

健康断奶仔猪携带猪繁殖与呼吸综合征病毒的流行病学调查

饶继红^{1,2}, 何彪², 涂长春², 张家宁^{1,2}, 葛淑敏^{1*}, 龚文杰^{2*}

(1. 长春理工大学生命科学技术学院, 吉林长春 130022; 2. 军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所, 吉林长春 130122)

摘要 为进一步了解我国规模化猪场健康断奶仔猪携带猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的情况,对2017年采自我国25个省(市)38个规模化猪场的断奶仔猪咽拭子、肛拭子、血清共4 059份样品进行了高通量测序,然后对检测到的病毒进行RT-PCR或PCR验证。基于高通量测序的宏基因组学结果显示,健康断奶仔猪的咽拭子、肛拭子、血清中共出现1 706条动脉炎病毒科的病毒基因Reads,其中包括PRRSV。通过RT-PCR扩增从咽拭子和肛拭子中共检测出46个PRRSV样品,样品阳性率为1.1%,猪场阳性率为39.5%。同时,试验成功扩增出7个毒株的ORF5基因,并进行了序列测定。基于ORF5基因核苷酸序列的系统进化分析发现,该试验获得的PRRSV流行毒株为高致病性毒株,属于Type II中的Subgroup 4。对健康断奶仔猪携带PRRSV的研究结果可为猪繁殖与呼吸综合征的防控提供科学数据。

关键词 猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV);断奶仔猪;ORF5;遗传进化分析

中图分类号 S852.65⁺1 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)11-0111-04

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.11.031



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Epidemiological Investigation of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Healthy Weaned Piglets

RAO Ji-hong^{1,2}, HE Biao², TU Chang-chun² et al (1. School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun, Jilin 130022; 2. Institute of Military Veterinary Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Changchun, Jilin 130122)

Abstract To further understand the prevalence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in healthy weaned piglets of pig farms in China, high throughput sequencing was carried on 4 059 samples from 38 large-scale pig farms in 25 provinces (metropolitans) of China, including throat swabs, anal swabs and serum. Then the detected viruses was verified by RT-PCR and PCR. Based on the metagenomics results of high throughput sequencing, it was found that 1 706 arteritis virus reads appeared in throat swabs, anal swabs and serum of healthy weaned piglets, including PRRSV. RT-PCR results showed that 46 samples were PRRSV positive in throat swabs and anal swabs, the individual positive rate was 1.1% and the herd positive rate was 39.5%. In addition, ORF5 genes of 7 strains were amplified and sequenced. Phylogenetic analysis based on the nucleotide sequences of ORF5 genes showed that the sequenced PRRS viruses belonging to subgroup 4 of Type II are closely related to highly pathogenic PRRSV. This study provided scientific basis for the prevention and control of PRRS in China.

Key words Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV); Weaned piglets; ORF5; Phylogenetic analysis

猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS),是严重危害养猪业的重大传染疾病,也是世界动物卫生组织(OIE)必须上报的动物疫病之一^[1-2]。PRRSV属于套式病毒目(Nidovirales)动脉炎病毒科(Arteriviridae)动脉炎病毒属(Arterivirus)^[3-5],其基因组大小约为15 kb,由9个重叠的开放阅读框组成。PRRSV是具有囊膜的单股正链RNA病毒,包括8个开放阅读框(ORFs),其中ORF1编码的蛋白与RNA复制和转录相关,非结构蛋白Nsp2基因位于ORF1区,ORF5编码重要的保护性抗原糖蛋白GP5。Nsp2和ORF5在PRRSV基因组中变异最大,是科学工作者研究PRRSV分子流行病学及其遗传进化规律常用的基因片段^[6]。

PRRSV在美国已经流行了30多年,在我国也流行了20余年,它仍然是危害世界养猪业的重要病原体之一^[7]。2006年,在我国高致病性PRRSV的暴发直接导致了200多万头猪死亡^[8]。高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒(HP-

PRRSV)具有高致病性和传染性等特点,一旦传播就会给我 国乃至全世界的养猪业造成巨大的经济损失。自2013年以来,由新的PRRSV变异株NADC30-like引起PRRSV在我国的再次流行^[9-10]。Guo等^[11]系统分析了我国PRRSV的流行状况,阐明了PRRSV-1和PRRSV-2在我国的流行情况。

