

郭佳琪, 杨晓宇, 冯 宇, 等. 猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(2): 357-362.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.02.016

猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测方法的建立及初步应用

郭佳琪¹, 杨晓宇¹, 冯 宇¹, 杨 钊¹, 徐志文^{1,2}, 朱 玲^{1,2}

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130; 2. 四川农业大学动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130)

摘要: 为建立一种快速、准确检测猪非典型性瘟病毒(APPV) 的方法, 根据 GenBank 发布的 APPV NS2 基因序列, 设计合成 1 对扩增后目的基因片段大小为 500 bp 的特异性引物。建立的 RT-PCR 方法对猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、伪狂犬病毒(PRV) 和猪瘟病毒(CSFV) 的检测结果均为阴性, 该方法对 APPV 的最低检出量为 1 μ l 4.95 \times 10⁴ 拷贝, 重复性试验中组间、组内试验结果均与预期相符。应用该方法对 68 份疑似患病的仔猪样品进行检测, 阳性病料检出率为 7.35%。利用 Mega7.0 绘制 APPV 系统进化树, 对 APPV 进行遗传进化分析, 结果显示本试验检出的 APPV(SC 株) 与中国报道的 APPV 的亲缘关系较近。建立的 APPV RT-PCR 检测方法可用于 APPV 的临床诊断及流行病学检测。

关键词: 猪非典型性瘟病毒; RT-PCR; 检测

中图分类号: S858.281.34⁺7

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2019) 02-0357-06

Establishment and preliminary application of RT-PCR detection method for atypical porcine pestivirus

GUO Jia-qi¹, YANG Xiao-yu¹, FENG Yu¹, YANG Fan¹, XU Zhi-wen^{1,2}, ZHU Ling^{1,2}

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Sichuan Provincial Key Laboratory of Animal Diseases and Human Health, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

Abstract: In order to establish a rapid and accurate method for detecting atypical porcine pestivirus (APPV), a pair of specific primers was designed and synthesized based on the APPV NS2 gene sequence published by GenBank, and the size of the target gene fragment was 500 bp after amplification. The detection results by the established RT-PCR method were negative for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), pseudorabies virus (PRV) and swine fever virus (CSFV), and the minimum detectable amount of APPV was 4.95 \times 10⁴ copies per microlitre, and the results of inter group and intra group test in the repeated test were all in conformity with the expected results. The method was applied to detect 68 suspected cases of piglets, and the positive rate was 7.35%. Mega7.0 was used to draw the phylogenetic tree of APPV and analyze the genetic evolution of APPV. The results showed that the APPV detected in this test was closely related to the Chinese reported APPV. The RT-PCR detection method of APPV can be used for the clinical diagnosis and epidemiological detection of APPV.

The results showed that the APPV detected in this test was closely related to the Chinese reported APPV. The RT-PCR detection method of APPV can be used for the clinical diagnosis and epidemiological detection of APPV.

Key words: atypical porcine pestivirus (APPV); RT-PCR; detection

收稿日期: 2018-05-15

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(2017NZ0038); “十二五”农村领域国家科技计划课题(2015BAD12B04-2.3); “十三五”育种攻关计划项目(2016NYZ0052)

