



双重 DPO-RT-PCR 检测南方菜豆花叶病毒及烟草环斑病毒

魏霜¹, 袁俊杰², 杨卓瑜², 马新华², 卢乃会², 陈文³, 渭婷玉⁴, 龙阳²

(1. 广州海关技术中心, 广东 广州 510000; 2. 湛江海关技术中心, 广东 湛江 524000; 3. 湛江海关, 广东 湛江 524000; 4. 西宁海关技术中心, 青海 西宁 810000)

摘要: 南方菜豆花叶病毒及烟草环斑病毒是中国进境植物检疫性有害生物, 属于大豆种传病害, 为提高在进口大豆中两种病毒的检出率, 本研究针对 SBMV 及 TRSV 基因组中的保守序列, 分别设计特异性 DPO 引物, 建立了一种快速检测这两种植物病毒的双重 DPO-RT-PCR 方法, 并对该方法的特异性、灵敏度及退火温度敏感性等性能进行评价。结果表明: 该方法能准确地从 10 种植物病毒中鉴定出 SBMV 及 TRSV, 表现出良好的特异性, 且检测灵敏度可达 $0.02 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 退火温度为在 $45 \sim 65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时该方法检测结果无明显差异, 表现出对退火温度不敏感的特性。研究结果为进出境植物病毒的高通量检测提供了新的思路。

关键词: 南方菜豆花叶病毒; 烟草环斑病毒; 进口大豆; 种传病毒; 检测; DPO-RT-PCR

Dual Priming Oligonucleotide System for Duplex Detection of Southern Bean Mosaic Virus and Tobacco Ring Spot Virus

WEI Shuang¹, YUAN Jun-jie², YANG Zhuo-yu², MA Xin-hua², LU Nai-hui², CHEN Wen³, WEI Ting-yu⁴, LONG Yang²

(1. Guangzhou Customs Technology Center, Guangzhou 510000, China; 2. Zhanjiang Customs Technology Center, Zhanjiang 524000, China; 3. Zhanjiang Customs, Zhanjiang 524000, China; 4. Xining Customs Technology Center, Xining 810000, China)

Abstract: Southern bean mosaic virus (SBMV) and tobacco ring spot virus (TRSV) are quarantine pests in China, belonging to soybean seed-borne diseases. In order to improve the detection rate of these two viruses in imported soybeans, we designed two pairs of DPO (dual priming oligonucleotide) primers based on specific sequence of SBMV and TRSV in this research, and developed a duplex DPO-RT-PCR method for the detection of SBMV and TRSV. The method has been evaluated for its specificity, sensitivity and annealing temperature sensitivity. The result showed that this method could accurately identify SBMV and TRSV from 10 kinds of plant viruses, showing good specificity and detection sensitivity up to $0.02 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$. The detection results of this method had no significant difference at the annealing temperature of $45 - 65 \text{ }^{\circ}\text{C}$, showing the insensitivity characteristics to annealing temperature. The study provides a new method for high-throughput detection of plant pathogens.

Keywords: Southern bean mosaic virus; Tobacco ring spot virus; Imported soybean; Seed-borne virus; Detection; DPO-RT-PCR

大豆是一种重要的油料作物, 中国每年进口大量大豆用于生产加工, 据海关数据显示, 2019 年全年共进口大豆 8 551.1 万 t, 为历史第二高峰。随着大豆大量进口, 其中携带的有害生物侵入我国的风险剧增^[1-4]。其中携带的有害生物特别是大豆病害可能给我国的大豆产业带来潜在的威胁。据报道, 目前可侵染大豆的病害达 70 多种^[5], 其中南方菜豆花叶病毒 (Southern Bean Mosaic Virus, SBMV) 和烟草环斑病毒 (Tobacco Ring Spot Virus, TRSV) 属于进境植物检疫性有害生物, 可以通过大豆种子进行传播, SBMV 主要存在于大豆种子的种皮中^[6], TRSV 在大豆种子的胚中含量较高, 其种传率最高可达 100%^[7]。相对于昆虫、杂草等有害生物, 植物病毒隐蔽性强, 截获难度大, 需要扩大筛查范围才

