

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

木尔坦棉花曲叶病毒 RPA 快速检测方法的建立

汤亚飞, 李正刚, 余小漫, 于琳, 蓝国兵, 何自福*

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要 木尔坦棉花曲叶病毒 *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV) 引起的病害是世界棉花生产上的毁灭性灾害,也是我国进境植物检疫性有害生物之一。因此,建立快速检测技术对 CLCuMuV 的检疫和防控具有重要意义。本研究根据 CLCuMuV 外壳蛋白 (CP) 基因序列设计引物,建立了该病毒的重组酶聚合酶等温扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 检测方法,并评价了该方法的灵敏度和特异性,进一步测定了对田间疑似病样的检测准确性。结果表明,建立的 RPA 检测方法仅能从感染 CLCuMuV 的样品中扩增出目的条带,而感染同属的其他 5 种病毒的样品中未扩增出目的条带。该方法检测灵敏度是常规 PCR 的 10 倍,且对田间疑似病样的检出结果与 PCR 试验结果一致。因此,本研究所建立的 CLCuMuV RPA 快速检测方法具有特异、灵敏、准确、操作简便、无需特殊设备等优点,这些为 CLCuMuV 的快速检测提供了一种新技术。

关键词 木尔坦棉花曲叶病毒; RPA; 快速检测

中图分类号: S436.418 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2020677

Establishment of RPA for rapid detection of *Cotton leaf curl Multan virus*

TANG Yafei, LI Zhenggang, SHE Xiaoman, YU Lin, LAN Guobing, HE Zifu*

(Research Institute of Plant Protection, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China)

Abstract *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV) causes destructive diseases in cotton crops worldwide, which is a quarantine organism subjected to phytosanitary regulations in China. The rapid detection technique is very important for the quarantine and control of CLCuMuV. In this study, a recombinase polymerase amplification (RPA) detection method was established based on the coat protein (CP) gene sequence of CLCuMuV. The sensitivity and specificity of this method were evaluated. The accuracy of this method was determined by detecting the suspected samples in fields. The results showed that the established RPA detection method amplified the target fragment only from CLCuMuV-infected samples, and no fragment was amplified from the samples infected by other five viruses belonging to the same genus with CLCuMuV. The sensitivity of the established RPA detection method was 10-fold higher than that of the conventional PCR. The RPA detection results of suspected diseased samples in fields were consistent with the PCR results. Therefore, the rapid CLCuMuV RPA detection method was established in this study, characterized by high specificity, sensitivity, accuracy, easiness to operate, and no requirement for special equipment. It provides a new technique for rapid detection of CLCuMuV.

Key words *Cotton leaf curl Multan virus*; RPA; rapid detection

木尔坦棉花曲叶病毒 *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV) 属双生病毒科 *Geminiviridae* 菜豆金色花叶病毒属 *Begomovirus* 成员^[1],由烟粉虱 *Bemisia tabaci* 以持久方式传播,可嫁接传播,但不能通过机械摩擦和种子带毒传播。CLCuMuV 最先

发现于巴基斯坦木尔坦地区,是 20 世纪 90 年代引起巴基斯坦棉花曲叶病大流行的主要病原^[2-4]。2006 年,我国首次在广东的朱槿 *Hibiscus rosa-sinensis* 上检测到 CLCuMuV^[5]。目前,该病毒已扩散到广西^[6-7]、海南^[8]、云南^[9]、福建^[10]、江苏^[11]、新

收稿日期: 2020-12-17 修订日期: 2020-12-29

基金项目: 国家自然科学基金(31871937);广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目(2020KJ134);广州市科技计划(201904010173);广东省科技创新战略专项资金(高水平农科院建设)(R2019PY-JX005)

* 通信作者 E-mail: hezf@gdppri.com

疆等地, 侵染朱槿^[5,7,10-11]、红麻 *H. cannabinus*^[8]、黄秋葵 *Abelmoschus esculentus*^[12]、陆地棉 *Gossypium hirsutum*^[6,13]、垂花悬铃花 *Malvaviscus penduliflorus*^[14]、玫瑰茄 *H. sabdariffa*^[15] 等多种锦葵科 Malvaceae 植物。

