

齿兰环斑病毒 RT-RPA 荧光实时检测体系的构建与应用

吴洁秋, 庄华才, 谭志勇, 李早文, 范俊强, 傅海平, 徐 匆*

东莞市农业科学研究中心, 广东东莞 523000

摘 要: 齿兰环斑病毒 (Odontoglossum ringspot virus, ORSV) 是危害兰花的主要致病病毒之一, 该病毒导致兰花叶片黄化、出现斑块, 花朵畸形, 对兰花的观赏性和商业价值影响极大。为实现 ORSV 的早期快速检测, 本研究根据 GenBank 数据库中兰花齿兰环斑病毒外壳蛋白 cp 基因的保守区域设计、筛选 RT-RPA 引物和探针, 优化扩增条件, 建立基于 RPA 的 ORSV 快速检测技术; 对 RT-RPA 特异性和灵敏性进行测定, 并通过开展田间样品检测试验, 以验证该检测技术在生产上的应用可行性。结果表明: RT-RPA 的最佳扩增引物组合为 F1/R1, 荧光探针为 P1, 最佳扩增温度为 41 °C, 扩增时间为 20 min; 特异性良好, 对建兰花叶病毒、黄瓜花叶病毒无交叉反应; 灵敏度较高, ORSV 核酸最低检测浓度达到 2.8×10^{-5} ng/ μ L。田间样品检测中, 采用齿兰环斑病毒为阳性对照, ddH₂O 为阴性对照, 20 份蝴蝶兰样本均检出 ORSV, 与 TaqMan 探针 RT-qPCR (real time quantitative PCR) 检测结果一致。本研究建立的 ORSV RT-RPA 荧光实时检测技术, 具有快速、灵敏、准确和简便的优点, 且适用于田间样品检测, 为兰花病害预防、切断感染源和控制 ORSV 的传播提供有效方法, 有助于兰花产业的健康发展。

关键词: 兰花; 齿兰环斑病毒; 反转录-重组酶聚合酶扩增 (RT-RPA); 检测

中图分类号: S436.8 文献标志码: A

Construction and Application of RT-RPA Fluorescence Real-time Detection System for Odontoglossum Ringspot Virus

WU Jieqiu, ZHUANG Huacai, TAN Zhiyong, LI Zaowen, FAN Junqiang, FU Haiping, XU Cong*

Dongguan Agricultural Science Research Center, Dongguan, Guangdong 523000, China

Abstract: Odontoglossum ringspot virus (ORSV), one of the major pathogens affecting orchids, seriously degrade the ornamental and economic value of orchids by causing leaf chlorosis, mottling, and floral deformities. To enable early-stage diagnosis, this study developed a rapid reverse transcription-recombinase polymerase amplification (RT-RPA) assay targeting ORSV. Primers and a fluorescent probe were designed based on conserved regions of the ORSV coat protein (CP) gene. Specificity, sensitivity and field applicability of the assay were systematically validated in this study. Results identified F1/R1 as the optimal primer pair, enabling amplification within 20 minutes at 41 °C. The method exhibited high specificity, distinguishing ORSV from Cymbidium mosaic virus and Cucumber mosaic virus, and achieved a detection limit of 2.8×10^{-5} ng/ μ L total RNA. Practical verification result of 20 *Phalaenopsis* field samples showed 100% concordance with TaqMan qPCR results. The RT-RPA assay would provide a rapid, sensitive, and field-deployable tool for ORSV surveillance, supporting timely disease management and sustainable orchid cultivation. Its simplicity and reliability make it particularly valuable for large-scale screening in industrial orchid production systems.

Keywords: Orchidaceae; Odontoglossum ringspot virus (ORSV); reverse transcription-recombinase polymerase amplification (RT-RPA); detection

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.07.021

收稿日期 2025-02-25; 接受日期 2025-03-25

基金项目 2022 年度广东省基础与应用基础研究基金 (区域联合基金) 项目 (No. 2022A1515140182)。

作者简介 吴洁秋 (1991—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 观赏植物。*通信作者 (Corresponding author): 徐 匆 (XU Cong), E-mail: 10306967@qq.com。

兰科 (Orchidaceae) 植物, 也称兰花 (orchid), 是物种最丰富的植物之一, 大约有 30 000 种, 其花朵美丽独特、颜色鲜艳, 芳香四散, 受到世界各地人们的喜爱, 是国际花卉市场的热销花卉之一^[1-2]。除经济效益外, 兰花还有生态、观赏、药用、美学和文化等诸多价值, 广泛用于食品、医药、化妆品、饮料、传统工艺等领域^[3-4]。然而, 兰花在栽植过程中遭受病虫等危害, 尤其是病毒侵染引起的种质退化、产量和质量下降已经成为兰花生产的一个棘手问题, 目前尚无有效的防治措施, 一旦感染病毒病则会造成很大的经济损失。目前, 全球兰花病毒大约有 57 种^[5], 齿兰环斑病毒 (Odontoglossum ringspot virus, ORSV) 作为兰花的主要致病病毒之一, 对兰花的影响广泛, 危害严重。ORSV 基因组是正义单链 RNA 病毒, 全长 6618 bp^[6-7], 为烟草花叶病毒属 (*Tobamovirus*), 病毒颗粒直杆状, 大小约 300 nm×18 nm^[7-8]。ORSV 一般通过机械传播, 主要寄生在兰花中, 但不同兰属 (种) 感染病毒后症状表现不一, 有的兰株无明显症状, 难以发现, 有的植株叶片有黄化条纹或褪绿斑块、坏死斑、黑斑等, 还有些花朵呈现褪色斑、畸形等症状, 从而导致寄主植株观赏性差甚至死亡^[6, 9-15]。目前, 市场上尚无能彻底清除兰花病毒病病原体的有效药剂, 因此, 通过及时开展病毒检测, 隔离和清除病株, 预防传播, 获取脱毒种苗, 对提高兰花产品质量, 减少经济损失具有重要意义。

