

畸形桑叶中病毒的鉴定及其小 RNA 特征分析

孔卫青, 凌 君, 杨金宏*

(安康学院, 陕西省蚕桑重点实验室, 安康 725000)

摘要 从安康市桑园采集了 68 份畸形桑树叶样品, 利用 PCR 扩增检测鉴定其中存在 4 种病毒, 分别是桑花叶型萎缩病相关病毒(mulberry mosaic dwarf-associated virus, MMDaV)、桑花叶卷叶病相关病毒(mulberry mosaic leaf roll associated virus, MMLRaV)、桑花叶萎缩类病毒(mulberry mosaic dwarf viroid, MMDVd)和桑潜隐病毒(mulberry cryptic virus, MuCV), 存在复合侵染。对 4 种病毒复合侵染桑叶进行小 RNA 深度测序和分析, 结果显示其中的 sRNA 来自 MMDaV、MMLRaV、MMDVd、MuCV 4 种病毒, 与 RT-PCR 检测结果一致。进一步分析 sRNA 长度和 5'-末端序列, MMDaV sRNA 长度以 24 nt 最多, 其他病毒 sRNA 主要为 21 nt。MMDaV 基因组链 sRNA 5'-末端以 A 和 T 为主, MuCV 以 C 最多, MMLRaV 和 MMDVd 一致, 均以 T 最多。

关键词 畸形桑叶; 病毒; 复合侵染; 小 RNA

中图分类号: S888.71 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021498

Identification and analysis of viruses and small RNA in deformed mulberry leaves

KONG Weiqing, LING Jun, YANG Jinhong*

(Shaanxi Key Laboratory of Sericulture, Ankang University 725000, China)

Abstract A total of 68 deformed mulberry leaves were collected from mulberry garden in Ankang city. Four viruses including mulberry mosaic dwarf-associated virus (MMDaV), mulberry mosaic leaf roll associated virus (MMLRaV), mulberry mosaic dwarf viroid (MMDVd) and mulberry cryptic virus (MuCV), and mix-infection were found by RT-PCR amplification in the samples. And then, the small RNA deep-sequencing and analysis of mulberry leaves mix-infected by four viruses were carried out. The results showed that the sRNA was from four viruses of MMDaV, MMLRaV, MMDVd and MuCV, which was in accordance with that from RT-PCR. The analysis of sRNA length showed that the predominated length of MMDaV sRNA was 24 nt, while 21 nt for other three viruses. The results of 5'-terminus nucleotide bias showed that 5'-terminus nucleotide of MMDaV genomic strands sRNA are most A and T, C for MuCV, while MMLRaV and MMDVd are both preferred T.

Key words deformed mulberry leaf; virus; mixed infection; small RNA

蚕桑产业是我国传统优势产业, 近年随着生物技术的发展, 蚕桑产业在食用、饲用、医药、化工等多个领域的应用得到不断拓展。桑叶是家蚕的唯一食物来源, 桑叶的产量和质量对蚕桑产业的发展具有重要影响。植物病毒病可导致宿主品质降低、产量下降、甚至绝收, 危害严重。近年常见桑叶病毒病的相关报道, 病害导致桑叶卷曲、畸形、发黄、萎缩等, 影响桑叶的产量和品质。迄今为止已报道的感染桑

树病毒有桑花叶型萎缩病相关病毒(mulberry mosaic dwarf associated virus, MMDaV)^[1]、桑花叶卷叶病相关病毒(mulberry mosaic leaf roll associated virus, MMLRaV)^[2]、桑杆状 DNA 病毒 1(mulberry badnavirus-1, MBV-1)^[3]、桑脉带相关病毒(mulberry vein banding associated virus, MVBaV)^[4]、桑花叶萎缩类病毒(mulberry mosaic dwarf viroid, MMDVd)^[5]、柑橘叶斑病毒(citrus leaf blotch virus,

收稿日期: 2021-09-08

修订日期: 2021-11-25

基金项目: 陕西省重点研发计划(2018ZDXM-NY-057); 陕西高校青年创新团队项目(2020AYSC01)