作者简介: 郭佳琪(1996-), 女, 山东苍山人, 本科。(E-mail) 1511701068@qq.com

通讯作者: 徐志文, (E-mail) abtexzw@126.com

仔猪先天性震颤(Congenital tremors, CT) 会导致

仔猪出生后数小时内出现骨骼肌双侧痉挛性收缩,妨碍仔猪站立、步行和寻找乳头^[1-3],致使仔猪饥饿和初乳摄入不足,严重的可导致仔猪死亡。一般根据神经系统是否发生病变,将CT分为A型和B型,A型有明显的大脑和脊柱的组织学损伤,B型无损伤^[4-5]。A型又可分为A-I~A-V 5种亚型,其中只有A-I型与A-II型具有传染性。A-I型一般认为是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起,以小脑发育不全为特征^[6-7]。A-II型的病因存在一定争议,直到2015年,Hause等通过宏基因组测序发现了猪非典型性瘟病毒(Atypical porcine pestivirus virus, APPV)^[8]。2016年,Arruda^[9]确定APPV是A-II的病因。随后,德国、荷兰、奥地利等多个国家先后发现猪群存在APPV流行^[10]。2017年,华南农业大学许古明等^[11]首次发现中国猪群APPV的发生,这使中国兽医学界展开了对APPV的研究。

APPV属于黄病毒科瘟病毒属,该病毒属还包括牛病毒性腹泻病毒1型(Bovine viral diarrhea virus 1, BVDV-1)和2型(Bovine viral diarrhea virus-2, BVDV-2)、猪瘟病毒(CSFV)和边界病病毒(Border disease virus, BDV)及之后发现的其他瘟病毒(Ho-Bi-like pestivirus)^[12]。APPV是基因组长约11 kb的RNA病毒^[13],包含上游5' UTR、ORF和下游3' UTR,ORF区编码的蛋白质可分为4种结构蛋白(C、Erns、E1、E2)和8种非结构蛋白(Npro、P7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B)^[14]。

RT-PCR检测方法对样品纯度要求低,不用分离病毒及培养细胞,具有操作简单快速、成本低、敏感性高等特点^[15],建立APPV的RT-PCR检测方法对于国内猪非典型性瘟病毒的检测研究具有重要意义。我们根据GenBank发表的APPV基因组序列,选择APPV NS2基因,建立RT-PCR快速检测方法,通过该方法对采自规模化猪场的疑似患病样品进行检测,并对其阳性样品PCR产物进行基因测序和遗传进化分析,为兽医临床诊断提供一种可靠的检测方法。

1 材料与方法

1.1 病毒和病料

猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)、伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)和猪瘟病毒(CSFV)均由四川农业大学动物生物技术中心保存。病料(颌下

淋巴结、小脑、腹股沟淋巴结等)采自四川省遂宁、邛崃、大邑、崇州、宜宾等地区的规模化养猪场。

1.2 主要试剂

5×Prime script buffer、Prime Script RT enzyme Mix I、Oligo dT primer、Random 6 mers、RNase free dH₂O、DL2000 DNA marker、Trizol、Taq Hs、10×Reaction buffer(Mg²⁺ free)均购自宝生物工程(大连)有限公司。质粒提取试剂盒(Plasmid Kit I)购自Omega公司。

1.3 APPV引物设计与合成

根据GenBank发表的APPV基因组序列,选择APPV NS2基因,应用NCBI设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。上游引物序列为5'-GAACCTAAGACCAACACGGAT-3',下游引物序列为5'-GAGGGTAGGAAGGGAAAG-3',其预期扩增片段大小为500 bp,稀释为20 μmol/L备用。

1.4 病毒RNA的提取及反转录

将疑似患非典型性猪瘟的样品充分剪碎,加入液氮研磨成粉末,再加入适量生理盐水保存于EP管中备用。采用Trizol法提取病料RNA,随后用反转录试剂盒将提取的RNA反转录成cDNA。反转录体系(10.0 μl):RNase free dH₂O 3.5 μl, 5×Prime script buffer 2.0 μl, Random 6 mers 0.5 μl, Oligo dT primer 0.5 μl, Primer Script RT enzyme Mix I 0.5 μl, RNA模板3.0 μl。产物于-20℃冰箱保存备用。

1.5 APPV的RT-PCR方法建立

PCR反应体系(25.0 μl)为:cDNA 2.0 μl, 10×Reaction buffer 2.5 μl, dNTP Mix 1.0 μl, Taq Hs 0.5 μl, 上、下游引物各0.5 μl, 加ddH₂O至25.0 μl。反应条件为:95.0℃ 4 min; 95.0℃ 30 s, 58.4℃ 30 s, 72.0℃ 30 s, 30个循环; 72.0℃ 7 min。

