

东北冷寒产区苹果褪绿叶斑病毒检测及其分子多样性分析

陈雅寒^{1,2}, 孙平平¹, 马强^{1,*}, 赵明敏¹, 武占敏³, 李正男^{1,*}

(¹内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 呼和浩特 010018; ²西北农林科技大学植物保护学院, 陕西杨凌 712100; ³鄂尔多斯市植保检疫站, 内蒙古鄂尔多斯 017000)

摘要: 采用 RT-PCR 对从东北地区和内蒙古自治区 8 个采样点采集的 165 份小苹果枝条样品进行了苹果褪绿叶斑病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) 的检测, ACLSV 的平均检出率为 60.6%, 说明 ACLSV 在中国东北和内蒙古自治区普遍发生。对其中 25 份样品中 ACLSV 的外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因进行了克隆和测序, 结果表明 25 个 ACLSV 分离物 CP 基因核苷酸序列一致性为 84.0% ~ 99.7%, 编码蛋白氨基酸序列一致性为 90.7% ~ 99.5%; 与其他 ACLSV 分离物 CP 基因核苷酸一致性为 67.7% ~ 99.7%, 氨基酸一致性为 71.0% ~ 99.5%。世界范围内已报道的 ACLSV 分离物分成 B6、P205、SHZ 和 Ta Tao 5 等 4 个组, 本研究中的 25 个 ACLSV 分离物分别属于 B6、P205 和 SHZ 组; 在 25 个 ACLSV 分离物间无重组事件。

关键词: 苹果; 苹果褪绿叶斑病毒; CP; 一致性; 系统发育进化分析; 重组

中图分类号: S 661.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 12-2397-09

Detection and Diversity Analysis of *Apple chlorotic leaf spot virus* in Northeast China

CHEN Yahan^{1,2}, SUN Pingping¹, MA Qiang^{1,*}, ZHAO Mingmin¹, WU Zhanmin³, and LI Zhengnan^{1,*}

(¹College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010018, China; ²College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; ³Plant Protective Station of Ordos, Ordos, Inner Mongolia 017000, China)

Abstract: In order to clarify the incidence and diversity of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) in northeast China and Inner Mongolia, a total of 165 apple leaf samples were collected from 8 sampling points in these areas and tested by reverse transcription-polymerase chain reaction. The average incidence of ACLSV among the collected samples was 60.6%, suggesting its wide spread in the surveyed regions. The fragments of the complete coat protein (CP) genes generated from 25 samples were cloned and sequenced. Pairwise comparison analysis showed that the nucleotide and amino acid sequence identities of CP genes of the 25 isolates ranged from 84.0% - 99.7% and 90.7% - 99.5%, respectively, while they shared the nucleotide and amino acid sequence identities with another 13 ACLSV isolates of 67.7% - 99.7%

收稿日期: 2019-07-12; **修回日期:** 2019-08-22

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (31860540); 内蒙古农业大学高层次人才科研启动金项目 (NDYB2018-3)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lizhengnan@imau.edu.cn, nmmaqiang@126.com)

and 71.0% - 99.5%, respectively. The ACLSV isolates worldwide were grouped into four groups (B6, P205, SHZ and Ta Tao 5), and the 25 ACLSV isolates were located in the groups B6, P205 and SHZ. No significant evidence of recombination was found among the 25 complete CP sequences.

Keywords: apple; ACLSV; CP; identity; phylogenetic analysis; recombination

苹果褪绿叶斑病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) 是侵染苹果的主要潜隐性病毒之一 (张双纳 等, 2018), 属于纤毛病毒属 (*Trichovirus*) (Martelli et al., 1994), 粒子形态为螺旋对称的弯曲线状, 长 640 ~ 760 nm, 直径 12 nm, 基因组大小约 7 545 ~ 7 555 nt, 为正义单链 RNA 分子, 含有 3'端 Poly (A) 尾和 5'端帽子结构, 编码 3 个部分重叠的开放式阅读框 (open reading frames, ORFs)。目前在中国针对 ACLSV 主要开展了抗血清制备、脱毒、基因组和分子变异等方面的研究 (洪霓 等, 1999; 董雅凤 等, 2002; Song et al., 2011; Liu et al., 2014), 其中针对病毒检测和分子变异开展的研究最多。ACLSV 的外壳蛋白 (coat protein, CP) 由 ORF3 编码, 其 N 端有高度可变区, 因此 CP 基因成为 ACLSV 株系划分的依据 (German et al., 1990; Sato et al., 1993; Jelkmann, 1996; German-Retana et al., 1997)。目前 ACLSV 依据 CP 基因在世界范围内划分为 4 个组, 分别是 B6、P205、SHZ 和 Ta Tao 5。明确 ACLSV 在各个苹果产区的发生率和分子变异情况对该病毒防控有重要指导意义。

