

葡萄卷叶伴随病毒 2 实时荧光定量 RT-PCR 技术的检测应用

任 芳, 张尊平, 范旭东, 胡国君, 张梦妍, 董雅凤*

(中国农业科学院果树研究所, 国家落叶果树脱毒中心, 兴城 125100)

摘要 通过引物筛选和体系优化建立了葡萄卷叶伴随病毒 2 *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) 的 SYBR Green I 染料法实时荧光定量 RT-PCR 检测技术。该技术标准曲线扩增效率为 102.2%, 决定系数为 0.999, 最低检出限可达 10^{-3} 稀释梯度, 是常规 RT-PCR 的 100 倍。对不同季节和不同部位葡萄样品的检出率普遍高于常规 RT-PCR。春夏秋季样品检出率分别为 67%、89% 和 86%, 比常规 RT-PCR 检出率分别高 42%、28% 和 17%。冬季休眠枝条检出率最高(100%), 与常规 RT-PCR 相同。夏季老叶柄和卷须、秋季和冬季枝条等样品检测效果最好, 检出率均为 100%。对来自我国 17 个省 38 个品种的 116 份田间葡萄样品检测结果表明, qRT-PCR 共检测到 10 个样品为阳性, 检出率略高于常规 RT-PCR。

关键词 葡萄; 葡萄卷叶伴随病毒 2; 实时荧光定量 RT-PCR; 常规 RT-PCR; 检测

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019119

Application of a real-time quantitative RT-PCR for detection of *Grapevine leafroll-associated virus 2*

REN Fang, ZHANG Zunping, FAN Xudong, HU Guojun, ZHANG Mengyan, DONG Yafeng*

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

Abstract A SYBR Green I based real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) method for *Grapevine leafroll-associated virus 2* (GLRaV-2) was established. An excellent linear correlation (0.999) and amplification efficiency (102.2%) were obtained from the standard curve. The detection limit of the method was 10^{-3} dilution fold, which was 100 times higher than that of conventional RT-PCR. The method was subsequently used to detect grapevine samples in different seasons and different positions of plant. The detection efficiency of qRT-PCR for grapevine samples in most seasons and positions were generally higher than that of conventional RT-PCR. The detection rates of qRT-PCR for samples in spring, summer and autumn were 67%, 89% and 86%, which were 42%, 28% and 17% higher than those of conventional RT-PCR, respectively. For dormant branches in winter, the detection rates were the same for the two methods (100%). In general, the old petioles and tendrils in summer, branches in autumn and winter were the best materials for GLRaV-2 detection by qRT-PCR, with the detection rates of 100%. For field samples (belonging to 38 cultivars) from 17 provinces in China, 10 of 116 samples were detected to be positive by qRT-PCR, and the detection efficiency was higher than that of conventional RT-PCR.

Key words grapevine; *Grapevine leafroll-associated virus 2*; qRT-PCR; conventional RT-PCR; detection

葡萄卷叶病是一种世界性病毒病害,也是我国葡萄上的主要病害,由多种葡萄卷叶伴随病毒 *Grapevine leafroll-associated virus* (GLRaV) 引起,其

中 GLRaV-2 和 GLRaV-3 是我国葡萄卷叶病的主要病原。GLRaV-2 属于长线病毒科 *Closteroviridae* 长线病毒属 *Closterovirus*, 为 RNA 病毒, 基因

收稿日期: 2019-03-12

修订日期: 2019-07-12

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFD1001800); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-29-bc-1)

* 通信作者 E-mail: yfdong@163.com

组全长 16.5 kb, 包含 9 个 ORFs, 分别编码一个大的多聚蛋白、p6、Hsp70h、p63、CPm、CP、p19 和 p24 等蛋白^[1-3]。GLRaV-2 除了引起葡萄卷叶病外, 还可导致嫁接不亲和、部分品种嫁接后死亡和幼树“速衰”等症给葡萄生产造成很大危害^[4-5]。除我国外, GLRaV-2 在美国、意大利等多个国家普遍发生, 且分为多个变异组群, 不同分离物间遗传变异性较大^[3,6], 给病毒检测和防控带来很大困难。病毒检测是葡萄病毒病防控的关键环节, 实时荧光定量 RT-PCR(qRT-PCR) 检测技术特异性强、灵敏度高, 在世界上已经应用多年^[5,7-8], 但我国还未见 GLRaV-2 qRT-PCR 检测技术的相关研究报道。本实验室前期建立的葡萄病毒 A *Grapevine virus A* (GVA) qRT-PCR 技术, 检测特异性好且灵敏度高, 灵敏度可达到常规 RT-PCR 的 100 倍以上^[9], 表明该技术在葡萄病毒检测中具有较好应用前景。因此本研究建立并优化了 GLRaV-2 的 qRT-PCR 检测技术体系, 并将其应用到不同季节和不同部位葡萄样品的检测中, 以期丰富 GLRaV-2 检测手段、提高病毒检测效率打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以辽宁省兴城市中国农业科学院果树研究所国家落叶果树脱毒中心毒源保存圃采集的感染 GLRaV-2 的葡萄样品(表 2)以及来自我国不同葡萄产区的田间葡萄样品(表 3)为试材。