1.5.1 Mg²⁺、Taq Hs、dNTP Mix用量的优化 PCR反应体系总体积25.0 μl保持不变,分别调整Mg²⁺、Taq Hs、dNTP Mix的用量,对反应体系进行优化。Mg²⁺用量依次为0.5 μl、1.0 μl、1.5 μl、2.0 μl、2.5 μl和3.0 μl, Taq Hs用量依次为0.1 μl、0.2 μl、0.3 μl、0.4 μl、0.5 μl和0.6 μl, dNTP Mix用量依次为1.0 μl、1.5 μl、2.0 μl、2.5 μl、3.0 μl和3.5 μl。在单一变量的情况下,选取目的条带扩增效果最好的试剂用量。

1.5.2 引物用量及退火温度优化 在Mg²⁺、Taq Hs、dNTP Mix用量优化的基础上,分别改变引物用

量(1.0 μl 、1.5 μl 、2.0 μl 和 2.5 μl) 和退火温度(52.0 $^{\circ}\text{C}$ 、52.7 $^{\circ}\text{C}$ 、54.0 $^{\circ}\text{C}$ 、55.9 $^{\circ}\text{C}$ 、58.4 $^{\circ}\text{C}$ 、60.3 $^{\circ}\text{C}$ 、61.4 $^{\circ}\text{C}$ 和 62.0 $^{\circ}\text{C}$), 进行 PCR 扩增, 筛选最适引物用量和退火温度。

1.5.3 RT-PCR 的特异性试验 在上述优化条件下, 应用建立的 RT-PCR 方法对 APPV、PRRSV、PRV、CSFV 进行特异性检测, 设阴性对照组, 验证该方法的特异性。

1.5.4 RT-PCR 的敏感性试验 用质粒提取试剂盒提取 APPV 质粒, 用核酸蛋白质仪测定所构建的阳性质粒浓度, 计算出模板的拷贝数。在上述优化条件下, 将模板进行倍比稀释进行 RT-PCR, 以验证本方法的敏感性。

1.5.5 RT-PCR 的重复性试验 提取 APPV 阳性病料 RNA, 以反转录的产物为模板, 应用建立的 RT-PCR 方法分别进行组间、组内重复性试验, 以验证本方法的稳定性。

1.6 临床样品检测及阳性样品鉴定

将 68 份样品病料充分剪碎, 加入液氮研磨成粉末, 再加入适量生理盐水制得研磨液, -20°C 保存备用。Trizol 法提取病料的 RNA, 随后用反转录试剂盒将提取的 RNA 反转录成 cDNA, 然后用建立的 RT-PCR 方法进行 APPV 检测, 对检测数据进行统计分析。

1.7 遗传进化分析

应用 Mega7.0 软件对获得的阳性序列、GenBank 公布的 APPV 基因序列和同是黄病毒科瘟病毒属的 BVDV-1、BVDV-2、BDV、CSFV 等毒株基因序列共同绘制系统进化树, 分析 APPV 的遗传与进化规律, 丰富完善 APPV 流行病学资料。

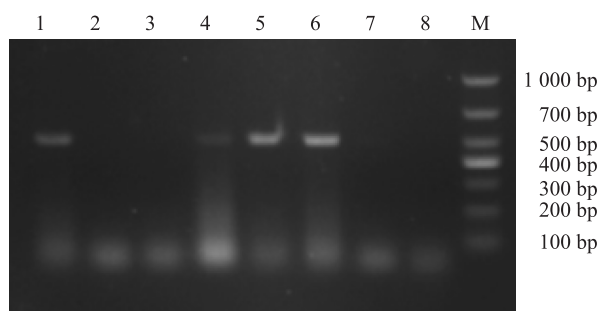
2 结果

2.1 猪非典型性瘟病毒 NS2 基因的 RT-PCR 扩增

将疑似患病样品处理后提取其 RNA, 用设计的引物进行 RT-PCR 反应。电泳结果显示, 本研究设计的引物扩增出 1 条约 500 bp 的条带(图 1), 与预期结果一致。