能提高截获率。并且, 不同于菜豆荚斑驳病毒 (Bean Pod Mottle Virus, BPMV), SBMV 和 TRSV 在种子上没有明显的症状特征, 而通过种植后获取带症状叶片耗时过长, 有针对性地选择待检样品难度较大, 与口岸快速放行通关的要求不符, 需要提高检测样品数量来达到提高检出率的目的, 因此建立高通量的检测方法对防止两种病毒随进口大豆侵入我国有重要意义。

目前针对两种病毒, 口岸应用较多的检测方法主要有两大类, 一类是基于血清学技术的双抗体夹心酶联免疫吸附法 (DAS-ELISA); 另一类是基于 PCR 技术的逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)、实时荧光逆转录聚合酶链式反应 (real-time RT-PCR) 以及免疫捕捉反转录聚合酶链式反应 (IC-RT-PCR)

收稿日期: 2020-12-03

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC0809200); 海关总署科研项目 (2019HK052, 2020HK147)。

第一作者: 魏霜 (1988—), 男, 硕士, 农艺师, 主要从事病原微生物检测研究。E-mail: weishuang2008@ hotmail. com。

通讯作者: 龙阳 (1983—), 男, 硕士, 高级农艺师, 主要从事病原微生物及转基因检测研究。E-mail: 461351@ qq. com。

等检测方法^[8-9]。两类方法各有其优缺点,其中血清学方法灵敏度相对较低,准确性稍差,现行的 RT-PCR、real-time RT-PCR、IC-RT-PCR 等方法不适合对大规模样本筛查^[10]。双启动寡核苷酸引物 (Dual-Priming Oligonucleotide, DPO) 是一种新型 PCR 引物^[11],具有特异性高、引物自身及引物间难形成二级结构、引物设计简单等优点^[12]。该方法目前已经广泛应用于如大丽轮枝菌、黑白轮枝菌、向日葵白锈病菌、向日葵黑茎病菌、油菜茎基溃疡病菌和番茄斑萎病毒等植物病害检测中^[13-17]。本研究针对

SBMV 和 TRSV 的保守区域序列分别设计特异性 DPO 引物,优化反应条件后建立了 SBMV 和 TRSV 双重 DPO-RT-PCR 检测方法,为进口大豆中两种病毒的快速筛查提供了新方法,也为其它病毒的高通量检测方法提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病毒和大豆样品 供试病毒样品详见表 1,阴性样品来源于美国进口大豆。

表 1 供试病毒样品
Table 1 Virus samples for testing

| 病毒名称 Virus name | 缩写 Abbreviation | 来源 Source |
|---------------------------------------|--------------------|-----------------|
| 南方菜豆花叶病毒 Southern bean mosaic virus | SBMV | Agdia LPC 24100 |
| 烟草环斑病毒 Tobacco ring spot virus | TRSV | Agdia LPC 64001 |
| 南芥菜花叶病毒 Arabis mosaic virus | ArMV | Agdia LPC 23203 |
| 菜豆荚斑驳病毒 Bean pod mottle virus | BPMV | Agdia LPC 46400 |
| 番茄环斑病毒 Tomato ringspet virus | ToRSV | Agdia LPC 22001 |
| 花生矮化病毒 Peanut stunt virus | PSV | Agdia LPC 44600 |
| 玉米褪绿斑驳病毒 Maize chlorotic mottle virus | MCMV | Agdia LPC 17002 |
| 小麦线条花叶病毒 Wheat streak mosaic virus | WSMV | Agdia LPC 47001 |
| 玉米矮花叶病毒 Maize dwarf mosaic virus | MDMV | Agdia LPC 18000 |
| 大豆花叶病毒 Soybean mosaic virus | SMV | Agdia LPC 33300 |

1.1.2 主要仪器 Veriti PCR 仪、Nanodrop 2000 核酸蛋白分析仪,美国 Thermofisher 公司;电泳仪、Geldoc XR + 凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司。