1.2 主要仪器和试剂

本研究所用实时荧光定量 PCR 仪为 CFX Connect™ Real-Time System(BIO-RAD, 美国)。主要

试剂 10×PCR Buffer、dNTPs、Taq 酶、DNA marker DL2000、反转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 和 *Escherichia coli* DH5α 感受态购自大连宝生物公司(TaKaRa); 2×SYBR Green I qPCR Mix、pTOPO-TA 载体、胶回收试剂盒购自北京艾德莱生物有限公司。

1.3 总 RNA 提取及反转录

取葡萄样品约 80 mg, 采用吸附柱法^[10]提取总 RNA, -80℃ 保存。采用反转录试剂盒(M-MLV Reverse Transcriptase, TaKaRa), 参照任芳等^[9]反转录方法合成 cDNA, -20℃ 保存。

1.4 引物筛选及克隆验证

根据文献报道选择 198F/290R^[7]、GLRaV-2F/2R^[8]和 P19qtF4/P24qtR^[5]等 3 对引物作为本研究 GLRaV-2 实时荧光定量 PCR 候选引物(表 1)。分别采用常规 RT-PCR 和 qRT-PCR 对引物特异性及扩增效果进行比较。qRT-PCR 反应体系 13 μL, 含 2×SYBR Green I qPCR Mix 6.25 μL、正反向引物各 0.25 μL、DEPC 水 5.25 μL 和 cDNA 1 μL。反应条件: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 15 s, 58℃ 15 s, 72℃ 20 s, 40 个循环, 熔解曲线分析温度 60~95℃, 每 5 s 增加 0.5℃。以扩增曲线 C_q 值(扩增产物荧光信号达到设定阈值所经过的循环次数) < 30 且熔解曲线为单一峰时判定为阳性。根据常规 RT-PCR 和 qRT-PCR 扩增效果选择 1 对引物作为本研究 qRT-PCR 检测引物, 将所选引物 PCR 扩增产物割胶回收纯化, 连接 pTOPO-TA 载体并转化大肠杆菌 DH5α, 挑取阳性克隆送北京诺赛基因组研究中心进行测序, 序列比对分析验证引物正确性。

表 1 用于筛选的 GLRaV-2 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primers screened for GLRaV-2 qRT-PCR amplification in this study

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	目标基因 Target gene	产物大小/bp Product size	参考文献 Reference
198F	CATTATATTCTTCATGCCTCTCAGGAT	Polyprotein	116	[7]
290R	GATGACAACCTTCTGTCCGCTATAGC			
GLRaV-2F	GATGGTGAAGCGTGACGCTAAGGTG	HEL	241	[8]
GLRaV-2R	TATGGTACACATCGTCGTACCAAGC			
P19qtF4	CTAACAAATTTCTTCTTTGGATCGCA	p19, p24	155	[5]
P24qtR	GAATGTCTTCAGCTTCATAAGGAG			

1.5 qRT-PCR 体系优化及标准曲线构建

以 10⁻¹ 倍稀释的 cDNA 作为模板, 在 54.0~

64.0℃ 退火温度梯度下进行 qRT-PCR 扩增选择最佳退火温度; 采用 100、200、300、400 nmol/L 和

样品扩增曲线呈梯度分布,标准曲线 C_q 值与模板浓度线性关系良好,扩增效率和决定系数均较高($E=102.2\%$, $R^2=0.999$)(图 2)。

2.3 qRT-PCR 检测特异性及灵敏度

用建立的 qRT-PCR 方法检测分别感染 GLRaV-2 和其他 9 种葡萄病毒的样品,只有 GLRaV-2 感染样品为阳性, C_q 值 19.11,熔解曲线为单一峰,其余样品为阴性,表明其可特异性检测 GLRaV-2。检测梯度稀释的 GLRaV-2 阳性样品时,常规 RT-PCR 最低只能检测 10^{-1} 倍稀释样品,而 qRT-PCR

