

双重 RT-PCR 法同步检测单头异沙叶蝉携带的两种小麦病毒

杜真真, 刘艳*, 王锡锋

(中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 异沙叶蝉可传播小麦矮缩病毒 *Wheat dwarf virus* (WDV) 和小麦黄条纹病毒 *Wheat yellow striate virus* (WYSV) 两种病毒。本文根据 WDV 和 WYSV 的基因序列分别设计两种病毒的特异性引物对, 以含有上述两种病毒的异沙叶蝉样品总 RNA 为模板, 以随机引物为 3' 端通用引物反转录获得 cDNA, 然后在同一个 PCR 反应体系加入两对引物, 分别得到与预期相符的 773 bp 和 322 bp 扩增产物条带。通过对引物浓度、dNTP 和 *rTaq* 用量以及退火温度等条件进行优化, 建立了能在同一异沙叶蝉体内检测 WDV 与 WYSV 两种小麦病毒的双重 RT-PCR 方法。该双重 PCR 方法特异性强、敏感性高, 可以快速准确地在一个体系里同步检测介体昆虫体内的两种病毒, 有效地检测虫体内病毒带毒率, 这些结果可为病毒预测预报和病害防治提供参考。

关键词 异沙叶蝉; 小麦矮缩病毒; 小麦黄条纹病毒; 双重 RT-PCR

中图分类号: S 435.12 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019079

Simultaneous detection of two wheat viruses harbored by a single leafhopper (*Psammotettix alienus*) by duplex RT-PCR

DU Zhenzhen, LIU Yan*, WANG Xifeng

(State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract It was found that the leafhopper (*Psammotettix alienus*) can transmit both *Wheat dwarf virus* (WDV) and wheat-infecting virus-Wheat yellow striate virus (WYSV). Here, the specific primer sets for WDV and WYSV were designed according to viral genomic sequences, respectively. Total RNA of leafhopper, which was positive for both WYSV and WDV, was used as a template for the first strand cDNA synthesis. Reverse-transcription was performed using random primer as 3' primer for each virus. WDV and WYSV specific primer sets was then added into the PCR system producing two distinct fragments of 773 and 322 bp, respectively. A method of duplex reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was developed for the simultaneous detection of WDV and WYSV in single leafhopper. The specific reagents and enzymes in the duplex RT-PCR reaction system, primers, dNTPs, and *rTaq* were first optimized by testing different concentrations and volumes of these components and the annealing temperature was then optimized. Thus, the duplex RT-PCR method optimized in this study was to develop and validate a highly specific and simple RT-PCR method for accurate detection of two viruliferous rates of leafhopper population, which could facilitate better forecasting and control of the virus diseases.

Key words *Psammotettix alienus*; *Wheat dwarf virus*; wheat yellow striate virus; duplex RT-PCR

异沙叶蝉 *Psammotettix alienus* Linnaeus 是一种农业害虫, 隶属于半翅目叶蝉科 Cicadellidae 沙叶蝉属 *Psammotettix*^[1]。它广泛分布于欧洲、非洲北部、北美及亚洲中北部地区, 同时也是我国西北、华

北地区干旱、半干旱地区麦田叶蝉的优势种^[2-3]。异沙叶蝉不仅通过刺吸小麦、大麦等多种禾本科农作物植株的茎、叶汁液对作物造成危害,更为重要的是它在取食的同时可传播多种病毒。因此,异沙叶蝉的大发生往往同时伴随着这些病毒病害的大面积流行,其传播病毒造成的危害远大于直接取食,给粮食作物生产带来了严重的损失。

由异沙叶蝉以持久性非增殖方式传播的小麦矮缩病毒 *Wheat dwarf virus* (WDV) 属于双生病毒科 *Geminiviridae* 玉米线条病毒属 *Mastrevirus* 的成员之一,病毒全基因组由 2 739~2 750 个核苷酸组成,为单链环状 DNA 病毒^[4-5]。感染小麦矮缩病毒的植株多表现严重矮化,分蘖增多,甚至无法抽穗。小麦矮缩病是小麦生产上威胁性较大的病害之一,在全世界小麦主产区特别是欧洲各国多次流行造成小麦严重减产^[6]。此外,近年来发现异沙叶蝉还能以持久性增殖方式传播小麦黄条纹病毒 *Wheat yellow striate virus* (WYSV)。小麦黄条纹病毒是 2016 年在陕西韩城田间发现的一种危害小麦的负单链 RNA 新病毒,该病毒基因组全长为 14 486 nt,以“N-P-P3-M-G-P6-L”顺序依次编码 7 种结构蛋白,是弹状病毒科 *Rhabdoviridae* 细胞核弹状属病毒 *Nucleorhabdovirus* 的暂定种^[7]。与被小麦矮缩病毒侵染后产生的症状不同,感染小麦黄条纹病毒的小麦无明显矮化,发病植株叶片沿叶脉失绿、严重黄化,并从叶尖干枯开始逐渐发展为整株叶片枯死。WYSV 可侵染小麦、大麦以及燕麦等多种麦类作物,是生产上一种潜在的威胁。

