

中图分类号: S532, S431.13 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2005)06-0361-05

马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 的检测与防治研究进展

吕典秋

(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要: 详细阐述了马铃薯类病毒 (PSTVd) 鉴定技术的研究进展, 比较了几种鉴定技术 (指示植物、往返电泳、核酸斑点杂交及 RT-PCR) 的优缺点, 并对类病毒的防治措施进行了论述。

关键词: 马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd); 检测; 防治

马铃薯纺锤块茎类病毒 (Potato spindle tuber viroid, PSTVd) 是由类病毒 (Viroid) 引起的病害。类病毒是已知病原中最小的 (246~463 nt)、单链高度结构化的、缺少蛋白外壳的 RNA 分子, 能在受侵染寄主植物中自我复制的环状 ssRNA 小分子。Schultz 和 Folsom^[1] 在关于此病报道中首次指出, 这种病具有传染性。Diener^[2] 首次提出类病毒 (Viroid) 的概念。马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd) 是危

害马铃薯产量和品质的主要病害。据报道, PSTVd 强系减产可达 60%, 弱系减产约 20%~35%^[3], 常造成较大经济损失。马铃薯类病毒是马铃薯种薯检疫规程中的主要检疫对象, 具有广泛的传播途径, 是唯一不能通过茎尖剥离、组织培养汰除而必须通过严格检测汰除的病害。

1 类病毒的鉴定

1.1 指示植物方法

自从马铃薯纺锤块茎类病毒被发现以来, 由于缺少适宜的指示植物和鉴定方法, 因此和同一时期发现的马铃薯病毒病相比, 研究进展相当缓慢。

收稿日期: 2005-05-10

基金项目: 国家科技部基础研究重大项目 (2001CC02900)

作者简介: 吕典秋 (1973-), 男, 助理研究员, 博士研究生, 主要从事马铃薯病毒、真菌、细菌病害检测及其分子生物学研究。

- brevi-dens and *S. tuberosum* through anther culture [J]. *Plant Sci*, 1995, 112: 85-95.
- [33] Chen H H, P H Li. Characterization of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species [J]. *Plant Physiol*, 1980, 65: 1146-1148.
- [34] Cardi T, F D'Ambrosio, D Consoli, et al. Production of somatic hybrid between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 99: 819-828.
- [35] Nyman M, S Waara. Characterization of somatic hybrid *Solanum tuberosum* and its frost-tolerant resistance relative *Solanum commersonii* [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 1127-1132.
- [36] Laurila J, I Laakso, J P T Valkonen, et al. Formation of parental-type and novel glycoalkaloids in somatic hybrids between *Solanum brevidens* and *S. tuberosum* [J]. *Plant Sci*, 1996, 118: 145-165.

- [37] Laurila J, I Laakso, J Larkka, et al. The proportions of glycoalkaloid aglycones are dependent on the genome constitutions of interspecific hybrids between two *Solanum* species (*S. brevidens* and *S. tuberosum*) [J]. *Plant Sci*, 2001, 161: 677-683.
- [38] Seppanen M M, T Cardi, M B Hyökki, et al. Characterization and expression of cold-induced glutathione S-transferase in freezing tolerant *Solanum commersonii*, sensitive *S. tuberosum* and their interspecific somatic hybrids [J]. *Plant Sci*, 2000, 153: 125-133.
- [39] Valkonen J P T, V - M Rokka. Combination and expression of two virus resistance mechanisms in interspecific somatic hybrids of potato [J]. *Plant Sci*, 1998, 131: 85-94.
- [40] Dong F, A L Tek, A B Frasca, et al. Development and characterization of potato-*Solanum brevidens* chromosomal addition/substitution lines [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 109: 368-72.

