

芜菁黄化花叶病毒RT-LAMP检测方法的建立

杨馥韩¹, 雷云廷¹, 姜宁², 杨再福¹, 冯文卓¹, 王勇¹, 陈相儒^{1*}

¹贵州大学农学院, 贵州 贵阳

²云南烟草科学研究院, 云南 昆明

收稿日期: 2022年3月30日; 录用日期: 2022年6月5日; 发布日期: 2022年6月14日

摘要

芜菁黄化花叶病毒(*Turnip yellow mosaic virus*, TYMV)是芜菁黄花叶病毒科(*Tymoviridae*)芜菁黄花叶病毒属(*Tymovirus*)的代表种, 该病毒侵染白菜能够引起黄化、花叶和皱缩等症状, 给白菜产业造成巨大的影响。在此, 我们建立了反转录环介导等温扩增(RT-LAMP)技术来检测白菜中的TYMV。针对TYMV分离株中保守的RNA依赖性RNA聚合酶(*RdRp*)基因的区域设计的RT-LAMP检测引物。优化后的RT-LAMP方法对TYMV的检测具有特异性和灵敏度, 灵敏度比RT-PCR高10,000倍。这种简单、高效、快速和灵敏的方法能够应用于白菜中TYMV的检测。

关键词

芜菁黄化花叶病毒, RT-LAMP, 病毒检测

Establishment of the Detection Method for *Turnip yellow mosaic virus* by RT-LAMP

Fuhan Yang¹, Yunting Lei¹, Ning Jiang², Zaifu Yang¹, Wenzhuo Feng¹, Yong Wang¹, Xiangru Chen^{1*}

¹College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang Guizhou

²Yunnan Academy of Tobacco Science, Kunming Yunnan

Received: Mar. 30th, 2022; accepted: Jun. 5th, 2022; published: Jun. 14th, 2022

Abstract

Turnip yellow mosaic virus (TYMV) is the type species of the genus *Tymovirus* in *Tymoviridae*. TYMV induce symptoms such as yellowing, mosaic and leaf rugosity in Chinese cabbage, damaging

*通讯作者。

文章引用: 杨馥韩, 雷云廷, 姜宁, 杨再福, 冯文卓, 王勇, 陈相儒. 芜菁黄化花叶病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 生物过程, 2022, 12(2): 116-123. DOI: 10.12677/bp.2022.122013

the Chinese cabbage industry. Therefore, developing an easy, efficient strategy for detecting TYMV is crucial. Here, we established a two-step reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technique for detecting TYMV in Chinese cabbage. RT-LAMP primers were designed against regions of the *RNA-dependent RNA polymerase (RdRp)* gene conserved among TYMV isolates. The optimized RT-LAMP method showed high specificity and sensitivity to TYMV, displaying 10,000 times greater sensitivity than conventional RT-PCR. This easy, efficient, sensitive, and inexpensive method for detecting TYMV in Chinese cabbage is the first application of RT-LAMP, to our knowledge, for detecting TYMV.

Keywords

Turnip yellow mosaic virus (TYMV), RT-LAMP, Virus Detection

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

白菜(*Brassica pekinensis*)属十字花科(Brassicaceae)芸薹属(*Brassica*)。在中国,白菜是种植面积最大的蔬菜之一,具有重要的经济价值。在白菜的生产过程中,白菜易受到多种病原物的危害。许多病毒能够侵染白菜,包括南芥菜花叶病毒(*Arabis mosaic virus, ArMV*)、蚕豆萎蔫病毒 2 (*Broad bean wilt virus 2, BBWV2*)、花椰菜花叶病毒(*Cauliflower mosaic virus, CaMV*)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus, CMV*)、长叶车前花叶病毒(*Ribgrass mosaic virus, RMV*)、烟草花叶病毒(*Tobacco mosaic virus, TMV*)、芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus, TuMV*)、芜菁环斑病毒(*Turnip ringspot virus, TuRSV*)和芜菁黄化病毒(*Brassica yellows virus, BrYV*) [1]-[9]。

