

一株广西鸡源 H6 亚型禽流感病毒全基因组序列分析及其重要生物学特性

李孟, 谢芝勋*, 李丹, 罗思思, 谢丽基, 张民秀, 黄娇玲, 范晴, 王盛, 谢志勤, 邓显文, 曾婷婷, 张艳芳

(广西壮族自治区兽医研究所, 广西兽医生物技术重点实验室, 广西南宁 530001)

摘要 2017 年对广西地区活禽交易市场进行低致病性禽流感流行病学调查, 从采集的鸡咽喉和泄殖腔拭子中分离鉴定出一株鸡源 H6N6 亚型禽流感病毒, 命名为 A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6)。应用 RT-PCR 方法分别对分离毒株的 8 个基因片段进行扩增, 同时将产物进行克隆和测序, 然后对测序结果进行同源性比对及遗传进化分析。另外, 还通过固相受体结合试验对毒株的唾液酸受体进行测定。结果显示, 该分离株的 HA 基因与广东分离株 A/chicken/Guangdong/G3249/2014(H6) 的核苷酸同源性最高, 裂解位点符合低致病性禽流感病毒的分子特征; NA 基因与江西分离株 A/duck/Ganzhou/GZ148/2016(H6N6) 核苷酸同源性最高; 内部基因中, PB1 和 NS 基因来源于广东的鸡, PB2 基因来源于越南的鸡, PA、NP 和 M 基因来源于广西的鹅; 同时, 研究还发现该病毒的 HA、NA、PA、NP 和 M 基因来源 H6 亚型 AIV, PB2、PB1 和 NS 基因来源 H9N2 亚型 AIV, 推测 A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6) 可能是由不同地区、不同宿主来源的 H6 和 H9 亚型 AIV 通过基因重组产生的一株新的重配毒株。由于广西地理位置特殊, 今后应加强对该地区 H6 亚型禽流感病毒变异情况的监测。

关键词 禽流感病毒; H6 亚型; 鸡; 遗传进化; 受体分析

中图分类号 S852.65 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)23-0125-04

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.23.030



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Whole Genome Sequence Analysis and Important Biological Characteristics of a Strain of H6 Subtype Avian Influenza Virus from Chicken in Guangxi

LI Meng, XIE Zhi-xun, LI Dan et al (Guangxi Veterinary Research Institute, Guangxi Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Nanning, Guangxi 530001)

Abstract In 2017, an epidemiological investigation of low-pathogenicity avian influenza was conducted in the live poultry trading market of Guangxi. One strain of H6N6 subtype of avian influenza virus was isolated and identified from throat and cloacal swab samples of chicken, named A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6). RT-PCR was used to amplify 8 gene fragments of isolated strains, and the products were cloned and sequenced at the same time. Then homology comparison and genetic evolution analysis were performed on the sequencing results. In addition, the sialic acid receptor of the strain was determined by solid phase receptor binding test. The results showed that HA gene in the isolated strain from Guangdong had the highest nucleotide homology with that in A/chicken/Guangdong/G3249/2014(H6), and the cracking sites conformed to the molecular characteristics of low pathogenic avian influenza virus. NA genes in the isolated from this strain had the highest nucleotide similarity with that in isolated strain A/duck/Ganzhou/GZ148/2016(H6N6). Among internal genes, PB1 and NS genes were derived from chicken in Guangdong, PB2 gene was derived from chicken in Vietnam, and PA, NP and M genes were derived from geese in Guangxi. At the same time, we found that the HA, NA, PA, NP and M genes in this virus were from H6 subtype of AIV, PB2, PB1 and NS genes were from H9N2 subtype of AIV, and it was speculated that A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6) might be a new strain of H6 and H9 subtypes of AIV from different regions, different host sources by gene recombination. Due to special geographical location of Guangxi, the monitoring of the variation of H6 subtype avian influenza virus in this region should be strengthened in the future.

