

葡萄蚕豆萎蔫病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法及应用

张梦妍, 张尊平, 任 芳, 胡国君, 范旭东*, 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, 辽宁兴城 125100)

摘 要: 建立了葡萄蚕豆萎蔫病毒 (*Grapevine fabavirus*, GFabV) 的实时荧光定量 RT-PCR (RT-qPCR) 检测技术。该技术标准曲线循环阈值与模板浓度呈良好的线性关系 (扩增效率 103.8%, 相关系数 0.998), 灵敏度是常规 RT-PCR 的 1 000 倍, 并具有特异性。采用 RT-qPCR 和常规 RT-PCR 方法对葡萄不同发育时期及不同部位的 316 个样品进行检测, 结果表明 RT-qPCR 方法对 GFabV 的检出率 (96.8%) 明显高于 RT-PCR (70.8%)。RT-qPCR 对休眠枝条中 GFabV 的检出率达 100%, 对其他部位样品的检出率均在 92% 以上, 明显高于 RT-PCR (42% ~ 97%)。各个发育时期样品 GFabV 的 RT-qPCR 检出率 (85% ~ 95%) 也普遍高于 RT-PCR (70% ~ 90%)。该技术对于田间样品的检测适用范围广。

关键词: 葡萄; 葡萄蚕豆萎蔫病毒; 实时荧光定量 RT-PCR; RT-PCR

中图分类号: S 663.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 01-0187-08

Establishment and Application of a Real-time Fluorescent Quantitative RT-PCR for Detection of *Grapevine fabavirus*

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

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

Abstract: A SYBR Green I RT-qPCR method for GFabV detection was established, an excellent linear correlation (0.998) and amplification efficiency (103.8%) were obtained from standard curve. The sensitivity of the method was 1 000 times higher than conventional RT-PCR, and had a strong specificity. The established RT-qPCR and conventional RT-PCR were used to detect GFabV in 316 grapevine samples from different development stages and different positions, and the results showed that the detection rate of RT-qPCR (96.8%) was apparently higher than conventional RT-PCR (70.8%). The detection rate of dormant branches using RT-qPCR was 100%, and for other positions detection were all above 92%, which were apparently higher than conventional RT-PCR (42% - 97%). The detection rates using RT-qPCR (85% - 95%) were higher than conventional RT-PCR (70% - 90%) in these samples from different development stages. Compared with conventional RT-PCR, the newly established RT-qPCR has obvious superiority in detection of various samples.

收稿日期: 2019 - 05 - 14; **修回日期:** 2019 - 10 - 25

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 (2018YFD0201301); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项

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

Keywords: grape; *Grapevine fabavirus*; RT-qPCR; RT-PCR

葡萄蚕豆萎蔫病毒 (*Grapevine fabavirus*, GFabV) 是 Al Rwahnih 等 (2016) 从两个日本鲜食葡萄 ‘黑色甜菜’ (*Vitis vinifera*) (Black Beet) 和 ‘长野紫峰’ (Nagano Purple) 上鉴定出的一种新的葡萄病毒。其属蚕豆萎蔫病毒属 (*Fabavirus*) (King et al., 2018)。2017 年中国学者采用小 RNA 测序技术在叶片表现褪绿斑驳及畸形症状的 ‘贝达’ 葡萄上检测到 GFabV, 并通过嫁接传毒的方法初步明确该病毒与 ‘贝达’ 病毒病症状相关 (Fan et al., 2017)。另外, 韩国学者在葡萄上也检测到该病毒, 其中感染 GFabV 的 ‘阳光玫瑰’ 葡萄表现叶片褪绿和畸形症状 (Jo et al., 2017)。

Fabavirus 属的病毒种类多, 寄主范围广, 能侵染莴苣、菠菜、辣椒、豌豆等一些农作物, 造成严重危害 (Ferrer et al., 2008)。最近在表现病毒病症状的樱桃和桃树上也报道了两种新的 *Fabavirus* 病毒, 分别命名为李属病毒 F (*Prunus virus F*, PrVF) 和桃叶凹陷相关病毒 (*Peach leaf pitting-associated virus*, PLPaV) (He et al., 2017; Villamor et al., 2017)。鉴于 *Fabavirus* 病毒的危害性较大, 对 GFabV 的发生、致病性及防控等研究工作十分必要。而建立快速、灵敏的检测方法, 是开展 GFabV 深入研究的基础。

