



# 白斑综合征病毒 PCR 检测方法的建立及初步应用

刘 芹,张秋桢,姜永厚

(浙江理工大学生命科学与医药学院,杭州 310018)

**摘 要:** 引起白斑综合征(White spot syndrome, WSS)的白斑综合征病毒(White spot syndrome virus, WSSV)是一种传播速度快、致死率高的对虾病毒,对全球对虾养殖业构成了严重威胁。为及早诊断 WSS,防止 WSS 的传播和暴发,有必要开发一种适用于对虾养殖场所的高灵敏度 WSSV 检测方法。该文针对保守区 VP28 序列设计和优化了一种可以特异地扩增 WSSV 的聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)检测方法。WSSV 扩增产物在凝胶电泳图上可观察到清晰且单一的目的条带,而非靶标病毒则没有对应扩增产物出现,最低检测限可以达到 50 拷贝/反应;利用该 PCR 方法检测杭州地区采集的 112 份对虾混样样品, WSSV 阳性率为 15.7%。该特异和灵敏的 PCR 方法可被应用于 WSS 流行早期监控。

**关键词:** 白斑综合征病毒;检测 PCR;特异性;灵敏度;对虾

**中图分类号:** S945.19;S945.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1673-3851(2023)09-0645-06

**引文格式:** 刘芹,张秋桢,姜永厚. 白斑综合征病毒 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 浙江理工大学学报(自然科学),2023,49(5):645-650.

**Reference Format:** LIU Qin, ZHANG Qiuya, JIANG Yonghou. Establishment and preliminary application of a PCR detection method for white spot syndrome virus[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2023, 49(5): 645-650.

## Establishment and preliminary application of a PCR detection method for white spot syndrome virus

LIU Qin, ZHANG Qiuya, JIANG Yonghou

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** The white spot syndrome virus (WSSV), a causative agent of white spot syndrome (WSS), is a rapidly spreading and highly lethal shrimp virus that poses a serious threat to the global shrimp farming industry. To diagnose WSS early and prevent its spread and outbreak, it is necessary to establish a highly sensitive WSS diagnostic method suitable for shrimp farms. In this study, a common polymerase chain reaction (PCR) assay targeting the conserved VP28 sequence was designed and optimized to specifically amplify WSSV. According to the gel electrophoresis map of the amplification products, a clear and single band was observed with WSSV, while non-target viruses were not amplified. The limit of detection of the assay can reach 50 copies/reaction. It is found that by using the PCR to detect 112 shrimp sample pools collected in Hangzhou, 15.7% samples were positive for WSSV. The specific and sensitive PCR method for detecting WSSV can be applied to early monitoring of disease epidemics.

**Key words:** white spot syndrome virus (WSSV); detecting PCR; specificity; sensitivity; shrimp

## 0 引 言

白斑综合征病毒(White spot syndrome virus,

WSSV)是线头病毒科(Nimaviridae)白斑病毒属(Whispovirus)的唯一成员,基因组为双链环状 DNA,大小约为 300 kb,预测编码至少 181 个蛋白,

收稿日期:2023-05-21 网络出版日期:2023-07-07

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LGC21C180002)