Key words Avian influenza virus; H6 subtype; Chicken; Genetic evolution; Receptor analysis

禽流感(avian influenza, AI)是由 A 型禽流感病毒(avian influenza virus, AIV)引起的一种动物传染性疾病。禽流感病毒基因组由 8 个不同的独立片段组成, 其片段包括 HA、NA、PB2、PB1、PA、NP、M 和 NS 基因^[1]。同时, 依据 AIV 对鸡的致病性, 将 AIV 分为高致病性 AIV(HPAIV)和低致病性 AIV(LPAIV)^[2]。1965 年美国科学家从水禽样品中首次分离到 H6 亚型 AIV^[3], 目前研究已发现 H6 亚型 AIV 广泛存在于各种宿主动物并在世界各地传播^[4-5]; 我国一些学者的研究表明, 近年来我国华东和华南区家禽中 H6 亚型 AIV 属于分离率较高的禽流感亚型之一^[6-8]。同时, 一些其他研究也发现某些 H6 亚型 AIV 可以跨越物种屏障, 直接感染哺乳动物小鼠和水貂等, 甚至在采集的健康人群血清中检测到抗 H6 亚型 AIV 的特异性抗体^[9-11]。2013 年 5 月, 我国

台湾地区首次报道了 H6N1 亚型 AIV 直接感染人的病例^[12], 通过基因遗传进化分析还发现 H6 亚型 AIV 可以为感染人的 H5N6、H7N9 和 H9N2 等亚型禽流感病毒提供内部基因^[13-15]。以上研究结果表明, H6 亚型 AIV 存在潜在的直接感染哺乳动物和人的可能性, 且严重威胁到人类的公共卫生安全。

笔者所在实验室自 2009 年以来一直对广西地区活禽交易市场进行 AIV 流行病学监测, 已经从表观健康的家禽体内分离到多株不同 HA 和 NA 组合的 H6 亚型 AIV^[16]。由于 H6 亚型 AIV 经常与 H5、H9 等亚型 AIV 同时存在于家禽体内, 当不同亚型 AIV 同时感染一只家禽时, 就大大增加了流感病毒基因重排的概率, 为产生新的禽流感病毒株创造了便利条件。广西处于华南“流感中心”, 且与禽流感疫情十分复杂的越南山水相连, 同时还处在候鸟迁徙路线上, 地理位置十分特殊。笔者于 2017 年从广西活禽市场分离到 1 株具有代表性的鸡源 H6N6 病毒, 进行全基因组测序并分析其遗传演化情况, 同时对部分重要生物学特性进行了测定, 以期了解 H6 亚型 AIV 在广西地区的遗传进化及变异情况, 为该亚

基金项目 广西科技重大专项(桂科 AA17204057); 广西科技基地和人才专项项目(桂科 AD17195083); 广西“八桂学者”专项

(2019-79); 国家“万人计划”领军人才专项(2016-37-88)。

作者简介 李孟(1981—), 男, 河南南阳人, 副研究员, 博士, 从事病原分子生物学研究。*通信作者, 研究员, 从事预防兽医学研究。

收稿日期 2020-03-22

型禽流感病毒的研究和防控提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品与鸡胚。2017 年从广西地区某活禽交易市场采集表观健康鸡群的咽喉和泄殖腔棉拭子,置于含有 4 种抗生素的保存液中,低温运输至广西兽医生物技术重点实验室进行病毒分离和鉴定。9~11 日胚龄 SPF 鸡胚,购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司。

1.1.2 主要试剂。DNA/RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒、感受态细胞、PCR 产物快速连接载体和 DNA Marker 均购自北京全式金生物技术有限公司;高保真 2× PCR Mix、随机引物、dNTP、MLV 反转录酶和 RNA 酶抑制剂均购自宝生物工程(北京)有限公司;6'-Sialyllactose-PAA-biotin(6'SL-PAA)和 3'-Sialyllactose-PAA-biotin(3'SL-PAA)购自 GlycoTech 公司;TMD 底物溶液购自北京天根生物科技有限公司;Streptavidin-HRP 购自美国 R&D systems 公司;其余试剂购自商业公司,均为国产分析纯。

1.1.3 引物设计及合成。参照文献[17]及 GenBank 中收录的相关 H6 亚型 AIV 的全基因序列,利用 Primer Premier 和 Oligo 软件设计多对 A 型流感病毒基因组 8 个节段的引物,用于扩增 A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6)全基因,引物由南宁捷瑞生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 病毒的分离、鉴定及空斑纯化。将不同活禽交易市场现场采集的鸡群棉拭子样品低温快速转运至实验室处理,经离心取上清液接种于 10 日胚龄 SPF 鸡胚尿囊腔,每个样品接种 2 枚鸡胚,0.2 mL/枚,37℃ 孵化 96 h;收获 24 h 后死亡和未死亡的鸡胚尿囊液,分别采用血凝试验(HA)和血凝抑制(HI)试验进行鉴定,用针对 H1~H16 亚型 AIV 以及新城疫病毒的多抗血清对具有 HA 效价的样品进行 HI 试验,初步确定样品的 HA 亚型。将 HI 试验确定为 H6 亚型 AIV 病毒株尿囊液接种于鸡胚成纤维细胞(CEF),通过空斑纯化的方法进行连续 3 轮的克隆纯化,再接种 SPF 鸡胚对纯化的毒株进行增殖,将收获尿囊液经 HI 试验鉴定后,-80℃ 下保存备用。