目前检测 ORSV 的技术有自然接种形态学^[16]和电镜鉴定^[8, 17]、血清学鉴定^[9, 17-23]及逆转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法^[13, 15, 22-27]、实时荧光定量 PCR 法^[12, 28-30]、逆转录环介导等温扩增 (RT-LAMP)^[31-33]等分子生物学技术。RT-PCR、荧光定量 PCR 等分子检测技术能准确检测病毒, 灵敏性高, 但实验操作不够简捷, 如非恒温热循环扩增、逆转录和扩增需单独开展等^[34], PCR 反应时间需约 90 min 以上^[35-37], 耗时较长; RT-LAMP 技术操作简单、成本低, 但是引物设计复杂, 灵敏性过高容易产生假阳性^[38-39]。PIEPENBURG 等^[40]开发的重组酶聚合酶扩增 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是一种恒温核酸体外扩增技术, 在 37~42 °C 恒温条件下, 重组酶、单链结合蛋白和 DNA 聚合酶联合作用促使 DNA 指数级扩增, 通过凝胶电泳、侧向流动试纸、实时荧光定量 PCR 仪等手段将检测结果可视化, 该方

法快速简便, 反应迅速 (5~20 min), 灵敏性高^[41]。目前已应用于大麦黄矮病毒 GAV (Barley yellow dwarf viruses-GAV, BYDV-GAV)^[38]、菊花 B 病毒 (Chrysanthemum virus B, CVB) 和番茄不孕病毒 (Tomato aspermy virus, TAV)^[42]、柑橘衰退病毒 (Citrus tristeza virus, CTV)^[41]、凤仙花坏死斑病毒 (Impatiens necrotic spot virus, INSV)^[36]等多种病毒的检测。采用 RAP 检测 ORSV 的相关报道较少, SUN 等^[43]以 ORSV cDNA 和质粒为模板进行 RPA 扩增, 通过琼脂糖凝胶电泳检测产物, 建立了 RT-RPA 检测系统。国内尚无相关文献报道。

本研究以 ORSV 外壳蛋白 (coat protein, cp) 基因序列保守区域为靶靶设计 RT-RPA 特异性扩增引物和荧光探针, 优化试验条件, 构建稳定的逆转录-聚合酶指数扩增 (reverse transcription-recombinase polymerase amplification, RT-RPA) 荧光实时检测 ORSV 的方法, 并开展田间样品检测。该方法能够在 30 min 内有效检测出齿兰环斑病毒, 达到快速、灵敏、准确和简便的效果, 实现“一步法”检测 ORSV, 为兰花病害检测和防治提供新的有效方法。

1 材料与方法

1.1 材料

齿兰环斑病毒 (ORSV)、建兰花叶病毒 (Cymbidium mosaic virus, CymMV)、黄瓜花叶病毒 (Cucumber mosaic virus, CMV) 购自美国 Agdia 公司。从花卉市场购买 20 株蝴蝶兰, 采集叶片进行 ORSV 田间检测。

RNA 恒温快速扩增试剂盒 (荧光型) 购自安普未来生物有限公司, SteadyPure Virus DNA/RNA Extraction Kit 购自艾瑞科生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RT-RPA 扩增引物和探针设计 从 GenBank 数据库中搜索齿兰环斑病毒基因序列, 进行对比分析找到保守区域, 并在 NCBI 上设计上游引物 (F1、F2、F3)、下游引物 (R1、R2、R3) 各 3 条以及 1 条荧光探针 (P1), 引物序列见表 1。引物和探针由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2.2 RT-RPA 荧光检测体系优化及引物筛选 以齿兰环斑病毒 RNA 为模板, 使用上游引物 F3 分别与下游引物 R1、R2、R3 配对, 加入荧光探

表 1 齿兰环斑病毒扩增引物序列
Tab. 1 Sequence of primers for amplification of ORSV

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')	GenBank 登录号 GenBank No.	用途 Purpose
F1	GAGAAAGTCATCGTATTACTCGAATGGGCT	X82130.1/NC001728.1/AY571290.1/ S83257.1/DQ139262.1/KF855954.1/ LC381916.1/MW316660.1/MW248355.1/ AY571290/AY376394/AF033848/AJ 429094	RT-RPA 荧光实时检测
F2	GGATAAATGTCACGCTTGGGGTGTGCGCA		
F3	TACACAGGTCCTCAAGTTCAACAGATG		
R1	CAACCAAGAACGCCATCTACTAACGTGACT		
R2	TTTCCACAACCAAGAACGCCATCTACTAAC		
R3	TTGTTGCTCTTACATGTCCAGACTTATTAG		
P1	CTATTTGTGGTGATTGGCGACGAGTGGCCG(FAM-dt) (THF)(BHQ-1-dt)CTTCAGATTCCCTT-C3-Spacer		
ORSV TF	GGGCTGACCCCAATTCACTA		TaqMan 探针 RT-qPCR
ORSV TR	ATCAGCAAAGTGC TGTGAACAG		
ORSV 探针	FAM-ACCAATTCTCTGGGTAATCAGTTCCA-Eclipse		

针 P1，进行扩增检测，根据扩增曲线情况筛选出最佳下游引物 R_n 。然后将下游引物 R_n 分别与上游引物 F1、F2、F3 组合，加入荧光探针 P1 进行第 2 次 RT-RPA，筛选出最佳上游引物 F_n ，进而确定最佳引物组合作为后续检测引物。

