

中国葡萄卷叶相关病毒 7 检测及基因变异分析

范旭东, 董雅凤*, 张尊平, 任 芳, 胡国君, 张梦妍, 李 晨

(中国农业科学院果树研究所, 国家落叶果树脱毒中心, 辽宁兴城 125100)

摘 要: 葡萄卷叶相关病毒 7 (grapevine leafroll-associated virus 7, GLRaV-7) 是与葡萄卷叶病相关的重要病原物之一。为明确中国 GLRaV-7 分离物的基因序列变异, 采用 RT-PCR 方法对采自中国 15 个省(市)、自治区的 188 份葡萄样品进行检测, 检出率为 24.5% (44/188)。对来源于 42 个 GLRaV-7 分离物的外壳蛋白 (coat protein, CP) 和 15 个分离物的热休克蛋白 70 (heat-shock protein 70, HSP70) 基因进行克隆、测序。序列分析结果显示, 来源于国内外 GLRaV-7 分离物的 CP 和 HSP70 基因的核苷酸和氨基酸序列同源性分别为 89.12% ~ 100.00% 和 88.94% ~ 100.00%、85.33% ~ 100.00% 和 88.97% ~ 100.00%。基于 CP 和 HSP70 基因序列构建的进化树, 分别将 GLRaV-7 分离物划分为 6 个和 5 个明显区分的组群。Gp3、Gp4 和 Gp5 仅由中国分离物组成。本研究中初次分析国内外 GLRaV-7 分离物的 CP 和 HSP70 基因序列变异, 可为进一步开展 GLRaV-7 分子检测的研发及不同变种的致病性研究提供依据。

关键词: 葡萄; 葡萄卷叶相关病毒 7; RT-PCR 检测; CP 基因; HSP70 基因; 进化树分析

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2021) 01-0347-08

Detection and Sequence Analyses of Grapevine Leafroll-associated Virus 7 Isolates in China

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

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

Abstract: Grapevine leafroll disease (GLD) is a virus disease widely distributed in the world and causes great damage on grapevine. Grapevine leafroll-associated virus 7 (GLRaV-7) is one of its pathogens. To investigate the genetic variation of GLRaV-7 isolates, 42 positive samples were screened out by reverse transcription-PCR (RT-PCR) from 188 grapevine samples which were collected from 15 Chinese provinces and regions. The detection rate of GLRaV-7 was 24.5%. The coat protein (CP) genes of 42 isolates and heat-shock protein 70 (HSP70) genes of 15 isolates were sequenced and analyzed respectively, and the results showed identities ranging 89.12% – 100.00% and 88.94% – 100.00%, 85.33% – 100.00% and 88.97% – 100.00% at the nucleotide and amino acid sequences respectively. Phylogenetic analysis of CP and HSP70 gene sequences showed that all of GLRaV-7 isolates can be divided into six and five groups, respectively. Gp3, Gp4 and Gp5 only included GLRaV-7 Chinese isolates obtained in this study.

收稿日期: 2020 – 09 – 18; 修回日期: 2020 – 12 – 11

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

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yfdong@163.com)

This is the first report on the genetic variation of CP and HSP70 genes of GLRaV-7 isolates in China, and this study will be helpful for pathogenicity studies and development of reliable diagnostic methods.

Keywords: grapevine; grapevine leafroll-associated virus 7; RT-PCR detection; CP gene; HSP70 gene; phylogenetic analysis

葡萄卷叶病是世界上广泛分布、危害严重的一种葡萄病毒病，能导致一些葡萄品种产量下降和品质降低（Lee & Martin, 2009; Atallah et al., 2012; Martelli, 2014）。与该病相关的葡萄卷叶相关病毒（grapevine leafroll-associated virus, GLRaV）有 6 种，即 GLRaV-1、GLRaV-2、GLRaV-3（王建辉 等, 2011; 范旭东 等, 2012）、GLRaV-4（包括 GLRaV-5、GLRaV-6、GLRaV-9、GLRaV-Pr 和 GLRaV-Car 等几个变种）、GLRaV-7 和 GLRaV-13（Martelli et al., 2012; Ito & Nakaune, 2016）。GLRaV 均属于长线型病毒科（*Closteroviridae*），其中，GLRaV-1、GLRaV-3、GLRaV-4、GLRaV-13 属于葡萄卷叶病毒属（*Ampelovirus*），GLRaV-2 属于长线型病毒属（*Closterovirus*），GLRaV-7 属于新确立的 *Velarivirus* 属（Al Rwahnih et al., 2012a）。