1.2.2 病毒 RNA 提取与 RT-PCR 扩增。取经空斑纯化后增殖的病毒尿囊液,使用 RNA 抽提试剂盒按照使用说明书提取其病毒总 RNA,利用流感病毒 Uni-12 通用引物及反转录酶按照其使用说明书进行 cDNA 合成。根据不同的基因引物设计不同的 PCR 程序,分别对各基因片段进行扩增。PCR 扩增产物利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

1.2.3 PCR 产物的回收纯化及克隆测序。将目的片段从琼脂糖凝胶切下后,按照胶回收试剂盒说明书进行回收纯化,然后与快速克隆载体进行连接后转化至感受态细胞中,涂板培养后挑取单个菌落进行菌液 PCR 鉴定,将 PCR 鉴定为阳性的菌液送交深圳华大基因(广州)公司进行序列测序。

1.2.4 序列比对及遗传进化分析。利用 DNASTAR 软件对毒株各基因测序结果进行比对和整理,并将比对结果与 NC-

BI 网站中的相关参考毒株进行分析。同时,选择一些具有代表性的参考毒株基因序列及不同宿主来源的 H6 亚型 AIV 基因序列,应用 MEGA6.0 软件对分离株和参考株的各基因进行比对,并构建其遗传进化树,进而分析分离毒株的遗传演化情况。

1.2.5 分离株受体亲和特性的测定。根据病毒的 HA 效价,用包被缓冲液将分离毒株尿囊液稀释至 7log₂,将准备好的病毒液 100 μL/孔加入 96 孔 ELISA 板,放置 4℃ 冰箱中包被过夜,设置空白对照;将 6'SL-PAA 及 3'SL-PAA 分别设置 4 个不同的稀释梯度,每个稀释梯度设 3 个重复,病毒和受体反应终止后,用酶标仪读取样品在 450 nm 波长处的吸光值。

2 结果与分析

2.1 病毒的分离鉴定及纯化结果 收集 HA 试验效价大于或等于 4log₂ 的鸡胚尿囊液样品,进行 HI 试验。编号为 286C10 样品的尿囊液 HI 试验结果表明,其仅与 H6 亚型 AIV 抗血清发生作用,而与其他 HA 亚型 AIV 和新城疫病毒抗血清不存在任何交叉作用,其结果初步确定该分离株为 H6 亚型 AIV。该毒株的尿囊液接种于 CEF 细胞上,经过 3 轮的空斑纯化后,经过 SPF 鸡胚增殖,通过 HA 试验测得其效价为 2⁶。同时,通过 HI 试验测定其对抗 H6 亚型 AIV 阳性血清的 HI 效价为 8log₂。

2.2 病毒全基因 RT-PCR 扩增及克隆测序结果 RT-PCR 扩增均得到与引物设计预期大小相符的目的基因条带。各目的基因经克隆和 PCR 鉴定成功后测序,测序结果用 DNASTAR 软件进行比对,将拼接后的基因序列进行同源性 BLAST 比对分析。比对结果表明,HA 和 NA 基因与 H6 及 N6 亚型 AIV 的核苷酸同源性最高。因此,将该分离毒株命名为 A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6)。

