

# 桑脉带相关病毒 RT-LAMP 检测方法的建立

吴凡<sup>1</sup>, 李杨秀<sup>1</sup>, 黄海娟<sup>2</sup>, 陈保善<sup>3</sup>, 蒙姣荣<sup>1,3\*</sup>

(1. 广西大学农学院, 南宁 530005; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530005;  
3. 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 南宁 530005)

**摘要** 桑脉带相关病毒 Mulberry vein banding-associated virus (MVBaV) 是广西桑树病毒病的主要病原病毒。本研究根据 MVBaV 基因组的核外壳蛋白 (nucleocapsid protein, N) 基因序列设计了 5 组引物, 筛选获得了 1 组有效引物, 建立了该病毒的反转录环介导等温扩增技术 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP) 检测方法。该方法能在恒温条件 (63℃) 下 1 h 内检测 MVBaV, 其灵敏度是 RT-PCR 检测方法的 10 倍。对 6 个田间样品进行 RT-LAMP 检测, 其结果与 RT-PCR 的结果一致。该方法可直接在反应管中加入 SYBR Green I, 通过颜色变化即可判定结果, 无需经过琼脂糖电泳或专门仪器, 具有灵敏、快速和特异性好的优点, 可应用于 MVBaV 的快速诊断及其田间监测。

**关键词** 桑脉带相关病毒; 反转录环介导等温扩增技术; 检测方法

中图分类号: S 888.71 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2018063

## Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the detection of Mulberry vein banding-associated virus

WU Fan<sup>1</sup>, LI Yangxiu<sup>1</sup>, HUANG Haijuan<sup>2</sup>, CHEN Baoshan<sup>3</sup>, MENG Jiaorong<sup>1,3</sup>

(1. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530005, China; 3. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Nanning 530005, China)

**Abstract** Mulberry vein banding-associated virus (MVBaV) is one of the main pathogenic viruses infecting mulberry in Guangxi. Five sets of specific primers were designed based on MVBaV nucleocapsid protein (N) gene for reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay, and one feasible set of primers was selected. The RT-LAMP method was developed for the detection of MVBaV from mulberry. In the RT-LAMP method, MVBaV genomic RNA could be amplified under isothermal conditions (63℃) within 1 h, and was 10 times more sensitive than RT-PCR. Consistent results of six mulberry samples from the field were obtained by the RT-LAMP and RT-PCR assay, suggesting the reliability of RT-LAMP in MVBaV detection. The results were validated by the measurement or observation of the color of the reaction mixture after adding SYBR Green I without gel electrophoresis or special equipments. This RT-LAMP method enabled sensitive, rapid and specific detection of MVBaV and could be applied for the rapid diagnosis and surveillance of MVBaV in the field.

**Key words** mulberry vein banding-associated virus; RT-LAMP; detection method

桑树病毒病是桑园常见的一类病害, 在广西桑蚕区发生严重, 发生率为 40% 左右, 是广西桑树的主要病害之一, 严重影响广西桑蚕业的发展<sup>[1-2]</sup>。桑脉带相关病毒 Mulberry vein banding-associated virus (MVBaV) 是番茄斑萎病毒属 *Tospovirus* 成员,

是广西桑树病毒病主要病原病毒<sup>[3-4]</sup>。病毒检测在了解病毒分布、病害发生规律及品种抗性评估中均具有重要意义, 是病害预防与防治研究的重要基础<sup>[5]</sup>。目前尚未有针对 MVBaV 检测方法进行系统研究的报道。