GLRaV-7 最早于 1996 年从阿尔巴尼亚 1 株无症状的白色酿酒葡萄品种中被发现，通过嫁接传染至‘赤霞珠’上，可诱导‘赤霞珠’植株产生轻微的卷叶病症状（Choueiri et al., 1996）。之后被美国、希腊、匈牙利等 10 多个国家相继报道（Al Rwahnih et al., 2012b; Lyu et al., 2013）。目前，登录 GenBank 数据库的仅有 2 个 GLRaV-7 分离物的全长基因组，即阿尔巴尼亚分离物 AA42 和美国分离物 Swi，其基因组全长为 16 404 nt，包含 9 个开放阅读框（Jelkmann et al., 2012）。除基因组全长序列外，GenBank 上已登录的有关 GLRaV-7 的序列主要为 CP、HSP70 及 61-kDa（p61）等功能基因的序列。关于 GLRaV-7 的介体昆虫尚未见报道。有研究表明该病毒可通过菟丝子传播至草本植物上（Mikona & Jelkmann, 2010）。

明确病毒基因序列的变异，有利于其分子检测方法的建立及不同变种的致病性研究。目前关于 GLRaV-7 中国分离物的功能基因 CP 和 HSP70 的基因变异尚未见报道。因此，对来自中国 15 个省（市）、自治区的 188 株葡萄样品进行了 GLRaV-7 检测，并对来源于 42 个 GLRaV-7 中国分离物的 CP 和 HSP70 的基因序列变异进行了分析，以期为进一步开展中国 GLRaV-7 不同分离物的分子检测和致病性研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2012—2015 年从全国 15 个省（市）、自治区随机采集葡萄休眠枝条 188 份，密封保湿后于 4℃ 冰箱保存。按照葡萄种群划分，包括 128 份欧亚种葡萄（*Vitis vinifera* L.）、19 份欧美种葡萄（*V. vinifera* × *V. labrusca*）、14 份山欧葡萄（*V. vinifera* × *V. amurensis*）、11 份美洲种葡萄（*Vitis labrusca*）、1 份刺葡萄（*V. davidii*）及 15 份不清楚种群类型的葡萄样品。按照葡萄用途分为 88 个鲜食品种、76 个酿酒品种、11 个砧木品种及 13 个其他品种。

1.2 引物

根据 GenBank 已报道的 GLRaV-7 分离物的 CP 和 HSP70 基因的保守序列，分别设计用于扩增 GLRaV-7 的 CP 和 HSP70 基因的 PCR 和巢式 PCR（nPCR）引物（表 1）。其中，引物 L7CP-F/R 和

L7HSP-F/R 分别用于 GLRaV-7 分离物 CP 和 HSP70 基因序列的常规 PCR 扩增, 引物 L7CPn-F/R 和 L7HSPn-F/R 用于第 2 轮的巢式 PCR 扩增。

表 1 用于 GLRaV-7 分离物 PCR 扩增的 PCR 和巢式 PCR 引物
Table 1 Primers used for the PCR 和 nPCR amplification of GLRaV-7

扩增区域 Genomic region	引物 Primer	序列 (5'-3') Sequences	产物大小/bp Size
CP	L7CP	F: GGRAATAGGWCRCAAAGTGAA; R: CTCYTRTTYAATGTRCGTCC	844
	L7CPn	F: GAATTACACCGAGAAGTCTG; R: TGTGCGCGCAAGTTGAGAAAGT	709
HSP70	L7HSP	F: GGGTTTGATTTTGGTACTACTTTTA; R: ACCACCTCCTTGTAAGCT	450
	L7HSPn	F: GAATTAAATATGAACGGATCAC; R: CCTCAAGAGAGATTTCTGATA	409

