

申 报	系列：实验技术
	专业：畜牧学
	职称：正高级 实验师

业绩成果材料

（申报人的业绩成果材料包括论文、科研项目、获奖以及其他成果等）

单 位（二级单位）_____动物科学学院_____

姓 名 _____陈伟国_____

材料核对人：

单位盖章：

核对时间：

华南农业大学制

目录

一、教学研究业绩.....	1
1.教学研究项目.....	1
1.1 关于华南农业大学-广东爱健康清远麻鸡全产业链科产教融合实践教学基地项目的立项通知（合同）及有关佐证材料.....	1
1.2 关于华南农业大学-广东爱健康清远麻鸡全产业链科产教融合实践教学基地项目的立项通知（合同）及有关佐证材料.....	9
1.3 关于“双一流”背景下《动物生产类 综合实习》教学模式的创新与实践项目的立项通知（合同）及有关佐证材料.....	29
2.教学成果奖证书.....	35
2.1 “一体两翼三轮驱动”的德才双修创新型人才培养模式研究与实践；校级一等奖.....	35
2.2“一体两翼三轮驱动”的德才双修创新型人才培养模式研究与实践；省级一等奖.....	36
二、科研项目.....	37
1.主持	37
1.1 关于黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性改良解析项目的立项通知（合同）及有关佐证材料 ..	37
1.2 关于清远麻鸡禽白血病抗性选育技术推广与示范项目的立项通知（合同）及有关佐证材料	49
1.3 关于禽白血病遗传抗性与抗病选育技术的示范推广项目的立项通知（合同）及有关佐证材料	57
1.4 关于抗禽白血病清远麻鸡品种的选育与推广项目的立项通知（合同）及有关佐证材料	70
1.5 关于清远麻鸡育种技术研究项目的立项通知（合同）及有关佐证材料	76
2.主参	84
2.1 关于抗禽白血病黄羽肉鸡新品种培育项目的立项通知（合同）及有关佐证材料	84
2.2 关于 ALV-J p68 蛋白 SUMO 化修饰结合 eEF1A 调控逆转录活性促进病毒增殖的分子机制项目的立项通知（合同）及有关佐证材料.....	108
2.3 关于 ALV-Jp19 基因编码的 ALV-miRNA-p19-01 调控 DUSP6/ERK 信号通路促进病毒出芽的分子机制项目的立项通知（合同）及有关佐证材料.....	112
2.4 关于抗重大疫病鸡新品种设计与培育项目的立项通知（合同）及有关佐证材料	148
2.5 关于湛江鸡抗病新品种选育、健康养殖和屠宰加工关键技术集成与推广应用项目的立项通知（合同）及有关佐证材料.....	158
2.6 关于中山麻鸭遗传资源保护与高效新品系的培育项目的立项通知（合同）及有关佐证材料	173
2.7 关于建设廉江市湛江鸡研究院项目合作协议书项目的立项通知（合同）及有关佐证材料	189
三、论文、著作等.....	201
1.检索证明.....	201
2.以第一作者发表本专业论文情况.....	203
2.1. Synergistic Immunosuppression of Avian Leukosis VirusSubgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Is Responsiblefor Enhanced Pathogenicity	203

2.2. tva 受体基因起始密码子突变对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒的影响	218
2.3. Semen extracellular vesicles mediate vertical transmission of subgroup J avian leukosis virus	227
3. 以通讯作者发表本专业论文情况	238
3.1. Synergy of Subgroup J Avian Leukosis Virus and Chicken Infectious Anemia Virus Enhances the Pathogenicity in Chickens	238
3.2. A Comprehensive Analysis of the ceRNA Network and Hub Genes in Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Superinfection	252
3.3. Deciphering Immune Modulation in Chickens Co-Infected with ALV-J and CIAV: A Transcriptomic Approach	266
四、科研成果	277
1. 科技奖励证书	277
1.1. 中国产学研合作创新成果奖一等奖	277
1.2. 广东省畜牧兽医学会奖-先进科技成果奖	278
1.3 广东省农业技术推广奖一等奖	279
1.4 广东省农业技术推广奖二等奖	280
1.5 广东省农业技术推广奖二等奖	281
2. 知识产权	282
2.1. 荷兰专利 MOLECULAR MARKER FOR GENETIC RESISTANCE OF CHICKEN AVIAN LEUKOSIS VIRUS SUBGROUPS A AND K (ALV-A AND ALV-K) AND USE THEREOF	282
2.2. 一种鸡 B 亚群禽白血病遗传抗性分子标记 tvb3215-3216insCC 及其应用	283
2.3 一种鸡 A 亚群禽白血病抗性分子标记 tva260G>A 及其应用	284
2.4 鸡 B 亚群禽白血病抗性分子标记 tvb3731-3732insA 及其分子诊断方法	285
2.5 鸡 B 亚群禽白血病抗性分子标记 tvb3667-3668insA3 及其分子诊断方法	286
2.6 一种鸡 A、K 亚群禽白血病遗传抗性分子标记及其应用	287
2.7 一种阻断鸡禽白血病病毒垂直传播的方法及其应用	288
2.8 一种与 ALV 逆转录酶 RT 结合的结构域、疫苗及用途	289
2.9 LEDGF 基因在抗禽白血病性状选育中的应用	290
2.10 一种与鸡 J 亚群禽白血病抗性相关的分子标记及其应用	291
2.11 一种表达鸡传染性贫血病毒 VP1、VP2 基因重组鸡痘病毒活载体疫苗	292
2.12 禽白血病分型智慧平台软件 V1.0	293
五、其他业绩	294
1. 指导学生学科竞赛	294
1.1. 共青团广东省委员会“挑战杯”广东大学生课外学术科技作品竞赛三等奖	294

广东省教育厅

粤教高函〔2024〕30号

广东省教育厅关于公布 2024 年度广东省本科 高校教学质量与教学改革工程建设 项目立项名单的通知

各本科高校：

按照《广东省教育厅关于开展 2024 年度广东省本科高校教学质量与教学改革工程项目申报推荐工作的通知》等文件安排，经学校遴选推荐、省教育厅审核、公示、复审等环节，现将 2024 年省本科高校质量工程建设项目立项名单予以公布，并就有关事项通知如下：

一、立项情况

确定立项建设省级实验教学示范中心 35 个、教学研究中心 1 个、校企联合实验室 31 个、科产教融合实践教学基地 66 个、大学生社会实践教学基地 47 个、教师教学发展中心 3 个、课程教研室 147 个、现代产业学院 32 个、专项人才培养计划 54 项、高等教育教学改革项目 850 项。具体立项名单见附件。

二、项目管理

（一）本次公布项目均为省质量工程建设项目，建设项目经学校组织建设、校内结题并通过省教育厅统一组织项目验收后，正式认定为省级项目。

（二）项目正式实施前，请确保已对项目建设目标、建设举措、预期成果、建设进度安排等进行科学论证，论证专家应不少于5人，且至少有三分之一来自外校。论证后的目标、任务等将作为项目结题验收时的重要依据。

（三）项目日常管理由学校主管部门负责，学校应统筹做好项目中期检查、校内结题验收等工作。校内结题时，邀请校外评审专家人数不得少于专家总人数的三分之二。满足以下条件的项目，经学校正式申请，可以参与省教育厅统一组织的项目验收：

1.项目已完成立项时设定的主要建设任务和目标；

2.项目已取得标志性建设成果，且该成果已在教学实践中得到检验和有效应用；

3.已按照要求完成项目校内结题；

4.符合当年度省统一验收规定的其他条件。

各校质量工程建设项目管理情况，将作为学校下一年度项目立项限额的参考依据。

（四）项目实施过程中，其名称、建设内容（任务）、建设目标、建设周期、主要负责人、预期成果等发生重大变更的，需由时任项目负责人在发生变更后及时提出，经学校项目主管

部门审核后由学校正式来函说明原因；擅自变更上述内容的，验收评定时列为不通过。

三、其他事项

（一）2024 年度各校向省教育厅推荐并获得立项的项目，学校须将项目校内评审、推荐及论证相关材料妥善保存，留底备查。

（二）各校要统筹本校“冲补强”提升计划资金及自有资金对立项项目予以资助，项目获得学校资助情况将作为项目结题验收时重要考察因素之一。如项目建设中取得具有推广价值的优秀成果，请及时形成书面材料报省教育厅高教处。

联系人：李成军，联系电话：020-37626882。

附件：2024 年度广东省本科高校教学质量与教学改革工程建设项目立项名单



公开方式：依申请公开

校对人：李成军

附件：

2024 年度广东省本科高校教学质量与教学改革工程立项项目名单

序号	项目类型	单位名称	项目名称	负责人
1	实验教学示范中心	中山大学	医学院基础医学实验教学中心	田国宝
2	实验教学示范中心	中山大学	微电子科学与工程实验教学中心	虞志益
3	实验教学示范中心	华南理工大学	生物医学创研创新实验中心	付晓玲
4	实验教学示范中心	华南理工大学	集成电路教学与创新实验中心	李斌
5	实验教学示范中心	华南理工大学	电工电子实验教学示范中心	汪娟娟
6	实验教学示范中心	暨南大学	密码科学与技术实验教学示范中心	赖俊祚
7	实验教学示范中心	南方医科大学	法医病理学实验教学示范中心	乔东访
8	实验教学示范中心	南方医科大学	医学人才临床综合能力培养数字化实验教学示范中心	沈洁
9	实验教学示范中心	广州中医药大学	中医养生学实验教学示范中心	黎晖
10	实验教学示范中心	广州中医药大学	临床技能培训实验教学示范中心	邬素珍
11	实验教学示范中心	华南师范大学	教育学实验教学示范中心	李盛兵
12	实验教学示范中心	广东工业大学	人因环境实验教学示范中心	周祥
13	实验教学示范中心	广东海洋大学	数字经济与产业发展综合实验教学示范中心	周昌仕
14	实验教学示范中心	仲恺农业工程学院	大数据技术实验教学示范中心	刘双印
15	实验教学示范中心	广东药科大学	中医临床技能教学示范中心	肖炜
16	实验教学示范中心	岭南师范学院	地理学实验教学示范中心	牛东风
17	实验教学示范中心	广州大学	心理学实验教学示范中心	聂衍刚
18	实验教学示范中心	广州医科大学	医学模拟教育中心	刘翔
19	实验教学示范中心	深圳大学	前沿交叉学科教学实验中心	李猛
20	实验教学示范中心	南方科技大学	人工智能实验教学示范中心	郝祁

序号	项目类型	单位名称	项目名称	负责人
21	实验教学示范中心	深圳技术大学	电路与电子智慧化实验教学示范中心	张文伟
22	实验教学示范中心	惠州学院	材料测试与分析实验教学示范中心	封科军
23	实验教学示范中心	惠州学院	大学物理实验教学示范中心	龙达峰
24	实验教学示范中心	东莞理工学院	机械工程学院实验教学示范中心	郭建文
25	实验教学示范中心	佛山大学	资源环境实验教学中心	张永利
26	实验教学示范中心	广东白云学院	智能制造技术实验教学示范中心	柳贵东
27	实验教学示范中心	广东科技学院	智能制造技术实验教学示范中心	严其艳
28	实验教学示范中心	广东东软学院	计算机系统原理实验教学中心	周富肯
29	实验教学示范中心	广东理工学院	机械工程实验教学中心	杨斌
30	实验教学示范中心	北京师范大学 珠海校区	地理实验教学示范中心	谢云
31	实验教学示范中心	珠海科技学院	工业机器人实验教学示范中心	张恩光
32	实验教学示范中心	广东外语外贸大学 南国商学院	计算机与人工智能实验教学示范中心	朱子江
33	实验教学示范中心	广州理工学院	人工智能实验教学示范中心	王煜林
34	实验教学示范中心	广州软件学院	智能电子与控制实验教学中心	甘俊英
35	实验教学示范中心	肇庆医学院	基础医学实验教学示范中心	郑恒
36	教学研究中心	华南理工大学	广东省高等学校人工智能教育研究中心	项聪
37	校企联合实验室	华南理工大学	智能计算联合实验室	何克晶
38	校企联合实验室	暨南大学	暨南大学-豪密科技校企联合实验室	黄书强
39	校企联合实验室	暨南大学	暨南大学包装-红塔仁恒校企联合实验室	林勤保
40	校企联合实验室	华南农业大学	华南农业大学-汕头保税区联通工业环境友好高分子材料联合实验室	张超群
41	校企联合实验室	南方医科大学	高校-血站-企业细胞工程联合实验室	李婷婷

序号	项目类型	单位名称	项目名称	负责人
42	校企联合实验室	南方医科大学	智能医学成像与诊断技术校企联合实验室	路利军
43	校企联合实验室	南方医科大学	法医生物物证精准鉴识联合实验室	朱波峰
44	校企联合实验室	华南师范大学	环境工程设计与模拟仿真联合实验室	张刚
45	校企联合实验室	广东工业大学	机器人及智能制造技术校企联合实验室	陈辞
46	校企联合实验室	广东外语外贸大学	基于大模型的智能会计综合实验室	左志刚
47	校企联合实验室	广东财经大学	金融区块链实验室	胡凡
48	校企联合实验室	广东医科大学	广东医科大学—兰卫医学实验技术校企联合实验室	张晶晶
49	校企联合实验室	广东海洋大学	力学分析校企联合实验室	陈扬枝
50	校企联合实验室	广东海洋大学	农业机械智能化技术与应用实验室	侯明鑫
51	校企联合实验室	广东药科大学	化妆品产教融合校企联合实验室	曹华
52	校企联合实验室	星海音乐学院	全息数智化校企联合实验室	李伟
53	校企联合实验室	广东技术师范大学	光电功能材料校企联合实验室	熊良斌
54	校企联合实验室	韩山师范学院	数据科学创新创业实验室	杨晓鹏
55	校企联合实验室	广东第二师范学院	食品分析与检测校企联合实验室	曾碧健
56	校企联合实验室	广州大学	精细化工新材料联合实验室	吴旭
57	校企联合实验室	深圳大学	深圳大学-腾讯云人工智能实验室	王旭
58	校企联合实验室	南方科技大学	脑-机器人康复技术联合实验室	张明明
59	校企联合实验室	深圳技术大学	光储充联合实验室	韩培刚
60	校企联合实验室	嘉应学院	光电检测技术联合实验室	陈书汉
61	校企联合实验室	东莞理工学院	东莞理工-中虹建设绿色建造技术联合实验室	花开慧
62	校企联合实验室	佛山大学	绿色低碳土木工程材料研发联合实验室	覃潇
63	校企联合实验室	广东科技学院	数字技术商务应用实验室	姚文戈
64	校企联合实验室	广东理工学院	华为数通与云计算实验室	倪元相
65	校企联合实验室	广州城市理工学院	电力电子技术校企联合智慧实验室	马海霞

序号	项目类型	单位名称	项目名称	负责人
66	校企联合实验室	广州理工学院	新工科智行机器人联合实验室	王如意
67	校企联合实验室	广州软件学院	大数据应用开发校企联合实验室	谭翔纬
68	科产教融合实践教学基地	中山大学	中山大学-普昕酒店-广东省旅控科产教融合实践教学基地	曾国军
69	科产教融合实践教学基地	中山大学	岭南音乐传承研究实践教学基地	蒋晶
70	科产教融合实践教学基地	华南理工大学	华南理工大学-中国南方电网超高压输电公司科产教融合实践教学基地	雪映
71	科产教融合实践教学基地	暨南大学	暨南大学-阳西县恒生水产养殖科产教融合实践教学基地	黄柏炎
72	科产教融合实践教学基地	暨南大学	暨南大学-昂宝电子科产教融合实践教学基地	麦文杰
73	科产教融合实践教学基地	暨南大学	暨南大学-中山中荣包装工程科产教融合实践教学基地	王志伟
74	科产教融合实践教学基地	华南农业大学	华南农业大学广州维德科技有限公司 科产教融合实践教学基地	张昕
75	科产教融合实践教学基地	华南农业大学	华南农业大学-盛方达本科生产学研培养基地	王海洋
76	科产教融合实践教学基地	华南农业大学	华南农业大学-广东爱健康清远麻鸡全产业链科产教融合实践教学基地	陈伟国
77	科产教融合实践教学基地	南方医科大学	AI 辅助药物设计与新药研发科产教融合实践教学基地	陈金香
78	科产教融合实践教学基地	南方医科大学	“一心两翼三化”实验诊断学科产教融合实践教学基地	郑磊
79	科产教融合实践教学基地	南方医科大学	南方医科大学-达瑞生物技术股份有限公司科产教融合实践教学基地	左大明
80	科产教融合实践教学基地	广州中医药大学	中医药人工智能科产教融合实践教学基地	陈平平
81	科产教融合实践教学基地	华南师范大学	华南师范大学-连州凌力电池有限公司 科产教融合实践教学基地	高爱梅
82	科产教融合实践教学基地	华南师范大学	华南师范大学-广东源视电子科技有限公司科产教融合实践教学基地	沈映珊
83	科产教融合实践教学基地	华南师范大学	华南师范大学 GIS 科产教融合实践教学基地	孙彩歌

附件2：华南农业大学2022年度教改及质量工程项目立项名单

项目编号	项目类别	项目名称	项目负责人	所属单位
JG22001	重点项目	新工科课程思政一体化教学改革与实践——以《测量学》课程为例	姚朝龙	资源环境学院
JG22002	重点项目	“双一流”背景下农林高校公共基础课的教学改革与实践——以大学数学课程群为例	李朗	数学与信息学院、软件学院
JG22003	重点项目	基于知识地图的高校实验室安全教育微课体系构建研究	刘小波	基础实验与实践训练中心
JG22004	重点项目	新工科背景下风景园林历史与理论课程教学改革研究	夏宇	林学与风景园林学院
JG22005	重点项目	融合“树医生”理念的《园林植物栽植与养护》课程思政与实践教学改革研究	刘天颐	林学与风景园林学院
JG22006	重点项目	落实“育德”教育与实践，打造《饲料生物技术》思政“金课”	孙加节	动物科学学院
JG22007	重点项目	“大思政课”视野下《中国近现代史纲要》教学改革与实践	崔芸	马克思主义学院
JG22008	重点项目	基于“SPOC+PBL”的《形势与政策》混合式教学模式改革与实践	项赠	马克思主义学院
JG22009	重点项目	习近平生态文明思想融入思政课教学机制研究	李俊宏	马克思主义学院
JG22010	重点项目	思政教育融合双创教育在专业实验课程中的研究与探索	罗霞	电子工程学院（人工智能学院）
JG22011	重点项目	基于“知农爱农”的农业高校课程思政模式建设研究	张运红	公共管理学院
JG22012	重点项目	“双一流”建设农业院校本科人才的培养目标与定位研究——以大数据管理及应用专业为例	熊俊涛	数学与信息学院、软件学院
JG22013	重点项目	基于科教、产教双融合理念的《小动物临床病理学实验》教学改革与实践	李英	兽医学院
JG22014	重点项目	强综合、重实践、补短板——面向专业认证的科产教融合式建筑设计课教学改革	陈乃华	水利与土木工程学院
JG22015	重点项目	基于课程思政建设的高校体育课程研究	周华锋	体育教学研究部
JG22016	重点项目	中外合作办学“学术英语”模块课程融合课程思政的探索	冯立新	国际教育学院（广州都柏林国际生命科学与技术学院）
JG22017	重点项目	后疫情时代全英《植物学》国际化教学探索	龚维	生命科学学院

JG22018	重点项目	乡村美育实施背景下农林院校音乐专业人才培养改革研究	朱虹	艺术学院
JG22019	重点项目	助力乡村振兴的高阶性新型农商复合人才培养实践教学模式研究	齐文娥	经济管理学院
JG22020	重点项目	基于“馆校协同+合作学习”的历史实践教学模式改革与探索	龚金红	人文与法学学院
JG22021	重点项目	基于“多维优化，三层互助”的专业课程改革、思政建设与实践——以《家具与室内材料学》为例	孙理超	材料与能源学院
JG22022	重点项目	《用户体验设计》课程深度学习模式与效应研究	周秀	艺术学院
JG22023	重点项目	基于PDCA与CDIO的实践教学模式研究与实践——以《汽车构造实验》为例	周锡恩	工程学院
JG22024	重点项目	问题驱动下的农业院校的数学分析课程线上线下教学改革的研究与实践	王石安	数学与信息学院、软件学院
JG22025	重点项目	以“学以致用”为导向的《茶叶审评与检验》课程教学改革	谭新东	园艺学院
JG22026	招标项目	大数据背景下统计学专业产教融合人才培养机制的探索与实践	肖莉	数学与信息学院、软件学院
JG22027	招标项目	教学高质量发展视域下本科学生评教指标体系的优化	贾莉	经济管理学院
JG22028	招标项目	数学核心素养与“三农”情怀融合的《大学数学I》课程思政探索与实践	曹静	数学与信息学院、软件学院
JG22029	招标项目	融合课程思政农林院校数学类公共基础课课程评价体系的建立和实践	丁仕虹	数学与信息学院、软件学院
JG22030	重点项目	乡村振兴赋能“双创”教育协力培养“三农”人才机制与实践	胡传双	材料与能源学院
JG22031	重点项目	科教融合的智慧农业创新人才培养模式探索与实践	胡炼	工程学院
JG22032	重点项目	食品大健康背景下《食品仪器分析》的实践教学改革与探索	肖苏尧	食品学院
JG22033	重点项目	植物病理学课程思政建设与实践研究	孔广辉	植物保护学院

JG22034	重点项目	英语系列选修课课程库构建与优化	吴章欣	外国语学院
JG22035	重点项目	农林院校国土空间规划多学科交叉融合教学改革研究	杨文越	林学与风景园林学院
JG22036	重点项目	“双一流”背景下我校学科建设与专业融合发展的模式和对策研究	章家恩	资源环境学院
JG22037	重点项目	“双一流”背景下汉语言文学专业语言学类课程思政改革的立体化探索	罗璟昕	人文与法学学院
JG22038	重点项目	理论学习、实践练习与学术研究：“三位一体”的行政管理国家级一流专业建设优化路径研究	武玉坤	公共管理学院
JG22039	重点项目	基于中国特色金融发展视角的《投资学》课程思政教学改革与实践	董莹	经济管理学院
JG22040	重点项目	提高昆虫学实践课程教学效果的探索	岑伊静	植物保护学院
JG22041	重点项目	新农科背景下案例融合思政在《土壤生物学》教学中的应用探索	宋孟珂	资源环境学院
JG22042	重点项目	应用化学一流本科专业创新型人才培养“五融合”式实践教学体系的改革与探索	李春远	材料与能源学院
JG22043	重点项目	《数字图像处理》产教融合校企协同育人模式探索与实践	张宇	电子工程学院（人工智能学院）
JG22044	重点项目	基于OBE理念的非机械类工科专业“工程图学”课程重构	付函	工程学院
JG22045	重点项目	伟大“抗疫精神”融入水产动物免疫学课程思政改革	李言伟	海洋学院
JG22046	重点项目	基于校企协同育人的“线上线下”混合式教学对临床兽医诊断学课程的改革与实践	胡莲美	兽医学院
JG22047	重点项目	以学生为中心的《环境生态学》实践教学改革	陈杨梅	资源环境学院
JG22048	重点项目	农工融合促进“新农科”《农业机械化及精确农业》课程体系建设与实践	牟英辉	农学院
JG22049	重点项目	广东省“一流专业”背景下《森林昆虫学》课程：理论研究与实践探索	马涛	林学与风景园林学院
JG22050	重点项目	“双一流”背景下生物学学科与专业协同发展机制探究与实践	龚慧	生命科学学院
JG22051	重点项目	以市场为导向培养创新人才的教学改革与实践——以《食用菌栽培学》为例	赵普艳	园艺学院

JG22052	重点项目	试验统计学的混合式教学设计与实践	刘桂富	农学院
JG22053	重点项目	《园艺产品加工学》全英课程线上线下混合教学设计与实践	王凯	食品学院
JG22054	重点项目	新技术支持下素养拓展型在线开放课程的开发与应用	胡远慧	艺术学院
JG22055	重点项目	“双一流”农科高校实验技术队伍可持续发展研究	徐军	基础实验与实践训练中心
JG22056	重点项目	案例教学在工程经济学全过程教学中的应用研究	陈凯	水利与土木工程学院
JG22057	重点项目	生态语言学视角下大学英语课程思政课堂话语研究	余乐斌	外国语学院
JG22058	青年项目	项目驱动教学法——在集成电路课程中的创新与实践	韩宋佳	电子工程学院（人工智能学院）
JG22059	一般项目	“新农科”背景下《动物营养学》课程的改革与创新	张世海	动物科学学院
JG22060	青年项目	线上线下有机融合教学模式探索与实践——以《农业标准化体系》课程为例	安静	农学院
JG22061	青年项目	兽医寄生虫虚拟仿真实验教学	夏宁波	兽医学院
JG22062	青年项目	课程思政视域下大学英语写作课教学模式探究	魏丹纯	国际教育学院（广州都柏林国际生命科学与技术学院）
JG22063	一般项目	工程训练课程思政建设与教学实践	陈海波	基础实验与实践训练中心
JG22064	一般项目	我校耕读教育课程多维价值探究与实践——以林学与园林训练站为例	陈丽君	基础实验与实践训练中心
JG22065	一般项目	新农科背景下农林高校《气象学》课程思政的探索实践	王蕾迪	农学院
JG22066	一般项目	农事教育促进大学生社会情感能力发展的机制与路径——与华南农业大学A系列课程的研究	张雯闻	公共管理学院
JG22067	一般项目	“三全育人”背景下《常微分方程》课程思政改革与实践	王霞	数学与信息学院、软件学院
JG22068	青年项目	基于应用型人才培养的《大学物理》对分课堂教学模式研究	陈仕长	电子工程学院（人工智能学院）
JG22069	一般项目	植物认知类实验实践课程的“互联网+”教学研究——以微信小程序教学平台为例	张卓欣	林学与风景园林学院

JG22070	一般项目	草地与牧草类课程线上+线下理实一体化教学探索与实践	王晓亚	林学与风景园林学院
JG22071	一般项目	课程思政视域下线上线下混合式教学的改革与实践——以《光电检测技术与系统》课为例	胡旭波	电子工程学院（人工智能学院）
JG22072	一般项目	基于OBE 理念的C 语言程序设计公共课“五位一体化”思政育人研究与实践	高月芳	数学与信息学院、软件学院
JG22073	一般项目	水产养殖专业细胞生物学课程教学模式探索	魏世娜	海洋学院
JG22074	一般项目	双一流背景下兽医学科“本硕博一体化”培养模式探究	赵夏琼	兽医学院
JG22075	一般项目	基于生态文明建设理论的华南农业博物馆思政教育体系构建与实践	李薇	文博馆（档案馆、华南农业博物馆）
JG22076	一般项目	《大学生职业生涯规划与就业力提升》课程中的校企合作实践教学研究	梁春江	生命科学学院
JG22077	一般项目	机电一体化技术课堂教学改革——混合教学中线上线下教学一体化设计	陈瑜	工程学院
JG22078	一般项目	习近平劳动观融入高校思政课程体系的路径与实践研究	梁健晟	外国语学院
JG22079	一般项目	基于智慧课堂的《经济学基础》课程思政改革研究与设计	王雅君	林学与风景园林学院
JG22080	青年项目	《食品分析》课程思政的探索与实践	温棚	食品学院
JG22081	青年项目	基于工程教育认证的“以学生为中心”的《农产品加工学》教学改革	黄卫娟	食品学院
JG22082	一般项目	基于生物育种类专业人才培养的《遗传学》教学改革与实践	吴锦文	农学院
JG22083	一般项目	基于应用型人才培养的环境生态学教学改革与创新研究	杨海燕	水利与土木工程学院
JG22084	青年项目	前沿科学研究视角下《现代食品科学技术》多维教学体系的探索与实践	刘旭炜	食品学院
JG22085	一般项目	《茶叶生物化学》一流课程建设改革	孙彬妹	园艺学院
JG22086	一般项目	“引进-融合-创新”：将CrossFit融入高校体能课程的整体优化研究与实践	宋明伟	体育教学研究部
JG22087	青年项目	数智时代背景下《会计信息系统》课程教学改革与实践	宋冰洁	经济管理学院

JG22088	一般项目	“五育并举”时域下高校劳动教育课程实效性提升研究	方媛媛	生命科学学院
JG22089	一般项目	信息化背景下大学生数字能力对外语教学的作用机制及教学策略研究	刘华	外国语学院
JG22090	一般项目	无人机航测虚拟仿真实验教学改革与实践	万欢	资源环境学院
JG22091	一般项目	广播电视编导专业学生导演能力培养体系建设	胡年春	艺术学院
JG22092	自筹项目	立德树人理念下《宏观经济学》课程思政教学改革探索	段伟	经济管理学院
JG22093	自筹项目	基于“雨课堂+虚拟仿真实验”的《液压与气动》线上线下混合式教学研究	曾文	工程学院
JG22094	自筹项目	科普研学背景下生物多样性教学改革与实践	刘卫欣	植物保护学院
JG22095	自筹项目	基于六西格玛管理的提高《农科数学》教学质量的线上线下混合式教学探索与实践	卢建平	数学与信息学院、软件学院
JG22096	自筹项目	基于 OBE 理念的园林专业《文献综述与论文写作》课程教学模式研究	魏倩	林学与风景园林学院
JG22097	自筹项目	基于增值性评价的《数据库应用》课程思政教学研究与实践	张春玲	数学与信息学院、软件学院
JG22098	自筹项目	新媒体背景下高校音乐审美素质培育路径创新研究	黄越嘉	艺术学院
JG22099	自筹项目	课程思政理念下大学英语翻译模块课的教学改革与实践	林如心	外国语学院
JG22100	自筹项目	“新农科”背景下通识管理技能训练课程思政建设与实践	张少翊	基础实验与实践训练中心
JG22101	自筹项目	思政引领、能力为本—《绩效管理》课程教学改革与实践	郭萍	经济管理学院
JG22102	自筹项目	“双一流”背景下《动物生产类 综合实习》教学模式的创新与实践	陈伟国	动物科学学院
JG22103	自筹项目	“双一流”背景下大学数学教学研究与实践	夏英俊	数学与信息学院、软件学院
JG22104	自筹项目	基于虚拟现实技术的《汽车构造》沉浸式教学改革与实践	冯骁	工程学院
JG22105	自筹项目	大数据背景下以数据分析能力为导向的 农业院校数据库类课程的教学改革研究	黄文玲	数学与信息学院、软件学院

JG22106	自筹项目	科教产教融合背景下的《普通植物病理学》教学改革研究与实践	郑正	植物保护学院
JG22107	自筹项目	课程思政质量评价体系的实践与建设研究	钟琚	人文与法学学院
JG22108	自筹项目	“互联网+”背景下公选课混合教学模式的 研究与实践	张俊杰	林学与风景园林学院
JG22109	自筹项目	基于思政的《动物免疫学》专业课程改革与实践	张新珩	动物科学学院
JG22110	自筹项目	智慧校园背景下高校大学生体质健康信息化建设研究	李梅	体育教学研究部
JG22111	自筹项目	基于RISC-V架构的计算机系统能力培养机制探索	刘心	数学与信息学院、软件学院
JG22112	自筹项目	基于创新能力培养的《误差理论与测量平差基础》教学改革研究	李红伟	资源环境学院
JG22113	自筹项目	《园艺产品贮运学》课程思政教学改革与实践	邝健飞	园艺学院
JG22114	自筹项目	人工智能时代背景下的《Python语言程序设计》实验改革探究	王国华	数学与信息学院、软件学院
JG22115	自筹项目	智慧校园环境OA系统电子文件（教学类）归档规范研究	陆炜斌	文博馆（档案馆、华南农业博物馆）
JG22116	自筹项目	基于虚拟园林漫游平台的《园林规划与设计》教学改革与实践	徐锐	林学与风景园林学院
JG22117	自筹项目	“专创融合”视域下的《创新创业实践》课程教学 模式优化研究—以华南农业大学农科类专业为例	谈庆娟	植物保护学院
JG22118	自筹项目	“双一流”背景下《农业环境保护研究前沿》课程的思政建设和实践教学形式改革研究	林学明	资源环境学院
JG22119	自筹项目	课程思政背景下岭南艺术设计概论课程中活动课堂教学的实践与探索	高阳	艺术学院
JG22120	自筹项目	基于创新能力培养的《设计材料与加工工艺》课程教学改革研究与实践	金鸿	工程学院
JG22121	自筹项目	工程实践课程安全教育新方法的研究与实践	陈德鸿	基础实验与实践训练中心
JG22122	自筹项目	数字经济背景下《数据挖掘与大数据分析》 课程体系优化研究	伍敬文	经济管理学院
JG22123	自筹项目	基于“互联网+翻转课堂”的饲料 卫生学课程创新与实践	吴坤	海洋学院

JG22124	自筹项目	图解方法在因果推断教学中的应用及效果研究	洪炜杰	经济管理学院
JG22125	自筹项目	大学生文化认同教育生活化的路径和机制研究	朱红梅	马克思主义学院
JG22126	自筹项目	基于“超星泛雅平台”公共政策学课程的混合式教学一体化研究	宋星洲	公共管理学院
JG22127	自筹项目	基于云计算技术的管理类专业虚拟仿真实验教学方法的研究与实践——以《物联网技术与应用》为例	张凯	数学与信息学院、软件学院
JG22128	自筹项目	四新建设背景下涉农高校中文课程改革和整体优化研究与实践	白海英	人文与法学学院
JG22129	自筹项目	“OBE”理念下大学英语语音课程思政的融入研究	荣莉	外国语学院
JG22130	自筹项目	应用型人才培养模式下《茶叶加工学》教学方法改革研究与实践	张凌云	园艺学院
JG22131	自筹项目	经典原著融入“马克思主义基本原理”课参与式教学探索	韩淑梅	马克思主义学院
JG22132	自筹项目	中国乡村脱贫故事融入涉农高校思政课教学研究——以《毛泽东思想和中国特色社会主义理论体系概论》为例	黄煌华	马克思主义学院
JG22133	自筹项目	问题链教学法在《原理》课教学中的探索与实践	谢倩	马克思主义学院
JG22134	自筹项目	《思想道德与法治》课教学的教育叙事方法研究	吴佩婷	马克思主义学院
JG22135	自筹项目	现代信息技术与教学深度融合研究 ——以高校思政课课堂教学互动为例	林玲	马克思主义学院
zlgc22001	大学生社会实践教学基地	华华南农业大学广东省良种引进服务公司大学生社会实践教学基地	冯发强	农学院
zlgc22002	大学生社会实践教学基地	华南农业大学—广东驱动力生物科技集团股份有限公司大学生社会实践教学基地	孙宝丽	动物科学学院
zlgc22003	大学生社会实践教学基地	华南农业大学—南方都市报大学生社会实践教学基地	程启军	公共管理学院
zlgc22004	大学生社会实践教学基地	华南农业大学—中山榄菊日化实业有限公司大学生社会实践教学基地	江定心	植物保护学院
zlgc22005	科产教融合实践教学基地	华南农业大学—佛山市南海东方澳龙制药有限公司科产教融合实践教学基地	周武艺	材料与能源学院
zlgc22006	科产教融合实践教学基地	华农-大北农动物营养与饲料科学科产教融合实践教学基地	高春起	动物科学学院

zlgc22007	科产教融合实践教学基地	华南农业大学广东省建筑设计研究院有限公司科产教融合实践教学基地	李湛波	水利与土木工程学院
zlgc22008	课程教研室	影视动画创作课程教研室	涂先智	艺术学院
zlgc22009	课程教研室	遗传学教研室	刘向东	农学院
zlgc22010	课程教研室	农业经济学教研室	谭砚文	经济管理学院
zlgc22011	课程教研室	数学建模课程教研室	湛秋辉	数学与信息学院、软件学院
zlgc22012	课程教研室	植物检疫学课程教研室	何晓芳	植物保护学院
zlgc22013	课程教研室	营养与食品卫生课程教研室	柳春红	食品学院
zlgc22014	课程教研室	植物学教研室	白玫	生命科学学院
zlgc22015	课程教研室	管理通识训练课程教研室	库天梅	基础实验与实践训练中心
zlgc22016	课程教研室	土力学课程教研室	姜俊红	水利与土木工程学院
zlgc22017	现代产业学院	华南农业大学-拉多美集团产业学院	储成才	农学院
zlgc22018	专项人才培养计划	农林经济管理乡村振兴实验班人才培养实践探索	罗明忠	经济管理学院
zlgc22019	“大国三农”课程	土壤与生活	莫其锋	林学与风景园林学院
zlgc22020	“四新”示范课程	园艺产品营养与功能	王惠聪	园艺学院
zlgc22021	“四新”示范课程	社会保障导论	徐强	公共管理学院
zlgc22022	“四新”示范课程	风景园林与乡村振兴	黄家平	林学与风景园林学院
zlgc22023	全英课程	全球营销管理	姜百臣	经济管理学院
zlgc22024	全英课程	园艺植物栽培原理	赵竑博	园艺学院
zlgc22025	全英课程	国际法案例研习	顾方愉	人文与法学学院
zlgc22026	全英课程	药用植物与健康	胡伟慧	海洋学院
zlgc22027	全英课程	汽车电子应用技术	赵祚喜	工程学院
zlgc22028	全英课程	心理学概论	贾昕珊	公共管理学院
zlgc22029	全英课程	水污染物化处理工程	陈澄宇	资源环境学院
zlgc22030	全英课程	光电图像处理技术(Photoelectric Image Processing)	林上港	电子工程学院（人工智能学院）
zlgc22031	全英课程	社会语言学	李颖	人文与法学学院
zlgc22032	一流专业建设点	光电信息科学与工程	林芳	电子工程学院（人工智能学院）
zlgc22033	一流专业建设点	历史学	刘玲娣	人文与法学学院
zlgc22034	一流专业建设点	经济学	李琴	经济管理学院
zlgc22035	一流专业建设点	统计学	夏强	数学与信息学院、软件学院
zlgc22036	一流专业建设点	城乡规划专业	余美萱	林学与风景园林学院
zlgc22037	一流专业建设点	建筑学	闫恩诚	水利与土木工程学院
zlgc22038	一流专业建设点	音乐表演	郑颜文	艺术学院
zlgc22039	一流专业建设点	信息管理与信息系统	张大斌	数学与信息学院、软件学院
zlgc22040	在线开放课程	信息光学	翁嘉文	电子工程学院（人工智能学院）
zlgc22041	在线开放课程	水产动物组织胚胎学	范兰芬	海洋学院

zlgc22042	在线开放课程	海洋环境化学	黄玉妹	海洋学院
zlgc22043	在线开放课程	植物生理学	张雪莲	生命科学学院
zlgc22044	在线开放课程	现代物流管理	梁红梅	外国语学院

[illegible]

省级

省级

省级

省级

省级

省级

省级

省级

省级

省级

省级

省级

省级

省级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级

校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
校级
省级
省级
省级
省级
省级
省级

[illegible]

校级
校级
校级

华南农业大

序号	项目编号	项目类别	学院
1	ZLGC202401	专项人才培养计划	人文与法学学院
2	ZLGC202402	专项人才培养计划	公共管理学院
3	ZLGC202403	现代产业学院	资源环境学院
4	ZLGC202404	校企联合实验室	经济管理学院
5	ZLGC202405	校企联合实验室	材料与能源学院
6	ZLGC202406	校企联合实验室	食品学院
7	ZLGC202407	校企联合实验室	工程学院
8	ZLGC202408	科产教融合实践教学基地	动物科学学院
9	ZLGC202409	科产教融合实践教学基地	水利与土木工程学院
10	ZLGC202410	大学生社会实践教学基地	动物科学学院
11	ZLGC202411	大学生社会实践教学基地	工程学院
12	ZLGC202412	大学生社会实践教学基地	数学与信息学院、软件学院
13	ZLGC202413	大学生社会实践教学基地	公共管理学院
14	ZLGC202414	校级一流专业建设点	艺术学院
15	ZLGC202415	校级一流专业建设点	艺术学院
16	ZLGC202416	校级一流专业建设点	材料与能源学院
17	ZLGC202417	校级一流专业建设点	电子工程学院（人工智能学院）
18	ZLGC202418	课程教研室	材料与能源学院
19	ZLGC202419	课程教研室	水利与土木工程学院
20	ZLGC202420	课程教研室	农学院
21	ZLGC202421	课程教研室	数学与信息学院、软件学院
22	ZLGC202422	课程教研室	国际教育学院（广州都柏林国际生命科学与技术学
23	ZLGC202423	课程教研室	电子工程学院（人工智能学院）
24	ZLGC202424	课程教研室	马克思主义学院
25	ZLGC202425	课程教研室	工程学院
26	ZLGC202426	课程教研室	食品学院
27	ZLGC202427	大国“三农”课程	数学与信息学院、软件学院
28	ZLGC202428	大国“三农”课程	经济管理学院
29	ZLGC202429	大国“三农”课程	数学与信息学院、软件学院
30	ZLGC202430	大国“三农”课程	外国语学院

31	ZLGC202431	“四新”示范课程	公共管理学院
32	ZLGC202432	“四新”示范课程	材料与能源学院
33	ZLGC202433	“四新”示范课程	数学与信息学院、 软件学院
34	ZLGC202434	“四新”示范课程	人文与法学学院
35	ZLGC202435	“四新”示范课程	工程学院
36	ZLGC202436	“四新”示范课程	公共管理学院

2024年度校级质量工程项目立项

项目名称	负责人
涉外法治人才培养实验班	杜国明
公共管理新文科创新试验班与领导力培养试验班	史传林
低碳农业现代产业学院	余光伟
华农-知链绿色金融与数字技术创新联合实验室	蔡键
环境友好高分子材料联合实验室	张超群
熟成肉制品微生态精准调控实验室	方祥
农用户外电源联合实验室	杨丹彤
华南农业大学-广东爱健康清远麻鸡全产业链科产教融合实践教学基地	陈伟国
华南农业大学-盛方达本科生产研学培养基	王海洋
广东华农大新龙畜牧股份有限公司大学生社会实践教学基地	邓铭
广州市威控机器人有限公司	孙振刚
华南农业大学金蝶精一实践教学基地	张建桃
华南农业大学—广州市花都区梯面镇人民政府大学生社会实践教学基地	邓永超
广播电视编导专业	赵娜
环境设计专业	郑欣
家具设计与工程专业	胡传双
电子信息科学与技术专业	刘勇
生物质先进材料课程教研室	孙理超
建设工程造价课程教研室	李高扬
遗传学实验课程教研室	刘自强
智慧农业课程教研室	黄栋
学术英语模块课程协同育人虚拟教研室	冯立新
电子信息工程专业课程教研室	孙道宗
国家安全与国防教育教研室	王向方
智能车辆电子控制技术课程教研室	李庆
葡萄酒科学与文化课程教研室	廖振林
《Python语言程序设计基础》	熊俊涛
《经济统计学》	吕玉红
《网络安全技术与实践》	宋歌
《农业科技英语新闻听读》	李舸

《公益慈善学概论》	廖慧卿
《医药生物材料学》	胡洋
《数据素养与统计思维》	肖莉
《乡村非物质文化遗产》	关溪莹
《产品设计方法学》	高锐涛
《区域规划》	李玮

名单

项目组成员
赵艳萍、刘傲冬、钟继军、王琳、王慧、顾方瑜、官隆清
唐斌、蔡茂华、王希、袁中友、贾海薇、廖杨、古佳妍、余祥
仇荣亮、郭勇军、舒迎花、张池、邓兰生、姚朝龙、梁瑜海、李择桂、郑芊、刘可星、陈扬梅等专任教师、行业教师20人
董莹、张沁岚、周伟、苏柳方、李巧璇
罗颖、刘威、张淑婷、王洋、董先明、徐悦华、方丹迪、李宗翰、沈镇坤、陈棋锐
钟青萍、廖振林、王洁、艾民珉
黄世醒、张亚莉、黄燕娟、范金凤、赖轲
谢青梅、孙宝丽、张新珩、李鸿鑫
王海洋、张敏、李庚英、陈幸斌
陈飞洋、李耀坤、徐智城、贾坤、刘天增、何杰、刘德武、郭勇庆、孙宝丽、柳广斌
赵祚喜、周学成、漆海霞、莫嘉嗣、孔莲芳、梅慧兰、胡仁俊
宋世领、陈炜颖、余平祥、吴春胤、杨振刚、邓成剑、黄文玲、韦婷婷
高云华、林玲、张小娟、苏亭、朱泽坤
李俊良、张帆、胡辉、郑文华、唐涤非、王柯、胡年春、王新锋、梁松清
陈薇薇、冯悦、黄鑫、胡朝晖、李春、翁威奇、李女仙、邱巧玲、戚芳妮
王清文、涂登云、郭琼、孙理超、易欣、宋杰、林秀仪、鲁群霞、周宁昌
杨意、成兰仙、欧阳强强、林祖芳、楼群、林上港、严炳辉、罗志环、贾维卿、陈金华
郝笑龙、周海洋、易欣、欧荣贤、李丽萍、郭垂根、孙瑾、云虹、王清文
陈幸斌、黄俐、李庚英、陆金驰、李东南
王少奎、谢庆军、胡斌、王兰、李楠
黄琼、胡炼、王燕、陈湘骥、崔金荣、高月芳、肖媚燕、涂淑琴
Alex Runchman、梁红梅、Stephen Kelly、苏安梅、侯丽娴、秦建华、周美珍、邵家声、郝刚、Paul Fanning、Li Chenguang、柯蔓、Laurisha、Daniel、David、Sean Hall
李震、吕石磊、薛秀云、高鹏、代芬、胡洁、宋淑然、王文博、徐梅宣、陈 楚、郭琪、姜晟、殷惠莉
李永宝、曹汉林、欧阳娟、伍鹏、杨松霖、聂锐、黄煌华
李君、陈学深、吴双龙、肖博一、施琳琳、周锡恩
薛红卫、徐振林、黄旭明、王洁、曾仁芳
黄文玲、邓成剑、骆威、邓金
尹爱兰、范文正、李宗璋、洪炜杰、张志珂 、张旭
张凯、赵丽宁
沈文静、余乐斌、朱婕

卓彩琴、张开云、徐强、陈玉生、苏巧平、曾永辉、唐晓容
倪春林、杨卓鸿、刘彦祺、楚状状、温青
周燕、刘曼莉、杨志程、夏英俊、夏强、刘吉平、谭砚文
田华、翟麦玲、李飞、陈琦
胡炼、曾智林、汪隼、杨慧珠、郭涵、张焕林、曾志雄
吴顺辉、孙传淳、高艳梅、王玉琳、刘卓君

“一体两翼三轮驱动”
获奖成果：的德才双修创新型人才
培养模式研究与实践

获奖者：谢青梅、邓 铭、
张海平、张永亮、
付晓兰、伍亚泰、
江青艳、陈飞洋、
李曼华、陈伟国

获奖等级：一等奖

证书编号：JXCG19003





第九届广东省教育教学成果奖
(高等教育)

获奖证书

获奖成果：“一体两翼三轮驱动”的德才双修
创新型人才培养模式研究与实践

获奖者：谢青梅、邓铭、付晓兰、张永亮、
张海平、伍亚泰、江青艳、陈伟国

获奖等级：一等奖

证书号：GJ20191025



课题编号： 2021YFD1300105

国家重点研发计划 子课题任务书

子课题：黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性改良解析

所属专项：畜禽新品种培育与现代牧场科技创新

所属项目：黄羽肉鸡育种技术创新与新品种培育

所属课题：黄羽肉鸡新品种培育及推广

委托部门（甲方）： 广东温氏南方家禽育种有限公司

承担部门（乙方）： 华南农业大学

2021 年 12 月

填写说明

- 1、任务书为课题验收的依据，其各项内容应尽可能详细填写。
- 2、课题目标要强调形成主导品种（产品、装备）、主推技术、重要标准（规程规范）、决策支持方案、知识产权等；考核指标应具体、量化、可考核。按已提交的实施方案进行填报，不得私自减少任务指标。
- 3、经费的使用应严格按有关经费管理办法执行。
- 4、开户银行及账号应是课题参加单位计财部门的开户行和账号。
- 5、本任务书要求用 A4 纸、正文四号仿宋_GB2312。
- 6、任务书正式文本一式五份，课题主持单位三份、课题参与单位两份。

课题名称		黄羽肉鸡新品种培育及推广					
子课题名称		黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性改良解析					
所属项目		黄羽肉鸡育种技术创新与新品种培育					
所属专项		畜禽新品种培育与现代牧场科技创新					
子经费预算		总需求 50 万元，其中中央财政专项资金需求 50 万元					
子课题周期节点		起始时间	2021 年 11 月		结束时间	2026 年 11 月	
		实施周期	共 60 个月		预计中期时间点	2024 年 05 月	
课题承担单位	单位名称	广东温氏南方家禽育种有限公司			单位法定代表人姓名	林东	
	单位性质	其他企业			组织机构代码	91445321723836602F	
	单位主管部门	新兴县市场监督管理局			隶属关系	地方	
	单位所属地区	广东省			地市（市、自治州、盟）	云浮市新兴县	
	通信地址	广东省新兴县东堤北路 6 号			邮政编码	527400	
	单位开户名称	广东温氏南方家禽育种有限公司					
	开户银行（全称）	中国工商银行股份有限公司新兴支行			汇入地点	广东省 云浮市	
	银行账号	2020003209024915265			银行机构代码	102593800328	
课题负责人	姓 名	张德祥	性 别	<input checked="" type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女		出生日期	1967-11-13
	证件类型	身份证	证件号码	230106196711132039			
	所在单位	广东温氏南方家禽育种有限公司					
	最高学位	<input checked="" type="checkbox"/> 博士 <input type="checkbox"/> 硕士 <input type="checkbox"/> 学士 <input type="checkbox"/> 其他					
	职 称	<input checked="" type="checkbox"/> 正高级 <input type="checkbox"/> 副高级 <input type="checkbox"/> 中级 <input type="checkbox"/> 初级 <input type="checkbox"/> 其他				职务	副总经理
	电子邮箱	Zhangdexiang0001@sina.com		移动电话		13600239070	
子课题承担单位	单位名称	华南农业大学	单位法定代表人姓名	刘雅红			
	单位性质	大专院校	组织机构代码	124400004554165634			

	单位主管部门	广东省教育厅		隶属关系		地方		
	单位所属地区	广东省		地市（市、自治州、盟）		广州市天河区		
	通信地址	广州市天河区五山路 483 号		邮政编码		510642		
	单位开户名称	华南农业大学						
	开户银行（全称）	中国工商银行股份有限公司广州五山支行		汇入地点		广东省广州市		
	银行账号	3602002609000310520		银行机构代码		102581000546		
子课题负责人	姓 名	陈伟国		性 别	<input checked="" type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女		出生日期	1981-09-06
	证件类型	身份证		证件号码	441502198109065051			
	所在单位	华南农业大学						
	最高学位	<input type="checkbox"/> 博士 <input checked="" type="checkbox"/> 硕士 <input type="checkbox"/> 学士 <input type="checkbox"/> 其他						
	职 称	<input type="checkbox"/> 正高级 <input checked="" type="checkbox"/> 副高级 <input type="checkbox"/> 中级 <input type="checkbox"/> 初级 <input type="checkbox"/> 其他				职务	高级实验师	
	电子邮箱	wgchen81@scau.edu.cn		移动电话	13632446076			

一、课题的简述

加强黄羽肉鸡良种培育、开发和利用，提升黄羽肉鸡种业创新水平与产业支撑能力，本课题以多元化的黄羽肉鸡配套系为素材，利用黄羽肉鸡表型智能化精准测定、功能基因挖掘与新型基因组选择、基因编辑抗病育种等精准育种技术，加快以屠宰型黄羽肉鸡为导向的专门化品系的持续选育，重点解决饲料转化效率、胴体性状、肉品质性状、繁殖性状等传统育种方法难以选择或者选择进展缓慢的痛点和难点；建立生长、繁殖和胴体性状等性能优异的核心育种群 4-6 个，培育新品种（配套系）3-5 个，推动“十”“千万”“亿”育种工程在黄羽肉鸡育种中落地推广，形成大规模示范效应，造好肉鸡“中国芯”，满足我国不同区域市场需求，保障我国种业安全。

二、子课题的主要考核指标

- (1) 鉴定黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性分子标记 1-2 个；
- (2) 解析 10 个黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病遗传抗性的改良潜力；
- (3) 发表 SCI 论文 1 篇；
- (4) 申请国家发明专利 1 项。

三、子课题的研究主要内容

(1) 发掘与鉴定有重要育种价值的禽白血病遗传抗性分子标记

开展黄羽肉鸡品种（品系）禽白血病病毒受体基因的遗传多样性研究，筛选禽白血病病毒受体基因的遗传变异位点，研究受体基因遗传变异位点对病毒感染、受体基因表达、病毒与受体结合能力的影响，开发有重要育种价值的禽白血病遗传抗性分子标记。

(2) 建立禽白血病遗传抗性标记的分子诊断技术

基于 PCR-RFLP 等方法，建立禽白血病遗传抗性标记的分子诊断及其基因分型方法，以用于黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性的标记辅助选育。

(3) 不同黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病遗传抗性的改良解析

精准鉴定 10 个黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病遗传抗性表型-基因型数据，剖析不同鸡种对不同亚群禽白血病抗性的遗传改良潜力。

四、子课题年度分工与实施计划

2021 年 12 月 至 2022 年 5 月	任务:	发掘与鉴定黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性分子标记
	考核指标:	样本采集、DNA 的提取
	成果形式:	进展报告
2022 年 6 月 至 2022 年 11 月	任务:	发掘与鉴定黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性分子标记
	考核指标:	筛选黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性分子标记
	成果形式:	课题年度技术进展报告
2022 年 12 月 至 2023 年 5 月	任务:	发掘与鉴定黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性分子标记
	考核指标:	分析关联标记基因
	成果形式:	进展报告
2023 年 6 月 至 2023 年 11 月	任务:	发掘与鉴定黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性分子标记
	考核指标:	鉴定禽白血病遗传抗性分子标记 1-2 个
	成果形式:	申请国家发明专利 1 项, 课题年度技术进展报告
2023 年 12 月 至 2024 年 5 月	任务:	建立禽白血病遗传抗性标记的分子诊断技术
	考核指标:	建立禽白血病遗传抗性标记的分子诊断技术 1-2 项
	成果形式:	课题中期技术进展报告
2024 年 6 月 至 2024 年 11 月	任务:	精准鉴定黄羽肉鸡品种(品系)对不同亚群禽白血病遗传抗性表型-基因型数据
	考核指标:	建立表型-基因型数据库

	成果形式:	课题年度技术进展报告
2024 年 12 月 至 2025 年 5 月	任务:	精准鉴定黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病遗传抗性表型-基因型数据
	考核指标:	继续扩大基因型-表型数据库
	成果形式:	进展报告
2025 年 6 月 至 2025 年 11 月	任务:	精准鉴定黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病遗传抗性表型-基因型数据
	考核指标:	分子标记的应用
	成果形式:	课题年度技术进展报告
2025 年 12 月 至 2026 年 5 月	任务:	精准鉴定黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病遗传抗性表型-基因型数据
	考核指标:	发表 SCI 论文 1 篇
	成果形式:	发表 SCI 论文 1 篇
2026 年 6 月 至 2026 年 11 月	任务:	精准鉴定黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病遗传抗性表型-基因型数据
	考核指标:	禽白血病遗传抗性分子标记的推广使用
	成果形式:	课题最终科技报告

五、参加人员名单

	姓名	单 位	年龄	性别	职称/职务	责任分工	手机号	邮箱
主 持 人	陈伟国	华南农业大学	40	男	高级实验师	发掘与鉴定黄羽肉鸡禽白血病遗传抗性分子标记	13632446076	wgchen81@scau.edu.cn
参 加 人								

白江湖

158 2 1 1

六、年度经费预算表

序号	预算科目名称	金额（万元）
	(1)	(2)
1	一、中央财政专项资金	50
2	(一) 直接费用	42.85
3	1. 设备费	0
	(1) 购置设备费	0
	(2) 设备试制/改造/租赁费	0
4	2. 业务费（材料费、测试化验加工费、燃料动力费、出版/文献/信息传播/知识产权事务费）	32.79
5	3. 劳务费（会议/差旅/国际合作交流费、劳务/专家咨询费、其他支出）	10.06
6	(二) 间接费用（自动计算）	7.15
7	二、其他来源资金	0
8	三、合计	50

七、共同条款

签约各方共同遵守《国务院办公厅关于改革完善中央财政科研经费管理的若干意见》（国办发[2021]32号）等有关规定。

1. 课题经费要专款专用，不得挪作它用。经费的使用要严格按照有关规定执行。若经费超支，由乙方自筹解决，但不得因此影响课题的执行。
2. 甲方根据相关规定，监督乙方经费的使用情况。凡不符合规定的开支，甲方负责提出调整意见。
3. 任务执行过程中，乙方如需调整任务，应根据有关规定，向甲方提出变更内容的申请报告，经甲方审核后逐级上报项目组织部门、科技部审定后实施。未接到正式批准书以前，双方须按原任务书履行，否则后果由自行调整的一方负责。
4. 乙方因某种原因（如：与可行性研究内容有出入、挪用经费、技术措施或某些条件不落实）致使计划无法执行，并要求中止任务，应视不同情况，部分或全部退还所拨经费；若乙方没有提出中止任务的要求，甲方根据调查情况有权提出中止任务的建议，经上报项目组织部门、科技部审核批准后执行。
5. 乙方因不可抗力不能履行任务书规定的工作内容时，应及时通知甲方，并在合理期间内出具不能履行的证明。
6. 乙方应保证课题负责人及主要承担人员的稳定，不得随意调换；如确需调换，应征得甲方同意，否则，由于人员安排问题造成课题不能正常实施，其损失由乙方负责。
7. 课题承担单位要严格按本任务书履行承担的任务，并于每年年底前，提交课题年度执行情况总结、经费决算及下年度工作计划。如不能按期完成本年度计划指标，项目负责人会同项目执行委员会成员有权对项目进行审核、缓拨经费，直至停止合同，撤销课题处理。
8. 课题结束后，乙方应根据有关要求，向甲方提交验收申请，由甲方组织有关专家，依据任务书的内容对课题进行验收。
9. 本课题形成的成果统一标注“国家重点研发计划经费资助”（编号 **2021YFD1300100**），SCI 论文第一标注（**National Key R&D Program of China, Grant No. 2021YFD1300100**）。
10. 本任务书签订各方均负有相应责任。若有争议或纠纷时，按照有关规定处理。

八、合同签约各方

甲方（委托方）：

广东温氏南方家禽育种有限公司（公章）

单位法人：（签章）



课题负责人：（签字）

2021年12月26日

陈良平

乙方（承担方）：

华南农业大学（公章）

单位法人：（签章）

刘永红

子课题负责人：（签字）

2021年12月31日

陈伟明

项目编号：2021XCDZX003

清远市科技计划项目
“抗禽白血病清远麻鸡新品种的选育与推广”
课题合同书

项目名称：抗禽白血病清远麻鸡新品种的选育与推广

项目起止时间：2021年06月09日至2024年05月31日

项目负责人：邝智祥 联系电话：15816298393

项目承担单位：广东爱健康生物科技有限公司

课题名称：清远麻鸡禽白血病抗性品系的选育

课题负责人：陈伟国 联系电话：13632446076

课题承担单位：华南农业大学



一、项目主要研究内容

1. 精准鉴定清远麻鸡纯系对不同亚群禽白血病病毒的抗性表型，构建表型-基因型数据库。

2. 创制抗禽白血病的清远麻鸡新种群和育种新材料。

3. 开展抗禽白血病清远麻鸡核心育种群的禽白血病抗性表型验证。

二、项目验收指标

序号	指标	结题考核 指标值	评测方式/方法
1	数据库	1 个	相关实验照片、记录、技术方案或论文等
2	专利	1 件	申请或授权证书等
3	论文	1 篇	发表或接收函等
4	人才培养	1 人	毕业论文、毕业证书、职称证书等

注：根据实际情况填写指标相关内容。

三、进度计划

起止时间	主要工作内容
2021.7.1- 2022.6.30	(1) 鉴定清远麻鸡 A、K 亚群禽白血病抗性表型-基因型信息； (2) 鉴定清远麻鸡 B、D、E 亚群禽白血病抗性表型-基因型信息； (3) 鉴定清远麻鸡 J 亚群禽白血病抗性表型-基因型信息。
2022.7.1- 2023.6.30	(1) 构建清远麻鸡禽白血病遗传抗性表型-基因型数据库； (2) 利用分子标记辅助选择，开展清远麻鸡禽白血病抗性品系的选育。
2023.7.1- 2024.5.31	(1) 持续开展清远麻鸡禽白血病抗性品系的选育； (2) 清远麻鸡禽白血病抗性新品系的禽白血病抗性表型验证； (3) 结题验收。

四、参与人员信息

序号	姓名	性别	职称/职务	学位	本课题承担任务	所在单位
1	陈伟国	男	高级实验师	博士	组建抗禽白血病清远麻鸡核心育种群	华南农业大学
2	谢青梅	女	教授	博士	技术培训与指导	华南农业大学
3	李鸿鑫	男	实验师	硕士	清远麻鸡核心育种群的禽白血病抗性表型验证	华南农业大学
4	张新珩	女	无取得	博士	清远麻鸡禽白血病抗性表型-基因型信息库建立	华南农业大学
5	聂瑜	男	硕士研究生	学士	鉴定清远麻鸡 A、K 亚群禽白血病抗表型-基因型信息	华南农业大学
6	李文雪	女	硕士研究生	学士	鉴定清远麻鸡 B、D、E 亚群禽白血病抗表型-基因型信息	华南农业大学
7	徐慧娟	女	硕士研究生	学士	鉴定清远麻鸡 J 亚群禽白血病抗表型-基因型信息	华南农业大学

五、项目经费

项目经费预算：			15	（单位：万元）
	清远市科技局经费			
支出经费	经费额	用途说明		
1、直接费用	11.1			
(1) 设备费	0	无		

(2) 材料费	2	购买分子生物学试剂及耗材费用。
(3) 测试化验加工外协费	4	用于基因测序及引物合成费等。
(4) 燃料动力费	0	无
(5) 差旅费/会议费/国际合作与交流费	0.6	开展省内外实验研究的差旅费、参加国内相关学术会议费、项目研讨会等。
(6) 出版/文献/信息传播/知识产权事物费	1.5	用于支付论文版面费、资料打印及复印费用、专利申请及其他知识产权事务等费用。
(7) 劳务费	3	用于支付参加项目研究的研究生劳务补贴等。
(8) 人员费	0	无
(9) 专家咨询费	0	无
(10) 直接费用其他支出	0	无
2、间接费用	3.9	
(1) 间接成本	0	无
(2) 管理成本	0.9	项目管理费用。
(3) 绩效支出	3	项目组成员绩效费用。
3、其他支出费用	0	无
合计	15	

六、知识产权对策、成果管理及合作权益分配

- 1.项目实施过程中所产生的知识产权，优先执行任务下达单位的知识产权管理政策，在此前提下，作如下规定：
 - ①本项目各方独立完成的所有权归各自所有；双方共同完成的由双方共享，具体按照双方的贡献大小进行分配或双方另行商定。
 - ②双方共有的知识产权（含成果、专利等）的转让，须在双方同意的前提下进行，任何一方不得私自转让或许可实施。
2. 项目成果申报各级奖项，双方单位排名根据具体情况另行商定，人员排名原则上按贡献大小先后排名。
3. 与本项目相关的论文、论著等成果公开发表时，应将本项目名称或项目编号进行标注。

七、任务书条款

第一条	甲方、乙方为顺利完成 2021 年抗禽白血病清远麻鸡新品种的选育与推广专项项目（文件编号：清科函【2021】68 号）经协商一致，特签署本课题合同书，作为甲乙双方在项目实施管理过程中共同遵守的依据。
第二条	甲方的权利和义务： <ol style="list-style-type: none">1. 按合同规定进行经费核拨的有关工作协调。2. 根据甲方需要，在不影响乙方工作的前提下，定期或不定期对乙方项目的实施情况和经费使用情况进行检查或抽查。
第三条	乙方的权利义务： <ol style="list-style-type: none">1. 按合同书规定，对甲方核拨的经费实行专款专用，单独列账，并随时配合甲方进行监督检查。2. 使用财政资金采购设备、原材料等，按照《广东省实<中华人民共和国招标投标法>办法》有关规定，符合招标条件的须进行招标。3. 项目实施完成或实施到一定程度，须按照《清远市科技计划项目结题管理的实施细则（试行）》提出验收或终止结题的申请，并按甲方要求做好项目结题工作。

	4. 在每年的 12 月向甲方如实提交上年度工作情况报告，报告内容包含上年度项目进展情况、经费决算和取得的成效等。项目验收时，须提交验收科技报告。
第四条	在履行本合同过程中，需要对项目起止时间、项目经费使用（包括自筹经费、经费分配及经费支出预算等）、项目内容（包括研发内容、技术指标、经济指标及成果指标等）、项目名称、项目承担单位（包括承担单位更名、承担单位替换）、参与单位、项目负责人和成员等进行变更的，甲乙双方须按照《清远市科技计划项目合同书管理的实施细则（试行）》有关规定执行。
第五条	在履行本合同的过程中，当事人一方发现可能导致项目整体或部分失败的情形时，应及时通知另一方，并采取适当措施减少损失，没有及时通知并采取适当措施，致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担责任。
第六条	乙方违法约定造成项目工作停滞、延误或失败，未能通过验收，应承担违约责任。
第七条	本项目技术成果的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享，除双方另有约定外，按国家、广东省和清远市有关法规执行。
第八条	属技术保密的项目，甲、乙双方应另行订立技术保密条款，作为本合同书正式内容的一部分，与本合同具有同等效力。
第九条	根据项目具体情况，经双方另行协商订立的附加条款，作为本合同正式内容的一部分，与本合同具有同等效力。
第十条	本合同书一式四份，各份具有同等效力。甲、乙双方各留存两份，本合同自签订之日起生效，有效期至项目结题后一年内。各方均应负任务书的法律责任，不应受机构、人事变动的影响。
第十一条	<p>违约责任：</p> <p>违法本合同约定，违方应承担违约责任。</p> <p>1. 违法本合同第三条第一项约定，乙方应承担违约责任，承担方式和违约金如下：</p> <p>（1） 合同解约。</p> <p>（2） 乙方退还已核拨的经费，并自行承担由此引起的损失。</p>

	<p>2. 违法本合同第六条约定，乙方应承担违约责任，承担方式和违约金额如下：</p> <p>（1） 退还甲方已核拨的经费。</p> <p>（2） 按已核拨经费的 20%支付违约金。</p>
第十二条	<p>保密条款：</p> <p>1. 本任务书保密内容范围为：</p> <p>无。</p> <p>2. 本任务书保密期限为：</p> <p>无。</p> <p>3. 乙方应与可能知悉保密内容的人员签订技术秘密保护协议。</p> <p>4. 各方应建立技术保密保护制度。</p> <p>5. 属技术保密的项目必须经市负责技术保密部门的审查后，确定可否发表或用于国际合作和交流。</p>
第十三条	<p>保证条款（可有保证人和被保证人另行约定）</p> <p>1. 当乙方不履行或不完全履行本合同，以及没有或没有完全违约责任时，保证人承担一般担保责任。</p> <p>说明：</p> <p>1. 本合同书中，凡是当事人违约无需填写的条款，应在该条款的空白处划（/）。</p> <p>2. 委托代理人签订本合书的，应出具合法、有效的委托书。</p>



八、签约各方

项目承担单位（甲方）：广东爱健康生物科技有限公司

项目负责人：

陈伟

项目联系人：

林子乾

开户单位名称：广东爱健康生物科技有限公司

开户银行：中国农业银行

开户账号：44690301040002492

2022年9月6日

课题承担单位（乙方）：华南农业大学

课题负责人：

陈伟

课题联系人：

徐慧娟

开户单位名称：华南农业大学

开户银行：中国工商银行广州五山支行

开户账号：3602002609000310520

2022年9月7日

2020 年广州市农村科技特派员项目

合同书

项目名称: 禽白血病遗传抗性与抗病选育技术的示范推广

项目负责人(乙方): 陈伟国

项目负责人联系电话: 13632446076

项目对接企业(合作社)(丙方): 广州市钊辉养殖有限公司

科技特派员所属单位(丁方): 华南农业大学

项目管理单位(甲方): 广东省农业科学院

项目起止年限: 2020 年 9 月至 2022 年 6 月

广东省农业科学院制



扫描全能王 创建

一、特派员及团队基本情况

(一) 负责人简介 (包括专业背景、工作经历、有无特派员工作经历等);

陈伟国, 博士, 硕士生导师。本人在动物健康养殖与安全生产学科领域的教学、科研和产学研合作方面有深入研究。近年来主持了国家自然科学基金 1 项、广东省重点领域研发计划项目子课题 1 项、广东省自然科学基金重点项目 1 项, 主持企业横向科研项目 3 项, 参加国家“十三五”重点研发计划、国家自然科学基金和广东省自然科学基金研究团队项目等重大课题 13 项。发表学术论文 38 篇 (SCI 收录论文 22 篇), 其中以第一作者 (或通讯作者) 在 Journal of Virology、Scientific Reports、Poultry Science 等国际著名期刊上发表 SCI 论文 12 篇, 中文核心期刊 8 篇; 申请国家发明专利 7 件, 获授权专利 2 件。曾获得广东省科学技术奖三等奖 (第 4 完成人) 和广东省农业技术推广奖一等奖 (第 2 完成人) 各 1 项。

本人现为广东省家禽产业技术体系秘书、广东省家禽产业技术体系创新团队首席专家团队成员, 广东省畜牧兽医学会理事。本人为广东省农村科技特派员, 广州市、中山市农村科技特派员, 具有 6 年以上的省、市级农村科技特派员工作经历。同时担任广东爱健康生物科技有限公司、广州壹号食品有限责任公司技术顾问, 长期在清远、广州、云浮和中山等地、市开展畜禽健康养殖与疾病控制、家禽抗病育种的科技服务工作。

(二) 团队成员简介 (包括专业背景、工作经历等);

谢青梅, 博士, 教授、博士生导师, 广东省高校“珠江学者”特聘教授、广东省第十二次党代会代表、广东省家禽产业技术体系首席专家、广东省高等学校“千百十工程”培养对象。现任华南农业大学科学发展研究院院长, 兼任广东省动物病毒载体疫苗工程技术研发中心, 广东省畜禽健康养殖与环境控制企业重点实验室副主任, 中国畜牧兽医学会禽病学理事、动物微生态学分会常务理事、世界家禽学会会员。主要从事动物营养与免疫、动物免疫与安全生产以及家禽疾病防控等教学科研工作。2011-2012 年赴美国农业部农业研究中心禽病与肿瘤研究所和美国密歇根州立大学访问学习。近 5 年以来, 承担国家“十三五”重大科技项



目、863 计划、国家自然科学基金、广东省重点领域研发计划项目等课题 25 项,主持科研经费 2100 多万元。发表学术论文 200 多篇,其中 SCI 收录论文 76 篇(其中第一作者或通讯作者发表 SCI 论文 56 篇,且以主要共同作者在 Nature 杂志上发表 SCI 论文 1 篇)。申请国家发明专利 37 件,获授权专利 14 件。曾获得广东全省科学技术三等奖、广东省农业技术推广一等奖等科研成果奖励 9 项,曾获“全国巾帼建功标兵”、“南粤优秀教师”、“广东省畜牧兽医杰出科技工作者”、“广州市优秀女科技工作者”等荣誉称号。

(三) 近 5 年科研及推广成果简介;

(1) 科研成果简介

禽白血病是由禽白血病病毒(ALV)引起的一类禽免疫抑制性肿瘤性传染病。可自然感染鸡群的 ALV 包括 ALV-A~E、J 和 K 7 个亚群。ALV 可引起感染鸡群产生免疫抑制、生产性能下降,乃至发生特征性肿瘤而死亡,给世界养禽业造成了重大经济损失。不同亚群的 ALV 由相应的细胞表面特异性受体介导侵入宿主细胞,继而发生感染。*tva*, *tvb* 和 *chNHE1* 基因分别编码 Tva、Tvb 和 NHE1 受体蛋白,分别决定宿主细胞对 ALV-A/K、ALV-B/D/E 和 ALV-J 感染的易感性或抗性。受体基因的遗传突变会导致受体蛋白的完全缺失或表达一个缺陷型受体蛋白,从而引起宿主对 ALV 的感染产生遗传抗性与抗病。

本团队长期从事鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术研究及其产业化应用。本团队首次从中国鸡种中发掘与鉴定了 *tva*^{r5}、*tva*^{r6}、*tva*^{r7}、*tva*^{r8} 和 *tva*^{r9} 等 5 个 ALV-A/K 遗传抗性位点,利用焦磷酸测序和直接测序方法,建立了 9 种 ALV-A/K 遗传抗性位点(*tva*^{r1}、*tva*^{r2}、*tva*^{r3}、*tva*^{r4}、*tva*^{r5}、*tva*^{r6}、*tva*^{r7}、*tva*^{r8} 和 *tva*^{r9})的分子诊断及其基因分型方法,创建了 1 套 A、K 亚群禽白血病遗传抗性选育技术。首次从中国鸡种中发掘与鉴定了 *tvb*^{r3}、*tvb*^{r4} 和 *tvb*^{r5} 等 3 个 ALV-B/D/E 遗传抗性位点,利用 PCR-RFLP 和直接测序方法,建立了 5 种 ALV-B/D/E 遗传抗性位点(*tvb*^{r1}、*tvb*^{r2}、*tvb*^{r3}、*tvb*^{r4} 和 *tvb*^{r5})的分子诊断及其基因分型方法,创建了 1 套 B、D、E 亚群禽白血病抗性选育技术。利用 BSP 测序和 PCR-RFLP 方法,建立了 2 种 ALV-J 抗性与抗病位点(TGFB2 基因启动子区 chr3:18755007 位点甲基化、ALV-J 的 NHE1 受体蛋白第 38 位氨基酸(色氨酸)缺失(NHE1ΔW38))的分子诊断及其基因分型方法,创建了 1 套 J 亚群禽白血病抗性/抗病选育技术。



本团队通过发掘中国鸡种 ALV-A/K、ALV-B/D/E 和 ALV-J 的遗传抗性与抗病位点，建立了一系列 ALV-A/K、ALV-B/D/E 和 ALV-J 抗性与抗病位点的分子诊断技术，构建了 ALV 遗传抗性与抗病位点的分子诊断技术平台，创建了不同亚群禽白血病遗传抗性与抗病的选育方法，集成了综合性的禽白血病遗传抗性与抗病选育技术体系。2019 年 9 月，研究成果“鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术研究与应用”完成了成果评价，评价专家组一致认为该科技成果整体达到国际先进水平。

(2) 推广成果简介

2015 年起，本团队围绕“高校+企业+基地”为核心的农科教合作推广模式，以点带面、点面结合，在广东、广西、江苏等优质鸡主产区全面开展了禽白血病遗传抗性选育技术的推广应用。2015-2018 年，该技术累计推广应用祖代（纯系）种鸡 53.1 万套。根据应用单位反馈的情况，应用本项目技术成果后，祖代种鸡 ALV 阳性率降低了 3-5%，父母代种鸡 ALV 阳性率降低了 4.5-7%，产蛋率提高了 5-7%，种鸡产蛋期死淘率下降了 2.0-3.5%，商品肉鸡存活率提高了 2.5-4%。该技术成果的推广应用累计创造总经济效益 47.5 亿元，带动农民总收入 12.1 亿元。该技术成果的推广应用有助于提高禽白血病的净化效率，加快禽白血病的净化进程，保障了广东省乃至我国优质鸡的种业安全，实现了我省优质鸡产业的提质增效，为农民增收致富和推动优质鸡产业转型升级提供了技术保障。2018 年，研究成果“优质鸡 A、B、J 亚群禽白血病抗性选育技术的推广应用”获得广东省农业技术推广奖一等奖。

(3) 近 5 年本人与本项目相关的科研成果如下：

1. 科研项目

- 1) 广东省重点领域研发计划项目子课题，2020B020222001，抗禽白血病黄羽肉鸡新品种培育，2020/01-2024/12，300 万，主持。
- 2) 国家自然科学基金青年基金项目，31602053，tva 受体基因插入/缺失突变致宿主抗 A 亚群禽白血病病毒感染的机制研究，2017/01-2019/12，24 万，主持。
- 3) 广东省自然科学基金重点项目，2018B030315009，禽免疫抑制性病原致病机制的研究，2018/05-2021/04，50 万，主持。



4) 广东省自然科学基金研究团队项目, S2013030013313, 中国地方鸡种禽白血病遗传抗性分子基础研究, 2013/08-2018/08, 200 万, 参加。

2. 代表性论文 (#表示共同第一作者)

1) Chen W (陈伟国), Liu Y, Li A, Li X, Li H, Dai Z, Yan Y, Zhang X, Shu D, Zhang H, Lin W, Ma J, Xie Q* (谢青梅). A premature stop codon within the tvb receptor gene results in decreased susceptibility to infection by avian leukosis virus subgroups B, D, and E. *Oncotarget*. 2017, 8(62):105942-105956.

2) Chen W (陈伟国), Liu Y, Li H, Chang S, Shu D, Zhang H, Chen F, Xie Q* (谢青梅). Intronic deletions of tva receptor gene decrease the susceptibility to infection by avian sarcoma and leukosis virus subgroup A susceptibility to infection by avian sarcoma and leukosis virus subgroup A. *Scientific Reports*, 2015, 5 (9900): 1-9.

3) Chen W (陈伟国), Qu H, Li C, Luo C, Wang J, Yang C, Shu D* (舒鼎铭). Polymorphism of avian leukosis virus subgroup E loci showing selective footprints in chicken. *Biochemical Genetics*. 2014, 52(11-12):524-37.

4) Li X#, Chen W# (陈伟国), Zhang H, Li A, Shu D, Li H, Dai Z, Yan Y, Zhang X, Lin W, Ma J, Xie Q* (谢青梅). Naturally Occurring Frameshift Mutations in the tvb Receptor Gene Are Responsible for Decreased Susceptibility of Chicken to Infection with Avian Leukosis Virus Subgroups B, D, and E. *Journal of Virology*. 2018, 2(8). pii: e01770-17.

5) Liao CT#, Chen SY#, Chen WG# (陈伟国), Liu Y, Sun BL, Li HX, Zhang HM, Qu H, Wang J, Shu DM, Xie QM* (谢青梅). Single nucleotide polymorphism variants within tva and tvb receptor genes in Chinese chickens. *Poultry Science*, 2014, 93: 1-8.