* 通信作者 E-mail: 418537663@qq.com

CLBV)^[6]、李坏死环斑病毒(prunus necrotic ring-spot virus, PNRSV)、桑潜隐病毒(mulberry cryptic virus, MuCV)^[7]、烟草线条病毒(tobacco streak virus, TSV)^[8]等,分属于 8 个科。

陕西安康地区是我国优质茧丝生产基地,近年来调查发现桑园病毒病害日趋严重。小 RNA (small RNA, sRNA)深度测序技术直接以宿主中 sRNA 为研究对象,是一种发现新病毒、监控病毒变异的有效方法,在植物、无脊椎动物和人体细胞病毒的鉴定和分类等方面有较多的应用^[9]。本研究对安康主要桑树种植区进行采样调查,利用 RT-PCR 对 9 种病毒在样品中的存在情况进行鉴定,对 MMLRaV、MMDaV、MMDVd 和 MuCV 复合感染的桑树叶片小 RNA (small RNA, sRNA)进行深度测序和分析,为桑树病毒病的防控和抗病育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2020 年春在安康市汉滨区五里镇、大同镇、恒口镇等地调查桑病毒病发生情况,采集表现为畸形的桑树病毒病症状的叶片 68 份,−80℃冰箱保存备用。

1.2 RNA 提取与 RT-PCR 扩增验证

利用 Eastep™ Super 总 RNA 提取试剂盒 (LS1040)提取桑树叶片的总 RNA,反转录试剂盒 (A5001)和 2×PCR 反应混合液 (M7122)进行总 RNA 的反转录和 PCR 扩增,以桑树 *actin* 基因为内参对照,检测畸形桑树叶片中的病毒。扩增程序为:94℃ 5 min 预变性;94℃ 30 s,52℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃延伸 10 min。检测引物来自文献或利用 Primer Premier 5.0 设计(表 1),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 病毒检测引物¹⁾

Table 1 Primers used for virus detection in this study

病毒 Virus	引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	登录号 Accession no.	片段长度/bp Fragment length
桑花叶型萎缩病相关病毒 Mulberry mosaic dwarf associated virus	MMDaV-F1	CATTGTCAGGCTGTGGAT	KP303687 ^[10]	252
	MMDaV-R1	CCAGAATCCTCGTGATTATAC		450
	MMDaV-F2	GGGGATGACACAAACCAAAG		
	MMDaV-R2	ATTAGCAGTCAATGTCACATTC		
桑潜隐病毒 Mulberry cryptic virus	MuCV-F1	ACATCGTCTTGGCGATCCTAA	MW029479 *	329
	MuCV-R1	TCTGTATTTCGGCAGAACCGTAA	MW029480 *	668
	MuCV-F2	CAAGCCTAGGCTAGCAAGCTAAAGG		
	MuCV-R2	GCTCTTCCCCATACGCCCTCTAAC		
桑脉带相关病毒 Mulberry vein banding associated virus	MVBaV-F1	TCAGTTATAGCATCTCTGAATG	KM819670 *	515
	MVBaV-R1	TCAGACAATCAGATGAGTCAAG	KM819701 *	966
	MVBaV-F2	CATAGCATCAGCCTCAA		
	MVBaV-R2	GTCTACCGTCCGTCAGC		
桑杆状 DNA 病毒 1 Mulberry badnavirus-1	MBV-1-F1	CAAAGGTCTAGATTTCTGTAAAG	LN651258 *	703
	MBV-1-R1	GTGCTTAGCGGCTTCGGCACTGG		526
	MBV-1-F2	GCATTTGCGAGTGGAACCTTT		
	MBV-1-R2	TCATCGACGCTAAGTGGCATT		
桑花叶卷叶病相关病毒 Mulberry mosaic leaf roll associated virus	MMLRaV-F1	AGAGGTATGATGGCCACGCA	MN240484 *	480
	MMLRaV-R1	GATTTCATTTCGCTTCTGTACAAG	MN240485 *	633
	MMLRaV-F2	CTCTTCCCTTTGATGTTCCCTT		
	MMLRaV-R2	AACCAGGAAGGGACGAATACC		
桑花叶萎缩类病毒 Mulberry mosaic dwarf viroid	MMDVd-F1	ATCCACAATTAACCGCCAGC	KJ532933 *	356
	MMDVd-R1	TGACCGTACTCATGCCTAACA		270
	MMDVd-F2	AGACCGCCGGAGCCTCAAATC		
	MMDVd-R2	GAACGAAATTGACTGTAGAGAAC		
柑橘叶斑病毒 Citrus leaf blotch virus	CLBV-F1	ACCAATGACAATGCCACA	MT767171 ^[6]	694
	CLBV-R1	TTATGAAACTCTTCCCACT		341
	CLBV-F2	CTGGAAGTATTTGGCATCA		
	CLBV-R2	AGTACATCTGCCTGTCTTG		