带毒介体的病毒检测通常采用血清学和分子生物学等手段^[8-10]。血清学具有快速简便、高通量等优点,但对抗体的特异性有较高要求。分子检测技术因其快速、灵敏、特异、准确等优点被广泛应用于带毒介体的快速检测和鉴定^[11-13]。多重 PCR 是一种 PCR 衍生方法,它的基本原理、反应试剂和操作均与常规 PCR 相同,区别在于多重 PCR 体系中含有 2 对或多对引物,分别扩增不同模板,可对多个靶标进行同时检测。本研究针对异沙叶蝉体内携带的 WDV 和 WYSV 两种病毒设计特异性引物,优化反应和扩增条件,建立了特异、高效的双重 PCR 检测

体系,实现了同一虫体两种病毒的同步检测,为病毒预测预报提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试异沙叶蝉的来源与保存

异沙叶蝉采自陕西韩城普通小麦田块。经 PCR 检测无毒的异沙叶蝉后代种群在健康小麦上扣罩饲养繁殖。WDV 和 WYSV 病毒分离物在小麦品种‘扬麦 12’上经异沙叶蝉传毒繁殖,常年保存在 22℃±1℃,20 000 lx 的光照培养箱中。无毒异沙叶蝉 2 龄若虫取食 WDV 和 WYSV 病毒毒株 4 d 后转移到健康小麦上备用。

1.2 异沙叶蝉总 RNA 的提取

将单头新鲜或冰冻的异沙叶蝉放入 1.5 mL 离心管中,用带有无线电动机的研杵(北京天根生化科技有限公司)研磨数秒之后迅速转移入液氮中冷冻,重复直至异沙叶蝉被充分研磨至粉末状,然后加入 200 μ L TRIzol(Invitrogen, USA),剧烈摇晃混匀,冰上静置 5 min;加入 40 μ L 氯仿,用力摇 15 s,冰上静置 5 min;4℃,12 000 r/min 离心 10 min;将上清转入新的离心管加入与上清等体积的异丙醇,轻轻颠倒混匀,冰上静置 10 min;4℃,12 000 r/min 离心 15 min,去上清;加入 500 μ L 预冷的 75%乙醇(灭菌的 DEPC 水配制),洗涤沉淀。4℃,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复上述洗涤步骤,以彻底洗干净盐分;真空干燥后用 15 μ L 灭菌的 DEPC 水溶解。

1.3 特异性引物的设计

比对 GenBank 中已报道的 WDV(GenBank no. KJ536138)和 WYSV(GenBank no. MG604920)的病毒全基因组序列,发现这两种病毒的序列全长分别为 2 750 bp 和 14 486 bp,同源性极低。分别根据两种病毒的外壳蛋白基因及部分上下游序列区域,应用 Primer Premier 6.0 软件设计这两种病毒的多对特异性检测引物,每对引物选择相似的退火温度且不同的 PCR 产物大小及避免二级结构和引物之间的互作,经 RT-PCR 验证特异性最终选择其中两对引物作为双重 RT-PCR 的引物,具体引物信息如表 1,引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 WDV 和 WYSV 的特异性检测引物

Table 1 Specific primers for WDV and WYSV detection

引物名称	Primer	序列 (5'-3')	Primer sequence	退火温度/℃	Annealing temperature	产物大小/bp	Size
WDV-F		GTAGGCGTTGCTTGGCTTGC		55		773	
WDV-R		TAATGTCGCCTATCTTGCCGTC					
WYSV-F		CACCAATCGGCAATGAAGCAGT		55		322	
WYSV-R		ACTCCTGCTACTTGTGACCTGAA					