芜菁黄化花叶病毒(*Turnip yellow mosaic virus, TYMV*)是芜菁黄花叶病毒科(*Tymoviridae*)芜菁黄花叶病毒属(*Tymovirus*)的代表种[10]。该病毒的基因组为一条长 6319 nt 的正义单链 RNA 组成,共编码 3 个开放阅读框(Open reading frame, ORF),分别包括重叠蛋白(Overlapping protein)、复制相关蛋白(Replicase polyprotein)和外壳蛋白(Coat protein)。TYMV 通过甲虫和机械进行传播并侵染十字花科的其他植物[8] [11]。TYMV 引起的典型症状是叶片黄化、花叶和皱缩。到目前为止,澳大利亚、加拿大、美国、菲律宾、韩国和日本等多个国家都发现并报道了该病毒[8] [11] [12] [13]。

2000 年,Notomi 等人开发了环介导等温扩增(LAMP)技术,目前被广泛用于检测病原物和病毒的检测[14] [15]。目前,许多植物病毒也可以利用 LAMP 或逆转录环介导等温扩增(RT-LAMP)检测,例如日本山药花叶病毒、梅子痘病毒和柑橘叶斑驳病毒[16] [17] [18] [19]。与 RT-PCR、ELISA 等方法相比,RT-LAMP 法具有简单、高效、灵敏、成本低等优点。本研究确定了 TYMV 在中国发生,并根据 TYMV 的基因序列设计 LAMP 检测引物,建立并优化了 RT-LAMP 检测方法,建立的 RT-LAMP 检测方法可用于田间白菜样品的 TYMV 检测。

2. 材料与方

2.1. 材料

感染 TYMV 的白菜样品采自贵州省威宁县,感染了 BBWV2, CMV, TuMV, 马铃薯病毒 S (*Potato virus S, PVS*)和马铃薯病毒 Y (*Potato virus Y, PVY*)的植物样品均由本实验室保存。快速通用植物 RNA 提

取试剂盒购自华越洋(北京)公司, Bst 2.0 DNA 聚合酶购自美国 NEB 公司, M-MLV 反转录酶购自美国 Promega 公司, 甜菜碱购自美国 Sigma 公司, SYBR Green I 染料购自索莱宝(北京)公司, 10 mmol/L dNTPs 和 Taq DNA 聚合酶均购自生工生物(上海)公司, pUC19-T 载体购自擎科(重庆)生物公司。

根据 GenBank 中的 TYMV (KF561253) 核酸序列合成引物, 使用软件 primer explorer 4.0 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) 设计 LAMP 检测引物, 使用软件 Primer Premier 5.0 设计 RT-PCR 检测引物, 引物由擎科(重庆)生物公司合成。引物序列见表 1。

Table 1. Primers sequences for the RT-LAMP and RT-PCR detection of TYMV

表 1. 芜菁黄花叶病毒 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测引物序列

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')	产物大小 Product size (bp)
TYMV(1316)F	CCTTCCATTGCCTATACCTC	516
TYMV(1832)R	GAAAGGAAGAAATGCTGTCG	
TYMV CP F	TTGGCGAATCACTATGGC	855
TYMV CP R	TTAGGTGGAAGTGCCGTG	
TYMV-F3	ACCCTGCCATCATCGTCT	
TYMV-B3	GGCTGTTGTTGAAGGCGT	
TYMV-FIP	ATCTGGATCGGGTGAGGGCGTGGACAACACTACACCAAGTGG	
TYMV-BIP	CAGGCGTTCAATTCATGGGCCCGGAAAACATGGCGGAAGA	

2.2. RNA 的提取及 RT-PCR

白菜叶片样品经液氮研磨后, 参照快速通用植物 RNA 提取试剂盒说明书提取白菜样品的总 RNA, 使用超微量分光光度计(Nano Drop 2000)测定 RNA 浓度和质量。使用 M-MLV 反转录酶进行反转录合成 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。反转录体系为: 5×反应缓冲液 6 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, 10 μmol/L 3' 引物 1.0 μL, 总 RNA 3000 ng, 20 U RRI (重组 RNA 酶抑制剂), 200 U M-MLV 反转录酶, ddH₂O 补足至 30 μL。将反转录反应体系置于 PCR 仪中反应, 37°C 60 min, 96°C 5 min, 反应结束后立即置于冰上。PCR 扩增体系为 25 μL:1.0 μL 反转录产物, 10 μmol/L 5' 引物和 3' 引物各 1.0 μL, 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 用 ddH₂O 补足体系至 25 μL。PCR 反应程序设置为: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。

