植物检疫检测技术应用现状及发展趋势

姜 帆[1] 向 均[2] 梁 亮[3] 王超楠[1] 朱水芳[1*]

（1. 中国检验检疫科学研究院，北京 100176；2. 南京农业大学园艺学院，南京 210095；
3. 农业农村部规划设计研究院，北京 100125）

摘要：植物检疫是一种生物安全措施，通过立法手段防止植物及其产品在流通过程中传播有害生物。检测鉴定是植物检疫措施实施的核心。该文概述植物检疫的作用及其面临的挑战、植物检疫检测技术的应用现状及发展趋势，并对多组学时代下植物检疫检测技术进行展望。

关键词：植物检疫；检测鉴定；现场检测；高通量检测

Application status and development prospect of detection technologies in plant quarantine

Jiang Fan[1] Xiang Jun[2] Liang Liang[3] Wang Chaonan[1] Zhu Shuifang[1*]

（1. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China; 2. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 3. Academy of Agricultural Planning and Engineering, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100125, China）

Abstract: Plant quarantine is one of biosecurity measures, which refers to prevent the spread of pests in the circulation of plants and their products by law. Identification and detection are the cores of phytosanitary measures. This paper reviewed the roles of the plant quarantine in China and challenges faced; summarized the current situations and future development directions of detection technologies in plant quarantine and discussed the prospect of plant quarantine detection technology in the era of multi-omics.

Key words: plant quarantine; detection and identification; field detection; high-throughput test

植物检疫是一种生物安全措施，其通过法律、行政和技术手段防止植物及其产品携带危险性有害生物，如细菌、真菌、病毒、昆虫、杂草、线虫、害鼠和软体动物等通过人为方式进行远距离传播，以保障农林生产安全和生态环境健康，促进国际贸易发展（朱水芳，2019），目的是减少尚未在某一地区发生或虽已发生但尚未广泛分布且受官方控制的危险性有害生物的传入和扩散（FAO，2022），在维护国门生物安全中具有重要作用（李志红和杨汉春，2021）。

为防范和应对生物安全风险，维护国家安全，2021年4月15日《中华人民共和国生物安全法》正式实施。在国家生物安全顶层设计的指导下，从外来生物入侵、定殖、成灾的基础理论和模型到检测、监测、预警和防控的全过程研究均受到重视，植物检疫相关的应用和基础研究层出不穷。本文概述植物检疫的作用及其面临的挑战、植物检疫检测技术的应用现状及发展趋势，并对多组学时代下植物检疫检测技术进行展望，以期在生物安全纳入国家安全体系以及在新冠肺炎疫情大流行的时代背景下为植物检疫检测鉴定工作提供一定的指导。

1 植物检疫的作用及其面临的挑战

植物检疫能有效降低危险性有害生物传入的风险，同时也放缓了植物及其产品的相关贸易。植物及其产品的贸易流动不仅对出口国的经济发展有重要作用，而且对进口国家和地区乃至国际市场的贸

基金项目：中国检验检疫科学研究院基本科研业务费项目（2018JK008），国家重点研发计划（2021YFF0601901，2016YFF0203205）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：zhusf@caiq.org.cn

收稿日期：2021-05-06

易竞争和粮食安全也非常重要。对于世界贸易组织（World Trade Organization，WTO）成员国来说，隶属于WTO多边货物贸易协议项下的《卫生与植物检疫措施》协议要求植物检疫政策和措施在适当情况下应符合《国际植物保护公约》所指定的规则和标准，植物检疫不应当被随意的用作贸易上的技术壁垒（WTO，1994；FAO，2019a，b）。同时没有任何一个国家或地区可以在毫无风险的基础上开展贸易，如果这样，就不会有任何外来植物或其产品进入该国或该地区（Beale et al.，2008）。因此，各国均采取科学的风险防控策略及与其相匹配的植物检疫措施（Ochoa-Corona，2011）。

中国的植物检疫按照公布的检疫性有害生物名单对进境物实施重点植物检疫措施，属于重点检疫型检疫措施（许志刚，2008）。2007年，原农业部发布了《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》，该名录包括了435种（属）有害生物；到2013年，原农业部、原国家质量监督检验检疫总局和原国家林业局对该名录进行修订，先后增加了6种检疫性有害生物，共有441种（属）检疫性有害生物；2021年4月9日，农业农村部和海关总署第413号联合公告生效，在原进境植物检疫性有害生物名录中增补5种有害生物，目前该名录涵盖有害生物总数增加到446项（朱崧琪等，2021）。

