

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.02.030

中国西南主要苹果产区潜隐性病毒分子鉴定

姚润东, 史文森, 孙吴润泽, 黄奎, 王健美

(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064)

摘要: 为了深入了解苹果受潜隐性病毒的影响情况, 本研究针对云南、贵州、四川三省的387份苹果叶片样本, 利用RT-PCR及多重RT-PCR技术, 分析鉴定了三种苹果潜隐性病毒——苹果茎痘病毒(ASPV)、苹果茎沟病毒(ASGV)和苹果褪绿叶斑病毒(ACLSV)在苹果上的发生现状。结果显示, 苹果样本中ASPV阳性率为89.4%, ASGV阳性率为100%, ACLSV阳性率为81.6%, 且它们多为混合感染, 共计304份样本同时感染了三种病毒, 混合感染率为78.5%。与云南、贵州相比, 采自四川的苹果样本受潜隐性病毒感染最为严重。本研究报道了我国西南苹果主产区潜隐性病毒感染现状, 建立了一套快速有效的苹果潜隐性病毒分子生物学鉴定方法。

关键词: 潜隐性病毒; 苹果茎痘病毒; 苹果茎沟病毒; 苹果褪绿叶斑病毒; 逆转录聚合酶链反应
中图分类号: Q945.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)02-0357-06

The molecular identification of latent viruses in the main apple production areas in Southwest China

YAO Run-Dong, SHI Wen-Sen, SUNWU Run-Ze, HUANG Kui, WANG Jian-Mei

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: In order to gain a further study of the impact of apples on the latent virus, 387 samples of apple leaves from the provinces of Yunnan, Sichuan and Guizhou were collected in this study. Three kinds of apple latent viruses, including ASPV (Apple stem pitting virus), ASGV (Apple stem grooving virus) and ACLSV (Apple chlorotic leaf spot virus), were analyzed and identified by RT-PCR (Reverse Transcription PCR) and multiplex RT-PCR. The results demonstrated that the incidence rate of ASPV, ASGV, and ACLSV was 89.4%, 100%, and 81.6%, respectively. In addition, 304 out of 387 samples were co-infected by all three viruses. Compared with Yunnan and Guizhou provinces, apple samples collected from Sichuan province are most seriously infected by the apple latent viruses. The status of latent viruses infection in the main apple producing areas in Southwest China is first reported in this study, a set of rapid and effective molecular method for latent viruses identification is established.

Keywords: Latent virus; ASPV; ASGV; ACLSV; RT-PCR

收稿日期: 2018-02-12

基金项目: 国家转基因重大专项(2016ZX08009003-002)

作者简介: 姚润东(1992-), 男, 甘肃省嘉峪关人, 硕士研究生, 从事植物生物技术研究. E-mail: iamyrd@163.com

通讯作者: 王健美. E-mail: wangjianmei@scu.edu.cn

1 引言

苹果(*Malus domestica* Borkh.)作为重要的经济果树之一,在世界各地广泛种植,并选育出了很多优良品种.中国是苹果的起源地,也是世界上最大的苹果资源、生产和消费国^[1].我国苹果主产区包括渤海湾产区、黄土高原产区、黄河故道产区以及西南冷凉高地产区^[2].随着苹果产业的不断发展,病毒病在世界各地广泛分布,严重影响树势、产量及果品质量^[3].

国外研究者早在 19 世纪 20 年代就开始研究苹果病毒病,我国在 20 世纪 80 年代才开始进行相关调查、鉴定和研究工作^[4].到目前为止,我国已鉴定明确的苹果病毒有 17 种,其中 4 种病毒和 1 种类病毒在我国普遍发生^[2],即苹果茎痘病毒(Apple stem pitting virus, ASPV)、苹果茎沟病毒(Apple stem grooving virus, ASGV)、苹果褪绿叶斑病毒(Apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、苹果花叶病毒(Apple mosaic virus, ApMV)和苹果锈果类病毒(Apple scar skin viroid, ASSV).根据病毒的危害特点,可以将其分为非潜隐性病毒和潜隐性病毒. ApMV 和 ASSV 属于非潜隐性病毒,在苹果叶片或果实上有明显的病症表现,通常作为田间初步诊断的依据^[5].而 ASPV、ASGV 和 ACLSV 属于潜隐性病毒,一般不会引起明显的树体病症,因而无法通过观察来判断苹果是否感病.但也有研究发现,该类病毒以梨树作为寄主时,会造成植物叶脉黄化,叶片出现黑色坏死斑点或红色斑点等症状^[6].