2.3. TYMV-LAMP 方法建立及优化

LAMP 反应体系[19]为: cDNA 2 μL, 10× Bst 缓冲液 2.5 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μL, 4 mmol/L 甜菜碱 2 μL, 10 mmol/L dNTPs 2 μL, 8 U/μL Bst 聚合酶 1 μL, 20 μmol/L FIP 和 BIP 引物各 2 μL, 10 μmol/L F3 和 B3 引物各 0.5 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。置于不同温度(60°C、62.5°C、65°C、67.5°C 和 70°C)下反应 60 min, 80°C 5 min。取 3 μL 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测; 在剩下的 LAMP 产物中加入 1.5 μL 100 倍稀释的 SYBR Green I 染料, 振荡混匀, 观察结果并拍照。

2.4. TYMV-LAMP 方法特异性检测

分别提取感染了 BBWV2, CMV, TuMV, PVS, PVY 和 TYMV 样品的总 RNA 经反转录后, 用建立的 RT-LAMP 和 RT-PCR 的方法进行检测, 以确定 RT-LAMP 检测方法的特异性。

2.5. TYMV-LAMP 方法灵敏度检测

取感染 TYMV 样品的总 RNA 3000 ng 用于反转录, 用 ddH₂O 将反转录产物 10 倍梯度稀释(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6})后作为模板, 分别检测 RT-LAMP 和 RT-PCR 方法的灵敏度。

2.6. TYMV-LAMP 方法田间应用

从贵州省、云南省、江苏省、吉林省、河北省和山东省采集了白菜样品共 80 份, 提取 80 样品的总 RNA, 使用 RT-LAMP 方法检测这些样品被 TYMV 感染情况, 并使用 RT-PCR 验证 RT-LAMP 检测结果。

3. 结果

3.1. TYMV 的 RT-PCR 检测

使用 TYMV (1316)F/(1832)R and TYMV CP F/R 引物扩增 TYMV 基因组片段, PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 长度分别为 500 bp 和 900 bp (图 1)。PCR 产物经纯化回收后连接载体 pUC19-T, 转化大肠杆菌后, 提取阳性克隆质粒送往擎科(重庆)生物公司测序, 测序结果经 Blast 比对确定为芜菁黄化花叶病毒。

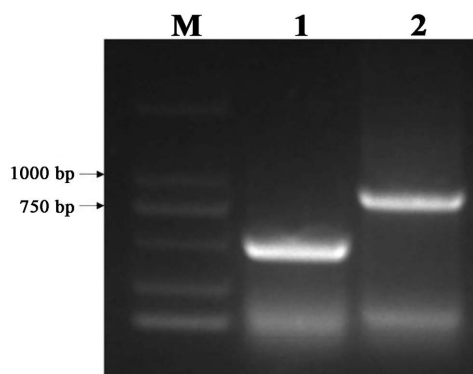


Figure 1. Amplified TYMV target fragments by PCR. M: DL2000 DNA marker; 1: products of primer set TYMV (1316)F/(1832)R; 2: products of primer set TYMV CP F/R

图 1. PCR 扩增 TYMV 目的片段。M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: TYMV (1316)F/(1832)R 扩增产物; 2: TYMV CP F/R 扩增产物

3.2. TYMV-LAMP 检测体系的建立及优化

使用从 TYMV 感染植物样品中提取的总 RNA 在不同的温度(60°C 至 70°C)下进行 RT-LAMP 检测。对反应温度的优化结果表明: 扩增温度为 60°C ~ 70°C 时, 电泳后均出现梯形条带, 加入 SYBR Green I 染料后反应产物颜色为绿色(图 2(b), 图 2(c))。结合实时扩增曲线和琼脂糖凝胶电泳结果, 65°C 下的反应具有最快的扩增速度和最佳的特异性(图 2(a), 图 2(b))。因此, 后续实验选择 65°C 作为反应温度。

