

王先坤, 谭磊, 徐凯文, 等. 猪伪狂犬病毒 HN-LD 株分离鉴定及部分毒力基因遗传进化分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(10): 171-176.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.10.027

猪伪狂犬病毒 HN-LD 株分离鉴定 及部分毒力基因遗传进化分析

王先坤¹, 谭磊², 徐凯文², 李静¹

(1. 娄底职业技术学院, 湖南娄底 417000; 2. 湖南农业大学动物医学院, 湖南长沙 410128)

摘要: 为了解湖南省伪狂犬病毒 (PRV) 病原特征及遗传变异情况, 从湖南娄底某猪场采集疑似感染伪狂犬病 (PR) 病料, 通过细胞传代、PCR 鉴定、间接免疫荧光试验 (IFA) 等进行病毒分离鉴定; 对该毒株的 *gC*、*TK* 和 *gE* 基因进行 PCR 扩增及测序, 分析其变异情况。结果表明, 临床病料接种 PK15 细胞后有 1 份样品出现细胞病变, 经过 PCR 和 IFA 鉴定结果表明分离的毒株为 PRV (命名为 HuN-LD 株), 盲传第 6 代病毒的滴度为 $10^{7.5}$ TCID₅₀/mL。与参考 PRV 毒株相比, 该毒株 *gE*、*TK* 和 *gC* 基因序列与国内流行变异株对应序列同源性最高, 与其他毒株同源性相对较低。基于 *gC* 基因序列构建的系统进化数分析结果表明, 该毒株与国内 2011 年后流行变异株亲缘关系最近, 属于同一分支, 但与国外流行的毒株 (NIA3 和 Becker 等) 相隔较远, 属于不同分支。提示成功分离得到 1 株 PRV 变异株, 该结果可为湖南省 PRV 流行病学研究及疫苗研发等提供科学依据。

关键词: 猪伪狂犬病毒; 分离鉴定; 遗传变异; 进化分析; 湖南省

中图分类号: S852.65⁺1

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2022)10-0171-05

猪伪狂犬病 (pseudorabies, PR) 是由猪伪狂犬病毒 (pseudorabies virus, PRV) 感染所引起, 该病原可感染多种动物, 包括猪、牛、羊和犬等, 临床症状主要包括腹泻、发热、脑炎和奇痒 (猪除外) 为主要特征^[1-2]。猪为 PRV 的主要宿主, 但不同发育阶段猪群感染该病原后表现临床症状均有所不同: 仔猪出现脑炎和腹泻等, 育肥猪出现呼吸道症状, 种公猪繁殖能力下降, 繁殖母猪流产、死胎等^[3]。目前, 对于 PR 防控主要依靠使用标记疫苗和相应的鉴别诊断方法, 部分国家或地区采用此策略成功控制或净化该病。2011 年前, 我国主要依靠基于 Bartha 株研发的基因缺失弱毒疫苗来防控 PR, 且取得较好效果。自 2011 年冬季以来, 我国部分省市猪场暴发 PR, 且这些猪场大部分均免疫接种过 PRV 弱毒疫苗, 这提示传统的 PRV 疫苗无法对目前流行的变异株提供完全保护, 而进一步序列分析结果也发现 PRV 变异株和传统株部分抗原基因存在较大差异^[4-5]。

PRV 为 DNA 病毒, 成熟的病毒粒子为球形, 其

基因组全长约为 143 kb, 可编码多种蛋白。*gE*、*gI*、*TK*、*gC* 和 *gD* 等蛋白共同调控 PRV 的毒力, 其中, *gE* 为 PRV 的主要毒力基因, 缺失该基因可导致保持毒株的免疫原性, 但毒力会极大下降^[6]; *TK* 基因编码的胸苷激酶可参与病毒的潜伏感染; *gC* 基因编码的糖蛋白则可诱导细胞免疫, 在病毒吸附和释放等过程中发挥重要的作用, 且该基因的变化可影响中和抗体的产生^[7]。