检测 10^{-3} 倍稀释样品时 C_q 值仍小于 30,为阳性,检测灵敏度可达普通 RT-PCR 的 100 倍(图 3)。

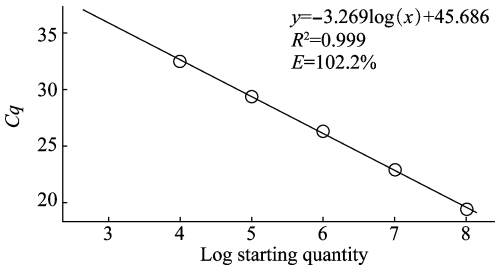


图 2 GLRaV-2 qRT-PCR 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of GLRaV-2 qRT-PCR method

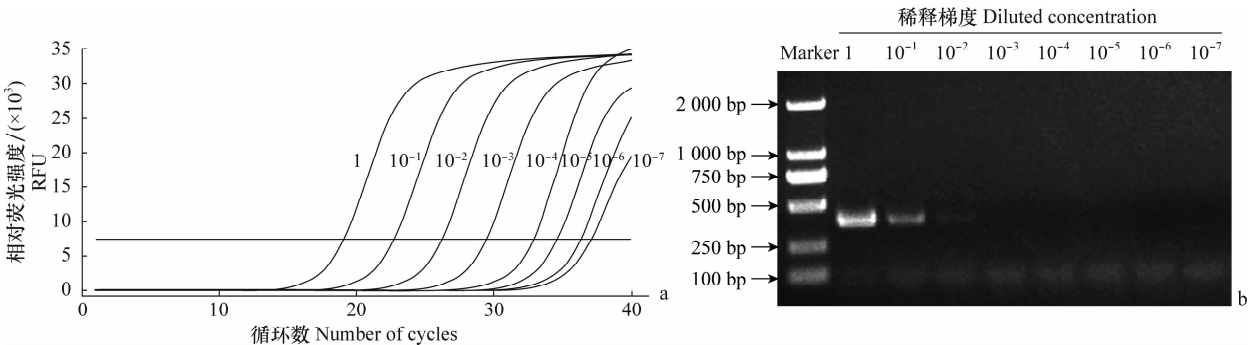


图 3 不同稀释梯度葡萄样品 qRT-PCR(a)和常规 RT-PCR(b)检测灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of qRT-PCR (a) and conventional RT-PCR (b) detection of grapevine samples at different diluted gradient

2.4 不同季节和不同部位葡萄样品检测

qRT-PCR 和常规 RT-PCR 两种方法对感染 GLRaV-2 的 6 株葡萄植株不同季节和部位共 114 个样品(表 2)检测结果及各季节和各部位样品平均检出率(图 4)对比结果表明,两种方法对冬季休眠枝条检测效果相当且检出率最高(均为 100%),对其余各季节和部位样品 qRT-PCR 检出率均高于常规 RT-PCR。尤其是对春季样品,RT-PCR 检出率很低,而 qRT-PCR 检出率可达 67%,比常规 RT-PCR 提高了 42 百分点。qRT-PCR 对夏季和秋季

样品检测效果相当,检出率达 89%和 86%,分别比常规 RT-PCR 高 28 百分点和 17 百分点。不同部位样品比较,qRT-PCR 对老叶、老叶柄、卷须和枝条样品检出率相当(83%~88%),嫩叶检出率最低,但所有部位样品检出率均高于常规 RT-PCR (图 4)。综合比较各季节各部位样品检测效果,qRT-PCR 对夏季老叶柄、卷须、秋季枝条和冬季休眠枝条检出率最高,均达 100%,其次为夏季和秋季其余部位样品及春季老叶样品,检出率均为 83%(表 2)。

表 2 不同季节和不同部位葡萄样品中 GLRaV-2 的常规 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测结果¹⁾

Table 2 Detection results of grapevine samples from different seasons and positions by RT-PCR and qRT-PCR