3.3. TYMV-LAMP 方法特异性检测

用分别感染了 TuMV、BBWV2、CMV、PVS 和 PVY 的样品检测 RT-LAMP 方法的特异性。结果表明被 TYMV 侵染样品的 RT-LAMP 产物经 SYBR Green I 染料染色后, 呈现绿色, 经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测出现阶梯状条带, 而被 TuMV、BBWV2、CMV、PVS 和 PVY 侵染样品的 RT-LAMP 产物经 SYBR Green I 染料染色后, 呈现橙色, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测没有出现特异性条带(图 3(a), 图 3(b), 图 3(c)), 说明本研究建立的 RT-LAMP 方法对 TYMV 具有良好的特异性。

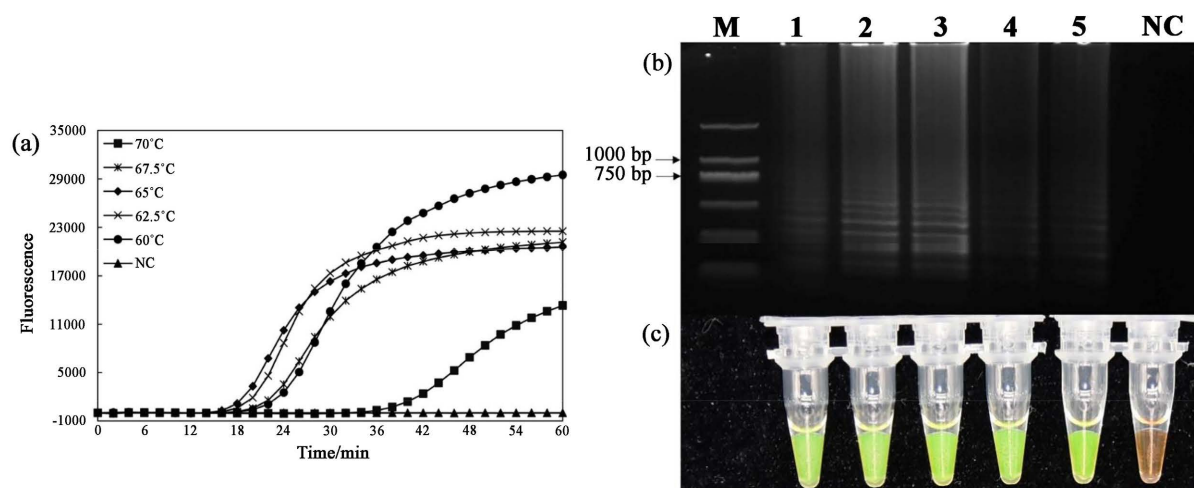


Figure 2. Optimize the best temperature for *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) detection by RT-LAMP assay. (a) Real-time amplification plots; (b) Amplified products resolved by 2% agarose gel electrophoresis. M, DL2000 marker; 1 to 5, reaction temperature of 60°C, 62.5°C, 65°C, 67.5°C, or 70°C, respectively; NC, negative control; (c) Visual detection of amplified products using SYBR Green I dye

图 2. RT-LAMP 法检测芜菁黄化花叶病毒(TYMV)的最佳温度。(a) 实时扩增曲线; (b) RT-LAMP 反应产物 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。M, DL2000DNA 分子量标准; 1 至 5, 反应温度分别为 60°C、62.5°C、65°C、67.5°C 或 70°C; NC, 阴性对照; (c) 加入 SYBR Green I 染料的检测结果

