

尹国友,王林嵩. 猪流行性腹泻病毒S基因分离鉴定及序列分析[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):71-74.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.014

# 猪流行性腹泻病毒S基因分离鉴定及序列分析

尹国友<sup>1,2</sup>, 王林嵩<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学生命科学学院,河南新乡 453007; 2. 河南城建学院生命科学与工程学院,河南平顶山 467036)

**摘要:**根据 NCBI 上传的猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV) [GenBank: JN547228 (CH/S)], 设计引物对阳性病料进行鉴定并回收, 与 pMD18-T 构建重组载体并测序。对猪流行性腹泻病毒的基因多样性及序列保守性进行分析, 一是以经典毒株为主, 包括 CV777、KPEDV-9 和 CH/S 株等为代表的 G1 基因型, 另一种是以近几年分离的毒株为主, 包括 HB3-CH2012、CXHZ-CH2013、HNCZ-CH2013 等为代表的 G2 基因型。基因同源性分析比较结果表明, 这 4 株 PEDV 之间的序列同源性为 97.6%~100.0%, 与经典株 CV777 的同源性为 92.7%~92.8%。同源分析显示, PEDV 不同毒株间的基因同源性仍高度相似, 但 PEDV 流行毒株已呈现进化分支的趋势。

**关键词:**猪流行性腹泻病毒; S 基因; 序列分析

**中图分类号:** S858.285.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2019)11-0071-03

猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)引起的猪流行性腹泻病(porcine epidemic diarrhea, PED)是一种高死亡率的肠道传染病,会在猪群中引起各个年龄段猪暴发急性腹泻,多发于仔猪和胎猪,其临床症状主要以猪水样腹泻、呕吐和脱水为主。1971年,英国首先报道了 PEDV 的暴发流行<sup>[1]</sup>,随后在比利时、德国、瑞士、日本、韩国等许多养殖大国出现报道<sup>[2-3]</sup>。1976年,中国大陆首次报道 PED 的发生与流行,1984年通过免疫荧光试验证实病原微生物为猪流行性腹泻病毒<sup>[4]</sup>。20世纪80年代后,我国不断有 PED 发生,其中26个省(市、自治区)都曾发生。20世纪90年代后期,猪传染性胃肠炎(华毒株)和猪流行性腹泻(CV777)二联灭活苗或弱毒苗,在我国开始大范围使用并取得良好免疫效果<sup>[5]</sup>。国内外对该病的研究和重视程度均远远不够,我国甚至没有把猪流行性腹泻列为国家动物法定传染病的一、二和三类疫病<sup>[6]</sup>。自2006年后,以经典毒株 CV777 基础研制的灭活苗或弱毒苗免疫效果下降,免疫过的猪场还出现多次猪流行性腹泻病的暴发。2010年起,猪流行性腹泻病开始在全国大部分的主要养殖区出现,导致初生仔猪死亡率高达90%以上,全国仔猪死亡估计有上千万头<sup>[7-8]</sup>,给生猪养殖业造成了难以估量的经济损失。

PEDV 属于冠状病毒科冠状病毒属,其中冠状病毒属分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  4 个群<sup>[9]</sup>,猪流行性腹泻属于冠状病毒  $\alpha$  群,猪流行性腹泻基因组是单股正链具有感染性的 RNA,其基因组大小为 28 kb 左右,其中 S 基因编码的 S 蛋白是一种跨膜糖蛋白,位于病毒表面。S 蛋白与细胞受体结合,病毒融合,最重要的是,在诱导中和抗体方面和病毒粒子与细胞表面受体结

合后通过膜融合侵入宿主细胞方面发挥关键作用<sup>[10-11]</sup>。通过分析比对猪流行性腹泻病毒 S 基因分离株与经典株之间核苷酸和氨基酸的同源性、抗原表位差异、糖基化位点及跨膜域差异性,以期为预防和控制猪流行性腹泻暴发流行提供理论数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

Trizol LS Reagent, 购自美国 Invitrogen 公司产品; pMD18-T 载体克隆试剂盒、DL 2000 DNA Marker、rTaq 酶、RNA 酶抑制剂(HPRI)、dNTP、反转录酶(AMV)、UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒,均购自生工生物工程(上海)有限公司; BamH I 及 Hind III 限制性内切酶,均购自宝日生物技术(北京)有限公司; DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞由实验室保存。本研究于 2016 年在河南城建学院分子生物学实验室完成。