作者简介:刘 芹(1998—),女,安徽滁州人,硕士研究生,主要从事病毒分子诊断方面的研究。

通信作者:姜永厚, E-mail: yonghoujiang@zstu.edu.cn

是目前已知最大基因组的病毒之一<sup>[1-2]</sup>。WSSV 是一种高致死率和高传染性病毒, 侵染对虾鳃、肝胰腺、外壳等组织, 导致患病虾外骨骼出现白色钙化斑点, 引起白斑综合征(White spot syndrome, WSS)。感染 WSSV 宿主在 3~10 d 内累积死亡率一般在 90%~100%<sup>[3-4]</sup>, 自 1992 年首次发现以来造成的经济损失总额约为 80~150 亿美元, 并且还以每年 10 亿美元的速度增加<sup>[5-6]</sup>。1995 年, 国际兽疫局(Office international des epizooties, OIE)、联合国粮农组织(Food and agriculture organization, FAO)以及亚太地区水产养殖发展网络中心(Network of aquaculture centers in Asia-Pacific, NACA)将 WSSV 列为需要报告的重要水生动物病毒病的病原之一。由于尚未发现有效的防治药物<sup>[7]</sup>, 建立一种有效检测 WSSV 的方法, 从而在疫病流行早期阶段及时做出诊断, 并采取隔离措施是控制该病毒传播的关键。

近 30 年来, 研究人员开发了多种 WSSV 检测技术, 包括原位杂交<sup>[8]</sup>、单克隆抗体<sup>[9]</sup>、侧流免疫测定<sup>[10]</sup>、酶联免疫<sup>[11]</sup>和聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)<sup>[12]</sup>等。尽管这些技术解决了诊断问题的某些方面, 但存在诸多局限性。原位杂交方法涉及切片及探针制备, 需要专业的操作培训; 单克隆抗体、侧流免疫测定及酶联免疫依赖免疫学原理, 病毒免疫分析的成功取决于抗体的高度敏感性和特异性, 而免疫抗体对某些变异病毒的敏感性和特异性较低, 容易受到基质干扰的影响, 限制了靶病毒抗原的稳定表达, 进而影响检测的准确性<sup>[13]</sup>。PCR 技术根据病毒核酸序列特异性扩增原理检测病毒, 具有高效、便捷和准确性高等优点, 逐渐成为病毒检测的主要方法。关于 WSSV 的 PCR 检测方法已有报道<sup>[14-15]</sup>, 但最低检测限为  $10^4 \sim 10^7$  拷贝/反应, 灵敏度较低; 荧光定量 PCR 方法虽然灵敏度高, 但需要的仪器和试剂成本较高, 且容易出现假阳性<sup>[16]</sup>。因此, 本文针对 WSSV 建立一种特异性好、灵敏度高的常规 PCR 检测方法, 对预防对虾 WSS, 选取正确的防治措施控制 WSSV 的传播及减少危害具有非常重要的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 病毒与样品来源

WSSV、对虾肝胰腺细小病毒(Hepatopancreas parvovirus, HPV)、传染性皮下和造血坏死病毒(Infectious hypodermal and hematopoietic necrosis

virus, IHHNV)和无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)对虾基因组 DNA/cDNA 以及含目的片段 WSSV 质粒保存于本实验室; 黄头病毒(Yellow head virus, YHV)、斑节对虾杆状病毒(Monodon baculovirus, MBV)和陶拉病毒(Taura syndrome virus, TSV)病毒基因片段由苏州金唯智生物有限公司直接合成。浙江杭州新农都市场共采集 560 只活对虾, 5 只对虾混合作为一个混样样品, 保存于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  的冰箱中。

### 1.2 实验试剂及仪器

PCR 扩增仪(Bio-Rad 公司), PowerPac 电泳仪(Bio-Rad 公司), Fresco 21 离心机(Eppendorf 公司), Tanon 3500R 凝胶成像系统(上海天能科技有限公司), 超微量分光光度计 Nanodrop 2000(Thermo 公司), 微波炉(Galanz 公司)和快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司)。

AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒和 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒(Axygen 公司),  $2\times$  Taq Master Mix(诺唯赞公司), 琼脂糖(Invitrogen 公司)。

### 1.3 病毒核酸提取

取虾鳃、肝胰腺、肌肉组织 0.2 g 于 1.5 mL 离心管中, 研磨仪研磨充分, 然后加  $1\times$  PBS buffer 2 mL 混匀, 反复冻融 3 次, 病毒粒子充分释放后 13000 r/min 离心 10 min, 吸取上清备用。根据 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒使用说明书, 取 200  $\mu\text{L}$  上清提取病毒 DNA。

