

杏和李树啤酒花矮化类病毒的检测与序列分析

杨元爱^{1,2} 李世访^{2*} 成卓敏² 王红清^{1*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院果树系, 北京 100094; ² 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 100094)

摘要: 从无明显症状表现的 24 个杏样品, 37 个李样品的 1 年生枝条表皮中抽提低分子 RNA 进行 DIG-cDNA 斑点杂交、RT-PCR、正反向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Return-PAGE) 和生物学检测。结果表明: 杏有 3 个样品, 李有 6 个样品带有啤酒花矮化类病毒 (*Hop stunt viroid*, HSVd)。从这 9 个样品中选 a5、a17、p6、p16 进行克隆和测序分析。所得序列与 GenBank 中已报道的 HSVd 序列同源性达 99.0% ~ 99.7%, 且序列变异与地域、寄主等无明显相关性, 说明 HSVd 的序列是比较保守的。

关键词: 啤酒花矮化类病毒; 检测; 杏; 李

中图分类号: S 662.2; 662.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 06-1193-06

Detection and Sequence Analysis of Hop stunt viroid in Apricot and Plum

Yang Yuanai^{1,2}, Li Shifang^{2*}, Cheng Zhuomin², and Wang Hongqing^{1*}

(¹ Department of Fruit Science, College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China;
² State Key Laboratory of Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract: Low molecular mass RNAs extracted from bark of one year old branch of 24 apricot samples, 37 plum samples were used for DIG-cDNA Dot-blot hybridization, RT-PCR, Return-PAGE and biological indexing. There were no clear symptoms when these samples were collected. The result showed that 3 of 24 apricot samples, 6 of 37 plum samples were infected with *Hop stunt viroid* (HSVd). a5, a17, p6, p16 selected from the 9 samples were used for cloning and sequencing analysis. HSVd sequence variants obtained were compared with HSVd reported in GenBank and showed 99.0% - 99.7% identity. There was no clear relativity among sequence variants, region and host. These results suggest that sequence of HSVd is relatively conserved.

Key words: *Hop stunt viroid*; Detection; Apricot; Plum

啤酒花矮化类病毒 (*Hop stunt viroid*, HSVd) 属于马铃薯纺锤形块茎类病毒科, 1970 年首次从日本啤酒花上分离得到^[1], 寄主范围非常广泛, 包括啤酒花、黄瓜、葡萄、柑橘、梨、桃、李、杏和扁桃等^[2-4]。该类病毒在某些寄主, 如葡萄^[2,5]和杏^[3]上呈潜伏侵染, 而对某些寄主却会造成严重病害, 如啤酒花矮化^[2]、李和桃果实斑驳^[6]、柑橘矮化^[7,8]等。HSVd 根据其序列特点被分成 5 个类型, 即李类型、啤酒花类型、柑橘类型、李—柑橘类型、李—啤酒花—柑橘类型, 其中前三者为主要类型, 后二者是近几年才发现的, 为次要类型^[2,9]。

HSVd 在杏树上发生比较普遍, 地中海地区平均带毒率为 34%^[10,11], 西班牙东南部高达 81%^[10,11], 土耳其西部 66.6%^[12], 叙利亚 62%^[13], 黎巴嫩 28%^[14], 塞浦路斯 10%, 摩洛哥 10%, 希腊 5%^[15]。HSVd 在杏树上虽呈潜伏侵染, 但却可能成为另一种栽培植物的潜在危险, 且有时和杏树上的其它病毒混合侵染, 加重病害的发生。从杏树上分离得到的序列大部分属于啤酒花类型或李—柑橘类型^[16]。

收稿日期: 2006-06-21; 修回日期: 2006-08-21

基金项目: 国家 '973' 项目 (2006CB100203)

* 通讯作者 Authors for correspondence (E-mail: sfli@ippcaas.cn; wanghq@cau.edu.cn)

HSVd在李树上的发生首次在日本报道^[6], 症状主要表现为果实不着色或果皮上有绿色斑点, 被称为“Dapple fruit”, 此外, 有些品种还表现有果肉不变红, 成熟期延迟等症状。李树上 HSVd的带毒率相对较低, 阿尔巴尼亚 6.7%, 埃及 3.3%, 土耳其 14.3%^[12]。

