

间接原位 RT-PCR 法检测辣椒叶组织中辣椒轻斑驳病毒的分布

杨洪一¹, 郭世辉¹, 李丽丽^{2,*}

(¹东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040; ²黑龙江省林业科学研究所, 哈尔滨 150081)

摘 要: 为了了解辣椒轻斑驳病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) 在辣椒组织中的分布特点, 探索利用间接原位 RT-PCR 技术对病毒在辣椒组织中进行定位。利用改进的 CTAB 法从辣椒叶片中提取总 RNA, 利用 RT-PCR 技术扩增出 PMMoV 的特异片段, 并经克隆测序, 证明其为 PMMoV 的特异片段。利用 PCR 技术, 制备出了地高辛标记的特异 cDNA 探针。对原位 RT-PCR 反应体系进行优化, 经过切片制备 (切片厚度 7 μm 、应用 Superfrost plus 正电荷防脱载玻片)、预处理 (1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白酶 K 消化 5 min)、RT-PCR (37 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 2.5 h、PCR 退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$)、杂交检测, 建立了应用间接原位 RT-PCR 技术检测 PMMoV 在辣椒组织中分布的方法。原位 RT-PCR 结果显示, 叶片组织中 PMMoV 阳性信号主要分布于栅栏组织, 其次是海绵组织, 表皮组织中也有少量阳性信号。此外, 叶柄中可见少量阳性信号, 主要位于表皮组织。

关键词: 辣椒; 辣椒轻斑驳病毒; 原位 RT-PCR; 地高辛; 组织定位; cDNA

中图分类号: S 641.3

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 03-0489-07

Analysis on the Distribution of *Pepper mild mottle virus* in Leaf Tissues of Peppers with Indirect *in situ* RT-PCR

YANG Hong-yi¹, GUO Shi-hui¹, and LI Li-li^{2,*}

(¹College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; ²Institute of Forestry Science of Heilongjiang Province, Harbin 150081, China)

Abstract: The aim of this study was to analyze the characterization of distribution of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) in tissue of peppers, and an *in situ* RT-PCR system was developed to locate PMMoV in tissue of peppers. Total RNA was extracted from pepper leaves with a modified CTAB method. The specific fragment was amplified by RT-PCR using total RNA as a temple, and it was testified that the fragment was PMMoV-specific one on the basis of cloning and sequencing. A specific digoxin-labeled cDNA probe of PMMoV was generated according to PCR labeling technique. A system for localization of PMMoV in tissue level was developed with indirect *in situ* RT-PCR, via optimization of *in situ* RT-PCR including section preparation (7 μm sections in the Superfrost plus positively charged slides), pre-treating (1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ protease K digested for 5 min), RT-PCR (performing 2.5 h in 37 $^{\circ}\text{C}$ for reverse transcription

收稿日期: 2014-11-17; 修回日期: 2015-01-26

基金项目: 中央高校基本科研业务费项目 (DL13EA06-3)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: hyl01@tom.com)

and annealing in 58 °C for PCR), and detection of hybridization. The technique, which can analyze the distribution of PMMoV in tissue of peppers, was developed. The result of *in situ* RT-PCR showed that PMMoV-positive signals were the best in palisade tissues of pepper leaves, and it had lots of PMMoV-positive signals in palisade tissues. Epidermis had also few positive signals. In addition, few positive signals located mostly in epidermis could be found in petioles.

Key words: *Capsicum*; *Pepper mild mottle virus*; *in situ* RT-PCR; digoxin; location in tissue cDNA