### 1.4 引物设计

参照 WSSV 基因组序列(GenBank 序列号 DQ979320), 在包膜蛋白基因 VP28 保守序列中设计一对引物, 上游引物 WSSV-F: 5'-CTCTTTTCG GTCGTGTCGGC-3', 下游引物 WSSV-R: 5'-TGC CAACTTCATCCTCATCAATA-3', 目标产物 493 bp。引物由苏州金唯智生物有限公司合成。

### 1.5 模板定量及稀释

将 WSSV 质粒解冻后, 利用 Nanodrop 测量初始浓度, 计算质粒初始浓度, 将质粒 10 倍梯度依次稀释到 5 拷贝/ $\mu\text{L}$ , 保存在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。

### 1.6 体系优化

根据实验室已有的 PCR 反应体系, 对扩增程序进行优化, 优化循环数(30、35、40 个循环和 45 个循环)和退火温度( $40.0 \sim 65.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ): 7.5  $\mu\text{L}$   $2\times$  Master Mix, 0.4  $\mu\text{L}$  上引物和下引物(浓度 10  $\mu\text{mol/L}$ ), 1  $\mu\text{L}$  对虾病毒模板( $5\times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ), 最后用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 15  $\mu\text{L}$ 。初始反应程序

如下:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,循环 34 次,在 72 ℃延伸 5 min,PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.7 特异性分析

根据优化后的 PCR 体系,分别以 SPF 虾基因组、YHV、MBV、TSV、IHHNV 和 HPV 基因组 DNA/cDNA 为模板扩增,以 ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照,判断引物是否有非特异性扩增,以 WSSV 模板为阳性对照,判断产物大小是否符合预期。

### 1.8 灵敏性分析

取  $5 \times 10^6 \sim 5$  拷贝的 WSSV 模板分别加入反应体系中,通过琼脂糖凝胶电泳结果判断检测最低限度。

### 1.9 对虾样品的检测

将 560 只对虾分成 112 组混样(5 只对虾 1

组),采用已优化的 PCR 方法对 112 组对虾混样样品进行检测,PCR 产物经凝胶电泳初步认定为阳性后送苏州金唯智生物有限公司进行测序以再次验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 退火温度优化

为确定 WSSV 的 PCR 最适退火温度,在初始 PCR 程序基础上(循环数为 35)进行温度梯度(40.0~65.0 ℃)扩增(图 1)。从图 1 中可以看出,在 40.0~60.0 ℃均有条带扩增,在 59.7、55.0 ℃和 49.4 ℃退火温度下条带最亮。综合考虑引物特异性和二聚体等因素,最终选择 55.0 ℃作为最佳退火温度。

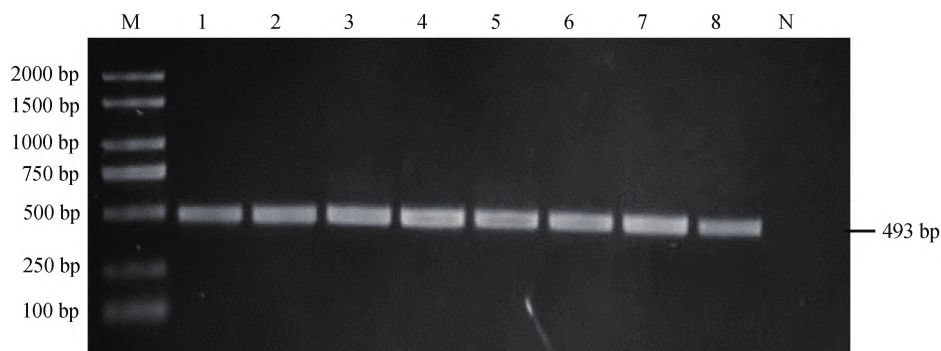


图 1 不同 PCR 退火温度扩增 WSSV 的产物电泳图

注:M 表示 DL2000 DNA Marker;1~8 分别表示不同退火温度的泳道,退火温度分别为 65.0、63.0、59.7、55.0、49.4、44.7、41.7 ℃和 40.0 ℃;N 表示阴性对照,WSSV 病毒模板浓度为  $5 \times 10^5$  拷贝/ $\mu$ L。

