

渤海湾两株 H2 亚型禽流感病毒的遗传进化分析

孟维悦^① 张国钢^{①*} 陆军^① 孟德荣^②

① 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 全国鸟类环志中心, 国家林业和草原局生物多样性重点实验室,

北京 100091; ② 沧州师范学院生命科学学院 沧州 061001

摘要: 野鸟是禽流感病毒的自然储存库, 病毒可以随着宿主的迁徙传播给其他野鸟与家禽。渤海湾是鸟类南北迁徙的重要停歇地, 也是东亚-澳大利亚鸟类迁徙通道的重要组成部分, 每年有大量水鸟在渤海湾停歇, 促进了禽流感病毒的传播。为了解渤海湾地区禽流感病毒的传播及进化与水鸟迁徙的相关性, 2018 年春季鸟类迁徙期间的 4 和 5 月份, 在渤海湾采集鸬鹚类粪便样品 2 120 份, 对样品进行检测, 分离出 2 株 H2 亚型禽流感病毒。对这 2 株 H2 亚型禽流感病毒进行了分子特征及遗传进化分析, 并结合渤海湾水鸟的环志回收数据, 对 H2 亚型病毒的重组及遗传进化与水鸟迁徙的联系进行了分析。结果表明, 2 株分离株的 HA 蛋白裂解位点符合低致病性禽流感病毒的分子特征, 它们的 8 个基因片段同源性均不高, 其中 879-H2N7 的 8 个基因片段分别与我国福建和澳大利亚的毒株同源性最高, 遗传关系最近; 854-H2N8 的 8 个基因片段分别与我国湖南以及日本、韩国、孟加拉国和越南的毒株同源性最高, 遗传关系最近。渤海湾水鸟的环志回收数据分析表明, 879-H2N7 随着野鸟的迁徙在渤海湾、福建沿海和澳大利亚之间进行传播与扩散; 854-H2N8 可能跨越东亚-澳大利亚和中亚-印度两条通道之间进行基因重组和进化, 并会随着鸟类迁徙进行传播和扩散。

关键词: 禽流感病毒; H2 亚型; 遗传进化; 鸟类迁徙; 渤海湾

中图分类号: Q985 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 05-736-10

Genetic Evolution of Two Strains of H2 Subtype Avian Influenza Virus Isolated from Bohai Bay

MENG Wei-Yue^① ZHANG Guo-Gang^{①*} LU Jun^① MENG De-Rong^②

① *Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Biodiversity of State Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091;* ② *Biology Department of Cangzhou Normal College, Cangzhou 061001, China*

Abstract: Wild birds are a natural reservoir for avian influenza virus. The virus can spread to other wild birds and domestic birds during migration. Bohai Bay is an important stopover site located in the East

基金项目 国家林业和草原局野生动物疫病监测和预警系统维护项目;

* 通讯作者, E-mail: zm7672@126.com;

第一作者介绍 孟维悦, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物生态学; E-mail: mengweiyue13@126.com。

收稿日期: 2019-03-11, 修回日期: 2019-06-04 DOI: 10.13859/j.cjz.201905015

Asian-Australasian Flyway. Every year, a large number of waterbirds rest in Bohai Bay, which accelerated the spread of the virus. To understand the correlation between the transmission and evolution of avian influenza virus and waterbirds migration in Bohai Bay during the spring, 2 120 fecal samples of waders were collected in western Bohai Bay from April to May in 2018. The samples were treated and tested, two strains of H2 subtype avian influenza virus were isolated, and their molecular characteristics and genetic evolution were analyzed. Combining the banding and recovery data of waterbirds, the association between the spread of H2 subtype virus and waterbirds migration was explored. The results showed that the HA protein cleavage site of the two isolates were consistent with the molecular characteristics of low pathogenicity avian influenza virus. All 8 gene fragments of these two strains were not highly homologous. The 8 gene fragments of A/waders/Hebei/879/2018 (H2N7) had the highest homology and the closest genetic relationship with the strains in Fujian and Australia (Table 1 for homology and Appendix 1 for genetic relationship). The 8 gene fragments of A/waders/Hebei/854/2018 (H2N8) had the highest homology and the closest genetic relationship with the strains in Hunan, Japan, Korea, Bangladesh and Vietnam, respectively (Table 1 for homology and Appendix 2 for genetic relationship). Based on the banding and recovery data of waterbirds in Bohai bay, AIV 879-H2N7 was spread with the wild bird migration between Bohai Bay, Fujian and Australia, AIV 854-H2N8 was spread and genetic reassortment was taken place with wild bird migration between East Asian-Australasian Flyway and Central Asia-India Flyway.

Key words: Avian influenza virus; H2 subtype; Genetic evolution; Bird migration; Bohai Bay

禽流感是一种威胁野生动物、家畜家禽以及人类健康的人兽共患疾病。自 1878 年首次发现以来, 禽流感已经在多个国家和地区暴发, 并呈全球性分布 (Arruda et al. 2016)。野鸟是禽流感病毒的自然宿主 (Webster et al. 1992, Olsen et al. 2006), 禽流感的传播与鸟类迁徙有关 (Tian et al. 2015), 鸟类迁徙具有分布广、流动性强、聚集程度高的特点, 促进了禽流感的传播与扩散 (Liu et al. 2005, Prosser et al. 2009, 2011)。1957 年分离到第一株 H2 流感病毒, 然后直到 1972 年才第一次从鸭中分离到 H2 亚型禽流感病毒 (Schäfer et al. 1993)。尽管目前从野鸟中分离到的 H2 亚型禽流感病毒较少, 但 H2 亚型禽流感病毒仍在其自然宿主中传播与扩散 (刘金华等 2004, Li et al. 2014)。

