

柑橘鳞皮病毒 RT-LAMP 检测方法的建立与应用

李 敏, 周天宇, 吴佳星, 周 彦, 曹孟籍*, 李中安*

(西南大学, 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712)

摘 要: 根据 NCBI 数据库柑橘鳞皮病毒 (*Citrus psorosis virus*, CPsV) 的外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因序列设计了 4 组特异性引物, 通过一系列优化, 筛选并获得 1 组特异性引物。以感染 CPsV 的柑橘叶片总 RNA 为模板, 采用一步法 RT-LAMP (One-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification), 在 60 °C 下反应 60 min, 对扩增产物进行琼脂糖电泳分析, 同时测定其特异性和灵敏度。结果表明, 建立的 RT-LAMP 检测方法能特异性扩增 CPsV, 灵敏度为 RT-PCR 的 10 倍。用 RT-LAMP 方法对 87 个田间样品进行检测, 发现有 5 个样品感染了 CPsV, 其检测结果与 RT-PCR 法一致。RT-LAMP 法具有特异性强、灵敏度高、操作简单、快速等特点, 适合对 CPsV 样品的快速检测与鉴定。

关键词: 柑橘; 柑橘鳞皮病毒; RT-LAMP; 检测

中图分类号: S 666

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 07-1409-08

Establishment and Application of Loop-mediated Isothermal Amplification on *Citrus psorosis virus*

LI Min, ZHOU Tianyu, WU Jiaying, ZHOU Yan, CAO Mengji*, and LI Zhongan*

(Citrus Research Institute, Southwest University, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

Abstract: Four sets of specific primer pairs in the conserved region of the CP (coat protein) gene of *Citrus psorosis virus* (CPsV) were designed for One-step RT-LAMP detection system based on NCBI database. One feasible pair of primers was screened to be suitable for this system. Template RNA extracted from CPsV infected citrus leaves was used for One-step RT-LAMP, and isothermal conditions were optimized to be 60 °C for 60 minutes. The agarose gel electrophoresis analysis of RT-LAMP products indicated that the established RT-LAMP system was specific and sensitive in detecting CPsV and 10-fold higher than RT-PCR method in sensitivity. Of 87 samples detected by this RT-LAMP system, five were found to be infected by CPsV, showing the detection result was consistent with RT-PCR method. Hence this RT-LAMP system is applicable for rapid and accurate detection and identification of CPsV.

Keywords: citrus; *Citrus psorosis virus* (CPsV); RT-LAMP; detection

收稿日期: 2018 - 12 - 19; **修回日期:** 2019 - 06 - 24

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作重点专项 (2017YFE0110900); 重庆市基础科学与前沿技术研究专项 (cstc2017jcyjBX0016); 重庆市研究生科研创新项目 (CYS18133, CYS17086)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhongan@cric.cn, caomengji@cric.cn)

柑橘鳞皮病是由柑橘鳞皮病毒 (*Citrus psorosis virus*, CPsV) 引起的, 该病自 20 世纪 90 年代在美国佛罗里达和加利福尼亚被发现以来, 相继在阿根廷、西班牙、埃及、意大利等国家广泛发生 (Roistacher, 1993), 但在中国未见报道。柑橘鳞皮病主要危害甜橙、葡萄柚和宽皮柑橘, 可引起寄主主干和大枝典型的树皮鳞片状开裂, 并伴随木质部导管充胶变色, 感染 CPsV 后的植株减产达 70% (Achachi et al., 2014)。柑橘鳞皮病主要通过嫁接进行传播 (Martín et al., 2002), 卵菌亚纲的油壶菌也可以传播 CPsV (Palle et al., 2005; Vaira et al., 2007, 2009)。柑橘鳞皮病有鳞皮病 A (PsA) 和鳞皮病 B (PsB) 两种类型, 以 PsA 常见, 引起植株主干树皮鳞片化开裂, 木质部导管充胶变色。

