

基础知识

Basic Knowledge

加强果树规范化采样和病毒检测,降低潜隐和危险性病毒对我国苹果产业的危害风险

董云浩, 谢吉鹏, 李梦菲, 郝璐, 叶婷, 国立耘, 范在丰, 周涛*

(中国农业大学植物病理学系, 农业与农村部作物有害生物监测与绿色防控重点实验室, 北京 100193)

摘要 苹果病毒病在世界各苹果产区广泛发生,危害严重,目前没有有效的防治药剂。苹果病毒具有潜隐危害、主要以嫁接方式传播的特点。危险性高的类病毒感染导致苹果果实几乎失去经济价值。苹果病毒的检测是防止其传播和危害,繁育无病毒苗木和苹果树无毒化管理的一项关键技术。由于对病毒在苹果树体中的组织分布和浓度认知不到位,苹果病毒检测中存在样品采集和检测方法的误区。本文根据课题组十年来开展苹果病毒检测和研究工作的数据,简要概述了我国苹果病毒的发生危害特点,苹果病毒检测方法,详细给出了规范的样品采集、处理、总RNA提取、RT-PCR参数、检测引物、对照设置及检测结果判别的技术方法。

关键词 苹果病毒; 潜隐病毒; 暴发风险; RT-PCR; 检测

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019011

Reduction of the losses and risk of outbreaks caused by apple latent and dangerous viruses on China apple production by strengthening standard fruit tree sample collection and virus detection

DONG Yunhao, XIE Jipeng, LI Mengfei, HAO Lu, YE Ting, GUO Liyun, FAN Zaifeng, ZHOU Tao*

(Key Laboratory for Crop Pest Monitor and Green Control of Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Virus diseases on apple trees occur worldwide and induce severe losses. To date, no pesticides are effective for virus diseases. Apple viruses cause latent infection and mainly transmit by grafting. Dangerous viroids infection may result in complete loss of economic value of apple fruit. Detection of apple viruses is effective to control their transmission and acts one of key measures for both virus-free seedling propagation and apple tree management. As there is a gap to know the tissue distribution and titer of viruses in apple trees, there are some misunderstandings for sample collection and detection methods. Here, based on our research and detection work on apple viruses for ten years, we briefly introduced the occurrence characteristics of apple viruses in China, detection methods, and the standard technical methods in detail that cover sample collection, processing, total RNA isolation, RT-PCR parameters, controls and results analysis. The detection primers were fully listed.

Key words apple virus; latent viruses; risk of outbreak; RT-PCR; detection

苹果病毒病在世界各苹果产区广泛发生,具有危害性强、传播扩散快的特点。病毒破坏和干扰果树正常生理功能,导致树势减弱,产量降低,果实畸

形、着色不匀、品质下降,造成严重经济损失^[1-3]。国外自20世纪40年代已开始了对苹果病毒病的调查研究,目前多数苹果主要生产国基本上实现了苹果

收稿日期: 2019-01-06

修订日期: 2019-03-22

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-28);国家重点研发计划(2016YFD0201100)

致谢: 感谢中国农业科学院兴城果树所董雅凤研究员在二氧化硅提取RNA方法优化中给出的建议;感谢中国农业科学院植物保护研究所李世访研究员在苹果坏死花叶病毒检测中的讨论;感谢山东省烟台市农业科学院宋来庆研究员、山东省青岛市果茶所沙广利研究员、山西省运城城市果树所畅文选研究员、辽宁省果树研究所刘志研究员、云南省农业科学院果树所马钧研究员、中国农业大学园艺学院张新忠教授等同行在苹果样品采集给予的帮助和指导。

* 通信作者

E-mail: taozhoucau@cau.edu.cn

的无毒化栽培^[4]。我国对苹果病毒病的研究起步较晚,虽然目前基本明确了我国苹果主产区病毒病的种类、分布,建立了病毒检测方法,但由于苹果病毒在树体中的含量低,分布和浓度因季节和组织而异,同时苹果病毒序列变异大,此外,检测中通常未设内参基因做对照,导致检测假性率高,数据不一致,制约了我国苹果病毒病可持续控制。