1.4 单一 RT-PCR 检测体系

利用随机引物反转录合成 cDNA。cDNA 合成体系总体积为 20 μL ,其中样品 RNA 3 μL ,10 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物(全式金生物有限公司)1 μL , DEPC H_2O 6 μL , 混匀后 95℃ 变性 2~3 min,立即置于冰上 2 min;然后加入 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 5 $\times$ M-MLV buffer 4 μL , 200 U/ μL M-MLV 反转录酶(Promega, USA) 1 μL , 40 U/ μL RRI(TaKaRa) 0.5 μL ,用 DEPC H_2O 补足至 20 μL 。混匀后,37℃ 孵育 1 h, 70℃ 10 min, -20℃ 保存。以合成的 cDNA 为模板,分别利用 WDV 和 WYSV 的特异性引物进行扩增。PCR 体系:cDNA 3 μL , 25 mmol/L 10 $\times$ PCR buffer (Mg^{2+} plus) 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 上下游引物各 0.5 μL , 5 U/ μL rTaq (TaKaRa) 0.1 μL ,用超纯水补足至 25 μL 。扩增程序如下:94℃ 3 min; 94℃ 30 s,55℃ 45 s 和 72℃ 50 s,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。同时设置无毒异沙叶蝉 RNA 为阴性对照。

1.5 双重 RT-PCR 体系的建立与优化

分别取单一 RT-PCR 检测结果为阳性的只携带 WDV 或 WYSV 的异沙叶蝉 RNA 各 1.5 μL 或者是同时携带两种病毒的异沙叶蝉 RNA 3 μL ,利用 1.4 中的方法合成 cDNA。双重 RT-PCR 与单重 RT-PCR 体系的其他试剂成分和反应条件相同。以只携带 WDV 或 WYSV 的异沙叶蝉 RNA 和无毒异沙叶蝉 RNA 为对照。为了优化双重 RT-PCR 体系,以上述合成的 cDNA 作为双重 PCR 反应模板,对 rTaq、dNTPs 浓度以及退火温度进行优化,优化某一因子时保持其他条件不变。5 U/ μL rTaq DNA 聚合酶设 0.1、0.2、0.3、0.4 μL 和 0.5 μL 5 个处理;2.5 mmol/L dNTPs 设 1、2、3、4 μL 和 5 μL 5 个处理;退火温度设 51、53、55、57℃ 和 59℃ 5 个梯度。

1.6 双重 RT-PCR 的灵敏度测定

为检测双重 RT-PCR 体系的灵敏度,将浓度为 200 ng/ μL 的 cDNA 按 10 倍梯度进行系列稀释 ($10^{-1}\sim 10^{-4}$),再取 3 μL cDNA 为模板按照优化后的最佳条件分别进行 PCR 扩增,通过观察电泳结果分析双重 RT-PCR 检测的灵敏度。

1.7 双重 RT-PCR 的初步应用

从陕西韩城田间采集的 17 头异沙叶蝉,分别提取全虫的总 RNA,采用优化的双重 RT-PCR 体系检测同一头虫体里携带 WDV 或 WYSV 的情况。将获得的 WYSV 和 WDV 扩增产物通过纯化回收,连接到 pEASY-T5 载体上,导入到感受态细胞 Trans-T1 中,将菌液 PCR 扩增阳性的样品送上海生工生物有限公司测序,并利用 Vector NT 软件对得到的序列进行比对分析。

2 结果与分析

2.1 双重 RT-PCR 检测体系的建立

用浓度 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的 WDV 和 WYSV 两对特异性引物分别对相应病毒的 cDNA 模板进行单一 RT-PCR 扩增,分别能够扩增出 773 bp 和 322 bp 特异性条带,符合设计目的条带大小。对引物浓度进行了优化,确定了上述两对特异性引物在同一 PCR 体系中最佳使用终浓度分别为 0.12 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.08 $\mu\text{mol/L}$,即 WDV 与 WYSV 引物对的比例为 3:2。按这个比例将两种引物加入到体系中,单独携带 WYSV 或 WDV 的有毒虫及和同时携带 WYSV 和 WDV 的有毒虫的 RNA 样品均能扩增出相应病毒的特异性条带,且无非特异性条带,表明两对引物有良好的兼容性(图 1)。