但应该注意的是，气候变化可能改变有害生物的分布和传播能力，全球化也使货物和人员流动大幅增加，进而为有害生物的传播提供优良载体。由于植物检疫本身具有法律强制性，中国采取的是重点检疫型植物检疫措施，应及时根据生态、贸易和有害生物本身等实际情况对中国的检疫性有害生物名录进行修订，否则可能导致对未在检疫名录中但具有生物安全风险的有害生物漏检。更重要的是，对于尚未报道过且没有相应检测方法的有害生物，特别是病原微生物，在检疫过程中需要考虑未知因素的影响（Brasier，2008；Bebber，2015），这些都给植物检疫带来了挑战。

2 植物检疫检测技术的应用现状

大多数的植物检疫措施都是针对特定的有害生物，特别是那些被认为对生产和生态系统存在重大威胁的有害生物。植物检疫措施的核心是检测的可靠性，目前在有害生物检疫检测工作中已成熟应用的方法主要三大类：第一，以形态学为主要依据的目测检查、生物测定和借助显微镜等仪器的传统检测；第二，以酶联免疫吸附测定（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）为代表的免疫学检测；第三，多种分子生物学检测方法，如DNA条形码、聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）及其衍生技术等。本文充分结合植物检疫检测工作实际，对这三大类方法中已成熟应用的技术现状进行总结，并重点分析其在检疫检测工作中可能存在的问题。

2.1 传统检测

目测检测是通过肉眼直观检查以确定是否存在植物病虫害、是否符合具体的植物检疫要求的检测方法。在口岸现场检疫时，通常是对有症状的样品进行症状观察，并记录病症和病状，做出初步判断（SN/T 2589—2010；SN/T 2601—2010；SN/T 2964—2011）。但植物病虫害症状复杂，很多病原微生物在不同种类的植物上，甚至同一种类植物不同发育期植株上表现的症状也不同（Rakhshandehroo et al.，2006）。同时，病原微生物还具有复合侵染等特性，难以仅从症状上做出正确诊断（张秀琪等，2021）。有害生物危害较弱且无明显症状的植物及其产品就极易逃脱肉眼检测（Schaad et al.，2003；Martin & Tzanetakis，2013）。如进境粮谷常携带杂草种子，而很多杂草种子小，不仅不易辨识，还可作为病原物的中间寄主传播植物病害（朱煜建和周伟光，2020），仅通过目测检测很容易漏检。因此，若待检样品为种子等微小样本，除观察病害在种子上的典型症状外，必要时还需进行生物测定，待种子生长为幼苗后通过观察是否有危害症状才能做出诊断（SN/T 2589—2010；SN/T 2601—2010；SN/T 2964—2011）。

对于目测检测现场发现的疑似检疫性有害生物需进一步进行实验室检测鉴定。对各类检疫性有害生物均可通过借助显微镜等仪器的检测方法进行种类鉴定：（1）对于植物病原细菌和真菌，可通过分离培养，待一定时间后根据菌落的形态特征或孢子形态等特点判断病原物种类，可根据需要进一步进行接种和致病性测定（SN/T 2589—2010；SN/T 2601—2010）；（2）对于植物病毒，由于无法进行离体培养，需进行接种培养，待一定时间后根据寄主症状判定是否携带病毒及病毒种类（SN/T 2964—2011）；（3）对于截获的昆虫，常为卵、幼虫和蛹等非成虫虫态，缺乏形态学鉴定特征，一般需经过一段时间将其饲养为成虫后进行种类鉴定（姜帆等，2011）。基于形态学特征对有害生物进行种类鉴定的方法，需要极强的专业知识背景，对于形态极近似的物种，虽然形态学专家可以采用此方法进行准确的检疫鉴定，但

该方法在植物检疫实际工作中仍存在一定的局限性：第一，无论是病原物的培养还是昆虫的饲养，均需要等待一定的时间（几天到十几天甚至更长时间）才能满足鉴定的需求，耗时费力，极大影响植物检疫工作的时效性；第二，有些病原菌专性寄生，生长条件苛刻，不易分离培养，此方法便不能全面反映病原物种类的真实情况（胡佳续等，2021）；第三，对于一些植物及其产品中仅存在低浓度的病原物时，此方法可能无法进行种的区分，缺乏灵敏性（战斌慧和周雪平，2018）；第四，对于截获到的昆虫残体或是无法饲养成功且缺乏分类学特征的昆虫，此方法无法进行种类鉴定（刘慎思等，2012）。