2.3 分离株各基因片段的序列比对及遗传进化分析 各个基因经过比对拼接形成病毒的全基因序列,各片段与 GenBank 中核苷酸同源性最高的病毒株进行 BLAST 分析,分析结果见表 1。A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6) HA 基因比对结果与广东鸡源分离株 A/chicken/Guangdong/G3249/2014(H6) 相似性最高,核苷酸同源性为 98.53%。序列分析结果表明,其 HA 基因开放阅读框(ORF)全长 1 701 bp。HA1 和 HA2 蛋白裂解位点不存在 3 个以上连续的碱性氨基酸,具有低致病性 AIV 的分子特征。HA 受体结合位点第 226(参照 H3 亚型编号)位氨基酸未发生 Q226L 突变。HA 基因遗传进化树分析表明,该毒株属于欧亚进化谱系的 ST339-like 分支,与北美分支 H6 病毒株有一定的遗传距离(图 1)。NA 基因的 ORF 全长为 1 413 bp,与 A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6)的 NA 基因核苷酸同源性最高的毒株为江西分离株 A/duck/Ganzhou/GZ148/2016(H6N6),核苷酸同源性为 98.80%。PB2 基因的 ORF 全长为 2 280 bp,与 A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6)的 PB2 基因核苷酸同源性最高的毒株为越南分离株 A/chicken/Vietnam/H7F-14-BN4-339/2014(H9N2),核苷酸同源性为 99.25%。PB1 基因的 ORF 全长为 2 274 bp,与 PB1 基因核

苷酸同源性最高的毒株是广东分离株 A/chicken/Shenzhen/1377/2013(H9N2),核苷酸同源性为 96.26%。*PA* 基因编码区全长为 2 151 bp,同源性最高的毒株为 A/goose/Guangxi/128/2013(H6N2),核苷酸同源性为 98.47%。*NP* 基因编码区全长为 1 497 bp,与其核苷酸同源性最高的毒株是 A/goose/Guangxi/128/2013(H6N2),核苷酸同源性为 98.13%。

M 基因编码区全长 982 bp,与 *M* 基因核苷酸同源性最高的毒株为 A/goose/Guangxi/128/2013(H6N2),核苷酸同源性为 99.12%。*NS* 基因编码区全长 838 bp,核苷酸同源性最高的毒株为 A/chicken/Guangdong/SIC41/2015(H9N2),核苷酸同源性为 99.55%。

表 1 A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6) 各基因片段的核苷酸同源性比较
Table 1 The homologous analysis of various genes of A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6) influenza virus

基因名称 Gene name	开放阅读框长度 Length of open reading frame//bp	核苷酸同源性最高的毒株 Strain with the highest nucleotide homology	核苷酸同源性 Nucleotide homology//%
HA	1 701	A/chicken/Guangdong/G3249/2014(H6)	98.53
NA	1 413	A/duck/Ganzhou/GZ148/2016(H6N6)	98.80
PB1	2 274	A/chicken/Shenzhen/1377/2013(H9N2)	96.26
PB2	2 280	A/chicken/Vietnam/H7F-14-BN4-339/2014(H9N2)	99.25
PA	2 151	A/goose/Guangxi/128/2013(H6N2)	98.47
M	982	A/goose/Guangxi/128/2013(H6N2)	99.12
NP	1 497	A/goose/Guangxi/128/2013(H6N2)	98.13
NS	838	A/chicken/Guangxi/C1228/2015(H9N2)	99.55