辣椒轻斑驳病毒 (*Pepper mild mottle virus*, PMMoV) 是一种严重危害辣椒生产的种传病毒。PMMoV 最早在美国发现, 其后在西班牙、德国、澳大利亚等国均有报道, 对英国、美国一些保护地辣椒曾造成毁灭性危害 (Antignus et al., 2008)。PMMoV 属于烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*), 病毒粒体直杆状, 为正单链 RNA 病毒, 基因组由 6 357 个核苷酸组成 (Hiroyuki et al., 2007)。PMMoV 可通过带毒种子、植株残体传播, 在植物残体中可存活数年, 可随辣椒制品进入人体, 随粪便排出后仍具有侵染活性 (Colson et al., 2010)。中国于 1994 年首次在新疆辣椒上发现 PMMoV, 后来山东青岛、河北保定、宁夏惠农等地区先后有该病毒发生的报道, 目前该病害危害日益严重 (Wang et al., 2009; 王亚南 等, 2010)。传统观点认为, 植物病毒在植株体内分布不均一, 但病毒的具体分布规律不详 (Hull, 2007; Matsushita et al., 2011)。病毒侵入植物, 经过复制及长距离转运扩散至植物各组织, 在此基础上, 进一步复制增殖, 从而干扰植物正常生理活动, 因而了解病毒分布是了解病毒转运及病理作用的一扇窗口。为了了解病毒的分布特点, 一些组织定位手段被开发。早期主要通过电子显微镜、免疫印迹、免疫胶体金、免疫荧光、原位杂交等技术进行病毒的组织定位 (Kelley & Cameron, 1986; Nass et al., 1998; Aparicio et al., 1999; Tzanetakis et al., 2004; Genda et al., 2005), 但灵敏度较低。尽管原位杂交灵敏度高于免疫学方法 (陈珏, 2010), 但多适于检测组织内高滴度病毒, 而低滴度病毒需则利用原位 RT-PCR 技术进行检测 (Bates et al., 1997)。

原位 RT-PCR 技术是近年来发展起来的病毒组织定位新技术, Hasse 等 (1990) 首次报道了原位 PCR 扩增技术, 简称原位 PCR (*in situ* PCR), 其结合了传统 PCR 技术的高效扩增和原位杂交技术的细胞定位的优点, 既能够在组织切片、细胞样品中检测到低拷贝的 RNA 或 DNA, 又能特异地确定其细胞来源和细胞定位。原位 PCR 主要用于医学研究, 近年来在植物学研究中也有所应用 (Johansen, 1997; Matsuda et al., 1997)。Silva 等 (2003) 首次将原位 RT-PCR 技术应用于植物病毒学研究, 在杏树组织中发现了大量李矮缩病毒 (*Prune dwarf virus*, PDV)。之后陆续有报道应用原位 RT-PCR 技术对植物病毒进行组织定位的报道。在草本植物中, 目前仅有关于草莓叶片中的草莓斑驳病毒组织定位的报道 (Yang et al., 2011)。在木本植物中, 已有利用原位 RT-PCR 技术对苹果、梨、杏、葡萄中的病毒、类病毒进行了组织定位的研究, 显示叶片中的病毒主要分布于叶肉细胞; 而葡萄、梨茎尖分生组织尖端未能检测到病毒 (赵英和牛建新, 2008; Zhao et al., 2009; 王钰婷 等, 2013)。为了进一步了解 PMMoV 在辣椒组织中的分布特点, 本研究中探索利用间接原位 RT-PCR 技术对病毒在叶片和叶柄组织中进行定位。

1 材料与方法

1.1 材料

8 株感病辣椒植株于 2011 年 9 月分别采自黑龙江哈尔滨、吉林九台辣椒田, 移栽入花盆, 保存

于东北林业大学微生物学实验室。利用 Agdia 公司的 DAS-ELISA 试剂盒对感病植株及阴性对照样品进行了检测, 确认感病植株为 PMMoV 阳性; RT-PCR 检测显示其未受黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)、烟草花叶病毒 (*Tobacco mosaic virus*, TMV) 和马铃薯 Y 病毒 (*Potato virus Y*, PVY) 感染 (Dai et al., 2012)。

大肠杆菌 DH5 α 菌株为本实验室保存。反转录酶 M-MLV 为 Invitrogen 公司产品, PCR 产物纯化试剂盒、dNTPs 购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司, *Taq* DNA 聚合酶、RNasin、pMD 18-T 载体、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司。DIG DNA 标记及检测试剂盒购自深圳莱伯克生物科技有限公司。其它药品为国产分析纯。引物序列为: 5'-CGATATAATGCCGTGCTAGAT-3' (上游引物), 5'-GCCATCATGTTTAAGGAGTTGT-3' (下游引物)。引物由大连宝生物公司合成。