中国的苹果生产区按照气候特点、生产规模、主要品种等因素, 划分为西南冷凉高地、西北黄土高原、黄河故道、环渤海湾和东北冷寒苹果产区 (崔家升和李晓萍, 2012)。其中东北冷寒苹果产区包括吉林省、黑龙江省和内蒙古自治区, 以生产小苹果为主, 主栽品种为黄太平、金红 (罗桂杰, 2008) 和锦绣海棠 (叶秀云 等, 2012) 等。除东北冷寒苹果产区外其他 4 个苹果产区均已经开展过 ACLSV 发生情况和分子变异的研究 (黄妍妍, 2010; Ji et al., 2013; 姬盼 等, 2013; Chen et al., 2014; Duan et al., 2014; 刘萍, 2014)。

本研究中对东北冷寒苹果产区 ACLSV 发生情况进行系统的调查和鉴定, 以了解 ACLSV 在东北冷寒苹果产区的发生情况; 基于 25 份样品中 ACLSV 全长 CP 基因对东北冷寒苹果产区 ACLSV 的分子变异情况进行了分析, 分析了东北冷寒苹果产区 ACLSV 分离物分子变异规律及明确其相应分离物的分类地位, 为该病毒防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在内蒙古农业大学园艺与植物保护学院果树病害实验室完成。2018 年 3—6 月在吉林省、黑龙江省和内蒙古自治区随机采集 ‘黄太平’、‘金红’ 和 ‘锦绣海棠’ 等小苹果树枝条样品 165 份 (表 1), 每株树采集长 15 cm 的新生枝条, 枝条两端用石蜡封口, 用报纸包裹保存于 4 °C 冰箱备用。以青岛农业大学园艺学院徐晓召博士提供的无毒 ‘富士’ 组培苗为健康对照。

1.2 ACLSV 的分子检测和 CP 全长序列的扩增

去除采集枝条的外表皮, 刮取其韧皮部, 在研钵中使用液氮研磨成粉末, 参照 Li 等 (2011) 的方法提取总 RNA。提取的总 RNA 溶解于 50 μ L 无核糖核酸酶水中, 测定浓度并检测完整性后保存于 -86 °C 冰箱中备用。

以提取的样品总 RNA 为模板进行 ACLSV 检测。取总 RNA 1 μg 作为模板, 加入引物 Oligo (dT) ($2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL (TaKaRa), 无核糖核酸酶水补至 13 μL , 充分混匀, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min; 再依次加入 M-MLV 5 \times Reaction Buffer 4 μL 、RNA Inhibitor 1 μL 、dNTPs ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1 μL 、M-MLV 反转录酶 ($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 1 μL (Invitrogen), 总体积 20 μL 。充分混匀后, $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 70 min, $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 min。所得 cDNA 保存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用。

用于 ACLSV 检测和全长 CP 基因克隆的引物根据 GenBank 数据库中存储的 ACLSV 序列设计。引物为 ACLSV-CPF (5'-GAGARTTTCAGTTTGCTMGR-3', M = A or C; R = A or G) 根据登录号为 KC935956 ACLSV 基因序列 6 727 ~ 6 746 位核苷酸设计的, ACLSV-CPR (5'-AGTCTACAGGCTATTTATTATAAGT-3') 根据登录号为 KC935956 的 ACLSV 基因序列中 7519 ~ 7543 位核苷酸设计(上海生工生物技术有限公司), 目标片段大小为 817 bp。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 25 μL , 含 $10 \times$ PCR Buffer 2.5 μL 、 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 2.0 μL 、 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物各 1 μL 、 $5 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ Taq 酶 0.5 μL (TaKaRa)、cDNA 2.0 μL , ddH₂O 补至 25 μL 。PCR 扩增程序为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 4 min 后进入以下循环: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $64 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 保持 10 min, 反应结束后取 PCR 产物 5 μL , 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离检测, EB 染色, 凝胶成像系统成像。