RT-RPA 荧光检测反应体系（50 μL ）：A 为 29.4 μL buffer，B 为 2.5 μL buffer，上下游引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）各 2 μL ，荧光探针（10 $\mu\text{mol/L}$ ）0.6 μL ，模板 RNA 1 μL ，ddH₂O 12.5 μL 。反应程序：41 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 20 min，每 30 s 收集 1 次荧光信号，在 QuantStudio1 实时荧光定量 PCR 仪（Thermo scientific，美国）中，41 $^{\circ}\text{C}$ 恒温扩增 30 s，40 个循环。

1.2.3 引物特异性检测 以齿兰环斑病毒、建兰花叶病毒和黄瓜花叶病毒 RNA 为模板，ddH₂O 为阴性对照，进行扩增检测，评估其特异性。反应体系、条件和程序同 1.2.2。

1.2.4 引物灵敏性检测 对齿兰环斑病毒 RNA 以 10 倍梯度（ 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 ）进行稀释，以上述稀释液为模板进行扩增，然后基于实时荧光定量 PCR 数据解析扩增曲线，评估灵敏度。反应体系、条件和程序同 1.2.2。

1.2.5 兰花叶片总 RNA 提取 称取蝴蝶兰嫩叶 100 mg，加入液氮研磨成粉末状，按照 SteadyPure Virus DNA/RNA Extraction Kit 试剂盒说明书，并根据实际情况作适当修改。抽取总 RNA，经 NanoDrop Life 超微量分光光度计（Thermo Scientific）测定和调整浓度后，置于 -80°C 保存，备用。

1.2.6 兰花齿兰环斑病毒田间检测 随机抽取 20 个蝴蝶兰叶片样品 RNA 为模板，以齿兰环斑病毒 RNA 为阳性对照，ddH₂O 为阴性对照（NC），按照所建立的 RT-RPA 荧光检测体系和 TaqMan 探针 RT-qPCR 法进行检测，分析 RT-RPA 荧光检测法对田间样品的适用性。RT-RPA 荧光检测方法同 1.2.2。

TaqMan 探针 RT-qPCR 法检测 ORSV 采用 Luna[®]通用探针一步法 RT-qPCR 试剂盒（manual-E3006, New England Biolabs, USA），扩增引物（ORSV TF 和 ORSV TR）和探针（ORSV 探针）序列从文献[44]获得（表 1），送生工生物工程（上海）股份有限公司合成。20 μL 扩增体系：Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2 $\times$) 10 μL ，Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20 $\times$) 1 μL ，上下游引物（10 $\mu\text{mol/L}$ ）各 0.8 μL ，荧光探针 0.4 μL ，模板 RNA 1 μL ，ddH₂O 6 μL 。反应条件：55 $^{\circ}\text{C}$ 反转录 10 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min；95 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s；60 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s，40 个循环。

2 结果与分析

2.1 RT-RPA 荧光检测体系优化及引物筛选

采用齿兰环斑病毒 RNA 作为模板，以 F3 为上游引物，分别与下游引物 R1、R2、R3 组合反应，结果如图 1A 所示，F3/R1 引物组合的扩增曲线荧光起峰时间最早，信号响应值最大，其次为 F3/R2 引物组合，F3/R3 引物组合荧光信号相对较弱。

进一步以 R1 为下游引物，筛选最佳上游引物。结果如图 1B 所示，F1/R1 引物组合的扩增曲

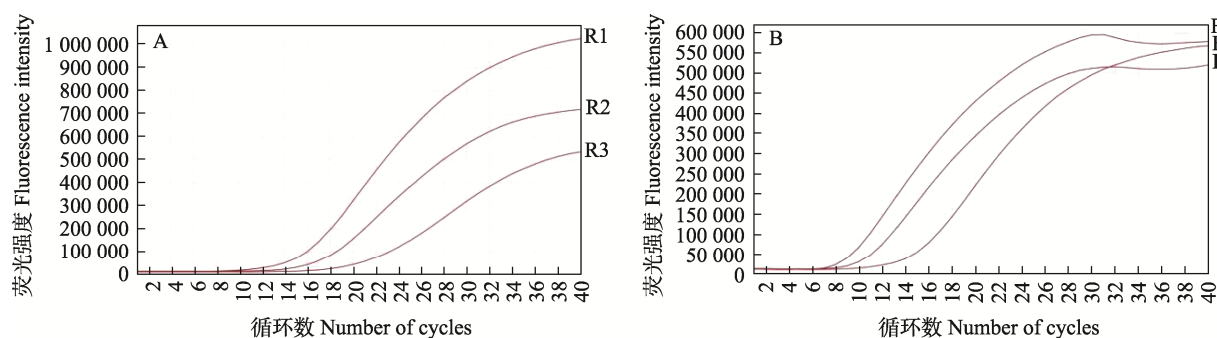


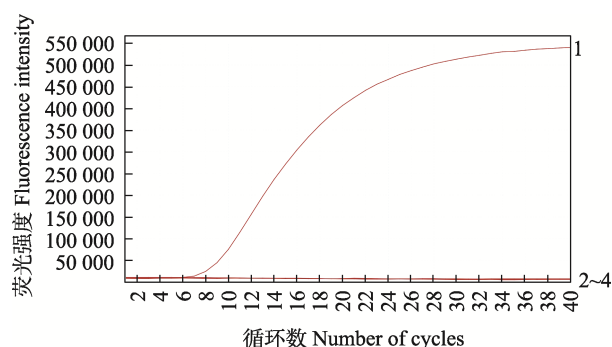
图 1 齿兰环斑病毒 RT-RPA 荧光检测体系扩增引物筛选曲线

Fig. 1 Amplification primer screening curve of RT-RPA fluorescence detection system of ORSV

线荧光信号最强,强度响应值高于 F2/R1 和 F3/R1 引物组合。F2/R1 引物组合的荧光起峰时间晚于 F3/R1,但 F2/R1 引物组合的荧光强度响应值高于 F3/R1。综上,RT-RPA 荧光检测体系扩增的最佳温度为 41 °C,扩增时间为 20 min。选择 F1/R1 引物组合以及荧光探针 P1 进行后续测试。

2.2 RT-RPA 荧光检测体系特异性分析

采用 ORSV、CymMV 及 CMV 3 种不同病毒 RNA 为模板,以 ddH₂O 为阴性对照,按照优化的 RT-RPA 荧光检测体系分析扩增特异性。结果如图 2 所示,以 ORSV 为模板的 RT-RPA 扩增线型及荧光信号强度响应值显著,而 CymMV、CMV 以及 ddH₂O 所在的扩增曲线未见起峰。结果表明,优化的 RT-RPA 荧光检测体系及其扩增引物组合 F1/R1 和荧光探针 P1 与其他病原体无明显交叉反应,能特异性检测出 ORSV。



1: ORSV; 2: CymMV; 3: CMV; 4: ddH₂O.