中国该类病毒在杏、李上的发生情况尚未见报道。本试验旨在了解我国杏和李上 HSVd的发生情况, 并建立一些较完善的检测方法。此外, 通过对该类病毒的序列分析, 了解其序列变异与地域、寄主等的相互关系。

1 材料与方法

1.1 材料

以黄瓜 (*Cucumis sativus* L. ‘Suyo’) 以及杏、李树的 1年生枝条为试材。Suyo黄瓜的种子由日本弘前大学佐野辉男教授馈赠。枝条分别从内蒙古、黑龙江、河北等地采样, 杏有 24个样品, 李有 37个样品 (表 1)。表中属于同一品种的样品来自不同的果园或同一果园的不同植株。

表 1 杏和李供试材料的名称及采样地

Table 1 Sampling places and variety names of apricot and plum in this study

杏 Apricot				李 Plum			
采样地 Location	采样数 Number of samples	编号 No.	品种 Variety	采样地 Location	采样数 Number of samples	编号 No.	品种 Variety
湖北 Hubei	1	a1	麦黄杏 Maihuangxing	内蒙古 InnerMongolia	14	p1 - p14	大紫李 Dazili
河北 Hebei	5	a2	菜籽黄 Caizihuang	湖北 Hubei	1	p15	未知 Unknown
		a3, a4	金太阳 Sun Gold	河北 Hebei	5	p16	蓝宝石 Lanbaoshi
		a5	凯特 Katy			p17	甜李子 Tianlizi
		a24	山杏 Shanxing			p18	酸李子 Suanlizi
山东 Shandong	4	a6	意大利 2号 Italy 2			p19	未知 Unknown
		a7	未知 Unknown			p20	红宝石 Ruby
		a8	开拓杏 Kaituoxing	山东 Shandong	2	p21, p22	黄李子 Huanglizi
		a9	未知 Unknown	黑龙江 Heilongjiang	2	p23	牡丹江 1号 Mudanjiang 1
陕西 Shaanxi	11	a10	干挂梅杏 Ganguameixing			p24	牡丹江 3号 Mudanjiang 3
		a11	梅杏 Meixing	陕西 Shaanxi	12	p25	日本早红 Japan Zaohong
		a12	短枝杏 Duanzhixing			p26	奥李 14 Australia 14
		a13	梅杏 Meixing			p27	笨梅 Benmei
		a14	曹杏 Caoxing			p28	巴怒怒 Banunu
		a15	鸡蛋杏 Jidanxing			p29	红宝石 Ruby
		a16	突生杏 Tushengxing			p30	秋姬 Qiuji
		a17	梅杏 Meixing			p31	奥李 14 Australia 14
		a18	曹杏 Caoxing			p32	安哥诺李 Angeleno
		a19	李杏 Lixing			p33	绿梅 Lünei
		a20	未知 Unknown			p34	金皇后 Queen Gold
黑龙江 Heilongjiang	3	a21	真杏 Zhenxing			p35, p36	笨李 Benli
		a22	山杏 Shanxing	广西 Guangxi	1	p37	未知 Unknown
		a23	2号杏 Xing 2				

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5, 2 × Taq PCR Master Mix酶购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 载体 pGEM-T, M-MLV 反转录酶购自 Promega公司; RNasin购自宝生物工程 (大连) 有限公司; DIG DNA Labeling and Detection Kit, DIG Easy Hyb购自 Roche公司。参考 GenBank 中 HSVd 的核苷酸序列 Y09349设计了 3条引物 (表 2)。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

表 2 RT-PCR检测 HSVd的引物序列

Table 2 Primers sequence of HSVd for RT-PCR

引物 Primer	极性 Polarity	序列 Sequence	位置 Position
RT-R1	-	5'-GCTGGA TTCTGA GAA GAG GTT-3'	106 - 87
PCR-R2	-	5'-AACCCGGGGCTCTCTTCTCA-3'	84 - 67
PCR-F3	+	5'-AACCCGGGGCAACTCTTCTC-3'	79 - 96