上述三种潜隐性病毒均为弯曲线性病毒科(*Flexiviridae*)单链正义链 RNA 病毒,粒子呈长线状或丝状,基因组 RNA 可以在寄主体内直接指导合成与病毒复制、感染相关的蛋白^[7].有研究发现潜隐性病毒造成树势衰弱,苹果减产,严重的会影响果树的根系木质部发育^[8].并且,苹果病毒病多为系统性侵染病害,主要通过嫁接与机械接种传播^[7].在农业生产上,控制苹果病毒传播的有效方式是通过生产无毒苗木作为嫁接原始材料.无论是在田间病毒鉴定过程中,还是在无毒苗木生产过程中,潜隐性病毒的分子生物学鉴定显得十分重要.前期许多分子生物学研究表明, ASPV、ASGV 和 ACLSV 在我国东北、华北、西北苹果主产区普遍发生,感染率很高,且多表现为复合感染^[9].

得益于特殊的地理位置和气候条件,西南的四川省盐源县、云南省昭通市和贵州省威宁县等地区逐渐成为我国重要的苹果产区,而与这些地区苹果产业有关的研究相对落后,亟待开展.在苹果病毒病研究方面,谢吉鹏等研究表明云南部分地区苹果潜隐性病毒感染率为 50%~70%^[10];孔宝华和姬盼等检测并分析了云南部分苹果产区 ASGV 和 ACLSV 分子变异性^[11,12].但是,针对四川和贵州苹果潜隐性病毒的研究未见报道.

本研究从云、贵、川三个省份的 18 个苹果园进行随机采样,共采集苹果叶片样本 387 份,在实验室条件下通过 RT-PCR 方法分析鉴定三种潜隐性病毒.结果表明,上述地区苹果植株普遍携带 ASPV、ASGV 和 ACLSV,而且表现出复合感染,共计 304 份样本同时感染了三种病毒.该研究首次报道了我国西南苹果主产区潜隐性病毒感染情况,建立了快速有效的潜隐性病毒分子鉴定方法,为更好地指导上述地区苹果病害防治和脱毒苗木生产奠定了基础.

2 材料与方法

2.1 实验材料

2016 年 6 月至 2017 年 9 月,在四川省、云南省和贵州省内 18 个苹果园进行随机采样,共采集苹果叶片样本 387 份,分别用 S、Y、G 三个字母对样品进行顺序编号(表 1),液氮低温冻存带回实验室检测分析.

表 1 中国西南苹果主产区样本分布

Tab. 1 Samples of apple leaves collected from the main apple production areas in Southwest China

编号首字母	采样地点	苹果品种	样品数量
S	四川省盐源县	富士、嘎拉、红星	166
Y	云南省昭通市	富士、金冠	126
G	贵州省威宁县	富士、金冠	95

2.2 实验方法

2.2.1 引物筛选与合成 根据文献报道的 ASPV、ASGV 和 ACLSV 引物序列和 NCBI 数据库中相应病毒外壳蛋白序列,初步筛选出 6 对特异性引物,并进一步根据实际 PCR 扩增结果确定出 3 对特异性好的病毒引物和 1 对苹果内参引物(表 2).所有引物序列均由华大基因公司合成,稀释为 10 μ M 使用.

表 2 苹果潜隐性病毒 RT-PCR 扩增引物及目的片段

Tab. 2 The primers and expected products of the latent viruses for RT-PCR

基因	引物	引物序列	产物(bp)	参考文献
Genes	Primers	Sequence 5'→3'	Products	References
ACTIN	For	GGATTTGCTGGTGATGATGCT	178	Qin <i>et al.</i> (2015)
	Rev	AGTTGCTCACTATGCCGTGC		
ASPV	For	ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA	370	Menzel <i>et al.</i> (2002)
	Rev	TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATAA		
ASGV	For	CTGCAAGACCGCGACCAAGTTT	524	Kenzie <i>et al.</i> (1997)
	Rev	CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC		
ACLSV	For	CAGACCCCTTCATGGAAAGACAG	630	Kumar <i>et al.</i> (2012)
	Rev	TGACTCTTTATACTCTTTCATGGGTTTC		