通过上述分析可以看出，目测检查或生物测定受限于寄主植物中有害生物的含量以及影响症状表现的环境和生物因素，可能无法区分能够引起类似症状的有害生物种类，而生物测定需要几周甚至几年的时间才能完成，借助仪器的形态学检测也无法完全满足各种情况的检疫需求且严重依赖专家（Rowhani et al.，2005）。因此，需要开发更有效的检测方法以提高发现有害生物的机会，同时缩短检测时间。

2.2 免疫学检测

免疫学检测方法是通过抗体与抗原的特异性结合，利用抗体来检测样本中是否存在抗原的方法，该方法能同时检测大量样本，检测效率高，不需要特殊设备，操作简单（Clark & Adams，1977；Clark，1981），已在植物病原微生物检测中广泛应用。ELISA、免疫荧光（immunofluorescene，IF）、斑点免疫法（dot immunobinding assay，DIA）、免疫电镜和免疫染色标记等是常用的技术和方法（朱延书和康宁，2003）。这些检测方法的基础均为抗体成分，检测所用的抗体以多克隆抗体居多，这种抗体制备简单便宜，在某些情况下对克隆抗血清的专一性要求不严格，目的是大范围检测目标病原微生物。对于较为复杂的病原微生物，多克隆抗体常不能专一性地检测出目标病原物，因为它们极易与结构相似的蛋白发生交叉反应从而产生假阳性结果（Hsu et al.，1988）。此类方法只能进行定性检测或者半定量检测，且特异性和灵敏度较低，仅适用于大量样本的初筛检测。

单克隆抗体则可以克服上述缺点，已被广泛用于病毒、细菌、真菌和线虫等的检测鉴定。单克隆抗体针对单一抗原决定簇，具有可靠的特异性，对蛋白质的不同活性部分具有良好的分辨能力，能比较容易解决血清学试验交叉反应的问题（王亚琴等，2020），并在病毒及不同株系病毒的检测上有极大的优势。已有标准的李属坏死环斑病毒（prunus necrotic ringspot virus，PNRSV）和苹果花叶病毒（apple mosaic virus，ApMV）等单克隆抗体商品在售。单克隆抗体在鉴别形态相似的马铃薯金色球孢囊线虫 *Globodera rostochiensis* 和白色球孢囊线虫 *G. pallida* 上也表现出了良好的效果（朱延书和康宁，2003）。但单克隆抗体因制备方法复杂、周期长、价格昂贵和制备环节影响因素多等原因，在一定程度上限制了其在植物检疫工作中的应用。

2.3 分子生物学检测

分子生物学检测方法已成为植物检疫工作中常用的检测鉴定方法，该方法基于物种特异性基因序列对物种进行准确鉴定，相比于免疫学检测方法，该方法在灵敏度、检出率和特异性等方面有了很大的提高。

DNA条形码方法通过对目标扩增片段的测序实现物种种类鉴定，是一种非靶向的检测鉴定方法。自2003年Hebert提出DNA条形码的概念以来，该方法被广泛用于不同生物类群的研究中（Hebert et al.，2003a，b；2004）。该方法检测准确性的核心在于所扩增的标准目标片段的有效性。针对不同类群的检疫性有害生物，国内外学者开展了大量的研究以评价、筛选可用来准确鉴定的物种DNA条形码，并制订了相关标准，如SN/T 4625—2016。目前，不同类群检疫性有害生物普遍被认可的DNA条形码分别为细菌16S基因、真菌ITS基因和昆虫 *COI* 基因等，但可能会由于引物的通用性或者扩增片段的遗传变异性影响检测结果的准确性，这个问题在几乎所有的检疫性有害生物类群中普遍存在。例如大部分细菌仅用16S基因区域无法鉴定到种水平（Chakravorty et al.，2007）；真菌也存在使用ITS基因无法全部鉴定到种水平的问题（Taylor et al.，2016）；对于昆虫来说，虽然 *COI* 基因在动物DNA条形码鉴定中被广泛应用，但仍存在近缘种无法有效鉴别的问题（Jiang et al.，2014）；病毒变异速度快，尚无较为广泛通用的DNA条形码。近年来，新条形码基因的筛选、多基因联合鉴定和新算法的开发仍是DNA条形码领域研究的热点（Talavera et al.，2013；Jiang et al.，2018）。