断奶仔猪处于一个较敏感的阶段,断奶效应、中断母体抗体供应以及外在环境因素的改变都会影响断奶仔猪的免疫机能,而仔猪的免疫系统一般4~8周才比较完善^[12]。虽然我国大部分规模化猪场都会对断奶仔猪进行PRRSV疫苗免疫,但健康断奶仔猪是否存在PRRSV持续性感染现象仍是值得关注的问题。为了进一步了解我国规模化猪场仔猪携带PRRSV的情况,笔者对2017年采集的国内规模化猪场健康断奶仔猪样品进行PRRSV检测和遗传进化分析,旨在为有效防控PRRSV提供数据支持,促进养猪业的健康发展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品信息及处理。2017年4—5月,从25个省(市)的38个近1年来无重大疫情的规模化猪场采集1 353头日龄40~45 d且无临床症状的健康断奶仔猪的咽拭子、肛拭子和血清,共4 059份,将其分装于1 mL离心管中,加入高压灭菌过的PBS(0.02 mol/L, pH 7.4),并将其置于实验室-80 °C冰箱中冷冻储藏,备用。

1.1.2 主要试剂与仪器。BioFlux Simply 总RNA提取试剂

基金项目 “十三五”国家重点研发计划项目(2017YFD0500104)。

作者简介 饶继红(1993—),女,广东韶关人,硕士研究生,研究方向:动物病毒学。*通信作者:葛淑敏,副教授,博士,硕士生导师,从事生物检测、单克隆抗体制备及特异性菌种筛选等研发工作;龚文杰,副研究员,博士,硕士生导师,从事动物病毒学的预防控制研究。

收稿日期 2018-12-25

盒,购自北京泰旭国际健康管理中心;2×Taq PCR Master Mix、Reverse Transcriptase M-MLV、Random Primer,购自天根生化科技有限公司;Prime STAR Max 高保真酶、dNTP Mixture、DL2000 DNA Marker 和 Agarose 等试剂购自 TaKaRa 公司。

1.1.3 主要仪器。无菌操作台(The BAKER COMPANY)、低温高速离心机(Eppendorf 公司)、制冰机(SANYO 公司)、PCR 仪(BioRad 公司)、电泳仪(BioRad 公司)、凝胶图像处理系统(BioRad 公司)、-25℃冰箱(Haier 公司)。

1.2 方法

1.2.1 高通量测序及病毒宏基因组学分析。猪场样本进行混样(5混1)后,参考 He 等^[13] Sword of Viral Metagenomic (SVM)实验方法,进行离心取上清液、过滤、核酶消化、核酸提取、sscDNA 合成、RNA 降解、sscDNA 纯化、dscDNA 合成、寡核酸降解、单引物扩增、DNA 检验,并进行 SVM 编号后,38 个猪场共计 38 个 SVM 宏基因组数据库。由北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行高通量测序,并将基于高通量测序的病毒宏基因组学数据进行整理分析。

1.2.2 样品 RNA 提取。将“1.1.1”中处理好的咽拭子、肛拭子、血清单样样品,分别取 100 μL 上清液用于 RNA 提取,具体试验操作步骤参考 BioFlux Simply 总 RNA 提取试剂盒说明书。

1.2.3 反转录。反转录体系如下:总 RNA 10 μL、随机引物(1 μmol)1.5 μL、Reverse Transcriptase M-MLV(200 U/μL)1 μL、dNTP Mix(10 mmol/L)1.5 μL、RRI 反转录酶抑制剂(40 U/μL)0.5 μL、5×M-MLV buffer 4 μL,无 RNA 酶水补足 20 μL。于 42℃ 恒温水浴锅中孵育 1 h,95℃ 酶灭活 5 min,获得病毒基因组 cDNA。

1.2.4 引物设计及合成。从 GenBank 数据库下载各种基因型的 PRRSV 毒株序列,使用 MEGA6.0 软件在 NSP2 基因保守区域两端设计 RT-PCR 引物,上游引物 PRRSV-FP 为 5'-CGGAAGAACTGTCGGTG-3',下游引物 PRRSV-RP 为 5'-CGCAGACAAATCCAGAGG-3'。ORF5 基因扩增的引物序列参照 Kang 等^[14] 的研究报道。ORF5 基因扩增的上游引物 PRRSV-ORF5-FP 为 5'-AATGAGGTGGCYACAACC-3',下游引物 PRRSV-ORF5-RP 为 5'-GCGTGACACCTTAAGGGC-3'。引物送交吉林省库美生物科技有限公司合成。