### 1.2 引物的设计和合成

根据 NCBI 数据库 GenBank 中发表的 JN547228 基因序列,设计并合成 S 基因测序引物,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	核苷酸序列(5'→3')	扩增长度(bp)
PEDV-S-F	GACAGTAATTGCCCTTTCAC	1 058
PEDV-S-R	ACAGCGCTTAGTCTTCATCA	

### 1.3 模板的制备

取来自发病猪的病变组织细胞匀浆液,按 Trizol LS Reagent 使用说明,提取病毒 RNA,将提取物 RNA 置于 -20℃ 冰箱保存。

### 1.4 RT-PCR

将设计好的下游引物 1.0  $\mu$ L, 0.4  $\mu$ L Rnase-Inhibitor, 5.0  $\mu$ L dNTP, 4.0  $\mu$ L 5  $\times$  AMV Buffer, 1.0  $\mu$ L AMV, 加入 10.0  $\mu$ L RNA, 42℃ 水浴 1~2 h, 即得 cDNA 模板, -20℃ 保存备用。

### 1.5 目的片段 S 基因的扩增

取 cDNA 产物 1.0  $\mu$ L 作为模板进行 PCR 扩增, 扩增体

收稿日期: 2018-02-24

基金项目: 河南省平顶山市科技攻关项目[编号: 2017007(7.5)]。

作者简介: 尹国友(1976—), 男, 山东陵县人, 博士研究生, 讲师, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: 121850427@qq.com。

通信作者: 王林嵩, 教授, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: 041008@htu.cn。

系:10 × PCR Buffer 2.5 μL, dNTP 2.0 μL, *rTaq* 酶 0.5 μL, PEDV - S - sense/PEDV - S - anti - sense 各 0.5 μL, 用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 补足 25.0 μL. PCR 扩增反应条件为:95 °C 预变性 5 min;94 °C 50 s,58 °C 50 s,72 °C 60 s,共进行 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min. RT - PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果。

1.6 目的基因的克隆及序列测定

将扩增的 RT - PCR 产物,回收产物与载体 pMD18 - T 进行连接,连接产物转化到感受态细胞 DH5α 中,挑选阳性菌落于 100 mL 液体 LB(含 A<sup>+</sup>)液体培养基中,放置于 37 °C 恒温摇床培养过夜,用碱性法提取重组质粒。并用双酶切酶 *Bam*H I、*Hind*III 酶切重组质粒,阳性质粒进行测序。

1.7 基因序列分析

利用 Clustal 1.83 和 MEGA 5.05 软件对猪流行性腹泻病毒的基因多样性及序列保守性分析,绘制毒株的系统进化树。

2 结果

2.1 目的基因的扩增

RT - PCR 扩增毒株,显示与预期片段 1 058 bp 相似大小的特异片段(图 1)。

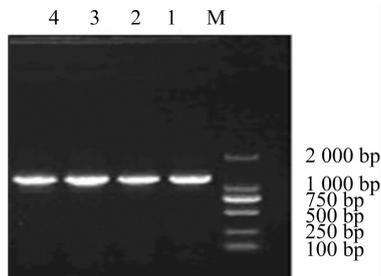


图1 PEDV-S 基因扩增结果

2.2 组质粒的酶切鉴定

用 *Bam*H I、*Hind*III 限制性内切酶对重组质粒 pMD18 -

*PEDV* - S 进行双酶切鉴定,将酶切产物用凝胶核酸电泳得到预期大小约 1 058 bp 和 2 000 bp 以上的 2 条电泳条带(图 2)。

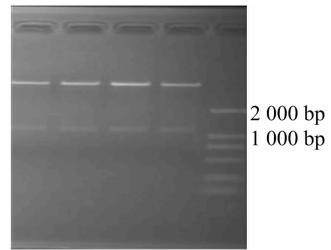


图2 PEDV-S 质粒酶切结果

2.3 DNA 序列测定

酶切鉴定阳性 pMD18 - *PEDV* - S 克隆质粒送上海生工生物工程有限公司测序,将测序序列通过 Blast 双重比对,分析表明 pMD18 载体已插入 *PEDV* - S 基因。