2.2 猪非典型性瘟病毒 (APPV) RT-PCR 检测的优化反应条件

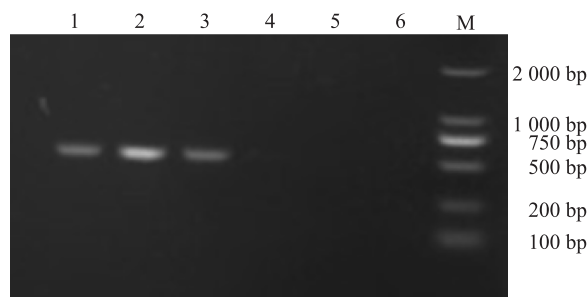
在其他条件不变的情况下对 Mg^{2+} 、 Taq Hs、dNTP Mix 用量单一变量进行优化。结果显示, 当 Mg^{2+} 、 Taq Hs、dNTP Mix 用量分别为 2.5 μl 、0.6 μl 、1.0 μl 时, 扩增的条带最为清晰(图 2、图 3、图 4)。



M: DNA 分子质量标准; 1~7: 样品 1~7; 8: 阴性对照。

图 1 猪非典型性瘟病毒 NS2 基因的 RT-PCR 扩增

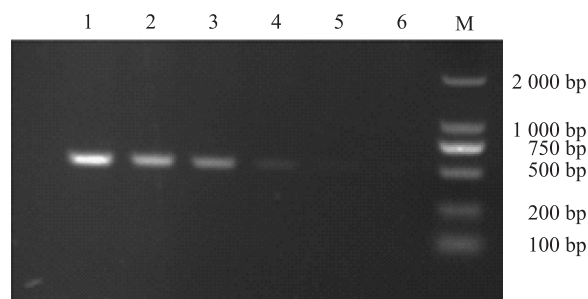
Fig.1 RT-PCR amplification of NS2 gene of atypical porcine pestivirus (APPV)



M: DNA 分子质量标准; 1~6: Mg^{2+} 用量依次为 3.0 μl 、2.5 μl 、2.0 μl 、1.5 μl 、1.0 μl 、0.5 μl 。

图 2 猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测的 Mg^{2+} 用量优化

Fig.2 Optimization of Mg^{2+} dosage of RT-PCR detection for atypical porcine pestivirus

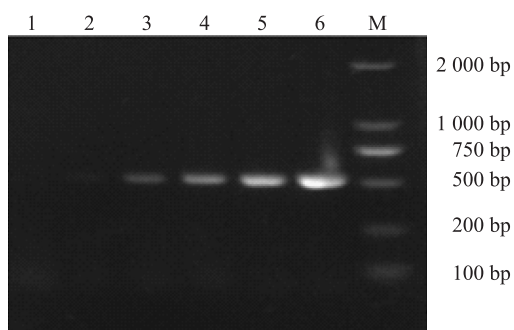


M: DNA 分子质量标准; 1~6: Taq Hs 用量依次为 0.6 μl 、0.5 μl 、0.4 μl 、0.3 μl 、0.2 μl 、0.1 μl 。

图 3 猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测的 Taq Hs 用量优化

Fig.3 Optimization of Taq Hs dosage of RT-PCR detection for atypical porcine pestivirus