续表 1 Table 1(Continued)

病毒 Virus	引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence	登录号 Accession no.	片段长度/bp Fragment length
李坏死环斑病毒 Prunus necrotic ringspot virus	PNRSV-F1	GTTTTTGTACTCGTGGTTGAGTT	KT444701 ^[11]	578
	PNRSV-R1	ACTGCACTACTCGACCAACTGTCTCTAAT		
	PNRSV-F2	TCTTGCAAGAAGTGCTATCCGA	MH282499 ^[11]	595
	PNRSV-R2	CGGAATCTGCACTCGTGGTAA		
烟草线条病毒 Tobacco streak virus	TSV-F1	AGATAAGTCGCTTCTCGGAC	KX405023 ^[8]	929
	TSV-R1	TGCTCGCATGGGTCATAGAC		
	TSV-F2	GTATTCTCCGAGCTTAAGATAC	KF264463 ^[8]	1 200
	TSV-R2	ATGGTCTGGACCTTGGATCA		
	Actin-F	CCTCACTGAAGCTCCTCTCAAC	HQ163776	315
	Actin-R	ACAATTTCCCGTTCAGCAGTGG		

1) 星号和方括号中的数字表示引物为本文设计或来源文献。
The asterisk (*) or number in square bracket indicated the primers were designed in this study or from literatures.

1.3 sRNA 文库构建与测序

为进一步鉴定桑树中的病毒,对经 RT-PCR 检测复合感染了 MMdVaV、MMLRaV、MMDVd 和 MuCV 的‘淮阴 4 号’桑树进行小 RNA 测序。取单株 5 个枝条,混合单枝条的 3 片桑叶为一个样本,共 5 个重复样本。以无病毒侵染的健康‘淮阴 4 号’桑树叶片为对照,3 个重复。提取各样本总 RNA,利用 Qubit RNA 检测试剂盒(Q32855, Life)进行定量,检测合格后送生工生物工程(上海)股份有限公司构建 sRNA 文库,Qubit DNA 检测试剂盒检测合格的 sRNA 文库进行 Hiseq 2500 平台高通量测序。

