

# 果树组织培养脱毒技术和 病毒检测技术研究进展

李俊芳<sup>1</sup>, 侯义龙<sup>2</sup>, 苏福才<sup>1</sup>, 张立娟<sup>2</sup>, 于亚军<sup>2</sup>

(1. 内蒙古农业大学, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 大连大学, 辽宁 大连 116622)

**摘要:** 病毒病对果树的危害日趋严重, 各国对病毒病害的研究和防治极为重视. 作者着重论述当前果树生产上主要应用的果树组织培养技术、脱除病毒技术和病毒检测技术, 包括其原理、操作过程和特点, 并简要探讨了病毒检测与脱毒的关系.

**关键词:** 组织培养; 脱毒; 病毒检测

**中图分类号:** S432      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1008-2395(2006)02-0010-06

## Proceedings in techniques of tissue culture, virus-free and virus detection in fruit-trees

LI Jun-fang<sup>1</sup>, HOU Yi-long<sup>2</sup>, SU Fu-cai<sup>1</sup>, ZHANG Li-juan<sup>2</sup>, YU Ya-jun<sup>2</sup>

(1. Inner Mongolia Agricultural University, Huhu 010019 China; 2. Dalian University, Dalian 116622, China)

**Abstract:** The hazard of virus diseases to the production of fruit trees become more and more severe. The study and prevention of virus diseases are regarded in the world. This paper introduced the application of tissue culture techniques, virus elimination techniques and virus detection techniques in fruit trees at the present, which includes the principles, operation process and characteristics of them. The relationship between virus elimination and virus detection also was discussed.

**Key words:** tissue culture; virus-free; virus detection

近40年来,植物组织培养技术得到了迅速发展,已经成为生物学科中的重要研究技术和手段之一. 组织培养技术对于果树这种需要采用无性繁殖的方法来大量培育种苗的植物来说,更具有十分重要的意义. 目前病毒病严重危害着果树业的发展. 实现无病毒化栽培是当前国内外急待并一直努力解决的问题. 脱毒和病毒检测技术是实现无病毒栽培的关键. 果树组织培养技术又为果树脱毒提供了手段.

## 1 果树组织培养技术的应用

利用植物组织培养技术不仅可以生产大量的优良无性系,并可获得药用价值高和工业生产所需的次生产品,细胞融合可打破种属间的界限,克服远缘杂交不亲和性障碍,在植物新品种的培育和种性的改良中有着巨大的潜力;组织培养的植物细胞也成为在细胞水平上分析研究的理想材料. 通过分离单倍体细胞,能培育纯合的二倍体优良品系,缩短育种时间;通过选择突变体,提高植物的品质,增强抗盐、抗旱、抗寒等方面的能力,扩大植物的生长范围;将体细胞冷藏于低温下,建立基因库,达到保存物种的目的.

收稿日期: 2005-09-22

基金项目: 辽宁省教育厅科学研究计划(2004D202), 辽宁省博士启动基金项目(20021052)

作者简介: 李俊芳(1979-),女,硕士研究生.

通讯作者: 侯义龙(1963-),男,教授,博士,主要研究方向: 果树病毒检测与无病毒栽培.

### 1.1 离体无性系快速繁殖

由于组织培养法繁殖作物的突出特点是快速,因此,对一些繁殖系数低、不能用种子繁殖的“名、优、特、新、奇”作物品种的繁殖,意义更大。对于脱毒苗、新育成、新引进、稀缺育种、优良单株、濒危植物和基因工程植株等可通过离体快繁,同时可不受地区、气候的影响,比常规方法快数万倍到数百万倍的速度扩大繁殖。我国在果树离体无性繁殖方面的研究和应用卓有成效,很多主要栽培品种已建立了比较完善的快繁体系。

### 1.2 生产脱毒苗

果树病毒病害在国内外都由于其危害的严重性、长期性及防治上的困难,一直是世界植物病理学者和果树生产者所关注的一个重要问题。果树多采用无性繁殖,某些病毒病蔓延严重。利用茎尖培养技术可以进行脱毒及快速繁殖无病毒苗木,以满足生产发展的需要。它与种子繁殖相比,除同样不带病毒之外,还有早结果、能保持母本优良性状的特点。目前国内外已通过茎尖培养方法得到大量苹果、柑桔、香蕉、葡萄、草莓及多种果树砧木等数百种果树植物的无病毒苗木。

