

PFT- $\alpha$ 对鸡传染性喉气管炎病毒侵染宿主细胞的影响

孙邦耀, 邵昱昊, 高琦, 李海, 刘胜旺\*

(中国农科院哈尔滨兽医研究所, 兽医生物技术国家重点实验室/禽呼吸道病创新团队, 黑龙江哈尔滨 150069)

**摘要** [目的]研究抑癌基因p53小分子抑制剂PFT- $\alpha$ 对ILTV侵染宿主细胞的影响。[方法]用PFT- $\alpha$ 处理LMH(鸡肝癌细胞),通过结晶紫染色技术检测细胞感染ILTV 24 h后的细胞死亡情况,通过流式细胞术检测PFT- $\alpha$ 对ILTV吸附、进入LMH细胞的影响,通过倒置荧光显微镜和高内涵细胞筛选系统检测PFT- $\alpha$ 对ILTV在细胞间扩散的影响。[结果]结晶紫染色表明,PFT- $\alpha$ 促进了ILTV感染后的细胞死亡,流式细胞术结果表明,PFT- $\alpha$ 对ILTV吸附细胞没有影响,但是促进了ILTV进入细胞。同时,倒置荧光显微镜和高内涵细胞筛选系统检测结果表明,PFT- $\alpha$ 对ILTV在细胞间扩散没有影响。[结论]研究初步检测了PFT- $\alpha$ 对ILTV侵染LMH细胞过程的影响,为进一步研究ILTV与宿主互作过程提供了理论补充。

**关键词** 传染性喉气管炎病毒;病毒吸附;病毒进入;病毒扩散

**中图分类号** S852.65 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)05-0087-04

Effect of PFT- $\alpha$  on Infectious Laryngotracheitis Virus Infecting Host Cells

SUN Bang-yao, SHAO Yu-hao, GAO Qi et al (Division of Avian Infectious Diseases, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

**Abstract** [Objective] To research the effect of PFT- $\alpha$ , a p53 inhibitor, on laryngotracheitis virus (ILTV) infecting host cells. [Method] In present study, we detected the effect of PFT- $\alpha$  on cell death, ILTV binding and penetration as well as transmission between LMH cells by stained with 0.1% crystal violet, flow cytometry and observing expression of EGFP using fluorescence microscopy and Operetta CLS high-content analysis system. [Result] Crystal violet staining result showed that PFT- $\alpha$  promoted LMH cells death after ILTV infection. Flow cytometry results showed that PFT- $\alpha$  had no effect on viral binding but promoted penetration of ILTV. Results of both fluorescence microscopy observation and Operetta CLS high-content analysis system showed that PFT- $\alpha$  had no effect on ILTV transmission between LMH cells. [Conclusion] Our findings have advanced our understanding about how ILTV infection host cells and provided another promising option for controlling AILT.

**Key words** Infectious laryngotracheitis virus; Virus binding; Virus penetration; Virus transmission

鸡传染性喉气管炎(avian infectious laryngotracheitis, AILT)是鸡的一种高度接触性传染病,其临床症状主要包括呼吸困难、咳嗽和产蛋下降等<sup>[1]</sup>。该病于1925年被首次报道于美国,目前分布于世界各地<sup>[2]</sup>。AILT的病原为传染性喉气管炎病毒(infectious laryngotracheitis virus, ILTV),属于疱疹病毒科(Herpesviridae) $\alpha$ 亚科(Alphaherpesvirinae)中的鸡疱疹病毒1型(Gallid herpesvirus 1)<sup>[3]</sup>。ILTV为线性双股DNA囊膜病毒,直径为195~250 nm。