1.1.3 主要试剂 植物总 RNA 提取试剂盒 (DP432)、FastKing 一步法 RT-PCR 试剂盒 (KR123)、Marker II DNA Marker (MD102),TIANGEN 公司;引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 使用植物总 RNA 提取试剂盒 (DP432)分别提取 10 种病毒样品及阴性大豆样品 RNA,置于 -80 ℃冰箱中备用。

1.2.2 引物设计 参考 DPO 引物设计方法和要求^[15],根据 SBMV 及 TRSV 保守序列分别设计 DPO 引物(表 2)。

表 2 引物序列
Table 2 Primer sequences

| 病毒 Virus | 引物序列(5' - 3') Primer sequence | GeneBank ID | 片段大小 Fragment size/bp |
|-------------|---|-------------|--------------------------|
| SBMV | SBMV-DPOf :GTACTGCTGCGTGTGCCAIIIIIGTGTGCTCCAA | MG344643. 1 | 609 |
| | SBMV-DPOr: CAAGGGCCTTGACCCTGCCGCHIIIGGTAGTTTAAAG | | |
| TRSV | TRSV-DPOf :GTTACGTTGTCTCTTTACTCTCHIIHATTTTAATTG | KJ556850. 1 | 1060 |
| | TRSV-DPOr :ATACCGAACAACTTCATGTTTCAGTHIIHTTAAAACGTCCAC | | |

I: 次黄嘌呤
I: Inosine

1.2.3 双重 DPO-RT-PCR 反应体系建立 按照 FastKing 一步法 RT-PCR 试剂盒(KR123)说明书建立反应体系,2 × FastKing One Step RT-PCR MasterMix 溶液 25 μL、25 × RT-PCR Enzyme Mix 2 μL、引物 (10 μmol·L⁻¹)各 1.25 μL、RNA 模板 2 μL、RNase-Free ddH₂O 调节至最终体积 50 μL。反应条件为:42 ℃ 30 min;95 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,60 ℃ 45 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 5 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像系统中成像分析。

1.2.4 双重 DPO-RT-PCR 特异性评价 以 10 个病毒样品总 RNA 和大豆 RNA 为模板,对所建立的双重 DPO-RT-PCR 反应体系的特异性进行评价。以 SBMV 和 TRSV 样品混合总 RNA 为阳性对照,以大豆 RNA 为阴性对照。

1.2.5 双重 DPO-RT-PCR 灵敏度评价 将 SBMV 及 TRSV 的总 RNA 分别用核酸蛋白分析仪标定浓度为 20 ng·μL⁻¹,再按 10 倍梯度稀释为 2,0.2,0.02 和 0.002 ng·μL⁻¹,共 5 个浓度,分别取 1 μL 作为模板检测反应体系的灵敏度。

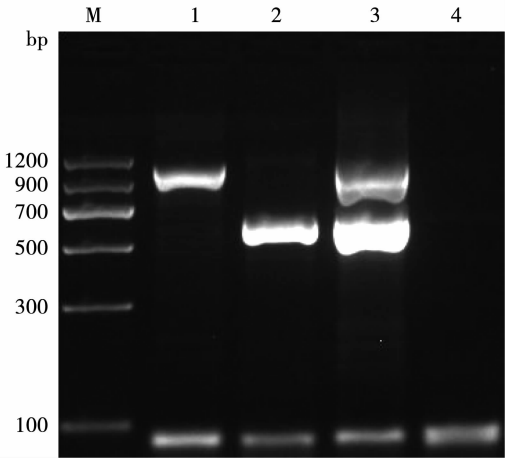
1.2.6 双重 DPO-RT-PCR 体系退火温度敏感性评价 将反应条件中的退火温度设定为 45 ~ 65 ℃,5 ℃ 为 1 个梯度,共 5 个梯度,进行 DPO-RT-PCR 扩增,评价双重 DPO-RT-PCR 体系退火温度敏感性。

2 结果与分析

2.1 双重 DPO-RT-PCR 检测方法建立

通过调整优化 DPO-RT-PCR 反应体系,确定引物终浓度为 0.2 μmol·L⁻¹时的扩增效果最佳。琼脂糖

凝胶电泳检测结果显示,分别在 609 和1 060 bp处有特异性条带,与目的片段条带一致(图 1)。结果说明本研究建立的双重 DPO-RT-PCR 可以运用于 SBMV 和 TRSV 两种病毒的检测。