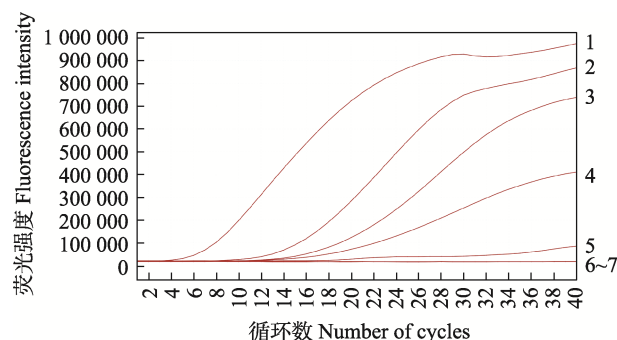
图 2 RT-RPA 荧光检测体系特异性分析曲线

Fig. 2 Specific analysis curve of RT-RPA fluorescence detection system

2.3 RT-RPA 荧光检测体系灵敏性分析

以 10 倍梯度稀释的齿兰环斑病毒 RNA 为模板,分别进行 RT-RPA 荧光实时检测。扩增结果如图 3 所示,稀释 10¹~10⁵ 倍的 ORSV 在反应中

均产生荧光信号,其中稀释 10 倍的 ORSV 扩增曲线峰值最高,稀释 10⁵ 倍的 ORSV 峰值最低,而稀释 10⁶ 和 10⁷ 倍的 ORSV 扩增信号接近 0。说明利用 RT-RPA 检测的齿兰环斑病毒 RNA 浓度最低为 2.8×10⁻⁵ ng/μL。



1~7 分别代表以 10 倍梯度稀释病毒 RNA 模板,即 10¹ (2.8×10⁻¹ ng/μL)、10²、10³、10⁴、10⁵、10⁶、10⁷。

1~7 represent a 10-fold gradient dilution of viral RNA templates including 10¹ (2.8×10⁻¹ ng/μL), 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷.

图 3 RT-RPA 荧光检测体系灵敏性分析曲线

Fig. 3 Sensitivity analysis curve of RT-RPA fluorescence detection system

2.4 RT-RPA 荧光检测体系田间样品检测

以 20 份蝴蝶兰叶片总 RNA 为模板,分别进行 RT-RPA 扩增。田间样品检测结果如图 4A 所示,22 条扩增曲线中,除阴性对照 ddH₂O (NC) 无荧光信号外,阳性对照 ORSV 和 20 份样本均有阳性扩增,荧光信号强度响应值良好。利用该批样品进行 TaqMan 探针 RT-qPCR 检测 (图 4B),分析溶解曲线可知,ORSV 阳性对照及 20 份田间样品的 C_t 值在 13~23 之间,ΔRn (荧光强度) > 1,ORSV 基因阳性扩增明显,而 ddH₂O 的 C_t 值为 35,ΔRn < 1,无扩增。2 种检测方法结果一致,表明 RT-RPA 荧光实时检测技术能准确检测 ORSV,具有较高的可靠性。

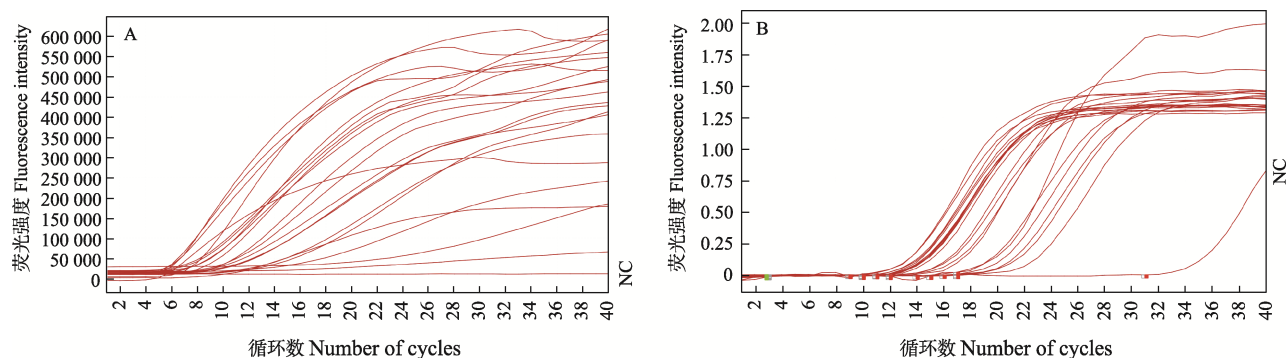


图 4 ORSV 田间样品 RT-RPA 荧光检测 (A) 和 TaqMan 探针 RT-qPCR 扩增 (B) 曲线

Fig. 4 ORSV field sample RT-RPA fluorescence detection (A) and TaqMan probe RT-qPCR amplification (B)