和其他 $\alpha$ 疱疹病毒一样,ILTV在急性入侵上呼吸道后会潜伏于神经系统内,从而逃避宿主免疫监视,当宿主免疫力低下时ILTV又从潜伏状态中激活,造成疫情暴发。当前,AILT防疫主要依靠接种减毒活疫苗所产生的免疫应答,但给鸡群注射减毒活疫苗时也存在散毒的风险,引起机体潜伏感染,从而逃避宿主免疫监视,使得清除困难<sup>[4]</sup>,因此难以长效地防制AILT。研究ILTV侵染宿主细胞的过程能帮助人们更深入地理解ILTV的传播与致病机理<sup>[5]</sup>,从而为AILT的防制提供新的思路。有研究表明,在ILTV感染机体的过程中,细胞免疫应答而非体液免疫应答起到决定性作用<sup>[6]</sup>,因此研究ILTV在细胞间的扩散显得尤为重要。该研究通过结晶紫染色、流式细胞术、倒置荧光显微镜以及高内涵细胞筛选系统检测了抑癌基因p53小分子抑制剂PFT- $\alpha$ 对ILTV

吸附和进入LMH细胞、ILTV在LMH细胞间扩散以及ILTV感染后的细胞死亡的影响,以期研究ILTV侵染宿主过程提供试验基础,也为完善现有AILT防控体系提供新的思路。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** LMH细胞(鸡肝癌细胞)、抗ILTV gI糖蛋白多克隆抗体、带GFP标签的病毒株ILTV-EGFP为哈尔滨兽医研究所禽呼吸道病创新团队实验室保存;ILTV-EGFP的TCID<sub>50</sub>为10<sup>-4.56</sup>/0.1 mL;0.1%结晶紫染色液、红色荧光染料Dil、R18及生物活性小分子PFT- $\alpha$ 、FITC标记的抗兔二抗均购自于Sigma公司;0.1  $\mu$ m PVDF膜过滤器购自于美国Millipore公司;所用离心机为Allegra X-15R台式冷冻离心机(美国,Beckman Coulter)。

**1.2 结晶紫染色** 以ILTV感染复数(病毒感染复数=感染性病毒颗粒/被感染细胞数,感染性病毒颗粒以PFU计算,PFU=TCID<sub>50</sub>×0.69<sup>[7]</sup>,下同)为0.1的剂量接种LMH细胞,并分别在ILTV感染前后各以PFT- $\alpha$ (20  $\mu$ mol/L)处理细胞,对照组为相同体积的DMSO,待各个处理组细胞死亡现象在肉眼观测下差异明显时进行结晶紫染色,弃去细胞上清,用70%乙醇室温固定30 min,弃掉固定液待室温下风干后用0.1%的结晶紫细胞室温染色40 min,之后回收结晶紫染色液,用PBS洗去细胞表面残留的染色液,室温风干后拍照。

**1.3 病毒制备** 待T25细胞瓶中LMH细胞长满单层后接种ILTV-EGFP,MOI为0.1,待细胞病变达70%以上时将细胞在-80℃下反复冻融3次以充分释放病毒,将病毒液以12 000 r/min离心10 min,取病毒上清分别用Dil(3  $\mu$ mol/L)

**基金项目** 现代农业蛋鸡产业技术体系项目(CARS-41-K12);国家科技支撑计划项目(2015BAD12B03)。

**作者简介** 孙邦耀(1991—),男,山东临沂人,硕士研究生,研究方向:动物传染病及其病原分子流行病学。\*通讯作者,研究员,博士,从事动物传染病及其分子流行病学研究。

**收稿日期** 2017-11-29

和 R18(3  $\mu\text{mol/L}$ ) 染色, 室温下避光孵育 20 min, 然后用 0.1  $\mu\text{m}$  的 PVDF 膜滤器过滤病毒液, 此时病毒滞留在滤膜上, 再用 2 mL 左右无血清培养基冲洗滤器, 最后将滤器置于无血清培养基中往回倒抽以回收病毒, 病毒液过滤体积: 病毒液回收体积为 2:1。