渤海湾是东亚-澳大利西亚水鸟迁徙通道的重要组成部分。冬季候鸟迁徙到我国南方、澳大利亚、日本和韩国等地越冬, 而到了春季又返回我国北方和俄罗斯远东地区繁殖。渤海湾作为迁徙的中途停歇地, 拥有广阔的海岸线

和滩涂湿地, 为候鸟提供了丰富的食物资源, 每年春季数千万只候鸟包括雁鸭类、鸕鹚类、鸥类等在此栖息, 取食补充能量 (陈克林等 2015)。因此, 渤海湾成为我国野生候鸟禽流感监测的重要区域, 候鸟携带禽流感病毒的种类及其遗传进化等方面都是监测的重要内容。在 2018 年春季, 我们在渤海湾采集了 2 120 份鸕鹚类候鸟新鲜粪便样品, 进行了病毒的分离鉴定, 检测出两株 H2 亚型禽流感病毒, 并对病毒进行了全基因组分析; 同时还探究了渤海湾鸟类迁徙与这两株 H2 亚型禽流感病毒的遗传进化关系, 进一步分析了鸟类迁徙对 H2 病毒传播的作用。希望研究成果能为我国渤海湾禽流感的监测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验方法

1.1.1 样品的采集、处理及病毒的分离 采集鸕鹚类新鲜粪便, 分别震荡混匀, 静置后取上清液, 并将上清液接种在 9 或 10 日龄无特定病

原体 (specific pathogen free, SPF) 鸡胚中。培养 72 h 后, 收取鸡胚尿囊液, 用鸡红细胞进行血凝实验, 观察红细胞是否凝集, 判断血凝效价。

1.1.2 病毒 RNA 提取 取血凝效价大于 5 的鸡胚尿囊液 100 μ l, 加入 1 ml Trizol (美国 Thermo 有限公司), 室温放置 10 min。加入 200 μ l 氯仿, 室温放置 10 min。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清至新离心管中, 加入等体积的异丙醇, 震荡 15 s, 室温放置 10 min。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 ml 75%乙醇, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清。沉淀于室温晾干 5~10 min, 加入 20 μ l DEPC 水, 将提取液冰箱保存备用。

1.1.3 禽流感全基因片段扩增 将病毒提取液用 GoScript 反转录试剂盒 (美国 Promega 公司) 进行反转录, 获得禽流感病毒的 cDNA, 进行 PCR 鉴定。参照柴洪亮 (2006) 的引物用 Primer 5.0 设计引物序列, 对禽流感病毒基因片段进行扩增。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 47 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。用 1%琼脂糖凝胶电泳检测病毒扩增的结果。

1.1.4 DNA 片段的回收、纯化和序列测定 琼脂糖凝胶电泳结果为阳性的 PCR 产物用试剂盒 (美国 Sigma-Aldrich 公司) 回收。回收产物由西安天隆科技有限公司使用 Ion PGM 高通量测序仪 (美国 Life Technologies 公司) 获得病毒的全基因组序列。

1.1.5 序列比较分析 从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 和 GISAID (<http://platform.gisaid.org>) 选取与分离到的病毒基因同源性最高的相关核酸序列, 在 MEGA 6.0 软件中, 采用 Neighbor-Joining 法, 分别构建禽流感病毒 8 个基因片段的进化树, bootstraps 值为 1 000。

1.2 环志回收数据处理

查询全国鸟类环志中心数据库, 在 ArcGIS

10.3 软件中, 对渤海湾等地的鸟类环志回收数据进行分析。

2 结果

2.1 禽流感病毒分离与鉴定结果

分离到 1 株 H2N7 亚型和 1 株 H2N8 亚型禽流感病毒, 分别命名为 A/waders/Hebei/879/2018 (H2N7) 和 A/waders/Hebei/854/2018 (H2N8), 本文使用二者的缩略名称, 分别为 879-H2N7 和 854-H2N8。

2.2 分子特征分析

从氨基酸序列分析可知, 879-H2N7 的 HA 基因裂解位点处氨基酸序列为 PQIEPK↓GLF, 854-H2N8 的 HA 基因裂解位点处氨基酸序列为 PQIEPR↓GLF, 没有多个连续的碱性氨基酸插入这两株病毒的裂解位点, 具有典型的低致病性禽流感病毒特征 (图 1)。879-H2N7 和 854-H2N8 的 HA 基因均有 8 个潜在糖基化位点, 其中 6 个位于 HA1 区, 分别位于 25、26、38、179、180 和 300 位氨基酸处, 2 个位于 HA2 区, 分别位于 494 和 553 位氨基酸处。对两株病毒的 HA 受体结合位点分析发现, 与宿主特异性有关的位点 236 位为 Q、238 位为 G, 为典型禽流感病毒 SA α -2,3Gal 唾液酸受体的特征, 说明该病毒还没发生可结合人受体的氨基酸突变。