1.2 方法

1.2.1 低分子 RNA 的提取 参考 Li 等的方法^[17]。-20℃保存备用。

1.2.2 DIG-dDNA 斑点杂交 以含有 HSVd 全长序列的重组质粒 pGEM-T-HSVd 为模板,在 50 μL 的 PCR 反应体系中含有 2×Taq PCR Master Mix 25 μL, DIG-11-dUTP 2 μL, 引物对 R2 和 F3 各 1 μL (20 μmol/L), 模板 3 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。得到的 PCR 产物为所制备的探针。然后将探针纯化, 方法是用 2.5 倍体积乙醇, 1/10 体积 pH 5.2, 3 mol/L NaAc 沉淀核酸, 经 70% 乙醇洗涤、干燥后溶于 10 μL ddH₂O 中, -20℃保存备用。

取 RNA 提取液 0.7 μL, 加 3 倍体积的变性液 (甲酰胺 500 μL, 甲醛 162 μL, 10×MOPS 100 μL), 65℃ 15 min, 冰上 2 min, 加等体积 20×SSC, 混匀, 点膜, 晾干后置 80℃ 烘箱中处理 2 h, 然后进行杂交。42℃ 预杂交 3 h, 50℃ 杂交 16 h, 弃杂交液, 用 2×SSC、0.1% SDS 和 0.5×SSC、0.1% SDS 洗膜, 各两次, 每次 15 min。1% 封闭液封闭 30 min, 加入 Anti-DIG-AP 抗体 37℃ 反应 1 h, 然后用洗涤缓冲液冲洗两次, 每次 15 min, 检测液平衡 5 min, 最后将膜在显色液 (NBT/BCIP) 中避光显色 3 h 或直至出现明显结果为止。

1.2.3 正反向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Return-PAGE) 参考 Li 等的方法^[17], 采用 5% 的聚丙烯酰胺凝胶制板, 电泳结束后取出凝胶进行银染色。

1.2.4 生物学检测 当黄瓜两片子叶完全展开时, 取 RNA 提取液 5 μL, 加 500 μL 接种缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L EDTA, pH 7.5)。先在叶片上倒一层金刚砂, 然后用棉棒蘸取接种液在叶片上来回涂 4~5 次, 约 10 min 后用水将叶片上的金刚砂冲掉。每个样品接种 4 株, 以不接种的黄瓜为负对照。温室温度保持在 30℃ 以上, 每隔两天调查 1 次, 记录发病情况。

1.2.5 RT-PCR 在 20 μL 的 RT 反应体系中, 含有模板 3 μL, M-MLV 5×buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL, RNasin 2 U/μL, R1 引物 1 μL (20 μmol/L), M-MLV 反转录酶 10 U/μL, 加 ddH₂O 至 20 μL, 混匀。室温放置 10 min, 42℃ 1 h, 冰上冷却 2 min, -20℃保存备用。

在 50 μL 的 PCR 反应体系中, 含有 2×Taq PCR Master Mix 25 μL, 引物对 R2 和 F3 各 1 μL (20 μmol/L), 模板 3 μL, 加 ddH₂O 至 50 μL, 混匀。PCR 反应程序为 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 53℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。

1.2.6 PCR 产物的克隆及其序列分析 将 PCR 产物经低熔点琼脂糖凝胶电泳, 于紫外灯下切割特异性条带, 装入 1.5 mL 离心管中, 加入 600 μL ddH₂O, 70℃ 加热 10 min, 胶融化后加入 600 μL 含有 1% CTAB 的水饱和正丁醇, 离心取上层, 经 2.5 mol/L NH₄Ac、正丁醇抽提, 最后经无水乙醇沉淀。将回收后的 PCR 产物与 pGEM-T 连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 感受态细胞, 提取质粒, 酶切鉴定, 筛选重组质粒。序列测定由宝生物工程 (大连) 有限公司完成。

采用 DNAMAN Version 5.2.2 软件将所得分离物序列与 GenBank 中已报道 HSVd 序列进行比较。

2 结果与分析

2.1 DIG-dDNA 斑点杂交

将 24 个杏样品和 37 个李样品的 RNA 经变性处理后点于带正电荷的尼龙膜 (Hybond-N⁺ Amersham Biosciences) 上, 点样量约为 50 mg 鲜样质量, 然后利用 DIG 标记的 HSVd dDNA 探针进行斑点杂交。结果表明: 杏有 3 个样品, 李有 6 个样品带有 HSVd (图 1)。