方法 Method	品种 Cultivar	春 Spring						夏 Summer						秋 Autumn						冬 Winter
		A	B	C	D	E	Z	A	B	C	D	E	Z	A	B	C	D	E	Z	Z
qRT-PCR	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	红地球-1 Red Globe-1	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	红地球-2 Red Globe-2	—	—	+	—	+	—	+	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+	+	+
	红地球-3 Red Globe-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	克瑞森无核 Crimson Seedless	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+
	品丽珠 Cabernet Franc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
	检出率/% Detection rate	50	67	83	67	67	67	83	83	83	100	100	83	83	83	83	83	83	100	100

续表 2 Table 2(Continued)

方法 Method	品种 Cultivar	春 Spring						夏 Summer						秋 Autumn						冬 Winter
		A	B	C	D	E	Z	A	B	C	D	E	Z	A	B	C	D	E	Z	Z
RT-PCR	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	—	—	—	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	红地球-1 Red Globe-1	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	红地球-2 Red Globe-2	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	—	—	—	+	+	+
	红地球-3 Red Globe-3	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+
	克瑞森无核 Crimson Seedless	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+	+	+
	品丽珠 Cabernet Franc	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+
	检出率/% Detection rate	17	17	17	33	17	50	33	50	50	83	67	83	50	83	67	50	83	83	100

1) A: 嫩叶; B: 嫩叶柄; C: 老叶; D: 老叶柄; E: 卷须; Z: 枝条。
A: Young leaf; B: Young petiole; C: Old leaf; D: Old petiole; E: Tendril; Z: Branch.

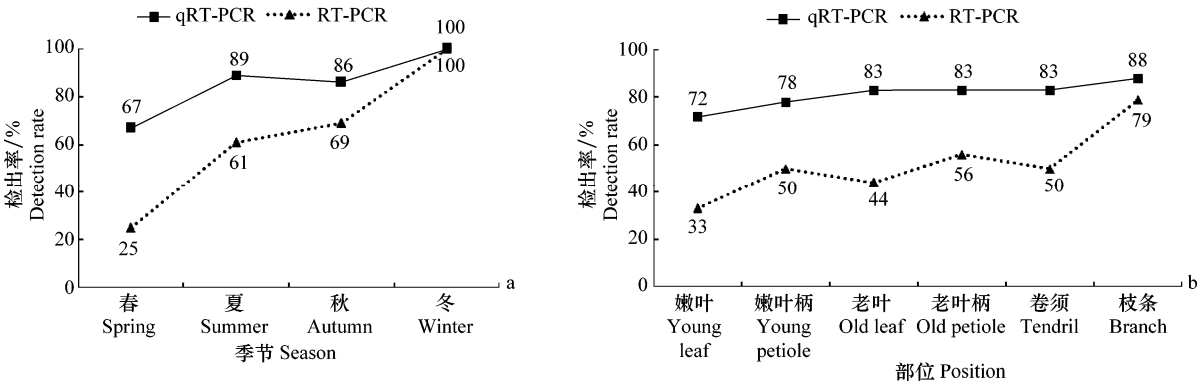


图 4 qRT-PCR 和 RT-PCR 检测不同季节(a)和不同部位(b)葡萄样品中 GLRaV-2 的平均检出率
Fig. 4 Detection rate of GLRaV-2 in grapevine samples from different seasons (a) and different positions (b) by qRT-PCR and RT-PCR

2.5 不同产区葡萄田间样品检测

对来自 17 个省不同产区 38 个品种的 116 份田间葡萄样品(表 3)分别进行了常规 RT-PCR 和 qRT-PCR 检测,常规 RT-PCR 有 8 个样品检测为阳性,检出率 6.9%,qRT-PCR 共检测到 10 个样品为阳性,其中包括常规 RT-PCR 检测为阳性的 8 个样品,qRT-PCR 检出率 8.6%,略高于常规 RT-PCR。

3 讨论

本研究根据文献报道的引物筛选及体系优化建立了 GLRaV-2 的 qRT-PCR 检测技术,检测灵敏度可达常规 RT-PCR 的 100 倍,与本实验室建立的 GVA^[9]等葡萄病毒 qRT-PCR 检测灵敏度相当,并且采用减半反应体系 13 μL,降低了试剂耗材等检测成本。为了检验该技术的实际应用效果,我们对不同季节、不同部位以及不同产区不同品种的葡萄样品进行了检测。结果表明,GLRaV-2 qRT-PCR 检测技术极大地提高了对不同季节或部位样品的检