CPsV 属于蛇形病毒科 (*Ophioviridae*) 蛇形病毒属 (*Ophiovirus*), 是一种三分体负单链 RNA 病毒 (García et al., 2017)。CPsV 的病毒粒子具有裸露的线形核衣壳, 直径 3 ~ 4 nm, 可形成卷曲的环, 呈极弯曲纽绞线状。CPsV 基因组全长约 12 kb, RNA1 的互补链编码 280 kD 依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) (Naum-Onganien et al., 2003) 和 1 个功能未知的 24 kD 蛋白; RNA2 的互补链编码 54 kD 的运动蛋白 (movement protein, MP) (Robles et al., 2013), RNA3 的互补链编码 49 kD 的外壳蛋白 (coat protein, CP) (Barthe et al., 1998)。

关于 CPsV 的检测主要有 ELISA、分子杂交、RT-PCR 和免疫电镜等方法 (Martín et al., 2004; Achachi et al., 2015)。其中 RT-PCR 法需要昂贵的检测仪器, 且灵敏度有待进一步的提高; ELISA、分子杂交和免疫电镜的方法操作费事, 且灵敏度低。环介导等温核酸扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术是采用 4 条特异引物和 DNA 链置换聚合酶 (Bst DNA polymerase) 在恒温条件下建立的一种新型分子检测技术 (Notomi et al., 2000), 已广泛应用于柑橘黄龙病 (黄丽 等, 2012)、柑橘溃疡病 (张仑 等, 2013)、柑橘黄化脉明病 (刘科宏 等, 2015)、柑橘碎叶病 (段硕, 2013)、柑橘衰退病 (Warghane et al., 2017) 和柑橘褪绿矮化病 (刘科宏 等, 2017) 等多种柑橘病害检测鉴定。本研究的目的是建立一种对 CPsA 特异、快速的检测方法, 为今后柑橘鳞皮病的田间快速检测应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

2018 年 3—6 月, 在西南大学柑桔研究所国家柑橘苗木脱毒中心采集健康的以及感染了 CPsV、柑橘黄化脉明病毒 (*Citrus yellow vein clearing virus*, CYVCV)、柑橘衰退病毒 (*Citrus tristeza virus*, CTV)、柑橘叶斑病毒 (*Citrus leaf blotch virus*, CLB) 和柑橘黄龙病菌 (*Citrus Huanglongbing*, HLB) 的柑橘嫩叶样品, 液氮速冻后, -80 °C 保存备用。

1.2 植物总 RNA 的提取, RT-LAMP 引物合成和筛选

取 50 mg 待测柑橘叶片, 按照 Trizol 试剂说明书提取样品的总核酸, 保存于 -20 °C 备用。

根据 NCBI 数据库登录的 CPsV CP 基因序列 (MG673946), 使用专门的 LAMP 引物设计软件 primer explorer 4.0 (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>) 设计引物, 得到针对 6 个区域的 4 组特异性引物序列, 普通 PCR 引物利用 primer 5 设计 (表 1)。

1.3 RT-PCR 反应条件

以提取的总 RNA 为模板, 利用 CPsV 的特异性引物进行扩增。RT-PCR 一步法反应体系: 以 1 μL

RNA 和 1 μ L ddH₂O 为模板, 变性后加入 10 μ L 混合液[2 \times 1 step buffer 5 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的 CPsV-F/R 各 0.2 μ L, PrimeScript 1 step Enzyme Mix 0.3 μ L (TaKaRa 公司, Prime Script[®] One Step RT-PCR Kit Ver.2), ddH₂O 4.3 μ L]。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 解链 5 min; 50 $^{\circ}$ C 反转 30 min; 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 25 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

表 1 柑橘鳞皮病毒 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测用引物序列
Table 1 Primers for the RT-LAMP and RT-PCR detection of CPsV