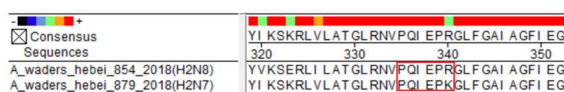


图 1 H2 基因裂解位点

Fig. 1 H2 gene cleavage site

879-H2N7 和 854-H2N8 的 NA 基因颈部均没有氨基酸缺失。854-H2N8 的 NA 基因共有 8 个潜在糖基化位点, 位于 46、54、67、84、144、268、293 和 398 位氨基酸处, 识别序列分别为 NET、NET、NTS、NNT、NGT、NFS、NWT、NWS。879-H2N7 的 NA 基因共有 12 个潜在糖基化位点, 位于 32、47、56、57、67、68、87、

145、200、234、284 和 401 位氨基酸处，识别序列分别为 NVS、NLT、NNT、NTT、NNT、NTT、NKS、NGT、NAT、NGT、NQS、NWS。

两株病毒的 PB2 基因与宿主特异性和病毒复制能力密切相关的第 627 位和第 701 位氨基酸分别为谷氨酸（Glu）和天冬氨酸（Asp），是禽源病毒特征性氨基酸。PB1 基因的第 198 位和 317 位氨基酸被认为是对小鼠（*Mus musculus domesticus*）致病性相关的位点，分别是赖氨酸（Lys）和甲硫氨酸（Met）未发生任何突变。M1 蛋白第 30 位和 215 位氨基酸发生突变。NS1 蛋白的第 42 位氨基酸发生突变，使毒株对小鼠的致病性增强，80~84 位氨基酸没有发生氨基酸缺失，92 位氨基酸为天冬氨酸（Asp），而不是谷氨酸（Glu）。此外，879-H2N7

的 PB2 基因第 591 位氨基酸发生与家禽相同的突变。

2.3 遗传进化分析

将 879-H2N7 和 854-H2N8 的全基因组序列在 NCBI 和 GISAID 上进行 BLAST 比对。结果显示，这两株病毒间全部 8 个基因片段的同源性很低。879-H2N7 病毒的 HA、PB2、PB1、PA、NP、M、NS 基因与 2017 年在福建的野鸟中分离到的禽流感病毒 A/wild bird/Fujian/24/2017（H2N6）同源性最高，NA 与澳大利亚相关亚型禽流感病毒同源性最高；854-H2N8 病毒的 8 个基因片段与来自日本、韩国、俄罗斯、越南和孟加拉国的相关亚型禽流感病毒同源性最高（表 1）。

从 879-H2N7 的进化树可以看出，与 NA

表 1 两株 H2 亚型分离株基因组与 GenBank 和 NCBI 中病毒的同源性比较
Table 1 Comparison of homology between the genomes of two isolates of H2 subtype a
nd the viruses in GenBank and NCBI

分离株 Isolates	基因 Gene	同源性最高的毒株 The strains having the genes with the highest nucleotide similarity to the counterparts of strains in Bohai Bay	同源性 Homology (%)
879-H2N7	PB2	A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6)	98.9
	PB1	A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6)	98.9
	PA	A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6)	99.3
	HA	A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6)	98.6
	NP	A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6)	98.7
	NA	A/wild bird/NSW/6526/2011 (H10N7)	95.8
	M	A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6)	99.5
	NS	A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6)	99.0
854-H2N8	PB2	A/duck/Bangladesh/27042/2015 (H7N9) A/duck/Bangladesh/26980/2015 (H7N9) A/duck/Bangladesh/26992/2015 (H7N9)	98.9
	PB1	A/environment/Kamchatka/18/2016 (H5N5)	98.5
	PA	A/mallard/Korea/A15/2016 (H7N7)	99.3
	HA	A/duck/Hokkaido/162/2013 (H2N1)	94.7
	NP	A/wild goose/dongting lake/121/2018 (H6N2)	98.2
	NA	A/muscovy duck/Vietnam/LBM529/2013 (H3N8)	97.8
	M	A/mallard/Korea/A15/2016 (H7N7) A/pintail/Russia_Primorje/222/2015 (H11N9)	99.8
	NS	A/black-tailed godwit/Bangladesh/24734/2015 (H7N5)	99.3

PB2. 碱性聚合酶蛋白 2 基因；PB1. 碱性聚合酶蛋白 1 基因；PA. 酸性聚合酶蛋白基因；HA. 血凝素基因；NP. 核蛋白基因；NA. 神经氨酸酶基因；M. 基质蛋白基因；NS. 非结构蛋白基因。

PB2. Polymerase basic protein 2 gene; PB1. Polymerase basic protein 1 gene; PA. Polymerase acid protein gene; HA. Hemagglutinin gene; NP. Nucleoprotein gene; NA. Neuraminidase gene; M. Matrix protein gene; NS. Non-structural protein gene.

基因亲缘关系最近的为澳大利亚的毒株, 与其余 7 个基因片段亲缘关系最近的为我国福建的毒株 A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6)。PB2、PB1、PA、NP 和 M 基因与澳大利亚毒株亲缘关系比较近, NS 基因与日本毒株亲缘关系比较近 (附录图 1)。

从 854-H2N8 的进化树可以看出, 与 HA 基因亲缘关系最近的为日本毒株, 并与浙江毒株在同一进化分支上, 与 NA 毒株亲缘关系最近的为 A/Duck/China/R059/2014 (H6N8), 并与越南和蒙古国毒株位于同一进化分支上, PB2 基因与孟加拉国毒株亲缘关系最近, 与日本、蒙古国和韩国毒株也处在同一进化分支上, PB1 基因与沙特阿拉伯毒株位于同一进化分支上, PA 基因与韩国毒株亲缘关系最近, NP 基因与我国洞庭湖毒株亲缘关系最近, 与日本和韩国的毒株也有较近的亲缘关系, M 基因与俄罗斯毒株亲缘关系最近, 与日本和韩国毒株也有较近的亲缘关系, 并处在同一进化分支上, NS 基因与孟加拉国毒株亲缘关系最近 (附录图 2)。