1.2.5 RT-nPCR 进行样品检测。由于样品数量大,试验采用 cDNA“5混1”的方法进行 RT-PCR 检测,将检测为阳性的混样,进一步检测单样 cDNA。PCR 反应体系(25 μL)如下:2×Taq Mastermix 12.5 μL, ddH₂O 8.5 μL,上游引物 PRRSV-FP 1 μL,下游引物 PRRSV-RP 1 μL,cDNA 模板 2 μL。PCR 反应程序如下:95℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;最后,72℃ 延伸 10 min。利用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果,并将阳性产物送交吉林省库美生物科技有限公司测序。

1.2.6 PRRSV ORF5 基因扩增及测序。选取阳性样品 cD-

NA,用高保真酶对 ORF5 基因进行 RT-PCR 扩增。PCR 反应条件同“1.2.5”,延伸时间改为 90 s。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,PCR 扩增为阳性的产物送至吉林省库美生物科技有限公司进行纯化及测序。

1.2.7 PRRSV ORF5 基因系统发育树及同源性分析。利用 MEGA 6.0 软件分析获得的 7 条 PRRSV ORF5 基因序列,绘制系统进化树分析。此外,利用 DNASTar MegAlign 与 GenBank 上收录的 PRRSV 参考序列进行同源性比对分析。

2 结果与分析

2.1 宏基因组学结果 将采集来自我国 25 个省(市)38 个规模化猪场的咽拭子、肛拭子和血清进行高通量测序后,结果发现健康断奶仔猪携带有动脉炎病毒科等病毒,其中 38 个 SVM 宏基因组中有 16 个 SVM 宏基因组表出现动脉炎病毒科病毒基因组片段,共 1 706 条 Reads(表 1)。

表 1 动脉炎病毒科病毒 Reads 数量统计

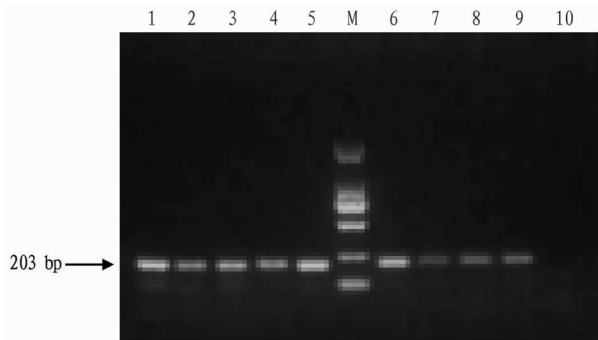
Table 1 Reads quantity statistics of viruses in arteritis virus family

SVM 编号 SVM No.	咽拭子 Throat swabs	肛拭子 Anal swabs	血清 Serum	不确定 Undefined
AH01	0	0	134	334
FJ01	1	0	552	124
GZ02	0	0	0	1
HeB01	0	0	49	76
HeB02	5	0	0	0
HeN01	0	0	2	0
HLJ01	0	0	8	0
HuN01	12	0	0	9
HuB01	0	0	0	6
NM01	49	0	0	24
NM02	1	0	0	4
SX01	0	0	53	140
SX02	1	1	48	40
SD01	0	0	0	5
SD02	0	0	0	1
TJ01	0	0	20	3

2.2 健康断奶仔猪携带 PRRSV 的 RT-PCR 检测结果 为了进一步验证健康断奶仔猪携带动脉炎病毒科中 PRRSV 的情况,利用 RT-PCR 对 2017 年 4—5 月采集自 25 个省(市)38 个猪场的 4 059 份健康断奶仔猪样品进行了检测,其中肛拭子、咽拭子、血清各 1 353 份。共检测到 46 份 PRRSV 阳性样品(阳性率为 1.1%)(图 1),包括咽拭子 36 份和肛拭子 10 份。在检测的 38 个猪场中,15 个猪场检测出 PRRSV,猪场阳性率为 39.5%,具体检测情况见表 2。将 PCR 产物测序获得的序列进行 BLAST 比对,结果发现检测的阳性样品与高致病性 PRRSV 的核苷酸同源性为 96%~100%。

2.3 健康断奶仔猪 PRRSV 的基因分型 利用 RT-PCR 从 46 份 PRRSV 阳性样品中成功扩增出 7 个 ORF5 基因(图 2),分别为 SCMY19(四川省绵阳市某规模化猪场咽拭子 19 号样品)、HeNHBG16(河南省鹤壁市某规模化猪场肛拭子 16 号样品)、GXHXY1、GXHXY4、GXHXY8、GXHXY11、GXHXY13(广西省南宁市横县某规模化猪场咽拭子 1 号、4 号、8 号、11 号和 13 号),并对 PCR 产物进行了序列测定,基因大小为 750 bp。基于 ORF5 基因核苷酸序列的系统发育树分析表明,所有的 PRRSV 病毒株可以分为 2 种基因型:基因 1 型