引物组合 Primer combination	引物名称 Primer name	引物序列 (5' - 3') Primer sequence	引物位置/nt Location
I	F3-5	CTTTGAGTCCATCAACTGTT	99 ~ 118
	B3-5	TCACTCTGAAGCTGACAT	288 ~ 305
	FIP-5 (F1c-5 + F2-5)	GGTGAAGGACCAACTAGGACGTTGCTGAAATCTGCCTC	161 ~ 180, 121 ~ 138
	BIP-5 (B1c-5 + B2-5)	GAAACCCCTTGTTCTTGTCGGGTGCTATAATTTACAGCCTCA	207 ~ 227, 267 ~ 287
	F3-75	AATTCCTCACTGATTTGTGAT	638 ~ 658
II	B3-75	CAACTTGTTCAAGATGGAAC	834 ~ 853
	FIP-75 (F1c-75 + F2-75)	CCTGGAAAAACCGATGATAAAAGGCACCATCATACAGCTTCG	709 ~ 732, 669 ~ 686
	BIP-75 (B1c-75 + B2-75)	CCAAGACAAATGCCGCTTGAGTTGATGGAGTGTGTGATT	753 ~ 772, 813 ~ 831
	F3-77	TGTGATAAACTTACATCACCAT	653 ~ 674
	B3-77	CAACTTGTTCAAGATGGAAC	834 ~ 853
III	FIP-77 (F1c-77 + F2-77)	GATCTCTTCCTGGAAAAACCGACAGCTTCGATTTGACAAAC	719 ~ 740, 679 ~ 697
	BIP-77 (B1c-77 + B2-77)	CCAAGACAAATGCCGCTTGAAGTTGATGGAGTGTGTGA	753 ~ 772, 815 ~ 832
	F3-88	GACTTTCCTTTTATCATCGGT	703 ~ 723
	B3-88	GATGGTCTGGTTTATGTCTC	878 ~ 897
	FIP-88 (F1c-88 + F2-88)	GCAAAGAGAGCAATTCAAGCGTTTTCCAGGAAGAGATCCT	766 ~ 786, 724 ~ 742
IV	BIP-88 (B1c-88 + B2-88)	AATCACACACTCCATCAACTTGGGAAGGGAGATACTAAGTCACT	813 ~ 834, 854 ~ 874
	CPsV-F	GGGACTTTCCTTTTATCATCGG	701 ~ 722
	CPsV-R	GCTGGAACAAAGATACTGGATGG	893 ~ 915

1.4 RT-LAMP 反应条件的优化

反应温度设置为 58、60、62、64、66 和 68 $^{\circ}$ C; 反应时间为 30、40、50、60、70 和 80 min; FIP/BIP : F3/B3 引物浓度比为 2 : 1、4 : 1、6 : 1、8 : 1、10 : 1 和 12 : 1 (Lu et al., 2018)。根据试验结果筛选出 RT-LAMP 的反应温度、反应时间和内外引物比最佳组合。

1.5 产物鉴定

将 RT-LAMP 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离后, 切取大小 200 bp 左右的条带, 用胶回收试剂盒回收目标片段连接于 pEASY-T1 载体, 连接产物转入 Trans1-T1 感受态细胞, 选取阳性克隆送重庆擎科兴业生物技术有限公司测序验证, 将测序结果在 NCBI 数据库进行比对。

1.6 RT-LAMP 特异性测定

分别提取健康的以及感染 CPsV、CTV、CYVCV、CLBV 和 HLB 的柑橘样品的总核酸为模板, 用建立的 RT-LAMP 检测体系进行检测。

1.7 灵敏度测定

将提取 CPsV 的柑橘样品总 RNA 经 Nandrop2000 进行浓度测试, 并将其以 10 倍梯度稀释至 10⁻⁴ 后作为模板, 分别用于 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测。