与DNA条形码方法相比，PCR及其衍生出的系列PCR方法具有更强的特异性和灵敏性，是一种靶向的检测鉴定方法，也是目前植物检疫工作中最常

使用的分子检测方法，主要有PCR、巢式PCR和实时荧光PCR检测方法等（李雪莲等，2021）。该方法可以相对避免DNA条形码方法的弊端，且无需测序，操作更便捷、快速。该方法检测准确性和灵敏性的核心在于引物的特异性和扩增效率，但即使在基因组的保守区域，遗传变异也可能降低引物的结合能力，从而影响检测的可靠性，进而导致假阴性结果，或者由于引物、探针等结合位点与其他物种相似而错误扩增，进而导致假阳性结果（Vincelli & Tisserat，2008；Powney et al.，2011；Jiang et al.，2016）。

上述传统检测方法、免疫学检测方法和已成熟应用的分子生物学检测方法多是为特定的目标物种而设计，是基于现有的生物学、遗传学和分子生物学等理论基础开发的，这些理论基础的有限导致它们检测能力有限，对于生物信息了解较少或者未知的种类不能进行有效检测。值得注意的是，任何一种检测方法都不是完全可靠的，物种的生物学特质及其与寄主和环境的相互作用可能会改变症状的表现或影响病原物滴度，从而影响检测的准确性或灵敏性。对于那些不典型的症状或是未知的病原物，无法使用现有的检测方法进行种类确认（Martin et al.，2016）。

3 植物检疫检测技术的发展趋势

3.1 现场快速检测

目前，在植物检疫工作中已成熟应用的PCR、实时荧光PCR等分子生物学检测方法往往需要昂贵的仪器设备、严格的热循环条件等，难以用于现场快速检测。等温扩增技术是一种反应温度恒定的核酸扩增技术，具有快速、灵敏、操作简便等优势，适用于现场检测，该技术已在诸多有害生物检测中开展应用研究，并被证明扩增效率等同或优于PCR技术；另外，该技术对PCR的抑制剂有较高的耐受性，因而对核酸的质量要求较低，可通过对样品核酸的粗提取进行扩增，极大简化试验过程（王道等，2021）。近年来，环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）、重组酶聚合酶扩增（recombinase polymerase amplification，RPA）、交叉引物扩增（cross-priming isothermal amplification，CPA）和重组酶介导扩增（recombinase-aid amplification，RAA）技术研究较多，其各具优势，如RPA和RAA技术的引物设计相对简单，一对引物即可扩增模板核酸，更易实现多重扩增；LAMP和CPA反应体系中需要4~6条引物，引物设计相对复杂，但在扩增特异性上更具优势（应淑敏等，2020）。

目前，等温扩增技术在植物检疫检测中仍以技术开发为主，尚未形成相关标准，也并未在植物检疫实际工作中应用，并且该技术易形成气溶胶污染而造成假阳性结果。研制集核酸提取和等温扩增于一体的现场便携式检测设备是近年来的研究热点，研究的重点在于简化核酸提取过程使其满足现场检测的需求（Hieno et al.，2019；McCoy et al.，2020）。在今后研究中，还应重点解决如何在试验操作过程中最大限度地避免气溶胶污染问题，使其操作流程标准化以便在植物检疫检测实际工作中发挥更大的作用。

3.2 一次性高通量检测

随着科学技术的进步，检测技术不断更新，被发现的新物种数量也大幅增长。如按照国际病毒分类学委员会发布的病毒分类系统（Walker et al.，2020），植物病毒和植物亚病毒共1 789种，而2014年为1 200多种，2005年为980种，1991年为380种，而且大多数病毒与病害有关（Barba et al.，2014；Adams et al.，2015）。一些生态领域调查研究也发现，植物病毒的数量可能远超想象（Wren et al.，2006；Roossinck，2012）。而未知有害生物的存在和不断进化给植物检疫检测工作带来了重大挑战。高通量测序技术又称下一代测序（next-generation sequencing，NGS）技术，其运用可提高对任何已知或未知有害生物的无偏检测能力，最大限度地降低病虫害流行的可能性（Mardis，2013；Boonham et al.，2014；Filloux et al.，2018）。植物病理学领域科研人员利用该技术已发现了大量的新病毒、类病毒或病毒新株系，其中一些严重危害农业生产的有害病原生物已被欧洲和地中海国家植物保护组织（European and Mediterranean Plant Protection Organization，EPPO）列入检疫性有害生物名单（邱艳红等，2020）。此外，该方法不仅能够检测已知和未知的物种，在一次检测中具备识别多种有害生物的能力，而且还具有检测极低滴度病原物和近缘种的能力（Wu et al.，2015；徐瑶等，2020）。利用NGS技术能够从组学层面较容易地挖掘更加丰富的遗传信息，让近似种的区分成为可能，并已成功鉴定检疫性实蝇的复合体物种（Zhang et al.，2021）。随着测序技术的不断改进、测序成本的降低和数据分析方法的改善，该技术将很可能作为一种快速、准确、常规的检测方法在植物检疫工作中应用。

