

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.03.17

烟粉虱体内木尔坦棉花曲叶病毒的 LAMP 快速检测技术

陈 婷, 齐国君, 赵 蕊, 何自福*, 吕利华*

(广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要: 木尔坦棉花曲叶病毒 (*Cotton leaf curl Multan virus*, CLCuMuV) 是引起世界范围内棉花曲叶病流行的主要病原之一, 目前已入侵我国广东、广西、海南、福建、云南等地区。该病害由烟粉虱传播, 随着烟粉虱扩散范围增加、危害不断加重, 棉花曲叶病对我国棉花生产的潜在危害也日益增加。加强该病毒传播介体携带病毒的快速、特异性检测技术研发, 对该病害的有效检疫与防控具有重要意义。本研究基于木尔坦棉花曲叶病毒 (CLCuMuV) 的基因序列设计出 LAMP 检测 4 条特异性引物, 建立 LAMP 扩增体系并优化扩增条件, 扩增试验证明引物组合的特异性高, LAMP 检测所需时间短, 仅 29 min 即可定性检测 CLCuMuV 扩增产物; 该方法较普通 PCR 的扩增灵敏度高, 可用于检测 1 头烟粉虱体内是否携带 CLCuMuV, 简便易行, 只通过颜色变绿或浊度变浑浊即可定性判断。建立的 LAMP 检测技术可被用于苗木上烟粉虱携带 CLCuMuV 的早期检测, 为介体昆虫带毒的检疫监测提供一种快速、准确和易操作的新技术。

关键词: 木尔坦棉花曲叶病毒; 烟粉虱; 环介导等温扩增; 检测

中图分类号: Q965.8; S433.39

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 03-0565-07

Detection of *Cotton leaf curl Multan virus* in the adult body of the whitefly *Bemisia tabaci* using LAMP technique

CHEN Ting, QI Guo-Jun, ZHAO Rui, HE Zi-Fu*, LU Li-Hua* (Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV), transmitting by the silver leaf whitefly complex of *Bemisia tabaci*, has caused cotton curve leaf disease in the regions of Pakistan and India since 1997. The infested *Hibiscus rose-sinensis* and other host plants in the Hibisceae tribe of the family Malvaceae, were found in the region of South China. The disease was predicted to pose potential threat to cotton production in China once the whitefly complex as its vector disperse more widely. It is important and necessary to develop a quick, practicable tool for detecting CLCuMuV presence in the whitefly body to efficiently prevent the virus from spread. Based on the conservative sequence of CLCuMuV, 4 primers specific to CLCuMuV were designed and used in detection of the Begomovirus in a body of whitefly adult using Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP). The reaction system for CLCuMuV detection in the infested whitefly body was set up and optimized. The LAMP technique was used to determine CLCuMuV incident in a whitefly body within a short time of 29 min and the turbidity and green color could be observed as indicators for CLCuMuV present in the whitefly body. The consequences showed the tool is of specific and sensitive for CLCuMuV detection in the whitefly.

Key words: *Cotton leaf curl Multan virus*; *Bemisia tabaci*; LAMP; detection

基金项目 “十二五” 国家科技支撑计划 (2015BAD08B02); 科技部科技伙伴计划 (KY201402015); 广州市科技计划项目 (2013J4500032)

作者简介: 陈婷, 女, 1986 年生, 硕士, 助理研究员, E-mail: ch.t120@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: hezf@gdppri.com; lhlh@gdppri.com

收稿日期 Received: 2015-09-17; 接受日期 Accepted: 2015-12-10

棉花曲叶病 (Cotton leaf curl Multan Disease) 是世界棉花上的一种毁灭性病害, 已在南亚、非洲的棉花产区流行成灾并造成了巨大的经济损失 (Nateshan *et al.*, 1996; Briddon, 2003); 而木尔坦棉花曲叶病毒 (Cotton leaf curl Multan virus, CLCuMuV) 是引起该病害大流行的主要病毒 (Zhou *et al.*, 1998; Briddon & Markham, 2000; Mansoor *et al.*, 2003)。此后相继在广东、广西、海南、福建、云南和江苏等省 (自治区) 发现其侵染朱槿 *Hibiscus rosa-sinensis* (毛明杰等, 2008; 林林等, 2011; 章松柏等, 2013; 张晖等, 2015)、黄秋葵 *Abelmoschus esculentus* (董迪等, 2010)、垂花悬铃花 *Malvaviscus arboreus* (汤亚飞等, 2013)、棉花 *Gossypium hirsutum* (Cai *et al.*, 2010; 汤亚飞等, 2015) 及红麻 *Hibiscus cannabinus* (待发表) 等植物。