**1.4 PFT- $\alpha$  对 ILTV 吸附细胞影响的检测** 将 PFT- $\alpha$  对 ILTV 吸附细胞的影响采取两种方法进行检测。方法一: 待 24 孔板中 LMH 细胞长满单层后接种 PFT- $\alpha$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ), 对照组为相同体积的 DMSO, 孵育 12 h 后用胰酶消化细胞, 1 200 r/min 离心 5 min 收集细胞, 弃掉上清后加入 500  $\mu\text{L}$  Dil 染色后回收的病毒液, 将细胞悬起混匀, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  内让病毒避光吸附 1 h, 之后 1 200 r/min 离心 5 min 收集细胞, 弃掉上清后加入 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞并过 300 目铜筛网置样品于流式细胞管中待测。方法二: 待 24 孔板中 LMH 细胞长满单层后接种 PFT- $\alpha$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ), 对照组为相同体积的 DMSO, 孵育 12 h 后用胰酶消化细胞, 1 200 r/min 离心 5 min 收集细胞, 弃掉上清后加入 500  $\mu\text{L}$  未染色的病毒液, 将细胞悬起混匀后置于 4  $^{\circ}\text{C}$  内让病毒吸附 1 h, 之后 1 200 r/min 离心 5 min 收集细胞, 弃掉上清后加入 1% BSA 稀释的抗 ILTV gI 糖蛋白的兔多克隆抗体, gI 抗体: 1% BSA = 1:10, 以免 IgG 作为对照, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后 1 200 r/min 离心 5 min 收集细胞, 弃掉上清后加入 1% BSA 稀释的 FITC 标记的抗兔二抗, 二抗稀释比例为 1:300, 4  $^{\circ}\text{C}$  内避光孵育 30 min 后 1 200 r/min 离心 5 min 收集细胞, 弃掉上清后加入 500  $\mu\text{L}$  PBS 重悬细胞并过 300 目铜筛网置样品于流式细胞管中待测。

**1.5 PFT- $\alpha$  对 ILTV 进入细胞影响的检测** 待 24 孔板中 LMH 细胞长满单层后弃掉上清, 用无血清培养基轻轻洗掉细胞表面残留的血清, 加入 500  $\mu\text{L}$  R18 染色后回收的病毒, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  让病毒避光吸附 1 h, 之后加入 PFT- $\alpha$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ), 对照组为 DMSO, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  内孵育 1 h 后转移至 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内孵育 1 h 让病毒进入细胞, 待病毒充分进入后收集细胞, 用流式细胞仪检测病毒进入情况。

**1.6 PFT- $\alpha$  对 ILTV 在细胞间扩散影响的检测** 以 MOI 为 1 的剂量给 24 孔板中长满单层的 LMH 细胞接种 ILTV-EGFP, 待病毒充分进入后将细胞消化离心, 将此感染细胞与另外未感染病毒的 LMH 细胞混匀后共同接种 96 孔板(6 孔板), 两者比例为 1:50, 待细胞贴壁后加入 PFT- $\alpha$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 及 DMSO, 并且在细胞表面铺一层低熔点琼脂糖凝胶, 另一组不铺胶作为对照, 之后于 6、18 和 24 h 在高内涵细胞筛选系统(倒置荧光显微镜)下检测 EGFP 荧光表达情况。

## 2 结果与分析

**2.1 PFT- $\alpha$  对细胞感染 ILTV 后细胞死亡的影响** 以 ILTV 感染复数为 0.1 的剂量接种 LMH 细胞, 并分别在 ILTV 感染前后各以 PFT- $\alpha$  (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理宿主细胞, 对照组为 DMSO, 在病毒感染 24 h 后做结晶紫染色。结果如图 1 所示, 和对照组相比, PFT- $\alpha$  处理组细胞死亡明显更多, 说明 PFT- $\alpha$  促进了 ILTV 感染后的细胞死亡。