目前NGS技术多是由一些服务商提供的，用户

往往会得到序列数据和一些基本的、常规的分析结果，这些分析能够识别已知的和假定的特征序列或结构，除了选择适当的分析参数外，用户并没有太多的参与分析，由此产生的假阳性或假阴性结果也成为该技术用于植物检疫工作所面临的主要问题（Stobbe et al.，2013；Roux et al.，2014；Shabardina et al.，2019）。如果没有为所需分析量身定做的生物信息学算法和数据库，对大量测序数据的分析将非常耗时，同样也是该技术应用于植物检疫的一个主要瓶颈。2016年，在国家重点研发计划项目支持下所开发的跨境生物智能鉴定系统具有在一次鉴定过程中同时检测其中所可能含有的多至上千种有害生物的能力，数据分析耗时在1 h内，该系统针对植物检疫工作量身定制了可选择宿主自动过滤的生物信息学分析方法，大幅度提高了植物检疫检测的准确性。

4 展望

面对气候变化以及日益复杂多变的国际环境和贸易格局，研发适用于口岸实验室的高效、精准、快速检测技术及对病虫害一次性检测技术是“十四五”期间植物检疫领域的重点研究方向之一。在目前NGS技术全面应用的时代，在获取组学信息的基础上挖掘单核苷酸多态性位点信息，可以为以基因序列为基础的各种分子生物学检测方法提供更加精准的标记位点，以此为基础开发更准确、快速、低成本的靶向检测技术，同时也可增强对新发、突发的未知有害生物的检测能力。

植物检疫是通过立法手段对有害生物进行防治。植物检疫措施的实施均需要在技术标准的基础上开展。纵观中国现行的植物检疫检疫鉴定标准，尚未囊括检疫名录中的所有有害生物，技术方法主要为形态学方法和以PCR技术和实时荧光PCR技术为主的分子生物学方法，亟需建立植物检疫性有害生物全覆盖的、成熟的现场快速和高通量一次性检测技术标准，重点解决检测结果的假阳性和假阴性问题，提高检测准确性，提升口岸有害生物检出率，切实维护好国门生物安全。

由于中国实行的重点检疫型的植物检疫工作策略，对于检疫名录以外的、特别是未知的具有潜在危害的有害生物极度缺乏关注，并且未知有害生物的存在和不断进化是植物检疫工作中不容忽视的一个难题。随着测序技术和生物信息学方法的不断改进，NGS技术在植物检疫检测工作中表现出了巨大的应用潜力，但该技术在全面用于植物检疫检测之前，仍有几点需要考虑，如在NGS检测过程中，组织取样是否充分；核酸质量是否符合要求；样品覆盖面以及测序深度达到多少可以代表一个真正的阳性或者阴性结果；对于新发现的物种，在其被列入检疫名单之前，如何获取并结合其生物学信息来避免对新物种的过度检疫措施而影响贸易。这些都需要制定相关的标准。在未来的植物检疫工作中，根据实际需求选择适合的检测方法，对检疫材料进行高效、低成本的检测，在保障国门生物安全和农林生产生态安全同时推进贸易高质量发展。

参 考 文 献（References）

Adams MJ, Hendrickson RC, Dempsey DM, Lefkowitz EJ. 2015. Tracking the changes in virus taxonomy. Archives of Virology, 160(5): 1375−1383

Barba M, Czosnek H, Hadidi A. 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. Viruses, 6(1): 106−136

Beale R, Fairbrother J, Inglis A, Trebeck D. 2008. One biosecurity: a working partnership. The independent review of Australia’s quarantine and biosecurity arrangements report to the Australian government. Canberra: Commonwealth of Australia

Bebber DP. 2015. Range-expanding pests and pathogens in a warming world. Annual Review of Phytopathology, 53: 335−356

Boonham N, Kreuze J, Winter S, van der Vlugt R, Bergervoet J, Tomlinson J, Mumford R. 2014. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing. Virus Research, 186: 20−31

Brasier CM. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. Plant Pathology, 57(5): 792−808

Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. 2007. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. Journal of Microbiological Methods, 69(2): 330−339

Clark MF. 1981. Immunosorbent assays in plant pathology. Annual Review of Phytopathology, 19: 83−106

Clark MF, Adams AN. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. The Journal of General Virology, 34(3): 475−483

FAO. 2019a. Pest risk analysis for quarantine pests.//International Standard for Phytosanitary Measures No. 2. Rome: IPPC, FAO

FAO. 2019b. Framework for pest risk analysis.//International Standard for Phytosanitary Measures No. 11. Rome: IPPC, FAO

FAO. 2022. Glossary of phytosanitary terms.//International Standard for Phytosanitary Measures No. 5. Rome: IPPC, FAO

Filloux D, Fernandez E, Loire E, Claude L, Galzi S, Candresse T, Winter S, Jeeva ML, Makeshkumar T, Martin DP, et al. 2018. Nanopore-based detection and characterization of yam viruses.

Scientific Reports, 8: 17879

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270(1512): 313−321

Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270(S1): 96−99

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS, Francis CM. 2004. Identification of birds through DNA barcodes. PLoS Biology, 2(10): e312

Hieno A, Li MZ, Afandi A, Otsubo K, Suga H, Kageyama K. 2019. Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* by simple DNA extraction and real-time loop-mediated isothermal amplification assay. Journal of Phytopathology, 167(3): 174−184

Hsu HT, Franssen JM, van der Hulst CTC, Derks AFLM, Lawson RH. 1988. Factors affecting selection of epitope specificity of monoclonal antibodies to tulip breaking *Potyvirus*. Phytopathology, 78 (10): 1337

Hu JX, Zhang Y, Wang ZM, Liu Y, Jiang Y. 2021. Preliminary study on fungal diversity in US soybean based on high throughput sequencing and culture methodology. Plant Quarantine, 35(1): 31−38 (in Chinese) [胡佳续, 张莹, 王仲敏, 刘勇, 姜一. 2021. 基于高通量测序及分离培养初步研究美国大豆中真菌多样性. 植物检疫, 35(1): 31−38]

Jiang F, Fu W, Clarke AR, Schutze MK, Susanto A, Zhu SF, Li ZH. 2016. A high-throughput detection method for invasive fruit fly (Diptera: Tephritidae) species based on microfluidic dynamic array. Molecular Ecology Resources, 16(6): 1378−1388

Jiang F, Jin Q, Liang L, Zhang AB, Li ZH. 2014. Existence of species complex largely reduced barcoding success for invasive species of Tephritidae: a case study in *Bactrocera* spp. Molecular Ecology Resources, 14(6): 1114−1128

Jiang F, Liang L, Li ZH, Yu YX, Wang J, Wu YP, Zhu SF. 2018. A conserved motif within cox 2 allows broad detection of economically important fruit flies (Diptera: Tephritidae). Scientific Reports, 8: 2077

Jiang F, Liu JQ, Li ZH, Wu JJ, Zhao S. 2011. Molecular identification of fruit fly larvae by DNA barcodes. Plant Protection, 37(4): 150−153 (in Chinese) [姜帆, 刘佳琪, 李志红, 吴佳教, 赵朔. 2011. 基于DNA条形码的广西苦瓜中实蝇幼虫分子鉴定研究. 植物保护, 37(4): 150−153]

Li XL, Zhang HL, Lü Y, Duan WJ. 2021. A brief analysis for standards of detection and identification of quarantine fungi. Plant Quarantine, 35(1): 15−19 (in Chinese) [李雪莲, 张慧丽, 吕燕, 段维军. 2021. 我国进境植物检疫性菌物检疫鉴定标准浅析. 植物检疫, 35(1): 15−19]

Li ZH, Yang HC. 2021. Outline of animal and plant quarantine. Beijing: China Agricultural University Press, pp. 21 (in Chinese) [李志红, 杨汉春. 2021. 动植物检疫概论. 北京: 中国农业大学出版社, pp. 21]

Liu SS, Zhang GF, Wu Q, Zhang AB, Wang JJ, Wan FH. 2012. Establishment and application of DNA barcoding technology for identification of the immatures and adult debris of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) (Diptera: Tephritidae). Acta Entomologica Sinica, 55 (3): 336−343 (in Chinese) [刘慎思, 张桂芬, 武强, 张爱兵, 王进军, 万方浩. 2012. 桔小实蝇幼体及成虫残体DNA条形码识别技术的建立与应用. 昆虫学报, 55(3): 336−343]