当前正值我国大面积推广矮砧密植苹果栽培方式,其育苗过程中要通过两次嫁接来实现早结果和早丰产。这种通过两次嫁接培育苹果苗的方法大大增加了病毒传播和复合侵染的几率。同时由于新建果园和需更新的果园面积大,苗木需求量巨大,市场基本无秩序和无监管,使得矮砧苗病毒病问题愈发严重,已危及我国苹果苗木的健康繁育,给我国苹果安全生产带来了极大的风险。利用无病毒苗木和加强病毒检测是目前控制苹果病毒病和防止其传播扩散的有效途径,特别是对采穗母本树实施病毒检测,是确保苹果苗木低毒化、无毒化和提升果品质量的关键。

本文根据课题组十年来开展苹果病毒检测和研究工作中取得的数据及发表的文章,首先概述了我国苹果病毒的发生危害特点,列举了检测方法,然后在整理、综合国内外研究建立的反转录(RT)-PCR检测苹果病毒技术的基础上,给出规范的从样品采集、处理、总 RNA 提取、RT-PCR 参数、检测引物、对照设置到检测结果判别的技术方法,供苹果病毒相关研究和育苗栽培生产中参考使用。

1 我国苹果病毒的种类及发生特点

根据对我国苹果主要产区(环渤海湾产区、黄土高原产区、黄河故道产区和西南高地产区)病毒病多年来的调查结果和病原检测结果进行分析,明确了我国苹果上发生的病毒种类和特点。一是病毒种类多。已明确的我国苹果上发生的主要病毒有 6 种,分别是苹果褪绿叶斑病毒 *Apple chlorotic leaf spot virus*(ACLSV)、苹果茎沟病毒 *Apple stem grooving virus*(ASGV)、苹果茎痘病毒 *Apple stem pitting virus*(ASPV)、苹果坏死花叶病毒 *Apple necrosis mosaic virus*(ApNMV)、苹果锈果类病毒 *Apple scar skin viroid*(ASSVd)和苹果凹果类病毒 *Apple dimple fruit viroid*(ADFVd)^[3,5-7]。其中,前三种(ACLSV、ASGV 和 ASPV)侵染苹果通常不

引起明显的症状,因此也称为潜隐病毒。ApNMV 是最近鉴定的引起我国苹果花叶病的主要病毒^[7];ASSVd 和 ADFVd 属于类病毒,虽然在苹果枝干和叶片上不引起症状,但对苹果果实危害最大,ASSVd 引起苹果锈果病和花脸病,ADFVd 引起苹果凹果病,受危害的果实几乎丧失经济价值^[5]。二是发生率高。ACLSV 和 ASGV 的发生率均高于 60%,一些果园达 100%,ASPV 发生率一般在 20%以上,相对较低;苹果花叶病发生率近年来明显增加,特别是一些新发展的苹果生产区,发生率高于 30%^[5]。三是复合侵染普遍。经检测,两种及更多种病毒复合侵染的发生率为 60%~100%,病毒复合侵染通常产生协生作用,其危害比一种病毒单独侵染更加严重,显著降低树势和缩短盛果期^[5]。四是苹果花脸病、锈果病对我国苹果产业造成重大危险。近年来富士苹果上发生的花脸病呈暴发趋势,特别是山东和黄土高原产区,新树结果后即表现果实花脸症状,调查发现发生率为 8%~100%,对我国苹果产业危害和风险最大;虽然苹果凹果病目前仅在山东和新疆发现,但潜在危害不容忽视^[5]。

2 苹果病毒主要检测方法

苹果病毒检测有多种方法,如指示植物法,电子显微镜技术,酶联免疫技术,分子生物学技术,以及近年来用于病毒鉴定的深度测序技术^[9-11]。分子生物学技术通过检测病毒核酸来证实病毒的存在,其灵敏度高,特异性强,检测快速,并可用于大量样品的检测,适用范围广。目前,常用的分子生物学技术包括核酸分子杂交技术、双链 RNA 电泳技术、RT-PCR 技术等,其中 RT-PCR 技术由于其准确度高、操作性和实用性强,是目前适宜推广的苹果病毒检测方法。