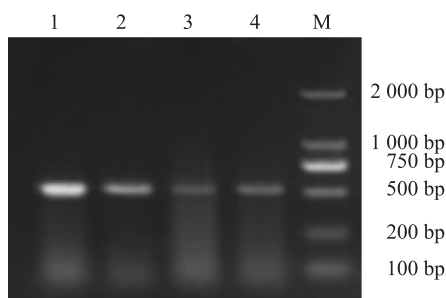
固定 25 μl PCR 反应体系的其他条件不变, 对引物用量和引物退火温度进行优化。结果表明最佳引物用量为 2.5 μl (图 5), 最佳退火温度为 58.4 $^{\circ}\text{C}$ (图 6)。



M: DNA 分子质量标准; 1~6: dNTP Mix 用量依次为 3.5 μ l、3.0 μ l、2.5 μ l、2.0 μ l、1.5 μ l、1.0 μ l。

图 4 猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测的 dNTP Mix 用量优化

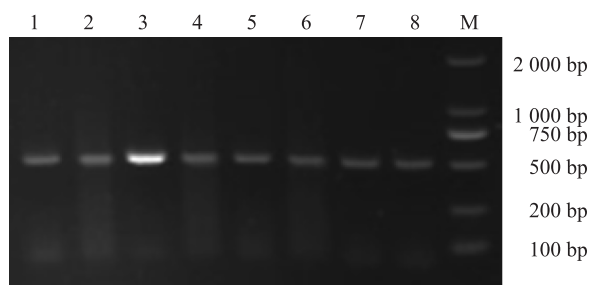
Fig.4 Optimization of dNTP Mix dosage of RT-PCR detection for atypical porcine pestivirus



M: DNA 分子质量标准; 1~4: 引物用量依次为 2.5 μ l、2.0 μ l、1.5 μ l、1.0 μ l。

图 5 猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测的引物用量优化

Fig.5 Optimization of primer concentration of RT-PCR detection for atypical porcine pestivirus



M: DNA 分子质量标准; 1~8: 退火温度依次为 62.0 $^{\circ}$ C、61.1 $^{\circ}$ C、58.4 $^{\circ}$ C、57.2 $^{\circ}$ C、55.4 $^{\circ}$ C、53.9 $^{\circ}$ C、52.6 $^{\circ}$ C、51.7 $^{\circ}$ C。

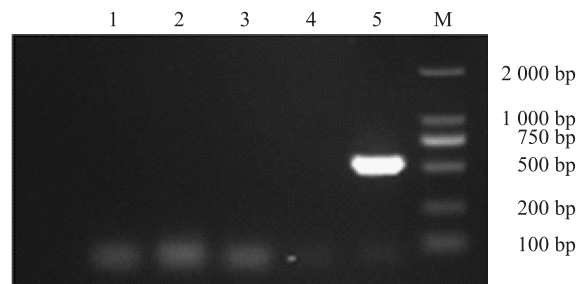
图 6 猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测的退火温度优化

Fig.6 Optimization of annealing temperature of RT-PCR detection for atypical porcine pestivirus

2.3 猪非典型性瘟病毒 (APPV) RT-PCR 检测的特异性

对建立的 APPV RT-PCR 检测方法的特异性进

行试验,结果表明建立的 APPV RT-PCR 检测方法对猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、伪狂犬病毒 (PRV) 和猪瘟病毒 (CSFV) 的检测结果均为阴性 (图 7)。说明本研究建立的方法特异性强,与其他病原无交叉反应。



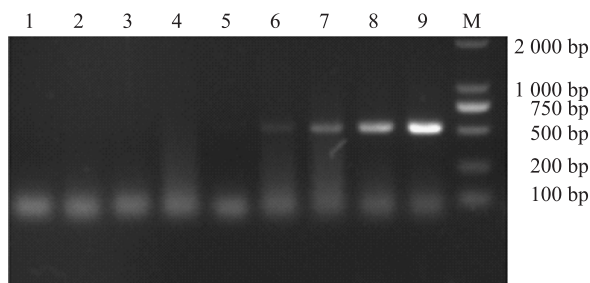
M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2: 猪瘟病毒 (CSFV); 3: 伪狂犬病毒 (PRV); 4: 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV); 5: 猪非典型性瘟病毒 (APPV)。