1.3 PCR 产物的纯化、克隆及序列测定

PCR 产物采用琼脂凝胶回收试剂盒纯化回收, 产物与 pTOPO-TA Simple vector (北京艾德莱生物科技有限公司) 连接, 室温下 5 min, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 (TaKaRa), 涂布在含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Amp 的 LB 固体培养基上, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 12 h。随机挑选白色菌落过夜摇菌培养, 对 PCR 鉴定为阳性的菌液提取质粒, 质粒中酶切结果为阳性的送上海生工生物技术有限公司进行测序, 每个分离物测序的阳性质粒为 3 个。

1.4 序列一致性分析

采用 Vector NTI Advance11 (Thermo Fisher Scientific, USA) 对质粒测序结果进行校正和拼接, 拼接好的序列在 BLASTn 上进行同源序列检索后, 提交到 GenBank 数据库进行存储。采用 SDT 软件分别分析序列间核苷酸和氨基酸的一致性, 选择 Clustal W 算法进行对比 (Muhire et al., 2014)。

1.5 基于全长 CP 序列的系统发育分析和氨基酸多重比对

将获得的 25 个 ACLSV 分离物全长 CP 基因, 与 4 个组 (ACLSV B6、P205、SHZ 和 Ta Tao 5) 的 13 个代表株系, 共 38 个序列采用 MEGA 6.0 软件的 Neighbor Joining 法构建系统发育进化树, 自展校正值设定为 1 000, 显示系统发育树时阈值为 50% (Kumar et al., 2016); 采用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列多重比对分析。

1.6 重组分析

采用 RDP3 软件对 25 个 ACLSV 分离物的全长 CP 基因进行重组分析 (Martin et al., 2010), 分析中采用 RDP、GENECONV、BOOTSCAN、MACCHI、CHIMAERA、SISCAN、3SEQ 等 7 种方法进行重组检测分析, 分子类型选择线性。当 ≥ 5 种方法在 $P < 1.0 \times 10^{-5}$ 时, 重组事件显著; 若 $P > 1.0 \times 10^{-5}$, 检测到的重组事件被看作是假定的潜在重组事件。

2 结果与分析

2.1 ACLSV 的检测结果

小苹果枝条 165 个样品中 103 个样品可以扩增到大小约 817 bp 的预期 ACLSV 全长 CP 基因片段, 同样大小的片段在健康对照样品中未检测到。8 个采样点平均 ACLSV 在采集样品中总检出率为 60.6%, ‘金红’在 7 个采样点检出率为 52.9%~69.2%, ‘黄太平’在 4 个采样点检出率为 50.0%~70.6%, ‘锦绣海棠’在吉林公主岭检出率为 61.5% (表 1), 说明 ACLSV 在中国东北冷寒苹果产区普遍发生, 其中从黑龙江省采集的苹果样品中 ACLSV 检出率低于内蒙古自治区和吉林省采集的苹果样品。从检测为 ACLSV 阳性的 103 份苹果样品中随机选择了 25 份样品进行 ACLSV 全长 CP 基因克隆测序, 这 25 份样品来自于 8 个地区的采样点。

表 1 东北及内蒙古苹果枝条样品中 ACLSV 的检测结果
Table 1 Sample incidence of ACLSV in Northeast China and Inner Mongolia

采样地点 Location	寄主品种 Host species	样品数 Number of collected samples	检出率/% Incidence rate of ACLSV
内蒙古 Inner Mongolia	呼和浩特 Huhhot	金红 Jinhong	15
	鄂尔多斯 Ordos	金红 Jinhong	7
		黄太平 Huangtaiping	8
吉林 Jilin	赤峰 Chifeng	金红 Jinhong	13
	通辽 Tongliao	黄太平 Huangtaiping	17
	白城 Baicheng	黄太平 Huangtaiping	12
		金红 Jinhong	17
		公主岭 Gongzhuling	金红 Jinhong
黑龙江 Heilongjiang	东宁 Dongning	锦绣海棠 Jinxiuhaitang	13
		黄太平 Huangtaiping	16
	绥化 Suihua	金红 Jinhong	12
		金红 Jinhong	17