**2.2 PFT- $\alpha$  对 ILTV 吸附细胞的影响** 用 PFT- $\alpha$  孵育

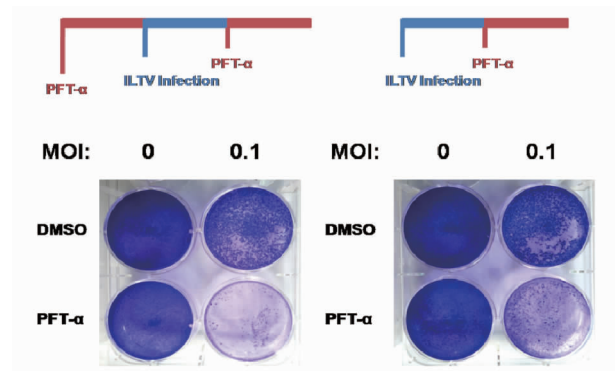
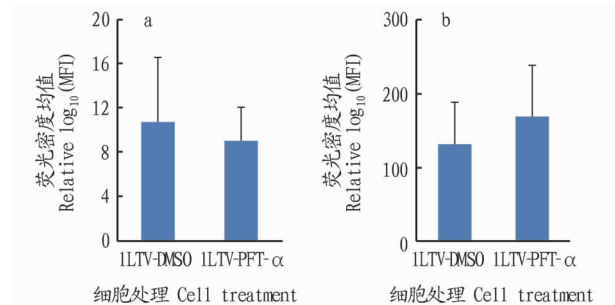


图 1 PFT- $\alpha$  对细胞感染 ILTV 24 h 后细胞死亡的影响(重复次数=3)

Fig. 1 The effect of PFT- $\alpha$  on cell death after ILTV infecting LMH cells for 24 hours ( $n=3$ )

LMH 细胞后用 Dil 预染的 ILTV 吸附细胞, 流式细胞术结果显示, 和对照组相比, PFT- $\alpha$  处理组的 Dil 荧光密度均值(MFI)没有显著变化( $P>0.05$ ), 这表明 PFT- $\alpha$  对 ILTV 吸附细胞没有影响(图 2a); 应用抗 ILTV gI 糖蛋白的兔多克隆抗体的方式通过流式细胞术进行检测, 也得到了相似的结论(图 2b)。综上所述, PFT- $\alpha$  对 ILTV 吸附细胞没有影响。



注: a. 通过 Dil 预染的 ILTV 检测病毒吸附情况; b. 通过抗 ILTV gI 糖蛋白的兔多克隆抗体检测病毒吸附情况

Note: a. Detection of virus adsorption by ILTV with Dil predye; b. Detection of virus adsorption by rabbit polyclonal antibody against ILTV gI glycoprotein

图 2 PFT- $\alpha$  对 ILTV 吸附细胞的影响(重复次数=3)

Fig. 2 The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV binding LMH cells ( $n=3$ )

**2.3 PFT- $\alpha$  对 ILTV 进入细胞的影响** 在对 LMH 细胞接种 R18 预染的病毒后, 先使病毒在 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下吸附 1 h, 然后添加 PFT- $\alpha$  并 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h, 之后将细胞转移至 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内让 R18 预染的病毒进入细胞。流式细胞术结果显示, 和对照组相比, PFT- $\alpha$  处理组 R18 的荧光密度均值显著增加( $P<0.05$ )。以上结果说明, PFT- $\alpha$  促进了 ILTV 进入细胞(图 3)。

**2.4 PFT- $\alpha$  对 ILTV 在细胞间扩散的影响** ILTV 在细胞间以 2 种方式进行扩散, 即游离扩散和细胞-细胞间扩散, 禽呼吸道病实验室分别对 2 种方式进行了检测。按照“1.5”中的方法操作, 待混合培养感染细胞与未感染细胞在 96 孔板(6 孔板)内贴壁后, 通过在 LMH 细胞表面添加低熔点琼脂糖凝胶的方式阻断病毒在细胞上清中的游离扩散, 然后通过观察 EGFP 荧光信号来检测 PFT- $\alpha$  对 ILTV 在细胞-

