

北京地区梨树主要病毒和类病毒检测

曾棋 黄闻霆 池海 王胜男 姜峰 李天忠 程玉琴*

(中国农业大学 园艺学院,北京 100193)

摘要 为了评估北京地区梨园健康状况并明确梨树感染病毒和类病毒的主要种类,本研究利用 RT-PCR 对北京市重要梨果生产区的 157 份样品进行苹果茎沟病毒(apple stem grooving virus, ASGV)、苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)、苹果褪绿叶斑病毒(apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)和苹果锈果类病毒(apple scar skin viroid, ASSVd)的检测。RT-PCR 的结果表明,ASGV 的检出率最高,高达 91.1%,其次为 ASPV 和 ASSVd,检出率分别为 59.2%和 54.8%,ACLSV 的检出率相对较低,为 35.7%。统计分析发现,84.7%的梨树样品表现出复合侵染,其中受到 ASGV+ASPV+ASSVd 复合侵染的样品数量最多,占所检样品数的 25.5%;受到 ASGV+ASPV 或 ASGV+ACLSV 侵染的样品各占 11.5%。同一果园中不同‘京白梨’植株所感染的病毒种类也不尽相同。本研究明确了北京地区梨园感染病毒和类病毒的主要种类,为梨病毒病防控提供了理论依据。

关键词 梨; 病毒; 类病毒; RT-PCR; 复合侵染

中图分类号 S961.6

文章编号 1007-4333(2021)11-0097-08

文献标志码 A

Detection of major viruses and viroid in pear plants in Beijing area

ZENG Qi, HUANG Wenting, CHI Hai, WANG Shengnan, JIANG Feng, LI Tianzhong, CHENG Yuqin*

(College of Horticulture, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract To evaluate the phytosanitary status of pear orchards and characterize the prevalence of viruses and viroids in pear plants in Beijing area, 157 pear samples collected from main pear-growing districts were detected for the presence of apple stem grooving virus (ASGV), apple stem pitting virus (ASPV), apple chlorotic leaf spot virus (ACLSV) and apple scar skin viroid (ASSVd) by RT-PCR. The results showed that all samples were tested positive for virus(es), among which 91.1% of the samples were tested positive for ASGV, 59.2% for ASPV and 54.8% for ASSVd. In contrast, the infection rate of ACLSV (35.7%) was relatively low. Up to 84.7% of the samples showed mixed infections, among which the mix-infection of ASGV + ASPV + ASSVd was the most common. It accounted for 25.5% of the samples, followed by the mix-infection of ASGV + ASPV 11.5% or ASGV + ACLSV 11.5%. Virus (including viroid) species detected in different pear plants of same cultivar ‘jingbaili’ in the same orchard were not exactly the same. In conclusion, the prevalence of viruses and viroid in pear plants in Beijing area was determined in this study, which could provide a reference for controlling of pear viral diseases.

Keywords *Pyrus* spp.; virus; viroid; RT-PCR; mixed-infection

病毒病是影响梨果产量和品质的重要因素之一。据报道,有 21 种病毒可侵染梨树^[1]。最近在我国又发现了 1 种侵染梨树的新病毒,暂命名为梨褪绿叶斑伴随病毒(pear chlorotic leaf spot-associated

virus)^[2]。研究表明苹果茎沟病毒(apple stem grooving virus, ASGV)、苹果茎痘病毒(apple stem pitting virus, ASPV)和苹果褪绿叶斑病毒(apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)是梨树上发生最

收稿日期: 2021-01-06

基金项目: 国家基础研发计划项目(2019YFD1001803);国家现代农业(梨)产业技术体系(CARS-28)

第一作者: 曾棋,硕士研究生,E-mail: qizeng360781@163.com

通讯作者: 程玉琴,教授,主要从事果树病毒病及病毒分子生物学研究,E-mail: chengyuqin@cau.edu.cn

普遍的3种重要病毒^[3]。此外,苹果锈果类病毒(apple scar skin viroid, ASSVd)在世界各地梨栽培地区也普遍发生,严重影响梨果产量和品质^[4]。