2.2 序列分析

同一个样品的 3 个克隆的测序结果是一致的。对测序结果采用 Vector NTI Advance11 软件进行校正和拼接, 共获得 25 条基因序列。将其逐条通过 BLASTn 程序在 GenBank 数据库进行同源性序列搜索, 发现获得的 25 个序列均与 ACLSV 的 CP 基因序列同源, 证明获得的 25 个序列均为 ACLSV CP 基因。25 条 ACLSV CP 基因序列 GenBank 登录号依次为 MH34879~MH34903。采用 SDT 软件分析结果表明, 该 25 个 ACLSV 分离物 CP 基因间核苷酸一致性为 84.0%~99.7%。该 25 条序列与 ACLSV B6、P205、SHZ 和 Ta Tao 5 的 13 个代表株系两两之间核苷酸一致性在 67.7%~99.7%之间; 该 25 个 ACLSV 分离物 CP 基因编码蛋白间氨基酸一致性为 90.7%~99.5%; 该 25 条序列编码蛋白与 ACLSV B6、P205、SHZ 和 Ta Tao 5 的 13 个代表株系两两之间氨基酸一致性在 71.0%~99.5%。基于上述核苷酸和氨基酸序列一致性数据可以看出, 25 个 ACLSV 分离物间在核苷酸水平存在较大变异, 在氨基酸水平变异很小。

2.3 系统发育进化分析和氨基酸多重比对

根据获得的 25 条 ACLSV 全长 CP 基因序列和 ACLSV B6、P205、SHZ、Ta Tao 5 的 13 个代表株系全长 CP 基因序列, 采用 MEGA 6.0 软件的 Neighbor Joining 法构建系统发育进化树。从系统发

育进化树(图1)上可以看到, 38个 ACLSV 分离物被分为4个组, 分别为 B6、P205、SHZ 和 Ta Tao 5, 本研究中所获得的 25 个 ACLSV 分离物分别属于 B6、P205 和 SHZ 组。ACLSV B6 和 SHZ 组在内蒙古自治区、吉林和黑龙江省均鉴定到, P205 组只在内蒙古自治区和吉林省鉴定到, 说明在中国东北和内蒙古自治区 ACLSV 分离物存在明显的群组差异。

