

# 山东鲜食葡萄主要类病毒的鉴定及序列分析

吴斌,冯佳,张眉,王升吉,姜珊珊,辛相启\*

(山东省农业科学院植物保护研究所,济南 250100)

**摘要:**【目的】通过对山东省鲜食葡萄主产区采集的149份疑似感病葡萄叶片进行RT-PCR检测,明确本地区类病毒的发生情况及种类,并进行序列分析。【方法】提取叶片总RNA后,用目前国内报道的葡萄黄斑类病毒1(*Grapevine yellow speckle viroid 1*, GYSVd1)、葡萄黄斑类病毒2(*Grapevine yellow speckle viroid 2*, GYSVd2)、澳大利亚葡萄类病毒(*Australian grapevine viroid*, AGVd)、啤酒花矮化类病毒(*Hop stunt viroid*, HSVd)和柑橘裂皮类病毒(*Citrus exocortis viroid*, CEVd)的特异性引物对采集的具有黄化、斑驳、皱缩和畸形症状的葡萄叶片进行RT-PCR检测并测序,同时建立系统进化树。【结果】GYSVd1、GYSVd2、AGVd和HSVd均得到了预期大小的目的片段。测序表明,山东省鲜食葡萄主产区GYSVd1、GYSVd2、AGVd和HSVd的分离物序列与GenBank已报道分离物序列一致性均超过90%。【结论】山东省鲜食葡萄主产区受到上述4种类病毒的侵染,并且在自然条件下常发生复合侵染。其中GYSVd2为山东首次报道。**关键词:** 鲜食葡萄;类病毒;分子鉴定;序列分析

中图分类号: S663.1

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2018)08-0928-08

## Identification and sequence analysis of major viroids of grapevine in Shandong

WU Bin, FENG Jia, ZHANG Mei, WANG Shengji, JIANG Shanshan, XIN Xiangqi\*

(Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, Shandong, China)

**Abstract:** 【Objective】Grape (*Vitis vinifera* L.) is one of the most susceptible fruit trees that may be infected by various phytopathogens. The wide distribution of these phytopathogens and serious damage on grape has aroused wide public concern. Viroid infection on grape results in yellow leaves, plant dwarfism, dysplasia, and even plant death. Viroid disease occurred in Xinjiang, Ningxia, Gansu, Liaoning and other grape growing areas, and the incidence rate could be as high as 100% in some cases. Shandong province is one of the major production region of fresh grape in China. In recent years, the viroid transmission increased due to the continuous expansion of planting area and the introduction of grapevine from other production regions. In this research, 149 grape leaf samples from the major production region in Shandong province were collected and detected by RT-PCR to identify the viroids. 【Methods】About 0.1 g of each grape leaf sample was weighed and placed into 2 mL centrifuge tube; the sterilized steel balls and liquid nitrogen were added and the tissues were ground quickly in the grinder until the sample was pulverized. The total RNA was extracted according to the instructions to the kit. Then cDNA of each sample is synthesized by using HiScript® II 1st Stand cDNA Synthesis Kit. The symptomatic samples were detected using RT-PCR and the specific primers GYSVd1, GYSVd2, AGVd, HSVd and CEVd. The amplification system was as follows: 2×Es Taq Master Mix 15 μL, upstream and down-

收稿日期: 2017-11-01 接受日期: 2018-06-18

基金项目: 山东省农业科学院科技创新工程项目(CXGC2016A09-监测预警); 山东省农业科学院科技创新工程项目(CXGC2016B11-绿色防控)

作者简介: 吴斌,男,博士,研究方向为植物病毒。Tel: 0531-66659646, E-mail: wubin228@126.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 0531-66659646, E-mail: xinxiangqi@126.com

stream primers 0.5  $\mu$ L respectively, cDNA 1.0  $\mu$ L, making up the total volume to 30  $\mu$ L by ddH<sub>2</sub>O. PCR amplification products were detected by 1% agarose gel electrophoresis and the indicated fragments were purified by reference to the kit. The purified target fragments were constructed into cloning vector pMD18-T. The recombinant vector was transformed into *E. coli* competent cells DH5 $\alpha$  for DNA sequencing. The sequences were compared in GenBank. We downloaded the sequence of viroid isolates from NCBI and constructed the phylogenetic tree by using MEGA 5 Neighbor-Joining (NJ). The tree of the branch confidence (Bootstrap) was analyzed repeatedly for 1 000 times. 【Results】 The specific bands of about 367 bp, 374 bp, 375 bp and 306 bp were amplified by primers of GYSVd1, GYSVd2, AGVd and HSVd, respectively. No specific band was amplified by CEVd primers. Compared with the reported isolates in GenBank, the coincidence of GYSVd1, GYSVd2, AGVd and HSVd was above 90% according to DNA sequencing and BLAST. None of the five viroids was detected in grape samples from Pingdu, Laiyang and Linshu; more than four viroids were detected in the samples collected from other sampling sites and complex infection of these viroids occurred in most cases. In order to clarify the phylogenetic relationship of four kinds of viroids in the major producing regions of Shandong, we used GYSVd1, GYSVd2, AGVd, HSVd isolates from Qingdao, Yantai, Rizhao, Linyi and the isolates of different regions from GenBank to construct a phylogenetic tree. The results revealed that the GYSVd1 isolates of Shandong were mostly similar to the isolates of Brazil, South Korea, and the United States; the GYSVd2 isolates of Shandong were mostly similar to those of Beijing and Iran; AGVd isolates of Shandong were mostly similar to those of Iran, Chile and the United States; HSVd isolates of Shandong were mostly similar to those of Japanese and American. 【Conclusion】 Grapes in Shandong province were infected by GYSVd1, GYSVd2, AGVd and HSVd and the complex infection normally occurred under natural conditions. GYSVd2 isolate was firstly reported in Shandong.