3 规范化的苹果样品采集和保存方法

不同生长期、不同组织中苹果病毒的含量差别大,无论使用哪种检测方法,都应在适宜时间采集病毒含量相对高的样品,并对样品进行恰当保存和运输,以提高苹果病毒检测准确度和检测效率。

采样时期:春季 4、5 月份,苹果萌芽和新梢生长期是各种病毒从根部移动到枝条并快速增殖的时期,此时树体内病毒含量高,是采集苹果病毒检测样品的最佳时期。

组织类型和取样方法:苹果树不同组织内病毒含量不同,为提高检测准确度,应选取病毒含量高的组织进行取样。依据我们对多地多年苹果样品的选取和检测,建议优先选取的苹果样品为嫩芽、花、韧皮部组织和嫩叶。春季剪取生长旺盛的新梢或带花的枝条,其他季节剪取两年生 15~20 cm 长的枝条或带有嫩叶的枝条用于剥取韧皮部组织。每株样品标记序号、品种、地点、采集人、采集时间等信息,装入塑料袋密封。苹果果皮中病毒含量高,也是一种常选择的取样组织。发育成熟的叶片及老熟叶片中病毒含量低,不建议采集。

取样数量:取样数量以检测目的而定,用于育苗的采穗母本树,应逐一进行单株取样和检测;苗圃中的幼苗或幼树建议按不小于 1% 或至少 3 株随机取样,并标记取样株。

样品保存与运输:因离体组织中的核酸极易降解,应尽快对样品进行检测。样品可在 4~10℃ 下保存 5~7 d。需长期保存时,将嫩芽、花、嫩叶、刮取的韧皮部组织直接用液氮速冻后置于 -20℃ 冰箱保存 1 个月或置于 -80℃ 冰箱保存半年。若需邮寄或长途运输时,嫩梢和枝条用湿润的报纸或吸水纸包住,或者用保鲜膜完全裹住,放在塑料袋中密封保湿运输。收到样品后应立即开展检测或进行保存。

4 苹果病毒的 RT-PCR 检测技术

该技术包括苹果样品总 RNA 的提取和质量检测、反转录、PCR 和结果判别 4 个步骤。

4.1 苹果病毒 RT-PCR 检测方法使用的试剂与设备

试剂: dNTPs、*Taq* DNA、M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂、琼脂糖、10× Loading Buffer、DNA Marker。

设备:水浴锅、PCR 仪、电泳仪及电泳槽、JY04S-3C 型紫外凝胶成像仪。

4.2 苹果样品总 RNA 提取和质量检测

因苹果组织中多酚、多糖含量高,常规 TRIzol 提取法不适用,推荐使用二氧化硅吸附法提取总 RNA,具体方法见备注 2。也可以使用常规的 CTAB 提取法,这里不做详细介绍。

为保证检测准确度,应对总 RNA 的质量进行检测:利用紫外分光光度计检测提取的总 RNA 纯度和浓度。 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~2.2 时,总 RNA 纯

度符合要求。浓度计算公式为 $RNA(\mu g/mL) = OD_{260} \text{ 值} \times 40$ 。

4.3 反转录

通常采用随机六聚体引物进行反转录,以便用于检测多种主要苹果病毒。仅需检测一种病毒时,可以使用特异性反向引物(表 1)进行反转录。具体为:

在 1.5 mL 离心管中加入苹果样品总 RNA 3.5 μL 、随机引物(10 $\mu mol/L$)0.5 μL 、Oligo dT(10 $\mu mol/L$)0.5 μL 、5×M-MLV Buffer 4.0 μL 、dNTPs(10 mmol/L)1.0 μL 、RNA 酶抑制剂 0.5 μL 、M-MLV 反转录酶(200 U/ μL)0.5 μL ,加 DEPC ddH₂O 至 20 μL ,42℃ 反应 1 h,cDNA 用于 PCR 或保存于 -20℃ 备用。