3 讨论

兰科植物花朵美丽、颜色鲜艳、香气宜人，全身均可入药养生，具有极大的观赏和经济价值，然而随着兰花进出口贸易的发展，病虫害传播也愈加严重，尤其病害，严重降低了其价值，造成很大的经济损失。ORSV 是危害兰科植物的重要病毒病原之一，以兰花为主要自然宿主，在兰花中广为流行，造成病株叶片黄化、产生斑块，花朵畸形，部分兰株症状不明显致使潜伏病毒交叉感染，导致兰花品质不佳甚至死亡^[9, 15, 18]。ORSV 的早期检测有利于及时采取防治措施，减少 ORSV 为害和传播，对提高兰花产品质量、种质保存尤为重要。

目前应对兰花病毒病的手段主要是通过早期检测、销毁和隔离病原，做好预防措施。近年来采用的 PCR、RT-LAMP 等检测技术耗时较长，要求较高，操作复杂，虽然灵敏性高，但假阳性机率也高^[38]。而 RT-RPA 在恒温条件下，反应体系的逆转录酶以 RNA 为模板直接合成 cDNA 第 1 链后进行重组酶扩增反应，反应迅速、灵敏，特异性高^[39, 42]，已被应用于多种病原体的检测。本研究优化、建立了检测齿兰环斑病毒的 RT-RPA 荧光实时检测方法，能在 30 min 内有效检出齿兰环斑病毒，具有良好的特异性、高效性和灵敏性，成本低、操作简便等优点，为 ORSV 检测提供一种更加方便快捷的方法。

RT-RPA 引物设计简单，利用 PrimerPremier 等常用设计软件即可获得合适的核酸扩增引物^[45]，谢锦^[46]设计的 3 种病原体各 4 对（共 12 对）引物均可扩增出条带。张艺林等^[38]指出，植物 RNA 病毒检测以总 RNA（含有大量 RNA 链）为模板，但其引物设计是以病毒基因序列为模板，难以估

测其他序列对扩增产生的影响，因此，在 RT-RPA 引物设计时，可尝试增加引物数量，通过 RT-RPA 反应筛选最优的引物组。本研究设计了 3 对 RT-RPA 扩增引物和 1 条荧光探针，首先用上游引物 F1 筛选到最佳下游引物 R1，进而使用 R1 筛选上游引物，各组合均具有良好的扩增效果，2 次 RT-RPA 扩增结果一致，确定 F1/R1 为最佳引物组合。采用该引物组合和探针的 RT-RPA 荧光实时检测体系对 ORSV 具有良好的特异性，与 CymMV 和 CMV 无明显交叉反应。

高灵敏性的病毒检测方法有助于病原体的早期检测。通过对柑橘衰退病毒^[41]、凤仙花坏死斑病毒^[36]、蝴蝶兰尼润潜隐病毒^[47]、梨树苹果褪绿叶斑病毒^[48]、鱼类弗氏柠檬酸杆菌^[49]等研究发现，RPA 的灵敏性约为 PCR 反应的 100~1000 倍。采用 RT-RPA-LED 在柑橘中最低可检测到 2.12×10^1 copies/ μ L 柑橘衰退病毒^[41]，而 RT-RPA-CRISPR/Cas12a 技术对蝴蝶兰尼润潜隐病毒的检测浓度最低可达到 10 zg/ μ L^[47]。本研究设计的 RT-RPA 扩增引物组合 F1/R1 的 RNA 浓度最低检测下限为 2.8×10^{-5} ng/ μ L。这些研究结果均表明 RT-RPA 技术具有较高的特异性和灵敏性，但 RT-RPA 灵敏度在不同的病原体、植物宿主及可视化方法中存在一定差异，这有待进一步深入研究比较。采用本研究建立的 RT-RPA 检测技术在随机抽取的 20 份蝴蝶兰样本中均检测到 ORSV，检出率达到 100%。表明齿兰环斑病毒是兰花的流行病原体之一，早期病毒检测对病害防控意义重大。

本研究建立了 RT-RPA 荧光实时检测齿兰环斑病毒的方法，田间样品均能检测到 ORSV，这与 TaqMan 探针 RT-qPCR 法检测田间样品 ORSV

获得的结果一致。RT-RPA 荧光实时检测方法稳定可靠, 灵敏性高, 操作简单, 耗时短, RNA 逆转录与 RPA 扩增在同一体系和条件下完成, 实现 ORSV “一步法”快速检测。相对于常规 RT-PCR 技术, RT-RPA 荧光实时检测方法能够快速精准检测田间样品, 有助于及时消除病源, 极大降低 ORSV 的传播扩散, 在齿兰环斑病毒早期快速检测中具有广泛的应用前景。