2.2.2 苹果叶片总 RNA 提取 利用 Trizol 法和改良 CTAB 法分别提取苹果叶片总 RNA, Trizol 法提取步骤依照 TaKaRa 公司说明书进行. 改良 CTAB 法需配合 β -巯基乙醇使用, 要求称取适量叶片在液氮中快速研磨至粉末状, 并将其放入预热处理的 CTAB 提取液中涡旋混匀, 经氯仿: 异戊醇 (24:1) 抽提两次后, 用高浓度 LiCl 溶液在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下沉淀 RNA 约 3 h, 最后离心并用 75% 和 100% 的乙醇依次洗涤白色沉淀, 将沉淀晾干后加入适量不含 RNA 酶的去离子水溶解得到总 RNA, 接着对其进行浓度与纯度的测定, 选择质量较高的总 RNA 用于电泳鉴定. 取 $3\text{ }\mu\text{L}$ 总 RNA 上样于 0.8% 的琼脂糖凝胶中电泳, 缓冲液为 $1\times\text{TAE}$ 溶液, 120 V 电泳 10 min, 溴化乙锭染色后在凝胶成像系统下观测电泳结果并拍照记录.

2.2.3 cDNA 的合成 合成 cDNA 的反应体系参照 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明进行. 反转录体系先在 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行去除 DNA 污染的操作, 接着选用随机引物作为第一链合成的引物, 加入到之前的反应体系中分别在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下恒温孵育 15 min 和 5 s, 最后将反转录成好的 cDNA 保存在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用.

2.2.4 PCR 反应扩增 通过温度梯度 PCR 对各个病毒引物进行最适退火温度的筛选, 与此同时, 优化引物使用浓度和 cDNA 模板用量, 确定 RT-PCR 的最佳反应程序和反应条件. 检测各病毒所选用的反应体系均为 $20\text{ }\mu\text{L}$, 模板量均为 $1\text{ }\mu\text{L}$, 上下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, PCR 扩增所用 rTaq 酶及缓冲液均采用 TaKaRa 公司产品. 在各病毒引物最适宜的退火温度下扩增 34 个循环, 扩增反应结束后取 $2\text{ }\mu\text{L}$ 反应液上样于 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 缓冲液为 $1\times\text{TAE}$ 溶液, 120 V 电泳 25 min, 溴化乙

锭染色后在凝胶成像系统下观测电泳结果.

2.2.5 多重 PCR 反应扩增 在上述 PCR 反应的基础上, 通过对模板量、引物用量、退火温度等因素的进一步优化, 确定多重 RT-PCR 的最佳反应程序和反应条件, 以此在同一个反应体系中扩增得到包括苹果内参基因在内的多个病毒产物, 提高检测鉴定的有效性. 检测体系为 $30\text{ }\mu\text{L}$, 模板量为 $3\text{ }\mu\text{L}$, ASPV 引物用量为 $1\text{ }\mu\text{L}$, ASGV 引物用量为 $1\text{ }\mu\text{L}$, ACLSV 引物用量为 $1.4\text{ }\mu\text{L}$, 苹果内参引物用量为 $1\text{ }\mu\text{L}$. 反应体系先在 $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下扩增 4 个循环, 接着在 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下扩增 30 个循环. 待反应结束后, 取 $6\text{ }\mu\text{L}$ 反应液上样于 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳, 最后观测电泳结果并拍照记录.