1.8 RT-LAMP 检测方法的应用

提取从湖南、云南、广西、重庆、江西和四川采集的 87 份疑似 CPsV 样品的总核酸，分别用优化的 RT-LAMP 的检测体系和 RT-PCR 的方法进行检测，琼脂糖凝胶电泳检验反应产物，并对阳性样品进行克隆测序验证。

2 结果与分析

2.1 柑橘鳞皮病毒 RT-LAMP 检测引物的筛选

根据在线引物设计软件设计了 4 组引物，参考 WarmStart[®] LAMP Kit 给出的引物配比等试验条件：WarmStart LAMP 2 × Mix 12.5 μL，10 μmol · L⁻¹ F3/B3 0.5 μL，10 μmol · L⁻¹ FIP/BIP 4 μL，RNA 2 μL 加水补足至 25 μL。60 °C 扩增 60 min，其中 F3-5/B3-5、FIP3-5/BIP3-5 的引物组合扩增条带相对于其他引物组合更加清晰，因此确定该引物组合为最优引物组合。

2.2 CPsV RT-LAMP 最佳反应温度、时间以及内外引物比的确定

参考 WarmStart[®] LAMP Kit 给出的反应体系，分别对反应温度和时间进行优化。如图 1 所示，CPsV RT-LAMP 在 58 ~ 68 °C 均有扩增，60 °C 时条带呈明显的阶梯状且在 100 ~ 200 bp 左右扩增条带明显；40 ~ 80 min 均有产物产出，且 60 min 后的产出量没有明显的增加。引物优化结果显示，不同引物浓度比均有扩增，结合 WarmStart[®] LAMP Kit 给出的内外引物浓度比为 8 : 1。因此，确定该反应条件为温度 60 °C、时间 60 min、内外引物浓度比为 8 : 1。

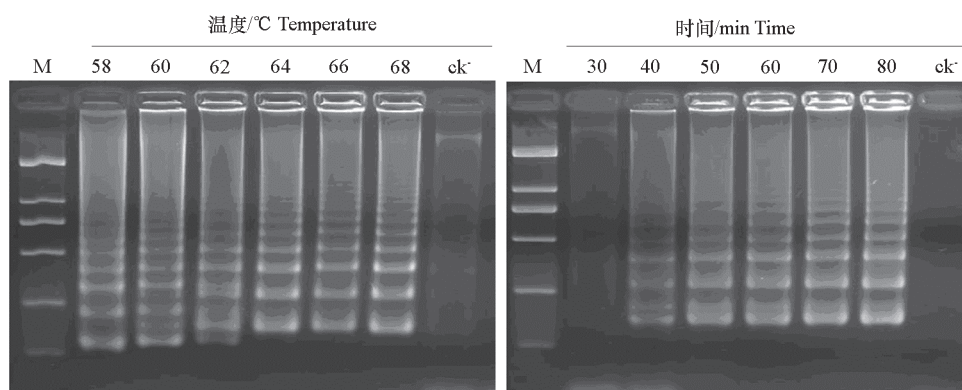


图 1 CPsV RT-LAMP 最佳反应温度、时间筛选

ck⁻: 负对照; M: 分子量标记 2 000 bp。

Fig. 1 Screening of the optimal temperature, time for RT-LAMP

ck⁻: Negative control; M: Molecular marker 2 000 bp.

2.3 产物鉴定

将西南大学柑桔研究所提供的感染 CPsV 的柑橘叶片样品的 LAMP 产物电泳分离后，切取 200 bp 左右的条带进行克隆，测序结果显示所克隆的片段大小为 206 bp。在 NCBI 数据库中进行序列比对结果表明，其与 CPsV 代表株系 P-121 的核苷酸同源性为 96%，说明获得的序列为 CPsV 的基因组

序列。

2.4 特异性验证

用建立的 LAMP 方法检测感染了 CTV、CYVVCV、CLBV、HLB 和 CPsV 的样品，只有感染了 CPsV 的样品检测结果有阳性条带（图 2），表明本体系可以特异地检测 CPsV。