3. 申请和授权专利

- 1) 鸡 B 亚群禽白血病抗性分子标记 $tvb^{3731-3732insA}$ 及其分子诊断方法, 专利号: ZL201511005987.7, 发明人: 谢青梅, 陈伟国, 蔺文成, 舒鼎铭, 李昕键。
- 2) 鸡 B 亚群禽白血病抗性分子标记 $tvb^{3667-3668insAG}$ 及其分子诊断方法, 专利号: ZL201511005988.1, 发明人: 谢青梅, 陈伟国, 蔺文成, 舒鼎铭, 李昕键。
- 3) 一种阻断鸡禽白血病病毒垂直传播的方法及其应用, 申请号:



- 201910391512.8, 发明人: 谢青梅, 廖立钦, 陈伟国, 蔺文成, 张新珩。
- 4) 一种鸡 A 亚群禽白血病抗性分子标记 $tva^{260G>A}$ 及其应用, 申请号: 201910240246.9, 发明人: 谢青梅, 陈伟国, 张翔宇, 张新珩, 廖立钦。
- 5) 一种鸡 A 亚群禽白血病抗性分子标记 $tva^{507A>G}$ 及其应用, 申请号: 201910240248.8, 发明人: 谢青梅, 陈伟国, 张翔宇, 张新珩, 廖立钦。
- 6) 一种鸡 A 亚群禽白血病抗性分子标记 $tva^{304-305insGCCC}$ 及其应用, 申请号: 201910240247.3, 发明人: 谢青梅, 陈伟国, 张翔宇, 张新珩, 廖立钦。
- 7) 一种与鸡 J 亚群禽白血病抗性相关的分子标记及其应用, 申请号: 201910264872.1, 发明人: 谢青梅, 张新珩, 严一铭, 廖志宏, 陈伟国。

4. 科研奖励

1) 2018 年 9 月, 优质鸡 A、B、J 亚群禽白血病抗性选育技术的推广应用, 广东省农业技术推广奖, 一等奖, 排名第 2。

2) 2016 年 2 月, 水禽常发病防控技术体系的建立与应用, 广东省科学技术奖, 三等奖, 排名第 4。

二、技术需求方基本情况

(一) 技术需求方介绍, 主要包括企业(合作社)规模、主营业务, 生产经营现状等;

广州市钊辉养殖有限公司成立于 2017 年 12 月, 位于广州市从化区太平镇石联村高星经济合作社。广州市钊辉养殖有限公司现有黄羽肉鸡种鸡场 1 个, 存栏 6 万套种鸡。华南农业大学谢青梅教授在从化区挂职副区长期间, 谢青梅教授及其团队在本公司示范与应用“鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术”, 协助公司开展抗禽白血病黄羽肉鸡新品种的选育, 使公司种鸡的 ALV 阳性率大大降低, 种鸡的生产成绩有了大幅度的提高, 产生了良好的经济效益。

2019 年, 广州市钊辉养殖有限公司通过“公司+合作社+养户”的模式为养户提高商品鸡苗 650 万羽, 销售总收入约 2500 万, 实现净利润 330 万。另外, 带动养殖户 68 户饲养黄羽肉鸡, 养户养殖单只盈利 3 元以上, 每户增收 6000 元以上, 实现了公司与养户共同发展, 互惠双赢的局面。

(二) 技术需求方目前遇到的具体技术需求, 需要哪些具体



的技术支持;

清远麻鸡产业是清远市最具特色的传统优势畜牧产业之一,已逐渐成为清远市转移农村富余劳动力,带动贫困地区农民脱贫致富奔小康、振兴农村经济的首选主导产业。近年来,清远市农业科技推广服务中心大力在清远市及周边地区推广清远麻鸡的养殖技术。然而,目前禽白血病导致清远麻鸡种鸡和肉鸡的生产性能及产品质量大大下降,该病已成为制约清远麻鸡产业升级与发展的瓶颈问题。禽白血病是清远麻鸡种源安全危害最大的疾病。禽白血病病毒(ALV)可引起感染鸡群发生特征性肿瘤而死亡,种鸡死淘率最高可达20%以上;清远麻鸡种鸡感染ALV后其产蛋率、种蛋合格率和受精率等生产指标大幅下降,致使种鸡的生产性能不能得到有效发挥。禽白血病是一种垂直传播性种源性疾病,从曾祖代-祖代-父母代-商品代逐渐放大,每代感染率扩大约5%-20%。1只曾祖代种鸡感染ALV可以导致约24万只商品肉鸡出现感染并被淘汰。另外,ALV致使感染鸡群产生严重的免疫抑制,导致鸡群对其他疫病(如禽流感、新城疫等)的易感性增高,对疫苗的免疫反应能力降低,造成对烈性传染病的免疫失败,也使感染鸡群极易并发或继发感染其他病毒病和细菌病。禽白血病不仅造成清远麻鸡种鸡、肉鸡的产出受损,还导致清远麻鸡的禽蛋、禽肉等产品品质下降,给我公司和养户带来巨大的经济损失。

禽白血病尚无商品化疫苗和有效的治疗方法,清远市的清远麻鸡经营企业主要通过淘汰阳性鸡,净化种鸡群的传统方法来控制该病。然而,禽白血病的种群净化周期长(至少8-10年);劳动强度大、费用高,每只鸡每个世代检测5-7次(ELISA和病毒分离),检测费用高达350-500元;容易出现假阳性,产生淘汰失误,且经过种群净化的阴性鸡群仍然有再感染ALV的风险。虽然清远市清远麻鸡育种公司经过多年的努力,在清远麻鸡禽白血病的净化中取得了一定的进展,但生产中清远麻鸡种鸡ALV感染阳性率仍处于较高水平,且存在与其他病毒病和细菌病病原混合感染的情况。国内外研究表明,提高宿主对禽白血病病毒的遗传抗性是防控禽白血病的有效策略。鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术能够准确、快速判定检测鸡只为禽白血病抗病鸡还是易感鸡,并可应用于筛选抗禽白血病清远麻鸡新品种的育种素材,具有很好的应用和推广价值。因此,清远市农业科技推广服务中心急需鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术的技



术支持。

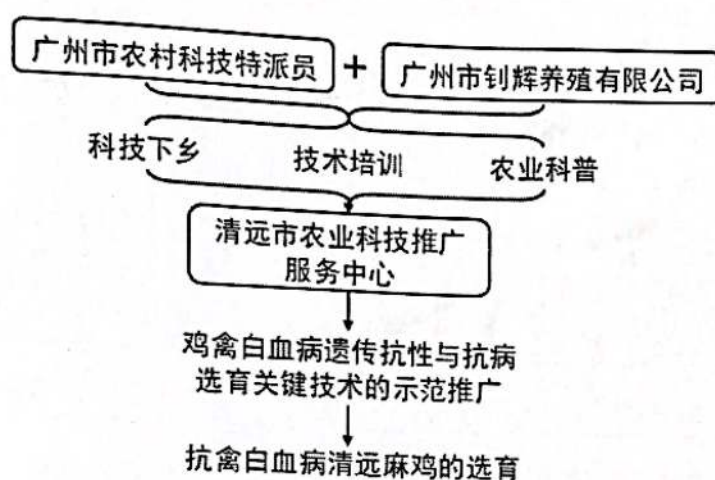
三、主要内容

(详细说明项目研究内容、技术路线、实施方案等。)

(一) 项目研究内容

针对禽白血病制约清远市清远麻鸡产业发展的关键技术问题,开展与清远市农业科技推广服务中心的科技对接与服务,大力开展鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术成果的示范推广,实施抗禽白血病清远麻鸡的选育,带动清远市农业科技发展。

(二) 技术路线



(三) 实施方案

广州市农村科技特派员团队(本团队)与广州市钊辉养殖有限公司共同开展科技下乡、举办技术培训、宣传农业科普等多种形式技术服务,示范推广鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术成果,采取“农业专家+实施主体+帮扶对象”模式,科技帮扶清远市农业科技推广服务中心。在清新区清远麻鸡产业园的牵头实施主体广东爱健康生物科技有限公司实施抗禽白血病清远麻鸡的选育。

四、工作目标及主要考核指标

(一) 工作目标

针对禽白血病成为制约清远市清远麻鸡产业发展的瓶颈问题,特派员团队与广州市钊辉养殖有限公司(从化),采用“农业专家+实施主体+科技帮扶”的方式,科技帮扶清远市农业科技推广服务中心,共同实施抗禽白血病清远麻鸡的选



育，以提高清远麻鸡禽白血病的净化效率，提升清远麻鸡的种源质量，从而保障清远市清远麻鸡种业工程的健康发展，推动清远麻鸡产业升级。

（二）主要考核指标

- 1、示范推广鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术，解决清远市农业科技推广服务中心提出的防控禽白血病的技術需求，提升清远市清远麻鸡育种与养殖企业的生产水平。
- 2、开展多种形式的技术服务，开展科技下乡 5 次以上，举办技术培训活动 1 次以上，农业培训参加及辐射人次 200 人以上，建立抗禽白血病清远麻鸡示范基地 1 个以上，通过示范带动清远市提升防控清远麻鸡禽白血病的技术水平。
- 3、开展农业科普宣传工作，制作或派发鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术的农业科技资料 300 册以上。
- 4、总结特派员工作经验模式，在省、市级电视台、报纸、网站等媒体上发布特派员工作报道 2 篇以上，提升特派员工作影响力。
- 5、科技带动 100 户以上的清远麻鸡养户增收致富，产生良好的经济和社会效益。

五、工作进度安排

时间进度	主要工作内容
2020 年 9 月至 2020 年 10 月	开展与清远市农业科技推广服务中心的科技对接。
2020 年 11 月至 2022 年 6 月	<ol style="list-style-type: none">1. 开展多种形式的技术服务，示范推广鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术；2. 指导企业开展抗禽白血病清远麻鸡的选育；3. 结题验收。



六、参加人员

(一) 参加人员

序号	姓名	职务/职称	单位	分工任务	签名
1	陈伟国	高级实验师	华南农业大学	科技对接与服务	陈伟国
2	谢青梅	教授	华南农业大学	技术培训	谢青梅
3	朱永标	总经理	广州市钊辉养殖有限公司	技术推广	朱永标
4	何国戈	科长	清远市农业科技推广服务中心	科技服务的对接	何国戈
5	郑经成	畜牧师	清远市农业科技推广服务中心	科技服务的对接	郑经成
6	邝智祥	技术总工	广东爱健康生物科技有限公司	抗禽白血病清远麻鸡的选育	邝智祥
7	黄群	种鸡场场长	广东爱健康生物科技有限公司	抗禽白血病清远麻鸡的选育	黄群

(二) 参与单位

序号	单位名称	任务内容	联系人及联系电话
1	华南农业大学	开展鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术的示范推广	联系人：陈伟国 联系电话：13632446076
2	广州市钊辉养殖有限公司	技术推广	联系人：朱永标 联系电话：13802788920
3	清远市农业科技推广服务中心	协助开展技术的示范与推广	联系人：何国戈 联系电话：13750192220
4	广东爱健康生物科技有限公司	开展抗禽白血病清远麻鸡的选育	联系人：邝智祥 联系电话：18934281410



七、资金使用预算

(一) 项目总经费预算(万元)

经费预算		
支出科目	金额(万元)	用途说明
劳务费	0	无
设备费	0	无
材料费	0	无
测试化验加工费	0	无
会议/差旅	5	举办技术培训会和开展科技下乡技的差旅费
出版/文献/信息传播/知识产权事务费	3.7	用于制作农业科技推广的资料费
专家咨询费	0	无
其他直接费用	0.5	项目管理费用
间接费用	0.8	项目组成员绩效费用

(二) 项目承担单位银行账户信息

账户名称	华南农业大学		
账号	3602002609000310520		
开户银行	广州工行五山支行		
财务负责人	刘烨	联系电话	020-85287730

八、其他事项

第一条 合同签约各方根据《中华人民共和国合同法》及国家有关法规和规定,经协商一致,特订立本合同,作为甲乙丙丁四方在项目实施管理过程中共同遵守的依据。

第二条 甲方的权利义务: 1. 按合同书规定进行经费核拨及有关工作



协调。2. 按照合同约定, 对乙方项目的实施情况和经费到位、使用情况进行监督、检查。3. 根据有关规定, 对乙方进行信用管理。

第三条 乙方的权利义务: 1. 为项目实施提供技术与条件保障。2. 按合同书规定, 对甲方核拨的经费做到专款专用, 单独列账, 并随时配合甲方进行监督检查。3. 按照合同要求按时完成项目内容, 根据甲方要求定期汇报项目工作进展情况, 项目验收后, 提交验收、自评和审计报告。

第四条 丙方的权利义务: 负责配合乙方开展项目实施工作, 为乙方提供项目实施场地、试验条件等。

第五条 丁方的权利义务: 负责对项目承担单位的实施条件、能力以及财务管理规范进行审查, 对推荐项目的实施场地、申报资料等进行真实性审核, 并监督项目实施、经费预算执行情况, 受委托或协助甲方组织绩效评价、项目验收等工作, 并及时向甲方报告情况。

第六条 在履行本合同的过程中, 如出现相关法律法规重大改变等不可抗力情况, 甲方有权对所核拨经费的数量和时间进行相应调整。因非不可抗力因素导致的项目未履行或未履行完毕, 或因乙方责任造成项目终止的, 甲方有权终止项目合同, 收回尚未使用和使用不符合规定的财政经费。

第七条 有关合同的未尽事宜, 按照国家、省有关专项项目和经费管理的规定执行。

第八条 本合同经甲乙丙丁四方签字盖章后生效, 甲方执两份, 乙方、丙方、丁方各执一份, 均具有同等法律效力。



九、本任务（合同）书签约各方

广东省农业科学院（甲方）：

广东省农业科学院（公章）



法定代表人（或法人代理）（签章）：



2020年12月30日

项目负责人（科技特派员）（乙方）：（签名）

陈伟国

2020年12月25日

对接企业（合作社）（丙方）：（公章）

法定代表人（或法人代理）（签章）：

朱永林



2020年12月26日

科技特派员所属单位（丁方）（公章）

法定代表人（或法人代理）（签章）：



刘建峰

年 月 日



华南农业大学新农村发展研究院

关于华南农业大学新农村发展研究院 2022 年度农业科技合作共建项目立项的通知

各学院,各相关单位:

为充分发挥我校科研人员在科技创新、产业服务与技术示范、智库服务等方面的支撑作用,鼓励广大科研工作者将科研成果转化和先进技术的应用和推广服务于基层,打造我校服务乡村振兴的品牌亮点,学校设立了新农村发展研究院 2022 年度农业科技合作共建项目,该项目认定为 B 类项目。现对 2022 年度我校农业科技合作共建项目立项名单予以公布,详情请参见附件。

附件: 华南农业大学新农村发展研究院 2022 年度农业科技合作共建项目立项清单

华南农业大学新农村发展研究院

2023 年 11 月 14 日



附件

华南农业大学新农村发展研究院 2022 年度农业科技 合作共建项目立项清单

序号	项目类别	项目负责人
1	珠海市对虾苗种重要病害防控技术的示范与推广	莫泽权
2	基于渔稻联作模式的养殖尾水处理技术服务	杨慧荣
3	花卉新品种和产业化技术示范推广	张志胜
4	遂溪特色火龙果新品种示范与生产技术集成示范	秦永华
5	湛江鸡健康养殖技术推广与示范	何 唱
6	湛江徐闻辣椒种植技术示范	姜 峰
7	云浮市观叶花木高效栽培和扩繁技术推广与示范	何 茜
8	郁南黄皮提质增效生产技术的示范与推广	张志珂
9	南药资源高值化利用关键技术研究	熊 平
10	清远大豆新品种及相关产业技术示范推广	年 海
11	阳江优质贝类种苗规模化生产与养殖示范	范兰芬
12	墨脱高香茶树品种引种及生态栽培技术示范推广	郑 鹏
13	楼房养猪生物安全防控技术推广与应用	张桂红
14	南雄市香稻增香富硒锌栽培技术示范	唐湘如
15	乐昌香芋病害病绿色防控	张炼辉
16	多源种养废物耦合利用技术集成示范	谭 涛
17	优良蔬菜新品种新技术示范推广	陈国菊
18	封开杏花鸡集中育雏综合技术集成示范	罗庆斌

19	乡村建设技术推广服务	舒 畅
20	清远麻鸡健康养殖技术推广与示范	谢青梅
21	粤北山区稻渔综合种养技术集成示范	章家恩
22	河源龙川食用菌栽培关键技术示范与推广	莫美华
23	连南县茶叶栽培加工技术推广	张凌云
24	连山黑山羊饲料均衡供应技术集成示范	邓 铭
25	梅州柚果生产机械化	李 震
26	梅州食用菌产业提质增效技术集成示范	王 杰
27	荔枝高产高效生产技术集成与推广	苏钻贤
28	高州市水果可食性涂膜保鲜技术开发与应用示范	徐小艳
29	沉香高效结香技术及新产品开发	黄少伟
30	惠来黑山羊饲料资源开发与利用技术应用与示范	孙宝丽
31	新会陈皮初加工及仓储智能装备关键技术	闫国琦
32	惠东蔬菜生产新技术应用与示范	翁群芳
33	惠东茶树优良品种引种及生产加工技术示范推广	刘少群
34	猕猴桃整果加工利用技术集成示范	韦晓群
35	高效设施农业技术示范推广	刘厚诚
36	东源水稻智慧农场关键技术的推广	周志艳
37	河源美林油茶科学化种植基地构建与示范	黄久香
38	东源航天丝苗水稻新品种示范及推广	陈 淳
39	佛山丹灶自然教育项目	高 伟
40	湛江葛根精深加工关键技术及新产品集成示范	杜 冰
41	智慧农业科技示范基地建设	肖德琴
42	南沙渔业创新科技实践及其示范应用	伍亚泰

43	香稻新品种试验示范与推广	程 雄
44	从化特色荔枝品种‘井岗红糯’配套栽培技术的集成与示范	王惠聪
45	从化蛋鸡健康养殖技术推广与示范	张新珩
46	彩色马蹄莲杂交亲和性和二代种球复花技术	范燕萍
47	广州从化乡村体育产业创新与示范	吕 立
48	从化达南楼房养猪生物安全体系的建立及运行	马静云
49	从化水果种植数字化管理技术集成示范	姜 晟
50	自然研学赋能的广州白云区乡村文旅产业创新发展模式示范与推广	汤 辉
51	广西马山县玉米制种技术集成及鲜食玉米新品种示范推广	黄 君
52	马山县桑树病虫害绿色生态防控技术集成与示范	刘吉平
53	智能农机技术推广服务	王红军
54	佛山南海设施蓝莓产业化技术示范与推广	陈日远
55	油茶副产物高值化综合利用	曹 庸
56	农产品设计与媒体推广	石娟娟
57	清远麻鸡禽白血病抗性选育技术推广与示范	陈伟国
58	广东省牛羊健康养殖技术示范推广	郭勇庆
59	生猪健康高效养殖技术示范推广乡村行	徐 铮
60	饲用酶制剂开发与推广	王声斌
61	广东乡村治理蓝皮书《广东乡村治理创新报告（2023）》	唐 斌
62	广东农业产业发展研究报告	谭砚文
63	大变局下推动高质量发展研究团队建设	张日新
64	岭南农耕文明重点实验室建设	倪根金

65	华南农业大学广东省习近平新时代中国特色社会主义思想研究中心基地建设	张丰清
66	华南农业大学中华优秀传统文化（广东音乐）传承研究	郑颜文
67	青年智库人才培养	唐 斌
68	构建农业科研项目经理人机制研究	罗明忠
69	社会工作介入乡村治理的基层服务模式研究	韩 丽
70	广东现代农业产业园调研报告(2022)	蒋育燕
71	乌克兰危机以来北极八国的北极政策调整及中国的应对策略	杨松霖
72	数字乡村背景下乡村治理困境及对策研究	宋星洲
73	重金属污染场地土壤的修复与管控问题研究	任宗玲
74	国家公园生态补偿何以有效？社区的双重代理角色及其作用机制	苏柳方
75	助力南平村，建设社会主义新农村	马亚男
76	吕田镇塘田村葡萄栽培技术提升	黄旭明
77	三华李高效种植及品牌构建与推广	邓兰生
78	服务井岗红糯，助力乡村振兴	甄文斌
79	基于互联网+网络直播和人工智能的木棉村休闲农业快速发展	彭红星
80	保生产拓市场促中田村荔农增收	齐文娥
81	土壤改良促从化良口镇礞溪青梅优质高产技术	彭桂香
82	蛋鸡重要病原快速检测技术示范推广	张新珩
83	粉葛种植与加工、包装关键技术服务	范小平
84	特色荔枝干果加工关键技术研发及推广	赵 雷
85	河源现代农业综合试验站总体规划	卢丹梅
86	华南农业大学研究团队奋“豆”系列纪实	唐涤非

87	一带一路成果示范推广（大豆产业化）	程艳波
88	一带一路成果示范推广（生物农药产业化）	钟国华
89	一带一路成果示范推广（水稻产业化）	蔡昆争

合同编号:

技术开发（委托）合同

项 目 名 称: 清远麻鸡育种技术研究

委托方（甲方）: 广东爱健康生物科技有限公司

受托方（乙方）: 华南农业大学

合 同 有 效 期: 二〇二三年一月至二〇二三年十二月

签 订 时 间: 二〇二三年一月

签 订 地 点: 广东爱健康生物科技有限公司

中华人民共和国科学技术部印刷

技术开发（委托）合同

委托方（甲方）：广东爱健康生物科技有限公司

住 所 地：清远市清新区太和镇环城中路 10 号华府假日酒店 2601 房

法定代表人：孙恒

项目联系人：邝智祥

联系方式：

通讯地址：清远市清新区太和镇环城中路 10 号华府假日酒店 2601 房

电 话：15622717273 传 真：0763-5828777

电子信箱：13318627530@163.com

受托方（乙方）：华南农业大学

住 所 地：广州市天河区五山路 483 号

法定代表人：刘雅红

项目联系人：陈伟国

联系方式

通讯地址：华南农业大学动物科学学院

电 话：13632446076 传 真：

电子信箱：wgchen81@scau.edu.cn

本合同甲方委托乙方研究开发清远麻鸡育种技术研究项目，并支付研究开发经费和报酬，乙方接受委托并进行此项研究开发工作。双方经过平等协商，在真实、充分地表达各自意愿的基础上，根据《中华人民共和国合同法》的规定，达成如下协议，并由双方共同恪守。

1、技术目标：为了使甲方养殖的清远麻鸡得到开发利用，甲乙双方经友好协商，决定以乙方的技术为依托，以甲方为技术承接方，共同进行清远麻鸡育种技术研究。

2、技术内容：依据甲方企业要求，乙方为甲方制定清远麻鸡品种规划与育种方案；制定清远麻鸡种鸡生产标准流程并执行；屠宰型清远麻鸡配套选育与研究；

第二条 乙方应在本合同生效后 10 日内向甲方提交研究计划。研究计划应包括以下主要内容：

- 1) 规划并制定甲方清远麻鸡的育种方案；
- 2) 制定清远麻鸡种鸡生产标准流程及开展相关技术培训包括：种鸡育雏、育成、产蛋鸡饲养流程、种鸡选育流程、种鸡保养流程等的制定及培训。

第三条 乙方应按下列进度完成研究开发工作：

2023 年 1 月，完成清远麻鸡育种方案的规划并制定。

2023 年 8 月，完成屠宰型清远麻鸡配套选育与研究，并与甲方发表相关论文 1 篇、实用新型专利 1 个。

2023 年 12 月，完成种鸡生产标准流程制定及培训，提交全部项目结题总结。（具体时间可根据甲方建设进度进行调整，以甲方实际需要为准。）

第四条 甲方应向乙方提供的技术资料及协作事项如下：

1、技术资料清单包括：种鸡生产标准流程 1 套，公司品种规划、育种方案的制定和执行方案各 1 套，公司品种选择标准 1 套，生产的数据分析报告 1 份，屠宰型清远麻鸡配套选育与研究相关论文一篇、实用新型专利 1 个。

2、提供时间和方式：

1) 每月固定 2-3 次种鸡养殖生产检查，以生产检查制定相关存在问题的整改方案、解决措施的执行考核；

2) 根据养殖需要开展有针对性的生产培训和技术指导；

3) 根据甲方需要开展屠宰型清远麻鸡配套选育与研究；

3、其他协作事项：另行协商或另加附属协议

本合同履行完毕后，上述技术资料归甲乙双方共有。

第五条 甲方应按以下方式支付研究开发经费和报酬：

1、研究开发经费总额为 人民币拾万元整（¥100,000 元），含产品研发所需材料、车辆津贴等。如果出现经费不足的情况，由乙方自行解决。乙方的报酬包含在研究开发经费中，甲方不再另行支付。

2、研究开发经费由甲方分两次支付乙方。具体支付方式和时间如下：

项目签订 7 个工作日后，甲方支付研究费用人民币伍万元整（¥50,000 元）给乙方。剩余伍万元整（¥50,000 元）将在 2023 年 8 月 30 日前支付完毕。

乙方开户银行名称、地址和帐号为：

开户银行：广州工商银行五山支行

帐 号：3602002609000310520

账 户：华南农业大学

纳税识别号：124400004554165634

甲方开票信息：公司名称：广东爱健康生物科技有限公司；纳税识别号：91441803398051632F；地址：清远市清新区太和镇环城中路 10 号华府假日酒店 2601 房（一照多址）；电话：0763-5277273；开户行及账号：中国农业银行股份有限公司清新领秀支行，44690301040002492。

第六条 本合同的研究开发经费由乙方以实验材料、试剂、样品分析检测费、劳务费、绩效等方式使用。甲方有权以口头和书面的方式检查乙方进行研发工作和使用研发经费的情况，并提出合理的意见或者建议，但不得妨碍乙方的正常工作。

第七条 本合同的变更必须由双方协商一致，并以书面形式确定。一方可以向另一方提出变更合同权利与义务的请求，另一方应当在7个工作日内予以答复；逾期未予答复的，视为同意。

第八条 未经甲方同意，乙方不得将本合同项目部分或全部研发工作转让给第三人承担，否则甲方有权解除本合同。但乙方因客观原因无法独立完成研究项目的，乙方可以经甲方同意，将本合同项目部分或全部研发工作转让给第三人承担，乙方应当就第三人完成的工作成果向甲方负责并保证按照合同要求完成工作。

第九条 在本合同履行中，因出现在现有技术水平和条件下难以克服的技术困难，导致研发失败或部分失败，并造成合作一方或双方损失的，双方按如下约定承担风险损失：合作双方各自承担所遭遇的风险损失。乙方向甲方退还已支付的经费剩余款项。

双方确定，本合同项目的技术风险按双方协商的方式认定。认定技术风险的基本内容应当包括技术风险的存在、范围、程度及损失大小等。认定技术风险的基本条件是：

- 1、本合同项目在现有技术水平条件下具有足够的难度；
- 2、乙方在主观上无过错且经认定研发失败为合理的失败。

一方发现技术风险存在并有可能致使研发失败或部分失败的情形时，应当在10日内通知另一方并采取适当措施减少损失。逾期未通知并未采取适当措施而致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担赔偿责任。上述情形发生后，乙方向甲方退还已支付的经费的剩余款项。

第十条 在本合同履行中，因作为研发标的技术已经由他人公开（包括以专利权方式公开），一方应在10日内通知另一方解除合同。逾期未通知并致使另一方产生损失的，另一方有权要求违约方支付合同总价的 20%作为违约金，违约金不足以赔偿损失的，违约方还应赔偿守约方的实际损失。

第十一条 双方确定因履行本合同应遵守的保密义务如下：

甲方：

1、保密内容（包括技术信息和经营信息）：项目研究思路、项目研究成果及相关技术资料。

2、涉密人员范围：参与研究、生产的所有人员。

3、保密期限：叁年（2022.12-2025.12）。

4、泄密责任：向乙方赔付违约金伍万元。

乙方：

1、保密内容（包括技术信息和经营信息）：项目研究成果及相关技术资料。

2、涉密人员范围：乙方课题组研究人员。

3、保密期限：叁年（2022.12-2025.12）。

4、泄密责任：向甲方赔付违约金伍万元。

第十二条 乙方应当按以下方式向甲方交付研究开发成果：

1、研究开发成果交付的形式及数量：研究成果为标准流程、分析报告、体系等文件。

2、交付的研究开发成果中应包含但不限于：

①清远麻鸡品种规划方案 1 套；

②清远麻鸡育种方案 1 套；

③种鸡生产标准流程 1 套。

3、研究开发成果交付的时间及地点：交付时间：在合同期内完成。交付地点：乙方所在地。

第十三条 双方确定，按以下标准及方法对乙方完成的研究开发成果进行验收：编制的体系、流程、报告等符合并满足甲方需求。

第十四条 乙方应当保证其交付给甲方的研究开发成果不侵犯任何第三人的合法权益。如发生第三人指控甲方实施的技术侵权的，乙方应当负责解决相应的纠纷。

第十五条 双方确定，因履行本合同所产生的研究开发成果及其相关知识产权权利归属，如下处理：

1、双方共同享有申请专利、技术认定的权利。专利权取得后的使用和有关利益分配方式如下：双方拥有专利技术的使用权。

2、技术成果和专利的使用许可和转让需经双方同意，所得经济收益由双方共同分享。在清远全市范围内和清远市外、广东省内清远麻类品种范围内，不得许可使用或转让本合同技术成果及其相关知识产权权利。

2、按技术秘密方式处理。有关使用和转让的权利归属及由此产生的利益按

以下约定处理：

（1）技术秘密的使用权：无；

（2）技术秘密的转让权：无；

（3）相关利益的分配办法：无。

双方对本合同有关的知识产权权利归属特别约定如下：由双方共同所有。

第十六条 乙方不得在向甲方交付研究开发成果前后，未经甲方书面同意，自行将研究开发成果转让给第三人。

第十七条 乙方完成本合同项目的研究开发人员享有在有关技术成果文件上写明技术成果完成者的权利和取得有关荣誉证书、奖励的权利。

乙方在专业期刊发表成果的文章，甲方享有署名权。

第十八条 乙方利用研究开发经费所购置与研究开发工作有关的设备、器材、资料等财产，按设备、器材、资料等财产所在地，归购置方所有；

第十九条 双方确定，乙方应在向甲方交付研究开发成果过程中，根据甲方的请求，为甲方指定的人员提供技术指导和培训，或提供与使用该研究开发成果相关的技术服务至完成投产。

1、技术服务和指导内容：与合同研究成果相关技术资料、方案、报告。

2、地点和方式：派专家到企业进行项目实施技术指导，培训相关技术人员。

3、费用及支付方式：甲方负责乙方专家到企业指导的食宿费用。

第二十条 双方确定，在甲方试产过程中，乙方应按照甲方提出的调整要求对开发成果予以调整。

第二十一条 违约责任

1、乙方不得将本合同转委托给任何第三人，否则，乙方应向甲方退还甲方已支付的所有款项，并按合同总价的 20%向甲方支付违约金。

2、乙方应按合同第三条约定的进度完成研究开发工作，否则，每逾期一天，乙方应按合同总价款的千分之一向甲方支付违约金。

第二十二条 双方确定：任何一方违反本合同约定，造成研究开发工作停滞、延误或失败或因履行本合同而发生的争议的，可以根据自愿选择协商、调解的方式解决，按双方协商的方式承担违约责任，协商、调解不成的，依法向甲方所在地人民法院起诉。

第二十三条 双方确定，甲方有权利用乙方按照本合同约定提供的研究开发成果，进行后续改进。由此产生的具有实质性或创造性技术进步特征的新的技术成果及其权利归属，归甲方所有。

乙方有权在完成本合同约定的研究开发工作后，利用该项研究开发成果进行后续改进。由此产生的具有实质性或创造性技术进步特征的新的技术成果，归

乙方所有。

第二十四条 双方确定，在本合同有效期内，甲方指定 邝智祥 为甲方项目联系人，乙方指定 陈伟国 为乙方项目联系人，项目联系人承担以下责任：

- 1、相关业务联系；
- 2、负责完成合同的具体事宜。

一方变更项目联系人的，应当及时并以书面形式通知另一方。未及时通知并影响本合同履行或造成损失的，应承担相应的责任。

第二十五条 双方确定，出现下列情形，致使本合同的履行成为不必要或不可能的，一方可以通知另一方解除本合同：

- 1、因发生不可抗力或技术风险；
- 2、甲方因客观原因，未继续支付研究费用；
- 3、乙方因客观原因，未按照甲方要求的时间完成研究。

第二十六条 双方因履行本合同而发生的争议，应协商、调解解决。协商、调解不成的，依法向甲方人民法院起诉。

第二十七条 本合同载明的地址作为各方的通知、文件资料、法律文书、司法文书的送达地址，若一方变更地址的应提前 3 个工作日书面通知另一方。一方
向另一方按送达地址寄送的资料，经查询显示妥投，或因拒收、地址不详、查无此人等原因退回的，视为完成送达，妥投之日或退回之日视为送达之日。

第二十八条 本合同一式四份，甲方执两份，乙方学校执一份，所在学院执一份，经甲乙双方签字盖章后生效，均具有同等法律效力。

第二十九条 本合同经合作双方签字盖章后生效。

（本页以下无正文）

甲方：_____（盖章）

法定代表人/委托代理人：_____（签名）

2023 年 1 月 3 日

乙方：_____（盖章）

法定代表人/委托代理人：_____（签名）

2023 年 1 月 3 日

印花税票粘贴处：

（以下由技术合同登记机构填写）

合同登记编号：

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

1、申请登记人：_____

2、登记材料：（1）_____

（2）_____

（3）_____

3、合同类型：_____

4、合同交易额：_____

5、技术交易额：_____

技术合同登记机构（印章）

经办人：

年 月 日

受理编号: c2052311800007

项目编号: 2020B020222001

项目下达文号: [2020]76号

广东省重点领域研发计划项目 任务书

项目名称: 抗禽白血病黄羽肉鸡新品种培育

专项名称: 现代种业

项目起止时间: 2020年 01月 01日 至 2024年 12月 31日

管理单位(甲方): 广东省科学技术厅

牵头承担单位一
(乙方): 广东温氏南方家禽育种有限公司项目推荐(主管)单位
(丙方): 云浮市科学技术局

通讯地址: 广东省云浮市新兴县广东省云浮市新兴县新城镇东堤北路6号

邮政编码: 527439

单位电话: 0766-2291637

项目负责人: 谢青梅

联系电话: 0766-2291726

项目联系人: 徐振强

联系电话: 13570493719



(广东科技微信公众号)

广东省科学技术厅
二〇一九年制

(受理纸质材料二维码)

填写说明

- 一、本任务书通过“广东省科技业务管理阳光政务平台”（以下简称阳光平台）在线填写。
- 二、任务书甲方即广东省科学技术厅，乙方即项目牵头承担单位一、二，丙方即项目推荐（主管）单位（包括各省直单位、各地市科技局、中央驻粤单位等）。
- 三、关于“牵头承担单位及项目负责人”的情况说明：
只有一个牵头承担单位的，只填写“牵头承担单位一”；原则上，只有省外单位作为“牵头承担单位一”时，才允许填写“牵头承担单位二”；一个牵头承担单位对应填写一个项目负责人，原则上项目负责人应该来自对应的牵头承担单位；特殊情况下，允许项目负责人为非牵头单位人员。
- 四、任务书中的单位名称，请按规范全称填写，并与单位公章一致。
- 五、涉密项目请在“广东省科技业务管理阳光政务平台”下载任务书的电子版模板，按保密要求离线填写、报送。
- 六、任务书的起点时间不得早于项目申报时间（以申报书提交业务系统之日为准），不得迟于项目立项文件下达之日。
- 七、本任务书中凡是当事人约定无需填写的内容，应在空白处划“/”，或用“无”表示。
- 八、任务书内容须按照项目申报书据实填写，要遵循实事求是原则，无需凑够字数。申报书中没有体现的内容应在任务书对应的位置划“/”，或用“无”表示。
- 九、乙方按照阳光平台提示完成任务书的在线填写，提交丙方初审并经甲方审核确认后，用A4纸在线打印、装订、签章。本任务书一式6份，其中甲方留存2份，乙方留存3份，丙方留存1份。
- 十、本任务书自签字并加盖公章之日起生效，各方均应负本任务书的法律责任，不应受机构、人事变动的影响。

项目基本信息表

项目名称	抗禽白血病黄羽肉鸡新品种培育		
项目编号	2020B020222001		
专项名称	现代种业		
专题名称	20190222—特色家禽新品种（配套系）选育	单位总数	3
经费预算	总投入 2000.00 万元，其中省级财政专项经费投入 600.00 万元		
项目周期节点	起始时间	2020年 01月 01日	结束时间 2024年 12月 31日
	实施周期	共 59 个月	预计中期时间点 2022-12-31
项目牵头承担单位一	单位名称	广东温氏南方家禽育种有限公司	单位性质 有限责任公司
	单位所在地	广东省-云浮市-新兴县	统一社会信用代码 91445321723836602F
	通信地址	广东省-云浮市-新兴县 广东省云浮市新兴县新城镇东堤北路6号	邮政编码 527439
	银行账号	2020003209024915265	法定代表人姓名 陈永华
	单位开户名称	广东温氏南方家禽育种有限公司	
	开户银行（全称）	中国工商银行新兴支行	

广东省重点领域研发计划项目任务书

项目负责人	姓名	谢青梅	性别	女	出生日期	1972-09-06
	证件类型	身份证	证件号码	440106197209061822		
	所在单位	广东温氏南方家禽育种有限公司				
	最高学位	博士				
	职称	教授	职务	无		
	电子邮箱	1361375077@qq.com	移动电话	18922374858		
项目联系人	姓名	徐振强	电子邮箱	zhenqiangxu@163.com		
	固定电话	0766-2291726	移动电话	13570493719		
	证件类型	身份证	证件号码	440182198511250078		
项目财务负责人	姓名	李斌雄	电子邮箱	782424707@qq.com		
	固定电话	0766-2929938	移动电话	13927142519		
	证件类型	身份证	证件号码	432625197404150018		
其他参与单位						
序号	单位名称	单位性质	统一社会信用代码			
1	华南农业大学	高等院校	124400004554165634			
2	广东省农业科学院动物科学研究所	科研机构	124400000651519695			
项目参加人数 21 人。其中		高级职称 9 人, 中级职称 2 人, 初级职称 0 人, 其他 10 人; 博士学位 9 人, 硕士学位 10 人, 学士学位 2 人, 其他 0 人。				

一、任务书条款

第一条	甲乙丙三方根据《广东省人民政府关于印发广东省重点领域研发计划实施方案的通知》（粤府〔2018〕84号）《关于进一步完善省级财政科研项目资金管理等政策的实施意见》（粤委办〔2017〕13号）《关于优化财政科研资金管理提升科研资金绩效的通知》（粤财教〔2018〕394号）等文件规定，以及有关法律、政策和管理要求，依据项目立项通知，为顺利完成（2020）年抗禽白血病黄羽肉鸡新品种培育专项项目（文件编号：2020B020222001），特签署本任务书。
第二条	本项目以攻克关键核心技术、研发关键零部件和重大装备为目标，力争突破前沿性、引领性的技术，取得产业带动性强、技术自主可控的重大原创科技成果和自主知识产权。 《项目申报书》和申报指南是本任务书填报的重要依据，任务书填报时不得降低考核指标，不得自行对主要研究任务作出调整。 《项目申报书》、申报指南和本任务书将共同作为项目过程管理、验收结题和监督评估的重要依据。
第三条	甲方有权按照《广东省重点领域研发计划实施方案》进行资源整合，以目标为导向，合理优化牵头单位、参与单位布局。甲方实行科技计划“放管服”改革，建立基于信任的管理制度，但有权按照有关规定采取日常监管、随机抽查、专项检查、中期评估、财务审计等方式对项目实施监督，并严格以本任务书中约定的任务、期限、目标和验收指标等具体内容作为监督依据。项目到期后，甲方依据本任务书对项目实施结果进行验收。甲方可根据《广东省科技计划项目信用管理办法（试行）》对乙方进行科技计划信用管理。
第四条	乙方要建立以诚信为原则的自主管理制度，按如下要求执行项目： 1. 承担项目的核心研究任务。 2. 统筹协调做好资源分配和任务分工工作，履行项目组织实施和资金使用等方面的主体责任，对项目实施目标和财政资金绩效负责。 3. 完善单位内部控制制度和单位间监督制约机制。 4. 乙方负责协调落实项目自筹经费及有关保障条件，按照任务分工、任务量和时间进度合理分配和拨付财政资金，确保财政资金使用的安全有效，并签订单位间的合作协议。 5. 乙方及相关参与单位均应对财政资金实行专款专用，单独列账，并积极配合甲方（或委托专业机构等）进行的监督检查。 6. 乙方须积极配合甲方组织的评估检查；项目完成后，应主动申请验收结题。 7. 乙方应按照国家 and 省有关规定，提交科技报告及其他材料。 8. 项目负责人及主要研究开发成员应实质性参与项目组织实施，不得出现挂名现象。
第五条	丙方作为项目推荐单位，应当推动和督促乙方实施好项目，监督项目执行，落实配套资金。
第六条	项目经费按单位性质、项目进展并结合评估情况分阶段拨付。 1. 主要承担单位是企业的，签订任务书后，拨付立项资金的15%；经评估，项目任务进展过半且项目总经费投入过半的，再拨付立项资金的65%；项目任务及项目总经费投入达到90%或达到验收条件的，可提出后续资金申请，经评估，拨付剩余20%资金。 2. 主要承担单位是高校或科研院所的，签订任务书后，拨付立项资金的30%；经中期评估，项目进展顺利并取得阶段性进展的，拨付立项资金的50%；项目任务完成90%或达到验收条件的，可提出后续资金申请，经评估，拨付剩余20%资金。 评估或验收结题不通过的，甲方有权终止项目，停止拨付后续资金；发现项目存在重大异常或违规使用财政资金的，甲方有权追回已经拨付的资金。
第七条	在本任务履行过程中，根据实际需要，乙方可按规定对项目起止时间、项目经费使用（包括自筹经费、经费分配及经费支出预算等）、项目内容（包括研发内容、技术指标、经济指标及成果指标等）、技术路线、项目参与单位、项目负责人和项目组成员等进行变更，具体按照《关于优化财政科研资金管理提升科研资金绩效的通知》（粤财教〔2018〕394号）等有关规定执行。 其中，科研经费直接费用中所有科目费用调剂权全部下放给项目承担单位，项目承担单位应建立完善的内部管理制度，及时为科研人员办理调剂手续。
第八条	在履行本任务过程中，乙方及参与单位必须恪守科研道德准则、科研活动规范和科研诚信规定，严格遵守有关法律法规。 涉及医学、生物技术和人工智能等敏感领域研究，应当按照国家有关规定设立伦理委员会，开展研究项目的伦理审查，遵循国际公认的科研伦理规范和生命伦理准则。

第九条	本项目主要研发活动应在广东境内开展，项目产生的知识产权应由广东省内单位牵头申请，项目成果应优先在广东境内实施转化应用。如确需到广东省外转化的，要向甲方做出报告说明。
第十条	省外牵头或参与单位在项目执行期内，到广东设立具有法人资格的单位或分支机构，开展项目研发和成果转移转化，具备条件的，可申请变更为项目牵头承担单位，或者申请增加为项目参与单位。
第十一条	根据广东省科技计划管理相关规定，代表甲方履行本项目过程管理及验收结题等相关组织管理工作。后期如甲方业务分工发生调整，以实际调整的专业机构为准。
第十二条	各方应充分理解本任务书的内容并自愿签署本任务书。未尽事宜，协商解决或签订补充协议进一步明确，甲方拥有最终解释权。

2020B020222001

二、项目验收指标

(一) 技术及成果指标				
1. 核心考核指标				
序号	成果名称	成果类型	验收指标	评测方式/方法
1	黄羽肉鸡禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息数据库	数据库	构建黄羽肉鸡禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息数据库1个	建立80个以上黄羽肉鸡品种(品系)抗禽白血病表型-基因型数据。
2	禽白血病遗传抗性与抗病选育技术	新技术	鉴定有重要育种价值的抗不同亚群禽白血病优势基因或标记 5~10个	鉴定有重要育种价值的抗不同亚群禽白血病的抗性标记或抗病基因5~10个, 构建禽白血病抗性标记与抗病位点的分子诊断及其基因分型技术平台, 集成与建立禽白血病遗传抗性与抗病选育技术体系。
3	抗禽白血病黄羽肉鸡新品种	新品种	形成抗禽白血病的黄羽肉鸡核心育种群2~3个, 培育抗禽白血病的黄羽肉鸡新杂交配套1~2个	新杂交配套在广东省内现代农业产业园或农业科技园区应用示范, 在申报单位大规模生产和推广, 示范推广 50 00 万羽肉鸡以上。
2. 高水平知识产权指标				
序号	内容	类型	结题时状态	拟解决关键问题
1	禽白血病抗性分子标记及其应用	国内发明专利	受理	形成技术首创
2	禽白血病抗病基因及其应用	国内发明专利	受理	形成技术首创
3	禽白血病抗病鸡品系培育方法	国内发明专利	受理	形成技术首创
对以上项目成果属于高质量知识产权的相关说明				
<p>通过开展不同品种黄羽肉鸡A/K、B/D/E、J亚群禽白血病病毒受体基因tva、tvb和chNHE1的遗传多样性研究, 筛选不同亚群禽白血病病毒受体基因的遗传变异位点, 开发有重要育种价值的禽白血病遗传抗性分子标记。应用基因组学、转录组学和蛋白组学等多组学分析技术, 联合全基因组关联分析和权重基因共表达网络分析等方法, 发掘有重要育种价值的禽白血病抗病基因。通过建立禽白血病抗性与抗病位点的高通量分子诊断及其基因分型技术, 能够准确、快速判定检测鸡只为禽白血病抗病鸡还是易感鸡, 并可应用于筛选禽白血病抗性与抗病鸡品种(品系)的育种素材, 从而在国内首次开展禽白血病抗性与抗病鸡品种(系)的培育, 具有很好的应用和推广价值。</p>				

3. 技术就绪度提升指标

当前技术就绪度等级	中期评估时技术就绪度等级	项目完成时技术就绪度等级
4级	5级	7级

对项目实施后技术就绪度提升情况的相关说明

本项目从不同黄羽肉鸡品种（品系）中进一步发掘A、K亚群禽白血病抗性标记与抗病基因，建立ALV-A/K抗性标记与抗病位点的分子诊断及其基因分型方法，完善A、K亚群禽白血病抗性与抗病选育技术；从不同黄羽肉鸡品种（品系）中进一步发掘B、D、E亚群禽白血病抗性标记与抗病基因，建立ALV-B/D/E抗性标记与抗病位点的分子诊断及其基因分型方法，完善B、D、E亚群禽白血病抗性与抗病选育技术；从不同黄羽肉鸡品种（品系）中进一步发掘J亚群禽白血病抗性标记与抗病基因，建立ALV-J抗性标记与抗病位点的分子诊断及其基因分型方法，完善J亚群禽白血病抗性与抗病选育技术，集成1套禽白血病遗传抗性与抗病选育技术体系。利用建立的不同亚群禽白血病抗性标记与抗病位点的分子诊断及其基因分型方法，精准鉴定80个以上黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病的抗性与抗病表型，构建黄羽肉鸡禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息数据库。根据不同黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病抗性与抗病的群体遗传参数，分析不同黄羽肉鸡品种对不同亚群禽白血病抗性与抗病的遗传改良潜力，筛选出抗ALV-A/K、ALV-B/D/E和ALV-J的育种素材。结合本申报团队前期选育并保有的抗A/K、B/D/E和J亚群禽白血病的黄羽肉鸡个体，进行小规模扩繁。利用不同亚群禽白血病遗传抗性与抗病的选育方法，通过杂交方式，创制出抗ALV-A/K、ALV-B/D/E、ALV-J、ALV-A/K/B/D/E、ALV-A/K/J、ALV-B/D/E/J和ALV-A/K/B/D/E/J的黄羽肉鸡新种群和育种新材料，用于选育抗禽白血病的黄羽肉鸡核心育种群。通过研究禽白血病抗病性状与肉质、生长、繁殖等品质效率性状的关系，提出黄羽肉鸡禽白血病抗病性状与效率性状平衡育种的遗传选择方法。以三系配套的杂交方式，培育出抗A-E、J、K亚群禽白血病的黄羽肉鸡新品种，并对其生长与繁殖等重要经济性状进行选育，最终培育出抗禽白血病黄羽肉鸡新品种，并在广东省内示范与推广应用。综上，项目完成后，项目整体技术水平可达到7级的技术就绪度。

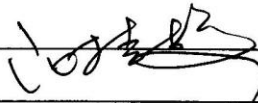
4. 科技报告考核指标

序号	报告类型	提交时间	公开类别及时限
1	年度技术进展报告	2020-12	延期公开，时限：3年以内
2	年度技术进展报告	2021-12	延期公开，时限：3年以内
3	年度技术进展报告	2022-12	延期公开，时限：3年以内
4	年度技术进展报告	2023-12	延期公开，时限：3年以内
5	最终科技报告	2024-12	延期公开，时限：3年以内

5. 参考指标

- 1) 发表研究论文6篇以上，其中SCI收录杂志上发表4篇以上；
- 2) 申请国家发明专利5项以上；
- 3) 培养博士、硕士研究生3~5人；
- 4) 获得省部级科技奖项1项。

项目负责人（签章）：



2020年3月23日

(二) 项目经济指标及社会效益

累计新增销售收入（万元，截至项目验收结题）	14510.00
累计新增利税（万元，截至项目验收结题）	5510.00

(三) 项目其他经济指标及社会效益说明, 包括攻克核心关键技术、“卡脖子”技术等内容

(1) 在支撑和服务其他重大科研方面: 禽白血病病毒 (ALV) 可致使感染鸡群产生严重的免疫抑制, 使感染鸡群极易并发或继发感染禽流感、新城疫等病毒病和大肠杆菌病等细菌病。项目实施后, 实现了黄羽肉鸡禽白血病的抗病育种, 提高了禽白血病净化效率, 有效降低了黄羽肉鸡ALV阳性率, 间接降低了禽流感、新城疫等病毒病和大肠杆菌病等细菌病的发生与流行, 研究成果可支撑和服务于国家重点研发计划“禽重大疫病防控与高效安全养殖综合技术研发”重点专项的科学研究。

(2) 经济效益:

项目实施期间, 预计在广东省内推广抗禽白血病的商品代肉鸡5000万羽, 按祖代种鸡: 父母代种鸡: 商品代肉鸡=1: 50: 5000的种禽扩繁比例, 则需培育50万套抗禽白血病父母代种鸡。较项目实施前, 降低了父母代种鸡ALV阳性率6%, 减少了父母代种鸡饲养药费12%, 提高了商品肉鸡存活率3%, 减少了商品肉鸡饲养药费20%, 节省了商品肉鸡饲料费3%。依据上述生产经济指标测算项目完成后产生的经济效益: 降低了父母代种鸡ALV阳性率6%, 则减少6%父母代种鸡的死淘, 相当于6%父母代种鸡增加的经济效益, 体现在商品代肉鸡的销售收入, 肉鸡预计售价为25元/只, 则新增销售收入: $5000 \times 0.06 \times 25 = 7500$ 万元; 扣除商品肉鸡的产生成本, 每只商品肉鸡的新增利润为5元, 则新增利润: $5000 \times 0.06 \times 5 = 1500$ 万元; 减少了父母代种鸡饲养药费12%, 每套父母代种鸡以减少药费0.2元计, 50万套祖代种鸡可节支的经济效益: $50 \times 0.2 = 10$ 万元; 提高了商品肉鸡存活率3%, 则带来的新增销售收入: $5000 \times 0.03 \times 25 = 3750$ 万元, 则新增利润: $5000 \times 0.03 \times 5 = 750$ 万元; 减少了商品肉鸡饲养药费20%, 每只商品肉鸡以减少药费0.2元计, 则节支的经济效益: $5000 \times 0.2 = 1000$ 万元; 节省了商品肉鸡饲料费3%, 饲养每只商品肉鸡的饲料费按15元计, 则节支的经济效益: $5000 \times 15 \times 0.03 = 2250$ 万元。综上, 本项目累计新增销售收入: $7500 + 10 + 3750 + 1000 + 2250 = 14510$ 万元; 本项目累计新增利税: $1500 + 10 + 750 + 1000 + 2250 = 5510$ 万元。

(3) 社会效益:

项目实施后, 促进了黄羽肉鸡产业的科技进步, 保障了黄羽肉鸡的种业安全, 实现了黄羽肉鸡产业的提质增效, 增强了黄羽肉鸡的市场竞争力, 推动了黄羽肉鸡产业的转型升级。另外, 项目实施期间以“公司+农户”的模式预计带动合作养殖户2000~2500户, 公司保价回收出栏肉鸡, 养殖户每只平均获利3元, 户均年增收6万元以上。

(4) 生态效益:

项目实施后, 提高了禽白血病净化效率, 加快了禽白血病净化进程, 降低鸡群并发或继发感染其他病毒病和细菌病, 减少病死鸡的外流污染环境, 有效改善了生态环境, 促进了人与自然的和谐发展。

(四) 阶段性成果评价

序号	指标名称	立项时已有指标值/状态	中期指标值/状态	完成时指标值/状态	评估方式(方法)及评价手段
1	数据库-黄羽肉鸡禽白血病抗性抗病表型-基因型信息数据库	建立了20个黄羽肉鸡品种(品系)禽白血病抗性抗病表型-基因型信息数据	建立60个以上黄羽肉鸡品种(品系)禽白血病抗性抗病表型-基因型信息数据	建立80个以上黄羽肉鸡品种(品系)禽白血病抗性抗病表型-基因型信息数据	构建黄羽肉鸡禽白血病抗性抗病表型-基因型信息数据库1个, 形成科技研究报告
2	新技术-禽白血病遗传抗性抗病选育技术	初步使用	优化和完善参数	大规模、大范围推广应用	集成禽白血病遗传抗性抗病选育技术体系, 形成技术方案
3	新品种-抗禽白血病黄羽肉鸡新品种	选育并保有抗A/K、B/D/E和J亚群禽白血病的黄羽肉鸡个体, 并进行了小规模扩繁。	形成抗禽白血病的黄羽肉鸡核心育种群2~3个	培育出抗禽白血病的黄羽肉鸡新杂交配套	形成新杂交配套, 进行示范和推广

三、项目研究内容、研究方法及技术路线、主要创新点

(一) 项目拟解决的关键问题

本项目拟解决以下3个关键问题：

(1) 黄羽肉鸡品种（品系）是否存在不同亚群禽白血病抗性与抗病位点？其禽白血病抗性与抗病位点的抗性与抗病基因型频率分布情况？

根据前期研究结果表明：不同黄羽肉鸡品种（品系）存在不同亚群禽白血病抗性与抗病位点及其基因型频率差异较大。通过系统建立禽白血病抗性与抗病标记的分子诊断技术平台，剖析不同黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病抗性与抗病的群体遗传参数，构建黄羽肉鸡禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息数据库，以分析不同黄羽肉鸡品种是否存在不同亚群禽白血病抗性与抗病位点及其抗性基因型的频率分布，评价其对禽白血病抗性与抗病的遗传改良潜力，筛选出抗ALV-A/K、ALV-B/D/E和ALV-J的育种素材，为抗禽白血病黄羽肉鸡新品种的培育奠定基础。

(2) 黄羽肉鸡的禽白血病抗病是否影响生长、繁殖等重要经济性状？

通过开展禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状的关联分析，阐明禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状的关系，从而综合提出黄羽肉鸡禽白血病抗病育种的遗传选育方法，以实现禽白血病抗病与肉鸡重要经济性状的平衡育种。

(3) 不同亚群禽白血病抗性标记与抗病基因聚合于同一个体的分子育种技术。

tva、tvb和chNHE1受体基因分别决定宿主对ALV-A/K、ALV-B/D/E和ALV-J感染的易感性或抗病性。通过创制抗ALV-A/K、ALV-B/D/E、ALV-J、ALV-A/K/B/D/E、ALV-A/K/J、ALV-B/D/E/J和ALV-A/K/B/D/E/J的黄羽肉鸡新种群和育种新材料，用于培育抗A-E、J和K亚群禽白血病黄羽肉鸡新品种（品系），实现黄羽肉鸡多亚群禽白血病抗病性状的遗传改良。

(二) 项目的主要研究内容

1、黄羽肉鸡禽白血病抗性标记与抗病基因的发掘

收集我国30个以上主要地方鸡品种及50个以上商业肉鸡品系,开展不同品种黄羽肉鸡A/K、B/D/E、J亚群禽白血病病毒受体基因tva、tvb和chNHE1的遗传多样性研究,筛选不同亚群禽白血病病毒受体基因的遗传变异位点,研究受体基因遗传变异位点对病毒感染、受体基因表达、病毒与受体结合能力的影响,开发有重要育种价值的禽白血病遗传抗性分子标记。应用基因组学、转录组学和蛋白组学等多组学分析技术,联合全基因组关联分析和权重基因共表达网络分析等方法,发掘有重要育种价值的禽白血病抗病基因。

2、黄羽肉鸡禽白血病抗性抗病表型-基因型数据库构建

结合前期开发的9种ALV-A/K遗传抗性位点(tvar1、tvar2、tvar3、tvar4、tvar5、tvar6、tvar7、tvar8和tvar9)、5种ALV-B/D/E遗传抗性位点(tvbr1、tvbr2、tvbr3、tvbr4和tvbr5)和2种ALV-J抗性抗病位点(TGFB2基因启动子区chr3:18755007位点甲基化、ALV-J的NHE1受体蛋白第38位氨基酸(色氨酸)缺失(NHE1 Δ W38))的分子诊断及其基因分型方法,系统建立禽白血病遗传抗性抗病位点的分子诊断技术平台,创建不同亚群禽白血病遗传抗性抗病的选育方法,集成综合性的禽白血病遗传抗性抗病选育技术体系。利用禽白血病抗性抗病标记分子诊断及基因分型方法,精准鉴定黄羽肉鸡品种(品系)对不同亚群禽白血病遗传抗性抗病表型,构建黄羽肉鸡的禽白血病抗性抗病表型-基因型信息数据库。分析不同黄羽肉鸡品种对不同亚群禽白血病抗性抗病的遗传改良潜力,从不同黄羽肉鸡品种(品系)中筛选出抗ALV-A/K、ALV-B/D/E和ALV-J的育种素材。

3、抗禽白血病黄羽肉鸡核心育种群的组建

利用抗不同亚群禽白血病黄羽肉鸡个体进行小规模扩繁,结合不同亚群禽白血病遗传抗性抗病的选育方法,通过杂交选育,创制抗ALV-A/K、ALV-B/D/E、ALV-J、ALV-A/K/B/D/E、ALV-A/K/J、ALV-B/D/E/J和ALV-A/K/B/D/E/J的黄羽肉鸡新种群和育种新材料。以市场需求为目标,现代家禽育种理论和方法为主导,选育抗禽白血病的黄羽肉鸡核心育种群。开展抗禽白血病黄羽肉鸡核心育种群的禽白血病跟踪与检测,证实核心育种群具有禽白血病抗病性状。开展禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状的关联分析,研究禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状的关系,提出黄羽肉鸡禽白血病抗病育种的遗传选择方法,实现禽白血病抗病性状与效率性状的平衡育种。

4、抗禽白血病黄羽肉鸡新品种(品系)的培育

以创制的抗禽白血病黄羽肉鸡核心育种群为育种素材,利用现代家禽育种理论和方法,结合基于禽白血病抗性抗病分子标记信息的黄羽肉鸡选种和选配技术,采用三系配套的杂交方式,培育抗A-E、J和K亚群禽白血病的黄羽肉鸡新品种。开展抗禽白血病黄羽肉鸡新品种的禽白血病跟踪与检测,证实黄羽肉鸡新品种具有禽白血病抗病特性。开展抗禽白血病黄羽肉鸡新品种(品系)生长与繁殖等经济性状的选育,最终培育出以抗禽白血病为特色、种鸡和肉鸡性能突出、市场竞争优势明显、适合在广东省内现代农业家禽产业园或农业科技园区应用示范及在申报单位大规模生产和推广的黄羽肉鸡新品种。

(三) 项目采取的研究方法及技术路线

1、项目拟采取的研究方法如下：

(1) 开展黄羽肉鸡禽白血病病毒受体基因的遗传多样性研究，筛选不同亚群禽白血病病毒受体基因新的遗传变异位点。

(2) 利用分子生物学、细胞生物学和分子免疫学方法，研究受体基因遗传变异位点对病毒感染、受体基因表达、病毒与受体结合能力的影响，发掘禽白血病遗传抗性分子标记。

(3) 应用基因组学、转录组学和蛋白组学等多组学分析技术，发掘禽白血病的抗病基因。

(4) 利用焦磷酸测序、PCR-RFLP等方法，建立禽白血病抗性标记与抗病位点的高通量分子诊断及基因分型方法，构建禽白血病遗传抗性与抗病位点的分子诊断技术平台。

(5) 利用禽白血病抗性与抗病选育技术，建立黄羽肉鸡禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息数据库，筛选抗ALV-A/K、ALV-B/D/E和ALV-J的育种素材。

(6) 结合不同亚群禽白血病遗传抗性与抗病的选育方法，通过杂交选育，创制抗ALV-A/K、ALV-B/D/E、ALV-J、ALV-A/K/B/D/E、ALV-A/K/J、ALV-B/D/E/J和ALV-A/K/B/D/E/J的黄羽肉鸡新种群和育种新材料。

(7) 通过研究禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状的关系，提出黄羽肉鸡禽白血病抗病性状与肉鸡重要经济性状平衡育种的遗传选择方法，选育抗禽白血病的黄羽肉鸡核心育种群。

(8) 利用基于禽白血病抗性与抗病分子标记信息的黄羽肉鸡选种和选配技术，采用杂交配套方式，培育抗A-E、J和K亚群禽白血病的黄羽肉鸡新品种，并进行示范与推广应用。

2、项目的技术路线

本项目的技术路线见可行性研究报告。

(四) 主要创新点

(1) 禽白血病抗性与抗病选育技术体系的创建与集成。禽白血病已成为制约黄羽肉鸡产业健康发展的瓶颈问题。抗病育种是控制禽白血病的一种新策略和重要途径。禽白血病抗性与抗病技术是实现黄羽肉鸡禽白血病抗病育种的核心关键技术。围绕该急需突破的关键前沿技术，本项目申报团队在国内率先开展黄羽肉鸡禽白血病抗性与抗病技术研究，发掘有重要育种价值的ALV-A/K、ALV-B/D/E和ALV-J抗性标记与抗病位点，建立不同亚群禽白血病抗性标记与抗病位点的分子诊断及其基因分型方法，创建并完善不同亚群禽白血病抗性与抗病选育技术，集成禽白血病抗性与抗病选育技术体系，从而在国内率先开展黄羽肉鸡禽白血病的抗病育种，引领家禽重要疾病抗病育种领域的技术创新，并将创建与集成的禽白血病抗性与抗病选育技术在全国示范与推广应用。同时，对开发的禽白血病抗性与抗病标记及其应用申请专利，加强在禽白血病抗性与抗病技术领域的知识产权布局，以提升本项目研发成果的核心技术创新与转化能力。

(2) 抗禽白血病黄羽肉鸡新品种的培育。禽白血病是危害黄羽肉鸡种业安全最大的疾病。迄今为止，禽白血病尚无商品化疫苗和有效的治疗方法，主要通过种群净化措施进行防控。每年用于黄羽肉鸡种群净化的费用超过7亿，虽然取得一定的成效，但净化后阴性鸡群依然面临着再次感染禽白血病的风险。因此，急需突破防控黄羽肉鸡禽白血病的核心关键技术。本项目申报团队在国内率先开展不同黄羽肉鸡品种（品系）对不同亚群禽白血病的遗传抗性与抗病评估，构建黄羽肉鸡禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息数据库，筛选出抗ALV-A/K、ALV-B/D/E和ALV-J的育种素材。在此基础上，创制出抗ALV-A/K、ALV-B/D/E、ALV-J、ALV-A/K/B/D/E、ALV-A/K/J、ALV-B/D/E/J和ALV-A/K/B/D/E/J的黄羽肉鸡新种群和育种新材料，以组建抗禽白血病的黄羽肉鸡核心育种群。通过杂交配套的选育方法，培育出抗A-E、J和K亚群禽白血病的黄羽肉鸡新品种，并进行示范与推广应用。黄羽肉鸡的禽白血病抗病育种，是从宿主的角度来防控禽白血病，与传统的种群净化措施不同，在控制禽白血病的策略与途径上创新强，可提高禽白血病的净化效率，提升了黄羽肉鸡的种源质量，从而保障我国黄羽肉鸡种业工程健康发展。

四、项目进度和阶段目标

(一) 项目起止时间: 2020年 01月 01日 至 2024年 12月 31日				
(二) 项目实施进度及阶段主要目标				
开始日期	结束日期	主要工作内容	预期目标	成果形式
2020年 01月 01日	2020年 12月 31日	1) 筛选黄羽肉鸡品种(品系)禽白血病病毒受体基因新的遗传变异位点, 开发有重要育种价值的禽白血病抗性标记; 2) 利用多组学技术, 发掘有重要育种价值的禽白血病抗病基因; 3) 建立禽白血病抗性标记与抗病位点的分子诊断技术; 4) 精准鉴定黄羽肉鸡品种(品系)对不同亚群禽白血病的抗性与抗病表型, 筛选抗ALV-A/K、ALV-B/D/E和ALV-J的育种素材。	1) 鉴定有重要育种价值的抗不同亚群禽白血病抗性标记或抗病基因3~5个; 2) 建立3~5种禽白血病抗性标记与抗病位点的分子诊断技术; 3) 获得50个以上黄羽肉鸡品种(品系)的禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息数据; 4) 筛选出抗ALV-A/K、ALV-B/D/E和ALV-J的育种素材。	1) 知识产权: 申请国家发明专利2~3件; 2) 论文: 发表研究论文2篇以上, 其中SCI收录1篇以上; 3) 人才: 培养研究生1名。 4) 科技报告: 撰写年度技术进展报告1篇。

2021年 01月 01日	2021年 12月 31日	<p>1) 持续挖掘有重要育种价值的抗不同亚群禽白血病抗性标记或抗病基因;</p> <p>2) 建立禽白血病抗性标记与抗病位点的分子诊断技术, 创建不同亚群禽白血病遗传抗性与抗病的选育方法;</p> <p>3) 继续鉴定黄羽肉鸡品种(品系)对 不同亚群禽白血病的抗性与抗病表型, 评价不同黄羽肉鸡品种禽白血病抗性与抗病遗传改良潜力;</p> <p>4) 创制抗ALV-A/K、ALV-B/D/E、ALV-J、ALV-A/K/B/D/E、ALV-A/K/J、ALV-B/D/E/J和ALV-A/K/B/D/E/J的黄羽肉鸡新种群和育种新材料。</p>	<p>1) 鉴定有重要育种价值的抗不同亚群禽白血病抗性标记或抗病基因2~5个;</p> <p>2) 系统建立禽白血病遗传抗性与抗病位点的分子诊断技术平台, 集成禽白血病遗传抗性与抗病选育技术体系;</p> <p>3) 更新黄羽肉鸡品种(品系)的禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息数据;</p> <p>4) 创制出抗禽白血病的黄羽肉鸡新种群和育种新材料。</p>	<p>1) 新技术: 集成1套禽白血病遗传抗性与抗病选育技术;</p> <p>2) 数据库: 构建黄羽肉鸡禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息数据库1个;</p> <p>3) 创制出抗禽白血病的黄羽肉鸡新种群和育种新材料5~7种;</p> <p>4) 知识产权: 申请国家发明专利2件以上;</p> <p>5) 论文: 发表研究论文2篇以上, 其中SCI收录1篇以上;</p> <p>6) 科技报告: 撰写年度技术进展报告1篇。</p>
2022年 01月 01日	2022年 12月 31日	<p>1) 选育抗禽白血病的黄羽肉鸡核心育种群;</p> <p>2) 开展抗禽白血病黄羽肉鸡核心育种群的禽白血病跟踪与检测;</p> <p>3) 开展A、B、D、E和K亚群禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状的关联分析。</p>	<p>1) 选育出抗A、B、D、E、J和K亚群禽白血病的黄羽肉鸡核心育种群;</p> <p>2) 证实核心育种群具有禽白血病抗病特性;</p> <p>3) 获得A、B、D、E和K亚群禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状关联分析的数据。</p>	<p>1) 形成抗禽白血病的黄羽肉鸡核心育种群2~3个</p> <p>2) 知识产权: 申请国家发明专利1件以上;</p> <p>3) 人才: 培养研究生1~2名。</p> <p>4) 科技报告: 撰写年度技术进展报告1篇。</p>

2023年 01月 01日	2023年 12月 31日	<p>1) 开展J亚群禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状的关联分析；</p> <p>2) 开展抗禽白血病黄羽肉鸡核心育种群的杂交配套，并选育其生长与繁殖等生产性能；</p> <p>3) 开展抗禽白血病黄羽肉鸡新杂交配套的禽白血病跟踪与检测。</p>	<p>1) 整理分析禽白血病抗病性状与肉鸡重要经济性状的关系，制定禽白血病抗病性状与肉鸡重要经济性状的平衡育种方案；</p> <p>2) 培育出抗禽白血病的黄羽肉鸡新杂交配套，并证实其禽白血病抗病特性。</p>	<p>1) 综合提出1种禽白血病病毒抗病选育的平衡育种方法；</p> <p>2) 论文：发表研究论文1篇以上；</p> <p>3) 科技报告：撰写研究报告1篇，年度技术进展报告1篇。</p>
2024年 01月 01日	2024年 12月 31日	<p>1) 抗禽白血病黄羽肉鸡新杂交配套的持续培育与扩繁，并进行示范与推广；</p> <p>2) 结题汇报。</p>	<p>形成以抗禽白血病为特色、种鸡和肉鸡性能突出的黄羽肉鸡新杂交配套，示范推广5000万羽肉鸡以上。</p>	<p>1) 培育出抗A-E、J和K亚群禽白血病黄羽肉鸡新杂交配套1~2个</p> <p>2) 知识产权：申请国家发明专利1件以上；</p> <p>3) 论文：发表SCI收录论文1篇以上；</p> <p>4) 人才：培养研究生1~2名；</p> <p>5) 科技报告：撰写最终科技报告1篇。</p>

五、知识产权对策、成果管理及合作权益分配

1. 项目实施过程中所产生的知识产权，优先执行任务下达单位的知识产权管理政策，在此前提下，作如下规定：

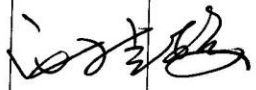
①本项目各方独立完成的所有权归各自所有；双方共同完成的由双方共享，具体按照双方的贡献大小进行分配或双方另行商定。

②双方共有的知识产权（含成果、专利等）的转让，须在双方同意的前提下进行，任何一方不得私自转让或许可实施。

2. 项目成果申报各级奖项，双方单位排名根据具体情况另行商定，人员排名原则上按贡献大小先后排名。

六、参与人员信息

项目负责人:

姓名	性别	年龄	职务	职称	学位	在项目中承担的任务	所在单位	签名
谢青梅	女	48	无	教授	博士	项目实施方案的制订、跟踪和落实	广东温氏南方家禽育种有限公司	

主要研究开发人员:

姓名	性别	年龄	职务	职称	学位	在项目中承担的任务	所在单位	签名
张德祥	男	52	副总经理	副教授	博士	新品种培育	广东温氏南方家禽育种有限公司	
陈伟国	男	38	无	高级实验师	硕士	禽白血病抗性与抗病表型-基因型信息库建立	华南农业大学	
蔡曼珊	女	39	无	兽医师	硕士	禽白血病抗病与肉鸡经济性状平衡育种研究	广东省农业科学院动物科学研究所	
季从亮	男	41	主任	高级畜牧师	博士	组建抗禽白血病黄羽肉鸡核心育种群	广东温氏南方家禽育种有限公司	
徐振强	男	34	副主任	未取得	博士	组建抗禽白血病黄羽肉鸡核心育种群	广东温氏南方家禽育种有限公司	
曹伟胜	男	44	无	教授	博士	禽白血病跟踪与检测	华南农业大学	
陈峰	男	46	副总裁	研究员	硕士	新配套系推广	华南农业大学	

广东省重点领域研发计划项目任务书

彭志军	男	46	育种研究员	未取得	硕士	新配套系推广	广东温氏南方家禽育种有限公司	彭志军
严霞	女	43	无	高级畜牧师	硕士	黄羽肉鸡禽白血病抗性与抗病表型的鉴定	广东省农业科学院动物科学研究所	严霞
蔺文成	男	32	无	副教授	博士	禽白血病遗传抗性与抗病选育方法的建立	华南农业大学	蔺文成
王劼	女	39	主任	研究员	博士	禽白血病抗病与肉鸡经济性状平衡育种研究	广东省农业科学院动物科学研究所	王劼
李鸿鑫	男	32	无	实验师	硕士	禽白血病抗性与抗病位点分子诊断技术的建立	华南农业大学	李鸿鑫
张新珩	女	30	无	未取得	博士	禽白血病抗病基因的挖掘	华南农业大学	张新珩
张燕	女	35	副主任	未取得	硕士	项目管理与跟踪	广东温氏南方家禽育种有限公司	张燕
廖秋生	男	47	禽病研究员	未取得	硕士	黄羽肉鸡品系的样品采集	广东温氏南方家禽育种有限公司	廖秋生
严专强	男	33	禽病研究员	未取得	博士	地方鸡种的样品采集	广东温氏南方家禽育种有限公司	严专强
严一铭	男	25	无	未取得	硕士	禽白血病抗病基因的挖掘	华南农业大学	严一铭

廖立钦	男	24	无	未取得	学士	禽白血病抗性标记的开发	华南农业大学	廖立钦
乔延召	男	27	无	未取得	硕士	新种群和育种新材料的建立	华南农业大学	乔延召
张翔宇	男	24	无	未取得	学士	禽白血病抗性标记的开发	华南农业大学	张翔宇

2020B020222001

七、承担、参与单位工作分工及经费分配情况

承担/参与单位名称 (盖章)	工作分工	总经费分摊 (万元)	财政经费分配 (万元)
广东温氏南方家禽育种有限公司 	(1) 提供黄羽肉鸡专门化品系, 并提供饲养场地 (2) 组建抗禽白血病为特色的黄羽肉鸡核心育种群, 并开展杂交配套应用 (3) 新杂交配套的示范和推广。	1625.00	225.00
华南农业大学 	(1) 发掘有重要育种价值的禽白血病遗传抗性分子标记与抗病基因; (2) 精准鉴定黄羽肉鸡品种对不同亚群禽白血病毒病的抗性表型, 构建表型-基因型数据库; (3) 利用分子标记辅助选择, 创制抗禽白血病的黄羽肉鸡新种群和育种新材料; (4) 开展抗禽白血病黄羽肉鸡核心育种群和新杂交配套的禽白血病跟踪与检测。	300.00	300.00
广东省农业科学院动物科学研究所 	(1) 精准鉴定10个黄羽肉鸡品种(品系)对不同亚群禽白血病的遗传抗性抗病表型; (2) 制定禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状的平衡育种方案, 研究禽白血病抗病性状与生长、繁殖等经济性状的关系。	75.00	75.00
合计		2000.00	600.00

八、项目总经费及省财政科技经费预算

(一) 省财政科技资金拟投入总额: (大写) 陆佰万圆整; (小写) 600.00万元;					
(二) 省财政科技资金分期下达计划 (此为正常情况下预计拨付计划, 中期评估或验收结题不通过的, 甲方有权停止或核减拨付后续资金):					
分期		经费(万元)			
第1期		90.00			
第2期		390.00			
第3期		120.00			
(三) 总经费及省财政科技资金投入情况				(单位: 万元)	
项目总经费投入	省财政科技资金	自筹经费			合计
		自有经费	地方政府投入	其它	
	600.00	1400.00		0.00	2000.00
自筹资金投入情况说明:					
项目经费预算:				(单位: 万元)	
	项目总经费		省财政科技资金		
支出经费	经费额	用途说明	经费额	用途说明	
1、直接费用	1925.00		525.00		
(1) 设备费	0	无	0.00	无	
(2) 材料费	1680.00	用于购买饲养抗禽白血病黄羽肉鸡新种群、育种新材料、核心育种群和杂交配套系种鸡所需的饲料、药物、疫苗, 购买分子生物学、细胞生物学和免疫学相关实验试剂; 购买实验动物及饲养费用; 购买其他化学试剂及耗材费用。	280.00	用于购买饲养抗禽白血病黄羽肉鸡新种群、育种新材料、核心育种群和杂交配套系种鸡所需的饲料、药物、疫苗, 购买分子生物学、细胞生物学和免疫学相关实验试剂; 购买实验动物及饲养费用; 购买其他化学试剂及耗材费用。	
(3) 测试化验加工外协费	95.00	用于基因测序、全基因组、转录组和蛋白组高通量测序、流式细胞术检测及引物合成费等。	95.00	用于基因测序、全基因组、转录组和蛋白组高通量测序、流式细胞术检测及引物合成费等。	
(4) 燃料动力费	0	无	0.00	无	
(5) 差旅费/会议费/国际合作与交流费	49.00	开展省内外实验研究的差旅费、参加国内相关学术会议费、组织开展项目研讨会、项目结题验收会议以及邀请国外专家来华技术交流费等费用。	49.00	开展省内外实验研究的差旅费、参加国内相关学术会议费、组织开展项目研讨会、项目结题验收会议以及邀请国外专家来华技术交流费等费用。	
(6) 出版/文献/信息传播/知识产权事务	26.00	用于支付论文版面费、文献购买及检索费、资料打印及复印费用、专	26.00	用于支付论文版面费、文献购买及检索费、资料打印及复印费用、专	

广东省重点领域研发计划项目任务书

费		利申请及其他知识产权事务等费用。		利申请及其他知识产权事务等费用。
(7) 劳务费	70.00	用于支付抗禽白血病黄羽肉鸡新种群、育种新材料、核心育种群和杂交配套系种鸡饲养和管理过程中临时聘用人员以及参加项目研究的研究生劳务补贴等。	70.00	用于支付抗禽白血病黄羽肉鸡新种群、育种新材料、核心育种群和杂交配套系种鸡饲养和管理过程中临时聘用人员以及参加项目研究的研究生劳务补贴等。
(8) 人员费	0	无	0.00	无
(9) 团队负责人及引进高端人才年薪制经费	0	无	0.00	无
(10) 专家咨询费	5.00	用于邀请专家对课题执行情况进行指导。	5.00	用于邀请专家对课题执行情况进行指导。
(11) 直接费用其他支出	0	无	0.00	无
2、间接费用	75.00		75.00	
(1) 间接成本	0	无	0.00	无
(2) 管理成本	23.00	项目管理费用。	23.00	项目管理费用。
(3) 绩效支出	52.00	项目组成员绩效费用。	52.00	项目组成员绩效费用。
3、其他支出费用				
合计	2000.00		600.00	
其它需说明的情况				
无。				

九、签约各方

管理单位（甲方）：广东省科学技术厅（盖章）

单位地址：广东省广州市越秀区连新路171号

法定代表人（或授权代表）：王瑞军（签章）

联系人（经办人）姓名：叶毓峰（签章）

Email: yeyf@gdstc.gov.cn QQ:

电话：020-83163906 微信：

2020年4月3日

牵头承担单位一（乙方）：广东温氏南方家禽育种有限公司
（盖章，单位法人章或单位法人授权章）

单位地址：广东省云浮市新兴县广东省云浮市新兴县新城镇东堤北路6号

法定代表人（或法人代理）：陈永华（签章）

联系人（项目主管）姓名：张燕（签章）

Email: 782424707@qq.com QQ:

电话：07662291726 微信：

2020年3月15日

项目推荐（主管）单位（丙方）：云浮市科学技术局
（盖章，单位法人章或单位法人授权章）

单位地址：广东省云浮市市辖区广东省云浮市吉祥中路25号市科技馆

法定代表人（或法人代理）：黄小润（签章）

联系人（项目主管）姓名：苏英慧（签章）

Email: 283015098@qq.com QQ:

电话：0766-8921360 微信：

年 月 日

国家自然科学基金资助项目批准通知

(预算制项目)

谢青梅 先生/女士:

根据《国家自然科学基金条例》、相关项目管理办法规定和专家评审意见,国家自然科学基金委员会(以下简称自然科学基金委)决定资助您申请的项目。项目批准号: 32272981, 项目名称: ALV-J

p68蛋白SUMO化修饰结合eEF1A调控逆转录活性促进病毒增殖的分子机制, 直接费用: 54.00万元, 项目起止年月: 2023年01月至 2026年12月, 有关项目的评审意见及修改意见附后。

请您尽快登录科学基金网络信息系统(<https://isisn.nsfc.gov.cn>), **认真阅读《国家自然科学基金资助项目计划书填报说明》并按要求填写《国家自然科学基金资助项目计划书》(以下简称计划书)**。对于有修改意见的项目,请您按修改意见及时调整计划书相关内容;如您对修改意见有异议,须在电子版计划书报送截止日期前向相关科学处提出。

请您将电子版计划书通过科学基金网络信息系统(<https://isisn.nsfc.gov.cn>)提交,由依托单位审核后提交至自然科学基金委。自然科学基金委审核未通过者,将退回的电子版计划书修改后再行提交;审核通过者,打印纸质版计划书(一式两份,双面打印)并在项目负责人承诺栏签字,由依托单位科研、财务管理等部门审核、签章并在承诺栏加盖依托单位公章,且将申请书纸质签字盖章页订在其中一份计划书之后,一并报送至自然科学基金委项目材料接收工作组。纸质版计划书应当保证与审核通过的电子版计划书内容一致。**自然科学基金委将对申请书纸质签字盖章页进行审核,对存在问题的,允许依托单位进行一次修改或补齐。**

向自然科学基金委提交电子版计划书、报送纸质版计划书并补交申请书纸质签字盖章页截止时间节点如下:

1. **2022年10月8日16点:** 提交电子版计划书的截止时间;
2. **2022年10月14日16点:** 提交修改后电子版计划书的截止时间;
3. **2022年10月19日:** 报送纸质版计划书(一式两份,其中一份包含申请书纸质签字盖章页)的截止时间。

4. 2022年10月28日：报送修改后的申请书纸质签字盖章页的截止时间。

请按照以上规定及时提交电子版计划书，并报送纸质版计划书和申请书纸质签字盖章页，逾期不报计划书或申请书纸质签字盖章页且未说明理由的，视为自动放弃接受资助；未按要求修改或逾期提交申请书纸质签字盖章页者，将视情况给予暂缓拨付经费等处理。

附件：项目评审意见及修改意见表

国家自然科学基金委员会

2022年9月7日

附件：项目评审意见及修改意见表

项目批准号	32272981	项目负责人	谢青梅	申请代码1	C1802
项目名称	ALV-J p68蛋白SUMO化修饰结合eEF1A调控逆转录活性促进病毒增殖的分子机制				
资助类别	面上项目		亚类说明		
附注说明					
依托单位	华南农业大学				
直接费用	54.00 万元		起止年月	2023年01月 至 2026年12月	
<p>通讯评审意见：</p> <p><1>具体评价意见：</p> <p>一、该申请项目的研究思想或方案是否具有新颖性和独特性？请详细阐述判断理由。 申请项目拟探究ALV-J的P68蛋白SUMO化修饰结合宿主蛋白eEF1A 的分子基础，解析P68蛋白促进病毒增殖的分子机制，研究思路较新。</p> <p>二、请评述申请项目所关注问题的科学价值以及对相关前沿领域的潜在贡献。 申请者所关注的问题具有一定的科学价值。</p> <p>三、请评述申请人的研究基础与研究方案的可行性。 申请者长期从事禽病研究，研究基础好，研究方案可行。</p> <p>四、其他建议</p> <p><2>具体评价意见：</p> <p>一、该申请项目的研究思想或方案是否具有新颖性和独特性？请详细阐述判断理由。 作者通过研究p68蛋白SUMO化修饰的分子基础及其对病毒增殖的影响，明确p68蛋白SUMO化修饰与宿主蛋白eEF1A两者关系，最终解析ALV-J p68蛋白SUMO化修饰结合eEF1A调控逆转录活性促进病毒增殖的分子机制。ALV p68蛋白SUMO化修饰未见报道，研究思路新颖独特。</p> <p>二、请评述申请项目所关注问题的科学价值以及对相关前沿领域的潜在贡献。 本项目通过研究 ALV-J 逆转录酶 p68 蛋白SUMO化修饰的分子基础，探明p68蛋白SUMO化修饰与宿主蛋白eEF1A的相互作用，研究二者之间相互作用的分子基础，阐明两者间的关系，解析ALV-J p68蛋白SUMO化修饰结合eEF1A调控逆转录活性促进病毒增殖的分子机制。研究结果将丰富ALV的致病机理的理论知识，为ALV-J的防控提供理论依据。</p> <p>三、请评述申请人的研究基础与研究方案的可行性。 研究内容及方案合理可行，申请人在相关领域有丰富的研究经验，且前期研究基础结果详实可靠，可以合理的进行下一步研究，预期结果可阐明eEF1A调控ALV-J逆转录活性的分子机制。</p> <p>四、其他建议</p> <p><3>具体评价意见：</p> <p>一、该申请项目的研究思想或方案是否具有新颖性和独特性？请详细阐述判断理由。 J亚群禽白血病严重危害养禽业;ALV-J逆转录复合物（RTC）在病毒逆转录过程中起至关重要的作用。该项目前期研究发现宿主蛋白eEF1A、SUMO2存在于ALV-J的RTC中，RTC重要组成成分p68存在SUMO化修饰，与ALV-J增殖相关。该项目拟通过研究ALV-J p68蛋白SUMO化修饰的分子基础及对病毒增殖的影响，探究p68蛋白SUMO化修饰结合宿主蛋白eEF1A的分子基础，解析p68蛋白SUMO化修饰结合eEF1A调控逆转录活性促进病毒增殖的分子机制。研究成果对ALV-J的防治具有较重要的理论价值，总体研究方案合理可行。</p>					

二、请评述申请项目所关注问题的科学价值以及对相关前沿领域的潜在贡献。
三、请评述申请人的研究基础与研究方案的可行性。
四、其他建议
<div>修改意见：</div> <div>生命科学部</div> <div>2022年9月7日</div>



项目批准号	31972659
申请代码	C1802
归口管理部门	
收件日期	



国家自然科学基金 资助项目结题/成果报告

资助类别：面上项目

亚类说明：

附注说明：

项目名称：ALV-Jp19基因编码的ALV-miRNA-p19-01调控DUSP6/ERK信号通路促进病毒出芽的分子机制

负责人：谢青梅 BRID：09697.00.89025

电子邮件：qmx@scau.edu.cn 电话：020-85280283

依托单位：华南农业大学

联系人：唐家林 电话：020-85280070

直接费用：59.0000（万元） 执行年限：2020.01-2023.12

填表日期：2024年01月03日

国家自然科学基金委员会制（2023年）



项目摘要

中文摘要:

J亚群禽白血病是由ALV-J引起的一种免疫抑制性肿瘤性疾病,严重危害养禽业。本团队首次发现在感染ALV-J的公鸡精液外泌体中存在ALV-J p19基因编码的miRNA(命名为ALV-miRNA-p19-01),研究表明该miRNA具有促进ALV-J出芽的作用,且DUSP6是其靶基因。研究报道DUSP6可通过抑制ERK酶活性调控ERK信号通路,而ERK信号通路与多种病毒的出芽和释放密切相关。基于这些研究基础,本项目将深入研究ALV-miRNA-p19-01促进 ALV-J出芽的调控机制,探讨该miRNA靶向DUSP6对ALV-J出芽的影响,以及该miRNA靶向DUSP6调控ERK信号通路对ALV-J出芽的影响,阐明ALV-miRNA-p19-01调控DUSP6/ERK信号通路促进ALV-J出芽的分子机制。本项目研究成果对J亚群禽白血病的防控有重要的理论和实践意义。

Abstract:

Avian leukosis subgroup J is an immunosuppressive oncogenic infectious disease caused by avian leukosis virus subgroup J (ALV-J), which is responsible for serious harm to poultry industry. Our team firstly found that exosomes derived from seminal plasma of rooster infected with ALV-J contain a microRNA encoded by ALV-J p19 gene and named it as ALV-miRNA-p19-01. Our previous study has demonstrated that this miRNA can promote the budding of ALV-J and its target gene is DUSP6. Previous studies have demonstrated DUSP6 can inhibit the activity of ERK, whereby regulating the function of ERK signaling pathway, which is closely related to the budding and release of a variety of viruses. Based on these research results, the aim of our project is to further study the regulatory mechanism of ALV-miRNA-p19-01 promoting ALV-J budding. We will investigate the effect of this miRNA targeting DUSP6 on ALV-J budding, and further investigate the effect of this miRNA targeted DUSP6 regulating ERK signaling pathway on ALV-J budding, and finally elucidate the molecular mechanism of ALV-miRNA-p19-01 promoting ALV-J budding through regulating DUSP6/ERK signaling pathway. The research results of this project will definitely have an important theoretical and practical significance for the prevention and control of avian leukosis subgroup J.