目前葡萄病毒的检测主要以常规 RT-PCR 方法为主, 但 RT-PCR 检测在灵敏度、检测效率、重复性上仍存在不足 (范旭东 等, 2014a)。近年来实时荧光定量 RT-PCR (RT-qPCR) 作为一种高敏感、简便、稳定性好及可定量的检测技术已广泛应用于果树病毒检测, 其灵敏度明显高于常规 RT-PCR (Beuve et al., 2007; Al Rwahnih et al., 2012; 秦子禹, 2015; 周俊 等, 2016)。由于 RT-qPCR 是可实时监测的闭管反应, 因此与巢式 PCR、RT-LAMP 等一些灵敏度较高的检测方法相比, 具有稳定、不易污染的优点。国内外尚未见 GFabV 的荧光定量 PCR 检测技术的报道。本研究中建立了一种 GFabV 的 SYBR Green I 染料法 RT-qPCR 检测方法, 可对田间不同发育时期的不同组织部位葡萄样品进行检测, 大大提高了 GFabV 的检测效率及检测范围。

1 材料与方法

1.1 材料

以实验室保存的 7 株 (7 个品种) 携带 GFabV 的葡萄 (SO₄、贝达、黄意大利、夏黑、阳光玫瑰、霞多丽和赤霞珠) 作为 RT-qPCR 引物筛选的测试样品。2018 年, 选择携带 GFabV 的夏黑、巨峰、品丽珠、赤霞珠、SO₄ 等 5 个品种各 2 株, 采集花序增大期 (EL-15)、始花期 (EL-19)、坐果期 (EL-27)、转色期 (EL-35)、成熟期 (EL-38) (Coombe, 1995) 的上部嫩叶、上部嫩叶柄、下部老叶、下部老叶柄、果实及落叶后的休眠枝条共 316 个样品, 用于 RT-qPCR 和常规 RT-PCR 检测。其中 1 株巨峰葡萄被用于 RT-qPCR 检测体系优化。

1.2 总 RNA 提取及反转录

取葡萄相应部位样品 50 mg, 采用吸附柱法 (范旭东 等, 2014b) 进行总 RNA 提取, -80 °C 保存备用。采用去除基因组 DNA 反转录试剂盒 (PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa) 合成 cDNA, 取 5× gDNA Eraser buffer 2.0 μL、gDNA Eraser 1.0 μL 及总 RNA 1.0 μL 混匀, 42.0 °C 2 min。加入含 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1.0 μL、RT Primer Mix 1.0 μL、5× PrimeScript buffer2 4.0 μL 和 RNase Free ddH₂O 4.0 μL 的混合液, 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 产物 -20 °C 保存备用。

1.3 引物设计筛选

根据 GenBank 已登录的 GFabV 序列及本实验室已报道 GFabV 分离物(Fan et al., 2017)的 *RNA1* 和 *RNA2* 基因保守序列, 设计合成了 5 对 GFabVRT-qPCR 引物 (表 1)。

分别采用常规 PCR 和 RT-qPCR 对引物进行扩增和筛选。常规 RT-PCR 反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 20 s, 72 °C 20 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。RT-qPCR 反应体系为 25 μL, 含 2× SYBR Green I qPCR Mix 12.5 μL、10 μmol · L⁻¹ 正、反向引物各 0.75 μL、DNase/RNase Free dH₂O 9 μL 和 cDNA 2 μL。扩增条件: 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 20 s, 40 个循环, 熔解曲线分析温度范围: 60 ~ 95 °C, 每 6 s 增加 0.5 °C。