1.3 总 RNA 提取及 RT-PCR

总 RNA 提取采用柱式提取方法（范旭东 等，2014）。反转录在 1.5 mL 灭菌离心管中进行，依次加入灭菌纯水 7.0 μL 、50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 6 碱基随机引物（5'-NNNNNN-3'，上海生工）1.0 μL ，总 RNA 2.0 μL ，离心混匀，95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min，冰上放置 2 min；加入 5 \times M-MLV buffer 5.0 μL 、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 1.5 μL 、200 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ M-MLV 逆转录酶 0.8 μL 、灭菌纯水 2.7 μL ，37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min，42 $^{\circ}\text{C}$ 50 min，70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。合成的 cDNA 立即用于 PCR 扩增或放 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

常规 PCR 反应体系为 25 μL ，含 10 \times *Taq* DNA 聚合酶缓冲液 2.5 μL 、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs 0.5 μL 、10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物各 0.5 μL 、5 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ *Taq* 酶 0.5 μL 、模板 cDNA 2.5 μL 、灭菌纯水 18 μL 。PCR 反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 40 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 45 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，循环 35 次；72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min；4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。巢式 PCR 以第 1 轮 PCR 产物 10 倍稀释物为模板，反应体系及 PCR 程序基本相同，仅改变循环次数为 30 次。

1.4 PCR 产物克隆、测序

PCR 扩增获得的 DNA 片段采用琼脂糖凝胶纯化回收试剂盒（北京艾德莱生物科技有限公司）进行回收纯化。取 4 μL 纯化 DNA 与零背景 TOPO TA 克隆试剂盒（北京艾德莱生物科技有限公司）中的 10 \times Enhancer buffer 0.5 μL 和 pTOPO-T 载体 0.5 μL 混匀，室温连接 5 min 后，转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 培养皿上，放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的培养箱培养过夜。挑取单克隆菌落进行菌液培养，并通过 PCR 鉴定获得阳性的重组质粒，每个 GLRaV-7 分离物至少选 3 个阳性的重组质粒送北京诺赛基因组研究中心进行测序。

1.5 序列分析

采用在线工具 ClustalW2 program (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 对获得的克隆序列进行同源性比对。如来源于同一样品中 3 个独立的单克隆序列同源性 $\geq 98\%$ ，则认为是一致的序列，仅用其中 1 个进行后续的序列分析。当 3 个独立的单克隆序列同源性 $< 98\%$ ，则选择差异的克隆序列进行后续分析。采用 MEGA6.0 软件（Tamura et al., 2013）的 Neighbor-joining 方法对本研究获得的及 GenBank 已报道的 HSP70 和 CP 基因序列分别构建系统进化树。采用重组分析软件 RDP3.0（Martin et al., 2010）对 GLRaV-7 分离物 HSP70 和 CP 基因序列中可能存在的重组事件进行分析。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测

采用引物 L7CP-F/R 和 L7HSP-F/R 对 188 个葡萄样品进行了常规 RT-PCR 检测, 引物 L7CP-F/R 检出率为 5.3% (10/188), 引物 L7HSP-F/R 未检测到阳性样品。采用引物 L7CPn-L/R 和 L7HSPn-F/R 对其进行第 2 轮巢式 PCR 检测, 检出率分别为 23.4%(44/188)和 8.5%(16/188)。采用引物 L7HSPn-F/R 检测为阳性的样品, 引物 L7CPn-F/R 也可检测为阳性。采用这些引物对 188 个葡萄样品总的检出率为 23.4%。

6 个省(市)、自治区的样品检测出 GLRaV-7, 包括河北(50%, 4/8)、新疆(46.2%, 6/13)、天津(33.3%, 2/6)、辽宁(28.7%, 25/87)、山东(21.1%, 8/38)和北京(6.3%, 1/16); 宁夏、上海、广西、甘肃、云南、安徽、广西、四川和福建等地的葡萄样品中未检出 GLRaV-7。美洲种葡萄 GLRaV-7 检出率最高, 为 36.7%, 其次为欧美种葡萄(26.3%)、欧亚种葡萄(25.8%)和山欧葡萄(7.1%)。砧木的检出率较高, 为 36.4%, 鲜食葡萄和酿酒葡萄检测率分别为 30.7%和 18.4%。