2.4 氨基酸的序列多样性、同源性分析

从 NCBI 数据库中下载经发表的 20 株国内外毒株序列,与 4 个分离株 (*PEDV* - HN1、*PEDV* - HN2、*PEDV* - HN3、*PEDV* - HN4) *PEDV* - S 基因序列进行核苷酸和氨基酸的同源性分析(表 2)。

2.5 PEDV - S 系统发育进化树

*PEDV* - S 基因序列同源性比较的系统发育进化树见图 3。

3 分析与讨论

猪流行性腹泻病毒刺突蛋白 S 基因保守性非常高,是主要的抗原表位所在域,*PEDV* - S 基因结构和功能与该病毒的致病性、感染性、中和抗体的产生和细胞结合能力密切相关<sup>[12-13]</sup>。本研究表明,*PEDV* 流行毒株的刺突蛋白基因不论在基因和蛋白质同源性上,还是在系统进化树上,与 *PEDV* 经典毒株 CV777、DR13 等疫苗株均存在显著差异,其基因的保守同源性只有 92.7% ~ 92.8%,从 *PEDV* - S 基因的系统进化树上可以看出,*PEDV* 流行毒株与经典疫苗株分为不同的组

表 2 氨基酸同源性比较结果

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	■	92.8	92.8	98.6	93.0	92.8	94.8	93.6	95.0	96.8	95.1	98.4	98.3	97.3	98.3	97.5	97.8	93.3	98.1	97.6	97.6	98.2	98.1	97.6
2	7.6	■	99.4	92.8	99.6	99.2	95.4	97.3	96.1	93.8	95.7	92.5	92.7	91.7	92.8	92.4	92.3	95.1	92.9	92.8	92.6	92.5	92.6	92.6
3	7.6	0.6	■	92.8	99.5	99.1	95.4	97.2	96.0	93.7	95.7	92.5	92.7	91.7	92.8	92.4	92.3	95.1	92.9	92.8	92.6	92.5	92.6	92.6
4	1.5	7.5	7.5	■	93.1	92.8	95.0	93.7	94.9	96.7	95.5	97.6	97.5	96.5	97.5	97.8	97.0	93.3	98.4	98.0	98.0	97.4	97.3	98.0
5	7.4	0.4	0.5	7.2	■	99.3	95.4	97.6	96.3	94.0	95.8	92.6	92.8	91.8	92.8	92.5	92.4	95.2	93.0	92.8	92.7	92.6	92.7	92.7
6	7.6	0.8	0.9	7.6	0.7	■	95.2	97.0	95.9	93.6	95.7	92.5	92.6	91.7	92.7	92.4	92.2	95.0	92.9	92.8	92.6	92.5	92.5	92.6
7	5.4	4.8	4.8	5.2	4.7	4.9	■	96.5	95.7	94.4	98.0	94.8	94.8	94.0	95.0	94.6	94.6	95.7	95.4	95.1	95.0	94.9	94.9	95.0
8	6.8	2.8	2.9	6.6	2.4	3.0	3.6	■	98.6	96.2	96.6	93.6	93.8	92.9	93.9	93.4	93.5	95.5	94.1	93.9	93.8	93.6	93.6	93.8
9	5.2	4.0	4.1	5.3	3.8	4.2	4.5	1.5	■	97.7	95.8	95.1	95.3	94.3	95.4	94.9	94.9	94.9	95.5	95.4	95.2	95.0	95.1	95.2