湖南省生猪养殖业发达, 但王昌建等的调查结果显示, 2018 年湖南省部分地区规模化猪场 PRV-*gE* 血清抗体阳性率达 21.0%, 提示猪伪狂犬病在湖南地区广泛流行, 且野毒感染情况较为严重^[8]。为初步调查湖南地区 PRV 流行株病原特征及基因变异情况, 本研究首先通过细胞传代、PCR 检测、间接免疫荧光检测技术 (IFA) 对病原进行分离及鉴定, 其后测定该毒株的滴度并分析其对小鼠的致病性, 最后通过 PCR 法对该毒株的 *gE*、*TK* 和 *gC* 基因序列进行扩增并测序, 分析其基因变异情况, 并分析其遗传进化关系, 以期对湖南省 PRV 分子流行病学研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 病料来源、细胞及试验动物

猪肾上皮细胞 (PK15 细胞), 由湖南农业大学

收稿日期: 2021-07-19

项目简介: 湖南省研究生科研创新项目 (编号: CX20200659)。

作者简介: 王先坤 (1988—), 男, 湖南永州人, 硕士, 讲师, 主要从事动物疾病诊断与防治研究。E-mail: kaqirui2021@sohu.com。

通信作者: 李静, 主要从事动物疾病诊断与防治研究。E-mail: 358778161@qq.com。

动物医学院保存。肾脏、肺脏、脑、淋巴结等组织样品于 2019 年 8 月初采集于河南省娄底市某疑似感染猪伪狂犬病的猪场,将样品标记后保存于 -20 ℃,待检。12 只 4 周龄雌性昆明小鼠,购自于湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 主要试剂

DNA/RNA 基因组提取试剂盒,购于 AXYGEN 公司;胰蛋白酶、DMEM 培养基和胎牛血清等,购于 Gbico 公司;ApexHF HS DNA 聚合酶预混液,购于艾克瑞生物有限公司;DL 3000 DNA marker、50 × TAE 溶液等,购于宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,购于 Omega 公司;MLV 反转录试剂,购于 Promega 公司;Random Primer 和 dNTP mix,均购于赛默飞世尔科技公司。

1.3 方法

1.3.1 病毒分离 将组织病料送至湖南农业大学动物医学院,取脑组织、肾脏和淋巴结样品剪碎后置于离心管内,加入适量灭菌 PBS 溶液和钢珠,匀浆后反复冻融 3 次,低温(4 ℃)高速(13 000 r/min)离心 5 min,获得上清,采用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。取 100 μL 滤液接种于单层的 PK15 细胞,2 h 后弃去病毒液,采用 PBS 溶液清洗后加入含 2% 血清 DMEM 培养液,37 ℃、5% CO₂ 培养箱中连续培养 3 d,期间观察细胞是否出现病变。

1.3.2 PCR/RT-PCR 鉴定、目的基因扩增及分析 当细胞出现明显病变后,收获细胞上清,采用 DNA/RNA 提取试剂盒提取基因组核酸,根据反转录步骤将基因组中 RNA 反转录为 cDNA。根据

GenBank 中 PRV 全基因序列设计并合成 4 对特异性引物,采用于 PRV 的分子鉴定和 *gE*、*gC*、*TK* 全基因扩增(表 1),同时参考猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒(PRRSV)的 *ORF5* 基因、猪圆环病毒 2 型(PCV-2)的 *ORF2* 基因和猪瘟病毒(CSFV)的 *NCR* 基因设计相应的特异性检测引物,引物均由擎科生物科技有限公司合成。

PCR 反应体系(25.0 μL):ApexHF HS DNA 聚合酶预混液 12.5 μL、DNA/cDNA 模板 2.0 μL、上下游引物各 0.5 μL 及灭菌双蒸水 9.5 μL;PCR 反应条件为:94 ℃ 1 min;98 ℃ 10 s,56 ~ 58 ℃ 15 s,72 ℃ 30 ~ 60 s,共 35 个循环;72 ℃ 7 min。PCR 反应结束后取 5.0 μL 产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,将阳性 PCR 产物送至擎科生物科技有限公司进行双向测序。

测序结果返回后,将序列拼接,同时在 GenBank 数据库中下载 PRV 参考毒株的对应序列,用 DNA star 5.0 软件分析本研究获得毒株的 *gE*、*gC* 和 *TK* 基因序列与参考序列的同源性;同时用 MEGA 6.0 软件中的邻接法构建 *gC* 基因序列的遗传进化树,其 Bootstrap 值设置为 1 000。