### 1.3 人工种子

人工种子是指通过组织培养方法获得发育完全的个体,将其用适当方法保护起来以代替天然种子。植物人工种子是当前生物技术中十分活跃的领域之一。它在快速繁殖优良品种与株系、固定杂种优势与脱病毒等生物技术相结合诸方面具有诱人的前景。

### 1.4 果树新品种诱导和选育

利用植物组织培养过程易产生体细胞变异这一特性,不仅可以诱导新的变异,缩短品种的改良周期,而且还可以进行抗性育种。胚挽救技术在果树育种中的应用有其独特的优势,解决了果树常规育种中一些问题:①克服种子休眠,缩短育种周期。②克服种胚发育不良或中途败育。③克服多胚品种珠心胚的干扰。柑橘类排除珠心胚干扰,提高了杂种苗出现率。④克服远缘杂交困难,促进远缘杂种发育。远缘杂交中,可把未受精的胚珠分离出来,在试管内用异种花粉在胚珠上萌发受精,产生的杂种胚在试管中发育成完整植株,此法称为“试管受精”。通过原生质体融合,可部分克服有性杂交不亲和性,而获得体细胞杂种,从而创造新种或育成优良品种。花药培养诱导花粉发育成单倍体植株,可以迅速而简便地获得纯合体,有助于利用杂种优势,缩短育种年限,加速育种进程,提高育种效率。

### 1.5 种质资源保存

农业生产是在现有种质资源基础上进行的,由于自然灾害和生物之间的竞争以及人类活动对大自然的影响,已有相当数量的植物物种在地球上消失或正在消失,具有独特遗传性状的生物物种的绝迹是一种不可挽回的损失,利用植物组织和细胞法低温保存种质,可以大大节约人力、物力和土地,同时也便于种质资源的交换和转移,防止有害病菌的人为传播,给保存和抢救有用基因带来了希望。

### 1.6 进行生理生化、细胞学、遗传学等领域的基础研究

植物体内的各种组织或细胞,在正常情况下是受各组织或细胞之间的相互作用和影响而彼此制约的。因此,要用原体植物来探讨器官是如何发生的,影响器官发生或形态建成的机理及其生理变化等问题就较为困难。对于从事理论研究来说,组织培养这一手段却在相当程度上克服了上述困难。一方面因为组织培养所用的材料是离体的,减少了植物体其它部份的干扰。同时,它又是在预知的控制条件之下,影响组织或细胞活动的因素相对较为简单。这样,人们就可有意识地去选择或设置一些能引起某种生理生化变化的因素进行处理,以便探索离体培养条件下,组织或细胞的发展变化规律及研究植物器官或组织形态建成的机理。

### 1.7 果树植物基因工程

植物细胞工程与基因工程的结合,更大程度地提高了基因转化的成功率。随着植物基因工程研究的迅速发展,把离体培养技术与分子生物学方法结合起来,在细胞水平上进行遗传修饰重组 DNA,可以达到改良果树品种的目的。人们力图通过基因工程的方法获得抗性强、产量高、品质优良的果树新品种。1988 年果树的基因转化首先在核桃上取得突破,随后在苹果、柑橘、桃、杏、李、梨、葡萄、枇杷等果树上都获得了转基因植株。

## 2 果树脱毒技术

### 2.1 热处理脱毒法

原理是根据感染病毒和寄主植物对高温忍耐程度的差异,在一定的温度下(37~40℃),病毒被钝化,失去增殖和再感染能力,而寄主植物正常生长.经过一段时间(3~8周)的处理,枝条前端生长点附近不含有病毒颗粒,切除这部分进行人工培养或嫁接到无病毒的砧木上得到无毒的苗木.已证明将近90种以上的病毒病可以用热处理的方法治疗,但并非所有的病毒都能够通过高温脱除.热处理的效果与病毒的致死温度没有相关性,但与病毒颗粒的形状有关,线状和球状病毒在一定高温下易被钝化,而对杆状病毒效果较差.由于高温脱毒对植株的环境压力较大,热处理过程中会造成部分植株死亡,因此,选择恰当的温度区间和处理时间是脱毒成功的关键,同时要注意保持充足的光照强度和湿度,尽可能的降低植株根部的温度,并选择生长势健壮的植株.