病毒和类病毒在梨树上通常为复合侵染^[5],带毒无性繁殖材料和带毒嫁接是其传播的主要途径。因此摸清现有梨树上主要病毒和类病毒的发生情况对于防控梨病毒病害具有十分重要的意义。

我国梨栽培面积和产量均为世界第一,其中河北、安徽、河南、新疆、辽宁、陕西和山东等主产区的种植面积占我国梨种植总面积的一半左右,产量约为我国梨总产量的64%^[6]。梨也是北京地区出产的第二大水果。据统计,2017年北京梨栽培面积为6700 hm²,产量达9.07万 t^[6],梨产业已成为带动北京农业经济发展的支柱产业之一。但是目前对于该地区梨树感染病毒和类病毒的情况尚不清楚。由于ASGV、ASPV、ACLSV和ASSVd在世界各地梨树栽培地区发生普遍,因此,本研究利用RT-PCR方法对采自北京市重要梨果生产区县的157份梨树样品进行ASGV、ASPV、ACLSV和ASSVd检测,旨在评估北京地区梨树的健康状况并明确感染病毒和类病毒的主要种类,以为管理和规范梨苗木生产和健全苗木检疫制度提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

阳性对照为已知感染ASGV+ASPV+ACLSV+ASSVd的‘冬蜜’和‘砀山酥梨’,栽种在中国农业大学上庄试验基地。阴性对照为本课题组保存的‘红宝石’和杜梨脱毒组培苗。

DNA分子量标准购自中科瑞泰生物科技有限公司;反转录试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司;RNA提取试剂盒(EASY spin plant RNA extracting kit)购自北京博迈德基因工程技术有限公司;琼脂糖购自Sigma公司;PCR预混液(2×Taq MasterMix)购自康为世纪生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 试验方法

1.2.1 样品采集

2019年和2020年的10月下旬在北京市门头沟、大兴和海淀区的10个梨园中采集了157份样品,包括‘京白梨’、‘鸭梨’、‘园黄梨’、‘丰水梨’、‘玉露香’、‘黄冠’和‘翠冠’等51个栽培品种。门头沟

区的东山和王平等4个果园的梨品种均为‘京白梨’,树龄大多为15年左右,每个果园随机选择12~15棵树采集样品,其中在东山果园还另采集2株百年树龄样品。大兴和海淀区6个梨园的梨树树龄为1~20年,在每个果园对每个梨品种随机选取1棵梨树进行样品采集。

从每棵梨树上采集一年生枝条2份,随后在室内分别剥取样品的韧皮部组织并保存在-80℃冰箱中待用。

在所有调查的果园中,梨树均为嫁接苗,砧木是杜梨。本研究进行调查和采样的时间为10月底,绝大多数果园的梨树叶子已开始变黄,有些果园的梨树甚至开始落叶,同时由于病毒在梨树上通常为隐性侵染,因此在采样时未能观察到梨树上有明显病毒病症状。

1.2.2 检测引物

根据NCBI上ACLSV复制酶(Putative viral replicase)基因序列信息,自行设计检测引物。ASGV、ASPV和ASSVd的检测引物均参考已发表文献^[7-9]。引物由生工生物工程有限公司合成。引物名称、序列、退火温度和扩增片段大小如表1所示。

1.2.3 总RNA提取

将一年生梨枝条韧皮部组织(100 mg)加液氮研磨成粉末。将粉末转移到2 mL的离心管中,然后按照RNA提取试剂盒的操作手册提取总RNA。

1.2.4 RT-PCR

在0.2 mL的PCR管中加入8 μL总RNA、8 μL RNase free H₂O和4 μL 5×TRUE RT MasterMix(试剂盒自带),用移液枪吸打混匀。25℃孵育10 min,42℃孵育15 min,85℃加热5 s。