木尔坦棉花曲叶病毒由烟粉虱携带并传播 (Harrison *et al.*, 1997)。目前, 其传播介体—烟粉虱在我国南、北方普遍发生 (罗晨和张芝利, 2000; 郭荣, 2005), 如果烟粉虱将木尔坦棉花曲叶病毒从发生区传带到长江流域、黄河流域和西北内陆的棉花主产区, 该病害将对我国棉花生产造成严重威胁 (何自福等, 2010)。尽管我国三大棉花主产区尚无棉花曲叶病毒侵染棉花的报道, 但华南地区已有该病害在棉田零星发生的报道 (Cai *et al.*, 2010; 汤亚飞等, 2015)。因此, 除了加强华南地区园艺花卉植物外运的检疫防控外, 还应加强转运苗木上烟粉虱是否携带 CLCuMuV 的检测监测, 其中建立快速、高效、灵敏度高和特异性强的检测技术对有效防止该病毒的传播与扩散具有重要意义。

环介导等温扩增技术 (Loop-Mediated Isothermal Amplification, LAMP) 是于 2000 年发明的一种全新的核酸恒温扩增技术 (Notomi *et al.*, 2000)。该技术是利用目的序列设计 2 对特异引物, 可在具有链置换活性的 DNA 聚合酶作用下, 实现高效扩增 (闻伟刚等, 2010; 刘洪义等, 2015)。LAMP 具有操作简单、快速、灵敏度高等优点, 已经应用于检测花椰菜花叶病毒 (孙敏等, 2010)、日本红薯花叶病毒 (Fukuta *et al.*, 2003)、马铃薯病毒 (Nie, 2005) 等植物病毒。但目前用于检测植株体内的 CLCuMuV 方法仍然是血清学检测、纳米磁珠荧光 PCR 检测 (张永江等, 2013)、实时荧光 PCR 法特异性检测及普通 PCR 法等 (张卫东等, 2015); 虽然已有检测烟粉虱体

内的瓜类褪绿黄化病毒的报道, 但方法并不详尽 (梁相志等, 2012), 尚未有利用 LAMP 检测烟粉虱体内 CLCuMuV 的相关研究, 为此, 本研究在根据 CLCuMuV 特异序列设计 LAMP 引物的基础上, 建立检测 1 头烟粉虱体内携带 CLCuMuV 的 LAMP 检测方法, 以期为该病毒的检疫和快速检测提供一种新技术, 为预防 CLCuMuV 在我国更大范围的传播扩散提供快速检测技术。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

毒源: 棉花曲叶病病株为 CLCuMuV 及其 β 卫星分子侵染性克隆接种的发病植株 (汤亚飞等, 2015), 台湾番茄曲叶病病株为台湾番茄曲叶病毒 (Tomato leaf curl Taiwan virus, ToLCTWV) 侵染性克隆接种的发病植株, 病株均置于室温的防虫笼内保存作为毒源。

烟粉虱供试虫源与饲养: 烟粉虱 Middle East-Asia Minor (简称 MEAM1, 原称 B 型烟粉虱) 隐种供试虫源采自茄子植株, 在 25℃ - 28℃、光周期 L:D = 16 h: 8 h 条件下的棉花植株上饲养, 用自制接虫袋 (尺寸为 12 cm × 12 cm, 袋网为 120 目) 分别将 1 - 2 周虫龄的 MEAM1 烟粉虱成虫接种到毒源棉花、蕃茄病株上部叶片, 获毒饲养 48 h 后收集, 单头用于检测, 未饲毒 MEAM1 烟粉虱为阴性对照。

Loopamp DNA 扩增反应试剂盒 (SLP204)、Loopamp FD 荧光检测试剂购自北京蓝谱生物科技有限公司; DNA 提取试剂盒 (DP304-03) 购自天根生物技术有限公司; LAMP 引物及普通 PCR 引物由生工生物工程股份有限公司合成; 无水乙醇、纯水等为常规分析纯试剂。

利用 LA-320C 实时浊度仪 (Eiken Chemical 公司, 日本), 在恒温条件下, 将扩增和检测两个环节同步完成。

1.2 引物设计

根据 GenBank 中已登录木尔坦棉花曲叶病毒序列 (GenBank 登陆号为: KP762786), 利用 Blast 进行同源性比较, 在序列的保守区, 使用 Primer Express 4.0 设计 F3、B3、FIP (F1c + TTTT + F2)、BIP (B1c + TTTT + B2) 4 条引物。同时, 设计正向引物 5'-TCCAGATGTCCGCACAAATA-3' 和反向引物 5'-AACCAGGTCAGCACATTTC-3', 用于 CLCuMV 的 PCR 检测 (扩增目的条带大小为 492 bp)。