1.3.3 间接免疫荧光(IFA)鉴定 取适当稀释的病毒上清接种于单层 PK15 细胞,孵育 1 h 后弃上清,加入适量含 2% NBS 的 DMEM 培养基,在 5% CO₂、37 ℃培养 24 h 后进行间接免疫荧光试验。其具体步骤如下:(1)弃去培养基,采用 PBS 洗涤 3 次;(2)加入 4% 多聚甲醛溶液室温固定 15 min,PBS 洗涤 3 次;(3)含 0.1% Triton-100 PBS 溶液室温

表 1 本研究所用引物相关信息

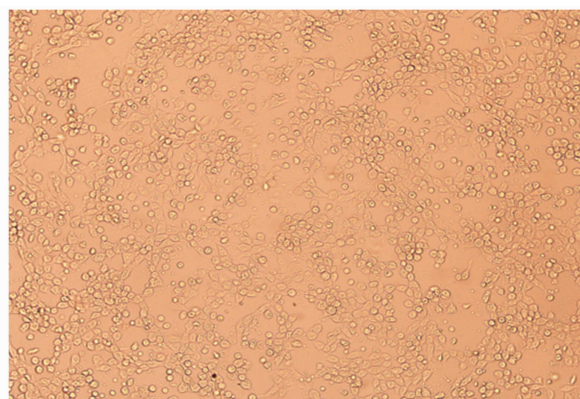
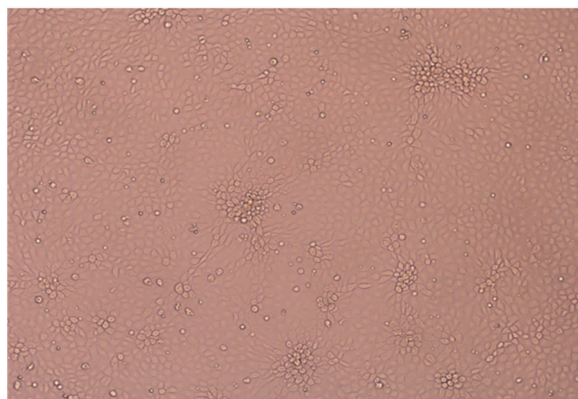
引物名称	引物序列(5'→3')	PCR 产物大小 (bp)	退火温度 (℃)	延伸时间 (s)	用途
PRV - gG - F	CGACTACGCCGACTACTACG	446	56	30	PRV 检测引物
PRV - gG - R	CGAAGATGTCAGAGGGCGAG				
PRV - gE - F	TTTGTGGGTGCGGTTTTATCTC	1 958	56	60	扩增 PRV <i>gE</i> 基因
PRV - gE - R	AGCAGTCCGAGTCGTCCTGG				
PRV - gC - F	CGCCACTAGCATTAATATCC	1 791	58	60	扩增 PRV <i>gC</i> 基因
PRV - gC - R	TCTCGCAGATGATGTCCC				
PRV - TK - F	TCGTAGAAGCGGTTGTGCC	1 134	58	45	扩增 PRV <i>TK</i> 基因
PRV - TK - R	GGCAAACCTTTATTGGGATGA				
PRRSV - ORF5 - F	GTGTCAGGCATTTGTGGCTGTG	850	56	30	PRRSV 检测引物
PRRSV - ORF5 - R	AAACTAGTCTAGAGACGACCCCATTG				
PCV2 - ORF2 - F	CCATATGAAATAAATTACTGAG	785	56	30	PCV2 检测引物
PCV2 - ORF2 - R	CAGCGCACTTCTTTTCGTTTTCAG				
CSFV - NCR - F	AACATGGATGGTGTAAGTGG	343	56	15	CSFV 检测引物
CSFV - NCR - R	TTCTCTATAGTGTTGGTCATTCC				

孵育 10 min, PBS 洗涤 3 次; (4) 含 3% BSA 的 PBS 溶液室温封闭 1 h; (5) 采用鼠源 PRV - gE 单克隆抗体 (1 : 1 000) 室温孵育 4 h, 其后 PBS 洗涤 5 次; (6) FITC 标记的驴抗鼠荧光二抗 (1 : 3 000) 室温孵育 45 min, PBS 洗涤 5 次; (7) 最后在荧光显微镜下观察结果并拍照保存。