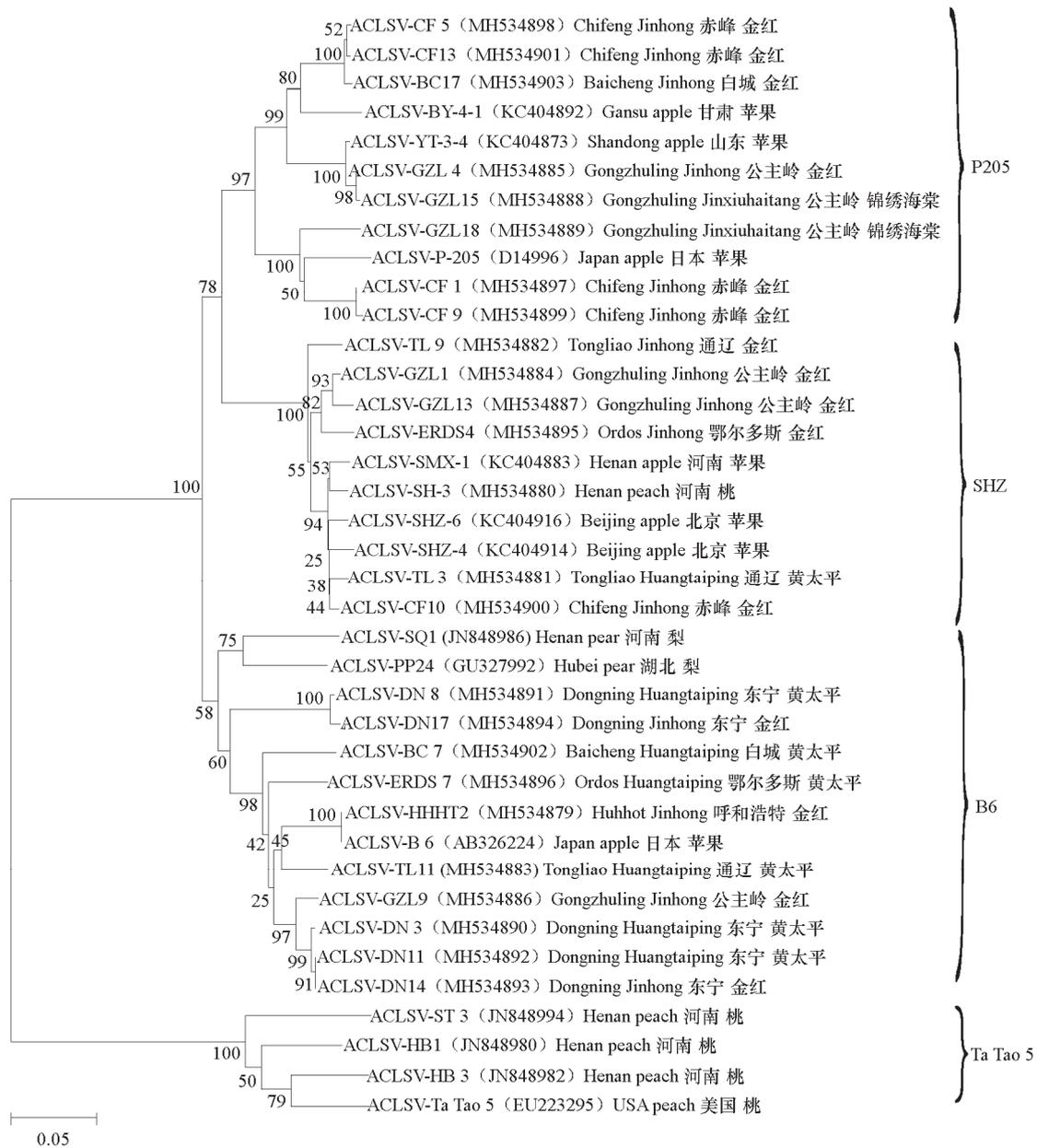


图1 25个 ACLSV 分离物与 ACLSV B6、P205、SHZ 和 Ta Tao 5 的 13 个代表株系的系统发育树
 Fig. 1 Phylogenetic tree based on CP gene nucleotide sequences of 25 ACLSV isolates under study and 13 isolates retrieved from the NCBI database

40 和 75 位点处存在共变异, B6 组和 SHZ 组 40 位为丝氨酸 (Ser) 或丙氨酸 (Ala), P205 组 40 位为丙氨酸 (Ala), Ta Tao 5 组 40 位为丝氨酸 (Ser) 或苯丙氨酸 (Phe); B6 组、SHZ 组、Ta Tao 5 组 75 位为酪氨酸 (Tyr), P205 组 75 位为苯丙氨酸 (Phe)。

2.4 重组

采用 RDP3 软件对获得的 25 条 ACLSV 全长 CP 基因序列和 ACLSV B6、P205、SHZ、Ta Tao 5 的 13 个代表株系全长 CP 基因序列进行重组分析, RDP、GENECONV、BOOTSCAN、MACCHI、CHIMAERA、SISCAN、3SEQ 等 7 种方法在上述 38 条 ACLSV 全长 CP 基因序列中均没有检测到重组事件。

3 讨论

本研究中 ACLSV 的检出率为 60.6%, 说明 ACLSV 在中国东北地区和内蒙古自治区苹果产区普遍发生, 并且在‘黄太平’、‘金红’、‘锦绣海棠’3 个小苹果品种上 ACLSV 检出率没有显著差异。该检出率与 Ji 等 (2013) 和 Duan (2014) 等对中国 12 个省份及北京市采集的 327 份苹果样品的 ACLSV 平均检出率 (69.7%) 和刘萍等 (2014) 对陕西省 550 份苹果样品的平均检出率 (67.6%) 基本持平, Ji 等 (2013)、Duan (2014) 和刘萍等 (2014) 的样品多是主栽的大苹果品种, 如富士等, 证明该病毒在中国苹果产区普遍发生, 并且大苹果品种和小苹果品种检出率基本持平。