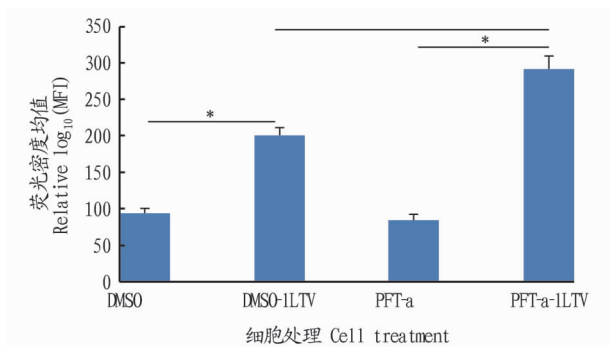
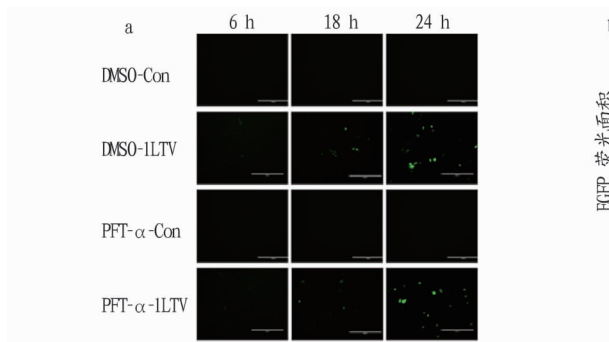


图3 PFT- $\alpha$ 对ILTV进入LMH细胞的影响(重复次数=3)

Fig. 3 The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV penetration into LMH cells ( $n=3$ )

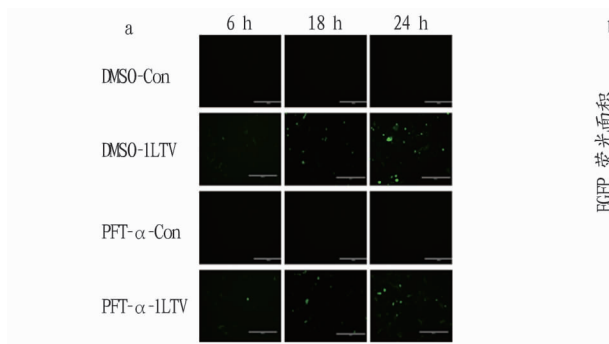


注:a.通过荧光显微镜观察PFT- $\alpha$ 对ILTV在细胞-细胞间扩散的影响;b.高内涵细胞筛选系统统计的各时间点EGFP荧光面积

Note:a. The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV cell-to-cell transmission observed by fluorescence microscopy;b. The fluorescence area of EGFP measured by high content cell screening system at each time point

图4 PFT- $\alpha$ 对ILTV在细胞-细胞间扩散的影响(标尺400  $\mu\text{m}$ ,重复次数=3)

Fig. 4 The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV cell-to-cell transmission (Scale bar indicates 400  $\mu\text{m}$ ,  $n=3$ )



注:a.通过荧光显微镜观察PFT- $\alpha$ 对ILTV游离扩散的影响;b.高内涵细胞筛选系统统计的各时间点EGFP荧光面积

Note:a. The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV free transmission observed by fluorescence microscopy;b. The fluorescence area of EGFP measured by high content cell screening system at each time point

图5 PFT- $\alpha$ 对ILTV游离扩散的影响(标尺400  $\mu\text{m}$ ,重复次数=3)

Fig. 5 The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV free transmission (Scale bar indicates 400  $\mu\text{m}$ ,  $n=3$ )

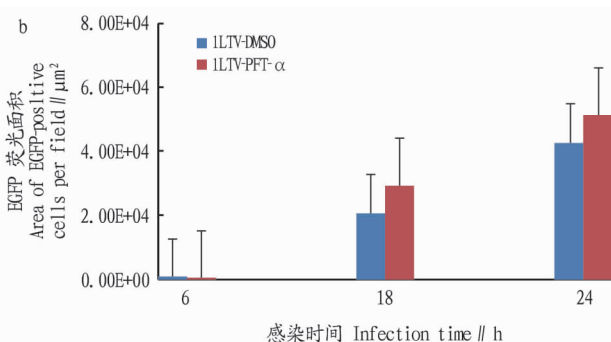
ILTV感染。但和强毒株一样,疫苗毒也会引起鸡群潜伏感染<sup>[8]</sup>,从而逃避宿主免疫监视,使AILT反复暴发,很难根除。因此探索一种更为安全有效的AILT防控新策略至关重要。

研究ILTV与宿主之间的相互作用尤其是ILTV的传播机制至关重要,它可以帮助人们更好地理解ILTV的复制、毒力和发病机理,并为完善现有AILT防控体系提供了新的切入点。病毒吸附、病毒进入和病毒在细胞间扩散是病毒侵袭宿主细胞的重要步骤。病毒吸附和病毒进入是病毒侵袭宿