**Key words:** Table grape; Viroid; Molecular identification; Sequence analysis

葡萄 (*Vitis vinifera* L.) 为葡萄科葡萄属木质藤本植物, 是一种重要的经济作物, 其种植面积和产量在 5 大果树中仅次于柑橘, 居世界第二位<sup>[1-2]</sup>。类病毒是一类单链共价闭合环状 RNA 分子, 由 Diener<sup>[3]</sup> 于 1971 年首次发现, 是目前发现的最小病原物。其基因组仅由 246~401 个核苷酸组成, 外围无外壳蛋白包被, 可在寄主植物体内进行自我复制<sup>[4-5]</sup>。类病毒潜伏期较长、危害性大, 可通过修剪、嫁接等农事操作进行传播。类病毒一旦侵染葡萄, 树体将终生带毒, 且容易发生多种病毒复合侵染, 给防治带来很大的困难<sup>[6-9]</sup>。因此, 了解类病毒种类和发生情况对病害早期预防具有重要意义。目前我国已报道的葡萄类病毒有 GYSVd1、GYSVd2、AGVd、GYSVd3、HSVd、CEVd、GLVd 等 7 种, 其中危害较重的是锈果类病毒属 (*Apscaviroid*) 的 GYSVd1、GYSVd2 和 AGVd, 啤酒花矮化类病毒属 (*Hostuviroid*) 的 HSVd 和马铃薯纺锤形块茎类病毒属 (*Pospiviroid*) 的

CEVd<sup>[10-13]</sup>。2011 年, 范旭东等<sup>[12]</sup>在辽宁、山东、新疆、宁夏和甘肃对侵染葡萄的部分类病毒进行调查和检测, 其中在山东采集了 4 个葡萄样品, 分别检测到了 GYSVd1、AGVd 和 HSVd 3 种类病毒; 赵静静等<sup>[13]</sup>于 2015 年对引起新疆地区葡萄黄化类症状的类病毒进行了检测和分析; 潘志勇等<sup>[14]</sup>和王升吉等<sup>[15]</sup>分别于 2002 年和 2011 年对山东葡萄种植区进行了病毒病的调查和检测, 没有对本地区的类病毒进行系统性的检测。山东作为我国鲜食葡萄主产区之一, 随着鲜食葡萄种植面积的不断扩大, 葡萄品种更新换代及葡萄苗木的调运日益频繁, 加大了本地区葡萄类病毒的扩散和流行。自然条件下葡萄类病毒常发生复合侵染, 近年来, 多地新建葡萄园均检出多种类病毒, 严重影响了本地鲜食葡萄的产量和品质。本研究采集山东鲜食葡萄主产区的类病毒疑似样品, 通过分子生物学检测方法进行主要类病毒检测, 并进行序列比对和进化关系分析, 旨在明确当地鲜食

葡萄类病毒的种类、复合侵染类型和分布情况,为山东鲜食葡萄的病害早期预防奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试样品:2016年于山东潍坊、青岛、烟台、日照和临沂等5个葡萄主产区采集具有花叶、斑驳、皱缩、褪绿、畸形等症状的葡萄叶片样品共149份<sup>[10]</sup>,将采集的样品保存于-80℃冰箱,以未感病的健康葡萄叶片作为阴性对照。

试剂:TransZol Plant 多糖植物总RNA提取试剂盒、大肠杆菌(*Escherichia coli*)*DH5α*菌株,北京全式金生物技术有限公司;HiScript® II 1st Stand cDNA Synthesis Kit, 诺唯赞生物;2×Es Taq Master Mix (Dye), 康为世纪;Plus DNA Extraction Kit, GeneMark 公司;克隆载体 pMD18-T、Solution I、DL2,000 DNA Marker, TaKaRa 公司;特异性引物合成,生工生物工程股份有限公司;其他生化试剂及普通化学试剂均为进口或国产分析纯。

仪器:MM400 组织研磨仪,德国 Retsch 公司;

Mastercycler nexus PCR 仪、Centrifuge 5430R 离心机,德国 Eppendorf 公司;AE224C 自动内标电子分析天平,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;JY300 电泳仪,北京君意东方公司;GelDoc-It 310 Imaging System 凝胶成像系统,美国 UVP 公司。