2.2 MP 和 CP 基因序列分析

对 PCR 产物进行回收、克隆及测序, 除去克隆内部同源性 $\geq 98\%$ 的序列, 共获得来源于 42 个 GLRaV-7 分离物的 CP 基因序列为 45 条, 及来源于 15 个 GLRaV-7 分离物的 HSP70 基因序列 16 条。其中, LN-SDHN2 和 LN-ZF 分离物的 CP 基因克隆之间及 LN-ZSX 分离物内的 HSP70 基因克隆之间存在同源性 $< 98\%$ 的序列。这些序列已提交至 GenBank 数据库, 登录信息见表 2。将获得的序列与已报道的序列进行同源性比较, CP 基因序列的核苷酸和氨基酸同源性分别为 89.12% ~ 100.00%和 88.94% ~ 100.00%, HSP70 基因序列的分别为 85.33% ~ 100.00%和 88.97% ~ 100.00%。

表 2 本研究获得的 GLRaV-7 分离物信息
Table 2 Details of GLRaV-7 isolates generated and analyzed in this study

来源 Location	样品 Sample	分离物编号 Isolate ID	扩增区域 Genomic region	GenBank 登录号 GenBank accession number
北京 Beijing	品丽珠 Cabernet Franc	BJ-CaF	CP	KT306553
河北 Heibei	巨峰 Kyoho	HB-Kyoho1	CP	KT306560
		HB-Kyoho2	CP	KT306561
	马瑟兰 Marselen	HB-MSL	CP	KT306562
		HB-MSL2	CP	KT306563
辽宁 Liaoning	阿尔曼玫瑰 Aerman Meigui	LN-AEMMG	CP, HSP70	KT306566, KT306603
	贝达 Beda	LN-BD1	CP	KT306567
		LN-BD2	CP	KT306568
		LN-BD3	CP	KT306569
	白塞涅 Baisenie	LN-BSN	CP	KT306570
	白瓦沙 Baiwashaka	LN-BWSK	CP, HSP70	KT306571, KT306604
	瑰宝 Guibao	LN-GB1	CP	KT306572
		LN-GB2	CP	KT306573
	红丹 Hongdan	LN-HD	CP	KT306574
	琥珀 Hupo	LN-HP	CP	KT306575
	李子香 Lizixiang	LN-LZX	CP	KT306576
	牛心 Niuxin	LN-NX	CP	KT306577
	巧保 2 号 Qiaobao 2	LN-QB2	CP, HSP70	KT306578, KT306605
	秋蜜 Qiumi	LN-QM	CP	KT306579
	秋无核 Qiuwuhe	LN-QWH1	CP, HSP70	KT306580, KT306606
		LN-QWH2	CP, HSP70	KT306581, KT306607
	桑多哈尼 Santos Hani	LN-SDHN1	CP, HSP70	KT306582, KT306608

续表 2				
来源	样品	分离物编号	扩增区域	GenBank 登录号
Location	Sample	Isolate ID	Genomic region	GenBank accession number
山东 Shandong	乌兹别克玫瑰 Uzbekistan Rose	LN-SDHN2	CP, HSP70	KT306583 ~ 84, KT306609
		LN-WZBKMG	CP	KT306585
		LN-ZF	CP	KT306586 ~ 88
		LN-ZSX	CP, HSP70	KT306589, KT306611 ~ 12
		LN-102495	CP, HSP70	KT306590, KT306613
	着色香 Zhaosexiang	LN-228	CP, HSP70	KT306591, KT306610
		SD-BBH	CP	KT306592
		SD-GRX5	CP	KT306593
	北冰红 Beibinghong	SD-GRX1	CP	KT306594
		SD-GRX2	CP	KT306595
		SD-GRX3	CP	KT306596
		SD-GRX4	CP	KT306597
天津 Tianjin	赤霞珠 Caberbet Sauvignon	TJ-CaS	CP	KT306565
		TJ-GRX	CP	KT306564
新疆 Xinjiang	贵人香 Italian Riesling	XJ-KRS	CP, HSP70	KT306559, KT306602
		XJ-WHB1	CP, HSP70	KT306558, KT306601
	克瑞森无核 Crimson Seedless	XJ-WHB2	CP	KT306554
		XJ-WHB3	CP, HSP70	KT306555, KT306598
		XJ-WHB4	CP, HSP70	KT306556, KT306599
	无核白 Thompson Seedless	XJ-WHB5	CP, HSP70	KT306557, KT306600