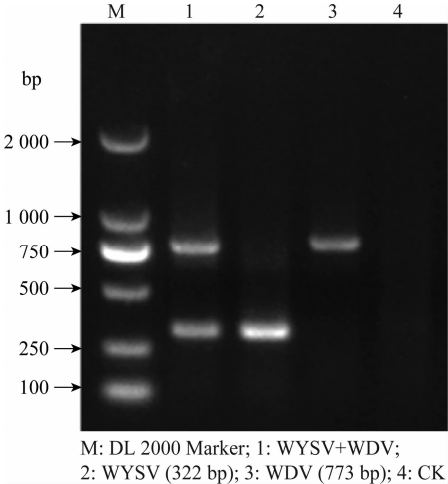


图 1 双重 RT-PCR 体系两种病毒引物兼容性检测
Fig. 1 Compatibility detection of two primers for duplex RT-PCR of WDV and WYSV

2.2 双重 RT-PCR 检测体系的优化

以 RT-PCR 产物为模板,对 dNTPs,rTaq 以及退火温度等因子进行进一步优化,确定 WDV 和 WYSV 双重 RT-PCR 检测体系最优的条件为:在总体积 25 μ L 的 PCR 体系中含有 3 μ L cDNA,2 μ L

浓度为 2.5 mmol/L 的 dNTPs、0.1 μ L rTaq(5U/ μ L)以及浓度为 10 μ mol/L WDV、WYSV 上下游引物各 0.3 μ L 和 0.2 μ L。PCR 扩增反应条件为:94 $^{\circ}$ C 3 min,94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s 和 72 $^{\circ}$ C 50 s 共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min(图 2)。

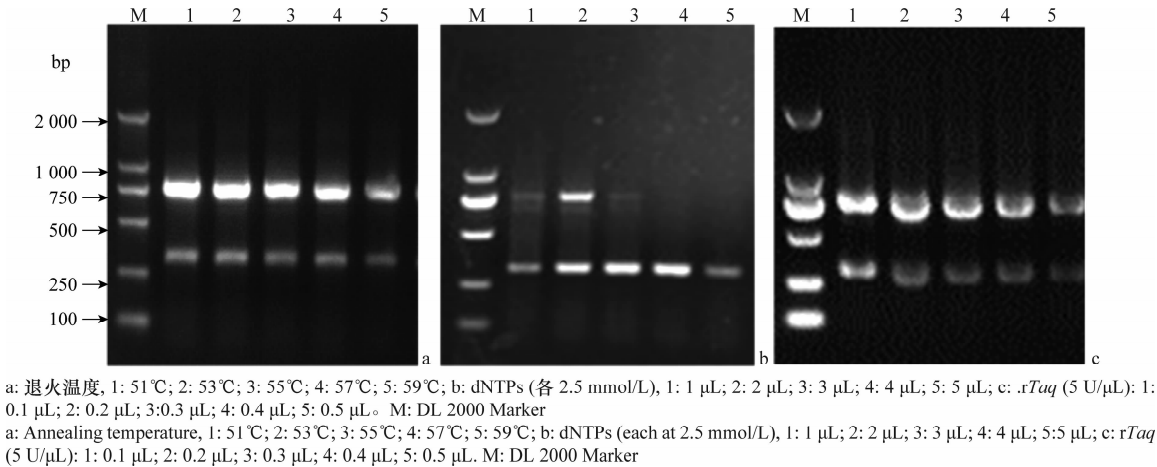


图 2 双重 RT-PCR 反应体系的优化
Fig. 2 Optimization of duplex RT-PCR reaction system

2.3 双重 RT-PCR 的灵敏度测定

为检测双重 RT-PCR 体系的灵敏度,将浓度为 200 ng/ μ L 的 cDNA 按 10 倍系列稀释($10^{-1} \sim 10^{-4}$),结果表明双重 RT-PCR 的检测下限是 10^{-2} 的 cDNA,当稀释 100 倍时,双重检测体系中 WDV 的条带比较模糊,而 WYSV 的条带依然清晰。当稀释了 1 000 倍时没有 WDV 目的条带出现,结果如图 3。

2.4 双重 RT-PCR 的初步应用

用优化好的双重 RT-PCR 体系对来自陕西韩城的 17 头叶蝉样品进行检测,发现单头虫体里既有 WDV 或 WYSV 一种病毒单独存在的情况,也有这两种病毒同时存在的情况(图 4)。将从双重 RT-PCR 体系中获得其中 3 个 WYSV 和 WDV 扩增产物分别通过克隆测序,序列比对表明扩增得到的序列与参考序列一致性均超过了 99%,证明了建立