表 1 GFabV 实时荧光定量 RT-PCR 引物序列
Table 1 Sequences of GFabV RT-qPCR primers

目标基因 Target gene	引物名称 Primer name	引物 (5' - 3') Primer	产物大小/bp Product size
<i>RNA1</i>	R1YG1a/1b	F: GGCTGGAGTTGGCAAAAGCAC; R: AATTGCCGCCGGTATCCACTC	135
	R1YG2a/2b	F: CTATTGGAGTGGATACCGGCG; R: CCTTCTCAGCCAAGCTTGCC	147
	R1YG3a/3b	F: CATAGATTGCTATTGGAGTGG; R: GCTTGCCATATTCAAACCTCAC	142
<i>RNA2</i>	R2YG1a/1b	F: GCCGCCCAGTGGTTATGTTGG; R: TCCCATATTGGAACCTGTGCC	133
	R2YG2a/2b	F: GCAAAACCGCACTCCATCTTGG; R: ACCATAGCCCCCTAAAAGCATT	139

1.4 体系优化

将感染 GFabV 的巨峰葡萄样品总 RNA 反转录得到的 cDNA 作为模板, 分别采用 50、100、200、300、400、500 nmol · L⁻¹ 的引物终浓度进行 RT-qPCR 扩增, 根据 *C_q* 值和扩增效果筛选出每对引物的最佳浓度。在最佳引物浓度下, 分别检测不同引物在 53.0、55.0、56.9、59.4、61.3 和 63.0 °C 退火温度下荧光信号的变化, 选取扩增效果最好的退火温度。

1.5 特异性检测和灵敏度比较

分别选取感染了葡萄病毒 A (*Grapevine virus A*, GVA)、葡萄病毒 B (*Grapevine virus B*, GVB)、葡萄病毒 E (*Grapevine virus E*, GVE)、葡萄卷叶相关病毒 1 ~ 4 (*Grapevine leafroll-associated virus* 1 ~ 4, GRLaV-1 ~ GRLaV-4)、葡萄斑点病毒 (*Grapevine fleck virus*, GFkV)、葡萄浆果内坏死病毒 (*Grapevine berry inner necrosis virus*, GINV)、灰比诺葡萄树病毒 (*Grapevine Pinot gris virus*, GPGV)、葡萄扇叶病毒 (*Grapevine fanleaf virus*, GFLV) 和 GFabV 的葡萄样品用于 GFabV 的 RT-qPCR 特异性检测。以 10⁰ ~ 10⁻⁷ 梯度稀释的 cDNA 为模板, 分别进行常规 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测, 比较两种检测方法对 GFabV 的灵敏度。

2 结果与分析

2.1 引物筛选与克隆测序

提取 7 个携带 GFabV 的葡萄样品的 RNA, 分别采用 5 对引物进行 RT-PCR 检测, 以不携带 GFabV 的葡萄样品为阴性对照。5 对引物检测阴性对照均未产生条带。对于携带 GFabV 的阳性样品, 引物 R2YG1a/1b 和 R2YG2a/2b 扩增效果较好, 其次为 R1YG1a/1b 和 R1YG3a/3b。引物 R1YG2a/2b 不能