Mardis ER. 2013. Next-generation sequencing platforms. Annual Review of Analytical Chemistry, 6: 287−303

Martin RR, Constable F, Tzanetakis IE. 2016. Quarantine regulations and the impact of modern detection methods. Annual Review of Phytopathology, 54: 189−205

Martin RR, Tzanetakis IE. 2013. High risk strawberry viruses by region in the United States and Canada: implications for certification, nurseries, and fruit production. Plant Disease, 97(10): 1358−1362

McCoy AG, Miles TD, Bilodeau GJ, Woods P, Blomquist C, Martin FN, Chilvers MI. 2020. Validation of a preformulated, field deployable, recombinase polymerase amplification assay for *Phytophthora* species. Plants, 9(4): 466

Ochoa-Corona FM. 2011. Biosecurity, microbial forensics and plant pathology: education challenges, overlapping disciplines and research needs. Australasian Plant Pathology, 40(4): 335−338

Powney R, Beer SV, Plummer K, Luck J, Rodoni B. 2011. The specificity of PCR-based protocols for detection of *Erwinia amylovora*. Australasian Plant Pathology, 40(1): 87−97

Qiu YH, Tian W, Xu XL. 2020. Application and development of high-throughput sequencing technology for plant virus quarantine. Plant Quarantine, 34(3): 1−6 (in Chinese) [邱艳红, 田文, 徐秀兰. 2020. 高通量测序技术在植物病毒检疫中的应用与发展. 植物检疫, 34(3): 1−6]

Rakhshandehroo F, Zamani Zadeh HR, Modarresi A, Hajmansoor S. 2006. Occurrence of *Prunus* necrotic ringspot virus and *Arabis* mosaic virus on rose in Iran. Plant Disease, 90(7): 975

Roossinck MJ. 2012. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. Annual Review of Genetics, 46: 359−369

Roux S, Tournayre J, Mahul A, Debroas D, Enault F. 2014. Metavir 2: new tools for viral metagenome comparison and assembled virome analysis. BMC Bioinformatics, 15: 76

Rowhani A, Uyemoto JK, Golino DA, Martelli GP. 2005. Pathogen testing and certification of *Vitis* and *Prunus* species. Annual Review of Phytopathology, 43: 261−278

Schaad NW, Frederick RD, Shaw J, Schneider WL, Hickson R, Petrillo MD, Luster DG. 2003. Advances in molecular-based diagnostics in meeting crop biosecurity and phytosanitary issues. Annual Review of Phytopathology, 41: 305−324

Shabardina V, Kischka T, Manske F, Grundmann N, Frith MC, Suzuki Y, Makałowski W. 2019. NanoPipe: a web server for nanopore MinION sequencing data analysis. GigaScience, 8(2): giy169

Stobbe AH, Daniels J, Espindola AS, Verma R, Melcher U, Ochoa-Corona F, Garzon C, Fletcher J, Schneider W. 2013. E-probe diagnostic nucleic acid analysis (EDNA): a theoretical approach for handling of next generation sequencing data for diagnostics. Journal of Microbiological Methods, 94(3): 356−366

Talavera G, Dincă V, Vila R. 2013. Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. Methods in Ecology and Evolution, 4(12): 1101−1110

Taylor DL, Walters WA, Lennon NJ, Bochicchio J, Krohn A, Caporaso JG, Pennanen T. 2016. Accurate estimation of fungal diversity and abundance through improved lineage-specific primers optimized for illumina amplicon sequencing. Applied and Environmental Microbiology, 82(24): 7217−7226

Vincelli P, Tisserat N. 2008. Nucleic acid-based pathogen detection in applied plant pathology. Plant Disease, 92(5): 660−669

Walker PJ, Siddell SG, Lefkowitz EJ, Mushegian AR, Adriaenssens EM, Dempsey DM, Dutilh BE, Harrach B, Harrison RL, Hendrickson RC, et al. 2020. Changes to virus taxonomy and the statutes ratified by the International Committee on taxonomy of viruses (2020). Archives of Virology, 165(11): 2737−2748

Wang D, Zhang PJ, Sun K, Hu XN, Wei S, Yang QQ, Yu XP. 2021. Advances in isothermal amplification of phytosanitary viruses. Chinese Journal of Virology, 37(5): 1268−1282 (in Chinese) [王道, 张蓬军, 孙凯, 胡学难, 魏霜, 杨倩倩, 俞晓平. 2021. 植物检疫性病毒等温扩增检测技术研究进展. 病毒学报, 37(5): 1268−1282]