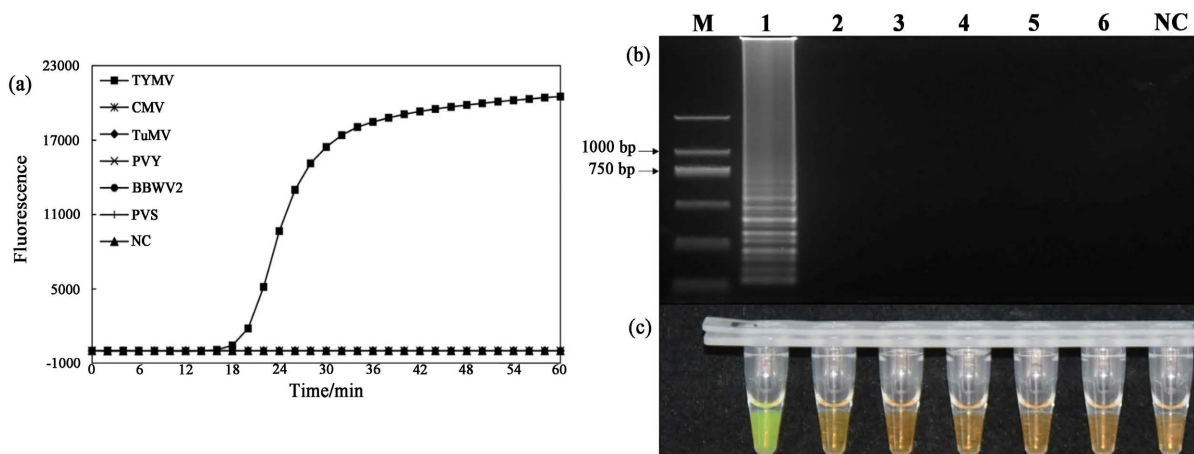


Figure 3. Specificity of *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) by RT-LAMP assay. (a) Real-time amplification plots; (b) Amplified products of RT-LAMP resolved by 2% agarose gel electrophoresis. M: DL2000 DNA marker; 1, TYMV; 2 to 6: TuMV, CMV, PVY, BBWV2, and PVS, respectively; NC: negative control; (c) Visual detection of amplified products using SYBR Green I dye

图 3. RT-LAMP 法检测芜菁黄化花叶病毒(TYMV)的特异性试验。(a) 实时扩增曲线; (b) RT-LAMP 反应产物 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: TYMV; 2~6: 分别为 TuMV、CMV、PVY、BBWV2 和 PVS; NC, 阴性对照; (c) 加入 SYBR Green I 染料的检测结果

3.4. TYMV-LAMP 方法灵敏度检测

为了检测 RT-LAMP 方法的灵敏度,将 TYMV cDNA 的 10 倍梯度稀释(10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}) 后作为模板。稀释后的 cDNA 进行 RT-PCR 和 RT-LAMP 检测。结果表明, RT-LAMP 检测灵敏度为 10^{-6} (图 4(a), 图 4(c), 图 4(d)), 而 RT-PCR 的灵敏度为 10^{-1} (图 4(b)), 说明 RT-LAMP 方法的灵敏度是 RT-PCR 法的 10 000 倍。因此, RT-LAMP 方法在田间检测时具有良好的应用的潜力。

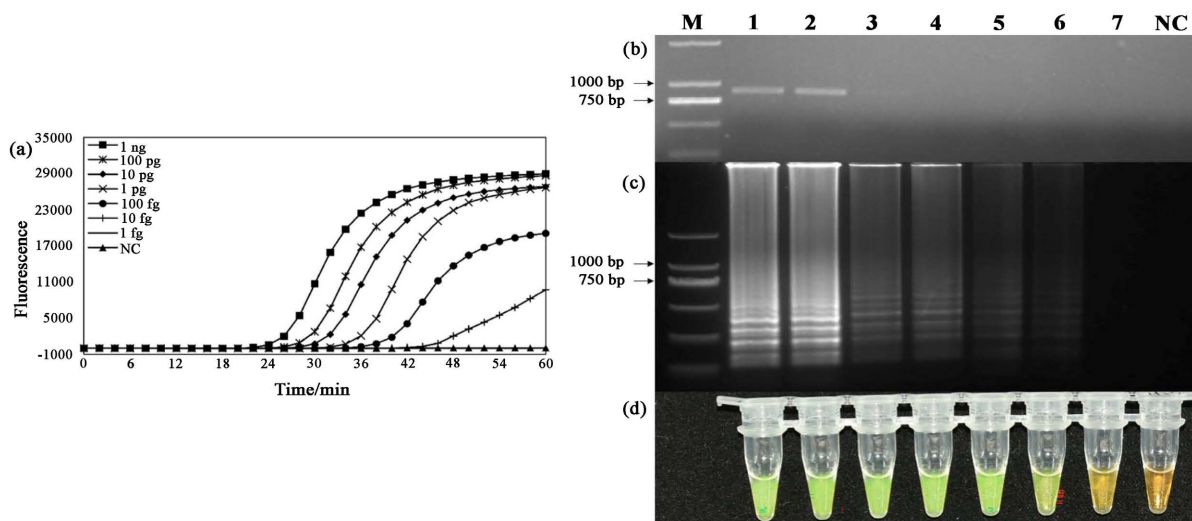


Figure 4. Sensitivity of *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV) by RT-LAMP assay. (a) Real-time amplification plots; (b) Amplified products from RT-PCR resolved by 1.2% agarose gel electrophoresis. M: DL2000 DNA marker; 1 to 7: standard concentrations of cDNA in the RT-LAMP reaction representing 10-fold serial dilutions from 10^0 (lane 1) to 10^{-6} (lane 7), respectively; NC: negative control; (c) Amplified products from RT-LAMP resolved by 2% agarose gel electrophoresis; (d) Visual detection of RT-LAMP assay of amplified products using SYBR Green I dye