1.2 RNA 提取及 RT-PCR

取 0.05 g 辣椒叶片, 利用改进 CTAB 法提取总 RNA (Yang & Zhang, 2007), 最后溶解于 50 μ L DEPC 水中。在 0.2 mL Eppendorf 管中加入随机 9mer 引物 ($0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、dNTPs ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、1 μ L 总 RNA、RNasin 0.3 μ L、反转录 Buffer 4 μ L、2 μ L DTT、0.5 μ L M-MLV 反转录酶 ($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 及 9 μ L 超纯水, 终体积 20 μ L, 混匀。之后进行反转录反应, 对反转录温度 (37、42 $^{\circ}\text{C}$) 及时间 (0.5、1.0、2.5 h) 进行优化。反转录结束后 70 $^{\circ}\text{C}$ 15 min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。

取 1 μ L 反转录产物进行 PCR 反应。反应体系中含 2 μ L 10 \times Buffer, 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs, 0.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物, 0.5 U *Taq* 酶, 用水补足至 20 μ L。

对 PCR 反应中的退火温度 (53 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$) 进行优化, 最终反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

1.3 克隆测序

以 PCR 产物纯化试剂盒回收 DNA 片段, 与 pMD 18-T 载体连接, 然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。经蓝白斑筛选, 挑取白色菌落培养, 提取质粒, 通过 PCR 鉴定阳性克隆 (Yang & Zhang, 2007)。测序工作委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行, 双向测序。

1.4 探针制备及点杂交

参照地高辛标记试剂盒说明, 利用 PCR 技术合成探针。利用点杂交对 RT-PCR 产物进行检测, 具体操作参见文献 (Wang et al., 2009)。

1.5 冰冻切片的制作及预处理

分别取 8 株感病植株及阴性对照样品, 每株分别取 2 个叶片或叶柄样品, 剪成 1.0 cm \times 0.5 cm 小段, 投入固定液 (4%低聚甲醛、4%蔗糖和 2.5%戊二醛) 中固定 1 ~ 2 h, 然后浸入 15%蔗糖磷酸溶液中, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。将包埋剂倒入锡箔纸盒内, 用液氮将材料迅速冷冻, 然后放入温度为 -20 $^{\circ}\text{C}$ 的冰冻切片机样品台上迅速冷冻固定。先将样品切取需要的部位, 然后拿出来室温放置 25 s, 使包埋块稍微变软。回温后的材料放入机箱内切片。用镊子小心夹取组织切片, 平展于载玻片上, 室温放置 10 min 使切片稍变干。

用 3 \times PBS 和 1 \times PBS 分别冲洗组织, 并温育 5 min。然后按顺序以 30%、60%、80%和 100%乙醇依次冲洗切片进行室温脱水, 每次 2 min。将载有固定样品的载玻片置于 105 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min。放入含 0.3% H_2O_2 PBS 中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 或室温放置过夜, 然后用 PBS 洗 1 遍。将载玻片浸于 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 蛋白

酶 K (1× PBS 稀释) 中, 温浴 10 min 后进行原位 RT-PCR 扩增。

1.6 原位 RT-PCR

将反转录溶液加于切片上, 盖上原位杂交专用盖玻片, 密封, 之后放于原位 PCR 仪上进行反转录反应。反转录反应结束后, 将 PCR 反应混合液加到切片上, 密封后放置原位 PCR 仪上进行 PCR 扩增。反转录体系、PCR 体系组成、反应程序与上述 RT-PCR 反应相同。利用地高辛标记的探针对组织切片进行杂交检测, 最后利用倒置显微镜进行观察并采集图像。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测系统的优化

以感病辣椒叶片组织为试材, 利用改进 CTAB 法提取总 RNA, 利用 PMMoV 特异引物扩增病毒基因组部分外壳蛋白 (Coat Protein, CP) 基因区域。最终优化的反转录程序为 37 °C 2.5 h; 最优退火温度为 58 °C。利用优化 RT-PCR 反应程序, 最终扩增出了与预期片段大小一致的 PCR 产物 (约 250 bp) (图 1)。