表 1 CLCuMuV 的 LAMP 引物序列表
Table 1 The primers designed for LAMP of CLCuMuV in the adult body of Bemisia tabaci

引物 Primer	序列 Sequence
F3	5'-GAAAACACTTGTGCACTCC-3'
B3	5'-AGAGTAGATCTTGAATGCGG-3'
FIP	5'-GCCACTTCAACCGTCCATTTCATAGTTGAACTGGATTCCGATC-3'
BIP	5'-CCTCCCAGATATATGCGCCATTCATCAACTGCCACAACCATG-3'

1.3 核酸提取

取 1 头烟粉虱成虫, 用 DP304-03 DNA 快速提取试剂盒提取样品总 DNA, 具体操作按试剂盒说明进行。

1.4 LAMP 体系的建立及设计

1.4.1 LAMP 体系

按照 SLP204 Loopamp DNA 扩增反应试剂盒说明制定 LAMP 反应体系。试验反应体系为 25 μL , 其包括: 反应缓冲液 12.5 μL , *Bst* 聚合酶 1 μL , 40 pmol/ μL 引物 FIP 1 μL , 40 pmol/ μL 引物 BIP 1 μL , 5 pmol/ μL 引物 F3 1 μL , 5 pmol/ μL 引物 B3 1 μL , DNA 模板 6 μL (浓度为 11.4 ng/ μL), 去离子水 1.5 μL , Loopamp FD 试剂 1 μL 。

LAMP 扩增产物结果观察: (1) 实时扩增曲线: 在扩增时, 如果有扩增产物出现, 反应液会出现混浊, 用 LA-320C 实时浊度仪会检测到液体的浊度, 获得信号, 并以扩增曲线给出结果。(2) 染料颜色反应: 在 LAMP 反应体系中加入 1 μL Loopamp FD 试剂, 反应结束后, 可通过肉眼观察到阳性反应变绿色浑浊, 阴性反应颜色不变。

1.4.2 CLCuMuV 的 LAMP 检测最佳反应温度

设反应温度梯度为 61 $^{\circ}\text{C}$ 、63 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 和 67 $^{\circ}\text{C}$, 反应时间 60 min。扩增反应在实时浊度仪上进行, 根据 60 min 内出现扩增曲线的最短时间确定最佳反应温度。

1.4.3 CLCuMuV 的 LAMP 特异性

对已饲毒 CLCuMuV、ToLCTWV 和对照 (未饲毒) 烟粉虱各 1 头提取 DNA, 然后以 CLCuMuV 的 FIP、BIP、F3 和 B3 引物组合为以上模板进行 LAMP 反应, 以水为空白对照, 用 BC 表示。在反应体系中加入 1 μL Loopamp FD 荧光检测试剂, 验证 LAMP 引物的特异性。

1.4.4 LAMP 检测最低检出的 CLCuMuV 浓度

将饲毒 CLCuMuV 1 头烟粉虱总 DNA 模板 11.4 ng/ μL , 分别取 3 μL 、4 μL 、5 μL 、6 μL 和

7 μL 为反应模板量, 其相应量为分别 34.2 ng/ μL 、45.6 ng/ μL 、57 ng/ μL 、68.4 ng/ μL 和 79.8 ng/ μL , 进行 LAMP 和普通 PCR 检测, 并比较反应结果。

2 结果与分析

2.1 CLCuMV 的 LAMP 检测最佳反应温度

以饲毒 CLCuMuV 的 1 头烟粉虱总 DNA 为模板, 进行 LAMP 反应, 实时浊度仪输出 61 $^{\circ}\text{C}$ 、63 $^{\circ}\text{C}$ 、65 $^{\circ}\text{C}$ 和 67 $^{\circ}\text{C}$ 的扩增时间曲线 (图 1A)。结果表明, 在 4 个供试温度中, 随着扩增时间的延长, 只有 65 $^{\circ}\text{C}$ LAMP 反应液在 29 min 始现浑浊, 其浊度随时间的延长逐渐增高, 60 min 时, 其浊度达 0.6 (图 1A)。颜色反应结果表明, 在 4 个温度中, 只有 65 $^{\circ}\text{C}$ 的反应液变浑浊并呈绿色, 呈阳性反应, 其它 3 个温度的反应液无颜色变化, 即阴性反应 (图 1B)。说明进行烟粉虱体内 CLCuMuV 的 LAMP 检测的最佳温度为 65 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 CLCuMuV 的 LAMP 反应特异性分析