1.4 候选病毒 sRNA 序列分析

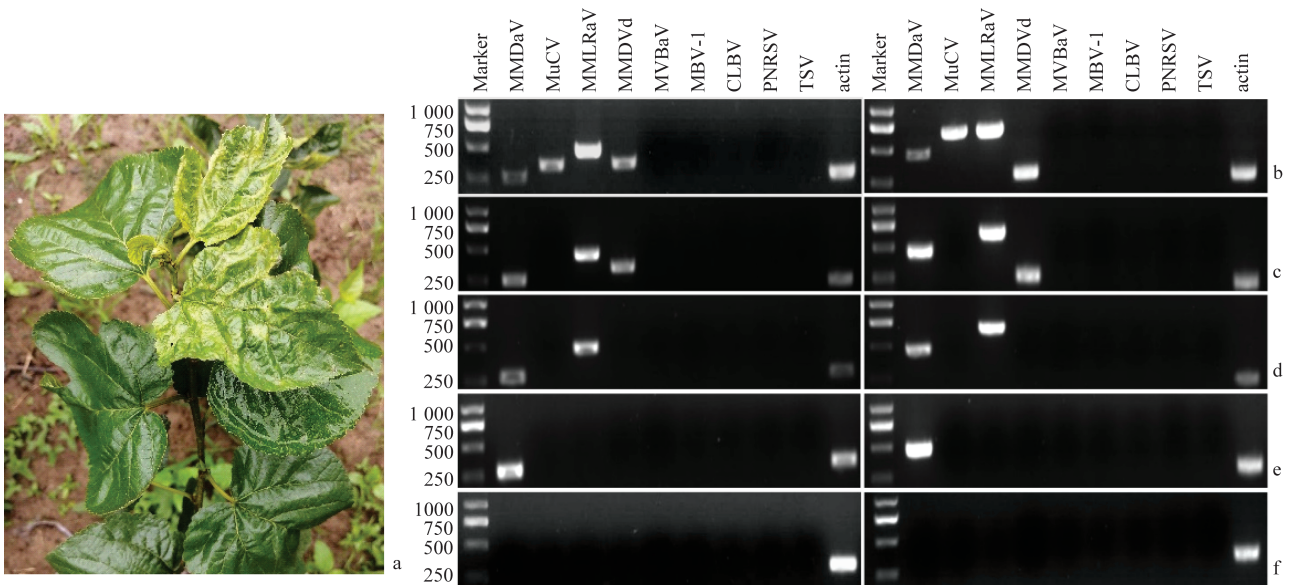
对测序所得数据进行处理,去除接头和低质量

数据,筛选长度为 18~28 nt 的 sRNA,使用 Bowtie 1.0 软件和无参考基因组分析候选寄主病毒 sRNA,统计 sRNA 数量、长度、5'-末端核苷酸组成。对基因组环状病毒,通过在完整基因组序列后面手动加入其自身的第 1~27 nt 序列作参考基因组进行分析。

2 结果与分析

2.1 侵染桑树的主要病毒种类检测

RT-PCR 对 68 份畸形桑树叶片进行检测,结果共检测到 MMdVaV、MMLRaV、MMDVd、MuCV 4 种病毒,其中 MuCV 只在 1 份样品中被检出,该样品同时检出了 MMdVaV、MMLRaV、MMDVd(图 1b),为 4



a: 4种病毒复合侵染桑树; b-e: 分别为4, 3, 2, 1种病毒侵染样本的检测; f: 健康对照; Marker: DNA Marker DL 2000; actin: 内参基因
a: Mulberry with four viruses; b-e: Detection of samples infected by four, three, two, and one viruses, respectively; f: Healthy control; Marker: DNA Marker DL 2000; actin: Reference gene

图 1 4 种病毒复合侵染桑树的症状及病毒侵染样本的检测

Fig. 1 Symptom of mulberry infected by four viruses and the detection of samples infected by viruses

种病毒的复合侵染(图 1a)。MMDVd 的检出率为 47.06%,且所有检出 MMDVd 的样本均同时检测到 MMDaV 和 MMLRaV(图 1c)。MMLRaV 的检出率为 83.82%(图 1d),MMDaV 在 68 份样品均检测(图 1e)。MBV-1、MVBaV、CLBV、PNRSV 和 TSV 等 5 种病毒在本次采集样本中没有检测到。

2.2 sRNA 及其特征分析

去除低质量和长度小于 18 nt 大于 28 nt 的

测序数据,复合侵染桑树样本和对照样本分别得到 sRNA 序列 58 920 928 条和 32 715 082 条,数据过滤后复合侵染桑树样本获得病毒 sRNA 序列 6 470 767 条,对照样本仅获得 74 条,几乎没有病毒来源序列(表 2)。与 GenBank 病毒数据库和桑树病毒序列进行比对,所得 sRNA 可以比对到 MMDaV、MMLRaV、MMDVd、MuCV 4 种病毒的核酸序列,与前述 RT-PCR 鉴定结果一致。