### 1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 合成

称取葡萄样品叶片约 0.1 g,置于 2 mL 离心管中,加入灭菌钢珠,液氮冷冻后迅速在组织研磨机上研磨,直至样品成粉末状,按试剂盒说明书提取叶片总 RNA,用于后续 cDNA 的合成及 PCR。

cDNA 的合成:反转录总体系为 20 μL,模板 RNA 6.0 μL, Random hexamers 1.0 μL, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 2.0 μL, 65℃ 变性 10 min,冰上放置 2 min,再加入下列试剂:2×RT Mix 10 μL, HiScript® II Enzyme Mix 2 μL。25℃, 5 min; 50℃, 45 min; 85℃, 5 min。合成的 cDNA 保存于-20℃冰箱备用。

### 1.3 PCR 扩增

以 cDNA 为模板,用 GYSVd1、GYSVd2、AGVd、HSVd 和 CEVd 特异性引物分别进行 PCR 扩增(表 1),扩增体系如下:2×Es Taq Master Mix 15

表 1 研究所用引物信息

Table 1 Primer information used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	长度 Length/bp	退火温度 T <sub>m</sub> /℃	参考文献 Reference
GYSVd1-F	CCTCAAAGAGCTAAACTGGAC	367	55	[16]
GYSVd1-R	CACATCACCGGAACCCAAAGTCAC			
GYSVd2-F	ACTAGTACTTTCTTCTATCTCCGAAGC	374	55	[17]
GYSVd2-R	ACTAGTCCGAGGACCTTTTCTAGCGCTC			
AGVd-F	GTCGACGAAGGGTCTCAGCAGAG	375	55	[18]
AGVd-R	GTCGACGACGAGTCGCCAGGTGAG			
HSVd-F	AACCCGGGGCTCCTTTCTCA	306	55	[19]
HSVd-R	AACCCGGGGCAACCTTCTC			
CEVd-F	ACGAGCTCCTGTTTCTCCGCTG	300	54	[20]
CEVd-R	CCGGGCGAGGGTGAAAGCCC			

μL, GYSVd1、GYSVd2、AGVd、HSVd 和 CEVd 上下游引物各 0.5 μL, cDNA 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足总体积至 30 μL。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.4 PCR 产物回收、测序及序列分析

参照试剂盒说明纯化目的片段。回收的扩增产物连接 pMD18-T 后,转化 *DH5α*,用含氨苄青霉素(*Amp*)抗性的培养基进行阳性筛选。菌落 PCR 验证后,菌液送交公司测序。将测序得到的序列与 Gen-

Bank 中的序列进行 Blast 比对,同时,下载 NCBI 已报道的分离物序列,利用 MEGA 5 软件邻接法(Neighbor-Joining, NJ),对选定的序列构建系统进化树,进化树中各分支置信度(Bootstrap)进行 1 000 次重复分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄疑似病叶症状