细胞间扩散的影响,同时通过高内涵细胞筛选系统统计病毒感染后不同时间点的EGFP荧光面积。结果显示,随着病毒感染时间的推移,EGFP表达逐渐增多,但和对照组相比,PFT- $\alpha$ 对EGFP的表达没有显著影响( $P>0.05$ ,图4a和b)。结果表明,PFT- $\alpha$ 对ILTV在细胞-细胞间扩散没有影响;另外,在未加低熔点琼脂糖凝胶的共培养系统里,病毒以2种方式进行扩散。观察结果表明,PFT- $\alpha$ 对EGFP的表达也没有显著影响( $P>0.05$ ,图5a和b)。综上所述,PFT- $\alpha$ 对ILTV的游离扩散和细胞-细胞间扩散均没有影响。

### 3 讨论

AILT每年都会给世界养禽业造成巨大的经济损失。目前,疫苗接种仍然是防控AILT的主要措施,它能有效地防止

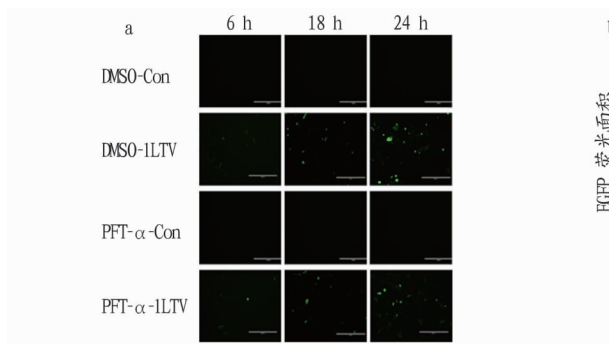


注:a.通过荧光显微镜观察PFT- $\alpha$ 对ILTV在细胞-细胞间扩散的影响;b.高内涵细胞筛选系统统计的各时间点EGFP荧光面积

Note:a. The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV cell-to-cell transmission observed by fluorescence microscopy;b. The fluorescence area of EGFP measured by high content cell screening system at each time point

图4 PFT- $\alpha$ 对ILTV在细胞-细胞间扩散的影响(标尺400  $\mu\text{m}$ ,重复次数=3)

Fig. 4 The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV cell-to-cell transmission (Scale bar indicates 400  $\mu\text{m}$ ,  $n=3$ )



注:a.通过荧光显微镜观察PFT- $\alpha$ 对ILTV游离扩散的影响;b.高内涵细胞筛选系统统计的各时间点EGFP荧光面积

Note:a. The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV free transmission observed by fluorescence microscopy;b. The fluorescence area of EGFP measured by high content cell screening system at each time point

图5 PFT- $\alpha$ 对ILTV游离扩散的影响(标尺400  $\mu\text{m}$ ,重复次数=3)

Fig. 5 The effect of PFT- $\alpha$  on ILTV free transmission (Scale bar indicates 400  $\mu\text{m}$ ,  $n=3$ )

主细胞的初始环节,而病毒在细胞内复制后通过扩散去感染新的宿主细胞。在体内病毒主要以2种方式进行扩散,即游离扩散和细胞-细胞间扩散。游离扩散是指病毒在感染细胞内大量复制后释放至外周环境中,然后借助外周环境进行远端扩散;细胞-细胞间扩散指病毒借助细胞间形成的通道进行扩散。和细胞-细胞间扩散相比,游离扩散很容易被体液中的中和抗体所阻断,不利于病毒的存活<sup>[9-10]</sup>。目前,关于人疱疹病毒1型和牛疱疹病毒1型在宿主细胞间扩散的