Raymer 等^[4]人发现番茄可以作为马铃薯纺锤块茎类病毒的指示植物, 马铃薯类病毒的研究工作才突飞猛进。但由于马铃薯类病毒弱系在番茄上不表现症状, 所以鉴定准确率很低。Fernow^[9]、崔荣昌^[9]利用番茄鉴定选育了一些马铃薯无性系, 但 Fernow 的鉴定准确率只达到 13%, 随后他们建立了可以鉴定 PSTVd 弱系的重复接种技术, 提高了番茄鉴定结果的准确率。但利用番茄进行鉴定期间, 很难控制好温室的温度和湿度。在温、湿度较好的温室中, 用重复接种鉴定法可比较准确地鉴定样品是否带 PSTVd, 但在高温、低湿温室中, 不接种的健康番茄植株也常表现出类似于 PSTVd 症状的株型, 严重影响了番茄重复接种的鉴定结果^[9]。接过种的番茄要保持在 10 764~21 525 m 烛光连续光照, 27~31 的温度和高于 60% 相对湿度条件下, 无论接种 PSTVd 弱系或强系都可表现白化症状^[7]。Singh 等^[8]发现, 无论强系或弱系均能使天蓬子 *Scopdia sinensis* Hems) 产生局部病斑, 但接过种的实生苗需要培育在 3 229~4 306 m 烛光、18~23 、高于 60% 的相对湿度条件下, 植株要定期施肥。应用天蓬子作指示植物存在问题是有时准确性低, 接种后并不产生局部病斑^[9]。Niblett 等^[10]报道, 菊花 *Chrys- anthemum morifolium*) 是 PSTVd 强系和弱系的局部病斑寄主, 两个变株都可以产生褪绿斑点症状。

ASBVd 接种在 Avocado 幼苗上需要 2 个月到 2 年的时间^[11], PSTVd 接种在指示植物鲁特格番茄也需要 2~4 个月左右时间^[7]。利用新莨苣 (*Scopdia sinensis*), 强系需 7~10 d, 弱系需 10~15 d, 因而长时间的接种过程和缺少合适的指示植物是限制生物学检测方法的主要因素。

1.2 聚丙烯酰胺凝胶电泳技术

Morris 等人^[9]首次把聚丙烯酰胺凝胶电泳法用于鉴定被马铃薯纺锤块茎类病毒侵染块茎组织中, 通过染色使 PSTV- RNA 显现可见的兰色区带。但由于取样数量大, 测定步骤多, 还难以作为鉴定方法供实践应用。Morris^[9]等修改和简化了 1975 年提出的方法, 使之应用于 PSTVd 鉴定中, 并对比了聚丙烯酰胺电泳和番茄生物鉴定 PSTVd 的准确性, 研究结果表明, 聚丙烯酰胺凝胶电泳比番茄生物试验快速、准确。此后, Schumacher 等^[12]又将该方法修改为往返电泳 (Return- polyacrylamide gel electrophoresis, R- PAGE)。第一次电泳是在非变性条

件下, 类病毒 RNA 的环状核酸和线状核酸同寄主核酸分离出来, 第二次电泳是在变性条件下 (使用沸煮的、低盐缓冲液) 变换电极, 此时, 类病毒核酸由棒状变成单链环状, 比同样大小的核酸迁移慢些, 因此, 类病毒 RNA 会产生一明显的带。Singh 等^[13]利用 R- PAGE 方法检测休眠块茎 PSTVd 的强系、弱系和中间株系, 同年 Singh 还报道, 用该方法检测马铃薯实生苗中弱株系 PSTVd, 其检测灵敏度达到利用核酸杂交技术反应的水平, 提取核酸的稀释比率最高达 1 256, PSTVd 块茎组织中的浓度大约是地上部分的 10%^[14]。R- PAGE 进行 PSTVd 检测的优点是灵敏度高、操作简便可靠。