参考文献

- [1] MADRIGAL Y, ALZATE J F, PABÓN-MORA N. Evolution of major flowering pathway integrators in Orchidaceae[J]. *Plant Reproduction*, 2024, 37: 85-109.
- [2] WEI Y L, JIN J P, LIN Z Y, LU C Q, GAO J, LI J, XIE Q, ZHU W, ZHU G F, YANG F X. Genome-wide identification, expression, and molecular characterization of the constans-like gene family in seven orchid species[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(23): 16825.
- [3] HEW C S, WONG Y S. History of Chinese *Cymbidium*[M]. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2022.
- [4] TIAN G G, WANG W, XIA E R, CHEN W H, ZHANG S Z. *Dendrobium officinale* alleviates high-fat diet-induced non-alcoholic steatohepatitis by modulating gut microbiota[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2023, 13(1): 15.
- [5] LEE C, ZHENG Y X, JAN F J. Orchid biotechnology III[M]/The orchid-infecting viruses found in the 21st century. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2016: 145-164.
- [6] 金晓香, 姚俊汐, 尹跃艳, 李婷婷, 郭森, 钟静, 和寿星, 陈越, 和家卫, 波鄢, 丁铭. 云南大花蕙兰复合感染的 ORSV 和 CyCMV 病毒基因组序列特征分析[J]. *园艺学报*, 2024, 51(8): 1844-1852.
JIN X X, YAO J X, YIN Y Y, LI T T, GUO M, ZHONG J, HE S X, CHEN Y, HE J W, BO Y, DING M. Molecular characterization of the Odontoglossum ringspot virus and Cymbidium chlorotic mosaic virus mix-infecting *Cymbidium hybridum* in Yunnan[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2024, 51(8): 1844-1852. (in Chinese)
- [7] 明艳林, 郑国华. 齿兰环斑病毒的研究进展[J]. *云南农业大学学报*, 2003, 18(4): 158-162.
MING Y L, ZHENG G H. Advances on Odontoglossum ringspot virus[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2003, 18(4): 158-162. (in Chinese)
- [8] 孙光荣, 王顺德, 王鸣岐. 齿兰环斑病毒和建兰花叶病毒的鉴定[J]. *自然杂志*, 1983(10): 798-799.
SUN G R, WANG S D, WANG M Q. Identification of Odontoglossum ringspot virus and Cymbidium chlorotic mosaic virus[J]. *Chinese Journal of Nature*, 1983(10): 798-799. (in Chinese)
- [9] 刘志昕, 潘俊松, 郑学勤. 侵染兰花的齿兰环斑病毒的分离、鉴定及检测研究[J]. *热带作物学报*, 1994(增刊): 41-48.
LIU Z X, PAN J S, ZHENG X Q. Identification and serological detection of Odontoglossum ringspot virus infecting orchids[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 1994(Suppl.): 41-48. (in Chinese)
- [10] 谢为龙, 谭群英, 李明福, 陈燕芳. 进境兰花的病毒检测[J]. *中国进出境动植物检*, 1995(2): 40-41.
XIE W L, TAN Q Y, LI M F, CHEN Y F. Detection of the imported orchid viruses[J]. *China Entry-Exit Animal and Plant Inspection*, 1995(2): 40-41. (in Chinese)
- [11] 陈艳, 张晓燕. 福州口岸进境蝴蝶兰疫情调查及分析[J]. *植物检疫*, 2002(5): 309-310.
CHEN Y, ZHANG X Y. Investigation and analysis on the epidemic of imported *Phalaenopsis* at Fuzhou port[J]. *Plant Quarantine*, 2002(5): 309-310. (in Chinese)
- [12] 徐匆, 黄皓, 黄晓彦, 陈彦, 李昀哲, 郑芝波. 齿兰环斑病毒 RT-qPCR 检测方法的建立[J]. *贵州农业科学*, 2023, 51(4): 86-92.
XU C, HUANG H, HUANG X Y, CHEN Y, LI Y Z, ZHENG Z B. Establishment of RT-qPCR method for detecting Odontoglossum ringspot virus (ORSV)[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2023, 51(4): 86-92. (in Chinese)
- [13] 明艳林, 郑国华, 李梅. 齿兰环斑病毒厦门分离物的研究[J]. *云南农业大学学报*, 2003, 18(4): 110-111.
MING Y L, ZHENG G H, LI M. The study of Odontoglossum ringspot virus isolated from Xiamen[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2003, 18(4): 110-111. (in Chinese)
- [14] 李丽, 于翠, 黄卫昌, 倪子轶. 上海辰山植物园兰花病毒病调查[J]. *绿色科技*, 2023, 25(23): 114-118.
LI L, YU C, HUANG W C, NI Z Y. Investigation on orchid viral diseases in Shanghai Chenshan Botanical Garden[J]. *Journal of Green Science and Technology*, 2023, 25(23): 114-118. (in Chinese)
- [15] 闫钟荣, 谢承智, 宋希强, 王洪星. 海南文心兰切花品种病毒病的分子鉴定[J]. *中南林业科技大学学报*, 2022, 42(11): 53-62.
YAN Z R, XIE C Z, SONG X Q, WANG H X. Molecular identification of viral diseases of *Oncidium hybridum* cutting flower in Hainan province[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2022, 42(11): 53-62. (in Chinese)
- [16] 杨翠云, 于翠, 郑建中, 陶庭典, 王寿南, 顾劲翊, 赵惠玲. 建兰花叶病毒检测标准方法的建立[J]. *上海交通大学学报(农业科学版)*, 2006(3): 250-255.