用 2 对 CLCuMuV 引物对饲毒 CLCuMuV 的烟粉虱 DNA 进行 LAMP 扩增, 以饲毒 ToLCTWV 烟粉虱 DNA 为对照, 以纯水为模板做为空白对照。设 LAMP 反应温度为 65 $^{\circ}\text{C}$ 、测定时间 60 min。结果表明, 在 3 个供试烟粉虱 DNA 处理中, 随着扩增时间的延长, 在含有饲毒 CLCuMuV 的烟粉虱的 LAMP 反应管中 29 min 始现浑浊, 而且其浊度随时间增加而逐渐增高 (图 2A)。颜色反应结果表明, 携带 CLCuMuV 的烟粉虱个体的反应液变浑浊并呈绿色, 而携带 ToLCTWV 的烟粉虱个体的反应液及空白对照反应液无颜色变化 (图 2B)。上述扩增曲线与颜色反应结果一致, 说明以 CLCuMuV 设计的 FIP、BIP、F3 和 B3 引物组合, 可被有效地用于烟粉虱个体是否含有 CLCuMuV 的 LAMP 检测, 而且这种检测对 CLCuMuV 具有特异性。

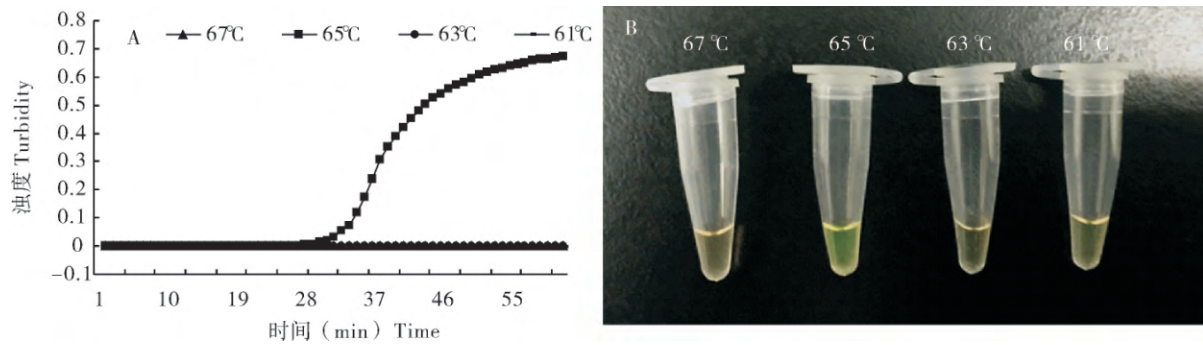


图1 烟粉虱体内 CLCuMuV 的 LAMP 检测最佳温度

Fig. 1 The temperature optimization for LAMP of CLCuMuV in a body of the whitefly adult

注: A, 扩增曲线; B, 染料颜色反应。Note: A, Amplification curve; B, Visual inspection.

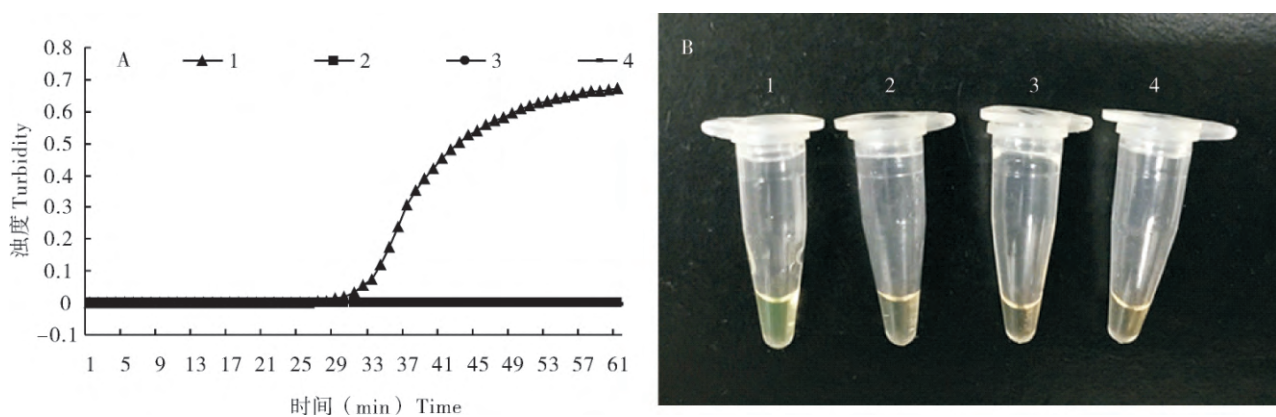


图2 基于 CLCuMuV 特异性引物的含有 CLCuMuV、ToLCTWV 和未饲毒烟粉虱成虫个体 LAMP 反应

Fig. 2 CLCuMuV-specific LAMP of CLCuMuV, ToLCTWV in the body of whitefly adult

注: A, 扩增曲线; B, 染料颜色反应; 1, 含 CLCuMuV 的烟粉虱个体 DNA; 2, 含 ToLCTWV 的烟粉虱 DNA; 3, 健康烟粉虱 DNA; 4, 水。Note: A, Amplification curve; B, Visual inspection; 1, DNA of a whitefly feeding CLCuMuV; 2, DNA of a whitefly feeding ToLCTWV; 3, DNA of a healthy whitefly; 4, No DNA template.