表 2 复合侵染和对照桑树样本的 sRNA 数

Table 2 Number of sRNA reads in mix-infection mulberry and control sample

样本 Sample	总 sRNA Total sRNA	病毒 sRNA Virus sRNA	MMDaV	MMDVd	MMLRaV		MuCV	
					RNA1	RNA2	RdRp	cp
复合侵染 Mix-infection	58 920 928	6 470 767	4 715 220	1 329 692	252 193	157 783	3 564	12 315
对照 Control	32 715 082	74	26	0	7	33	2	6

统计 sRNA 的长度,MMLRaV、MMDVd、MuCV 的 sRNA 长度以 21 nt 最多,而 MMDaV 的 sRNA 长度以 24 nt 最多(图 2)。分别统计来自本研究 4 种病毒基因组链和互补链的 sRNA 的末端序列(图 3),结果显示 MMDaV 基因组链 sRNA 的 5'-末端以 A 和 T 为主,分别占总数的 37.10%和 32.39%,互补链以 A 为主,占总数的 44.57%。MMLRaV 和 MMDVd 基因组链 sRNA 的 5'-末端以 T 最多,均占总数的 50%以上,而其互补链刚好相反,以 A 和 G 居多。MuCV 基因组链 sRNA 的 5'-末端以 C 最多,占总量的 54.15%,互补链主要为 A,占其总量的 70.66%。

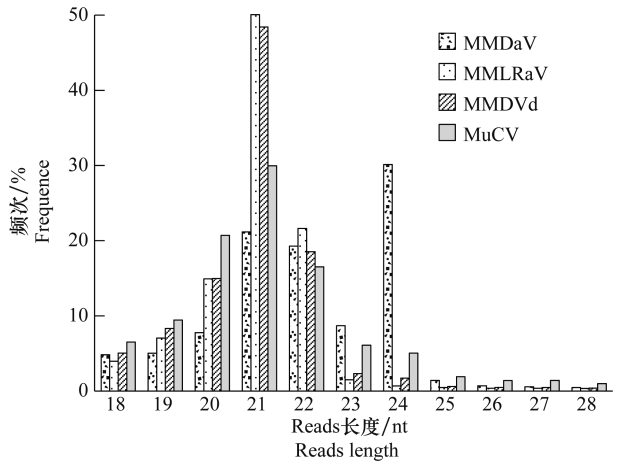


图 2 4 种病毒 sRNA 长度分布

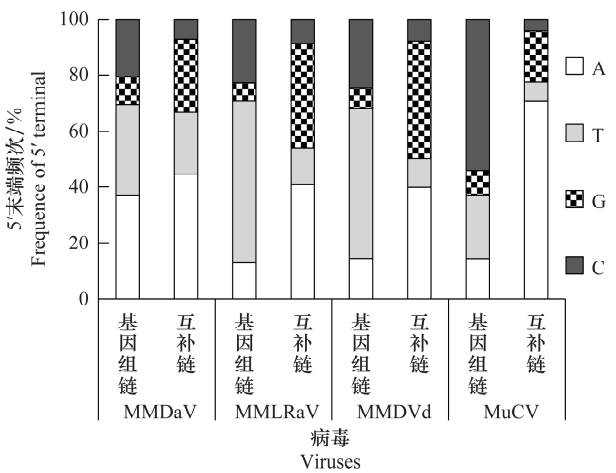


图 3 4 种病毒基因组链和互补链 sRNA 5'-末端碱基

Fig. 3 The 5'-terminal nucleotide bias of sRNA from genomic and negative strands of four viruses