### 2.2 循环数优化

为确定 WSSV 普通 PCR 合适循环数,在最佳退火温度 55.0 ℃基础上,分别进行 30、35、40 个循环和 45 个循环的扩增(图 2)。从图 2 中可以看出:WSSV 在 30 个循环下条带暗淡甚至降低一个灵敏

度;35 个循环下虽然能达到检测限最低拷贝数,但条带不够清晰;在 40、45 个循环下检测最低拷贝数时,条带都较为清晰且均无引物二聚体和非特异性扩增。考虑到反应时间和检测效率的问题,最终选择 40 个循环作为 PCR 反应条件。

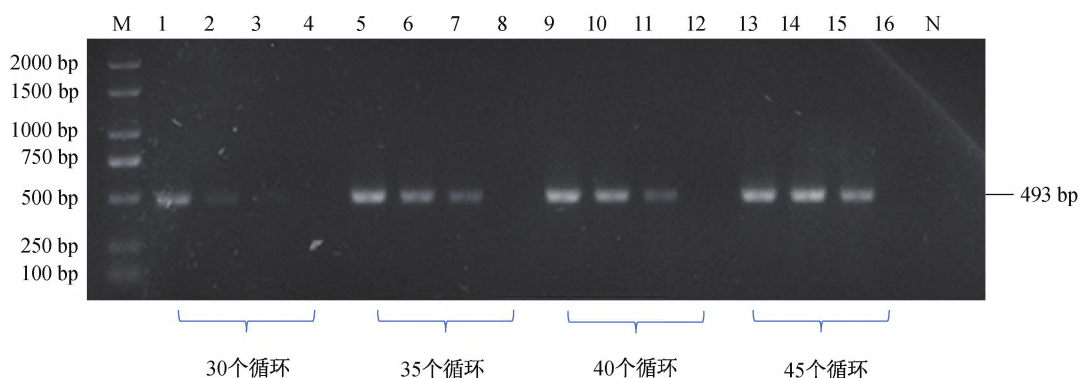


图 2 不同 PCR 循环数扩增 WSSV 的产物电泳图

注:M 表示 DL2000 DNA Marker;1~4、5~8、9~12、13~16 分别为  $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^1$  拷贝/ $\mu$ L 和 5 拷贝/ $\mu$ L 浓度病毒模板;N 表示阴性对照。



### 2.3 特异性

分别以 WSSV、YHV、HPV、IHHNV、MBV、TSV、PEDV 和 SPF 对虾基因组 DNA/cDNA 为模板进行 PCR,分析 WSSV PCR 检测方法特异性(图 3)。从图 3 中可以看出:以 WSSV 为模板时,有清晰的单一条带产生,符合预期大小;以非靶标病毒为模板时没有非特异性扩增,同时阴性对照无二聚体产生。这表明建立的 WSSV 方法具有较好的特异性。

### 2.4 灵敏度分析

以 10 倍梯度稀释后的病毒标准品( $5 \times 10^6 \sim 5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ )为模板,在优化后的 PCR 反应体系中扩增,通过凝胶电泳图条带清晰度判断最低检测浓度,结果如图 4 所示。图 4 显示:随着标准品模板拷贝数的逐级降低,对应的特异性条带亮度也逐渐减弱,模板浓度最低为  $5 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$  时仍可以观察到特异性条带,表明针对 WSSV 建立的 PCR 方法最低检测限为 50 拷贝/反应,灵敏度表现较好。