有效扩增 3 号和 5 号阳性样品 (图 1)。

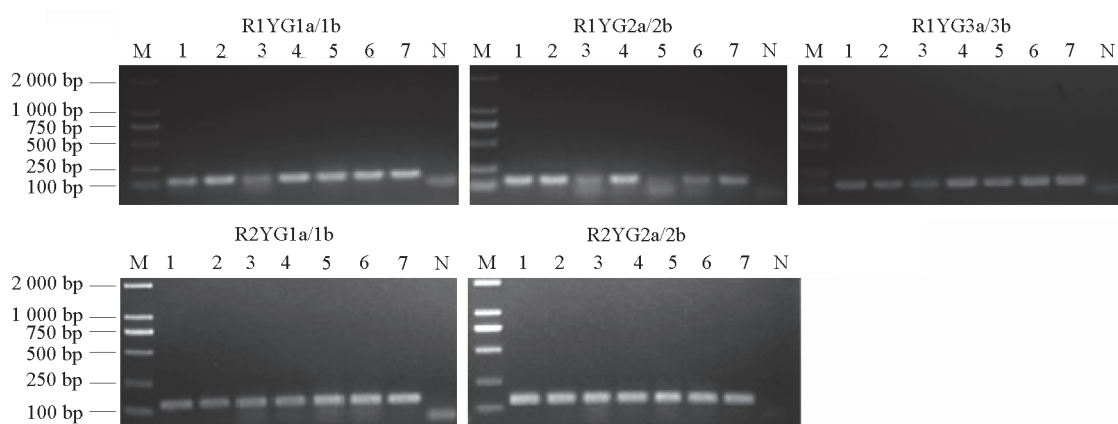


图 1 5 个 GFabV 引物的 RT-PCR 扩增结果比较

M: DL2000; N: 阴性对照; 1~7: 携带 GFabV 的葡萄样品。

Fig. 1 Comparison of different RT-PCR primer pairs for GFabV detection

M: DL2000; N: Negative control; 1 - 7: GFabV infected grape samples.

以巨峰葡萄样品 $10^0 \sim 10^{-7}$ 梯度稀释的 cDNA 为模板, 采用引物 R1YG1a/1b、R1YG3a/3b、R2YG1a/1b、R2YG2a/2b 进行 RT-qPCR 扩增并构建标准曲线, 结果表明 R2YG2a/2b 扩增效率最高 (表 2)。

R2YG2a/2b 扩增产物经克隆测序获得 139 bp 的目的片段序列, 经 NCBI BLAST 比对, 与 GenBank 已登录的 GFabV 分离物 (登录号: KX962564) 相应片段序列相似性最高, 达 99.2%, 表明本研究中扩增片段与 GFabV 序列正确匹配。因此, 选择 R2YG2a/2b 作为检测引物。

表 2 各引物标准曲线的扩增效率、决定系数、斜率、截距
Table 2 Efficiency, R^2 , slope and y-intercept curves of each primer

引物 Primer	扩增效率/% PCR efficiency	决定系数 R^2	斜率 Slope	y 轴截距 y-intercept
R1YG1a/1b	97.0	0.990	-2.614	34.868
R1YG3a/3b	100.0	0.897	-2.981	37.600
R2YG1a/1b	96.0	0.992	-3.011	36.432
R2YG2a/2b	103.8	0.998	-3.234	37.490

2.2 实时荧光定量 RT-PCR 体系优化

6 个退火温度设置为 $53.0 \sim 63.0$ $^{\circ}\text{C}$ 之间, RT-qPCR 扩增 C_q 值范围在 $20.91 \sim 25.99$ 之间。当退火温度为 61.3 $^{\circ}\text{C}$ 和 63.0 $^{\circ}\text{C}$ 时, 具有较高的 C_q , 明显与其他 4 个温度的曲线相区分。 53.0 $^{\circ}\text{C}$ 、 55.0 $^{\circ}\text{C}$ 、 56.9 $^{\circ}\text{C}$ 及 59.4 $^{\circ}\text{C}$ 的 C_q 值差异较小, 为 $20.91 \sim 21.20$ 。当温度为 59.4 $^{\circ}\text{C}$ 时, 相对荧光强度最高, 因此, 选择 59.4 $^{\circ}\text{C}$ 作为最终退火温度。引物不同终浓度优化试验发现, 不同引物浓度下, 扩增 C_q 值相差不大 (图 2)。引物 R2YG2a/2b 终浓度为 $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 相对荧光强度最高, 检测效果较好 (图 3), 因此, 选择 $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为该体系引物浓度。

采用优化后的 RT-qPCR 反应体系构建标准曲线, 结果表明 $10^0 \sim 10^{-7}$ 倍稀释样品扩增曲线呈梯度分布, 扩增效率为 103.8%, 决定系数为 0.998 (图 4)。

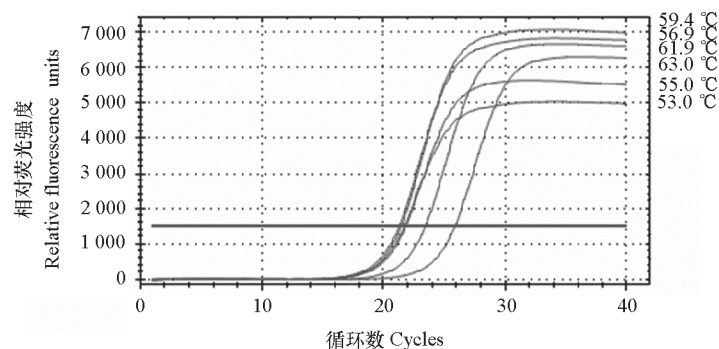


图 2 不同退火温度下 GFabV 的 RT-qPCR 扩增结果

Fig. 2 Amplification results of GFabV RT-qPCR with primers at different temperatures