2.3 CLCuMuV 的 LAMP 最低检出浓度

以 1 头有 CLCuMuV 的烟粉虱个体总 DNA 为供试母液, 以 3 μ L、4 μ L、5 μ L、6 μ L 和 7 μ L 模板为 LAMP 和普通 PCR 的反应量 (图 3A、B、C)。在以上 5 个 LAMP 反应中, 只有 6 μ L 和 7 μ L DNA 模板的 LAMP 反应液有实时扩增曲线产生 (图 3A), 在 27 min, 反应液出现浑浊; 60 min 时, 这两个 LAMP 反应液的浊度达 0.67 和 0.57, LAMP 颜色反应表明, 60 min 时, 6 μ L 和 7 μ L 的反应液出现明显浑浊并呈绿色 (图 3B)。5 μ L 及以下模板量的反应液没变混浊, 可以判定 CLCuMuV-LAMP 的最低检出浓度为 68.4 ng/ μ L。

分别以 3 μ L、4 μ L、5 μ L、6 μ L 和 7 μ L DNA 母液为反应模板量进行 CLCuMV 普通 PCR 检测, 电泳结果显示, 空白对照中无目标条带出现, 添

加 3 μ L、4 μ L、5 μ L、6 μ L 和 7 μ L DNA 模板的 PCR 扩增中均有出现 492 bp 目标条带, 但其扩增量极低 (图 3C), 均不能为准确判断 CLCuMV 有无提供清楚条带。结果说明, 在 DNA 模板浓度相同时, LAMP 检测的灵敏度较普通 PCR 的要高。

3 结论与讨论

目前, 环介导等温扩增技术已被广泛用于人类、畜禽的病原病毒快速检测 (Dinh *et al.*, 2011; 张永乐, 2011; 原冬伟等, 2013), 也被用于家蚕及蜜蜂的病原病毒的检测 (唐芬芬等, 2013; 庄明亮等, 2014), 以及植物病毒的快速检测 (秦文韬等, 2013)。双生病毒是由烟粉虱传播的一类植物病毒, 植株体内的双生病毒检测方法

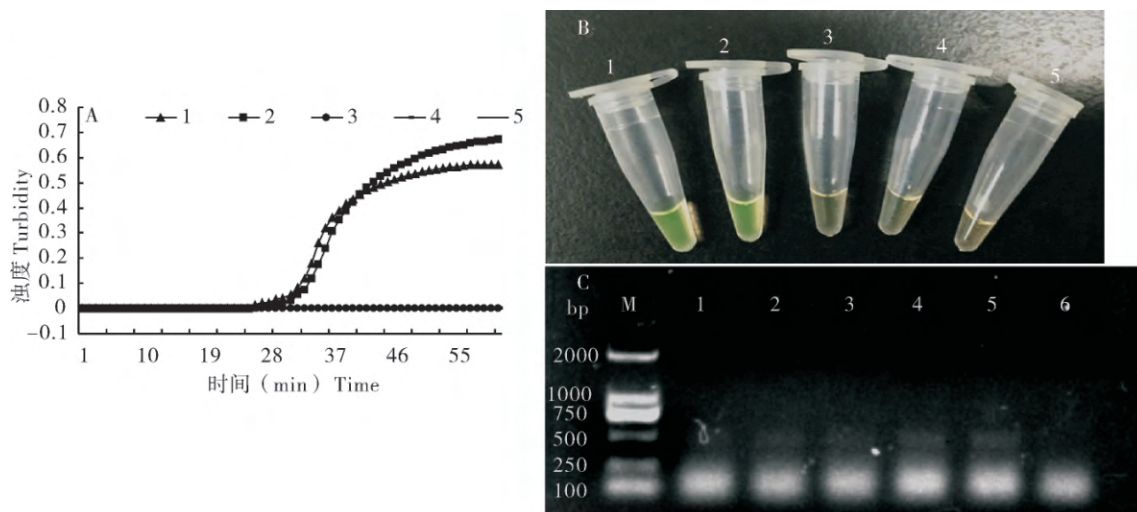


图3 LAMP 和 PCR 检测 CLCuMuV 的灵敏度

Fig. 3 Comparison of sensitivity for CLCuMV detection in a whitefly body using LAMP and PCR