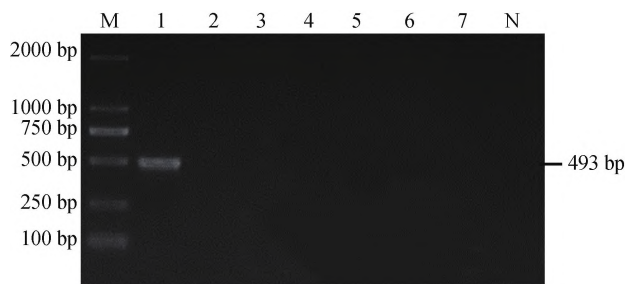


图 3 WSSV PCR 扩增不同对虾病毒的产物电泳图

注:M 表示 DL2000 DNA Marker;1~7 分别代表不同的病毒模板,1 为 WSSV;2 为 YHV;3 为 HPV;4 为 IHHNV;5 为 MBV;6 为 TSV;7 为 SPF 对虾基因组;WSSV 病毒模板浓度为  $1 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;N 表示阴性对照。

### 2.5 样品检测

利用建立的 WSSV 检测方法检测 112 份混合对虾样品,17 份阳性样品检出,样品阳性率为 15.7%,根据俞潇潇等<sup>[17]</sup>报道的混合检验总体率可信区间估计方法,获得虾群中 WSSV 的阳性率为 3.3%;部分阳性样品送苏州金唯智生物有限公司测序,经 BLAST 序列比对,确定虾样品中的病毒为 WSSV。

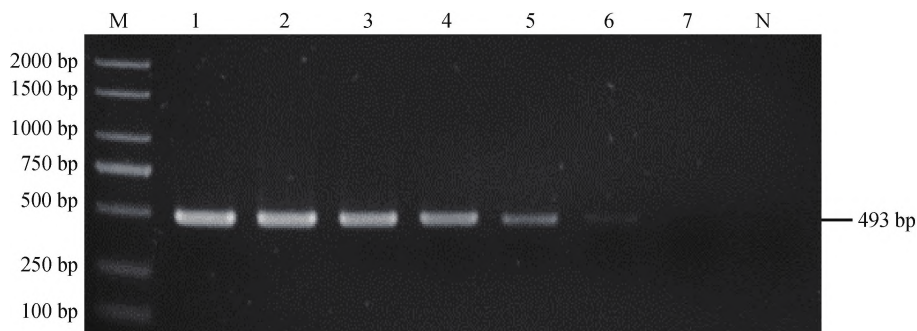


图 4 WSSV PCR 扩增不同浓度 WSSV 的产物电泳图

注:M 表示 DL2000 DNA Marker;泳道分别表示不同浓度质粒拷贝数,其中 1 表示  $5 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;2 表示  $5 \times 10^5$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;3 表示  $5 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;4 表示  $5 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;5 表示  $5 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;6 表示  $5 \times 10^1$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ;7 表示 5 拷贝/ $\mu\text{L}$ ;N 表示阴性对照。

## 3 讨论

PCR 检测方法具有特异性强、灵敏度高、效率高等优点,已广泛应用于水产品的各个研究领域<sup>[18]</sup>。在 PCR 检测方法建立的过程中,引物对靶标病毒的特异性是诊断方法各项性能的基础<sup>[19]</sup>。通过对 WSSV 全基因组比对分析,找到保守区 VP28 并设计一对特异性引物,同时通过对退火温度和循环次数的优化,使得建立的 PCR 方法具有良好的特异性和敏感性。本文建立的 PCR 检测方法只对 WSSV 模板产生特异性单一扩增产物,对非目标模板和阴性对照均未产生扩增;对 WSSV 的最

