

## 研究报告

## 鸽新城疫病毒 BJ-C 分离株基因组测序及系统发育分析

韩坤<sup>1,2,3</sup>, 梁琳<sup>1,2</sup>, 李复煌<sup>4</sup>, 梁瑞英<sup>1,2</sup>, 汤新明<sup>\*1,2</sup>, 丁家波<sup>\*1,2</sup>

1 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

2 农业农村部动物生物安全风险预警及防控重点实验室(北方), 北京 100193

3 西北农林科技大学动物医学院, 陕西 杨凌 712199

4 北京市畜牧总站, 北京 100101

韩坤, 梁琳, 李复煌, 梁瑞英, 汤新明, 丁家波. 鸽新城疫病毒 BJ-C 分离株基因组测序及系统发育分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5034-5044

Han Kun, Liang Lin, Li Fuhuang, Liang Ruiying, Tang Xinming, Ding Jiabo. Genome sequencing and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus BJ-C strain in pigeons[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5034-5044

**摘要:**【背景】鸽新城疫是由鸽I型副黏病毒(pigeon paramyxovirus type I, PPMV-1)感染引起的危害最严重的疫病之一, 至今尚无有效的防控制剂。【目的】分析鸽新城疫病毒 BJ-C 株的基因组信息及系统发育关系, 为鸽新城疫的防控提供科学依据。【方法】设计首尾重叠的 6 对特异性引物, 利用分段扩增的方法, 以鸽新城疫病毒 BJ-C 株基因组 cDNA 为模板, 分别扩增、测序后进行全基因组序列拼接。以 NCBI 数据库中发布的新城疫病毒序列为参考, 针对鸽新城疫病毒 BJ-C 株的基因组、F 基因建立系统发育树。【结果】鸽新城疫病毒 BJ-C 株的基因组全长为 15 192 nt。基于全基因组的系统发育分析发现其与 PPMV-1/BJ-01/CH 株的系统发育关系最近, 核苷酸相似性为 99.96%, 氨基酸相似性高达 100%, 属于同一个分支, 而与 LaSota 疫苗株等其他新城疫毒株的亲缘关系相对较远。基于 F 基因序列的系统发育树分析发现 BJ-C 株 F 基因与我国的 BJP2013 株同属一个分支。Class II 类 VI 亚型 F 基因高变区序列(47–420 nt)比对结果显示, 安徽株 Pigeon/Anhui/2369/2012、广东株 Pigeon/Guangdong/GZ288/2013、北京株 BJP13、浙江株 Pigeon/Zhejiang/2036/2012 及比利时株 PPMV-1/Belgium/11-09620/2011 等与 BJ-C 毒株处于同一个分支, 同属 VIb 亚型。【结论】本研究获得了鸽新城疫病毒 BJ-C 株全基因组序列, 分析了其系统发育关系, 确定其属于 Class II 类 VIb 型, 为后续防控产品的开发提供了理论依据。

**关键词:** 鸽新城疫病毒; 全基因组测序; F 基因; 系统发育分析

基金项目: 中国农业科学院创新工程计划(ASTIP-IAS15)

Supported by: Agricultural Science and Technology Innovation Program (ASTIP-IAS15)

\*Corresponding authors: E-mail: TANG Xinming: tangxinming@caas.cn; DING Jiabo: dingjiabo@caas.cn

Received: 2022-07-12; Accepted: 2022-09-02; Published online: 2022-10-11

# Genome sequencing and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus BJ-C strain in pigeons

HAN Kun<sup>1,2,3</sup>, LIANG Lin<sup>1,2</sup>, LI Fuhuang<sup>4</sup>, LIANG Ruiying<sup>1,2</sup>, TANG Xinming<sup>\*1,2</sup>, DING Jiabo<sup>\*1,2</sup>

1 Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

2 Key Laboratory of Animal Biosafety Risk Warning and Prevention and Control (North), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100193, China

3 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling 712199, Shaanxi, China

4 Beijing Municipal Animal Husbandry General Station, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Background] Pigeon Newcastle disease (ND), caused by pigeon paramyxovirus type I (PPMV-1), is a severe infectious disease. However, there is no effective method to control this disease. [Objective] To elucidate the phylogenetic analysis of BJ-C and provide a scientific basis for the prevention and control of pigeon ND. [Methods] Six pairs of specific primers overlapped at the beginning and ending were designed. The genomic cDNA sequence of BJ-C strain was used as the template for amplification and sequencing. The phylogenetic tree of BJ-C strain was established by sequence alignment with the published PPMV-1 and NDV strains on the NCBI website. [Results] The genome length of BJ-C strain was 15 192 nt. BJ-C strain had the closest genetic relationship with PPMV-1/BJ-01/CH strain based on the whole genome analysis, with nucleotide similarity of 99.96% and amino acid similarity of 100%. BJ-C strain shared the same branch with PPMV-1/BJ-01/CH strain, whereas it was far from other ND virus strains such as the LaSota vaccine strain. The phylogenetic tree built based on F gene showed that BJ-C strain was in the same branch with BJP2013 strain isolated in China. The sequence alignment of the hypervariable region (47–420 nt) of F gene showed that the VIb subtype strains including Pigeon/Anhui/2369/2012, Pigeon/Guangdong/GZ288/2013, BJP13, Pigeon/Zhejiang/2036/2012, PPMV-1/Belgium/11-09620/2011, and BJ-C were in the same clade. [Conclusion] The full-length genome sequence of BJ-C strain was obtained and the strain was grouped to the class II VIb type based on phylogenetic analysis. Our results are of theoretical significance for the development of pigeon ND vaccines and other prevention and control methods.