的双重 RT-PCR 检测的可靠性。

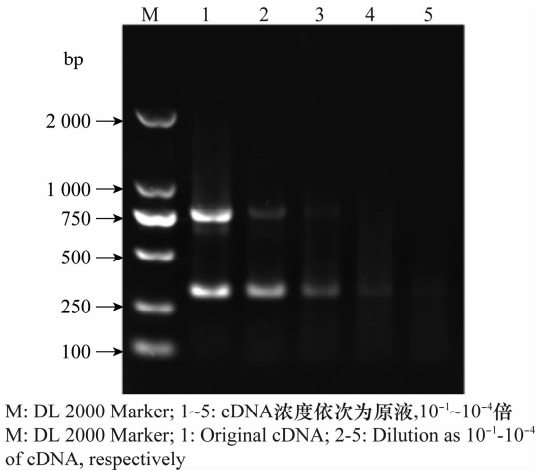


图 3 双重 RT-PCR 灵敏度的检测
Fig. 3 Sensitivities analysis of the duplex RT-PCR reaction system

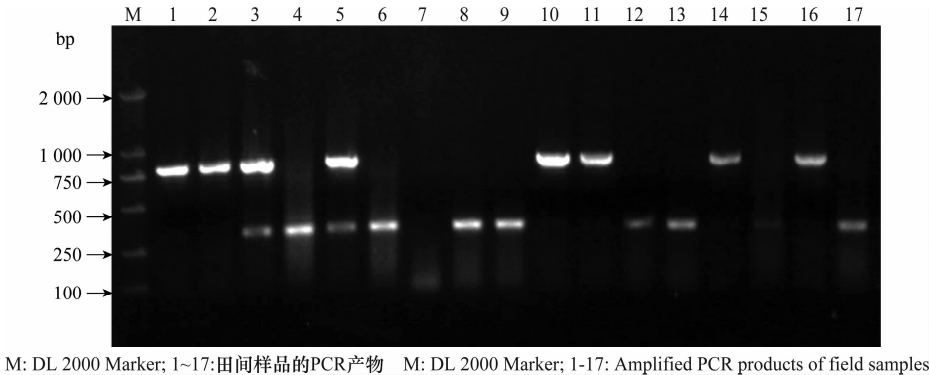


图 4 陕西韩城地区异沙叶蝉田间样品的检测
Fig. 4 Virus detection for leafhopper populations from Hancheng district, Shaanxi province by duplex RT-PCR

3 讨论

在自然界中, 寄主植物往往受到两种或两种以上植物病毒的复合侵染, 同一介体昆虫也可以传播两种或两种以上不相关的植物病毒^[14-15], 这给病毒病害流行监测带来了一定的困难。PCR 方法具有快速、特异、灵敏和重复性好的优点, 但是单一 PCR 方法用于多种病毒感染的田间样品鉴别诊断时, 不能一次达到目的, 并且对样品需求量大, 耗时较长。近年来, 基于 PCR 技术建立的多重 PCR 或 RT-PCR 检测方法已广泛应用到植物病毒的检测中^[16-17], 亦被成功地应用于虫传植物病毒在介体昆虫中的检测, 例如在同一灰飞虱体内水稻条纹病毒 *Rice stripe virus* (RSV) 和 水稻黑条矮缩病毒 *Rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV) 两种病毒的检测^[18]。

WYSV 是近年来我国西北部麦区新发现的一种可侵染麦类作物的植物弹状病毒。WDV 的传毒介体异沙叶蝉也是目前发现的可传播 WYSV 病毒的唯一介体。异沙叶蝉的带毒虫量是这两种小麦病害发生流行的关键因子, 因此建立一种快速、灵敏检测异沙叶蝉带毒率的方法十分必要。但异沙叶蝉体型较小, 成虫体长仅 3~4 mm, 单独提取同一个体较难满足 DNA 和 RNA 的用量。虽然 WDV 是一种 DNA 病毒, 但其转录过程产生的病毒 mRNA 可以作为 RT-PCR 的模板^[19-20]。因此本研究提取异沙叶蝉总 RNA, 用随机引物进行反转录, 一次性合成 cDNA 作为双重 RT-PCR 体系的模板, 在同一个反应体系加入兼容性好的两种病毒特异性引物对进行 PCR 扩增, 组建了 WDV 与负单链 RNA 病毒 WYSV 的同步检测体系。本研究还对引物浓度、dNTPs 和 rTaq 用量以及退火温度等条件进行了优化, 发现两种引物浓度配比以及 dNTPs 的用量是该 RT-PCR 体系的关键。建立的双重 RT-PCR 方法不仅可以应用于同一异沙叶蝉体内快速同步检测 WYSV 和 WDV 两种小麦病毒, 亦可用于麦类作物样品中这两种病毒的检测, 确认单一感染或混合感染, 达到快速诊断、鉴别的目的, 比常规 PCR 或 RT-PCR 方便快捷, 节约试剂和降低检测周期。因此, 本方法的建立将为异沙叶蝉带毒率的检测及田间小麦矮缩病毒病和小麦黄条纹病毒病的流行监测提供技术支持, 服务于小麦虫传病毒病害的防治。