棉花是重要的纤维作物, 在我国国民经济和社会发展中占有重要的地位。我国是世界上最大的棉花生产国和消费国。棉花曲叶病是世界棉花生产上最具毁灭性的病毒病害。虽然目前我国长江流域、黄河流域和西北内陆三大棉区尚未发生棉花曲叶病, 但能引起该病害的病原 CLCuMuV 已在我国多地危害多种锦葵科作物, 尤为重要, 华南地区已出现由该病毒侵染引起的棉花曲叶病^[6,13], 再加上其传播介体烟粉虱在我国各地普遍发生, CLCuMuV 极有可能导致棉花曲叶病在我国暴发和流行。我国在首次检测到 CLCuMuV 后, 立即将其列入中国进境植物检疫性有害生物名录, 确定作为一种检疫性病害, 依法对其实施检疫。任何植物病毒病诊断、防治和预测预报都需快速、灵敏和特异的检测方法。因此, 建立快速准确 CLCuMuV 检测技术是阻止该病毒传播与扩散的前提, 即对预警该病毒侵染引致棉花曲叶病在我国棉区暴发和流行有重要意义。

重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)是 Piepenburg 等研发出的一种等温核酸扩增技术^[16]。该技术原理是: 在恒温(25~43℃)条件下, 重组酶(recombinase)与引物核苷酸结合形成聚合体, 并促使引物与模板 DNA 序列进行配对; 在碱基序列互补配对时, 单链 DNA 结合蛋白(single strand binding protein)促使模板 DNA 打开双链; 进一步在 DNA 聚合酶(DNA polymerase)的作用下形成新的 DNA 互补链, 完成扩增反应。该技术具有简便快捷, 且不需要专门的仪器设备的优点, 被认为是目前最具有应用潜力的恒温扩增技术。樊晓旭等^[17]综述了 RPA 技术在医学病原物快速诊断中的应用, 周莹等^[18]综述了近几年 RPA 技术在植物病原物检测上的应用。但目前尚未有 RPA 技术在棉花曲叶病毒检测方面的报道。本研究建立了不需专门仪器设备、操作简便快捷的 CLCuMuV 的 RPA 检测技术, 为该病毒的检疫和快速检测提供一种新技术, 从而为预防 CLCuMuV 在我国棉花产区传播扩散、大流行提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试感染 CLCuMuV 的病样采自广东广州的

朱槿、感染台湾番茄曲叶病毒 *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTV) 的病样采自广东广州的番茄、感染番茄黄化曲叶病毒 *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) 的病样采自海南三亚的番茄、感染泰国番茄黄化曲叶病毒 *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* (TYLCTHV) 的病样采自广东汕头的番茄、感染中国南瓜曲叶病毒 *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) 的病样是采自广东河源的南瓜病样、感染黄花稔曲叶病毒 *Sida leaf curl virus* (SiLCuV) 的病样采自海南东方的番茄; 健康样品为采自本实验室网室繁殖的朱槿植株; 待测 7 份田间朱槿病样分别采自广东省广州(2 份)、茂名(2 份)、湛江(2 份)、清远(1 份)。

TwistAmp Basic RPA 试剂盒购自英国 Twist-Dx 公司, 植物 DNA 提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, Premix Taq™ 和 DNA 片段纯化试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计

通过比对 CLCuMuV 中国分离物的外壳蛋白基因核苷酸序列找出保守区域, 结合 RPA 的引物要求设计引物对 CLCV-F/CLCV-R; 同时设计用于 PCR 检测 ToLCTV、TYLCV、TYLCTHV、SLCCNV、SiLCuV 的特异引物, 引物详情见表 1。所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 总 DNA 的提取

取适量的供试植物叶片, 用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。具体操作按照试剂盒说明书进行。DNA 沉淀溶解于 50 μL TE 缓冲液, 保存于一 20℃ 冰箱, 备用。

1.2.3 RPA 反应体系及最佳反应时间

以 CLCuMuV 阳性植株总 DNA 为模板, 利用引物 CLCV-F/CLCV-R 进行 RPA 扩增。按照 TwistAmp Basic RPA 试剂盒的说明配制 RPA 反应体系, 向试剂盒中装有冻干酶粉的 0.2 mL 反应管中加入 Rehydration Buffer 29.5 μL、10 μmol/L 引物 CLCV-F 和 CLCV-R 各 2 μL、模板 DNA 2 μL、280 mmol/L 醋酸镁 2.5 μL、无 RNase 水 12 μL, 反应总体积为 50 μL。在 40℃ 恒温金属浴中分别反应 20、30、40、50、60 min; 反应结束后, 用 DNA 片段纯化试剂盒对 RPA 产物进行纯化回收, 取纯化后的 RPA 产物 10 μL 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 在凝胶成像系统上观察结果, 根据琼脂糖凝胶电泳结果确定最佳反应时间。