**Keywords:** Newcastle disease virus of pigeon; full-length genome sequencing; fusion gene; phylogenetic analysis

新城疫(Newcastle disease, ND)是由新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)引起的一种禽类传染病。NDV 属于副黏病毒科(Paramyxoviridae)副黏病毒亚科(Paramyxivirinae)正黏病毒属(Avulavirus)的禽正黏病毒I型。NDV 感染宿主范围广泛, 多数家禽及野生水禽等均可感染 NDV<sup>[1-2]</sup>, 可被自然或人工感染的鸟类多达

250 余种<sup>[3]</sup>。鸽新城疫是由鸽I型副黏病毒(pigeon paramyxovirus I, PPMV-1)引起的一种发病症状类似于鸡新城疫的传染病。因 PPMV-1 属于 NDV 的变种, 而且其引起鸽子的发病症状与鸡 ND 神经型相似, 因此称为鸽新城疫。Liu 等<sup>[4]</sup>对 1996–2005 年间分离自我国的 14 株鸽 NDV 进行基因分型, 发现有 10 株属于基因VIb

型, 有 3 株 VIIId 型及 1 株基因 II 型。此外, 还有 VIj、VIk 等亚型的报道, 收录于 GenBank 中的 VIk 型的 NDV 序列多达 28 株<sup>[5]</sup>。2018 年, 有研究人员分别从英国和美国的肺炎患者体内分离出了 PPMV-1<sup>[6]</sup>。鸽子在飞翔过程中极有可能传播 NDV, 其被认为是 NDV 感染家禽的潜在传播媒介<sup>[7]</sup>。由于目前缺少专门针对鸽 NDV 的疫苗, 鸽 ND 给相关养殖业带来严重的经济损失。鸽 NDV 既可以感染鸽, 也可以感染人, 具有重要的公共卫生意义, 对该病毒感染引起的疫病应高度重视。因此, 有必要对鸽 NDV 的系统发育关系进行分析, 这也对防治禽类 ND 意义重大。在全基因组测序的基础上, 可通过构建鸽 NDV 感染性克隆平台实现对鸽 NDV 基因组的改造, 有助于鸽 NDV 致病机理和疫苗载体的研究。

本研究通过对实验室保存的鸽 NDV BJ-C 株进行全基因组测序, 以期了解 BJ-C 株的全基因组序列特征和系统发育关系, 为鸽 NDV 感染性克隆平台的建立提供数据, 为后期鸽 NDV 致

病机制的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 病毒与主要试剂、仪器

鸽新城疫病毒 BJ-C 株分离自北京某肉鸽养殖场。病毒 RNA 提取试剂盒, 北京艾德莱生物科技有限公司; 反转录试剂盒 FastKing RT Kit, 天根生化科技(北京)有限公司; 高保真酶 PrimeSTAR Max, 大连宝日医生物技术有限公司; pEASY-Blunt Cloning Kit 和感受态细胞 Trans-T1, 北京全式金生物技术有限公司。台式高速离心机, 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 全自动凝胶成像仪, 北京赛智科技有限公司; 超微量核酸分析仪, 杭州奥盛仪器有限公司。

#### 1.1.2 引物

根据 GenBank 中已经公布的鸽新城疫病毒的全基因组序列(登录号为 MH807446.1)比对分析后, 设计了 6 对特异性引物对 F1-F/R-F6-F/R (表 1), 引物由北京擎科新业生物技术公司合成。

表 1 扩增 BJ-C 株全基因序列的引物

Table 1 Primers for amplification of complete genome of BJ-C

名称 Name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	基因位置 Position	片段大小 Length (bp)	退火温度 Temperature (°C)
F1-F	ACCAAACAGAGAATCYGTGAGYTA	1-24	2 102	55
F1-R	GTCCTGTTGATTGGAGGTGTCTTGG	2 078-2 102		
F2-F	GTGAACTAGGGTGAACATGGCAACT	1 877-1 901	2 255	59
F2-R	AGCACAGAAGGTCCGAGTACATCA	4 278-4 301		
F3-F	GACCCGAAGAGCCCGCTAGTAA	3 938-3 969	3 124	59
F3-R	GCAGATGTCCGAAGCACACCAA	7 040-7 061		
F4-F	GGCTGCACTCGGATACCCTCAT	6 928-6 949	3 072	59
F4-R	ACCGCCACACTGTCGTCTCTT	9 978-9 999		
F5-F	AGACAAGGCAATCGCACATCCG	9 793-9 814	3 265	56
F5-R	GACCACACGTCGAGTGCAAGAG	13 036-13 057		
F6-F	ATATTGCAGCTACAATTTCTCACCC	12 909-12 933	2 284	53
F6-R	ACCAAACAAAGATTTGGTGAACGAT	15 168-15 192		

## 1.2 方法

### 1.2.1 RNA 的提取

将 BJ-C 株接种 9-11 日龄鸡胚, 回收尿囊液。根据 RNA 试剂盒的说明书提取回收尿囊液的 RNA。取 200  $\mu$ L 尿囊液到 1.5 mL 离心管中, 加入 400  $\mu$ L 裂解液 RLB, 充分裂解, 加入 450  $\mu$ L 乙醇吹打混匀。将上述混合液加入吸附柱 RA 中, 13 000 r/min 离心 1 min, 弃溶液; 再加入 500  $\mu$ L 去蛋白液 RE, 12 000 r/min 离心 30 s, 弃溶液; 加入 500  $\mu$ L 漂洗液 RW, 12 000 r/min 离心 30 s, 弃溶液; 13 000 r/min 空离 2 min; 将吸附柱放入 1 个新的无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中, 加入 20  $\mu$ L Rnase free water 到膜上, 12 000 r/min 离心 1 min, 将提取的 RNA 保存于  $-80^{\circ}\text{C}$  备用。