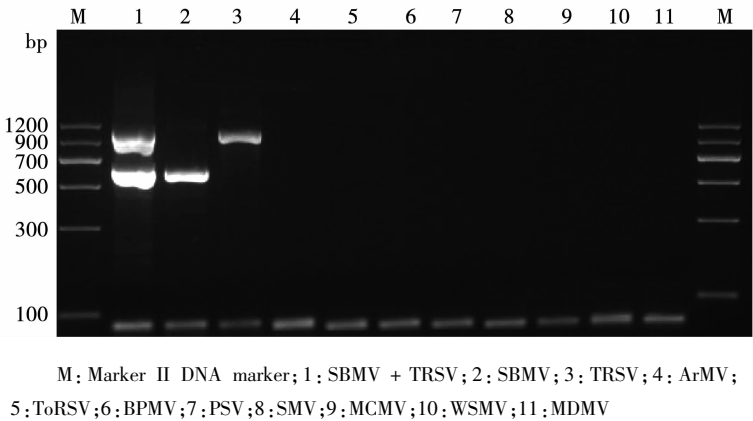


M: Marker II DNA Marker; 1: TRSV; 2: SBMV; 3: TRSV + SBMV; 4: 阴性对照
M: Marker II DNA Marker; 1: TRSV; 2: SBMV; 3: TRSV + SBMV; 4: Negative control

图 1 双重 DPO-RT-PCR 的建立
Fig. 1 Establishment of the duplex DPO-RT-PCR

2.2 双重 DPO-RT-PCR 特异性评价

如图 2 所示,含 SBMV 或 TRSV 的样品扩增获得单一目的条带,同时含 SBMV 和 TRSV 的混合样品获得 2 种目的条带,其余 8 个样品及空白对照未发生特异性扩增,表明所建立的双重 DPO-RT-PCR 检测方法具有良好的特异性,可用于 SBMV 及 TRSV 两种病毒的检测。



M: Marker II DNA marker; 1: SBMV + TRSV; 2: SBMV; 3: TRSV; 4: ArMV; 5: ToRSV; 6: BPMV; 7: PSV; 8: SMV; 9: MCMV; 10: WSMV; 11: MDMV

图 2 双重 DPO-RT-PCR 特异性评价

Fig. 2 Specific verification of the duplex DPO-RT-PCR

2.3 双重 DPO-RT-PCR 灵敏度评价

如图 3 所示,当 RNA 模板量为 0.02 ng·μL⁻¹以上时,能得到较好的扩增效果;当 RNA 模板量为 0.002 ng·μL⁻¹时,虽有扩增条带但是条带十分微弱,几近于无,肉眼很难观察。表明本研究建立的双重 DPO-RT-PCR 灵敏度至少可达 0.02 ng·μL⁻¹。

2.4 双重 DPO-RT-PCR 退火温度敏感性评价

由图 4 可知,退火温度设定为 45 ~ 65 ℃时,利用双重 DPO-RT-PCR 检测体系均能高效扩增出目的基因,退火温度对扩增结果影响不明显。表明所建立的双重 DPO-RT-PCR 检测方法退火温度范围较宽并且对退火温度不敏感。