首先利用 Datamonkey 软件 (<http://www.datamonkey.org/>) 中的 SBP (single breakpoint scanning) 和 GARD (genetic algorithm recombination) 方法对所有 GLRaV-7 分离物的 CP 和 HSP70 基因核苷酸序列进行内部重组事件分析, 结果表明 CP 基因序列中存在重组事件, HSP70 基因序列无重组事件发生 (结果未列出)。同时, 也采用重组分析软件 RDP V.4.22 对 CP 基因序列的重组事件进行分析, 结果表明 LN-ZF clone 9 为 1 个重组序列 (6 种重组分析方法支持), 它的两个亲本分别为 Gp2 中的 LN-QWH1 和 Gp3 中的 LN-228 (表 3)。

表 3 GLRaV-7 分离物 LN-ZF CP 基因序列重组事件分析
Table 3 Putative intragenic recombination events in CP gene sequences of GLRaV-7

重组序列 Recombinant Sequences	亲本序列 (major × min) Parental sequences	重组区域 Breakpoints (begin-end)	重组分析方法 RDP-implemented method	P 值 P value
LN-ZF clone 9	LN-228 × LN-QWH1	59 ~ 415	GeneConv	4.885×10^{-03}
			Bootscan	3.031×10^{-07}
			MaxChi	8.660×10^{-08}
			CHIMAERA	2.498×10^{-07}
			SiScan	1.422×10^{-07}
			3SEQ	1.471×10^{-14}

2.3 进化树分析

将本研究获得的 CP 和 HSP70 基因序列与 GenBank 已登录分离物的 CP 和 HSP70 基因序列一起进行系统进化树分析, 结果 (图 1) 显示构建的 CP 基因系统进化树将 GLRaV-7 分离物划分为 6 个组群, HSP70 基因进化树将 GLRaV-7 分离物划分为 5 个组群。重组子 LN-ZF clone 9 在 CP 进化树中形成了一个独立的进化分支 (图 1)。由于 LN-ZF clone 9、日本分离物 Ru、阿富汗分离物 GLRaV-7-Afg 和智利分离物 CI-3473 在进化树中均未与其他分离物聚在一起, 因此, 暂未对其进行分组。CP 和 HSP70 进化树分析结果显示, 中国分离物分别被划分到 5 个组群中, 组群 Gp1 和 Gp2 的中国分离物居多, Gp3、Gp4 和 Gp5 仅包含中国分离物, 属于新的组群。