利用琼脂糖凝胶回收试剂盒对扩增产物进行胶回收, 连接至载体后进行测序, 测序结果显示该序列为 246 bp; 与 GenBank 中所报道的 PMMoV CP 基因的序列同源性为 91%~98%, 显示该序列为 PMMoV 特异序列。

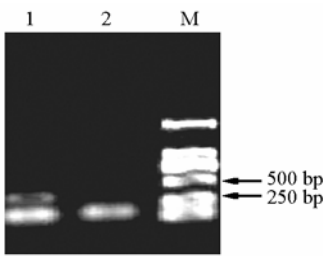


图 1 利用 RT-PCR 检测 PMMoV

M: DL2000 Marker; 1: PMMoV 阳性样本; 2: 阴性对照。
Fig. 1 Detection of PMMoV by RT-PCR
M: DL2000 Marker; 1: Sample infected PMMoV; 2: Negative control.

2.2 间接原位 RT-PCR 法检测 PMMoV 在辣椒组织中的分布

2.2.1 探针制备及其有效性分析

以质粒 DNA 为模板, 利用地高辛标记试剂盒, 以 DIG-dUTP 为底物, 用随机渗入法对 DNA 进行标记, 制备了地高辛的探针, 经电泳显示探针大小与预期相符。为了确定探针的有效性, 利用制备的探针对感染 PMMoV 样本的 RT-PCR 产物进行斑点杂交检测 (图 2), 杂交后加入抗地高辛的碱性磷酸酶标记的抗体, 利用碱性磷酸酶和化学底物的作用检测杂交靶 DNA, 该探针可与 RT-PCR 产物产生明显杂交信号, 而阴性对照中未见杂交信号, 说明制备的探针及整个杂交体系是有效的。

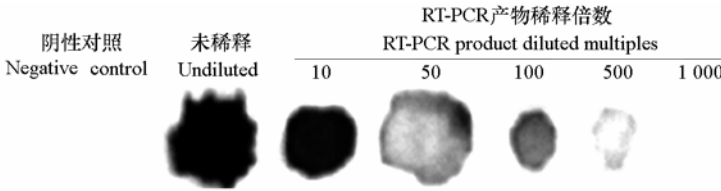


图 2 PMMoV 探针的斑点杂交反应结果

Fig. 2 The result of spots hybridization of PMMoV probe

2.2.2 冰冻切片制备及蛋白酶处理过程优化

将辣椒组织利用包埋剂进行包埋, 利用液氮将辣椒组织冷冻, 在冰冻切片机上将辣椒组织制成

冰冻切片。对切片厚度进行了优化 (5 ~ 30 μm), 最终最优的切片厚度为 7 μm 。切片过薄则不能保持细胞形态的完整性, 导致杂交显色后组织形态模糊, 且后续试验中组织易碎。切片过厚则背景颜色太深, 杂交后的显色不明显, 不利于观察, 也易导致样品吸附力降低, 与载玻片结合不牢固。将切片展片到 Superfrost plus 正电荷防脱载玻片上, 在显微镜下可清晰观察到叶片内部组织形态(图 3)。

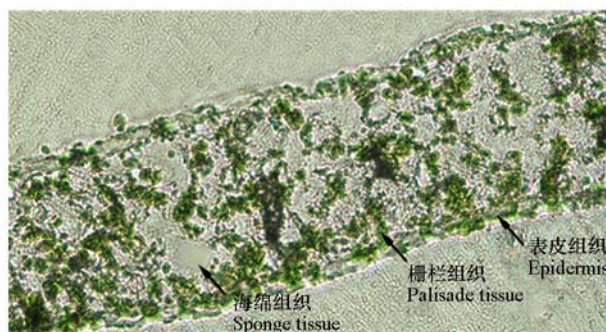


图 3 辣椒叶片组织冰冻切片 (放大 200 \times)

Fig. 3 Frozen tissue section of pepper leaf (magnifying 200 \times)

在切片预处理过程中, 还对蛋白酶的消化时间进行了优化。蛋白酶消化主要是为了增加细胞的通透性, 利于反应溶液进入细胞内部。切片的最佳消化时间为 5 min (蛋白酶 K 浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 时间过长会导致细胞膜完整性受到破坏, 细胞组织形态模糊; 时间过短则细胞通透性不好, 反应不稳定, 易出现假阴性。