2.2 正反向聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Return-PAGE)

为了检测该类病毒的环状 RNA 分子, 从斑点杂交检测呈阳性的 9 个样品中, 每个省份选取 1 个, 即 a5、a17、p6、p16 进行 Return-PAGE 检测, 以无 HSVd 的样品为负对照, 以苹果上发生的苹果锈果类病毒 (ASSVd) 和锦紫苏上发生的锦紫苏类病毒 (CBVd-1) 为对照, 进行 5% 的聚丙烯酰胺凝

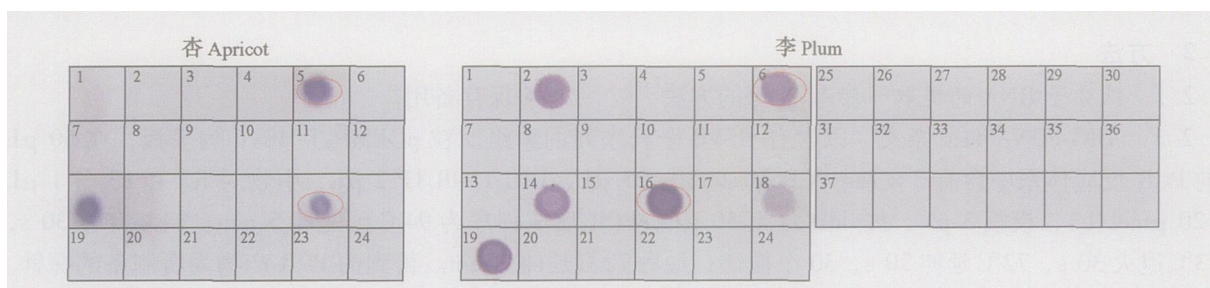


图 1 利用 DIG 标记的 HSVd cDNA 探针斑点杂交检测杏、李中发生的 HSVd

所圈样品为选择进行 Return-PAGE、生物学检测和克隆测序分析。

Fig 1 Analysis by dot-blot hybridization with a DIG-labelled cDNA probe specific for HSVd in apricot and plum

Circled samples are those selected for Return-PAGE detection, biological indexing, cloning and sequencing analysis

胶电泳 (图 2)。结果显示: a17、p6、p16 呈阳性, a5 呈阴性, 且无 HSVd 的样品均呈阴性。

2.3 生物学检测

选取 a5、a17、p6、p16 进行生物学接种, 接种 4 周后指示植物开始陆续发病, 6 周后大多数已发病, 表现为新叶向后仰卷、皱缩、茎间缩短、植株矮化, 花瓣皱缩等症状 (图 3)。

2.4 RT-PCR

为了进一步研究该类病毒的序列变异情况, 利用所设计的引物, 以斑点杂交检测呈阳性的样

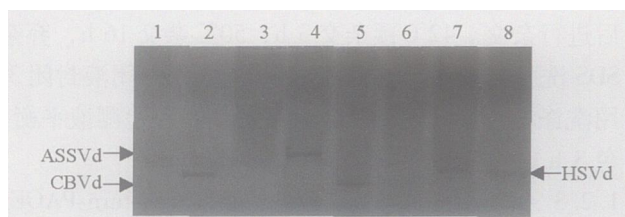


图 2 利用 Return-PAGE 检测杏、李中发生的 HSVd 环状 RNA 分子

1: a5; 2: a17; 3: 杏无 HSVd 对照; 4: ASSVd 对照; 5: CBVd 对照; 6: 李无 HSVd 对照; 7: p6; 8: p16

Fig 2 Detection of HSVd circular RNA structure in apricot and plum by Return-PAGE

1: a5; 2: a17; 3: Apricot without HSVd control; 4: ASSVd standard; 5: CBVd standard; 6: Plum without HSVd control; 7: p6; 8: p16