表 1 用于病毒检测的引物
Table 1 The primers used for detecting viruses

病毒 Virus	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence	片段大小/bp Size of fragments	退火温度/℃ Annealing temperature
木尔坦棉花曲叶病毒 CLCuMuV	CLCV-F	TATGGATGGATGAAAATATAAAGACCAGGAAT	299	54
	CLCV-R	GTATTTTCCTGCTTCCTGTTGATTGTAAAC		
番茄黄化曲叶病毒 TYLCV	Ty-F	GGATGTGAAGGCCCATGTAAAGTC	760	55
	Ty-R	ACGACATTACAGCCTCAGACTGG		
台湾番茄曲叶病毒 ToLCTV	Tw-F	GTGTCCTTCCAGTACGACTCTCACCT	774	55
	Tw-R	CATAAATGCCATTTAGTGTCCAAG		
中国南瓜曲叶病毒 SLCCNV	SL-F	GTATTAGTGATGTTACACGAGGAACCG	547	55
	SL-R	GCGTGAGTACAGGCCATATACAACATTA		
黄花稔曲叶病毒 SiLCuV	Si-F	CATCAGTTGCTGCTGCCCTTACTG	628	55
	Si-R	AGAGGCATGAGTACATGCCATG		
泰国番茄黄化曲叶病毒 TYLCTHV	TH-F	TCTCGAAAGTACGTCGCCGTCTGAAC	613	55
	TH-R	CTTCCCAGCTTCCTGGTGATTGTAA		

1.2.4 普通 PCR

以 CLCuMuV、ToLCTV、TYLCV、TYLCTHV、SLCCNV、SiLCuV 阳性植株总 DNA 为模板,分别利用表 1 中检测相应病毒的特异引物进行 PCR 扩增。模板 DNA 2 μL 、*rTaq*TM Premix 25 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物各 2 μL 、灭菌水 19 μL ,反应总体积为 50 μL 。反应条件为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 45 s,在表 1 中每种病毒的退火温度下反应 45 s,72℃ 延伸 45 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μL 进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统上观察结果。

1.2.5 灵敏度试验

以 CLCuMuV 阳性植物总 DNA 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释液为模板,分别进行 RPA 和普通 PCR 检测,比较二者的检测灵敏度。RPA 反应体系同 1.2.3,于 40℃ 恒温金属浴中温浴 40 min;普通 PCR 扩增反应体系和反应程序同 1.2.4。

1.2.6 特异性评价

分别以 CLCuMuV、ToLCTV、TYLCV、TYLCTHV、SLCCNV、SiLCuV 特异引物 PCR 检测为阳性的植物总 DNA 为模板进行 RPA 扩增,对所建立的 RPA 检测方法特异性进行评价,RPA 反应体系同 1.2.3,然后在恒温金属浴 40℃ 条件下温浴 40 min。

1.2.7 样品检测

从广东省广州、茂名、湛江、清远采集疑似感染 CLCuMuV 的朱槿病样 7 份,提取总 DNA,用本研究建立的 RPA 方法检测,并用普通 PCR 扩增验证。

2 结果与分析

2.1 RPA 最佳反应时间

以 CLCuMuV 阳性植株总 DNA 为模板,利用

引物 CLCV-F/CLCV-R 进行 RPA 扩增。电泳结果(图 1)表明,40℃ 温浴 20 min 时就可以获得目的条带,温浴 40 min 获得的目的条带最亮,随着时间延长条带亮度无明显变化。根据琼脂糖凝胶电泳结果,确定 40 min 为最佳反应时间。