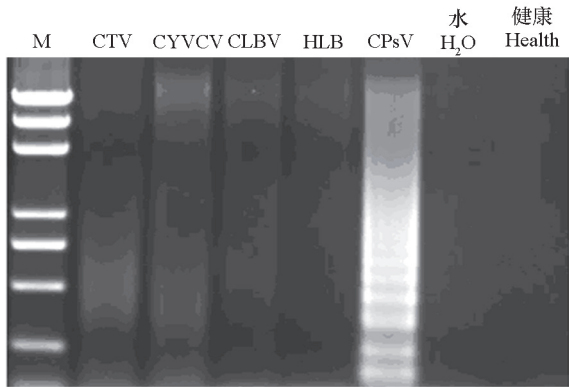


图 2 CPsV RT-LAMP 检测特异性
Fig. 2 Specificity analysis of CPsV RT-LAMP assay

2.5 灵敏度验证

选取了 1 个经测定感染 CPsV 样品的抽提物（核酸总浓度为 $2.0 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ），经 10 倍梯度稀释后的检测结果（图 3）显示，RT-LAMP 和 RT-PCR 可检测的最小核酸浓度分别为 2.0×10^{-2} 和 $2.0 \times 10^{-1} \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ，因此，RT-LAMP 的灵敏度是 RT-PCR 灵敏度的 10 倍。

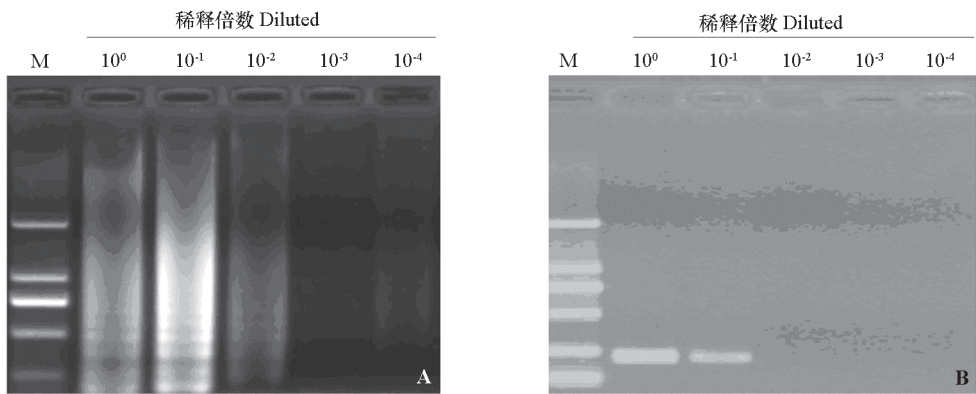


图 3 CPsV 的 RT-LAMP (A) 与 RT-PCR (B) 灵敏度对比
Fig. 3 Comparative analysis of the sensitivity between RT-LAMP (A) and RT-PCR (B) for CPsV

2.6 RT-LAMP 方法的应用

运用 RT-LAMP 法对从湖南、云南、广西、重庆、江西和四川采集的 87 份疑似样品进行检测，有 5 份检测到 CPsV，检出率为 5.7%。且 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测结果一致（表 2）。阳性样品测序结果显示，湖南沃柑和云南茂谷柑与 MG673946（NCBI）的序列相似性分别为 94%和 92%。

表 2 田间样品检测结果
Table 2 Detection results of field samples

地区 Region	品种 Variety	样品株数 Number of samples	阳性株数 Positive number	
			RT-LAMP	RT-PCR
湖南 Hunan	沃柑 Orah	10	4	4
云南 Yunnan	茂谷柑 Murcott	30	1	1
广西 Guangxi	沃柑 Orah	7	0	0
重庆 Chongqing	德维特 Oweet Orange	15	0	0
江西 Jiangxi	纽荷尔 Navel Orange	10	0	0
四川 Sichuan	大雅 Daya	15	0	0