3 讨论

随着检测技术的发展,近年来报道的病毒种类不断增多,同时,由于媒介昆虫能传播多种病毒,植物病毒的复合侵染现象时常发生。桑树病毒病在我国江苏、广东、广西、陕西等地均有发生,且复合侵染现象严重,发生症状多为卷叶、花叶、皱缩等,难以区分,如孙勋勋等^[10]从皱缩状和花叶状桑叶样品中同时检测到 MMDaV 和 MVBaV, Ma 等^[1]从畸形的桑树叶片中同时检测到 3 种病毒 MMDaV、MMLRaV 和 MMDVd。本文利用 RT-PCR 对安康地区 3 个蚕

Fig. 2 Length distribution of sRNA from four viruses

桑重点镇桑园的 68 份桑叶样本的感染情况进行了检测,发现了最多 4 种病毒的复合侵染。

MMDaV 为双生病毒科 *Geminiviridae* 成员,又被称为桑树皱叶病毒 (mulberry crinkle leaf virus, MCLV),目前的研究主要集中在病毒的检测,先后建立了酶联免疫吸附 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、核酸斑点杂交 (nucleic acid spot hybridization, NASH)、基于 SYBR Green I 的 qPCR 检测等方法^[12-14]。柴建萍等对发病桑园中半翅目 Hemiptera 粉虱科 Aleyrodidae 桑粉虱 *Pealius mori* 的研究显示,其可通过取食获毒,是该病毒的携带者和传播媒介^[15]。但关于 MMDaV 的侵染性、宿主范围及其损害评估等缺乏相关研究。MMLRaV 为豇豆花叶病毒科 *Comoviridae* 成员,2014 年卢全有在花叶卷叶症状桑叶中发现^[2]。MMDVd 为植物亚病毒感染因子,又称为小分子环状 RNA (mulberry small circular RNA, mscRNA),最新研究显示其为 MMLRaV 的卫星 RNA。MuCV 为双分病毒科 *Partitiviridae* 成员^[7],2020 年在陕西安康地区发现, MuCV 的感染是首次在我国发现,该病毒引起症状不显著,同时存在于无症状桑叶中,给桑树病毒病的预防和防治提供了参考。

植物在对抗病毒侵染的过程中,通过 RNA 沉默机制靶向病毒基因组可产生病毒小 RNA^[16],近年来,利用小 RNA 深度测序发现和检测植物病原应用广泛。本文对复合病毒感染的畸形桑叶进行了小 RNA 深度测序,分析叶片感染的病毒,所得结果与 RT-PCR 鉴定一致,未发现其他新病毒。病毒 sRNA 的产生和其在寄主体内的复制机制有关,本文进一步分析 4 种病毒 sRNA 的长度和 5'-末端组成。从长度组成,3 种 RNA 病毒 MMLRaV、MMDVd 和 MuCV 的 sRNA 长度主要为 21 nt, DNA 病毒 MMDaV 以 24 nt 最多,与非洲木薯花叶病毒 (African cassava mosaic virus, ACMV) 中的研究一致^[17],说明 3 种 RNA 病毒和 DNA 病毒由不同 Dicer-like (DCL) 蛋白加工生成^[18]。不同 sRNA 的 5'-末端组成决定了其结合的宿主蛋白^[19-20], 5'-末端序列组成方面, MMLRaV 和 MMDVd 比较一致,与 MuCV 和 MMDaV 均不相同,说明本研究复合病毒侵染桑树中存在多个 sRNA 识别装载机制,为桑树病毒的复制侵染机制研究奠定了基础。