参考文献

- [1] LINDBLAD M, ARENO P. Temporal and spatial population dynamics of *Psammotettix alienus*, a vector of *Wheat dwarf virus* [J]. International Journal of Pest Management, 2002, 48(3): 233–238.
- [2] MANURUNG B, WITSACK W, MEHNER S, et al. The epidemiology of *Wheat dwarf virus* in relation to occurrence of the leafhopper *Psammotettix alienus* in Middle-Germany [J]. Virus Research, 2004, 100(1): 109–113.
- [3] 王锡锋, 刘艳, 韩成贵, 等. 我国小麦病毒病害发生现状与趋势分析[J]. 植物保护, 2010, 36(3): 13–19.
- [4] KUNDU J K, GADIOU S, ČERVENÁ G. Discrimination and genetic diversity of *Wheat dwarf virus* in the Czech Republic [J]. Virus Genes, 2009, 38(3): 468–474.
- [5] LIU Yan, WANG Biao, VIDA G, et al. Genomic analysis of the natural population of *Wheat dwarf virus* in wheat from China and Hungary [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2012, 11(12): 2020–2027.
- [6] KUMAR J, KUMAR J, SINGH S, et al. Prevalence of *Wheat dwarf India virus* in wheat in India [J]. Current Science, 2015, 108(2): 260–265.
- [7] LIU Yan, DU Zhenzhen, WANG Hui, et al. Identification and characterization of *Wheat yellow striate virus*, a novel leafhopper-transmitted nucleorhabdovirus infecting wheat [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 468. DOI:10.3389/fmicb.2018.00468.
- [8] 王贵珍, 周益军, 周雪平. 以直接斑点免疫结合测定法检测灰飞虱体内的水稻条纹病毒[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版): 2005, 31(1): 37–40.
- [9] CHEN Zhuo, LIU Jiaju, ZENG Mengjiao, et al. Dot immunobinding assay method with chlorophyll removal for the detection of *Southern rice black-streaked dwarf virus* [J]. Molecules, 2012, 17(6): 6886–6900.
- [10] 张水英, 蒋春和, 兰平秀, 等. 应用 RT-PCR 和 dot-ELISA 方法检测单头灰飞虱体内水稻条纹病毒 [J]. 植物保护, 2016, 42(2): 119–122.
- [11] ZHANG Xu, ZHOU Guanghe, WANG Xifeng. Detection of *Wheat dwarf virus* (WDV) in wheat and vector leafhopper (*Psammotettix alienus* Dahlb.) by real-time PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 169(2): 416–419.
- [12] ZHANG Peng, MAR T T, LIU Wenwen, et al. Simultaneous detection and differentiation of *Rice black streaked dwarf virus* (RBSDV) and *Southern rice black streaked dwarf virus* (SRBSDV) by duplex real time RT-PCR [J/OL]. Virology Journal, 2013, 10: 24. DOI:10.1186/1743–422X–10–24.
- [13] 李俊敏, 周燕茹, 孙宗涛, 等. 单头灰飞虱体内两种水稻病毒的双重一步法 RT-PCR 检测[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(2): 378–383.

特征较一致^[11]。GLRaV-2 各部位间检出率差异也较小,但嫩叶检出率较低这一点与 GVA 一致,与 GFLV 不同^[12]。影响不同病毒和不同葡萄样品检测效果的因素目前尚不清楚,是否与病毒种类有关以及是否与病毒在寄主体内的时空分布规律呈正相关等有待于下一步研究。

参考文献

[1] 王萌,费菲,周涛,等. 葡萄卷叶伴随病毒 2 号和 3 号辽宁分离物部分基因组的序列分析[J]. 植物病理学报,2009,39(5):458-465.