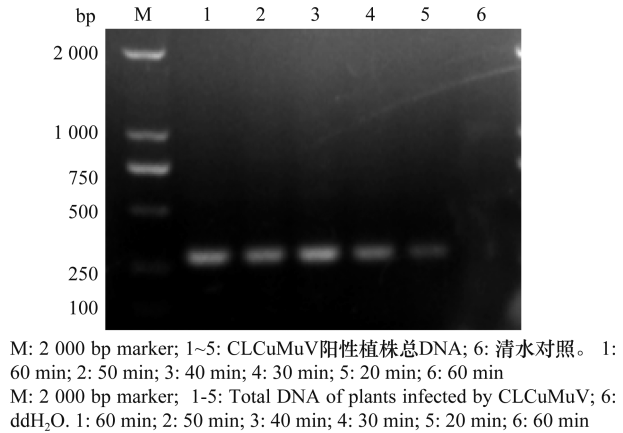


图 1 RPA 各反应时间下 CLCuMuV 扩增结果
Fig. 1 Amplification results of CLCuMuV by RPA in different reaction-time regimes

2.2 灵敏度检测结果

以稀释度分别为 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 的 CLCuMuV 阳性植株总 DNA 为模板,分别进行 RPA 和普通 PCR 检测。电泳结果(图 2)显示,RPA 在模板稀释倍数为 10⁻³ 时能扩增出目的条带,普通 PCR 在模板稀释倍数为 10⁻² 时能扩增出目的条带,因此,本研究所建立的 RPA 检测方法是普通 PCR 检测方法的 10 倍。

2.3 特异性评价结果

分别以 ToLCTV、TYLCV、TYLCTHV、SLCCNV、

SiLCuV 检测为阳性(图 3)的植物病样总 DNA 和 CLCuMuV 阳性植株总 DNA 为模板进行 RPA 扩增,对所建立的 RPA 检测方法特异性进行评价。电泳结果(图 4)显示,所建立的 RPA 检测方法只能从含有 CLCuMuV 的总 DNA 中扩增出目的条带,不能从其他几种病毒总 DNA 中扩增出任何条带。由此可见,所建立的 RPA 检测技术具有较好的特异性,可有效检测 CLCuMuV。

2.4 田间样品的检测结果

从广东省广州、茂名、湛江、清远采集疑似感染 CLCuMuV 的朱槿病样 7 份,用所建立的 RPA 扩增系统进行检测,电泳结果显示(图 5),7 份疑似病样均为阳性,进一步应用 PCR 加以验证,其检测结果与 RPA 结果的一致率为 100%,表明,所建立的 RPA 检测方法能够实现田间病样中 CLCuMuV 的快速、准确检测与诊断。

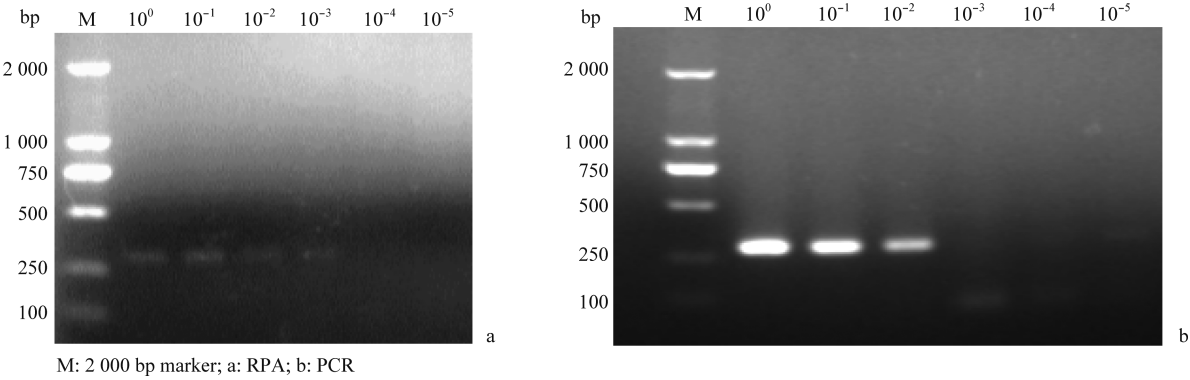
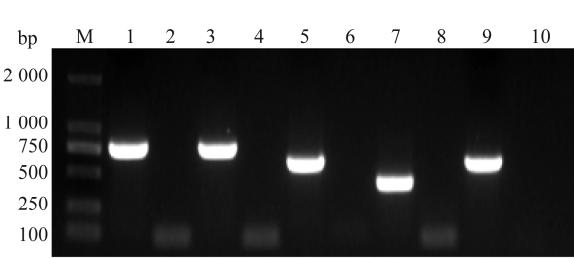
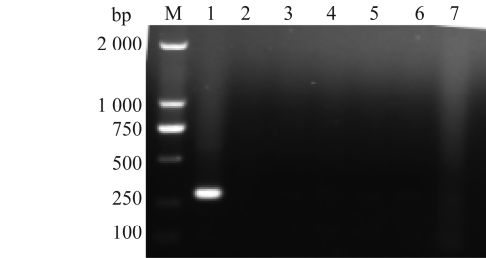
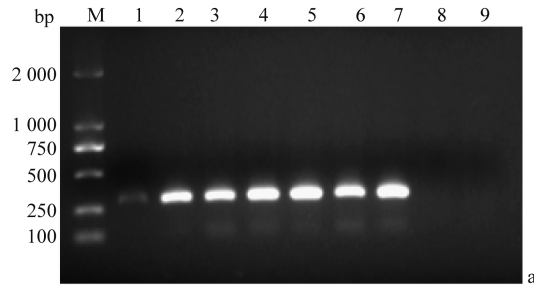