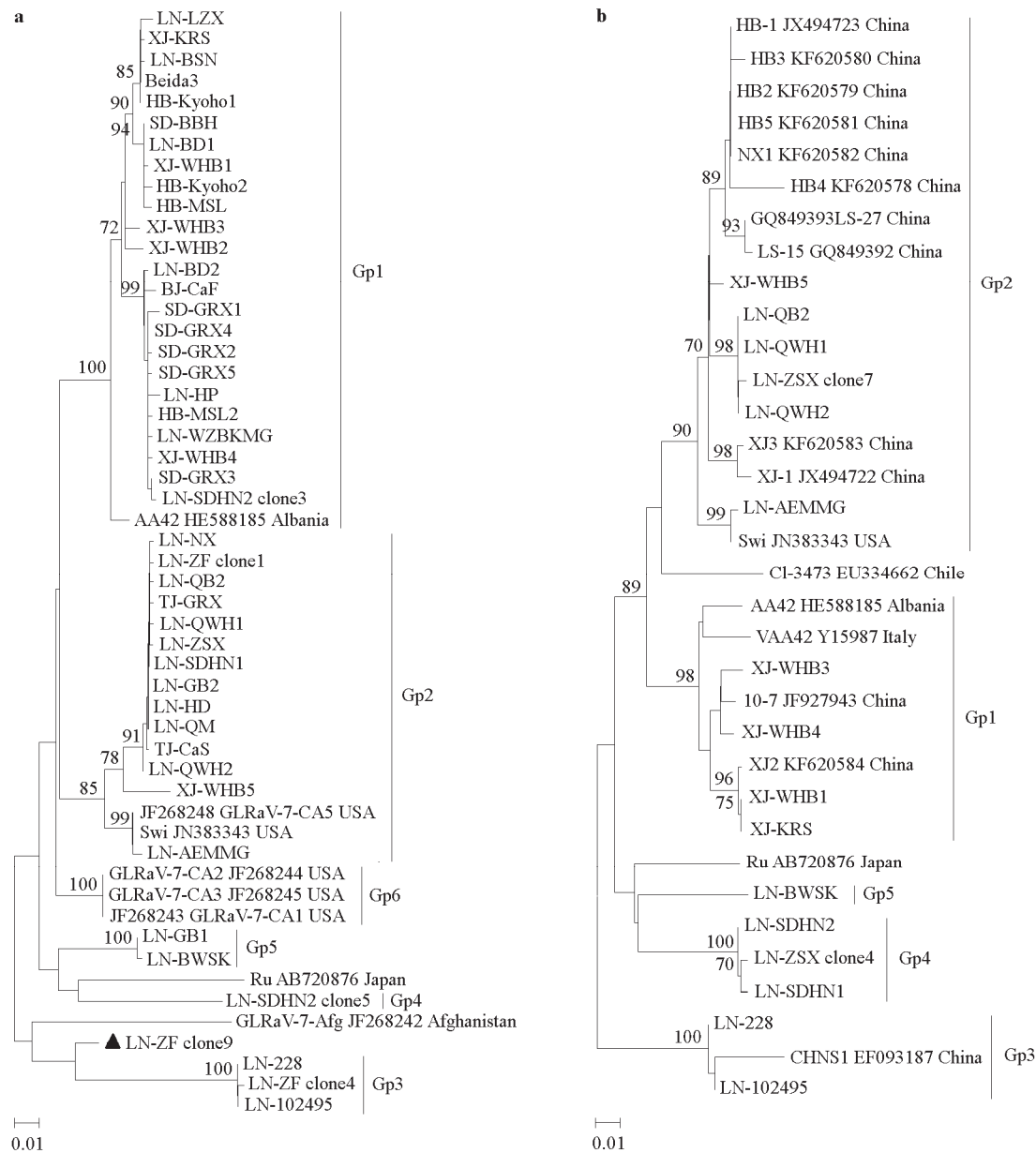


图1 GLRaV-7 分离物 CP 基因 (a) 和 HSP70 (b) 基因的核苷酸序列的进化树分析
GenBank 已登录的序列在图中显示为分离物名字、基因登录号及来源。进化树采用邻接法构建
(置信值设为 1 000), 70%以下的值未显示。

Fig. 1 Phylogenetic analyses of GLRaV-7 isolates based on nucleotide sequences of the coat protein genes (a)
and heat-shock protein 70 genes (b)

The sequences available from GenBank are identified by their isolate names, followed by their GenBank accession numbers and source. The trees were constructed using the Neighbor-joining method. The numbers at the nodes indicate bootstrap support (1 000 replicates). Values below 70% are not shown.

3 讨论

目前, 果树病毒病主要以预防为主, 及时清除田间带毒植株及栽植无病毒苗木是目前主要的防

控措施。病毒检测在病毒病防控中占据重要地位(陈雅寒 等, 2020; 黄爱军 等, 2020; Shi et al., 2020; 卜方迪 等, 2021; 陈玲 等, 2021)。本研究中对来自中国不同地区不同品种的 188 份葡萄样品进行了 GLRaV-7 检测, 其中常规 RT-PCR 检测结果不理想。一方面可能是 GLRaV-7 在葡萄植株体内浓度偏低, 导致常规的 RT-PCR 方法很难检测出; 另一方面也可能由于采用的引物是基于有限的 GLRaV-7 分离物序列设计的, 本身的扩增能力较差, 从而导致扩增失败。采用巢式 PCR 方法改善了 GLRaV-7 的检测, 扩增获得了来源于 42 个 GLRaV-7 分离物的 CP 基因和 15 个 GLRaV-7 分离物的 HSP70 基因序列, 明确了 GLRaV-7 分离物 CP 和 HSP70 基因变异特点, 为分子检测工具的研发打下了基础。