反转录后随即进行PCR扩增。25 μL的扩增体系中包括2 μL cDNA、2.5 μL 10×buffer缓冲液、2 μL dNTP、各0.5 μL的正向和反向引物(20 μmol/L)、0.2 μL DNA聚合酶(5 U/μL)及17.3 μL ddH₂O。PCR反应条件为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,54~60℃退火30 s(退火温度详见表1);72℃延伸24~45 s(根据产物长度确定),35个循环,最后72℃延伸10 min。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳进行检测,同时选取部分样品的PCR产物送去测序以验证检测结果。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

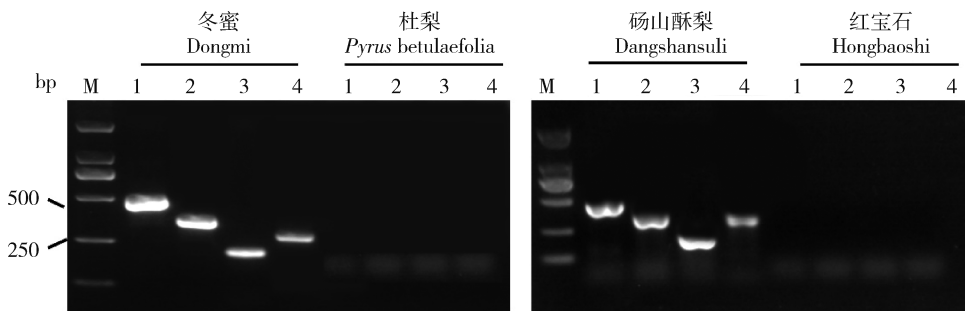
引物名称 Primer name	序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度/℃ Annealing temperature	片段大小/bp Fragment length
RT-ASGV-F	CCCGCTGTTGGATTTGATACACCTC	57	500
RT-ASGV-R	GGAATTTACACGACTCCTAACCTCC		
RT-ASPV-F	ATGTCTGGAACCTCATGCTGCAA	54	400
RT-ASPV-R	TTGGGATCAACTTTACTAAAAAGCATA		
RT-ACLSV-F	TGAGAGGCTCTATTCACATCTTG	56	197
RT-ACLSV-R	CAATTGGAATATCCCCTTCTGCGAT		
RT-ASSVd-F	CCGGTGAGAAAGGAGCTGCCAGCA	60	333
RT-ASSVd-R	CCTTCGTCGACGACGACAGGTGAG		
MdActin-S	TGACCGAATGAGCAAGGAAATTACT	56	200
MdActin-AS	TACTCAGCTTTGGCAATCCACATC		

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 检测 ASGV、ASPV、ACLSV 和 ASSVd

利用 RT-PCR 方法检测阳性对照梨树样品(‘冬蜜’和‘砀山酥梨’)中的病毒和类病毒,阴性对照为‘红宝石’和杜梨脱毒组培苗。由图 1 可知,在 2 个阳性样品‘冬蜜’和‘砀山酥梨’中均扩增到 ASGV、ASPV、ACLSV 和 ASSVd 的特异性条带,

而在阴性对照‘红宝石’和杜梨脱毒组培苗中则未出现特异性扩增条带。为了进一步确定检测结果,将阳性样品的 PCR 产物送公司测序。将测序结果在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行比对分析,结果显示这些扩增产物分别为病毒和类病毒对应的基因片段。上述结果表明,本研究所采用的 RT-PCR 方法可特异性地检测梨树样品中的 ASGV、ASPV、ACLSV 和 ASSVd。



M, DNA 分子量标准(100~2 000 bp);泳道 1~4,分别为 ASGV、ASPV、ACLSV 和 ASSVd 的检测结果。

M, DNA molecular weight marker (100-2 000 bp). Lanes 1-4, PCR products for detection of ASGV, ASPV, ACLSV and ASSVd, respectively.