从植物组织中提取 PSTVd- RNA 是鉴定 PSTV 的关键步骤, 目前有关类病毒的提取方法很多。Morris 等^[9]的方法可靠, 但使用 LiCl 透析较麻烦。Schumacher 等^[15]的提取方法较简单, 但加入提取缓冲液量大, 不易操作。吕典秋等^[16]在 Palukitis^[17]、Singh 等人^[18]的基础上加以改进, 使提取缓冲液体积减少, 提取时加入少量氯仿、SDS、皂土, 省去了巯基乙醇, 并改变了试剂加入顺序, 减少了酚等有害物质对人体的伤害。在加热变性过程中, 不使用循环水浴, 改为在烘箱中进行, 使该方法对设备要求更为简单, 便于普及和操作, 取得很好的提取效果。利用改进的 R- PAGE 电泳方法检测样品, 可检测最低总核酸量为 13 ng, 但没有达到 Singh 和 Boucher^[19]提出的灵敏度 500 pg)。R- PAGE 也用于检测类病毒的不同株系和交互保护研究中^[20]。

崔荣昌^[21]、李学湛等^[22]也已采用往返电泳和银染法成功鉴定马铃薯块茎、幼芽中的 PSTVd。

1.3 核酸斑点杂交技术

近些年, 应用核酸斑点杂交 (Nucleic acid spot hybridization, NASH) 技术检测 DNA 或 RNA 片段已得到广泛的应用。在类病毒检测上, 由于类病毒自身结构特点, 不可以利用 ELISA 等免疫学方法进行。所以核酸杂交方法在类病毒检测上显得尤为重要。核酸杂交技术最初用于液体内形成 RNA 或 DNA 的杂交分子。将含有核酸的溶液 (如感染了类病毒或病毒的提取液) 点在硝化纤维素膜上或尼龙膜上, 然后将膜和探针溶液一起孵育。探针是用纯化的病毒和类病毒核酸制备, 并经标记的互补 DNA 和 RNA, 可直接合成或采用重组体方法。和探针一起孵育之后, 在膜上的核酸形成杂交分子,

探针可用放射性自显影检测出来。

核酸杂交的关键是标记核酸和标记物的选择。通常, ^{32}P 用于核酸标记^[23-25], 但使用放射性标记存在一些问题(如对人的伤害, 半衰期短, 放射性污染等)。目前, 不同的非放射性标记得到越来越广泛的应用, 其中最多的为生物素、地高辛和荧光素标记探针^[26-28]。在生物素标记探针中, 核酸用生物素标记, 通过标记有碱性磷酸酶(AP)的亲亲和素-链亲和素检测。用地高辛标记的探针是通过抗地高辛--碱性磷酸酶抗体的结合来检测。然后, 通过发光系统(如 CDP-Star, Lumi-Phos530e 等底物)或发色系统(如 NBT/BCIP 等底物)进行判断。据 Kanematsu 等^[29]报道, 利用随机引物制备探针灵敏度低于切口平移, 而使用 PCR 扩增制备探针灵敏度效果最好, 使用较小分子量的探针为模板^[30]可能引起较低的标记效率。利用化学颜色反应时使用 BSA 产生较强的底色而用于化学发光反应时产生背景颜色较浅。Roy 等^[31]报道, 使用生物素标记探针可检测几个 pg 的 PSTVd, 但产生一些强的非特异性信号。而使用放射性探针可检测的最小数量大约为 0.5~20 pg^[32]。Kanematsu 等^[29]比较 6 种非放射性 cDNA 探针后发现, 用切口平移和随机引物法标记的生物素探针通过颜色反应可检测 20 pg 纯化 PSTVd, 通过发光反应可检测 2~20 pg, 地高辛标记的可检测 200 pg, 而通过 PCR 合成的生物素 dUTP 或 dATP 探针的灵敏度为 0.2~2 pg。