### 1.2.2 RT-PCR 反应

将提取的 RNA 反转录成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: PrimeSTAR Max 25  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, 无菌水 21  $\mu$ L。PCR 反应条件:  $95^{\circ}\text{C}$  3 min;  $95^{\circ}\text{C}$  20 s,  $53-60^{\circ}\text{C}$  30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  90 s, 循环 30 次;  $72^{\circ}\text{C}$  7 min。PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定片段大小正确后进行胶回收。

### 1.2.3 全基因组克隆和序列测定

分别将 6 个片段连接到 pEASY-Blunt 载体上, 将连接产物转化到大肠杆菌 Trans-T1 感受态细胞中,  $37^{\circ}\text{C}$  培养过夜, 挑单克隆至氨苄(100  $\mu$ g/mL) 抗性的 LB 培养基,  $37^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 12 h 左右进行菌液 PCR 鉴定, 鉴定正确的样品送至北京擎科新业生物技术公司测序, 每个片段至少测 3 个重复。

### 1.2.4 序列分析

利用 DNASTar 软件对 6 个片段序列进行拼接, 再利用 MegAlign 将拼接好的全序列与

GenBank 的 NDV 代表株基因组全序列进行系统发育分析, 并利用 MEGA 6.0 软件对 BJ-C 株 F 基因与 GenBank 中其他已知 NDV 毒株的 F 基因进行亲缘关系分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 RT-PCR 结果

用高保真酶 PCR 扩增目的基因, 获得 6 条大小不同的目的片段(图 1)。6 条目的片段长度为 2 000-4 000 bp (表 1), 与预期相符。

### 2.2 鸽 NDV BJ-C 株全基因组序列测定和拼接

将 RT-PCR 获得的 6 个片段进行克隆与测序, 获得了鸽 NDV BJ-C 株的全基因组序列。BJ-C 株基因组全长为 15 192 nt, 与 GenBank 上登录的鸽 NDV 基因组大小一致, 3'端前导序列和 5'端尾随序列分别由 55 和 114 个核苷酸组

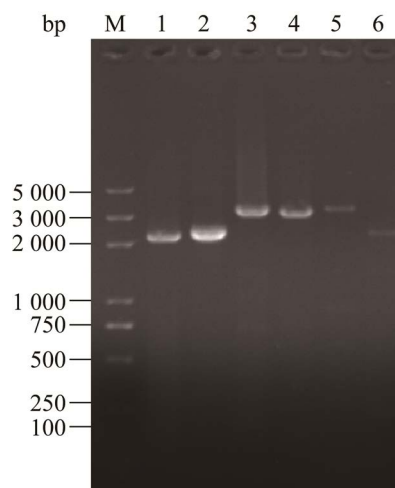


图 1 鸽 NDV BJ-C 株全基因分段 RT-PCR 扩增产物电泳图 M: Trans2K Plus DNA Marker; 1-6: F1-F6 目的片段

Figure 1 Electrophoretic diagram segmentation RT-PCR of complete genome of BJ-C strain of amplified products. M: Trans2K Plus DNA Marker; 1-6: Purpose fragment of F1-F6.

成, 其中 NP、P、M、F、HN 和 L 蛋白的 ORF 基因大小分别为 1 470、1 188、1 095、1 662、1 716 和 6 615 nt (图 2)。BJ-C 株基因间隔序列与大多数鸽 NDV 相同, NP-P、P-M 和 M-F 基因间隔均为 1 个碱基; HN 和 L 基因之间间隔 47 个碱基(表 2)。

### 2.3 鸽 NDV BJ-C 株基因组序列与其他 NDV 株系统发育分析

基于分离毒株全基因组与 26 株参考株制作系统发育树, 如图 3 所示, PPMV-1/BJ-01/CH 株与 BJ-C 分离株亲缘关系最密切, 同属一个进化分支。核苷酸相似性为 99.96%, 氨基酸相似性高达 100%; 而 BJ-C 分离株与 Class I 参考毒株 JX07、LaSota 疫苗株(核苷酸相似性为 83.27%, 氨基酸相似性仅为 61.77%)等亲缘关系均较远。

### 2.4 BJ-C 株 F 基因片段系统发育分析

将 BJ-C 株各基因序列进行在线 BLAST 比对, 发现 BJ-C 株的 6 个结构基因均与 PPMV-1/BJ-01/CH 毒株对应基因的相似性最高。NDV 的 F 蛋白由 553 个氨基酸组成, 相对分子量为 59.6 kDa, 主要负责病毒囊膜与宿主细胞膜之间的融合。F 蛋白裂解位点氨基酸基序是决定 F 蛋白裂解能力的关键, 也是决定 NDV 毒力的关键因子。基于 BJ-C 毒株 F 基因完整编码序列绘制了包含部分 Class I 毒株和部分 Class II 不同基因亚型 NDV 的系统发育树(图 4)。结果显示, BJ-C 株与国内的 2013 年北京分离株 BJP13 亲缘关系密切, 核苷酸相似性为 98.38%, 氨基酸相似性为 98.73%, 处于同一分支, 同属 VIb 型, 而与 LaSota 疫苗株等其他基因型 NDV 和 Class I

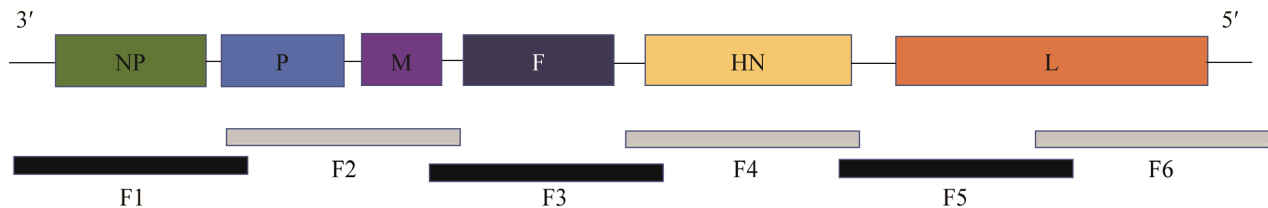


图 2 BJ-C 基因组结构模式图及其全长分段策略 NP、P、M、F、HN 和 L 分别代表 NDV 的 6 个结构蛋白

Figure 2 The structure pattern diagram and strategy of complete genome segmentation of BJ-C. NP, P, M, F, HN and L represent the six structural proteins of NDV respectively.