### 2.2 茎尖培养脱毒法

茎尖培养不仅对优良苗木的快速繁殖及工厂化育苗具有重要意义,而且对脱除病毒<sup>[1]</sup>,培育无病毒苗木起到重要作用.茎尖大小对分化率和脱毒率有很大的影响;茎尖分化率与茎尖大小成正比,脱毒率与茎尖大小成反比.通过茎尖培养脱毒一般有几个环节:①材料处理和接种;②诱导芽分化和小植株的增殖,诱导生根;病毒检测;③生根植株的移栽;④移入苗圃.茎尖培养的最大缺点是茎尖不易培养,生根和移栽成活率低.在果树上仅在草莓和葡萄等少数树种上获得成功并用于生产.二次取尖脱毒可有效提高脱毒率,该法已在草莓和苹果上应用,也可尝试用于其它果树脱毒.

### 2.3 热处理与茎尖培养结合脱毒技术

近年来的研究证明,用热处理和茎尖培养相结合的方法,培育无病毒母本苗效果较好,特别是对于一些难于用茎尖培养或热处理脱毒的果树病毒,此种方法尤为重要.借助于热处理钝化病毒,就可切取较大茎尖,利用热处理过的嫩梢进行茎尖培养,或将试管苗进行热处理,之后再行茎尖培养,可提高脱毒率30~40%,所取茎尖大小因植物种类和待脱病毒种类而异,一般为0.5~2.0 mm.采用该法成功脱除病毒的事例很多,据董雅凤<sup>[2]</sup>报道采用单纯茎尖培养,检测22个苹果茎尖,仅有6个茎尖脱除了苹果褪绿叶斑病毒,苹果茎沟病毒则全未脱除;而采用热处理后茎尖培养,苹果茎沟病毒和苹果褪绿叶斑病毒的脱毒率分别为75%~100%;而采用试管苗热处理36 d的脱毒率为82.3%.

### 2.4 微体嫁接脱毒法

在茎尖培养的基础上,Marashige等提出微体嫁接技术,即将茎尖分生组织嫁接在试管中经脱毒培养的砧木上得到完整植株.微体嫁接解决了某些木本植物茎尖培养发根困难、生长缓慢的问题,并且可使复合侵染的病毒分离.1983年Navarro<sup>[3]</sup>在试管培养10~14 d的梨新梢上,利用长为0.5~1.0 mm带3~4个叶原基的茎尖进行试管微体嫁接,最后获得无毒苗.目前,微嫁接成功的植物有杏、酿酒葡萄、桉树、山茶、桃、李、樱桃、苹果和柑桔等.

### 2.5 植物病毒的化学防治

抑制植物病毒活性的化学物质包括代谢拮抗物质、植物生长调节物质等,常用的抗病毒化学药物有三氮唑核苷(病毒唑),5-二氢尿嘧啶和双乙酰-二氢-5-氮尿嘧啶.化学处理往往与组织培养结合进行,即先获得待脱病毒样品的茎尖培养植株,然后在进行离体植株培养的培养基中加入化学抑制物质,继代培养一定时间后,再取新梢在无化学抑制剂的培养基上培养,经病毒检测,保留无病毒的单株.化学处理脱除的果树病毒有葡萄扇叶病毒、苹果褪绿叶斑病毒和苹果茎沟病毒等<sup>[4]</sup>.

### 2.6 植物病毒生物防治

病毒交叉保护(virus cross-protection)现象,即一种病毒的存在可使寄主植物抵抗其他病毒的侵染.这一现象是Mckinney等观察到用某些病毒的弱毒株预先接种植物,随后再接种相关的强毒株时,常常不表现强毒株症状,交叉保护也是诱导抗性的一种,如烟草接种TMV后,获得了对霜霉病的抗性,后来又在病毒以外的其他病原生物如真菌细菌等也发现类似的交叉保护现象,保护作用可以在种内不同株系间发生,也可以在不同种甚至不同类型的病原物之间发生.