图 7 猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测的特异性

Fig.7 Specificity of RT-PCR detection for atypical porcine pestivirus

2.4 猪非典型性瘟病毒 (APPV) RT-PCR 检测的敏感性

采用建立的 RT-PCR 检测方法对倍比稀释后的 APPV 阳性质粒进行扩增,1% 琼脂糖电泳观察。用 NanoDrop 测定 6 号 APPV 样品检出量为 1 μ l 4.95×10^4 拷贝 (图 8), 表明该方法敏感性较强。



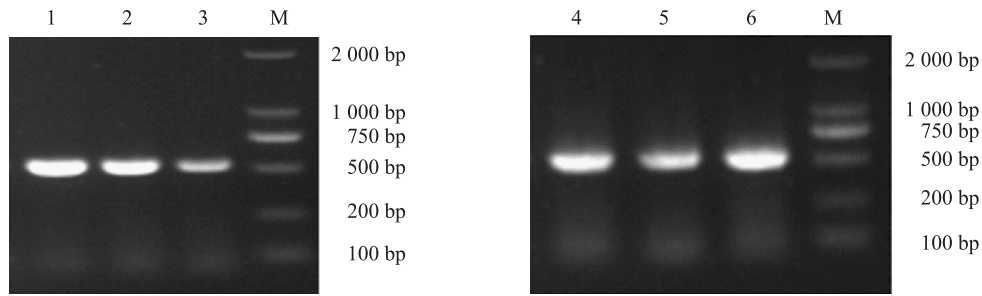
M: DNA 分子质量标准; 1: 阴性对照; 2~9: 模板的稀释梯度依次为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 。

图 8 猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测的敏感性

Fig.8 Sensitivity of RT-PCR detection for atypical porcine pestivirus

2.5 猪非典型性瘟病毒 (APPV) RT-PCR 检测的重复性

对样品中猪非典型性瘟病毒核酸分别进行组间、组内重复性试验,结果均一致 (图 9), 表明本试验方法的重复性较好。



M:DNA 分子质量标准;1~3:组内重复;4~6:组间重复。

图9 猪非典型性瘟病毒 RT-PCR 检测的重复性

Fig.9 Repeatability of RT-PCR detection for atypical porcine pestivirus

2.6 建立的 APPV RT-PCR 检测方法对临床样品的检测应用

利用本试验建立的 RT-PCR 检测方法对 68 份疑似患病样品进行检测,共检出阳性样品 5 份,阳性检出率为 7.35%。将 5 份阳性样品的 PCR 产物进行测序,测序结果证实目的条带均为 APPV NS2 基因的特异性片段。测序分析结果与 RT-PCR 结果高度一致,进一步验证了本试验建立的检测方法的特异性与准确性。

2.7 猪非典型性瘟病毒 (APPV) 遗传进化分析

将检出的临床阳性样品 RT-PCR 产物送至生工

生物工程(上海)有限公司测序。用 Mega7.0 软件对 APPV 阳性样品的基因序列和 GenBank 已发表的 APPV 基因序列,以及与 APPV 同科同属的 BVDV-1、BVDV-2、BDV、CSFV 等基因序列进行遗传进化分析。结果(图 10)表明,本研究中检出的猪非典型性瘟病毒(SC 株)NS2 基因序列与所有 APPV 基因参考序列均处于同一分支,与其他 APPV 核苷酸序列的同源性在 92% 以上。SC 株与中国报道的 APPV 的亲缘关系较近,与国外报道的 APPV 的亲缘关系较远。且与 CSFV、BDV 及 BVDV 均不在同一分支内。