10	3.3	6.5	6.6	3.4	6.3	6.7	5.8	3.9	2.4	■	94.5	96.8	97.0	96.1	97.0	96.6	96.5	93.3	97.3	97.1	97.0	96.6	96.7	97.0
11	5.1	4.4	4.4	4.6	4.3	4.5	2.0	3.5	4.3	5.7	■	95.0	95.1	94.3	95.1	95.4	94.9	96.2	96.1	95.8	95.7	95.1	95.0	95.7
12	1.6	7.9	7.9	2.4	7.8	8.0	5.4	6.7	5.1	3.2	5.2	■	99.2	97.9	99.1	98.0	98.5	93.2	98.3	98.0	97.8	98.6	98.6	97.8
13	1.7	7.7	7.7	2.5	7.6	7.8	5.4	6.4	4.9	3.0	5.1	0.8	■	97.9	99.1	98.1	98.5	93.3	98.3	98.0	98.0	98.6	98.6	98.0
14	2.8	8.8	8.8	3.6	8.7	8.9	6.3	7.5	5.9	4.0	6.0	2.1	2.1	■	98.3	96.8	98.7	92.4	97.3	97.3	97.0	97.6	97.7	97.0
15	1.7	7.6	7.6	2.5	7.6	7.7	5.2	6.4	4.8	3.0	5.0	0.9	0.9	1.7	■	97.9	98.9	93.4	98.3	98.2	97.8	98.8	98.9	97.8
16	2.5	8.0	8.0	2.3	8.0	8.0	5.6	6.9	5.3	3.5	4.7	2.1	2.0	3.2	2.1	■	97.4	92.9	98.8	98.5	98.3	97.6	97.5	98.3
17	2.2	8.1	8.1	3.0	8.0	8.2	5.7	6.8	5.3	3.6	5.3	1.5	1.3	1.1	2.6	■	93.0	97.8	97.7	97.3	98.2	98.3	97.3	
18	7.1	5.1	5.1	7.0	5.0	5.2	4.5	4.6	5.3	7.1	3.9	7.2	7.0	8.0	6.9	7.5	7.4	■	93.7	93.4	93.4	93.2	93.3	93.4
19	2.0	7.5	7.5	1.6	7.4	7.5	4.7	6.2	4.6	2.8	4.0	1.8	1.8	2.7	1.8	1.2	2.3	6.6	■	99.1	99.4	98.0	97.9	99.4
20	2.4	7.6	7.6	2.0	7.5	7.6	5.0	6.4	4.8	2.9	4.3	2.1	2.1	2.8	1.8	1.5	2.3	6.9	0.9	■	98.7	97.7	97.6	98.7
21	2.4	7.8	7.8	2.0	7.7	7.8	5.2	6.5	4.9	3.1	4.5	2.2	2.1	3.1	2.2	1.7	2.7	6.9	0.6	1.3	■	97.7	97.6	100.0
22	1.8	7.9	7.9	2.6	7.8	8.0	5.3	6.8	5.2	3.5	5.1	1.5	1.5	2.4	1.2	2.4	1.8	7.2	2.1	2.3	2.3	■	99.9	97.7
23	1.9	7.8	7.8	2.7	7.7	7.9	5.3	6.7	5.1	3.4	5.2	1.4	1.4	2.3	1.1	2.5	1.8	7.1	2.1	2.4	2.4	0.1	■	97.6
24	2.4	7.8	7.8	2.0	7.7	7.8	5.2	6.5	4.9	3.1	4.5	2.2	2.1	3.1	2.2	1.7	2.7	6.9	0.6	1.3	0.0	2.3	2.4	■