4.4 PCR

鉴于苹果病毒的复合侵染普遍,这里给出了常规 PCR 和多重 PCR 两种方法。常规 PCR 适用于单独对每种苹果病毒进行检测,多重 PCR 检测方法适用于同时检测多种苹果病毒。检测引物见表 1。鉴于 ASSVd 和 ADFVd 同属于苹果锈果类病毒属 *Apscarviroid*,可使用该属的通用引物对 apscarviroids-F 和 apscarviroids-R 进行检测。PCR 体系应设置空白对照(超纯水)、阴性对照(健康或不带病毒样品)、阳性对照(带有病毒的苹果组织材料)和内参对照。推荐使用苹果 EF-1 α 基因作为内参(引物对 EF-1 α -F 和 EF-1 α -R,详见表 1)。

常规 PCR:选用表 1 中所列每种病毒的特异引物分别进行常规 PCR。反应体系包括反转录产物 cDNA 2.0 μL 、10×PCR Buffer 2.5 μL 、dNTPs(10 mmol/L)0.5 μL 、正向引物(20 $\mu mol/L$)0.5 μL 、反向引物(20 $\mu mol/L$)0.5 μL 、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL)0.25 μL ,加 ddH₂O 至 25 μL 。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,对应引物适宜退火温度(表 1)复性 45 s,72℃ 对应延伸 1 min,反应 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

多重 PCR:反应体系为反转录产物 cDNA 2.0 μL 、10×PCR Buffer 5.0 μL 、dNTPs(10 mmol/L)0.5 μL 、ACLSV-F(20 $\mu mol/L$)1.0 μL 、ACLSV-R(20 $\mu mol/L$)1.0 μL 、ASGV-F1(20 $\mu mol/L$)1.0 μL 、ASGV-R1(20 $\mu mol/L$)1.0 μL 、ASPV-F1(20 $\mu mol/L$)0.4 μL 、ASPV-R1(20 $\mu mol/L$)0.4 μL 、apscarviroids-F(20 $\mu mol/L$)

0.5 μL、apscarviroids-R (20 μmol/L) 0.5 μL、EF-1α-F (20 μmol/L) 0.5 μL、EF-1α-R (20 μmol/L) 0.5 μL、*Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL,加 ddH₂O 至 25 μL。

PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 53℃ 复性 45 s, 68℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

表 1 用于苹果病毒检测的引物¹⁾

Table 1 Primers for detection of apple major viruses

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence	目标片段/bp Target fragment	退火温度/℃ Annealing temperature	应用 Application
ACLSV-F ^[12]	GAGARTTTCAGTTTGCTMGA	794	53	RT-PCR 和多重 RT-PCR
ACLSV-R	AGTCTACAGGCTATTTATTATAAGT			
ASGV-F1 ^[13]	TGGAAACCGAGGATGGACAG	666	59	多重 RT-PCR
ASGV-R1	CTGGTACCCAAACCAAGCCTTAG			
ASGV-F2 ^[14]	GGAATTTTCACACGACTCCTAACCTCC	500	59	RT-PCR
ASGV-R2	CCCCTGTTGGATTGTGATACACCTC			
ASPV-F1 ^[13]	GAAGTAATCGCATCATTCAC	346	55	多重 RT-PCR
ASPV-R1	GATATGTACC TATTGATGGTTTC			
ASPV-F2 ^[15]	TGCCTCAAAGTACACCCCTCAGT	316	59	RT-PCR
ASPV-R2	CGCCAAGAAATGCACAGC			
ApNMV-CP(+) ^[6]	ATGGTGTGCAATCGCTGTCA	640	50	RT-PCR
ApNMV-CP(-)	CATCGACCATAAGGATATCA			
apscarviroids-F ^[16] (PBCVd100C)	AGACCCTTCGTCGACGACGA	220	58	RT-PCR 和多重 RT-PCR
apscarviroids-R (PBCVd94H)	TGTCCCGCTAGTCGAGCGGA			
EF-1α-F ^[13]	TCATCATGAACCACCCCG	520	58	RT-PCR 和多重 RT-PCR
EF-1α-R	CCTGTCCAGAACCAATTC			
ASSVd-H ^[17]	CCGGTGAGAAAGGAGCTGCCAGCA	333	67	RT-PCR
ASSVd-C	CCTTCGTCGACGACGACAGGTGAG			
ADFVd-F ^[18]	GAGGAAAAC TCCGTGTGTTTC	274	55	RT-PCR
ADFVd-R	AGCTCCACTCCCTGCCAGACC			

1) EF-1α 为苹果内参基因。
EF-1α is reference genes.