2.4 鸟类环志回收数据分析

环志回收数据分析表明, 渤海湾环志的鸟类共有 75 条回收记录, 渤海湾回收环志记录共有 644 条。环志回收记录最多的为鸕鹚类 (533 条), 其余还有鸥类、雁鸭类和鹤类。与渤海湾之间鸟类环志回收记录最多的地区多位于东亚-澳大利西亚迁徙路线上, 包括我国辽宁、福建、香港等地, 以及澳大利亚、新西兰、日本、韩国、蒙古国、俄罗斯东部等。其他地区如印度、哈萨克斯坦环志的水鸟也在渤海湾被回收。因此可以认为, 渤海湾的水鸟大多在东亚-澳大利西亚通道上迁徙, 也有一部分水鸟跨越中亚-印度和东亚-澳大利西亚迁徙通道, 在我国青海以及印度、哈萨克斯坦、蒙古国间迁徙 (图 2)。

3 讨论

本研究从渤海湾分离出来的 879-H2N7 和

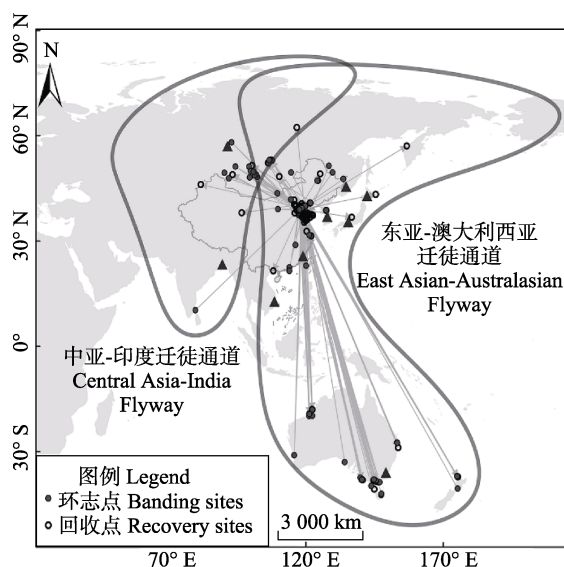


图 2 渤海湾水鸟环志回收位点

Fig. 2 Waterbirds banding and recovery sites in Bohai Bay

三角形表示与渤海湾两株病毒基因片段同源性最高毒株的位点。

The triangles represent the site of the strain with the highest homology with the two strains of the virus from Bohai Bay.

854-H2N8 亚型禽流感病毒有嗜禽源性分子生物特性 (王聪等 2016), 没有发生可以结合人受体的氨基酸突变, M 和 NS 蛋白的突变使毒株对小鼠的致病性增强, 这两株病毒虽然是低致病性禽流感病毒, 但与致病性有关的基因位点存在部分突变, 有潜在的毒力增强趋势。

879-H2N7 除 NA 基因外, 其他 7 个基因与我国福建分离到的禽流感病毒同源性较高, NA 基因与澳大利亚毒株的同源性最高。就鸟类迁徙而言, 我国福建和渤海湾都属东亚-澳大利西亚通道上候鸟迁徙的重要停歇地, 澳大利亚是候鸟特别是鸕鹚类重要的越冬地 (杨洪燕等 2006, 惠鑫等 2009, 陈克林等 2015, 张勇 2016)。鸟类环志回收的数据分析结果也证实了上述三个地点即我国渤海湾和福建与澳大利亚之间存在着密切的鸟类迁徙往来。蔡振鸿 (2018) 在福建野鸟中分离到的 A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6) 毒株与当地家禽分离株亲缘关系较远, 表明该毒株由家禽运输传播

到福建地区的可能性较小, 而 879-H2N7 与福建 A/wild bird/Fujian/24/2017 (H2N6) 毒株的 7 个基因同源性较高, 因此初步推测, 879-H2N7 亚型禽流感病毒随着野鸟迁徙在三个地点之间进行了传播与扩散。

854-H2N8 病毒的 8 个基因片段均为欧亚分支, 其中 6 个基因 PB1、M、PA、NP、NA、HA 分别与同属于东亚-澳大利西亚迁徙通道上的俄罗斯东部、日本、韩国、越南及我国东部地区毒株的同源性最高, 另外 2 个基因 NS 和 PB2 与孟加拉国毒株的同源性最高。鸟类迁徙数据表明, 渤海湾鸕鹚类除了在东亚地区迁徙以外, 还在印度和孟加拉国之间迁徙, 而印度与孟加拉国属中亚-印度候鸟迁徙通道。因此我们认为, 854-H2N8 亚型禽流感病毒可能在东亚-澳大利西亚和中亚-印度两条通道之间进行基因重组和进化, 并随着鸟类迁徙进行传播和扩散。

在鸟类迁徙过程中的重要聚集地如渤海湾地区, 禽流感病毒可以通过野鸟个体间紧密接触相互感染和传播, 或者通过被污染栖息环境如湖水在鸟类间相互传播 (黄建龙等 2014, Fries et al. 2015), 并发生重组和进化。由于迄今为止, 还没有在该地区的家禽中分离到 H2 亚型禽流感病毒序列的相关报道, 因此该亚型病毒的传播与家禽贸易及运输是否有关, 家禽贸易及运输过程对渤海湾地区禽流感传播的作用仍需进一步研究。本研究对病毒基因序列的同源性比较和遗传进化分析表明, 渤海湾这两株 H2 亚型禽流感病毒的传播与鸟类大规模迁徙和聚集停歇有密切联系, 并且可能在东亚和中亚两条候鸟迁徙通道上进行传播和扩散。

参 考 文 献

Arruda P H E, Stevenson G W, Killian M L, et al. 2016. Outbreak of H5N2 highly pathogenic avian influenza A virus infection in two commercial layer facilities: lesions and viral antigen distribution. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 28(5): 568–573.