3 结果与分析

3.1 改良 CTAB 法与 Trizol 法提取苹果叶片总 RNA 效果比较

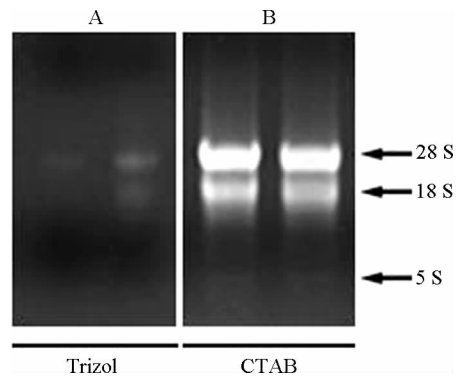


图 1 两种方法提取总 RNA 效果比较
Fig. 1 The effects of two total RNA extraction methods

A: The total RNA extracted by Trizol,
B: The total RNA extracted by CTAB

Trizol 法和改良 CTAB 法提取的总 RNA 经

0.8%凝胶电泳检测结果表明,两种方法均能提取出苹果成熟叶片总 RNA,电泳胶呈现 28S 和 18S 谱带,亮度比大约为 2:1(图 1 所示). Trizol 法虽然提取过程简便,灵活性较高,但所得 RNA 浓度较低,电泳并未呈现 5S 谱带,完整性较差,这些都会影响下一步 cDNA 的合成,从而影响病毒检测的结果. 比较而言,改良 CTAB 法更适合木本植物的总 RNA 提取,电泳时 28S、18S 和 5S 谱带都较为清晰, RNA 浓度较高,更有利于下游实验的进行,但缺点在于提取过程较为复杂,耗时较长. 为了真实客观地反应 RT-PCR 的检测结果,本研究选用提取总 RNA 效果更好的改良 CTAB 法.

3.2 苹果潜隐性病毒鉴定

根据前期试验已建立的 RT-PCR 检测体系,对不同苹果种植区所采集的苹果叶片样本进行特异性病毒检测,结果显示(图 2 所示),所用检测体系均能稳定扩增出与引物范围相同大小的目的条带. 2 μ L 反应液在电泳后可以得到清晰高亮条带,无非特异性杂带. ASPV 的条带大小为 375 bp, ASGV 的条带大小为 520 bp, ACLSV 的条带大小为 670 bp,将阳性样本 RT-PCR 扩增出的三个目的条带切胶回收并纯化后进行测序比对,发现它们与 NCBI 数据库中已报道的序列相似度很高,分别达到了 95%、98%和 96%. 与此同时,采用苹果基因 Actin 作为内参基因,在所有样本中也同样扩增得到了该基因片段. 以上结果说明 RT-PCR 方法可以快速有效地准确检测出样本中的潜隐性病毒,检测水平具有很高的灵敏性,且检测结果有可靠性.

3.3 西南苹果主产区潜隐性病毒感染情况

分别用三对特异性引物对所有样品进行 RT-PCR 检测,结果显示在 387 份样品中,346 份样品检测出 ASPV,阳性率为 89.4%; ASGV 在所有样品中均能够检测得到,阳性率为 100%; 316 份样品检测出 ACLSV,阳性率为 81.6%. 另外,304 份苹果叶片样本均能够检测出三种病毒,说明这些样本多为混合感染,混合感染率为 78.5%(图 3 所示).

从不同苹果主产区来看, ASPV 和 ASGV 的感染情况基本相同,而 ACLSV 在四川盐源县最为严重,感染率达 85.5%, ACLSV 在云南昭通市感染率相对较低. 此外,四川盐源县苹果产区受三种潜隐性病毒混合感染较为严重,混合感染率达 83.1%,而云南昭通市苹果产区感病相对较弱,混合感染率为 73.8%,贵州威宁县的感病情况介于

两者之间(图 4 所示).