系统发育分析将来自东北地区和内蒙古自治区的 25 个 ACLSV 分离物分至 B6、P205 和 SHZ 等 3 个组, 截至目前世界范围内 ACLSV 被划分为 B6、P205、SHZ 和 Ta Tao 5 等 4 个组, 其中 Ta Tao 5 的成员均为世界范围内的桃树分离物, 还没有其他寄主分离物成员, 由此, 可以证明 ACLSV 在东北和内蒙古自治区苹果园中存在较高的多样性。ACLSV 在系统进化上同寄主表现了一定的相关性已经被大量研究所证明 (Rwahnih et al., 2014), 在本研究中将 38 个 ACLSV 分离物划分为 4 个组, 其中 P205 组和 SHZ 组成员均为来自于苹果的 ACLSV 分离物, Ta Tao 5 的成员均为来自于桃树的 ACLSV 分离物, 只有 B6 的成员为来自于苹果和梨的 ACLSV 分离物。由于本研究获得的序列有限, 因此, ACLSV 这种在系统进化上表现出来的特点, 还需要对大量序列进行分析来证明其和寄主存在的相关性。

Yaegashi 等 (2007) 研究证明, 分别将 P205 组 CP 基因 40 位氨基酸由丙氨酸 (Ala) 突变为丝氨酸 (Ser), 或 75 位氨基酸由苯丙氨酸 (Phe) 突变为酪氨酸 (Tyr) 后, 病毒在寄主细胞中的积累减少, 两个位点同时突变后, 病毒在寄主细胞中积累没有变化。通过氨基酸序列比较发现, 在分类上属于 P205 组的 CF1、CF5、CF9、CF13、BC17、GZL4、GZL15、GZL18 这 8 个分离物与 P205 组代表株系一致, 40 和 75 位氨基酸分别为丙氨酸 (Ala) 和苯丙氨酸 (Phe), 表明这些分离物与其他 P205 组成员有相似的侵染特性。在分类上分别属于 B6 (HHHT2、Ordos7、TL11、BC7、GZL9、DN3、DN8、DN11、DN1、DN17) 和 SHZ (Ordos4、CF10、TL3、TL9、GZL1、GZL13、SH3) 组的成员, 在 40 位和 75 位这两个位置也是与代表株系是一致的, 但是这两个位置在属于这两个组的 ACLSV 株系复制中的作用还没有阐明。

本研究中没有在 25 条 ACLSV 全长 CP 基因序列中检测到重组事件, Liu 等 (2014) 基于 153 个 ACLSV 分离物的部分 CP 基因序列, 鉴定到 KC404877 和 KC04872 为重组株系, 但重组分析软件 RDP3 规定, 1 个重组事件需要被 RDP、GENECONV、BOOTSCAN、MAXCHI、CHIMAERA、SISCAN、3SEQ 等 7 种中的至少 5 种所验证, 并且每种方法的 P 值小于 10^{-5} , KC404877 和 KC04872

这 2 个株系的重组事件虽然被 7 种检测方法所验证,但是每个株系中 P 值均小于 10^{-5} 的检测方法只有 3 种,因此,这两个重组株系只能被定义为潜在的重组株系。李科等 (2015) 克隆到中国山东青岛红苹果 ACLSV 分离物全长基因组序列,在其基因组中检测到 9 个潜在的重组事件,其中重组事件 1 和 2 均被 5 种重组事件检测方法验证,证明为真实的重组事件,这两个重组事件分别发生在基因组的 6 507 ~ 6 247 nt 和 6 397 ~ 6 497 nt 间;张双纳等 (2018) 克隆到来源于辽宁省兴城市寒富苹果 ACLSV 分离物全长基因组序列,在其基因组中检测到 3 个潜在的重组事件,其中重组事件 1 和 2 均被 6 种重组事件检测方法验证,证明为真实的重组事件,这两个重组事件分别发生在 0 ~ 338 nt 和 3 611 ~ 5 033 nt 间;由此可以看出在 ACLSV 的基因组中发生重组的位置均发生在复制酶 (replicase, RdRp) 基因区域或者运动蛋白 (movement protein, MP) 基因区域。因此,本研究下一步计划扩增出 25 条 ACLSV 全长基因组序列,进一步检测和分析重组事件。