Fries A C, Nolting J M, Bowman A S, et al. 2015. Spread and persistence of influenza A viruses in waterfowl hosts in the north American Mississippi migratory flyway. *Journal of Virology*,

89(10): 5371–5381.

Li X D, Zou S M, Zhang Y, et al. 2014. A novel reassortant H2N3 influenza virus isolated from China. *Biomedical and Environmental Sciences*, 27(4): 240–249.

Liu J, Xiao H, Lei F, et al. 2005. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*, 309(Suppl 1): 1206.

Olsen B, Munster V J, Wallensten A, et al. 2006. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 312(5772): 384–388.

Prosser D J, Cui P, Takekawa J Y, et al. 2011. Wild bird migration across the Qinghai-Tibetan plateau: a transmission route for highly pathogenic H5N1. *PLoS One*, 6(3): e17622.

Prosser D J, Takekawa J Y, Newman S H, et al. 2009. Satellite-marked waterfowl reveal migratory connection between H5N1 outbreak areas in China and Mongolia. *Ibis*, 151(3): 568–576.

Schäffr J R, Kawaoka Y, Bean W J, et al. 1993. Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir. *Virology*, 194(2): 781–788.

Tian H, Zhou S, Dong L, et al. 2015. Avian influenza H5N1 viral and bird migration networks in Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(22): 172–177.

Webster R G, Bean W J, Gorman O T, et al. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 569(1): 152–179.

蔡振鸿. 2018. 福建省厦门市野鸟 H2N6 亚型禽流感病毒分离与序列分析. *中国动物检疫*, 35(11): 62–67.

柴洪亮. 2006. 禽流感病毒分离株 A/Mallard/ZhaLong/88/04 (H4N6) 全基因的克隆及序列分析. 哈尔滨: 东北林业大学硕士学位论文, 15.

陈克林, 杨秀芝, 吕咏. 2015. 鸕鹚类鸟东亚-澳大利西亚迁飞路线上的重要驿站: 黄渤海湿地. *湿地科学*, 13(1): 1–6.

黄建龙, 王昌建, 谭丹, 等. 2014. 洞庭湖区 H10 亚型禽流感监测及其遗传进化分析. *中国农学通报*, 30(32): 15–20.

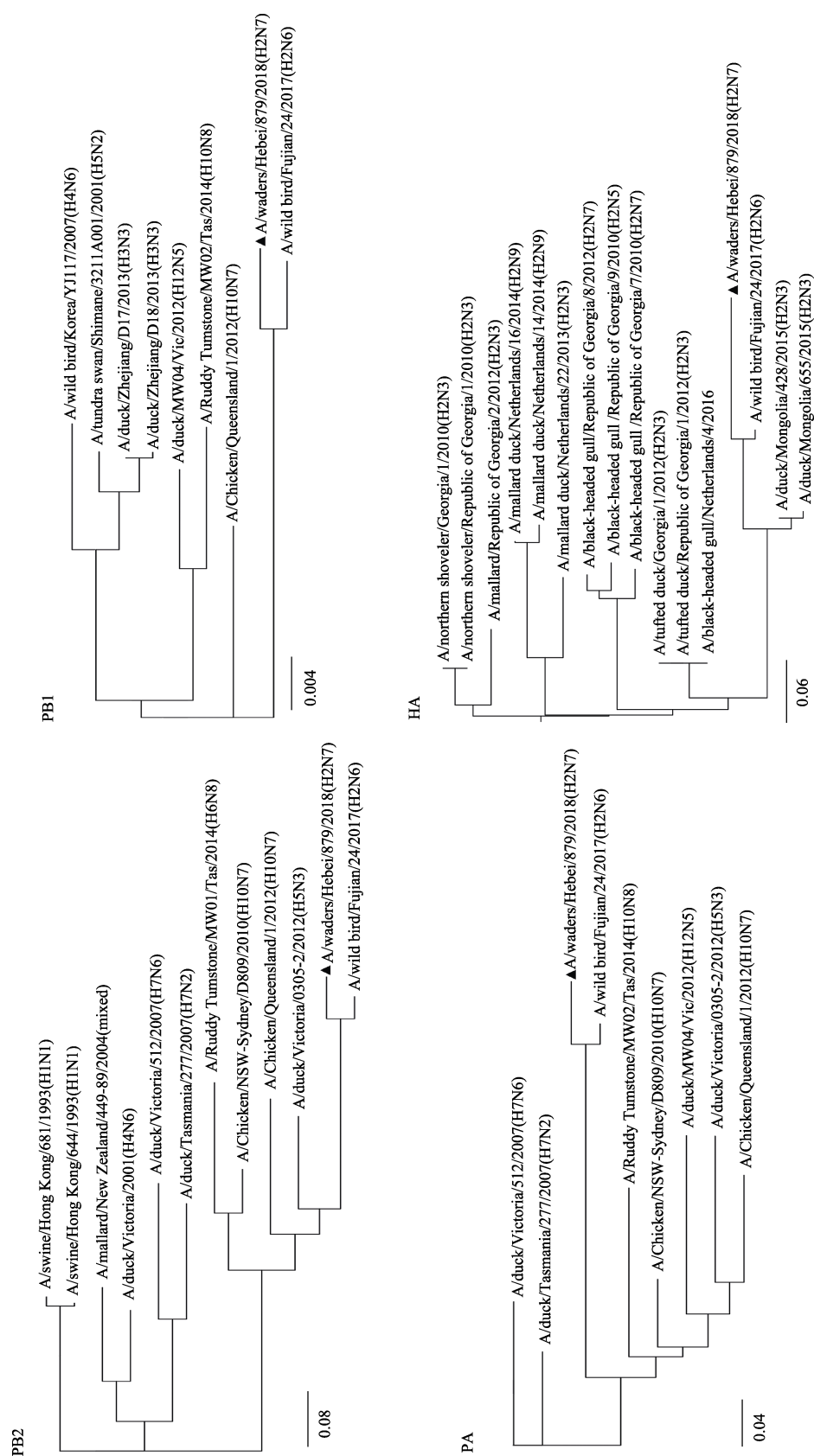
惠鑫, 马强, 向余劲攻, 等. 2009. 崇明东滩鸕鹚类迁徙路线的环志分析. *动物学杂志*, 44(3): 23–29.