参考文献

- [1] MA Yuxin, NAVARRO B, ZHANG Zhixiang, et al. Identification and molecular characterization of a novel monopartite geminivirus associated with mulberry mosaic dwarf disease [J]. Journal of General Virology, 2015, 96(8): 2421 - 2434.
- [2] 卢全有. 桑树中一种新病毒和一种小分子环状 RNA 的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
- [3] ELBEAINO T, CHIUMENTI M, DE STRADIS A, et al. Identification of a badnavirus infecting mulberry [J]. Journal of Plant Pathology, 2013, 95(1): 207 - 210.
- [4] 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. DOI: 10.1371/journal.pone.0136196.
- [5] FEI Jianming, LI Yufeng, WU Yan, et al. Identification of a latent pathogen on mulberry tree with a disease of mosaic dwarf [J]. African Journal of Biotechnology, 2009, 8(20): 5358 - 5361.
- [6] XUAN Zhiyou, XIE Jiayi, YU Haodong, et al. Mulberry (*Morus alba*) is a new natural host of citrus leaf blotch virus in China [J]. Plant Disease, 2020, 105(3): 716.
- [7] SKELTON A, FOWKES A, ADAMS I, et al. First report of prunus necrotic ringspot virus and mulberry cryptic virus 1 in mulberry (*Morus alba*) in the United Kingdom [J]. New Disease Reports, 2018, 37: 23.
- [8] RAGESHWARI S, RENUKADEVI P, MALATHI V G, et al. Occurrence of tobacco streak virus in mulberry [J]. Plant Disease, 2018, 103(4): 779.
- [9] 钱亚娟, 徐毅, 周琦, 等. 利用深度测序技术发掘植物病毒资源 [J]. 中国科学: 生命科学, 2014, 44(4): 351 - 363.
- [10] 孙勋勋, 周铁楠, 黄吉雷, 等. 两种桑树病毒的形态观察与检测 [J]. 植物保护, 2019, 45(5): 252 - 258.
- [11] 李正男, 张双纳, 张尊平, 等. 李属坏死环斑病毒辽宁桃树分离物基因组分析 [J]. 园艺学报, 2017, 44(12): 2275 - 2284.
- [12] 卢全有, 张建平, 孙鑫, 等. 桑树皱叶病毒外壳蛋白基因的原核表达和抗体制备及应用 [J]. 蚕业科学, 2017, 43(3): 388 - 394.
- [13] 孙鑫, 张健, 杨磊, 等. 桑树皱叶病毒 NASH 检测方法的建立及应用 [J]. 蚕业科学, 2018, 44(6): 828 - 833.
- [14] 孙鑫, 张健, 杨磊, 等. 基于 SYBR Green I 的桑树皱叶病毒 qPCR 检测方法的建立及应用 [J]. 蚕业科学, 2020, 46(2): 140 - 145.
- [15] 柴建萍, 罗雁婕, 江秀均, 等. 桑粉虱携带双生病毒 (桑树皱叶病毒) 的 PCR 检测 [C]. 杨凌: 中国蚕学会 2018 年学术年会论文集, 2018: 61.
- [16] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281 - 297.