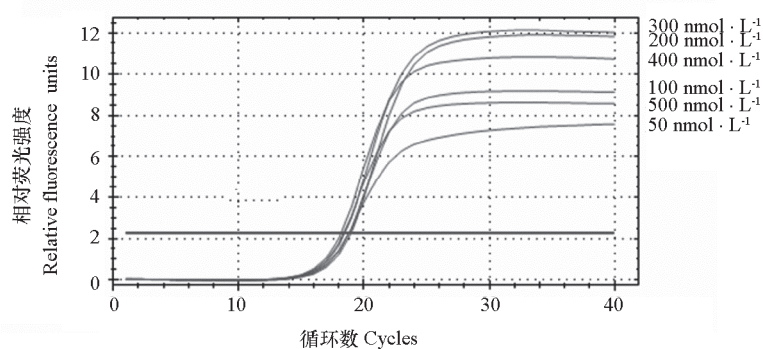


图 3 不同引物浓度的 GFabV RT-qPCR 扩增结果

Fig. 3 Results of GFabV RT-qPCR Amplification with different concentration of primers

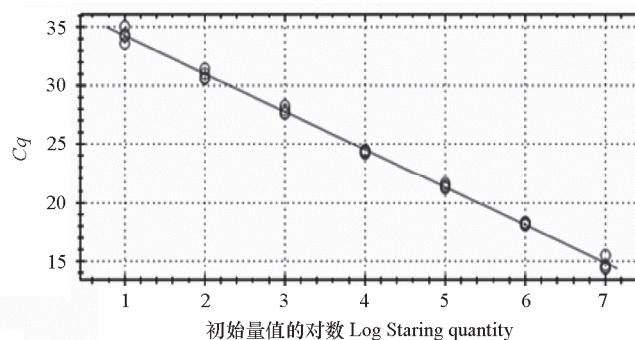


图 4 GFabV 引物 GFabV R2YG2a/2b 的标准曲线

Fig. 4 The standard curve of GFabV RT-qPCR primer GFabV R2YG2a/2b

2.3 灵敏度比较

RT-qPCR 可检测 10^{-6} 稀释倍数的 GFabV 阳性葡萄样品 cDNA, 而常规 RT-PCR 只能检测到 10^{-3} 稀释倍数的 GFabV 阳性葡萄样品 cDNA, 说明实时荧光定量 RT-PCR 检测灵敏度较常规 RT-PCR 检测提高了 1 000 倍 (图 5)。

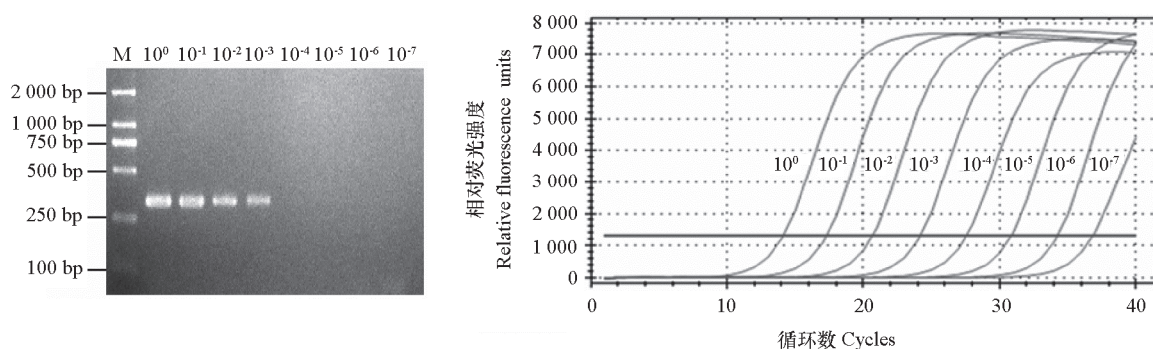


图 5 不同稀释梯度葡萄样品常规 RT-PCR (左) 和 RT-qPCR (右) 检测灵敏度比较

Fig. 5 Comparison of detection sensitivity between conventional RT-PCR (left) and RT-qPCR (right) of grape samples with different dilution gradients