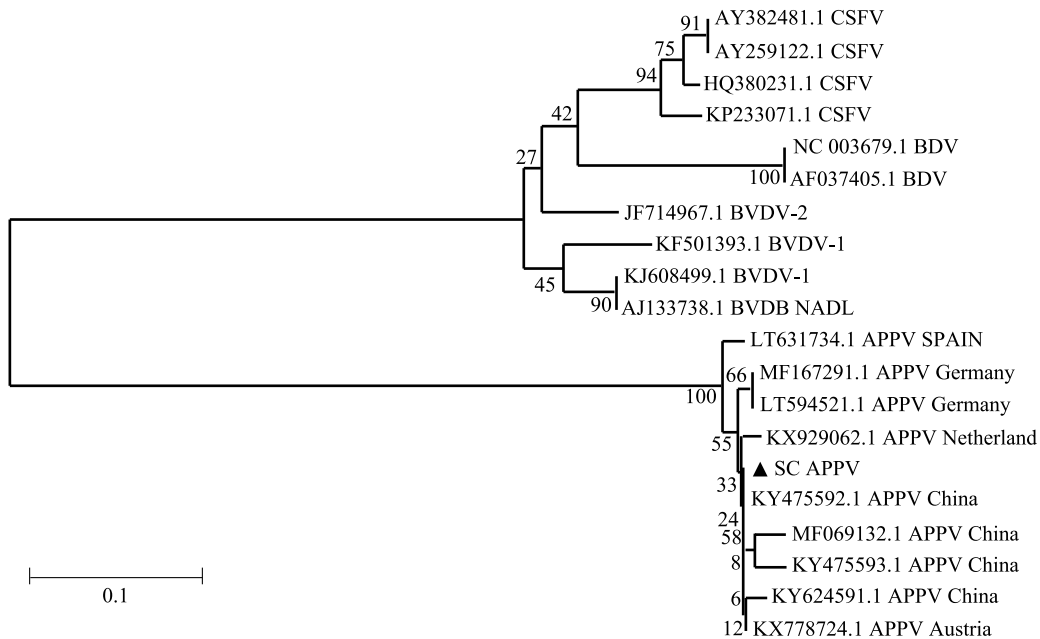


图10 猪非典型性瘟病毒 (APPV) NS2 基因部分序列系统进化树

Fig.10 Phylogenetic tree of atypical porcine pestivirus (APPV) NS2 gene partial sequence

3 讨论

猪非典型性瘟病毒 (APPV) 是中国最近几年才检测出的一种新病毒。人工感染试验证实 APPV 是一种可以引起 A-II 型仔猪先天性震颤的病原^[9]。感染该病毒的仔猪四肢、头部或全身出现有节奏的震颤^[16], 强烈的重复性震颤使仔猪无法寻找乳头, 导致仔猪母乳摄入不足, 严重时会导致仔猪死亡。如果护理得当, 大多数仔猪断奶后震颤现象自行消失^[3]。中国养猪业规模庞大, 在受影响的养殖场中发现约 1%~2% 的流行率, 由于养猪业的规模和 100% 淘汰率, APPV 造成了极大的经济损失^[8], 促使我们为兽医临床诊断建立一种简单快速的检测方法。