先前研究已对 GLRaV-7 的 p61 蛋白基因进行了系统进化树分析, 其结果表明中国的 GLRaV-7 分离物属于 3 个组群中的 2 个(Lyu et al., 2014)。目前 GenBank 上已登录的国外 GLRaV-7 的 CP 基因和 HSP70 基因序列数量明显多于 P61 蛋白基因序列, 且长线性病毒科的病毒分类及遗传多样性通常依据 CP 基因和 HSP70 基因序列变异情况来划分, 因此, 基于 CP 和 HSP70 基因的遗传多样性的分析更能全面了解 GLRaV-7 的整体变异情况。本研究中基于 CP 和 HSP70 基因的系统进化树分析结果表明, 中国的分离物属于 5 个明显区分的组群, 其中, Gp3、Gp4 和 GP5 仅包含中国分离物, 是 3 个新的组群。研究的结果也显示一些 GLRaV-7 分离物, 比如 CP 基因系统进化树中的日本分离物 Ru 和中国分离物 LN-SDHN2, 以及 HSP70 基因系统进化树中的 LN-BWSK, 分别形成单一的进化分支, 这表明中国的 GLRaV-7 分离物具有更为复杂的基因变异和遗传多样性。另外, 通过重组分析软件发现, 其中 1 个变种序列(LN-ZF clone9)为 CP 基因内部重组序列。本研究的结果丰富了 GLRaV-7 的基因多样性, 为进一步揭示 GLRaV-7 分离物的遗传进化特点及不同变种的致病性研究提供了依据。

本研究中首次对 GLRaV-7 国内外分离物的 CP 和 HSP70 基因变异及系统进化进行了分析, 明确中国部分葡萄样品中 GLRaV-7 的分子变异特点, 发现 3 个新的组群, 这为下一步 GLRaV-7 不同分离物分子检测和致病性差异的研究提供依据。

References

- Al Rwahnih M, Dolja V V, Daubert S, Koonin E V, Rowhani A. 2012a. Genomic and biological analysis of grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family *Closteroviridae*. *Virus Research*, 163: 302 - 309.
- Al Rwahnih M, Osmana F, Sudarshana M, Uyemoto J, Minafra A, Saldarelli P, Martelli G, Rowhani A. 2012b. Detection of grapevine leafroll-associated virus 7 using real time qRT-PCR and conventional RT-PCR. *Journal of Virological methods*, 179: 383 - 389.
- Atallah S S, Gómez N I, Fuchs M F, Martinson T E. 2012. Economic impact of grapevine leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63: 73 - 79.
- Bu Fangdi, Chen Junguang, Liu Zhen, Xiang Benchun, Shen Mian, Cui Baiming, Zheng Yinying. 2021. Nectarine stem pitting-associated virus and Asian Prunus virus found in *Prunus persica* of Xinjiang. *Acta Horticulturae Sinica*, 48 (1): 49 - 59. (in Chinese)
- 卜方迪, 陈俊光, 刘 贞, 向本春, 申 冕, 崔百明, 郑银英. 2021. 新疆蟠桃中发现油桃茎痘相关病毒和亚洲李属病毒. *园艺学报*, 48 (1): 49 - 59.
- Chen Ling, Yan Guohua, Zhang Xiaoming, Zhou Yu, Wang Jing, Duan Xuwei, Li Yanlin, Zhang Kaichun. 2021. Establishment of recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick for detection of prune dwarf virus. *Acta Horticulturae Sinica*, 48, (1): 183 - 192. (in Chinese)
- 陈 玲, 闫国华, 张晓明, 周 宇, 王 晶, 段续伟, 李彦林, 张开春. 2021. 李矮缩病毒重组酶聚合酶扩增—侧流层析试纸条检测方法的建立. *园艺学报*, 48, (1): 183 - 192.
- Chen Yahan, Ma Qiang, Sun Pingping, Zhang Le, Li Zhengnan. 2020. Identification of viruses causing apricot decline and leaf chlorosis disease by