图 1 RT-PCR 检测梨树样品 ASGV、ASPV、ACLSV 和 ASSVd

Fig. 1 Detection of ASGV, ASPV, ACLSV and ASSVd in pear samples by RT-PCR

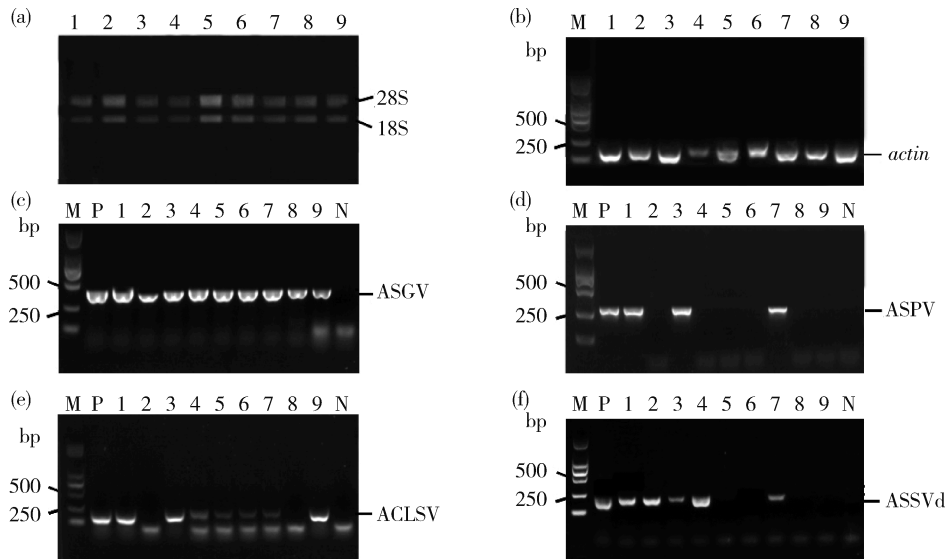
2.2 北京地区梨树样品病毒和类病毒的检测结果分析

利用 RT-PCR 对北京地区采集的所有梨树样品进行 ASGV、ASPV、ACLSV 和 ASSVd 检测。其中在检测来自门头沟区 4 个果园的 51 份‘京白梨’

样品时发现,同一果园的不同‘京白梨’植株,其感染病毒的种类也不尽相同。以采自门头沟区东山果园的样品为例,对 9 个‘京白梨’样品进行 RT-PCR 检测(图 2),其中泳道 1 和 3 分别是采自 2 株百年树龄‘京白梨’的样品,泳道 2、泳道 4~9 分别为采自

不同株 15 年树龄梨树的样品。图 2(a)显示了从各样品所提取的总 RNA,其 28S 和 18S 条带清晰,且前者宽度约为后者的两倍;图 2(b)显示了在各样品中均扩增到内参基因 *actin* 的特异性条带,这些结果再次表明 RT-PCR 检测体系的可靠性。由图 2(c)~(f)可知,9 个‘京白梨’样品所感染的病毒种类并不相同。其中 2 株百年树龄老树(泳道 1 和 3)和 1 株

15 树龄梨树(泳道 7)均感染了 ASGV、ASPV、ACLSV 和 ASSVd。在其它 6 株 15 年树龄的‘京白梨’中,1 株(泳道 8)感染了 ASGV,3 株(泳道 5、6 和 9)感染了 ASGV+ACLSV,1 株(泳道 2)感染了 ASGV+ASSVd,1 株(泳道 4)则感染 ASGV+ACLSV+ASSVd。采自门头沟区其它 3 个果园的‘京白梨’样品也显示出相似的检测结果(表 2)。



(a)总 RNA 电泳图;(b)~(f)分别为扩增内参基因 *actin*、ASGV、ASPV、ACLSV 和 ASSVd 的 PCR 产物电泳结果;M,DNA 分子量标准;P,阳性样品(‘冬蜜’);N,阴性对照(‘红宝石’脱毒组培苗);泳道 1~9,分别为采自门头沟区东山果园的 9 个‘京白梨’样品。

(a) Total RNA; (b)–(f) PCR products for detection of *actin* (the internal reference gene), ASGV, ASPV, ACLSV and ASSVd, respectively. M, DNA molecular weight marker. P, positive control sample (‘Dongmi’). N, negative control sample (virus-free pear ‘Hongbaoshi’ plantlets). Lanes 1–9, nine ‘Jingbaili’ samples collected from Dongshan orchard in Mentougou district.