(欧洲型, Type I)和基因 2 型(美洲型, Type II)。Type II 可以进一步划分为 4 个主要的亚群:亚群 1 是以 VR-2332 为代表的美洲型毒株;亚群 2 是 NADC30-like 重组毒株;亚群 3 是以 CH-1a 为代表的中国经典型毒株;亚群 4 是中国高致病性 PRRSV 毒株^[15]。该试验中的 7 个 PRRSV 毒株都属于基因 2 型(美洲型, Type II)中的亚群 4 (Subgroup 4), 与以 LV 为代表的 PRRSV 基因 1 型(欧洲型)病毒株遗传关系较远(图 3)。



注: M. DL2000 DNA marker; 1. 阳性对照; 2. HeNHBG16(河南省肛拭子样品); 3. GXHXG16(广西省咽拭子样品); 4. GXHXY1(广西省咽拭子样品); 5. GXHXY4(广西省咽拭子样品); 6. GXHXY8(广西省咽拭子样品); 7. GXHXY9(广西省咽拭子样品); 8. GXHXY10(广西省咽拭子样品); 9. GXHXY11(广西省咽拭子样品); 10. 阴性对照

Note: M. DL2000 DNA marker; 1. Positive control; 2. HeNHBG16(anal swab sample from Henan); 3. GXHXG16(throat swab sample from Guangxi); 4. GXHXY1(throat swab sample from Guangxi); 5. GXHXY4(throat swab sample from Guangxi); 6. GXHXY8(throat swab sample from Guangxi); 7. GXHXY9(throat swab sample from Guangxi); 8. GXHXY10(throat swab sample from Guangxi); 9. GXHXY11(throat swab sample from Guangxi); 10. Negative control

图 1 PRRSV 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis results of amplified PRRSV products

2.4 健康断奶仔猪 PRRSV 的同源性分析 经序列比对发现, 该研究获得的 PRRSV 毒株间的 *ORF5* 基因序列同源性为 96.7%~100%, 这些毒株与 HP-PRRSV 代表株 JXA1 的核苷酸序列同源性最高, 为 97.7%~99.6%, 与 VR-2332 株和 LV 株的 *ORF5* 核苷酸序列同源性分别为 89.2%~89.5% 和 63.6%~64.1%, 与 CH-1a 株、CH-1R 株和 NADC30 株的 *ORF5* 核苷酸序列同源性分别为 94.1%~95.0%、93.2%~94.1% 和 85.6%~86.5%。这些结果表明健康断奶仔猪携带的 PRRSV 病毒株属于 HP-PRRSV。

3 讨论

猪繁殖与呼吸综合征是影响全球养猪业的重大传染病之一, 其临床症状主要表现为病猪发热, 身体局部出现蓝紫色斑块, 怀孕母猪流产、产死胎或木乃伊胎, 仔猪和育肥猪发病死亡率高, 该疫病每年都造成巨大的经济损失^[16-17]。PRRSV 感染可严重损伤免疫系统, 可造成猪的持续性感染,

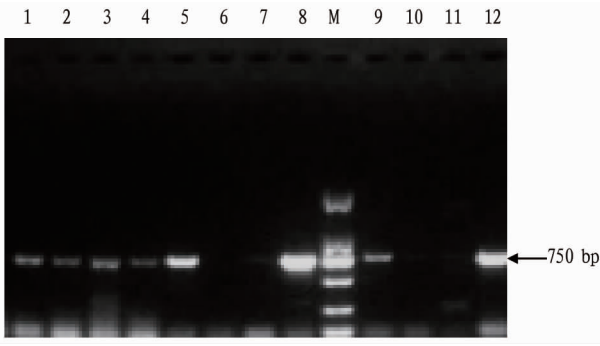
免疫预防相对比较困难^[18], 尽管有多种减毒活疫苗应用于临床, 但 PRRSV 容易发生重组, PRRSV 流行仍然非常严峻, 明确病毒的流行病学特点对于防控措施的制定非常重要。因此, 该研究在开展健康断奶仔猪病毒组学研究的同时, 对采集的咽拭子、肛拭子和血清样品进行了 PRRSV 流行病学调查。结果表明, 宏基因组测序数据中仅有少量的动脉炎病毒科病毒 Reads(1 706 条), 后续验证发现 4 059 份样品中有 46 份为 PRRSV 阳性, 阳性率仅为 1.1%, 表明 PRRSV 在健康断奶仔猪的携带率非常低。此外, 试验从 46 份阳性样品中仅扩增获得了 7 个毒株的 *ORF* 全长基因, 可能是由于咽拭子或肛拭子的病毒载量较低。