注:右上数据为同源性,%;左下数据为差异性,%;序号 1 ~ 24 分别表示:CH1\_CH2011. pro, CH3\_CH2011. pro, CH4\_CH2011. pro, CH8\_CH2011. pro, CV777\_CH1994. pro, DR13\_SK2006. pro, DX\_CH2007. pro, FJND - 1\_CH2011. pro, FJND - 2\_CH2011. pro, FJND - 3\_CH2011. pro, FJXM - 2\_CH2012. pro, GDS01\_CH2012. pro, GDS02\_CH2013. pro, GXHZ\_CH2013. pro, GXNN\_CH2012. pro, HB3\_CH2012. pro, HNCZ\_CH2013. pro, KPEDY - 0\_SK1997. pro, SDLY\_CH2011. pro, YJ3F\_CH2012. pro, PEDV - HN - S1. pro, PEDV - HN - S2. pro, PEDV - HN - S3. pro, PEDV - HN - S4. pro。

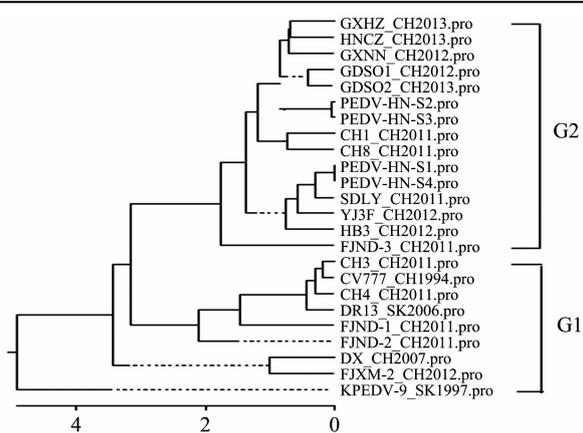


图3 PEDV-S序列系统发育进化树

群,表明 PEDV 流行毒株与经典疫苗株抗原表位的刺突蛋白 S 出现了基因多样性及保守性的变化<sup>[14]</sup>。

### 3.1 PEDV-S 基因同源性分析

Meg Align 软件进行同源性分析, PEDV 进化上主要有 G1 和 G2 这 2 个基因组型, G1 型以经典毒株为主, 包括 CV777、KPEDV-9 和 CH/S 株等, G2 型则以近年分离的毒株为主, 包括 HB3-CH2012、CXHZ-CH2013、HNCZ-CH2013 等。PEDV-HN1、PEDV-HN2、PEDV-HN3 和 PEDV-HN4 的同源性为 97.6%~100.0%, 与参考病毒株 CV777、DR13、KPEDV-9 等的同源性为 92.6%~93.3%。

分离株 PEDV-HN1、PEDV-HN2、PEDV-HN3 和 PEDV-HN4 与参考病毒株 CV777 相比, 比经典毒株多 2 个插入突变和 1 个缺失突变, 其中一个插入部位在流行毒株的第 58~59 位之间插入(QGVN), 另一个插入部位在流行毒株 139~140(N), 流行毒株 62~164(KNI) 位存在缺失突变, 与经典毒株 CV777 蛋白质同源性相比, 分离株的多个氨基酸位点发生突变, 共有 65 个位点发生氨基酸突变: 第 2~5 位(TPLI→KSLT)、第 15 位(L→T)、第 27~30 位(QSTI→SANT)、第 64 位(S→T)、第 68~74 位(GTGIETD→AGQHPTA)、第 86~87 位(DS→RG)、第 89 位(Q→H)、第 118 位(S→N)、第 138 位(V→A)、第 157~163 位(LQDGKNI→HSEHS—)、第 200~202 位(KRS→SGG)、第 210 位(T→E)、第 227~229 位(SYQ→YYE)、第 236 位(S→Y)、第 246~247 位(DS→EP)、第 270 位(L→V)、第 286 位(W→L) 等。

### 3.2 PEDV-S 基因蛋白抗原位点变化

ExPASy 分析经典毒株 CV777 的 S 蛋白抗原表位表明, 它有 51 个潜在的抗原位点, 而 PEDV-HN1 株预测存在 56 个抗原位点, PEDV-HN4 株存在 57 个抗原位点, PEDV-HN2 和 PEDV-HN3 株均含有 54 个抗原位点。与参考毒株 CV777 相比, 分离株 PEDV-HN1、PEDV-HN2、PEDV-HN3 和 PEDV-HN4 在 130~136 位缺失 1 个抗原位点, 而新增加的抗原位点(第 159~165 位氨基酸、第 191~199 位氨基酸和第 631~610 位氨基酸) 主要出现在猪流行性腹泻病毒的 S1 区。

### 3.3 PEDV-S 基因蛋白糖基化位点变化

ExPASy 分析 PEDV S 蛋白糖基化位点可知, CV777 及 PEDV-HN2 株中存在 29 个 N-糖基化修饰位点, 而 PEDV-HN1、PEDV-HN3、PEDV-HN4 株含有 28 个 N-糖基化位点。4 株分离毒株与 CV777 相比, 其 N-糖基化位点

出现 3 处改变, 第 57 位氨基酸由 NSSS 变为 NSTW, 第 1196 位氨基酸增加了 1 个 N-糖基化位点 NHTA, 第 230 位氨基酸有 1 个 N-糖基化位点缺失 NCTG。

### 3.4 PEDV-S 基因跨膜螺旋法

通过 SOSUI 预测 PEDV S 蛋白跨膜螺旋区分析可知, 经典毒株 CV777 在第 1331~1356 位氨基酸形成了首个跨膜螺旋域, 在第 2~24 位氨基酸形成第二次跨膜螺旋域。而 PEDV-HN1 和 PEDV-HN4 毒株在第 1337~1359 位氨基酸形成首次跨膜螺旋域, 在第 1~23 位氨基酸形成第二次跨膜螺旋, PEDV-HN2 和 PEDV-HN3 在第 1328~1350 位氨基酸形成了首次跨膜螺旋域, 在第 1~23 位氨基酸和第 1356~1378 位氨基酸分别形成了第二次跨膜螺旋域<sup>[16]</sup>。