关键词(用分号分开): 非编码RNA; 分子机制; J亚群禽白血病病毒; ALV-miRNA-p19-01; 出芽

Keywords (separated by;): non-coding RNA; molecular mechanism; Avian leukosis virus subgroup J; ALV-miRNA-p19-01; budding



结题摘要

中文摘要（对项目的背景、主要研究内容、重要结果、关键数据及其科学意义等做简单概述）：

本项目经过4年的深入研究，圆满完成了研究任务，从分子水平上阐明了ALV-miRNA-p19-01通过调控DUSP6/ERK2信号通路促进ALV-J释放的分子机制。研究发现：（1）鉴定了一种新的，由ALV-J编码的病毒miRNA——ALV-miRNA-p19-01，并系统研究了其生物发生途径与靶基因功能分析。（2）明确了ALV-miRNA-p19-01通过抑制靶基因DUSP6表达从而促进ALV-J出芽的功能表型。（3）解析了宿主蛋白DUSP6通过调控ERK2磷酸化进而影响ALV-J出芽的作用机制。（4）阐明了ALV-miRNA-p19-01通过调控DUSP6/ERK2信号通路促进ALV-J出芽的分子机制。相关研究在Cell Death & Disease等国际专业学术期刊发表学术论文13篇，培养博士研究生1人、硕士研究生3人。研究成果有助于深入理解ALV-J生命周期新的调控模式，对ALV-J的防治具有重要的理论价值。

Abstract (Brief description of research background, main methods, contributions, and research data):

This project has been successfully completed after four years of in-depth research, elucidating the molecular mechanism by which ALV-miRNA-p19-01 promotes the release of ALV-J by regulating the DUSP6/ERK2 signaling pathway. The findings include: (1) Identification of a novel viral miRNA encoded by ALV-J, ALV-miRNA-p19-01, and systematic study of its biogenesis and target gene function analysis. (2) Demonstration that ALV-miRNA-p19-01 promotes ALV-J budding by inhibiting the expression of its target gene, DUSP6. (3) Elucidation of the mechanism by which the host protein DUSP6 regulates ALV-J budding through modulation of ERK2 phosphorylation. (4) Clarification of the molecular mechanism by which ALV-miRNA-p19-01 promotes ALV-J budding by regulating the DUSP6/ERK2 signaling pathway. Thirteen academic papers related to this research have been published in international professional journals such as Cell Death & Disease, and one doctoral student and three master's students have been trained. These findings contribute to a deeper understanding of the new regulatory mechanisms in the life cycle of ALV-J and have significant theoretical value for the prevention and treatment of ALV-J.

关键词（用分号分开）： J亚群禽白血病病毒； 非编码RNA； DUSP6； ERK2； 出芽

Keywords (separated by;): ALV-J; miRNA; DUSP6; ERK2; virus budding



正文

《结题/成果报告》正文分为两个部分：**结题部分和成果部分**。请按照《结题/成果报告》填报说明及撰写要求填写。

（一）结题部分

1. 研究计划执行情况概述。

（1）按计划执行情况。

本项目经过 4 年的深入研究，圆满完成了研究任务，超额完成了研究目标，从分子水平阐明了 ALV-J 编码的病毒 miRNA——ALV-miRNA-p19-01 调控 DUSP6/ERK2 信号通路促进 ALV-J 释放的分子机制。在项目执行过程中，证明了宿主蛋白 DUSP6 对 ALV-J 出芽的调控作用，明确了 DUSP6 调控 ERK 磷酸化的具体过程，解析了 ERK 信号通路对 ALV-J 出芽的影响，并最终发现 ALV-miRNA-p19-01 通过调控 DUSP6/ERK2 信号通路促进 ALV-J 释放的分子机制。相关研究成果已在 Veterinary Microbiology、Poultry Science、Cell Death & Disease 等国际专业学术期刊发表研究论文 13 篇。

（2）研究目标完成情况。

项目执行过程中，根据项目研究目标和研究内容，超额完成了研究任务，无研究目标或研究内容的调整。

2. 研究工作主要进展、结果和影响。

（1）主要研究内容。

本项目的主要研究内容是阐明 ALV-miRNA-p19-01 影响 ALV-J 出芽的作用机制。具体研究内容如下：**①研究 DUSP6 对 ALV-J 出芽的影响。**过表达 DUSP6 或沉默 DUSP6 表达，研究细胞中 DUSP6 蛋白表达改变后对 ALV-J 出芽的影响，阐明 DUSP6 在调控 ALV-J 出芽过程中发挥的生物学功能。**②研究 DUSP6 对 ERK 信号通路的调控作用。**研究 DUSP6 对 ERK 信号通路关键蛋白及 ERK 信号通路下游分子蛋白的表达及磷酸化修饰水平的影响，明确 DUSP6 对 ERK 信号通路活性的调控作用，阐明 DUSP6 调控 ERK 信号通路的作用机制。**③研究 ERK 信号**



通路对 ALV-J 出芽的影响。激活或抑制 ERK 信号通路活性, 研究细胞内 ERK 信号通路的活性改变后对 ALV-J 出芽的影响, 阐明 ERK 信号通路在 ALV-J 出芽过程中发挥的生物学功能。④研究 ALV-miRNA-p19-01 调控 DUSP6/ERK 信号通路对 ALV-J 出芽的影响。研究 ALV-miRNA-p19-01 靶向 DUSP6 对 ERK 信号通路的调控作用, 解析 DUSP6/ERK 信号通路对 ALV-J 出芽的影响, 阐明 ALV-miRNA-p19-01 调控 DUSP6/ERK 信号通路影响 ALV-J 出芽的作用机制。

(2) 取得的主要研究进展、重要结果、关键数据等及其科学意义或应用前景。

① 研究 DUSP6 对 ALV-J 出芽的影响。

为探究过表达 DUSP6 对 ALV-J 释放的影响, 本研究构建了 pRK5-flag-DUSP6 真核表达质粒, 并转染 DF-1 细胞。用 rSCAU1903-mut 感染 DF-1 细胞, 连续六天收取细胞上清, 用 RT-PCR 检测上清中病毒拷贝数。从图 1 可以看出, 过表达 DUSP6 组与对照组相比, 上清中病毒拷贝数显著 ($p < 0.01$) 低于对照组。同时, TCID₅₀ 结果显示过表达 DUSP6 组细胞上清的病毒滴度显著 ($p < 0.01$) 低于对照组 (图 2)。

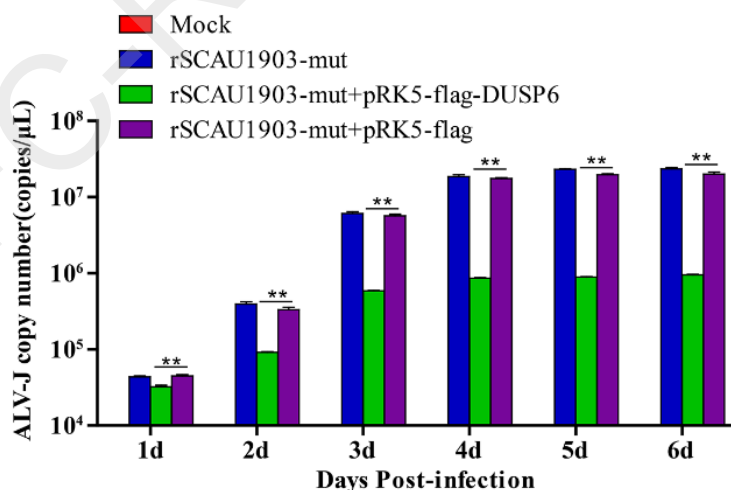


图 1 过表达 DUSP6 对细胞上清中 ALV-J 病毒拷贝数的影响

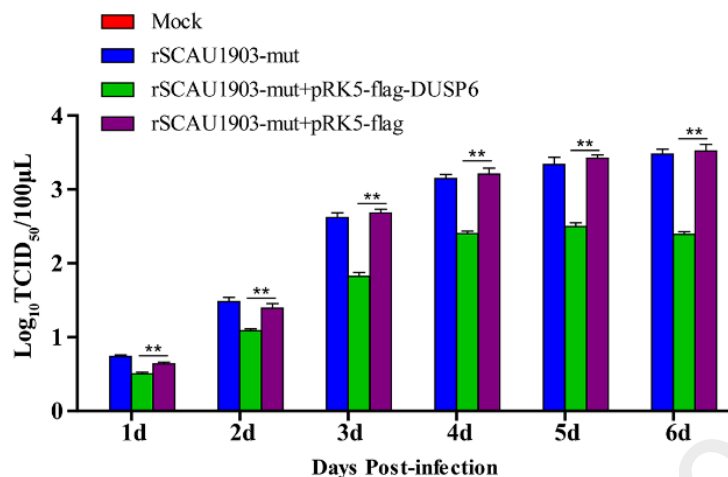


图2 过表达 DUSP6 对细胞上清中病毒滴度的影响

DF-1 过表达 pRK5-flag-DUSP6 后, 对细胞进行攻毒。收取攻毒细胞的上清及细胞蛋白, 并用 Western Blot 检测。由图 3 可知, 与对照组相比, 过表达 DUSP6 真核表达质粒后, DF-1 细胞内 DUSP6 蛋白表达量增多, ERK 磷酸化水平降低。同时, 上清中 p27 含量与细胞中 p27 含量的比值低于对照组。综上结果表明, 过表达 DUSP6 抑制了 ALV-J 的释放。

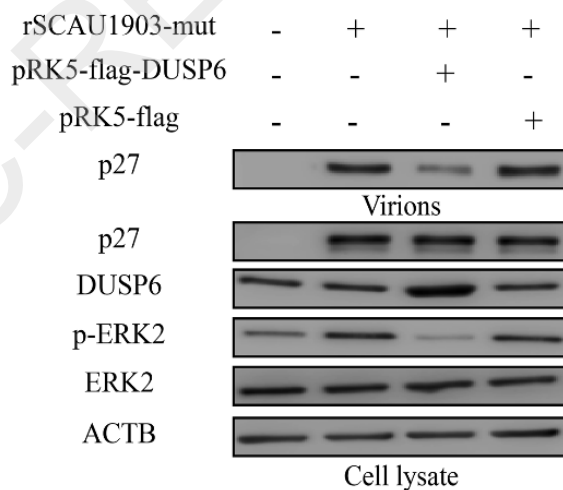


图3 过表达 DUSP6 对病毒释放及 ERK2 激酶活性的影响

为了进一步研究 DUSP6 对 ALV-J 释放的影响, 本研究根据 NCBI 上鸡源的 DUSP6 序列设计了 4 条干扰 RNA, 并转染 DF-1 细胞。通过 RT-PCR 结果可以看出, 有两条 si-RNA 可以降低 DF-1 细胞内 DUSP6 mRNA 表达水平 (图 4),



根据干扰效率，选择干扰效率最高的进行后续实验。

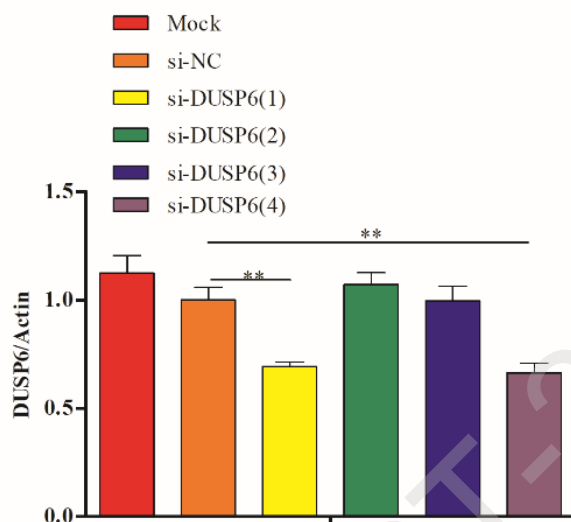


图 4 si-DUSP6 的干扰效率检测

将干扰效率最高的 si-DUSP6 转染 DF-1 细胞并感染 rSCAU1903-mut，连续六天收取细胞上清。将收取的上清用 RT-PCR 的方法测定上清中 ALV-J 病毒拷贝数，从图 5 中可以看出，转染 si-DUSP6 后，上清中 ALV-J 病毒拷贝数显著 ($p < 0.01$) 高于对照组。同时，TCID₅₀ 结果表明，si-DUSP6 转染组细胞上清中病毒滴度显著 ($p < 0.01$) 高于对照组（图 6）。

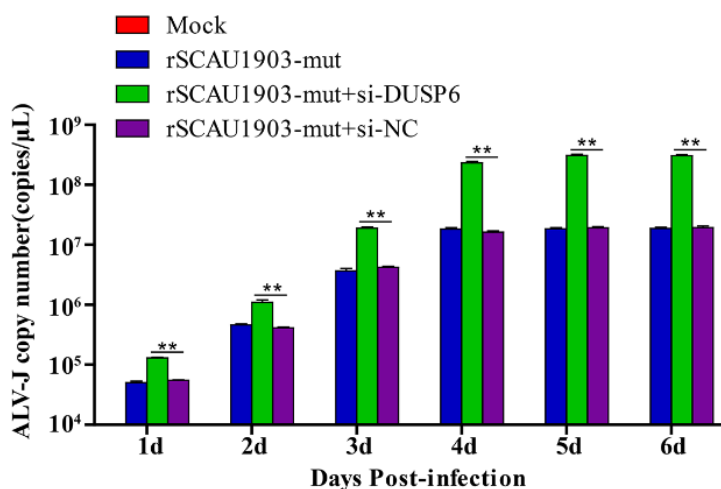


图 5 干扰 DUSP6 表达对细胞上清中 ALV-J 病毒拷贝数的影响

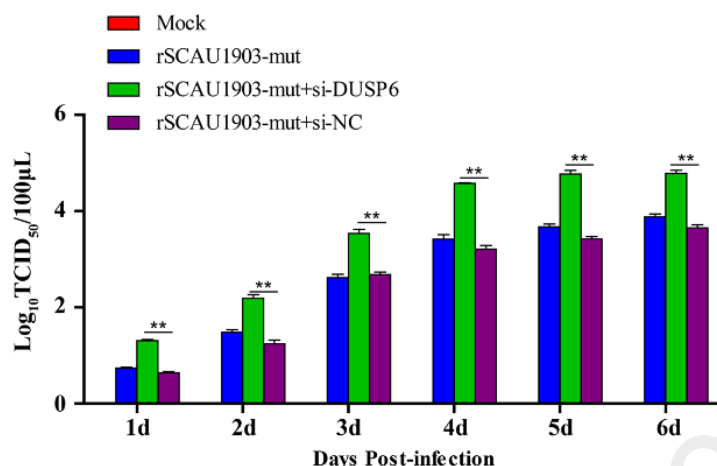


图 6 干扰 DUSP6 表达对细胞上清中病毒滴度的影响

此外,本研究利用透射电镜观察病毒释放情况。由图 7 可知,相比于对照组,si-DUSP6 组在细胞外有更多的病毒粒子。从电镜图中可以发现对照组的部分病毒粒子仍附着在细胞膜上。综上结果表明,干扰 DF-1 细胞内 DUSP6 表达有助于 ALV-J 病毒的释放。

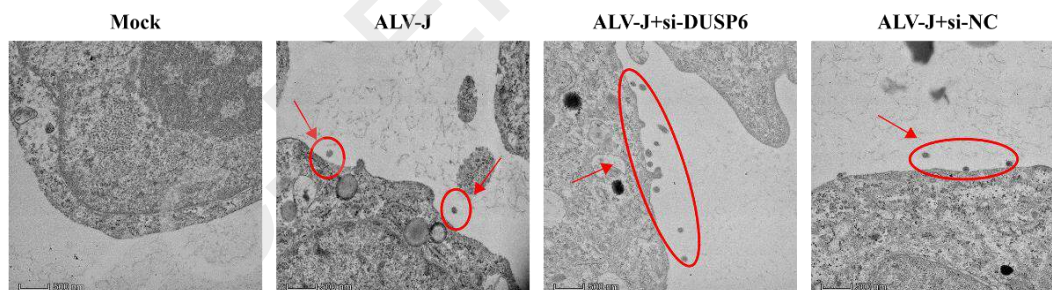


图 7 透射电镜观察干扰 DUSP6 表达对病毒释放的影响

② 研究 DUSP6 对 ERK 信号通路的调控作用。

DF-1 细胞转染 si-DUSP6 并对细胞进行攻毒。收取攻毒细胞的上清及细胞蛋白,并用 Western Blot 检测。由图 8 可知,与对照组相比,si-DUSP6 可有效抑制 DF-1 细胞中 DUSP6 蛋白表达,ERK 磷酸化水平随之升高。同时上清中 p27 含量与细胞中 p27 含量的比值高于对照组。

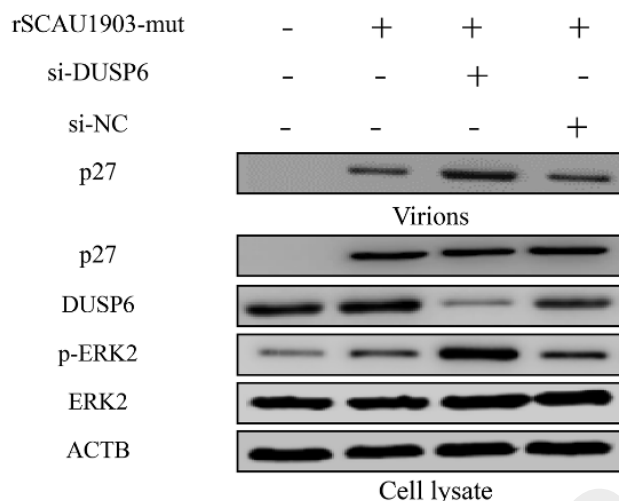


图 8 干扰 DUSP6 表达对病毒释放及 ERK2 激酶活性的影响

③ 研究 ERK 信号通路对 ALV-J 出芽的影响。

为探究 ERK2 对 ALV-J 释放的影响,本研究根据 NCBI 上鸡的 ERK2(MAPK3) 基因序列设计 4 条 si-RNA。将 4 条 si-RNA 转染 DF-1 细胞,并检测各 si-RNA 的干扰效率。结果如图 9 所示。

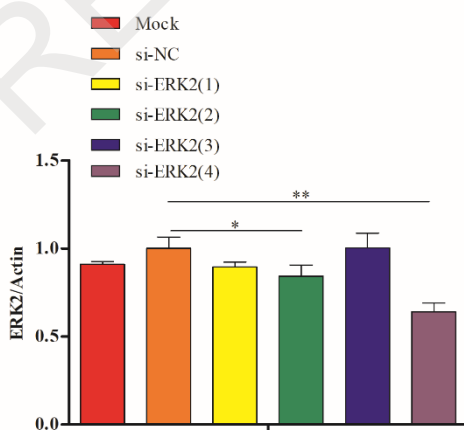


图 9 si-ERK2 的干扰效率检测

选择干扰效率最高的 si-ERK2 转染 DF-1 细胞,并感染 rSCAU1903-mut。每天收取细胞上清,连续收取 6 天,用 RT-PCR 检测上清中病毒拷贝数。从图 10 中可以看出,对照组相比,当细胞内 ERK2 表达受到干扰时,上清中病毒拷贝数显著 ($p < 0.01$) 降低。同时,对收取的上清进行 TCID₅₀ 测定,结果表明 si-ERK2



组细胞上清中病毒滴度显著 ($p < 0.01$) 低于对照组(图 11)。

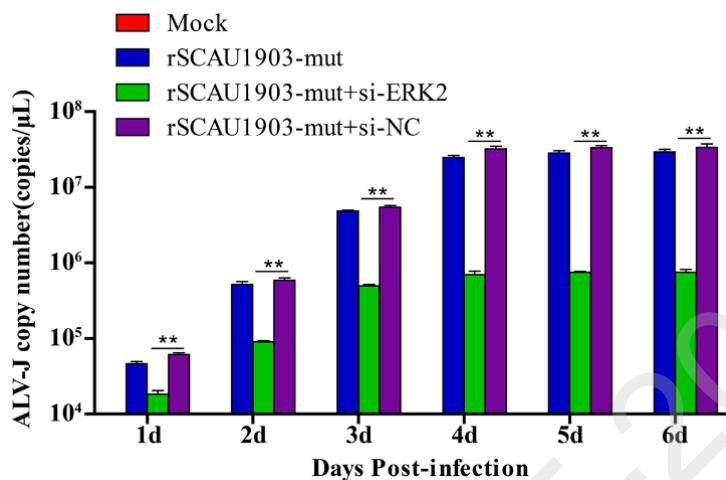


图 10 干扰 ERK2 表达对细胞上清中 ALV-J 病毒拷贝数的影响

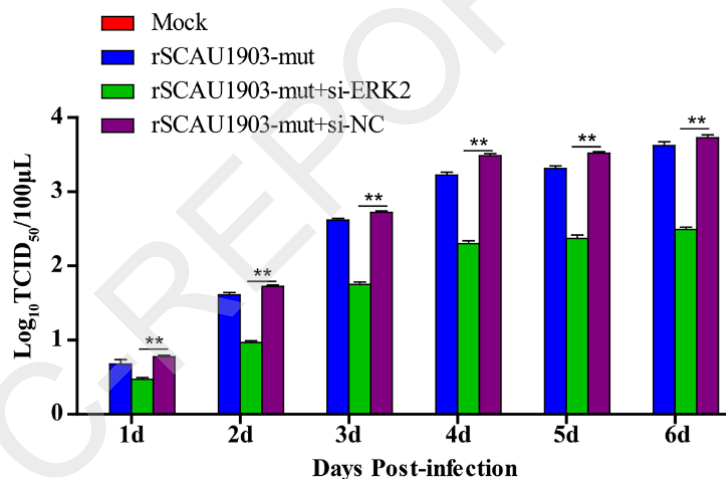


图 11 干扰 ERK2 表达对细胞上清中病毒滴度的影响

同时，本研究还收取转染 si-ERK 后攻毒细胞的上清及细胞，并分别收集蛋白，进行 Western Blot 检测。由图 4.7 可知，与对照组相比，转染 si-ERK2 后 DF-1 细胞中 ERK2 蛋白表达量明显降低，同时上清中 p27 含量与细胞中 p27 含量的比值低于对照组。综合以上结果，表明干扰 ERK2 可抑制 ALV-J 病毒释放。

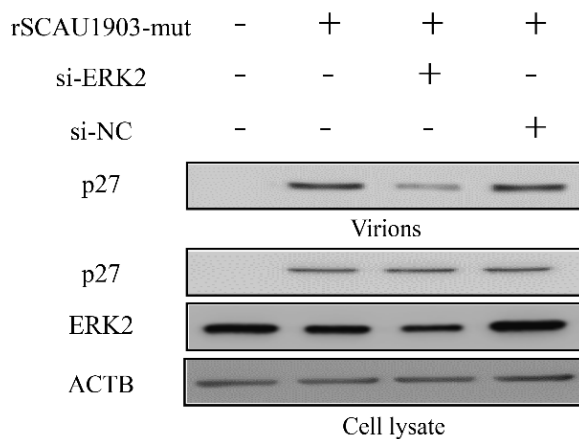


图 12 干扰 ERK2 表达对病毒释放的影响

由上述结果可知，当细胞内 ERK2 蛋白表达量降低时会抑制 ALV-J 病毒释放。众所周知，ERK2 是细胞内重要的蛋白激酶，通常以活化形式发挥功能。干扰 ERK2 表达可能影响了 ERK2 激酶的活性，进而导致病毒释放被抑制。为了证实这一假设，本研究使用 MK-8353，该药物是 ERK2 的抑制剂，可抑制 ERK2 激酶的活性。

Western Blot 结果表明，当用浓度为 25 nM 的 MK-8353 处理 DF-1 细胞时，细胞内 ERK2 激酶的活性显著 ($p < 0.01$) 低于对照组 (图 13)，因此选择浓度为 25 nM 的 MK-8353 进行后续实验。

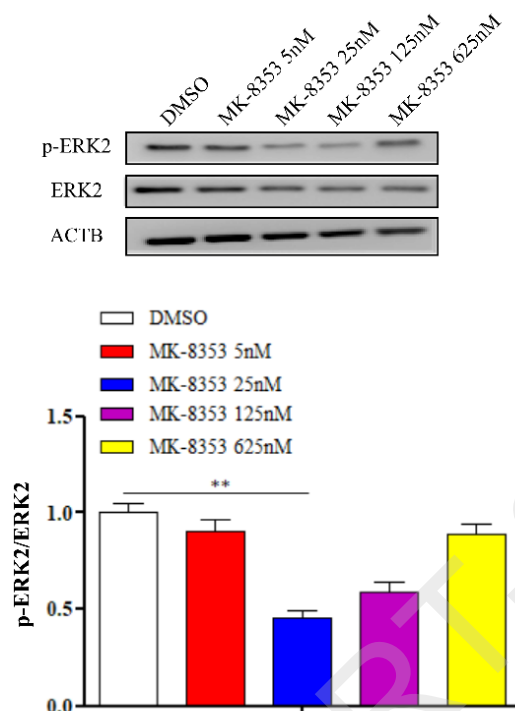


图 13 不同浓度 MK-8353 处理 DF-1 细胞对 ERK2 激酶活性影响

用浓度为 25 nM 的 MK-8353 处理 DF-1 细胞并感染 rSCAU1903-mut，连续六天收取细胞上清并进行酶活性检测。从图 14 可知，在试验过程中 MK-8353 对 ERK2 激酶活性有较好的抑制效果。采用 RT-PCR 对细胞上清病毒拷贝数进行检测。结果显示，MK-8353 处理组细胞上清病毒拷贝数显著 ($p < 0.01$) 低于对照组（图 15）。同时，MK-8353 处理组细胞上清病毒滴度同样显著 ($p < 0.01$) 低于对照组（图 16）。

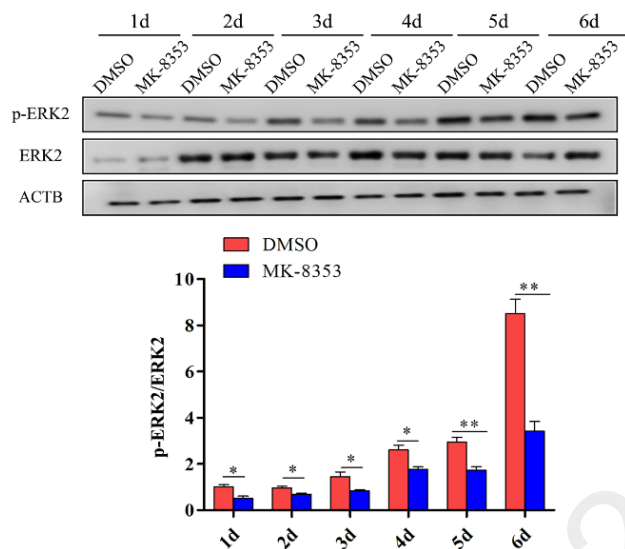


图 14 MK-8353 处理 DF-1 细胞对 ERK2 激酶活性影响

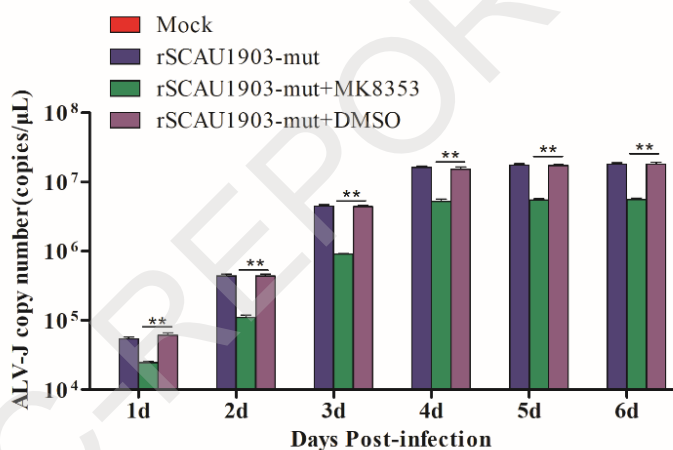


图 15 MK-8353 处理对细胞上清中 ALV-J 病毒拷贝数的影响

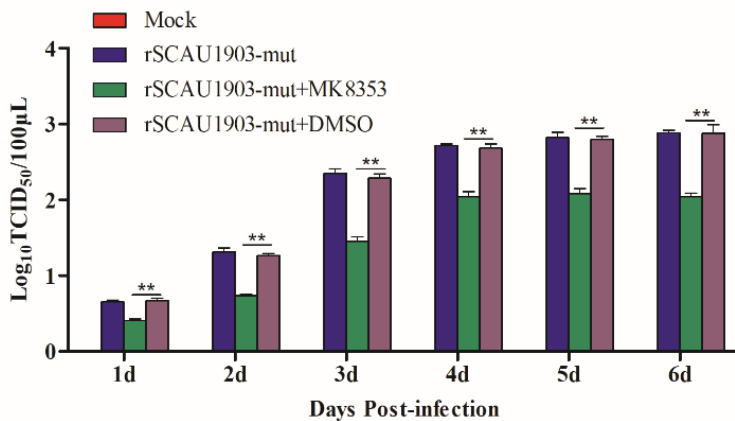


图 16 MK-8353 处理对细胞上清中病毒滴度的影响



Western Blot 检测 MK-8353 处理后收取攻毒细胞的上清及细胞蛋白。由图 17 可知,与对照组相比,MK-8353 处理组有效抑制了 DF-1 细胞中 ERK2 的磷酸化。同时,上清中 p27 含量与细胞中 p27 含量的比值低于对照组。综合以上结果,表明 MK-8353 可抑制 ALV-J 病毒释放。由此可知,当细胞内 ERK2 激酶活性受到抑制时,ALV-J 释放同样会受到抑制。

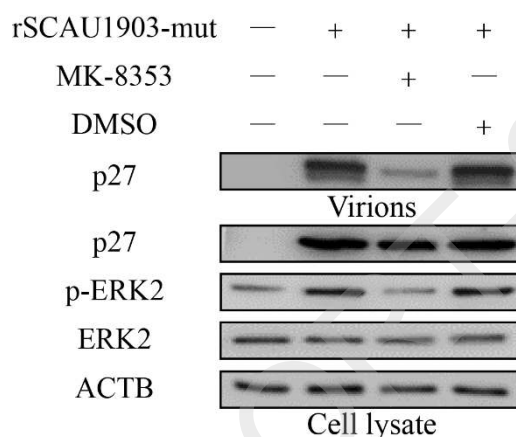


图 17 MK-8353 处理对病毒释放及 ERK2 激酶活性的影响

④ 研究 ALV-miRNA-p19-01 调控 DUSP6/ERK 信号通路对 ALV-J 出芽的影响。

将 ALV-miRNA-p19-01 mimic 转染 DF-1 细胞,并对用 rSCAU1903-mut 感染细胞,连续六天收取细胞上清。用 RT-PCR 对细胞上清中病毒拷贝数进行检测,从图 18 中可知,与对照组相比,在 DF-1 细胞中转染 ALV-miRNA-p19-01 mimic 后,细胞上清中的病毒粒子数量显著 ($p < 0.01$) 增多(图 18)。用 TCID₅₀ 测定细胞上清病毒滴度可以发现,ALV-miRNA-p19-01 mimic 转染组的病毒滴度显著 ($p < 0.01$) 高于对照组(图 19)。

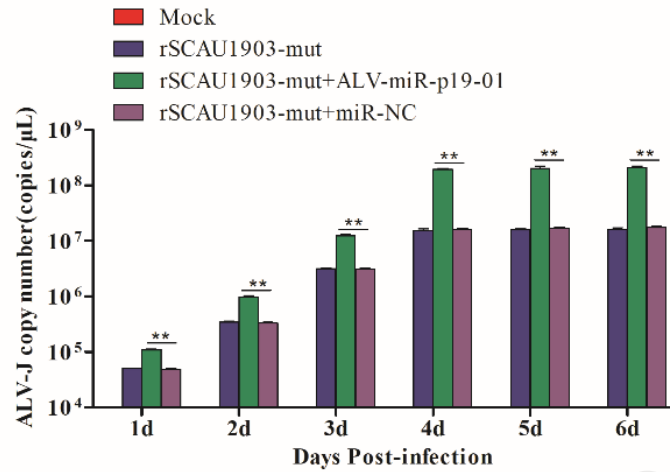


图 18 过表达 ALV-miRNA-p19-01 对细胞上清中 ALV-J 病毒拷贝数的影响

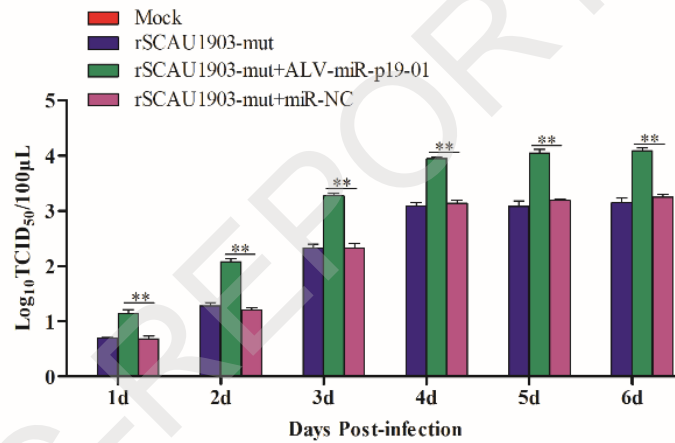


图 19 过表达 ALV-miRNA-p19-01 对细胞上清中病毒滴度的影响

同时，本研究还收取转染 ALV-miRNA-p19-01 后攻毒细胞的上清及细胞，并分别收集蛋白，进行 Western Blot 检测。由图 20 可知，转染 ALV-miRNA-p19-01 组上清中 p27 含量与细胞中 p27 含量的比值高于对照组。

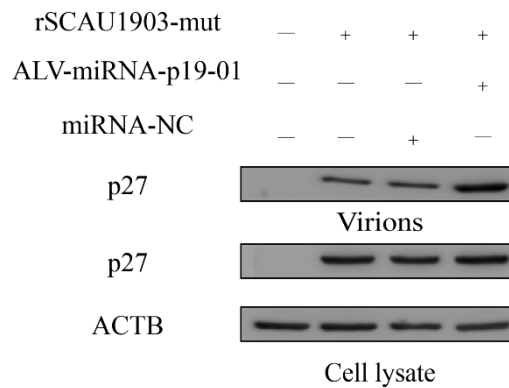


图 20 过表达 ALV-miRNA-p19-01 对病毒释放的影响

用透射电镜观察过表达 ALV-miRNA-p19-01 mimic 后病毒的释放情况, 由图 21 可以看出, 相比于对照组, 过表达 ALV-miRNA-p19-01 组在细胞膜外有更多的病毒粒子聚集。综合以上结果表明 ALV-miRNA-p19-01 可促进 ALV-J 病毒粒子释放。

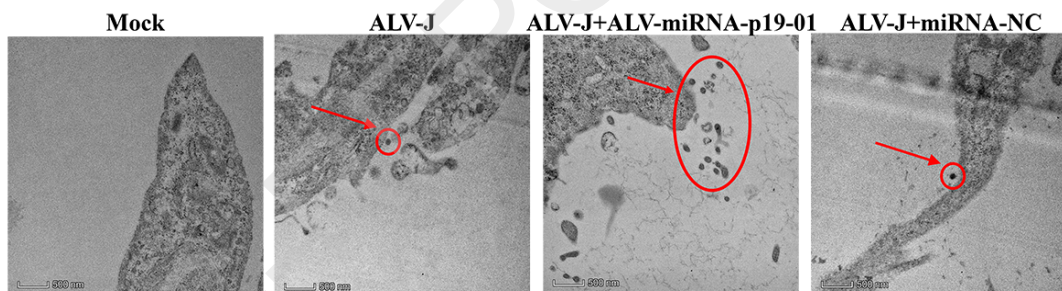


图 21 透射电镜观察过表达 ALV-miRNA-p19-01 对病毒释放的影响

为了进一步研究 ALV-miRNA-p19-01 对病毒释放的影响, 我们使用 ALV-miRNA-p19-01 特异性反义寡核苷酸 ASO-ALV-miRNA-p19-01。从 RT-PCR 结果可以看出, 转染 ASO-ALV-miRNA-p19-01 可有效降低由 ALV-J SCAU1903 编码的 ALV-miRNA-p19-01 水平 (图 22)。

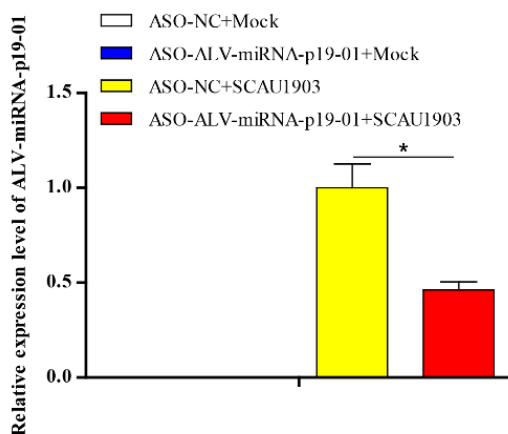


图 22 RT-PCR 检测 ASO-ALV-miRNA-p19-01 对 ALV-miRNA-p19-01 的抑制效率

用 ALV-J SCAU1903 感染 DF-1 细胞并转染 ASO-ALV-miRNA-p19-01，连续六天收取细胞上清。用 RT-PCR 对细胞上清中病毒拷贝数进行检测，从图 23 中可知，与对照组相比，在 DF-1 细胞中转染 ASO-ALV-miRNA-p19-01 后，细胞上清中的病毒粒子数量显著 ($p<0.01$) 降低 (图 23)。用 TCID₅₀ 测定细胞上清病毒滴度可以发现，ASO-ALV-miRNA-p19-01 转染组的病毒滴度显著 ($p<0.01$) 低于对照组 (图 24)。

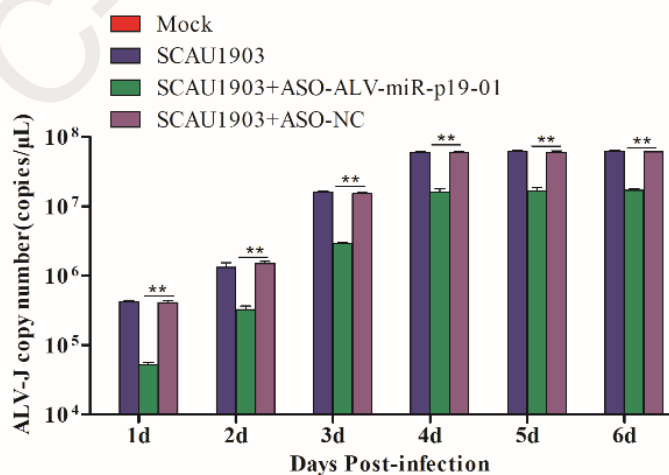


图 23 ASO-ALV-miRNA-p19-01 对细胞上清中 ALV-J 病毒拷贝数的影响

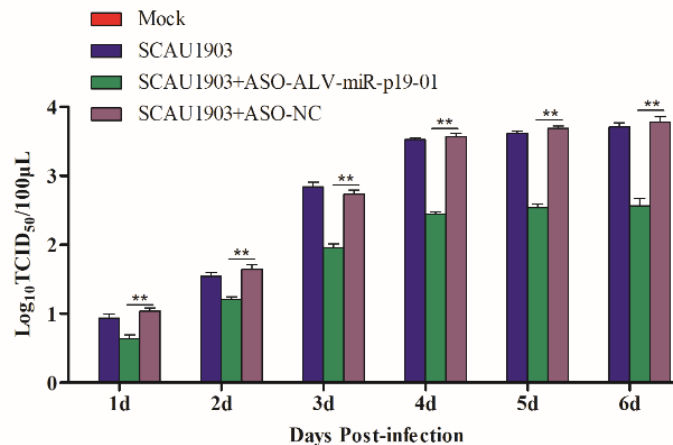


图 24 ASO-ALV-miRNA-p19-01 对细胞上清中病毒滴度的影响

DF-1 感染 ALV-J SCAU1903 并转染 ASO-ALV-miRNA-p19-01。收取攻毒细胞的上清及细胞蛋白，并用 Western Blot 检测。由图 25 可知，转染 ASO-ALV-miRNA-p19-01 后，上清中 p27 含量与细胞中 p27 含量的比值低于对照组。综上结果表明，DF-1 细胞转染 ASO-ALV-miRNA-p19-01 后，ALV-J SCAU1903 编码的 ALV-miRNA-p19-01 被部分消耗，进而减弱了 ALV-miRNA-p19-01 促进病毒释放的效率。

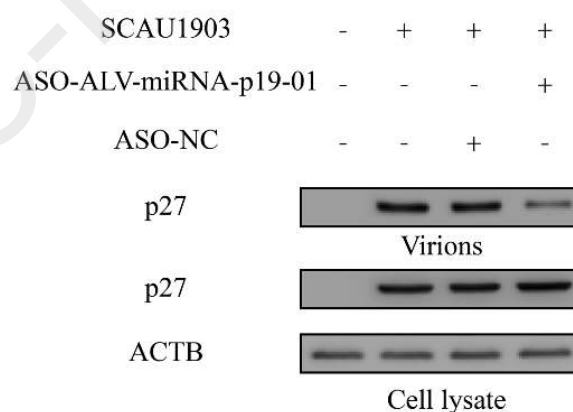


图 25 ASO-ALV-miRNA-p19-01 对病毒释放的影响

为了进一步验证 ALV-miRNA-p19-01 可抑制靶基因 DUSP6 的表达，本研究在 DF-1 细胞中过表达 ALV-miRNA-p19-01 mimic，并设立对照组，然后检测细胞中 DUSP6 蛋白的表达量。由图 26 可以发现，与对照组相比，当细胞中过表达



ALV-miRNA-p19-01 mimic 后, DUSP6 蛋白表达受到抑制。同时发现, 当 DF-1 细胞感染 ALV-J SCAU1903 时, 细胞内 DUSP6 蛋白表达同样受到抑制。

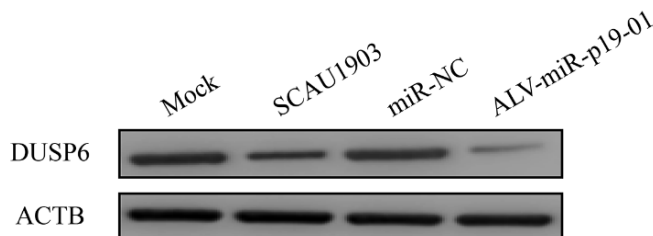


图 26 Western Blot 检测 DF-1 细胞内 DUSP6 蛋白水平

将 ALV-miRNA-p19-01 转染 DF-1 细胞后, 用 rSCAU1903-mut 感染细胞, 收取细胞上清及细胞, 并分别收集蛋白, 进行 Western Blot 检测。由图 27 可知, 与对照组相比转染 ALV-miRNA-p19-01 mimic 后, 细胞中 DUSP6 蛋白表达量降低, ERK2 蛋白磷酸化水平升高, 同时上清中 p27 含量与细胞中 p27 含量的比值高于对照组。表明 ALV-miRNA-p19-01 通过抑制 DUSP6 蛋白表达, 增强了细胞中 ERK2 激酶的活性, 进而促进 ALV-J 病毒释放。

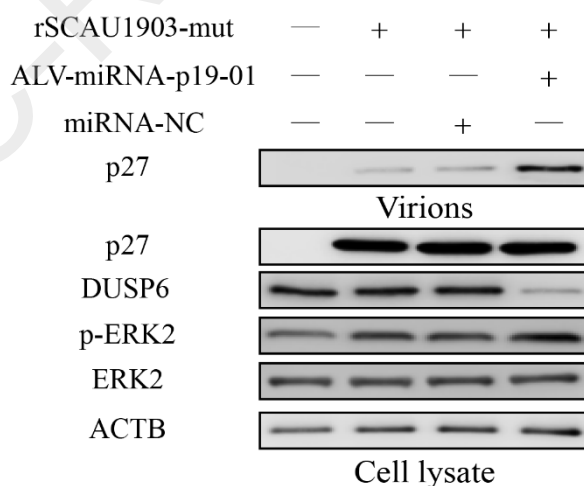


图 27 ALV-miRNA-p19-01 对 DUSP6 蛋白表达水平、ERK2 激酶活性及病毒释放的影响

用 ALV-J SCAU1903 感染 DF-1 细胞后, 转染 ASO-ALV-miRNA-p19-01, 收



取细胞上清及细胞，并分别收集蛋白，进行 Western Blot 检测。由图 28 可以发现，ASO-ALV-miRNA-p19-01 降低由 ALV-J SCAU1903 编码的 ALV-miRNA-p19-01 后，细胞内 DUSP6 表达水平高于对照组，同时 ERK2 的磷酸化水平降低，上清中 p27 含量与细胞中 p27 含量的比值也降低。结果说明 ASO-ALV-miRNA-p19-01 通过降低 ALV-J SCAU1903 编码的 ALV-miRNA-p19-01 水平，减弱了 ALV-miRNA-p19-01 对 DUSP6 的抑制效应，导致细胞内 DUSP6 蛋白水平增加，抑制了 ERK2 激酶活性，降低了病毒释放效率。

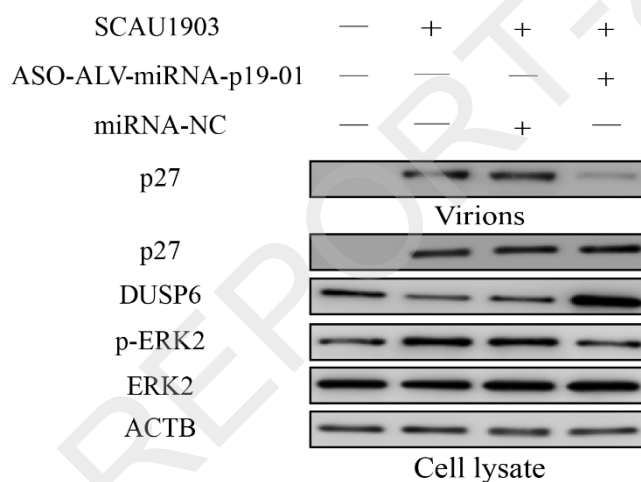


图 28 ASO-ALV-miRNA-p19-01 对 DUSP6 蛋白表达水平、ERK2 激酶活性及病毒释放的影响

将 ALV-miRNA-p19-01mimic 与 pRK5-flag-DUSP6 质粒共同转染 DF-1 细胞后，用 rSCAU1903-mut 感染细胞，收取细胞上清及细胞，并分别收集蛋白，进行 Western Blot 检测。由图 29 可知，共转组 DUSP6 蛋白水平高于对照组。同时，共转组的 ERK2 磷酸化水平低于对照组，上清中 p27 含量与细胞中 p27 含量的比值低于对照组。结果说明共转组由于额外表达 DUSP6 蛋白，消除了 ALV-miRNA-p19-01 对细胞内 DUSP6 的抑制效应。因此，共转组 DUSP6 蛋白水平高于对照组。共转组 DUSP6 蛋白水平的增加直接导致 ERK2 激酶活性降低，并降低了病毒释放效率。综合以上结果，ALV-miRNA-p19-01 是通过抑制 DUSP6 蛋白表达进而增强 ERK2 激酶活性的方式促进 ALV-J 病毒释放。

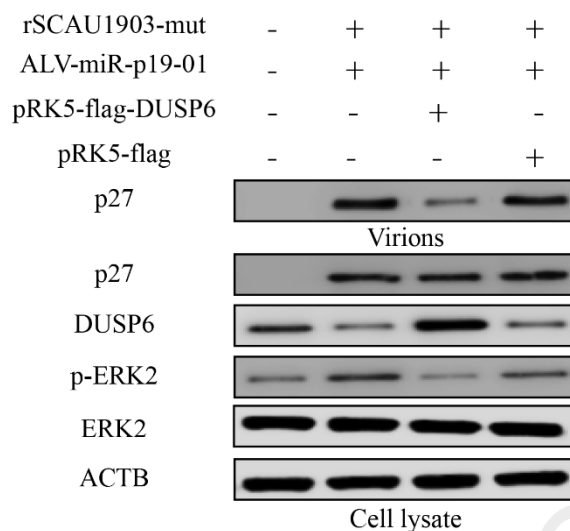


图 29 ALV-miRNA-p19-01 mimic 与 pRK5-flag-DUSP6 共转对 DUSP6 蛋白表达水平、ERK2 激酶活性及病毒释放的影响

本研究通过对 ALV-J 阳性公鸡精液外泌体进行 RNA-seq, 在阳性公鸡精液外泌体中发现一种新的, 由 ALV-J 编码的病毒 miRNA, 命名为 ALV-miRNA-p19-01, 并系统研究了其生物学发生途径和靶基因功能。进一步的, 本研究鉴定了 ALV-miRNA-p19-01 在 ALV-J 生命周期中促进病毒出芽的关键功能, 并阐明了其通过抑制 DUSP6 蛋白表达进而增强 ERK2 激酶活性促进 ALV-J 病毒释放的分子机制。研究成果对深入理解 ALV-J 生命周期具有重要意义, 为 ALV-J 的防治提供了理论依据。

3. 研究人员的合作与分工。

谢青梅, 教授, 项目主持人, 负责项目的全面设计和实施。

蔺文成, 副教授, 项目研究骨干, 协助统筹实验设计。

陈伟国, 高级实验师, 项目研究骨干, 负责实验方案与数据分析。

李鸿鑫, 高级实验师, 项目研究骨干, 负责 ALV-J 与外泌体的相关研究。

张新珩, 副教授, 项目研究骨干, 负责 ALV-J 与病毒出芽的相关研究。

严一铭, 博士生, 项目研究骨干, 具体负责研究内容四: ALV-miRNA-p19-01 调控 DUSP6/ERK 信号通路对 ALV-J 出芽的影响。

廖立钦, 博士生, 项目研究骨干, 具体负责研究内容三: ERK 信号通路对 ALV-J 出芽的影响。



廖志宏，硕士生，项目研究骨干，具体负责研究内容二：DUSP6 对 ERK 信号通路的调控作用。

张翔宇，硕士生，项目研究骨干，具体负责研究内容一：DUSP6 对 ALV-J 出芽的影响。

4. 国内外学术合作交流等情况。

(1) 2020 年 12 月，参加“2020 年世界种业论坛”，应邀做会议报告“鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术研究与应用”。

(2) 2021 年 8 月，参加“2021 中国禽业大会暨第 30 届广东畜牧兽医科技大会”，应邀做会议报告“传染性支气管炎最新流行情况及防控措施”。

(3) 2022 年 8 月，参加“2022 华南禽业大会”，应邀做会议报告“当前鸡病流行情况与防控措施”。

(4) 2023 年 3 月，参加“首届鸡传染性支气管炎防控技术专题峰会”，应邀做会议报告“鸡传染性支气管炎的流行现状与研究”。

(5) 2023 年 5 月，参加“中国畜牧兽医学会禽病学分会第二十次学术研讨会”，应邀做会议报告“鸡禽白血病遗传抗性选育技术的建立及应用研究”和壁报“ALV-J 通过 GADD45 β /MEKK4/P38MAPK 信号通路抑制细胞自噬”。

(6) 2023 年 11 月，参加“第十二届亚太家禽大会（APPC 2023）”，应邀做会议报告“家禽病毒性载体疫苗研发及思考”。

5. 存在的问题、建议及其他需要说明的情况。

项目进展顺利，取得了丰富的研究成果，暂无其他问题。

(二) 成果部分

1. 项目取得成果的总体情况。

本项目在完成过程中取得了一批原创性的研究成果：①鉴定了一种新的，由 ALV-J 编码的病毒 miRNA——ALV-miRNA-p19-01，并系统研究了其生物发生途径与靶基因功能分析。②明确了 ALV-miRNA-p19-01 通过抑制靶基因 DUSP6 表达促进 ALV-J 出芽的功能表型。③解析了宿主蛋白 DUSP6 通过调控 ERK2 磷酸



化进而影响 ALV-J 出芽的作用机制。④阐明了 ALV-miRNA-p19-01 通过调控 DUSP6/ERK2 信号通路促进 ALV-J 出芽的分子机制。研究成果有助于深入理解 ALV-J 生命周期的新的调控模式,对 ALV-J 的防治具有重要的理论价值。本项目在 4 年的研究过程中,共以学术论文的形式发表项目标注 SCI 论文 13 篇,研究论文明细如下:

(1) Chen S, Yan YM, Gao LG, Gao S, Feng KY, Li HX, Zhang XH, Chen WG, Chen F, Xie QM. Proteomic profiling of purified avian leukosis virus subgroup J particles. *Veterinary Microbiology*. 2023 284:109821

(2) Liao L, Chen W, Zhang X, Zhang H, Li A, Yan Y, Xie Z, Li H, Lin W, Ma J, Zhang X, Xie Q*. Semen extracellular vesicles mediate vertical transmission of subgroup J avian leukosis virus. *Virologica Sinica*. 2022 37(2):284-294.

(3) Liao L, Wu Z, Chen W, Zhang H, Li A, Yan Y, Xie Z, Li H, Lin W, Ma J, Zhang X, Xie Q*. Anti-CD81 antibody blocks vertical transmission of avian leukosis virus subgroup J. *Veterinary Microbiology*. 2022 264:109293.

(4) Wu XH, Yao ZQ, Zhao QQ, Chen S, Hu ZZ, Xie Z, Chen LY, Ji J, Chen F, Zhang XH, Xie QM*. Development and application of a reverse-transcription recombinase-aided amplification assay for subgroup J Avian leukosis virus. *Poultry Science*. 2022 101(4):101743.

(5) Wu X, Chu F, Zhang L, Chen S, Gao L, Zhang H, Huang H, Wang J, Chen M, Xie Z, Chen F, Zhang X, Xie Q*. New rapid detection by using a constant temperature method for avian leukosis viruses. *Frontiers in Microbiology*. 2022 13:968559.

(6) Zhao Q, Yao Z, Chen L, He Y, Xie Z, Zhang H, Lin W, Chen F, Xie Q*, Zhang X*. Transcriptome-Wide Dynamics of m6A Methylation in Tumor Livers Induced by ALV-J Infection in Chickens. *Frontiers in Immunology*. 2022 13:868892.

(7) Zhang X, Chen L, Liao Z, Dai Z, Yan Y, Yao Z, Chen S, Xie Z, Zhao Q, Lin W, Chen F, Xie Q*. TCP1 mediates gp37 of avian leukosis virus subgroup J to inhibit autophagy through activating AKT in DF-1 cells. *Veterinary Microbiology*. 2022 271:109472.

(8) Chen W, Chen S, Nie Y, Li W, Li H, Zhang X, Chen F, Xie Q*. Synergistic



Immunosuppression of Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Is Responsible for Enhanced Pathogenicity. *Viruses*. 2022 14(10):2312.

(9) Yan Y, Chen S, Liao L, Gao S, Pang Y, Zhang X, Zhang H, Xie Q. ALV-miRNA-p19-01 Promotes Viral Replication via Targeting Dual Specificity Phosphatase 6. *Viruses*. 2022 14(4):805.

(10) Yan Y, Zhang H, Gao S, Zhang H, Zhang X, Chen W, Lin W, Xie Q*. Differential DNA Methylation and Gene Expression Between ALV-J-Positive and ALV-J-Negative Chickens. *Frontiers In Veterinary Science*. 2021 8:659840.

(11) Liao Z, Zhang X, Song C, Lin W, Cheng Y, Xie Z, Chen S, Nie Y, Li A, Zhang H, Li H, Li H, Xie Q*. ALV-J inhibits autophagy through the GADD45 β /MEKK4/P38MAPK signaling pathway and mediates apoptosis following autophagy. *Cell Death & Disease*. 2020 11(8):684.

(12) Zhang X, Liao Z, Wu Y, Yan Y, Chen S, Lin S, Chen F, Xie Q*. gga-microRNA-375 Negatively Regulates the Cell Cycle and Proliferation by Targeting Yes-associated Protein 1 in DF-1 Cells. *Experimental And Therapeutic Medicine*. 2020 20(1):530-542.

(13) Chen S, Liao L, Zhao Q, Zhang X, Li H, Lin W, Chen F, Xie Q*. MicroRNA expression profile in extracellular vesicles derived from ALV-J infected chicken semen. *Virus Research*. 2020 286:198083.

2. 项目成果转化及应用情况。

本研究为基础性研究，研究目标是阐明 ALV-miRNA-p19-01 调控 DUSP6/ERK2 信号通路促进 ALV-J 释放的分子机制，为 ALV-J 的防治提供理论依据。研究成果主要以研究论文和人才培养形式呈现，暂无成果转化与应用。

3. 人才培养情况。

本项目培养了 3 名研究生，包括 1 名博士生和 2 名硕士生。其中 1 名博士生和 1 名硕士生已经毕业，另一名硕士生正以直博形式继续攻读博士学位。



4. 其他需要说明的成果。

无。

5. 项目成果科普性介绍或展示网站。

J 亚群白血病是一种严重危害养禽业的传染性肿瘤性疾病，目前尚无有效疫苗或药物可以防治。ALV-J 感染宿主后，其编码的 ALV-miR-p19-01 可以通过调控细胞内 DUSP6/ERK2 信号通路促进病毒出芽，研究成果对深入理解 ALV-J 的生命周期具有重要意义，为 ALV-J 的防治提供了理论依据。



研究成果目录

项目负责人通过系统，从文献库中检索研究成果或者按要求格式自行填入。请按照期刊论文、会议论文、学术专著、专利、会议报告、标准、软件著作权、科研奖励、人才培养、成果转化的顺序列出，其它重要研究成果如标本库、科研仪器设备、共享数据库、获得领导人批示的重要报告或建议等，应重点说明研究成果的主要内容、学术贡献及应用前景等。

项目负责人不得将非本人或非参与者所取得的科研成果、与受资助项目无关的科研成果、未标注国家自然科学基金资助和项目批准号的论文以及取得时间早于项目资助期开始时间的研究成果列入报告中。发表的科研成果（包括专利），项目负责人和参与者均应如实注明得到国家自然科学基金项目资助和项目批准号，科学基金作为主要资助渠道或者发挥主要资助作用的，应当将自然科学基金作为第一顺序进行标注。

期刊论文

(1) Sheng Chen; Yiming Yan; Liguao Gao; Shuang Gao; Keyu Feng; Hongxin Li; Xinheng Zhang; Weiguo Chen; Feng Chen; Qingmei Xie; [Proteomic profiling of purified avian leukosis virus subgroup J particles](#), *Veterinary Microbiology*, 2023, 284: 109821. 第二标注

(2) Liqin Liao; Weiguo Chen; Xiangyu Zhang; Huanmin Zhang; Aijun Li; Yiming Yan; Zi Xie; Hongxing Li; Wencheng Lin; Jingyun Ma; Xinheng Zhang; Qingmei Xie; [Semen Extracellular Vesicles Mediate Vertical Transmission of Subgroup J Avian Leukosis Virus](#), *Virologica Sinica*, 2022, 37(2): 284-294. 第二标注

(3) Liqin Liao; Zhiqiang Wu; Weiguo Chen; Huanmin Zhang; Aijun Li; Yiming Yan; Zi Xie; Hongxin Li; Wencheng Lin; Jingyun Ma; Xinheng Zhang; Qingmei Xie; [Anti-CD81 antibody blocks vertical transmission of avian leukosis virus subgroup J](#), *Veterinary Microbiology*, 2022, 264: 109293. 第一标注

(4) X.H. Wu; Z.Q. Yao; Q.Q. Zhao; S. Chen; Z.Z. Hu; Z. Xie; L.Y. Chen; J. Ji; F. Chen; X.H. Zhang; Q.M. Xie; [Development and application of a reverse-transcription recombinase-aided amplification assay for subgroup J Avian leukosis virus](#), *Poultry Science*, 2022, 101(4): 101743. 第二标注

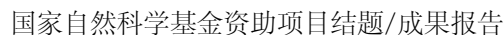


- (5) Xiuhong Wu; Fengsheng Chu; Luxuan Zhang; Sheng Chen; Liguao Gao; Hao Zhang; Haohua Huang; Jin Wang; Mengjun Chen; Zi Xie; Feng Chen; Xinheng Zhang; Qingmei Xie; [New rapid detection by using a constant temperature method for avian leukosis viruses](#), *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 968559. 第二标注
- (6) Qiqi Zhao; Ziqi Yao; Liyi Chen; Yaai He; Zi Xie; Huanmin Zhang; Wencheng Lin; Feng Chen; Qingmei Xie; Xinheng Zhang; [Transcriptome-Wide Dynamics of m6A Methylation in Tumor Livers Induced by ALV-J Infection in Chickens](#), *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 868892. 第二标注
- (7) Xinheng Zhang; Liyi Chen; Zhihong Liao; Zhenkai Dai; Yiming Yan; Ziqi Yao; Sheng Chen; Zi Xie; Qiqi Zhao; Feng Chen; Qingmei Xie; [TCP1 mediates gp37 of avian leukosis virus subgroup J to inhibit autophagy through activating AKT in DF-1 cells](#), *Veterinary Microbiology*, 2022, 271: 109472-109472. 第二标注
- (8) Weiguo Chen; Sheng Chen; Yu Nie; Wenxue Li; Hongxin Li; Xinheng Zhang; Feng Chen; Qingmei Xie; [Synergistic Immunosuppression of Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Is Responsible for Enhanced Pathogenicity](#), *Viruses*, 2022, 14(10): 2312. 第二标注
- (9) Yiming Yan; Sheng Chen; Liqin Liao; Shuang Gao; Yanling Pang; Xinheng Zhang; Huanmin Zhang; Qingmei Xie; [ALV-miRNA-p19-01 Promotes Viral Replication via Targeting Dual Specificity Phosphatase 6](#), *Viruses*, 2022, 14(4): 805. 第二标注
- (10) Yan, Yiming; Zhang, Huihua; Gao, Shuang; Zhang, Huanmin; Zhang, Xinheng; Chen, Weiguo; Lin, Wencheng; Xie, Qingmei; [Differential DNA Methylation and Gene Expression Between ALV-J-Positive and ALV-J-Negative Chickens](#), *FRONTIERS IN VETERINARY SCIENCE*, 2021, 8: 659840. 第一标注
- (11) Zhihong Liao; Xinheng Zhang; Cailiang Song; Wencheng Lin; Yuzhen Cheng; Zi Xie; Sheng Chen; Yu Nie; Aijun Li; Huanmin Zhang; Hongxin Li; Haiyun Li; Qingmei Xie; [ALV-J inhibits autophagy through the GADD45 \$\beta\$ /MEKK4/P38MAPK signaling pathway and mediates apoptosis following autophagy](#), *Cell Death and Disease*, 2020, 11(8): 684. 第二标注



(12) Xinheng Zhang; Zhihong Liao; Yu Wu; Yiming Yan; Sheng Chen; Shaoli Lin; Feng Chen; Qingmei Xie; [gga-microRNA-375 negatively regulates the cell cycle and proliferation by targeting Yes-associated protein 1 in DF-1 cells](#), *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 20(1): 530-542. 第一标注

(13) Chen, Sheng; Liao, Liqin; Zhao, Qiqi; Zhang, Xinheng; Li, Hongxin; Lin, Wencheng; Chen, Feng; Xie, Qingmei; [MicroRNA expression profile in extracellular vesicles derived from ALV-J infected chicken semen](#), *VIRUS RESEARCH*, 2020, 286: 198083. 第二标注

[illegible]



国家自然科学基金项目资金决算表

项目批准号：31972659		项目负责人：谢青梅			金额单位：万元		
序号	科目名称	预算数			累计支出数 (4)	结余数 (5) = (3) - (4)	结余占比 (6) = (5) ÷ (3)
		批准预算	预算调整	调整后预算			
		(1)	(2)	(3) = (1) + (2)			
1	项目总经费	70.8000	0.0000	70.8000	-	-	1.40%
2	项目直接费用	59.0000	0.0000	59.0000	58.0081	0.9919	-
3	1、设备费	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-
4	其中：设备购置费	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	-
5	2、业务费	49.4800	8.9000	58.3800	58.0081	0.3719	-
6	3、劳务费	9.5200	-8.9000	0.6200	0.0000	0.6200	-
7	项目间接费用	11.8000	0.0000	11.8000	-	-	-

注：1. 本表仅填列自然科学基金批准资助的项目经费决算情况，其他来源资金的经费决算情况不属于本表填报范围；
2. 本表中（1）、（3）、（5）、（6） 栏为系统自动生成，不需项目负责人填写；本表中（2） 栏填列预算调整数；本表中（4）栏填列项目的实际支出数；
3. 本表中第7行数值由系统自动生成，不需项目负责人填写；
4. 第7行“预算调整”栏请参照《国家自然科学基金预算制项目决算表编制说明》中有关要求填列。



决算说明书

（请按照《国家自然科学基金预算制项目决算表编制说明》等的有关要求，说明项目预算支出情况、预算调整情况、资金结余情况、合作研究外拨资金情况、单价50万元（含）以上的设备情况、资金管理和使用过程中的问题建议，以及其他需要说明的事项。）

国家自然科学基金“ALV-J p19基因编码的ALV-miRNA-p19-01调控DUSP6/ERK信号通路促进病毒出芽的分子机制”项目，全部申请经费70.8000万元，其中直接经费59.0000万元，间接经费11.8000万元。截至2023年12月31日，该项目实际到账70.8000万元，直接经费支出58.0081，直接经费执行率98.31%，结余0.9919万元。

直接经费使用情况具体如下：

- 1. 设备费：预算0.0000万元，未做预算调整，共计支出0.0000万元，结余0.0000万元。
- 2. 业务费：预算49.4800万元，后经预算调整为58.3800万元，共计支出58.0081万元，结余0.3719万元。其中33.2590万元用于材料费、16.6265万元用于测试化验加工费、5.0274万元用于会议/差旅、3.0952万元用于出版费。
- 3. 劳务费：预算9.5200万元，后经预算调整为0.6200万元，共计支出0.0000万元，结余0.6200万元。

间接经费：预算11.8000万元，未作预算调整，实际支出11.8000万元，结余0.00万元，主要用于课题管理费。



签字及审核意见表

项目负责人承诺：

我所承担的项目（编号：31972659 名称：ALV-Jp19基因编码的ALV-miRNA-p19-01调控DUSP6/ERK信号通路促进病毒出芽的分子机制）结题报告内容真实，数据准确，未出现《国家科学技术保密规定》中列举的属于国家科学技术秘密范围的内容。在今后的研究工作中，如有与本项目相关的成果，将如实注明得到国家自然科学基金项目资助和项目批准号，并报送国家自然科学基金委员会。

项目负责人（签章）：

日期：

依托单位科研管理部门：

负责人（签章）：

日期：

依托单位财务管理部门：

负责人（签章）：

日期：

依托单位审查意见：

依托单位公章：

科学处审核意见：

完成情况
综合评分
(划√)

优

良

中

差

负责人（签章）：

日期：

科学部核准意见（对重点项目等）：

负责人（签章）：

日期：

分管委领导意见（对重大项目等）：

委领导（签章）：

日期：



电子附件目录

序号	附件类型	附件名称	备注
1	论著	期刊论文	
2	论著	期刊论文	
3	论著	期刊论文	
4	论著	期刊论文	
5	论著	期刊论文	
6	论著	期刊论文	
7	论著	期刊论文	
8	论著	期刊论文	
9	论著	期刊论文	
10	论著	期刊论文	
11	论著	期刊论文	
12	论著	期刊论文	
13	论著	期刊论文	

国家自然科学基金资助项目批准通知

谢青梅 先生/女士：

根据《国家自然科学基金条例》和专家评审意见，国家自然科学基金委员会（以下简称自然科学基金委）决定批准资助您的申请项目。项目批准号：31972659，项目名称：ALV-Jp19基因编码的ALV-miRNA-p19-01调控DUSP6/ERK信号通路促进病毒出芽的分子机制，直接费用：59.00万元，项目起止年月：2020年01月至2023年12月，有关项目的评审意见及修改意见附后。

请尽早登录科学基金网络信息系统（<https://isisn.nsfc.gov.cn>），获取《国家自然科学基金资助项目计划书》（以下简称计划书）并按要求填写。对于有修改意见的项目，请按修改意见及时调整计划书相关内容；如对修改意见有异议，须在电子版计划书报送截止日期前向相关科学处提出。

电子版计划书通过科学基金网络信息系统（<https://isisn.nsfc.gov.cn>）上传，依托单位审核后提交至自然科学基金委进行审核。审核未通过者，返回修改后再行提交；审核通过者，打印纸质版计划书（一式两份，双面打印），依托单位审核并加盖单位公章后报送至自然科学基金委项目材料接收工作组。电子版和纸质版计划书内容应当保证一致。向自然科学基金委提交和报送计划书截止时间节点如下：

- 1、提交电子版计划书截止时间为**2019年9月11日16点**（视为计划书正式提交时间）；
- 2、提交电子修改版计划书截止时间为**2019年9月18日16点**；
- 3、报送纸质版计划书截止时间为**2019年9月26日16点**。

请按照以上规定及时提交电子版计划书，并报送纸质版计划书，未说明理由且逾期不报计划书者，视为自动放弃接受资助。

附件：项目评审意见及修改意见表

国家自然科学基金委员会
2019年8月16日

附件：项目评审意见及修改意见表

项目批准号	31972659	项目负责人	谢青梅	申请代码1	C180202
项目名称	ALV-Jp19基因编码的ALV-miRNA-p19-01调控DUSP6/ERK信号通路促进病毒出芽的分子机制				
资助类别	面上项目		亚类说明		
附注说明					
依托单位	华南农业大学				
直接费用	59.00 万元		起止年月	2020年01月 至 2023年12月	
<p>通讯评审意见：</p> <p><1>具体评价意见：</p> <p>一、请针对创新点详细评述申请项目的创新性、科学价值以及对相关领域的潜在影响。</p> <p>申请者前期发现禽白血病毒（ALV）感染宿主或细胞后自身会分泌miRNA——ALV-miRNA-p19-01，作用于双特异性磷酸酶（DUSP6）；且该miRNA能促进病毒的出芽。已有文献报道DUSP6可调控ERK通路，ERK通路与病毒的出芽有关，但是否该通路影响ALV的出芽还未见报道。其次，申请者还将探索ALV编码的miRNA是否能通过 DUSP6/ERK通路调控ALV的出芽，更增加了该项目的创新性。该项目的研究成果将对ALV的生命周期、致病性、传播性等提供重要的理论依据，因此具备重要的科学价值和领域影响力。</p> <p>二、请结合申请项目的研究方案与申请人的研究基础评述项目的可行性。</p> <p>根据主持的项目和发表的文章，表明申请者长期从事ALV相关的研究，积累了丰富的经验和实验技能，对本项目的开展打下了牢固的基础。该申请项目逻辑性好，可阅读性强，引用的参考文献也很好的聚焦于DUSP6/ERK通路调控病毒的复制、出芽等。在实验方案3.2.2“DUSP6对ERK信号通路的调控作用”中，申请者在过表达DUSP6的细胞中加入ERK通路的激活剂，这一激活剂的加入可能掩盖了DUSP6调控ERK通路的作用，是否需要该激活剂还应仔细考虑。除此之外，该项目具有很好的可行性。</p> <p>三、其他建议</p> <p>建议作者在研究方案中可适当增加内容，例如该ALV-miRNA-p19-01是如何产生的，DUSP6如何调控ERK通路等方面的内容，这可能使该项目获得的研究成果更丰富。</p> <p><2>具体评价意见：</p> <p>一、请针对创新点详细评述申请项目的创新性、科学价值以及对相关领域的潜在影响。</p> <p>该项目前期在感染ALV-J的公鸡精液外泌体中检测到ALV-miRNA-P19-01的基础上，进一步分析该miRNA调控靶基因DUSP6/ERK信号通路，促进ALV-J出芽的作用机制，这个研究内容对于了解ALV-J的致病机理具有重要的理论意义，这也是该项目的创新之处。</p> <p>二、请结合申请项目的研究方案与申请人的研究基础评述项目的可行性。</p> <p>项目负责人具有多年ALV-J的研究积累，在公鸡精液外泌体方面具有扎实的前期研究基础，本项目基于这些研究基础开展工作，研究方案和技术路线合理可行，这为该项目的顺利开展奠定了基础。</p> <p>三、其他建议</p> <p>项目申请者写作思路清楚，研究目标明确。</p> <p><3>具体评价意见：</p> <p>一、请针对创新点详细评述申请项目的创新性、科学价值以及对相关领域的潜在影响。</p> <p>申请人拟针对在前期研究中发现的感染ALV-J的公鸡精液外泌体中存在的ALV-miRNA-p19-01调节ALV-J出芽的调控机制进行进一步研究。由于DUSP6是该miRNA的靶基因，通过调节ERK通路在多种病毒的出芽和释放中发挥作用，因此假设ALV-miRNA-p19-01通过调控DUSP6/ERK信号通路</p>					