表 2 不同猪场 PRRSV 的检测结果

Table 2 Detection results of PRRSV in different pig farms

采样地点 Sampling sites	猪场 Pig farms	阳性率 Positive rate,/%		
		咽拭子 Throat Swab	肛拭子 Anal swab	血清 Serum
黑龙江 Heilongjiang	猪场 1	0(0/30)	0(0/30)	0(0/30)
吉林 Jilin	猪场 1	0(0/50)	0(0/50)	0(0/50)
辽宁 Liaoning	猪场 1	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)
内蒙 Inner Mongolia	猪场 1	0(0/50)	0(0/50)	0(0/50)
	猪场 2	2.0(1/50)	0(0/50)	0(0/50)
北京 Beijing	猪场 1	0(0/20)	0(0/40)	0(0/40)
	猪场 2	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)
	猪场 3	10(1/10)	0(0/10)	0(0/10)
天津 Tianjin	猪场 1	2.5(1/40)	0(0/40)	0(0/40)
山东 Shandong	猪场 1	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)
	猪场 2	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)
河北 Hebei	猪场 1	0(0/40)	5.0(2/40)	0(0/40)
	猪场 2	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)
山西 Shanxi	猪场 1	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)
陕西 Shaanxi	猪场 1	2.5(1/40)	5.0(2/40)	0(0/40)
	猪场 2	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)
宁夏 Ningxia	猪场 1	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)
河南 Henan	猪场 1	0(0/30)	6.7(2/30)	0(0/30)
	猪场 2	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)
江苏 Jiangsu	猪场 1	0(0/30)	0(0/30)	0(0/30)
安徽 Anhui	猪场 1	0(0/45)	0(0/45)	0(0/45)
湖北 Hubei	猪场 1	2.5(1/40)	0(0/40)	0(0/40)
湖南 Hunan	猪场 1	7.1(3/42)	0(0/42)	0(0/42)
	猪场 2	0(0/35)	0(0/35)	0(0/35)
浙江 Zhejiang	猪场 1	0(0/40)	2.5(1/40)	0(0/40)
福建 Fujian	猪场 1	0(0/30)	0(0/30)	0(0/30)
江西 Jiangxi	猪场 1	0(0/30)	0(0/30)	0(0/30)
广东 Guangdong	猪场 1	0(0/32)	3.1(1/32)	0(0/32)
	猪场 2	0(0/31)	0(0/31)	0(0/31)
	猪场 3	4.7(2/42)	0(0/42)	0(0/42)
重庆 Chongqing	猪场 1	2.5(1/40)	0(0/40)	0(0/40)
四川 Sichuan	猪场 1	20.0(8/40)	0(0/40)	0(0/40)
	猪场 2	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)
贵州 Guizhou	猪场 1	0(0/40)	0(0/40)	0(0/40)
	猪场 2	0(0/33)	0(0/33)	0(0/33)
广西 Guangxi	猪场 1	0(0/50)	2.0(1/50)	0(0/50)
	猪场 2	28.3(17/60)	1.7(1/60)	0(0/60)
云南 Yunnan	猪场 1	0(0/33)	0(0/33)	0(0/33)

PRRSV *Nsp2* 和 *ORF5* 是科学工作者研究 PRRSV 分子流行病学及其遗传进化规律常用的基因片段, 所以该试验在 *Nsp2* 基因保守区域设计引物用于 PRRSV 检测, 并扩增



注: M. DL2000 DNA marker; 1. SCMY19(四川省咽拭子样品); 2. HeNHBG16(河南省肛拭子样品); 3. GXHXY1(广西咽拭子样品); 4. GXHXY4(广西咽拭子样品); 5. GXHXY8(广西咽拭子样品); 6. GXHXY9(广西咽拭子样品); 7. GXHXY10(广西咽拭子样品); 8. GXHXY11(广西咽拭子样品); 9. GXHXY13(广西咽拭子样品); 10. GXHXY16(广西肛拭子样品); 11. 阴性对照; 12. 阳性对照