1.3.4 病毒滴度测定 将该毒株纯化后连续扩增传 6 代, 取第 6 代病毒进行 10 倍稀释后分别接种于 PK15 单层细胞 (培养于 96 孔板), 每个稀释度作 8 个重复, 每个孔接种 100 μ L 病毒, 并设置阴性对照 (接种 100 μ L DMEM 培养基)。将 96 孔板置于细胞培养箱内 3 d, 其后观察各孔细胞病变情况, 并按照 Reed - Muench 法计算病毒的 TCID₅₀。

1.3.5 动物试验 将 12 只 4 周龄的雌性昆明小鼠随机分为 2 组, 每组 6 只小鼠, 设置为对照组和试验组。试验组小鼠分别接种 100 μ L 10⁵ TCID₅₀/0.1 mL 的病毒, 接种途径为腿部肌肉注射; 对照组小鼠分别于腿部肌肉注射 100 μ L DMEM 培养液。接种后每日观察小鼠临床症状及死亡情况, 72 h 后将各组存活小鼠处死, 取脑组织提取基因组后进行 PCR 检测。

2 结果与分析



左为正常 PK15 细胞; 右为 PRV 感染的细胞
图2 PRV 毒株接种 PK15 细胞病变观察(100 \times)

2.3 分离毒株 IFA 鉴定

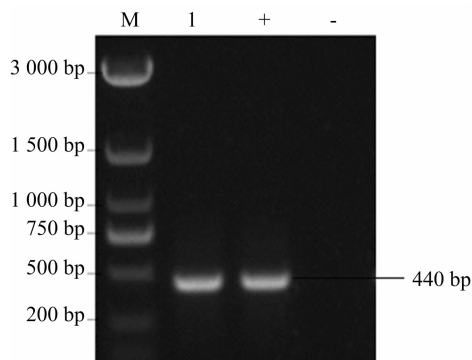
将分离的毒株接种于 PK15 细胞, 24 h 后进行 IFA 鉴定。由图 3 可知, 接种病毒的部分 PK15 细胞可见明显绿色荧光, 而对照组细胞未见绿色荧光。由于感染该病毒的细胞可被 PRV 单克隆抗体特异性识别, 因此本研究分离的毒株为 PRV (命名为 HuN - LD 株)。

2.4 PRV 目的基因扩增及分析

采用 DNA 提取试剂盒提取第 6 代 PRV 病毒基

2.1 PCR 检测结果

将组织病料处理后, 提取组织中病毒核酸, 通过 PCR/RT - PCR 对 PRV、PCV2、PRRSV 和 CSFV 特定基因进行检测, 由图 1 可知, 样品中仅检出 PRV gG 特异性核酸, 其 PCR 产物大小约为 440 bp, 但未检测出其他病原核酸 (图略)。