### 3.5 PEDV-S 基因的遗传演化趋势

Meg Align 软件进行同源性分析, 猪流行性腹泻病毒进化上可以分为 G1 和 G2 这 2 个不同的基因组型。同源分析的 24 株 PEDV 中, 9 株 PEDV 为 G1 基因组型, 占 37.5%, 15 株 PEDV 为 G2 基因组型, 占 62.5%。近年, PEDV 主要的流行优势毒株也位于 G2 基因组型中, G1 基因组型主要是经典 CV777、DR13、KPEDV 等疫苗株以及我国发现的部分毒株。最近出现的流行株 G2 群, 除在我国发现外, 也出现在东北亚国家日本和韩国, 此次分离鉴定的 4 株毒株均属于 G2 群, 我国近年分离的 PEDV 流行毒株与 G2 群同源性最高, 结果说明我国跨地域的生猪调配导致不同区域的毒株之间存在交叉感染基因重配, 可能与 PEDV 的传播和致病有一定相关性。系统进化树进化不同分支的时间显示, 不同时代鉴别的 PEDV 流行毒株有相同的进化方向, 并不存在明显的时空聚集性<sup>[15]</sup>。

猪流行性腹泻病是严重影响我国养猪业发展的重要传染病之一, 给生猪饲养、育种等造成巨大的经济损失。在很长一段时期内由于疫苗的使用减少了该病的感染, 但同时由于疫苗长期使用导致 PEDV 的基因发生突变<sup>[17]</sup>。通过本研究发现, 目前我国广泛流行的猪流行性腹泻病毒株与以往经典毒株相比已经存在一些在基因序列及蛋白结构方面的明显差异, 这可能是疫苗免疫失败的主要原因之一。

### 参考文献:

- [1] 孙振钊, 赵伟男, 王靖飞. 猪腹泻病例中 PEDV、TGEV 及 PRV 的感染调查[J]. 动物医学进展, 2014, 35(5): 132-135.
- [2] Pan Y, Tian X, Li W, et al. Isolation and characterization of a variant porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Virology Journal, 2012: 195.
- [3] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines[J]. Virus Genes, 2012, 44(2): 167-175.
- [4] Chen J, Wang C, Shi H, et al. Molecular epidemiology of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Archives of Virology, 2010, 155: 1471-1476.
- [5] Park J E, Cruz D J, Shin H J. Receptor-bound porcine epidemic diarrhea virus spike protein cleaved by trypsin induces membrane fusion[J]. Archives of Virology, 2011, 156: 1749-1756.
- [6] Chen J F, Liu X Z, Shi D, et al. Detection and molecular diversity of spike gene of porcine epidemic diarrhea virus in China[J]. Viruses, 2013, 5(10): 2601-2613.

吴晓军,胡喜贵,陈向东,等. 小麦成熟胚再生体系优化效果评价及高再生率基因型筛选[J]. 江苏农业科学,2019,47(11):74-77.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.11.015

# 小麦成熟胚再生体系优化效果评价 及高再生率基因型筛选

吴晓军, 胡喜贵, 陈向东, 姜小苓, 丁位华, 李 淦, 茹振钢  
(河南科技学院小麦中心/河南省现代生物育种协同创新中心, 河南新乡 453003)

**摘要:**为了对小麦成熟胚的再生优化体系进行培养效果评价及筛选高再生率基因型,以 7 个小麦品种成熟胚为材料,采用常规和优化 2 种培养体系,研究 3 种胚处理方式对成熟胚出愈率、分化率及再生率的影响。结果表明:优化培养体系组织培养效果显著优于常规培养体系;胚处理方式与基因型之间可能存在一定的互作关系,特定基因型品种采用不同胚处理方法,其组织培养效果差异明显,且不同品种的最适胚处理方式可能不同。在供试的 7 个品种中,矮抗 58、济麦 22、百农 419、百农 160 和周麦 22 在经完整胚法处理,分化率均达到 50% 以上,再生率均达到 25% 以上,其中以矮抗 58 和百农 160 最优,再生率分别达到 51.74%、43.84%。而采用纵半切略带胚乳法时,宝丰 7228 和中麦 175 的分化率和再生率均较完整胚法有了较大提升,分别达到 62.89%、56.79% 和 26.88%、36.75%。说明特定基因型品种须要找到最适合的胚处理方法,以充分挖掘其再生能力,获得的高再生率小麦品种可用于遗传转化研究。