植物病原物的检测方法主要有酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、PCR 技术、小 RNA 深度测序以及环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等<sup>[5-8]</sup>。ELISA 检测需要制备高质量的病毒血清, 且检测时间长, 灵敏度低<sup>[7]</sup>; PCR 技术以及小 RNA 深度测序等具有灵敏度高的优点<sup>[6-7]</sup>, 但是需要购买专门的仪器, 且费用昂贵。LAMP 技术则可以恒温条件下对靶基因进行扩增, 反应结束后加入荧光染料即可观察到结果, 具有检测速度快、灵敏度高和无需专业仪器等优点<sup>[8-9]</sup>。RT-LAMP 检测是在 LAMP 检测的基础上加入反转录酶, 在同一温度条件下实现反转录及核酸扩增<sup>[10]</sup>。多数的植物病毒是 RNA 病毒, RT-LAMP 已被广泛应用于植物病毒病的诊断与病毒检测<sup>[10-15]</sup>。本研究依据 MVBaV 基因组 N 基因的序列, 设计、筛选该病毒 RT-LAMP 检测体系的特异引物, 评估其特异性及灵敏性, 并进行田间样品检测应用, 以期对桑脉带病毒病的早期诊断、预测预报及防控决策等提供方便、快捷的检测技术。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

具有典型脉带症状的桑脉带病毒病样品采集于广西忻城县并移栽种植于广西大学桑园, 疑似 MVBaV 感染样品及健康桑叶样品采集自广西大学桑园; 番茄环纹斑点病毒 Tomato zonate spot virus (TZSV) 侵染的烟草样品采自广西靖西烟田、朱顶红褪绿环斑病毒 *Hippeastrum chlorotic ringspot virus* (HCRV) 侵染的水鬼蕉, 采自广西大学校园。以上样品均经过 RT-PCR 检测验证, 置于  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。携带 N 基因的质粒 S-XCSY-1-7 由亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室构建并保存<sup>[3]</sup>。

Loopamp 脱氧核糖核酸扩增试剂盒、核糖核酸扩增试剂盒购自荣研生物科技 (中国) 有限公司。Bst DNA polymerase、硫酸镁由 New England Biolabs 公司生产; AMV 逆转录酶购自 Promega 公司; RNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; SYBR Green I (10 000  $\times$ ) 购自上海索莱宝生物科技有限公司; 一步法 RT-PCR Kit 购自诺唯赞生物科技有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 引物设计

依据 MVBaV 的 N 基因序列 (KM819701.1)<sup>[3]</sup>, 利用 LAMP 在线引物设计网页 Primer Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>), 设计 5 组 LAMP 引物, 同时设计一对引物 MVBaV-N-F 和 MVBaV-N-R 特异扩增 N 基因, 用于 MVBaV RT-PCR 检测, 该引物目的片段大小为 800 bp。所有引物序列见表 1, 由北京奥科鼎盛生物合成。

### 1.2.2 总 RNA 的提取

参照天根生化科技 (北京) 有限公司总 RNA 提取试剂盒说明书分别提取所有植物样品的总 RNA, 分别用于 MVBaV 的 RT-PCR 扩增和 RT-LAMP 检测。

### 1.2.3 MVBaV 的 RT-PCR 检测

参照诺唯赞生物科技有限公司的一步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行操作。反应体系  $50.0\ \mu\text{L}$ , 依次加入  $2\times$  One Step Mix  $25.0\ \mu\text{L}$ , One Step Enzyme Mix  $2.5\ \mu\text{L}$ , MVBaV-N-F、MVBaV-N-R 各  $1.0\ \mu\text{L}$  (浓度为  $10.0\ \mu\text{mol/L}$ ), 模板总 RNA  $1.0\ \mu\text{L}$ , 加水至  $50.0\ \mu\text{L}$ 。反应条件为:  $50^{\circ}\text{C}$  反转录 30 min;  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $56^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 55 s, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  终延伸 7 min。取  $1.0\ \mu\text{L}$  产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.4 MVBaV 的 LAMP 及 RT-LAMP 反应体系

LAMP 反应体系为  $25.0\ \mu\text{L}$ :  $2\times$  反应缓冲液 (RM)  $12.5\ \mu\text{L}$ , 酶溶液 (EM)  $1.0\ \mu\text{L}$ , FIP、BIP 各  $2.0\ \mu\text{L}$  (浓度为  $20.0\ \mu\text{mol/L}$ ), F3、B3 各  $0.5\ \mu\text{L}$  (浓度为  $20.0\ \mu\text{mol/L}$ ), 质粒 DNA 模板 (质粒 S-XCSY-1-7, 浓度  $10\ \text{ng}/\mu\text{L}$ )  $1.0\ \mu\text{L}$ , 去离子水补足  $25.0\ \mu\text{L}$ 。  $63^{\circ}\text{C}$  反应 60 min,  $80^{\circ}\text{C}$  5 min。反应结束, 取  $1.0\ \mu\text{L}$  产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。LAMP 反应体系用于筛选 LAMP 检测引物组。