研究均有报道<sup>[11-14]</sup>,然而,关于 ILTV 在细胞间扩散的研究知之甚少。此外,有研究表明,宿主 Src(原癌基因酪氨酸激酶)作为主要调节因子调控 ILTV 感染过程<sup>[15]</sup>,但该研究并未阐明 Src 调控 ILTV 在宿主细胞间传播的具体机制。该研究中,以 ILTV 感染 LMH 细胞为体外研究模型,初步探讨了抑癌基因 p53 小分子抑制剂 PFT- $\alpha$  对 ILTV 侵染宿主细胞的影响。通过结晶紫染色发现,PFT- $\alpha$  促进了 ILTV 感染后的细胞死亡。通过对 ILTV 进行 Dil 染色和应用抗 ILTV gI 糖蛋白抗体 2 种方式检测,该研究发现 PFT- $\alpha$  对 ILTV 吸附细胞没有影响。通过 R18 染色的方式对 ILTV 进入宿主细胞的影响进行检测。R18 是一种二聚体小分子红色荧光染料,此时本身荧光自淬灭。当标记有 R18 染料的 ILTV 囊膜与细胞膜发生融合时,R18 在细胞膜上随着细胞膜的流动被稀释成单体,可以产生荧光信号,直接反映病毒进入宿主细胞的能力。流式细胞术结果指出,PFT- $\alpha$  可促进 ILTV 进入细胞。通过观察和统计感染细胞和未感染细胞共培养系统里的 EGFP 荧光表达情况表明,PFT- $\alpha$  对 ILTV 的游离扩散和细胞-细胞间扩散均没有影响。该研究结果提示,可通过改变 ILTV 侵染宿主细胞的环节来影响病毒的致病过程。该研究为研究 ILTV 侵染宿主过程提供了试验基础,也为完善现有 AILT 防治体系提供了新的思路。

#### 参考文献

- [1] DAVISON A J. Herpesvirus systematics [J]. Vet Microbiol, 2010, 143 (1/2):52-69.
- [2] JOHNSON D C, MAXFIELD B G. An occurrence of avian influenza virus infection in laying chickens [J]. Avian Dis, 1976, 20(2):422-424.
- [3] MCGEOCH D J, RIXON F J, DAVISON A J. Topics in herpesvirus genom-

ics and evolution [J]. Virus research, 2006, 117(1):90-104.

- [4] KOTIWM, WILKS C R, MAY J T. The effect of serial *in vivo* passage on the expression of virulence and DNA stability of an infectious laryngotracheitis virus strain of low virulence [J]. Veterinary microbiology, 1995, 45 (1):71-80.
- [5] VOEVODIN A F, MARX P A. Principles of virology [M]. Washington DC: ASM Press, 2004:471-472.
- [6] COPPO M J C, HARTLEY C A, DEVLIN J M. Immune responses to infectious laryngotracheitis virus [J]. Developmental & comparative immunology, 2013, 41(3):454-462.
- [7] WULFF N H, TZATZARIS M, YOUNG P J. Monte Carlo simulation of the Spearman-Kaerber TCID<sub>50</sub> [J]. J Clin Bioinforma, 2012, 2(1):2-5.
- [8] OU S, GIAMBRONE J J, MACKLIN K S. Infectious laryngotracheitis vaccine virus detection in water lines and effectiveness of sanitizers for inactivating the virus [J]. Journal of applied poultry research, 2011, 20(2):223-230.
- [9] MOTHES W, SHERER N M, JIN J, et al. Virus cell-to-cell transmission [J]. J Virol, 2010, 84(17):8360-8368.
- [10] SATTENTAU Q. Avoiding the void: Cell-to-cell spread of human viruses [J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(11):815-826.
- [11] ZHU L Q, YUAN C, HUANG L Y, et al. The activation of p38MAPK and JNK pathways in bovine herpesvirus 1 infected MDBK cells [J]. Veterinary research, 2016, 47(1):91.
- [12] SAYERS C L, ELLIOTT G. Herpes simplex virus 1 enters human keratinocytes by a nectin-1-dependent, rapid plasma membrane fusion pathway that functions at low temperature [J]. J Virol, 2016, 90(22):10379-10389.
- [13] DOCEUL V, HOLLINSHEAD M, VAN DER LINDEN L, et al. Repulsion of superinfecting virions: A mechanism for rapid virus spread [J]. Science, 2010, 327(5967):873-876.
- [14] DINGWELL K S, BRUNETTI C R, HENDRICKS R L, et al. Herpes simplex virus glycoproteins E and I facilitate cell-to-cell spread *in vivo* and across junctions of cultured cells [J]. Journal of virology, 1994, 68(2):834-845.
- [15] LI H, WANG F J, HAN Z X, et al. Genome-wide gene expression analysis identifies the proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src as a crucial virulence determinant of infectious laryngotracheitis virus in chicken cells [J]. J Virol, 2015, 90(1):9-21.