测效果,春夏秋季样品检出率比常规 RT-PCR 提高了 17~42 百分点,对不同部位的样品检出率比常规 RT-PCR 提高了 9~39 百分点。对来自我国辽宁、山东、河北等 17 个省 38 个品种的 116 个田间葡萄样品检测结果也表明,其与常规 RT-PCR 检测结果基本一致且检出率更高。同时,研究结果还可为选择 GLRaV-2 检测或脱毒的最佳取样时间或部位提供参考依据,在一定程度上提高病毒检测准确率,减少漏检情况的发生,如夏季老叶柄、卷须、秋季枝条和冬季休眠枝条检测效果最好,检出率均达 100%,其次为春季老叶和夏秋季其余部位样品。与之相反,在选择材料用于葡萄病毒脱除时,则可选择春季幼嫩组织以提高脱毒效率。不同葡萄病毒在不同季节或部位葡萄样品中的检测效果也有所不同,如 GVA 在不同季节间检出率差异较明显,大多部位在春夏季较低,在秋冬季较高^[9],而本研究采用 qRT-PCR 检测 GLRaV-2,检出率除春季外,其余季节间无明显差异,与 GLRaV-3 夏季浓度最高,生长季末期检出率较高等

表 3 不同来源田间葡萄样品中 GLRaV-2 的检测

Table 3 Detection of GLRaV-2 in grapevines of different origins

样品编号 Number	来源 Origin	品种 Cultivar	RT-PCR	qRT-PCR	样品编号 Number	来源 Origin	品种 Cultivar	RT-PCR	qRT-PCR
1	安徽 Anhui	巨峰 Kyoho	—	—	33	辽宁 Liaoning	巨玫瑰 Jumeigui	—	—
2	安徽 Anhui	夏黑 Summer Black	—	—	34	辽宁 Liaoning	巨玫瑰 Jumeigui	—	—
3	北京 Beijing	品丽珠 Cabernet Franc	—	—	35	辽宁 Liaoning	巨玫瑰 Jumeigui	—	—
4	北京 Beijing	美乐 Merlot	—	—	36	辽宁 Liaoning	巨玫瑰 Jumeigui	—	—
5	广西 Guangxi	巨峰 Kyoho	—	—	37	辽宁 Liaoning	巨玫瑰 Jumeigui	—	—
6	广西 Guangxi	美人指 Manicure Finger	—	—	38	辽宁 Liaoning	巨玫瑰 Jumeigui	—	+
7	广西 Guangxi	美人指 Manicure Finger	—	—	39	辽宁 Liaoning	蛇龙珠 Cabernet Gernischt	—	—
8	广西 Guangxi	美人指 Manicure Finger	—	—	40	辽宁 Liaoning	华葡 1 号 Huapu 1	—	—
9	广西 Guangxi	美人指 Manicure Finger	—	—	41	辽宁 Liaoning	华葡 1 号 Huapu 1	—	—
10	广西 Guangxi	温克 Wenk	—	—	42	辽宁 Liaoning	摩尔多瓦 Moldova	—	—
11	广西 Guangxi	红地球 Red Globe	+	+	43	辽宁 Liaoning	阳光玫瑰 Shine-Muscat	—	—
12	广西 Guangxi	红地球 Red Globe	+	+	44	辽宁 Liaoning	红脸无核 Blush Seedless	+	+
13	广西 Guangxi	温克 Wenk	—	—	45	辽宁 Liaoning	红脸无核 Blush Seedless	—	—
14	广西 Guangxi	红地球 Red Globe	—	—	46	辽宁 Liaoning	布朗无核 Bronx Seedless	—	—
15	广西 Guangxi	温克 Wenk	—	—	47	宁夏 Ningxia	蛇龙珠 Cabernet Gernischt	—	—
16	贵州 Guizhou	水晶葡萄 Crystal Grapes	—	—	48	宁夏 Ningxia	品丽珠 Cabernet Franc	+	+
17	贵州 Guizhou	水晶葡萄 Crystal Grapes	—	—	49	宁夏 Ningxia	品丽珠 Cabernet Franc	—	—
18	河北 Hebei	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	—	—	50	宁夏 Ningxia	品丽珠 Cabernet Franc	—	—
19	河北 Hebei	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	—	—	51	宁夏 Ningxia	霞多丽 Chardonnay	—	—
20	河南 Henan	燎峰 Liao Feng	—	—	52	宁夏 Ningxia	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	—	—
21	黑龙江 Heilongjiang	火星无核 Mars	+	+	53	宁夏 Ningxia	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	—	—
22	黑龙江 Heilongjiang	里扎马特 Rizamat	—	—	54	宁夏 Ningxia	赤霞珠 Cabernet Sauvignon	—	—
23	吉林 Jilin	金皇后 Golden Queen	—	—	55	宁夏 Ningxia	梅鹿辄 Merlot	—	—
24	吉林 Jilin	87-1	—	—	56	宁夏 Ningxia	蛇龙珠 Cabernet Gernischt	—	—
25	吉林 Jilin	87-1	—	—	57	宁夏 Ningxia	蛇龙珠 Cabernet Gernischt	—	—
26	吉林 Jilin	着色香 Zhaosexiang	—	—	58	宁夏 Ningxia	蛇龙珠 Cabernet Gernischt	—	—
27	吉林 Jilin	着色香 Zhaosexiang	—	—	59	山东 Shandong	5BB	—	—
28	吉林 Jilin	着色香 Zhaosexiang	+	+	60	山东 Shandong	贵妃玫瑰 Guifeimeigui	+	+
29	吉林 Jilin	左优红 Zuoyouhong	—	—	61	山东 Shandong	蛇龙珠 Cabernet Gernischt	—	—
30	辽宁 Liaoning	426	—	—	62	山东 Shandong	贝达 Beta	—	—
31	辽宁 Liaoning	426	—	—	63	山东 Shandong	黑佳美 Gamay noir	—	—
32	辽宁 Liaoning	巨玫瑰 Jumeigui	—	—	64	山东 Shandong	红宝石无核 Ruby Seedless	—	—