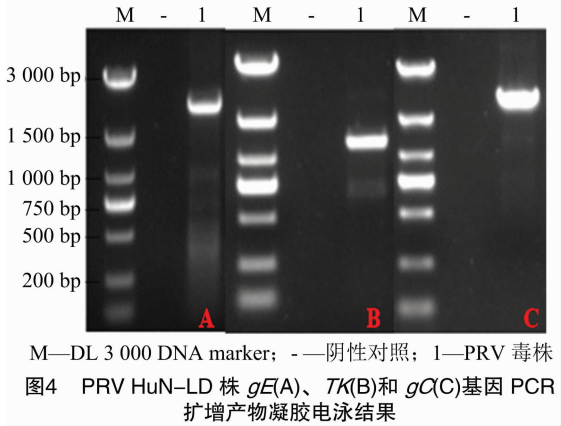
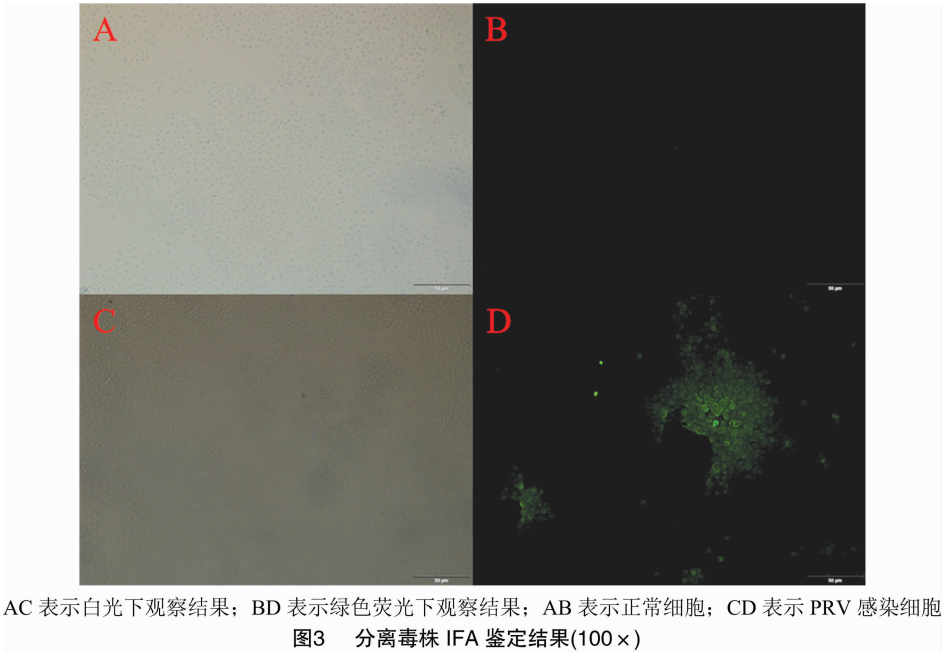
M—DL 3 000 DNA marker; 1—待检样品;
+—阳性对照; -—阴性对照
图1 PRV gG 基因检测结果

2.2 病毒分离结果

将组织处理后取上清接种于单层 PK15 细胞, 由图 2 可知, 24 h 后可见接毒后细胞出现明显病变, 主要表现为细胞变圆、融合和拉丝等, 而空白对照组细胞未出现细胞病变。

因组, 采用 PCR 法对该毒株的 gE、gC 和 TK 基因进行扩增。由凝胶电泳结果 (图 4) 可知, 该毒株的 gE、TK 和 gC 基因分别扩增约 1 900、1 200、1 800 bp 条带, 与预期片段大小一致。

基因核苷酸序列同源性分析结果表明, PRV HuN - LD 株 gE、TK 和 gC 基因与国内流行的 PRV 变异株 (如 JS - 2012 株、HeN1201 株、TJ 株和 JXCH 株等) 对应序列同源性分别为 99.4% ~ 99.9%、99.7% ~ 100.0% 和 99.8% ~ 100.0%, 与国内 2011



年前流行的毒株(Ea 株和 Fa 株)和国外流行毒株(Bartha 株、NIA3 株和 Becker 株等)同源性相对较低。

为进一步分析本研究获得的 PRV 毒株与其他参考毒株的遗传进化关系,基于 PRV *gC* 基因核苷酸序列构建系统种系发育树。由图 5 可知,所有 PRV 毒株在系统进化树上可分为 2 个基因型分支,分别为基因 1 型和 2 型,本研究获得毒株(HuN-LD 株)与国内流行的变异株(如 HN1201 株和 JS-2012 株)聚为同一分支,与国内流行的传统株(Ea 株和 Fa 株)相隔较近,均属于基因 2 型;而国外流行的毒株(如 Bartha 株和 Becker 株)属于基因 1 型,与本研究获得的毒株所属分支相隔较远。因此,本试验获得的毒株应属于 PRV 变异株。