**关键词:**小麦;成熟胚;基因型;再生体系;再生率;分化率

**中图分类号:** S512.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)11-0074-04

小麦是世界主要粮食及饲料作物之一,不断改善小麦营养品质和提高产量潜力始终是小麦遗传改良的中心任务,而相关有利基因的发掘和利用是关键环节。目前,随着小麦全基因组序列的公布,大量基因被挖掘出来,迫切须要进行功能

鉴定和利用研究。因此,建立稳定高效的组织培养再生体系将会极大地推进小麦功能基因组学和遗传转化研究。

不同外植体对组织培养再生有很大影响,目前小麦幼穗、盾片、幼叶、根尖分生组织、花药、幼胚、成熟胚等都被成功应用于小麦组织培养中<sup>[1-2]</sup>,其中小麦幼胚是最常用的外植体,它具有操作简单、愈伤诱导及植株再生能力强的特点,被认为是最为理想的组织培养材料,然而小麦幼胚的获得受时间、空间和季节条件的限制,并且难以判断籽粒发育阶段是否一致;另外,小麦幼胚周年利用须要使用人工气候室,建造和维持成本较高,这在一定程度上限制了幼胚在遗传转化中的应用<sup>[3]</sup>。而小麦成熟胚具有发育状态一致、不受季节限制、可以大量获取的优点,是进行小麦遗传转化最为方便利用的受体材料。

目前,对小麦成熟胚的组织培养研究主要集中于种子预

收稿日期:2018-02-08

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0100705);河南省高等学校重点科研项目(编号:16A210047);河南省新乡市科技重大专项(编号:ZD17005);河南科技学院引进高层次人才科研启动项目(编号:201010615002)。

作者简介:吴晓军(1980—),男,河南固始人,博士,讲师,主要从事小麦单倍体育种技术研究。E-mail:jdfs30@163.com。

通信作者:茹振钢,教授,硕士生导师,主要从事小麦遗传育种和杂种优势利用研究。E-mail:rzh58@163.com。

[7] Hao J, Xue C, He L, et al. Bioinformatics insight into the spike glycoprotein gene of field porcine epidemic diarrhea strains during 2011—2013 in Guangdong, China[J]. *Virus Genes*, 2014, 49(1): 58-67.

[8] Tian P F, Jin Y L, Xing G, et al. Evidence of recombinant strains of porcine epidemic diarrhea virus, United States, 2013[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, 20(10): 1735-1738.

[9] Li Z L, Zhu L, Ma J Y, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) field strains in South China[J]. *Virus Genes*, 2012, 45(1): 181-185.

[10] 田野, 苏丹萍, 蒋伟, 等. 华南地区猪流行性腹泻病毒的分离鉴定及其 S 基因抗原表位片段的遗传变异分析[J]. *中国兽医杂志*, 2013, 49(5): 3-5, 8.

[11] 孙东波, 陈建飞, 时洪艳, 等. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白受体结合域的分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(4): 528-532.

[12] Sun D B, Feng L, Shi H Y, et al. Spike protein region (aa 636-789) of Porcine epidemic diarrhea virus is essential for induction of

neutralizing antibodies[J]. *Acta Virologica*, 2007, 51(3): 149-156.

[13] Sun D B, Feng L, Shi H Y, et al. Identification of two novel B cell epitopes on porcine epidemic diarrhea virus spike protein[J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 131(1/2): 73-81.

[14] 郑逢梅, 霍金耀, 赵军, 等. 2010—2012 年华中地区猪流行性腹泻病毒分子特征和遗传进化分析[J]. *病毒学报*, 2013, 29(2): 197-205.

[15] Du L, Zhao G, Kou Z, et al. Identification of a receptor-binding domain in the S protein of the novel human coronavirus Middle East respiratory syndrome coronavirus as an essential target for vaccine development[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(17): 9939-9942.

[16] Gao Y Y, Kou Q W, Ge X N, et al. Phylogenetic analysis of porcine epidemic diarrhea virus field strains prevailing recently in China[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(3): 711-715.

[17] Belouzard S, Millet J K, Licitra B N, et al. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein[J]. *Viruses*, 2012, 4(6): 1011-1013.