续表 3 Table 3(Continued)

样品编号 Number	来源 Origin	品种 Cultivar	RT-PCR	qRT-PCR	样品编号 Number	来源 Origin	品种 Cultivar	RT-PCR	qRT-PCR
65	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	91	山西 Shanxi	黑比诺 Pinot noir	—	—
66	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	92	山西 Shanxi	黑比诺 Pinot noir	—	—
67	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	93	山西 Shanxi	品丽珠 Cabernet Franc	—	—
68	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	94	山西 Shanxi	品丽珠 Cabernet Franc	—	—
69	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	95	四川 Sichuan	红地球 Red Globe	+	+
70	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	96	四川 Sichuan	蛇龙珠 Cabernet Gernischt	—	—
71	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	97	四川 Sichuan	美乐 Merlot	—	—
72	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	98	四川 Sichuan	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—
73	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	99	四川 Sichuan	西拉 Syrah	—	—
74	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	100	四川 Sichuan	梅鹿辄 Merlot	—	—
75	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	101	天津 Tianjin	玫瑰香 Muscat Hamburg	—	—
76	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	102	天津 Tianjin	玫瑰香 Muscat Hamburg	—	—
77	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	103	天津 Tianjin	玫瑰香 Muscat Hamburg	—	—
78	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	104	天津 Tianjin	玫瑰香 Muscat Hamburg	—	—
79	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	105	新疆 Xinjiang	无核白 Thompson Seedless	—	—
80	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	106	新疆 Xinjiang	无核白 Thompson Seedless	—	—
81	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	107	新疆 Xinjiang	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—
82	山东 Shandong	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	108	新疆 Xinjiang	无核白 Thompson Seedless	—	—
83	山西 Shanxi	品丽珠 Cabernet Franc	—	—	109	新疆 Xinjiang	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—
84	山西 Shanxi	西拉 Syrah	—	—	110	新疆 Xinjiang	无核白 Thompson Seedless	—	—
85	山西 Shanxi	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	111	新疆 Xinjiang	无核白 Thompson Seedless	—	—
86	山西 Shanxi	小白玫瑰 Muscat Blanc a Petits Grains	—	—	112	云南 Yunnan	克瑞森无核 Crimson Seedless	—	—
87	山西 Shanxi	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	113	云南 Yunnan	维多利亚 Victoria	—	—
88	山西 Shanxi	赤霞珠 Carbenet Sauvignon	—	—	114	云南 Yunnan	红地球 Red Globe	—	—
89	山西 Shanxi	小白玫瑰 Muscat Blanc a Petits Grains	—	—	115	浙江 Zhejiang	玉手指 Yushouzhi	—	—
90	山西 Shanxi	西拉 Syrah	—	—	116	浙江 Zhejiang	红地球 Red Globe	—	+

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)