## 2.7 培育抗病毒的品种

病毒病的防治最有效和最根本的办法是培育抗病毒的品种. 应用最广泛的是基于病毒外壳蛋白基因的转基因技术, 它是通过基因工程的手段将病毒外壳蛋白基因导入植物体内诱发植物对病毒的免疫性, 培育出对病毒具有一定免疫力的工程果树品种. Huntley 等<sup>[5]</sup> 用雀麦草花叶病毒不同片段的核酸, 经重组成缺陷型 RNA 后导入水稻, 转基因植株表现出显著的抗病毒特性. 目前, 为进一步提高工程植株的抗病性, 人们多采用复合基因策略, 即转多种抗性基因控制一种病毒, 可以提高转基因植物的抗性强度和抗病的持久性和广谱性, 这是转基因抗病毒育种产业化发展的趋势.

## 3 果树病毒的检测方法

### 3.1 果树病毒的指示植物检测法

该法是以对某种病毒十分敏感的植物作为指示物, 根据病毒侵染指示植物后的症状, 对病毒的存在与否及种类做出鉴别. 可用作病毒鉴定的草本指示植物种类很多, 常用的有藜科、茄科、豆科、葫芦科等植物. 李春敏<sup>[6]</sup> 利用指示植物检测了核果坏死环斑病毒. 此法特异性较差, 往往存在一病多症、多病一症的现象. 检测速度慢, 且受季节限制, 获得检测结果所需时间长, 维护指示植物园费用高. 指示植物法的灵敏度也较低.

### 3.2 电子显微镜技术检测果树病毒

应用电镜方法鉴定和检测果树病毒, 应该先对不同病毒组的形态和典型病毒的特点有所了解. 用电镜观察病毒粒体, 要经过提纯, 用超速离心机反复低温离心, 可把病毒粒子提纯分离出来. 提纯液可用于电镜制片, 观察病毒形态结构. 此法已用于草莓、葡萄和枣等果树的病毒鉴定.

### 3.3 血清学方法检测果树病毒

目前最常用的血清学方法是酶联免疫吸附法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 和点免疫结合测定技术 (Dot Immuno binding Assay, DIBA).

ELISA 是将抗原和抗体的免疫反应与酶的高效催化反应相结合而应用于植物病毒检测的方法. 其原理是通过化学的方法, 将酶与抗体或抗原结合起来, 形成酶标记物, 如通过碘酸钠将辣根过氧化物酶和抗体球蛋白相结合形成酶标抗体. 具有活性的酶标记物与相应的抗原或抗体反应, 形成更大的复合体, 加入酶反应底物呈颜色反应, 从而达到检测病毒的目的. ELISA 法检测病毒具有适于测定大量样品, 不需要使用同位素和复杂的设备, 且对人体基本无害等一系列优点. 但是, 此法检测需制备高质量的抗血清. 免疫反应物消耗量较大, 抗体 (或抗原) 被酶联板吸附后与抗原 (或抗体) 的结合力下降, 抗原与抗体结合比在液相中慢.

DIBA 的基本原理是通过酶标记抗体与吸附于硝酸纤维素膜 (简称 NC 膜) 上的抗原发生特异性结合, 产生酶标记的免疫复合体, 当加入相应的酶反应底物后, 产生不溶性的产物, 在 NC 膜上形成有色的斑点来检测病毒的. 用 NC 膜的斑点免疫测定法与酶联板的 ELISA 方法相比有以下优点: 1) 成本低. 2) 反应结果可长期保存. 3) 快捷、简便. 其缺点是, 检测时有假阳性反应, 需要设置各种对照; 需要在合适的工作浓度下反应. 血清学检测方法在植物病毒的鉴定、定量和定位分析中得到广泛的应用<sup>[7-10]</sup>.

### 3.4 分子生物学检测法

血清学方法检测病毒的基础是利用病毒外壳蛋白的抗原性, 但有些果树病毒在某些情况下缺乏外壳蛋白, 而类病毒则没有外壳蛋白, 而且目前多数果树病毒未能制备出特异抗血清. 因此, 血清学方法无法检测某些病毒或株系, 也不能检测类病毒. 分子生物学检测法是通过检测病毒核酸来证实病毒的存在. 此方法比血清学方法的灵敏度要高, 特异性强, 有着更快的检测速度, 操作也比较简便, 可用于大量样品的检测, 另外, 该法适应范围广, 其应用对象既可是 DNA 病毒和 RNA 病毒, 也可以是类病毒. 目前, 在果树病毒检测与鉴定方面应用的分子生物学技术主要包括核酸分子杂交技术、多聚酶链式反应技术、双链 RNA 电泳技术等<sup>[11]</sup>.