检测限为 50 拷贝/反应,比闫冬春等<sup>[20]</sup>和 Xie 等<sup>[21]</sup>建立的 WSSV PCR 方法最低检测限( $8 \times 10^5$  拷贝/反应和  $2 \times 10^8$  拷贝/反应)要低 4~7 个数量级,接近于陈信忠等<sup>[22]</sup>和 Moody 等<sup>[23]</sup>建立的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 方法(30 拷贝/反应和 2 拷贝/反应)以及 Mendoza-Cano 等<sup>[24]</sup>建立的 SYBR 实时荧光定量 PCR(12 拷贝/反应)。因此,本文建立的 WSSV PCR 检测方法具有特异性强和灵敏度高等优势,为 WSS 早期诊断提供了新的技术手段。

近年来,WSSV 在国内多个地区养殖对虾体内均有检出<sup>[25-26]</sup>。本文采集了杭州地区 112 份混合对虾样品,检测发现样品阳性率为 15.7%,计算虾群

阳性率为 3.3%。施慧等<sup>[25]</sup>在对浙江地区 118 份凡纳滨对虾苗种检测发现, WSSV 的阳性样品检出率为 27.1%。陈一兵等<sup>[26]</sup>在苏北地区养殖场 516 份对虾样品中检测出 139 份阳性样品, 阳性率为 21.9%。孙悦等<sup>[27]</sup>对 2014—2020 年在天津地区采集的对虾样品检测发现, WSSV 的感染率在 1.23%~7.23%。梁静真等<sup>[28]</sup>对广西地区养殖对虾调查发现, 2013—2016 年的 WSSV 样品检出率在 13.8%~21.6%。本文所检测对虾样品 WSSV 虾群阳性率略低于之前报道, 可能与所采集样品皆为相对健康的成体虾有关, 而健康成体虾携带 WSSV 更应引起养殖户警惕。

#### 4 结 论

本文建立了一种特异性好、灵敏度高、操作简单和成本低的对虾 WSSV PCR 检测方法, 最低检测限度可以达到 50 拷贝/反应; 应用该方法对 112 份田间样品进行了检测和测序分析验证, 确认了该方法的可靠性, 为 WSS 早期防控及流行病学调查提供了技术支持。

#### 参考文献:

- [1] Jeeva S, Kim N I, Jang I K, et al. Development of a multiplex PCR system for the simultaneous detection of white spot syndrome virus and hepatopancreatic parvovirus infection[J]. *Aquaculture Research*, 2014, 45 (6): 1073-1083.
- [2] Qiu W, Geng R, Zuo H L, et al. Toll receptor 2 (Toll2) positively regulates antibacterial immunity but promotes white spot syndrome virus (WSSV) infection in shrimp[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2021, 115: 103878.
- [3] Verbruggen B, Bickley L K, van Aerle R, et al. Molecular mechanisms of white spot syndrome virus infection and perspectives on treatments[J]. *Viruses*, 2016, 8(1): 23.
- [4] Zhu G H, Li S H, Wu J, et al. Identification of functional gene modules associated with STAT-mediated antiviral responses to white spot syndrome virus in shrimp[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 212.
- [5] Lightner D V, Redman R M, Pantoja C R, et al. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in the Americas[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 174-183.
- [6] Stentiford G D, Neil D M, Peeler E J, et al. Disease will limit future food supply from the global crustacean fishery and aquaculture sectors [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2012, 110(2): 141-157.
- [7] Xu J D, Jiang H S, Wei T D, et al. Interaction of the small GTPase Cdc42 with arginine kinase restricts white spot syndrome virus in shrimp[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(5): e01916.
- [8] Nunan L M, Lightner D V. Development of a non-radioactive gene probe by PCR for detection of white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Journal of Virological Methods*, 1997, 63(1/2): 193-201.
- [9] Zhan W B, Wang Y H, Fryer J L, et al. Production of monoclonal antibodies (MAbs) against white spot syndrome virus (WSSV)[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1999, 11(1): 17-22.
- [10] Cheng Q Y, Meng X L, Xu J P, et al. Development of lateral-flow immunoassay for WSSV with polyclonal antibodies raised against recombinant VP (19 + 28) fusion protein[J]. *Virologica Sinica*, 2007, 22(1): 61-67.
- [11] Tang X Q, Liang Q R, Liu L S, et al. An optimized double-antibody sandwich ELISA for quantitative detection of WSSV in artificially infected crayfish[J]. *Journal of Virological Methods*, 2018, 251: 133-138.
- [12] Ma C, Tian Z, Yang L L, et al. Validation of qPCR from a crude extract for the rapid detection of white spot syndrome virus [J]. *Aquaculture International*, 2022, 30(5): 2679-2690.
- [13] Su W T, Liang D, Tan M Q. Nucleic acid-based detection for foodborne virus utilizing microfluidic systems[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 113: 97-109.
- [14] 刘飞, 张宝存, 张晓华, 等. 对虾 6 种病毒多重 PCR 检测方法的建立[J]. *渔业科学进展*, 2014, 35(1): 60-67.
- [15] 吴思思, 金立方, 余招锋. 南美白对虾桃拉病毒和白斑病毒多重 PCR 检测体系的建立[J]. *农业与技术*, 2012, 32(10): 81-83.
- [16] 陈信忠, 任聪, 龚艳清, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测对虾白斑综合征病毒[J]. *检验检疫学刊*, 2009, 19 (2): 7-11.
- [17] 俞潇潇, 刘沛. 混合检验总体率可信区间估计方法[J]. *中国卫生统计*, 2007, 24(1): 74-75.
- [18] Phromjai J, Boonsaeng V, Withyachumnarnkul B, et al. Detection of hepatopancreatic parvovirus in Thai shrimp *Penaeus monodon* by in situ hybridization, dot blot hybridization and PCR amplification[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2002, 51(3): 227-232.
- [19] Kwon J Y, Hong J S, Kim M J, et al. Simultaneous