注: A, 扩增曲线; B, 颜色反应; C, PCR 扩增; M, DL2000 DNA marker; 1-5, 7 μ L、6 μ L、5 μ L、4 μ L、3 μ L CLCuMuV 饲毒烟粉虱 DNA 模板; 6, 无 DNA 模板。Note: A, Amplification curve; B, Visual inspection; C, Agarose gel electrophoresis of PCR products; M, DL2000 DNA marker; 1-5: 7 μ L, 6 μ L, 5 μ L, 4 μ L, and 3 μ L DNA of a whitefly feeding CLCuMV; 6, No DNA template.

有血清学检测、纳米磁珠荧光 PCR 检测、实时荧光 PCR 法特异性检测及普通 PCR (张永江等, 2013; 张卫东等, 2015)。基于木尔坦棉花曲叶病毒 (CLCuMuV) 基因序列, 设计出用于 LAMP 检测的 4 条特异性引物, 然后建立了木尔坦棉花曲叶病毒 LAMP 扩增体系并优化其扩增温度, 最佳反应温度为 65 $^{\circ}$ C; 当以饲毒 ToLCTWV 烟粉虱为对照双生病毒时, 设计出的引物组合特异性高, 可以鉴定出 1 头烟粉虱是否含有 CLCuMuV; 建立的 CLCuMuV-LAMP 方法可将检测时间短至 29 min, 较普通 PCR 反应扩增时间减少了 1/2, 而且其检测灵敏度高, 最低检测浓度为 68.4 ng/ μ L, 而 PCR 的检测最低浓度 79.8 ng/ μ L 以上。此外, LAMP 快速检测不仅可检测 1 头烟粉虱是否携带 CLCuMuV; 而且操作方便, 用水浴锅保证 65 $^{\circ}$ C 恒温即可对供试样本进行扩增; 另外, 利用样本反应液的颜色就可直接判断虫体是否含有 CLCuMuV 病毒, 或者用 LA-320C 实时浊度仪检测反应液的浑浊度, 判定烟粉虱成虫是否携带 CLCuMuV 病毒。由此可知, 本研究提出的木尔坦棉花曲叶病毒 LAMP 检测技术为烟粉虱携带 CLCuMuV 的早期检测提供了快速、简便的检测手段, 该技术的应用将对有效防止该病毒的传播与扩散具有积极的作用。

参考文献 (References)

- Briddon RW, Markham PG. Cotton leaf curl virus disease [J]. *Virus Research*, 2000, 71 (1-2): 151-159.
- Briddon RW. Cotton leaf curl disease, a multicomponent begomovirus complex [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4 (6): 427-434.
- Cai JH, Xie K, Lin L, et al. Cotton leaf curl Multan virus newly reported to be associated with cotton leaf curl disease in China [J]. *Plant Pathology*, 2010, 59 (4): 794-795.
- Dinh DT, Le MT, Vuong CD, et al. An updated loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of H5N1 avian influenza viruses [J]. *Trop Med. Health*, 2011, 39 (1): 3-7.
- Dong D, He ZF, Chai ZX. Detection of whitefly-transmitted geminivirus associated with the okra yellow vein leaf curl disease in Guangdong [J]. *Plant Protection*, 2010, 36 (1): 65-68. [董迪, 何自福, 柴兆祥. 广东黄秋葵黄脉曲叶病样中检测到烟粉虱传双生病毒 [J]. 植物保护, 2010, 36 (1): 65-68]
- Fukuta S, Lida T, Mizukami Y, et al. Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP [J]. *Archives of Virology*, 2003, 148: 1713-1720.
- Guo R. Cotton leaf curl virus disease will cause a serious threat to cotton production [J]. *China Plant Protection*, 2005, 25 (2): 46-47. [郭荣. 对棉花生产构成严重威胁的病害—棉花曲叶病毒病 [J]. 中国植保导刊, 2005, 25 (2): 46-47]
- Harrison BD, Liu YL, Khalid SH, et al. Detection and relationships of Cotton leaf curl virus and allied whitefly-transmitted geminiviruses occurring in Pakistan [J]. *Annals of Applied Biology*, 1997,