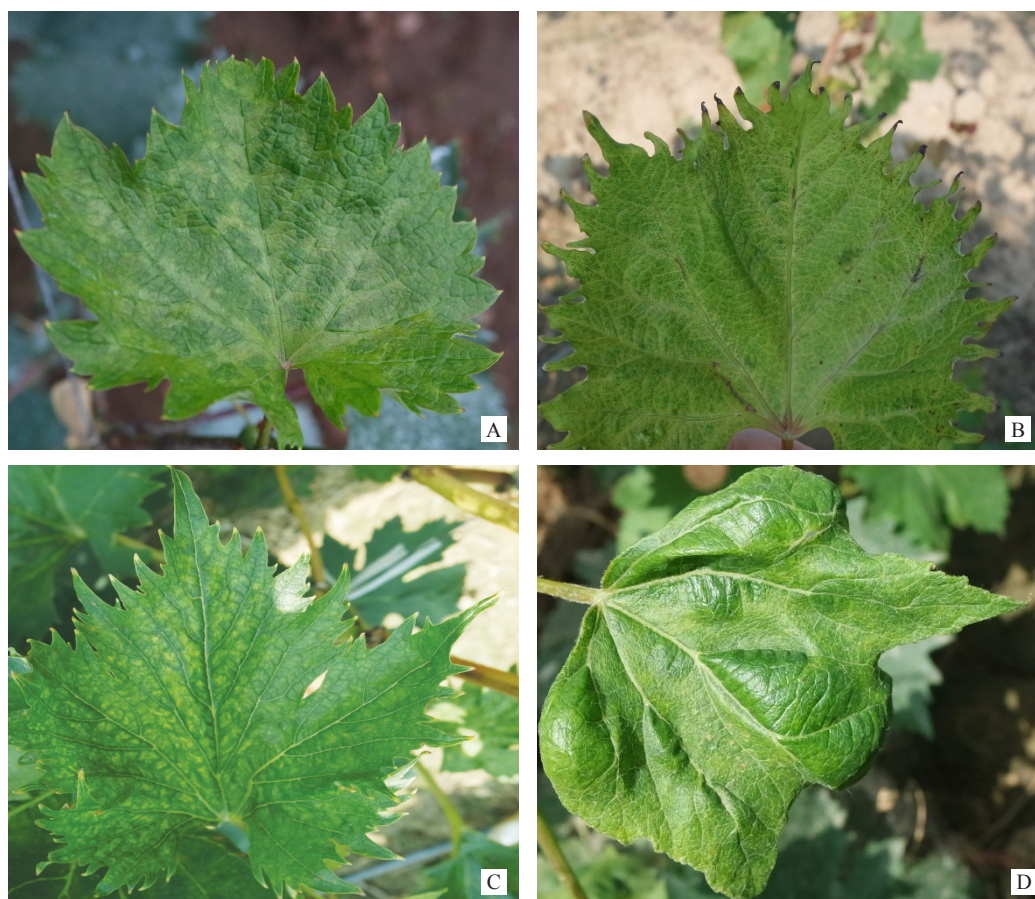
在对山东省鲜食葡萄主产区进行的调查中发



现,疑似感病叶片的症状大多表现为叶片黄化、不同程度的叶脉褪绿、花叶斑驳、皱缩,病情严重的种植园出现新叶畸形等症状(图1)。

## 2.2 类病毒RT-PCR检测

以提取的葡萄叶片总RNA为模板,采用5种类病毒的特异性引物分别进行RT-PCR扩增。结果表



A. 褪绿、斑驳; B. 黄化、花叶; C. 脉间褪绿; D. 叶片畸形。

A. Chlorosis, mottled; B. Yellowing, mosaic; C. Pulse-to-pulse faded Green; D. Leaf malformation.

图1 葡萄类病毒田间症状类型

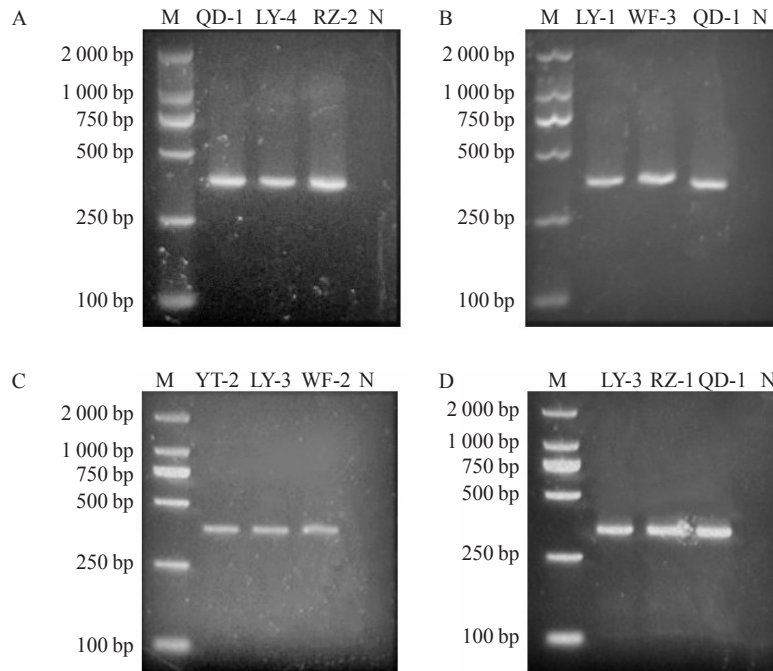
Fig. 1 The field types of symptoms for grapevine viroid

明利用 GYSVd1、GYSVd2、AGVd 和 HSVd 的引物分别扩增得到了大小约为 367、374、375 和 306 bp 的特异性条带(图2),CEVd 引物扩增未获得目的条带。经测序及 BLAST 比对发现 GYSVd1、GYSVd2、AGVd 和 HSVd 与 GenBank 中已报道的分离物序列的一致性均在 90% 以上。

对山东葡萄主产区采集的 149 份葡萄样品 RT-PCR 检测结果进行统计,发现共检测到了 GYSVd1、GYSVd2、AGVd 和 HSVd 4 种类病毒,除平度、莱阳和临沭样品未检测到这 5 种类病毒外,其他采样地点的葡萄均受到不同种类的类病毒侵染,同时伴有复合侵染现象。具体检测情况见表 2。

## 2.3 序列分析

为进一步明确侵染山东葡萄主产区 4 种类病毒的分子进化遗传关系,选择 GenBank 中不同地区有代表性的 GYSVd1、GYSVd2、AGVd、HSVd 分离物序列和具有 4 种类病毒符合侵染的青岛即墨市、烟台福山区、日照莒县和临沂兰山区的 GYSVd1、GYSVd2、AGVd、HSVd 序列,构建系统进化树(图 3)。结果表明,GYSVd1 山东分离物与巴西、韩国、美国分离物亲缘关系最近(图 3-A),同源性均在 97% 以上;GYSVd2 山东分离物与北京和伊朗分离物的亲缘关系最近(图 3-B),同源性均在 97% 以上;AGVd 山东分离物与伊朗、智利和美国分离物的亲