促进ALV-J出芽。J亚群ALV-J一直是养禽业重点防控的疾病之一，研究病毒的出芽调节机制，对于该病的防控具有重要的理论意义。该研究基于临床问题及前期研究结果，拟研究的内容具有较强可行性，建议资助。

二、请结合申请项目的研究方案与申请人的研究基础评述项目的可行性。

三、其他建议

修改意见：

生命科学部

2019年8月16日

课题编号：2023ZD0405301

农业生物育种重大项目 子课题任务书

子课题：基于 ALV 生命周期的多亚型禽白血病抗病基因
位点鉴定及抗性专门化品系选育

所属项目：抗重大疫病鸡新品种设计与培育

所属课题：鸡精准基因编辑与抗禽白血病新品系培育

委托部门（甲方）：扬州大学

承担部门（乙方）：华南农业大学

2024 年 01 月

填写说明

- 1、任务书为课题验收的依据，各项内容应尽可能详细填写。
- 2、课题目标要强调形成主导品种（产品、装备）、主推技术、重要标准（规程规范）、决策支持方案、知识产权等；考核指标应具体、量化、可考核。按已提交的实施方案进行填报，不得私自减少任务指标。
- 3、经费的使用应严格按有关经费管理办法执行。
- 4、开户银行及账号应是课题参加单位计财部门的开户行和账号。
- 5、本任务书要求用 A4 纸、正文四号仿宋_GB2312。
- 6、任务书正式文本一式捌份。

课题名称		鸡精准基因编辑与抗禽白血病新品系培育					
子课题名称		基于 ALV 生命周期的多亚型禽白血病抗病基因位点鉴定及抗性专门化品系选育					
所属项目		抗重大疫病鸡新品种设计与培育					
子经费预算		总需求 36 万元，其中中央财政专项资金需求 36 万元					
子课题周期节点		起始时间	2023 年 09 月		结束时间	2025 年 12 月	
		实施周期	共 28 个月		预计中期时间点	2024 年 12 月	
课题 承担 单位	单位名称	扬州大学			单位法定代表人姓名	丁建宁	
	单位性质	高等学校			组织机构代码	12320000466007837W	
	单位主管部门	江苏省教育厅			隶属关系	地方	
	单位所属地区	江苏省			扬州市	邗江区	
	通信地址	扬州市大学南路 88 号			邮政编码	225009	
	单位开户名称	扬州大学					
	开户银行 (全称)	中国工商银行扬州分行汶河支行			汇入地点	江苏省扬州市	
	银行账号	1108022009000002048			银行机构代 码	102312002094	
课题 负责 人	姓 名	常国斌	性 别	<input checked="" type="checkbox"/> 男 <input type="checkbox"/> 女		出生日期	1975.11.27
	证件类型	身份证	证件号码	321001197511270031			
	所在单位	扬州大学					
	最高学位	<input checked="" type="checkbox"/> 博士 <input type="checkbox"/> 硕士 <input type="checkbox"/> 学士 <input type="checkbox"/> 其他					
	职 称	<input checked="" type="checkbox"/> 正高级 <input type="checkbox"/> 副高级 <input type="checkbox"/> 中级 <input type="checkbox"/> 初级 <input type="checkbox"/> 其他			职务	院长	
	电子邮箱	gbchang@yzu.edu.cn		移动电话	13665241883		
子课题 承担 单位	单位名称	华南农业大学			单位法定代表 人姓名	薛红卫	
	单位性质	高等学校			组织机构代码	124400004554165634	

	单位主管部门	广东省教育厅	隶属关系		地方	
	单位所属地区	广东省	广州市		天河区	
	通信地址	广州市五山路 483 号	邮政编码		510642	
	单位开户名称	广东广州工行五山支行				
	开户银行 (全称)	中国工商银行股份有限公司广州五山支行	汇入地点		广东省广州市	
	银行账号	3602002609000310520	银行机构代码		102581000546	
子课题 负责人	姓 名	谢青梅	性 别	<input type="checkbox"/> 男 <input checked="" type="checkbox"/> 女	出生日期	1972.09.06
	证件类型	身份证	证件号码		440106197209061822	
	所在单位	华南农业大学				
	最高学位	<input checked="" type="checkbox"/> 博士 <input type="checkbox"/> 硕士 <input type="checkbox"/> 学士 <input type="checkbox"/> 其他				
	职 称	<input checked="" type="checkbox"/> 正高级 <input type="checkbox"/> 副高级 <input type="checkbox"/> 中级 <input type="checkbox"/> 初级 <input type="checkbox"/> 其他			职务	院长
	电子邮箱	qmx@scau.edu.cn	移动电话		15800003007	

一、子课题的研究主要内容		
1、解析宿主蛋白调控禽白血病病毒（ALV）逆转录与整合过程的作用机制，鉴定抗禽白血病宿主遗传调控因子。 2、筛选鉴定调控 ALV 逆转录与整合的宿主蛋白功能氨基酸位点。 3、以抗禽白血病宿主遗传调控因子的功能位点为靶点，利用基因编辑技术创制抗禽白血病鸡新素材。 4、以抗禽白血病鸡为育种素材，开展禽白血病抗性专门化品系选育。		
二、子课题的主要考核指标		
1、解析抗禽白血病宿主遗传调控因子 1-2 个； 2、联合创制抗禽白血病鸡新素材 1 个； 3、申请或授权国家发明专利 1 件，发表学术论文 2 篇。		
三、子课题实施计划		
2023 年 09 月 至 2024 年 06 月	任务：	解析宿主蛋白调控 ALV 逆转录的作用机制，并鉴定其功能氨基酸位点
	考核指标：	鉴定抗禽白血病宿主遗传调控因子 1 个
	成果形式：	发表论文或专利申请
2024 年 07 月 至 2024 年 12 月	任务：	解析宿主蛋白调控 ALV 整合的作用机制，并鉴定其功能氨基酸位点
	考核指标：	鉴定抗禽白血病宿主遗传调控因子 1 个
	成果形式：	发表论文或专利申请
2025 年 01 月	任务：	利用基因编辑技术，创制抗禽白血病鸡新素材

至 2025 年 06 月	考核指标:	获得抗禽白血病鸡新素材 1 个
	成果形式:	发表论文或专利申请
2025 年 07 月 至 2025 年 12 月	任务:	开展禽白血病抗性专门化品系的选育
	考核指标:	初步获得禽白血病抗性专门化品系 1 个
	成果形式:	发表论文、专利申请、性能测定报告等

四、参加人员名单								
	姓 名	单 位	年 龄	性 别	职 称/职 务	责 任 分 工	手 机 号	邮 箱
主 持 人	谢青梅	华南农业大学	52	女	教授/院长	禽白血病抗性宿主基因功能鉴定	15800003007	qmx@scau.edu.cn
参 加 人	陈伟国	华南农业大学	43	男	高级实验师/ 无	血病抗性专门化品系的选育	13632446076	wgchen81@scau.edu.cn
	乔延召	华南农业大学	31	男	无	创制抗禽白血病鸡新素材	18320728770	q2440154044@163.com
	肖更生	华南农业大学	27	男	无	解析宿主蛋白调控 ALV 逆转录的作用机制	13622716718	gsxiao2021@163.com
	徐慧娟	华南农业大学	27	女	无	解析宿主蛋白调控 ALV 整合的作用机制	18855067713	xhj20210301@163.com
	王若楠	华南农业大学	24	女	无	鉴定禽白血病抗性宿主基因功能位点	15769468009	1102665020@qq.com

五、年度经费预算表

序号	预算科目名称	金额（万元）
	(1)	(2)
1	一、中央财政专项资金	36.00
2	（一）直接费用	30.80
3	1. 设备费	0.00
4	其中：购置设备费	0.00
5	2. 业务费	25.41
6	3. 劳务费	5.39
7	（二）间接费用（自动计算）	5.20
8	二、其他来源资金	0.00
9	三、合计	36.00

六、共同条款

签约各方共同遵守《国务院办公厅关于改革完善中央财政科研经费管理的若干意见》（国办发[2021]32号）等有关规定。

1. 课题经费要专款专用，不得挪作它用。经费的使用要严格按照有关规定执行。若经费超支，由乙方自筹解决，但不得因此影响课题的执行。
2. 甲方根据相关规定，监督乙方经费的使用情况。凡不符合规定的开支，甲方负责提出调整意见。
3. 任务执行过程中，乙方如需调整任务，应根据有关规定，向甲方提出变更内容的申请报告，经甲方审核后逐级上报项目组织部门、科技部审定后实施。未接到正式批准书以前，双方须按原任务书履行，否则后果由自行调整的一方负责。
4. 乙方因某种原因（如：与可行性研究内容有出入、挪用经费、技术措施或某些条件不落实）致使计划无法执行，并要求中止任务，应视不同情况，部分或全部退还所拨经费；若乙方没有提出中止任务的要求，甲方根据调查情况有权提出中止任务的建议，经上报项目组织部门、科技部审核批准后执行。
5. 乙方因不可抗力不能履行任务书规定的工作内容时，应及时通知甲方，并在合理期间内出具不能履行的证明。
6. 乙方应保证课题负责人及主要承担人员的稳定，不得随意调换；如确需调换，应征得甲方同意，否则，由于人员安排问题造成课题不能正常实施，其损失由乙方负责。
7. 课题承担单位要严格按本任务书履行承担的任务，并于每年年底前，提交课题年度执行情况总结、经费决算及下年度工作计划。如不能按期完成本年度计划指标，项目负责人会同项目执行委员会成员有权对项目进行审核、缓拨经费，直至停止合同，撤销课题处理。
8. 课题结束后，乙方应根据有关要求，向甲方提交验收申请，由甲方组织有关专家，依据任务书的内容对课题进行验收。
9. 本课题形成的成果统一标注“**农业生物育种重大项目**”（编号 **2023ZD04053**）。
10. 本任务书签订各方均负有相应责任。若有争议或纠纷时，按照有关规定处理。

七、合同签约各方

甲方（委托方）：

（公章）



单位法人：（签章）

[Handwritten signature in blue ink]



课题负责人：（签字）

[Handwritten signature in black ink]

年 月 日

乙方（承担方）：

单位（公章）



单位法人：（签章）

[Handwritten signature in blue ink]

子课题负责人：（签字）

[Handwritten signature in black ink]

年 月 日

受理编号: c2342150100029

项目编号: 2023B0202010029

文件编号:

广东省省级科技计划项目

任务书

项目名称: 湛江鸡抗病新品种选育、健康养殖和屠宰加工关键技术集成与推广应用

专项资金类别: 区域创新能力与支撑保障体系建设

计划类别: 农村科技

项目起止时间: 2023-01-01 至 2025-12-31

管理单位(甲方): 广东省科学技术厅

承担单位(乙方): 华南农业大学

乙方主管部门(丙方): 华南农业大学

通讯地址: 广东省广州市天河区五山路483号

邮政编码: 510642

单位电话: 020-85283435

项目负责人: 谢青梅

联系电话: 020-85281805

项目联系人: 陈伟国

联系电话: 13632446076



(广东科技微信公众号)

广东省科学技术厅
二〇一七年制

(受理纸质材料二维码)

填写说明

一、项目任务书内容原则上要求与申报书相关内容保持一致，不得无故修改。

二、项目承担单位通过广东省科技业务管理阳光政务平台下载项目任务书，按要求完成签名盖章后提交至省科技厅受理窗口。

三、签名盖章说明。请分别在单位工作分工及经费分配情况页、人员信息页、签约各方页等地方按要求签字或盖章，签章不合规或错漏将不予受理。其中，人员信息页要求所有参与人员本人亲笔签名，代签或印章无效，漏签将不予受理。

四、本任务书自签字并加盖公章之日起生效，各方均应负本任务书的法律责任，不应受机构、人事变动影响。

一、研发内容和关键技术

1. 主要研究内容

(1) 湛江鸡抗病新品种（品系）的选育及推广

精准鉴定湛江黄鸡1号配套系禽白血病遗传抗性与抗病基因型信息，筛选抗禽白血病育种素材，应用抗病分子标记信息的选种和选配技术，组建抗病选育基础群和核心育种群，结合现代家禽育种方法，选育出具有抗病高效、优质高产等特性突出的湛江鸡抗病新品种（品系），并推广应用。

(2) 湛江鸡重大疫病监测与健康预警模型的优化与示范

制定湛江鸡养殖技术规范 and 疫病防控技术体系，利用肉鸡健康智能感知技术，监测鸡只多源大数据特征，评价环境舒适度，感知疾病预警信号，构建湛江鸡养殖环境与健康预警技术体系，并示范与推广应用。

(3) 湛江鸡种养结合生态循环模式构建与示范

研究湛江鸡高效生产工艺和显著降低碳氮损失、提高肥料产品产量和质量的堆肥技术，优化废弃物资源化利用循环体系中有毒物质的防控与去除技术，构建从养殖端到种植业全链条的有害物质防控技术体系，建立种养结合的生态循环体系并示范。

(4) 湛江鸡肉（蛋）品质提升关键技术的集成与示范

利用生物转化的微量元素、桉叶多酚等配合鸡饲料，改善鸡肉和鸡蛋品质；高效制备山莓叶、单/双甘油酯等岭南特色植物源饲料，提高湛江鸡抗病、抗腹泻能力和饲料转化效率。

(5) 湛江鸡屠宰加工技术与预制工艺的集成与示范

围绕园区整体规划、屠宰、分割、液氮速冻、低温熟食加工和预制工艺等环节，集成一套屠宰加工技术体系，并推广应用。

2. 拟解决的关键问题及技术路线

若要实现湛江鸡产业提质增效和健康发展，关键在于湛江鸡种源是否安全，同时疫病监测与健康预警、精细化与智能化管理、废弃物利用与生态环境控制、肉蛋品质提升、屠宰加工与预制工艺等关键技术的分类集成是否确当也是需要重点关注的问题。为解决这些关键问题，本项目采用了以下技术路线：湛江鸡抗病新品种（品系）的选育→重大疫病监测与健康预警模型的建立+种养结合生态循环模式构建+肉蛋品质提升关键技术建立+屠宰加工技术与预制工艺建立→湛江鸡抗病新品种选育、健康养殖和屠宰加工技术的分类集成及体系建立→湛江鸡抗病新品种、所有技术的示范（良种和技术推广）

3. 创新点

(1) 基于抗病分子标记信息的选种和选配技术，选育出湛江鸡抗病新品种（品系），保障了湛江鸡种源安全。

(2) 基于具有自主知识产权的技术成果，创建湛江鸡从种源到预制产品的分类集成方案与全链条技术体系。

(3) 湛江鸡良种和分类集成技术的推广应用，以实现湛江鸡产业提质增效。

二、项目考核指标

1. 项目完成后提供的研究开发成果及形式(须明确产品、专利、版权、标准等成果的类型及数量)

成果形式		成果数量	成果形式		成果数量
发明专利	申请	3	引进人才(人)		
	授权		培养人才(人)		3
实用新型专利	申请	3	科技人才奖励(人)		
	授权		技术标准制定	牵头(个)	
外观设计专利	申请	1		参与(个)	1
	授权		科技报告(篇)		1
国外专利	PCT受理	1	软件著作权(项)		
	授权		论文论著(篇)		3
获得国家级奖项(项)			其中：被收录论文数(篇)	SCI	3
获得省级奖项(项)				EI	
新服务(项)				ISTP	
新产品（或新材料、新装备、新品种（系））		1	新工艺（或新方法、新模式、新技术）		4
创新载体项目必填		技术服务数量（项）			
		服务企业数量（家）			
科技金融项目必填		开展培训宣讲活动场次(次)			
		服务企业数量(家)			
		帮助企业融资(万元)			
		引进专业机构(家)			
院士工作站项目必填		引进院士及其团队科技成果转化数量			
		院士开展的战略咨询和技术指导次数			
		院士年进站次数			
		院士及院士团队年进站时间			
软科学项目必填		决策参考报告(篇)(至少1篇)			
		研究总报告(篇)			
		研究中期报告(篇)			
		研究分报告(篇)			
		调研报告(篇)			
		专著(篇)[须注明“广东省软科学研究计划项目(项目编号：)资助”]			
		核心期刊论文(篇)[以第一作者发表，须注明“广东省软科学研究计划项目(项目编号：)资助”]			
		培养人才(人)			

	获国家级奖项(项)			
	获省级奖项(项)			
	其他			
2. 其他成果及形式说明:				
集成1套湛江鸡抗病新品种选育、健康养殖和屠宰加工关键技术体系,并以技术示范、技术培训和技术服务等多种方式进行推广应用。				
3. 主要技术经济指标及社会效益				
累计新增销售收入(万元)	5000.00			
累计新增利税(万元)	2000.00			
4. 其他主要技术经济指标及社会效益说明:				
<p>其他主要技术经济指标: (1) 选育出湛江鸡抗病品系3个; (2) 培育出湛江鸡抗病新杂交配套1个; (3) 建立1套湛江鸡重大疫病监测与健康预警模型; (4) 构建1种湛江鸡种养结合生态循环模式; (5) 研发1套湛江鸡肉(蛋)品质提升关键技术; (6) 创建1套湛江鸡屠宰加工技术与预制工艺关键技术。本项目研究成果可集成一套湛江鸡抗病新品种选育、健康养殖和屠宰加工关键技术体系,并在廉江市湛江鸡产业园主体企业示范推广,通过联农带农激励机制,辐射带动湛江鸡产业提质增效和农户稳产增收,提升了粤西地区农业科技创新能力,助力与巩固粤西地区乡村全面振兴和农业农村现代化建设。</p>				

三、项目进度和阶段目标

开始日期	结束日期	主要工作内容
2023-01-01	2023-12-31	(1) 湛江黄鸡1号配套系的审定, 抗病新品种选育基础群和核心群的组建; (2) 湛江鸡养殖技术规范 and 疫病防控技术体系的制定; (3) 构建湛江鸡种养结合生态循环模式; (4) 湛江鸡肉(蛋)品质提升关键技术建立、桉叶多酚鸡饲料应用后的功效鉴评。
2024-01-01	2024-12-31	(1) 湛江鸡抗病核心群的持续选育; (2) 湛江鸡养殖环境与健康预警技术体系的构建与应用; (3) 基于生态链有害物质防控技术的种养循环体系建立与应用; (4) 湛江鸡高品质肉(蛋)鉴评; (5) 山莓叶、单/双甘油酯等植物源饲料添加剂应用后的功效鉴评。
2025-01-01	2025-12-31	(1) 湛江鸡抗病核心群的持续选育与新杂交配套组建; (2) 健康养殖、肉(蛋)品质提升、和屠宰加工关键技术集成; (3) 湛江鸡抗病新品种、所有技术在湛江鸡产业园实施主体单位应用并示范推广。(4) 结题验收。

四、承担、参与单位工作分工及经费分配情况

承担/参与单位名称 (盖章)	工作分工	总经费分摊 (万元)	省级财政科技资金分配 (万元)
华南农业大学	(1) 开展湛江鸡抗病新品种(品系)选育; (2) 建立并优化湛江鸡重大疫病监测与健康预警模型; (3) 构建湛江鸡种养结合生态循环模式; (4) 研发湛江鸡肉(蛋)品质提升关键技术; (5) 创建湛江鸡屠宰加工技术与预制工艺。	150.00	120.00
广州市微量元素研究所(普通合伙)	参与研发湛江鸡肉(蛋)品质提升关键技术。	20.00	16.00
广东润生农业集团有限公司	(1) 利用已集成的鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术,选育湛江鸡抗病新品种(品系); (2) 示范应用与推广湛江鸡健康养殖和屠宰加工关键技术。	230.00	24.00
合计		400.00	160.00

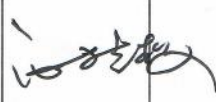
五、项目总经费及省科技厅经费预算

(一) 省财政科技资金拟投入总额: (大写) 壹佰陆拾万圆整; (小写) 160万元;							
(二) 省财政科技资金分期下达计划:							
分期				经费(万元)			
第1期				160.00			
(三) 总经费及财政科技资金投入情况 (单位: 万元)							
项目总经费投入	财政科技资金			自筹经费			合计
	省级	中央	地方	自有经费	贷款	地方政府投入及其他	
	160.00			240.00			
自筹资金投入情况说明:							
按照广东省科学技术厅关于征集2023年广东省农业科技社会化服务成果集成示范项目的通知, 华南农业大学联合广州市微量元素研究所及湛江市廉江市广东润生农业集团有限公司作为技术推广应用示范单位, 共同申报2023年广东省农业科技社会化服务成果集成示范项目“湛江鸡抗病新品种选育、健康养殖和屠宰加工关键技术集成与推广应用”, 申请省财政经费200万。广东润生农业集团有限公司承诺为该项目自筹经费200万。							
项目经费预算						(单位: 万元)	
是否为数学等纯理论基础研究项目: 否							
		项目总经费		省级财政科技资金			
支出经费	经费额	用途说明		经费额	用途说明		
1、直接费用	368.00			134.40			
(1) 设备费	0.00			0.00			
(2) 业务费	340.00	材料费、实施设备、测试、差旅费/会议费/国际合作与交流费和出版/文献/信息传播/知识产权事务费		112.00	材料费、测试化验加工外协费、差旅费/会议费/国际合作与交流费和出版/文献/信息传播/知识产权事务费		
(3) 直接人力资源成本	28.00	用于参加项目研究的研究生劳务补贴等		22.40	用于参加项目研究的研究生劳务补贴等		
2、间接费用	32.00			25.60			
(1) 绩效支出	20.00			16.00			
(2) 管理费用	12.00	项目管理费用		9.60	项目管理费用		
(3) 其他间接费用	0.00	项目组成员研究工作的绩效支出		0.00	项目组成员研究工作的绩效支出		
合计	400.00			160.00			
其他需说明的情况							
无。							

单价50万元以上购置/试制设备预算明细表

序号	设备名称	设备分类	功能和技术指标	单价(万元)	数量	金额(万元)	购置或试制单位	安置单位	购置设备类型	主要生产厂家及国别	规格型号	拟开放共享范围
单价50万元以上购置设备合计					0	0.00	/	/	/	/	/	/
单价50万元以上试制设备合计					0	0.00	/	/	/	/	/	/

六、人员信息

项目负责人情况								
姓名	年龄	性别	职称	职务	学历	在项目中所承担的任务	所在单位	签名
谢青梅	51	女	教授	院长	博士研究生	负责项目的管理、实施、总结和组织验收	华南农业大学	

主要研究开发人员								
姓名	年龄	性别	职称	职务	学历	在项目中所承担的任务	所在单位	签名
陈伟国	41	男	高级实验师	无	博士研究生	抗病新品种（品系）选育	华南农业大学	
张新珩	33	女	副教授	无	博士研究生	重大疫病监测	华南农业大学	
王燕	42	女	教授	无	博士研究生	种养结合生态循环模式构建	华南农业大学	
陈运娇	38	女	副教授	无	博士研究生	鸡肉（蛋）品质提升关键技术建立	华南农业大学	
何国锋	53	男	研究员	执行所长	博士研究生	鸡肉（蛋）品质提升关键技术建立	广州市微量元素研究所（普通合伙）	
曹庸	56	男	教授	省重点实验室主任	博士研究生	鸡肉（蛋）品质提升关键技术集成	华南农业大学	
李颖	46	女	副研究员	所长	硕士研究生	鸡肉（蛋）品质提升关键技术建立	广州市微量元素研究所（普通合伙）	
林婕	56	女	副教授	无	硕士研究生	屠宰加工技术与预制工艺集成	华南农业大学	
叶明江	52	男	未取得	董事长	其他	示范推广	广东润生农业集团有限公司	

广东省科技计划项目任务书

肖德琴	52	女	教授	省重点实验室主任	博士研究生	健康预警模型优化	华南农业大学	肖德琴
陈胜	26	男	未取得	无	博士研究生	ALV-A/K遗传抗性标记基因分型	华南农业大学	陈胜
陈丽怡	25	女	未取得	无	硕士研究生	ALV-A/K遗传抗性标记基因分型	华南农业大学	陈丽怡
徐慧娟	25	女	未取得	无	硕士研究生	抗病新品种（品系）选育	华南农业大学	徐慧娟
吴承洋	23	男	未取得	无	硕士研究生	ALV-B/D/E遗传抗性标记基因分型	华南农业大学	吴承洋
郑泓昊	22	男	未取得	无	硕士研究生	抗病新品种（品系）选育	华南农业大学	郑泓昊
朱学风	27	女	未取得	无	硕士研究生	抗病新品种（品系）推广	华南农业大学	朱学风
李广珍	41	男	未取得	总经理	本科	示范推广	广东润生农业集团有限公司	李广珍
李富豪	30	男	未取得	场长	本科	新品种（品系）培育和应用	广东润生农业集团有限公司	李富豪

七、承担、参与单位合作

合作协议

项目承担单位：华南农业大学

项目参与单位：广州市微量元素研究所

项目参与单位：广东润生农业集团有限公司

华南农业大学、广州市微量元素研究所、广东润生农业集团有限公司经友好协商决定联合申报2023年广东省农业科技社会化服务成果集成示范项目，项目名称：湛江鸡抗病新品种选育、健康养殖和屠宰加工关键技术集成与推广应用。并达成如下合作协议：

第一条：项目研究工作详细分工：

华南农业大学：（1）开展湛江鸡抗病新品种（品系）选育；（2）建立并优化湛江鸡重大疫病监测与健康预警模型；（3）构建湛江鸡种养结合生态循环模式；（4）研发湛江鸡肉（蛋）品质提升关键技术；（5）创建湛江鸡屠宰加工技术与预制工艺。甲方（承担单位）主要考核指标如下：（1）协助湛江鸡抗病新品种（品系）选育；（2）建立1套湛江鸡重大疫病监测与健康预警模型；（3）构建1个湛江鸡种养结合生态循环模式；（4）研发1套湛江鸡肉（蛋）品质提升关键技术；（5）创建1套湛江鸡屠宰加工技术与预制工艺关键技术；（6）申请国家发明专利3件以上；（7）发表高水平论文3篇以上；（8）培养研究生2~3人；（9）提交科技报告1篇。

广州市微量元素研究所：参与研发湛江鸡肉（蛋）品质提升关键技术。

广东润生农业集团有限公司：（1）利用已集成的鸡禽白血病遗传抗性与抗病选育关键技术，选育湛江鸡抗病新品种（品系）；（2）示范应用与推广湛江鸡健康养殖和屠宰加工关键技术。

第二条：经费分配及自筹：

1、本项目获得批准后，给广州市微量元素研究所和广东润生农业集团有限公司分配省科技厅经费20万元和30万元用于开展相应科学研究。

2、广东润生农业集团有限公司为本项目自筹经费200万，用于场地设施建设和购买鸡苗饲料药物等；

3、华南农业大学在收到广东省科学技术厅下达的资助经费后的一个月内按比例将广州市微量元素研究所和广东润生农业集团所占经费支付给广州市微量元素研究所和广东润生农业集团指定帐户。

第三条至第八条协议具体见合作协议。

八、任务书条款

第一条	甲方与乙方根据《中华人民共和国民法典》及国家有关法规和规定，为顺利完成（2023）年湛江鸡抗病新品种选育、健康养殖和屠宰加工关键技术集成与推广应用专项项目（项目编号：2023B0202010029）经协商一致，特订立本任务书，作为甲乙双方在项目实施管理过程中共同遵守的依据。
第二条	甲方的权利义务： 1. 按任务书规定进行经费核拨的有关工作协调。 2. 根据甲方需要，在不影响乙方工作的前提下，定期或不定期对乙方项目的实施情况和经费使用情况进行检查或抽查。 3. 根据《广东省科研诚信管理办法（试行）》（粤科规范字（2020）2号）等有关科研诚信政策制度对乙方进行科技计划信用管理。
第三条	乙方的权利义务： 1. 确保落实自筹经费及有关保障条件。 2. 按任务书规定，对甲方核拨的经费实行专款专用，单独列账，并随时配合甲方进行监督检查。 3. 使用财政资金采购设备、原材料等，按照《广东省实施〈中华人民共和国招标投标法〉办法》有关规定，符合招标条件的须进行招标。 4. 项目实施完成或实施到一定程度，须按照《广东省省级科技计划项目验收结题工作规程（试行）》（粤科监字〔2020〕77号）提出验收或终止结题的申请，并按甲方要求做好项目结题工作。 5. 在每年3月向甲方如实提交上年度工作情况报告，报告内容包含上年度项目进展情况、经费决算和取得的效果等。 6. 按照国家和省有关规定，每年须提交年度科技报告；项目验收时，须提交验收科技报告。
第四条	在履行本任务书的过程中，如出现广东省相关政策法规重大改变等不可抗力情况，甲方有权对所核拨经费的数量和时间进行相应调整。
第五条	在履行本任务书过程中，需要对项目起止时间、项目经费使用（包括自筹经费、经费分配及经费支出预算等）、项目内容（包括研发内容、技术指标、经济指标及成果指标等）、项目名称、项目承担单位（包括承担单位更名、承担单位替换）、参与单位、项目负责人和成员等进行变更的，甲乙双方按照《广东省省级科技计划项目验收结题工作规程（试行）》（粤科监字〔2020〕77号）有关规定执行。
第六条	在履行本任务书的过程中，当事人一方发现可能导致项目整体或部分失败的情形时，应及时通知另一方，并采取适当措施减少损失，没有及时通知并采取适当措施，致使损失扩大的，应当就扩大的损失承担责任。
第七条	本项目技术成果的归属、转让和实施技术成果所产生的经济利益的分享，除双方另有约定外，按国家和广东省有关法规执行。
第八条	属技术保密的项目，甲乙双方应另行订立技术保密条款，作为本任务书正式内容的一部分，与本任务书具有同等效力。
第九条	根据项目具体情况，经双方另行协商订立的附加条款，作为本任务书正式内容的一部分，与本任务书具有同等效力。
第十条	本任务书的争议应由双方本着协商一致的原则解决，如双方协商不成的，则应向甲方所在地法院提起诉讼。
第十一条	保密条款： 1. 本任务书保密内容范围为： 无。 2. 本任务书保密期限为： 无。 3. 乙方应与可能知悉保密内容的人员签订技术秘密保护协议。 4. 各方应建立技术秘密保护制度。 5. 属技术保密的项目必须经省负责技术保密部门审查后，确定可否发表或用于国际合作和交流。

第十二条	甲方可根据具体情况决定乙方是否需要单位担保,若需要保证单位,应订立担保条款,作为本任务书正式内容一部分。当乙方不履行或不完全履行本任务书,以及没有或没有完全承担违约责任时,乙方的保证单位承担连带保证责任。
第十三条	本任务书一式六份,各份具有同等效力。甲方存三份,乙方存二份,丙方存一份,本任务书自签字之日起生效,有效期至项目结题后一年内。各方均应负责任务书的法律责任,不应受机构、人事变动的影响。
说明:本任务书中,凡是当事人约定无需填写的内容,应在空白处划(/)。	

) 年
编号
呈中经费
诚信

督检

) 办

程 (

目结

经

告。

有权

配及
项目
成员
(粤及时
的,

定外

分,

与

在地

和交

九、本任务书签约各方

管理单位（甲方）： 广东省科学技术厅 （盖章）

单位地址： 连新路171号

法定代表人（或授权代表）： 龚国平

（签章）

立项责任人： 叶毓峰

（签章）

承担单位（乙方）： 华南农业大学

（盖章）

二级部门： 华南农业大学动物科学学院

单位地址： 五山路483号

法定代表人（或法人代理）： 刘雅红

（签章）

联系人（项目主管）姓名： 倪慧群

（签章）

Email: kjcgxk@scau.edu.cn

电话： 020-85283435 / 15920301530

开户单位名称： 华南农业大学

开户银行及账号： 广东广州工行五山支行 3602002609000310520

年 月 日

乙方主管部门（丙方）： 华南农业大学

（盖章）

单位地址： 五山路483号

法定代表人（或法人代理）： 刘雅红

（签章）

年 月 日

86

合同编号: 2022-Xp4-00-012

2022年省级乡村振兴战略专项资金 种业振兴项目

合 同 书

项目名称: 中山麻鸭遗传资源保护与高效新品系的培育

项目管理单位(甲方): 广东省农业农村厅

项目牵头承担单位(乙方): 华南农业大学

项目推荐(主管)单位(丙方): 华南农业大学

项目负责人: 张细权 联系电话: 13922276891

项目联系人: 罗庆斌 联系电话: 13392618305

广东省农业农村厅制

第一条 为保障 2022 年省级乡村振兴战略专项种业振兴项目顺利实施, 按时保质保量完成项目任务, 根据《中华人民共和国民法典》、《广东省省级财政专项资金管理办法(试行)》、《广东省财政厅关于安排 2022 年省级乡村振兴战略专项资金种业振兴项目资金的通知》(粤财农[2022]184 号)、《广东省农业农村厅财政专项资金管理办法》等文件有关规定, 经甲、乙、丙三方协商一致, 签署本合同书。

第二条 甲方的权利义务: 本合同履行过程中, 甲方有权对乙方项目的实施情况和资金到位、使用情况进行监督、检查, 提出改进要求。

第三条 乙方的权利义务:

1. 按财政资金管理规定, 对甲方核拨的资金做到专款专用, 单独列账, 并随时配合甲方进行监督检查;

2. 认真填写本合同书附件 1《项目任务书》, 《项目任务书》的内容应与乙方的《项目申报书》保持一致;

3. 严格按照本合同书及合同书附件 1《项目任务书》的要求及时完成项目建设内容, 项目实施完成后, 按照本合同附件 2 的要求提交验收报告;

4. 按照《广东省农业农村厅财政专项资金管理办法》规定, 按季度向甲方、丙方报告项目实施情况、财政资金开支进度等内容;

5. 乙方需保留与所有参与单位的合作实施协议和相关财务凭证, 并向甲方备案。

第四条 丙方的权利义务:

1. 为乙方项目实施提供必要的条件保障;

2. 负责对项目承担单位的实施条件、能力以及财务管理规范进行审查, 对推荐项目的实施场地、申报资料等进行真实性审核, 并监督项目实

施、资金预算执行情况;

3.受甲方委托或协助甲方完成项目验收等工作,并及时向甲方报告情况。

第五条 本项目资金不得用于以下方向: 1.行政事业单位基本支出; 2.各项奖金、津贴和福利补助; 3.企业担保金和弥补企业亏损; 4.修缮楼堂馆所以及建造职工住宅; 5.弥补单位预算支出缺口和偿还债务; 6.购买交通工具及通讯设备; 7.形成地方政府债务的支出; 8.购买理财产品、发放借款及平衡预算等。

第六条 项目验收。对财政资金投资 500 万元 (含) 以上 (科研项目财政资金在 200 万元 (含) 以上) 的项目, 及乙方直接向甲方申报的项目, 由甲方负责组织验收; 对财政资金投资 500 万元以下 (科研项目财政资金 200 万元以下) 的项目, 甲方自主或委托推荐(主管)单位负责验收, 由验收单位向甲方提交验收材料, 甲方对验收材料进行审核确认。

第七条 在履行本合同的过程中, 如出现相关政策法规重大改变等不可抗力情况, 甲方有权对所核拨经费的数量和时间进行相应调整。因非不可抗力因素导致的项目未履行或未履行完毕, 或因乙方责任造成项目不能继续开展的, 甲方有权终止项目合同, 收回尚未使用和使用不符合规定的财政经费。

第八条 在履行本合同的过程中, 当事人一方发现可能导致项目整体或部分失败的情形时, 应及时通知另一方, 并采取适当措施减少损失, 没有及时通知并采取适当措施, 致使损失扩大的, 应当就扩大的损失承担责任。

第九条 实施项目所获得的科技成果(项目成果)归属、成果转让和

实施技术成果所产生的经济利益的分享,按照国家和广东省有关规定执行。项目研究成果应向省农业农村厅进行登记、备案,对外发布前应征求省农业农村厅的意见。

第十条 本合同在履行过程中发生的任何争议,由甲乙丙三方友好协商解决。

项目管理单位(甲方) (盖章): 广东省农业农村厅

法定代表人(或授权代表) (签章): 刘中国

签订日期: 2023年2月23日

项目牵头承担单位(乙方) (盖章):

法定代表人(或授权代表) (签章):

项目负责人(签章): 张明权

签订日期: 2023年1月18日

乙方推荐(主管)单位(丙方) (盖章):

法定代表人(或授权代表) (签章):

签订日期: 年 月 日

项目任务书

填写说明

一、本项目任务书由乙方填写。

二、本项目任务书所列内容应实事求是填写，表达要明确、严谨。对填写不符合要求的，或填报内容出现虚报夸大、不切实际的，将退回项目承担单位修改。

三、项目任务书规定的项目考核指标、建设内容和绩效目标必须依据《项目申报书》填写，应遵循明确、量化、可考核的原则，其中技术指标应明确项目完成时达到的关键技术参数及预期可以形成的发明专利、标准、新技术、新产品、新装置、论文、专著等的数量。项目申报指南对项目技术、经济和成果等指标有明确要求的，应符合项目申报指南的要求，相关专项管理办法有特别规定的，应符合相关规定。

四、《项目申报书》及申报指南是本项目任务书填报的重要依据，项目任务书填报不得修改考核指标、绩效目标、资金预算等内容。《项目申报书》、申报指南和本项目任务书将共同作为项目过程管理、综合绩效评价（验收）和监督评估的重要依据。

五、省财政资金支出的预算计划应按照国家及省相关规定执行。

六、表格栏目不够可自行增加。

一、目的及意义

主要说明项目的建设目的、研究价值和意义。

中山麻鸭是广东省唯一的地方鸭品种，已有 600 多年的形成历史，曾在珠江三角洲地区大量养殖，是中山人民、也是广东人民的宝贵财富。随着原产地自然生态条件和社会经济条件的变迁，特别是工业化、城镇化的快速发展，中山麻鸭的养殖数量快速下降，其遗传资源日渐稀缺。在 2006 年开始的第二次全国畜禽遗传资源调查中，中山麻鸭被确认为处于濒临灭绝状态。2014 年至今，中山市农业科技推广中心在华南农业大学相关科研团队的技术支持下，积极收集中山麻鸭种源，进行抢救性收集保护，取得了阶段性成效。本项目申报单位华南农业大学联合云浮市云城温氏畜牧有限公司、中山市农业科技推广中心，旨在发挥产学研政合作的模式，结合各自优势，进一步完善中山麻鸭遗传资源的保护工作，开展中山麻鸭的提纯复壮，扩大保种群体，确保中山麻鸭保种判定至安全级；并以中山麻鸭资源为基础，在保持中山麻鸭主要特征特性的基础上，培育具有大体型、生长快、饲料转化率高的麻鸭新品系，将我省唯一的优良鸭种质资源选育提高、发扬光大。

二、项目建设内容

详细说明项目建设内容（项目需求或项目建设任务）。

运用现代家禽育种技术，开展中山麻鸭的提纯复壮，扩大保种群体，确保中山麻鸭保种判定至安全级；在保持中山麻鸭主要特征特性的基础上，培育具有大体型、生长快、饲料转化率高的新品种，并取得进展成效。

（一）项目（课题）牵头承担单位

1. 单位名称：华南农业大学

2. 研究开发内容（或推广内容）：

（1）基于中山麻鸭选育品系挖掘与鉴定影响麻鸭生长、饲料转化效率、产蛋、抗病性等重要性状的功能基因及其 SNPs，为性状的分子标记辅助选择奠定基础。

（2）持续为中山市农业科技推广中心中山麻鸭的保种工作提供技术支持，进行保种群体的家系组建、性能测定等工作。

（3）发表论文 2 篇、申请专利 3 件。

（4）协助中山市农业科技推广中心起草制定中山麻鸭品种地方标准。

（二）项目（课题）参与单位一

1. 单位名称：中山市农业科技推广中心

2. 研究开发内容（或推广内容）：

（1）依照科学的保种技术，精心管理好中山麻鸭保种核心群，持续进行保种群体的提纯复壮工作，保种核心群家系达到 40 个，群体数量超过 2000 只。

（2）组织起草制定中山麻鸭品种地方标准。

（3）为参与单位云浮市云城温氏畜牧有限公司提供中山麻鸭新品系培育所需的种质资源。

（三）项目（课题）参与单位二

1. 单位名称：云浮市云城温氏畜牧有限公司

2. 研究开发内容（或推广内容）：

（1）以中山麻鸭素材为基础，培育高效新品系 2 个，各选育品系核心群家系不少于 40 个，核心群及性能测定群体数量超过 2000 只。

（2）对新品系生长、饲料转化效率、产蛋等重要性状的测定。

备注：项目建设内容（项目需求或项目建设任务）按《项目申报书》内容填写。

三、项目绩效目标

主要说明项目实施后，预期达到的目标和产生的效果，相关表述应量化。

1. 总体目标：运用现代家禽保种和育种技术，开展中山麻鸭的提纯复壮，扩大保种群体，确保中山麻鸭保种判定至安全级；在保持中山麻鸭主要特征特性的基础上，培育具有大体型、生长快、饲料转化率高的新品种，并取得进展成效。

总体考核指标：恢复中山麻鸭体型外貌、品种性状，保种核心群家系达到 40 个，群体数量超过 2000 只，生产性能稳定，建立中山麻鸭地方品种标准体系。培育中山麻鸭新品系 2 个，父系 80-90 日龄出栏重提高 15-20%，料重比 2.8-3.0，母系年产蛋提高 10%以上，受精率 90%以上，各选育品系核心群家系不少于 40 个，核心群及性能测定群体数量超过 2000 只。申请发明专利 3 件，发表论文 2 篇。

2. 本年度绩效目标：（1）第 7 世代保种核心群的组建、饲养、性能测定；（2）起草《中山麻鸭》省级品种标准文稿；（3）建立中山麻鸭选育基础群（F0 代），测定基础群主要生长及繁殖性能。（4）基于中山麻鸭选育品系的功能基因挖掘鉴定预实验。

本年度考核指标：提交中山麻鸭本年度保种工作报告 1 份，提交《中山麻鸭》省级品种标准文稿（初稿）1 套。

四、项目进度安排

详细说明各阶段的工作内容和时间安排情况。

2023 年 1 月 1 日-12 月 31 日：

（1）麻鸭功能基因挖掘：参与中山麻鸭新品系选育基础群构建和性能测定、评估，样品采集、初步实验。

（2）中山麻鸭遗传资源保护：组建第 7 世代保种群，保种群饲养管理及性能测定，完成《中山麻鸭》品种省级标准初稿的起草。

（3）中山麻鸭高效新品系培育：构建中山麻鸭高效新品系选育基础群、性能测定与评估，制定选育方案。

备注：项目绩效目标按《项目申报书》内容填写。

五、项目主要合作、参与单位(含牵头承担单位)

单位名称	单位性质	统一社会信用代码	通讯地址
华南农业大学	事业单位	124400004554165634	广州市天河区五山路 483 号
中山市农业科技推广中心	事业单位	12442000735004598W	广东省中山市东区桂园东路 8 号
云浮市云城温氏畜牧有限公司	股份制企业	914453007864509420	广东省云浮市云城区思劳镇云城温氏畜牧有限公司

六、项目组主要成员(含项目负责人)

姓名	性别	身份证号	单位	职称/职务	电话
张细权	男	440106196305161992	华南农业大学	正高级	13922276891
罗庆斌	男	513101196905200034	华南农业大学	副高级	13392618305
叶树才	男	442000197810020712	中山市农业科技推广中心	副高级	13923317396
季从亮	男	320828197801014813	云浮市云城温氏畜牧有限公司	副高级	13826859658
田政巍	男	440281197809012878	中山市农业科技推广中心	中级	13924939163
吴咏梅	女	440421196611080023	中山市农业科技推广中心	副高级	13924939201
苏伟岳	男	440106197203121855	云浮市云城温氏畜牧有限公司	其他	13826703110
朱炜健	男	445321199308175233	云浮市云城温氏畜牧有限公司	其他	19925599670
陈伟国	男	441502198109065051	华南农业大学	副高级	13632446076
殷颖珊	女	442000198409078381	中山市农业科技推广中心	中级	13925324613
刘满清	女	320102197709204620	华南农业大学	副高级	13751853060
张新珩	女	220722198903140244	华南农业大学	中级	13316294331

蓝立明	男	36072319940318201X	云浮市云城温氏畜牧有限公司	其他	13358215879
方成	男	32010619921224041X	华南农业大学	其他	13422089186
史春华		440883198304040013	云浮市云城温氏畜牧有限公司	其他	18125257068
李震源	男	440620197101250538	中山市农业科技推广中心	中级	13702300783
梁巧华	女	44200019850804892X	中山市农业科技推广中心	初级	13600338410
常志强	男	411528199806156218	华南农业大学	其他	18065172923
薛瑞祥	男	520201200002083213	华南农业大学	其他	17608584800
范折霞	女	622727199711308025	华南农业大学	其他	15521476413
叶茂	男	441622199603101770	华南农业大学	其他	13414965207

七、资金使用预算

主要说明资金使用的范围或方向及资金使用进度安排。

(一) 直接费用：97 万元。

1. 设备费（应当对仪器设备购置进行重点说明）：0 万元。

2. 材料费：63.7 万元。

(1) 中山麻鸭新品系选育：饲料费 20.5 万元。疫苗药物费用 2.5 万元。电子耳牌 1.0 万元。共计 24.0 万元；

(2) 中山麻鸭遗传资源保护：小鸭料费用合计 0.7 万元，大鸭料费用合计 7.4 万元，种蛋鸭料费用合计 16.9 万元，共计饲料费 25 万元。

(3) 麻鸭功能基因挖掘：采样采血耗材包括真空管、采血针、冻存管、冻存盒、PCR8 联管、干冰、手术刀、镊子和剪刀，费用需要 1.2 万元；购买血液 DNA 抽提试剂盒和组织样 RNA 抽提试剂盒需要 1.5 万元；购买细胞培养试剂耗材 9.0 万元；基因功能验证试剂耗材 3.0 万元。共计 14.7 万元。

3. 测试化验加工费：25.8 万元。

麻鸭功能基因挖掘：采集 300 日龄中山麻鸭和北京鸭各 6 个个体的胸肌组织样送全转录组测序，预计费用：全转录组测序 12 个样，单价 0.5 万元，需要花费 6.0 万元；采集 300 日龄中山麻鸭和北京鸭各 6 个个体的卵巢和输卵管组织样，其中卵巢送全转录组测序，输卵管送普通转录组测序，预计费用：全转录组测序 12 个样，单价 0.5 万元，需要花费 6.0 万元，普通转录组测序 12 个样，单价 0.1 万元，需要花费 1.2 万元，共计 7.2 万元；采集 300 日龄中山麻鸭和北京鸭各 6 个个体的肠道组织样和肠道内容物，其中肠道组织样送普通转录组测序，肠道内容物送宏基因组测序，预计费用：普通转录组测序 12 个样，单价 0.1 万元，需要花费 1.2 万元，宏基因组测序 12 个样，单价 0.2 万元，需要花费 2.4 万元，共计 3.6 万元；采集 300 日龄中山麻鸭和北京鸭各 6 个个体的大脑和肝脏组织样送普通转录组测序，预计费用：普通转录组测序 24 个样，单价 0.1 万元，需要花费 2.4 万元；筛选麻鸭生长、饲料转化效率、繁殖性能等差异基因，探讨差异基因多态性，6000 个反应二代测序，每个反应 11 元，需要花费 6.6 万元。共计 25.8 万元。

4. 燃料动力费：0 万元。

5. 出版/文献/信息传播/知识产权事务费：0 万元。

6. 会议/差旅/国际合作与交流费（科研人员结合科研活动实际需要编制预算并按规定统筹安排使用，其中不超过直接费用 10%的，不需要提供预算测算依据。超过直接费用 10%的，应说明测算过程和依据）：2.5 万元。

(1) 中山麻鸭新品系选育：调研、学术交流等差旅支出 1.0 万元。

(2) 麻鸭功能基因挖掘：主要用于项目实施过程中出差采样，参加项目启动和验收会议支出 1.5 万元。

7. 培训费：0 万元。

8. 劳务费（劳务费预算无比例限制。参与项目实施的研究生、博士后、访问学者以及项目聘用的人员、科研辅助人员等，均可开支劳务费。项目聘用人员的劳务费开支标准，参照当地科学研究和技术服务业从业人员平均工资水平，根据其在项目实施中承担的工作任务确定，其社会保险补助纳入劳务费科目中列支）：5.0 万元。

用于参与本项目的研究生三助补贴，按照硕士生 600 元/月/人，4 人参与；硕士生 800 元/月/人，2 人参与；博士生 1000 元/月/人，1 人参与，每人工作 10 个月，合计支出 5.0 万元。

9. 专家咨询费：0 万元。

10. 其他支出：0 万元。

（二）、间接费用：3.0 万元。

华南农业大学科研管理费 3.0 万元。

八、保障措施

说明围绕完成项目任务、目标所要采取的具体措施。

华南农业大学与温氏集团早在 1992 年就开启了产学研合作，堪称典范。华南农业大学家禽遗传育种团队与温氏水禽育种团队已有近 20 年的密切合作。2021 年起，华南农业大学家禽遗传育种团队作为中山市农业科技推广中心中山麻鸭保种技术支持团队，在中山麻鸭遗传资源保护上形成了稳定而密切的合作关系。本项目聚集各方优势资源，创造了“产学研政”合作保护和开发利用畜禽遗传资源的新模式。

联合申报项目协议书

甲方：华南农业大学

乙方：中山市农业科技推广中心

丙方：云浮市云城温氏畜牧有限公司

甲方、乙方、丙方经友好协商决定联合申报 2022-2023 年度省级种业振兴行动品种培育 项目，项目名称：中山麻鸭遗传资源保护与高效新品系的培育。并达成如下合作协议：

第一条：项目研究工作详细分工：

甲方(主持方)：(1) 负责挖掘与鉴定影响中山麻鸭新品系生长、饲料转化效率、产蛋、持续受精力等重要性状的功能基因及其 SNPs，为性状的分子标记辅助选择奠定基础。(2) 完成项目发表论文、申请专利、人才培养等绩效任务。(3) 持续为丙方的保种工作提供技术支持，帮助丙方进行保种群体的家系组建、性能测定等工作。(4) 协助丙方起草制定中山麻鸭品种地方标准。

乙方(参与方)：(1) 依照科学的保种技术，精心管理好中山麻鸭保种核心群，改善核心群养殖条件与饲养管理水平，持续进行保种群体的提纯复壮工作，力争完成项目保种群数量、家系数量、提升中山麻鸭安全等级等项目绩效要求。(2) 组织起草制定中山麻鸭品种地方标准。(3) 为甲方提供中山麻鸭新品系培育所需的种质资源。

丙方(参与方)：(1) 负责培育中山麻鸭高效新品系 2 个，新品系的家系数量、群体数量及相关性能指标达到项目绩效要求。(2) 负责新品系生长、饲料转化效率、产蛋、持续受精力等性状的测定。

第二条：经费分配：

1、如果本申报项目获批立项，按政府下达的资助经费，甲方、乙方、丙方同意此经费分别按政府资助经费的甲方：50%、乙方：25%、丙方：25%进行分配。



2、甲方在收到 广东省农业农村厅 下达的资助经费后的一个月内拨付乙方、丙方所分配的项目经费。

第三条：企业配套经费比例： 本项目无企业配套 。

第四条：知识产权归属：

1. 项目实施过程中所产生的知识产权，优先执行任务下达单位的知识产权管理政策，在此前提下，作如下规定：

①各方独立完成的所有权归各自所有；三方或某两方共同完成的由三方或两方共享，具体按照各方的贡献大小进行分配或另行商定。

②共同完成的项目成果的转让，须在各方同意的前提下进行，任何一方不得私自转让或许可实施。

2. 项目成果申报各级奖项，各方单位排名根据具体情况另行商定，人员排名原则上按贡献大小先后排名。

第五条：合作项目各方应严格遵守共同签订的合作协议书，除因不可抗拒的客观原因，不得中途撤消或中止合同。在合同期内，某方要求修改合同条款，须各方协商，确认后方能生效。

第六条：如合作方因各种原因无法履行合同条款时，由项目负责人应及时报项目主管部门。

第七条：经批准中途退出合作的一方，应视具体情况将所余经费退回项目主持方，已用经费由项目负责人提出审查报告，报项目主管部门审批。

第八条：合作一方在工作进行中有问题不及时报告，影响项目整体的年度进展者，项目负责人应及时通报项目主管部门。如影响项目整体无法完成者，将承担相关责任，并报主管部门。

第九条：本协议自双方签字盖章之日起生效，至项目完成之日起终止；若合作申请未获资助，本协议自动废止。



甲方单位(盖章):

项目负责人(签字):

[Handwritten signature of the first party's project manager]

2022年8月16日



乙方单位(盖章):

项目负责人(签字):

[Handwritten signature of the second party's project manager]

2022年8月16日

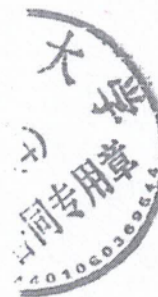


丙方单位(盖章):

项目负责人(签字):

[Handwritten signature of the third party's project manager]

2022年8月16日



合同编号：

建设廉江市湛江鸡研究院项目 合作协议书

项目名称：湛江鸡 1 号配套系的选育与开发利用

甲 方：广东名龙农牧有限公司

乙 方：华南农业大学

签订时间：2023 年 2 月

签订地点：广东名龙农牧有限公司

研发期限：2023 年 3 月-2026 年 12 月



中华人民共和国科学技术部印制

填 写 说 明

一、本合同为中华人民共和国科学技术部印制的技术开发（合作）合同示范文本，各技术合同认定登记机构可推介技术合同当事人参照使用。

二、本合同书适用于当事人各方就共同进行新技术、新产品、新工艺或者新材料及其系统的研究开发所订立的技术开发合同。

三、本合同书未尽事项，可由当事人附页另行约定，并可作为本合同的组成部分。

四、当事人使用本合同书时约定无需填写的条款，应在该条款处注明“无”等字样。

甲 方： 广东名龙农牧有限公司
住所地： 廉江市石颈镇白垵村委会细径村
法定代表人： 徐强年
项目联系人： 徐强年
联系方式： 13802344498
通讯地址： 廉江市石颈镇白垵村委会细径村
电话： _____
电子信箱： _____

乙 方： 华南农业大学
住所地： 广州市天河区五山路 483 号华南农业大学
法定代表人： 刘雅红
项目联系人： 谢青梅
联系方式： 15800003007
通讯地址： 广州市天河区五山路华南农业大学动物科学学院
电话： 020-85281805 传真： 020-85280071
电子信箱： qmx@scau.edu.cn

为了完成湛江市廉江市湛江鸡产业园“湛江鸡研究院”项目，经广东名龙农牧有限公司（简称甲方）招标，华南农业大学（简称乙方）为项目中标单位，经过平等协商，在真实、充分地表达各自意愿的基础上，根据《中华人民共和国民法典》的规定，达成如下协议，并由甲乙双方共同恪守。

第一条 本合同甲方、乙方承担工作分别如下：

甲方：

负责按期支付资金，提供场地以及配合乙方开展育种工作。

乙方：

一、技术目标：湛江鸡 1 号配套系（具体名字待定）的选育与开发利用。

二、技术内容：

1、省级财政资金项目：（1）湛江鸡 1 号配套系的选育及提纯；（2）配套系育种，培育符合粤西地区市场需求的商业化品种；（3）湛江鸡配套系重要畜禽资源的收集鉴定，重要优势基因的挖掘等；

2、当地财政资金项目：（1）建设湛江鸡原种保护基地，开展湛江鸡品种资源的收集、保存、评价与利用，育种技术研发；（2）联合申报产学研项目、产业园、产学研基地等。

三、技术开发方法的路线设定：

（1）配套系育种。

①建立基础群，依据测定指标组建家禽系谱；

②测定后备鸡的体重、体尺、繁殖等性能指标；

③配合力测定，筛选最符合粤西地区市场需求的最佳组合；

（2）湛江鸡 1 号配套系重要畜禽资源的收集与鉴定。

（3）组织材料进行湛江鸡 1 号配套系审定，获得国家畜禽遗传资源委员会审定的湛江鸡 1 号配套系（具体名字待定）证书。

(4) 建设湛江鸡原种保护基地，开展湛江鸡品种资源的收集、保存、评价与利用，育种技术研发；育种技术研究。研究湛江鸡 1 号配套系屠宰性能、生长性能、外观性状等育种技术，开发符合粤西地区市场需求的商业化品种。

(5) 联合申报产学研项目、产业园、产学研基地等。

①技术人员的培训、人才培养等工作，定期到甲方对育种工作人员开展培训或讲座；

②联合申报省、市地级科研项目、产业园及产学研基地等；联合申请项目时，根据项目总资金、内容分工以及参与单位等情况另行协商经费分配比例。

4. 研究开发期限：2023 年 3 月-2026 年 12 月。

5. 研究开发地点：应包括广东名龙农牧有限公司、华南农业大学。

第二条 为确保本合同的全面履行，甲乙双方确定，采取以下方式对研究开发工作进行组织管理和协调：双方协商。

资料和条件按以下方式处理：双方存档保留。

第三条 甲乙双方确定，按如下方式提供或支付本合同项目的研发资金：

1、甲方支付项目研发资金（中标金额）：人民币柒佰万圆整。

2、提供或支付方式：分期支付。

(1) 合同生效 30 天内，甲方支付给乙方预付项目总金额 40% 的 280 万元（贰佰捌拾万元整）到乙方指定账户，乙方收款后按甲方需求提供湛江鸡 1 号配套系 6000 套原种培育素材（甲方提前 3 个月报计划给乙方）。

(2) 2023 年 12 月左右，中期评估时乙方帮助甲方完成下列工作：

A、围绕湛江鸡 1 号品种选育与繁殖技术，培育出生产性能高、体型外貌好，抗病强、肉质优良，完成每一世代的数据造册。

B、建设湛江鸡 1 号配套系原种保护基地，开展湛江鸡 1 号配套系品种育种资源收集保存，乙方帮助甲方完成育种资料收集及整理以及品种更新。

C、完成上述 A 和 B 工作后，经甲乙双方确认后甲方支付项目总金额 30% 的 210 万元（贰佰壹拾万元整）到乙方指定账户。

(3) 2026 年 12 月前乙方提供由经国家畜禽遗传资源委员会审定的湛江鸡 1 号配套系证书给甲方，培育单位应包括甲方与乙方。甲方收到证书后支付总金额 30% 的 210 万元（贰佰壹拾万元整）到乙方指定账户。

3、研发资金汇转账户：

乙方开户银行名称、地址和帐号为：

开户银行： 广州工行五山支行

名 称： 华南农业大学

帐 号： 3602002609000310520

乙方如需变更指定收款帐户，应提前以书面形式通知甲方，经双方确认同意后方可使用。

第四条 提供技术的合作方应保证其所提供技术不侵犯任何第三人的合法权益。如发生第三人指控该项技术侵权的，提供技术方应当 独立承担相应责任。

第五条 本合同的变更必须由合作双方协商一致，并以书面形式确定。但有下列情形之一的，合作一方可以向合作的另一方提出变更合同权利与义务的请求，合作的另一方应当在 10 日内予以答复；逾期未予答复的，视为同意：

1、 发生了使合同基础发生变化的客观情况；

2、主要人员变动、国家政策变动等使原合同的继续履行显失公平或合同无法履行；

3、法律法规规定的合同可以变更的情形出现；

4、考虑双方合作过程中可能发生的变更，为维护双方利益，应留下空间。

第六条 未经合作方同意，合作的另一方不得将本合同项目部分或全部研究开发工作转让给第三人承担。

第七条 甲乙双方确定因履行本合同应遵守的保密义务如下：

甲方：

1.保密内容（包括技术信息和经营信息）：①涉及本合同的种鸡育种资源素材及相关信息、技术文件、资料、经营信息和商业秘密；②未经合作方同意不得对外转让或泄露。

2. 涉密人员范围：①直接或间接涉及本合同技术的有关人员；②涉及与该技术成果的相关人员。

3. 保密期限：在取得乙方同意后才能公布相应数据材料等。

4. 泄密责任：依照法律法规承担责任。

乙方：

1.保密内容（包括技术信息和经营信息）：①涉及本合同的种鸡育种资源素材及相关信息、技术文件、资料、经营信息和商业秘密；②未经合作方同意不得对外转让或泄露。

2. 涉密人员范围：①直接或间接涉及本合同技术的有关人员；②涉及与该技术成果的相关人员。

3. 保密期限：在取得甲方同意后才能公布相应数据材料等。

4. 泄密责任：依照法律法规承担责任。

第八条：乙方按以下方式交付研究开发成果给甲方：

1. 研究开发成果交付的形式及数量：现场验收，湛江鸡 1 号配套系证书。

2. 研究开发成果湛江鸡 1 号配套系交付的时间及地点：2026 年 12 月底前，广东名龙农牧有限公司湛江鸡品种提升培育基地。

3. 2023 年按第三条协议规定，乙方提供湛江鸡 1 号配套系 6000 套育种素材给甲方。

4. 2026 年 12 月底前乙方提供国家畜禽遗传资源委员会审定的湛江鸡 1 号配套系证书给甲方，培育单位应包括甲方和乙方。

5. 2024 年 12 月前乙方帮助甲方开展湛江鸡 1 号配套系品种育种资源收集保存，帮助甲方完成品种更新。

第九条：甲乙双方确定，按以下标准及方法对合作一方完成的研究开发工作成果进行验收：

甲方：承诺并保证，严格履行本合同约定的全部 responsibilities 和义务，为乙方提供合同约定的研发资金。

乙方：承诺并保证，严格履行本合同约定的全部 responsibilities 和义务，开展湛江鸡 1 号配套系育种，测定湛江鸡 1 号配套系的生产性能数据，负责组织材料进行湛江鸡 1 号配套系审定，获得国家畜禽遗传资源委员会审定的湛江鸡 1 号配套系证书，培育符合粤西地区市场需求的商业化品种。

第十条：甲乙双方确定，按以下标准及方法对本合同最终完成的研究开发工作成果进行验收：(1) 测定湛江鸡 1 号配套系的生产

性能并进行品种审定，申请配套系审定的单位为乙方，甲方为培育单位之一。获得国家畜禽遗传资源委员会审定的湛江鸡 1 号配套系证书，培育单位应包括甲方和乙方；（2）乙方为甲方培育出适合粤西地区市场需求的商业化配套系 1 个，并承诺提供甲方种鸡苗 6000 套（具体提供时间由甲方提前 3 个月报给乙方）；（3）开展湛江鸡 1 号配套系品种育种资源收集保存，帮助甲方完成品种更新。

第十一条：甲乙双方分别独立完成并与履行本合同有关的阶段性技术成果的研究开发人员，享有在有关此阶段性技术成果文件上写明技术成果完成者的权利和取得有关荣誉证书、奖励的权利。

甲乙双方应以协商方式确定最终研究成果的完成人员名单。此完成人员享有在有关最终技术成果文件上写明技术成果完成者的权利和取得有关荣誉证书、奖励的权利。

共同向国家畜禽遗传资源委员会申报湛江鸡 1 号配套系证书，培育单位应包括广东名龙农牧有限公司和华南农业大学。湛江鸡 1 号配套系育种素材归甲方拥有。

第十二条：任何一方违反本合同约定义务，造成合作另一方研究开发工作停滞、延误或失败的，应当按以下约定承担违约责任：

甲方：

1. 违反本合同约定，应当 每日按照年度经费额*0.5‰向乙方支付违约金（支付违约金或损失赔偿额的计算方法）。

乙方：

1. 违反本合同约定，应当 每日按照年度产学研经费额*0.5‰

向甲方支付违约金（支付违约金或损失赔偿额的计算方法）。

第十三条：为有效履行本合同，合作双方确定，在本合同有效期内，甲方指定徐强年为甲方项目联系人，乙方指定谢青梅为乙方项目联系人。项目联系人承担以下责任：

- 1、按照约定的联系时间、联系方式和联系地点完成交办的相关工作；
- 2、防止因人事变动而使合同难以履行或无法履行；
- 3、保证按约定和法律法规，履行本合同。

合作一方变更项目联系人的，应当及时并以书面形式通知另一方。未及时通知并影响本合同履行或造成损失的，应承担相应的责任。

第十四条：合同任何一方违约导致合同目的无法实现的，违约方应向守约方承担赔偿责任。

第十五条：合作双方因履行本合同而发生的争议，应协商、调解解决。协商、调解不成的，确定按以下第2种方式处理：

1. 提交仲裁委员会仲裁；
2. 依法向合同签订地人民法院起诉。

第十六条：合作双方约定本合同其他相关事项为：本协议未尽事宜，甲、乙双方应本着公平、合理、诚信的态度协商解决，协商不成，可通过诉讼解决。

第十七条：本合同一式肆份，具有同等法律效力。

第十八条：本合同经合作双方签字盖章后生效。

甲方：_____ (盖章)

法定代表人 / 委托代理人：_____ (签名)

2023年 8 月 18 日

乙方：_____ (盖章)

法定代表人 / 委托代理人：_____ (签名)

2023年 8 月 18 日

印花税票粘贴处:

(以下由技术合同登记机构填写)

合同登记编号:

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

1. 申请登记人: _____

2. 登记材料: (1) _____

(2) _____

(3) _____

3. 合同类型: _____

4. 合同交易额: _____

5. 技术交易额: _____

技术合同登记机构 (印章)

经办人:

年 月 日

检索证明

根据委托人提供的论文材料，委托人华南农业大学动物科学学院 陈伟国 6 篇论文收录情况如下表。

序号	论文名称	发表刊物及发表的年月卷期/页码等	作者排名	论文等级	作者文中单位	收录情况	影响因子	中科院大类分区
1	Deciphering Immune Modulation in Chickens Co-Infected with ALV-J and CIAV: A Transcriptomic Approach	MICROORGANISMS 出版年: 2024 出版日期: DEC 卷期: 12 12 页码: - 文献号: 2453 文献类型: Article	通讯作者	A 类	华南农业大学 动物科学学院	SCI	IF2-year=4.2 IF5-year=4.6 (2024)	生物学 2 区 Top 期刊: 否 (2025)
2	A Comprehensive Analysis of the ceRNA Network and Hub Genes in Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Superinfection	ANIMALS 出版年: 2024 出版日期: DEC 卷期: 14 23 页码: - 文献号: 3449 文献类型: Article	通讯作者	A 类	华南农业大学 动物科学学院	SCI	IF2-year=2.7 IF5-year=3.2 (2024)	农林科学 2 区 Top 期刊: 否 (2025)
3	Synergy of Subgroup J Avian Leukosis Virus and Chicken Infectious Anemia Virus Enhances the Pathogenicity in Chickens	MICROORGANISMS 出版年: 2024 出版日期: APR 卷期: 12 4 页码: - 文献号: 740 文献类型: Article	共同通讯作者 (倒数第一)	A 类	华南农业大学 动物科学学院	SCI	IF2-year=4.2 IF5-year=4.6 (2024)	生物学 2 区 Top 期刊: 否 (2025)

4	Synergistic Immunosuppression of Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Is Responsible for Enhanced Pathogenicity	VIRUSES-BASEL 出版年: 2022 出版日期: OCT 卷期: 14 10 页码: - 文献号: 2312 文献类型: Article	第一作者	B 类	华南农业大学 动物科学学院	SCI	IF2-year=4.7 IF5-year=4.8 (2022)	医学 3 区 Top 期刊: 否 (2022)
5	Semen extracellular vesicles mediate vertical transmission of subgroup J avian leukosis virus	VIROLOGICA SINICA 出版年: 2022 出版日期: APR 卷期: 37 2 页码: 284-294 文献类型: Article	并列第一作者	A 类	华南农业大学 动物科学学院	SCI	IF2-year=5.5 IF5-year=4.9 (2022)	医学 2 区 Top 期刊: 否 (2022)
6	tva 受体基因起始密码子突变对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒的影响	华南农业大学学报 出版年: 2023 卷期: 页码: - 文献号: 文献类型:	第一作者	B 类	华南农业大学 动物科学学院	北大核心	无	无

说明: 论文等级和中科院大类分区按《华南农业大学学术论文评价方案(试行)》划分。

报告免责声明: 如未盖章, 报告无效



Article

Synergistic Immunosuppression of Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Is Responsible for Enhanced Pathogenicity

Weiguo Chen ^{1,2,3,4,†}, Sheng Chen ^{1,2,3,4,†}, Yu Nie ^{1,2,3}, Wenxue Li ^{1,2,3}, Hongxin Li ^{1,2,3}, Xinheng Zhang ^{1,2,3}, Feng Chen ^{3,4} and Qingmei Xie ^{1,2,3,4,*}

¹ Heyuan Branch, Guangdong Provincial Laboratory of Lingnan Modern Agricultural Science and Technology & Guangdong Provincial Key Laboratory of Agro-Animal Genomics and Molecular Breeding, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

² Guangdong Engineering Research Center for Vector Vaccine of Animal Virus, Guangzhou 510642, China

³ South China Collaborative Innovation Center for Poultry Disease Control and Product Safety, Guangzhou 510642, China

⁴ Key Laboratory of Animal Health Aquaculture and Environmental Control, Guangzhou 510642, China

* Correspondence: qmx@scau.edu.cn

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: In recent years, superinfections of avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) and infectious bursal disease virus (IBDV) have been frequently observed in nature, which has led to the increasing virulence in infected chickens. However, the reason for the enhanced pathogenicity has remained unclear. In this study, we demonstrated an effective candidate model for studying the outcome of superinfections with ALV-J and IBDV in cells and specific-pathogen-free (SPF) chicks. Through in vitro experiments, we found that ALV-J and IBDV can establish the superinfection models and synergistically promote the expression of IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ in DF-1 and CEF cells. In vivo, the weight loss, survival rate, and histopathological observations showed that more severe pathogenicity was present in the superinfected chickens. In addition, we found that superinfections of ALV-J and IBDV synergistically increased the viral replication of the two viruses and inflammatory mediator secretions in vitro and in vivo. Moreover, by measuring the immune organ indexes and blood proportions of CD3⁺, CD4⁺, and CD8 α ⁺ cells, our results showed that the more severe instances of immunosuppression were observed in the superinfected chickens. In the present study, we concluded that the more severe immunosuppression induced by the synergistic viral replication of ALV-J and IBDV is responsible for the enhanced pathogenicity.

Keywords: Avian Leukosis Virus Subgroup J (ALV-J); Infectious Bursal Disease Virus (IBDV); superinfection; pathogenicity; immunosuppression; lymphocyte subsets



Citation: Chen, W.; Chen, S.; Nie, Y.; Li, W.; Li, H.; Zhang, X.; Chen, F.; Xie, Q. Synergistic Immunosuppression of Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Is Responsible for Enhanced Pathogenicity. *Viruses* **2022**, *14*, 2312. <https://doi.org/10.3390/v14102312>

Academic Editors: Yulong Gao and Suyan Wang

Received: 10 September 2022

Accepted: 13 October 2022

Published: 21 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Complex infections, which occur when at least two different pathogens establish an infection, have broad implications for the evolution of virulence, genetic diversity, epidemiology, and control strategies. Coinfections and superinfections refer to how complex infections develop before or after the development of an adaptive immune response [1,2]. In some studies, however, this semantic point causes confusion and sometimes complicates comparisons between studies [3]. The outcome of any coinfection or superinfection is complicated and affected by the interactions between the infectious agents, the characteristics of the host, the microorganism community, and the triggered immune response [4]. Thus, different scenarios can be observed, including the first pathogen promoting a more virulent infection of the second, reducing its severity, or completely suppressing it [5]. Conversely, the second pathogen may also directly or indirectly influence the first. It is this complexity that makes the common reductionist approach of host–pathogen interactions unsuitable

for the study of single infections [6]. On a special note, when the first pathogen can cause immunosuppression in the host, the second one usually causes stronger progress of the disease. For instance, people with human immunodeficiency virus (HIV) superinfections have a lower CD4⁺ cell count, which leads to faster disease progression [7,8]. There are, however, a number of fundamental knowledge gaps to be filled, including how virulence changes in hosts, especially in superinfection.

Superinfection is not only an important infection model in medicine but also a serious threat to the development of the poultry industry. Several studies have demonstrated that chickens are often infected by several pathogens simultaneously, which usually cause more severe clinical symptoms and mortality [2,9–11]. For example, chicks dually infected with chicken anemia virus (CAV) and reovirus demonstrated the synergism of lower weight gain and more severe tissue damage [12]. Marek's disease virus (MDV) and reticuloendotheliosis virus (REV) superinfections significantly increased disease severity and reduced vaccine efficacy [11]. These results indicate that the effect of a superinfection is greater than the mere sum of its parts. Among them, ALV-J in particular is more likely to induce complex infections due to its viral characteristics.

ALV-J can cause neoplastic disease and immunosuppression in infected chickens, resulting in huge economic losses for the poultry industry worldwide. A remarkable property of ALV-J is its vertical transmission, which is responsible for persistent and complex infections [13,14]. For this reason, one-day-old chickens are often infected with ALV-J, and it makes these flocks more susceptible to secondary viruses, a process known as superinfection, which causes immunosuppression, growth retardation, and tissue tumors in the infected chickens [15,16]. Several reports have reported that ALV-J superinfections with REV or MDV caused more severe growth arrest and immunosuppression than single infections [2,10]. IBDV, like ALV-J, leads to severe immunosuppression in young chickens. At 3–6 weeks of age, chickens are most susceptible to IBDV due to this period's coincidence with the stage of Bursa Fabricii development. Therefore, ALV-J and IBDV are often cause superinfections in poultry production [17]. However, the cellular and animal models of ALV-J and IBDV superinfections have not been established. In addition, the changes in virulence and the degree of immunosuppression of superinfection are still unclear.

In this research, we present a systematic and in-depth analysis of the pathogenicity and immunosuppression activity of superinfections with ALV-J and IBDV *in vitro* and *in vivo*. The purpose of the present work was to establish superinfection models and examine the effects of superinfections with ALV-J and IBDV.

2. Materials and Methods

2.1. Viruses, Cells, and Animals

ALV-J strain SCAU-HN06 was a generous gift from Professor Liao of South China Agricultural University. IBDV strain 801 (cell-adapted strain) was stored in our laboratory. Virus titers were calculated using Reed–Muench formula to calculate 50% tissue-cultural-infective dose (TCID₅₀)/mL. DF-1 cells were stored in our laboratory and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Waltham, MA, USA), and maintained at 37 °C and 5% CO₂. Chicken embryo fibroblasts (CEF) cells were prepared as previously described [18].

2.2. Cell Experimental Design

DF-1 and CEF cells were divided into 4 groups in 6-well dishes, which included experimental treatment groups ALV-J, IBDV, ALV-J+IBDV, and control. In ALV-J and ALV-J+IBDV groups, cells were infected with ALV-J at a multiplicity of infection (MOI) of 1. After 24 h post-ALV-J infection, cells were infected with IBDV at MOI of 0.1. The cells from control group were treated with equal amount PBS. Samples were collected at 12, 24, 36, and 48 h post-IBDV infection. To determine the viral proliferation, total cell samples were collected for RT-qPCR and protein samples for Western Blot detection. Cell supernatants

were collected to measure the concentrations of cytokines by ELISA. Specific groups and treatments are shown in Figure 1A.

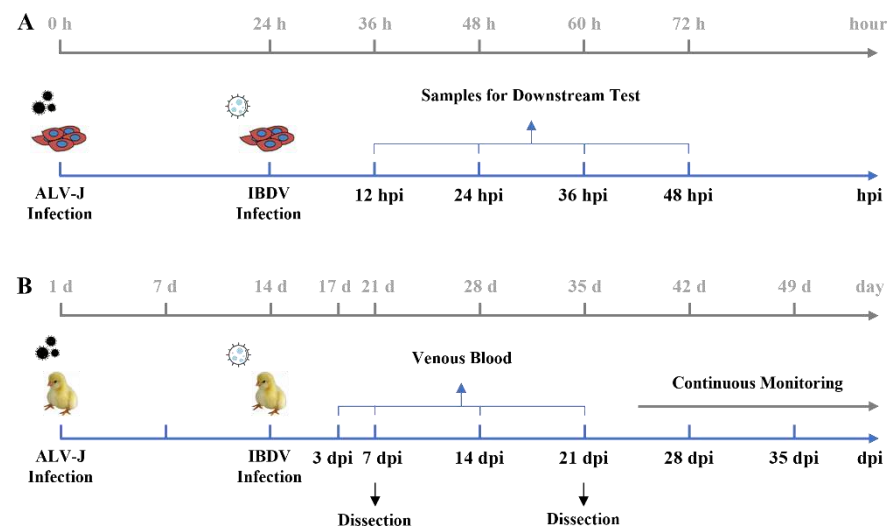


Figure 1. Time course diagram. (A) Time course of superinfection of ALV-J and IBDV in DF-1 and CEF cells. The cultured monolayer cells were infected with ALV-J firstly and IBDV 24 h later. After 12, 24, 36, and 48 h of IBDV infection, cell samples were collected for downstream testing. All the experiments were performed independently at least three times. Hpi—hours post-IBDV infection. (B) Time course of superinfection of ALV-J and IBDV in SPF chickens. The SPF chickens were infected with ALV-J firstly and IBDV 14 days later. After 3, 7, 14, and 21 days of IBDV infection, venous blood samples of 6 chickens in each group were collected to detect viral load. At 7 and 21 days of IBDV infection, samples of the immune organs including Bursa Fabricii and spleen were excised and weighed for 6 chickens in each group. Weight loss and mortality were continuously monitored throughout the experimental period. Dpi—days post-IBDV infection.

2.3. ELISA for Cytokines

A 5 mL supernatant was collected from samples at 12, 24, 36, and 48 hpi and then centrifuged at 1000 rpm for 20 min. To measure the expression levels of IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ in the sample, ELISA tests were carried out using commercial kits (CUSABIO, Houston, TX, USA) according to the manufacturer's instructions.

2.4. Quantitative Reverse Transcription-PCR

Quantitative reverse transcription-PCR (RT-qPCR) was used to detect viral loads and expression levels of cytokine genes. The total RNA of samples was extracted by Trizol Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA), while qPCR experiments were performed using Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix (Vazyme, Nanjing, China) according to the manufacture's instruction. Results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The primer sequences used for amplifications are listed in Table 1.

Table 1. Primer used for RT-qPCR.

Primer	Sequence (5'-3')
Env-F	TGCGTGCGTGGTTATTATTTTC
Env-R	AATGGTGAGGTCGCTGACTGT
VP2-F	ATGACAAACCTGCAAGATCA
VP2-R	ATCGAACTTGTAGTTCCCAT
IL-6-F	AATCCCTCCTCGCCTTTCTG
IL-6-R	GCCCTCACGGTCTTCTCCAT

Table 1. Cont.