图 2 RPA 与 PCR 的灵敏度检测结果
Fig. 2 Sensitivity test results of RPA and PCR



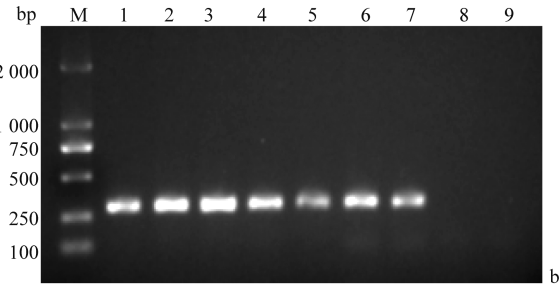
M: 2 000 bp marker; 1: 番茄黄化曲叶病毒; 3: 台湾番茄曲叶病毒; 5: 泰国番茄黄化曲叶病毒; 7: 中国南瓜曲叶病毒; 9: 黄花稔曲叶病毒; 2、4、6、8、10: 清水对照
M: 2 000 bp marker. 1: *Tomato yellow leaf curl virus*; 3: *Tomato leaf curl Taiwan virus*; 5: *Tomato yellow leaf curl Thailand virus*; 7: *Squash leaf curl China virus*; 9: *Sida leaf curl virus*; 2,4,6,8,10: ddH₂O

图 3 其他 5 种病毒的病样 PCR 检测结果
Fig. 3 PCR results of other five viruses in infected samples



M: 2 000 bp marker; 1: 木尔坦棉花曲叶病毒; 2: 台湾番茄曲叶病毒; 3: 番茄黄化曲叶病毒; 4: 泰国番茄黄化曲叶病毒; 5: 中国南瓜曲叶病毒; 6: 黄花稔曲叶病毒; 7: 阴性对照
M: 2 000 bp marker; 1: *Cotton leaf curl Multan virus*; 2: *Tomato leaf curl Taiwan virus*; 3: *Tomato yellow leaf curl virus*; 4: *Tomato yellow leaf curl Thailand virus*; 5: *Squash leaf curl China virus*; 6: *Sida leaf curl virus*; 7: Negative control

图 4 RPA 特异性检测结果
Fig. 4 Specificity test results of RPA



a: RPA; b: PCR。M: 2 000 bp marker; 1~7: 疑似病样; 8: 阴性对照; 9: 清水对照
a: RPA; b: PCR. M: 2 000 bp marker; 1-7: Suspected infected samples; 8: Negative control; 9: ddH₂O

图 5 田间病样的 RPA 和普通 PCR 检测结果
Fig. 5 Detection results of infected samples from fields by RPA and PCR

3 讨论

本研究建立了木尔坦棉花曲叶病毒快速 RPA 检测方法。与普通 PCR 检测方法相比,RPA 扩增过程中不需要热循环,可在恒温水浴锅或烘箱中进行,不依赖昂贵而专业的仪器设备;反应速度快,在适合温度条件下最短 20 min 就可以完成扩增反应;RPA 检测灵敏度是普通 PCR 的 10 倍;RPA 检测技术对引物要求比常规 PCR 严格,引物一般由 30~35 个核苷酸组成,而常规 PCR 引物长度通常为 20~25 个核苷酸。本研究根据 CLCuMuV 中国分离物的外壳蛋白基因核苷酸序列设计引物,检测与 CLCuMuV 同属的其他 5 种病毒,结果均为阴性,特异性较好。因此,本研究建立了简便、快速、灵敏和特异的 CLCuMuV 检测方法。