RT-LAMP 反应体系  $25.0\ \mu\text{L}$ : Bst DNA polymerase  $1.0\ \mu\text{L}$ ,  $10\times$  Bst Buffer  $2.5\ \mu\text{L}$ ,  $\text{MgSO}_4$   $1.5\ \mu\text{L}$ , Betaine  $1.0\ \mu\text{L}$  ( $1.0\ \text{mol/L}$ ), AMV  $1.0\ \mu\text{L}$ , RNase Inhibitor  $1.0\ \mu\text{L}$ , FIP、BIP 各  $2.0\ \mu\text{L}$  (浓度为  $20.0\ \mu\text{mol/L}$ ), F3、B3 各  $0.5\ \mu\text{L}$  (浓度为  $20.0\ \mu\text{mol/L}$ ), dNTPs  $3.5\ \mu\text{L}$  ( $10\ \text{mmol/L}$ ), 总 RNA 模板, 加 RNase Free  $\text{H}_2\text{O}$  至  $25.0\ \mu\text{L}$ , 充分混匀。  $63^{\circ}\text{C}$  反应 60 min,  $80^{\circ}\text{C}$  灭活 5 min。反应结束, 取  $1.0\ \mu\text{L}$  产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳, 同时向 RT-LAMP 产物中加入  $2.0\ \mu\text{L}$  SYBR Green I (稀释 10 倍), 直接观察, 绿色为阳性, 橙色为阴性。

表 1 用于检测 MVBaV 的 RT-LAMP 及 RT-PCR 引物序列表

Table 1 Primer sequences used for RT-LAMP and RT-PCR assay of MVBaV

引物组 Primer set	引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Sequence	引物位置 Primer location
MVBaV- LAMP-I	F3 B3	AGCAAGAGGGAAAAACAATTGG AGATGATCCGGATGGTCGA	2 709-2 729 2 920-2 902
	FIP(F1c+F2) BIP(B1c+B2)	CTTGTGCATTGAGGCTGATGCTAT-GCTTTGAAGCTGGATAGAAGAGAC AGGTGGGGCATTTAGACCATAAGCA-AGCAAGCAACGAATCCAAAT	2 800-2 777, 2 737-2 760 2 811-2 835, 2 895-2 876
MVBaV- LAMP-II	F3 B3	GGATTGCTCTCGCTCAACAT GTCTTCTATCCAGCTTCAAAG	2 545-2 564 2 760-2 738
	FIP(F1c+F2) BIP(B1c+B2)	GGCTAAAGTTCCTTTCAGCTGCTCAA-CTTAAGTCTTCTCAAAGAGAGTC ACACCTGCTCATAAGTGGAGAAGTT-CCAATTGTTTTCCCTCTTGCTTAC	2 637-2 613, 2 565-2 589 2 645-2 669, 2 729-2 706
MVBaV- LAMP-III	F3 B3	GAGACTTCTTCTTAGAATTCTCACC GTGCAAAGTGGCTAAAGTTCT	2 426-2 450 2 646-2 626
	FIP(F1c+F2) BIP(B1c+B2)	CGCTGAAGAAGTATGATGAGCAAGT-CATCCACAACAAGTGAAGAGCT GCTGGCAGTTCTGGATGCT-TTGACTTTCAGGGAGACTCAAGA	2 524-2 500, 2 456-2 477 2 532-2 552, 2 611-2 588
MVBaV- LAMP-IV	F3 B3	CGCTCAACATCTTAACTGCTTC GTCTTCTATCCAGCTTCAAAG	2 555-2 576 2 760-2 738
	FIP(F1c+F2) BIP(B1c+B2)	GCAAAGTGGCTAAAGTTCCTTTCAGC-CAAAGAGAGTCTTGAAGTCTCCCT ACACCTGCTCATAAGTGGAGAAGTT-CCAATTGTTTTCCCTCTTGCTTAC	2 644-2 620, 2 579-2 602 2 645-2 669, 2 729-2 706
MVBaV- LAMP-V	F3 B3	AGAGACAGAGGTCCTCCAATG CAATGCCGGATTGATGATTG	2 755-2 775 2 976-2 956
	FIP(F1c+F2) BIP(B1c+B2)	CCTTTGGTGTCTGCTTATGGTCTA-TAGCATCAGCCTCAATGCACAA ATTTGGATTCTGTTGCTTGTGC-ACTGAGGCACTCATCAGAGTT	2 846-2 823, 2 778-2 799 2 876-2 897, 2 942-2 922
	MVBaV-N-F MVBaV-N-R	ATGTCTACCGTCCGTCAGCTG ACTTCTATAGAATTAGAAGTGCTGG	3 227-3 207 2 398-2 423