(上接第 48 页)

表 1 甘薯脱毒对茎分支数、结薯数、产量的影响

Table 1 Effects of *I. batatas* detoxification on the stem branch number, tuberization number and yield per plant

品种 Variety	处理方法 Treatment method	茎分支数 Stem branch number//支	结薯数 Tuberization number//个	单株产量 Yield per plant//kg
一窝红	CK	8.500	3	0.674 0 bcAB
Yiwohong	脱毒	8.000	2.62	0.933 7 aA
卢选 1 号	CK	8.100	3	0.600 7 cB
Luxuan 1	脱毒	8.333	3.333	0.833 0 abAB

综上所述,通过对比试验发现,脱毒甘薯地上部分和地下部分生长势均明显优于普通甘薯(CK)。

### 3 结论与讨论

研究表明,甘薯种性退化在不同品种中普遍存在,甘薯种性退化与病毒侵染有关,带毒甘薯生产上出现诸多不利影响,导致产量大幅降低。通过茎尖组织培养繁育无病毒种苗能解决这一问题,且效果十分显著<sup>[8-9]</sup>。该试验结果表明,脱毒甘薯植株营养生长旺盛,生长势强,光合作用增加,有利于干物质的形成,并且薯块商品价值高、市场竞争力强。但脱毒甘薯栽插后,因品种不同而表现出不同程度的缓苗慢的特征,前期地上部分和地下部分均生长缓慢,而中期长势稳健,生理代谢逐渐恢复;后期田间观察无明显病毒病症状,薯

块粗裂变形症状消失或减轻、增产效果也很显著。但脱毒甘薯开放种植后,会被病毒再次感染,这些症状又再次逐渐出现,并且有明显的减产效应。因此,脱毒甘薯能有效地克服病毒病造成的产量、质量下降等问题,是恢复品种优良特性并达到增产、增收的有效途径。2 个品种比较研究结果显示,虽然脱毒甘薯具有显著的增产作用,但仅仅是在原品种的基础上恢复其优良特性,说明不同品种对病毒病抗(耐)性有差异。因此,实际操作中,必须选择有实际生产意义的优良品种进行脱毒培养,同时还必须有严格的病毒检测技术,以确保脱毒薯苗的质量。

#### 参考文献

- [1] 河北植物志编辑委员会. 河北植物志:第 2 卷 [M]. 石家庄:河北科学技术出版社,1986:385-386.
- [2] 卢春生,杨立明. 脱毒甘薯的增产机理及高产栽培技术 [J]. 种子科技, 2001(6):368-369.
- [3] 宋伯符,王胜武,谢开云,等. 我国甘薯脱毒研究的现状及展望 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(6):43-48.
- [4] 邢继英,杨永嘉,邹景禹,等. 脱毒甘薯生产性能研究 [J]. 中国甘薯, 1993(5/6):56-58.
- [5] 张佃文,秦泗明,宋百柳,等. 脱毒甘薯栽培技术研究初报 [J]. 山东农业科学, 1996(3):28-29.
- [6] 陆国权. 甘薯脱毒研究现状及其应用前景 [J]. 国外农学—杂粮作物, 1996(2):44-46.
- [7] 王兴军. 我国甘薯脱毒研究及应用 [J]. 生物技术, 1997, 7(2):40-42.
- [8] 张兆干. 脱毒甘薯增产机理及应用 [J]. 农业科技通讯, 2000(1):9.
- [9] 江苏农业科学院, 山东农业科学院. 中国甘薯栽培学 [M]. 上海:上海科学技术出版社, 1984:69-87.