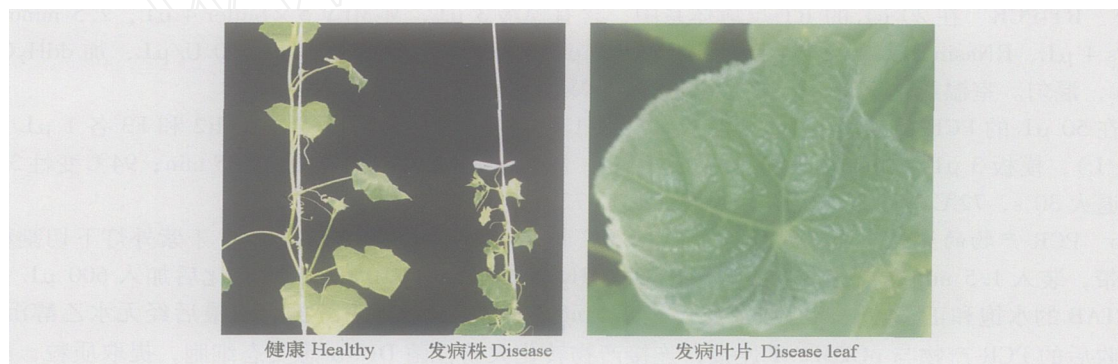


图 3 'Suyo' 黄瓜接种 6 周后发病症状

Fig 3 Severe symptoms on 'Suyo' cucumber six weeks post inoculation

品为模板进行 RT-PCR, 以无 HSVd 的样品和水为负对照, 所得 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 结果斑点杂交呈阳性的样品均出现一条约 300 bp 的特异条带 (图 4)。

2.5 序列测定及比较分析

选取 a5、a17、p6、p16 进行克隆测序分析, 每个样品挑取 5 个克隆进行测序, 共 20 个克隆。测序结果: 20 条序列中有相同序列, 共获得 13 条不同的序列。将这 13 条序列与 GenBank 中已报道序列进行比较分析 (表 3), 结果表明: 序列同

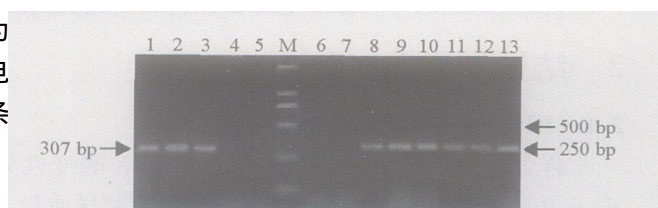


图 4 杏、李中发生的 HSVd 的 RT-PCR 检测

1~3: a5, a13, a17; 4: 杏无 HSVd 对照; 5: 水对照; M: DL 2000; 6: 水对照; 7: 李无 HSVd 对照; 8~13: p2, p6, p14, p16, p18, p19

Fig 4 Detection of HSVd by RT-PCR in apricot and plum

1-3: a5, a13, a17; 4: Apricot without HSVd control; 5: Water control; M: DL 2000; 6: Water control; 7: Plum without HSVd control; 8-13: p2, p6, p14, p16, p18, p19

源性达 99.0% ~ 99.7%，且序列变异与地域、寄主等无明显相关性。

表 3 所得 HSVd 序列与 GenBank 已报道 HSVd 序列的分析比较

Table 3 Analysis of HSVd sequence variants obtained with HSVd reported in GenBank

树种 Stone fruit	省份 Province	品种 Variety	克隆号 Code of clone	克隆数 No. of clones	大小 Size (nt)	最接近的序列 Closest HSVd variant	碱基变化 Nucleotide different with closest sequence *
杏 Apricot	河北 Hebei	凯特 Katy	a5.1	1	297	Y09345	G ¹⁰⁷ A, A ²⁰⁰ G
			a5.2	6	297	Y09345	G ¹⁰⁷ A
			a5.5	2	298	Y09345	- ¹⁰² T, G ¹⁰⁷ A
	陕西 Shaanxi	梅杏 Meixing	a17.2	1	297	Y09345	T ²⁶⁰ C
			a17.3	2	297	A Y425171	G ¹⁰⁷ A
			a17.5	1	297	Y09345	C ¹⁰² G, G ¹⁰⁷ A, C ²⁵⁹ T
李 Plum	内蒙古 Inner Mongolia	大紫李 Dazili	p6.1	1	297	A Y425171	G ¹¹¹ T
			p6.2	1	297	A Y425171	G ¹⁰⁷ A, G ¹¹⁴ A
			p6.3	1	298	Y09345	- ⁹⁷ C, G ¹⁰⁷ A
			p6.5	1	297	A Y425171	G ⁴⁹ A, G ¹⁰⁷ A, T ²³⁸ C
	河北 Hebei	蓝宝石 Lanbaoshi	p16.1	1	298	Y09345	- ⁴⁶ A, G ¹⁰⁷ A, T ¹³⁵ C
			p16.2	1	297	Y09345	A ¹¹⁰ G
			p16.5	1	297	Y09345	T ¹⁸ C, G ¹⁰⁷ A, A ¹⁶⁰ G