Primer	Sequence (5'-3')
IL-10-F	GCTCTGAGCACAGTCGTTTG
IL-10-R	CAGATGGGGACGTGGTTACG
IFN- α -F	CAACGACACCATCCTGGACA
IFN- α -R	ATCCGGTTGAGGAGGCTTTG
IFN- γ -F	GAGCCAGATTGTTTCGATGTAAGT
IFN- γ -R	CATCAGGAAGGTTGTTTTTCAGAG
GAPDH-F	GAACATCATCCCAGCGTCCA
GAPDH-R	CGGCAGGTCAGGTCAACAAC

2.5. Immunofluorescence and Confocal Microscopy

DF-1 and CEF cell monolayers were fixed using 4% paraformaldehyde (Python Bio, Guangzhou, China) for 15 min at room temperature. Then, cells were permeabilized with 0.1% Triton-X 100 (Python Bio, Guangzhou, China) for 15 min at room temperature. Afterwards, cells were blocked with 5% skimmed milk powder for 30 min at room temperature. Next, cells were incubated with ALV-J Env antibody (JE9) (generous gift from Professor Qin of Yangzhou University) and IBDV-VP2 antibody (stored in our lab) for 1 h and then fluorochrome-conjugated secondary antibodies (Alexa fluor 488 for ALV-J Env and Alexa fluor 594 for IBDV VP2) (Abcam, Cambridge, UK) for 1 h in the dark. For nuclear staining, cells were incubated with DAPI (Beyotime, Shanghai, China). The fluorescence signals were visualized with a TCS SP8 confocal fluorescence microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

2.6. Animal Experimental Design

A total of 220 one-day-old SPF chicks were randomly divided into 4 groups, which included experimental treatment groups ALV-J, IBDV, and ALV-J + IBDV, and control. At 1 day of age, chicks in the ALV-J and IBDV+ALV-J groups were inoculated via intra-abdominal injection with ALV-J at 100 μ L $10^{3.7}$ TCID₅₀. At 14 days of age, chicks in the IBDV and IBDV + ALV-J groups were inoculated intra-abdominally with IBDV at 100 μ L $10^{3.6}$ ELD₅₀. The chicks from control group were inoculated with 100 μ L PBS at 1 day of age and 14 days of age. Weight loss and mortality were recorded throughout the experimental period. At 3, 7, 14, and 21 days post-infection (dpi), venous blood samples were collected from three chickens of each group and virus titers were detected by RT-qPCR. Considering the accidental death caused by inoculation in abdomen, chicks dead in the first 3 days were subtracted from total number of birds. The animal experiment was repeated to test the consistency and the reliability between two independent experiments. Specific groups and treatments are shown in Figure 1B.

2.7. Index of Immune Organ

At 7 and 21 dpi, samples of the immune organs including Bursa Fabricii and spleen from 6 chickens in each group were excised and weighed. A measurement of the immune organs' indices can be obtained by comparing the weight of the immune organ to the weight of the body.

2.8. Histopathological and Examination

At 21 dpi, the immune organs (including spleen, Bursa Fabricii, and thymus) and other organs (including heart, liver, and kidneys) were stained by standard hematoxylin-eosin procedure for histological observation under light microscope. After collecting the tissues and fixing them in 10% formalin for 120 h, paraffin sections with a thickness of 5 μ m were cut. Hematoxylin and eosin staining was performed after deparaffinization and hydration of slides.

2.9. Fluorescent Cell Sorting Analysis of Peripheral Blood Lymphocyte Subpopulations

At 21 dpi, lymphocytes from three chickens from each group were isolated using lymphocyte separation kit (TBD science, Tianjin, China) according to the manufacturer's protocol. A total of 10^6 lymphocytes were incubated with 3 μ L of PE-CD3 antibody (1:100) (MA5-28697, Invitrogen, USA), 2 μ L of FITC-CD4 antibody (1:100) (MA5-28685, Invitrogen, USA), and 1 μ L of APC-CD8 antibody (1:100) (MA5-28718, Invitrogen, USA). After mixing, the samples were incubated in the dark for 30 min at room temperature. A total of 1 mL of PBS was added to each tube, and the cells were collected by centrifugation at $400 \times g$ for 5 min. Then, the supernatant was discarded, and the cell pellet was washed twice with PBS. A total of 300 μ L of PBS was added to each tube for flow analysis. The data were analyzed by flow cytometry using a fluorescence-activated-cell-sorting (FACS) BD AccuriC6 cell sorter (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, NJ, USA).

2.10. Statistical Analysis

The statistical analysis was conducted using GraphPad Prism version 8.0 (San Diego, CA, USA). Statistically significant differences between multiple experiment groups were determined using one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. Different lowercase letters indicate significant differences between different groups. Comparisons of the viral-titer and viral-load data between two groups were performed using Student's *t*-test. Survival curves between two groups were compared using a log-rank test (Mantel-Cox). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. ALV-J and IBDV Synergistically Increase Viral Replication In Vitro

The DF-1 cell line is widely accepted as a common cell line used for avian virus studies and both ALV-J and IBDV can infect DF-1 alone. CEF, as primary culture cells, can better reflect the interaction between the pathogen and host. To investigate the synergistic effects of ALV-J and IBDV, monolayer CEF and DF-1 cells were inoculated with PBS, ALV-J, IBDV, and both viruses (ALV-J + IBDV). The time course of the superinfection is shown in Figure 1A. Firstly, before measuring the viral replication, we used laser-confocal microscopy to determine whether the two viruses could cause a superinfection. As shown in Figure 2A, ALV-J and IBDV showed obvious colocalization in both DF-1 and CEF cells, indicating the successful formation of a superinfection. Since the level of infection varies, the accumulation level of ALV-J and IBDV was significantly higher in the superinfection group than that in the single-virus-infected group at 12 hpi to 36 hpi. However, after 48 hpi, the viral titers in the IBDV-infected group and the superinfection group suddenly decreased to a very low level due to accelerated cell death (Figure 2B–E). We next evaluated the protein level of the two viruses via Western blotting at 36 hpi (Figure 2F,G). The results showed that both the ALV-J and IBDV protein expressions were significantly increased in the superinfected group at 36 hpi, whether in DF-1 or CEF cells (Figure 2I,J). In addition, the immunofluorescence assay was also consistent with the above results (Figure 2H). Taken together, the superinfection of ALV-J and IBDV synergistically increased viral replication in vitro.

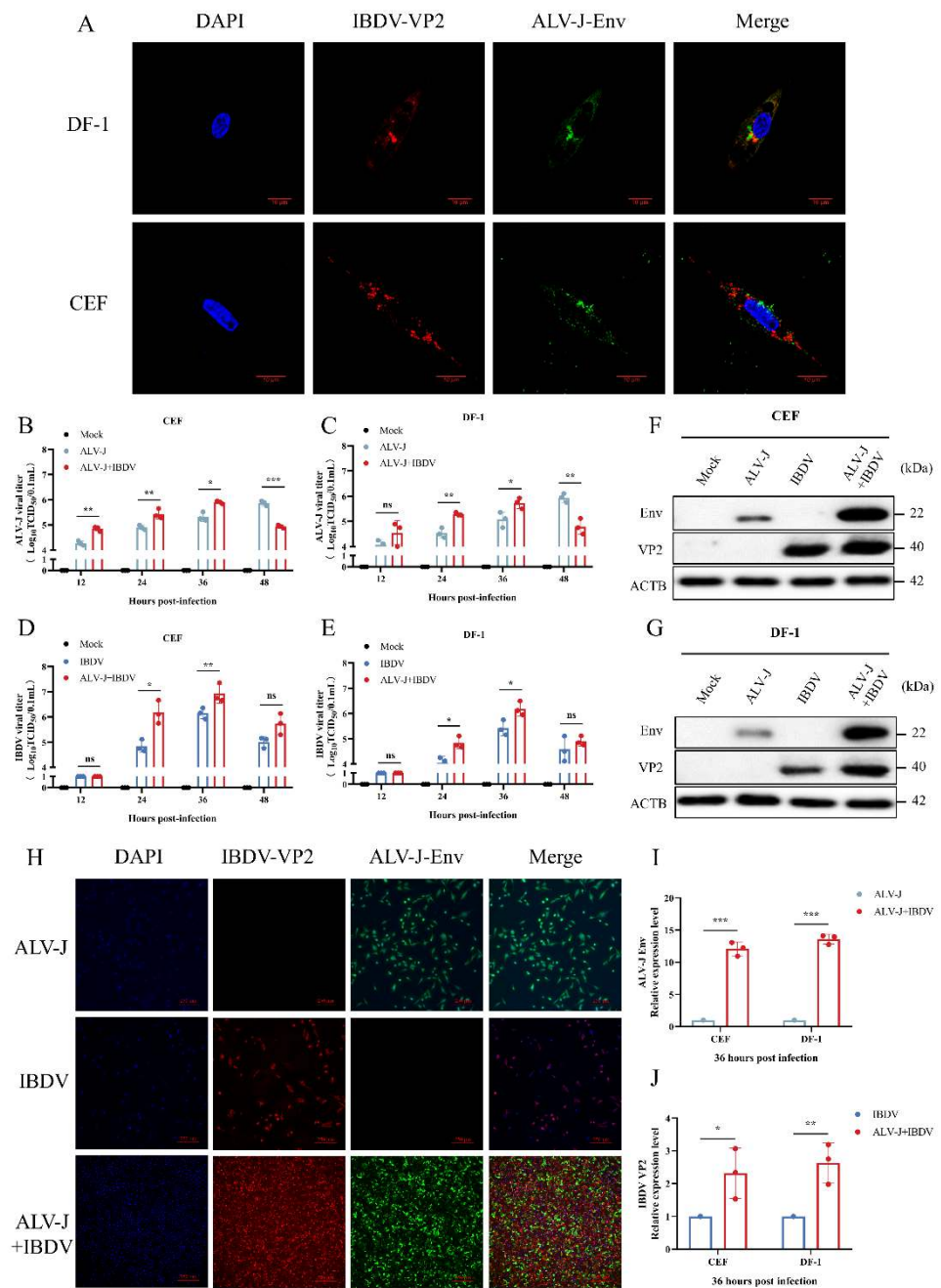


Figure 2. ALV-J and IBDV synergistically increase viral replication in vitro. (A) Protein expression and localization of ALV-J and IBDV examined in DF-1 and CEF cells by confocal laser microscope. Alexa fluor 488 (green for ALV-J Env) and Alexa fluor 594 (red for IBDV VP2) were used as the secondary antibodies in the assay. DAPI (blue) was used to stain the nuclear DNA. Scale bar: 10 μ m. (B,C) ALV-J virus titers in CEF and DF-1 cells were determined from 12 hpi to 48 hpi by Reed–Muench methods, respectively. Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by One-way ANOVA test. (D,E) IBDV virus titers in CEF and DF-1 cells were determined from 12 hpi to 48 hpi by Reed–Muench methods, respectively. Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by One-way ANOVA test. (F,G) Protein expression levels of ALV-J env and IBDV VP2 in CEF and DF-1 cells, respectively, were examined by Western Blot at 36 hpi. (H) The protein expression of ALV-J env and IBDV VP2 were detected by immunofluorescence (magnification, $\times 10$). Scale bar: 250 μ m. (I) Densitometric

ALV-J/ACTB ratios in CEF and DF-1 cells at 36 hpi are shown. (J) Densitometric IBDV/ACTB ratios in CEF and DF-1 cells at 36 hpi are shown. Data are expressed as mean \pm SE and analyzed by Student's *t*-test. These experiments were performed independently at least three times with similar results. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, no significant.

3.2. ALV-J and IBDV Synergistically Induce Inflammatory Mediator Secretion In Vitro

The balance of inflammatory factors is also an important index to evaluate the level of cellular immunity. To further understand whether a superinfection of ALV-J and IBDV could synergistically induce inflammatory mediator secretion in vitro, we tested the dynamic changes of several inflammatory mediators using ELISA. The results showed that the superinfected cells were found to have significantly higher levels of IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ compared to the single-virus-infected group or the controls (Figure 3). These results showed that the superinfection of ALV-J and IBDV indeed induces inflammatory mediator secretion in vitro.

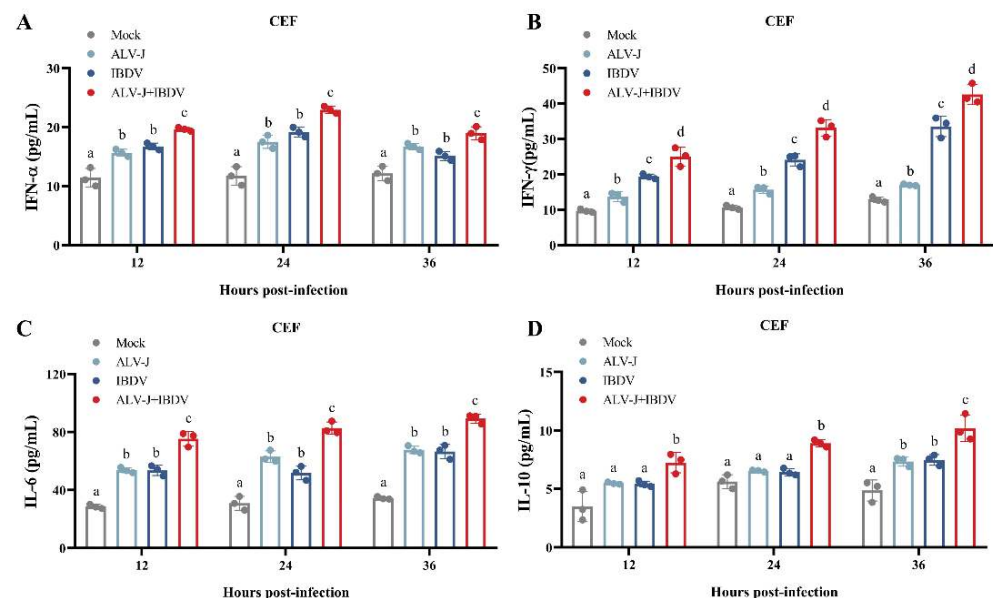


Figure 3. ALV-J and IBDV synergistically induce inflammatory mediator secretion in vitro. The secretion activities of inflammatory mediators IFN- α (A), IFN- γ (B), IL-6 (C), and IL-10 (D) were determined by ELISA in CEF cells from 12 hpi to 36 hpi. These experiments were performed independently at least three times with similar results. Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by One-way ANOVA test. Different lowercase letters indicate significant differences between different groups.

3.3. ALV-J and IBDV Synergistically Enhance Pathogenicity in SPF Chickens

To further determine the synergistic effects of a superinfection of ALV-J and IBDV in vivo, we performed animal experiments on the SPF chickens as documented in Figure 1B. No chickens showed clinical symptoms and mortality in the control group. The survival period of the chickens in the superinfection group of ALV-J and IBDV was generally shorter than that of the chickens in the ALV-J or IBDV singly infected groups, as shown by the survival curves in Figure 4A. The overall mortality rate of the ALV-J- and IBDV-infected chickens was 16% and 44%, respectively, while that of the superinfection group was 72%. By continuously measuring the weight gain of chickens for 49 days, we found that chickens in the superinfection group gained weight more slowly, weighing only 253.57 ± 15.9 g at 49 days, much less than the 463.48 ± 22.56 g of the control group. The body weights of the ALV-J- or IBDV-infected groups at 49 days were 328.29 ± 26.11 g and 301.12 ± 15.59 g, respectively (Figure 4B). Our histopathological results have also confirmed an enhanced pathogenicity. In the superinfection group, a more severe inflammatory cell infiltration was

observed in the heart, liver, kidneys, and Bursa Fabricii; additionally, the heterophilic granulocyte levels had increased and connective tissue hyperplasia was observed (Figure 4C). These results showed that the severity of the pathogenicity, including weight loss and mortality, caused by the superinfection was more serious than that caused by ALV-J or IBDV alone.

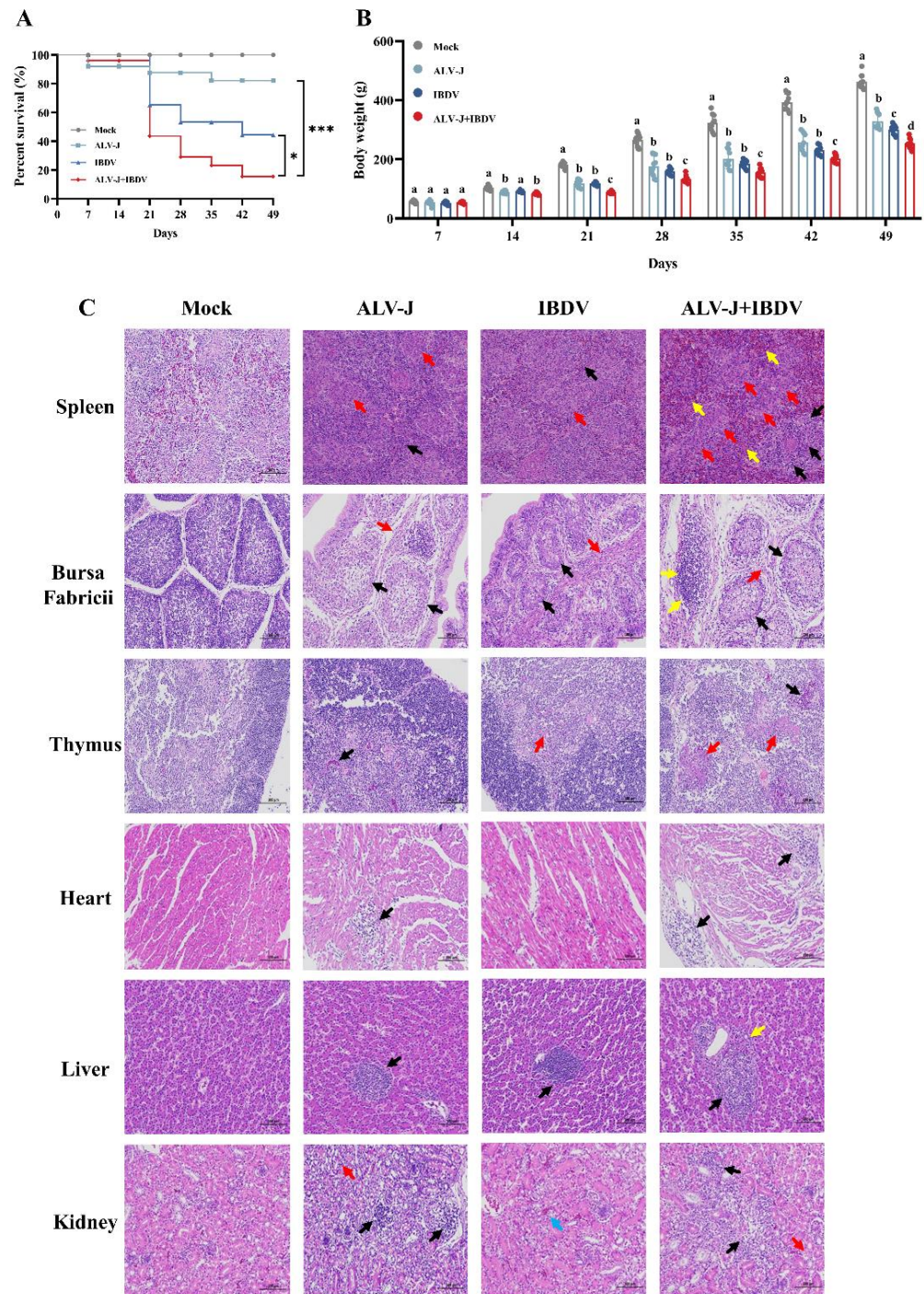


Figure 4. ALV-J and IBDV synergistically enhance pathogenicity in SPF chickens. **(A)** Survival curves for the Mock, ALV-J, IBDV, and ALV-J+IBDV groups. **(B)** Body weights of SPF chickens for each group from day 1 to day 49. Data are expressed as mean \pm SE and analyzed by one-way ANOVA test. Different lowercase letters indicate significant differences between different groups. **(C)** Histological

lesions of each group (hematoxylin-eosin, 200×). Spleen: lymphocytic depletion (black arrow), malignant reticulosis (red arrow), and polycythemia (yellow arrow). Bursa Fabricii: proliferation of undifferentiated epithelial cells (black arrow), connective tissue proliferation (red arrow), and inflammatory cell infiltration (yellow arrow). Thymus: vascular congestion (black arrow) and eosinophilic protein-like fluid exudates (red arrow). Heart: inflammatory cell infiltration (black arrow). Liver: inflammatory cell infiltration (black arrow) and heterophile leukocyte infiltration (yellow arrow). Kidney: inflammatory cell infiltration (black arrow), cytoplasmic loose (red arrow), and mild vascular congestion (blue arrow). The visual examinations of the histological lesions were controlled in a double-blind manner. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

3.4. ALV-J and IBDV Synergistically Increase Viral Replication In Vivo

Although we have a clear understanding of superinfection synergistically increasing viral replication in vitro, the nature of viral proliferation in vivo is unclear. To further analyze the viral titers in the tissues and blood of infected chickens, the samples were tested at 3, 7, 14, and 21 dpi by RT-qPCR. The results showed that the viral load of ALV-J or IBDV in the blood of the superinfection group was significantly increased far more than in the single-virus-infected chickens from 3 dpi to 21 dpi (Figure 5A,B). Similarly, in different tissues, the viral loads of both ALV-J and IBDV in the superinfection group were also far more than the single virus-infected group (Figure 5C,D). Most interestingly, the synergistic viral replication of ALV-J and IBDV in the superinfected chickens is much higher than those in the CEF and DF-1 cells. Based on these results, ALV-J infection is capable of affecting IBDV replication in vivo.

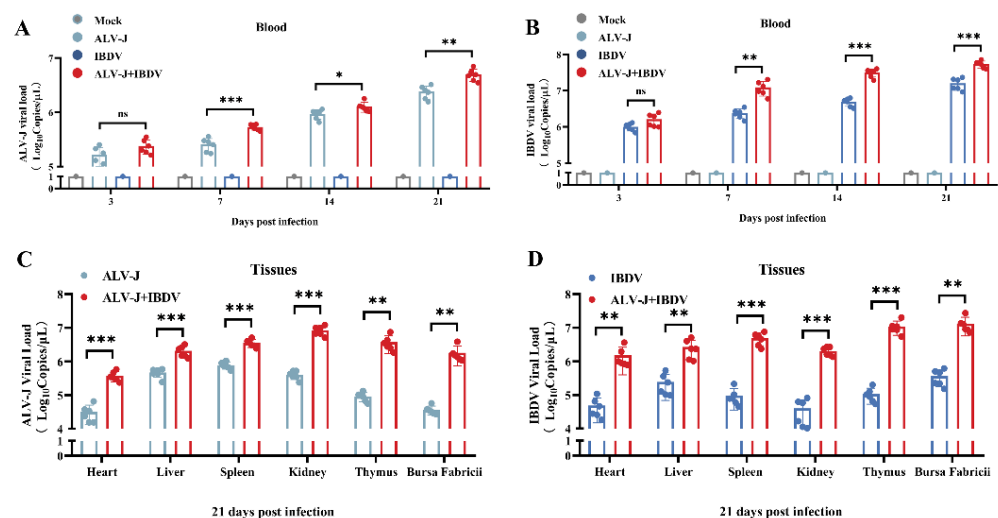


Figure 5. ALV-J and IBDV synergistically increase viral replication In Vivo. (A) ALV-J loads in blood from 3 dpi to 21 dpi. (B) IBDV loads in blood from 3 dpi to 21 dpi. (C) ALV-J loads in spleen, bursa, thymus, heart, liver, and kidneys at 21 dpi. (D) IBDV loads in spleen, bursa, thymus, heart, liver, and kidneys at 21 dpi. Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by One-way ANOVA test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, no significant.

3.5. ALV-J and IBDV Synergistically Induce Immunosuppression in SPF Chickens

Both ALV-J and IBDV are immunosuppressive viruses, and an infection of either one can cause severe immunosuppression in chickens. To determine whether a superinfection of ALV-J and IBDV can synergistically induce more severe immunosuppression in chickens, we evaluated the index of the immune organs, the differentiation of lymphocyte subsets, and the secretion of inflammatory factors. The anatomical results showed that the superinfection of ALV-J and IBDV induced the atrophy of immune organs (Figure 6A). The immune organ index results showed that the index of the spleen in the superinfection group exhibited no significant change at 7 dpi, while the index of Bursa Fabricii

decreased significantly (Figure 6B). However, at 21 dpi, the indexes of the spleen and Bursa Fabricii in the superinfection group were much lower than those in the single virus-infected group (Figure 6C).

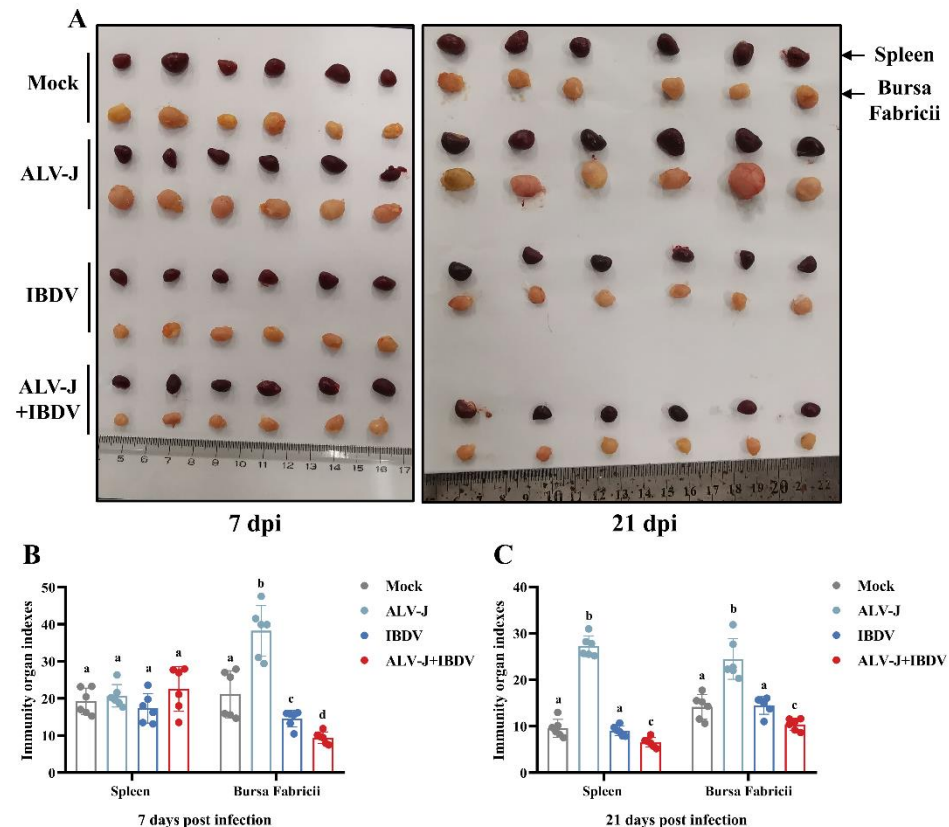


Figure 6. ALV-J and IBDV synergistically induce immune organ atrophy in SPF chickens. (A) Anatomical picture of spleen and bursa for the Mock, ALV-J, IBDV, and ALV-J+IBDV groups at 7 dpi (left) and 21 dpi (right). The top row is the spleen, and the bottom is the bursa fabricii. Six replicates of each group are shown. (B) Immune organ indexes of spleen and bursa at 7 dpi. (C) Immune organ indexes of spleen and bursa at 21 dpi. The immune organ indexes are expressed as the weight of immune organ relative to body weight. Data are expressed as mean \pm SE and analyzed by One-way ANOVA test. Different lowercase letters indicate significant differences between different groups.

Next, we investigated the cellular immune responses by measuring the proportions of CD3⁺, CD4⁺, and CD8 α ⁺ cells in the blood (Figure 7A). Our results showed that the CD3⁺, CD4⁺, and CD8 α ⁺ cell proportions slightly decreased in the ALV-J single virus-infected group, but not significantly, while those in the IBDV single virus-infected group showed a significant decrease compared to the control group. In the superinfection group, the lymphocyte cells exhibited a more drastic decline than that of the control group, which was not significant compared to that of the IBDV single virus-infected group. However, when compared with the controls, the CD4⁺/CD8⁺ ratios were similar in all the infected groups. In addition, by detecting the expression levels of IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ in several immune organs, including the spleen, thymus, and Bursa Fabricii, we found that the inflammatory factors were significantly increased in all the infected groups. Moreover, the expression level of inflammatory factors in the superinfection group showed a significant increase compared to that of the single virus-infected group, indicating a more severe degree of immunosuppression induced by the superinfection. In addition, the results in vivo were also consistent with those in vitro. These results showed that the superinfection of ALV-J

and IBDV induces more severe immunosuppression than that in a single virus-infected group in chickens.

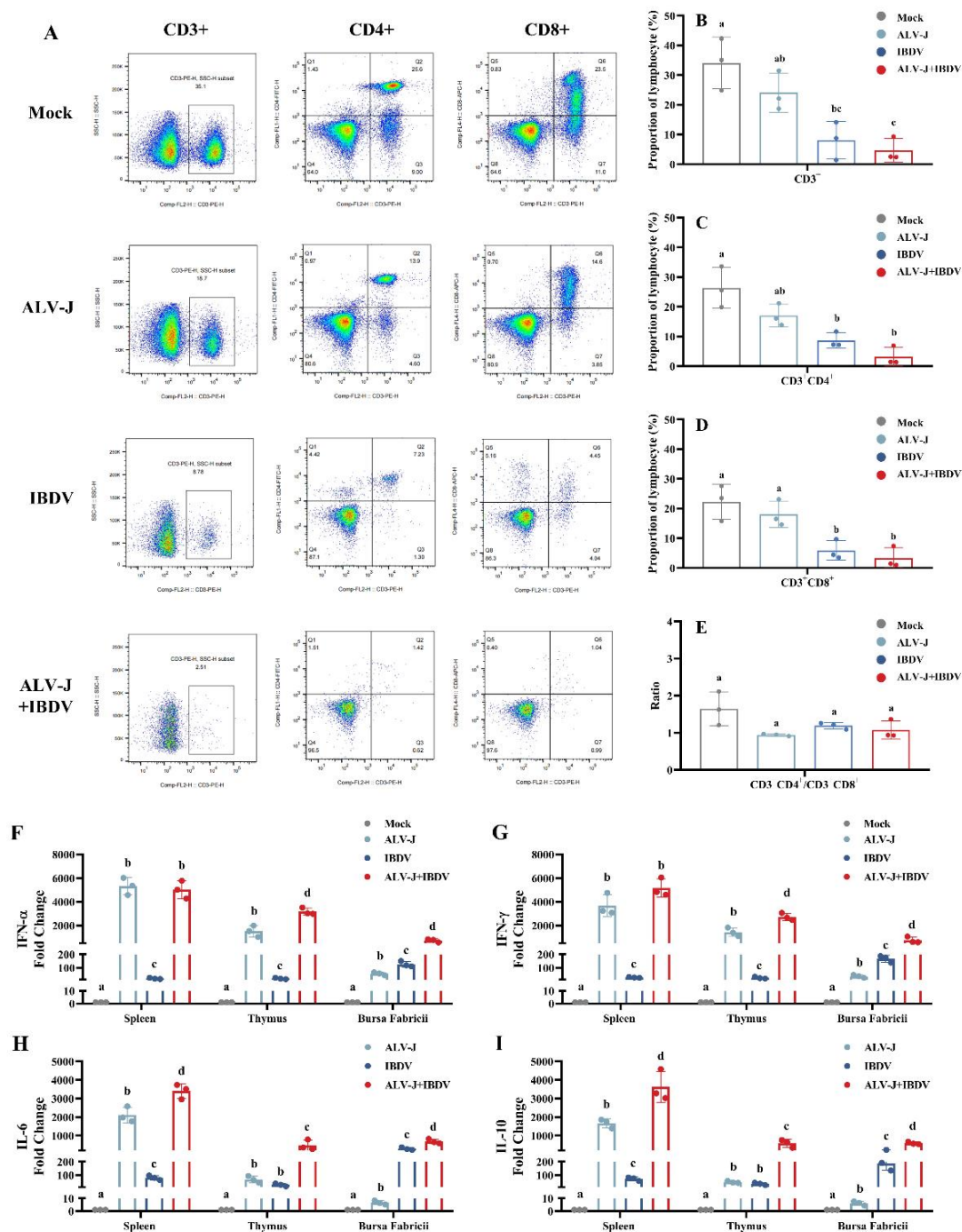


Figure 7. ALV-J and IBDV synergistically induce lymphocyte apoptosis and inflammatory mediator secretion in vivo. (A) Representative FACS scatter diagrams showing the percentages of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cells in peripheral blood mono-nuclear cells from treatment groups ALV-J, IBDV, ALV-J+IBDV, and empty control. The proportion of lymphocyte sub-groups CD3⁺ (B), CD3⁺CD4⁺ (C), CD3⁺CD8⁺ (D), and the ratio of CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ (E) were summarized in the diagram on the right. The secretions of inflammatory mediators IFN-α (F), IFN-γ (G), IL-6 (H), and IL-10 (I) were determined by RT-qPCR for the spleen, thymus, and bursa at 21 dpi. Data were expressed as mean ± SE and analyzed by One-way ANOVA test. Different lowercase letters indicate significant differences between different groups.

4. Discussion

In recent years, although the eradication of ALV-J has been continuously carried out, the outlook regarding the prevention and control of ALV-J is still pessimistic due to many problems such as complex genetic resources, the serious contamination of commercial vaccines, and poor breeding environments [18,19]. An important feature of an ALV-J infection is that it causes severe immunosuppression in infected chickens [20]. Moreover, due to ALV-J being easily transmitted vertically, it is likely to induce superinfections. Therefore, it is currently accepted that a superinfection of ALV-J ultimately leads to increased virulence and reduced vaccine efficacy in infected chickens [21,22]. As mentioned above, ALV-J is often mixed with homologous viruses such as ALV-A, ALV-B, and ALV-K as well as heterologous viruses such as REV [23], MDV [2], CAV [22], and IBDV. There are many natural examples of ALV-J superinfections with different viruses; however, the direct cause for the enhanced pathogenicity and tumorigenesis remains obscured.

In the present study, we demonstrated a synergism in the viral replication of a heterologous superinfection of ALV-J and IBDV *in vitro* and *in vivo*. Notably, our results showed that chickens superinfected with ALV-J and IBDV not only caused much more severe growth retardation and mortality, but also more severe immunosuppression (Figures 6 and 7). In viral synergistic interactions, a specific crosstalk among different viral proteins modulates the natural history, the immune response, and life cycle of both viruses in mixed-infected individuals [24,25]. These effects are mediated by immune mechanisms and crosstalk between the two viruses, which can interfere with host defense mechanisms [2,26]. In particular, when one or both viruses are immunosuppressive, more severe immunological defects are observed. For instance, several studies have shown that HIV worsens the course of a hepatitis C virus (HCV) infection, increasing the risk of disease. In addition, HCV may increase immunological defects due to HIV [26].

To verify the hypothesis that the more severe immunosuppression induced by the synergistic viral replication of ALV-J and IBDV is the direct cause of the enhanced pathogenicity, we tested the host immune responses *in vivo* in ALV-J and IBDV dually infected chickens. First, immune organ indexes are the most commonly used measures of immunity in poultry. In the present study, we found that the Bursa Fabricii of the group superinfected with ALV-J and IBDV exhibited significantly greater atrophy and dehydration than the control group or any single virus-infected group. The original feature of IBDV infection is bursal necrosis, which causes severe damage to the immune system [27]. These results suggest that the superinfection of IBDV induced by ALV-J may aggravate the damage to the Bursa Fabricii and cause more severe immunosuppression. A previous study has shown that bursal lesions are associated with the degree of B cell depletion [28,29]. Moreover, ALV-J infection could cause the developmental arrest and dysfunction of B cell progenitors in the Bursa Fabricii [30], which may be synergistic with IBDV-induced bursal injury, resulting in more severe immunosuppression in superinfected chickens. On the other hand, it is well known that ALV-J infection causes splenomegaly in chickens [31], while IBDV infection causes spleen atrophy [32]. In the superinfection group, the spleen showed significantly greater atrophy compared to the ALV-J infected group at 21 dpi, which illustrates the role of IBDV in the superinfection group. Thus, both ALV-J and IBDV can induce immune organ injury in SPF chickens, while additive effects were also observed.

With respect to inflammatory mediator secretion, both ALV-J and IBDV dramatically upregulated IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ expressions in the spleen, Bursa Fabricii, and thymus. The balance of inflammatory factors is also an important index to evaluate the level of cellular immunity. The superinfection of ALV-J and IBDV promotes the secretion of inflammatory factors *in vitro* and *in vivo*, which is also a manifestation of the synergistically enhanced pathogenicity of both viruses. These results were consistent with those of previous studies [9,33,34], and our histopathology results confirmed this. We observed necrosis and the depletion of lymphoid cells of the Bursa Fabricii, inflammatory cell infiltration, and fibroplasias in the superinfection group and single virus-infected groups, which was consistent with the expression of pro-inflammatory cytokines. It is worth noting

that the expression level of cytokines in the superinfection group significantly increased not only in the Bursa Fabricii but also in the thymus, and was more pronounced in the latter. This suggests that a superinfection with ALV-J and IBDV may induce a different pattern of immune injury than a single infection.

We assessed cellular immune responses by measuring the blood proportions of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cells. Previous studies have shown that ALV-J could induce lymphocyte apoptosis in immune organs, especially in young chickens [35]. Our results showed both ALV-J and IBDV infections induce the decline in the blood proportions of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ at 21 dpi, and IBDV induced this effect more significantly. These results indicate that IBDV induces more severe lymphocyte apoptosis in peripheral blood. In the superinfection group, the proportions of lymphocytes exhibited a more severe decrease, although it was not more significant than the IBDV single virus-infected group. However, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ was similar in the superinfection group when compared to the control. These results indicate that the superinfection of ALV-J and IBDV induces overall CD3⁺-positive lymphocyte apoptosis but does not change the ratio of CD4⁺/CD8⁺.

Our research demonstrates the effectiveness of a candidate model for studying the outcome of a superinfection with ALV-J and IBDV in SPF chickens. Using the infection model, we elucidated synergistic pathogenic effects between ALV-J and IBDV. In addition, we found that the immunosuppression induced by ALV-J infection combined with the immunosuppression and pathogenicity induced by IBDV infection can seriously impair the host's immune resistance to both viruses' infections, inevitably resulting in a more serious illness in the superinfected chickens. However, further studies are needed to elucidate the deeper mechanisms by which a superinfection of ALV-J and IBDV cooperates to induce more severe immunosuppression.

Author Contributions: Conceptualization, W.C., X.Z., H.L., F.C. and Q.X.; Formal analysis, S.C.; Funding acquisition, F.C. and Q.X.; Investigation, S.C. and Y.N.; Methodology, W.C.; Validation, W.L.; Writing—original draft, S.C.; Writing—review & editing, W.C. and Q.X. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by grants from Guangdong Provincial Key R&D Program (2020B020222001, 2019B020218004), the National Natural Science Foundation of China (31972659), Guangdong basic and applied basic research fund project (2019B1515210034), the construction project of modern agricultural science and technology innovation alliance in Guangdong province (2021KJ128, 2020KJ128) and the Special Project of National Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-41).

Institutional Review Board Statement: All animal experiments comply with the ARRIVE guidelines and carried out in accordance with the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No.8023, revised 1978) and Experimental Animal Welfare Ethics Committee of South China Agricultural University [SYXK-2022-0136].

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We would like to thank all the reviewers who participated in the review, as well as Wei Shu from the Testing Center of South China Agricultural University for the technical support of laser confocal experiment.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Koku, R.; Herndon, D.R.; Avellan, J.; Morrison, J.; Futse, J.E.; Palmer, G.H.; Brayton, K.A.; Noh, S.M. Both Coinfection and Superinfection Drive Complex Anaplasma marginale Strain Structure in a Natural Transmission Setting. *Infect. Immun.* **2021**, *89*, e0016621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Zhou, J.; Zhao, G.L.; Wang, X.M.; Du, X.S.; Su, S.; Li, C.G.; Nair, V.; Yao, Y.X.; Cheng, Z.Q. Synergistic Viral Replication of Marek's Disease Virus and Avian Leukosis Virus Subgroup J is Responsible for the Enhanced Pathogenicity in the Superinfection of Chickens. *Viruses* **2018**, *10*, 271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Saade, G.; Deblanc, C.; Bougon, J.; Marois-Crehan, C.; Fablet, C.; Auray, G.; Belloc, C.; Leblanc-Maridor, M.; Gagnon, C.A.; Zhu, J.; et al. Coinfections and their molecular consequences in the porcine respiratory tract. *Vet. Res.* **2020**, *51*, 80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kumar, N.; Sharma, S.; Barua, S.; Tripathi, B.N.; Rouse, B.T. Virological and Immunological Outcomes of Coinfections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00111-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Asner, S.A.; Science, M.E.; Tran, D.; Smieja, M.; Merglen, A.; Mertz, D. Clinical disease severity of respiratory viral co-infection versus single viral infection: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Opriessnig, T.; Gimenez-Lirola, L.G.; Halbur, P.G. Polymicrobial respiratory disease in pigs. *Anim. Health Res. Rev.* **2011**, *12*, 133–148. [[CrossRef](#)]
7. Gottlieb, G.S.; Nickle, D.C.; Jensen, M.A.; Wong, K.G.; Grobler, J.; Li, F.; Liu, S.L.; Rademeyer, C.; Learn, G.H.; Karim, S.S.; et al. Dual HIV-1 infection associated with rapid disease progression. *Lancet* **2004**, *363*, 619–622. [[CrossRef](#)]
8. Grobler, J.; Gray, C.M.; Rademeyer, C.; Seoighe, C.; Ramjee, G.; Karim, S.A.; Morris, L.; Williamson, C. Incidence of HIV-1 dual infection and its association with increased viral load set point in a cohort of HIV-1 subtype C-infected female sex workers. *J. Infect. Dis.* **2004**, *190*, 1355–1359. [[CrossRef](#)]
9. Cui, N.; Wang, Q.; Shi, W.; Han, L.; Wang, J.; Ma, X.; Li, H.; Wang, F.; Su, S.; Zhao, X. Synergy of subgroup J avian leukosis virus and Eimeria tenella to increase pathogenesis in specific-pathogen-free chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2016**, *177*, 42–47. [[CrossRef](#)]
10. Dong, X.; Zhao, P.; Chang, S.; Ju, S.; Li, Y.; Meng, F.; Sun, P.; Cui, Z. Synergistic pathogenic effects of co-infection of subgroup J avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus in broiler chickens. *Avian. Pathol.* **2015**, *44*, 43–49. [[CrossRef](#)]
11. Sun, G.R.; Zhang, Y.P.; Zhou, L.Y.; Lv, H.C.; Zhang, F.; Li, K.; Gao, Y.L.; Qi, X.L.; Cui, H.Y.; Wang, Y.Q.; et al. Co-Infection with Marek's Disease Virus and Reticuloendotheliosis Virus Increases Illness Severity and Reduces Marek's Disease Vaccine Efficacy. *Viruses* **2017**, *9*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. McNeilly, F.; Smyth, J.A.; Adair, B.M.; McNulty, M.S. Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian. Dis.* **1995**, *39*, 532–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lin, Y.; Xia, J.; Zhao, Y.; Wang, F.; Yu, S.; Zou, N.; Wen, X.; Cao, S.; Huang, Y. Reproduction of hemangioma by infection with subgroup J avian leukosis virus: The vertical transmission is more hazardous than the horizontal way. *Virol. J.* **2013**, *10*, 97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Liao, L.; Chen, W.; Zhang, X.; Zhang, H.; Li, A.; Yan, Y.; Xie, Z.; Li, H.; Lin, W.; Ma, J.; et al. Semen extracellular vesicles mediate vertical transmission of subgroup J avian leukosis virus. *Virol. Sin.* **2022**, *37*, 284–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Li, H.; Wang, P.; Lin, L.; Shi, M.; Gu, Z.; Huang, T.; Mo, M.L.; Wei, T.; Zhang, H.; Wei, P. The emergence of the infection of subgroup J avian leucosis virus escalated the tumour incidence in commercial Yellow chickens in Southern China in recent years. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 312–316. [[CrossRef](#)]
16. Liu, H.; Ma, K.; Liu, M.; Yang, C.; Huang, X.; Zhao, Y.; Qi, K. Histologic findings and viral antigen distribution in natural coinfection of layer hens with subgroup J avian leukosis virus, Marek's disease virus, and reticuloendotheliosis virus. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2019**, *31*, 761–765. [[CrossRef](#)]
17. Li, X.; Lu, J.; Liu, H.; Wang, W.; Hu, X. Molecular Epidemiological Investigations of Immunosuppressive Viruses in AA Broiler Chicken Flocks and Analysis of Their Influence on the Function of NDV Vaccines. *Chin. J. Vet. Sci.* **2008**, *10*, 1141–1144.
18. Federspiel, M.J.; Hughes, S.H. Retroviral gene delivery. *Methods Cell. Biol.* **1997**, *52*, 179–214. [[PubMed](#)]
19. Li, H.; Tan, M.; Zhang, F.; Ji, H.; Zeng, Y.; Yang, Q.; Tan, J.; Huang, J.; Su, Q.; Huang, Y.; et al. Diversity of Avian leukosis virus subgroup J in local chickens, Jiangxi, China. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 4797. [[CrossRef](#)]
20. Liu, P.; Li, L.; Jiang, Z.; Yu, Y.; Chen, X.; Xiang, Y.; Chen, J.; Li, Y.; Cao, W. Molecular characteristics of subgroup J avian leukosis virus isolated from yellow breeder chickens in Guangdong, China, during 2016–2019. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *89*, 104721. [[CrossRef](#)]
21. Wang, P.; Lin, L.; Shi, M.; Li, H.; Gu, Z.; Li, M.; Gao, Y.; Teng, H.; Mo, M.; Wei, T.; et al. Vertical transmission of ALV from ALV-J positive parents caused severe immunosuppression and significantly reduced marek's disease vaccine efficacy in three-yellow chickens. *Vet. Microbiol.* **2020**, *244*, 108683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Zhang, J.; Ma, L.; Li, T.; Li, L.; Kan, Q.; Yao, X.; Xie, Q.; Wan, Z.; Shao, H.; Qin, A.; et al. Synergistic pathogenesis of chicken infectious anemia virus and J subgroup of avian leukosis virus. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 101468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dong, X.; Ju, S.; Zhao, P.; Li, Y.; Meng, F.; Sun, P.; Cui, Z. Synergetic effects of subgroup J avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus co-infection on growth retardation and immunosuppression in SPF chickens. *Vet. Microbiol.* **2014**, *172*, 425–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Belay, M.; Bjune, G.; Abebe, F. Prevalence of tuberculosis, HIV, and TB-HIV co-infection among pulmonary tuberculosis suspects in a predominantly pastoralist area, northeast Ethiopia. *Glob. Health Action* **2015**, *8*, 27949. [[CrossRef](#)]
25. Bell, L.C.K.; Noursadeghi, M. Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis co-infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 80–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Liberto, M.C.; Zicca, E.; Pavia, G.; Quirino, A.; Marascio, N.; Torti, C.; Foca, A. Virological Mechanisms in the Coinfection between HIV and HCV. *Mediators. Inflamm.* **2015**, *2015*, 320532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Gimeno, I.M.; Schat, K.A. Virus-Induced Immunosuppression in Chickens. *Avian. Dis.* **2018**, *62*, 272–285. [[CrossRef](#)]
28. Huang, X.; Liu, W.; Zhang, J.; Liu, Z.; Wang, M.; Wang, L.; Zhou, H.; Jiang, Y.; Cui, W.; Qiao, X.; et al. Very virulent infectious bursal disease virus-induced immune injury is involved in inflammation, apoptosis, and inflammatory cytokines imbalance in the bursa of fabricius. *Dev. Comp. Immunol.* **2021**, *114*, 103839. [[CrossRef](#)]
29. Courtillon, C.; Allee, C.; Amelot, M.; Keita, A.; Bougeard, S.; Hartle, S.; Rouby, J.C.; Eterradossi, N.; Soubies, S.M. Blood B Cell Depletion Reflects Immunosuppression Induced by Live-Attenuated Infectious Bursal Disease Vaccines. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 871549. [[CrossRef](#)]
30. He, S.; Zheng, G.; Zhou, D.; Li, G.; Zhu, M.; Du, X.; Zhou, J.; Cheng, Z. Clonal anergy of CD117 + chB6 + B cell progenitors induced by avian leukosis virus subgroup J is associated with immunological tolerance. *Retrovirology* **2019**, *16*, 1. [[CrossRef](#)]
31. Xu, M.; Hang, F.; Qian, K.; Shao, H.; Ye, J.; Qin, A. Chicken hepatomegaly and splenomegaly associated with novel subgroup J avian leukosis virus infection. *BMC Vet. Res.* **2022**, *18*, 32. [[CrossRef](#)]
32. Jayasundara, J.; Walkden-Brown, S.W.; Katz, M.E.; Islam, A.; Renz, K.G.; McNally, J.; Hunt, P.W. Pathogenicity, tissue distribution, shedding and environmental detection of two strains of IBDV following infection of chickens at 0 and 14 days of age. *Avian. Pathol.* **2017**, *46*, 242–255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Xu, Z.Y.; Yu, Y.; Liu, Y.; Ou, C.B.; Zhang, Y.H.; Liu, T.Y.; Wang, Q.X.; Ma, J.Y. Differential expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory genes of layer chicken bursa after experimental infection with infectious bursal disease virus. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 5307–5314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gao, Y.; Liu, Y.; Guan, X.; Li, X.; Yun, B.; Qi, X.; Wang, Y.; Gao, H.; Cui, H.; Liu, C.; et al. Differential expression of immune-related cytokine genes in response to J group avian leukosis virus infection in vivo. *Mol. Immunol.* **2015**, *64*, 106–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Liu, D.; Dai, M.; Zhang, X.; Cao, W.; Liao, M. Subgroup J avian leukosis virus infection of chicken dendritic cells induces apoptosis via the aberrant expression of microRNAs. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

华南农业大学学报

第 44 卷 第 3 期 2023 年 5 月

目 次

- CD163 基因敲除大白猪的抗蓝耳病性能和主要生产性能研究 张 健, 吴珍芳, 杨化强 (333)
- 大白公猪精浆外泌体 miRNA 表征鉴定及功能分析
..... 孙艳梅, 孙敬帅, 秦佳丽, 袁仁强, 朱晓萍, 赵云翔 (340)
- 理化因素对非洲猪瘟病毒灭活效果的研究
..... 龚 浪, 孙英硕, 许润达, 陈熊男, 高 琦, 黄 钊, 陈孝军, 郑佳琛,
郭彦辰, 吴芮霞, 曾凡亮, 王 衡, 张桂红 (348)
- MicroRNA-1285 及其靶标 DDX3X 对猪塞内卡病毒感染 PK-15 细胞的调控作用
..... 孙 媛, 唐晓钰, 白 杨, 陈雨琪, 郑瑶瑶, 吴俊玲, 蓝 天, 马静云 (357)
- tva 受体基因起始密码子突变对鸡感染 A 亚群禽白血病毒的影响
..... 陈伟国, 邱智祥, 张翔宇, 李文雪, 徐慧娟, 朱学风, 谢青梅 (367)
- 复方中药超微粉对蛋鸡产蛋性能、生殖激素及相关基因表达的影响
..... 韩坤良, 林文超, 蒙成文, 兰 伟, 胡 新, 崔亚东, 孔祥峰 (374)
- 广东省牛流行热病毒分离株 JM 2020 的全基因组测序及进化分析 贾荣荣, 汪祥斌, 贾 坤 (382)
- 石斑鱼 *PPAR- δ* 基因 SNP 位点和单倍型与抗虹彩病毒和神经坏死病毒抗性的关联
..... 黄健玲, 杨子敏, 王雨欣, 李鑫帅, 刘翠瑜, 陈锦鹏, 秦启伟, 杨 敏 (391)
- 氟苯尼考联合铜环境胁迫对土壤固氮菌成膜能力及相关基因表达的研究
..... 梁 仪, 周 童, 白 玲, 王 美, 孙永学 (402)
- 滴灌水氮管理对玉米种植土壤无机氮含量和氧化亚氮排放的影响 肖 未, 吴庆峰, 李伏生 (410)
- 大豆 *GmMADS4* 基因克隆、亚细胞定位及功能分析
..... 薛迎斌, 宋 佳, 李泉艺, 李小豪, 陈经烨, 伍萍珍, 朱胜男, 刘 颖 (420)
- 辣椒炭疽病病原分离鉴定及对杀菌剂敏感性测定
..... 周志成, 孙 海, 肖仲久, 莫维弟, 程欢欢, 彭丽娟, 丁海霞 (430)
- 基于多尺度特征提取深度残差网络的水稻害虫识别 郑显润, 郑 鹏, 王文秀, 程亚红, 苏宇锋 (438)
- 基于改进 SSS 算法的轻量化三七病害检测 杨 康, 熊 凯, 周 平, 杨启良 (447)
- 基于 ISS-L 融合特征点的油菜分枝点云配准方法 谢忠红, 黄一帆, 吴崇友 (456)
- 蔬菜移栽机可移动式喂苗装置设计与试验
..... 田素博, 谢 天, 王鹤锦, 张雪峰, 张 堃, 白晓虎, 孙周平 (464)
- 基于深度强化学习的柑橘采摘机械臂路径规划方法 熊春源, 熊俊涛, 杨振刚, 胡文馨 (473)
- 基于 PLC 的屋顶绿化雨水滞蓄效能自动监测系统及应用
..... 王 婷, 欧嵘熹, 于 立, 漆海霞, 章家恩 (484)

封面图片: 由庄延提供

期刊基本参数: CN44 * 1110/S * 1959 * b * A4 * 162 * zh * P * ¥15.00 * 1000 * 18 * 2023-05

陈伟国, 邝智祥, 张翔宇, 等. *tva* 受体基因起始密码子突变对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 367-373.
CHEN Weiguo, KUANG Zhixiang, ZHANG Xiangyu, et al. Effect of initiation codon mutation within *tva* receptor gene on chicken resistance to infection by avian leukemia virus subgroup A [J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 367-373.

tva 受体基因起始密码子突变对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒的影响

陈伟国^{1†}, 邝智祥^{2†}, 张翔宇¹, 李文雪¹, 徐慧娟¹, 朱学风¹, 谢青梅¹

(1 华南农业大学 动物科学学院/广东省畜禽健康养殖与环境控制重点实验室, 广东 广州 510642;

2 广东爱健康生物科技有限公司, 广东 清远 511800)

摘要:【目的】探索 *tva* 受体基因起始密码子突变 (*tva* c.3G>A) 对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒 (Avian leukemia virus subgroup A, ALV-A) 的影响。【方法】利用 Sanger 测序和 RT-PCR 验证我国黄羽肉鸡存在 *tva* c.3G>A 突变。利用流式细胞术检测 *tva* c.3G>A 突变对鸡体外感染 RCASBP(A)-GFP 荧光报告病毒的影响。通过 ALV-A 体内攻毒试验, 探究 *tva* c.3G>A 突变对鸡体内感染 ALV-A 的影响。利用直接测序方法对我国黄羽肉鸡品系 *tva* c.3G>A 突变位点进行基因分型。【结果】Sanger 测序和 RT-PCR 结果鉴定我国黄羽肉鸡品系 *tva* 基因编码区第 3 位碱基由 G 突变为 A, 该突变引起 *tva* 基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA。流式细胞术检测结果显示野生型 *tva* c.3G/G 鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblast, CEF) 对 RCASBP(A)-GFP 易感, 纯合突变型 *tva* c.3A/A CEF 抗 RCASBP(A)-GFP 感染, 表明 *tva* c.3G>A 突变导致鸡体外抗 RCASBP(A)-GFP 的感染。ALV-A 体内攻毒试验的结果表明, *tva* c.3G>A 突变导致鸡体内抗 ALV-A 的感染。*tva* c.3G>A 突变位点基因分型发现, CB01、CB08、CB10 和 CB15 品系存在纯合抗性基因型 *tva* c.3A/A, 频率分别为 0.10、0.15、0.23 和 0.08。【结论】*tva* c.3G>A 突变引起鸡在体外、体内抗 ALV-A 感染, *tva* c.3G>A 突变位点可作为 ALV-A 的遗传抗性位点。

关键词: A 亚群禽白血病病毒; *tva* 受体基因; 起始密码子; 突变; 遗传抗性; 黄羽肉鸡

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0367-07

Effect of initiation codon mutation within *tva* receptor gene on chicken resistance to infection by avian leukemia virus subgroup A

CHEN Weiguo^{1†}, KUANG Zhixiang^{2†}, ZHANG Xiangyu¹, LI Wenxue¹, XU Huijuan¹, ZHU Xuefeng¹, XIE Qingmei¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Health Aquaculture and Environmental Control, Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Love-Health Biotechnology Co., Ltd., Qingyuan 511800, China)

Abstract: 【Objective】To explore the effect of initiation codon mutation within *tva* receptor gene (*tva*

收稿日期: 2022-06-15 网络首发时间: 2022-10-09 09:45:31

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20221006.1613.002.html>

作者简介: 陈伟国, 高级实验师, 博士, 主要从事动物健康养殖与安全生产、抗病育种研究, E-mail: wgchen81@scau.edu.cn; 邝智祥, 高级畜牧师, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 88631608@qq.com; †表示同等贡献; 通信作者: 谢青梅, 教授, 博士, 主要从事动物免疫与生物安全和家禽疾病防控研究, E-mail: qmx@scau.edu.cn

基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2020B020222001); 国家重点研发计划 (2021YFD1300100); 清远市科技计划项目 (2021DZX019)

陈伟国, 邝智祥, 张翔宇, 等. *tva* 受体基因起始密码子突变对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒的影响 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(3): 367-373.
CHEN Weiguo, KUANG Zhixiang, ZHANG Xiangyu, et al. Effect of initiation codon mutation within *tva* receptor gene on chicken resistance to infection by avian leukemia virus subgroup A[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(3): 367-373.

tva 受体基因起始密码子突变对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒的影响

陈伟国^{1†}, 邝智祥^{2†}, 张翔宇¹, 李文雪¹, 徐慧娟¹, 朱学风¹, 谢青梅¹

(1 华南农业大学 动物科学学院/广东省畜禽健康养殖与环境控制重点实验室, 广东 广州 510642;

2 广东爱健康生物科技有限公司, 广东 清远 511800)

摘要:【目的】探索 *tva* 受体基因起始密码子突变 (*tva* c.3G>A) 对鸡感染 A 亚群禽白血病病毒 (Avian leukemia virus subgroup A, ALV-A) 的影响。【方法】利用 Sanger 测序和 RT-PCR 验证我国黄羽肉鸡存在 *tva* c.3G>A 突变。利用流式细胞术检测 *tva* c.3G>A 突变对鸡体外感染 RCASBP(A)-GFP 荧光报告病毒的影响。通过 ALV-A 体内攻毒试验, 探究 *tva* c.3G>A 突变对鸡体内感染 ALV-A 的影响。利用直接测序方法对我国黄羽肉鸡品系 *tva* c.3G>A 突变位点进行基因分型。【结果】Sanger 测序和 RT-PCR 结果鉴定我国黄羽肉鸡品系 *tva* 基因编码区第 3 位碱基由 G 突变为 A, 该突变引起 *tva* 基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA。流式细胞术检测结果显示野生型 *tva* c.3G/G 鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblast, CEF) 对 RCASBP(A)-GFP 易感, 纯合突变型 *tva* c.3A/A CEF 抗 RCASBP(A)-GFP 感染, 表明 *tva* c.3G>A 突变导致鸡体外抗 RCASBP(A)-GFP 的感染。ALV-A 体内攻毒试验的结果表明, *tva* c.3G>A 突变导致鸡体内抗 ALV-A 的感染。*tva* c.3G>A 突变位点基因分型发现, CB01、CB08、CB10 和 CB15 品系存在纯合抗性基因型 *tva* c.3A/A, 频率分别为 0.10、0.15、0.23 和 0.08。【结论】*tva* c.3G>A 突变引起鸡在体外、体内抗 ALV-A 感染, *tva* c.3G>A 突变位点可作为 ALV-A 的遗传抗性位点。

关键词: A 亚群禽白血病病毒; *tva* 受体基因; 起始密码子; 突变; 遗传抗性; 黄羽肉鸡

中图分类号: S855.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)03-0367-07

Effect of initiation codon mutation within *tva* receptor gene on chicken resistance to infection by avian leukemia virus subgroup A

CHEN Weiguo^{1†}, KUANG Zhixiang^{2†}, ZHANG Xiangyu¹, LI Wenxue¹, XU Huijuan¹, ZHU Xuefeng¹, XIE Qingmei¹

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University/Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal Health Aquaculture and Environmental Control, Guangzhou 510642, China;

2 Guangdong Love-Health Biotechnology Co., Ltd., Qingyuan 511800, China)

Abstract: 【Objective】To explore the effect of initiation codon mutation within *tva* receptor gene (*tva*

收稿日期: 2022-06-15 网络首发时间: 2022-10-09 09:45:31

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20221006.1613.002.html>

作者简介: 陈伟国, 高级实验师, 博士, 主要从事动物健康养殖与安全生产、抗病育种研究, E-mail: wgchen81@scau.edu.cn; 邝智祥, 高级畜牧师, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 88631608@qq.com; †表示同等贡献; 通信作者: 谢青梅, 教授, 博士, 主要从事动物免疫与生物安全和家禽疾病防控研究, E-mail: qmx@scau.edu.cn

基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2020B020222001); 国家重点研发计划 (2021YFD1300100); 清远市科技计划项目 (2021DZX019)

c.3G>A) on resistance of chickens to infection by avian leukemia virus subgroup A (ALV-A). 【Method】 Sanger sequencing and RT-PCR were used to verify the presence of *tva* c.3G>A mutation in Chinese yellow-feathered broilers. The effect of *tva* c.3G>A mutation on infection of chickens by RCASBP(A)-GFP fluorescence reporter virus *in vitro* was detected using flow cytometry. The effect of *tva* c.3G>A mutation on infection of chickens by ALV-A was investigated using ALV-A challenge test *in vivo*. Direct sequencing was used to genotype *tva* c.3G>A mutation site within Chinese yellow-feathered broiler lines. 【Result】 The results of Sanger sequencing and RT-PCR identified the mutation from G to A on the third base in the coding region of *tva* gene of Chinese yellow-feathered broilers, which caused the mutation from ATG to ATA in the initial codon sequence of *tva* gene. The result of flow cytometry showed that chicken embryo fibroblasts (CEFs) of wild-type *tva* c.3G/G were susceptible to infection by RCASBP(A)-GFP, while the homozygous mutant *tva* c.3A/A CEFs were resistant to infection by RCASBP(A)-GFP, indicating that *tva* c.3G>A mutation led to chicken resistance to infection by RCASBP(A)-EGFP *in vitro*. The results of ALV-A challenge test *in vivo* also indicated that *tva* c.3G>A mutation led to chicken resistance to infection by ALV-A. Genotyping of *tva* c.3G>A revealed that homozygous resistance genotype *tva* c.3A/A was present in lines CB01, CB08, CB10 and CB15, with the frequencies of 0.10, 0.15, 0.23 and 0.08, respectively. 【Conclusion】 The *tva* c.3G>A mutation causes chicken resistance to infection by ALV-A *in vitro* and *in vivo*, and the *tva* c.3G>A mutation site can be used as the genetic resistance site of ALV-A.

Key words: Avian leukemia virus subgroup A; *tva* receptor gene; Initiation codon; Mutation; Genetic resistance; Yellow-feathered broiler

禽白血病是由禽白血病病毒 (Avian leukemia virus, ALV) 引起的一类禽免疫抑制性肿瘤性传染病。可自然感染鸡群的禽白血病病毒包括 ALV-A~E、J 和 K 7 个亚群, 其中 ALV-A 是引起我国鸡群发生禽白血病的主要病原^[1-2]。ALV-A 可使感染鸡群产生免疫抑制、生产性能下降, 乃至发生特征性肿瘤而死亡, 给养禽业造成巨大的经济损失^[3-4]。目前, 该病鲜有商品化疫苗和有效的治疗方法, 主要通过净化种群和生物安全措施进行预防^[5]。然而, 近年来禽白血病的流行病学调查研究发现, ALV-A 在我国地方鸡种^[6-7]、商品肉鸡^[8]、蛋鸡^[9]及野生鸟类^[10]中普遍存在。可见, 现有措施并不能完全控制 A 亚群禽白血病在中国的发生与流行, 该病已成为威胁我国养鸡业 (尤其是种鸡业) 可持续健康发展的重大疾病之一。因此, 研发更适合防控我国 A 亚群禽白血病的新策略已迫在眉睫。国外已有研究证实, 提高宿主对 A 亚群禽白血病的遗传抗性, 开展 A 亚群禽白血病的抗病育种可成为防控该病的有效策略^[11-13]。

ALV-A 由 *tva* 受体基因编码的细胞表面特异性受体 Tva 介导侵入宿主细胞, 继而发生感染^[14]。*tva* 受体基因的遗传突变会导致 Tva 受体蛋白的完全缺失或表达一个不适宜作为 ALV-A 受体的缺陷型 Tva 受体蛋白, 从而引起宿主细胞对 ALV-A 的

感染产生遗传抗性^[15]。在国外白来航近交品系 *tva* 受体基因中已经鉴定了 *tva*^{r1}、*tva*^{r2}、*tva*^{r3} 和 *tva*^{r4} 4 个 ALV-A 遗传抗性位点^[16-17]。Chen 等^[18]首次从中国鸡种中成功鉴定了 *tva*^{r5} 和 *tva*^{r6} 2 个 ALV-A 遗传抗性位点。另外, 我们前期研究 (未发表) 发现中国鸡种 *tva* 受体基因存在新的自然突变位点: *tva* 基因编码区第 3 位碱基由 G 突变为 A, 推测该突变引起 *tva* 基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA, 将该 *tva* 基因自然突变命名为 *tva* c.3G>A, 但其对宿主感染 A 亚群禽白血病病毒的影响尚不清楚。因此, 本研究拟通过 ALV-A 体外感染试验和体内攻毒试验, 从体外、体内 2 个层面验证 *tva* c.3G>A 突变是否引起宿主对 ALV-A 的感染产生遗传抗性, 以期鉴定新的 ALV-A 遗传抗性位点。

1 材料与方法

1.1 试验动物、病毒、细胞株及质粒

黄羽肉鸡品系 CB01~CB15^[19] 抗凝血样采自于温氏食品集团股份有限公司, 每个品系随机采取 36~60 份血样, 共 670 份血液样品。1 日龄无特定病原 (Specific pathogen free, SPF) 鸡苗购自广东大华农有限公司。ALV-A GD08 株、DF-1 细胞系为广东省畜禽健康养殖与环境控制重点实验室保存。RCASBP (A)-GFP 重组质粒为广东省畜禽健康养殖与环境控

制重点实验室前期构建并保存^[18]。

1.2 主要试剂

血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;质粒小量提取试剂盒、无内毒素质粒大量提取试剂盒、凝胶 DNA 回收试剂盒均购自 OMEGA 公司;ReverTra Ace[®]qPCR RT Kit、KOD-FX 购自 Toyobo 公司;FastStart SYBR Green Master(Rox) 购自 Roche 公司;反转录试剂盒、pMD19-T、PrimeScript[®] One Step RT-PCR Kit 购自 Takara 公司;Opti-DMEM 无血清培养基、DMEM 细胞培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、青链霉素均购自 Gibco 公司;TRIZOL reagent、Lipofectamine 3000 转染试剂购自 Invitrogen 公司。

表 1 *tva* 受体基因全长序列 PCR 扩增引物信息

Table 1 Primers used to amplify the whole sequence of *tva* receptor gene

片段 Fragment	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度/℃ Annealing temperature	片段大小/bp Segment size
1	P1-F	GTTCAGCAGATCCTCATCTCCCG	62	1 308
	P1-R	GGCCATTGTGCGATCTAAGAGGG		
2	P2-F	AGCCCTCTTAGATCGCACAA	60	1 253
	P2-R	GTGACACCGAGCACAAAATG		
3	P3-F	GTTGGAGCTGGATGAGCACT	60	1 132
	P3-R	TGAGGGAATTCCTGTACCT		

1.4 *tva* 基因 mRNA 的 RT-PCR 扩增

采用 Trizol 法提取 *tva* c.3G>A 突变位点野生型 *tva* c.3G/G 和纯合突变型 *tva* c.3A/A 种鸡血液的总 RNA, 参考反转录试剂盒说明书反转录成 cDNA。参考文献 [18] 中的引物序列和 PCR 反应体系、扩增条件, 利用 KOD-FX 高保真酶 RT-PCR 扩增 *tva* 基因整个编码序列。回收、纯化的 RT-PCR 产物克隆入 pMD19-T, 送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果应用 Lasergene 7.1 软件进行分析。

1.5 鸡胚成纤维细胞分离与培养

采集 10 日龄鸡胚消毒后, 用镊子打开气室和壳膜, 夹起鸡胚, 用眼科剪刀和镊子剔除头、爪、骨头和内脏, 把鸡胚组织块置于平皿中, 用 PBS 液漂洗去除血污。将漂洗好的组织块放入 5 mL 离心管, 用眼科剪刀剪至肉糜状, 用 0.25%(w) 的胰酶在 37℃ 水浴箱中消化 15~20 min, 加入适量的小牛血清终止消化。使用 200 目细胞滤膜过滤后, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清液, 用完全培养基对细胞进行重悬, 分装入无菌培养皿中, 获取纯化的鸡胚成纤维细胞 (Chicken embryo fibroblast, CEF), 细

1.3 黄羽肉鸡品系 *tva* 基因的遗传变异分析

参考 NCBI 数据库中鸡 *tva* 基因的 DNA 序列 (GenBank 登录号: AY531262.1), 应用 Primer 5.0 软件设计 3 对引物, 分 3 个片段 (1、2 和 3 段) PCR 扩增 *tva* 基因全长序列 3 607 bp, 引物信息见表 1。提取黄羽肉鸡品系 CB01~CB15 血液样品的基因组 DNA, 用该 3 对引物 PCR 扩增 *tva* 基因全长序列。将 PCR 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 应用 DNASTAR 和 Mutation Surveyor 基因序列分析软件比对 *tva* 基因序列和测序序列, 分析黄羽肉鸡品系 *tva* 基因的遗传变异, 对 *tva* c.3G>A 突变位点进行基因分型。

胞置于 CO₂ 体积分数为 5%、37℃ 的培养箱内培养。

1.6 流式细胞术检测 RCASBP(A)-GFP 报告病毒感染

将重组质粒 RCASBP(A)-EGFP 转染入 DF-1 细胞中, 转染后第 7 天, 拯救并收集 DF-1 细胞上清液中表达绿色荧光蛋白的重组病毒 RCASBP(A)-GFP, 测定病毒感染单位 (IU) 后, 分装保存于 -80℃ 备用。分离与培养 *tva* c.3G>A 突变位点野生型 *tva* c.3G/G、杂合突变型 *tva* c.3G/A 和纯合突变型 *tva* c.3A/A CEF, 分别接种于 24 孔板中, 每孔接种 5×10^4 个细胞, 培养 24 h 后, 每孔接种 5×10^5 IU/mL 的 RCASBP(A)-GFP 病毒液。孵育 2 h 后, 弃掉病毒液, 用含 1%(v) 胎牛血清的维持液继续培养。感染后第 1、2、3、7 天, 使用 Cytomics FC 500 分析仪 (Beckman Coulter, USA) 通过荧光激活细胞分选 (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) 定量 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型 CEF 的 GFP 阳性细胞百分比。

1.7 ALV-A 体内感染试验

前期研究发现 *tva* c.3G>A 突变主要存在于 CB06 品系。从 CB06 品系随机挑选 75 只 1 日龄雏

鸡随机分为 3 组, 每组 25 只商品鸡和 3 只 SPF 鸡作为对照, 饲养于 3 个隔离器, 并随意提供饲料和水。1 日龄时, 每只雏鸡腹腔接种 ALV-A GD08 株病毒液 (S/P=2.1) 0.2 mL, 5 日龄时, 再攻毒 1 次。攻毒后 1 周, 采集每只雏鸡抗凝血样, 抽取全基因组 DNA, 通过直接测序方法对每只雏鸡 *tva* c.3G>A 突变位点进行基因分型。攻毒后 1 个月, 采集雏鸡的血样, 利用 Trizol 试剂盒抽提血样总 RNA, 利用 ALV-A GD08 株特异性检测引物, RT-PCR 检测每只雏鸡的病毒血症情况, 确定 *tva* c.3G>A 突变不同基因型雏鸡对 ALV-A GD08 株的感染状态^[18]。

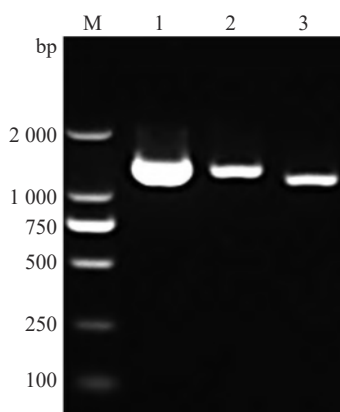
1.8 统计分析

所有数据均使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行绘图和数据分析, 2 组数据比较采用独立样本 *t* 检验分析, 数据结果以平均值±标准差表示。利用 Popgene 软件分析 *tva* c.3G>A 突变位点在我国黄羽肉鸡品系中的基因型频率分布。

2 结果与分析

2.1 黄羽肉鸡品系中 *tva* c.3G>A 突变位点的鉴定

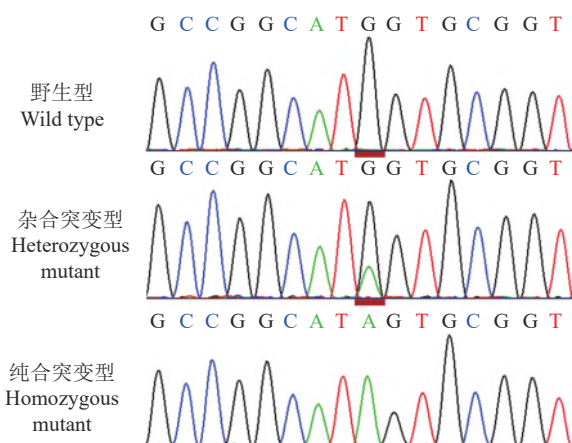
为了剖析中国黄羽肉鸡品系 *tva* 受体基因的遗传变异, 分 3 个片段 PCR 扩增每只鸡 *tva* 受体基因的基因组区域。如图 1 所示, PCR 扩增出 *tva* 基因的 1、2 和 3 片段的目的条带, 片段大小与预期结果相符。将 PCR 产物进行 Sanger 测序, 发现中国黄羽肉鸡品系 *tva* 基因 DNA 序列第 260 位碱基存在由 G 突变为 A 的自然突变 (图 2), 进一步分析推测该突变致使 *tva* 基因编码区第 3 位碱基由 G 突变为 A, 引起 *tva* 基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA, 将该 *tva* 基因自然突变命名为 *tva* c.3G>A。为了证实纯合突变型 *tva* c.3A/A 转录本存在 G>A 突变, RT-PCR 扩增野生型 *tva* c.3G/G 和纯合



M: DL2000 marker; 1~3: *tva* 基因的 1、2 和 3 片段
M: DL2000 marker; 1~3: Fragment 1, 2 and 3 of *tva* gene

图 1 *tva* 基因 3 个片段的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplified results of three fragments of *tva* gene

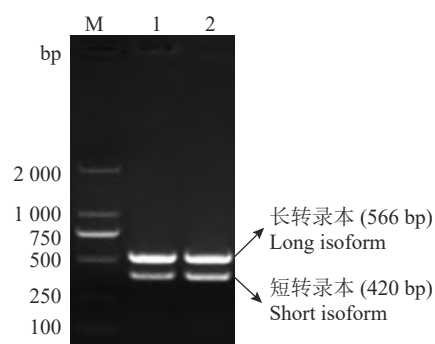


红色加粗标注为 *tva* 基因 DNA 序列第 260 位碱基由 G 突变为 A
The positions of the mutates from G to A at 260th base of *tva* gene are underlined in red bold

图 2 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型测序图

Fig. 2 Sequence traces for *tva* c.3G>A mutation sites of different genotypes

突变型 *tva* c.3A/A 血液 *tva* 基因整个编码序列。结果如图 3 所示, *tva* c.3G/G 和 *tva* c.3A/A 基因型血样均扩增出 566 和 420 bp 的条带, 表明 *tva* c.3G>A 突变位点在不同基因型血样均可扩增出 *tva* 基因长、短 2 个转录本。RT-PCR 产物的克隆测序结果表明, 与野生型 *tva* c.3G/G 相比, 纯合突变型 *tva* c.3A/A 基因型 2 个 *tva* cDNA 序列第 3 位碱基均由 G 突变为 A, 引起 Tva 受体蛋白氨基酸序列第 1 个氨基酸由甲硫氨酸 (M) 改变为异亮氨酸 (I)。



M: DL2000 marker; 1: 野生型 *tva* c.3G/G; 2: 纯合突变型 *tva* c.3A/A
M: DL2000 marker; 1: Wild type *tva* c.3G/G; 2: Homozygous mutant *tva* c.3A/A

图 3 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型血样全长 *tva* 编码序列的 RT-PCR 扩增结果

Fig. 3 RT-PCR amplified results of the full-length *tva* coding sequences for blood samples from different genotypes of *tva* c.3G>A mutation site

2.2 *tva* c.3G>A 突变致宿主体外抗 ALV-A 感染

RCASBP(A)-EGFP 重组质粒转染 DF-1 细胞 48 h 后, 用倒置荧光显微镜观察到 GFP 荧光标记蛋白表达, 表明成功拯救了 RCASBP(A)-GFP 荧光报告病毒 (图 4)。为探究 *tva* c.3G>A 突

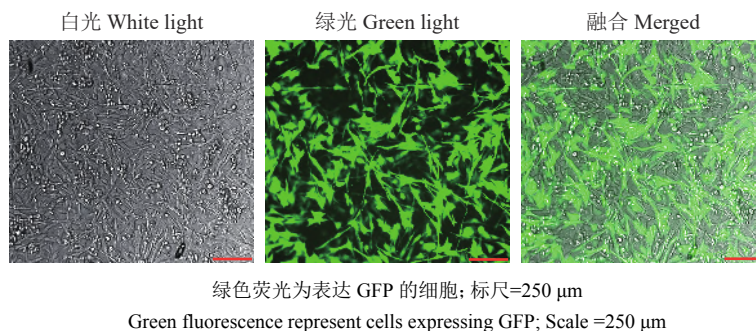
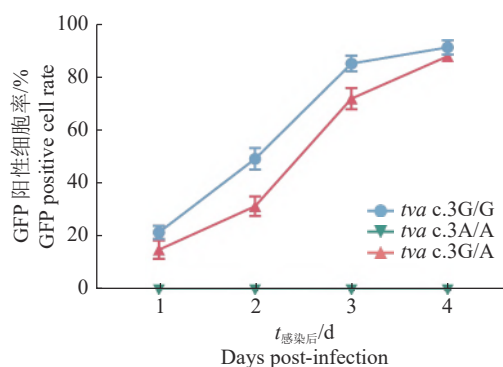
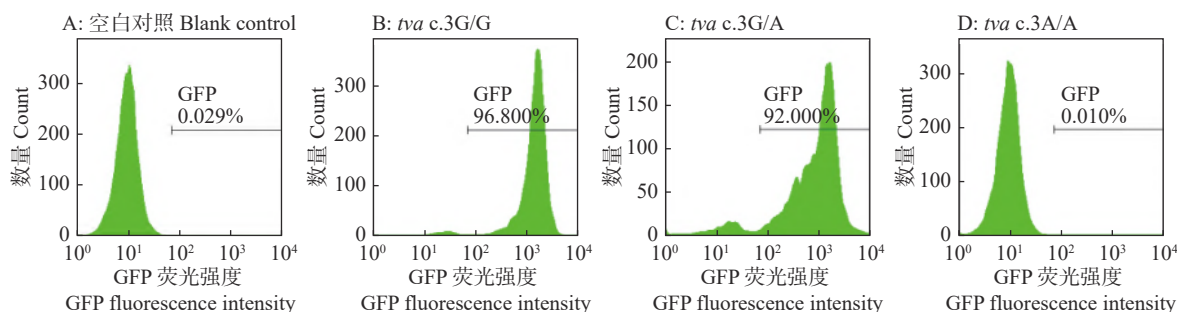