在探针制备上有切口平移法、随机引物法、PCR 扩增法。根据核酸性质, 探针可分为 RNA 探针和 DNA 探针, 根据信号产生方式又可分为化学发光和化学颜色反应两种表达方式^[2], 根据这些标记物种类、反应灵敏度、准确性、经济适用等特点, 吕典秋^[33]选用了 PCR 扩增制备探针的方法, 通过生物素标记作为探针, 结果利用 NBT/BCIP 颜色反应和 CDP-Star 底物荧光反应进行检测类病毒。利用 NBT/BCIP 作底物检测 PSTVd, 检出提纯的 PSTVd 最低量为 50 pg, 利用 CDP-Star 作底物时可检测最低 PSTVd 量为 5 pg, 灵敏度是 NBT/BCIP 的 10 倍, 是 R-PAGE 方法的 260 倍, 接近 Hadidi 等^[34]报道的 RT-PCR 的检测 PSTVd 灵敏度。

Sano 等^[35]证明, 在中央保守区合成的探针对同一组类病毒有更广泛的专一性, 而在可变区的探针对株系有专一性。然而专一性和灵敏性可通过

RNA 探针得到提高^[36], 对于 DNA 探针来说, RNA 探针有几点优点: RNA-DNA 杂交比 DNA-DNA 杂交更稳定; 非专一性的接合探针可被 RNase A 酶消化, 该酶对单链 RNA 有非常高的专化性。Candresse 等^[37]报道, 生物素标记 cRNA 探针比 ^{32}P 标记探针灵敏度低 15 倍, 比 cRNA 探针低 6 倍。Podleckis 等^[38]认为, 地高辛标记的 cRNA 探针检测 PSTVd 或 ASSVd 同 ^{32}P 标记的有同样的灵敏度。

1.4 聚合酶链式反应(PCR)技术

随着 PCR 技术的产生, RT-PCR 技术已越来越多的用在 RNA 病原鉴定上^[39]。PCR 是一种高专一性、多功能的通过使用 Taq 酶或 pfu 聚合酶进行扩增 DNA 的方法。要扩增一特定的 DNA 片段, 需要设计一对引物。扩增程序包括: 目的片段的变性、引物和其互补序列的退火及目的区域的延伸。这三步在热循环仪中重复, 直至产生足够数量的产物。反转录 PCR(RT-PCR)已成功的用于检测 PSTVd^[39, 40]。何小源等^[40]报道, 用 RT-PCR 检测 PSTVd 可检出量为 0.15 pg, 灵敏度是 R-PAGE 的 5000 倍, 是 ^{32}P 标记 cDNA 探针杂交反应的 65 倍, 是 ^{32}P 标记 RNA 探针的 10 倍, 可最低检出量为 0.15 pg。Hadidi 等^[39]报道, 利用 RT-PCR 检测 ASSVd 可检测到 0.3 pg 总核酸量。使用 RT-PCR 可检测不同的株系, 如 GYSVd1 和 GYSVd2 (grapevine yellow speckled viroid), 而在利用核酸斑点杂交方法使用 cDNA 探针不能检测出来^[41]。尽管核酸片段对于类病毒鉴定是可以肯定的, 但其应用也有局限性。PCR 技术可做为一个很好的补充。

利用 RT-PCR 技术可成功检测感染 PSTVd 马铃薯块茎组织的核酸抽提液中的 PSTVd。该法不但可增加检测速度, 且无需构建探针和分子杂交, 灵敏度高, 样品用量少, 是核酸杂交检测技术很好的补充, 但其操作需要一定技术, 有时易出现假阳性反应, 且检测费用较高, 检测样品数量有限。

2 类病毒的防治

类病毒作为一种外来的自主复制的小分子核酸, 通过干扰寄主代谢而引起症状。因此类病毒致病有其不同特点: 首先, 易造成不显性感染; 其次, 从侵染到发病潜伏期长; 第三, 类病毒具有极高稳定性, 且传染性强, 极易机械传播; 第四, 不同株系之间有干扰作用, 即交叉保护作用; 第五,