1.2.5 RT-LAMP 特异性和灵敏度测定

提取 TZSV 和 HCRV 阳性样品的总 RNA,使用本研究筛选获得的 RT-LAMP 引物按照“1.2.4”的反应体系进行 RT-LAMP 检测,评估引物特异性;提取感染桑脉带病毒病并且已经显症的桑叶样品总 RNA,并将总 RNA 进行 10 倍梯度稀释,共设 10.0 ng/ $\mu$ L、1.0 ng/ $\mu$ L、100.0 pg/ $\mu$ L、10.0 pg/ $\mu$ L、1.0 pg/ $\mu$ L、100.0 fg/ $\mu$ L 和 10.0 fg/ $\mu$ L 共 7 个梯度,分别按照“1.2.3”进行 RT-PCR 检测和“1.2.4”进行 RT-LAMP 检测,通过比较其最低检测量评估灵敏度。

1.2.6 MVBaV 病株的检测

提取田间采集的 MVBaV 病株或疑似病株的总 RNA,分别按照“1.2.3”进行 RT-PCR 检测和“1.2.4”进行 RT-LAMP 检测。

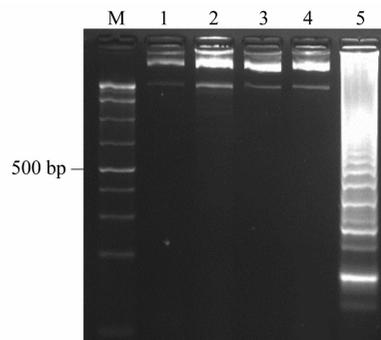
2 结果与分析

2.1 引物筛选及 RT-LAMP 体系的建立

使用所设计的 5 组候选引物组(表 1),以携带 MVBaV-N 基因重组质粒 S-XCSY-1-7 为模板,在 63 $^{\circ}$ C 恒温条件下 LAMP 反应。LAMP 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,第 V 组引物组的反应产物可见典型的 LAMP 反应阶梯状条带,而第 I

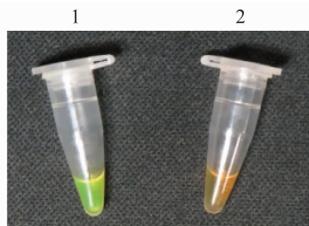
~IV 组引物组的反应产物除了一些疑似模板 DNA 的条带,没有可见阶梯状条带(图 1)。因此选择第 V 组引物组进行下一步的 RT-LAMP 检测。

分别以感染 MVBaV 的桑叶及健康桑叶(均经过 RT-PCR 方法确认)的总 RNA 为模板,利用第 V 组引物组,63 $^{\circ}$ C 恒温条件下进行 RT-LAMP 反应 1 h,80 $^{\circ}$ C 处理 5 min 终止反应,向 RT-LAMP 反应液中加入 SYBR Green I,阳性样品变成绿色,阴性样品为橙色(图 2)。