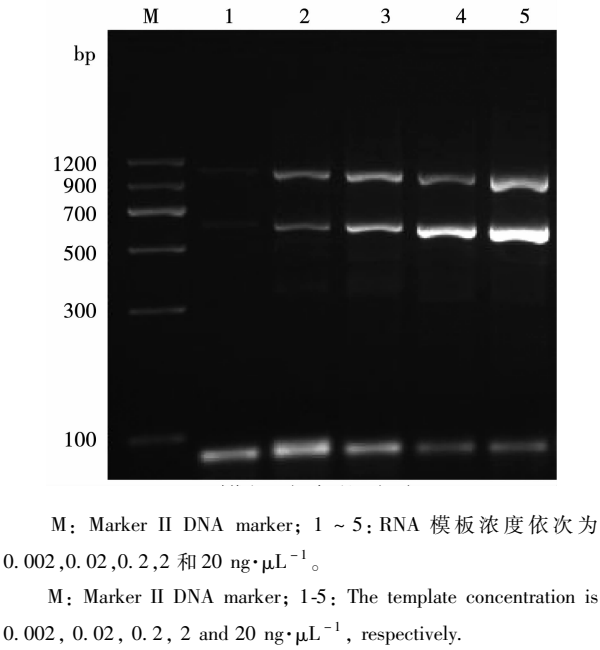


图3 双重 DPO-RT-PCR 灵敏度评价

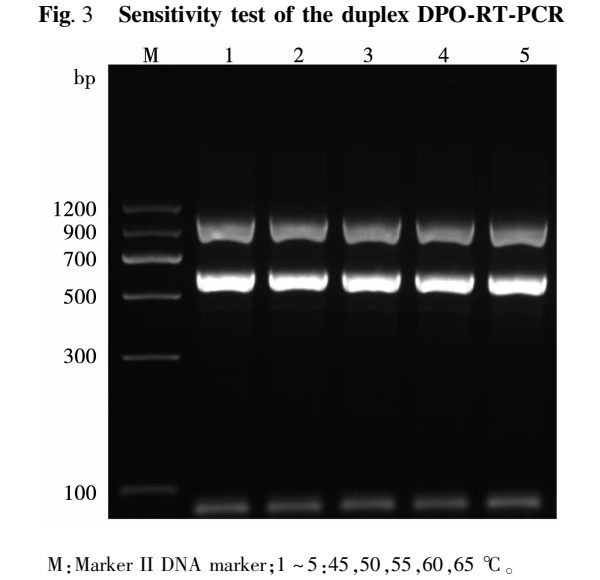


图4 双重 DPO-RT-PCR 退火温度敏感性检测

Fig.4 Sensitivity test on the annealing temperature of the duplex DPO-RT-PCR

3 讨论

SBMV 及 TRSV 作为中国进境植物检疫性有害生物备受关注,由于其可随种子远距离传播,因此需要及时检测以防止其传入我国并产生危害。各种新技术被应用于两种病毒的检测中,魏霜等^[18]根据 SBMV 的保守序列设计特异性引物,建立了用于 SBMV 检测的 RT-RPA 检测方法,灵敏度可达 0.1 ng,但该方法所需引物长,不适用于短序列核酸的检测,且结果容易产生假阴性。袁俊杰等^[19]利用添加扩增内标的 RT-RPA 检测 SMV、BPMV 和 SBMV,该方法特异性强,灵敏度可达 0.05 ng,也能有效指示 3 种病毒 RT-RPA 检测过程中的假阴性,

但是由于缺乏专用软件辅助引物探针的设计和筛选,因此较难实现多重方法的建立。郭立新等^[20]针对 SBMV、张吉红等^[21]针对 TRSV 分别建立了 RT-LAMP 检测方法,虽然具有耗时短,灵敏度高、但其对引物筛选要求较高,且容易出现假阳性结果。因此亟需建立针对两种病毒的高效新型检测方法。

传统双重 PCR 技术对退火温度要求很高,而不同实验室之间会因为仪器设备的不同而存在退火温度的差异,从而对双重 PCR 结果造成影响,容易因环境差异造成误差。DPO 引物因对退火温度不敏感的特点,能够极大地减少 PCR 反应体系摸索难度,是多重 PCR 检测体系构建的新解决方案。本研究对所建立的双重 DPO-RT-PCR 方法的退火温度敏感性进行了试验,验证其对双重 DPO-RT-PCR 检测结果的影响,结果表明 DPO-RT-PCR 对退火温度不敏感,有效避免了普通双重 PCR 易受退火温度影响的缺点,增强了该技术在不同实验室的可推广性。同时,双重 PCR 的引物设计困难,需要保证两个引物退火温度基本一致以使扩增效率一致,并且引物之间不能形成二级结构。而 DPO 引物间以及引物本身较少形成二级结构,且对退火温度不敏感,使得 DPO 引物设计更为简便,降低了双重 PCR 引物设计难度。本研究也利用这一优势建立了 SBMV 及 TRSV 的双重 DPO-RT-PCR 检测方法,但在引物筛选时应注意到的是,病毒来源多样,变异速度快,而 DPO 引物相对普通 PCR 引物更长,一般可达 24 ~ 37 个碱基^[11],因此在引物设计过程中应尽量多的收集目标基因序列,以确保所设计引物兼具种间特异性与种内通用性。