类病毒 RNA 常和染色质结合, 多分布于生长旺盛的分生组织, 造成系统侵染。这些特点使 PSTVd 不易诊断, 防治困难。

2.1 建立 PSTVd 的鉴定技术, 使用健康种薯

筛选无 PSTVd 植株, 建立无 PSTVd 的无性系, 借以汰除基础种薯和实生种子亲本 PSTVd。该方法是目前防治此病传播的切实可行途径。用已建立的 R-PAGE 技术、NASH 技术准确检测存在的 PSTVd-RNA。在防治策略上, 首先从所有主栽品种的基础种薯中汰除 PSTVd, 并在种质资源评价、育种亲本选择、品系鉴定中引进 PSTVd 检测措施才能有效防治 PSTVd 带来的经济损失。

2.2 抗性育种, 使用抗性材料

抗性育种是防治病毒病的一个重要方法。Singh 和 Slack^[42]对 81 个样品进行 PSTVd 弱系和强系抗性试验, 反应从无症状到明显症状有很大变化, 但没有发现过敏性植株, 因而使用抗性材料不可行, 因为一旦侵染, 它将成为一个毒源起危害作用。后来, Singh^[18]报道了两个对 PSTVd 汁液接种的有抗性的 *S. berthaultii* 无性系材料。

2.3 利用基因工程方法

核酶 (ribozyme) 是能催化或特异切割 RNA 的一类小 RNA 分子, 通过对 mRNA 的切割, 具有抑制基因表达作用, 因此成为控制病原物基因和其它有害基因的有力手段。近年来, 国内外许多实验室利用核酶控制 PSTVd 研究^[43, 44], 应用植物基因工程技术将核酶转入马铃薯, 经抗性筛选获得抗 PSTVd 侵染的基因工程马铃薯^[45]。

3 结 语

马铃薯纺锤块茎类病毒是危害我国马铃薯生产和实生种子 TPS 品质的重要病害, 是我国种薯生产和实生种子利用中急待解决的主要问题。在利用抗性育种和基因工程育种没有得到很好应用的形式下, 通过严格鉴定汰除 PSTVd, 筛选无类病毒种薯进行种薯生产, 建立严格科学的种薯生产体系是防治该病的有效途径。目前, 在种薯生产上国外很多国家和地区普遍采用核酸斑点杂交 (NASH) 技术进行类病毒的常规检测, 和其他检测技术相比, 该方法具有一次性检测样品数量多, 检测灵敏度高等优点, 适合于异地取样和大批量样品检测。在没有实验条件的地方 (如田间等), 可直接将样品点在膜

上, 样品可在膜上长期保存。目前, 我国已进行一些相关检测技术的研究, 但还没有形成相关的检测商品试剂盒。因此应尽快研制出使用方便、操作简单的类病毒检测试剂盒, 以满足国内种薯生产检测及科研的需要。

[参 考 文 献]