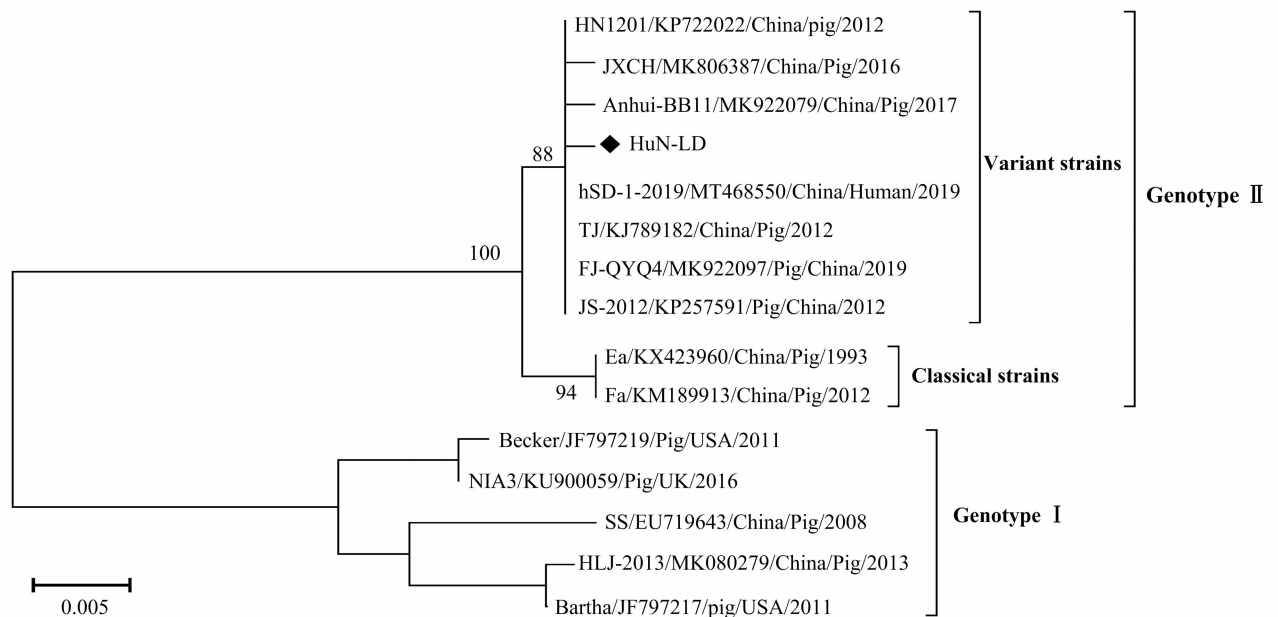
2.5 TCID₅₀测定与动物试验

将第 6 代病毒梯度稀释后接种于 96 孔板的

PK15 细胞,培养 72 h 后通过观察各稀释组出现细胞病变情况计算该病毒的 TCID₅₀ 值。结果显示,该病毒的滴度为 10^{7.5} TCID₅₀/mL。将该病毒稀释至 10^{6.0} TCID₅₀/mL,给试验组小鼠各接种 100 μL,接种 24 h 后临床观察可见试验组小鼠均出现呼吸急促、奇痒等症状,于 36 ~ 48 h 小鼠全部死亡,而对照组小鼠无异常表现。剖检各组小鼠,可发现接种病毒组小鼠脑组织充血或出血,其他脏器无明显病变,对照组小鼠各组织脏器均正常。进一步 PCR 验证结果也确定试验组小鼠脑组织存在 PRV 核酸,而对照组为 PRV 核酸阴性。

3 讨论

猪伪狂犬病是一种对养猪业威胁巨大的重要传染病之一,该病可导致仔猪出现腹泻、呕吐和神经症状等,伴随高发病率和死亡率;母猪和种公猪出现繁殖障碍,前者一般为流产、死胎等,而种公猪则表现睾丸炎和精液品质下降等,且精液中也可携带病毒,对其他健康待配种猪群造成威胁^[9-10]。当前,对于伪狂犬病的防控主要依赖于疫苗免疫接种和相应的鉴别诊断策略,近 30 年来国外使用基于 Bartha 株研发的基因缺失疫苗对伪狂犬病的防控取得了较好的效果,但 2011 年以来部分已接种传统疫苗的猪场仍然暴发伪狂犬病,且进一步测序结果表明这些毒株与传统毒株的抗原基因存在较大差异,这可能是导致传统疫苗对当前流行的 PRV 变异株防控效果不理想的主要原因^[11]。

图5 基于 *gC* 基因核苷酸序列构建 PRV 遗传进化树

本研究从湖南娄底某免疫 Bartha 株仍发病猪场分离获得 1 株病毒,通过 PCR 检测、IFA 检测和细胞病变情况可将其鉴定为 PRV 毒株 (HuN - LD 株);其后将该病毒人工感染昆明小鼠,可导致小鼠出现明显的临床症状和死亡,最终在死亡小鼠脑组织中也检测到了 PRV 核酸,其结果提示该毒株对小鼠具有较高的致病性,但对猪的致病性还需要进一步试验探究。