图 2 RT-PCR 检测部分‘京白梨’样品病毒和类病毒

Fig. 2 RT-PCR detection of viruses and viroids in several pear (‘jingbaili’) samples

表 2 门头沟不同果园‘京白梨’样品中病毒和类病毒的发生情况分析

Table 2 Occurrence of viruses and viroids in pear (‘Jingbaili’) samples collected from different orchards

采样果园 Sampled orchard	样品/个 Number of samples	检出率/% Detection rate			
		ASGV	ASPV	ACLSV	ASSVd
东山 Dongshan	15	100.0	26.7	100.0	66.7
孟悟 Mengwu	12	100.0	41.7	91.7	16.7
王平 Wangping	12	100.0	75.0	91.7	83.3
西马各 Ximage	12	100.0	33.3	83.1	25.0
总计 Total	51	100.0	43.1	92.2	49.0

注:检出率=检出该病毒的样品数/总样品数 $\times 100\%$ 。下同。

Note: Detection rate=the number of positive samples/total number of samples tested $\times 100\%$. The same below.

对大兴、海淀及门头沟区果园中的‘翠冠’，‘黄冠’，‘玉露香’和‘京白梨’等 51 个品种总计 157 份梨树样品的检测结果进行分析(表 3)，北京地区梨树上普遍感染了 ASGV，检出率高达 91.1%。其中采自门头沟区的 51 个‘京白梨’样品均检出 ASGV，检出率为 100%；采自大兴区的 45 个样品和海淀区的 61 个样品中，该病毒的检出率分别为 97.8% 和 78.7%。

北京地区梨树 ASPV 和 ASSVd 的检出率分别为 59.2% 和 54.8%，其中采自海淀区的样品中 ASPV 和 ASSVd 的检出率相对较高，分别为 73.8% 和 65.6%，而在大兴和门头沟区的梨树样品中 ASPV 和 ASSVd 的检出率相对较低。梨树样品中 ACLSV 的检出率较低，为 35.7%，但该病毒的检出率在不同采样地点间的差异较大。其中在门头沟区‘京白梨’样品中，该病毒的检出率高达 92.2%，而在大兴和海淀区样品中的检出率仅为 8.8% 和 8.2%。上述结果表明，ASGV 是侵染北京地区梨树的最主要病毒种类，其次为 ASPV 和 ASSVd，

ACLSV 的发生率相对较低，但在门头沟区‘京白梨’品种上发生普遍。

本研究在所调查的大多数果园中，对每一梨品种进行随机抽样检测，由于同一果园相同品种的不同植株之间可能携带不同的病毒种类(图 2 和表 2)，因此对本次调查的大多数梨品种而言，分析这些品种间带毒率的差异可能没有太大的参考价值。但少数几个梨主栽品种如‘京白梨’、‘翠冠’、‘玉露香’和‘黄冠’等所检测的样品数相对较多，故对这 4 个品种病毒和类病毒的发生情况进行了统计分析，结果见表 4。由表可知，ASGV 和 ASPV 是侵染‘翠冠’和‘玉露香’的主要病毒种类，而 ACLSV 和 ASSVd 没有或极少检出。‘黄冠’品种上病毒和类病毒的发生情况与‘翠冠’和‘玉露香’类似，只是 ASSVd 的检出率相对较高。‘京白梨’则普遍感染了 ASGV 和 ACLSV，同时 ASPV 和 ASSVd 的检出率也分别达到 43.1% 和 49.0%。这些结果表明，不同梨品种所感染的病毒种类存在明显差异，且‘京白梨’感染病毒和类病毒的情况更为严重。