3.4.1 核酸分子杂交技术: 互补的核苷酸序列通过碱基配对形成稳定的杂合双链分子的过程称为杂

交. 杂交的双方是使用的探针和要检测的核酸. 检测对象可以是克隆化的基因组 DNA, 也可以是细胞总 DNA 或总 RNA. 根据使用的方法, 被检测核酸可以是提纯的, 也可以在细胞内杂交, 即细胞原位杂交. 该技术在马铃薯纺锤块茎类病毒 (PSTVd)、柑橘裂皮类病毒 (CEVd) 等检测中有广泛的应用, 核酸杂交还可和 RT-PCR 结合使用. Bertolini 等<sup>[12]</sup> 采用复合 RT-PCR 同时检测能侵染橄榄树的 6 种 RNA 病毒, 后用这 6 种病毒的特异 Dig 标记的探针对 PCR 产物进行检测. 核酸分子杂交法特异性强, 灵敏度高, 可检测到 1pg 的 DNA, 可检测大量样品.

3.4.2 聚合酶链式反应 (PCR) 技术: PCR 技术是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 的方法, 是美国科学家 Mullis 等人 1985 年发明的. 该技术近几年被广泛地应用于生物学各个领域, 国内外学者相继采用 RT-PCR 技术, 张开春等, 侯义龙等, 牛建新等采用 RT-PCR 技术检测了苹果褪绿叶斑病毒、苹果茎痘病毒、苹果茎沟病毒、苹果花叶病毒、李属坏死环斑病毒、李矮缩病毒、葡萄卷叶病毒等<sup>[13-18]</sup>. 复合 RT-PCR 是在同一 RT-PCR 反应体系中用几对不同的引物同时检测多个目的片段. Nie 等<sup>[19]</sup> 应用复合 RT-PCR 技术同时检测了马铃薯的 5 种病毒和 1 种类病毒. 复合 RT-PCR 和用单一 RT-PCR 做相同数目的病毒检测相比, 节约了时间和试剂.

PCR 技术用于植物病毒的检测具有特异性强、灵敏度高、快速简便又无放射性的危害, 据报道, PCR 的灵敏度可达到 pg 级甚至 fg 级水平. PCR 技术的特异性极强, 研究表明其产物的碱基错配率一般只有  $2 \times 10^{-4}$ , 足可供作特异性分析. PCR 技术诞生后, 在病毒病理科研人员的积极努力探索下, 又衍生出一些以 PCR 技术为基础的病毒检测方法, 如 RT-PCR 法、IC-PCR 法、IC-RT-PCR 法、PCR 微量板杂交法, 套式 PCR 等.

3.4.3 双链 RNA (dsRNA) 电泳技术: ssRNA 病毒在植物体内增殖, 通过核酸互补而形成一种健康植物没有的碱基配对 dsRNA. dsRNA 经提纯、电泳、染色后, 在凝胶上所显示的谱带可以反映每种病毒组群的特异性, 并且有些单个病毒的 dsRNA 在电泳图谱上也显示一定的特征. 因此, 利用病毒 dsRNA 的电泳图谱可以检测出病毒的类型和种类. dsRNA 检测法具有快速、敏感、简便等优点, 既可有效地检测已知和未知的病毒, 又不受寄主和组织的影响, 同样可以检测类病毒. dsRNA 检测法自 1976 年首次应用于检测植物病毒以来, 日本、加拿大已检测了 20 多种果树病毒. 牛建新等<sup>[20]</sup> 对生产中广泛发生的葡萄卷叶病毒 (GLRV) 和葡萄扇叶病毒 (GFV) 进行了检测并确立了检测标准.