PRV 属于疱疹病毒科成员,其基因组较大(约 143 kb),可编码至少 72 种蛋白,其中部分编码蛋白与病毒毒力或免疫相关,其中 *gE*、*PK* 等基因主要病毒的毒力或致病性等相关,*gC* 糖蛋白可诱导细胞免疫,在病毒吸附、释放等过程发挥重要作用^[3,12]。由于 PRV 基因组庞大,这导致扩增其全基因组序列分析基因变异情况相对困难,所以研究人员一般通过分析这些与免疫及毒力相关基因序列信息来初步确定毒株基因组变异情况。本研究通过对 PRV HuN - LD 株的 *gE*、*TK* 和 *gC* 基因序列进行扩增与分析,发现与国内流行变异株相比,其核苷酸序列仅部分位点出现碱基替换或变异,提示当前变异株主要毒力或免疫基因在核苷酸或氨基酸水平上具有较高的保守性^[3]。

基于 *gC* 基因构建 PRV 系统进化树,分析本研究获得毒株与 GenBank 收录的国内外具有代表性 PRV 毒株的遗传进化关系。结果发现,本研究获得的毒株可与国内流行的变异株(如 JS - 2012 株和 HN1201 株)聚为同一分支,与国内流行的 PRV 传统株(如 Ea

株)和国外流行毒株(疫苗株)相距较远,提示本研究分离毒株属于 PRV 变异株。虽然,目前大部分猪场通过加强免疫接种疫苗(如 Bartha 或 HB - 98 疫苗)可有效防控 PRV 野毒感染,但目前我国 PRV 流行情况仍然不容客观,这可能主要与许多散养户未免疫接种 PRV 相关疫苗或养殖水平较低等有关^[12],但这也提示我们需要研发以 PRV 变异株为亲本的新型疫苗,这样可能对猪伪狂犬病的防控更为有效。

参考文献:

- [1] 傅宏庆,姚志兰,刘轶秋,等. 猪伪狂犬病毒 YZ 株的分离鉴定及遗传进化分析[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2020,41(5):36-41.
- [2] Tan L, Yao J, Yang Y D, et al. Current status and challenge of pseudorabies virus infection in China[J]. Virologica Sinica,2021,36(4):588-607.
- [3] 袁献宇,杨龙斌,何赞赞,等. 安徽省猪伪狂犬病毒的分离鉴定及其主要毒力基因分子特征[J]. 浙江农业学报,2020,32(1):43-56.
- [4] An T Q, Peng J M, Tian Z J, et al. Pseudorabies virus variant in bartha - K61 - vaccinated pigs, China, 2012 [J]. Emerging Infectious Diseases,2013,19(11):1749-1755.
- [5] 夏伟,牟迪,唐志芬,等. 2016 年 245 个规模猪场 7 种病毒类疾病病原流行病学调查与 2017 年防控建议[J]. 养猪,2017(2):89-92.
- [6] 刘珍. 猪伪狂犬病病毒变异株的分离鉴定及 *gE* 基因缺失株的构建[D]. 扬州:扬州大学,2017.
- [7] 吴开. 猪伪狂犬病病毒 TA - 2017 的分离鉴定及其主要囊膜糖蛋白遗传变异分析[D]. 泰安:山东农业大学,2018.
- [8] 王昌建,方铃,林源,等. 2018 年湖南省规模猪场伪狂犬病血清学调查[J]. 动物医学进展,2021,42(5):132-135.

徐振南,王建坤,胡益嘉,等. 基于 MobileNetV3 的马铃薯病害识别[J]. 江苏农业科学,2022,50(10):176-182.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.10.028

基于 MobileNetV3 的马铃薯病害识别

徐振南¹,王建坤¹,胡益嘉¹,张智聪¹,赵旭东¹,杨琳琳^{1,2},李文峰^{1,2}

(1. 云南农业大学机电工程学院,云南昆明 650201; 2. 云南省作物生产与智慧农业重点实验室,云南昆明 650201)