表 3 北京地区梨树病毒和类病毒发生情况分析

Table 3 Occurrence of viruses and viroids in pear plants in Beijing

采样地点 Sampling location	样品/个 Number of samples	检出率/% Detection rate			
		ASGV	ASPV	ACLSV	ASSVd
大兴区 Daxing district	45	97.8	57.8	8.8	46.7
海淀区 Haidian district	61	78.7	73.8	8.2	65.6
门头沟区 Mentougou district	51	100.0	43.1	92.2	49.0
合计 Total	157	91.1	59.2	35.7	54.8

表 4 4 个梨主栽品种病毒和类病毒发生情况统计

Table 4 Occurrence of viruses and viroids in four popular pear cultivars

品种 Cultivar	检出率/% Detection rate			
	ASGV	ASPV	ACLSV	ASSVd
翠冠 Cuiguan	83.6	60.0	0.0	20.0
黄冠 Huangguan	96.3	87.0	9.3	42.6
玉露香 Yuluxiang	87.2	68.1	0.0	17.0
京白梨 Jingbaili	100.0	43.1	92.2	49.0

2.3 北京地区梨树上病毒和类病毒复合侵染情况

对北京地区梨树样品中病毒和类病毒复合侵染情况进行统计，结果见表 5。在所检测的 157 份样

品中，有 24 份样品只检出 1 种病毒或类病毒。其中 18 份样品只检出 ASGV，4 份样品只检测出 ASPV，其他 2 份样品分别只检测出 ACLSV 和 ASSVd。

其余 133 份样品则为多种病毒(包括类病毒)的复合侵染,占样品总数的 84.7%。其中受到 ASGV+ASPV+ASSVd 复合侵染的样品数量最多,占所检样品数的 25.5%;受到 ASGV+ASPV 或 ASGV+ACLSV 侵染的各占 11.5%的样品;各有 10.2%的样品分别感染了 ASGV+ASPV+ACLSV+ASSVd

或 ASGV+ASSVd。此外,有 5.8%、5.1%、2.5%和 2.5%的样品分别受 ASGV+ACLSV+ASSVd、ASGV+ASPV+ACLSV、ASPV+ASSVd 和 ASPV+ACLSV 的复合侵染。以上说明北京地区梨树受到病毒复合侵染的现象远比单一侵染的更普遍,该结果为北京地区梨病毒病防控提供了参考。

表 5 北京地区梨树病毒(类病毒)单一侵染和复合侵染情况

Table 5 Occurrence of single and mixed infection in pear plants in Beijing

病毒(类病毒)种类 Types of viruses (viroids)	样品/个 Sample	检出率/% Detection rate
ASGV+ASPV+ASSVd	40	25.5
ASGV+ASPV	18	11.5
ASGV+ACLSV	18	11.5
ASGV+ASSVd	16	10.2
ASGV+ASPV+ACLSV+ASSVd	16	10.2
ASGV+ACLSV+ASSVd	9	5.8
ASGV+ASPV+ACLSV	8	5.1
ASPV+ASSVd	4	2.5
ASPV+ACLSV	4	2.5
ASGV	18	11.5
ASPV	4	2.5
ACLSV	1	0.6
ASSVd	1	0.6

3 讨论

ASGV、ASPV 和 ACLSV 是侵染梨树的 3 种主要病毒种类,但这几种病毒在不同国家或地区梨园中的发生率有明显区别。如在主栽东方梨品种的韩国,ASGV 是侵染该国梨树的最主要病毒种类,检出率为 74.2%,其次为 ASPV (34.8%),而 ACLSV 则极少检测到^[10];在拉脱维亚^[11]和突尼斯^[12]等主栽西洋梨品种的国家,ACLSV 是最主要的病毒种类;在我国,杨蕊等^[13]用 RT-PCR 检测了天津地区的梨树样品,结果表明 ACLSV (47.1%)的检出率最高,其次为 ASPV (11.4%)和 ASSVd (10%),而 ASGV 的检出率只有 8.6%。本研究结果显示,ASGV 是侵染北京地区梨树的最主要病毒种类,检出率高达 91.1%,其次为 ASPV (59.2%),ACLSV 的检出率(35.7%)相对较低。本研究检测