2.2.3 间接原位 RT-PCR 技术检测 PMMoV 的结果

经过优化反应体系, 建立了间接原位 RT-PCR 技术检测 PMMoV 的技术体系。以辣椒叶片、叶柄为试材, 制备冰冻切片, 切片厚度为 7 μm , 置于 Superfrost plus 正电荷防脱载玻片上; 切片预处理过程采用蛋白酶 K ($1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 消化 5 min; 之后在原位 PCR 仪中进行 RT-PCR 反应, 反转录程序为 37°C 2.5 h、PCR 反应退火温度为 58°C ; 之后利用地高新标记的探针对 RT-PCR 产物进行分子杂交检测; 最后将切片置于倒置显微镜下进行镜检, 感染 PMMoV 辣椒组织中可见一些紫黑色斑

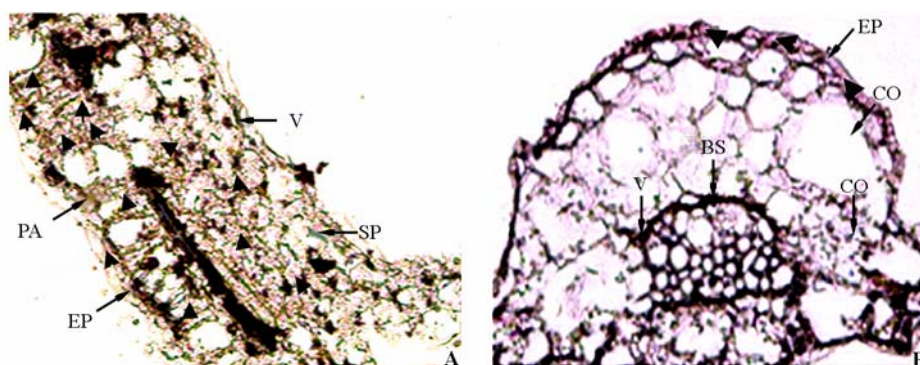


图 4 PMMoV 的组织定位 (放大 200 \times)

A: 叶片组织; B: 叶柄组织。EP: 表皮组织; PA: 栅栏组织; SP: 海绵组织; V: 病毒粒子; CO: 皮层; BS: 维管束鞘。黑色箭头标示阳性信号密集聚集区。

Fig. 4 Location of PMMoV in tissue of pepper (magnifying 200 \times)

A: Leaf tissue; B: Petiole tissue; EP: Epidermis; PA: Palisade tissue; SP: Sponge tissue; V: Virus; CO: Cortex; BS: Bundle sheath. Strong positive-sign regions were signed with black arrow.

点在组织中沉积。探针是以 PMMoV 的一段特异序列为模板合成的, 因此探针能与 PMMoV 的核酸发生互补配对, 即只有存在 PMMoV 的组织才会有紫黑色斑点的出现。该原位 RT-PCR 体系为间接原位 RT-PCR, 相比直接法操作较繁琐, 但其灵敏度、稳定性较高。

以感染 PMMoV 辣椒叶片、叶柄为试材的原位 RT-PCR 结果显示, 紫黑色沉淀在叶片组织中主要分布于栅栏组织, 其次是海绵组织, 表皮组织中也有少量阳性信号 (图 4), 阴性对照中未见紫黑色沉淀。此外, 叶柄中仅见少量阳性信号, 主要位于表皮组织, 维管束鞘中可见少量阳性信号。

3 讨论

原位 RT-PCR 技术流程较长, 技术难度较大, 需要对试验中的各个技术环节进行优化及调整。在载玻片、盖玻片方面, 原位杂交专用盖玻片、Superfrost plus 正电荷防脱载玻片效果最优, 常规的多聚赖氨酸载玻片效果较差, 组织易脱落。在组织选择上, 总体上含水量低、硬度较高的组织制备切片及原位 RT-PCR 反应效果较好。在间接原位 RT-PCR 体系中, 通过多次冲洗, 影响 RT-PCR 反应中酶活性的植物次级代谢物质可能在反应过程中被冲洗掉了, 因而其稳定性较好。本研究是利用原位 RT-PCR 技术进行辣椒病毒组织定位的首次报道, 所建立的原位 RT-PCR 体系可为其他植物病毒研究所借鉴。