表 2 BJ-C 株基因组编码的氨基酸、各基因起始、终止序列及基因间隔

Table 2 Coding amino acid, sequences of gene start, gene end and intergenic region of BJ-C genome

Gene	ORF position	Coding amino acid number	Gene start	Gene end	Intergenic region
NP	122-1 591	489	ACGGGTAGAA	TTAGAAAAAAA	T
P	1 893-3 080	395	ACGGGTAGAA	TTAAGAAAAAAA	T
M	3 296-4 390	364	ACGGGTAGAA	TTAGAAAAAAA	C
F	4 550-6 211	553	ACGGGTAGAA	TTAAGAAAAAAA	CTACTGGATATAAGCAACCGAAAAG CAATAC
HN	6 418-8 133	571	ACGGGTAGAA	TTAAGAAAAAAA	TATGGATGGTAGTGAAATACAAGGG AAAACAACATACAAAGGCCAAC
L	8 387-15 001	2 204	ACGGGTAGGA	TTAGAAAAAAA	

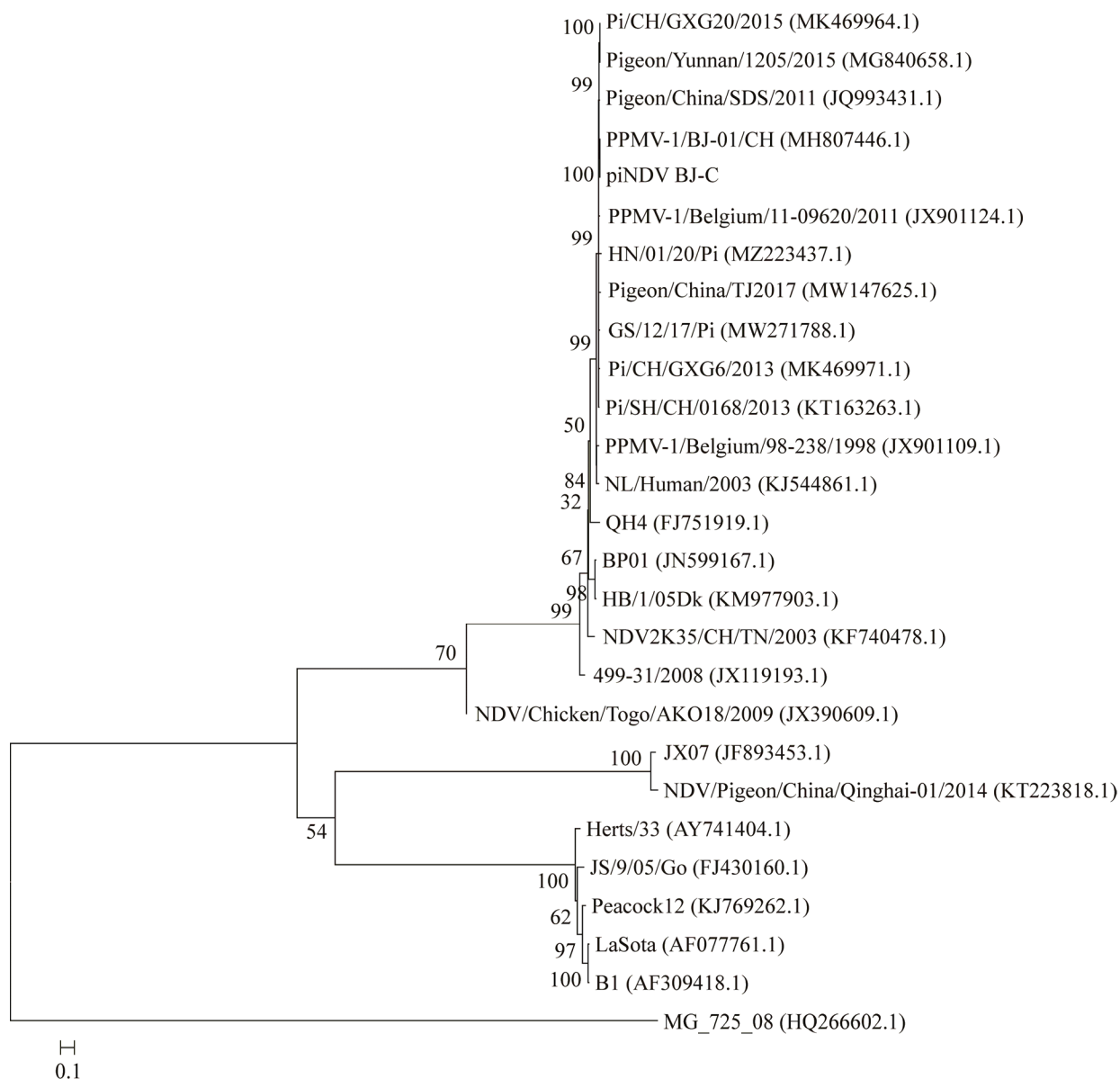


图 3 新城疫病毒全基因组系统发育树 GenBank 登录号列于 NDV 毒株名称之后

Figure 3 Phylogenetic tree of complete genome of NDV. GenBank accession number were listed after the names of NDV.