Note: M. DL2000 DNA marker; 1. SCMY19(throat swab sample from Sichuan); 2. HeNHBG16(anal swab sample from Henan); 3. GXHXY1(throat swab sample from Guangxi); 4. GXHXY4(throat swab sample from Guangxi); 5. GXHXY8(throat swab sample from Guangxi); 6. GXHXY9(throat swab sample from Guangxi); 7. GXHXY10(throat swab sample from Guangxi); 8. GXHXY11(throat swab sample from Guangxi); 9. GXHXY13(throat swab sample from Guangxi); 10. GXHXY16(anal swab sample from Guangxi); 11. Negative control; 12. Positive control

图2 PRRSV ORF5 基因的 RT-PCR 扩增结果

Fig.2 Amplification results of PRRSV ORF5 gene by RT-PCR

ORF5 基因和测定其核苷酸序列用于系统发育树分析。据报道,PRRSV-1 和 PRRSV-2 在我国都有流行,虽然最近有关于 PRRSV-1 在我国流行的报道,但其临床检出率仍然很低,后者仍占据主导地位。1999 年我国首次报道了 PRRSV-1 的流行,赵耘等^[19]对 B13 流行毒株的 ORF5 基因片段进行克隆和遗传进化分析,其与 PRRSV-2 代表病毒株 LV 的 ORF5 基因只有 2 个核苷酸相异,二者同源性高达 99.7%。近年来,我国已有越来越多关于 PRRSV-1 流行的调查研究,内蒙古、北京、福建、贵州和香港等地区均出现了欧洲型 PRRSV 流行毒株,且猪场阳性率约 5%。自 2013 年以来,我国主要流行的毒株为 HP-PRRSV 和 NADC30-like^[20]。此次 PRRSV 流行病学调查,2017 年采集的健康断奶仔猪阳性样品都为 PRRSV-2 型的 HP-PRRSV,未检测出 PRRSV-1 型及 NADC30-like 等 PRRSV 毒株。HP-PRRSV 在我国不同规模的猪场流行,母猪或仔猪一旦感染此病毒,容易导致死亡,这可能由于 HP-PRRSV 的 *Nsp2* 基因缺失 30 个不连续氨基酸,改变其嗜组织性从而增强毒力,使发病猪的死亡率升高。

根据采样猪场断奶仔猪的免疫背景信息,该研究的 38 个规模化猪场中有 24 个猪场的断奶仔猪已经免疫 PRRSV 弱毒疫苗,其中有 6 个猪场检测出 PRRSV。在未免疫的 14 个猪场中,有 9 个猪场检测出 PRRSV 呈阳性。值得注意的是,四川省某猪场免疫蓝耳弱毒疫苗后,健康仔猪的 PRRSV 阳性率竟高达 20%。该猪场毒株的序列与 HP-PRRSV like 毒株 JXA1 的同源性为 99.6%,与 HP-PRRSV 疫苗株 JXA1-