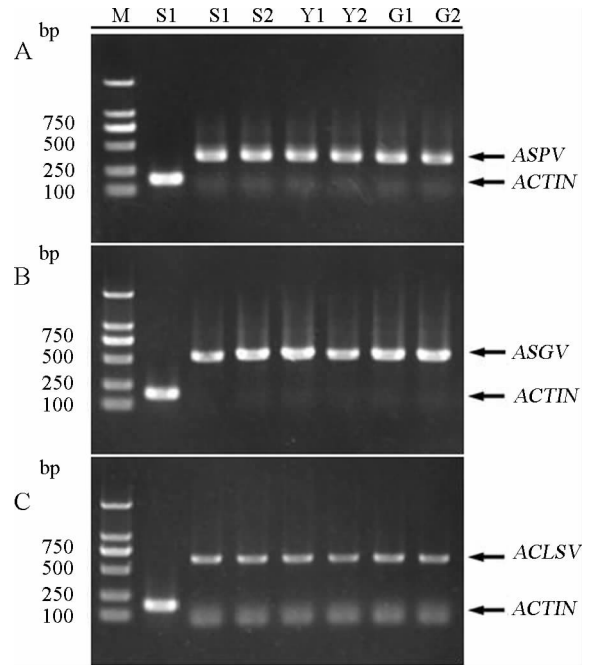


图 2 苹果潜隐性病毒 RT-PCR 分子鉴定

Fig. 2 The detection of latent viruses infected apple leaves by RT-PCR

M: marker. A/B/C: The detection of ASPV, ASGV and ACLSV in the gel. S1/S2: samples of apple leaves from Sichuan Province. Y1/Y2: samples of apple leaves from Yunnan Province. G1/G2: samples of apple leaves from Guizhou Province. Arrows: the expected products for virus and internal reference.

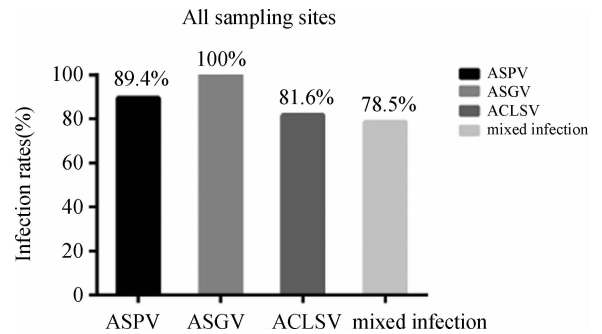


图 3 西南地区苹果潜隐性病毒感染率

Fig. 3 The infection rates of latent virus in apple in Southwest China

3.4 多重 RT-PCR 体系检测苹果病毒

本研究在前期试验中,对酶浓度、引物浓度、退火温度、cDNA 模板量及缓冲液进行了优化,成功建立可同时检测 ASPV、ASGV 和 ACLSV 这三种潜隐病毒的多重 RT-PCR 检测体系,我们利用该体系在之前的研究结果之上再次对混合侵染的苹果样本加以检测应用,试图确定多重 RT-PCR 方法在多病毒鉴定中的可行性和高效性. 与单一 RT-

PCR 检测结果比较, 多重 PCR 体系可以在同一反应条件下扩增得到包括苹果内参基因片段在内的三个病毒外壳蛋白分子片段, 纯化得到的条带经测序比对, 与之前的结果一致. 由于多对引物间存在模板竞争, 使得扩增产物的浓度明显降低(图 5 所示). 综合以上结果, 多数苹果叶片呈混合感染状态, 可以由多重 RT-PCR 体系检测出共同感染植物的潜隐性病毒, 保证多样本多病毒分子鉴定高效简便.

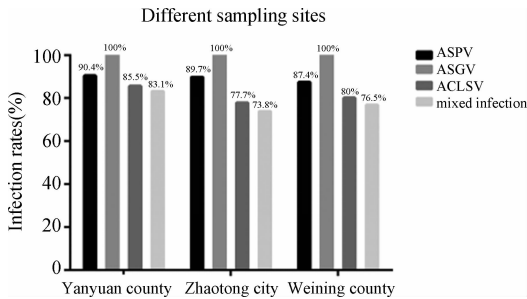


图 4 各采样地苹果潜隐性病毒感染率

Fig. 4 The infection rates of latent virus in apple in different sampling sites

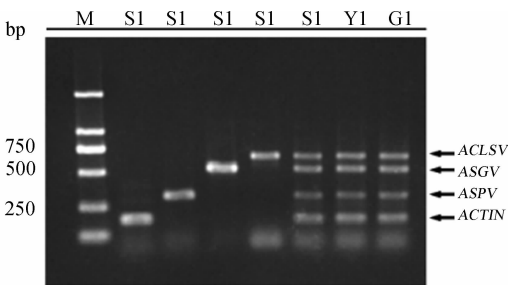


图 5 多重 RT-PCR 体系鉴定多种苹果潜隐性病毒

Fig. 5 The detection of the three latent viruses in apple leaves by multiplex RT-PCR

M: marker. S1/Y1/G1: the samples of apple leaves from different regions. Arrows: the expected products for virus and internal reference.