A. 引物 GYSVd1-F/R 扩增结果; B. 引物 GYSVd2-F/R 扩增结果; C. 引物 AGVd-F/R 扩增结果; D. 引物 HSVd-F/R 扩增结果; M. DL2000 DNA Marker; N. 阴性对照; QD-1、RZ-2、LY-1、LY-3、LY-4、WF-2、WF-3、YT-2、RZ-1. 采集的各地葡萄样品。

A. Amplification results with primers of GYSVd1-F/R; B. Amplification results with primers of GYSVd2-F/R; C. Amplification results with primers of AGVd-F/R; D. Amplification results with primers of HSVd-F/R; M. DL2,000 DNA Marker; N. Negative control; QD-1, RZ-2, LY-1, LY-3, LY-4, WF-2, WF-3, YT-2, RZ-1. Samples of main grape plant areas.

图 2 侵染葡萄类病毒 RT-PCR 扩增结果

Fig. 2 RT-PCR amplification results of Shandong grapevine samples by viroid infection

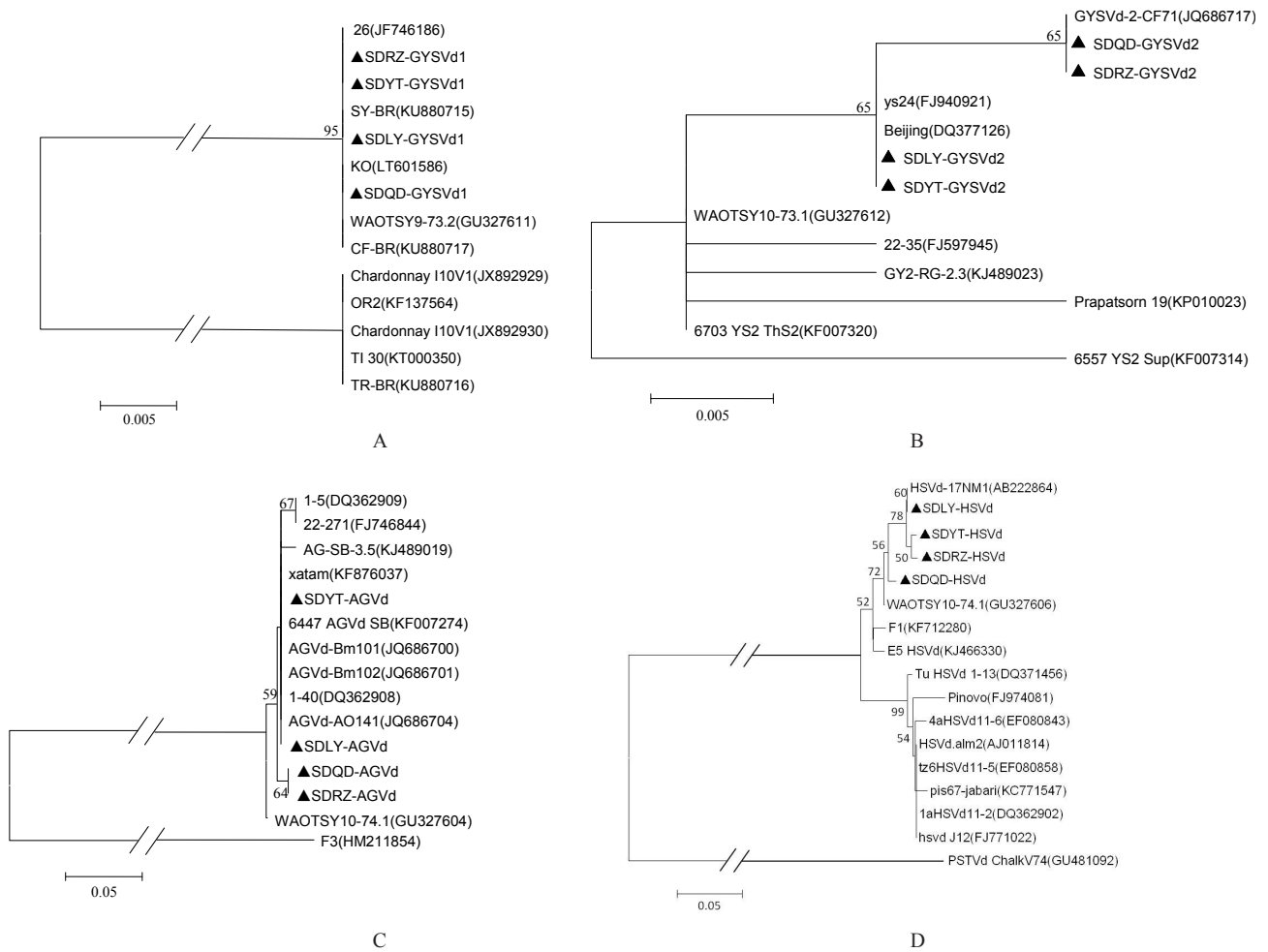
表 2 山东鲜食葡萄主产区类病毒 RT-PCR 检测结果

Table 2 RT-PCR detected results of viroid in samples of Shandong Grape

采集地点 Sampling place	样品数量 Sample quantities	阳性数/检出率 Positive number/detection rates (%)									
		GYSVd1	GYSVd2	AGVd	HSVd	GYSVd1+ HSVd	GYSVd2+ HSVd	AGVd+ HSVd	GYSVd1+ GYSVd2+HSVd	GYSVd1+GYSVd2+ HSVd+AGVd	
潍坊 昌邑 Weifang Changyi	18	1/5.56	2/11.11	-	8/44.44	2/11.11	-	-	-	-	
青岛 平度 Pingdu Qingdao	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
莱西 Laixi	19	-	1/5.26	-	6/31.58	-	-	-	-	-	
即墨 Jimo	28	-	-	2/7.19	6/21.43	1/3.57	1/3.57	1/3.57	7/25.00	1/3.57	
烟台 福山 Fushan Yantai	6	-	-	1/16.67	1/16.67	-	1/16.67	-	-	2/33.3	
莱阳 Laiyang	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
日照 莒县 Juxian Rizhao	26	3/11.54	-	-	7/26.92	4/15.38	-	-	5/19.23	3/11.54	
临沂 莒南 Junan Linyi	4	-	-	-	2/50.00	-	-	-	-	-	
临沭 Linshu	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
兰山 Lanshan	6	-	-	-	3/50.00	-	1/16.67	-	-	1/16.67	
沂水 Yishui	12	1/8.33	1/8.33	-	6/50.00	-	-	1/8.33	-	-	