的 NDV 亲缘关系较远。根据 F 基因编码序列高变区域(47-420 nt)绘制了基于基因VI型 NDV 的发育树(图 5), 结果显示, 归类于基因VIb 亚型的我国安徽株 Pigeon/Anhui/2369/2012、广东株 Pigeon/Guangdong/GZ288/2013、北京株 BJP13 及比利时株 PPMV-1/Belgium/11-08304/2011 等

与 BJ-C 毒株处于同一个分支, 亲缘关系最近, 而其他基因VI亚型的 NDV 毒株亲缘关系较远。系统发育分析结果表明, BJ-C 株属于 Class II 基因VIb 亚型 NDV 毒株, BJ-C 株与 Class I 类毒株、基因VII型毒株及 LaSota 疫苗株系统发育关系较远。

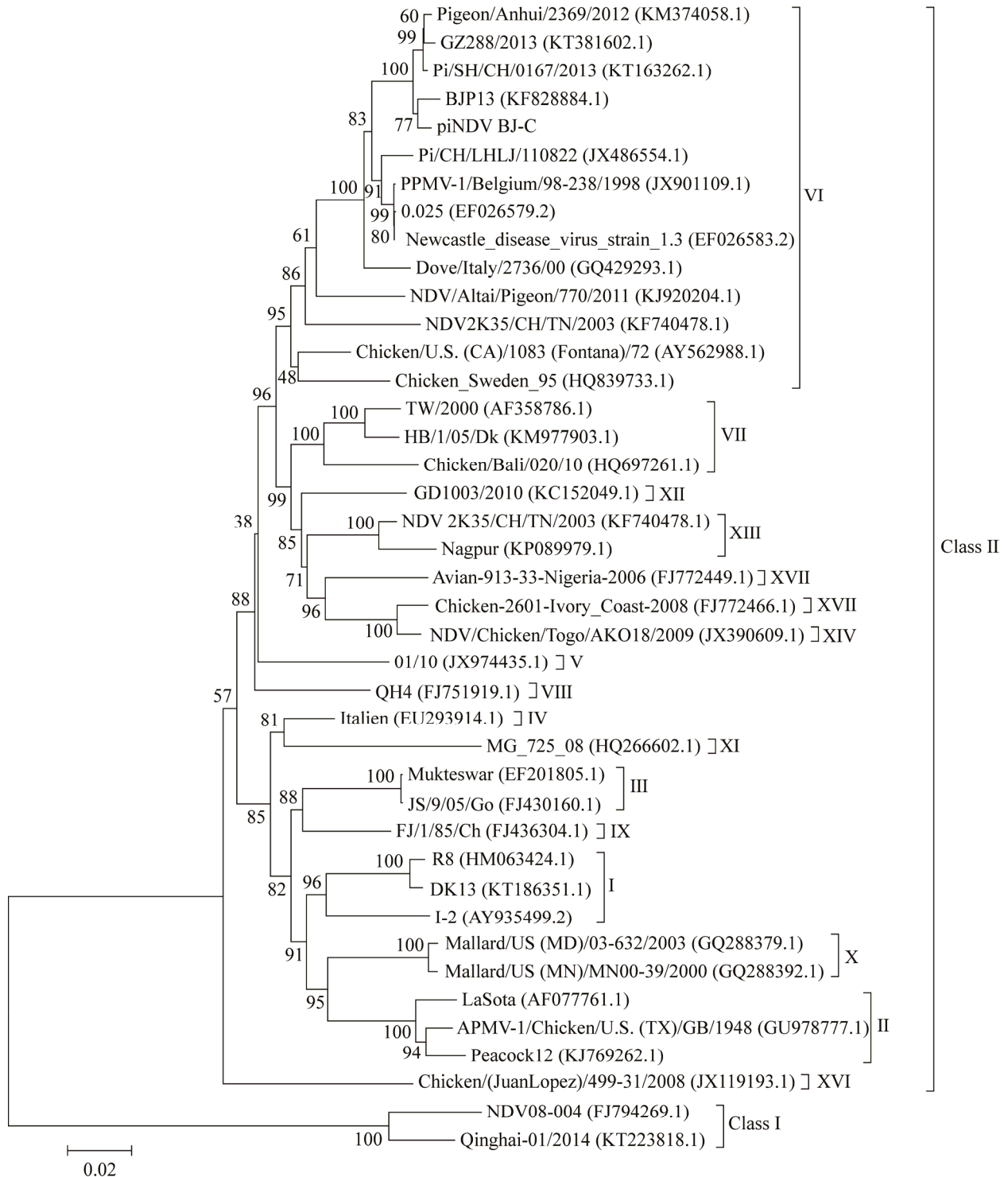


图 4 基于新城疫病毒 F 基因的系统发育树 GenBank 登录号列于 NDV 毒株名称之后；标尺刻度代表序列差异

Figure 4 Phylogenetic tree of NDV based on F gene sequence. GenBank accession number were listed after the names of NDV; The scale bar means sequence difference.