4 讨论

基于 RT-PCR 技术快速、特异、灵敏的优势, 它被广泛应用于植物病毒的诊断和检测^[13]. 对试验材料进行总 RNA 的提取, 并保证 RNA 质量完好, 是 RT-PCR 技术成败的关键环节. 苹果作为木本植物含有大量多糖、多酚及其他次生代谢物, 常规的总 RNA 提取方法并不能满足试验需求, 研究中通常采用 CTAB 法和 SDS 法^[14]. 本研究结果表明改良的 CTAB 法适合苹果叶片总 RNA 提取, CTAB 作为一种强变性剂能够去除蛋白等杂质, 试剂中的 β -巯基乙醇可以有效阻止酚类物质氧化, 避免氧化后的产物与 RNA 不可逆地结合,

PVP 可以吸附酚类、多糖和其他次生代谢物. 此外, 改进的提取液中加入的亚精胺能够结合并沉淀 DNA, 经多次抽提后用高浓度的 LiCl 可以选择性沉淀 RNA. 虽然此方法提取步骤复杂, 耗时较长, 但是所得总 RNA 纯度和完整性更好, 有益于反转录合成高质量的 cDNA 模板.

此后, 用筛选得到的 3 对病毒引物进行 RT-PCR 扩增, 均能特异性地扩增得到目的片段, 进一步证实了 PCR 在病毒检测应用上的可靠性和稳定性. 但这种方法对检测引物的要求较高, 既要保证引物与病毒分子的特异性结合, 也要保证引物不能与苹果基因组结合, 以此排除假阳性结果的影响. 另外, 本研究利用已建立的多重 RT-PCR 检测体系在多病毒鉴定过程中简化了操作程序, 也减少了试剂的浪费, 缩短了检测时间. 但是, 我们的体系与其他研究相比还需要进一步改进^[15], 比如引物用量和模板量较高, 扩增体系的体积较大等, 这些都与引物的质量及反应条件密不可分, 必需确保引物间不存在自身匹配和竞争性扩增^[16,17]. 最后, 多重 RT-PCR 的检测结果与单一的 RT-PCR 结果一致, 在 387 份样品中, 346 份样品检测出 ASPV, 阳性率为 89.4%; ASGV 在所有样品中均能够检测得到, 阳性率为 100%; 316 份样品检测出 ACLSV, 阳性率为 81.6%; 304 份样品呈现三种潜隐性病毒的混合感染, 混合感染率为 78.5%.

我国自开展病毒研究工作以来, 已在多个苹果主要种植区对潜隐性病毒的分布进行过较为详细的报道. 胡国军等利用 RT-PCR 的方法对我国 10 个果园的 141 个苹果叶片样品进行分子检测, 结果显示 ASPV 的发生率为 60%, ASGV 的带发生为 66%, ACLSV 的发生率为 58.9%, 三种病毒的混合感染率为 55%^[3]; 郝璐等对我国北方部分苹果主产区二百多份样品进行 RT-PCR 检测, 发现它们在不同地区的发生率均高于 60%, 部分地区甚至高达 100%^[9]; 陈红霞等对我国八个省份的部分苹果园调查研究表明, ASPV 的发生率在 40% 以上, ASGV 的发生率高达 100%, ACLSV 的发生率为 40%^[18]. 总体来看, 我国苹果主产区主栽品种和矮化砧木普遍携带潜隐性病毒^[2,3]. 本研究结果表明, 西南地区三种苹果潜隐性病毒的感染率均高于我国多数北方地区, 三种病毒的混合感染情况非常严重. 可能的原因是受地理环境的限制, 带毒植株会作为嫁接材料在西南苹果高密度地区广泛传播, 且潮湿温和的气候条件会加快果树病毒的繁殖, 而

较为落后的果园管理条件无法提高果树对病毒的抵抗力,使得病毒在该地区发生非常普遍^[19,20]。此前,已有报道对云南省苹果潜隐性病毒进行了研究^[10],与其相比,我们的结果显示云南省苹果病毒的感染率有所上升,ASGV 感染率高达 100%。三个采样地的 ASPV 和 ASGV 感染情况相近,但四川苹果产区 ACLSV 的感染率明显高于云南省和贵州省,且具有病毒混合感染率高的特点,贵州省苹果病毒感染情况介于二者之间。潜隐性病毒对果树造成慢性侵害,使果树苗木生长发育不良,带毒果树的树体生长量比健康果树减少 10%~36%,果实产量降低,平均减产 16%~46%^[2,5]。因此,苹果病毒病造成的危害在短时间内可能无法预估,在生产栽培过程中应引起果农和研究者的重视。