- YANG C Y, YU C, ZHENG J Z, TAO T D, WANG S N, GU J Y, ZHAO H L. Establish of standard detection methods for Cymbidium mosaic virus[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University (Agricultural Science), 2006(3): 250-255. (in Chinese)
- [17] 陈青, 余芳平, 张江洪. 从进境的蝴蝶兰上检出齿兰环斑病毒[J]. 植物检疫, 2003(3): 144-145.
- CHEN Q, YU F P, ZHANG J H. Detection of Odontoglossum ringspot virus on imported *Phalaenopsis* orchids[J]. Plant Quarantine, 2003(3): 144-145. (in Chinese)
- [18] 肖火根, 郑冠标, 张曙光, 高乔婉. 广东兰花病毒病的鉴定和检测研究[J]. 华南农业大学学报, 1996(1): 21-24.
- XIAO H G, ZHENG G B, ZHANG S G, GAO Q W. Studies on the identification and detection of orchid viruses in Guangzhou province[J]. Journal of South China Agricultural University, 1996(1): 21-24. (in Chinese)
- [19] 潘俊松, 刘志昕, 康由发, 郑学勤. 齿兰环斑病毒外壳蛋白基因的表达及其表达产物抗血清的制备[J]. 热带作物学报, 1999, 20(2): 62-66.
- PAN J S, LIU Z X, KANG Y F, ZHENG X Q. Expression in escherichia coli of Odontoglossum ringspot virus coat protein gene and preparation of antiserum of the product[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1999, 20(2): 62-66. (in Chinese)
- [20] 魏梅生, 黄冲. A 蛋白斑点免疫金染色和双抗体夹心酶联检测齿兰环斑病毒的比较[J]. 植物检疫, 2000(6): 344-346.
- WEI M S, HUANG C. Detection of Odontoglossum ringspot virus by protein-A-gold complexes and DAS-ELISA[J]. Plant Quarantine, 2000(6): 344-346. (in Chinese)
- [21] 明艳林, 郑国华, 李梅. 齿兰环斑病毒的鉴定及其抗血清的制备与应用[J]. 中国病毒学, 2006(1): 64-67.
- MING Y L, ZHENG G H, LI M. Identification and serological study of Odontoglossum ringspot virus[J]. Virologica Sinica, 2006(1): 64-67. (in Chinese)
- [22] 王钰丽, 李凡, 李正跃, 赵瑞荣, 陈海如. 文心兰病毒病原鉴定[J]. 植物保护, 2007(7): 72-74.
- WANG Y L, LI F, LI Z Y, ZHAO R R, CHEN H R. Identification of the pathogens of *Oncidium* viral diseases[J]. Plant Protection, 2007(7): 72-74. (in Chinese)
- [23] 任锐, 魏永路, 朱根发, 杨凤玺. 广东省国兰病毒病害调查及 CymMV 和 ORSV 基于 cp 基因的系统进化分析[J]. 植物保护学报, 2020, 47(2): 372-383.
- REN R, WEI Y L, ZHU G F, YANG F X. Investigation of Chinese Cymbidium viral disease, and phylogenetic analysis of cp gene of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ring spot virus in Guangdong province[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(2): 372-383. (in Chinese)
- [24] 明艳林, 李梅, 郑国华. RT-PCR 检测齿兰环斑病毒技术的建立[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003(3): 345-347.
- MING Y L, LI M, ZHENG G H. Development of RT-PCR assay for the detection of Odontoglossum ringspot virus[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2003(3): 345-347. (in Chinese)
- [25] 周国辉, 陈晓琴, 李梅辉. 广东地区两种兰花病毒病害的分子鉴定及检测[J]. 中国病毒学, 2004(2): 54-57.
- ZHOU G H, CHEN X Q, LI M H. Identification and detection of two major viruses infecting orchids by molecular technique[J]. Virologica Sinica, 2004(2): 54-57. (in Chinese)
- [26] 周国辉, 陈晓琴, 李梅辉, 周洁浪, 唐添华, 冯盛祥, 郭丽晶, 张旺. 双重一步法 RT-PCR 同时检测兰花上的两种主要病毒[J]. 农业生物技术学报, 2004(6): 743-744.
- ZHOU G H, CHEN X Q, LI M H, ZHOU J L, TANG T H, FENG S X, GUO L J, ZHANG W. Simultaneous detection of two orchid viruses by dual one-step RT-PCR[J]. Journal Of Agricultural Biotechnology, 2004(6): 743-744. (in Chinese)
- [27] 罗金水. 两种兰花病毒的生物学特性及其抗血清的制备与应用[D]. 福州: 福建农林大学, 2007.
- LUO J S. Biological and serological properties of two orchid viruses[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2007. (in Chinese)
- [28] 孙爱青, 王丽花, 张艺萍, 杨秀梅, 许凤, 苏艳. TaqMan 探针双重实时荧光定量 PCR 法同步检测兰花中的建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒[J]. 植物保护, 2024, 50(2): 219-227.
- SUN A Q, WANG L H, ZHANG Y P, YANG X M, XU F, SU Y. Simultaneous detection of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus by TaqMan duplex real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Plant Protection, 2024, 50(2): 219-227. (in Chinese)
- [29] 孙爱青, 王丽花, 张艺萍, 杨秀梅, 苏艳, 吴学尉. 蝴蝶兰不同部位 CymMV 和 ORSV 同步检测及含量比较研究[J]. 植物病理学报, 2024, 54(3): 504-511.
- SUN A Q, WANG L H, ZHANG Y P, YANG X M, SU Y, WU X W. Simultaneous detection and comparison of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus levels in different parts of *Phalaenopsis aphrodite*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2024, 54(3): 504-511. (in Chinese)
- [30] 宋起萱, 浦艳飞, 余蓉培, 瞿素萍, 杨春梅, 吴丽芳, 汪国鲜, 阮继伟. 蝴蝶兰建兰花叶病毒和齿兰环斑病毒的实时荧光定量 PCR 检测[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(15): 21-28.
- SONG Q X, PU Y F, YU R P, QU S P, YANG C M, WU L F, WANG G X, RUAN J W. Real-time fluorescence quantitative PCR detection of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus in *Phalaenopsis*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(15): 21-28. (in Chinese)