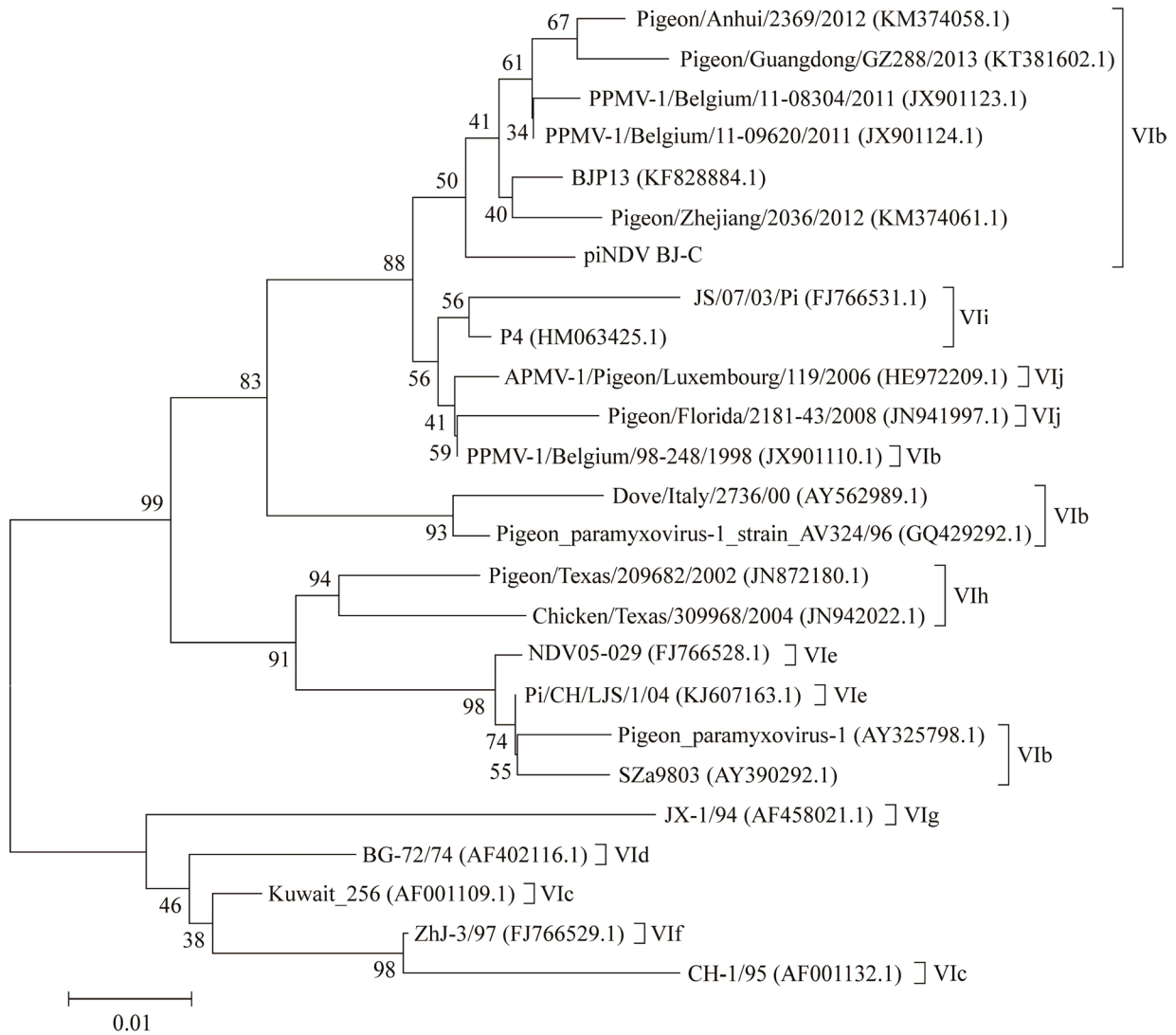


图 5 基于新城疫病毒 Class II 基因 VI 亚型 F 基因高变区(47–420 nt)的系统发育树 GenBank 登录号列于 NDV 毒株名称之后; 罗马数字: NDV 基因型

Figure 5 Phylogenetic tree of NDV based on a variable sequence (47–420 nt) of the F gene of the sub-genotype NDV strains in Class II. GenBank accession number were listed after the names of NDV; Roman numerals: NDV genotype.

### 3 讨论与结论

近年来, 随着养鸽业的不断发展壮大, 鸽 ND 发病趋势也呈现上升状态, 危害日趋严重。已经有研究人员从人体内分离出鸽 NDV<sup>[6]</sup>。本研究对分离的鸽 NDV BJ-C 株进行测序分析发现, 其基因组全长为 15 192 nt, 遵循“六碱基原

则”, 与已报道的鸽 NDV 的基因组长度一致, 结构基因顺序为 3'-NP-P-M-F-HN-L-5', 符合 NDV 的全基因组特征<sup>[8]</sup>。NDV 各基因非编码区的基因起始(gene start, GS)、基因终止(gene end, GE)和结构基因间隔序列(intergenic sequence, IGS)已被证明能够影响其毒力<sup>[9]</sup>。本研究的 BJ-C 株 F 基因的 GE 序列为 TTAAGAAAAA,