的梨树样品数为 157 份,涉及‘京白梨’、‘鸭梨’、‘园黄梨’、‘丰水梨’、‘玉露香’、‘黄冠’和‘翠冠’等 51 个栽培品种,而杨蕊等^[14]检测的梨树样品为 70 份,只涉及 7 个品种,样本数量可能是导致调查结果出现差异的原因。这表明了今后需开展全国范围内的广泛和系统的调查,以摸清我国梨树病毒和类病毒的发生情况。

北京地区梨树样品中 ASSVd 的检出率高达 54.8%,该数值明显高于韩国^[10]、波黑^[14]和希腊^[15]等国报道的数据。虽然目前尚未系统研究 ASSVd 对梨品种果实的危害,但是已有研究表明 ASSVd 可导致梨品种‘Niitaka’的果实出现明显的凹果(Dimpling)病症,严重影响梨果品质^[16]。因此鉴于 ASSVd 对梨果实的潜在危害,在北京地区进行梨树苗木繁育和调运过程中,相关部门需加强对 ASSVd 的检测。

本研究发现所有检测的样品均受到病毒侵染, 而且有 84.7% 的梨树样品受到多种病毒(包括类病毒)的复合侵染, 该数值显著高于世界上其他国家如拉脱维亚^[11]和突尼斯^[12]等国家报道的数据。在以后的工作中, 需要进行更多梨树品种和数量的病毒携带情况调查, 从而为苗木生产和繁育提供数据支持和指导。

本研究结果表明‘京白梨’、‘翠冠’、‘玉露香’和‘黄冠’等不同梨品种所携带的病毒种类各不相同, 这与 Pūpola 等^[11]报道一致。需要引起重视的是, 本研究通过对门头沟区 4 个果园单一栽培品种(‘京白梨’)的广泛调查发现, 即使是同一果园同一品种的不同梨树, 所感染的病毒种类也存在着明显差异。由于无法得知这些果园接穗和砧木的来源及其当时带毒情况, 目前尚不清楚造成这种结果的确切原因。有报道表明, 苹果和梨种子也是传播病毒(类病毒)的途径之一^[17-20], 因此推测砧木(杜梨实生苗)带毒可能是同一果园内的不同‘京白梨’树感染不同病毒种类的原因; 另一个原因可能是‘京白梨’接穗来源不同而携带不同病毒种类所致。在以后的研究中, 需要对更多果园中其它梨品种的不同植株进行病毒和类病毒检测, 以分析这种现象是否具有普遍性。

4 结 论

针对北京市重要梨果生产区的 157 份样品进行 ASGV、ASPV、ACLSV 和 ASSVd 检测, 发现北京地区梨树普遍受到病毒和类病毒的复合侵染。其中 ASGV+ASPV+ASSVd 复合侵染率最高。侵染北京地区梨树的最主要病毒种类是 ASGV。