[2] LIU Yuping, PEREMYSLOV V V, MEDINA V, et al. Tandem leader proteases of *Grapevine leafroll-associated virus 2*: host-specific functions in the infection cycle [J]. Virology, 2009, 383(2): 291-299.

[3] MARTELLE G P. Grapevine Virology Highlights: 2010-2012. Proceedings of the 17th Congress of ICVG [C]. Davis, California, USA. 2012: 13-31.

[4] MENG Baozhong, LI Caihong, GOSZCZYNSKI D E, et al. Genome sequences and structures of two biologically distinct strains of *Grapevine leafroll-associated virus 2* and sequence analysis [J]. Virus Genes, 2005, 31(1): 31-41.

[5] BEUVE M, SEMPE L, LEMAIRE O. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine [J]. Journal of Virology

[14] MANDAL B, KUMAR A, JAIN R K, et al. Mixed infection of geminivirus, tospovirus and urdbean leaf crinkle complex in urdbean (*Vigna mungo*) under field conditions [J]. Indian Journal of Virology, 2008, 19(1): 116-117.

[15] SYLLER J. Biological and molecular events associated with simultaneous transmission of plant viruses by invertebrate and fungal vectors [J]. Molecular Plant Pathology, 2014, 15(4): 417-426.

[16] 蒋素华,程喜梅,宋彩霞,等. 三种甘薯病毒多重 RT-PCR 检测技术的建立[J]. 植物保护, 2017, 43(1): 126-130.

[17] YANG Xin, LV Kalun, WANG Mingqiang, et al. Investigation of viruses infecting rice in southern China using a multiplex RT-PCR assay [J]. Crop Protection, 2017, 91: 8-12.

[18] LI Shuo, WANG Xi, XU Jianxiang, et al. A simplified meth-

cal Methods, 2007, 141(2): 117-124.

[6] 任芳,董雅凤,张尊平,等. 葡萄病毒研究最新进展[J]. 园艺学报,2014,41(9):1777-1792.

[7] OSMAN F, LEUTENEGGER C, GOLINO D, et al. Real-time RT-PCR (*TaqMan*®) assays for the detection of *Grapevine Leafroll associated viruses* 1-5 and 9 [J]. Journal of Virological Methods, 2007, 141(1): 22-29.

[8] POQJARI S, ALABI O J, OKUBARA P A, et al. SYBR® Green-based real-time quantitative reverse-transcription PCR for detection and discrimination of grapevine viruses [J]. Journal of Virological Methods, 2016, 235: 112-118.

[9] 任芳,董雅凤,张尊平,等. 葡萄病毒 A 实时荧光定量 RT-PCR 检测技术的建立及应用[J]. 园艺学报, 2018, 45(11): 2243-2253.

[10] FAN Xudong, HONG Ni, DONG Yafeng, et al. Genetic diversity and recombination analysis of *Grapevine leafroll-associated virus 1* from China [J]. Archives of Virology, 2015, 160(7): 1669-1678.

[11] TSAI C W, DAUGHERTY M P, ALMEIDA R P P. Seasonal dynamics and virus translocation of *Grapevine leafroll-associated virus 3* in grapevine cultivars [J]. Plant Pathology, 2012, 61(5): 977-985.

[12] KREBELJ A J, ČEPIN U, RAVNIKAR M, et al. Spatio-temporal distribution of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) in grapevine [J]. European Journal of Plant Pathology, 2015, 142(1): 159-171.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 179 页)

od for simultaneous detection of *Rice stripe virus* and *Rice black-streaked dwarf virus* in insect vector [J]. Journal of Virological Methods, 2015, 211: 32-35.

[19] ZHANG Peipei, LIU Yan, LIU Wenwen, et al. Simultaneous detection of *Wheat dwarf virus*, *Northern cereal mosaic virus*, *Barley yellow striate mosaic virus* and *Rice black-streaked dwarf virus* in wheat by multiplex RT-PCR [J]. Journal of Virological Methods, 2017, 249: 170-174.

[20] PAKKIANATHAN B C, KONTSEDALOV S, LEBEDEV G, et al. Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* in its whitefly vector, *Bemisia tabaci* [J]. Journal of Virology, 2015, 89(19): 9791-9803.

(责任编辑: 杨明丽)