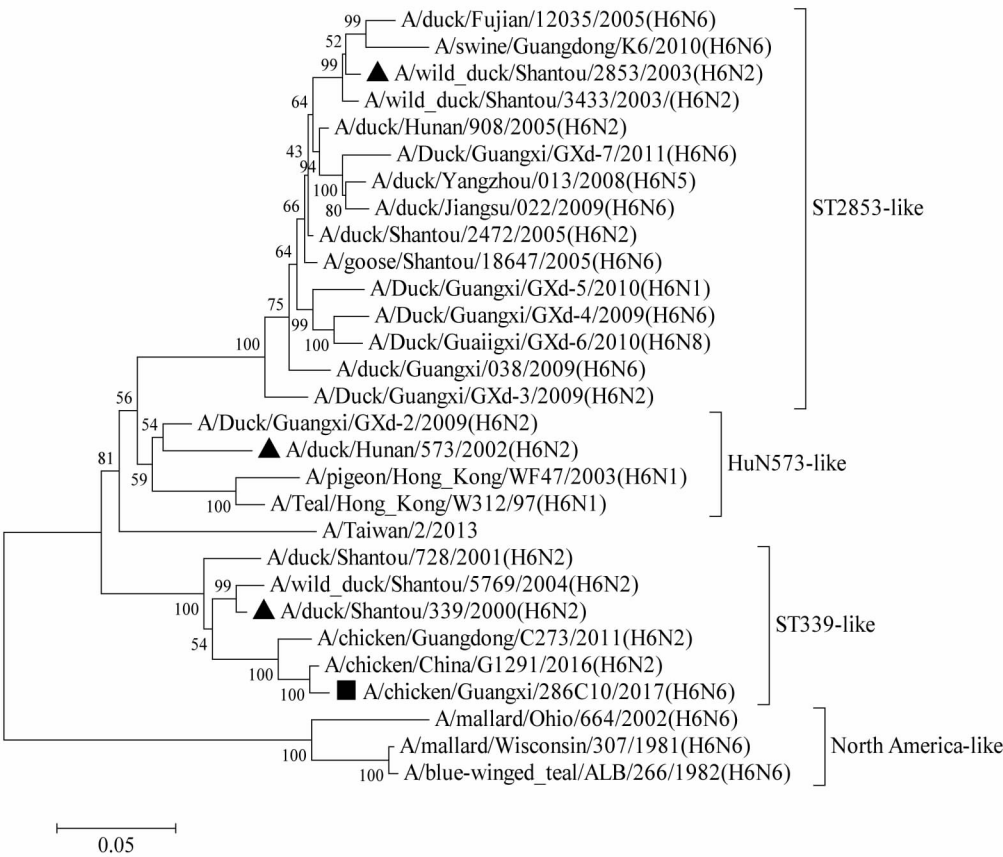


图 1 A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6) HA 基因遗传进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on HA gene of A/chicken/Guangxi/286C10/2017(H6N6)

2.4 受体亲和性测定结果 通过酶联免疫吸附试验对纯化的毒株进行了受体结合特异性的测定,结果表明分离毒株虽然优先选择与 SAα2,3 受体结合,但也同时具有与 SAα2,6 受体的亲和特性,但结合能力存在差异(其与 α-2,3 唾液酸受体结合能力稍强,见图 2),表明该鸡源 H6N6 AIV 同时具备与 α-2,3 和 α-2,6 唾液酸受体结合的特性,具有潜在的

感染人的风险。
3 讨论
AIV 由于亚型众多,极易发生变异和重组,研究表明部分亚型 AIV 能够跨越种属屏障感染直接感染哺乳动物和人,不但给全球养禽业造成严重的经济损失,而且还会威胁到人类公共卫生安全^[18]。高致病性 H5 和 H7 亚型 AIV 及低致病

性的 H9 亚型 AIV 分别因其对家禽的高致死率及在家禽中的广泛流行而受到人们的普遍关注^[19]。低致病性的 H6 亚型 AIV 虽然在自然界中普遍存在,但由于其一般不引起宿主产生明显的临床症状和死亡,因而一直没有引起人们对它的重视。2014 年 5 月在我国四川地区首次出现人感染 H5N6 亚型 AIV 病例,通过对毒株基因组分析发现该病毒的 NA 基因片段来自禽源 H6N6 亚型病毒^[20]。另外,有报道利用血清学调查的方法在美国和中国的健康人群中发现了一定比例的 H6 亚型 AIV 抗体阳性人员^[21]。因此,H6 亚型 AIV 引起的公共卫生安全问题已经越来越引起人们的重视。

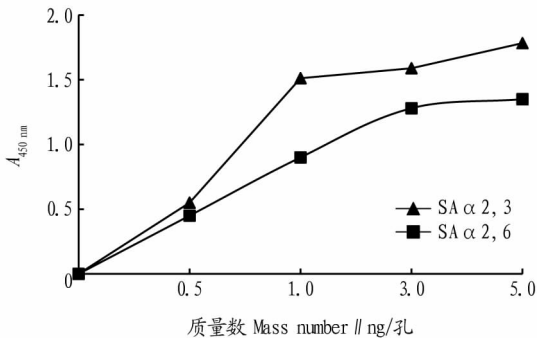


图2 分离株 A/chicken/Guangxi/286C10/2017 (H6N6) 与受体亲和和特性测定结果

Fig. 2 The determination results of the affinity features of isolated strain A/chicken/Guangxi/286C10/2017 (H6N6) with receptor