* 107 代表碱基位置；G 代表 GenBank 中 Y09345 107 位的碱基；A 代表所测序列 107 位的碱基。

* 107 stand for position of nucleotide; G stands for nucleotide of Y09345 in 107; A stands for nucleotide of sequence variants in 107.

3 讨论

本研究表明 HSVd 在我国杏、李树上也有发生。作者于 2005 年 9 月从北京昌平区果树研究所采取杏、李叶片各 6 个品种，经检测各有 1 个品种（杏‘银白’，李‘大石早生’）带有该类病毒^[18]，杏‘银白’采样时叶片呈现有不规则分布的黄色斑点，叶边缘皱缩等症状。但该症状是否与 HSVd 的侵染有关还有待进一步研究。本文所述含有 HSVd 全长序列的重组质粒 pGEM-T-HSVd 就是由此得到的。此外，本研究所用样品为冬天采一年生枝条，采样时其树皮无明显症状表现。

类病毒 Return-PAGE 检测虽灵敏度较低，但能检测类病毒的环状 RNA 分子，且不需要知道其核酸序列信息。斑点杂交灵敏度较高，忠实性高，操作简单，一次可对大量样品进行检测。RT-PCR，虽灵敏度很高，但存在交叉污染导致的假阳性及假阴性等问题，实际应用中有时受到限制。生物学检测比较灵敏，但需要一定空间和保温设备，试验周期较长，不适合对大批量样品进行检测。因此，在具体的研究中，需根据具体情况将各种方法结合使用，对结果进行综合分析。本研究还发现，a5 经 Return-PAGE 检测结果呈阴性（图 2），但是从杂交信号来看，其含量应与 a17 相近（图 1），也可能是样品（枝条皮）经反复冻融，组织被褐化而影响类病毒的提取。在第 2 次提取时，a5 有较严重的褐化现象。但褐化是否影响类病毒的提取以及影响的程度，还需在今后的试验中进行细致的观察和研究。

测序结果表明，HSVd 序列变异较小，特别是中央保守区几乎没有变化，且不同地域，不同树种之间有相同序列。这些说明 HSVd 的序列变异与地域、寄主等无明显相关性。已有报道也显示 HSVd 序列相当保守，特别是中央保守区几乎没有变化。

从目前的检测结果分析，我国北京、河北、陕西、内蒙古等地的杏、李树上均感染有该类病毒。但由于目前所采样品数量较少，采样地也较单一，因此对其详细的分布情况还需要通过今后扩大调查区域范围，增加样品检测数量来进行进一步的分析。

参考文献：

- 1 Yamamoto H, Kagami Y, Kurokawa M, Nishimura S, Kubo S, Inoue M, Murayama D. Studies on hop stunt disease. Memoirs of the Faculty