3 讨论

CPsV 是蛇形病毒属 (*Ophiovirus*) 的代表种, 在地中海地区和南美洲地区分布比较广, 目前该病毒的传播介质还不清楚, 因此对该病的防治困难较大 (Achachi et al., 2014)。本研究中通过对 CPsV 序列的分析, 在 CP 基因处设计了 4 组特异性引物, 经过引物筛选, 反应体系的优化, 建立了特异的用于检测 CPsV 的 RT-LAMP 方法。该方法仅需 1 台水浴锅在 60 min 内就可完成反应, 而 RT-PCR 的反应时间为 2 h 左右, 由于具有简单、方便、快捷的特点, 比较适合基层检测人员的使用。通过灵敏度比较发现, RT-LAMP 的灵敏度是 RT-PCR 灵敏度的 10 倍, 利用 RT-LAMP 检测不同的病原微生物灵敏度存在差异, 如检测柑橘褪绿矮化相关病毒 (*Citrus chlorotic dwarf-associated virus*, CCDaV) 的灵敏度是 RT-PCR 方法的 100 倍 (刘科宏 等, 2017)、检测 CYVCV 是 RT-PCR 方法的 10 倍 (刘科宏 等, 2015)、检测苹果褪绿叶斑病毒 (*Apple chlorotic leaf spot virus*, ACLSV) 是 RT-PCR 的 100 倍 (张双纳 等, 2018)、检测甜瓜黄斑病毒 (*Melon yellow spot virus*, MYSV) 是 RT-PCR 的 100 倍 (李战彪 等, 2017)、检测马铃薯 S 病毒 (*Potato virus S*, PVS) 是 RT-PCR 的 100 倍 (李华伟 等, 2018)、检测甘薯羽状斑驳病毒 (*Sweet potato feathery mottle virus*, SPFMV) 是 RT-PCR 的 10 倍 (姜珊珊 等, 2018)。本试验中设计的引物 FIP/BIP 可以形成二聚体结构, 而且 F2 的 5'端至 F1c 的 5'端的距离为 24 bp (小于要求的 40 ~ 60 bp), 这可能是造成本研究中 RT-LAMP 灵敏度是 RT-PCR 10 倍的原因。

沃柑具有树势强、适应性广、抗病性强、早结丰产及果实外观漂亮、品质优良等特点, 在广西、重庆、四川、云南等地快速推广。陈国庆等 (1996) 对中国在摩洛哥引进的血橙上的柑橘环斑病毒进行了指示植物鉴定, 但没有进行基因组序列测定, 因此不能完全断定为柑橘鳞皮病毒。这是首次在中国柑橘苗木上检测到 CPsV, 可能是由于近几年在中国大面积推广种植沃柑品种时地区之间不规范引种或高接换种嫁接造成的。

References

- Achachi A, Ait Barka E, Ibriz M. 2014. Recent advances in *Citrus psorosis virus*. *Virus Disease*, 25 (3): 261 - 276.
- Achachi A, Jijakli M H, Fahime E E, Soulaymani A, Ibriz M. 2015. Detection of *Citrus psorosis virus*, using an improved one-step RT-PCR. *Arabian Journal for Science & Engineering*, 40 (1): 7 - 13.
- Barthe G A, Ceccardi T L, Manjunath K L, Derrick K S. 1998. *Citrus psorosis virus*: nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. *The Journal of General Virology*, 79 (6): 1531 - 1537.
- Chen Guo-qing, Wang Hong-xiang, Yan Sen-xiang. 1996. The occurrence and biochemical identification of citrus ringspot disease. *Zhejiang Citrus*, 13 (3): 43. (in Chinese)