- siRNA high-throughput sequencing and RT-PCR Detection. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (4): 725 - 733. (in Chinese)
- 陈雅寒, 马 强, 孙平平, 张 磊, 李正男. 2020. 杏衰退萎黄病病毒的 siRNA 高通量测序和 RT-PCR 鉴定. *园艺学报*, 47 (4): 725 - 733.
- Choueiri E, Boscia D, Digiario M, Castellano M A, Martelli G P. 1996. Some properties of a hitherto undescribed filamentous virus of the grapevine. *Vitis*, 35: 91 - 93.
- Fan Xu-dong, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Ren Fang, Hu Guo-jun, Zhu Hong-juan. 2014. Molecular identification and gene sequence analysis of Grapevine virus E, 44 (5): 455 - 460. (in Chinese)
- 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 任 芳, 胡国君, 朱红娟. 2014. 葡萄病毒 E 分子检测及基因序列分析. *植物病理学报*, 44 (5): 455 - 460.
- Fan Xu-dong, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Ren Fang, Li Ya-hui. 2012. Multiplex RT-PCR for simultaneous detection of four grapevine viruses. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (5): 949 - 956. (in Chinese)
- 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 任 芳, 李亚惠. 2012. 葡萄 4 种病毒多重 RT-PCR 检测体系的建立. *园艺学报*, 39 (5): 949 - 956.
- Huang Aijun, Ding Min, Wang Ying, Su Huanan, Yi Long. 2020. Establishment of RT-LAMP assay for detection of citrus leaf blotch virus. *Acta Horticulturae Sinica*, 47 (11): 2215 - 2222. (in Chinese)
- 黄爱军, 丁 敏, 王 莹, 苏华楠, 易 龙. 2020. 柑橘叶斑驳病毒的 RT-LAMP 检测. *园艺学报*, 47 (11): 2215 - 2222.
- Ito T, Nakaune R. 2016. Molecular characterization of a novel putative ampelovirus tentatively named grapevine leafroll-associated virus 13. *Archives of Virology*, 161: 2555 - 2559.
- Jelkmann W, Mikona C, Turturo C, Navarro B, Rott M E, Menzel W, Saldarelli P, Minafra A, Martelli G P. 2012. Molecular characterization and taxonomy of Grapevine leafroll-associated virus 7. *Archives of Virology*, 157: 359 - 362.
- Lee J, Martin R R. 2009. Influence of Grapevine leafroll associated viruses (GLRaV-2 and -3) on the fruit composition of oregon *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir: Phenolics. *Food Chemistry*, 112: 889 - 896.
- Lyu M D, Li M J, Li J, Li X M, Cheng Y Q. 2013. First Report of grapevine leafroll-associated virus 7 in two native grape varieties in China. *Plant Disease*, 97 (1): 150.
- Lyu M D, Li X M, Guo R, Li M j, Liu X M, Wang Q, Cheng Y Q. 2014. Prevalence and distribution of grapevine leafroll-associated virus 7 in China detected by an improved reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Plant Pathology*, 63: 1168 - 1176.
- Martelli G P. 2014. Grapevine-infecting viruses. *Journal of Plant Pathology*, 96: 7 - 8.
- Martelli G P, Ghanem-Sabanadzovic N A, Agranovsky A A, Al Rwahnih M, Dolja V V, Dovas C I, Fuchs M, Gugerli P, Hu J S, Jelkmann W, Katis N I, Maliogka V I, Melzer M J, Melzel W, Minafra A, Rott M E, Rowhani A, Sabanadzovic S, Saldarelli P. 2012. Taxonomic revision of the family Closteroviridae with special reference to the grapevine leafroll-associated members of the genus Ampelovirus and the putative species unassigned to the family. *Journal of Plant Pathology*, 94: 7 - 19.
- Martin D P, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevre P. 2010. RDP3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26 (19): 2462 - 2463.
- Mikona C, Jelkmann W. 2010. Replication of Grapevine leafroll-associated virus-7 (GLRaV-7) by cuscutea species and its transmission to herbaceous plants. *Plant Disease*, 94: 471 - 476.
- Shi Y X, Jin Z W, Meng X L, Wang L X, Xie X W, Chai A L, Li B J. 2020. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection and identification of *Pectobacterium carotovorum* on celery in the field. *Horticultural Plant Journal*, 6 (5): 313 - 320.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725 - 2729.
- Wang Jian-hui, Liu Jian-jun, Chen Ke-ling, Li Hong-wen, Xi De-hui, Lin Hong-Hui. 2011. Optimizing multiple detection and phylogenetic studies on grapevine leafroll associated virus-3 and grapevine virus A. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (12): 2401 - 2410. (in Chinese)
- 王建辉, 刘建军, 陈克玲, 李洪雯, 席德慧, 林宏辉. 2011. 葡萄卷叶伴随 3 型病毒和葡萄 A 病毒的多重检测及其系统进化分析. *园艺学报*, 38 (12): 2401 - 2410.