图 4. RT-LAMP 法检测芜菁黄花叶病毒(TYMV)的灵敏度试验。(a) 实时扩增曲线; (b) RT-PCR 的扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。M: DL2000 DNA 分子量标准; 1~7: 分别代表稀释 cDNA 浓度 10^0 (泳道 1)到 10^{-6} (泳道 7); NC: 阴性对照。(c) RT-LAMP 的扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果; (d) 加入 SYBR Green I 染料的检测结果

3.5. TYMV-LAMP 方法的田间应用

从六个省收集了白菜样品 80 份。提取这些样品的总 RNA, 并分别通过 RT-LAMP 和 RT-PCR 检测 TYMV。RT-LAMP 结果表明, 这些收集的样品中有 8 个被 TYMV 感染(图 5(b))。此外, RT-LAMP 结果与 RT-PCR 检测结果完全一致(图 5(a), 图 5(b))。因此本研究建立的 RT-LAMP 能够很好地应用于田间样品的 TYMV 检测。

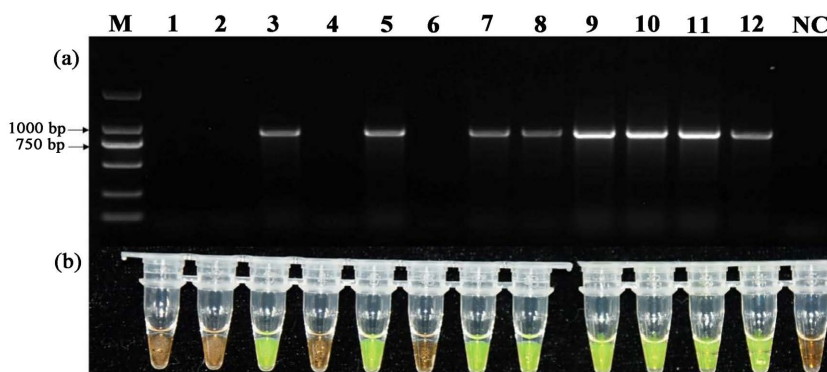


Figure 5. Applications of RT-LAMP assay in detecting field samples. (a) RT-PCR products resolved by 1.2% agarose gel electrophoresis. M: DL2000 DNA marker; 1 to 12: leaf samples collected from the field; NC: negative control; (b) Visual detection based on SYBR Green I

图 5. RT-LAMP 方法的田间应用。(a) PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。M: DL2000DNA 分子量标准; 1~12: 田间白菜叶片样品; NC: 阴性对照; (b) 加入 SYBR Green I 染料的检测结果

4. 讨论

白菜是世界上种植最广泛的蔬菜之一,具有重要的经济价值。中国是白菜的最大消费国,也是白菜种植面积最大的国家[20]。白菜的产量和质量受到许多因素的影响,如病原体、害虫、非生物胁迫,特别是病毒[21]。到目前为止,全世界至少有9种病毒能够侵染白菜。病毒的检测和监控对于病毒的防控至关重要,因此需要建立快速、准确、可靠的病毒检测方法。