广西地处我国华南地区,同时又处于全球 8 大候鸟迁徙路线之一的东亚和澳大利亚线路上,每年都有大量迁徙的候鸟途经此地。此外,广西是全国的养禽大省,与广东等省份有着频繁的活禽贸易往来,还与流感疫情复杂的越南相邻,加上广西地区人口稠密,活禽市场遍布城乡,水禽养殖规模大,且有放养畜禽的习惯,人与家禽、野鸟和候鸟的生活空间高度重叠,密切接触,这些都为流感病毒变异株或新亚型 AIV 的产生创造了理想的条件,严重威胁畜牧业和公共卫生的安全。当不同亚型和不同宿主来源的 AIV 在感染同一宿主或细胞时,病毒可以通过交换某些基因片段发生基因重排,进而产生新的子代重配病毒,研究也表明自然界往往会发生多重 AIV 重组^[22-23]。通过对鸡源 A/chicken/Guangxi/286C10/2017 (H6N6) 病毒的全部基因组序列进行分析以及与其他亚型病毒株的比较显示,该研究中的病毒基因组的序列来源可能各不相同:HA、PB1 和 NS 基因来源于广东的鸡,NA 基因来源于江西的鸭,PB2 基因来源于越南的鸡,PA、NP 和 M 基因来源于广西的鹅;同时研究还发现该病毒的 HA、NA、PA、NP 和 M 基因来源 H6 亚型 AIV,PB2、PB1 和 NS 基因基因来源 H9N2 亚型 AIV,推测 A/chicken/Guangxi/286C10/2017 (H6N6) 可能是由不同地区不同宿主来源的 H6 和 H9 亚型 AIV 通过基因重组产生的一株新的重配毒株,由此可见该病毒基因来源的复杂性。正是因为复杂来源及重配导致目前 AIV 毒株的生物学特性也变得日益复杂化,同时也给 AI 的科学综合防控造成新的难题。

已有的研究发现禽流感病毒 HA 蛋白某些受体结合位点的特异性可以决定该病毒感染的宿主范围^[24],A/chicken/Guangxi/286C10/2017 (H6N6) HA 基因的 226 位受体结合位点没有由 Q 变异为 L,说明该毒株存在与哺乳动物受体结合的潜在可能性较小。该研究中 AIV 受体结合试验的结果也显示 A/chicken/Guangxi/286C10/2017 (H6N6) 具备与 α -2,6 唾液酸受体结合的特性(即跨越种属屏障感染哺乳动物),该毒株其他相关的生物学特性有待进一步深入研究和验证。近年来的流行病学调查结果显示,家禽中 H6N6 亚型 AIV 的分离率逐渐升高,H6N6 亚型 AIV 极易与其他亚型的禽流感病毒在宿主体内发生基因重配进而形成新的流感病毒重组毒株或变异株,对畜牧业健康发展和对人类公共卫生安全构成严重的威胁。因此,深入研究 H6N6 AIV 的起源、进化和生物学特性等的变化对 H6 亚型禽流感病毒的科学防控具有重要意义。