Wang YQ, Tian YM, Yu C, Zhou XP, Wu JX. 2020. Monoclonal antibody-based serological technology for southern bean mosaic virus detection. Journal of Plant Protection, 47(2): 347−354 (in Chinese) [王亚琴, 田沂民, 于翠, 周雪平, 吴建祥. 2020. 基于单克隆抗体的南方菜豆花叶病毒血清学检测技术. 植物保护学报, 47(2): 347−354]

Wren JD, Roossinck MJ, Nelson RS, Scheets K, Palmer MW, Melcher U. 2006. Plant virus biodiversity and ecology. PLoS Biology, 4 (3): e80

WTO (World Trade Organization). 1994. Agreement on the application of sanitary and phytosanitary measures.//The legal texts: results of the Uruguay round of multilateral trade negotiations. Geneva, Switzerland: WTO, pp. 59−72

Wu QF, Ding SW, Zhang YJ, Zhu SF. 2015. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. Annual Review of Phytopathology, 53: 425−444

Xu Y, Alia T, Li XY, Shi WP, Cao C. 2020. The discovery of viruses associated with the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* by high-throughput sequencing. Journal of Plant Protection, 47(4): 807−814 (in Chinese) [徐瑶, Alia T, 李向永, 石旺鹏, 曹川. 2020. 基于高通量测序技术检测草地贪夜蛾病毒多样性. 植物保护学报, 47(4): 807−814]

Xu ZG. 2008. Plant quarantine. 3rd edition. Beijing: Higher Education Press, pp. 14 (in Chinese) [许志刚. 2008. 植物检疫学. 第3版. 北京: 高等教育出版社, pp. 14]

Ying SM, Guo J, Wang JY, Li L, Zhang CQ. 2020. Application of LAMP in the detection of plant pathogens. Journal of Plant Protection, 47(2): 234−244 (in Chinese) [应淑敏, 郭俭, 王教瑜, 李玲, 张传清. 2020. 环介导等温扩增技术在植物病原物检测中的应用. 植物保护学报, 47(2): 234−244]

Zhan BH, Zhou XP. 2018. Application of next-generation sequencing technology in detection of plant and insect viruses. Plant Protection, 44(5): 120−126, 167 (in Chinese) [战斌慧, 周雪平. 2018. 高通量测序技术在植物及昆虫病毒检测中的应用. 植物保护, 44(5): 120−126, 167]

Zhang XQ, Liu SY, Yang YZ, Li ML, Hu AA, Liu C, Zhang ZY, Han CG, Wang Y. 2021. Virus identification and detection by high-throughput sequencing and RT-PCR from rose plants in Beijing. Acta Phytopathologica Sinica, 51(4): 525−535 (in Chinese) [张秀琪, 刘松誉, 杨一舟, 李梦林, 胡安安, 刘唱, 张宗英, 韩成贵, 王颖. 2021. 北京月季病原病毒的高通量测序鉴定和RT-PCR检测. 植物病理学报, 51(4): 525−535]

Zhang Y, de Meyer M, Virgilio M, Feng SQ, Badji K, Li ZH. 2021. Phylogenomic resolution of the *Ceratitis* FARQ complex (Diptera: Tephritidae). Molecular Phylogenetics and Evolution, 161: 107160

Zhu SF. 2019. Plant quarantine. Beijing: Science Press, pp. 1 (in Chinese) [朱水芳. 2019. 植物检疫学. 北京: 科学出版社, pp. 1]

Zhu YS, Kang N. 2003. Application of biotechnology in plant quarantine detection. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology, 30(3): 42−47 (in Chinese) [朱延书, 康宁. 2003. 生物技术在植物检疫检测中的应用. 江苏林业科技, 30(3): 42−47]

Zhu YJ, Zhou WG. 2020. To pay attention to the potential possibility of imported soybeans carrying weed-borne plant diseases. Agriculture and Technology, 40(5): 38−40 (in Chinese) [朱煜建, 周伟光. 2020. 关注进口大豆携带杂草传带植物病害的潜在可能性. 农业与技术, 40(5): 38−40]

Zhu SQ, Liang ZW, Wang SW. 2021. Update project introduction of catalogue of quarantine pests for import plants to the People's Republic of China. China Customs, (7): 54 (in Chinese) [朱崧琪, 梁柱伟, 汪绍文. 2021.《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》更新项目简介. 中国海关, (7): 54]

（责任编辑：张俊芳）