RPA 技术不仅具有快速、灵敏、特异等优点,而且可以在恒温条件下完成扩增,适用于实验室外的现场诊断,是目前最具有应用潜力的恒温扩增技术。自 2006 年首次报道以来,RPA 技术已取得快速发展,尤其随着商业化产品的出现,该技术在医学、食品、农业等领域得到了更为广泛的应用。近几年 RPA 技术也逐渐被应用于植物病毒的检测。目前已报道建立了番茄斑萎病毒 *Tomato spotted wilt virus* (TSWV)^[19]、番茄褪绿病毒 *Tomato chlorosis virus* (ToCV)^[20]、番茄黄化曲叶病毒 (TYLCV)^[21]、南方菜豆花叶病毒 *Southern bean mosaic virus* (SBMV)^[22]、樱桃病毒 A *Cherry virus A* (CVA)^[23]、玉米褪绿斑驳病毒 *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV)^[24]、菜豆荚斑驳病毒 *Bean pod mottle virus* (BPMV)^[25]、大豆花叶病毒 *Soybean mosaic virus* (SMV)^[26]、葡萄卷叶伴随病毒 3 号 *Grapevine leaf roll-associated virus 3* (GLRaV-3)^[27]、李矮缩病毒 *Prune dwarf virus* (PDV)^[28] 等多种植物病毒的 RPA 检测方法,但未见有 CLCuMuV RPA 检测报道。

CLCuMuV 是有可能引起我国棉花曲叶病暴发和流行的病毒,是我国进境植物检疫性有害生物,可随带毒苗木进行远距离传播。针对性加强病毒寄主苗木的检疫是防止 CLCuMuV 在我国棉花产区发生的关键。目前,用于检测 CLCuMuV 的技术主要有常规 PCR、实时荧光 PCR^[29-30]、纳米磁珠荧光 PCR^[31]。这些技术都需要专业仪器设备,只能适用于实验室快速检测。本研究建立的 CLCuMuV RPA 技术不需要专业仪器设备,适合基层单位和口

岸现场以及田间检测使用,为我国棉花曲叶病的田间诊断、预测预报和相关寄主苗木带毒快速检测提供了一种更为便捷的技术手段,具有广泛的应用前景,对我国棉花曲叶病的综合防控具有重要意义。

参考文献

- [1] BROWN J K, ZERBINI F M, NAVAS-CASTILLO J, et al. Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence comparisons [J]. *Archive of Virology*, 2015, 160(6):1593-619.
- [2] ZHOU Xueping, LIU Yule, ROBINSON D J, et al. Four DNA-A variants among Pakistani isolates of *Cotton leaf curl virus* and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra [J]. *Journal of General Virology*, 1998, 79(4): 915-923.
- [3] BRIDDON R W, MARKHAM P G. Cotton leaf curl virus disease [J]. *Virus Research*, 2000, 71(1/2): 151-159.
- [4] MANSOOR S, BRIDDON R W, BULL S E, et al. Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA β [J]. *Archives of Virology*, 2003, 148(10): 1969-1986.
- [5] 毛明杰,何自福,虞皓,等. 侵染朱槿的木尔坦棉花曲叶病毒及其卫星 DNA 全基因组结构特征[J]. *病毒学报*, 2008, 24(1): 64-68.
- [6] CAI Jianhe, XIE Ke, LIN Lin, et al. *Cotton leaf curl Multan virus* newly reported to be associated with cotton leaf curl disease in China [J]. *Plant Pathology*, 2010, 59(4): 794-795.
- [7] 林林,蔡健和,罗恩波,等. 南宁市朱槿曲叶病毒病原分子鉴定和寄主范围研究[J]. *植物保护*, 2011, 37(4): 44-47.
- [8] 汤亚飞,何自福,杜振国,等. 海南红麻曲叶病的病原检测与鉴定[J]. *植物病理学报*, 2015, 45(6): 561-568.
- [9] TANG Yafei, HE Zifu, ZHOU Guohui. *Passiflora edulis* is a new host of *Cotton leaf curl Multan virus*-betasatellite complex in China [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2020, 42(4):493-498.
- [10] 章松柏,夏喜喜,张洁,等. 福州市发生由木尔坦棉花曲叶病毒引起的朱槿曲叶病[J]. *植物保护*, 2013, 39(2):196-200.
- [11] 张晖,季英华,吴淑华,等. 江苏朱槿上分离到的木尔坦棉花曲叶病毒基因组结构特征分析[J]. *植物病理学报*, 2015, 45(4): 361-369.
- [12] 董迪,朱艳华,何自福,等. 侵染广东黄秋葵的木尔坦棉花曲叶病毒及伴随卫星 DNA 的分子特征[J]. *华南农业大学学报*, 2012, 33(1): 33-39.
- [13] 汤亚飞,何自福,杜振国,等. 木尔坦棉花曲叶病毒及其伴随的 β 卫星分子复合侵染引起广东棉花曲叶病[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(16): 3166-3175.
- [14] 汤亚飞,何自福,杜振国,等. 侵染垂花悬铃花的木尔坦棉花曲叶病毒分子特征研究[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(2): 120-127.
- [15] ARIF M, LIN Wenzhong, LIN Lihuang, et al. *Cotton leaf curl Multan virus* infecting *Hibiscus sabdariffa* in China [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2018, 40(1):128-131.