参考文献

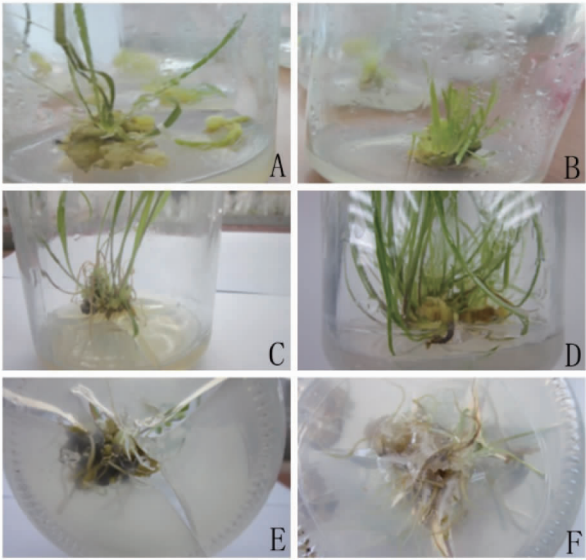
- [1] 谭伟,徐倩,谢芝勋. 禽流感病毒研究概述[J]. 基因组学与应用生物学,2014,33(1):194-199.
- [2] 秦爱建. 禽流感病毒[M]//韦平,秦爱建. 重要动物病毒分子生物学. 北京: 科学出版社,2008:3-27.
- [3] 王熹婧,朱银川,庞夏凤,等. H6N6 亚型禽流感病毒进化演变及跨种属传播研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2019,35(6):558-562.
- [4] 陈思,崔鹏飞,关立峰,等. 一株 H6N6 亚型野鸟禽流感病毒全基因组序列分析以及对小鼠的感染性研究[J]. 中国预防兽医学报,2017,39(6):431-434.
- [5] 陈佳琪,嵇辛勤,段志强,等. 一株鸭源 H6N6 亚型禽流感病毒的遗传进化及致病性分析[J]. 中国预防兽医学报,2016,38(3):175-179.
- [6] HUANG K,ZHU H C,FAN X H,et al. Establishment and lineage replacement of H6 influenza viruses in domestic ducks in southern China[J]. J Virol,2016,86(11):6075-6083.
- [7] WU H B,LU R F,PENG X M,et al. Isolation and genetic characterization of novel reassortant H6N6 subtype avian influenza viruses isolated from chickens in eastern China[J]. Arch Virol,2016,161:1859-1872.
- [8] YUAN R Y,ZOU L R,KANG Y F,et al. Reassortment of avian influenza A/H6N6 viruses from live poultry markets in Guangdong,China[J]. Front Microbiol,2016,7:1-8.
- [9] KIM H R,LEE Y J,LEE K K,et al. Genetic relatedness of H6 subtype avian influenza viruses isolated from wild birds and domestic ducks in Korea and their pathogenicity in animals[J]. J Gen Virol,2010,91:208-219.
- [10] 葛志闯,孙文强,刘东,等. 一株鸭源 H6N6 亚型禽流感病毒的基因组测序及遗传进化分析[J]. 中国家禽,2017,39(14):21-28.
- [11] 王飞. 低致病性禽流感病毒感染人的机制研究[D]. 北京:中国农业大学,2015.
- [12] 孙增辉,朱银川,王熹婧,等. H6N1 亚型禽流感病毒跨种属传播研究进展[J]. 中国人兽共患病学报,2017,33(3):236-240.
- [13] 黎玉莲. 2 株 H5N6 亚型禽流感病毒的序列分析和致病性研究[D]. 广州:华南农业大学,2016.
- [14] 祁思敏,宋勇春,崔伦标,等. 1 株 H6N6 亚型禽流感病毒分子遗传特性分析[J]. 微生物与感染,2017,12(5):287-293.
- [15] 张烁,林宏文,袁润余,等. H6N6 亚型禽流感病毒广东分离株分子遗传演化分析[J]. 畜牧兽医学报,2014,45(6):989-996.
- [16] PENG Y,XIE Z X,LIU J B,et al. Epidemiological surveillance of Low Pathogenic Avian Influenza Virus (LPAIV) from poultry in Guangxi Province,Southern China[J]. PLoS One,2013,8(10):1-7.
- [17] HOFFMANN E,STECH J,GUAN Y,et al. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses[J]. Arch Virol,2001,146:2275-2289.
- [18] 张蔚,施一. 禽流感病毒跨种传播的分子机制[J]. 生命科学,2015,27(5):539-548.
- [19] 顾敏,彭大新,刘秀梵. 我国 H9N2 亚型禽流感病毒的流行和进化特点[J]. 生命科学,2015,27(5):531-538.

(下转第 142 页)

表 4 开放式组织培养最佳组合验证
Table 4 Best practices in open organizational culture

处理 Treatment	接种芽数 Number of inoculated buds//株	污染情况 Contamination		增殖情况 Proliferation		生根情况 Rooting			
		污染数 Number of contami- nation//株	污染率 Contam- ination rate//%	增殖数 Number of prolife- ration//株	增殖系数 Proliferation coefficient	生根数 Rooting number//株	生根率 Rooting rate//%	根长 Root length//cm	生根数 Rooting number//个
开放式 Open	90	10	11.45 a	295	3.28 a	80	88.89 b	4.1 a	6.1 a
传统 Tradition	90	5	6.01 b	268	2.98 b	82	91.47 a	3.7 b	5.4 a

开放式组培的增殖系数(3.28)高于传统组培(2.98);开放式组培的生根率(88.89%)低于传统组培(91.47%),但开放式组培的根长和生根数目优于传统组培。



注:A.传统增殖培养;B.开放增殖培养;C和E.传统生根培养;D和F.开放生根培养

Note:A. Traditional proliferation culture; B. Open propagation culture; C and E. Traditional rooting culture; D and F. Open rooting culture

图 1 开放培养与传统培养山丹丹生长情况对比
Fig. 1 Open culture and traditional culture of *Lilium pumilum*

3 结论与讨论

该试验对开放式组培过程中山丹丹增殖培养基和生根培养基次氯酸钠最佳抑菌浓度进行筛选,结果可得培养芽的污染率和次氯酸钠浓度呈正相关,而增殖系数和生根率随着次氯酸钠浓度的增加出现先升高后降低的趋势。培养芽的增殖系数最高时,次氯酸钠添加浓度为 0.013%,此时污染率略高于传统组织培养;当次氯酸钠浓度为 0.016%时,尽管此时的污染率降低,培养芽生长的根数较多,但增殖系数降低,是由于次氯酸钠浓度越高,对山丹丹不定芽毒害作用越大