图4 RCASBP(A)-EGFP 质粒转染 DF-1 细胞 48 h 后的绿色荧光蛋白表达

Fig. 4 Expression of green fluorescent protein in DF-1 cells after transfection with RCASBP(A)-EGFP plasmid for 48 h

变对宿主细胞体外感染 ALV-A 的影响, 利用拯救的 RCASBP(A)-GFP 荧光报告病毒分别感染 *tva* c.3G/G、*tva* c.3G/A 和 *tva* c.3A/A CEF, 感染后不同时间点利用流式细胞术检测 RCASBP(A)-GFP 对 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型 CEF 的感染情况, 结果如图 5 和 6 所示。野生型 *tva* c.3G/G CEF 和杂合突变型 *tva* c.3G/A CEF 对 RCASBP(A)-GFP 病毒易感, 而纯合突变型 *tva* c.3A/A CEF 抗 RCASBP(A)-GFP 的感染, 表明 *tva* c.3G>A 突变导致宿主体外抗 RCASBP(A)-GFP 的感染。

图5 *tva* c.3G/G、*tva* c.3G/A 和 *tva* c.3A/A CEF 感染 RCASBP(A)-EGFP 的过程Fig. 5 Time course of infection of *tva* c.3G/G, *tva* c.3G/A and *tva* c.3A/A CEFs with RCASBP(A)-EGFP图6 流式细胞术检测 *tva* c.3G>A 突变位点不同基因型 CEF 感染 RCASBP(A)-GFP 7 d 后的 GFP 阳性细胞率Fig. 6 GFP positive cell rates for CEFs of different genotypes of *tva* c.3G>A mutation site seven days after infection with RCASBP(A)-GFP detected by flow cytometry

2.3 *tva* c.3G>A 突变致宿主体内抗 ALV-A 感染

为探究 *tva* c.3G>A 突变对宿主体内感染 ALV-A 的影响, 利用 ALV-A 野毒感染 *tva* c.3G>A 突变野生型、杂合突变型、纯合突变型雏鸡。作为阳性对照, 9 只 SPF 雏鸡攻 ALV-A 野毒后均为 ALV-A 阳性, 说明 ALV-A 体内攻毒试验成立。ALV-A 攻毒试验结果显示, 野生型 *tva* c.3G/G 雏鸡 (25 只) 攻 ALV-A 野毒后均为 ALV-A 阳性, 杂合突变型 *tva* c.3G/A 雏鸡 (28 只) 攻 ALV-A 野毒后病毒血症阳性率为 75%, 而纯合突变型 *tva* c.3A/A 雏鸡 (22 只) 攻 ALV-A 野毒后均为 ALV-A 阴性 (表 2)。

结果表明, *tva* c.3G>A 突变导致宿主体内抗 ALV-A 的感染, ALV-A 体内攻毒试验结果与 ALV-A 体外感染试验结果一致, 证实 *tva* c.3G>A 突变位点为 ALV-A 的遗传抗性位点。

2.4 *tva* c.3G>A 抗性位点在不同黄羽肉鸡品系的基因型频率分布

不同黄羽肉鸡品系 *tva* c.3G>A 抗性位点的基因分型结果如表 3 所示。CB01、CB08、CB10 和 CB15 品系中检测到 *tva* c.3G>A 抗性位点的杂合基因型 *tva* c.3G/A, 其频率分别为 0.05、0.05、0.10 和 0.14, 在 CB01、CB08、CB10 和 CB15 品系中检测到

表 2 ALV-A 攻毒后雏鸡病毒血症阳性率

Table 2 Positive infection rate of viremia in chicks infected by ALV-A

雏鸡 Chick	基因型 Genotype	阳性样品数/总样品数 No. of positive samples/Total No. of samples	阳性感染率/% Positive infection rate
SPF	<i>tva</i> c.3G/G	9/9	100
	<i>tva</i> c.3G/G	25/25	100
CB06	<i>tva</i> c.3G/A	21/28	75
	<i>tva</i> c.3A/A	0/22	0

表 3 我国黄羽肉鸡品系 *tva* c.3G>A 抗性位点的基因型频率分布Table 3 Genotypic frequency of *tva* c.3G>A resistance locus in Chinese yellow-feathered broiler lines

品系 Line	样品数/只 No. of samples	基因型 Genotype		
		<i>tva</i> c.3G/G	<i>tva</i> c.3G/A	<i>tva</i> c.3A/A
CB01	60	0.85	0.05	0.10
CB02	50	1	0	0
CB03	36	1	0	0
CB04	30	1	0	0
CB05	48	1	0	0
CB06	60	1	0	0
CB07	30	1	0	0
CB08	60	0.80	0.05	0.15
CB09	30	1	0	0
CB10	60	0.67	0.10	0.23
CB11	35	1	0	0
CB12	45	1	0	0
CB13	60	1	0	0
CB14	30	1	0	0
CB15	36	0.78	0.14	0.08

纯合抗性基因型 *tva* c.3A/A, 其频率分别为 0.10、0.15、0.23 和 0.08, 其余黄羽肉鸡品系所检样品均为野生型 *tva* c.3G/G。

3 讨论与结论

本研究鉴定了中国黄羽肉鸡品系 *tva* 受体基因中存在 1 种自然突变位点, 即 *tva* 基因编码区第 3 位碱基由 G 突变为 A, 引起 *tva* 基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA, 致使宿主对 ALV-A 体外、体内的感染产生遗传抗性, 证实 *tva* c.3G>A 突

变位点为 ALV-A 的遗传抗性位点。据我们所知, 本研究首次报道了受体基因起始密码子序列突变可以引起宿主遗传性抗特定 ALV 亚群的感染, 这增强了我们对 ALV-A 宿主共同进化的理解。

尽管种鸡群净化策略和生物安全措施已用来控制禽白血病^[20], 但这些传统方法并不能完全消除禽白血病在中国和东南亚国家的发生与流行^[21-22]。ALV 在鸡群中的流行, 致使暴露于 ALV 的宿主可能会受到选择性压力而对 ALV 的感染产生完全抗性或者至少降低了对 ALV 感染的易感性。*tva*、*tvb*、*tvb* 和 *chNEH1* 受体基因分别编码 Tva、Tvb、Tvc 和 NHE1 受体蛋白, 分别介导宿主细胞对 ALV-A、ALV-B/D/E、ALV-C 和 ALV-J 的感染^[14, 23-25]。受体基因的遗传突变会导致受体蛋白的完全缺失或表达一个缺陷型受体蛋白, 从而引起宿主对 ALV 的感染产生遗传抗性。目前, 已在国外某些白来航近交品系和中国肉鸡品系中鉴定了致使宿主细胞对 ALV-A、ALV-B/D/E 和 ALV-C 感染产生遗传抗性的受体基因遗传突变^[16, 24, 26]。Elleder 等^[16]在白来航品系 C 中发现 *tva* 基因第 619 碱基由 C 变为 G(*tva*^{r1}), 引起编码的氨基酸由 Cys 改变为 Trp, 大大降低 ALV-A 囊膜糖蛋白与 Tva 受体的亲和力, 从而对 ALV-A 的感染产生遗传抗性。Elleder 等^[16]在白来航品系 7₂ 中发现 *tva* 基因碱基序列第 305—306 位点插入 CTCG 4 个碱基 (*tva*^{r2}), 导致 Tva 受体蛋白缺失表达, 从而产生对 ALV-A 的抗性。Chen 等^[18]研究发现中国鸡种存在 *tva*^{r3}、*tva*^{r4}、*tva*^{r5} 和 *tva*^{r6} ALV-A 遗传抗性位点, 其为位于 *tva* 受体基因内含子 1 破裂点信号保守区域的 4 种缺失突变, *tva*^{r3} 为 *tva* 基因第 507—516 碱基 (序列为 ACCCCGCCCC) 缺失、*tva*^{r4} 为 *tva* 基因第 507—511 碱基 (序列为 ACCCC) 缺失、*tva*^{r5} 为 *tva* 基因第 502—511 碱基 (序列为 CGCTCACC CC) 缺失、*tva*^{r6} 为 *tva* 基因第 502—516 碱基 (序列为 CGCTCACCCCGCCCC) 缺失, 这 4 种 *tva* 受体基因遗传突变均影响 *tva* 基因 mRNA 的剪切, 降低了 ALV-A 囊膜糖蛋白与 Tva 受体蛋白结合的亲和力, 从而降低宿主细胞对 ALV-A 的易感性。本研究在我国黄羽肉鸡品系中发现 *tva* 受体基因起始密码子序列由 ATG 突变为 ATA, 引起 Tva 受体蛋白氨基酸序列第 1 个氨基酸由甲硫氨酸 (M) 改变为异亮氨酸 (I), 推测该突变导致 Tva 受体蛋白的表达完全缺失, 从而引起宿主抗 ALV-A 的感染。

抗病育种是控制禽白血病的有效策略和重要途径, 为评估不同黄羽肉鸡品系对 ALV-A 的遗传

抗性,本研究对 15 个黄羽肉鸡品系 *tva* c.3G>A 抗性位点进行了基因分型,结果发现 CB01、CB08、CB10 和 CB15 品系存在 *tva* c.3G>A 抗性位点,其纯合抗性基因型 *tva* c.3A/A 的频率分别为 0.10、0.15、0.23 和 0.08,提示这些黄羽肉鸡品系具有良好的抗 ALV-A 遗传改良潜力,可从这些鸡品系中筛选出培育抗 ALV-A 感染的育种素材,并运用于 ALV-A 遗传抗性鸡品种的选育,为实现 A 亚群禽白血抗病育种提供理论依据和技术支撑。

参考文献:

- [1] 李德娟,崔梦笛,王学静,等. 禽白血病毒及其受体研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022(9): 34-41.
- [2] 王鑫,赵鹏,崔治中. 我国地方品种鸡分离到的一个禽白血病毒新亚群的鉴定[J]. 病毒学报, 2012, 28(6): 609-614.
- [3] PAYNE L N, NAIR V. The long view: 40 years of avian leukosis research[J]. Avian Pathology, 2012, 41(1): 11-19.
- [4] 崔治中. 禽白血病毒研究的过去、现在和将来[J]. 生命科学, 2012, 24(4): 305-309.
- [5] 崔治中. 种鸡场禽白血病防控和净化技术方案[J]. 中国家禽, 2015, 37(23): 1-7.
- [6] 俞燕. 地方品种鸡群禽白血病流行病学调查及检测净化技术研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [7] SU Q, LI Y, LI W, et al. Molecular characteristics of avian leukosis viruses isolated from indigenous chicken breeds in China[J]. Poultry Science, 2018, 97(8): 2917-2925.
- [8] 冯敏,谭利强,代曼曼,等. 种禽场 A 亚群禽白血病毒原学调查及分离株遗传进化分析[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(4): 11-15.
- [9] 钱琨,朱钰峰,沈海玉,等. 地方蛋鸡群 A 亚群禽白血病毒的分离与全基因组序列分析[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(10): 1005-1010.
- [10] 杨波,高玉龙,高宏雷,等. 我国东北地区野生鸟类 A 亚群禽白血病毒分子流行病学调查及 *env* 基因序列分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(3): 245-247.
- [11] BACON L D, HUNT H D, CHENG H H. A review of the development of chicken lines to resolve genes determining resistance to diseases[J]. Poultry Science, 2000, 79(8): 1082-1093.
- [12] JIE H, LIU Y P. Breeding for disease resistance in poultry: Opportunities with challenges[J]. World's Poultry Science Journal, 2011, 67(4): 687-696.
- [13] CHENG H H, KAISER P, LAMONT S J. Integrated genomic approaches to enhance genetic resistance in chickens[J]. Annual Review of Animal Biosciences, 2013, 1: 239-260.
- [14] BATES P, YOUNG J A, VARMUS H E. A receptor for subgroup A Rous sarcoma virus is related to the low density lipoprotein receptor[J]. Cell, 1993, 74(6): 1043-1051.
- [15] BARNARD R J, ELLEDER D, YOUNG J A. Avian sarcoma and leukosis virus-receptor interactions: From classical genetics to novel insights into virus-cell membrane fusion[J]. Virology, 2006, 344(1): 25-29.
- [16] ELLEDER D, MELDER D C, TREJBALOVA K, et al. Two different molecular defects in the *Tva* receptor gene explain the resistance of two *tvar* lines of chickens to infection by subgroup A avian sarcoma and leukosis viruses[J]. Journal of Virology, 2004, 78(24): 13489-13500.
- [17] REINISOVA M, PLACHY J, TREJBALOVA K, et al. Intronic deletions that disrupt mRNA splicing of the *tva* receptor gene result in decreased susceptibility to infection by avian sarcoma and leukosis virus subgroup A[J]. Journal of Virology, 2012, 86(4): 2021-2030.
- [18] CHEN W, LIU Y, LI H, et al. Intronic deletions of *tva* receptor gene decrease the susceptibility to infection by avian sarcoma and leukosis virus subgroup A[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 9900.
- [19] LIAO C T, CHEN S Y, CHEN W G, et al. Single nucleotide polymorphism variants within *tva* and *tvb* receptor genes in Chinese chickens[J]. Poultry Science, 2014, 93(10): 2482-2489.
- [20] KREAGER K S. Chicken industry strategies for control of tumor virus infections[J]. Poultry Science, 1998, 77(8): 1213-1216.
- [21] MENG F, LI Q, ZHANG Y, et al. Characterization of subgroup J avian leukosis virus isolated from Chinese indigenous chickens[J]. Virology Journal, 2018, 15(1): 33.
- [22] LI H, TAN M, ZHANG F, et al. Diversity of Avian leukosis virus subgroup J in local chickens, Jiangxi, China[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 4797.
- [23] ADKINS H B, BLACKLOW S C, YOUNG J A. Two functionally distinct forms of a retroviral receptor explain the nonreciprocal receptor interference among subgroups B, D, and E avian leukosis viruses[J]. Journal of Virology, 2001, 75(8): 3520-3526.
- [24] ELLEDER D, STEPANETS V, MELDER D C, et al. The receptor for the subgroup C avian sarcoma and leukosis viruses, *Tvc*, is related to mammalian butyrophilins, members of the immunoglobulin superfamily[J]. Journal of Virology, 2005, 79(16): 10408-10419.
- [25] CHAI N, BATES P. Na/H exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(14): 5531-5536.
- [26] LI X, CHEN W, ZHANG H, et al. Naturally occurring frameshift mutations in the *tvb* receptor gene are responsible for decreased susceptibility of chicken to infection with avian leukosis virus subgroups B, D, and E[J]. Journal of Virology, 2018, 92(8): e01770-e01717.

【责任编辑 庄 延】



Research Article

Semen extracellular vesicles mediate vertical transmission of subgroup J avian leukosis virus



Liqin Liao^{a,b,e,1}, Weiguo Chen^{a,b,e,f,1}, Xiangyu Zhang^{a,e}, Huanmin Zhang^c, Aijun Li^d,
Yiming Yan^{a,b,e}, Zi Xie^{a,b,e}, Hongxing Li^{a,b,e}, Wencheng Lin^{a,b,e,f}, Jingyun Ma^{a,b,e,f},
Xinheng Zhang^{a,b,e,*}, Qingmei Xie^{a,b,e,f,*}

^a Heyuan Branch, Guangdong Provincial Laboratory of Lingnan Modern Agricultural Science and Technology, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, 510642, China

^b Guangdong Provincial Key Lab of Agro Animal Genomics and Molecular Breeding, Guangzhou, 510642, China

^c USDA, Agriculture Research Service, Avian Disease and Oncology Laboratory, East Lansing, MI, 48823, USA

^d College of Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, 510632, China

^e Key Laboratory of Animal Health Aquaculture and Environmental Control, Guangdong, Guangzhou, 510642, China

^f Guangdong Engineering Research Center for Vector Vaccine of Animal Virus, Guangzhou, 510642, China

ARTICLE INFO

Keywords:

Semen extracellular vesicles (SE)
Subgroup J avian leukosis virus (ALV-J)
Infection
Vertical transmission

ABSTRACT

Subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) is a highly oncogenic retrovirus that has been devastating the global poultry industry since the late 1990s. The major infection model of ALV-J is vertical transmission, which is responsible for the congenital infection of progeny from generation to generation. Increasing evidence has suggested that extracellular vesicles (EVs) derived from virus-infected cells or biological fluids have been thought to be vehicles of transmission for viruses. However, the role of EVs in infection and transmission of ALV-J remains obscure. In the present study, semen extracellular vesicles (SE) were isolated and purified from ALV-J-infected rooster seminal plasma (SE-ALV-J), which was shown to contain ALV-J genomic RNA and partial viral proteins, as determined by RNA sequencing, reverse transcription-quantitative PCR and Western blotting. Furthermore, SE-ALV-J was proved to be able to transmit ALV-J infection to host cells and establish productive infection. More importantly, artificial insemination experiments showed that SE-ALV-J transmitted ALV-J infection to SPF hens, and subsequently mediated vertical transmission of ALV-J from the SPF hens to the progeny chicks. Taken together, the results of the present study suggested that ALV-J utilized host semen extracellular vesicles as a novel means for vertical transmission, enhancing our understanding on mechanisms underlying ALV-J transmission.

1. Introduction

Subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) is a positive sense, single-stranded RNA virus, which belongs to the *Alpharetrovirus* genus of family *Retroviridae* (Neoplastic Diseases, 2013). ALV-J genome is 7.6 kb in length and mainly consists of *gag*, *pol*, and *env* genes, which encode Gag (including capsid protein p27), reverse transcriptase as well as integrase, and envelope glycoproteins consisting of protein gp85 and gp37, respectively (Payne et al., 1993; Venugopal et al., 1997; Bai et al., 1998). Since its discovery in the United Kingdom (Payne et al., 1991), ALV-J has been in the news media spotlight due to its global spread and devastating

effects on poultry flocks in the world (Fadly and Smith, 1999; Landman et al., 2002; Li et al., 2020). Indeed, ALV-J infection remains pervasive throughout China and in other Asian countries (F. Meng et al., 2018; F. Meng et al., 2018; P Wang et al., 2018; Wang et al., 2020). Furthermore, the epidemic strains of ALV-J are not only capable to induce hemangiosarcomas, myelocytomatosis and visceral neoplasms, but also to cause poor production performance and severe immunosuppression (Payne and Nair, 2012; Malhotra et al., 2015; Zhou et al., 2019). These evidences indicate that ALV-J may have been responsible for the tremendously economic losses within worldwide poultry industry (Wang et al., 2012; Shen et al., 2014).

* Corresponding authors.

E-mail addresses: xhzhang@scau.edu.cn (X. Zhang), qmx@scau.edu.cn (Q. Xie).

¹ Contributed equally to this work.

ALV-J can be readily transmitted vertically from hen to chicks via fertile eggs or horizontally from bird to bird by early contact (Rubin et al., 1962). Notably, vertical transmission of ALV-J is the major route of ALV-J infection and is more deleterious than horizontal route due to higher efficiency of transmission from eggs to progenies and higher efficiency of virus shedding. (Lin et al., 2013). Vertical transmission of ALV-J may occur through the venereal route resulted from mating of infected roosters and healthy hens (Smith and Fadly, 1994), which implies that ALV-J-infected roosters play a pivotal role in transmission of ALV-J and may be responsible for the congenital infection of chicks during reproduction from one generation to the next. Once the breeding flocks, particularly breeder roosters, are infected by ALV-J, it is reasonably assumed that a large number of commercial chickens would be infected by ALV-J as a result of vertical transmission. Therefore, an improved understanding of the mechanisms underlying vertical transmission of ALV-J is required to enable the development of novel therapies for control and elimination of the ALV-J infection.

The primary vector for vertical transmission of ALV-J is semen, a complex bodily fluid mainly composed of spermatozoa cells and seminal plasma (Dhama et al., 2014). In addition to the soluble constituents, a variety of semen extracellular vesicles (SE) are contained in the plasma (Vojtech et al., 2014; Welch et al., 2017). Extracellular vesicles (EVs), including SE, are double membraned vesicles derived from multivesicular bodies during the maturation of endosomes (Thery et al., 2002). Extracellular vesicles have been shown to contain a variety of biological materials, including proteins, lipids, and genetic material such as DNA, RNA and microRNA, which deliver their cargo to recipient cells, reportedly mediating intercellular communications and thus participating in various biological and pathological processes (Kalluri and LeBleu, 2020; Kumar et al., 2020). Over the past decade, a growing body of literature has shown that EVs play pivotal roles in viral pathogenesis and serve as vector for the transmission of a variety of viruses (Chahar et al., 2015; Urbanelli et al., 2019). For instance, EVs released from porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)-infected cells contain PRRSV RNA and proteins, which can mediate the transmission of PRRSV in both susceptible and non-susceptible naive cells (T Wang et al., 2018). EVs have also been shown to play dual roles in mediating the transmission of hepatitis A Virus (HAV) and hepatitis C Virus (HCV), thereby avoiding immune surveillance (Longatti, 2015). Intriguingly, several studies have shown that EVs serve as a novel mode of flavivirus transmission from arthropod to human cells (Vora et al., 2018; Zhou et al., 2018). Langat virus (LGTV)-infected tick cell-derived exosomes have been shown to contain infectious virus RNA and protein, which facilitate transmission of LGTV from tick to vertebrate host cells (Zhou et al., 2018). Dengue virus (DENV)-infected mosquito cell-derived exosomes contain infectious DENV RNA and proteins, which can serve as a means for DENV transmission from mosquito to mammalian cells (Vora et al., 2018). These studies highlighted the crucial role of EVs in viral life cycle. On the other hand, some viruses are reportedly evolved in hijacking cellular EVs pathways, such that to mediate viral infection and transmission (Urbanelli et al., 2019). One earlier study reported that ALV-J infection can promote the production of exosomes, and partial viral proteins were observed in ALV-J-infected DF-1 cell-derived exosomes (Wang et al., 2017), but the roles of EVs in ALV-J infection and transmission still largely need to be elucidated.

In this study, we aimed to understand the composition and functionality of extracellular vesicles from ALV-J-infected rooster seminal plasma (SE-ALV-J) in relation to ALV-J transmission and infection in chicken.

2. Materials and methods

2.1. Cell culture and viruses

Chicken embryo fibroblasts (CEFs) were prepared from 10-day-old Specific Pathogen Free (SPF) chicken embryos, which were obtained from Guangdong Wen's DaHuaNong Biotechnology Co., Ltd., as described

previously (Federspiel and Hughes, 1997). CEFs and DF-1 cells (immortalized chicken embryo fibroblast cells) were cultured in DMEM (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) supplemented with 10% exosome-depleted FBS (System Biosciences, Inc.) and 1% penicillin-streptomycin at 37 °C with 5% CO₂. The ALV-J strain GD1109 (GenBank: accession no. JX254901.1) used throughout this study was associated with hemangioma and stored in our lab following propagation and titration in DF-1 cells.

2.2. Animal challenge experiments

A total of 15 one-day-old SPF male chicks were inoculated with 0.3 mL 1×10^5 /mL TCID₅₀ of ALV-J strain GD1109 virus stock per chick intra-abdominally and inoculated once again when they were 5 days old. Anti-coagulated blood samples were collected from all the inoculated SPF male chickens every 4 weeks starting from the 4th week until the 24th week post-infection, and tested for ALV-J infection status by viral isolation as previously described (Fanfeng Meng et al., 2018). Another 15 one-day-old SPF male chicks and 30 one-day-old SPF female chicks were not infected and used as the healthy chick controls. All SPF White Leghorn chicks were purchased from Guangdong Wen's DaHuaNong Biotechnology Co., Ltd. and were raised in negative-pressure-filtered air isolators under quarantined conditions. All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee at the South China Agricultural University (approval ID: SYXK-2019-0136).

2.3. Isolation and purification of semen EVs and free ALV-J

Semen samples were collected from experimentally ALV-J infected SPF White Leghorn roosters (n = 15) and healthy SPF White Leghorn roosters (n = 15), respectively. ALV-J-infected and uninfected rooster semen samples were pooled with every 5 roosters, respectively, and stored at –80 °C. The procedure for isolation and purification of SE-ALV-J and SE from mock-infected rooster semen samples (SE-Mock), as well as free ALV-J particles was as described previously (Bukong et al., 2014) with minor modifications. Briefly, ALV-J-infected and mock-infected rooster semen samples were thawed on ice and centrifuged (300×g, 10 min, 4 °C; 2,400×g, 10 min, 4 °C; 10,000×g, 30 min, 4 °C) to remove cellular debris. The seminal plasma was filtered through a 0.22-μm PVDF (EMD Millipore) and subsequently mixed with Exo-Quick reagent (System Biosciences, Inc., USA) at a ratio of 4:1 (seminal plasma: Exo-Quick), and incubated at 4 °C overnight according to the manufacturer's protocol. The mixture was then centrifuged at 1,500×g for 30 min at 4 °C to remove the supernatant. The resulting SE-ALV-J, free ALV-J and SE-Mock pellets were resuspended in PBS in 1/5 of the original volume of semen. Then, the SE-ALV-J, ALV-J and SE-Mock pellets were further purified using Exosome-human CD63 Isolation kit CD63-labeled-Dynabeads (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) according to the manufacturer's protocol. After the isolation, SE-ALV-Js (the pellet) were separated from ALV-J virion (the supernatant). And among SE-ALV-J, SE-Mock and free ALV-J were used for downstream experiments. Finally, SE-ALV-J and SE-Mock were eluted from the Dyna-beads with 100 mmol/L ice-cold Glycine-HCl (pH 3.0) and neutralized to pH 7.4 using 1 mol/L Tris-HCl buffer (pH 8.5).

2.4. Electron microscopy and immunogold labeling

The purified SE-ALV-J, and purified ALV-J free particles were resuspended in PBS and then spotted onto Formvar-coated 400-mesh copper grids. Subsequently, the adsorbed SE-ALV-J, SE-Mock or virions were fixed in 4% paraformaldehyde at room temperature for 30 min. Excess liquid was removed using filter paper. The grids were negatively stained with uranyl acetate for 1 min and then observed using a transmission electron microscope (TEM; Talos F200S; Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). For immunogold labeling, the SE-ALV-J or viral suspensions were deposited on Formvar-coated nickel grids and fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min. After washing with PBS, the grids were blocked

with PBS containing 5% BSA for 30 min and incubated with primary antibody against CD63 (System Biosciences, Inc., USA) and gp85 (made in our laboratory), and then with 10-nm colloidal gold-conjugated secondary antibody (goat anti-rabbit IgG). Finally, the grids were washed five times with blocking buffer, rinsed in deionized water, and then negatively stained and visualized as indicated above.

2.5. Nanoparticle tracking analysis (NTA)

NTA was performed using a Nano-sight LM-10 instrument (Nano-Sight) according to the manufacturer's protocol. For each sample of SE-ALV-J and SE-Mock, NTA was performed for 1 min and measured three times. Size distributions and concentrations of each sample were obtained by analyzing 1 min videos of data collection using the NTA software (version 2.3). The results represent the mean \pm standard deviation of SE-ALV-J and SE-Mock isolations.

2.6. RNA sequencing analysis

To exclude the contamination of RNA, the EVs were firstly treated with RNase to eliminate non-vesicular RNA. Total RNA was isolated from SE-ALV-J samples and SE-Mock samples using TRIzol® reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) according to the manufacturer's protocol. The RNA samples from SE-ALV-J or SE-Mock were pooled (respectively) in equal amounts, and total RNA yield was determined using electrophoresis (Agilent Bioanalyzer 2100; Agilent Technologies, Inc., USA). The resulting RNAs from SE-ALV-J and SE-Mock samples were used to prepare the RNA sequencing library as previously described (Zhang et al., 2016). RNA sequencing was performed on an Illumina NextSeq 500 platform (Illumina, Inc.). The raw FASTQ files for each sample from the RNA-Seq were trimmed three times using Cutadapt software (Kechin et al., 2017). The trimmed reads were mapped to the Gallus gallus reference genome (galGal6), ALV-J strain GD1109 genomic sequences (GenBank accession no. JX254901.1), as well as its *gag*, *pol* and *env* coding region sequences (CDS) using Bowtie2 version 2.1.0 (Langmead and Salzberg, 2012).

2.7. SE labeling and uptake

The SE-ALV-J or SE-Mock were labeled with the red dye DiI (1,1'-Diiododecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, DiI was diluted with PBS to a working concentration of 5 μ mol/L, and added to SE-ALV-J-PBS or SE-Mock-PBS suspensions (v/v, 1:5). The dye solution and the SE-ALV-J-PBS or SE-Mock-PBS suspensions were mixed and incubated for 20 min. The labeled SE-ALV-J or SE-Mock were centrifuged and washed to remove the excess dye. DF-1 cells (2×10^4) were seeded in a Laser confocal petri dish and cultured overnight in DMEM with 10% FBS. DiI labeled SE-ALV-J or SE-Mock (25 mg/mL) were added to 60–70% confluent DF-1 cells in 5% CO₂ at 37 °C for 2 h. The cells were washed three times with PBS and labeled using a green fluorescent DiO (3,3'-Diiododecylmethyloxycarbocyanine Perchlorate; Sigma-Aldrich; Merck KGaA, USA) to stain the plasma membranes of the cells. The cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized, blocked in 5% BSA solution, and subsequently incubated with an anti-gp85 antibody (made in our laboratory), followed by immunofluorescence staining with Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG or Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA). The cell nuclei were stained with DAPI. Imaging was performed using a confocal laser-scanning microscope (Leica X, Leica Microsystems, Inc., Germany) to detect the uptake of SE by DF-1 cells for 2 h and 4 h.

2.8. SE-ALV-J infection assays in vitro

RNase (sigma) was added to purified EVs and incubation for 1 h at 37 °C before infection. For Fifty-percent tissue culture infective dose

(TCID₅₀) assays, purified ALV-J free particles or SE-ALV-J (diluted from 10^{-1} to 10^{-8} with DMEM) were added into 96-well plate (seeded with 5×10^4 DF-1 cells or CEFs per well) and TCID₅₀ was analyzed with Spearman-Kärber formula. For infection assays, DF-1 cells or CEFs were seeded at a density of 5×10^5 cells per well in a 12-well plate. Approximately 5×10^5 TCID₅₀ of free ALV-J particles and SE-ALV-J were added to the cells. After 2 h of incubation, the medium was replaced with fresh maintenance medium and incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 72 h. At 12, 24, 36, 48, or 72 h post-infection, cell samples were collected, and total RNA were extracted to determine ALV-J RNA copy numbers by using reverse transcription-quantitative RT-qPCR. At the same time, the collected cell samples were lysated and subjected to analyze ALV-J gp85 protein expression by Western blotting.

2.9. Western blotting

Cells and SE were lysed in RIPA lysis buffer (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA), loaded on a 10% SDS gel, resolved using SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (EMD Millipore). Membranes were blocked in 5% skimmed milk, 0.05% Tween 20 in PBS, and subsequently incubated with the primary antibodies at 4 °C overnight, followed by incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies against goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (Beyotime Institute of Biotechnology, China) at room temperature for 1 h. Signals were visualized using an ECL Advance western blotting detection kit (CW Biotechnology, China). Bands were imaged using an Azure c300 digital imager system (Azure Biosystems), CD81 (System Biosciences, Inc., USA), CD63 (System Biosciences, Inc., USA), tumor susceptibility gene 101 (TSG101; Absin Biotechnology, China), GPR78 (Abcam, UK), β -actin (CW Biotechnology, China), and ALV-J p27, gp37 and gp85 (made in our laboratory) were used primary antibodies.

2.10. Analysis and quantification of ALV-J RNA

To detect ALV-J RNA, total RNA was extracted from seminal EVs (RNase treated) using TRIzol® reagent (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA) and reverse transcribed into cDNA using a Prime-Script™ cDNA synthesis kit (Takara Bio, Inc., China). The full-length ALV-J genome was divided into three overlapping fragments (A, B and C) to be amplified, and the primers for each fragment are present in [Supplementary Table S1](#). For quantification of the RNA copies of ALV-J in ALV-J-infected or SE-ALV-J treated cells, total RNAs were isolated from cultured cells and reverse transcribed into cDNA as described above. RT-qPCR was performed using a CFX96 system (Bio-Rad Laboratories, Inc, USA) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Roche Diagnostic) according to the manufacturer's protocol. To construct a standard plasmid, a 148 bp fragment of ALV-J gp85 gene was amplified with the primer pairs J-F and J-R ([Supplementary Table S1](#)), and then cloned into the pMD-19T vector (Takara Bio, Inc., China). The copy number of viral RNA was calculated based on the results for the standard plasmid diluted 10-fold (1×10^1 copies/ μ L to 1×10^9 copies/ μ L). Each sample was analyzed in triplicate. For analysis of the homology of ALV-J, total RNAs were extracted from ALV-J strain GD1109, SE-ALV-J, and ALV-J isolated from the progeny chicks, and reverse transcribed into cDNA as described above. The gp85 coding sequence (924 bp) was amplified using the primer pair gp85-F and gp85-R ([Supplementary Table S1](#)) with the FOD-FX (Toyobo Life Science, China). The purified RT-PCR products were cloned into the pMD-19T vector for sequencing. Sequence alignment was performed using Lasergene version 7.1 (DNASTar, Inc.)

2.11. Transmission of ALV-J infection via SE-ALV-J

A total of 18 SPF hens were randomly selected from 24 weeks old laying SPF hens that were prepared in advance as described above and divided into 3 groups, with 6 SPF laying hens per group. Semen samples were collected from 5 healthy roosters with no ALV-J infection and

mixed with SE or free ALV-J for artificial insemination of different groups of SPF hens. For detection of infection and transmission of ALV-J mediated by SE-ALV-J, 3 groups of artificial insemination experiments were performed. Group A hens were artificially inseminated with 40 μL of semen from healthy roosters mixed with 40 μL of SE-Mock and used as the mock control. Group B and C hens were artificially inseminated with 40 μL of semen from healthy roosters mixed with equal viral titers (0.5×10^5 TCID₅₀) of SE-ALV-J and free ALV-J, respectively. Whole blood samples from all the hens in all 3 groups were collected at 1, 2, 3, and 4 week post-insemination. Blood plasma prepared from each individual hen was inoculated into DF-1 cells for ALV-J isolation as previously described (Wang et al., 2020), and the serum samples were assessed for the presence of ALV-J antibody using ELISA detection kits (IDEXX Laboratories). The eggs were collected from the different groups of SPF hens and tested for p27 antigen in egg albumin with an Avian Leukosis Virus Antigen Test Kit (IDEXX Laboratories, USA). Fertilized eggs from the 3 different groups of SPF hens were collected for hatching. Whole blood samples of hatched progeny chicks from the 3 different groups of SPF hens were collected at an age of 1 day, as well as at subsequent 1–3 weeks of age, and assessed for ALV-J infection status through viral isolation as described above. Meconiums were sampled from hatched progeny chicks

and tested for p27 antigen using a direct p27 ELISA kit. All samples collected were analyzed in duplicate.

2.12. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, Inc.). Results are presented as the mean \pm standard error of the mean. Differences were compared using an unpaired Student's *t*-test. $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

3. Results

3.1. Isolation and characterization of SE from ALV-J-infected rooster semen

To ensure the purity of the SE-ALV-J, we optimized a two-step isolation method to extract and purify SE from ALV-J-infected rooster semen by using Exo-Quick-TC™ in combination with CD63-immunomagnetic beads affinity purification. After Exo-Quick centrifugation, the free ALV-J particles (Free ALV-J) were present in the

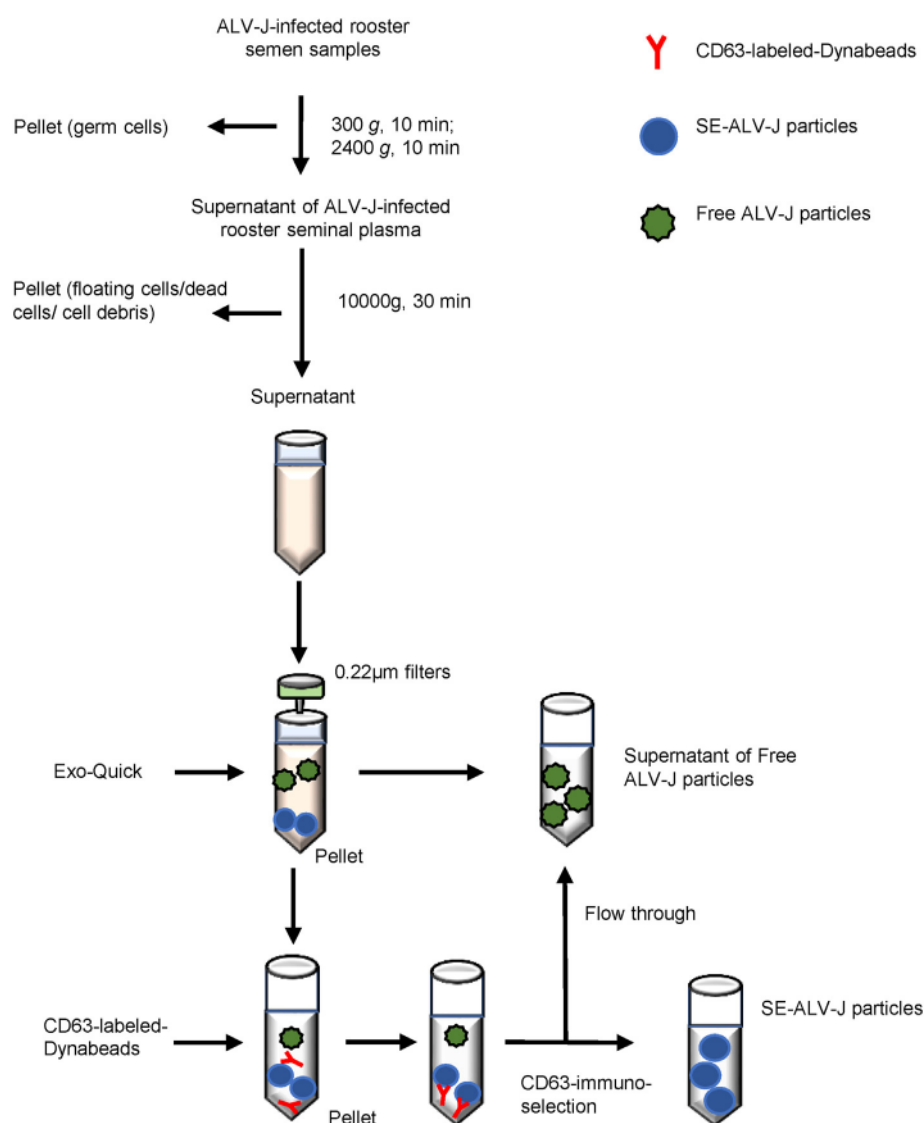


Fig. 1. Schematic presentation of Exo-Quick + CD63 immuno-magnetic selection for SE-ALV-J purification. SE-ALV-Js were separated from free ALV-J particles by binding to CD63 immuno-magnetic beads, and then purified SE-ALV-Js were eluted from Dyna-beads.

supernatant and flow through following CD63 immuno-magnetic isolation (Fig. 1). The morphology of the isolated SE-ALV-J was verified by using transmission electron microscopy (TEM) examination and nanoparticle tracking analysis (NTA). TEM showed that the purified SE-ALV-J exhibit a classical cup-shaped appearance with a lipid bilayer membrane, while the purified ALV-J particles display a spherical appearance with an enveloped structure (Fig. 2A). The results of NTA showed that the size distribution patterns were similar between SE-ALV-J and SE-Mock, over 85% and 80% of SE were observed with sizes ranging from 50 to 200 nm, respectively (Fig. 2B). Next, the purified SEs were characterized through an analysis of EV-specific

markers by Western blotting. Both SE-Mock and SE-ALV-J expressed the marker proteins CD81, CD63, and tumor susceptibility gene 101 (TSG101) but lack of expression of GRP78 (endoplasmic reticulum marker) (Fig. 2C), suggesting that there was no contamination with endoplasmic vesicles in the purified SE. Subsequently, the purified SE-ALV-J was further characterized by immunogold labeling with antibodies against the marker CD63 and ALV-J envelope protein gp85. The results showed that the CD63 marker protein but not the viral gp85 protein could be probed in the SE-ALV-J (Fig. 2D). Collectively, these results showed that there was no cellular and free ALV-J particles contamination in the purified SE-ALV-J.

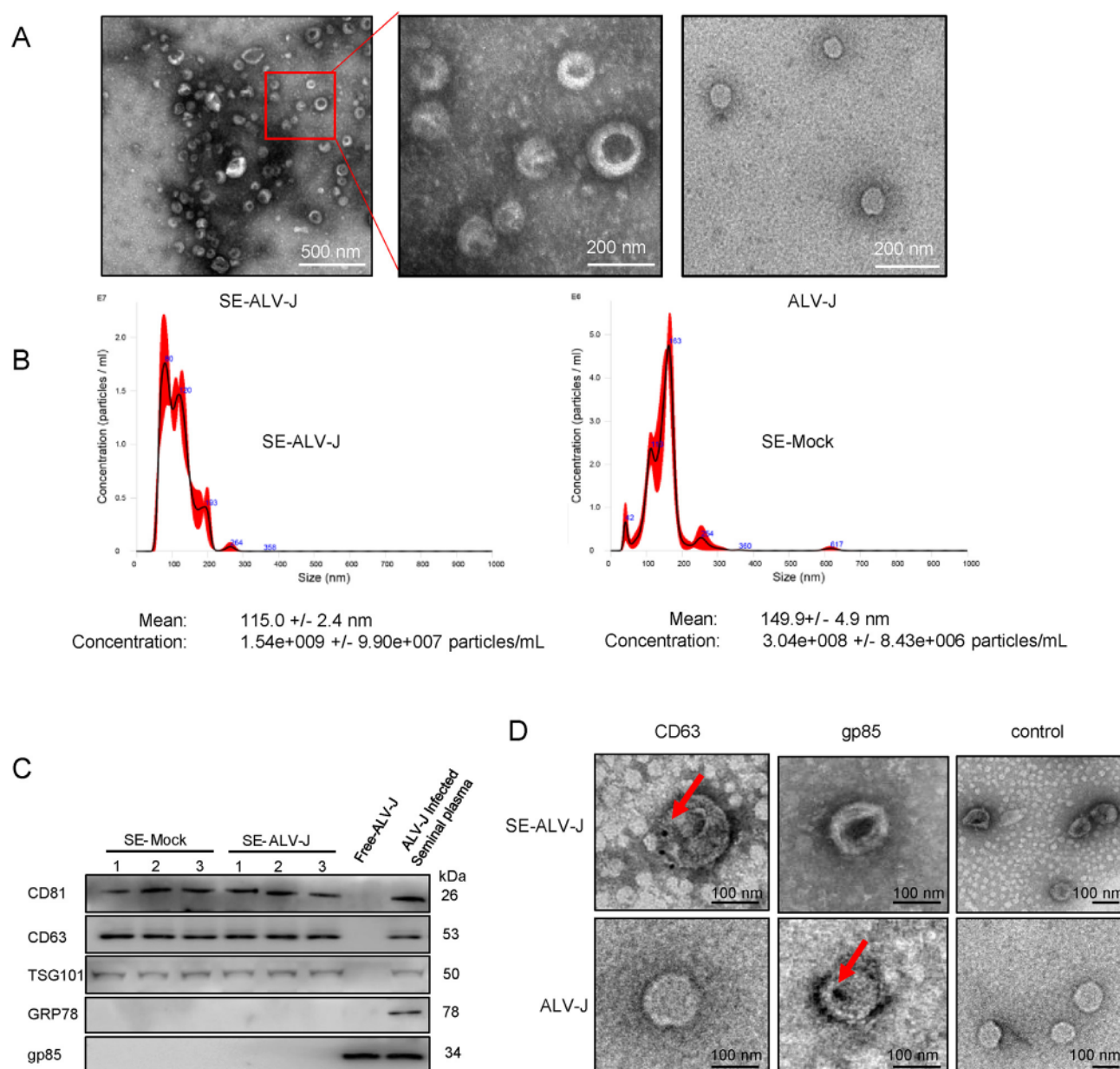


Fig. 2. Isolation and characterization of SE from ALV-J-infected rooster seminal plasma. **A** Transmission electron microscopy observations of negatively stained SE derived from ALV-J-infected rooster semen (SE-ALV-J) and purified virions (free ALV-J). Representative images of purified SE-ALV-J and ALV-J are shown. **B** Size distribution and concentration of SE-ALV-J and SE-Mock were determined by NTA. Results are represented as the average distribution of three independent isolations of SE-ALV-J and SE-Mock. **C** Western blot analysis on SE derived from three different mock- or ALV-J-infected rooster seminal plasmas samples using antibodies against the common exosome markers CD81, CD63 and TSG101, and the endoplasmic reticulum marker GRP78. Purified virions and ALV-J-infected rooster seminal plasma were used as the controls. **D** Immunoelectron microscopy of purified SE-ALV-J or virions from ALV-J infected rooster seminal plasma. Immunogold labeling was performed using antibodies against exosome marker protein CD63 and viral protein gp85. The antibody staining with gold particles is indicated by arrows. One representative experiment of three is shown.

3.2. SE derived from ALV-J-infected rooster semen contained ALV-J components

In order to characterize the contents of SE purified from ALV-J-infected rooster seminal plasmas, we performed RNA sequencing on pooled SE-ALV-J and pooled SE-Mock. A total of 43,074,934 and 22,983,798 reads was identified for SE-ALV-J and SE-Mock, respectively. These reads were then mapped to the chicken reference genome (galGal6) using Bowtie2 version 2.1.0 (Langmead and Salzberg, 2012). As shown in [supplementary Table S2](#), the percentage of mapped reads was 54.13% and 40.39% for SE-ALV-J and SE-Mock, respectively, indicating that both SE-ALV-J and SE-Mock are derived from the cells of the chickens. The reads were further mapped to the ALV-J strain GD1109 genomic RNA sequences, as well as its *Gag*, *Pol* and *Env* coding region sequence (CDS) of ALV-J strain GD1109. The total mapped reads and fractions to GD1109 genomic RNA, mapped reads and percentages to *Gag*, *Pol* and *Env* CDS are listed in [supplementary Table S3](#). The percentages of the total mapped reads of SE-ALV-J and SE-Mock to ALV-J strain GD1109 genomic RNA sequences were 22.59% and 0.45%, respectively. Furthermore, the mapped reads of SE-ALV-J to *Gag*, *Pol* and *Env* CDS were much higher than the mapped reads of SE-Mock ([supplementary Table S3](#)). To further validate whether ALV-J RNAs were present in SE-ALV-J, we designed RT-PCR primers to amplify the entire genomic RNA of ALV-J in three overlapping fragments (A, B, and C) as depicted in [Fig. 3](#) (top chart). As shown in [Fig. 3](#) (bottom gel image), all three overlapped fragments were amplified successfully from SE-ALV-J, which indicated that SE-ALV-J contained the complete ALV-J RNA genome. Taking together, the above data demonstrated that SE-ALV-J contained ALV-J genomic RNA.

3.3. SE-ALV-J can transfer ALV-J components to uninfected naive cells

Giving that ALV-J components were present in the purified SE-ALV-J, it prompted us to investigate if SE-ALV-J can transfer ALV-J components to uninfected naive cells. To this end, DiO-labeled DF-1 cells were incubated with DiI-labeled SE-ALV-J and DiI-labeled SE-Mock, respectively, and confocal fluorescence microscopy was employed to visualize the contour of the cells. As shown in [Fig. 4A](#), both SE-ALV-J and SE-Mock were observed being colocalized with the plasma membrane, which

signified that both SE-ALV-J and SE-Mock were uptaken by the DF-1 cells. Notably, Alexa Fluor-594 labeled viral protein gp85 was detected in the cytoplasm of DF-1 cells exposed to SE-ALV-J, but not detected in the cytoplasm of DF-1 cells co-incubated with SE-Mock ([Fig. 4B](#)). Furthermore, Alexa Fluor-488 dye labeled viral protein gp85 was co-localized with SE-ALV-J within the cytoplasm of DF-1 cells, as shown in [Fig. 4C](#), indicating that SE-ALV-J contains ALV-J envelope protein gp85. Moreover, much more SE-ALV-J were uptaken by DF-1 cells after incubation between DiO-labeled DF-1 cells and DiI-labeled SE-ALV-J for 4 h than that of 2 h, as indicated by confocal fluorescence microscopy, as shown in [Fig. 4D](#), confirming that the uptake of SE-ALV-J by DF-1 cells was an active process. This experimental evidence indicated that SE-ALV-J could be taken up by DF-1 cells and subsequently transferred ALV-J components to the DF-1 cells.

3.4. SE-ALV-J transmits ALV-J and establishes productive infection in host cells

Since the purified SE-ALV-J can carry and deliver ALV-J components into recipient cells, it prompted us to further understand whether SE-ALV-J can transmit ALV-J infection to uninfected naive cells. For this purpose, the purified SE-ALV-J was incubated with DF-1 cells and primary chicken embryo fibroblasts (CEFs), respectively, and TCID₅₀ assays were performed to determine the viral titers in the SE-ALV-J-treated DF-1 cells and CEFs. Cells infected with free ALV-J were used as the positive control. As shown by the results in [Fig. 5A](#), the purified SE-ALV-J generated high viral titers in both DF-1 cells and CEFs, which were similar to the levels determined in cells infected with free ALV-J. To further characterize SE-ALV-J *in vitro*, DF-1 cells were incubated with the purified SE-ALV-J, and real-time qPCR (RT-qPCR) designed for detection of viral RNA contents and Western blotting for viral gp85 protein expression levels were performed at 12, 24, 36, 48, and 72 h post treatment. Cells infected with free ALV-J with equal viral titers were used as the positive control, while cells incubated with SE-Mock were used as the negative control. As shown in [Fig. 5B](#), RT-qPCR data indicated that the levels of viral RNA in SE-ALV-J treated cells showed a continuous increment trend over the time points, but replicating slower than the free ALV-J. At the same time, the results of Western blotting showed that the expression levels of gp85 protein between the SE-ALV-J and free ALV-J

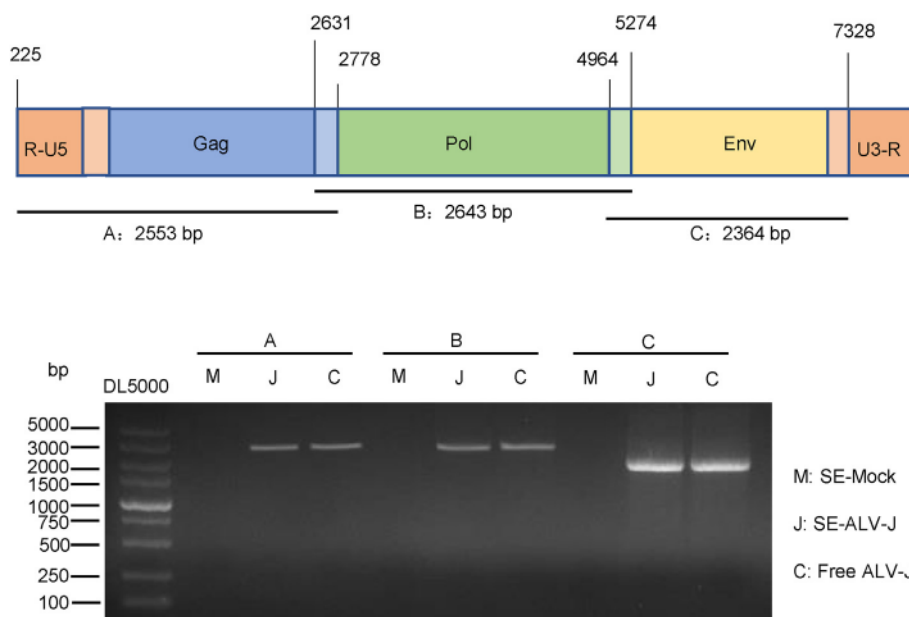


Fig. 3. Components of SE derived from ALV-J-infected rooster seminal plasma. ALV-J genomic RNA in SE-ALV-J was detected using reverse transcription-PCR. Three overlapping fragments (A, B, and C) were designed based on the genome sequence of the ALV-J strain GD1109. SE-Mock and purified free ALV-J particles were used as the controls.

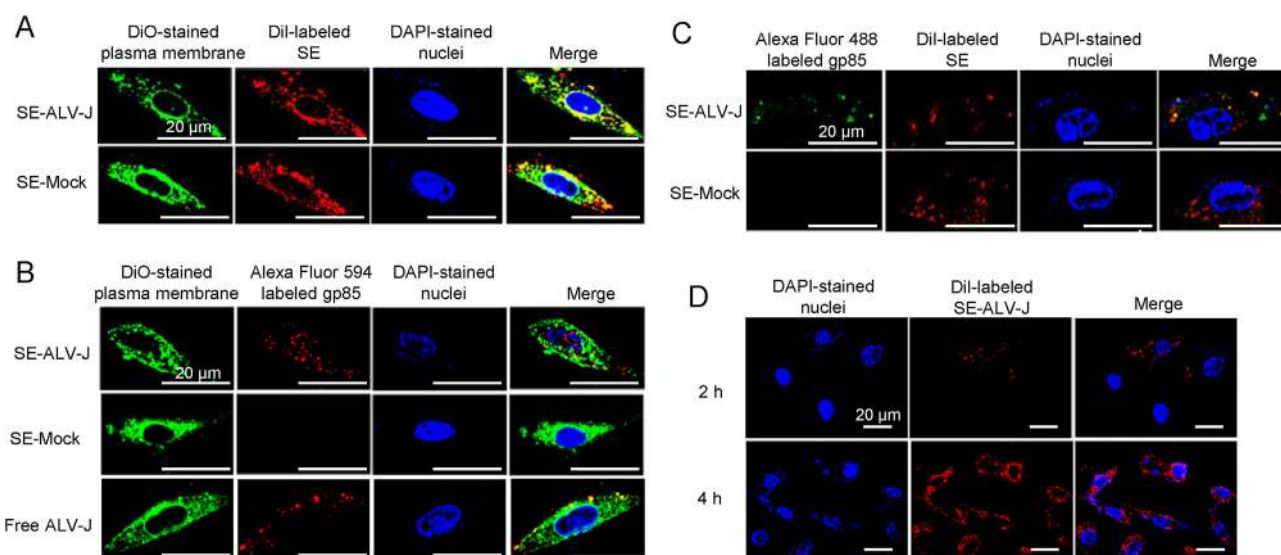


Fig. 4. SE-ALV-J can transmit ALV-J components to DF-1 cells. **A** Both SE-ALV-J and SE-Mock can be uptaken into DF-1 cells. Purified SE-ALV-J or SE-Mock were firstly stained with the red fluorescent dye DiI for 20 min, and then were added to DF-1 cells. After 2 h of incubation at 37 °C, the cells were fixed and stained with the green fluorescent dye DiO. The cell nuclei were stained with DAPI (blue) and observed under a confocal microscopy. Scale bar, 20 μm. **(B, C)** SE-ALV-J contained ALV-J envelope protein gp85. After being incubated with purified SE-ALV-J or SE-Mock for 2 h, DF-1 cells were incubated with an anti-gp85 antibody and then stained with Alexa Fluor 594-conjugated anti-mouse IgG (red) or Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG (green). Confocal co-localization analysis of SE-ALV-J or SE-Mock and viral protein gp85 were performed. The cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 μm. **D** The confocal image shows the co-localization of DiO-labeled DF-1 cells incubated with DiI-labeled SE-ALV-J (red) for 2 h and 4 h, respectively. The cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar, 20 μm.

groups at all tested time points remained consistent (Fig. 5D and E). As expected, ALV-J viral RNA and viral protein gp85 were not detected in the cells treated with SE-Mock (Fig. 5B–E). These experimental data confirmed that a productive infection was established in DF-1 cells inoculated with SE-ALV-J. Furthermore, it was shown that ALV-J RNA and viral protein gp85 were clearly detectable in the lysates of CEFs co-cultured with SE-ALV-J by Real-time qPCR and Western blot, respectively (Fig. 5C and E), confirming a similar productive infection was established in CEFs after treatment with SE-ALV-J. The expression of the ALV-J viral proteins p27, gp85, and gp37 can also be detected by Western blotting in DF-1 cells and CEFs treated with SE-ALV-J (Fig. 5F), further confirming the establishment of productive infections. These observations taken together suggested that SE-ALV-J had the same efficiency as free ALV-J in infection of naive cells and could establish productive infections in host cells.

3.5. Vertical transmission of ALV-J infection can be mediated by SE-ALV-J *in vivo*

Given that SE-ALV-J are capable of transmitting infection and establishing productive infection *in vitro*, which prompted a question on SE-ALV-J mediating infection of ALV-J *in vivo*. First, whether SE-ALV-J could transmit infection of ALV-J to specific pathogen-free (SPF) hens through a series of artificial insemination was determined. SPF hens were artificially inseminated with healthy roosters' semen mixed with SE-Mock (Group A, used as a mock control group). SPF hens were artificially inseminated with healthy roosters' semen mixed with equal viral titers of SE-ALV-J (group B) or free ALV-J (group C). ALV-J infection status of the SPF hens in all three groups was subjected to test for the presence of virus and ALV-J antibody in blood plasma and serum individually at 1-, 2-, 3-, and 4-week post insemination. The control group hens at 1–4 weeks post insemination were all tested negative for virus and antibody response. However, all group B hens at 1–4 weeks post insemination were positive both on virus and antibody response. The group C hens at 1–4 weeks post insemination were also tested negative for ALV-J and ALV-J antibody response (Table 1). Furthermore, eggs were collected for 4 weeks after artificial insemination from the hens in

groups A, B and C to determine the vertical infection of ALV-J using an ALV p27 ELISA kit. All 23 eggs collected from the control group hens and 20 eggs from hens in group C were negative for p27 antigen. In contrast, the p27 antigen was present in egg albumin of all 25 eggs collected from the hens in group B (Table 2). These results suggest that the infection of SPF hens by ALV-J can be mediated via SE-ALV-J and the infected hens shed ALV-J antigens into their egg albumin.

To further investigate whether SE-ALV-J was capable of transmitting infection of ALV-J from hen to progeny, the eggs were also collected from group A, B and C SPF hens and tested for presence of p27 antigen in meconium as well as for virus to hatch chicks. Consistent with the results in egg albumin, p27 antigens were detected in meconium samples of all 1-day-old chicks of the group B hens, while none of chicks hatched from the group A and C hens was positive for p27 antigen (Table 1). Furthermore, ALV-J was isolated from all 16 chicks of the group B hens at one-day-old of age up to three weeks of age, while no virus viremia was detected in any of chicks of the group A and C hens (Table 1). Subsequently, we compared the homology of ALV-J gp85 gene nucleotide sequences isolated from the group B progeny chicks, SE-ALV-J and original GD1109 challenge virus. As shown in Table 3, gp85 gene of the ALV-J isolated from the group B progeny chicks exhibited a 99.1%–99.5% and a 98.9%–99.3% nucleotide sequence identity with the ALV-J isolated from five SE-ALV-J samples and the original GD1109 ALV-J strain of viruses, respectively. Furthermore, the gp85 of ALV-J isolated from five SE-ALV-J samples shared 98.8%–99.4% nucleotide sequence identity with the original challenge virus GD1109. These data provided key evidence that the ALV-J isolated from the group B progeny chicks came from the original challenge virus, whilst further supporting the notion that SE-ALV-J but not ALV-J variation mediates vertical transmission of ALV-J infection from hen to progeny.

4. Discussion

Extracellular vesicles were initially hypothesized to serve as vehicles to discard cellular waste (Muller, 2020), however, they have then been emerged as vital mediators of cell-to-cell communication by shuttling biologically active proteins, lipids and RNAs between cells, which serving

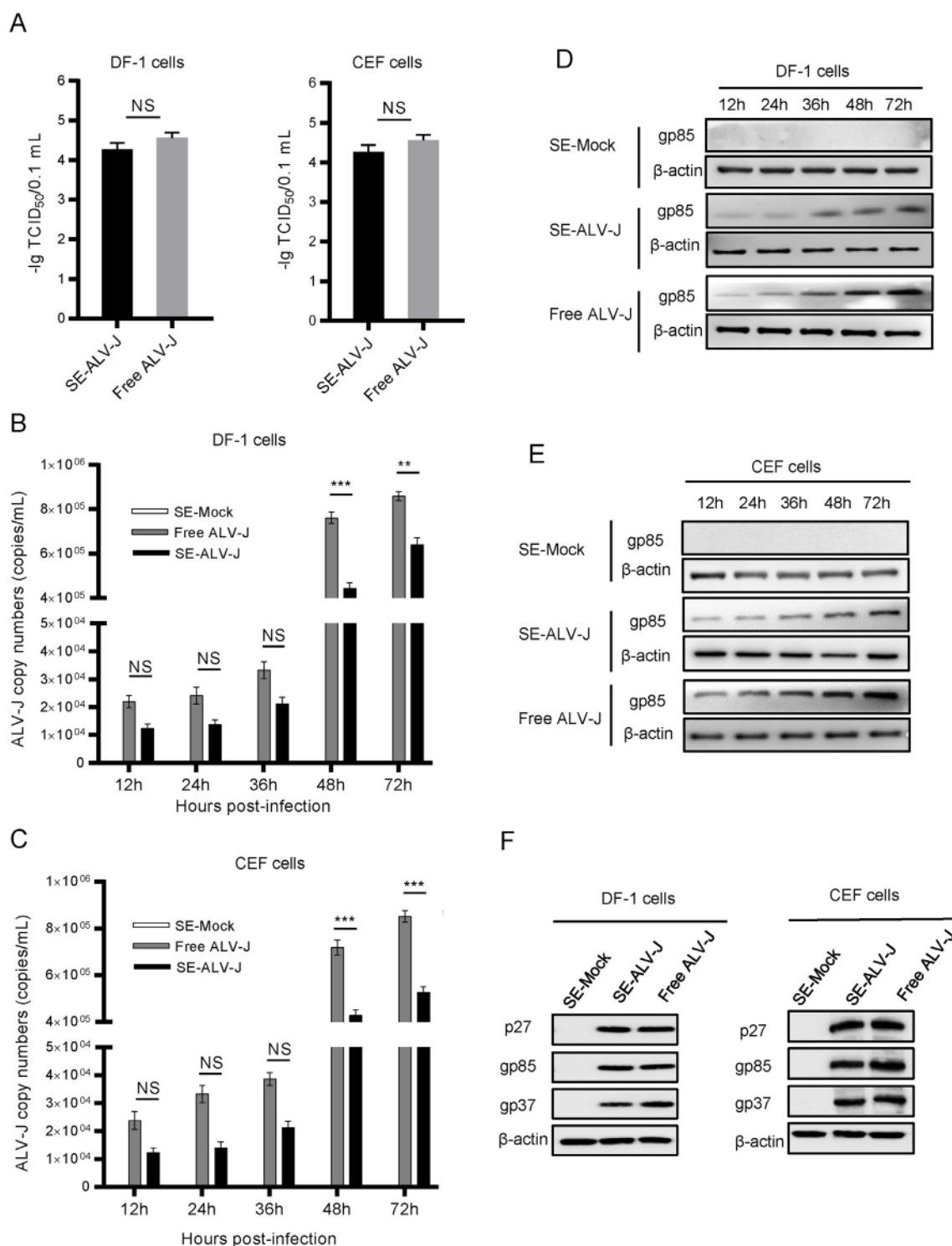


Fig. 5. SE-ALV-J transmits ALV-J and establishes productive infections in host cells. **A** DF-1 cells and CEFs were treated with purified SE-ALV-J or infected with ALV-J, respectively, and the viral titers were determined with TCID₅₀ assay. **(B to E)** Real-time qPCR and western blot analysis demonstrated productive infection of DF-1 cells and CEFs after treatment with SE-ALV-J. DF-1 cells and CEFs were cocultured with purified SE-ALV-J or infected with free ALV-J at an approximate MOI of 1.0. At 12, 24, 36, 48, and 72 h post treatment or infection, total RNA from DF-1 cells (**B**) and CEFs (**C**) was extracted and RT-qPCR was performed for detection of viral RNA contents, cell lysates from DF-1 cells (**D**) and CEFs (**E**) were collected and subjected to Western blot test with the antibody against ALV-J gp85 protein. **F** Western blot analysis of ALV-J p27, gp85 and gp37 protein expression in DF-1 cells and CEFs treated with purified SE-ALV-J or infected with free ALV-J for 72 h.

an important role in an array of key pathophysiological processes in literature (Johnstone et al., 1987; Colombo et al., 2014). EVs have also been hypothesized to serve as crucial constituents involved in the pathogenesis of viral infection and serve an important role in life cycle of viruses (Alenquer and Amorim, 2015; Gurunathan et al., 2019). Indeed,

numerous studies have shown that EVs derived from virally-infected cells or bodily fluids are responsible for transmission of viral information, and the cargos of EVs may be involved in both viral infection and transmission (Urbanelli et al., 2019). In the present study, it was shown that SE-ALV-J contains viral RNAs and viral proteins, which can be

Table 1

The viremia results of meconium test of one-day-old chicks and virus isolation results of chicks of the group A-C hens at one-day up to three weeks of age.

Day/week post-hatch	Group ^a	Virus isolation	Meconium
1 day	A	0/13 ^b	0/13
	B	16/16	16/16
	C	0/18	0/18
1 week	A	0/13	/
	B	16/16	/
	C	0/18	/
2 week	A	0/13	/
	B	16/16	/
	C	0/18	/
3 week	A	0/13	/
	B	16/16	/
	C	0/18	/

^a Group A = SPF hens were artificially inseminated with 40 μ L healthy roosters' semen mixed with 40 μ L SE-Mock; Group B and C = SPF hens were artificially inseminated with 40 μ L healthy roosters' semen mixed with equal viral titers (0.5×10^5 TCID₅₀) of SE-ALV-J and free ALV-J, respectively.

^b No. of positive samples/total no. of samples.

Table 2

The infection status of SPF hens and eggs post artificial insemination with different pre-treated semen.

Week post-insemination	Group ^a	Virus isolation	ALV-J antibody response	p27 antigen of eggs
1 week	A	0/6 ^b	0/6	0/23 ^c
	B	6/6	6/6	25/25
	C	0/6	0/6	0/20
2 week	A	0/6	0/6	
	B	6/6	6/6	
	C	0/6	0/6	
3 week	A	0/6	0/6	
	B	6/6	6/6	
	C	0/6	0/6	
4 week	A	0/6	0/6	
	B	6/6	6/6	
	C	0/6	0/6	

^a Group A = SPF hens were artificially inseminated with 40 μ L healthy roosters' semen mixed with 40 μ L SE-Mock; Group B and C = SPF hens were artificially inseminated with 40 μ L healthy roosters' semen mixed with equal viral titers (0.5×10^5 TCID₅₀) of SE-ALV-J and free ALV-J, respectively.

^b No. of positive hens/total no. of hens.

^c No. of positive eggs/total no. of eggs.

Table 3

ALV-J gp85 gene nucleotide sequence identity comparisons among ALV-J isolates of the progeny chicks of the SE-ALV-J pretreated SPF hens, the SE-ALV-J, and the original GD1109 challenging virus.

	GD1109 ^a	SE-ALV-J	progeny chicks
GD1109	–	98.8%–99.4%	98.9%–99.3%
SE-ALV-J	98.8%–99.4%	–	99.1%–99.5%
progeny chicks	98.9%–99.3%	99.1%–99.5%	–

^a GD1109 = original challenging virus.

transmitted to naive cells and establish a productive infection. Our data also demonstrated that SE-ALV-J is capable of mediating vertical transmission of ALV-J from hen to progeny.

As ALV-J virions and SE share significant similarities including size, buoyancy densities and sedimentation velocities, conventional sucrose gradient differential ultracentrifugation cannot efficiently extract SE-ALV-J free of cellular and viral contamination. In order to overcome these limitations, a CD63 immunomagnetic bead isolation method was optimized to further purify SE-ALV-J isolated from ALV-J-infected rooster semen. This two-step purification method appeared more stringent and ensured the SE-ALV-J separation without carryover of free viruses, thereby

further underscoring the capacity of SE-ALV-J to transmit ALV-J infection (Zhou et al., 2020). TEM analysis showed that both SE-ALV-J and SE-Mock displayed the classical morphological characteristics of EVs (Fig. 2A), which confirmed the purity of SE-ALV-J and SE-Mock. NTA showed that SE contained majority of the EVs size ranging from 50 to 200 nm (Fig. 2B), which suggested the feasibility of the isolation methods in obtaining the highly pure SE-ALV-J and SE-Mock. Although the size distribution of SE particles between SE-ALV-J and SE-Mock is different, they both resembled to that described in previous studies (Colombo et al., 2014; van Niel et al., 2018). Since retrovirus and exosomes share the same secretion pathway (Thery et al., 2002), the reason why SE-Mock is larger than SE-ALV-J is probably that SE-Mock is mostly composed of microvesicles (~100–1000 nm), but SE-ALV-J is mostly exosomes (<150 nm). Exosomes and microvesicles both are one of the three major types of extracellular vesicles, which have been studied and discussed by a number of groups. The purified SE-Mock and SE-ALV-J also expressed the EV-marker proteins CD81, CD63 and TSG101, and did not express the endoplasmic reticulum marker protein GRP78 (Fig. 2C), which suggesting that both SE-ALV-J and SE-Mock came from non-endoplasmic reticulum sources. Immune-electron microscopy analysis confirmed that there were no free ALV-J virions in the purified SE-ALV-J (Fig. 2D). These results suggest that both the purified SE-ALV-J and SE-Mock were free of viral and no cellular contamination.

Recent studies have shown that the constituents of EVs can be altered following viral infection (Crenshaw et al., 2018)(49). The results of the present study showed the enrichment of ALV-J viral RNAs in the purified SE-ALV-J, including the complete ALV-J genomic RNA (Fig. 3). In addition to packaging viral genomes, EVs can also incorporate a set of viral-encoded proteins that promote viral spread. Indeed, three structural proteins, p27, gp37 and gp85, were identified in the purified SE-ALV-J using Western blotting (Fig. 5F). These results demonstrated that the contents of SE-ALV-J were altered compared with SE-Mock, and the contents of SE-ALV-J reflected the pathological state of the host cells. Upon exposure to DF-1 cells, both SE-ALV-J and SE-Mock were uptaken by DF-1 cells (Fig. 4A). Furthermore, the intact SE-ALV-J taken up by DF-1 cells was capable of transferring ALV-J components to non-infected cells (Fig. 4B and C). Based on our findings, we speculate that if viral components were packaged into EVs, they were exported and subsequently transmitted to the neighboring cells, thereby regulating host cellular behavior and producing productive infections. In recent years, increasing evidence suggested that EVs derived from virally infected cells or bodily fluids can carry and deliver viral genomes, mRNAs, microRNAs, proteins, and/or even virions into recipient cells, thereby facilitating viral infection and transmission, as shown for PRRSV, HCV and many other animal viruses (Madison et al., 2014; Longatti, 2015; Vora et al., 2018; T Wang et al., 2018; Zhou et al., 2018; Sadri et al., 2019; Slonchak et al., 2019). For example, PRRSV-infected cell derived-exosomes contain viral genomic RNA and partial viral proteins, which can transfer PRRSV to susceptible and non-susceptible cells and establish a productive infection (T Wang et al., 2018). Exosomes released from HCV-infected cells containing infectious viral RNA and proteins were also shown capable of mediating HCV transmission between hepatocyte-like cells (Bukong et al., 2014). In the present study, SE-ALV-J transmitted ALV-J RNA and viral protein to uninfected naive cells and functioned effectively as free ALV-J virus, but exhibited different replication capability within recipient cells. Infection of naive DF-1 and CEFs with infectious SE-ALV-J increased viral RNA content and viral protein levels within the recipient host cells, which confirmed the establishment of productive infections and further suggested an important role for SE-ALV-J as ALV-J viral RNA and protein transporters. These results strongly suggested that ALV-J also took advantage of the seminal exosomal pathway to transfer virus to naive cells and establish a productive infection.

A significant finding of this study is that SPF hens were infected by ALV-J through artificial insemination of semen from healthy roosters mixed with SE-ALV-J, which for the first time revealed that SE-ALV-J is capable of mediating ALV-J infection in SPF hens. Since our data have demonstrated that SE-ALV-J carries and delivers viral RNA and protein

into recipient cells, which subsequently is capable of establishing productive infection *in vitro*, the SE-ALV-J mediating ALV-J infection of SPF hens could be resulted from two plausible events. One would be that ALV-J infection changes the immunosuppressive properties of SE-ALV-J by hijacking the exosomal pathways, thereby allowing SE-ALV-J to promote ALV-J infection and to impair the protective immune response against the infectious virus. The other would be that ALV-J infection triggers alterations in the composition and signal transduction of SE-ALV-J, which may promote a series of functional effects, such as increased target cell activation and cytokine expression, therefore, compromising the protective immune response, and thereby enhancing ALV-J entry into target cells. Another significant finding from the present study is that SE-ALV-J further mediated the infection and transmission of ALV-J from hen to progeny. Although the underlying mechanistic events are heretofore unknown, several plausible explanations might somewhat light up the vertical transmission of ALV-J infection event from hen to progeny via SE-ALV-J. Since the ALV-J viral RNA and viral proteins were present inside of SE-ALV-J, one possible explanation that reconciles these findings is that SE-ALV-J provided a suitable environment for ALV-J viral RNA and viral proteins, thereby it contributed to the protection of these ALV-J-related molecules from enzymatic degradation and transportation of the cargos from ALV-J infected-hen to the progeny through overcoming biological barriers and eluding immune recognition. Another possible explanation is that the SE-ALV-J mediated transmission of ALV-J through endocytic uptake of infectious SE-ALV-J into host cells, which were not restricted by the cellular surface receptors, thus the spread of ALV-J from infected-hen to progeny is very fast and efficient. Notably, SPF hens cannot be infected by ALV-J through artificial insemination of semen from healthy roosters mixed with free ALV-J virus. Therefore, it is possible that SE derived from the semen of healthy roosters would inhibit ALV-J infection and/or potentially block viral transmission, thereby limiting disease progression in SPF hens. Consistent with this hypothesis, previous studies have showed that healthy human semen-derived SE can inhibit infection and transmission of HIV-1 *in vitro* (Madison et al. 2014, 2015). Healthy human semen-derived SE inhibits the binding and recruitment of host transcription factors components, such as NF- κ B, SP1 and RNA Pol II, to the promoter of HIV-1 and also inhibits the interaction between Tat proteins, explaining the SE-mediated inhibition of HIV-1 infection and transmission (Welch et al., 2018). However, the exact role of SE in HIV-1 transmission is not fully understood yet. Therefore, the results of the present and previous studies demonstrated that SE can influence viral infection and transmission by either facilitating or blocking it, dependent on the nature of the cells releasing the vesicles, the target cells and many other factors packed in the EVs.

5. Conclusions

In summary, the present study for the first time demonstrated that seminal plasma from ALV-J-infected roosters secreted SE, which transmitted ALV-J infection to SPF hens, and subsequently mediated transmission of ALV-J from the SPF hens to the progeny chicks. Our findings of this study provided experimental evidence on semen extracellular vesicles in relation to ALV-J transmission and infection, which shed valuable insights into the importance of semen extracellular vesicles in mediating vertical transmission of ALV-J.

Data availability

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author/s.

Ethics statement

All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee at the South China Agricultural University (approval ID:

SYXK-2019-0136). All study procedures and animal care activities were conducted in accordance with the national and institutional guidelines for the care and use of laboratory animals.

Author contributions

Liqin Liao: Investigation, Data curation, Formal analysis, Writing - original draft. Weiguo Chen: Funding acquisition, Methodology, Validation, Writing - review & editing. Xiangyu Zhang: Investigation. Huanmin Zhang: Resources, Writing - review & editing. Aijun Li: Funding acquisition. Yiming Yan: Investigation, Validation. Zi Xie: Investigation. Hongxing Li: Funding acquisition. Wencheng Lin: Funding acquisition, Validation, Writing - review & editing. Jingyun Ma: Resources. Xinheng Zhang: Funding acquisition, Resources, Methodology, Writing - review & editing. Qingmei Xie: Funding acquisition, Conceptualization, Methodology.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

This work was supported by the Key Research and Development Program of Guangdong Province (2020B020222001), the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31972659, 31902252, 31672564, 31602053), Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2019A1515012006), Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018B030315009), China Postdoctoral Science Foundation (2019M652922), the Special Project of National Modern Agricultural Industrial Technology System (CARS-41), and the Chief expert Project of Agricultural Industry Technology system in Guangdong Province (2019KJ128). The authors acknowledge the support of Instrumental Analysis & Research Center of South China Agriculture University. The authors are thankful to Dr. Huanmin Zhang from USDA, Agriculture Research Service, Avian Disease and Oncology Laboratory for providing helpful comments in this study.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.01.026>.

References

- Alenquer, M., Amorim, M.J., 2015. Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection. *Viruses* 7, 5066–5083.
- Bai, J.H.K., Payne, L.N., Skinner, M.A., 1998. Sequence of host-range determinants in the env gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J). *Avian Dis.* 27, S92–S93.
- Bukong, T.N., Momen-Heravi, F., Kodys, K., Bala, S., Szabo, G., 2014. Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90. *PLoS Pathog.* 10, e1004424.
- Chahar, H.S., Bao, X., Casola, A., 2015. Exosomes and their role in the life cycle and pathogenesis of RNA viruses. *Viruses* 7, 3204–3225.
- Colombo, M., Raposo, G., Thery, C., 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289.
- Crenshaw, B.J., Gu, L., Sims, B., Matthews, Q.L., 2018. Exosome biogenesis and biological function in response to viral infections. *Open Virol. J.* 12, 134–148.
- Dhama, K., Singh, R., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Wani, M.Y., Mohan, J., 2014. Artificial insemination in poultry and possible transmission of infectious pathogens: a review. *Asian J. Anim. Vet. Adv.* 9, 211–228.
- Fadly, A.M., Smith, E.J., 1999. Isolation and some characteristics of a subgroup J-like avian leukosis virus associated with myeloid leukemia in meat-type chickens in the United States. *Avian Dis.* 43, 391–400.
- Federspiel, M.J., Hughes, S.H., 1997. Retroviral gene delivery. *Methods Cell Biol.* 52, 179–214.
- Gurunathan, S., Kang, M.H., Jeyaraj, M., Qasim, M., Kim, J.H., 2019. Review of the isolation, characterization, biological function, and multifarious therapeutic approaches of exosomes. *Cells* 8.