这与基因IV型毒株 Herts/33、基因VI型毒株 pi/CH/LGD/110208 等的 GE 序列相同<sup>[10]</sup>。当 NDV 入侵细胞时,其 F 蛋白在 116 和 117 位氨基酸之间被裂解,形成 F1 和 F2 两段蛋白<sup>[11]</sup>。多项研究已证实 F 蛋白与 NDV 毒力有着直接关联,而 F 蛋白能否被宿主细胞裂解常取决于裂解位点处碱性氨基酸的数目,弱毒裂解位点碱性氨基酸数量较少<sup>[12]</sup>。NDV 强毒株的裂解位点通常是<sup>112</sup>R/K-R-Q-K/R-R-F<sup>117</sup><sup>[13-14]</sup>,而弱毒<sup>112</sup>G/E-K/R-Q-G/E-R-L<sup>117</sup>比较常见。由于 NDV 弱毒 F 蛋白裂解位点的碱性氨基酸多被中性氨基酸替代,F 蛋白无法裂解,导致其融合活性丧失,从而使病毒感染性降低或消失。本研究中, BJ-C 株的 F 蛋白裂解位点为<sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>,符合强毒株标准,但之前的研究表明,PPMV-1 的 F 蛋白裂解位点氨基酸组成不能够作为判定其毒力的唯一标准<sup>[15-16]</sup>,因此,关于该毒株的毒力还需开展相关实验进一步验证。有研究者在 2014–2021 年间搜集了我国多个地区活禽市场的鸽拭子,分离到 76 株鸽 NDV,并对其中 18 株进行全基因组序列分析,发现所有分离株 F 蛋白均含有<sup>112</sup>R-R-Q-K-R-F<sup>117</sup>裂解位点,而且这 18 株代表株均属于VIb 亚型<sup>[17]</sup>。这与本研究的 BJ-C 株同属于一个亚型。最近有研究者从伊朗地区的鸽群里分离出了 XXI.2 型鸽 NDV<sup>[18]</sup>。因此,不应该忽视鸽 NDV 的遗传变异,有必要对鸽 NDV 的系统发育关系进行定期监测。

截至目前,研究者至少发现了VIa–VIk 11 个亚型的 NDV 毒株<sup>[5]</sup>。NDV 分型对其进化及流行趋势的研究至关重要,最初研究者通过对 NDV F 蛋白的限制性酶切位点来区分 NDV 毒株的种类<sup>[19-20]</sup>。目前多用基因分析的方法对鸽 NDV 进行分型。对 NDV 分型的方法通常是基于 F 基因的 CDS 区<sup>[21]</sup>或通过比对其 F 基因高变

区(42–470 nt)进行系统发育分析<sup>[2]</sup>。BJ-C 分离株全基因组系统发育分析发现,该分离株仅与 Belgium/98-238/1998 分离株同属一个进化分支,属于VI亚型,而同其他新城疫毒株的亲缘关系相对较远。BJ-C 株 F 基因与国内外毒株进行系统发育分析发现,该分离株与我国北京株 BJP13 株的系统发育关系较近,与 LaSota 疫苗株等其他国内外参考毒株系统发育关系较远。同时, BJ-C 分离株 F 基因高变区序列系统发育分析结果发现,该分离株与我国安徽株 Pigeon/Anhui/2369/2012、广东株 GZ288/2013、北京株 BJP13、浙江株 Pigeon/Zhejiang/2036/2012 及比利时株 Belgium/11-08304/2011 等属于同一个分支,属于VIb 亚型。这与王林等<sup>[22]</sup>分离自北京地区赛鸽源的VIb 亚型鸽 NDV 一致。2013 年, Awu 等<sup>[23]</sup>从北京地区的发病鸽子体内分离出 1 株VIb 型鸽 NDV。裴育等<sup>[24]</sup>对分离自我国北京、天津及山东地区的 4 株鸽 NDV 全基因组测序比对发现,这 4 株鸽 NDV 均属于VIb 亚型。上述研究中的鸽 NDV 分离株都与本研究中的鸽 NDV 同属一个亚型,说明北京地区的鸽 NDV 很可能都来源于基因VI型的病毒。鸽群感染 NDV 后通常呈现流行性暴发,死亡率可达到 100%<sup>[12,25]</sup>。从本研究 BJ-C 株的系统发育关系结果可以看出, BJ-C 株与现有疫苗株 LaSota 进化关系较远,推测鸡 ND 疫苗可能对鸽子不能形成足够的免疫保护作用,亟待开发一种专门针对鸽 NDV 的疫苗来控制鸽新城疫。

## REFERENCES

- [1] Garcia SC, Lopez RN, Morales R, Olvera MA, Marquez MA, Merino R, Miller PJ, Afonso CL. Molecular epidemiology of Newcastle disease in Mexico and the potential spillover of viruses from poultry into wild bird species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(16): 4985-4992