- [1] Schuit E S, D C Folsom. A "spindling-tuber" disease of Irish potatoes [J]. Science, 1972, 57: 149.
- [2] Diener T A. Potato spindle tuber "virus". A replicating low molecular weight RNA [J]. Virology, 1971, 5: 411.
- [3] 程天庆. 马铃薯栽培技术 [M]. 第二版. 北京: 金盾出版社, 1996: 123.
- [4] Raymer W B, M J O'Brien, D Merriam. Tomato as a source of an indicator plant for the potato spindle tuber virus [J]. Amer Potato J, 1964, 14: 311-314.
- [5] Fernow K H. Tomato as a test plant for detecting mild strains of potato spindle tuber virus [J]. Phytopathology, 1967, 57: 1347-13.
- [6] 崔荣昌. 马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTV) 的重复接种鉴定研究报告 [J]. 马铃薯科学, 1984, 2: 1-9.
- [7] Morris T J, E M Smith. Potato spindle tuber disease: procedures for detection of viroid RNA and certification of disease free of viroid RNA and certification of disease-free potato tubers [J]. Phytopathology, 1977, 67: 145-150.
- [8] Singh R P. A local lesion host for potato spindle tuber virus [J]. Phytopathology, 1971, 61: 1034-1035.
- [9] Morris T J, N S Wright. Detection on polyacrylamide gel of a diagnostic acid from tissue infected with potato spindle tuber viroid [J]. Amer Potato J, 1975, 52: 57-63.
- [10] Niblett C L, E Dickson, R K Horst, et al. Additional host and an efficient purification procedure for four viroids [J]. Phytopathology, 1980, 70: 610-615.
- [11] Palukaitis P, A G Rakowski, D Alexander, et al. Rapid indexing of the sunblotch disease of avocados using a complementary DNA probe to avocado sunblotch viroid [J]. Ann Appl Biol, 1981, 98: 439-449.
- [12] Schumacher J, N Meyer, D Riesner, et al. Diagnostic procedure for detection of viroids and viruses with circular RNAs by "return" gel electrophoresis [J]. J Phytopathol, 1986, 115: 332-343.
- [13] Singh R P, A Boucher, J E A Seabrook. Detection of the mild strains of potato spindle tuber viroid from spindle tuber potato seed by return electrophoresis [J]. Phytopathology, 1988, 78: 663-667.
- [14] Singh R P. Infectivity of potato spindle tuber viroid in potato plant parts [J]. Phytopathology, 1977, 67: 15-17.
- [15] Schumann G L, H D Thurston, R K Horst, et al. Comparison of tomato bioassay and slab gel electrophoresis for detection of potato spindle tuber viroid in plant [J]. Phytopathology, 1978, 68:

- 1256-1259.
- [16] 吕典秋, 李学湛, 白艳菊, 等. NASH 技术和 R- PAGE 技术在类病毒检测上的应用 [J]. 东北农业大学学报, 2003, 34(1): 15-18.
- [17] Palukatis P. Detection and characterization of subgenomic RNA in plant viruses [J]. Methods Virol, 1984, 7: 259-317.
- [18] Singh R P. Clones of *Solanum Berthaultii* resistant to potato spindle tuber viroid [J]. Phytopathology, 1985, 75: 1432-1434.
- [19] Singh R P, A Boucher. Comparative detection of mild strains of potato spindle tuber viroid from dormant potato tubers by return-polyacrylamide gel electrophoresis and nucleic acid hybridization [J]. Potato Res, 1988, 31: 159-166.
- [20] Singh R P, A Boucher, T H Somerville. Cross-protection with strains of potato spindle tuber viroid in the potato plant and other solanaceous hosts [J]. Phytopathology, 1990, 80: 246-250.
- [21] 崔荣昌. 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴定马铃薯纺锤块茎类病毒 PSTV 的鉴定技术应用 [J]. 马铃薯科学, 1983, 1: 53-60.
- [22] 李学湛, 吕典秋, 何云霞. 聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测马铃薯类病毒技术的改进 [J]. 中国马铃薯, 2001, 15(4): 213-214.
- [23] Barker J M, J L McInnes, P J Murphy, et al. Dot-blot procedure with [³²P] DNA probes for the sensitive detection of avocado sunblotch and other viroids in Plants [J]. J Virol Methods, 1985, 10: 87-98.
- [24] 张奇亚, 刘勇, 杨平, 等. 柑橘裂皮类病毒和菊花矮化类病毒互补 DNA 探针的合成及检测 [J]. 病毒学杂志, 1986, 1 (40): 93-98.
- [25] 扈惠平, 哈斯阿古拉, 张鹤龄. 用 ³²P 标记 cDNA 探针进行核酸斑点杂交检测马铃薯卷叶病毒 (PLRV) [J]. 中国病毒学, 1995, 7 (3): 362-366.
- [26] Hoppe H E, L Gliavedoni, M A Mandel, et al. Biotinylated nucleic acid hybridization probes for potato virus detection [J]. Archives of Virology, 1988, 103: 231-241.
- [27] Anon. Potato introduction of cultivars [M]. Pages 22-28 in Keshan Agricultural Research Institute, Acad. Agric. Sci. Heilongjiang. May 1981.
- [28] 宁德刚, 刘海燕, 雷时美, 等. 荧光素标记的庚型肝炎病毒基因探针的制备及应用 [J]. 中国病毒学, 1999, 14 (2): 147-151.
- [29] Kanematsu S, T Hibi, J Hashimoto, et al. Comprehensive of nonradioactive cDNA probes for detection of potato spindle tuber viroid by dot-blot hybridization assay [J]. Journal of Virological Methods, 1991, 35: 189-197.
- [30] Hashimoto J, Y Machida. The sequence in the potato spindle tuber viroid required for its cDNA to be infective: a putative processing site in viroid replication [J]. Gen Appl Microbiol, 1985, 31: 551-561.
- [31] Roy B P, M G AbouHaidar, A Alexander. Biotinylated RNA probes for the detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) in plants [J]. J Virol Methods, 1989, 23: 149-156.
- [32] Zekanowski C, M Welnicki, J Skrzeczkowski, et al. Detection of potato spindle tuber viroid (PSTVd) in dormant potato tubers by concatemeric cDNA probe [J]. J Virol Methods, 1990, 30: 127-130.
- [33] 吕典秋, 李学湛, 于德才, 等. 马铃薯类病毒 (PSTVd) 非放射性标记 cDNA 探针的制备及其在检测上的应用 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(2): 104-108.
- [34] Hadidi A, X Yand. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification [J]. J Virol Methods, 1990, 30: 261-270.
- [35] Sano T, H Kudo, T Sugimoto, et al. Synthetic oligonucleotide hybridization probes to diagnose hop stunt viroid strains and citrus exocortis viroid [J]. J Virol Methods, 1988, 19: 109-120.
- [36] Melton D A, D A Krieg, M R Rebagliati, et al. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes for plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter [J]. Nucleic Acids Res, 1984, 12: 7035-7506.
- [37] Candresse T, T D Diener, R A Owens. The role of the viroid central conserved region in cDNA infectivity [J]. Virology, 1990, 175(1): 232-237.
- [38] Podleckis E V, R W Hammond, S S Hurtt, et al. Chemiluminescent detection of potato and pome fruit viroids by digoxigenin-labelled dot blot and tissue blot hybridization [J]. J Virol Methods, 1993, 43: 147-158.
- [39] Hadidi A, L Levy, V Podleckis. Polymerase chain reaction technology in plant pathology. Chapter 13 [A]. Singh R P, Singh US. Molecular Methods in Plant Pathology [M]. CRC Press Boca Raton, USA. 1995.
- [40] 何小源, 周广和, 成卓敏, 等. 用聚合酶链式反应 (PCR) 检测马铃薯纺锤块茎类病毒 [J]. 中国病毒学, 1992, 7 (3): 362-366.
- [41] Rezaian M A, L R Krake, D A Golino. Common identity of grapevine viroids from USA. and Australia revealed by PCR analysis [J]. Intervirology, 1992, 34: 38-43.
- [42] Singh R P, S A Slack. Reaction of tuber-bearing *Solanum* species to infection with potato spindle tuber viroid [J]. Plant Dis, 1984, 68: 784-787.
- [43] 邓文生, 杨希才, 康良仪, 等. 特异切割马铃薯纺锤块茎类病毒负链的多价核酶的构建和体外活性测定 [J]. 病毒学报, 2000, 4: 370-373.
- [44] 孙洁霖, 张朝春, 周丽, 等. 专一切割苹果锈果类病毒多体自切割核酶的克隆和转录物的体外活性测定 [J]. 生物工程学报, 2002, 18 (5): 588-592.
- [45] Yang X C, Y Yie, F Zhou, et al. Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 4861-4865.