刘金华, 岗崎克则, 喜田宏. 2004. H2 亚型流感病毒内部蛋白基因在北美和欧亚迁徙鸟中可发生地区间传播. *中国人兽共患病杂志*, 20(z1): 142–149.

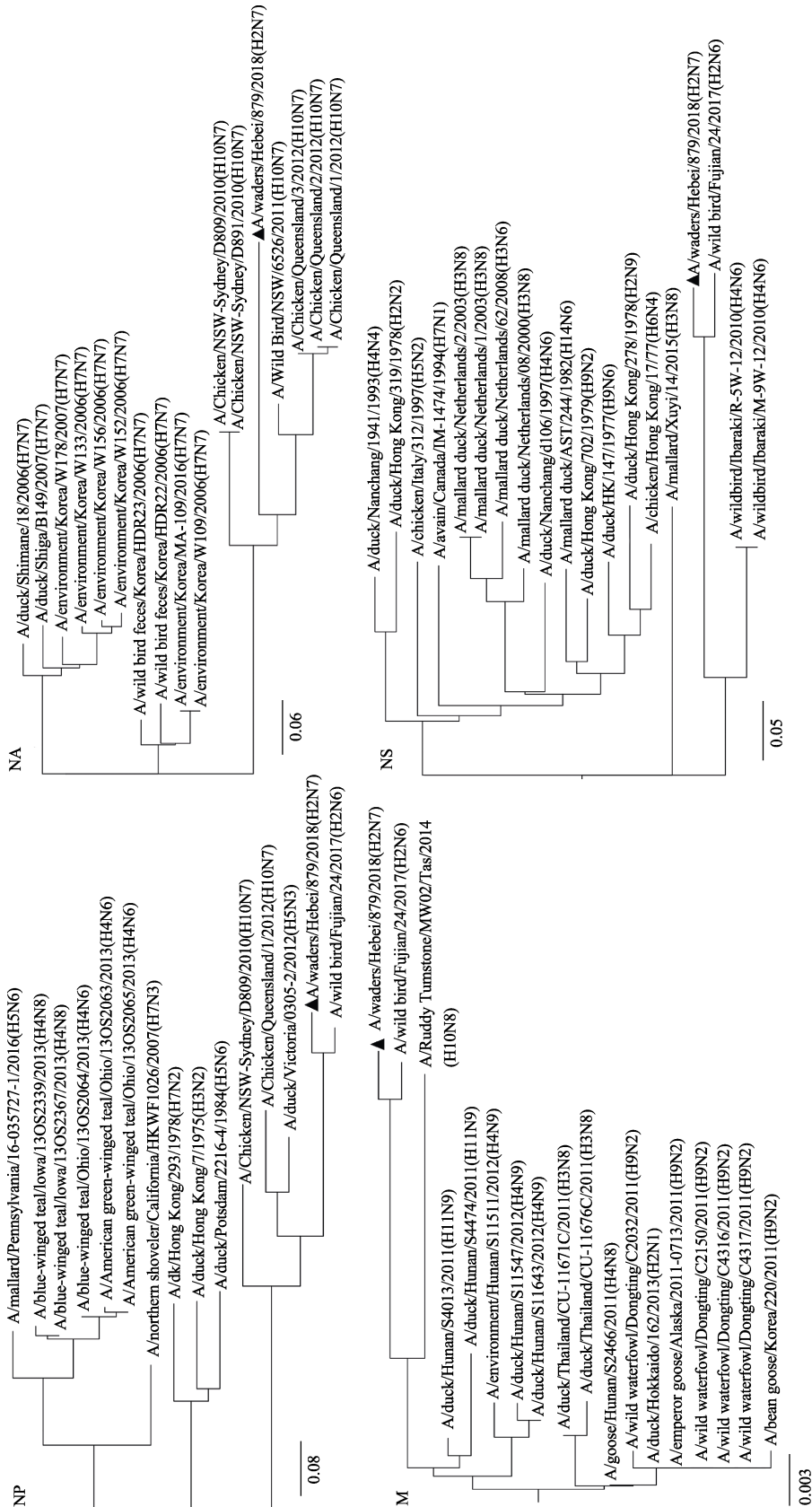
王聪, 费荣梅. 2016. 野鸭源 H3N8 亚型禽流感病毒的系统进化和分子遗传特征分析. *中国兽医科学*, 46(12): 1489–1496.