本研究首次报道了TYMV在中国的出现。同时,建立了TYMV的RT-LAMP检测方法。实验结果表明RT-LAMP方法十分灵敏,灵敏度比RT-PCR高出10,000倍。RT-PCR和RT-LAMP方法都能够检测出被TYMV侵染的白菜样品,但RT-LAMP方法具有速度快,操作简单的优点。RT-LAMP技术是在恒温条件下进行的,不需要特定的设备。RT-LAMP的反应产物加入SYBR Green I染料后[22],通过直接观察颜色变化,确定检测结果,十分便捷。在中国的6个省中收集了80份田间样品,有8份样品RT-LAMP和RT-PCR检测结果呈阳性。所有的阳性样品都来自贵州省,这表明TYMV现在可能只发生在贵州省,还没有传播到中国的其他省份。TYMV在贵州省一些县的田间发生率较高,有很大的可能传播到中国的其他省份,并对其他省份的大白菜造成严重损害,引起巨大的损失。病毒引起的植物病害往往具有难以治愈的特点,最实用的防控方法是种植脱毒植物或及时处理被病毒侵染的植物,这些措施需要准确可靠的病毒检测方法来支持。本研究建立的RT-LAMP检测技术能够准确、快速地检测出被TYMV侵染的白菜样品,在TYMV的防治中发挥重要作用。

综上所述,本研究建立了一种实用的检测TYMV的RT-LAMP方法,该方法在检测TYMV方面有很大的应用潜力。本研究设计的RT-LAMP检测引物是基于TYMV *RdRp* 基因中的保守区域设计的,这说明该方法也能够检测TYMV的其它分离物,在白菜产业的TYMV检测上具有良好的应用潜力。本研究建立的RT-LAMP方法具有良好的特异性及灵敏度,检测结果可通过颜色变化直接进行观察,方便快捷,适用于田间样品TYMV的检测,对该病毒病害的发生、流行监控具有积极意义。

参考文献

- [1] Mossop, D.W., Fry, P.R. and Young, B.R. (1983) New Plant Disease Records in New Zealand: Arabis Mosaic Virus in Celery, Lettuce and Chinese Cabbage, Tomato Spotted Wilt Virus in Celery. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, **26**, 257-259. <https://doi.org/10.1080/00288233.1983.10427070>
- [2] Cai, L., Zhang, Y.C., Chen, Y.S., Hong, N. and Xu, W.X. (2017) First Report of Broad Bean Wilt Virus 2 Infecting Non-Heading Chinese Cabbage in China. *Plant Disease*, **101**, 1559-1560. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-17-0310-PDN>
- [3] Farzadfar, S.H., Ahoomanesh, A., Mosahebi, G.H., Pourrahim, A.R. and Golnaraghi, A.R. (2007) Occurrence and Distribution of Cauliflower Mosaic Virus on Cruciferous Plants in Iran. *Plant Pathology Journal*, **6**, 22-29. <https://doi.org/10.3923/ppj.2007.22.29>
- [4] Liu, S., Cao, X. and Yuan, X. (2017) First Report of Cucumber Mosaic Virus and Its Associated Satellite RNA in Celery Cabbage in Shandong Province of China. *Plant Disease*, **101**, 1829-1830. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0538-PDN>
- [5] Kim, J.S., Cho, J.D., Choi, H.S., Lee, S.H., Choi, G.S., Lee, S.Y., Kim, H.J. and Yoon, M.K. (2010) Ribgrass Mosaic Tobamovirus Occurred on Chinese Cabbage in Korea. *The Plant Pathology Journal*, **26**, 328-339. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2010.26.4.328>
- [6] Green, S.K. and Deng, T.C. (1985) Turnip Mosaic Virus Strains in Cruciferous Hosts in Taiwan. *Plant Disease*, **69**, 28-31. <https://doi.org/10.1094/PD-69-28>
- [7] Chen, Y.K. and Chang, Y.S. (2011) First Report of Turnip Ringspot Virus in Field Mustard (*Brassica chinensis*) in Taiwan. *Plant Disease*, **95**, 1036. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0224>
- [8] Kirino, N., Inoue, K., Tanina, K., Yamazaki, Y. and Ohki, S.T. (2008) Turnip yellow mosaic virus Isolated from Chinese Cabbage in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, **74**, Article No. 331. <https://doi.org/10.1007/s10327-008-0108-2>