4.5 检测结果判别

PCR 反应结束后,取 5~10 μL 产物加入 DNA 上样缓冲液,使用预先做好的 1%~1.2%琼脂糖凝胶进行电泳,120~150 V 电压电泳约 30 min,用 0.5 μg/mL 溴化乙锭或其他 DNA 染料染色 10 min。在凝胶成像仪中利用紫外光观察条带位置,如果出现与阳性对照样品扩增的条带位置相同的预期特异性条带(片段大小参考表 1),初步判断为阳性样品。如果需要进一步确认,则将 PCR 产物直接进行测序或将目标条带切胶纯化后测序。将测序获得的序列在 GenBank 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行 BLASTn 比对,根据比对获得的序列相似度最高的病毒确定是否为目标病毒。如果未观察到目标条带,与阴性对照样品一样,则说明样品中不含有待检病毒。

附录

1. 苹果组织总 RNA 的二氧化硅吸附提取法^[19]

操作步骤:

- 1) 用液氮预冷研钵,取约 0.1 g 植物组织(叶片、韧皮部或果皮)放于研钵中研磨,将研磨后的粉末转入 1.5 mL 离心管中。
- 2) 向离心管中加入 1 mL 研磨缓冲液和 100 μL 2%偏重亚硫酸钠,振荡混匀。
- 3) 短暂离心,取 800 μL 匀浆转入事先加入 150 μL 10%十二烷基肌氨酸钠的离心管中,70℃ 保温 10 min(中间颠倒混匀 3~4 次),冰上放置 5 min,12 000 g 离心 10 min。
- 4) 取上清转入含有 150 μL 无水乙醇、300 μL 6 mol/L 碘化钠、30 μL 10% 二氧化硅悬浮液(pH 2.0)的离心管中,室温振荡 20 min。
- 5) 6 000 r/min 离心 1 min,弃去上清,加入 500 μL 清洗缓冲液振荡悬浮沉淀,6 000 r/min 离心 1 min。
- 6) 重复步骤(5)1 至 2 次。
- 7) 将离心管反扣在纸巾上,用枪头吸掉管中残

余的上清,室温下自然干燥 3~5 min,加入 80 μ L 无核酶的纯水,振荡悬浮,70℃保温 4 min。

8) 13 000 r/min 离心 3 min,吸取上清 60 μ L,用于合成 cDNA 或保存-80℃。

试剂配制:

以下试剂均用无核酶的纯水或焦磷酸二乙酯(DEPC)处理的 ddH₂O 水进行配制。

10%二氧化硅悬浮液:称取 SiO₂ 微粒 20 g 于 200 mL 无核酶的纯水中,摇匀,沉淀一昼夜;倒掉上清,加水至 200 mL,摇匀,沉淀 5 h;倒掉 176 mL 上清,留下 24 mL 粉浆用盐酸调节 pH=2.0;高温高压灭菌后分装于 1.5 mL 离心管,4℃保存。

2%偏重亚硫酸钠:称取偏重亚硫酸钠 1 g 溶于 50 mL 水中,搅拌均匀,高温高压灭菌,4℃保存。

10%十二烷基肌氨酸钠:称取十二烷基肌氨酸钠 5 g 溶于 50 mL 水中,搅拌均匀,高温高压灭菌,4℃保存。

6 mol/L 碘化钠:称取 90 g 碘化钠溶于 100 mL 水中,搅拌均匀,高温高压灭菌,4℃保存。

研磨缓冲液:称取(异)硫氰酸胍 23.6 g,醋酸钠(NaAC)0.82 g,EDTA 0.37 g,醋酸钾(KAC)4.9 g,PVP-K30 1.25 g 溶于 50 mL 水中,搅拌混匀,高温高压灭菌,冷却后 4℃保存,使用前加入适量 2%偏重亚硫酸钠。