杨洪燕, 张正旺. 2006. 渤海湾地区红腹滨鹚迁徙动态的初步研究. *动物学杂志*, 41(3): 85–89.

张勇. 2016. 福建闽江河口湿地水禽群落组成及迁徙动态研究. *四川动物*, 35(6): 928–935.



(转下页)

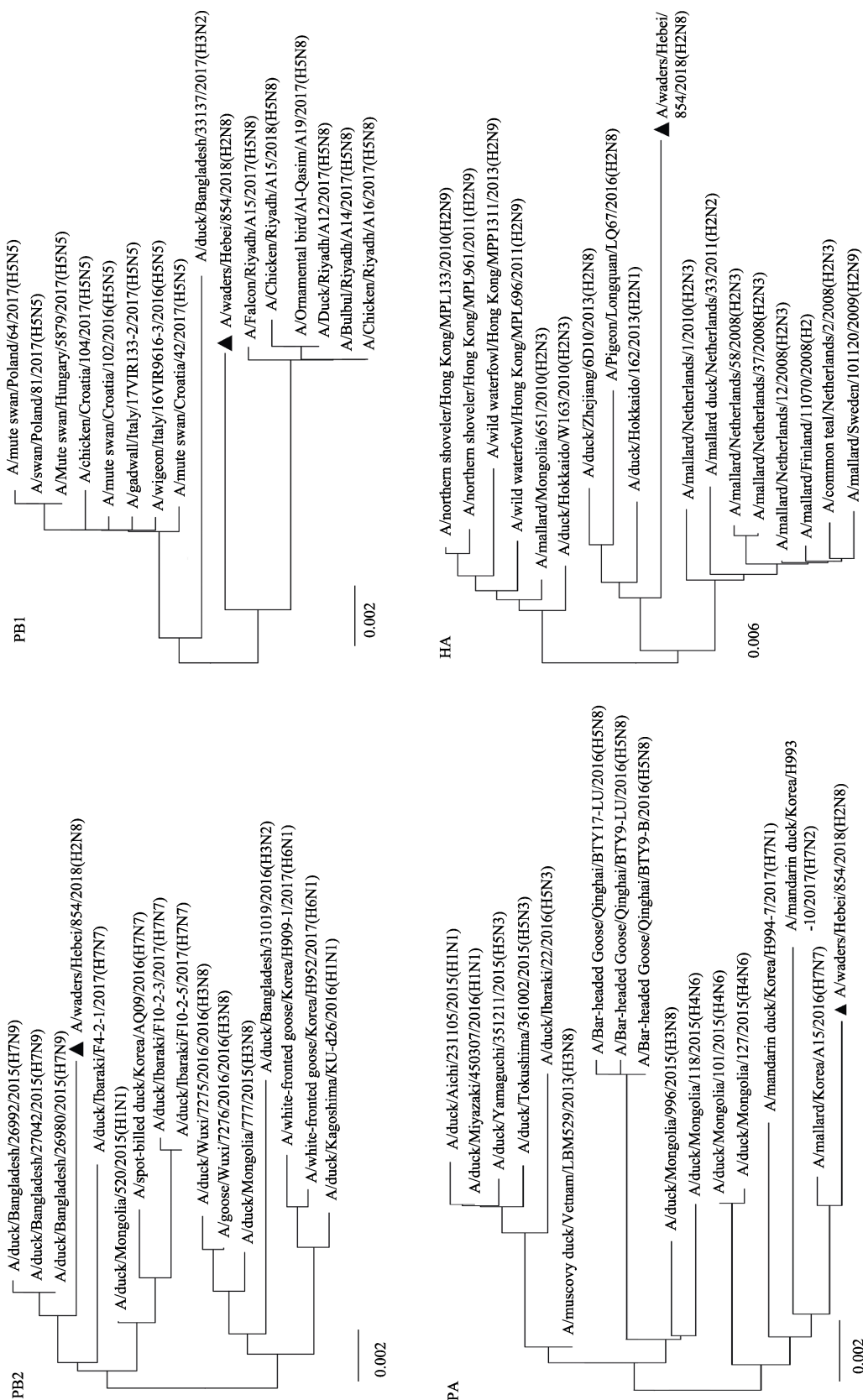


附录图 1 879-H2N7 毒株的基因进化树

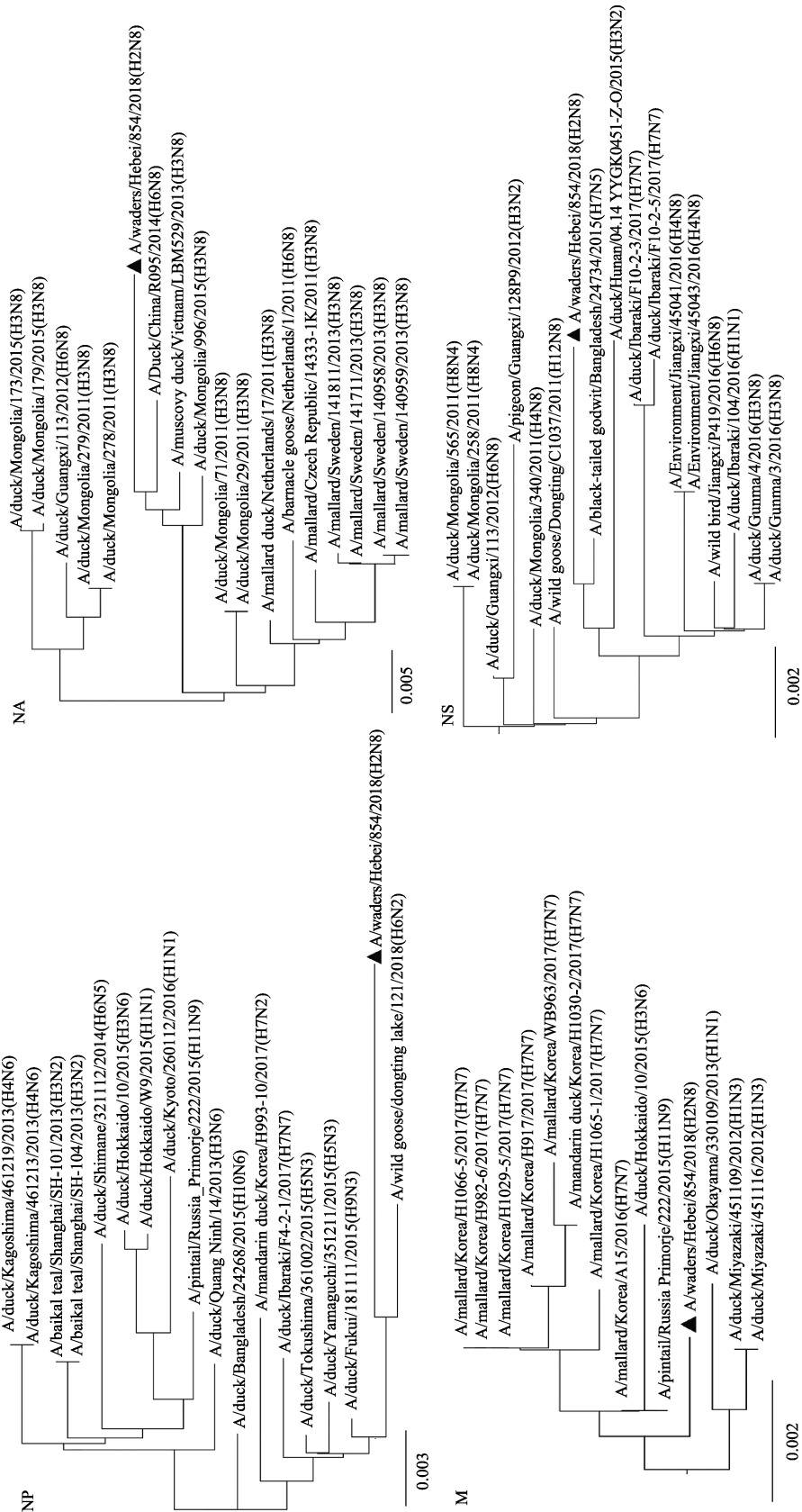
Appendix 1 Phylogenetic trees of genes of 879-H2N7 with reference sequences

PB2. 碱性聚合酶蛋白 2 基因; PB1. 碱性聚合酶蛋白 1 基因; PA. 酸性聚合酶蛋白基因; HA. 血凝素基因; NP. 核蛋白基因; NA. 神经氨酸酶基因; M. 基质蛋白基因; NS. 非结构蛋白基因。图中的序列名称即 A 型流感病毒/物种名/采样地点/样品编号/年份(亚型)。▲. 在渤海湾地区分离到的毒株。标尺表示基因组的遗传变异度。

PB2. Polymerase basic protein 2 gene; PB1. Polymerase basic protein 1 gene; PA. Polymerase acid protein gene; HA. Hemagglutinin gene; NP. Nucleoprotein gene; NA. Neuraminidase gene; M. Matrix protein gene; NS. Non-structural protein gene. The name of sequences in the figure, i.e. type A influenza virus/species name/sampling site/sample number/year (subtype). ▲. Newly isolate at Bohai bay in this study is indicated by the symbol. The number under the scale indicates the degree of genetic variation in the genome of this length.



(转下页)



附录图 2 854-H2N8 毒株的基因进化树
Appendix 2 Phylogenetic trees of genes of 854-H2N8 with reference sequences

PB2. 碱性聚合酶蛋白 2 基因; PB1. 碱性聚合酶蛋白 1 基因; PA. 酸性聚合酶蛋白基因; HA. 血凝素基因; NP. 核蛋白基因; NA. 神经氨酸酶基因; M. 基质蛋白基因; NS. 非结构蛋白基因。图中的序列名称即 A 型流感病毒/物种名/采样地点/样品编号/年份(亚型)。▲. 在渤海湾地区分离到的毒株。标尺表示基因组的遗传变异度。

PB2. Polymerase basic protein 2 gene; PB1. Polymerase basic protein 1 gene; PA. Polymerase acid protein gene; HA. Hemagglutinin gene; NP. Nucleoprotein gene; NA. Neuraminidase gene; M. Matrix protein gene; NS. Non-structural protein gene. The name of sequences in the figure, i.e. type A influenza virus/species name/sampling site/sample number/year (subtype). ▲. Newly isolate at Bohai bay in this study is indicated by the symbol. The number under the scale indicates the degree of genetic variation in the genome of branches of this length.