合计 Total	149	5/3.36	4/2.68	3/2.01	39/26.17	7/4.70	3/2.01	2/1.34	12/8.05	7/4.70	

注: 未检测到的侵染类型在表中未显示。

Note: The type of undetected infection was not shown in the table.



A. GYSVd1 山东分离物与其他分离物系统进化树; B. GYSVd2 山东分离物与其他分离物系统进化树; C. AGVd 山东分离物与其他分离物系统进化树; D. HSVd 山东分离物与其他分离物系统进化树。

A. Phylogenetic relationships between GYSVd1 Shandong isolate and other GYSVd1 isolates; B. Phylogenetic relationships between GYSVd2 Shandong isolate and other GYSVd2 isolates; C. Phylogenetic relationships between AGVd Shandong isolate and other AGVd isolates; D. Phylogenetic relationships between HSVd Shandong isolate and other HSVd isolates.

图3 GYSVd1、GYSVd2、AGVd 和 HSVd 系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic relationships based on sequences of GYSVd1, GYSVd2, AGVd and HSVd

缘关系最近(图3-C), 同源性均在95%以上; HSVd 山东分离物与日本分离物的亲缘关系最近(图3-D), 同源性均在98%以上。

### 3 讨论

葡萄类病毒是一类影响葡萄生产的重要病原体。近年来我国葡萄栽培面积不断扩大, 为葡萄类病毒的传播提供了有利条件。田间管理不当、栽培技术不规范, 均加速了病毒的蔓延; 感病种苗盲目引进, 地区间相互引种交换频繁, 缺乏完善的病毒检测标准, 增加了病毒传播机会, 影响了葡萄的产量和品

质<sup>[21]</sup>。

山东是我国鲜食葡萄主产区之一, 笔者对山东地区鲜食葡萄感染的主要类病毒发生情况和种类做了系统性的调查和分析。对山东省具有代表性的鲜食葡萄主产区采集的样品进行了分子检测, 结果表明被检测地区除青岛平度、烟台莱阳和临沂临沭外, 其他地区均受到GYSVd1、GYSVd2、AGVd和HSVd等4种类病毒不同程度的侵染, 以HSVd的检出率最高, 为46.98%, 其中在临沂兰山地区检出率高达83.34%; GYSVd1和GYSVd2的检出率次之, 分别为20.81%和17.44%, 并且GYSVd2为山东首次发现;



AGVd 的检出相对上述 3 种类较低, 仅为 8.05%。在山东省调查的 5 个地级市中, 类病毒种类的分布与地理位置没有相关性, 其中青岛平度、烟台莱阳和临沂临沭等地均为传统品种种植区, 苗木引进频率较低, 降低了葡萄感染类病毒的风险。同时, 结果表明葡萄感染类病毒表现出多样化的复合侵染类型, 复合侵染检出率为 20.81%, 加重了类病毒的危害。

类病毒进化变异情况与其致病流行能力密切相关。本研究序列分析表明, 山东省青岛即墨市、烟台福山区、日照莒县和临沂兰山区 4 种类病毒的序列均与国外分离物的亲缘关系较近, 分析认为这与苗木的引进交流有密切关系。为了有效控制本省葡萄类病毒的传播蔓延, 建议加强进出口检疫力度, 对外来地区引入的葡萄苗木、接穗、插条、砧木等繁殖材料应严格检测, 确保无外来病毒入侵<sup>[22]</sup>; 同时加强对种植农户栽培技术的指导, 避免因农事操作不当导致病毒传播。