潜隐性病毒在我国各苹果主产区均有较为严重的分布。目前,这些病毒并没有非常有效的防治方式,在接下来的工作中应把重心放在病毒脱毒研究中,通过组织培养技术生产无毒苗木,以此阻断病毒的传播和扩散。另外,还应加强果树种植区的水肥管理和建设,开展果树遗传转化研究,提高果树对病害的抗性,使果树更加适应逆境胁迫。

参考文献:

- [1] Duan N, Bai Y, Sun H, *et al.* Genome re-sequencing reveals the history of apple and supports a two-stage model for fruit enlargement [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 249.
- [2] 王亚南, 胡同乐, 刘淑香, 等. 我国苹果病毒病的研究现状 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38: 15.
- [3] 胡国君, 张尊平, 范旭东, 等. 我国主要苹果病毒及其研究进展 [J]. *中国果树*, 2017, 3: 71.
- [4] 刘福昌. 苹果病毒及病毒病害简述 [J]. *中国果树*, 1980, 1: 77.
- [5] 王国平, 洪霓. 我国落叶果树的病毒病及其研究现状 [J]. *中国果树*, 1997, 3: 43.
- [6] Kundu J K, Yoshikawa N. Apple stem pitting virus [M]. USA: Studium Press LLC, 2008: 1.
- [7] Lewsey M G, Carr J P. Plant Pathogens; RNA viruses [J]. *Encyclop Microbio*, 2009, 1: 443.
- [8] Jelkmann W, Paunovic S. Apple stem pitting virus [M]. *Integrated Pest Management Program*, 2011.
- [9] 郝璐, 叶婷, 陈善义, 等. 我国北方部分苹果主产区病毒病的发生与检测 [J]. *植物保护*, 2015, 2: 158.
- [10] 谢吉鹏 王少杰, 龚卓群, 等. 云南部分地区苹果样品病毒和类病毒的检测 [C]// 中国植物病理学会青年学术研讨会论文选编. 中国山东泰安, 2015.
- [11] 姬盼, 王连春, 孔宝华, 等. 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 [J]. *云南农业大学学报: 自然科学*, 2013, 4: 458.
- [12] 姬盼, 王连春, 孔宝华, 等. 云南苹果产区苹果茎沟病毒(ASGV)的发现及其分子变异 [J]. *果树学报*, 2013, 3: 397.
- [13] Kundu J K. The application of RT-PCR assay for the detection of apple stem pitting virus and apple stem grooving virus in four apple cultivars [J]. *Plant Prot Sci*, 2002, 38: 13.
- [14] Gambino G, Perrone I, Gribaudo I, A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants [J]. *Phytochem Anal*, 2008, 19: 520.
- [15] Ji Z, Zhao X, Duan H, *et al.* Multiplex RT-PCR detection and distribution of four apple viruses in China [J]. *Acta Virologica*, 2013, 57: 435.
- [16] 胡娜, 杨千, 李晨阳, 等. 麻疯树适生区域土壤 DNA 提取及多重 PCR 验证 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2016, 3: 683.
- [17] 杨帆, 王红宁, 张安云, 等. 多重 PCR 检测病死鸡中沙门氏菌方法的研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2015, 1: 163.
- [18] 陈红霞, 邵建柱, 孙建设, 等. 两步多重 RT-PCR 快速检测苹果潜隐性病毒 [J]. *果树学报*, 2012, 4: 695.
- [19] 孔宝华, 姬盼, 马学林, 云南苹果病害的调查与鉴定 [J]. *云南农业大学学报*, 2014, 29: 135.
- [20] 杨毅娟, 李永青, 陈敏. 云南昭通苹果几种主要病害发生特点及防治对策 [J]. *中国果树*, 2017, 2: 72.

引用本文格式:

中文: 姚润东, 史文森, 孙吴润泽, 等. 中国西南主要苹果产区潜隐性病毒分子鉴定 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2019, 56: 357.

英文: Yao R D, Shi W S, Sun Wu R Z, *et al.* The molecular identification of latent viruses in the main apple production areas in Southwest China [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 357.