本研究中明确了 ACLSV 在中国东北地区 and 内蒙古自治区的发生情况和 ACLSV 分离物的分类地位,是对中国 ACLSV 发生情况和群体多样性的有益补充,对 ACLSV 防控有重要指导意义。

References

- Chen S, Zhou Y, Ye T, Hao L, Guo L, Fan Z, Li S, Zhou T. 2014. Genetic variation analysis of *Apple chlorotic leaf spot virus* coat protein reveals a new phylogenetic type and two recombinants in China. *Archives of Virology*, 159 (6): 1431 - 1438.
- Cui Jia-sheng, Li Xiao-ping. 2012. Apple planting in the world and apple production prospects in China. *Journal of Northern Fruit Trees*, (4): 1 - 3. (in Chinese)
- 崔家升, 李晓萍. 2012. 世界苹果种植概况与我国苹果生产前景展望. *北方果树*, (4): 1 - 3.
- Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Zhang Shao-yu, Hong Ni, Yu Ji-min. 2002. Study on stem tip culture of apple and pear trees combined with heat treatment devirus. *Journal of Northern Fruit Trees*, (2): 9 - 11. (in Chinese)
- 董雅凤, 张尊平, 张少瑜, 洪 霓, 于济民. 2002. 苹果和梨树茎尖培养结合热处理脱病毒研究. *北方果树*, (2): 9 - 11.
- Duan H, Ji Z R, Wang S T, Hu T L, Wang Y N, Cao K Q. 2014. Molecular characterization and distribution of *Apple chlorotic leaf spot virus* on apple in China. *Journal of Phytopathology*, 162 (5): 284 - 290.
- German-Retana S, Bergey B, Delbos R P, Candresse T, Dunez J. 1997. Complete nucleotide sequence of the genome of a severe cherry isolate of *Apple chlorotic leaf spot trichovirus* (ACLSV). *Archives of Virology*, 142: 833 - 841.
- German S, Candresse T, Lanneau M, Huet J C, Pernollet J C, Dunez J. 1990. Nucleotide sequence and genomic organization of *Apple chlorotic leaf spot closterovirus*. *Virology*, 179: 104 - 112.
- Hong Ni, Wang Guo-ping, Boscia D, Martelli G P. 1999. Purification and antiserum preparation of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *China Fruits*, (1): 15 - 18. (in Chinese)
- 洪 霓, 王国平, Boscia D, Martelli G P. 1999. 苹果褪绿叶斑病毒提纯及抗血清制备技术研究. *中国果树*, (1): 15 - 18.
- Huang Yan-yan. 2010. The detection and molecular identification of *Apple chlorotic leaf spot virus* and *Apple stem grooving virus* from XinJiang[M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 黄妍妍. 2010. 来源于新疆的苹果褪绿叶斑病毒和苹果茎沟病毒的检测及其分子鉴定[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Jelkmann W. 1996. The nucleotide sequence of a strain of *Apple chlorotic leaf spot virus* responsible for plum pseudopox and its relation to an apple and plum bark split strain. *Phytopathology*, 86: 101 - 111.
- Ji Pan, Wang Lian-chun, Kong Bao-hua, Li Xiao-peng, Cao Ke-qiang, Ma Jun. 2013. RT-PCR detection and sequence analysis of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV) infecting apple in Yunnan. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 28 (4): 458 - 464. (in Chinese)
- 姬 盼, 王连春, 孔宝华, 李晓鹏, 曹克强, 马 钧. 2013. 侵染云南苹果的苹果褪绿叶斑病毒的 RT-PCR 检测和序列分析. *云南农业大学学报*, 28 (4): 458 - 464.
- Ji Z, Zhao X, Duan H, Hu T, Wang S, Wang Y, Cao K. 2013. Multiplex RT-PCR detection and distribution of four apple viruses in China. *Acta Virologica*, 57 (4): 435 - 441.

- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology & Evolution*, 3 (7): 1870.
- Li Ke, Shi Hong-wei, Jing Chen-chen, Sun Xian-chao, Zhou Chang-yong, Qing Ling. 2015. Analysis of genome recombination and CP sequence diversity of ACLSV apple isolate from Shandong. *Scientia Agricultura Sinica*, 48 (14): 2857 - 2867. (in Chinese)
- 李 科, 时洪伟, 荆陈沉, 孙现超, 周长勇, 青 玲. 2015. ACLSV 山东苹果分离物基因组重组及 CP 序列多样性分析. *中国农业科学*, 48 (14): 2857 - 2867.
- Li Z N, Zhang L, Luo C, Han M, Wu Y. 2011. First report of *Apple stem pitting virus* in Shaanxi, China. *Journal of Plant Pathology*, 93 (4): S83.
- Liu P, Li Z N, Song S, Wu Y F. 2014. Molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* in Shaanxi, China. *Phytoparasitica*, 42 (4): 445 - 454.
- Liu Ping. 2014. Molecular variability and genome study of latent viruses in Shaanxi [Ph. D. Dissertation]. Yangling: Northwest A & F University. (in Chinese)
- 刘 萍. 2014. 陕西苹果潜隐性病毒分子变异与基因组研究 [博士论文]. 杨凌: 西北农林科技大学.
- Luo Gui-jie. 2008. Research on physiology character of small and medium sized apples after picking [M. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
- 罗桂杰. 2008. 中小型苹果采后贮藏生理特性的研究 [硕士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Rwahnih M A, Turturo C, Minafra A, Saldarelli P, Myrta A, Pallós V, Savino V. 2004. Molecular variability of *Apple chlorotic leaf spot virus* in different hosts and geographical regions. *Journal of Plant Pathology*, 86 (2): 117 - 122.
- Martelli G P, Minafra A, Saldarelli P. 1994. Vitivirus, a new genus of plant viruses. *Archives of Virology*, 134 (3 - 4): 451 - 455.
- Martin D P, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuve P. 2010. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26 (19): 2462 - 2463.
- Muhire B M, Varsani A, Martin D P. 2014. SDT: a virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS ONE*, 9 (9): e108277.
- Sato K, Yoshikawa N, Takahashi T. 1993. Complete nucleotide sequence of the genome of an apple isolate of *Apple chlorotic leaf spot virus*. *Journal of General Virology*, 74: 1927 - 1931.
- Song Y S, Hong N, Wang L P, Hu H J, Tian R, Xu W X, Ding F, Wang G P. 2011. Molecular and serological diversity in *Apple chlorotic leaf spot virus* from sand pear (*Pyrus pyrifolia*) in China. *European Journal Plant Pathology*, 130: 183 - 196.
- Yaegashi H, Isogai M, Tajima H, Sanoand T, Yoshikawa N. 2007. Combinations of two amino acids (Ala40 and Phe75 or Ser40 and Tyr75) in the coat protein of *Apple chlorotic leaf spot virus* are crucial for infectivity. *Journal of General Virology*, 88 (9): 2611 - 2618.
- Ye Xiu-yun, Wang Bao-xia, Bao Mu-lin, Fu Jian-ping. 2012. The new variety of small apple is the breeding of beautiful begonia. *China Fruits*, (6): 5. (in Chinese)
- 叶秀云, 王宝侠, 包木林, 付建平. 2012. 小苹果新品系锦绣海棠的选育. *中国果树*, (6): 5.
- Zhang Shuang-na, Li Zheng-nan, Zhang Zun-ping, Fan Xu-dong, Ren Fang, Hu Guo-jun, Dong Ya-feng. 2018. Biology and complete genome of *Apple chlorotic leaf spot virus* Liaoning isolate. *Acta Phytopathologica Sinica*, 48 (5): 716 - 720. (in Chinese)
- 张双纳, 李正男, 张尊平, 范旭东, 任 芳, 胡国君, 董雅凤. 2018. 苹果褪绿叶斑病毒辽宁分离物生物学和基因组研究. *植物病理学报*, 48 (5): 716 - 720.