M: Gene Ruler 1 kb plus Ladder; 1~5: 表1所列 I~V 引物组  
M: Gene Ruler 1 kb plus Ladder; 1-5: Primer sets in table 1

图 1 不同 LAMP 引物组扩增结果电泳分析  
Fig. 1 Electrophoresis analysis of amplified products using different primer sets



1: 感染MVBaV的桑叶; 2: 健康桑叶  
1: Mulberry infected by MVBaV; 2: Healthy mulberry

图 2 MVBaV 的一步法 RT-LAMP 可视化检测

Fig. 2 One-step RT-LAMP assay of MVBaV by addition of SYBR Green I stain for visual inspection

## 2.2 RT-LAMP 检测方法的特异性

以 MVBaV 阳性样品为对照, 对 TZSV、HCRV 阳性样品进行 RT-LAMP 检测。结果显示, 只有 MVBaV 阳性样品为绿色, TZSV 与 HCRV 阳性样品为橙色(图 3), RT-LAMP 仅检测出目标 MVBaV, 不能检测出 TZSV 和 HCRV, 表明 MVBaV 的 RT-LAMP 引物具有较强的特异性。



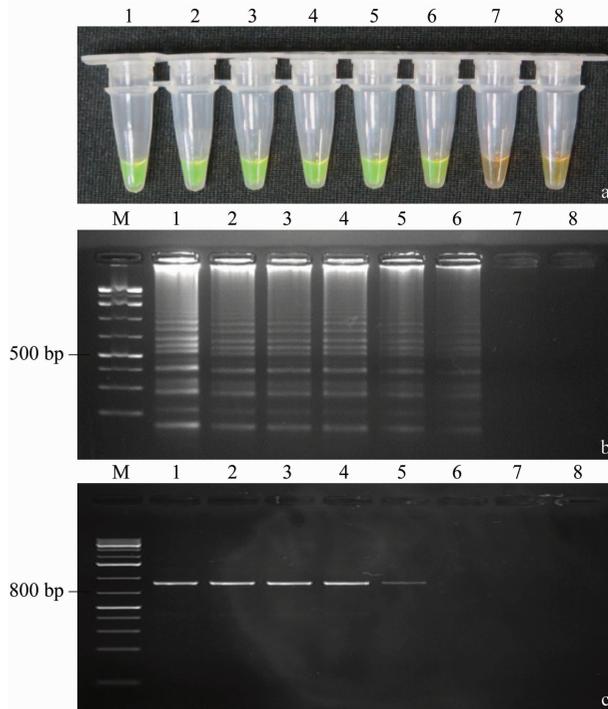
1: 感染MVBaV的桑叶(阳性对照); 2: 感染TZSV的烟草; 3: 感染HCRV的水鬼蕉  
1: MVBaV-infected mulberry as a positive control; 2: TZSV-infected tobacco; 3: HCRV-infected *Hymenocallis littoralis*

图 3 MVBaV 的一步法 RT-LAMP 特异性检测

Fig. 3 Specificity of one-step RT-LAMP for the detection of MVBaV

## 2.3 RT-LAMP 检测方法的灵敏度

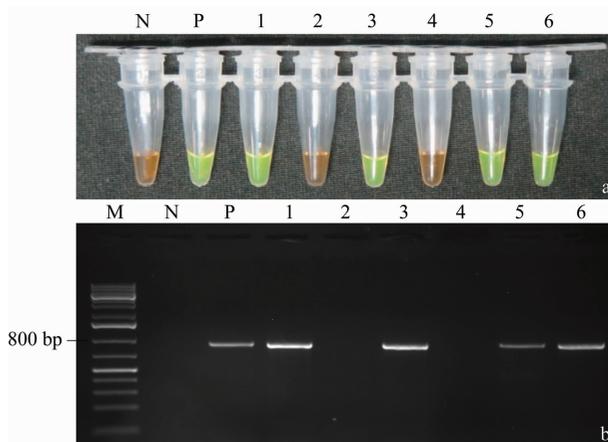
提取 MVBaV 感染的桑病叶组织总 RNA, 使用微量分光光度计测定其浓度并按照 10 倍比例稀释, 共设 7 个梯度, 分别进行 RT-LAMP 检测和 RT-PCR 检测。结果显示, 使用 RT-LAMP 方法检测, 当模板含量为 100 fg 时, 反应液呈绿色(阳性反应), 电泳时条带清晰可见(图 4a~b); 使用 RT-PCR 方法检测, 采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 扩增产物, 当模板含量为 1 pg 时, 扩增条带较弱; 当模板含量为 100 fg 时, 已无明显的可见特性条带(图 4c)。RT-LAMP 检测方法比 RT-PCR 检测方法的灵敏度高 10 倍。