- multiplex PCR detection of seven cucurbit-infecting viruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 206: 133-139.
- [20] 闫冬春, 黄健, 董双林, 等. PCR 检测对虾白斑综合征病毒(WSSV)中使用 UNG 防遗留污染[J]. *海洋水产研究*, 2003, 24(3): 29-33.
- [21] Xie Z X, Pang Y S, Deng X W, et al. A multiplex RT-PCR for simultaneous differentiation of three viral pathogens of penaeid shrimp[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 76(1): 77-80.
- [22] 陈信忠, 任聪, 龚艳清, 等. 实时荧光定量 PCR 法检测对虾白斑综合征病毒[J]. *检验检疫学刊*, 2009, 19(2): 7-11.
- [23] Moody N J G, Mohr P G, Williams L M, et al. Performance characteristics of two real-time TaqMan polymerase chain reaction assays for the detection of WSSV in clinically diseased and apparently healthy prawns[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2022, 150: 169-182.
- [24] Mendoza-Cano F and Sánchez-Paz A. Development and validation of a quantitative real-time polymerase chain assay for universal detection of the white spot syndrome virus in marine crustaceans [J]. *Virology Journal*, 2013, 10: 186.
- [25] 施慧, 谢建军, 许文军, 等. 浙江地区凡纳滨对虾苗 3 种对虾病毒携带情况研究[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2013, 32(1): 25-30.
- [26] 陈一兵, 万夕和, 周俊芳, 等. 苏北部分地区南美白对虾养殖场白斑综合征病毒流行病学调查[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(5): 328-331.
- [27] 孙悦, 刘健, 叶桂焯, 等. 2014 年—2020 年天津凡纳滨对虾苗种主要病毒携带情况调查[J]. *中国水产*, 2022(5): 95-96.
- [28] 梁静真, 马沙, 肖双燕, 等. 2013—2016 年广西沿海养殖凡纳滨对虾 2 种病毒的流行情况调查[J]. *西南农业学报*, 2018, 31(5): 1088-1096.

(责任编辑:张会巍)