- Johnstone, R.M., Adam, M., Hammond, J.R., Orr, L., Turbide, C., 1987. Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *J. Biol. Chem.* 262, 9412–9420.
- Kalluri, R., LeBleu, V.S., 2020. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 367.
- Kechin, A., Boyarskikh, U., Kel, A., Filipenko, M., 2017. cutPrimers: a new tool for accurate cutting of primers from reads of targeted next generation sequencing. *J. Comput. Biol.* 24, 1138–1143.
- Kumar, A., Kodidela, S., Tadrous, E., Cory, T.J., Walker, C.M., Smith, A.M., Mukherjee, A., Kumar, S., 2020. Extracellular vesicles in viral replication and pathogenesis and their potential role in therapeutic intervention. *Viruses* 12.
- Landman, W.J., Post, J., Boonstra-Blom, A.G., Buyse, J., Elbers, A.R., Koch, G., 2002. Effect of an in ovo infection with a Dutch avian leukosis virus subgroup J isolate on the growth and immunological performance of SPF broiler chickens. *Avian Pathol.* 31, 59–72.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359.
- Li, T., Yao, X., Li, C., Zhang, J., Xie, Q., Wang, W., Lu, H., Fu, H., Li, L., Xie, J., Shao, H., Gao, W., Qin, A., Ye, J., 2020. Gp37 regulates the pathogenesis of avian leukosis virus subgroup J via its C terminus. *J. Virol.* 94.
- Lin, Y., Xia, J., Zhao, Y., Wang, F.Y., Yu, S.C., Zou, N.L., Wen, X.T., Cao, S.J., Huang, Y., 2013. Reproduction of hemangioma by infection with subgroup J avian leukosis virus: the vertical transmission is more hazardous than the horizontal way. *Virol. J.* 10.
- Longatti, A., 2015. The dual role of exosomes in hepatitis A and C virus transmission and viral immune activation. *Viruses* 7, 6707–6715.
- Madison, M.N., Jones, P.H., Okeoma, C.M., 2015. Exosomes in human semen restrict HIV-1 transmission by vaginal cells and block intravaginal replication of LP-BM5 murine AIDS virus complex. *Virology* 482, 189–201.
- Madison, M.N., Roller, R.J., Okeoma, C.M., 2014. Human semen contains exosomes with potent anti-HIV-1 activity. *Retrovirology* 11, 102.
- Malhotra, S., Justice, J., Lee, N., Li, Y., Zavala, G., Ruano, M., Morgan, R., Beemon, K., 2015. Complete genome sequence of an American avian leukosis virus subgroup J isolate that causes hemangiomas and myeloid leukosis. *Genome Announc.* 3, e01586-01514.
- Meng, F., Li, Q., Zhang, Y., Cui, Z., Chang, S., Zhao, P., 2018a. Isolation and characterization of subgroup J Avian Leukosis virus associated with hemangioma in commercial Hy-Line chickens. *Poultry Sci.* 97, 2667–2674.
- Meng, F., Li, Q., Zhang, Y., Zhang, Z., Tian, S., Cui, Z., Chang, S., Zhao, P., 2018b. Characterization of subgroup J avian Leukosis virus isolated from Chinese indigenous chickens. *Virol. J.* 15, 33.
- Muller, L., 2020. Exosomes: nanodust? *HNO* 68, 56–59.
- Neoplastic Diseases. Diseases of Poultry. <https://doi.org/10.1002/9781119421481.ch152013>, 513–673.
- Payne, L.N., Brown, S.R., Bumstead, N., Howes, K., Frazier, J.A., Thouless, M.E., 1991. A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *J. Gen. Virol.* 72 (Pt 4), 801–807.
- Payne, L.N., Gillespie, A.M., Howes, K., 1993. Unsuitability of chicken sera for detection of exogenous ALV by the group-specific antigen ELISA. *Vet. Rec.* 132, 555–557.
- Payne, L.N., Nair, V., 2012. The long view: 40 years of avian leukosis research. *Avian Pathol.* 41, 11–19.
- Rubin, H., Fanshier, L., Cornelius, A., Hughes, W.F., 1962. Tolerance and immunity in chickens after congenital and contact infection with an avian leukosis virus. *Virology* 17, 143–156.
- Sadri, N.J., Bokharaei-Salim, F., Karimzadeh, M., Moghoofei, M., Karampoor, S., Mirzaei, H.R., Tabibzadeh, A., Jafari, A., Ghaderi, A., Asemi, Z., Mirzaei, H., Hamblin, M.R., 2019. MicroRNAs and Exosomes: Key Players in HIV Pathogenesis. *HIV Med.*
- Shen, Y., Cai, L., Wang, Y., Wei, R., He, M., Wang, S., Wang, G., Cheng, Z., 2014. Genetic mutations of avian leukosis virus subgroup J strains extended their host range. *J. Gen. Virol.* 95, 691–699.
- Slonchak, A., Clarke, B., Mackenzie, J., Amarilla, A.A., Setoh, Y.X., Khromykh, A.A., 2019. West Nile virus infection and interferon alpha treatment alter the spectrum and the levels of coding and noncoding host RNAs secreted in extracellular vesicles. *BMC Genom.* 20, 474.
- Smith, E.J., Fadly, A.M., 1994. Male-mediated venereal transmission of endogenous avian leukosis virus. *Poultry Sci.* 73, 488–494.
- Thery, C., Zitvogel, L., Amigorena, S., 2002. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 569–579.
- Urbanelli, L., Buratta, S., Tancini, B., Sagini, K., Delo, F., Porcellati, S., Emiliani, C., 2019. The role of extracellular vesicles in viral infection and transmission. *Vaccines (Basel)* vol. 7.
- van Niel, G., D'Angelo, G., Raposo, G., 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 213–228.
- Venugopal, K., Howes, K., Barron, G.S., Payne, L.N., 1997. Recombinant env-gp85 of HPRS-103 (subgroup J) avian leukosis virus: antigenic characteristics and usefulness as a diagnostic reagent. *Avian Dis.* 41, 283–288.
- Vojtech, L., Woo, S., Hughes, S., Levy, C., Ballweber, L., Sauteraud, R.P., Strobl, J., Westerberg, K., Gottardo, R., Tewari, M., Hladik, F., 2014. Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res.* 42, 7290–7304.
- Vora, A., Zhou, W., Londono-Renteria, B., Woodson, M., Sherman, M.B., Colpitts, T.M., Neelakanta, G., Sultana, H., 2018. Arthropod EVs mediate dengue virus transmission through interaction with a tetraspanin domain containing glycoprotein Tsp29Fb. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E6604–E6613.
- Wang, G., Wang, Z., Zhuang, P., Zhao, X., Cheng, Z., 2017. Exosomes carrying gag/env of ALV-J possess negative effect on immunocytes. *Microb. Pathog.* 112, 142–147.
- Wang, P., Li, M., Li, H., Lin, L., Shi, M., Gu, Z., Gao, Y., Huang, T., Mo, M., Wei, T., Wei, P., 2020. Full-length cDNA sequence analysis of 85 avian leukosis virus subgroup J strains isolated from chickens in China during the years 1988–2018: coexistence of 2 extremely different clusters that are highly dependent upon either the host genetic background or the geographic location. *Poultry Sci.* 99, 3469–3480.
- Wang, P., Lin, L., Li, H., Yang, Y., Huang, T., Wei, P., 2018. Diversity and evolution analysis of glycoprotein GP85 from avian leukosis virus subgroup J isolates from chickens of different genetic backgrounds during 1989–2016: coexistence of five extremely different clusters. *Arch. Virol.* 163, 377–389.
- Wang, Q., Gao, Y., Wang, Y., Qin, L., Qi, X., Qu, Y., Gao, H., Wang, X., 2012. A 205-nucleotide deletion in the 3' untranslated region of avian leukosis virus subgroup J, currently emergent in China, contributes to its pathogenicity. *J. Virol.* 86, 12849.
- Wang, T., Fang, L., Zhao, F., Wang, D., Xiao, S., 2018. Exosomes mediate intercellular transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.* 92.
- Welch, J.L., Kaddour, H., Schlievert, P.M., Stapleton, J.T., Okeoma, C.M., 2018. Semen exosomes promote transcriptional silencing of HIV-1 by disrupting NF-kappaB/Sp1/Tat circuitry. *J. Virol.* 92.
- Welch, J.L., Madison, M.N., Margolick, J.B., Galvin, S., Gupta, P., Martinez-Maza, O., Dash, C., Okeoma, C.M., 2017. Effect of prolonged freezing of semen on exosome recovery and biologic activity. *Sci. Rep.* 7, 45034.
- Zhang, X., Yan, Z., Li, X., Lin, W., Dai, Z., Yan, Y., Lu, P., Chen, W., Zhang, H., Chen, F., Ma, J., Xie, Q., 2016. GADD45beta, an anti-tumor gene, inhibits avian leukosis virus subgroup J replication in chickens. *Oncotarget* 7, 68883–68893.
- Zhou, D., Xue, J., Zhang, Y., Wang, G., Feng, Y., Hu, L., Shang, Y., Cheng, Z., 2019. Outbreak of myelocytomatosis caused by mutational avian leukosis virus subgroup J in China, 2018. *Transboundary Emerg. Dis.* 66, 622–626.
- Zhou, W., Woodson, M., Neupane, B., Bai, F., Sherman, M.B., Choi, K.H., Neelakanta, G., Sultana, H., 2018. Exosomes serve as novel modes of tick-borne flavivirus transmission from arthropod to human cells and facilitates dissemination of viral RNA and proteins to the vertebrate neuronal cells. *PLoS Pathog.* 14, e1006764.
- Zhou, Y., McNamara, R.P., Dittmer, D.P., 2020. Purification methods and the presence of RNA in virus particles and extracellular vesicles. *Viruses* 12.



Article

Synergy of Subgroup J Avian Leukosis Virus and Chicken Infectious Anemia Virus Enhances the Pathogenicity in Chickens

Huijuan Xu ^{1,2,3,†}, Wenxue Li ^{1,2,†}, Yu Nie ^{1,2,3}, Sheng Chen ^{1,2,3}, Hongxin Li ^{1,2,3,4}, Xinheng Zhang ^{1,2,3,4} , Qingmei Xie ^{1,2,3,4,*} and Weiguo Chen ^{1,2,3,4,*}

- ¹ State Key Laboratory of Swine and Poultry Breeding Industry, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; sunnyxu20181@outlook.com (H.X.); 18846921030@163.com (W.L.); thcscau@163.com (Y.N.); chens@stu.scau.edu.cn (S.C.); hxli@scau.edu.cn (H.L.); xhzhang@scau.edu.cn (X.Z.)
- ² South China Collaborative Innovation Center for Poultry Disease Control and Product Safety, Guangzhou 510642, China
- ³ Key Laboratory of Animal Health Aquaculture and Environmental Control, Guangzhou 510642, China
- ⁴ Heyuan Branch, Guangdong Laboratory of Lingnan Modern Agricultural Science and Technology, Heyuan 517001, China
- * Correspondence: qmx@scau.edu.cn (Q.X.); wgchen81@scau.edu.cn (W.C.)
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Subgroup J avian leukemia virus (ALV-J) and chicken infectious anemia virus (CIAV) are widely acknowledged as significant immunosuppressive pathogens that commonly co-infect chickens, causing substantial economic losses in the poultry industry. However, whether co-infection of ALV-J and CIAV have synergistic pathogenicity remains uncertain. To explore their synergistic pathogenesis, we established a co-infection model of ALV-J and CIAV in HD11 cells and specific-pathogen-free (SPF) chickens. We discovered that ALV-J and CIAV can synergistically promote the secretion of IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ and apoptosis in HD11 cells. *In vivo*, compared to the ALV-J and CIAV mono-infected group, the mortality increased significantly by 27% (20 to 47%) and 14% (33 to 47%) in the co-infected group, respectively. We also discovered that ALV-J and CIAV synergistically inhibited weight gain and exhibited more severe organ damage in co-infected chickens. Furthermore, we found that CIAV can promote the replication of ALV-J in HD11 cells and significantly enhance ALV-J viral load in blood and tissues of co-infected chickens, but ALV-J cannot promote the replication of CIAV. Moreover, by measuring the immune organ indexes and proportions of blood CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ lymphocytes, more serious instances of immunosuppression were observed in ALV-J and CIAV co-infected chickens than in mono-infected chickens. Taken together, our findings demonstrate that ALV-J and CIAV synergistically enhance pathogenicity and immunosuppression.

Keywords: subgroup J avian leukosis virus; chicken infectious anemia virus; synergistic pathogenicity



Citation: Xu, H.; Li, W.; Nie, Y.; Chen, S.; Li, H.; Zhang, X.; Xie, Q.; Chen, W. Synergy of Subgroup J Avian Leukosis Virus and Chicken Infectious Anemia Virus Enhances the Pathogenicity in Chickens. *Microorganisms* **2024**, *12*, 740. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040740>

Academic Editors: Renfu Yin and Aleksandar Dodovski

Received: 15 March 2024

Revised: 31 March 2024

Accepted: 2 April 2024

Published: 5 April 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Immunosuppressive viral diseases cause increased susceptibility to secondary infections and sub-optimal response to vaccinations in chickens, posing a significant threat to the global poultry industry [1,2]. Subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) and chicken infectious anemia virus (CIAV) are classical immunosuppressive viral pathogens in chickens [3]. ALV-J infection mainly causes tumor mortality, growth retardation, and serious immunosuppression in chickens [4]. Clinical manifestations of ALV-J infection include hepatomegaly and splenomegaly [5]. Additionally, research studies have indicated a tendency of ALV-J to target the bone marrow, the central immune organ. Early infection with ALV-J triggers lymphocyte apoptosis, leading to dysplasia in the thymus and Fabricius [6].

CIAV infection generally results in host aplastic anemia, systemic lymphoid tissue atrophy and severe immunosuppression [7]. The illness predominantly impacts chicks aged

1 to 3 weeks, and is characterized by symptoms of intramuscular bleeding, thymus atrophy, weight loss, and myelodysplasia, whereas adult chickens typically exhibit subclinical infection [8–11]. Owing to its nonspecific symptoms, this disease is frequently overlooked. Nonetheless, it is noteworthy that outbreaks of CIAV infection have been documented in 20-week-old laying hens, especially in instances of co-infection where immunosuppressive factors could be significant [12]. *In vitro* infection and proliferation experiments revealed that CIAV replicated in chicken embryos and lymphoblastic cell lines, but not in chicken embryo fibroblasts (CEFs), chicken kidney cells, or other primary cell types [13]. Chicken macrophages are crucial immune cells when combating diverse viral infections and serve as susceptible targets for both ALV-J and CIAV [14].

A growing body of evidence indicates that co-infection of immunosuppressive viruses is ubiquitous in poultry, resulting in more severe pathogenic effects [15]. For instance, our recent study has demonstrated that the synergistic viral replication of ALV-J and infectious bursal disease virus (IBDV) induces more severe immunosuppression in chickens and enhanced the pathogenicity as a result [16]. In addition, the synergistic pathogenic effect of ALV-J and avian reticuloendotheliosis virus (REV) co-infection leads to more serious growth retardation, immunosuppression, and secondary *E. coli* infection in broiler chickens [17]. Previous studies have also indicated that the co-infection of ALV-J with Marek's disease virus (MDV) or *E. tenella* caused more severe pathogenicity, growth inhibition, mortality, and immunosuppression than mono-infections [18,19]. Additionally, CIAV chickens co-infected with avian reovirus or Gyrovirus homsa 1 have exhibited synergism in promoting viral replication, immunosuppression, and more serious tissue damage [20,21].

Since ALV-J and CIAV are mainly transmitted vertically through eggs, and could be transmitted horizontally through other media, too, these two viruses are highly contagious in chickens [22,23], leading to the prevalence of CIAV and ALV-J infections [24–28], which are responsible for huge economic losses to the poultry industry worldwide. In addition to the ALV-J or CIAV infection alone, several recent reports have described clinical cases of co-infection of ALV-J and CIAV in Chinese chicken flocks [29]. However, the synergy of ALV-J and CIAV remains inadequately elucidated. In this study, we established a co-infection cellular model and animal model of ALV-J and CIAV to investigate the synergistic pathogenicity *in vitro* and *in vivo*.

2. Materials and Methods

2.1. Viruses, Cells, and Animals

The SCAU-HN06 strain of ALV-J and the GD-101 strain of CIAV were stored in our laboratory. The 50% tissue culture infectious dose (TCID₅₀) of the SCAU-HN06 strain of ALV-J was titrated by limiting dilution in the DF-1 culture. The GD-101 strain of CIAV was propagated in the MSB1 cells and titrated as previously described [30]. The chicken macrophage-like cells HD11 (stored in our laboratory), as well as DF-1 and MSB1 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies) and 1% penicillin–streptomycin (Life Technologies) at 37 °C in a 5% CO₂ incubator. One-day-old SPF chicks (White Leghorn), including both hen chicks and cock chicks, were purchased from Xinxing Dahuanong Poultry Eggs Co., Ltd. (Yunfu, China).

2.2. Real-Time Quantitative PCR (qPCR) for the Detection of CIAV

Viral DNA was extracted from HD11 cells or tissues by using the HiPure Tissue DNA Mini Kit (Magen, Guangzhou, China) according to the manufacturer's instructions. The primers (forward: 5'-GGACCATCAACGGTGTTCAGG-3' and reverse: 5'-GTCGCAGGATCGCTTCTTCGA-3') for detecting the VP3 of CIAV were designed based on the sequence of the GD-101 strain of CIAV. The viral load of CIAV was detected by qPCR with SYBR Green qPCR Master Mix (Glpbio, Montclair, CA, USA). The samples were amplified and analyzed in a Bio-Rad Laboratories CFX96 real-time fluorescence quantitative

PCR apparatus (Shanghai, China) with the following program: 95 °C for 30 s, 40 cycles of 95 °C for 5 s, 60 °C for 35 s. The results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

2.3. Cell Infection and Sampling Design

HD11 cells were infected with ALV-J, CIAV, and ALV-J + CIAV in 12-well plates at a multiplicity of infection (MOI) of 1 of ALV-J or 1×10^6 copy numbers of CIAV per well. The cells treated with equal amounts of phosphate-buffered saline (PBS) were used as mock-infected controls. The designated time course of infection and sampling is shown in Figure 1A.

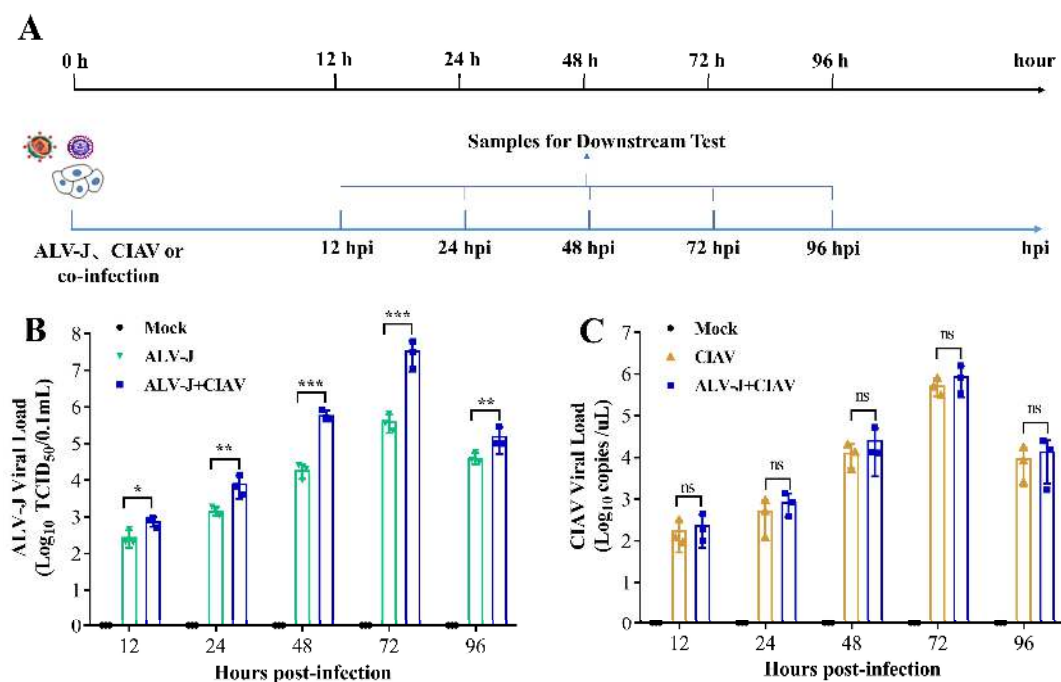


Figure 1. A time course diagram showing that *in vitro* and CIAV can increase the replication of ALV-J. (A) Time course of simultaneous co-infection of ALV-J and CIAV in HD11 cells. The cultured monolayer cells were infected with ALV-J and CIAV. At 12, 24, 48, 72, and 96 hpi, cell samples were collected for downstream testing. All the experiments were performed independently at least three times (hpi, hours post infection) (B,C). ALV-J and CIAV virus titers in HD11 cells were determined from 12 to 96 hpi by qPCR. Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by a one-way ANOVA Test. These experiments were performed independently at least three times with similar results. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns—not significant.

2.4. Testing Indices of Cell Infection Experiments

At 12, 24, 48, 72, and 96 h post-infection (hpi), HD11 cell supernatants were collected to test the viral load of ALV-J or CIAV and the concentrations of cytokines. The ALV-J and CIAV viral load were quantified by using the published qPCR method [16] and the qPCR method as described above, respectively. The concentrations of IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ in the cell supernatants were measured through ELISA as previously described [16]. At 12, 24, and 96 hpi, HD11 cells were collected to test the apoptosis using a Dead Cell Apoptosis Kit with annexin V-fluorescein isothiocyanate and propidium iodide (Beyotime). The percentage of apoptotic cells was quantitated by using a fluorescence-activated cell-sorting (FACS) BD AccuriC6 cell sorter (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.5. Animal Infection Experiments

A total of 160 one-day-old SPF chickens were randomly divided into 4 groups (40 chicks per group) and were housed in four separate negative-pressure-filtered air isolators. ALV-J

mono-infected chickens were inoculated with $10^{4.5}$ TCID₅₀ of the ALV-J strain SCAU-HN06 in 0.2 mL PBS through intraabdominal injection. CIAV mono-infected chickens were inoculated with 1×10^6 copy numbers of the CIAV strain GD-101 in 0.2 mL PBS by leg muscle injection. Co-infected chickens were inoculated with $10^{4.5}$ TCID₅₀ of the ALV-J and 1×10^6 copy numbers of the CIAV in 0.2 mL PBS. Mock-infected chickens were inoculated with 0.2 mL PBS. All animal experiments were performed following the guidelines of the South China Agricultural University Animal Care and Use Committee (permit no. SCAU 2021b020). At the end of the experiment, all the chickens were euthanized with CO₂.

2.6. Testing Indices of Animal Experiments

The chickens in each group were clinically inspected daily after infection, and their weights and mortality were recorded each week throughout the experimental period. Venous blood samples from three chickens randomly selected from each group were collected in vacuum tubes at one-week intervals and then utilized for the ALV-J and CIAV viral load tests by qPCR. Three chickens selected randomly from each group were euthanized humanely and necropsied at 7, 21, and 42 days post-infection (dpi), and tissues from the spleen, thymus, Fabricius, liver, and kidney were collected to determine the viral load of ALV-J or CIAV in different organs by qPCR, as described above. At 21 and 42 dpi, samples of the immune organs, including the spleen, thymus, and Fabricius, were excised from 6 chickens in each group and weighed. The immune organ indices were calculated as organ weight (mg)/body weight (g) $\times 100\%$. At 21 dpi, 3 chickens selected randomly from each group were euthanized humanely, and necropsy tissue samples from the spleen, thymus, bursa of the Fabricius, liver, and kidney were collected for histopathological examination. At 7 dpi, anticoagulant-treated blood samples were collected from three chicks in each group and then utilized for analysis of peripheral blood lymphocyte subsets by fluorescence-activated cell-sorting (FACS) as previously described [16].

2.7. Statistical Analysis

The statistical analyses in this study were performed using the GraphPad Prism version 8.0 (San Diego, CA, USA). Survival curves between the two groups were compared using a log-rank test (Mantel–Cox). Comparisons of the viral load, cytokines expression, immune organ indices, and peripheral blood lymphocyte subsets data between two groups at different time points or tissues were performed using multiple *t*-tests (such as the Holm–Sidak method) and one-way analysis of variance (ANOVA). Different lowercase letters indicate significant differences between different groups. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$. *p* values of less than 0.05, 0.01, and 0.001 are indicated with *, ** and ***, respectively.

3. Results

3.1. CIAV Can Increase the Replication of ALV-J *In Vitro*

To investigate the synergistic effects of the replication of ALV-J and CIAV *in vitro*, HD11 cells were infected with phosphate buffer (Mock), ALV-J, CIAV, and both viruses (ALV-J + CIAV), respectively. The time course of infection and sampling is shown in Figure 1A. As expected, the ALV-J RNA could not be detected in CIAV mono-infected and mock-infected HD11 cells; on the other hand, the ALV-J viral load of co-infected HD11 cells was higher than that of ALV-J mono-infected HD11 cells at 12 hpi, and this difference was extremely significant from 24 hpi to 96 hpi (Figure 1B). However, the CIAV copy number in CIAV mono-infected and co-infected HD11 cells did not differ significantly in any time detected with regard to the stage of infection (Figure 1C). These results demonstrate that CIAV can significantly promote the ALV-J replication in chicken macrophage cells but ALV-J cannot enhance the CIAV replication *in vitro*.

3.2. ALV-J and CIAV Synergistically Induce Inflammatory Mediator Secretion and Apoptosis

To explore whether the two viruses, ALV-J and CIAV, could synergistically promote the secretion of cytokines, we tested the dynamic changes in IL-6, IL-10, IFN- α and IFN- γ secretion in HD11 cells by ELISA. The results showed that the levels of IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ (from 12 hpi to 96 hpi) in the co-infection cells were significantly higher compared to the ALV-J and CIAV mono-infected cells or the controls (Figure 2). The data indicated that ALV-J and CIAV synergistically induce the secretion of inflammatory mediators *in vitro*.

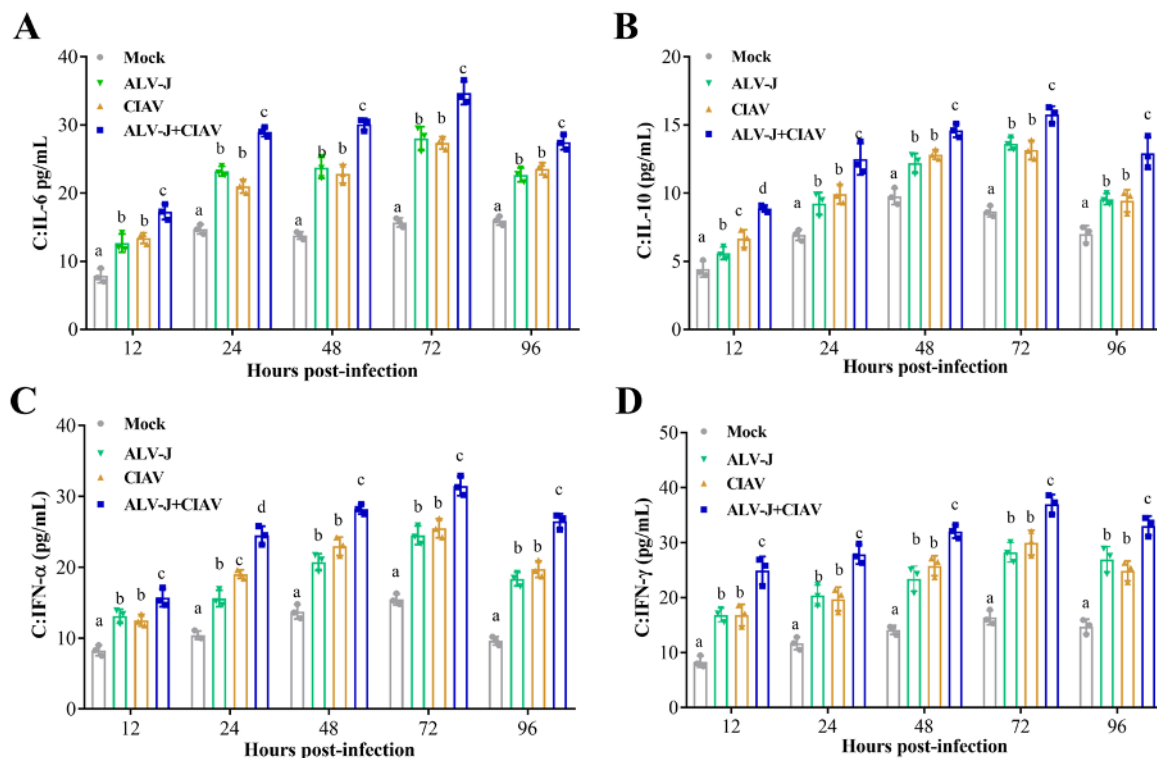


Figure 2. ALV-J and CIAV synergistically induce inflammatory mediator secretion *in vitro*. (A) IL-6 (B) IL-10 (C) IFN- α and (D) IFN- γ in cells at 12, 24, 48, 72 and 96 dpi were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by a one-way ANOVA test. Different lowercase letters indicate significant differences between different groups.

Next, we collected HD11 cells to evaluate the effect of ALV-J or CIAV mono-infection and co-infection on apoptosis. As shown in Figure 3, there was no significant difference in the apoptosis rate between ALV-J and CIAV mono-infected cells, but both of them had significantly higher rates than that of mock-infected cells at 12 hpi. Notably, the apoptosis rate of the co-infected cells was significantly higher than that of mono-infected cells at 12 hpi. The apoptosis rate of CIAV mono-infected cells was significantly higher than that of ALV-J mono-infected or mock-infected cells at 24 hpi and 96 hpi, while the ALV-J and CIAV co-infected cells had significantly higher apoptosis rates than ALV-J or CIAV mono-infected cells at 24 hpi and 96 hpi. These results revealed that ALV-J and CIAV indeed synergistically promote apoptosis and cause more serious harm to HD11 cells.

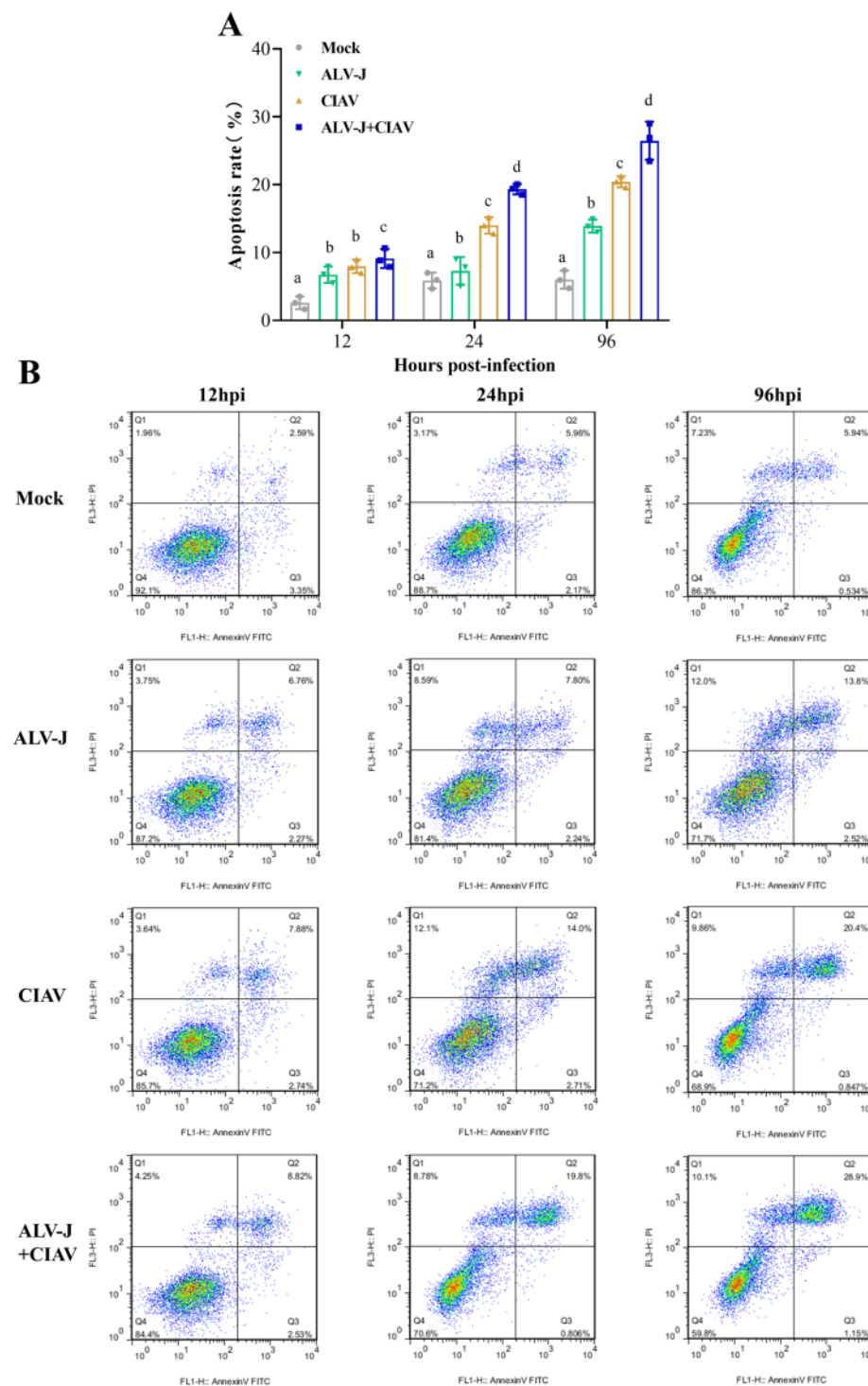


Figure 3. ALV-J and CIAV synergistically induced apoptosis of HD11 cells. **(A).** Statistics of cell apoptosis rate in each group. Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by a one-way ANOVA test. Different lowercase letters indicate significant differences between different groups. **(B).** Scatter plots of apoptosis detected by flow cytometry in each group.

3.3. ALV-J and CIAV Synergistically Increase the Pathogenicity in SPF Chickens

To further understand the co-pathogenicity of ALV-J and CIAV *in vivo*, we performed animal infection experiments on one-day-old SPF chicks and the experimental process is illustrated in Figure 4A. As shown by the survival curves in Figure 4B, none of the uninfected chickens showed clinical symptoms and mortality, while the overall mortality of

co-infected chickens was significantly higher than that of mono-infected chickens. The ALV-J and CIAV mono-infected chickens had an overall mortality of 20% and 33%, respectively, while the co-infected chickens had 47%. The average body weight of ALV-J and CIAV co-infected chickens was significantly lower than that of ALV-J and CIAV mono-infected chickens or uninfected chickens from 14 dpi to 49 dpi. The average body weight of co-infected, ALV-J, CIAV mono-infected, and uninfected chickens was 267.5 g, 322.8 g, 359.3 g, and 506.6 g at 49 dpi, respectively (Figure 4C).

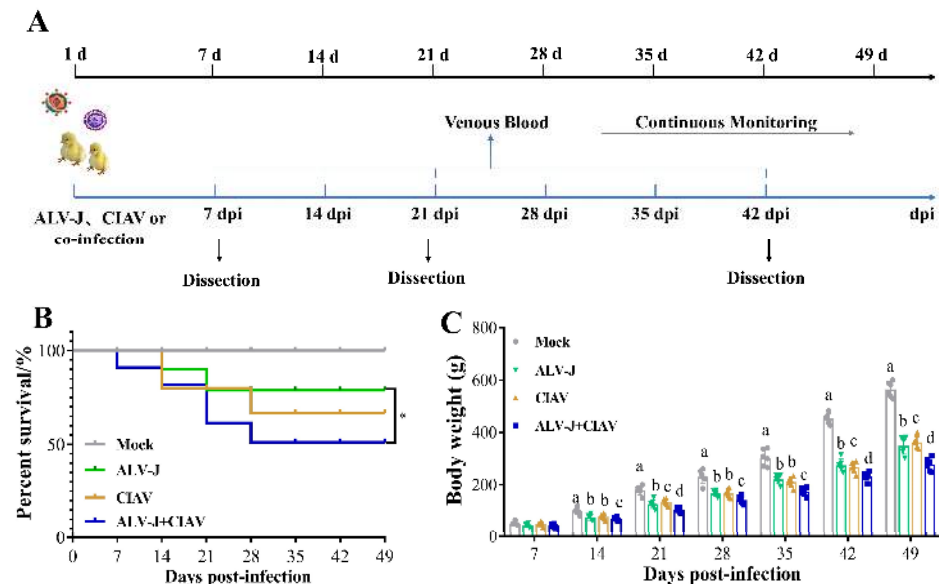


Figure 4. ALV-J and CIAV synergistically increase the pathogenicity in SPF chickens. (A). Time course of simultaneous co-infection of ALV-J and CIAV in SPF chickens. After infection, venous blood from 3 chickens was collected from each group weekly to detect the virus load. At 21 and 42 dpi, samples of the immune organs, including the thymus, Fabricius, and spleen, from 3 chickens in each group were excised and weighed. Weight loss and mortality were continuously monitored throughout the experimental period. (dpi—days post infection). (B). Survival curves for each group. (C). Body weight of SPF chickens for each group from day 1 to day 49. Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by one-way ANOVA Test. Different lowercase letters indicate significant differences between different groups. These experiments were performed independently at least three times with similar results. *, $p < 0.05$; ns—not significant.

To better understand the functional damage of organs caused by co-infection with ALV-J and CIAV, the spleen, thymus, Fabricius, liver, and kidney were collected and examined histologically. Compared to the ALV-J and CIAV mono-infected chickens, the histopathological observation results presented that ALV-J and CIAV co-infected chickens had the most severe lymphocyte loss in their immune organs, and more severe damage in liver and kidney manifested in more severe inflammatory cell infiltration (Figure 5). Taken together, these results clearly demonstrated that ALV-J and CIAV co-infection causes increased mortality, severe growth retardation, and tissue damage.

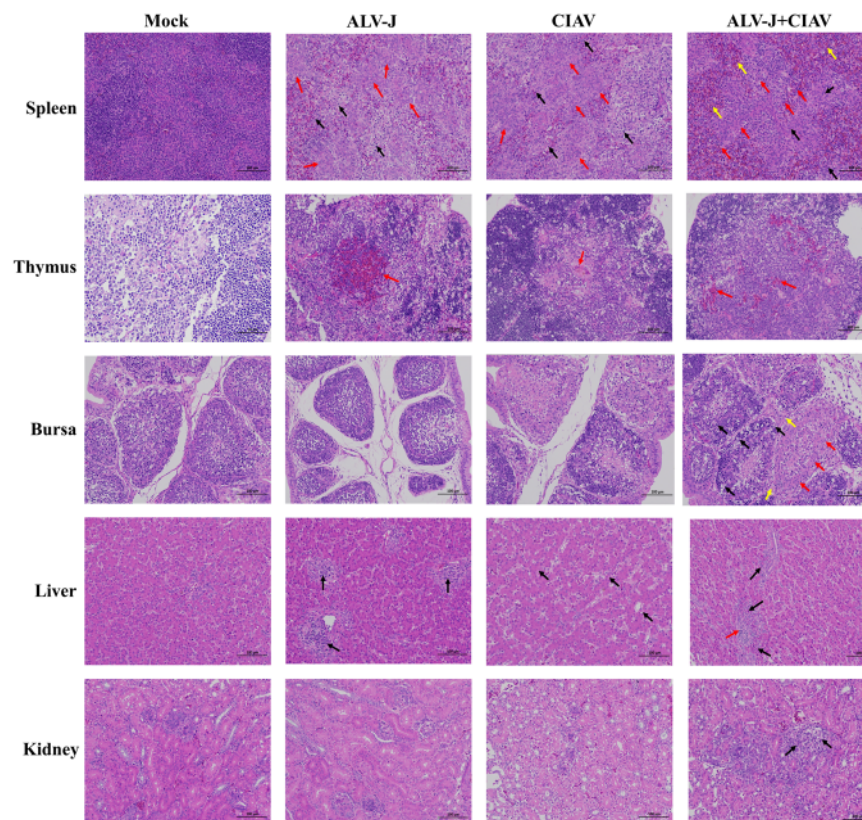


Figure 5. The histological examination of co-infection of ALV-J and CIAV. The thymus, Fabricius, spleen, liver, and kidney tissues were stained by HE (200×). The thymus tissue volume showed obvious atrophy, cortical thinning (black arrow), and necrosis of cells within the reticular structure occurred occasionally, along with cytoplasmic eosinophilic enhancement (red arrow). The Fabricius had an unclear boundary, with epithelial cells proliferation and a densely layered arrangement (black arrow), with a large amount of connective tissue hyperplasia in the follicular interstitium (red arrow) and inflammatory cell infiltration (yellow arrow). The spleen showed signs of lymphopenia (black arrow), reticulum cells proliferation (red arrow), and erythrocytoses (yellow arrow). The liver showed myeloma cells accumulation, large nuclei, obvious eosinophilic granules in the cytoplasm (black arrow), and inflammatory cell infiltration (red arrow). The kidney exhibited inflammatory cell infiltration (black arrow).

3.4. CIAV Can Promote the Replication of ALV-J *In Vivo*

To further investigate whether ALV-J and CIAV could regulate the replication of each other *in vivo*, the viral loads of ALV-J and CIAV in venous blood and organs of infected chicken were detected using qPCR. The viral load of ALV-J in the venous blood of co-infected chickens was significantly higher than that of ALV-J mono-infected chickens at 7 dpi and 42 dpi, and this difference was extremely significant from 14 dpi to 35 dpi (Figure 6A). However, the viral load of CIAV in the venous blood of chickens in the co-infected group was not significantly different from that in the CIAV mono-infected group at all time points tested (Figure 6B). The viral load of ALV-J in the spleen, thymus, and liver from ALV-J and CIAV co-infected chickens was extremely significantly higher than that of ALV-J mono-infected chickens at 7 dpi, 21 dpi, and 42 dpi (Figure 6C–E). The ALV-J viral load in the Fabricius of co-infected chickens was significantly higher than that of ALV-J mono-infected chickens at 7 dpi, and this difference was extremely significant at 21 dpi, while this difference was not significant at 42 dpi. Additionally, the kidneys of co-infected chickens had significantly higher ALV-J viral loads than those of ALV-J mono-infected chickens at 7 dpi, and this difference was extremely significant at 21 dpi and 42 dpi (Figure 6C–E). However, the viral load of CIAV in the spleen, thymus, Fabricius, liver, and

kidney of chickens in the co-infected group was not significantly different from that in the CIAV mono-infected group at 7 dpi, 21 dpi, and 42 dpi (Figure 6F–H). These results demonstrate that CIAV can promote the replication of ALV-J in chicken peripheral blood and major organs, but ALV-J has no significant effects on the replication of CIAV *in vivo*.

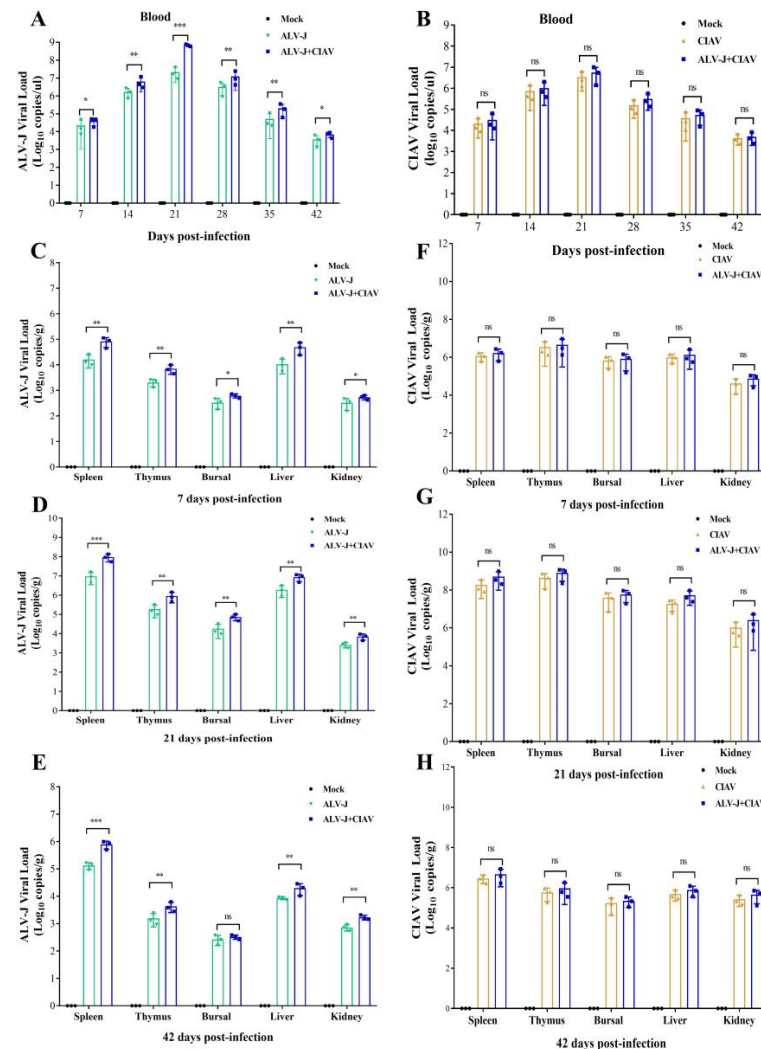


Figure 6. CIAV can promote the replication of ALV-J *in vivo*. (A). ALV-J viral load in blood of different groups of SPF chickens from 7 to 42 dpi. (B). CIAV viral load in blood of different groups of SPF chickens. (C–E). The viral load of ALV-J mono-infected groups and CIAV co-infected groups in the thymus, bursa, spleen, liver, and kidneys at 7 dpi, 21 dpi, and 42 dpi according to qPCR. (F–H). The viral load of CIAV mono-infected groups and ALV-J co-infected groups in thymus, bursa, spleen, liver, and kidneys at 7 dpi, 21 dpi and 42 dpi by qPCR. Data were expressed as mean \pm SE and analyzed by One-way ANOVA Test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ns, no significant.

3.5. ALV-J and CIAV Synergistically Enhances the Immunosuppression in SPF Chickens

To determine whether co-infection of ALV-J and CIAV could synergistically promote more severe immunosuppression in chickens, we further evaluated the immune organ indexes and the differentiation of lymphocyte subsets. As described in Figure 7A,B, the spleen index was significantly higher in co-infected chickens than that in ALV-J or CIAV mono-infected chickens at 21 dpi and 42 dpi, indicating that co-infection can cause more serious splenomegaly. The thymus index was significantly lower in co-infected chickens than that in ALV-J or CIAV mono-infected chickens at 21 dpi and 42 dpi, indicating that co-infection caused more severe atrophy of the thymus gland (Figure 7A,B). At 21 dpi, the Fabricius index of ALV-J mono-infected chickens was significantly higher than that of

co-infected chickens, CIAV mono-infected chickens, or uninfected chickens, and that of co-infected chickens was significantly higher than that of CIAV mono-infected chickens or uninfected chickens (Figure 7A). At 42 dpi, there was no significant difference in the Fabricius index among all groups (Figure 7B). Next, we measured the proportions of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cells in the blood to assess the cellular immune responses after infection. Compared to the controls, the proportion of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, and CD3⁺CD8⁺ cells in the blood of co-infected chickens and mono-infected chickens significantly decreased. Furthermore, the proportion of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, and CD3⁺CD8⁺ cells in the blood of CIAV mono-infected chickens were significantly lower than that of ALV-J mono-infected chickens, while the proportion of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, and CD3⁺CD8⁺ cells in the blood of co-infected chickens was even more significantly lower than that of CIAV mono-infected chickens. Moreover, when compared to the controls, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ in the blood of co-infected and mono-infected chickens was significantly lower. These data demonstrate that co-infection of ALV-J and CIAV can promote more severe immunosuppression in chickens than the single infection with either ALV-J or CIAV.

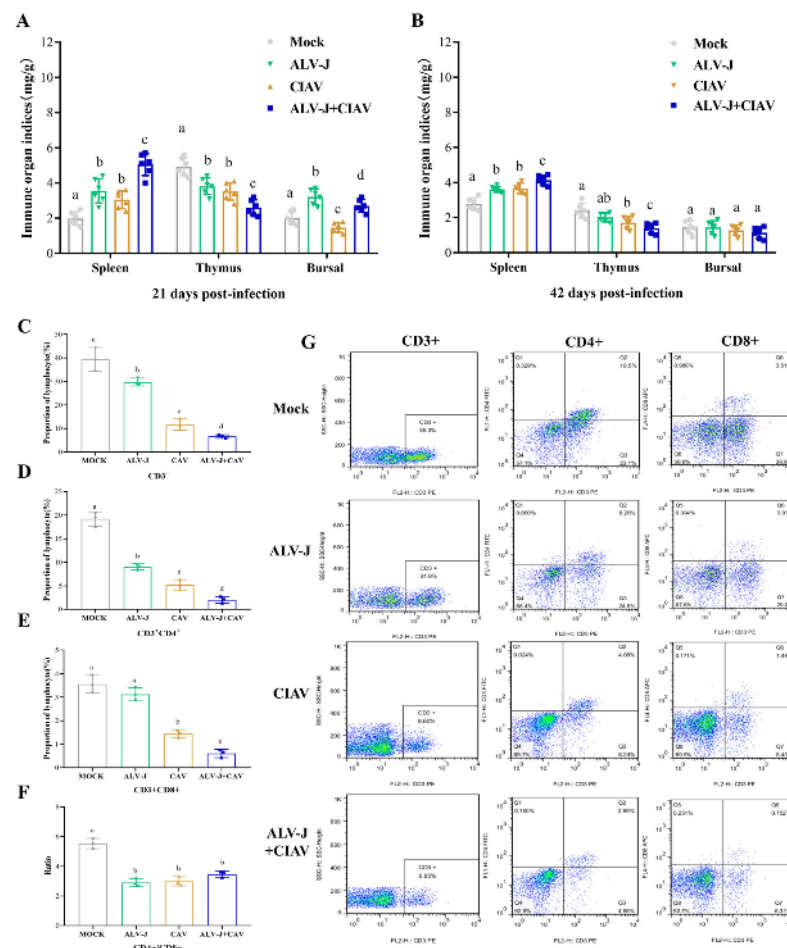


Figure 7. ALV-J and CIAV synergistically enhance the immunosuppression in SPF chickens. (A,B) Immune organ indexes of thymus spleen and bursa at 21 dpi and 42 dpi. (C–F) The proportion of lymphocyte subpopulation CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, and the ratio of CD4⁺/CD8⁺ are summarized in the diagram on the left. Data are expressed as mean ± SE and analyzed by a one-way ANOVA Test. Different lowercase letters indicate significant differences between different groups. (G) Representative FACS scatter diagrams showing the percentages of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cells in peripheral blood mono-nuclear cells from treatment groups ALV-J, CIAV, ALV-J + CIAV, and empty control.

4. Discussion

ALV-J and CIAV co-infected chickens manifested greater disease severity and higher mortality than ALV-J or CIAV mono-infected chickens. However, the synergistic pathogenicity of ALV-J and CIAV in chicken is still incompletely elusive. Thus, a full comprehension of the synergistic pathogenic effects of ALV-J and CIAV co-infection is critical for providing efficient strategies to solve such production problems in the poultry industry.

4.1. Co-Infection of ALV-J and CIAV Can Significantly Aggravate the Severity of Illness *In Vitro* and *In Vivo*

Co-infection of viruses in chicken flocks is common in nature, and often alters the biological properties of viruses and cells, such as viral pathogenicity and cell apoptosis [31,32]. The outcome of any co-infection of viruses is complex and contributes significantly to disease severity and epidemiology. In this study, we established the cellular and animal co-infection model of ALV-J and CIAV to further understand the synergistic pathogenicity of ALV-J and CIAV *in vitro* and *in vivo*. Cytokines, such as IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ , have been shown to be involved in the progression of disease [16]. Thus, our study is concerned with the secretion of IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ in ALV-J and CIAV co-infected HD11 cells, which can be employed as target cells both for ALV-J and CIAV [14,33]. Consistent with previous studies [34,35], co-infected cells were found to have significantly higher levels of IL-6, IL-10, IFN- α , and IFN- γ at different time points (Figure 2), manifesting synergistically enhanced pathogenicity of both ALV-J and CIAV. Additionally, the apoptosis rate of the co-infected HD11 cells was significantly higher than that of mono-infected or mock-infected cells at the different time points tested (Figure 3), revealing that ALV-J and CIAV can synergistically promote apoptosis and cause more serious harm to HD11 cells. Furthermore, we found that co-infection with ALV-J and CIAV significantly increased mortality and caused more severe growth retardation in chickens when compared to the ALV-J or CIAV mono-infection (Figure 4). Moreover, our histopathological examination revealed more serious tissue damage in the ALV-J and CIAV co-infected chickens (Figure 5). These results have consistently demonstrated that co-infection with ALV-J and CIAV could significantly aggravate the severity of illness *in vitro* and *in vivo*.

4.2. CIAV Can Efficiently Promote the Replication Ability of ALV-J

The most common outcome of co-infection is the effect of one virus on the replication of another, which is known as viral interference, whereby one virus can competitively constrain or promote the replication of the other virus within the host cell. Recent studies have shown that synergistic replication of ALV-J and MDV or ALV-J and REV is essential for boosting viral pathogenicity in chickens [17,19]. In the present study, we found that the ALV-J viral load was significantly higher in co-infected HD11 cells than in ALV-J mono-infected HD11 cells at all the detection time points (Figure 1B), indicating that CIAV can significantly promote ALV-J replication *in vitro*. However, the CIAV load in co-infected and CIAV mono-infected HD11 was not significantly different at any time detected at the stage of infection (Figure 1C), suggesting that ALV-J cannot enhance the CIAV replication *in vitro*. Notably, co-infected chickens had significantly higher ALV-J loads than ALV-J mono-infected chickens in the peripheral blood and in each organ at all the detection time points, which was consistent with the *in vitro* data and indicated that CIAV could significantly enhance ALV-J replication *in vivo*, while ALV-J still could not promote the replication of CIAV *in vivo*, according to the results of the CIAV viral load between the co-infected and CIAV mono-infected chickens. Various factors can influence viral synergistic interactions in co-infection, such as specific crosstalk between the two viruses and the induced immune response [36,37]. Viruses may hijack the host factors for their replication and meet the requirements associated with virus replication [38,39]. For example, miR-155 facilitates the synergistic replication between ALV-J and REV by targeting the PRKCI-MAPK8 and TIMP3-MMP2 dual-pathway [40]. Thus, it is reasonable to speculate that there is a competitive relationship between ALV-J and CIAV replication during the co-infection.

The underlying reason for the interesting phenomenon that CIAV can enhance ALV-J replication *in vitro* and *in vivo*, but not vice versa, requires further investigation. Taking our findings together, the synergistic pathogenicity of ALV-J and CIAV co-infection revealed that CIAV can efficiently promote the replication ability of ALV-J, which may result in more serious immunosuppression in chickens.

4.3. Co-Infection of ALV-J and CIAV Can Aggravate Immunosuppression

Previous studies have consistently confirmed that the severity of immunodeficiency increases when one or both immunosuppressive viruses infect the same host. Co-infection of ALV-J with REV, IBVDV, or MDV in chickens can result in more severe immune organ damage and T and B lymphocyte exhaustion [17,19,41]. In our study, the spleen index was significantly higher in ALV-J and CIAV co-infected chickens than in mono-infected chickens, which intuitively reflected that co-infection can cause more serious splenomegaly. Furthermore, the decrease in the thymus index in ALV-J and CIAV co-infected chickens indicated that co-infection caused more severe atrophy of the thymus gland (Figure 7A,B). T cells play a pivotal role in the defense against viral invasions, immune surveillance, and antiviral immunity [42]. CD4⁺ T cell activation, following differentiation into Th1 and Th2 subsets, is involved in both cellular and humoral immunity [43]. CD8⁺ T cells are primarily induced by the apoptosis of target cells resulting from direct damage or viral infection, contributing to cellular immunity [44,45]. Changes in the proportion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells directly impact the immune status of the organism. Our results showed that the proportion of CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, and CD3⁺CD8⁺ cells in the blood of CIAV mono-infected chickens was significantly lower than that of ALV-J mono-infected chickens or uninfected chickens, indicating that CIAV induces severe lymphocyte apoptosis in peripheral blood. Furthermore, the proportions of lymphocytes exhibited more severe decreases in the blood of co-infected chickens compared to that of CIAV mono-infected chickens, revealing that ALV-J and CIAV co-infection may exacerbate immunosuppression.

In summary, this study demonstrates a synergy between ALV-J and CIAV in co-infected cells and chickens, as reflected by the fact that ALV-J and CIAV co-infection induced a more severe pathogenicity and worsened the immunosuppression of chickens. It provides a warning for the prevention and control of ALV-J and CIAV and the necessity of eradicating ALV-J or CIAV in large-scale chicken farms.

Author Contributions: H.X.: Conceptualization, methodology, formal analysis and writing—original draft. W.L.: Conceptualization and methodology. Y.N.: Methodology. S.C.: Formal analysis and investigation. H.L. and X.Z.: Supervision and project administration. W.C. and Q.X.: Funding acquisition and writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by Qingyuan City science and technology project (2021DZX019); the Guangdong Provincial Key R&D Program (2020B020222001); the National Natural Science Foundation of China (31602053, 32272981); Heyuan Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture Project (DT20220003); Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (2018B030315009, 2022A1515012115); the construction project of modern agricultural science and technology innovation alliance in Guangdong province (2022KJ128, 2023KJ128).

Informed Consent Statement: All animal experiments were approved by the Animal Ethics Committee of South China Agricultural University (SCAU), Guangzhou, China (approval ID: 2021b020).

Data Availability Statement: All the data generated or analyzed during this study are included in this article. The datasets were deposited in a publicly accessible repository; the datasets generated for this study can be found in GenBank: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank> (accessed on 30 March 2024). Genbank accession numbers are mentioned in the Materials and Methods Section 2 of the article.

Acknowledgments: The authors would like to thank the members of the South China Collaborative Innovation Center for Poultry Disease Control and Product Safety for supporting this work.

Conflicts of Interest: The authors declare that this research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

1. Hoerr, F.J. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis.* **2010**, *54*, 2–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Gimeno, I.M.; Schat, K.A. Virus-Induced Immunosuppression in Chickens. *Avian Dis.* **2018**, *62*, 272–285. [[CrossRef](#)]
3. Song, H.; Bae, Y.; Park, S.; Kwon, H.; Lee, H.; Joh, S. Loop-mediated isothermal amplification assay for detection of four immunosuppressive viruses in chicken. *J. Virol. Methods* **2018**, *256*, 6–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Payne, L.N.; Nair, V. The long view: 40 years of avian leukosis research. *Avian Pathol.* **2012**, *41*, 11–19. [[CrossRef](#)]
5. Xu, M.; Hang, F.; Qian, K.; Shao, H.; Ye, J.; Qin, A. Chicken hepatomegaly and splenomegaly associated with novel subgroup J avian leukosis virus infection. *BMC Vet. Res.* **2022**, *18*, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Yue, Q.; Yulong, G.; Liting, Q.; Shuai, Y.; Delong, L.; Yubao, L.; Lili, J.; Sidang, L.; Xiaomei, W. Mutations in and Expression of the Tumor Suppressor Gene p53 in Egg-Type Chickens Infected With Subgroup J Avian Leukosis Virus. *Vet. Pathol.* **2015**, *52*, 1052–1056. [[CrossRef](#)]
7. Santen, V.L.V.; Joiner, K.S.; Murray, C.; Petrenko, N.; Hoerr, F.J.; Toro, H. Pathogenesis of chicken anemia virus: Comparison of the oral and the intramuscular routes of infection. *Avian Dis.* **2004**, *48*, 494–504. [[CrossRef](#)]
8. Wang, J.; Li, Y.; Zhang, Y.; Chen, L.; Fang, L.; Chang, S.; Wang, Y.; Zhao, P. Construction of chicken infectious anemia virus infectious clone and study on its pathogenicity. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1016784. [[CrossRef](#)]
9. Miller, M.M.; Schat, K.A. Chicken infectious anemia virus: An example of the ultimate host-parasite relationship. *Avian Dis.* **2004**, *48*, 734–745. [[CrossRef](#)]
10. Kim, H.-R.; Kwon, Y.-K.; Bae, Y.-C.; Oem, J.-K.; Lee, O.-S. Molecular characterization of chicken infectious anemia viruses detected from breeder and broiler chickens in South Korea. *Poult. Sci.* **2010**, *89*, 2426–2431. [[CrossRef](#)]
11. Fatoba, A.J.; Adeleke, M.A. Chicken anemia virus: A deadly pathogen of poultry. *Acta Virol.* **2019**, *63*, 19–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Zeng, Y.; Zhang, H.; Zhang, H. Isolation, Identification, and Whole Genome Analysis of Chicken Infectious Anemia Virus in an Outbreak of Disease in Adult Layer Hens. *Vet. Sci.* **2023**, *10*, 481. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhang, X.; Liu, Y.; Wu, B.; Sun, B.; Chen, F.; Ji, J.; Ma, J.; Xie, Q. Phylogenetic and molecular characterization of chicken anemia virus in southern China from 2011 to 2012. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 3519. [[CrossRef](#)]
14. McConnell, C.D.; Adair, B.M.; McNulty, M.S. Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route. *Avian Dis.* **1993**, *37*, 366–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zheng, L.-P.; Teng, M.; Li, G.-X.; Zhang, W.-K.; Wang, W.-D.; Liu, J.-L.; Li, L.-Y.; Yao, Y.; Nair, V.; Luo, J. Current Epidemiology and Co-Infections of Avian Immunosuppressive and Neoplastic Diseases in Chicken Flocks in Central China. *Viruses* **2022**, *14*, 2599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Chen, W.; Chen, S.; Nie, Y.; Li, W.; Li, H.; Zhang, X.; Chen, F.; Xie, Q. Synergistic Immunosuppression of Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Is Responsible for Enhanced Pathogenicity. *Viruses* **2022**, *14*, 2312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Dong, X.; Ju, S.; Zhao, P.; Li, Y.; Meng, F.; Sun, P.; Cui, Z. Synergetic effects of subgroup J avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus co-infection on growth retardation and immunosuppression in SPF chickens. *Vet. Microbiol.* **2014**, *172*, 425–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Cui, N.; Wang, Q.; Shi, W.; Han, L.; Wang, J.; Ma, X.; Li, H.; Wang, F.; Su, S.; Zhao, X. Synergy of subgroup J avian leukosis virus and *Eimeria tenella* to increase pathogenesis in specific-pathogen-free chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **2016**, *177*, 42–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Zhou, J.; Zhao, G.-L.; Wang, X.-M.; Du, X.-S.; Su, S.; Li, C.-G.; Nair, V.; Yao, Y.-X.; Cheng, Z.-Q. Synergistic Viral Replication of Marek's Disease Virus and Avian Leukosis Virus Subgroup J is Responsible for the Enhanced Pathogenicity in the Superinfection of Chickens. *Viruses* **2018**, *10*, 271. [[CrossRef](#)]
20. McNeilly, F.; Smyth, J.A.; Adair, B.M.; McNulty, M.S. Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian Dis.* **1995**, *39*, 532–537. [[CrossRef](#)]
21. Yang, M.; Yang, Q.; Bi, X.; Shi, H.; Yang, J.; Cheng, X.; Yan, T.; Zhang, H.; Cheng, Z. The Synergy of Chicken Anemia Virus and Gyrovirus Homsa 1 in Chickens. *Viruses* **2023**, *15*, 515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Li, X.; Zhang, K.; Pei, Y.; Xue, J.; Ruan, S.; Zhang, G. Development and Application of an MRT-qPCR Assay for Detecting Coinfection of Six Vertically Transmitted or Immunosuppressive Avian Viruses. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 1581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Liao, L.; Chen, W.; Zhang, X.; Zhang, H.; Li, A.; Yan, Y.; Xie, Z.; Li, H.; Lin, W.; Ma, J.; et al. Semen extracellular vesicles mediate vertical transmission of subgroup J avian leukosis virus. *Virol. Sin.* **2022**, *37*, 284–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Krapez, U.; Barlic-Maganja, D.; Toplak, I.; Hostnik, P.; Rojs, O.Z. Biological and molecular characterization of chicken anemia virus isolates from Slovenia. *Avian Dis.* **2006**, *50*, 69–76. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Farooque, M.; Li, X.; Hussain, A.; Fayyaz, A.; Bao, Y.; Xing, L.; Yu, M.; Chang, F.; Wang, S.; Liu, P.; et al. Isolation and molecular characterization of the first subgroup J avian leukosis virus from chicken in Pakistan. *Infect. Genet. Evol.* **2020**, *85*, 104425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Liu, P.; Li, L.; Jiang, Z.; Yu, Y.; Chen, X.; Xiang, Y.; Chen, J.; Li, Y.; Cao, W. Molecular characteristics of subgroup J avian leukosis virus isolated from yellow breeder chickens in Guangdong, China, during 2016–2019. *Infect. Genet. Evol.* **2021**, *89*, 104721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Shah, P.T.; Bahoussi, A.N.; Cui, X.; Shabir, S.; Wu, C.; Xing, L. Genetic diversity, distribution, and evolution of chicken anemia virus: A comparative genomic and phylogenetic analysis. *Front. Microbiol.* **2023**, *14*, 1145225. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Xu, S.; Zhang, Z.; Xu, X.; Ji, J.; Yao, L.; Kan, Y.; Xie, Q.; Bi, Y. Molecular Characteristics of Chicken Infectious Anemia Virus in Central and Eastern China from 2020 to 2022. *Animals* **2023**, *13*, 2709. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Meng, F.; Dong, G.; Zhang, Y.; Tian, S.; Cui, Z.; Chang, S.; Zhao, P. Co-infection of fowl adenovirus with different immunosuppressive viruses in a chicken flock. *Poult. Sci.* **2018**, *97*, 1699–1705. [[CrossRef](#)]
30. Wu, X.; Kong, J.; Yao, Z.; Sun, H.; Liu, Y.; Wu, Z.; Liu, J.; Zhang, H.; Huang, H.; Wang, J.; et al. A new rapid and sensitive method for detecting chicken infectious anemia virus. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 994651. [[CrossRef](#)]
31. Körner, C.; Krämer, B.; Schulte, D.; Coenen, M.; Mauss, S.; Fätkenheuer, G.; Oldenburg, J.; Nattermann, J.; Rockstroh, J.K.; Spengler, U. Effects of HCV co-infection on apoptosis of CD4+ T-cells in HIV-positive patients. *Clin. Sci.* **2009**, *116*, 861–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Zhang, H.; Han, F.; Shu, X.; Li, Q.; Ding, Q.; Hao, C.; Yan, X.; Xu, M.; Hu, H. Co-infection of porcine epidemic diarrhoea virus and porcine deltacoronavirus enhances the disease severity in piglets. *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, 1715–1726. [[CrossRef](#)]
33. Feng, M.; Xie, T.; Li, Y.; Zhang, N.; Lu, Q.; Zhou, Y.; Shi, M.; Sun, J.; Zhang, X. A balanced game: Chicken macrophage response to ALV-J infection. *Vet. Res.* **2019**, *50*, 20. [[CrossRef](#)]
34. Heidari, M.; Zhang, H.M.; Sharif, S. Marek's disease virus induces Th-2 activity during cytolytic infection. *Viral Immunol.* **2008**, *21*, 203–214. [[CrossRef](#)]
35. Parvizi, P.; Read, L.; Abdul-Careem, M.F.; Lusty, C.; Sharif, S. Cytokine gene expression in splenic CD4(+) and CD8(+) T-cell subsets of chickens infected with Marek's disease virus. *Viral Immunol.* **2009**, *22*, 31–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Liberto, M.C.; Zicca, E.; Pavia, G.; Quirino, A.; Marascio, N.; Torti, C.; Focà, A. Virological Mechanisms in the Coinfection between HIV and HCV. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 320532. [[CrossRef](#)]
37. Bell, L.C.K.; Noursadeghi, M. Pathogenesis of HIV-1 and Mycobacterium tuberculosis co-infection. *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 80–90. [[CrossRef](#)]
38. Bochnakian, A.; Zhen, A.; Zisoulis, D.G.; Idica, A.; KewalRamani, V.N.; Neel, N.; Daugaard, I.; Hamdorf, M.; Kitchen, S.; Lee, K.; et al. Interferon-Inducible MicroRNA miR-128 Modulates HIV-1 Replication by Targeting TNPO3 mRNA. *J. Virol.* **2019**, *93*, e00364-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Modai, S.; Farberov, L.; Herzig, E.; Isakov, O.; Hizi, A.; Shomron, N. HIV-1 infection increases microRNAs that inhibit Dicer1, HRB and HIV-EP2, thereby reducing viral replication. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0211111. [[CrossRef](#)]
40. Xue, J.; Zhou, D.; Zhou, J.; Du, X.; Zhang, X.; Liu, X.; Ding, L.; Cheng, Z. miR-155 facilitates the synergistic replication between avian leukosis virus subgroup J and reticuloendotheliosis virus by targeting a dual pathway. *J. Virol.* **2023**, *97*, e0093723. [[CrossRef](#)]
41. Liu, H.; Ma, K.; Liu, M.; Yang, C.; Huang, X.; Zhao, Y.; Qi, K. Histologic findings and viral antigen distribution in natural coinfection of layer hens with subgroup J avian leukosis virus, Marek's disease virus, and reticuloendotheliosis virus. *J. Vet. Diagn. Investig.* **2019**, *31*, 761–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. He, S.; Zheng, G.; Zhou, D.; Huang, L.; Dong, J.; Cheng, Z. High-frequency and activation of CD4+CD25+ T cells maintain persistent immunotolerance induced by congenital ALV-J infection. *Vet. Res.* **2021**, *52*, 119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cherai, M.; Hamel, Y.; Baillou, C.; Touil, S.; Guillot-Delost, M.; Charlotte, F.; Kossir, L.; Simonin, G.; Maury, S.; Cohen, J.L.; et al. Generation of Human Alloantigen-Specific Regulatory T Cells Under Good Manufacturing Practice-Compliant Conditions for Cell Therapy. *Cell Transplant.* **2015**, *24*, 2527–2540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Vaccari, M.; Franchini, G. T Cell Subsets in the Germinal Center: Lessons from the Macaque Model. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 348. [[CrossRef](#)]
45. Velu, V.; Mylvaganam, G.; Ibegbu, C.; Amara, R.R. Tfh1 Cells in Germinal Centers During Chronic HIV/SIV Infection. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1272. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

A Comprehensive Analysis of the ceRNA Network and Hub Genes in Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Superinfection

Sheng Chen ^{1,2,3}, Huijuan Xu ¹, Tingxi Pan ¹, Yu Nie ¹, Xinheng Zhang ^{1,2,3} , Feng Chen ^{1,2,3}, Qingmei Xie ^{1,2,3} and Weiguo Chen ^{1,2,3,*}

- ¹ State Key Laboratory of Swine and Poultry Breeding Industry & Heyuan Branch, Guangdong Provincial Laboratory of Lingnan Modern Agricultural Science and Technology, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; chens@scau.edu.cn (S.C.); sunnyxu20181@outlook.com (H.X.); txpan@scau.stu.edu.cn (T.P.); thcscau@163.com (Y.N.); xhzhang@scau.edu.cn (X.Z.); fengch@scau.edu.cn (F.C.); qmx@scau.edu.cn (Q.X.)
- ² Guangdong Provincial Key Lab of AgroAnimal Genomics and Molecular Breeding, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China
- ³ Guangdong Engineering Research Center for Vector Vaccine of Animal Virus, Guangzhou 510642, China
- * Correspondence: wgchen81@scau.edu.cn; Tel.: +86-20-85280279; Fax: +86-20-85280740

Simple Summary: Viral superinfections in poultry can seriously impact chicken health and cause major financial losses. Two viruses, avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) and infectious bursal disease virus (IBDV), are especially concerning because they often infect chickens together, leading to worsened health issues and reduced productivity. Previous research has studied these effects, but the specific genes and pathways driving this problem were unknown. In this study, we analyzed immune organ samples from chickens infected with either ALV-J, IBDV, or both. Using these data, we mapped out complex networks among the RNA molecules to reveal how these viruses interact both by working together and through individual responses. We identified the key genes and pathways involved in these processes. This insight could support new methods to control these infections, enhancing poultry health and lowering economic losses.



Citation: Chen, S.; Xu, H.; Pan, T.; Nie, Y.; Zhang, X.; Chen, F.; Xie, Q.; Chen, W. A Comprehensive Analysis of the ceRNA Network and Hub Genes in Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Superinfection. *Animals* **2024**, *14*, 3449. <https://doi.org/10.3390/ani14233449>

Academic Editor: Velmurugu Ravindran

Received: 6 September 2024

Revised: 4 November 2024

Accepted: 19 November 2024

Published: 28 November 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: In the realm of poultry production, viral superinfections pose significant challenges, causing substantial economic losses worldwide. Among these, avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) and infectious bursal disease virus (IBDV) are particularly concerning as they frequently lead to superinfections in chicken, further exacerbating production losses and health complications. Our previous research delved into the pathogenicity and immunosuppressive effects of these superinfections through in vitro and in vivo analyses. Yet, the underlying key genes and pathways governing this phenomenon remained elusive. In this study, we randomly selected three chickens at 21 days post infection from each treatment group (ALV-J, IBDV, ALV-J+IBDV, and control group) to collect the bursa of Fabricius samples for full transcriptome analysis. Utilizing these data, we constructed a comprehensive circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA network which elucidated both synergistic and specific activations during the superinfection. Notably, three pivotal genes (FILIP1L, DCX, and MYPN) were pinpointed in datasets reflecting synergistic activations. Conversely, four other genes (STAP, HKR6, XKR4, and TLR5) emerged in datasets associated with specific activations. Further exploration revealed diverse significant GO terms and pathways associated with both synergistic and distinct activation processes. These ceRNA network and core genes potentially wield substantial influence over the synergistic or specific activation of tumorigenesis and pathogenesis induced by ALV-J and IBDV. These findings could help develop targeted therapies and improve disease control in poultry, reducing economic losses.

Keywords: ALV-J; IBDV; superinfection; circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA network

1. Introduction

Superinfection, characterized by at least two distinct pathogens simultaneously infecting a host, holds significant implications for various aspects, such as virulence evolution, genetic diversity, epidemiological understanding, and the development of control strategies [1,2]. Superinfections have become widespread in various animal groups in recent decades [3,4]. This multifaceted nature renders the traditional reductionist approach to host–pathogen interactions ill-suited for studying singular infections [5]. At present, the majority of superinfection studies remain at the phenotypic research level [6]. The task of pinpointing crucial differentially expressed genes during superinfection events is complicated by the synergistic effects of multiple factors. We have developed a novel strategy which characterizes the pathogenic effects of superinfection by studying both synergistic and specific activations during the superinfection process. Synergistic activation refers to genes or pathways which can be activated by either virus individually, with superinfection significantly enhancing their expression levels. In contrast, specific activation pertains to genes or pathways which are uniquely activated only in the presence of both viruses simultaneously. Both models reveal the infection of pathogenic characteristics from different angles.

In the poultry industry, avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) can induce tumorigenesis and immunosuppression in infected chickens, leading to substantial financial setbacks [7]. Similar to ALV-J, infectious bursal disease virus (IBDV) is also known to trigger tumor development in young chicks [8]. Notably, ALV-J and IBDV often cause superinfections in poultry production [9]. In a previous study, we conducted a comprehensive analysis of the pathogenicity and immunosuppressive activity of superinfections with ALV-J and IBDV *in vitro* and *in vivo* [10]. The findings indicated that superinfection synergistically enhances tumorigenesis and disease progression. However, the key genes or pathways regulating this process remain unclear.

Competing endogenous RNAs (ceRNAs) are a class of non-coding RNAs which interact with microRNAs (miRNAs) to regulate gene expression. According to the ceRNA hypothesis, various RNA species can compete for binding to shared miRNAs, thereby influencing the levels of target mRNAs [11,12]. This interaction can modulate a range of biological processes, including cell differentiation, proliferation, and apoptosis. The construction of a ceRNA network is based on three principal criteria: (1) a targeting relationship between miRNAs and potential ceRNAs, accompanied by a negative correlation in their expression patterns; (2) a positive correlation in the expression levels among candidate ceRNAs; and (3) the degree of enrichment of candidate ceRNAs binding to a specific miRNA. In the context of viral infections, ceRNAs may play a critical role in regulating the host's response to pathogens, potentially affecting the viral life cycle and the pathogenesis of related diseases [13]. Given their regulatory capabilities, ceRNAs may significantly influence the synergistic and specific activation of tumorigenesis and pathogenesis induced by ALV-J and IBDV.

This study aims to investigate the regulatory networks involved in ALV-J and IBDV superinfection by analyzing full transcriptome data to identify the key hub genes and associated pathways. To achieve this, a circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA network is constructed through comprehensive analysis of the synergistic and specific activations during the superinfection process. Three hub genes (FILIP1L, DCX, and MYPN) are identified in synergistic activation datasets, while four hub genes (STAP, HKR6, XKR4, and TLR5) are identified in specific activation datasets. Additionally, different significantly enriched GO terms and pathways are identified during the processes of synergistic and characteristic activation. We further validate the differential expression of key hub genes and their targeted relationships with miRNAs. These hub genes may have a significant influence on the synergistic or specific activation of tumorigenesis and pathogenesis by ALV-J and IBDV.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

Institutional and national guidelines for the use and care of laboratory animals were closely followed. All animal experiments were performed following the guidelines of the South China Agricultural University Animal Care and Use Committee (permit no. SCAU2021b020). This study was performed in positive pressure, high-efficiency, particulate air-filtered stainless steel isolators with an enclosed and ventilated environment, and feed and water were provided ad libitum.

2.2. Virus and Animals

The ALV-J strain SCAU-HN06 was a generous gift from Professor Liao of South China Agricultural University. IBDV strain 801 (cell-adapted strain) was stored in our laboratory. Virus titers were calculated using the Reed–Muench formula to calculate the 50% tissue cultural infective dose (TCID₅₀) per milliliter. One-day-old SPF chicks (White Leghorn), including both hen chicks and cock chicks, were purchased from Xinxing Dahuanong Poultry Eggs Co., Ltd. (Yunfu, China).

2.3. Animal Experimental Design and Sample Collection

A total of 220 one-day-old SPF chicks were randomly assigned to four groups: ALV-J, IBDV, ALV-J+IBDV, and a control group. At 1 day of age, the chicks in the ALV-J and ALV-J+IBDV groups were inoculated via intra-abdominal injection with 100 µL of ALV-J at a dose of 10^{3.7} TCID₅₀. At 14 days of age, the chicks in the IBDV and ALV-J+IBDV groups were similarly inoculated with 100 µL of IBDV at a dose of 10^{3.6} ELD₅₀. The control group was given 100 µL of PBS at both day 1 and day 14, following the protocol described in a previous study [10]. At 21 days post infection (35 days of age), three chickens from each group were randomly selected for the collection of bursa of Fabricius, which were then sent to Guangzhou Genedenovo Biotechnology Co., Ltd. (Guangzhou, China) for full transcriptome high-throughput sequencing. The specific groups and treatments are detailed in Figure 1.

2.4. Differentially Expressed mRNA, miRNA, circRNA, and lncRNA

To detect differentially expressed transcripts among the samples, the edgeR package (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html>, accessed on 18 November 2024) was utilized, where mRNAs, lncRNAs, and circRNAs with a fold change ≥ 2 and an FDR < 0.05 were deemed significant DEGs, while miRNAs required a fold change ≥ 2 and $p < 0.05$ for significance.

2.5. miRNA Target Prediction

For the samples, a triad of computational tools—mireap, miRanda, and TargetScan—was harnessed to discern the miRNA targets. Information pertaining to miRNA sequences and their respective families was gleaned from the TargetScan online repository (accessible at <http://www.targetscan.org/>, accessed on 18 November 2024).