参考文献

- [1] 蔡秋生, 张志红, 高慧琴. 秦艽药理作用及临床应用研究进展[J]. 甘肃中医学院学报, 2010, 27(6): 55-58.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 282.
- [3] 梁晋如, 朱砂, 张新新, 等. 粗茎秦艽的研究概况及展望[J]. 中药材, 2012, 35(3): 495-499.
- [4] 聂燕琼, 李海彦, 孙娜, 等. 粗茎秦艽资源研究进展[J]. 中国现代中药, 2012, 14(5): 37-40.
- [5] 宋九华. 丽江粗茎秦艽主要品质指标及其与土壤特征的相关性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
- [6] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [7] 林丽飞, 邓裕亮, 江楠, 等. 我国药用植物根结线虫病的分布与危害[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(6): 666-669.
- [8] 陆秀红, 黎达境, 黄金玲, 等. 栀子根结线虫病的病原鉴定[J]. 热带作物学报, 2021, 42(8): 2356-2361.
- [9] 尹庆璋, 梁秀荣, 游玉明, 等. 罗汉果根结线虫病的发生与防治[J]. 广西农学报, 2010, 25(5): 24-25.
- [10] 王柱华, 王文鹏, 吴文涛, 等. 根结线虫不同侵染程度对三七生物量及皂苷含量的影响[J]. 中药材, 2021, 44(6): 1291-1296.
- [11] 唐养璇, 张慧. 陕西商洛地区桔梗根结线虫发生规律与防治试验[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2006, 34(11): 199-202.
- [12] 杨艳梅, 刘沛, 董涵, 等. 云南省紫茎泽兰根结线虫病病原种类鉴定[J]. 植物保护学报, 2020, 47(3): 657-665.
- [13] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 39.
- [14] 谢辉. 植物线虫分类学[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 2000: 34.
- [15] ADAM M A M, PHILLIPS M S, BLOK V C. Molecular diagnostic key for identification of single juveniles of seven common and economically important species of root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) [J]. Plant Pathology, 2010, 56(1): 190-197.
- [16] VRAIN T, WAKARCHUK D, LAPLANTELEVESQUE A, et al. Intraspecific rDNA restriction fragment length polymorphism in the *Xiphinema americanum* group [J]. Fundamental & Applied Nematology, 1992, 15(6): 563-573.
- [17] TRINH Q P, LE T M L, NGUYEN T D, et al. *Meloidogyne daklakensis* n. sp. (Nematoda: Meloidogynidae), a new root-knot nematode associated with Robusta coffee (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner) in the Western Highlands, Vietnam [J]. Journal of Helminthology, 2019, 93(2): 242-254.
- [18] DONG K, DEAN R A, FORTNUM B A, et al. Development of PCR primers to identify species of root-knot nematodes: *Meloidogyne arenaria*, *M. hapla*, *M. incognita* and *M. javanica* [J]. Nematropica, 2001, 31(2): 271-280.
- [19] 杨意伯, 张绍升. 龙眼和番石榴根际的短针中环线虫鉴定[J]. 热带作物学报, 2016, 37(7): 1370-1376.
- [20] LUC M, TAYLOR D P. *Meloidogyne hapla* [C] // CIH descriptions of plant-parasitic nematodes, 1977: 1-4.
- [21] 赵鸿, 彭德良, 朱建兰. 根结线虫的研究现状[J]. 植物保护, 2003, 29(6): 6-9.
- [22] 喻盛甫, 杨宝君, 王秋丽. 云南植物根结线虫种类调查与鉴定[J]. 云南农业大学学报, 1990, 5(4): 212-217.
- [23] 周银丽, 杨伟, 余光海, 等. 中国云南省石榴根结线虫的种类初报[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(4): 351-354.
- [24] 喻盛甫, 罗文富, 胡先奇, 等. 三七根腐病中线虫病病原问题的研究[J]. 云南农业大学学报, 1998, 13(3): 22-25.
- [25] 钱振官, 何重缘. 附子北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*)的生物学和防治[J]. 上海农业学报, 1996, 12(2): 81-86.
- [26] 胡先奇, 王扬, 喻盛甫. 云南药用植物根结线虫病调查[J]. 中药材, 2001(12): 851-853.
- [27] 赵来顺, 杨彦杰. 北方根结线虫中草药寄主初步调查[J]. 植物病理学报, 1990, 20(2): 81-82.
- [28] 高月, 徐江, 郭笑彤, 等. 药用植物根结线虫病害及防治策略[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2762-2767.
- [29] 肖顺, 张绍升, 刘国坤. 淡紫拟青霉对根结线虫的防治作用[J]. 福建农业大学学报, 2006, 35(5): 463-465.
- [30] 东晔, 李云霞, 刘沛, 等. 生物活性有机肥“红土运”对番茄根结线虫病抑制的初步研究[J]. 广东农业科学, 2021, 48(6): 72-77.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 255 页)

- [17] AKBERGENOV R, SI-AMMOUR A, BLEVINS T, et al. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species [J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(2): 462-471.
- [18] MILLER W A, SHEN Ruizhong, STAPLIN W, et al. Non-coding RNAs of plant viruses and viroids: sponges of host translation and RNA interference machinery [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2016, 29(3): 156-164.
- [19] MI Shijun, CAI Tao, HU Yugang, et al. Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide [J]. Cell, 2008, 133(1): 116-127.
- [20] YE Ruiqiang, WANG Wei, IKI T, et al. Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* ARGONAUTE4/siRNA complexes [J]. Molecular Cell, 2012, 46(6): 859-870.

(责任编辑: 田 喆)