- 陈国庆, 王洪祥, 严森祥. 1996. 柑桔环斑病的发生与生物学鉴定初报. 浙江柑橘, 13 (3): 43.
- Duan Shuo. 2013. Establishment of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detecting *Citrus tatter leaf virus* and its prokaryotic expression of coat protein gene[M. D. Dissertation]. Chongqing: Southwest University. (in Chinese)
- 段 硕. 2013. 柑橘碎叶病毒 RT-LAMP 检测体系建立及其外壳蛋白基因的原核表达 [硕士论文]. 重庆: 西南大学.
- García M L, Bó E D, a Graça J V, Gago-Zachert S, Hammond J, Moreno P, Natsuaki T, Pallás V, Navarro J A, Reyes C A, Luna G R, Sasaya T, Tzannetakis I E, Vaira A M, Verbeek M. 2017. ICTV virus taxonomy profile: *Ophioviridae*. Journal of General Virology, 98: 1161 – 1162.
- Huang Li, Su Hua-nan, Tang Ke-zhi, Huang Ai-jun, Zhou Chang-yong, Li Zhong-an. 2012. Establishment and application of loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of Citrus Huanglongbing. Journal of Fruit Science, 29 (6): 1121 – 1126. (in Chinese)
- 黄 丽, 苏华楠, 唐科志, 黄爱军, 周常勇, 李中安. 2012. 柑橘黄龙病 LAMP 快速检测方法的建立及应用. 果树学报, 29 (6): 1121 – 1126.
- Jiang Shan-shan, Feng Jia, Zhang Mei, Wang Sheng-ji, Xin Zhi-mei, Wu Bin, Xin Xiang-qi. 2018. Development of RT-LAMP assay for rapid detection of *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV). Scientia Agricultura Sinica, 51 (7): 1294 – 1302. (in Chinese)
- 姜珊珊, 冯 佳, 张 眉, 王升吉, 辛志梅, 吴 斌, 辛相启. 2018. 甘薯羽状斑驳病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立. 中国农业科学, 51 (7): 1294 – 1302.
- Li Huawei, Xu Yongqing, Luo Wenbin, Ji Rongchang, Liu Zhonghua, Xu Guo-chun, Zhang Hong, Li Guoliang, Lin Zhaomiao, Qiu Yong-xiang, Qiu Sixin, Tang Hao. 2018. Establishment of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Potato virus S* rdinary strain. Acta Horticulturae Sinica, 45 (8): 1613 – 1620. (in Chinese)
- 李华伟, 许泳清, 罗文彬, 纪荣昌, 刘中华, 许国春, 张 鸿, 李国良, 林赵淼, 邱永祥, 邱思鑫, 汤 浩. 2018. 马铃薯 S 病毒 PVS⁰ 株系 RT-LAMP 检测方法的建立及应用. 园艺学报, 45 (8): 1613 – 1620.
- Li Zhanbiao, Xie Huiting, Cui Lixian, Su Qin, Qin Bixia, Yang Shian, Deng Tiejun, Cai Jianhe. 2017. Establishment of reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Melon yellow spot virus*. Acta Horticulturae Sinica, 44 (5): 1005 – 1010. (in Chinese)
- 李战彪, 谢慧婷, 崔丽贤, 苏 琴, 秦碧霞, 杨世安, 邓铁军, 蔡健和. 2017. 甜瓜黄斑病毒 (MYSV) RT-LAMP 快速检测方法的建立. 园艺学报, 44 (5): 1005 – 1010.
- Liu Kehong, Chen Hongming, Zhou Yan, Li Zhongan. 2015. Establishment of RT-LAMP assay for detection of *Citrus yellow vein clearing virus*. Acta Horticulturae Sinica, 42 (5): 997 – 1002. (in Chinese)
- 刘科宏, 陈洪明, 周 彦, 李中安. 2015. 柑橘黄化脉明病毒 RT-LAMP 检测方法的建立. 园艺学报, 42 (5): 997 – 1002.
- Liu Kehong, Chen Hongming, Zhou Yan, Song Zhen, Li Zhongan. 2017. Establishment of LAMP assay for detection of *Citrus chlorotic dwarf-associated virus* (CCDaV). Acta Horticulturae Sinica, 44 (5): 999 – 1004. (in Chinese)
- 刘科宏, 陈洪明, 周 彦, 宋 震, 李中安. 2017. 柑橘褪绿矮化相关病毒 LAMP 检测体系的建立. 园艺学报, 44 (5): 999 – 1004.
- Lu Yongcan, Yao Bingyu, Wang Guoping, Hong Ni. 2018. The detection of ACLSV and ASPV in pear plants by RT-LAMP assays. Journal of Virological Methods, 252: 80 – 85.
- Martín S, Alioto D, Milne R G, Guerri J, Moreno P. 2002. Detection of *Citrus psorosis virus* in field trees by direct tissue blot immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. Plant Pathology, 51 (2): 134 – 141.
- Martín S, Alioto D, Milne R G, Garnsey S M, García M L, Grau O, Guerri J, Moreno P. 2004. Detection of *Citrus psorosis virus*, by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. European Journal of Plant Pathology, 110 (7): 747 – 757.
- Naum-Onganía G, Gago-Zachert S, Peña E, Grau O, Garcia M L. 2003. *Citrus psorosis virus* RNA 1 is of negative polarity and potentially encodes