在植物病毒检测研究中, 同一植株不同季节、不同组织取材可能得到相反的结果 (Posthuma et al., 2002; Thompson et al., 2003), 其原因可能和检测技术的灵敏度相关, 也可能与病毒在植株体内分布不均衡有关。经过原位 RT-PCR 检测, 在辣椒叶片组织中发现大量病毒粒子, 而叶柄组织中病毒粒子数量相对较少。在叶片中, 栅栏组织中含有较多病毒粒子, 而栅栏组织中存在大量的叶绿体, 推断病毒可能影响叶绿体的合成, 从而影响光合作用和叶片发育。

在原位 RT-PCR 相关研究中, 除了以叶片组织为试材外, 近年来一些研究开始探索花粉、茎尖中病毒的分布 (Silva et al., 2003; Zhao et al., 2009), 其对于了解病毒的传播特点及控制病毒传播具有重要意义。本研究仅针对叶片和叶柄组织中 PMMoV 的分布进行了分析, 下一步将对辣椒花粉、种子、特别是病毒灭活处理后种子内病毒的分布特点进行分析。

References

- Antignus Y, Lachman O, Pearlsman M, Maslenin L, Rosner A. 2008. A new pathotype of *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) overcomes the L⁴ resistance genotype of pepper cultivars. *Plant Disease*, 92: 1033 – 1037.
- Aparicio F, Sanchez-Pina M A, Sanchez-Navarro J A, Pallas V. 1999. Location of *Prunus necrotic ringspot* Ilarvirus within pollen grains of infected nectarine trees: Evidence from RT-PCR, dot-blot and *in situ* hybridisation. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 623 – 627.
- Bates P J, Sanderson G, Holgate S T, Johnston S L. 1997. A comparison of RT-PCR, *in-situ* hybridisation and *in-situ* RT-PCR for the detection of rhinovirus infection in paraffin sections. *Journal of Virological Methods*, 67: 153 – 160.
- Chen Yu. 2010. Detection of condyloma acuminatum by *in situ* hybridisation compared with immunohistochemistry. *The Chinese Journal of Dermatovenereology*, 24 (9): 868 – 870. (in Chinese)
- 陈 珏. 2010. 原位杂交和免疫组化技术检测尖锐湿疣的比较. *中国皮肤性病杂志*, 24 (9): 868 – 870.
- Colson P, Richet H, Desnues C, Balique F, Moal V, Grob J, Berbis P, Lecoq H, Harle' J, Berland Y, Raoult D. 2010. *Pepper mild mottle virus*, a plant virus associated with specific immune responses, fever, abdominal pains, and pruritus in humans. *PloS One*, 5 (4): e10041.
- Dai J, Cheng J, Huang T, Zheng X, Wu Y. 2012. A multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of five tobacco viruses in tobacco plants. *Journal Virology Methods*, 183 (1): 57 – 62.