## 4 结 语

果树组织培养技术作为现代生物技术的一个重要组成部分, 已由实验室走向商业化生产, 为人类创造着巨大财富. 大量的试验认为: 单一的脱毒方法虽然能够脱除几种主要的病毒或在一定程度上降低病毒的浓度, 但脱毒率均比较低. 通常生产上将几种脱毒技术结合使用, 如: 热处理加小茎尖培养、热处理加微体嫁接、化学处理加小茎尖培养等均收到了很好的效果. 迄今为止, 病毒的检测技术已经历了传统生物学鉴定、免疫化学方法和核酸分子鉴定方法三个阶段. 传统的生物学鉴定方法以其简便、直观的特点为病毒的鉴定提供了形态学上的指标; 以抗原抗体反应为基础的免疫化学方法以其快速、灵敏的特点为植物病毒提供了蛋白质分子水平的检测技术; 而基于核酸分子组成差异的核酸分子标记技术为病毒的准确鉴定提供了分子水平的检测技术. 分子生物学技术在病毒检测实践中的应用, 已使得病毒的鉴定方法发生了革命性的变化. 相信, 各种脱毒技术与日益先进的病毒检测技术相互配合, 将为果树脱毒与无病毒化栽培奠定坚实的基础.

### 参考文献:

- [1] HERLIHY EA, CROKE JT. Influence of in vitro factors on titre and elimination of model fruit tree viruses [J]. Plant cell Tissue and Organ Culture, 2003, 72, 33-42.
- [2] 董雅凤. 苹果和梨树茎尖培养结合热处理脱病毒研究 [J]. 北方果树, 2002 (2): 9-11.
- [3] NAVARRO L, LIACER G, CAMBRA M, et al. Shoot-tip grafting in vitro for elimination of viruses in peach plants [J]. Acta

- Horticulturae,1982,130(3):185-192.
- [4]AINARDI M,TRIOLO EXPONETIAL of (RS)-DHPA for plum pox and prunus necrotic ring spot viruses in vitro[J]. Acta Horticulturae,1995,386:275-279.
- [5]HUNTLEY C,HALL T C. Interference with bromemosaic virus replication in transgenic rice[J]. Molecular Plant Microbe-Interactions,1996,9:164-170.
- [6]李春敏. 利用指示植物检测核果坏死环斑病毒[J]. 河北果树,2003(4):14-15.
- [7]陈继峰,李绍华. 血清学病毒检测方法在果树上的应用[J]. 北方果树,2004(6):1-4.
- [8]刘永清,王国平. 葡萄病毒种类调查与检测技术研究[J]. 中外葡萄与葡萄酒,2004(4):27-28.
- [9]王引权. 葡萄病毒病研究进展[J]. 果树学报,2004,21(3):258-263.
- [10]ROBERT KW,GREGORY S,NEAL K, et al. Anna Rev Phytopathol[J]. Palo Alto California 2000,38:207-239.
- [11]AUNOVIC S,MAKSIMOVIC V. Virus detection of apple stem pitting in different species of pome fruits[J]. Zastita Bilja, 2001,52(235):5-18.
- [12]ERTOLINI E,OLMOS A,MARTINEZ MC, et al. Single-step multiplex RT-PCR for simultaneous and colourimetric detection of six RNA viruses in olive trees[J]. J. of Virol Methods,2001,96(1):33-41.
- [13]侯义龙,张开春,胡文玉,等. 逆转录-聚合酶链式反应技术检测果树 RNA 病毒[J]. 病毒学报,2002,18(1):71-73.
- [14]侯义龙. 采用 RT-PCR 技术检测葡萄卷叶病毒[J]. 植物保护学报,2003,30(3):305-308.
- [15]侯义龙. 苹果花叶病毒 RT-PCR 检测技术[J]. 中国果树,2004,6:5-6.
- [16]侯义龙,张开春,杨俊玲. 应用 RT-PCR 方法检测桃和樱桃及其组培苗上的 PNRSV 和 PDV[J]. 果树学报,2005,22(2):184-185.
- [17]侯义龙,杨俊玲,李春敏. 李矮缩病毒 RT-PCR 检测体系建立及应用[J]. 中国农业科学,2005(2):25-27.
- [18]DOVAS CI,KATIS NI. A spot nested RT-PCR method for the simultaneous detection of members of the Vitivirus and Fo-veavirus genera in grapevine[J]. J. of Virol. Methods,2003,170:99-106.
- [19]NIE X,SINGH RP. Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a comon cDNA primer in multi-plex RT-PCR [J]. J Virol Methods,2000,86(2):179-185.
- [20]牛建新,李东栋. 葡萄病毒病的双链 RNA(dsRNA)检测技术研究[J]. 果树学报,2002,19(3):149-152.