2.4 特异性检测

采用 RT-qPCR 方法检测分别感染 GVA、GVB、GVE、GLRaV-1、GLRaV-2、GLRaV-3、GLRaV-4、GFKV、GINV、GPGV、GFLV 和 GFabV 的葡萄样品, 仅 GFabV 感染样品出现正常的扩增曲线, C_q 值 14.79, 熔解曲线为单一峰 (图 6)。感染其他病毒的样品均无明显扩增曲线, 且熔解曲线无峰, 表明该 RT-qPCR 方法可特异性检测 GFabV。

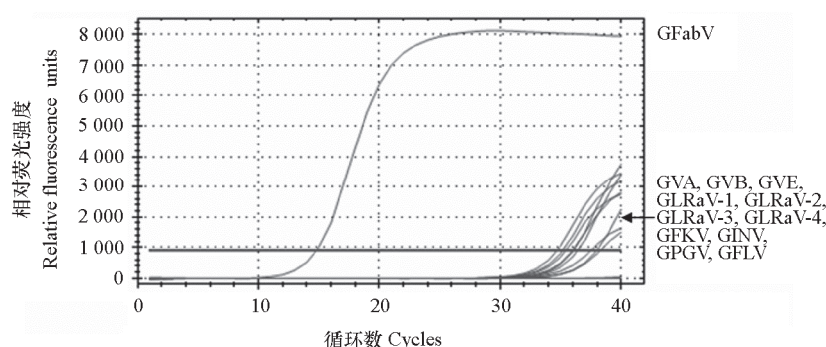


图 6 RT-qPCR 检测方法的特异性检测

Fig. 6 The specificity test of RT-qPCR technique

2.5 不同时期和不同部位田间葡萄样品检测

采用常规 RT-PCR 和 RT-qPCR 方法分别对 10 株 GFabV 带毒葡萄植株不同发育时期的不同部位共 316 个样品进行检测, 常规 RT-PCR 共检测出 224 个阳性, 检出率 70.8%, RT-qPCR 共检测出 306 个阳性, 检出率 96.8%, 由此可见, RT-qPCR 检测率明显高于常规 RT-PCR。不同发育时期的 RT-qPCR 和 RT-PCR 检出率差异为 5% ~ 23%。始花期、坐果期、成熟期样品的 RT-qPCR 检出率相同, 花序增大期的检出率相对较低。成熟期样品的常规 RT-PCR 检出率相比其他时期为最高 (图 7, A)。除休眠枝条外, 不同部位样品 RT-qPCR 与 RT-PCR 检出率相差均较大, 其中, 下部叶柄差异最大 (54%), 其次为上部叶柄 (48%)。RT-qPCR 在不同部位的样品检出率 (92% ~ 100%) 差别不大, 而 RT-PCR 在不同部位的检出率 (42% ~ 97%) 差异明显。RT-qPCR 和 RT-PCR 对休眠枝条的检出率均较高 (图