本研究对山东鲜食葡萄主栽区的主要类病毒发生情况、病毒种类、复合侵染类型和分子进化遗传关系进行了系统性分析, 为山东地区葡萄类病毒的早期预警与防治奠定基础, 为本省葡萄产业的健康发展提供有利保障。

## 参考文献 References:

- [1] 贺普超. 葡萄学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999:1-2.  
HE Puchao. ampelology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1999:1-2.
- [2] 王引权, 古勤生, 陈建军, 曹义文. 葡萄病毒病研究进展[J]. 果树学报, 2004, 21(3): 258-263.  
WANG Yinquan, GU Qinqing, CHEN Jianjun, CAO Ziyi. Advances in research of grapevine viruses[J]. Journal of Fruit Science, 2004, 21(3): 258-263.
- [3] DIENER T. Viroids: the smallest known agents of infectious disease[J]. Annual Review of Microbiology, 1974, 28(15): 23-39.
- [4] 李桂芬, 李明福, 张永江. 植物类病毒检测技术概述[J]. 河南农业科学, 2007, 3(4): 19-21.  
LI Guifen, LI Mingfu, ZHANG Yongjiang. Overview of detection technology for plant Viroids[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2007, 3(4): 19-21.
- [5] 黄家凤, 许文博. 植物类病毒研究进展[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2007, 2(25): 276-281.  
HUANG Jiafeng, XU Wenbo. Advances in studing plant viroids [J]. Journal of Shihezi University (Natural Science), 2007, 2(25): 276-281.
- [6] 黄家凤, 刘升学. 果树类病毒及检测技术研究进展[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(20): 6165-6167.  
HUANG Jiafeng, LIU Shengxue. Advances in detection technologies for fruit tree viroids[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2007, 35(20): 6165-6167.
- [7] JIANG D M, SANO T, TSUJI M, ARAKI H, SAGAWA K, ADKAR-PURUSHOTHAMA C R, ZHANG Z X, GUO R, XIE L H, WU Z J, WANG H Q, LI S F. Comprehensive diversity analysis of viroids infecting grapevine in China and Japan[J]. Virus Research, 2012, 169(1): 237-245.
- [8] ADKAR-PURUSHOTHAMA C R, KANCHEPALLI P R, YANJARAPPA S M, ZHANG Z X, SANO T. Detection, distribution, and genetic diversity of Australian grapevine viroid in grapevines in India[J]. Virus Genes, 2014, 49(2): 304-311.
- [9] SALMAN T M, HABIL N, SHI B J. Effect of temperature on symptom expression and sequence polymorphism of grapevine yellow speckle viroid 1 in grapevine[J]. Virus Research, 2014, 189: 243-247.
- [10] 彭山. 葡萄 (*Vitis vinifera*) 类病毒检测[D]. 沈阳: 东北农业大学, 2008.  
PENG Shan. Detection of grapevine virroids[D]. Shenyang: Northeast Agricultural University, 2008.
- [11] ZHANG Z X, QI S S, TANG N, ZHANG X X, CHEN S S, ZHU P F, MA L, CHENG J P, XU Y, LU M G, WANG H Q, DING S W, LI S F, WU Q F. Discovery of replicating circular RNAs by RNA-Seq and computational algorithms[J]. PLOS Pathogens, 2014, 10(12): e1004553.
- [12] 范旭东, 董雅凤, 张尊平, 任芳. 4 种葡萄类病毒检测及序列分析[J]. 中外葡萄与葡萄酒, 2011, 5(14): 13-17.  
FAN Xudong, DONG Yafeng, ZHANG Zunping, REN fang. Detection of four grapevine virroids and sequence analysis[J]. Sino-Overseas Grapevine & Wine, 2011, 5(14): 13-17.
- [13] 赵静静, 乾义柯, 颜超, 郭庆元, 胡白石, 陆平. 引起葡萄黄化类症状的病毒和类病毒 RT-PCR 检测[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(6): 1099-1104.  
ZHAO Jingjing, QIAN Yike, XIE Chao, GUO Qingyuan, HU Baishi, LU Ping. RT-PCR detection for virus and viriod yellowing class symptom[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2015, 52(6): 1099-1104.
- [14] 潘志勇, 翟衡, 左方梅, 史启照. 山东葡萄产区主要病毒病发生危害调查[J]. 植物保护, 2002, 28(6): 40-42.  
PAN Zhiyong, ZHAI Heng, ZUO Fangmei, SHI Qizhao. Investigation in occurrence and damage of main grapevine viruses in Shandong Province producing area[J]. Plant Protection, 2002, 28(6): 40-42.
- [15] 王升吉, 赵玖华, 尚佑芬, 吕志华, 张加魁. 山东省葡萄几种主要病毒病调查及检测研究[J]. 北方园艺, 2011(07): 20-23.