- [2] Diel DG, Da Silva LHA, Liu HL, Wang ZL, Miller PJ, Afonso CL. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2012, 12(8): 1770-1779
- [3] Aldous EW, Alexander DJ. Detection and differentiation of Newcastle disease virus (avian paramyxovirus type 1)[J]. *Avian Pathology*, 2001, 30(2): 117-128
- [4] Liu HL, Wang ZL, Song CP, Wang YK, Yu B, Zheng DX, Sun CY, Wu YG. Characterization of pigeon-origin Newcastle disease virus isolated in China[J]. *Avian Diseases*, 2006, 50(4): 636-640
- [5] Xue C, Xu XH, Yin RF, Qian J, Sun YX, Wang CF, Ding C, Yu SQ, Hu SL, Liu XF, et al. Identification and pathotypical analysis of a novel Vlk sub-genotype Newcastle disease virus obtained from pigeon in China[J]. *Virus Research*, 2017, 238: 1-7
- [6] Kuiken T, Breitbart M, Beer M, Grund C, Höper D, Van Den Hoogen B, Kerkhoffs JH, Kroes ACM, Rosario K, Van Run P, et al. Zoonotic infection with pigeon paramyxovirus type 1 linked to fatal pneumonia[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2018, 218(7): 1037-1044
- [7] Wang XL, Ren SH, Wang XW, Wang CY, Fan MF, Jia YQ, Gao XL, Liu H, Xiao S, Yang ZQ. Genomic characterization of a wild-bird-origin pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV-1) first isolated in the northwest region of China[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(3): 749-761
- [8] Sabra M, Dimitrov KM, Goraichuk IV, Wajid A, Sharma P, Williams-Coplin D, Basharat A, Rehmani SF, Muzyka DV, Miller PJ, et al. Phylogenetic assessment reveals continuous evolution and circulation of pigeon-derived virulent avian avulaviruses 1 in Eastern Europe, Asia, and Africa[J]. *BMC Veterinary Research*, 2017, 13(1): 291
- [9] Yan YQ, Rout SN, Kim SH, Samal SK. Role of untranslated regions of the hemagglutinin-neuraminidase gene in replication and pathogenicity of Newcastle disease virus[J]. *Journal of Virology*, 2009, 83(11): 5943-5946
- [10] Guo HB, Liu XL, Han ZX, Shao YH, Chen JD, Zhao SS, Kong XG, Liu SW. Phylogenetic analysis and comparison of eight strains of pigeon paramyxovirus type 1 (PPMV-1) isolated in China between 2010 and 2012[J]. *Archives of Virology*, 2013, 158(6): 1121-1131
- [11] Swanson K, Wen XL, Leser GP, Paterson RG, Lamb RA, Jardetzky TS. Structure of the Newcastle disease virus F protein in the post-fusion conformation[J]. *Virology*, 2010, 402(2): 372-379
- [12] Panda A, Huang ZH, Elankumaran S, Rockemann DD, Samal SK. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2004, 36(1): 1-10
- [13] Ji YH, Liu T, Jia YE, Liu B, Yu QZ, Cui XL, Guo FF, Chang HY, Zhu QY. Two single mutations in the fusion protein of Newcastle disease virus confer hemagglutinin-neuraminidase independent fusion promotion and attenuate the pathogenicity in chickens[J]. *Virology*, 2017, 509: 146-151
- [14] Orabi A, Hussein A, Saleh AA, El-Magd MA, Munir M. Evolutionary insights into the fusion protein of Newcastle disease virus isolated from vaccinated chickens in 2016 in Egypt[J]. *Archives of Virology*, 2017, 162(10): 3069-3079
- [15] Guo HB, Liu XL, Xu Y, Han ZX, Shao YH, Kong XG, Liu SW. A comparative study of pigeons and chickens experimentally infected with PPMV-1 to determine antigenic relationships between PPMV-1 and NDV strains[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 168(1): 88-97
- [16] Heiden S, Grund C, Röder A, Granzow H, Kühnel D, Mettenleiter TC, Römer-Oberdörfer A. Different regions of the Newcastle disease virus fusion protein modulate pathogenicity[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e113344
- [17] Yu XH, Luo YY, Wang JJ, Shu B, Jiang WM, Liu S, Li Y, Li JP, Hou GY, Peng C, et al. A molecular, epidemiological and pathogenicity analysis of pigeon paramyxovirus type 1 viruses isolated from live bird markets in China in 2014–2021[J]. *Virus Research*, 2022, 318: 198846
- [18] Esmaelzadeh-Dizaji R, Molouki A, Hosseini H, Fallah-Mehrabadi MH, Ziafati-Kafi Z, Takalou A, Eram N, Kumar N, Ashuri A, Sadri N, et al. Molecular characterization of a pigeon paramyxovirus type 1 virus isolated from Eurasian collared doves in Iran, 2017[J]. *Journal of Veterinary Science*, 2022, 23(3): e29
- [19] Naveen K, Singh S, Mohanty T. Pathobiological and molecular characterization of an Indian isolate of pigeon paramyxovirus type-I[J]. *Indian Journal of Veterinary Pathology*, 2009, 33(1): 58-61
- [20] Ballagi-Pordány A, Wehmann E, Herczeg J, Belák S, Lomniczi B. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of a

- region from the F gene[J]. Archives of Virology, 1996, 141(2): 243-261
- [21] Meng CC, Qiu XS, Jin SQ, Yu SQ, Chen HJ, Ding C. Whole genome sequencing and biological characterization of Duck/JS/10, a new lentogenic class I Newcastle disease virus[J]. Archives of Virology, 2012, 157(5): 869-880
- [22] 王林, 韦海涛, 宋彦军, 周德刚, 梅力, 李刚, 雷琪莉, 冯小宇. 鸽新城疫病毒北京分离株 F 基因的系统发育分析[J]. 动物医学进展, 2015, 36(2): 48-52  
Wang L, Wei HT, Song YJ, Zhou DG, Mei L, Li G, Lei QL, Feng XY. Genetic evolution analysis of F gene of a Newcastle disease virus isolate from pigeon in Beijing[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(2): 48-52 (in Chinese)
- [23] Awu A, Shao MY, Liu MM, Hu YX, Qin ZM, Tian FL, Zhang GZ. Characterization of two pigeon paramyxovirus type 1 isolates in China[J]. Avian Pathology, 2015, 44(3): 204-211
- [24] 裴育, 孙雅丽, 赵焯, 张国中, 薛佳. 4 株鸽新城疫病毒的基因组序列与致病性分析[J]. 病毒学报, 2022, 38(2): 402-414  
Pei Y, Sun YL, Zhao Y, Zhang GZ, Xue J. Genome sequencing and pathogenicity analyses of four isolates of the Newcastle disease virus in pigeons[J]. Chinese Journal of Virology, 2022, 38(2): 402-414 (in Chinese)
- [25] 钟植文, 黎先伟, 陈珊, 高绮静, 刘镇明, 杨傲冰. 一株鸽新城疫病毒的分离鉴定及 F 与 HN 基因序列分析[J]. 动物医学进展, 2015, 36(5): 86-90  
Zhong ZW, Li XW, Chen S, Gao QJ, Liu ZM, Yang AB. Isolation, identification and sequence analyses of F and HN genes of one Newcastle disease virus strain in pigeons[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(5): 86-90 (in Chinese)