7, B)。

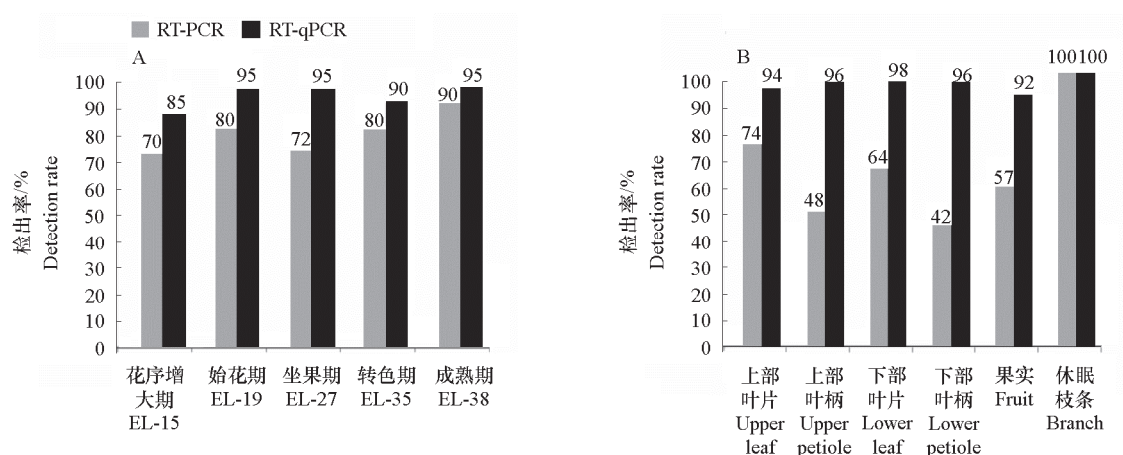


图 7 不同发育时期 (A) 和不同部位 (B) 葡萄样品常规 RT-PCR 和 RT-qPCR 阳性检出率对比
Fig. 7 Comparison of positive detection rate of grape samples from different development stages and different positions and by RT-PCR and RT-qPCR

3 讨论

本研究中建立的 GFabV SYBR Green 染料法 RT-qPCR 检测方法可特异性检测 GFabV, 大大提高了检测效率, 是常规 RT-PCR 检测灵敏度的 1 000 倍。该方法检测适用范围广, 对不同发育时期和不同部位的葡萄样品检测效果均较好, 检出率明显高于常规 RT-PCR。因此, 建立的 RT-qPCR 检测方法明显优于常规的 RT-PCR 检测方法。

先前的研究表明不同种类的葡萄病毒在植株体内的浓度分布规律可能不同 (Krebelj et al., 2015; 任芳 等, 2018)。因此, 确定合适的检测时间及检测部位对病毒的有效检测十分关键。本研究中采用 RT-qPCR 对各个部位 GFabV 检出率均在 92.0% 以上, 其中休眠枝条 GFabV 的检出率为 100%。而采用常规 RT-PCR 进行检测, 不同部位的检测结果差异明显, 休眠枝条 GFabV 的检出率最高为 97.0%, 其次为上部嫩叶 (74.0%)。因此, 综合两种方法的检测结果, 可优先采用休眠枝条作为病毒检测材料, 其次为上部嫩叶。关于采样的时期, 花序增大期的 RT-qPCR 和常规 RT-PCR 的检出率均明显低于其他时期, 这可能由于病毒尚未积累到一定浓度, 从而影响检测效果, 因此在该时期检测可能会造成漏检。始花期、转色期、成熟期样品的 RT-qPCR 检出率不存在差异, 而成熟期样品的常规 RT-PCR 检出率最高。因此, 综合两种方法的结果, 在成熟期取样可能会获得更好的检测效果。本研究确定了 GFabV 检测时最适宜的采样时期及采样部位, 为今后 GFabV 准确检测提供参考。

本研究为国内外首次关于 GFabV 的荧光定量 PCR 检测技术的报道。建立的 RT-qPCR 检测方法 with 常规 RT-PCR 相比, 具有灵敏高、闭管反应、适用范围广等优越性, 可实现对不同时期不同部位葡萄样品中 GFabV 的高效检测。