- 130 (1): 61–75.
- He ZF, Dong D, Li SF, *et al.* Threat of *Cotton leaf curl Multan virus* to China cotton production [J]. *Plant Protection*, 2010, 36 (2): 147–149. [何自福, 董迪, 李世访, 等. 木尔坦棉花曲叶病毒已对我国棉花生产构成严重威胁 [J]. 植物保护, 2010, 36 (2): 147–149]
- He ZF, She XM, Tang YF. *Cotton leaf curl Multan virus* invading China and its damage potential [J]. *Journal of Biosafety*, 2012, 21 (2): 87–92. [何自福, 余小漫, 汤亚飞. 入侵我国的木尔坦棉花曲叶病毒及其为害 [J]. 生物安全学报, 2012, 21 (2): 87–92]
- Kono T, Savan R, Sakai M, *et al.* Rapid detection of a fish iridovirus using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Journal of Virological Methods*, 2004, 121 (2): 155–161.
- Liang XZ, Shi Y, Li JJ, *et al.* Detection of *Cucurbit chlorotic yellows virus* in the adult body the whitefly *Bemisia tabaci* using LAMP [J]. *Insect studies in Central China*, 2012, 8: 372. [梁相志, 施艳, 李静静, 等. 利用环介导等温扩增技术 (LAMP) 检测烟粉虱体内的瓜类褪绿黄化病毒 (CCYV) [J]. 华中昆虫研究, 2012, 8: 372]
- Lin L, Cai JH, Luo EB, *et al.* Molecular identification and host range of a geminivirus infecting *Hibiscus* in Nanning city [J]. *Plant Protection*, 2011, 37 (4): 44–47. [林林, 蔡健和, 罗恩波, 等. 南宁市朱槿曲叶病毒病原分子鉴定和寄主范围研究 [J]. 植物保护, 2011, 37 (4): 44–47]
- Liu HY, Xin YY, Liu ZM, *et al.* Development of a RT-LAMP assay for rapid detection of potato virus A [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31 (11): 143–147. [刘洪义, 辛言言, 刘忠梅, 等. 马铃薯 A 病毒 RT-LAMP 检测方法的建立 [J]. 中国农学通报, 2015, 31 (11): 143–147]
- Luo C, Zhang ZL. Research summary of *Bemisia tabaci* (Germadius) [J]. *Beijing Agricultural Science*, 2000, 18 (Suppl.): 4–13. [罗晨, 张芝利. 烟粉虱 *Bemisia tabaci* (Germadius) 研究概述 [J]. 北京农业科学, 2000, 18 (增刊): 4–13]
- Mansoor S, Briddon RW, Bull SE, *et al.* Cotton leaf curl disease is associated with multiple monopartite begomoviruses supported by single DNA β [J]. *Archives of Virology*, 2003, 148 (10): 1969–1986.
- Mao MJ, He ZF, Yu H, *et al.* Molecular characterization of *Cotton leaf curl Multan virus* and its satellite DNA that infects *Hibiscus rosa-sinensis* [J]. *Chinese Journal of Virology*, 2008, 24 (1): 64–68. [毛明杰, 何自福, 虞皓, 等. 侵染朱槿的木尔坦棉花曲叶病毒及其卫星 DNA 全基因组结构特征 [J]. 病毒学报, 2008, 24 (1): 64–68]
- Nateshan HM, Muniyappa V, Swanson MM, *et al.* Host range, vector relations and serological relationships of *Cotton leaf curl virus* in south India [J]. *Annals of Applied Biology*, 1996, 128 (2): 233–244.
- Nie X Z. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y [J]. *Plant Disease*, 2005 (89): 605–610.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28 (12): e63.
- Qin WT, Wang ZY, Zhang H. The progress of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and its application in detection of plant virus [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013, 29 (21): 170–174. [秦文韬, 王中跃, 张昊, 环介导等温扩增技术 (LAMP) 及其在植物病毒检测中的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2013, 29 (21): 170–174]
- Rao YY, Shen LL, Zhu SF, *et al.* The economic losses of *Cotton leaf curl virus* invading China on cotton [J]. *Plant Quarantine*, 2011, 25 (3): 12–16. [饶玉燕, 沈玲丽, 朱水芳, 等. 棉花曲叶病毒对棉花造成的经济损失评估 [J]. 植物检疫, 2011, 25 (3): 12–16]
- Sun M, Liang CZ, Gao HW, *et al.* Detection of CaMV 35S promoter by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Food Science and Technology*, 2010, 35 (4): 255–258. [孙敏, 梁成珠, 高宏伟, 等. 花椰菜花叶病毒 CaMV35S 启动子 LAMP 检测方法的建立 [J]. 食品科技, 2010, 35 (4): 255–258]
- Tang FF, Yang WK, Shao YL, *et al.* Prompt diagnosis of *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2013, 50 (4): 1013–1019. [唐芬芬, 杨伟克, 邵榆岚, 等. 应用环介导等温扩增技术 (LAMP) 快速检测家蚕核型多角体病毒的研究 [J]. 应用昆虫学报, 2013, 50 (4): 1013–1019]
- Tang YF, He ZF, Du ZG, *et al.* Molecular characterization of the *Cotton leaf curl Multan virus* infecting *Malvastrum arboreus* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2013, 43 (2): 120–127. [汤亚飞, 何自福, 杜振国等. 侵染垂花悬铃花的木尔坦棉花曲叶病毒分子特征研究 [J]. 植物病理学, 2013, 43 (2): 120–127]
- Tang YF, He ZF, Du ZG, *et al.* The complex of *Cotton leaf curl Multan virus* and its associated betasatellite molecule causing cotton leaf curl disease in Guangdong province [J]. *Scientia Agricultura Sinica*. 2015, 48 (16): 3166–3175. [汤亚飞, 何自福, 杜振国, 等. 木尔坦棉花曲叶病毒及其伴随的 β 卫星分子复合侵染引起广东棉花曲叶病 [J]. 中国农业科学, 2015, 48 (16): 3166–3175]
- Wen WG, Yang CY, Cui JX, *et al.* Detection of *Bean pod mottle virus* by RT-LAMP [J]. *Plant Protection*, 2010, 36 (6): 139–141. [闻伟刚, 杨翠云, 崔俊霞, 等. RT-LAMP 技术检测菜豆荚斑驳病毒的研究 [J]. 植物保护, 2010, 36 (6): 139–141]
- Yuan DW, Liu JS, Guo DC *et al.* Application of a loop-mediated isothermal amplification method in detection of RHDV [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2013, 43 (4): 390–395. [原冬伟, 刘家森, 郭东春, 等. 环介导等温扩增技术兔出血症病毒检测中的应用 [J]. 中国兽医科学, 2013, 43 (4): 390–395]
- Zhang H, Ji YH, Zhao WH, *et al.* Identification and characterization of *Cotton leaf curl Multan virus* from *Hibiscus rosa-sinensis* in Jiangsu [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2015, 45 (4): 361–369. [张晖, 季英华, 吴淑华, 等. 江苏朱槿上分离到的木尔坦棉花曲叶病毒基因组结构特征分析 [J]. 植物病理学报, 2015, 45 (4): 361–369]
- Zhang SB, Xia XX, Zhang J, *et al.* Leaf curl disease on *Hibiscus rose-*