- in its complementary strand a 24K protein of unknown function and 280K putative RNA dependent RNA polymerase. Virus Research, 96 (1): 49 - 61.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research, 28 (12): E63.
- Palle S R, Miao H, Seyran M, Louzada E S, Graca J V D, Skaria M. 2005. Evidence for association of *Citrus psorosis virus* with symptomatic trees and an Olpidium-like fungus in Texas. International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957—2010), 16: 423 - 426.
- Robles Luna G, Peña E J, Borniego M B, Heinlein M, Garcia M L. 2013. Ophioviruses CPsV and MiLBVV movement protein is encoded in RNA 2 and interacts with the coat protein. Virology, 441 (2): 152 - 161.
- Roistacher C N. 1993. Psorosis - a review//Moreno P, da Graca J V, Timmer L W. Proceedings of 12th conference on international organisation of citrus virologists. Riverside: University of California: 139 - 154.
- Vaira A M, Hansen M A, Murphy C, Reinsel M D, Hammond J. 2009. First report of *Freesia sneek virus* in *Freesia* sp. in Virginia. Plant Disease, 93 (9): 965.
- Vaira A M, Kleynhans R, Hammond J. 2007. First report of *Freesia sneek virus* infecting *Lachenalia* cultivars in South Africa. Plant Disease, 91 (6): 770.
- Warghane A, Misra P, Bhos S, Biswas K K, Sharma A K, Reddy M K, Ghosh D K. 2017. Development of a simple and rapid reverse transcription-loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for sensitive detection of *Citrus tristeza virus*. Journal of Virological Methods, 250: 6 - 10.
- Zhang Lun, Yin You-ping, Wu Yu-jia, Wang Zhong-kang. 2013. Regular LAMP and fast LAMP for the detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Plant Protection, 39 (3): 95 - 101. (in Chinese)
- 张 仑, 殷幼平, 吴瑜佳, 王中康. 2013. 柑橘溃疡病菌的普通 LAMP 及快速 LAMP 检测方法的建立. 植物保护, 39 (3): 95 - 101.
- Zhang Shuang-na, Li Zheng-nan, Fan Xu-dong, Zhang Zun-ping, Ren Fang, Hu Guo-jun, Dong Ya-feng. 2018. Establishment of RT-LAMP assay for detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV). Scientia Agricultura Sinica, 51 (9): 1706 - 1716. (in Chinese)
- 张双纳, 李正男, 范旭东, 张尊平, 任 芳, 胡国君, 董雅凤. 2018. 苹果褪绿叶斑病毒 RT-LAMP 检测方法的建立. 中国农业科学, 51 (9): 1706 - 1716.