所致,如再提高抑菌剂浓度,生根数和根长都会受到抑制。为降低不定芽的污染,兼顾生根和增殖,选择 0.014% 为山丹丹开放式组织培养的最适抑菌浓度。

传统组织培养具有污染率低的优点,但其需要严格的无菌操作和无菌培养环境,消毒过程中易造成培养基营养成分和激素损失,影响后期培养芽的增殖和生长状态,同时无菌操作环节所需仪器设备等投入增加了生产成本,降低了经济效益。开放式组织培养是组织培养的一种改进形式,这种培养需借助抑菌剂抑制培养环境中的微生物生长,在开放未消毒的环境中进行试验操作,省去无菌操作,简化组培环节,降低了生产成本,激素和营养元素损失较少,组培苗品质优良。开放式组织培养的关键在于抑菌剂的使用,抑菌剂种类和浓度的选择关乎开放式组织培养的成败。该试验选择次氯酸钠作为抑菌剂,筛选合适的使用浓度,为山丹丹的开放式组培奠定了基础,同时也为开放式组织培养中抑菌剂的使用提供了理论依据和选择参考。

参考文献

[1] 周亚辉. 植物组培新方法——开放式组织培养研究概况[J]. 中国园艺文摘,2018,34(6):57-59.
[2] 王丹,刘霞. 山梨酸钾在红豆杉开放式组织培养中的应用[J]. 安徽农业科学,2010,38(2):634-635.
[3] 解辉. 香蕉开放式组织培养体系研究[D]. 海口:海南大学,2011.
[4] 赵青华,陈永波,滕建勋,等. 开放式组织培养下魔芋快繁技术研究[J]. 现代农业科技,2011(13):114-115.
[5] WANG S J,LIU L L,YUAN L N,et al. Applied research on agricultural streptomycin in open culture of taxus cuspidate[C]//World Automation Congress(WAC). Puerto Vallarta,Mexico;IEEE,2012:1-4.
[6] 齐向英,陈宗礼,薛皓,等. 陕北野生山丹丹组培快繁技术研究[J]. 北方园艺,2011(22):115-117.
[7] 王延峰,杨宗保,贺晓龙,等. 低温和植物生长调节剂对山丹丹休眠与花期的影响[J]. 延安大学学报(自然科学版),2014,33(4):89-91.
[8] 王珍华,莫帼超,唐道城,等. 八种百合的主要营养成分比较分析[J]. 青海大学学报(自然科学版),2012,30(1):11-13,34.
[9] 王琦. 兰州百合化学成分的研究[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007:10-11.
[10] 黄敏,梁春辉,李秀平,等. 两种抑菌剂在铁皮石斛开放式组织培养的应用[J]. 北方园艺,2018(12):136-140.
[11] 曲波,张谨华,王鑫,等. 温度和光照对藜麦幼苗生长发育的影响[J]. 农业工程,2018,8(7):128-131.
[12] 李菀,李俊毅,田哲妮,等. 野生山丹鳞片快速无性繁殖体系的建立[J]. 陕西农业科学,2018,64(8):35-36,42.

(上接第 128 页)

[20] 李晓丹,张烨,邹淑梅,等. 高致病性 A(H5N6) 亚型禽流感病毒全基因组序列测定方法的建立[J]. 病毒学报,2017,33(1):19-23.
[21] 王熹婧. 鸡源禽流感病毒 H6N6 亚型对小鼠致病性以及在小鼠和人呼吸道组织复制的研究[D]. 南宁:广西医科大学,2019.
[22] 丁晴微,邓国华,施建忠,等. 两株鸭源 H6N2 亚型禽流感病毒的序列

分析及对鸡的致病性研究[J]. 中国预防兽医学报,2011,33(4):270-275.
[23] 熊文婕,谢芝勋,曹国敏,等. 2016~2017 年防城港市活禽市场低致病性禽流感病毒监测分析[J]. 中国家禽,2018,40(9):70-72.
[24] 徐晓龙,包红梅,陈化兰,等. 影响禽流感病毒致病性和传播的关键氨基酸位点的研究进展[J]. 中国预防兽医学报,2014,36(2):165-168.