参考文献 References

- [1] Umer M, Liu J W, You H F, Xu C, Dong K L, Luo N, Kong L H, Li X P, Hong N, Wang G P, Fan X D, Kotta-Loizou I, Xu W X. Genomic, morphological and biological traits of the viruses infecting major fruit trees[J]. *Viruses*, 2019, 11(6): 515
- [2] Liu H Z, Wang G P, Yang Z K, Wang Y X, Zhang Z, Li L H, Waqas M, Hong N, Liu H Z, Wang G P, Hong N, Hong J, Zhang J G, Xu L, Qi L Y. Identification and characterization of a pear chlorotic leaf spot-associated virus, a novel *Emaravirus* associated with a severe disease of pear trees in China[J]. *Plant Disease*, 2020, 104(11): 2786-2798
- [3] Németh M. Viruses [C] In: *Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees*. The Netherlands: Dordrecht, 1984
- [4] Kyriakopoulou P E, Hadidi A. Natural infection of wild and cultivated pears with apple scar skin viroid in Greece[J]. *Acta Horticulturae*, 1998(472): 617-626
- [5] 张放. 2017 年我国主要水果生产统计分析[J]. 中国果业信息, 2019, 36(10): 22-31
Zhang F. 2017 China fruit production statistics [J]. *China Fruit News*, 2019, 36(10): 22-31 (in Chinese)
- [6] Desvignes J C, Boyé R, Cornaggia D, Grasseau N, Hurtt S, Waterworth H. Virus diseases of fruit trees; Diseases due to viroids, viruses, phytoplasmas and other undetermined infectious agents[J]. *Virus Diseases of Fruit Trees*, 1999: 202
- [7] James 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(1/2): 1-9
- [8] Menzel W, Jelkmann W, Maiss E. Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control[J]. *Journal of Virological Methods*, 2002, 99(1/2): 81-92
- [9] Hadidi A. 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
- [10] Cho I S, Kim D H, Kim H R, Chung B N, Cho J D, Choi G S. Occurrence of pome fruit viruses on pear trees (*Pyrus pyrifolia*) in Korea[J]. *Research in Plant Disease*, 2010, 16(3): 326-330
- [11] Pūpola N, Moročko-Bičevska I, Kāle A, Zeltiņ A. Occurrence and diversity of pome fruit viruses in apple and pear orchards in Latvia[J]. *Journal of Phytopathology*, 2011, 159(9): 597-605
- [12] Mahfoudhi N, Air M E, Moujahed R, Salleh W, Djelouah K. Occurrence and distribution of pome fruit viruses in Tunisia [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2013, 52(1): 136-140
- [13] 杨蕊, 韩雪纯, 李晴, 陈招荣. 天津地区梨病毒病检测方法筛选及带毒率检测[J]. 华北农学报, 2018, 33(5): 129-129
Yang R, Han X C, Li Q, Chen Z R. Screening of pear viral disease detection methods and detection of pear virus disease in Tianjin region[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2018, 33(5): 125-129 (in Chinese)
- [14] Lolic B, Afechtal M, Matic S, Myrta A, Di Serio F. Detection by tissue-printing of pome fruit viroids and characterization of Pear blister canker viroid in Bosnia and Herzegovina[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2007, 89(3):

369-375

- [15] Kyriakopoulou P E, Giunchedi L, Hadidi A. Peach latent mosaic and pome fruit viroids in naturally infected cultivated pear *Pyrus communis* and wild pear *P amygdaliformis*; implications on possible origin of these viroids in the Mediterranean region[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2001, 83(1), 51-62
- [16] Osaki H, Kudo A, Ohtsu Y. Japanese pear fruit dimple disease caused by apple scar skin viroid(ASSVd)[J]. *Japanese Journal of Phytopathology*, 1996, 62(4): 379-385
- [17] Hadidi A, Hansen A J, Parish C L, Yang X. Scar skin and dapple apple viroids are seed-borne and persistent in infected apple trees[J]. *Research in Virology*, 1991, 142(4): 289-296
- [18] Kim H R, Lee S H, Lee D H, Kim J S, Park J W. Transmission of apple scar skin viroid by grafting, using contaminated pruning equipment, and planting infected seeds [J]. *The Plant Pathology Journal*, 2006, 22(1): 63-67
- [19] Nakamura K, Yamagishi N, Isogai M, Komori S, Ito T and Yoshikawa N. Seed and pollen transmission of apple latent spherical virus in apple [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2011, 77(1): 48-53
- [20] Yao B Y, Lu Y C, Li L, Wang Y X, Li Q Y, Wang G P, Hong N. A sensitive nested multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of three common viruses infecting pear plants[J]. *Journal of Virological Methods*, 2019, 263: 105-110

责任编辑:董金波