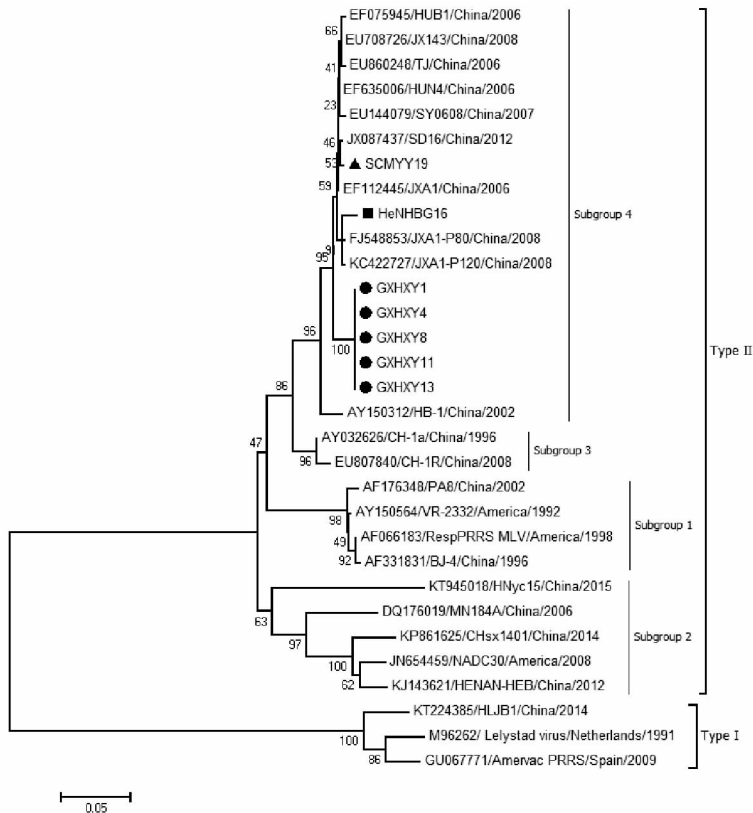


图3 基于 PRRSV ORF5 基因核苷酸序列的系统发育树分析

Fig.3 Phylogenetic tree analysis based on the nucleotide sequences of PRRSV ORF5 genes

叶绿体基因组差异主要是由反向重复区的收缩、扩张或缺失引起的,而 IR 在稳定叶绿体基因组结构和影响叶绿体基因组大小方面起着非常重要的作用^[11-12]。5 种芸香科植物的 IR 区存在一定的差异,作为水果食用的甜橙、柠檬、黄皮其 IR 区域在 26 991~26 999 bp,而作为一种野生果树或观赏果树的假黄皮和山小橘两者的 IR 区域在 27 kb 左右,同时,作为观赏果树的九里香(*Murraya koenigii*)其 IR 区域也在 27 kb。IR 区是不是与芸香科果实的可食性有一定关系有待进一步研究。

近年来,植物叶绿体基因组的研究得到国内外众多学者的普遍关注,现已成为叶绿体转化技术和植物亲缘关系鉴定的一个重要手段。通过对 20 种园艺植物的叶绿体基因组分析发现,亲缘关系较近的同属植物、同属不同种的植物更容易聚在一起。笔者首次采用高通量测序技术完成了黄皮叶绿体基因组序列、结构和注释工作,丰富了黄皮的遗传资源,对 5 种芸香科植物的叶绿体基因组的信息进行了比较分析,为热带果树的叶绿体研究提供了参考,丰富了热带果树的叶绿体基因组数据库,为种质资源的合理开发利用提供了基础性数据。

参考文献

- [1] SHINOZAKI K, OHME M, TANAKA M, et al. The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression [J]. *EMBO J*, 1986, 5(9): 2043-2049.
- [2] WAKASUGI T, TSUDZUKI T, SUGIURA M. The genomics of land plant

- chloroplasts: Gene content and alteration of genomic information by RNA editing [J]. *Photosynth Res*, 2001, 70(1): 107-118.
- [3] KAHLAU S, ASPINALL S, GRAY J C, et al. Sequence of the tomato chloroplast DNA and evolutionary comparison of solanaceous plastid genomes [J]. *J Mol Evol*, 2006, 63(2): 194-207.
- [4] SHIMADA H, SUGIURA M. Fine structural features of the chloroplast genome: Comparison of the sequenced chloroplast genome [J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19(5): 983-995.
- [5] LOHSE M, DRECHSEL O, KAHLAU S, et al. Organellar Genome DRAW—a suite of tools for generating physical maps of plastid and mitochondrial genomes and visualizing expression data sets [J]. *Nucleic acids research*, 2013, 41: 575-581.
- [6] NEI M, KUMAR S. *Molecular evolution and phylogenetics* [M]. Oxford, USA: Oxford University Press, 2000.
- [7] YANG Z H, PAML Z. Phylogenetic analysis by maximum likelihood [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1586-1591.
- [8] BAUSHER M G, SINGH N D, LEE S B, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck var 'Ridge Pineapple': Organization and phylogenetic relationships to other angiosperms [J]. *BMC Plant Biology*, 2006, 6: 1-11.
- [9] BAI L J, YE Y T, CHEN Q, et al. The complete chloroplast genome sequence of the white strawberry *Fragaria pentaphylla* [J]. *Conservation genetics resources*, 2017, 9(4): 659-661.
- [10] XIE H K, JIAO J, FAN X C, et al. The complete chloroplast genome sequence of Chinese wild grape *Vitis amurensis* (Vitaceae: *Vitis* L.) [J]. *Conservation genetics resources*, 2017, 9(1): 43-46.
- [11] PALMER J D, THOMPSON W F. Chloroplast DNA rearrangements are more frequent when a large inverted repeat sequence is lost [J]. *Cell*, 1982, 29(2): 537-550.
- [12] WANG R J, CHENG C L, CHANG C C, et al. Dynamics and evolution of the inverted repeat-large single copy junctions in the chloroplast genomes of monocots [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2008, 8(1): 36-51.