- of Agriculture, Hokkaido University, 1970, 7: 491 ~ 512 (in Japanese)
- 2 Shikata E. New viroids from Japan. *Seminars in Virology*, 1990, 1: 107 ~ 115
 - 3 Astruc N, Marcos J F, Macquaire G, Candresse T, Pallas V. Studies on the diagnosis of *Hop stunt viroid* in fruit trees: identification of new hosts and application of a nucleic acid extraction procedure based on non-organic solvents. *European Journal of Plant Pathology*, 1996, 102: 837 ~ 846
 - 4 Canizares M, Marcos J, Pallas V. Molecular characterization of an almond isolate of *Hop stunt viroid* (HSVd) and conditions for eliminating spurious hybridization in its diagnostics in almond samples. *European Journal of Plant Pathology*, 1999, 105: 553 ~ 558
 - 5 Polivka H, Staub U, Gross H J. Variation of viroid profiles in individual grapevine plants: novel grapevine yellow speckle viroid 1 mutants show alterations of haip in I. *Journal of General Virology*, 1996, 77: 155 ~ 161
 - 6 Sano T, Hataya T, Terai Y, Shikata E. Hop stunt viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *Journal of General Virology*, 1989, 70 (6): 1311 ~ 1319
 - 7 Diener T, Smith D, Hammond R, Albanese G, La Rosa R, Davino M. Citrus B viroid identified as a strain of *Hop stunt viroid*. *Plant Disease*, 1988, 72: 691 ~ 693
 - 8 Semancik J S, Roistacher C N, Rivera-Bustamante R, Duran Vila N. Citrus cachexia viroid, a new viroid of citrus: relationship to viroids of the exocortis disease complex. *Journal of General Virology*, 1988, 69: 3059 ~ 3068
 - 9 Ragozzino E, Faggioli F, Barba M, Malfitano M. Molecular characterization of *Hop stunt viroid* (HSVd) sequence variants from *Prunus* species. *Acta Horticulturae International Society for Horticultural Science (ISHS)* Leuven, Belgium, 2004, 657: 385 ~ 389
 - 10 Cañizares M C, Marcos J F, Pallás V. Studies on the incidence of *Hop stunt viroid* in apricot trees (*Prunus amariaca*) by using an easy and short extraction method to analyze a large number of samples. *Acta Horticulturae*, 1998, 472 (2): 581 ~ 585
 - 11 Cañizares M C, Aparicio F, Amari K, Pallás V. Studies on the aetiology of apricot 'Virela' disease. *Acta Horticulture*, 2001, 550: 249 ~ 258
 - 12 Torres H, Gomez G, Pallas V, Shalaby A, Aouane B, Gavriel I, Kominek P, Caglayan K, Sipahioğlu M, Michelutti R, Myrta A, Flore N. Detection by tissue printing of stone fruit viroids from Europe, the Mediterranean and north and south America. *Acta Horticulture*, 2004, 657: 379 ~ 383
 - 13 Ismael F, Abou Ghanem-Sabanadzovic N, Myrta A, Di Terlizzi B, Savino V. First record of *Peach latent mosaic viroid* and *Hop stunt viroid* in Syria. *Journal of Plant Pathology*, 2001, 82 (2): 227
 - 14 Choueiri E, Abou Ghanem-Sabanadzovic N, Khazzaka K, Sabanadzovic S, Di Terlizzi B, Myrta A, El-Zammar S, Jreijiri F, Savino V, Martelli G P. First record of *Hop stunt viroid* on apricot in Lebanon. *Journal of Plant Pathology*, 2002, 84 (1): 69
 - 15 Amari K, Cañizares M C, Myrta A, Sabanadzovic S, Shiri M, Gavriel I, Aglayan K, Varveri C, Gatt M, Di Terlizzi B, Pallás V. First report of *Hop stunt viroid* (HSVd) from some Mediterranean countries. *Phytopathologia Mediterranea*, 2000, 39: 271 ~ 276
 - 16 Amari K, Gomez G, Myrta A, Di Terlizzi B, Pallás V. The molecular characterization of 16 new sequence variants of *Hop stunt viroid* reveals the existence of invariable regions and a conserved hammerhead-like structure on the viroid molecule. *Journal of General Virology*, 2001b, 82: 953 ~ 962
 - 17 Li S F, Onodera S, Sano T, Yoshida K, Wang G P, Shikata E. Gene diagnosis of viroids: Comparisons of reverse-PAGE and hybridization using DIG-labelled DNA and RNA probes for practical diagnosis of hop stunt, citrus exocortis and apple scar skin viroids in their natural host plants. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1995, 61: 381 ~ 390
 - 18 Yang Y A, Wang H Q, Guo R, Cheng Z M, Li S F, Sano T. First report of *Hop stunt viroid* in apricot in China. *Plant Disease*, 2006, 90 (6): 828