4 结论

本研究基于 SBMV 及 TRSV 的保守序列,分别设计 DPO 引物,首次建立了 SBMV 及 TRSV 的双重 DPO-RT-PCR 检测方法。该方法在 45 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度范围内,检测结果无明显差异,表现出对退火温度不敏感的特点,极大地简化了多重 PCR 反应体系,同时该方法具有特异性强、适用范围广的优点,能够满足口岸一线对两种病毒快速筛检的需求,也为植物病原物的高通量检测方法提供了新思路,具有较强的实用价值。

参考文献

[1] 陈萍, 李盼畔, 刘明航, 等. 广州南沙口岸进口大豆截获有害生物疫情分析[J]. 植物检疫, 2020, 34(1): 67-70. (Chen P, Li P P, Liu M H, et al. Analysis of pests intercepted from imported soybean in Guangzhou Nansha Port [J]. Plant

Quarantine, 2020, 34(1): 67-70.)

[2] 魏尊苗, 艾嘉亮, 尤波, 等. 黑龙江口岸进口俄罗斯大豆疫情分析与建议[J]. 植物检疫, 2018, 32(4): 78-81. (Wei Z M, Ai J L, You B, et al. Analysis of pest interception from Russia soybean in Heilongjiang ports and managment suggestion [J]. Plant Quarantine, 2018, 32(4): 78-81.)

[3] 杨卓瑜, 卢乃会, 袁俊杰, 等. 2014—2018 年湛江口岸进境大豆疫情分析与建议[J]. 植物检疫, 2020, 34(3): 80-84. (Yang Z Y, Lu N H, Yuan J J, et al. Analysis on epidemic situation of imported soybean at Zhanjiang Port and quarantine suggestions[J]. Plant Quarantine, 2020, 34(3): 80-84.)

[4] 朱煜建, 周伟光. 关注进口大豆携带杂草传带植物病害的潜在可能性[J]. 农业与技术, 2020, 40(5): 38-40. (Zhu Y J, Zhou W G. Concern about the potential of imported soybeans to carry weed-borne plant diseases[J]. Agriculture and Technology, 2020, 40(5): 38-40.)

[5] 马淑梅, 丁俊杰, 顾鑫, 等. 黑龙江省大豆主要病害发生危害调查[J]. 黑龙江农业科学, 2005(6): 48-52. (Ma S M, Ding J J, Gu X, et al. Survey on the occurrence and damage in main disease of soybean in Heilongjiang Province [J]. Heilongjiang Agrcultrual Sciences, 2005(6): 48-52.)

[6] 谷建夫, 范晓红, 陈建宏, 等. 南方菜豆花叶病毒在大豆种子中的分布特点与检疫的关系[J]. 天津农林科技, 1998(1): 3-5. (Gu J F, Fan X H, Chen J H, et al. The relationship between quarantine and distribution characteristics of mosaic virus in soybean seeds[J]. Science and Technology of Tianjin Agriculture and Forestry, 1998(1): 3-5.)

[7] 黄江华, 陈秀菊, 彭仁, 等. 烟草环斑病毒研究进展[J]. 现代农业科学, 2008(1): 24-27. (Huang J H, Chen X J, Peng R, et al. Research advance in tobacco ringspot virus[J]. Modern Agricultural Sciences, 2008(1): 24-27.)

[8] 国家质量监督检验检疫总局. SN/T 3438-2012, 南方菜豆花叶病毒检疫鉴定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. SN/T 3438-2012, Detection and identification of southern bean mosaic virus [S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.)

[9] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 28081-2011, 烟草环斑病毒检疫鉴定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine. GB/T 28081-2011, Detection and identification of tobacco ringspot virus[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.)