- [31] 徐匆, 黄皓, 罗华建, 杜见南, 黄晓彦, 陈彦, 梁卫驱, 胡珊. 一步法 RT-LAMP-HNB 检测兰花建兰花叶病毒和齿舌兰环斑病毒方法的建立[J]. 广东农业科学, 2022, 49(5): 95-101.
- XU C, HUANG H, LUO H J, DU J N, HUANG X Y, CHEN Y, LIANG W Q, HU S. Establishment of RT-LAMP-HNB method for detection of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2022, 49(5): 95-101. (in Chinese)
- [32] 陈定虎, 熊仁广, 刘晓媚, 朱春红, 管维, 吴颖儿. 基于纳米磁珠-LAMP 结合技术检测齿兰环斑病毒的初步研究[J]. 植物检疫, 2015, 29(4): 47-50.
- CHEN D H, XIONG R G, LIU X M, ZHU C H, GUAN W, WU Y E. Preliminary study on Odontoglossum ringspot virus in Orchid based on LAMP-magnetic nano-particles detection technology[J]. Plant Quarantine, 2015, 29(4): 47-50. (in Chinese)
- [33] KUAN C P, LIN Y F, LIN Y C, CHEN C C. One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of capsicum chlorosis virus in *Phalaenopsis* orchids[J]. Journal of General Plant Pathology, 2016, 82(6): 307-313.
- [34] 刘沛然, 王四清. 建兰花叶病毒及齿兰环斑病毒的检测方法(综述)[J]. 热带作物学报, 2009, 30(1): 99-103.
- LIU P R, WANG S Q. Advances on detection methods of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(1): 99-103. (in Chinese)
- [35] 王春伟, 李广信, 周书悦, 左敏, 王琳, 苏健, 王燕. 引起黄芩根腐病的锐顶镰刀菌的 RPA 检测方法[J]. 中国植保导刊, 2024, 44(9): 5-9.
- WANG C W, LI G X, ZHOU S Y, ZUO M, WANG L, SU J, WANG Y. Recombinant polymerase amplification method for detection of *Fusarium acuminatum* causing *Astragalus membranaceus* root rot[J]. China Plant Protection, 2024, 44(9): 5-9. (in Chinese)
- [36] ZHANG S L, HLADKY L L, HASEGAWA D K. Rapid detection of impatiens necrotic spot virus from thrips vectors using reverse transcription-recombinase polymerase amplification[J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 21946.
- [37] LI H Q, ZHU Y J, WAN C H, WANG Z Z, LIU L, TAN M F, ZHANG F F, ZENG Y B, HUANG J N, WU C C, HUANG Y, KANG Z F, GUO X Q. Rapid detection of goose astrovirus genotypes 2 using real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification [J]. BMC Veterinary Research, 2023, 19(1): 245.
- [38] 张艺林, 杨明, 王岩滨, 郝兴安. 大麦黄矮病毒 BYDV-GAVRT-RPA 检测体系的建立及应用[J]. 植物病理学报, 2024: 1-8. (2024-04-12)[2025-02-09]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001353>.
- ZHANG Y L, YANG M, WANG Y B, HAO X A. Establishment and application of RT-RPA for barley yellow dwarf virus-GAV detection[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2024: 1-8. (2024-04-12)[2025-02-09]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.001353>. (in Chinese)
- [39] KATSAROU K, BARDANI E, KALLEMI P, KALANTIDIS K. Viral detection: past, present, and future[J]. Bioessays, 2019, 41(10): 1900049.
- [40] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, ARMES N A. DNA detection using recombination proteins[J]. PLoS Biology, 2006, 7(4): 1115-1121.
- [41] 申世凯, 曾婷, 乔兴华, 陈力, 任杰群, 周彦. 柑橘衰退病毒 RT-RPA-LFD 可视化检测方法的建立及应用[J]. 果树学报, 2023, 40(12): 2652-2660.
- SHEN S K, ZENG T, QIAO X H, CHEN L, REN J Q, ZHOU Y. Establishment and application of RT-RPA-LFD visualization assay for rapid detection of Citrus tristeza virus[J]. Journal of Fruit Science, 2023, 40(12): 2652-2660. (in Chinese)
- [42] 姜自红, 刘文干, 孙钦花. 菊花 B 病毒和番茄不孕病毒 RT-RPA 双重荧光实时检测体系的构建与性能评价[J]. 病毒学报, 2023, 39(1): 174-184.
- JIANG Z H, LIU W G, SUN Q H. Establishment and performance evaluation of RT-PRA real-time fluorescent detection system for Chrysanthemum virus B and Tomato aspermy virus[J]. Chinese Journal of Virology, 2023, 39(1): 174-184. (in Chinese)
- [43] SUN A Q, WANG L H, ZHANG Y I, YANG X M, SU Y, WU X W. Development and application of a duplex RT-RPA assay for the simultaneous detection of Cymbidium mosaic virus and Odontoglossum ringspot virus[J]. Viruses-Basel, 2024, 16(4): 543.
- [44] 闻伟刚, 谭钟, 崔俊霞. 实时荧光 RT-PCR 方法检测齿兰环斑病毒与建兰花叶病毒[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 101-104.
- WEN W G, TAN Z, CUI J X. Detection of Odontoglossum ringspot virus and Cymbidium mosaic virus by real-time fluorescent RT-PCR[J]. Plant Protection, 2009, 35(4): 101-104. (in Chinese)
- [45] 沈方园, 葛萧, 张晓宇, 张郁勃, 周慧姿, 李恒. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1495-1511.
- SHEN F Y, GE X, ZHANG X Y, ZHANG Y B, ZHOU H Z, LI H. Research progress on recombinase polymerase amplification[J]. Microbiology China, 2024, 51(5): 1495-1511. (in Chinese)

- [46] 谢锦. 基于重组酶聚合酶扩增的马铃薯病毒等温检测体系的建立和应用[D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- XIE J. Establishment and application of an isothermal detection system for potato virus based on recombinase polymerase amplification[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [47] LEE H J, KIM H J, CHO I S, JEONG R D. Identification of viruses infecting *Phalaenopsis* orchids using nanopore sequencing and development of an RT-RPA-CRISPR/Cas12a for rapid visual detection of nerine latent virus[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(5): 2666.
- [48] JEONG H W, GO S M, JEONG R D. Rapid and specific detection of apple chlorotic leaf spot virus in pear by reverse-transcription recombinase polymerase amplification[J]. Acta Virologica, 2021, 65(2): 237-241.
- [49] 王姝然, 范厚勇, 徐嘉楠, 周天琦, 许丹, 郑跃平. 弗氏柠檬酸杆菌 RPA-LFD 快速检测方法的建立及应用[J]. 大连海洋大学学报, 2024, 39(2): 241-249.
- WANG S R, FAN H Y, XU J N, ZHOU T Q, XU D, ZHENG Y P. Establishment and application of a method for rapid detection of *Citrobacter freundii* by recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow strips (LFD)[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2024, 39(2): 241-249. (in Chinese)