- [9] Xiang, H.Y., Dong, S.W., Shang, Q.X., Zhou, C.J., Li, D.W., Yu, J.L. and Han, C.G. (2011) Molecular Characterization of Two Genotypes of a New Polorovirus Infecting Brassicas in China. *Archives of Virology*, **156**, 2251-2255. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1091-z>
- [10] Morch, M.D., Boyer, J.C. and Haenni, A.L. (1988) Overlapping Open Reading Frames Revealed by Complete Nucleotide Sequencing of *Turnip yellow mosaic virus* Genomic RNA. *Nucleic Acids Research*, **16**, 6157-6173. <https://doi.org/10.1093/nar/16.13.6157>
- [11] Alfaro-Fernandez, A., Serrano, A., Tornos, T., Cebrian, M.C., Cordoba-Selles, M.C., Jorda, C. and Font, M.I. (2016) *Turnip yellow mosaic virus* in Chinese Cabbage in Spain: Commercial Seed Transmission and Molecular Characterization. *European Journal of Plant Pathology*, **146**, 433-442. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0929-3>
- [12] Spak, J., Kubelkova, D.A. and Hnilicka, E. (1993) Seed Transmission of *Turnip yellow mosaic virus* in Winter Turnip and Winter Oil Seed Rapes. *Annals of Applied Biology*, **123**, 33-35. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1993.tb04069.x>
- [13] de Assis Filho, F.M. and Sherwood, J.L. (2000) Evaluation of Seed Transmission of *Turnip yellow mosaic virus* and Tobacco Mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology*, **90**, 1233-1238. <https://doi.org/10.1094/PHTO.2000.90.11.1233>
- [14] Fukuta, S., Ohishi, K., Yoshida, K., Mizukami, Y., Ishida, A. and Kanbe, M. (2004) Development of Immunocapture Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Detection of Tomato Spotted Wilt Virus from Chrysanthemum. *Journal of Virological Methods*, **121**, 49-55. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.05.016>
- [15] Buates, S., Bantuchai, S., Sattabongkot, J., Han, E.T., Tsuboi, T., Udomsangpetch, R., Sirichaisinthop, J. and TanAriya, P. (2010) Development of a Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Clinical Detection of *Plasmodium Falciparum gametocytes*. *Parasitology International*, **59**, 414-420. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.05.008>
- [16] Fukuta, S., Iida, T., Mizukami, Y., Ishida, A., Ueda, J., Kanbe, M. and Ishimoto, Y. (2003) Detection of Japanese Yam Mosaic Virus by RT-LAMP. *Archives of Virology*, **148**, 1713-1720. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0134-5>
- [17] Varga, A. and James, D. (2006) Use of Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification for the Detection of Plum Pox Virus. *Journal of Virological Methods*, **138**, 184-190. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.08.014>
- [18] Peng, Q., Ning, J., Xu, Q., Yang, T., Wang, Y., Zheng, T., Zhuang, Q. and Xi, D. (2021) Development and Application of a Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with Lateral Flow Dipstick for Rapid and Visual Detection of Citrus Leaf Blotch Virus in Kiwifruit. *Crop Protection*, **143**, Article ID: 105555. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105555>
- [19] Feng W Z, Hieno, A., Kusunoki, M., Suga, H. and Kageyama, K. (2018) LAMP Detection of Four Plant-Pathogenic Oomycetes and Its Application in Lettuce Fields. *Plant Disease*, **103**, 298-307. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0858-RE>
- [20] Wang, J., Hou, X., Yang, X. and Gustafson, P. (2011) Identification of Conserved MicroRNAs and Their Targets in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* Subsp. *Pekinensis*). *Genome*, **54**, 1029-1040. <https://doi.org/10.1139/g11-069>
- [21] Liu, Y., Li, F., Li, Y.Y., Zhang, S.B., Gao, X.W., Xie, Y., Yan, F., Zhang, A.S., Dai, L.Y., Cheng, Z.B., Ding, M., Niu, Y.B., Wang, S.B., Che, H.Y., Jiang, T., Shi, X.B., He, Z.F., Wu, Y.F., Zhang, D.Y., Qing, L., Yan, W.R., Yang, X.H., Tang, Y.F., Zheng, H.Y., Tang, Q.J., Zhang, S.B., Zhang, D.F., Cai, L. and Tao, X.R. (2019) Species, Distribution and Occurrence Trends of Viruses Infesting Major Vegetable Crops in China. *Chinese Agricultural Science*, **52**, 239-261.
- [22] Kokane, A.D., Kokane, S.B., Warghane, A.J., Gubyad, M.G., Sharma, A.K., Reddy, M.K. and Ghosh, D.K. (2021) A Rapid and Sensitive Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay for the Detection of Indian Citrus Ringspot Virus. *Plant Disease*, **105**, 1346-1355. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1349-RE>