- [8] BARANIAK E, MAZURKIEWICZ A, PAŁKA K. Nowe stanowiska interesujących gatunków Microlepidoptera w Polsce [J]. Wiadomości Entomologiczne, 2001, 19(3/4): 161–168.
- [9] 武春生, 魏忠民. 中国羽蛾科(鳞翅目)昆虫的种类与分布[C]//中国昆虫学会. 当代昆虫学研究——中国昆虫学会成立 60 周年纪念大会暨学术讨论会论文集, 2004:7.
- [10] 武春生. 中国羽蛾科(鳞翅目)昆虫的寄主植物分析[C]//中国昆虫学会. 昆虫学研究进展, 2005:4.
- [11] HHA L Z. List of Chinese insects (Voi. III) [M]. Guangzhou: Sun Yat-sen University Press, 2005.
- [12] KIM S, BYUN B K, PARK K T, et al. Taxonomic study of the tribe Oidaematophorini (Lepidoptera: Pterophoridae) from Korea, with descriptions of the two new species [J]. Journal of Natural History, 2010, 44(23/24):1377–1399.
- [13] ZHANG Aaihua, LI H H. Catalogue of Eucosmini from China (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. SHILAP Revista de Lepidopterología, 2005, 33(131): 265–298.
- [14] BAE Y S, BYUN B K, KIM M S. Insect fauna of Korea (Volume 16, Number 8, Arthropoda: Insecta: Lepidoptera: Tortricidae: Olethreutinae Leafroller III) [M]. Incheon: The National Institute of Biological Resources, 2012:31–32.
- [15] 刘友樵, 李广武. 中国动物志昆虫纲 第二十七卷 鳞翅目卷蛾科[M]. 北京: 科学出版社, 2002:155.
- [16] 白九维. 白桦树上几种卷蛾幼期的研究[J]. 东北林学院学报, 1983, 11(3):57–68.
- [17] MAIER P. Vergleichende untersuchungen der biodiversität von Schmetterlingen (Lepidoptera) in den Naturschutzgebieten “Isarauen zwischen Hangenham und Moosburg” und “Freisinger Buckl” [J]. Berichte des Kreises Nürnberger Entomologen, 2005:109–137.
- [18] SVENSSON I. Anmärkningsvärda fynd av småfjärilar (Microlepidoptera) i Sverige 2008 [J]. Entomologisk Tidskrift, 2009, 130 (1): 61–72.
- [19] ZAEMDZHIKOVA G I. Ichneumon wasps (Hymenoptera: Ichneumonidae) reared from tortrix moths (Lepidoptera: Tortricidae) in oak forests in Sofia region, Bulgaria [J]. Acta Zoologica Bulgarica, 2017, 8:123–129.
- [20] 虞国跃. 北京蛾类图谱 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 184,117.
- [21] 刘雨晴, 钱硕楠, 李后魂. 中国鳞翅目小蛾类昆虫寄主植物分析[J]. 环境昆虫学报, 2019, 41(3):520–532.
- [22] 徐群玉, 李知, 吕世民, 等. 北沙参钻心虫的发生与防治[J]. 昆虫知识, 1979, 16(5):218–221.
- [23] 严吉明, 杨群芳, 叶华智, 等. 四川重要药用植物害虫种类名录[J]. 西南农业学报, 2010, 23(3):768–771.
- [24] 孙颖慧. 中国纹卷蛾族及台湾地区卷蛾科分类学研究(鳞翅目:卷蛾总科)[D]. 天津:南开大学, 2015.
- [25] 杨春清, 樊瑛. 药用植物害虫黄芩前舞蛾的初步研究[J]. 植物保护, 1992, 18(1):22–23.
- [26] 刘璐, 聂海洋. 浅谈道地药材的保护与发展——以吉林省为例[J]. 经贸实践, 2018(7):145.
- [27] 王品舒, 岳瑾, 王建泉, 等. 北京药用植物植保现状和问题及发展对策[J]. 中国植保导刊, 2017, 37(7):87–89.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 167 页)