a: RT-LAMP反应管; b: 电泳检测RT-LAMP产物; c: 电泳检测RT-PCR产物。M: Gene Ruler 1 kb plus Ladder; 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 100 pg; 4: 10 pg; 5: 1 pg; 6: 100 fg; 7: 10 fg; 8: 阴性对照  
a: Reaction tubes of RT-LAMP; b: Electrophoresis of RT-LAMP products; c: Electrophoresis of RT-PCR products. M: Gene Ruler 1 kb plus Ladder; 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 100 pg; 4: 10 pg; 5: 1 pg; 6: 100 fg; 7: 10 fg; 8: Negative control

图 4 MVBaV 一步法 RT-LAMP 检测与 RT-PCR 检测的灵敏度检测

Fig. 4 Detection sensitivity of MVBaV by one-step RT-LAMP and RT-PCR



M: Gene Ruler 1 kb plus Ladder; N: 阴性对照; P: 阳性对照; 1~6: 桑园采集的待测样品  
M: Gene Ruler 1 kb plus Ladder; N: Negative control; P: Positive control; 1~6: Six mulberry samples from the field

图 5 6 份桑树样品的 MVBaV RT-LAMP 检测(a)和 RT-PCR 检测(b)

Fig. 5 MVBaV detection in six mulberry samples by one-step RT-LAMP (a) and RT-PCR (b)

## 2.4 MVBaV RT-LAMP 检测方法的应用

采用 RT-LAMP 对 6 份田间样品进行检测。结果显示,1、3、5、6 号样品显示为绿色,表明这 4 个样品中带有 MVBaV(图 5a),2、4 号样品显示为橙色,表明这 2 个样品中没有 MVBaV。进一步 RT-PCR 进行验证,其结果显示 1、3、5、6 号样品可扩增出约 800 bp 的特异性条带(图 5b),2、4 号样品无可见条带,与 RT-LAMP 结果一致。值得一提的是,3 号样品为无明显症状的隐症样品,说明 RT-LAMP 方法检测到隐症样品中的目标病毒。

## 3 讨论

本研究以 MVBaV N 基因为靶标,建立了该病毒的 RT-LAMP 检测技术,该技术可以直接检测桑叶中的 MVBaV,可用于桑脉带病毒病的快速诊断及 MVBaV 检测。桑树病毒病在田间具有花叶状、环斑状和畸形等多种症状表现,是由多种病毒引起的病害类群<sup>[2,16]</sup>。国际分类委员会网站及其历年的病毒报告中记录的侵染桑树的病毒有桑潜隐病毒和桑环斑病毒<sup>[17]</sup>。近年来,随着小 RNA 深度测序技术的应用,在桑树病毒病样品中发现了番茄斑萎病毒属 *Tospovirus*<sup>[4]</sup>、双生病毒属 *Geminiviruses*<sup>[18]</sup>、杆状 DNA 病毒属 *Badnavirus*<sup>[19]</sup> 和线虫传多面体病毒属 *Nepovirus*<sup>[20]</sup> 等多种病毒。桑树病毒病的诊断依据主要是病害症状。由于多数病毒的田间症状常受不同气候条件、品种、栽培条件的影响,症状复杂多变,而且不同的病毒也有可能引起相同或相似的症状,易造成误诊。本研究建立的 MVBaV RT-LAMP 检测技术在反应完成后可以依据颜色变化直接判断检测结果,不需要对产物进行电泳,具有检测时间短、操作简便等优点,可为科研单位及生产单位检测 MVBaV 提供技术支持。MVBaV 引起的桑脉带病毒病存在高温隐症现象<sup>[2-3]</sup>,也给该病害的诊断和无毒苗木的调运带来一定的困难。本研究建立的 RT-LAMP 检测方法不仅适用显症样品中病毒的检测,对隐症样品的快速检测同样有效,在无毒种苗生产中也有重要实用价值。