References

- Al Rwahnih M, Osman F, Sudarshana M, Uyemoto J, Minafra A, Saldarelli P, Martelli G, Rowhani A. 2012. Detection of *Grapevine leafroll-associated virus 7* using real time qRT-PCR and conventional RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 179 (2): 383 - 389.
- Al Rwahnih M, Alabi O J, Westrick N M, Golino D, Rowhani A. 2016. Near-complete genome sequence of grapevine fabavirus, a novel putative member of the genus *Fabavirus*. *Genome Announcements*, 4: e00703-16.
- Beuve M, Sempé L, Lemaire O. 2007. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting *Grapevine leafroll-associated virus 2* variants in grapevine. *Journal of Virological Methods*, 141 (2): 117 - 124.
- Coombe B G. 1995. Adoption of a system for identifying grapevine growth stages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 1: 100 - 110.
- Fan X D, Zhang Z P, Ren F, Hu G J, Li Z N, Dong Y F. 2017. First Report of grapevine fabavirus in grapevines in China. *Plant Disease*, 101: 847.
- Fan Xu-dong, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Ren Fang, Hu Guo-jun, Zhu Hong-juan. 2014a. Progress on molecular detection of grapevine virus. *Acta Horticulturae Sinica*, 41 (5): 1009 - 1019. (in Chinese)
- 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 任芳, 胡国君, 朱红娟. 2014a. 葡萄病毒分子检测技术研究进展. *园艺学报*, 41 (5): 1009 - 1019.
- Fan Xu-dong, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Ren Fang, Hu Guo-jun, Zhu Hong-juan. 2014b. Molecular identification and gene sequence analysis of *Grapevine virus E*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 44 (5): 455 - 460. (in Chinese)
- 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 任芳, 胡国君, 朱红娟. 2014b. 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.
- Ferrer R M, Escriu F M, Guerri J L, Moreno P, Rubio L. 2008. New molecular methods for identification of *Broad bean wilt virus 1*. *Molecular and Cellular Probes*, 22: 223 - 227.
- He Y, Cai L, Zhou L L, Yang Z K, Hong N, Wang G P, Li S F, Xu W X. 2017. Deep sequencing reveals the first fabavirus infecting peach. *Scientific Reports*, 7: 11329.
- Jo Y, Song M K, Choi H, Park J S, Lee J W, Cho W K. 2017. First report of grapevine fabavirus in diverse *Vitis* species in Korea. *Plant Disease*, 101: 1829.
- King A M Q, Lefkowitz E J, Mushegian A R, Adams M J, Dutilh B E, Gorbalenya A E, Harrach B, Harrison R L, Junglen S, Knowles N J, Kropinski A M, Krupovic M, Kuhn J H, Nibert M L, Rubino L, Sabanadzovic S, Sanfaçon H, Siddell S G, Simmonds P, Varsani A, Zerbini F M, Davison A J. 2018. Changes to taxonomy and the international code of virus classification and nomenclature ratified by the international committee on taxonomy of viruses. *Archives of Virology*, 163: 2601 - 2631.
- Krebelj A J, Čepin U, Ravnikar M, Novak M P. 2015. Spatio-temporal distribution of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) in grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, 142: 159 - 171.
- Qin Zi-yu, Sun Jian-she, Wang Na, Shao Jian-zhu. 2015. An efficient TaqMan real-time RT-PCR assay for detecting *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV). *Journal of Plant Protection*, 42 (4): 551 - 556. (in Chinese)
- 秦子禹, 孙建设, 王娜, 邵建柱. 2015. 一种高效的苹果褪绿叶斑病毒 TaqMan 探针实时荧光定量 RT-PCR 检测方法. *植物保护学报*, 42 (4): 551 - 556.
- Ren Fang, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Fan Xu-dong, Hu Guo-jun. 2018. Development and application of a quantitative RT-PCR approach for detection of *Grapevine virus A*. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (11): 2243 - 2254. (in Chinese)
- 任芳, 董雅凤, 张尊平, 范旭东, 胡国君. 2018. 葡萄病毒 A 实时荧光定量 RT-PCR 检测技术的建立及应用. *园艺学报*, 45 (11): 2243 - 2254.
- Villamor D E V, Pillai S S, Eastwell K C. 2017. High throughput sequencing reveals a novel fabavirus infecting sweet cherry. *Archives of Virology*, 162: 811 - 816.
- Zhou Jun, Fan Xu-dong, Dong Ya-feng, Zhang Zun-ping, Hu Guo-jun, Ren Fang, Li Zheng-nan. 2016. Development and application of a quantitative RT-PCR approach for quantification of *Grapevine fanleaf virus*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (3): 538 - 548. (in Chinese)
- 周俊, 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 胡国君, 任芳, 李正男. 2016. 葡萄扇叶病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用. *园艺学报*, 43 (3): 538 - 548.