- [16] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J/OL]. PLoS Biology, 2006, 4(7): e204. DOI:10.1371/journal.pbio.0040204.
- [17] 樊晓旭, 赵永刚, 李林, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在疾病快速检测中的研究进展[J]. 中国动物检疫, 2016, 33(8): 72–77.
- [18] 周莹, 岳瑾, 李云龙, 等. 重组酶介导的等温扩增技术及其在植物病原检测中的应用[J]. 中国植保导刊, 2020, 40(6): 27–31.
- [19] 余辛, 魏梅生, 林晓红, 等. 番茄斑萎病毒 RT-RPA 检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2020, 34(5): 46–49.
- [20] 宋建, 薛俊, 孙海波, 等. 一种基于 RPA 的番茄褪绿病毒检测方法[J]. 植物保护, 2020, 46(4): 168–170.
- [21] 周莹, 杨丽梅, 刘梅, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在番茄黄化曲叶病毒检测中的应用[J]. 中国蔬菜, 2019 (1):36–40.
- [22] 魏霜, 袁俊杰, 李桂芬, 等. 南方菜豆花叶病毒 RT-RPA 检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2018, 32(1): 50–53.
- [23] 陈玲, 段续伟, 张开春, 等. 基于重组酶聚合酶扩增(RPA)技术的樱桃病毒 A(CVA)的检测方法[J]. 园艺学报, 2020, 47 (1):1–9.
- [24] 冯黎霞, 魏霜, 余辛, 等. 重组酶聚合酶扩增技术(RPA)快速检测玉米褪绿斑驳病毒[J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 217–218.
- [25] 张永江, 魏霜, 袁俊杰, 等. 一步法逆转录重组酶聚合酶常温扩增(RT-RPA)技术检测菜豆斑驳病毒[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 96–98.
- [26] 袁俊杰, 魏霜, 龙阳, 等. 一步法逆转录重组酶聚合酶常温扩增(RT-RPA)技术检测大豆花叶病毒[J]. 检验检疫学报, 2018, 28(2): 1–4.
- [27] 张娜, 乾义柯, 魏霜, 等. 基于重组酶聚合酶扩增技术(RPA)的葡萄卷叶伴随病毒 3 号检测方法[J]. 新疆农业科学, 2016, (2): 302–308.
- [28] 陈玲, 闫国华, 张晓明, 等. 李矮缩病毒重组酶聚合酶扩增——侧流层析试纸条检测方法的建立[J]. 园艺学报, 2021, 48(1): 183–192.
- [29] 赵蕊, 吕利华, 陈婷, 等. 木尔坦棉花曲叶病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(6): 87–90.
- [30] 张卫东, 王岚, 冯宇梅, 等. 实时荧光 PCR 法特异性检测棉花曲叶病毒[J]. 广东农业科学, 2015, 42(2): 126–130.
- [31] 张永江, 李明福, 辛言言, 等. 应用纳米磁珠荧光 PCR 检测棉花曲叶病毒[J]. 棉花学报, 2013, 25(1): 90–94.

(责任编辑: 杨明丽)