- simensis* in Fuzhou caused by *Cotton leaf curl Multan virus* [J]. *Plant Protection*, 2013, 39 (2): 196–200. [章松柏, 夏宣喜, 张洁, 等. 福州市发生由木尔坦棉花曲叶病毒引起的朱槿曲叶病 [J]. 植物保护, 2013, 39 (2): 196–200]
- Zhang WD, Wang L, Feng YM, *et al.* Rapid detection of *Cotton leaf curl virus* by real-time PCR [J]. *Guangdong Agricultural Science*, 2015, 42 (2): 126–130. [张卫东, 王岚, 冯宇梅, 等. 实时荧光 PCR 法特异性检测棉花曲叶病毒 [J]. 广东农业科学, 2015, 42 (2): 126–130]
- Zhang YJ, Li MF, Xin YY, *et al.* Detection of *Cotton leaf curl virus* by real-time fluorescent PCR combining with magnetic nanoparticles [J]. *Cotton Science*, 2013, 25 (1): 90–94. [张永江, 李明福, 辛言言, 等. 应用纳米磁珠荧光 PCR 检测棉花曲叶病毒 [J]. 棉花学报, 2013, 25 (1): 90–94]
- Zhang YL, Pan KN, Wu J, *et al.* Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of influenza A (H1N1) virus [J]. *Journal of Medical Research*, 2011, 40 (6): 144–147. [张永乐, 潘克女, 武静, 等. 环介导等温扩增检测甲型 H1N1 病毒核酸方法的建立 [J]. 医学研究杂志, 2011, 40 (6): 144–147]
- Zhou XP, Liu YL, Robinson DJ, *et al.* Four DNA-A variants among Pakistani isolates of *Cotton leaf curl virus* and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra [J]. *Journal of General Virology*, 1998, 79 (4): 915–923.
- Zhuang ML, Li JH, Chen DF, *et al.* Diagnosis of the *Black queen cell virus* (BQCV) by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2014, 51 (6): 1612–1619. [庄明亮, 李江红, 陈大福, 等. 应用环介导等温扩增技术 (LAMP) 检测蜜蜂黑蜂王台病毒的研究 [J]. 应用昆虫学报, 2014, 51 (6): 1612–1619]