(上接第 114 页)

P80 的同源性为 97.3%。该试验结果表明,即使接种疫苗,仔猪依然存在 PRRSV 持续性感染状况。我国现有的商业化 PRRSV 弱毒疫苗能否有效预防 HP-PRRSV,尚有待进一步研究。

总而言之,该试验首次研究了全国规模化断奶仔猪携带 PRRSV 的现状,可为猪繁殖与呼吸综合征防控提供重要的数据和理论依据。

参考文献

- [1] NEUMANN E J, KLIEBENSTEIN J B, JOHNSON C D, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States [J]. *J Am Vet Med Assoc*, 2005, 227(3): 385-392.
- [2] 刘莹, 王凤雪, 温永俊, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒非结构蛋白 2 的研究进展 [J]. *中国预防兽医学报*, 2015, 37(2): 155-158.
- [3] HANADA K, SUZUKI Y, NAKANE T, et al. The origin and evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses [J]. *Molecular biology & evolution*, 2005, 22(4): 1024-1031.
- [4] MURTAUGH M P, STADEJEK T, ABRAHANTE J E, et al. The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virus research*, 2010, 154(1): 18-30.
- [5] WANG X, MARTHALER D, ROVIRA A, et al. Emergence of a virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vaccinated herds in the United States [J]. *Virus research*, 2015, 210(1): 34-41.
- [6] LIU Y, WANG F X, WEN Y J, et al. Effect of nonstructural protein 2 hypervariable regions in the replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in marc-145 cells [J]. *Intervirology*, 2015, 58(5): 288-296.
- [7] 付利芝, 徐登峰, 周淑兰, 等. 重庆地区猪繁殖与呼吸综合征病毒和猪瘟病毒感染检测 [J]. *中国兽医杂志*, 2009, 45(4): 44-45.
- [8] TIAN K G, YU X L, ZHAO T Z, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: Unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark [J]. *PLoS One*, 2007, 2(6): 1-10.

- [9] ZHAO K, YE C, CHANG X B, et al. Importation and recombination are responsible for the latest emergence of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China [J]. *Journal of virology*, 2015, 89(20): 10712-10716.
- [10] ZHOU L, WANG Z C, DING Y P, et al. NADC30-like strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, China [J]. *Emerging infectious diseases*, 2015, 21(12): 2256-2257.
- [11] GUO Z H, CHEN X X, LI R, et al. The prevalent status and genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in China: A molecular epidemiological perspective [J]. *Virology journal*, 2018, 15(1): 1-14.
- [12] 祝永才, 胡兴义, 张双翔, 等. 复合益生菌对早期断奶仔猪生长性能和免疫水平的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2018, 45(6): 1518-1525.
- [13] HE B, LI Z S, YANG F L, et al. Virome profiling of bats from Myanmar by metagenomic analysis of tissue samples reveals more novel mammalian viruses [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): 1-14.
- [14] KANG H, YU J E, SHIN J E, et al. Geographic distribution and molecular analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome viruses circulating in swine farms in the Republic of Korea between 2013 and 2016 [J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1): 160.
- [15] SUI X K, XIN T, GUO X Y, et al. Genomic characterization and pathogenic study of two porcine reproductive and respiratory syndrome viruses with different virulence in Fujian, China [J]. *Journal of veterinary science*, 2018, 19(3): 339-349.
- [16] 徐晓杰, 张乔亚, 谈晨, 等. 2015-2016 年我国部分地区猪繁殖与呼吸综合征的分子流行病学调查 [J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(6): 153-156.
- [17] ZHANG H, KONO H. Economic impacts of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) outbreak in Vietnam pig production [J]. *Tropical agricultural research*, 2012, 23(2): 152-159.
- [18] ZHU L Y, BI J L, ZHENG L L, et al. In vitro inhibition of porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication by short antisense oligonucleotides with locked nucleic acid modification [J]. *BMC Veterinary Research*, 2018, 14(1): 109.
- [19] 赵耘, 罗长宝, 林志雄, 等. 猪繁殖和呼吸综合征病毒中国分离株 B₁₃ 株 ORF₅ 基因在杆状病毒系统中的表达 [J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(3): 211-215.
- [20] 郭振华, 陈鑫鑫, 李睿, 等. 中国猪繁殖与呼吸综合征病毒流行历史及现状 [J]. *畜牧兽医学报*, 2018, 49(1): 1-9.