## 参考文献

[1] 张璐,朱丽玲,潘瑞兰,等. 利用酵母双杂交系统研究桑脉带相关病毒核壳蛋白自身相互作用[J]. 基因组学与应用生物学, 2015,34(11):2428-2435.  
[2] 邱长玉,朱方容,林强. 桑树花叶病的研究进展[J]. 广西蚕业, 2011(2):32-37.

[3] MENG Jiaorong, LIU Pingping, ZHU Liling, et al. Complete genome sequence of mulberry vein banding associated virus, a new tospovirus infecting mulberry [J/OL]. PLoS ONE, 2015, 10(8): e0136196.  
[4] MENG Jiaorong, LIU Pingping, ZOU Chengwu, et al. First report of a tospovirus in mulberry [J]. Plant Disease, 2013, 97(7): 1001.  
[5] 陶源,吴兴泉. 植物病毒检测方法的研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(7): 2901-2906.  
[6] FANG Y, RAMASAMY R P. Current and prospective methods for plant disease detection[J]. Biosensors, 2015, 5(3): 537-561.  
[7] BOONHAM N, KREUZE J, WINTER S, et al. Methods in virus diagnostics; from ELISA to next generation sequencing [J]. Virus Research, 2014, 186: 20-31.  
[8] WARD L I, HARPER S J. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of plant pathogens [M]//SUCHER N J, HENNELL J R, CARLES M C. Plant DNA Fingerprinting and Barcoding: Methods and Protocols. New York: Humana Press, 2012: 161-170.  
[9] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J/OL]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.  
[10] WU Xinghai, CHEN Chanfa, XIAO Xizhi, et al. Development of reverse transcription thermostable helicase-dependent DNA amplification for the detection of tomato spotted wilt virus [J]. Journal of AOAC International, 2016, 99(6): 1596-1599.  
[11] 张永江,辛言言,李桂芬,等. 葡萄 A 病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2016, 49(1): 103-109.  
[12] 汤亚飞,何自福,余小漫,等. 辣椒黄脉病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立[J]. 植物保护, 2016, 42(6): 100-104.  
[13] 陈柳,尚巧霞,陈笑瑜,等. 草莓轻型黄边病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2015, 48(3): 613-620.  
[14] 陈先锋,张吉红,崔俊霞,等. 南芥菜花叶病毒的 RT-LAMP 检测试剂盒的研制[J]. 植物保护学报, 2013, 40(2): 189-190.  
[15] 郭木金,廖富荣,陈青,等. 豇豆重花叶病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 植物保护, 2012, 38(1): 123-127.  
[16] 蒯元璋. 桑树病毒与病毒病的研究进展( I ) [J]. 蚕业科学, 2010(5): 818-825.  
[17] 陈明胜,吴福安. 桑花叶病研究的现状与对策[J]. 中国蚕业, 2009(2): 20-23.  
[18] MA Yuxin, NAVARRO B, ZHANG Zhixiang, et al. Identification and molecular characterization of a novel monopartite geminivirus associated with mulberry mosaic dwarf disease [J]. The Journal of General Virology, 2015, 96(8): 2421-2434.  
[19] CHIUMENTI M, MORELLI M, DE STRADIS A, et al. Unusual genomic features of a badnavirus infecting mulberry [J]. The Journal of General Virology, 2016, 97(11): 3073-3087.  
[20] LU Quanyou, WU Zujian, XIA Zhisong, et al. A new nepovirus identified in mulberry (*Morus alba* L.) in China [J]. Archives of Virology, 2015, 160(3): 851-855.