本试验根据 GenBank 中已发表的 APPV NS2 基因序列, 设计了 1 对特异性引物并且成功建立了一种 APPV 的 RT-PCR 快速检测方法。特异性试验结果表明, 本研究建立的方法可以特异性地从样品中检测出 APPV, 而与 PRRSV、PRV 和 CSFV 等病原无交叉反应, 具有较高的特异性。敏感性试验结果表明, 建立的 RT-PCR 检测方法的最低检出量为 $1 \mu\text{L}$ 4.95×10^4 拷贝。为验证该方法的稳定性, 本研究进行了组间、组内重复性试验, 结果表明该方法具有良好的重复性。对采自四川省遂宁、邛崃等地区的 68 份疑似患病样品进行检测, 共有 5 份检测结果为阳性, 阳性检出率为 7.35%。同时, 我们根据阳性产物测序结果利用 Mega7.0 绘制 APPV 的系统进化树^[17], 发现本研究检测的 APPV SC 株与其他 APPV 核苷酸序列的同源性在 92% 以上, SC 株与中国报道的 APPV 的亲缘关系较近, 并且国内大部分 APPV 分离株与国外分离株位于不同分支, 表明国内的 APPV 的生物学特性、致病性等与国外分离株可能有所区别。以上试验结果均表明, 本试验研究建立的 APPV RT-PCR 检测方法可应用于临床 APPV 的诊断、检测和流行病学调查, 为今后开展 APPV 的深入研究提供了技术手段, 有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] ARRUDA B L, ARRUDA P H, MAGSTADT D R, et al. Identification of a divergent lineage porcine pestivirus in nursing piglets with congenital tremors and reproduction of disease following experimental inoculation[J]. PLoS ONE, 2016, 11(2): e0150104.
- [2] 杨晓宇, 徐 雷, 殷鑫欢, 等. 猪非典型性瘟病毒与猪流行性腹

- 泻病毒双重 PCR 方法的建立与应用[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(5): 1081-1086.
- [3] PATTERSON D S, DONE J T, FOULKES J A, et al. Neurochemistry of the spinal cord in congenital tremor of piglets (type AII), a spinal dysmyelination of infectious origin[J]. Neurochem, 1976, 26: 481-485.
- [4] PATTERSON D S, SWEASEY D, BRUSH P J. Neurochemistry of the spinal cord in British Saddleback piglets affected with congenital tremor, type A-IV, a second form of hereditary cerebospinal hypomyelination[J]. J Neurochem, 1973, 21(2): 397-406.
- [5] BAUMGARTNER B G, BRENIG B. The role of proteolipid proteins in the development of congenital tremors type A III: A review[J]. Dtsch Tierarztl Wochenschr, 1996, 103(10): 404-407.
- [6] DE GROOF A, DEJIS M, GUELEN L, et al. Atypical porcine pestivirus: A possible cause of congenital tremor type A-II in newborn piglets[J]. Viruses, 2016, 8(10): 271.
- [7] DONE J T, WOOLLEY J, UPCOTT D H, et al. Porcine congenital tremor type AII: Spinal cord morphometry[J]. Br Vet J, 1986, 142: 145-150.
- [8] YUAN J, HAN Z, LI J, et al. Atypical porcine pestivirus as a novel type of pestivirus in pigs in China[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 862.
- [9] POSSATTI F, HEADLEY S A, LEME R A, et al. Viruses associated with congenital tremor and high lethality in piglets[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(2): 331-337.
- [10] POSTEL A, HANSMANN F, BAECHEIN C, et al. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in new-born piglets correlates with congenital tremor[J]. Sci Rep, 2016, 6: 27735.
- [11] 许古明, 葛士坤, 张凯照, 等. 猪非典型瘟病毒的基因组特征分析及荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2017(11): 1357-1362.
- [12] MÓSENA A C S, WEBER M N, DA CRUZ R A S, et al. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(1): 22-26.
- [13] BEER M, WERNIKE K, DRAGER C, et al. High prevalence of highly variable atypical porcine pestiviruses found in Germany[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2017, 64(5): 22-26.
- [14] ZHANG H, WEN W, HAO G, et al. Phylogenetic and genomic characterization of a novel atypical porcine pestivirus in China[J]. Transboundary and emerging diseases, 2018, 65(1): 202-204.
- [15] 夏文龙, 余树培, 吴 植, 等. 荧光定量 RT-PCR 检测高致病性 PRRSV 接触感染仔猪增殖动态[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(10): 169-172.
- [16] 张文波, 吴松松, 邓舜洲, 等. 一种新型仔猪先天性震颤及其病原的初步研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(7): 2147-2154.
- [17] 董安国, 高 琳, 赵建邦, 等. 基于 DNA 序列的系统进化树构建[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2008, 36(10): 221-226.

(责任编辑: 张震林)