- WANG Shengji, ZHAO Jiuhua, SHANG Youfen, LÜ Zhihua, ZHANG Jiakui. Research on the survey and detection of several kinds of main grapevine viruses in Shandong Province[J]. Northern Horticulture, 2011(07): 20-23.
- [16] JIANG D M, ZHANG Z X, WU Z J, GUO R, WANG H Q, FAN P G, LI S F. Molecular characterization of grapevine yellow speckle viroid-2 (GYSVd-2)[J]. Virus Genes, 2009, 38(3): 515-520.
- [17] ELLEUCH A, FAKHFAKH H, PELCHAT M, LANDRY P, MARRAKCHI M, PERREAULT Jean- Pierre. Sequencing of Australian Grapevine Viroid and Yellow Speckle Viroid isolated from a Tunisian grapevine without passage in an indicator plant European[J]. Journal of Plant Pathology, 2002, 108(8): 815-820.
- [18] 周莹, 李世访, 成卓敏, 赵建波, 姜全. 桃树上啤酒花矮化类病毒(*Hop stunt viroid*)的检测及序列分析[J]. 植物病理学报, 2006, 36(6): 501-507.
- ZHOU Ying, LI Shifang, CHENG Zhuomin, ZHAO Jianbo, JIANG Quan. Detection and sequence analysis of Hop stunt viroid isolated from peach in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(6): 501-507.
- [19] 彭军, 周常勇, 唐科志, 谭万忠. 柑橘裂皮病类病毒的一步法 RT-PCR 法检测及其在甜橙体内的分布[J]. 果树学报, 2005, 22(6): 744-747.
- PENG Jun, ZHOU Changyong, TANG Kezhi, TAN Wanzhong. Preliminary study on One-step RT-PCR detection of *Citrus exocortis viroid* (CEVd) and its distribution in different parts of sweet orange[J]. Journal of Fruit Science, 2005, 22(6): 744-774.
- [20] 王建辉, 刘建军, 陈克玲, 何健, 赵黎明. 葡萄病毒病研究进展[J]. 北方园艺, 2017(9): 179-183.
- WANG Jianhui, LIU Jianjun, CHEN Keling, HE Jian, ZHAO Liming. Research progress in grapevine viruses[J]. Northern Horticulture, 2017(9): 179-183.
- [21] 甘琴华, 吴兴海, 封立平. 山东局从法国进境葡萄砧木中截获啤酒花矮化类病毒[J]. 植物检疫, 2014, 28(1): 92.
- GAN Qinhu, WU Xinghai, FENG Liping. The hops dwarf virus was intercepted from the French vine rootstock by Shandong bureau[J]. Plant Quarantine, 2014, 28(1): 92.
- [22] 周莹, 林秀敏, 严红, 燕继晔, 乔广行, 李兴红. 胶东半岛地区葡萄病毒病田间调查和血清检测[J]. 中国果树, 2011(2): 43-46.
- ZHOU Ying, LIN Xiumin, YAN Hong, YAN Jiye, QIAO Guangxing, LI Xinghong. Field investigation and serologic tests of Grapevine Viruses in Jiaodong peninsular region[J]. China Fruits, 2011(2): 43-46.

## 沉痛悼念著名果树学家韩明玉教授

中国共产党党员、九三学社社员、国务院政府津贴获得者、西北农林科技大学园艺学院教授、博士生导师韩明玉教授因病医治无效,于2018年08月02日16:35在西安唐都医院逝世,享年56岁。

韩明玉教授1984年毕业于西北农学院园艺系果树专业,曾任陕西省果树研究所室主任、陕西省果树研究所副所长、所长、西北农林科技大学园艺学院院长、西北农林科技大学科技推广处处长等职。曾兼任中国园艺学会常务理事,中国园艺学会桃分会副理事长,中国园艺学会苹果分会副理事长,中国苹果协会副会长,陕西省第八、九、十、十一届政协委员,陕西省第二届决策咨询委员会委员,陕西省农业科学院学术委员会委员,西北农林科技大学第一届学术委员会委员,陕西省园艺学会副理事长,陕西省果业协会副会长,《果树学报》编委等职。

韩明玉教授曾任国家苹果产业技术体系首席科学家,国家苹果改良中心杨凌分中心主任,陕西果业发展协同创新中心主任。1996年入选陕西省农业科学院跨世纪人才,1997年获陕西省有突出贡献的中青年专家,同年入选陕西省“三五”人才,2003年获陕西省有突出贡献的专家,2008年享受国务院政府特殊津贴,2012年入选农业部“全国农业科研杰出团队”和“全国农业科研杰出人才”。

韩明玉教授是我国著名的果树学家,是中国果树工作者的优秀代表,为我国果树产业的发展作出了突出贡献,他的逝世是我国果树界的重大损失。

我们对韩明玉教授的逝世表示沉痛哀悼!

《果树学报》编辑委员会  
2018年8月3日