摘要:针对传统卷积神经网络在马铃薯叶部病害识别中结构复杂、参数庞大,难以实现在移动设备上的良好应用的问题,提出一种基于轻量级卷积神经网络和迁移学习的马铃薯叶部病害识别方法。首先,采集马铃薯叶部病害图像样本,再运用 GrabCut 算法进行图像分割;再基于 MobileNetV3 构建病害识别基础模型,并通过调整模型结构及宽度系数 α 等方式对模型进行优化,最后运用迁移学习的方式将预训练参数迁移至优化模型进行训练。结果表明,该方法对马铃薯健康、晚疫病、早疫病、炭疽病及其他病害叶部图像识别准确率为 98.00%,模型权重仅为 0.68 MB,识别速率为 0.014 s/幅。本研究结果可为马铃薯叶部病害识别在移动设备上应用的实现提供理论支持。

关键词:马铃薯;叶部病害;GrabCut;MobileNetV3;迁移学习;小样本

中图分类号: TP391.41 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2022)10-0176-07

马铃薯是我国四大粮食作物之一,目前,已知马铃薯病害有 100 余种,其中晚疫病和早疫病造成的危害最为严重,马铃薯早疫病发病严重时减产可达 30% 以上^[1],晚疫病则可造成高达 80%~100% 的减产^[2]。传统马铃薯病害识别通常为专家直接对患病部位进行观察,如晚疫病发病初期在叶尖或叶缘有水浸状绿褐色斑点^[3]。该方法具有较高的准确率,但效率较低,且受限于专家数量,难以实现有效推广。

由于计算机智能识别技术在对农业病害进行检测识别时,具有无损、快速的特点^[4],故被广泛应用于病害识别。赵建敏等用 8 层 CNN + softmax 分层卷积神经网络模型识别了简单背景单一病斑^[5];孙文杰等使用一种基于 VGGNet-BiLSTM 的算法实现了对桃树叶部病害图像的识别^[6];谢裕睿等通过

构造恒等残差块和卷积残差块来搭建 20 层的 ResNet 模型识别了 5 种常见烟草病害^[7]。上述研究在图像识别领域取得了良好效果,但其所采用的模型存在深度及参数过大等不足。目前,农业病害识别趋向于模型结构小型化、实用化,以期更好地实现其在移动端的应用。杨森等提出一种基于轻量卷积网络的马铃薯外部缺陷无损分级方法,识别准确率为 96.04%^[8]。刘洋等基于 MobileNet 与 InceptionV3 提出 2 种轻量级卷积神经网络作物病害分类模型^[9]。以上研究表明,轻量级卷积神经网络模型在减少网络参数数量的同时,可保证较高的识别准确率,适用于移动端。

本研究提出一种基于 MobileNetV3 优化和迁移学习方法的马铃薯叶部病害图像识别方法,并从训练、测试准确率及损失函数、模型权重和识别速率等方面对模型进行评估,为开发移动端的马铃薯害智能识别系统提供模型构建技术支持。

1 图像数据集及预处理

1.1 试验数据

图像数据采集点为云南省昭通市,为体现样本

收稿日期:2021-08-17

基金项目:国家自然科学基金(编号:31860331);云南省科技厅重大专项(编号:2018ZJ001);云南省智慧农业重点实验室基金。

作者简介:徐振南(1997—),男,浙江金华人,硕士研究生,研究方向为智能检测及自动控制。E-mail:872137530@qq.com。

通信作者:杨琳琳,博士,副教授,研究方向为智能检测及自动控制。E-mail:29545343@qq.com。

[9] Szpara M L, Tafuri Y R, Parsons L, et al. A wide extent of inter-strain diversity in virulent and vaccine strains of alphaherpesviruses[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(10): e1002282.

[10] 杨永能. 种公猪精液携带 6 种繁殖障碍性病原状况调查[J]. 中国猪业, 2019, 14(5): 75-78.

[11] Ye C, Zhang Q Z, Tian Z J, et al. Genomic characterization of

emergent pseudorabies virus in China reveals marked sequence divergence: Evidence for the existence of two major genotypes[J]. Virology, 2015, 483: 32-43.

[12] 杨涛涛, 赵 墩, 刘崇灵, 等. 湖南省 4 株伪狂犬病病毒的分离鉴定及其免疫与毒力相关基因的序列分析[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(1): 50-57.