- Genda Y, Sato I, Nunomura O, Hirabayashi T, Ohnishi J, Tsuda S. 2005. Immunolocalization of *Pepper mild mottle virus* in *Capsicum annuum* seeds. *Journal of General Plant Pathology*, 71: 238 - 242.
- Hasse A T, Retzel, Staskus K. 1990. Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 4971 - 4975.
- Hiroiyuki H, Reiko T, Yasuya I, Kappei K, Ikuko M, Shigeharu T, Yasufumi H, Kazumi S. 2007. Cooperative effect of two amino acid mutations in the coat protein of *Pepper mild mottle virus* overcomes L³-mediated resistance in *Capsicum* plants. *Virus Genes*, 34: 205 - 214.
- Hull R. 2007. *Matthews' plant virology*. Fan Zai-feng, Li Huai-fang, Han Cheng-gui, Li Da-wei Trans. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 赫尔 R. 2007. 马修斯植物病毒学. 范在丰, 李怀方, 韩成贵, 李大伟 译. 北京: 科学出版社.
- Johansen B. 1997. *In situ* PCR on plant material with sub-cellular resolution. *Annals of Botany*, 80: 697 - 700.
- Kelley R D, Cameron H R. 1986. Location of prune dwarf and prunus necrotic ringspot virus in sweet cherry pollen and fruit. *Phytopathology*, 76: 317 - 322.
- Matsuda Y, Toyoda H, Kurita O S. 1997. *In situ* PCR technique based on pircking microinjection for cDNA cloning in single cells of barley coleoptile and powdery mildew pathogen. *Plant Cell Reports*, 16: 612 - 618.
- Matsushita Y, Usugi T, Tsuda S. 2011. Distribution of tomato chlorotic dwarf viroid in floral organs of tomato. *European Journal Plant Pathology*, 130: 441 - 447.
- Nass P H, Domier L L, Jakstys B P, D'Arcy C J. 1998. *In situ* localization of barley yellow dwarf virus-PAV 17-kDa protein and nucleic acids in oats. *Phytopathology*, 88: 1031 - 1039.
- Posthuma K I, Adams A N, Hong Y, Kirby M J. 2002. Detection of strawberry crinkle virus in plants and aphids by RT-PCR using conserved L gene sequences. *Plant Pathology*, 51: 266 - 274.
- Silva C, Tereso S, Nolasco G, Oliveira M M. 2003. Cellular location of prune dwarf virus in almond sections by *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 93: 278 - 285.
- Thompson J R, Wetzel S, Klerks M M, Vaskova D, Schoen C D, Spak J, Jelkmann W. 2003. Multiplex RT-PCR detection of four aphid-borne strawberry viruses in *Fragaria* spp. in combination with a plant mRNA specific internal control. *Journal of Virological Methods*, 111: 85 - 93.
- Tzanetakis I E, Halgren A B, Keller K F, Hokanson S C, Maas J L, McCarthy P L, Martin R R. 2004. Identification and detection of a virus associated with strawberry pallidosis disease. *Plant Disease*, 88: 383 - 390.
- Wang Y, Li X, Liu Y, Wang X, Zhou G. 2009. Development of a simple and effective method for specific detection of *Pepper mild mottle virus*. *Acta Virologica*, 53 (1): 21 - 27.
- Wang Ya-nan, Zhao Xu-sheng, Yuan Wen-long, Liu Shu-xiang. 2010. Research status of *Pepper mild mottle virus*. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 38 (14): 7401 - 7404. (in Chinese)
- 王亚南, 赵绪生, 袁文龙, 刘淑香. 2010. 辣椒轻斑驳病毒研究现状. *安徽农业科学*, 38 (14): 7401 - 7404.
- Wang Yu-ting, Jin Zhu, Dong Fang-yuan, He Shi-yu, Zhang Li, Niu Jian-xin. 2013. Detection and sequence analysis of the *Apple scar skin viroid* isolated from pear trees in Xinjiang. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 50 (1): 100 - 105. (in Chinese)
- 王钰婷, 金 珠, 董芳园, 和世玉, 张 莉, 牛建新. 2013. 新疆梨树上苹果锈果类病毒的检测与全序列分析. *新疆农业科学*, 50 (1): 100 - 105.
- Yang H Y, Zhuang X, Li L L, Qin Z W. 2011. Localization of a plant virus combining *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction with a light microscope. *Advanced Science Letters*, 4: 1536 - 1540.
- Yang H Y, Zhang Z H. 2007. Detection of *Strawberry mottle virus* by RT-PCR. *Acta Horticulturae*, 764: 127 - 136.
- Zhao Y, Liu N, Niu J X. 2009. A study of the distribution of *Apple stem pitting virus* in tissues of pear tree using *in situ* hybridization and *in situ* RT-PCR. *Agricultural Sciences in China*, 8 (11): 1351 - 1359.
- Zhao Ying, Niu Jian-xin. 2008. Detection and sequencing of *Apple scar skin viroid* from apricot in Xinjiang. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (6): 805 - 810. (in Chinese)
- 赵 英, 牛建新. 2008. 新疆杏树苹果锈果类病毒的检测与全序列分析. *园艺学报*, 35 (6): 805 - 810.