃栽培面积已超过 4 000 hm²,本研究通过对肥城桃主产区连续 3 年的检测,确定肥城桃上发生啤酒花矮化类病毒(HSVd)和桃潜隐花叶类病毒(PLMVd)2 种类病毒和苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)、李树皮坏死茎纹孔伴随病毒(PBNPaV)、李属坏死环斑病毒(PNRSV)3 种病毒的侵染,发生比例较高,且部分病毒伴有复合侵染现象。由于病毒、类病毒一旦侵染桃树,将终生带毒,这将对肥城桃产业的健康持续发展带来潜在风险,必须引起足够重视并采取相应的预警措施。

参考文献

- [1] 阮小凤,周媛月,马书尚,等. 桃病毒病调查与检测研究[J]. 西北农业学报,1998,7(3):59-62.
- [2] 刘建,杨莉莉. 侵染桃树的病毒、类病毒和植原体病害研究进展[J]. 果树科学,1999,16(S1):27-31.
- [3] Diener T O. Viroids: the smallest known agents of infectious disease [J]. Annual Review of Microbiology, 1974, 28: 23-39.
- [4] 范宏艳. 桃树类病毒发生率调查及 PLMVd 基因多样性分析[D]. 长春:吉林农业大学,2011.
- [5] 周莹,李世访,成卓敏,等. 桃树上啤酒花矮化类病毒(*Hop stunt viroid*)的检测及序列分析[J]. 植物病理学报,2006,36(6):501-507.
- [6] 杨元爱,李世访,成卓敏,等. 杏和李树啤酒花矮化类病毒的检测与序列分析[J]. 园艺学报,2006,33(6):1193-1198.
- [7] 徐文兴,王国平,洪霓. 桃潜隐花叶类病毒 RT-PCR 和分子杂交检测技术的建立[J]. 植物检疫,2005,19(5):268-271.
- [8] 张少瑜,张尊平,洪霓,等. 桃潜隐花叶类病毒的鉴定[J]. 中国果树,2000(1):30-31.
- [9] Sano T, Hataya T, Terai Y, et al. *Hop stunt viroid* strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan [J]. Journal of General Virology, 1989, 70(6): 1311-1319.
- [10] Desvignes J C. Peach latent mosaic and its relation to peach yellow mosaic virus disease [J]. Acta Horticulture, 1986, 193: 51-57.
- [11] 董晓民,张毅,刘伟,等. 桃病毒病及检测技术研究进展[J]. 北方园艺,2016(3):199-203.
- [12] 李世访,卢美光. 桃树病毒病研究现状与防控对策[J]. 中国果业信息,2013,30(10):80-81.
- [13] 王国平,洪霓. 我国果树病毒病发生危害现状与防治对策[J]. 北方果树,1997(3):8-10.
- [14] 王国平,洪霓. 果树病毒检测与脱除技术的研究进展[J]. 华中农业大学学报,2004,23(6):685-691.
- [15] 周莹. 桃树类病毒鉴定及序列多样性分析[D]. 北京:中国农业科学院,2007.
- [16] Park H L, Yoon J S, Kim H R, et al. Multiplex RT-PCR assay for the detection of *Apple stem grooving virus* and *Apple chlorotic leaf spot virus* in infected Korean apple cultivars [J]. Plant Pathology Journal, 2006, 22(2): 168-173.
- [17] James D, Upton C. Genome segment RNA-1 of a flat apple isolate of *Cherry rasp leaf virus*: nucleotide sequence analysis and RT-PCR detection [J]. Archives of Virology, 2005, 150(7): 1469-1476.
- [18] James D, Upton C. Single primer pair designs that facilitate simultaneous detection and differentiation of peach mosaic virus and cherry mottle leaf virus [J]. Journal of Virological Methods, 1999, 83(1): 103-111.
- [19] Marais A, Faure C, Couture C, et al. Characterization by deep sequencing of divergent *Plum bark necrosis stem pitting-associated virus* (PBNPaV) isolates and development of a broad-spectrum PBNPaV detection assay [J]. Phytopathology, 2014, 104(6): 660-666.
- [20] 王文文,宗晓娟,陈立伟,等. 山东地区樱桃绿环斑驳病毒(CGRMV)的 RT-PCR 检测及外壳蛋白基因的克隆[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2012,43(2):206-210.
- [21] 周灼标,郑雷青,管维,等. 用二重 PCR 方法检测李痘病毒和李坏死环斑病毒[J]. 植物保护,2006,32(4):107-109.
- [22] 陈立伟,宗晓娟,王文文,等. 李矮缩病毒外壳蛋白基因克隆及原核表达研究[J]. 中国农学通报,2012,28(12):177-181.
- [23] 于云. 多重 RT-PCR 技术检测桃病毒的研究[D]. 福州:福建农林大学,2012.
- [24] Lim S, Igori D, Yoo R H, et al. Genomic detection and characterization of a Korean isolate of *Little cherry virus 1* sampled from a peach tree [J]. Virus Genes, 2015, 51(2): 260-266.
- [25] 赵晓丽,周琦,孙宁,等. 啤酒花矮化类病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 植物保护学报,2013,40(4):309-314.
- [26] Ding B. The biology of viroid-host interactions [J]. Annual of Review Phytopathology, 2009, 47: 105-131.
- [27] Hassan M, Zouhar M, Rysanek P. Development of a PCR method of *Peach latent mosaic viroid* detection for certification of planting material [J]. Acta Horticulturae, 2004, 657: 392-395.
- [28] Huttinga H. Sensitivity of indexing procedures for viruses and viroids [J]. Advances in Botanical Research, 1996, 23: 59-71.