清洗缓冲液:取 Tris 碱 0.30 g 溶于 125 mL 水,盐酸调节 pH=7.5,称取 0.04 g EDTA,0.73 g NaCl 加入以上 Tris-HCl 中,加入无水乙醇 125 mL,定容至 250 mL,4℃保存。

参考文献

[1] 刘福昌,王焕玉. 苹果病毒病的研究和防治[J]. 中国果树,1983(2):31-33.

[2] 王国平,刘福昌. 苹果病毒病害的研究进展[J]. 农牧情报研究,1990(2):18-26.

[3] 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,2015,41(2):158-161.

[4] 何水涛. 苹果无病毒及无病毒化技术概述[J]. 河南农业科学,1995(5):23-27.

[5] YE Ting, CHEN Shanyi, WANG Renheng, et al. Identification and molecular characterization of *Apple dimple fruit viroid* in China [J]. Journal of Plant Pathology, 2013, 95(3): 637-641.

[6] NODA H, YAMAGISHI N, YAEHASHI H, et al. *Apple necrotic mosaic virus*, a novel ilarvirus from mosaic-diseased apple trees in Japan and China [J]. Journal of General Plant Pathology,

2017, 83(2): 83-90.

[7] XING Fei, ROBE B L, ZHANG Zhixiang, et al. Genomic analysis, sequence diversity, and occurrence of *Apple necrotic mosaic virus*, a novel ilarvirus associated with mosaic disease of apple trees in China [J]. Plant Disease, 2018, 102(9): 1841-1847.

[8] KIM H R, LEE S H, LEE D H, et al. Transmission of Apple scar skin viroid by grafting, using contaminated pruning equipment, and planting infected seeds [J]. Plant Pathology Journal, 2006, 22(1): 63-67.

[9] 郝璐. 苹果病毒多重 PCR 检测及苹果茎痘病毒全序列测定分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.

[10] COETZEE B, FREEBOROUGH M J, MAREE H J, et al. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard [J]. Virology, 2010, 400(2): 157-163.

[11] HE Yan, YANG Zuo kun, HONG Ni, et al. Deep sequencing reveals a novel closterovirus associated with wild rose leaf rosette disease [J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(5): 449-458.

[12] 陈善义. 苹果茎痘病毒的侵染对苹果基因表达影响的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2013.

[13] HAO Lu, XIE Jipeng, CHEN Shanyi, et al. A multiple RT-PCR assay for simultaneous detection and differentiation of latent viruses and apscarviroids in apple trees [J]. Journal of Virological Methods, 2016, 234: 16-21.

[14] JAME D. A simple and reliable protocol for the detection of apple stem grooving virus by RT-PCR and in a multiplex PCR assay [J]. Journal of Virological Methods, 1999, 83(1): 1-9.

[15] MACKENZIE D J, MCLEAN M A, MUKERJI S, et al. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 1997, 81(2): 222-226.

[16] TERUO S, KOBAYASHI T, ISHIGURO A, et al. Two types of grapevine yellow speckle viroid 1 isolated from commercial grapevine had the nucleotide sequence of yellow speckle symptom-inducing type [J]. Journal of General Plant Pathology, 2000, 66(1): 68-70.

[17] HADIDI A, HUANG C, HAMMOND R W, et al. Homology of the agent associated with dapple apple disease to apple scar skin viroid and molecular detection of these viroids [J]. Phytopathology, 1990, 80(3): 263-268.

[18] LI R, MOCKA R, HUANG Q, et al. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens [J]. Journal of Virological Methods, 2008, 154: 48-55.

[19] ROTT M E, JELKMANN W. Characterization and detection of several filamentous viruses of cherry: adaptation of an alternative cloning method (DOP-PCR), and modification of an RNA extraction protocol [J]. European Journal of Plant Pathology, 2001, 107(4): 411-420.

(责任编辑: 杨明丽)