[10] 王亚琴, 田沂民, 于翠, 等. 基于单克隆抗体的南方菜豆花叶病毒血清学检测技术[J]. 植物保护学报, 2020, 47(2): 347-354. (Wang Y Q, Tian Y M, Yu C, et al. Monoclonal antibody-based serological technology for southern bean mosaic virus detection [J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47 (2): 347-354.)

[11] Chun J Y, Kim K J, Hwang I T, et al. Dual priming oligonucleotide system for the duplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of *CYP2C19* gene[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(6): e40.

[12] 苏琰, 李融, 黎华. 基于双启动寡聚核苷酸引物的 PCR 技术及其研究应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(7): 2906-2912. (Su Y, Li R, Li H. Research and application of PCR technique based on dual priming oligonucleotide primers[J]. Genomics and Applied Biology, 2018, 37(7): 2906-2912.)

[13] 魏霜, 马新华, 汪天杰, 等. 双重 DPO-PCR 检测副溶血弧菌和霍乱弧菌[J]. 食品工业科技, 2016, 37(22): 80-83. (Wei S, Ma X H, Wang T J, et al. Multiplex DPO-PCR for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2016, 37 (22): 80-83.)

[14] 张娜, 乾义柯, 魏霜, 等. 两种向日葵检疫性真菌病害的双重 DPO-PCR 检测方法[J]. 植物检疫, 2015, 29(6): 35-38. (Zhang N, Qian Y K, Wei S, et al. Multiplex DPO-PCR detection of two quarantine fungal diseases of sunflower[J]. Plant Quarantine, 2015, 29(6): 35-38.)

[15] 乾义柯, 张娜, 魏霜, 等. 向日葵萎黄病病原菌轮枝菌的双重 DPO-PCR 检测方法[J]. 植物保护学报, 2017, 44(1): 115-120. (Qian Y K, Zhang N, Wei S, et al. Multiplex DPO-PCR detection of *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum* from sunflower *Verticillium* wilt[J]. Journal of Plant Protection, 2017, 44(1): 115-120.)

[16] 刘忠梅, 罗佳, 潘仲乐, 等. 应用 DPO 技术检测番茄斑萎病毒方法的建立[J]. 河南农业科学, 2017, 46(11): 93-97. (Liu Z M, Luo J, Pan Z L, et al. Development of DPO-PCR detection method for tomato spotted wilt virus [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2017, 46(11): 93-97.)

[17] 龙阳, 袁俊杰, 候翠丽, 等. 油菜茎基溃疡病菌 DPO-PCR 检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2017, 31(4): 42-45. (Long Y, Yuan J J, Hou C L, et al. Development of DPO-PCR method for the detection of *Leptosphaeria maculans*[J]. Plant Quarantine, 2017, 31(4): 42-45.)

[18] 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. (Wei S, Yuan J J, Li G F, et al. One-step Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification (RT-RPA) for the detection of southern bean mosaic virus[J]. Plant Quarantine, 2018, 32(1): 50-53.)

[19] 袁俊杰, 龙阳, 渭婷玉, 等. 添加扩增内标的逆转录重组酶聚合酶扩增技术检测三种大豆病毒[J]. 农业生物技术学报, 2020, 28(12): 2261-2269. (Yuan J J, Long Y, Wei T Y, et al. Application of RT-RPA technology included with IAC in the detection of soybean three viruses [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2020, 28(12): 2261-2269.)

[20] 郭立新, 段维军, 徐亚飞, 等. 逆转录环介导等温扩增技术检测南方菜豆花叶病毒[J]. 植物病理学报, 2014, 44(4): 349-356. (Guo L X, Duan W J, Xu Y F, et al. Detection of southern bean mosaic virus by the reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44 (4): 349-356.)

[21] 张吉红, 陈先锋, 孙辉. 逆转录环介导等温扩增技术检测烟草环斑病毒的研究[J]. 植物病理学报, 2014, 44(6): 629-633. (Zhang J H, Chen X F, Sun H. Research on detection of tobacco ringspot virus by RT-LAMP [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44(6): 629-633.)