2.6. Construction of ceRNA Network

In the context of ceRNAs being communally regulated by miRNAs, ascertaining the target genes for differentially expressed miRNAs represents an integral preliminary step in exploring ceRNA regulatory networks. The Spearman Rank correlation coefficient (SCC) was employed to assess the expression correlation between mRNA–miRNA, lncRNA–miRNA, or circRNA–miRNA pairs. Pairs exhibiting an SCC of less than -0.7 were deemed to be negatively co-expressed lncRNA–miRNA pairs, mRNA–miRNA pairs, or circRNA–miRNA pairs, with mRNA, lncRNA, and circRNA identified as miRNA target genes and all RNAs demonstrating differential expression.

The Pearson correlation coefficient (PCC) was utilized to evaluate the expression correlation between lncRNA–mRNA or circRNA–mRNA pairs. Pairs characterized by a

PCC exceeding 0.9 were recognized as co-expressed lncRNA-mRNA pairs or circRNA-mRNA pairs. In these pairs, both mRNA and lncRNA or both mRNA and circRNA were targeted and exhibited negative co-expression with a shared miRNA.

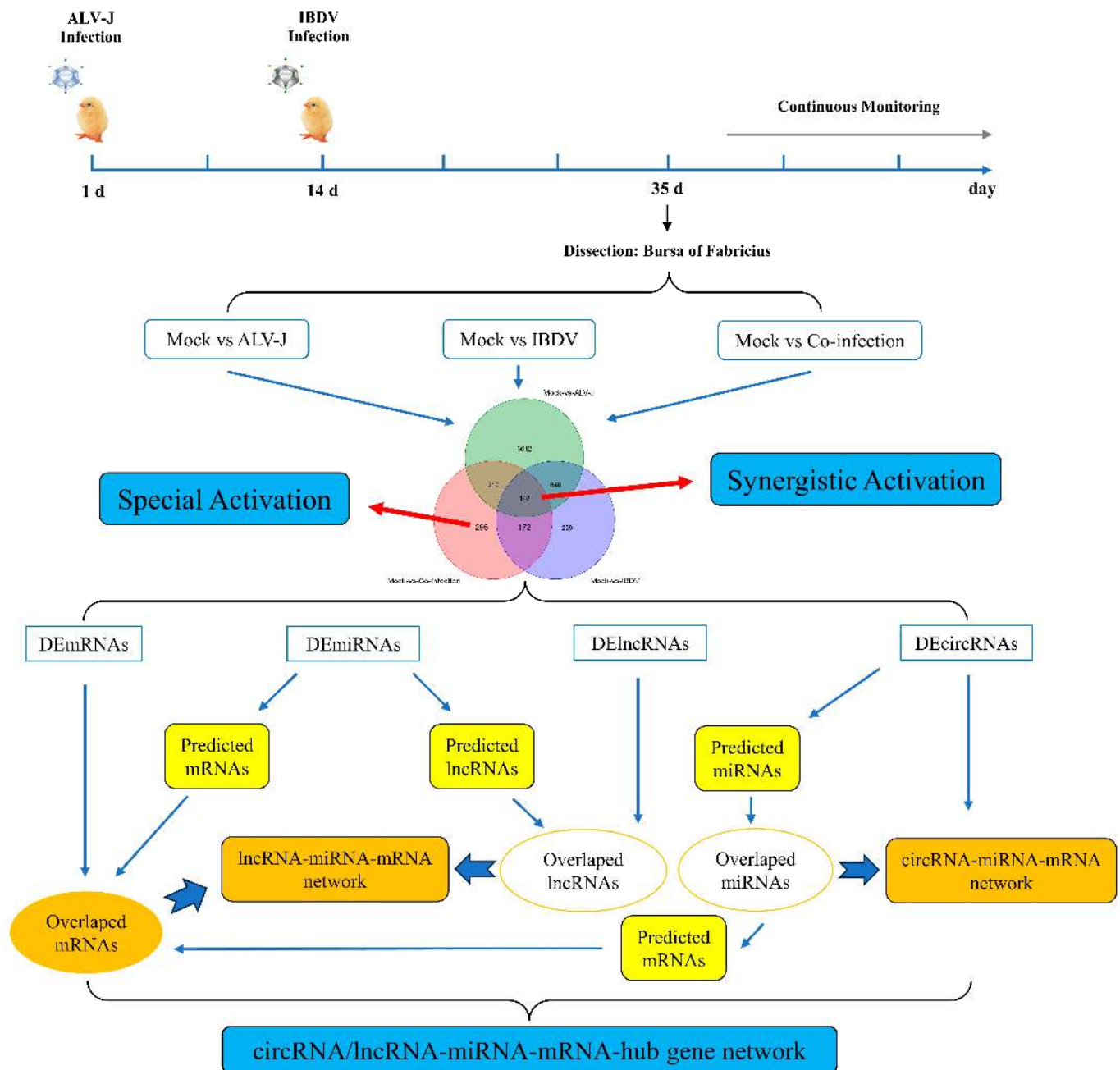


Figure 1. Workflow of bioinformatics analysis.

2.7. Visualization of ceRNA Network

The assembly of the lncRNA-miRNA-mRNA network was accomplished by amalgamating all previously identified co-expression competing triplets, which were subsequently visualized using Cytoscape software version 3.6.0, available at <http://www.cytoscape.org/>, accessed on 18 November 2024.

2.8. ceRNA Connectivity Analysis

Within the ceRNA network, RNA connectivity was defined by the count of co-expressed targeted miRNAs. Consequently, ceRNAs exhibiting the highest connectivity were considered hub genes, which are deemed more crucial within biological networks.

2.9. Functional Enrichment Analysis

To evaluate functional enrichment, Gene Ontology (GO) biological processes term and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses of mRNAs within the ceRNA network were conducted using Cytoscape. GO enrichment analysis reveals all GO terms which are significantly enriched in ceRNAs compared with the genome background and filters the ceRNAs associated with specific biological functions. Initially, all ceRNAs were mapped to GO terms in the Gene Ontology database (accessible at <http://www.geneontology.org/>, accessed on 18 November 2024). The gene counts were tallied for each term, and GO terms significantly enriched in ceRNAs relative to the genomic background were determined using the hypergeometric test.

Genes typically interact to execute certain biological functions. Pathway-based analysis aids in the deeper understanding of gene functions. KEGG is a principal public database related to pathways (available at <http://www.kegg.jp/kegg/>, accessed on 18 November 2024). Pathway enrichment analysis pinpointed the metabolic pathways or signal transduction pathways which were significantly enriched in ceRNAs when contrasted with the entire genome background.

2.10. Reverse Transcription and Quantitative PCR (qRT-PCR)

The total RNA was reverse transcribed into cDNA using a Prime-Script™ cDNA synthesis kit (Takara Bio, Inc., Shanghai, China), while miRNAs were extracted using an miRNA Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. The relative expression of lncRNAs, miRNAs, and mRNAs was evaluated using qRT-PCR. The primers mentioned above for qRT-PCR are listed in Supplementary Table S1. Then, qRT-PCR was performed on a CFX96 system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, USA) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN, USA) according to the manufacturer's protocol. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

2.11. Statistical Analysis

GraphPad Prism version 8.1 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) was used for statistical analysis. The values reported in each graph are expressed as the mean \pm standard error of the mean (S.E.M.) of at least three independent experiments. One-way ANOVA was used to test the differences between different groups. We considered $p < 0.05$ to be statistically significant. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3. Results

3.1. Identification of Differentially Expressed circRNAs (DEcircRNAs), lncRNAs (DElncRNAs), miRNAs (DEmiRNAs), and mRNAs (DEmRNAs) in Superinfection of ALV-J and IBDV

Our previous research results indicated that superinfection with ALV-J and IBDV synergistically causes pathogenicity by mutually enhancing viral replication, leading to more severe immunosuppression than infections with ALV-J or IBDV alone [10]. However, the molecular mechanisms underlying this outcome are still unclear. Consequently, we randomly selected three chickens at 21 days post infection from each group (ALV-J, IBDV, ALV-J+IBDV, and control group) to collect bursa of Fabricius samples for full transcriptome analysis using high-throughput sequencing.

As illustrated in Figure 1, this strategy was employed to analyze the competing endogenous RNA (ceRNA) regulatory network during the superinfection process with ALV-J and IBDV, focusing on both synergistic and specific activations (Figure 1). In addressing synergistic activation, we filtered differentially expressed mRNAs, miRNAs, lncRNAs,

and circRNAs which exhibited synergistic activation for integrative analysis, subsequently constructing a circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA hub gene network. For specific activation, differentially expressed RNAs which were characteristically activated were selected, and a similar gene network analysis was conducted.

To ensure data quality, it was essential to perform data filtering on the raw data before information analysis to minimize interference from invalid data. We utilized FastP for quality control on the raw reads generated from sequencing, filtering out low-quality data to obtain clean reads (Supplementary Table S2). Subsequently, we used the short read alignment tool Bowtie2 to align the clean reads with the ribosomal database of the species, removing reads which mapped to ribosomes without allowing for mismatches. The unmapped reads which remained were then used for subsequent transcriptomic analysis (Supplementary Table S2).

For the differential expression analysis of various RNA types based on expression levels, we selected mRNAs, lncRNAs, and circRNAs with an $FDR < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1$ and miRNAs with $p < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1$ as significantly differentially expressed RNAs. In terms of differential mRNAs, compared with the mock group, the ALV-J group had a total of 70 genes downregulated and 378 genes upregulated, and the IBDV group had 87 genes downregulated and 361 genes upregulated, while the superinfection group had 90 genes downregulated and 358 genes upregulated (Figure S1A and Supplementary Table S3). The differential miRNAs are presented in Figure S1B and Supplementary Table S3, the differential lncRNAs are shown in Figure S1C and Supplementary Table S3, and the differential circRNAs are shown in Figure S1D and Supplementary Table S3.

To identify genes which play a pivotal role during the superinfection process, the strategy delineated above was employed to analyze differentially expressed genes across the comparison groups (Figure 2). Among these, there were 448 mRNAs, 15 miRNAs, 70 lncRNAs, and 6 circRNAs synergistically activated during superinfection (Supplementary Table S4). For signature activation in superinfection, there were 295 mRNAs, 57 miRNAs, 110 lncRNAs, and 18 circRNAs (Supplementary Table S5). Tailored circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA interaction networks were constructed for both the synergistic and signature activation processes observed in superinfection, followed by subsequent functional analysis.

3.2. Construction of ceRNA Network During Superinfection with Synergistic Activation

In accordance with the ceRNA hypothesis, circRNAs or lncRNAs can inhibit miRNAs, which themselves repress mRNAs. Thus, after filtering out mismatched RNA interaction pairs, a circRNA/lncRNA-miRNA hub gene network was formed, consisting of 1 circRNA, 23 lncRNAs, 8 miRNAs, and 40 mRNAs (Figure 3).

In regulatory networks, nodes with high connectivity often hold significant biological importance; these genes are referred to as hub genes. In the ceRNA regulatory network, the connectivity of an RNA molecule (lncRNA/mRNA/circRNA) is defined as the number of miRNA molecules with which it has a targeting regulatory relationship. RNA molecules with higher connectivity possess a greater potential regulatory capability. For the top 10 mRNA/lncRNA/circRNA paths in terms of connectivity, a Sankey diagram was created to illustrate their targeting regulatory relationships with miRNAs (Figure 4). Among them, three hub genes of significant biological importance were identified, including FILIP1L (ncbi_769163), DCX (ncbi_374242), and MYPN (ncbi_423684). These hub genes may play an important role in the synergetic activation of tumorigenesis and pathogenesis by ALV-J and IBDV.

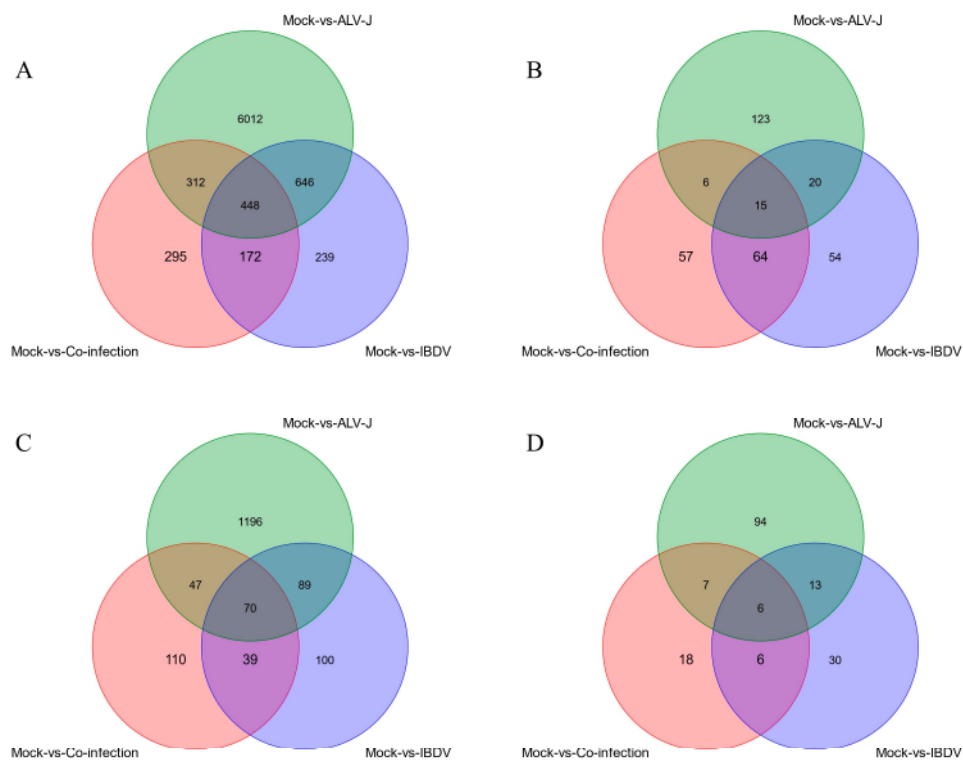


Figure 2. Venn diagram of differentially expressed RNAs. (A) mRNAs. (B) miRNAs. (C) lncRNAs. (D) circRNAs.

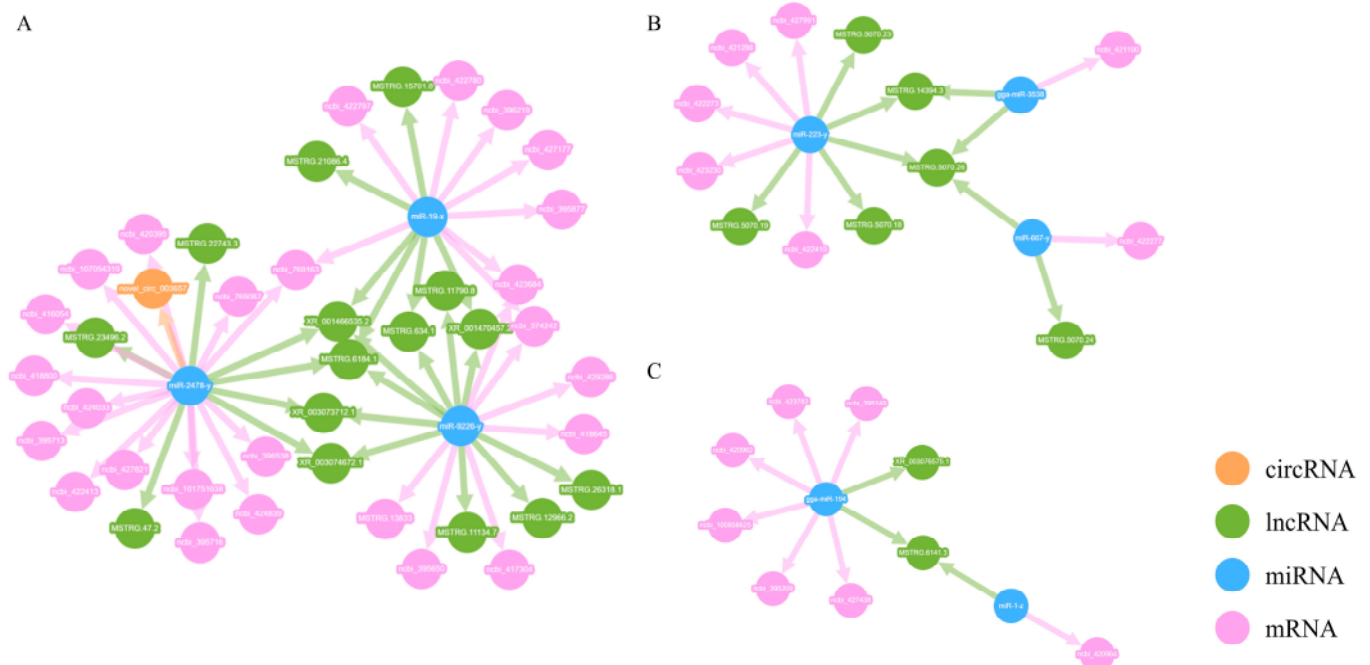


Figure 3. The circRNA/lncRNA-miRNA hub gene network. Construction of ceRNA network during superinfection with synergistic activation. (A) Interaction network showing the regulatory relationships among circRNAs, lncRNAs, miRNAs, and mRNAs; (B) Key regulatory network highlighting miRNA-mediated lncRNA and mRNA interactions; (C) Subnetwork emphasizing the regulation of specific miRNA hubs connecting lncRNAs and mRNAs.

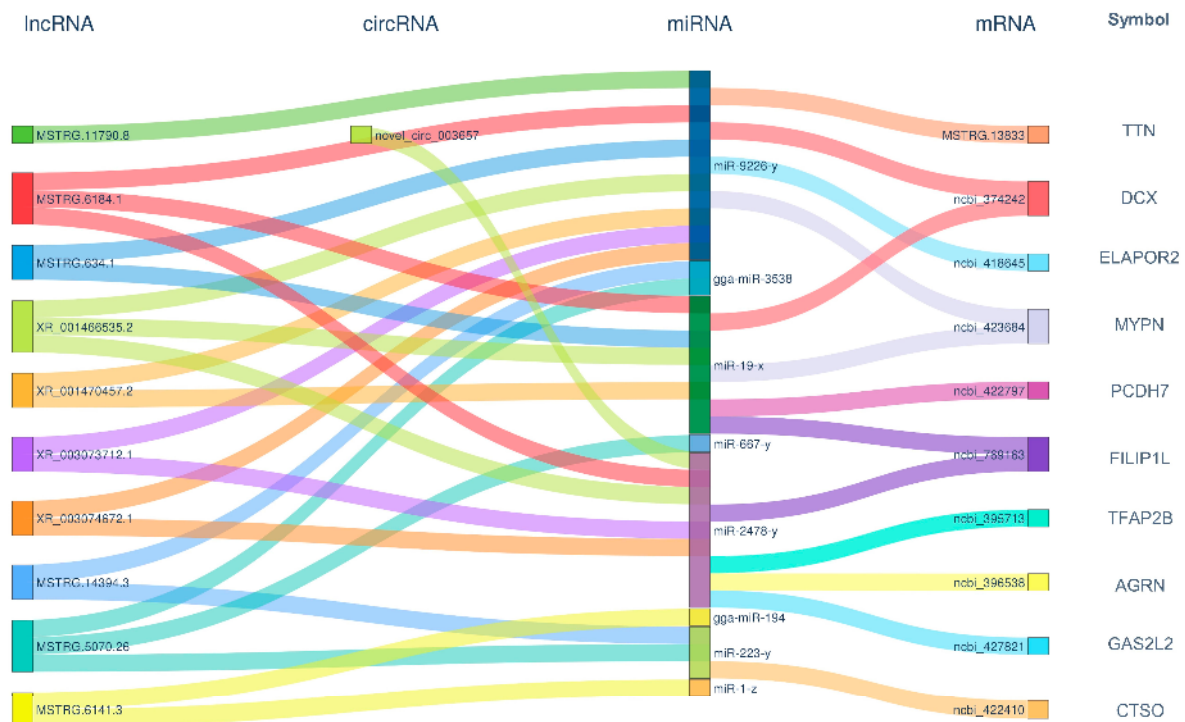


Figure 4. A ceRNA connectivity Sankey diagram during superinfection with synergistic activation. We created a Sankey diagram of the top 10 mRNA/lncRNA/circRNA paths with the highest connectivity, illustrating their targeting regulatory relationships with miRNAs. The diagram visualizes the interactions between circRNAs, lncRNAs, miRNAs, and mRNAs, showing the flow of regulatory relationships. Each node represents a specific RNA molecule, with the width of the connecting lines indicating the strength or frequency of interactions. The left side displays circRNAs and lncRNAs, which act as potential ceRNAs, while miRNAs are placed in the center, mediating the regulatory interactions. The right side shows the target mRNAs influenced by ceRNA interactions. The diagram highlights how different RNA species compete for shared miRNAs, affecting gene expression. The colors correspond to different RNA types, and the thickness of the connections reflects the enrichment level of the interaction.

3.3. Biological Functions of DEmRNAs in the ceRNA Network During Superinfection with Synergistic Activation

GO annotation and KEGG functional enrichment analyses were performed on the mRNAs in the ceRNA regulatory network, revealing significantly enriched gene functions and pathways within the ceRNA regulatory network. This provides clues for selecting the target genes in the next step. The GO analysis results show that the most enriched biological processes (BPs) mainly included cellular process and biological regulation. The cell, cell part, and organelle were the most enriched cellular components (CCs). According to the molecular function (MF), these DEmRNAs were mainly enriched in terms of binding, catalytic activity, and the molecular function regulator (Figure 5A and Supplementary Table S6). In KEGG pathway enrichment analysis, these DEmRNAs are mainly involved in the cholesterol metabolism, glycerolipid metabolism, PPAR signaling pathway, and glycerophospholipid metabolism (Figure 5B and Supplementary Table S7).

3.4. Construction of ceRNA Network During Superinfection with Specific Activation

In response to the uniquely activated genes observed during the superinfection process, a ceRNA regulatory network was also established. This network was composed of 9 circRNAs, 63 lncRNAs, 40 miRNAs, and 108 mRNAs (Figure 6). A Sankey diagram was similarly employed to depict their targeting regulatory interactions with miRNAs (Figure 7). Notably, the hub genes exhibiting the highest connectivity included STAP (ncbi_428761),

HTR6 (ncbi_430019), XKR4 (ncbi_100858171), and TLR5 (ncbi_554217). The hub genes likely had a significant influence on the specific activation of tumorigenesis and pathogenesis by ALV-J and IBDV.

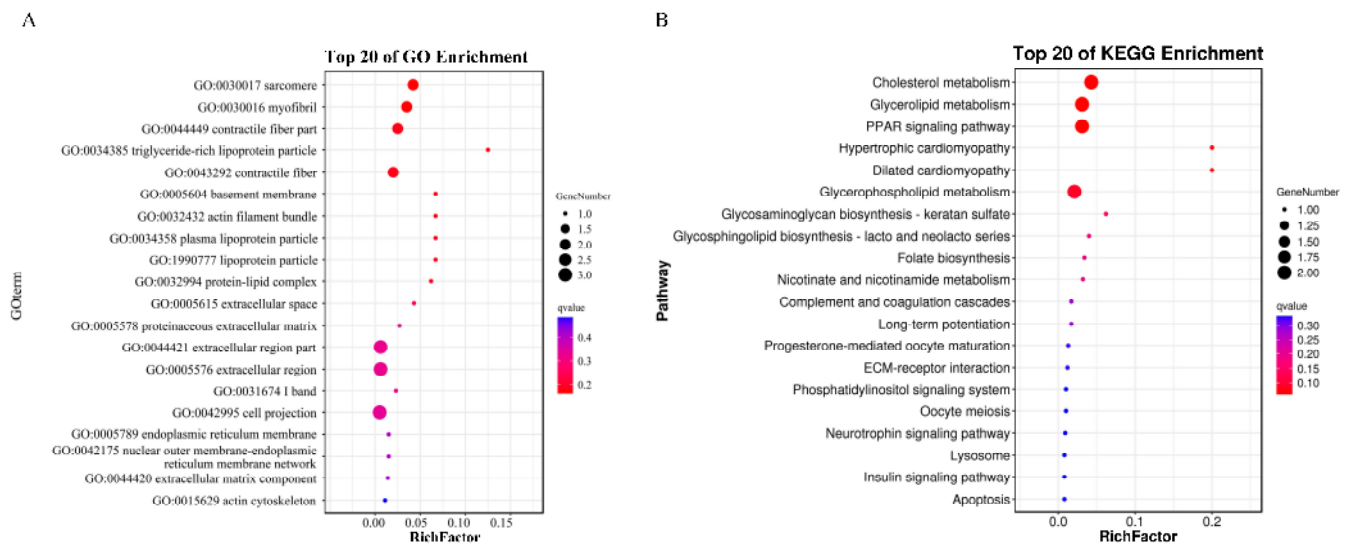


Figure 5. Biological functions of DEmRNAs in the ceRNA network during superinfection with synergistic activation. **(A)** GO terms. **(B)** KEGG pathway. The top 20 GO and KEGG terms with the smallest Q-values are presented. The y axis represents the GO and KEGG terms, and the x axis shows the enrichment factor (the ratio of the number of differentially expressed genes in a GO or KEGG term to the total number of genes in that term). The size of the dots indicates the number of genes, and the color gradient from red to yellow reflects the Q-value, with red indicating smaller Q-values.

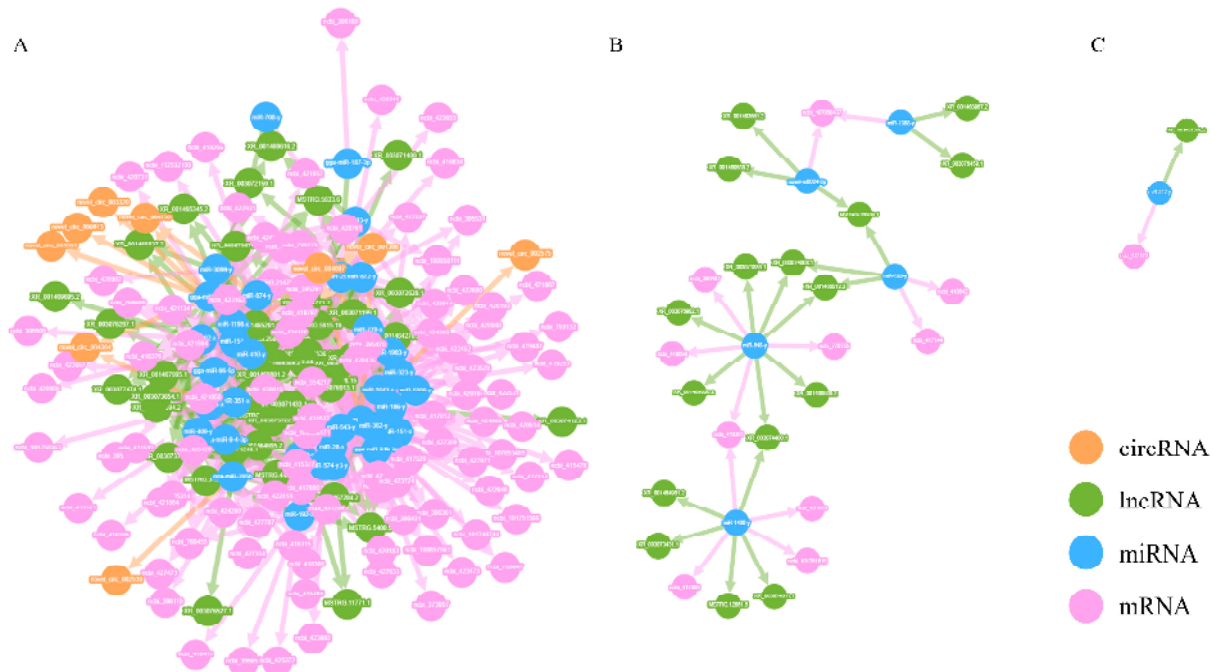


Figure 6. The circRNA/lncRNA-miRNA hub gene network. Construction of ceRNA network during superinfection with specific activation. **(A)** Interaction network showing the regulatory relationships among circRNAs, lncRNAs, miRNAs, and mRNAs; **(B)** Key regulatory network highlighting miRNA-mediated lncRNA and mRNA interactions; **(C)** Subnetwork emphasizing the regulation of specific miRNA hubs connecting lncRNAs and mRNAs.

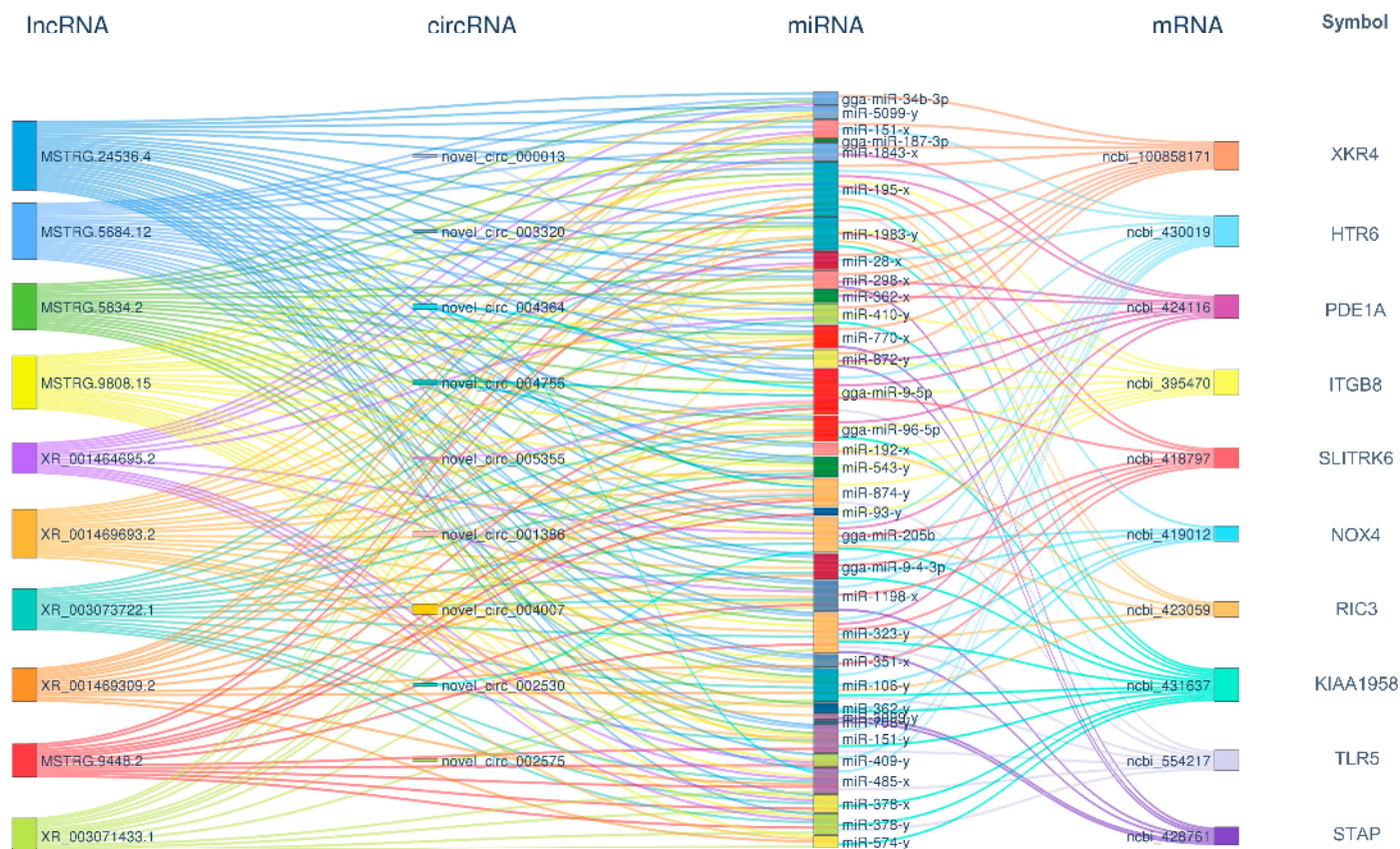


Figure 7. ceRNA connectivity Sankey diagram during superinfection with specific activation. The diagram visualizes the interactions between circRNAs, lncRNAs, miRNAs, and mRNAs, showing the flow of regulatory relationships. Each node represents a specific RNA molecule, with the width of the connecting lines indicating the strength or frequency of interactions. The left side displays circRNAs and lncRNAs, which act as potential ceRNAs, while miRNAs are placed in the center, mediating the regulatory interactions. The right side shows the target mRNAs influenced by ceRNA interactions. The diagram highlights how different RNA species compete for shared miRNAs, affecting gene expression. The colors correspond to different RNA types, and the thickness of the connections reflects the enrichment level of the interaction.

3.5. Biological Functions of DEmRNAs in the ceRNA Network During Superinfection with Specific Activation

The GO analysis outcomes indicate that the most significantly enriched BPs primarily encompassed cellular processes, single-organism processes, and biological regulation. As for the CCs, cells, cell parts, and organelles were found to be the most enriched categories. Regarding MFs, these DEmRNAs were predominantly associated with binding, catalytic activity, and molecular function regulator activity (Figure 8A and Supplementary Table S8). In the KEGG pathway enrichment analysis, these DEmRNAs were mainly implicated in neuroactive ligand–receptor interaction, the calcium signaling pathway, and axon guidance (Figure 8B and Supplementary Table S9).

3.6. Verification of Hub Genes, miRNAs, and circRNAs in the ceRNA Network

To validate the sequencing results, we employed a rigorous approach which involved the random selection of four differentially expressed transcripts from the ceRNA network for qPCR analysis. As illustrated in Figure 9, the gene expression patterns of the differentially expressed genes, miRNAs, and lncRNAs chosen from each group were not only statistically significant but also exhibited trends which aligned with the sequencing data. This congruence between the qPCR validation and sequencing outcomes underscores the reliability and precision of our findings. In addition, we also used the miRNA tar-

get prediction database to predict the targeting relationship between candidate miRNAs and mRNAs.

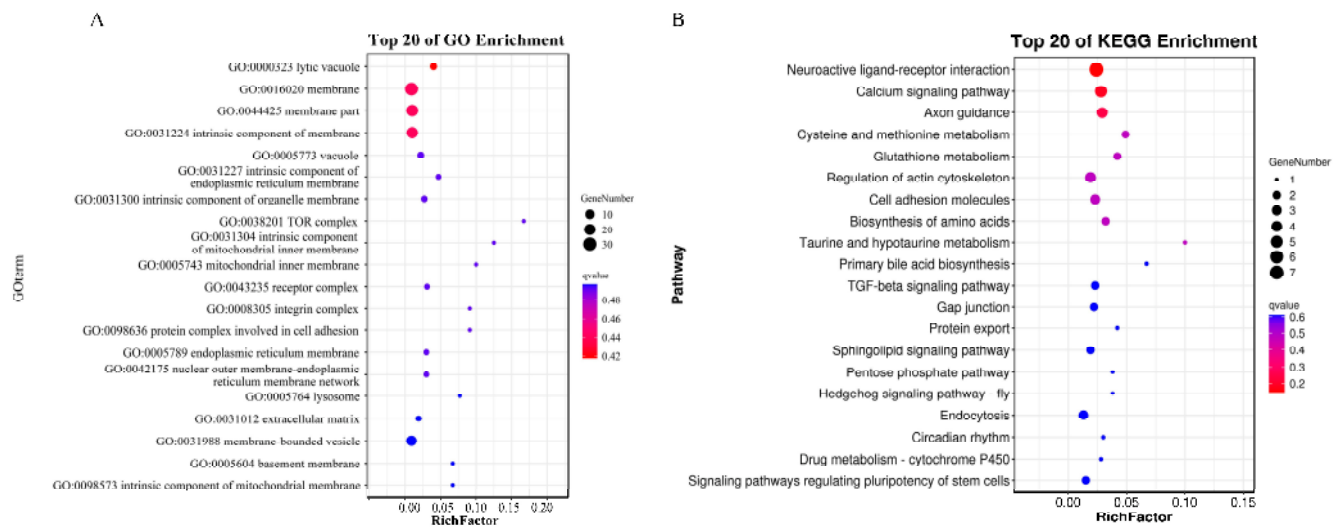


Figure 8. Biological functions of DEMRNAs in the ceRNA network during superinfection with specific activation. **(A)** GO terms. **(B)** KEGG pathway. The top 20 GO and KEGG terms with the smallest Q-values are presented. The y axis represents the GO and KEGG terms, and the x axis shows the enrichment factor (the ratio of the number of differentially expressed genes in a GO or KEGG term to the total number of genes in that term). The size of the dots indicates the number of genes, and the color gradient from red to yellow reflects the Q-value, with red indicating smaller Q-values.

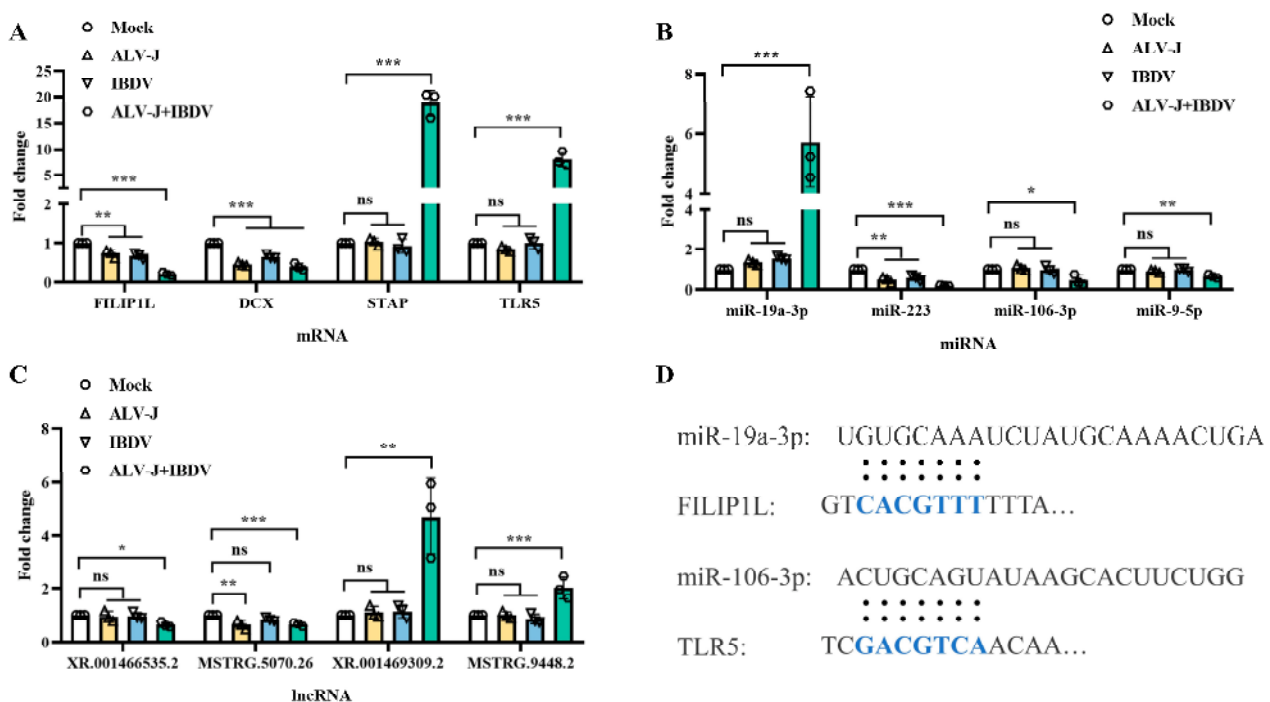


Figure 9. qPCR identification and miRNA-mRNA predication. **(A)** Identification of DEMRNAs during superinfection. **(B)** Identification of DEMiRNAs during superinfection. **(C)** Identification of DElncRNAs during superinfection. **(D)** miRNA-mRNA prediction used by miRNA target prediction database. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns $p > 0.05$.

4. Discussion

Our findings provide novel insights into the molecular mechanisms underlying the superinfection of ALV-J and IBDV. Through transcriptome analysis of bursae of Fabricius collected from SPF chickens (21 days post infection), we identified both synergistic and specific activation patterns within the constructed circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA network. These networks revealed key regulatory elements which potentially drive the pathogenesis and immune response during superinfection.

During the process of synergistic activation by ALV-J and IBDV superinfection, three key hub genes were identified. Filamin A interacting protein 1-like (FILIP1L) is a novel tumor suppressor-like protein which has its expression downregulated in various cancers, like colorectal cancer [14], ovarian cancer [15], and lung cancer [16]. FILIP1L-mediated cell apoptosis, epithelial-mesenchymal transition, and extracellular matrix synthesis aggravate multiple tumorigenesis [17]. Importantly, the function of FILIP1L's decrease in enhancing tumor invasion and metastasis is mainly achieved by promoting the Wnt/ β -catenin signaling pathway [18]. It is interesting to note that ALV-J induced Wnt signaling activation, which is reported to have caused tumor generation [19,20]. In this study, we found that separate ALV-J infections or IBDV infections can induce a decrease in FILIP1L expression, two kinds of virus superinfection more significantly lowered FILIP1L expression and prompt FILIP1L cutting, and repeated infection-induced tumor enhancement is closely related to the formation. Doublecortin (DCX) is a key regulatory protein in the JNK signaling pathway and closely associated with cell survival and apoptotic processes [21]. Doublecortin-like kinase 1 is an important target in various virus infection and tumorigenesis processes [22]. Importantly, Doublecortin-like kinase 1 was identified as a cancer stem cell marker in ALV-J-infected cells, which interacts with the surface protein of ALV-J to promote virus replication, activate the epithelial-mesenchymal transition, and accelerate cell proliferation, enabling ALV-J to obtain metastatic ability [23]. These reports further suggest that DCX may play an important role in the synergistic tumorigenesis of ALV-J and IBDV. MYPN, with TTN (MSTRG_13833), another identified significantly different mRNA, may have a common function which has been reported in both human disease and porcine growth and development [24,25].

A total of four key hub genes were identified in the process of specific activation of ALV-J and IBDV superinfection, including STAP, HTR6, XKR4, and TLR5. The signal-transducing adaptor protein (STAP) family, particularly STAP-2, is known to interact with key components of immune signaling pathways, such as the IKK complex, STAT3, STAT5, and MyD88, a critical adaptor in TLR signaling [26,27]. This interaction promotes inflammatory cytokine production and regulates immune responses. In our study, STAP was specifically upregulated during the superinfection of ALV-J and IBDV, suggesting its potential role in amplifying immunosuppressive effects, creating a favorable environment for persistent viral infection and tumorigenic processes. Additionally, our data show that miR-106-3p, a key regulator upstream of TLR5, was significantly downregulated during superinfection. This suggests that TLR signaling may be activated in response to superinfection, as TLR5 plays a pivotal role in pathogen recognition and immune activation [28]. The simultaneous activation of STAP and TLR5 signaling pathways may reflect a complex immune regulatory strategy during superinfection, where initial immune responses are activated but are subsequently modulated to suppress effective immunity, facilitating viral persistence and potential tumorigenesis. These findings provide new insights into how viral infections manipulate immune signaling pathways to enhance pathogenesis and may guide future studies in identifying therapeutic targets for mitigating the effects of such superinfections in poultry.

5. Conclusions

In conclusion, our study successfully constructed a comprehensive circRNA/lncRNA-miRNA-mRNA network which revealed the complex interplay of RNA molecules during the superinfection of ALV-J and IBDV. This network elucidated both synergistic and specific

activation processes, providing new insights into the molecular mechanisms underlying these viral infections. Notably, we identified three pivotal genes (FILIP1L, DCX, and MYPN) linked to synergistic activation, suggesting their potential roles in enhancing viral pathogenesis. In contrast, four other genes (STAP, HKR6, XKR4, and TLR5) were specifically activated, indicating their involvement in modulating immune responses during superinfection. Our findings highlight significant GO terms and pathways which may drive tumorigenesis and immunosuppression associated with ALV-J and IBDV. These results underscore the importance of further investigation into these key regulatory pathways, which may offer therapeutic targets for mitigating the adverse effects of viral superinfections in poultry.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ani14233449/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, S.C., Q.X., and W.C.; methodology, H.X. and T.P.; writing—review and editing, S.C.; visualization, S.C.; data curation, S.C. and Y.N.; investigation, Y.N. and X.Z. funding acquisition, F.C., Q.X., and W.C.; project administration, Q.X. and W.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the National Key R&D Program of China (Grant No. 2021YFD1300105), Science and Technology Program of Guangdong Province (grant no. 2023B0202010029), National Natural Science Foundation of China (grant no. 32272981, 31972659, 32202847), and Natural Science Foundation of Guangdong Province (2021A1515011147 and 2022A1515012243).

Institutional Review Board Statement: All animal experiments were performed following the guidelines of the South China Agricultural University Animal Care and Use Committee (permit no. SCAU2021b020).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All the data generated or analyzed in this study are included in this paper.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Fakhri, O.; Devlin, J.M.; Browning, G.F.; Coppo, M.J.C.; Quinteros, J.A.; Diaz-Méndez, A.; Lee, S.W.; Hartley, C.A. Superinfection and recombination of infectious laryngotracheitis virus vaccines in the natural host. *Vaccine* **2020**, *38*, 7508–7516. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Paget, C.; Trottein, F. Mechanisms of Bacterial Superinfection Post-influenza: A Role for Unconventional T Cells. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Semrau, A.; Wibbelt, G.; Hilbe, M.; Lieckfeldt, D.; Hermes, R.; Müller, K.E.; Heckert, H.P.; Hoyer, M.J.; Frölich, K. Experimental superinfection of a Lesser Malayan mousedeer (*Tragulus javanicus*) persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Zoo Wildl. Med.* **2008**, *39*, 124–127. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Andreychev, A.; Boyarova, E.; Brandler, O.; Tukhbatullin, A.; Kapustina, S. Terrestrial and Subterranean Mammals as Reservoirs of Zoonotic Diseases in the Central Part of European Russia. *Diversity* **2023**, *15*, 39. [\[CrossRef\]](#)
5. Opriessnig, T.; Madson, D.M.; Roof, M.; Layton, S.M.; Ramamoorthy, S.; Meng, X.J.; Halbur, P.G. Experimental reproduction of porcine circovirus type 2 (PCV2)-associated enteritis in pigs infected with PCV2 alone or concurrently with *Lawsonia intracellularis* or *Salmonella typhimurium*. *J. Comp. Pathol.* **2011**, *145*, 261–270. [\[CrossRef\]](#)
6. Zhou, J.; Zhao, G.L.; Wang, X.M.; Du, X.S.; Su, S.; Li, C.G.; Nair, V.; Yao, Y.X.; Cheng, Z.Q. Synergistic Viral Replication of Marek's Disease Virus and Avian Leukosis Virus Subgroup J is Responsible for the Enhanced Pathogenicity in the Superinfection of Chickens. *Viruses* **2018**, *10*, 271. [\[CrossRef\]](#)
7. Wang, P.; Lin, L.; Shi, M.; Li, H.; Gu, Z.; Li, M.; Gao, Y.; Teng, H.; Mo, M.; Wei, T.; et al. Vertical transmission of ALV from ALV-J positive parents caused severe immunosuppression and significantly reduced marek's disease vaccine efficacy in three-yellow chickens. *Vet. Microbiol.* **2020**, *244*, 108683. [\[CrossRef\]](#)
8. Ouyang, W.; Wang, Y.S.; Meng, K.; Pan, Q.X.; Wang, X.L.; Xia, X.X.; Zhu, Y.M.; Bi, Z.W.; Zhang, H.B.; Luo, K. gga-miR-2127 downregulates the translation of chicken p53 and attenuates chp53-mediated innate immune response against IBDV infection. *Vet. Microbiol.* **2017**, *198*, 34–42. [\[CrossRef\]](#)
9. Williams, S.M.; Sellers, H.S. Response of white leghorn chickens to infection with avian leukosis virus subgroup J and infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* **2012**, *56*, 2–6. [\[CrossRef\]](#)

10. Chen, W.; Chen, S.; Nie, Y.; Li, W.; Li, H.; Zhang, X.; Chen, F.; Xie, Q. Synergistic Immunosuppression of Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Is Responsible for Enhanced Pathogenicity. *Viruses* **2022**, *14*, 2312. [[CrossRef](#)]
11. Thomson, D.W.; Dinger, M.E. Endogenous microRNA sponges: Evidence and controversy. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 272–283. [[CrossRef](#)]
12. Salmena, L.; Poliseno, L.; Tay, Y.; Kats, L.; Pandolfi, P.P. A ceRNA hypothesis: The Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell* **2011**, *146*, 353–358. [[CrossRef](#)]
13. Ala, U. Competing Endogenous RNAs, Non-Coding RNAs and Diseases: An Intertwined Story. *Cells* **2020**, *9*, 1574. [[CrossRef](#)]
14. Park, Y.L.; Park, S.Y.; Lee, S.H.; Kim, R.B.; Kim, J.K.; Rew, S.Y.; Myung, D.S.; Cho, S.B.; Lee, W.S.; Kim, H.S.; et al. Filamin A interacting protein 1-like expression inhibits progression in colorectal cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 72229–72241. [[CrossRef](#)]
15. Burton, E.R.; Gaffar, A.; Lee, S.J.; Adeshuko, F.; Whitney, K.D.; Chung, J.Y.; Hewitt, S.M.; Huang, G.S.; Goldberg, G.L.; Libutti, S.K.; et al. Downregulation of Filamin A interacting protein 1-like is associated with promoter methylation and induces an invasive phenotype in ovarian cancer. *Mol. Cancer Res.* **2011**, *9*, 1126–1138. [[CrossRef](#)]
16. Kwon, M.; Rubio, G.; Wang, H.; Riedlinger, G.; Adem, A.; Zhong, H.; Slegowski, D.; Post-Zwicker, L.; Chidananda, A.; Schrupp, D.S.; et al. Smoking-associated Downregulation of FILIP1L Enhances Lung Adenocarcinoma Progression Through Mucin Production, Inflammation, and Fibrosis. *Cancer Res. Commun.* **2022**, *2*, 1197–1213. [[CrossRef](#)]
17. Jing, R.; Hu, C.; Qi, T.; Yue, J.; Wang, G.; Zhang, M.; Wen, C.; Pei, C.; Ma, B. FILIP1L-mediated cell apoptosis, epithelial-mesenchymal transition and extracellular matrix synthesis aggravate posterior capsular opacification. *Life Sci.* **2021**, *286*, 120061. [[CrossRef](#)]
18. Kwon, M.; Libutti, S.K. Filamin A interacting protein 1-like as a therapeutic target in cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **2014**, *18*, 1435–1447.
19. Xiang, Y.; Yu, Y.; Li, Q.; Jiang, Z.; Li, J.; Liang, C.; Chen, J.; Li, Y.; Chen, X.; Cao, W. Mutual regulation between chicken telomerase reverse transcriptase and the Wnt/ β -catenin signalling pathway inhibits apoptosis and promotes the replication of ALV-J in LMH cells. *Vet. Res.* **2021**, *52*, 110. [[CrossRef](#)]
20. Tang, S.; Leng, M.; Tan, C.; Zhu, L.; Pang, Y.; Zhang, X.; Chang, Y.F.; Lin, W. Critical role for ribonucleoside-diphosphate reductase subunit M2 in ALV-J-induced activation of Wnt/ β -catenin signaling via interaction with P27. *J. Virol.* **2023**, *97*, e0026723. [[CrossRef](#)]
21. Zeke, A.; Misheva, M.; Reményi, A.; Bogoyevitch, M.A. JNK Signaling: Regulation and Functions Based on Complex Protein-Protein Partnerships. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2016**, *80*, 793–835. [[CrossRef](#)]
22. Standing, D.; Arnold, L.; Dandawate, P.; Ottemann, B.; Snyder, V.; Ponnurangam, S.; Sayed, A.; Subramaniam, D.; Srinivasan, P.; Choudhury, S.; et al. Doublecortin-like kinase 1 is a therapeutic target in squamous cell carcinoma. *Mol. Carcinog.* **2023**, *62*, 145–159. [[CrossRef](#)]
23. Zhou, J.; Zhou, D.; Du, X.; Xue, J.; Yang, J.; Wang, G.; Cheng, Z. Interaction between Avian Leukosis Virus Subgroup J Surface Protein and Doublecortin-Like Kinase 1 Accelerates Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition. *J. Virol.* **2022**, *96*, e0165721. [[CrossRef](#)]
24. Paz-Cruz, E.; Ruiz-Pozo, V.A.; Cadena-Ullauri, S.; Guevara-Ramirez, P.; Tamayo-Trujillo, R.; Ibarra-Castillo, R.; Laso-Bayas, J.L.; Onofre-Ruiz, P.; Domenech, N.; Ibarra-Rodriguez, A.A.; et al. Associations of MYPN, TTN, SCN5A, MYO6 and ELN Mutations with Arrhythmias and Subsequent Sudden Cardiac Death: A Case Report of an Ecuadorian Individual. *Cardiol. Res.* **2023**, *14*, 409–415. [[CrossRef](#)]
25. Braglia, S.; Davoli, R.; Zappavigna, A.; Zambonelli, P.; Buttazzoni, L.; Gallo, M.; Russo, V. SNPs of MYPN and TTN genes are associated to meat and carcass traits in Italian Large White and Italian Duroc pigs. *Mol. Biol. Rep.* **2013**, *40*, 6927–6933. [[CrossRef](#)]
26. Matsuda, T.; Oritani, K. Possible Therapeutic Applications of Targeting STAP Proteins in Cancer. *Biol. Pharm. Bull.* **2021**, *44*, 1810–1818. [[CrossRef](#)]
27. Sekine, Y. Adaptor protein STAP-2 modulates cellular signaling in immune systems. *Biol. Pharm. Bull.* **2014**, *37*, 185–194. [[CrossRef](#)]
28. Frazão, J.B.; Errante, P.R.; Condino-Neto, A. Toll-like receptors' pathway disturbances are associated with increased susceptibility to infections in humans. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **2013**, *61*, 427–443. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Article

Deciphering Immune Modulation in Chickens Co-Infected with ALV-J and CIAV: A Transcriptomic Approach

Sheng Chen ^{1,2,3}, Huijuan Xu ¹, Wenxue Li ¹, Yu Nie ¹, Qingmei Xie ^{1,2,3} and Weiguo Chen ^{1,2,3,*}

- ¹ State Key Laboratory of Swine and Poultry Breeding Industry & Heyuan Branch, Guangdong Provincial Laboratory of Lingnan Modern Agricultural Science and Technology, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; chens@scau.edu.cn (S.C.); sunnyxu20181@outlook.com (H.X.); cs@scau.stu.edu.cn (W.L.); thcscau@163.com (Y.N.); qmx@scau.edu.cn (Q.X.)
- ² Guangdong Provincial Key Lab of AgroAnimal Genomics and Molecular Breeding, College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China
- ³ Guangdong Engineering Research Center for Vector Vaccine of Animal Virus, Guangzhou 510642, China
- * Correspondence: wgchen81@scau.edu.cn; Tel.: +86-20-85280279; Fax: +86-20-85280740

Abstract: Viral co-infections pose significant challenges, causing substantial economic losses worldwide in the poultry industry. Among these, avian ILeukosis virus subgroup J (ALV-J) and chicken infectious anemia virus (CIAV) are particularly concerning, as they frequently lead to co-infections in chickens, further compromising their immune defenses, increasing susceptibility to secondary infections and diminishing vaccine efficacy. While our previous studies have examined the pathogenicity and immunosuppressive effects of these co-infections in vitro and in vivo, the key genes and molecular pathways involved remain largely unexplored. This study investigates the synergistic effects of co-infection with ALV-J and CIAV through comprehensive transcriptome analysis using high-throughput sequencing. We identified 1007 differentially expressed mRNAs (DEmRNAs) and 62 differentially expressed miRNAs (DEmiRNAs) associated with the synergistic activation effects of co-infection, along with 331 DEmRNAs and 62 DEmiRNAs linked to specific activation processes. Notably, the immune suppression observed in co-infected chickens may be influenced by the enhanced utilization of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress pathways, which impact host immune responses. Furthermore, co-infection appears to employ distinct immune evasion strategies through the modulation of rRNA metabolism, differing from single infections. These insights provide a deeper understanding of the molecular mechanisms underlying immune suppression during viral co-infections and help develop targeted therapies and improve disease control in poultry, reducing economic losses.

Keywords: avian leukosis virus subgroup J (ALV-J); chicken infectious anemia virus (CIAV); co-infection; miRNA-mRNA



Citation: Chen, S.; Xu, H.; Li, W.; Nie, Y.; Xie, Q.; Chen, W. Deciphering Immune Modulation in Chickens Co-Infected with ALV-J and CIAV: A Transcriptomic Approach.

Microorganisms **2024**, *12*, 2453.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms12122453>

Academic Editor: Paolo Calistri

Received: 31 October 2024

Revised: 14 November 2024

Accepted: 27 November 2024

Published: 28 November 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Immunosuppressive viral diseases weaken chickens' immune defenses, making them more prone to secondary infections and less responsive to vaccines, which poses a serious challenge to the global poultry industry [1,2]. Studies increasingly indicate that co-infections with immunosuppressive viruses are widespread in poultry and often result in more-severe disease manifestations [3,4]. For instance, our recent findings revealed that superinfection with avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) and infectious bursal disease virus (IBDV) exacerbate immunosuppression and increase disease severity in chickens [5]. Similarly, both our research and studies by other groups have highlighted the detrimental effects of co-infection with ALV-J and chicken infectious anemia virus (CIAV) in amplifying immunosuppression, facilitating viral replication, and worsening pathogenic

outcomes [6–8]. Despite these insights, the specific genes and molecular pathways driving the aggravated disease processes during co-infection remain largely unexplored.

The identification of key differentially expressed genes during co-infection is complicated by the intricate interplay of multiple factors [9,10]. To overcome this challenge, we established a novel approach that analyzes both synergistic and specific gene activation patterns in co-infected hosts. Synergistic activation involves genes or pathways that can be stimulated by either virus individually but exhibit markedly increased expression when both viruses co-occur. In contrast, specific activation refers to genes or pathways that are exclusively induced in the presence of both viruses. These two analytical frameworks offer complementary perspectives, providing deeper insights into the molecular mechanisms underlying the pathogenic processes of co-infection.

In this study, we performed a comprehensive miRNA–mRNA enrichment analysis to reveal both synergistic and specific activation patterns during the co-infection of ALV-J and CIAV. Our results suggest that the observed immunosuppression may be attributed to the intensified activation of reactive oxygen species (ROS) and oxidative stress pathways, which interfere with the host's immune regulation. Furthermore, compared to individual infections, co-infection appears to leverage unique immune evasion mechanisms by modulating rRNA metabolism. These findings offer novel insights into the molecular mechanisms underlying immune suppression in viral co-infections.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

Institutional and national guidelines for the use and care of laboratory animals were closely followed. All animal experiments were performed following the guidelines of the South China Agricultural University Animal Care and Use Committee (permit no. SCAU2021b020). The study was performed in positive-pressure high-efficiency particulate air-filtered stainless-steel isolators with an enclosed and ventilated environment, and feed and water were provided ad libitum.

2.2. Virus and Animals

ALV-J strain SCAU-HN06 was a generous gift from Professor Liao of the South China Agricultural University. The GD-101 strain of CIAV was stored in our laboratory. One-day-old SPF chicks (White Leghorn), including both hen chicks and cock chicks, were purchased from Xinxing Dahuanong Poultry Eggs Co., Ltd. (Yunfu, China).

2.3. Animal Experimental Design and Sample Collection

A total of 160 one-day-old SPF chicks were randomly divided into four groups (40 chicks per group): ALV-J, CIAV, ALV-J+CIAV, and a control group. Each group was housed in separate negative-pressure isolators equipped with filtered air systems. ALV-J mono-infected chickens were inoculated with $10^{4.5}$ TCID₅₀ of the ALV-J strain SCAU-HN06 in 0.2 mL PBS through intraabdominal injection. CIAV mono-infected chickens were inoculated with 1×10^6 copy numbers of the CIAV strain GD-101 in 0.2 mL PBS by leg muscle injection. Co-infected chickens were inoculated with $10^{4.5}$ TCID₅₀ of ALV-J and 1×10^6 copy numbers of CIAV in 0.2 mL PBS. Mock-infected chickens were inoculated with 0.2 mL PBS. At 7 days post-infection, three chicks from each group were randomly selected for the collection of spleens, which were then sent to Genedenovo Biotechnology Co., Ltd. (Guangzhou, China) for full transcriptome high-throughput sequencing. The specific treatments are detailed in Figure 1.

2.4. Differentially Expressed mRNA and miRNA

To identify differentially expressed transcripts across samples or groups, the edgeR package (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/edgeR.html> accessed on 26 November 2024) was used. We identified mRNA and lncRNA with a fold change

of ≥ 2 and a false discovery rate (FDR) of < 0.05 in a comparison as significant DEGs, and miRNA with a fold change of ≥ 2 and $p < 0.05$.

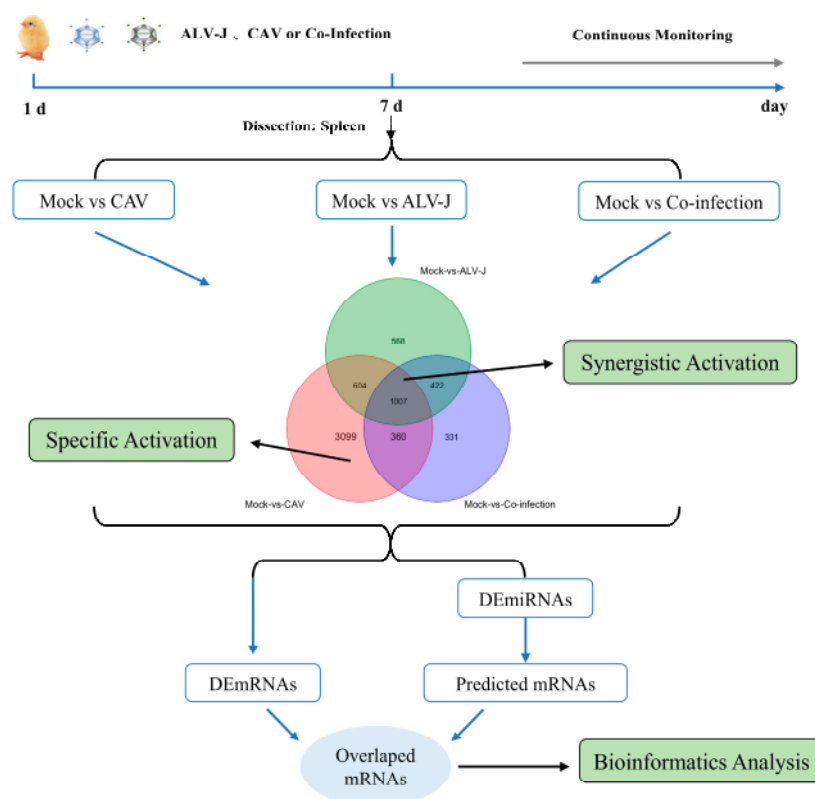


Figure 1. Workflow of bioinformatics analysis.

2.5. MiRNA Target Prediction

For samples, a triad of computational tools—mireap, miRanda, and TargetScan—were harnessed to discern miRNA targets. Information pertaining to miRNA sequences and their respective families was gleaned from the TargetScan online repository (accessible at <http://www.targetscan.org/> accessed on 26 November 2024).

2.6. Construction of the miRNA–Target Network

Expression correlation between the miRNA and target was evaluated using the Pearson correlation coefficient (PCC). For the multi-group, pairs with a $PCC < -0.7$ and $p < 0.05$ were selected as negatively co-expressed miRNA–target pairs, and all RNAs were differentially expressed.

2.7. Visualization of the miRNA–Target Network

The miRNA–target network was constructed as above, and then visualized using Cytoscape software (v3.6.0) (<http://www.cytoscape.org/>).

2.8. Functional Enrichment Analysis

To assess functional enrichment, the Gene Ontology (GO) Biological Processes term and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analyses of mRNAs in the network were conducted. For circRNA, we performed the functional enrichment analysis of source genes to study the main functions of these source genes of circRNAs. GO enrichment analysis provides all GO terms that are significantly enriched in genes compared to the genome background, and filters the genes that correspond to biological functions. Firstly, all genes were mapped to GO terms in the Gene Ontology database (<http://www.geneontology.org/>), gene numbers were calculated for every term, and

significantly enriched GO terms in genes compared to the genome background were defined by a hypergeometric test. Genes usually interact with each other to play roles in certain biological functions. Pathway-based analysis helps to further understand gene biological functions. KEGG is the major public pathway-related database (<http://www.kegg.jp/kegg/>). Pathway enrichment analysis identified significantly enriched metabolic pathways or signal transduction pathways in genes compared with the whole genome background.

3. Results

3.1. Identification of Differentially Expressed miRNAs (DEmiRNAs) and mRNAs (DEmRNAs) in the Co-Infection of ALV-J and CIAV

Our previous research results indicated that co-infection with ALV-J and CIAV synergistically causes pathogenicity by enhancing viral replication, resulting in more-severe immunosuppression than infections with either virus alone [6]. However, the precise molecular mechanisms driving this synergistic effect remain unknown. To investigate further, we randomly selected three chickens from each experimental group (ALV-J, CIAV, ALV-J+CIAV, and control) at 7 days post-infection and collected spleen samples for comprehensive transcriptome analysis using high-throughput sequencing.

As illustrated in Figure 1, this strategy was employed to analyze the miRNA–mRNA target network during the co-infection process with ALV-J and CIAV, with an emphasis on both synergistic and specific activations. In addressing synergistic activation, we filtered differentially expressed mRNAs and miRNAs that exhibit synergistic activation for integrative analysis. For specific activation, differentially expressed, characteristically activated RNAs were selected, and a similar gene network analysis was conducted.

To ensure high-quality data for analysis, it is crucial to filter raw sequencing data to reduce noise from invalid entries. In this study, we employed FastP for quality control, removing low-quality reads to generate clean data for further processing (Supplementary Table S1). The clean reads were then aligned to the species' ribosomal database using Bowtie2, with only perfect matches allowed to eliminate ribosomal sequences. Reads that did not align were retained for subsequent transcriptomic analysis. Principal component analysis (PCA) revealed distinct clusters for both single-infection and co-infection groups, confirming that the miRNA and mRNA data obtained are robust and suitable for downstream analyses (Figure 2A,D).

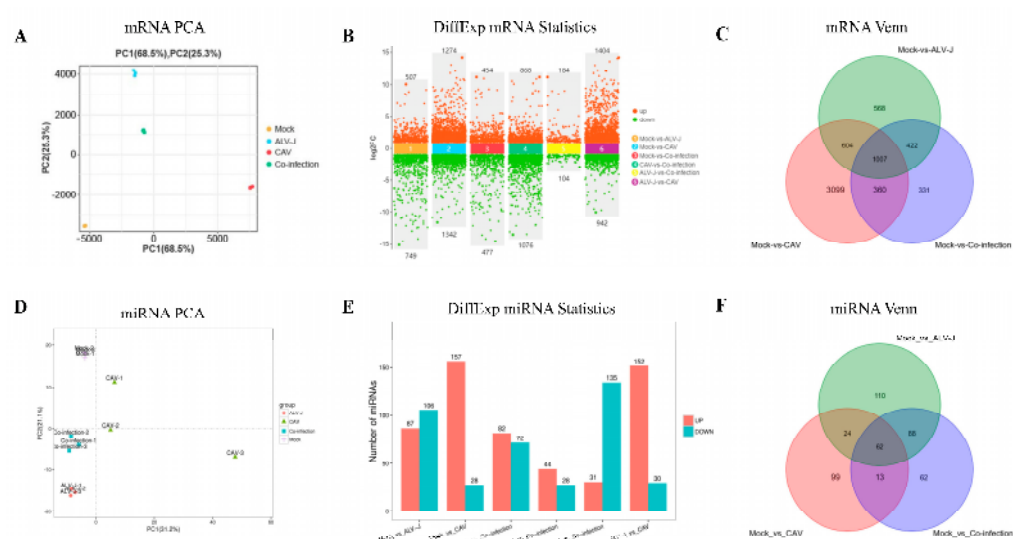


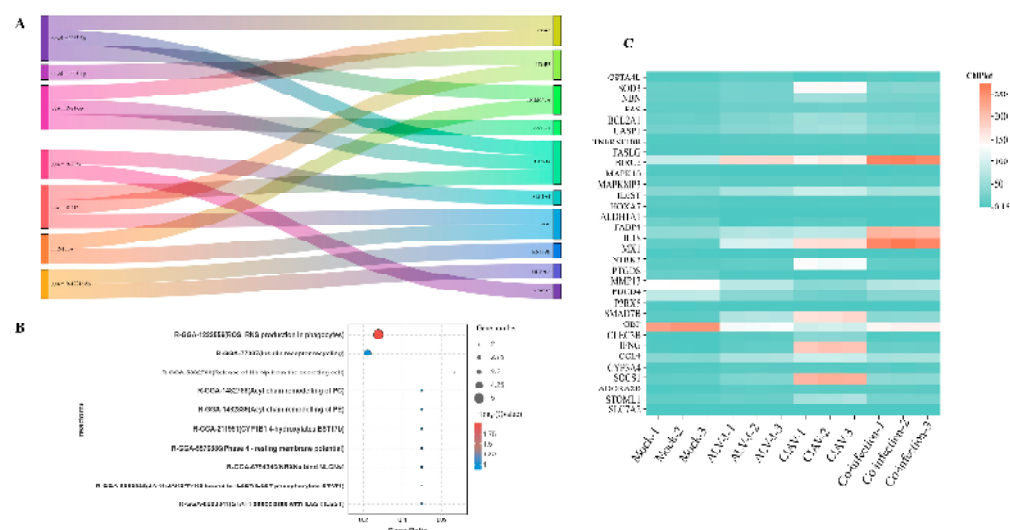
Figure 2. Statistical analysis of differentially expressed RNAs. (A) Principal components analysis of mRNAs. (B) Differentially expressed mRNAs. (C) Venn diagram of mRNAs. (D) Principal components analysis of miRNAs. (E) Differentially expressed miRNAs. (F) Venn diagram of miRNAs.

For the differential expression analysis across different RNA types, we identified significantly differentially expressed mRNAs with an $FDR < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1$, and miRNAs with $p < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1$. Regarding mRNAs, a total of 749 genes were downregulated and 507 were upregulated in the ALV-J group compared to the control group. In the CIAV group, 1342 genes showed downregulation, while 1274 were upregulated. Meanwhile, the co-infection group exhibited 477 downregulated and 454 upregulated genes (Figure 2B and Supplementary Table S2). The corresponding results for differentially expressed miRNAs are illustrated in Figure 2E and Supplementary Table S3.

To identify genes that play a pivotal role during the co-infection process, the strategy delineated above was employed to analyze differentially expressed genes across comparison groups (Figure 2C,F). Among these, there were 1007 mRNAs and 62 miRNAs synergistically activated during co-infection (Supplementary Table S4). Additionally, 331 mRNAs and 62 miRNAs were found to be specifically activated under co-infection conditions (Supplementary Table S5). To further explore the mechanisms behind these synergistic and specific activation patterns, miRNA–mRNA interaction networks were constructed, and functional enrichment analysis was conducted on the overlapping mRNAs.

3.2. Biological Functions of DEmRNAs During Co-Infection with Synergistic Activation

A Sankey diagram was generated to visualize the regulatory interactions between miRNAs and the top 10 differentially expressed mRNAs (Figure 3A). In addition, we explored the metabolic pathways associated with the differentially enriched genes. The analysis revealed that co-infection with ALV-J and CIAV synergistically activates metabolic pathways linked to the production of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) in phagocytes (Figure 3B and Supplementary Table S6). Notably, Several genes, such as FASLG, MX1, and GBP, exhibit notable upregulation under co-infection conditions, suggesting a heightened oxidative stress response or immune activation. Additionally, inflammatory markers such as IL18 and IFNG demonstrate differential expression, with increased activity in certain infection states, reflecting their role in modulating inflammation in response to ROS (Figure 3C).



transport of monovalent inorganic cations (Figure 4A). For cellular components (CCs), membrane-related categories, such as membrane parts and intrinsic components of membranes, were highly enriched (Figure 4B). In terms of molecular function (MF), the differentially expressed mRNAs were primarily involved in transmembrane transporter activities, including cation, ion, and substrate-specific transmembrane transport (Figure 4C).

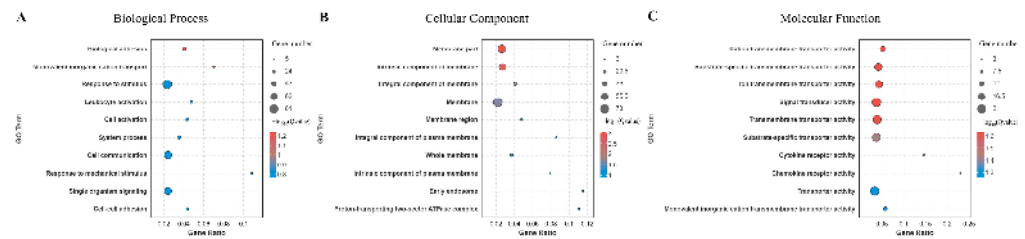


Figure 4. GO analysis of DE miRNAs and DE mRNAs during co-infection with synergistic activation. (A). Biological Process. (B). Cellular Component. (C). Molecular Function.

In the KEGG pathway enrichment analysis, we first obtained an overview of the KEGG pathways enriched with differentially expressed genes. The results revealed that these genes were primarily concentrated in immune-system-related pathways. Additional enriched pathways involved amino acid metabolism, transport, and degradation, as well as signal transduction processes (Supplementary Table S8 and Figure 5A). Further analysis of specific pathways showed that co-infection with ALV-J and CIAV significantly enhanced processes such as protein digestion, absorption, and phagosome formation (Figure 5B). Pathway correlation analysis identified the phagosome pathway (ko04145) as the most interconnected with other KEGG pathways (Figure 5C). Overall, these findings suggest that ALV-J and CIAV co-infection intensifies host immune responses, with the phagosome pathway playing a particularly prominent role.

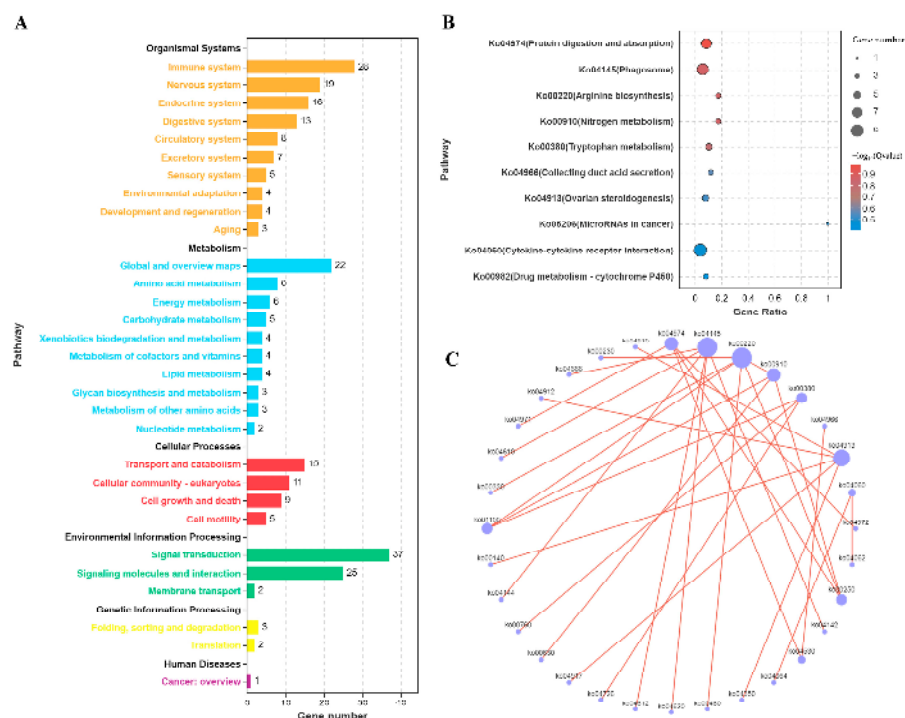


Figure 5. KEGG pathway analysis of DE miRNAs and DE mRNAs during co-infection with synergistic activation. (A). Bar chart of the number of KEGG pathways. (B). Bubble chart of KEGG enrichment results. (C). Network diagram of KEGG pathway correlations.

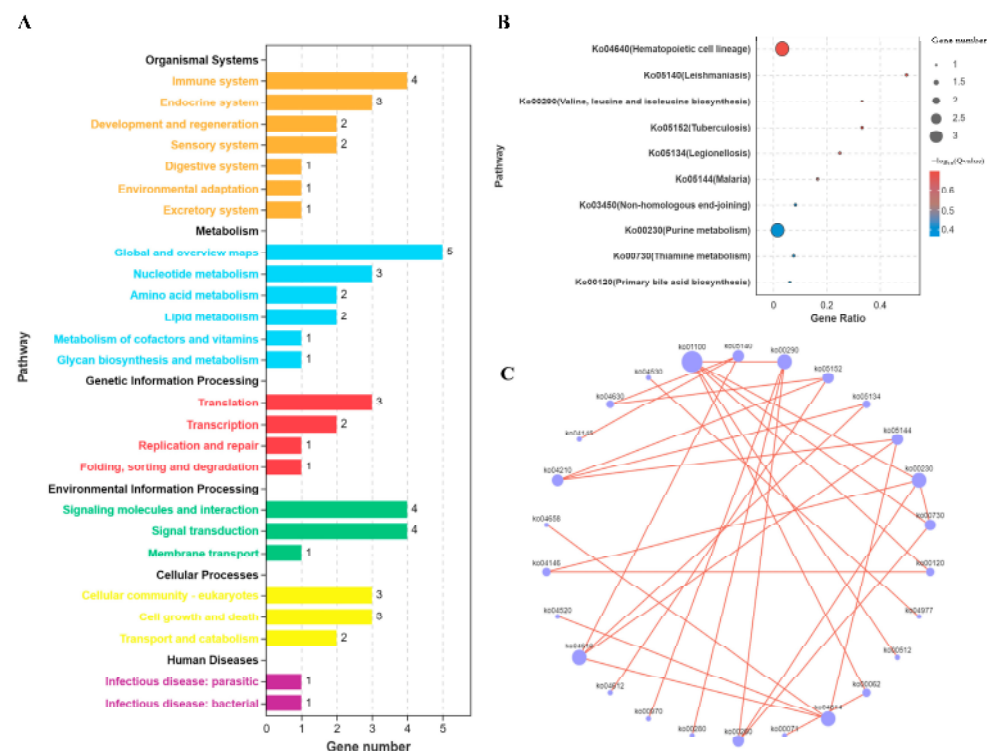


Figure 7. KEGG pathway analysis of DE miRNAs and DE mRNAs during co-infection with specific activation. **(A).** Bar chart of the number of KEGG pathways. **(B).** Bubble chart of KEGG enrichment results. **(C).** Network diagram of KEGG pathway correlations.

4. Discussion

Viral co-infections pose significant challenges, causing substantial economic losses worldwide in the poultry industry. Recent studies have demonstrated that co-infection with ALV-J and Marek's disease virus (MDV) significantly promotes tumor initiation and metastasis, highlighting its critical role in the pathogenesis of avian diseases [11]. Our previous studies investigated the pathogenicity and immunosuppressive effects of ALV-J and CIAV co-infections through both in vitro and in vivo experiments [6]. However, the key genes and molecular pathways driving these effects remain unclear. In this study, we collect spleen samples for comprehensive transcriptome analysis using high-throughput sequencing. To uncover the synergistic and specific activation mechanisms of co-infection, we analyzed the sequencing data, predicted miRNA–mRNA interactions, and performed an enrichment analysis on the overlapping mRNAs. The observed synergistic activation during co-infection implies that while individual viruses can initiate these functions, their presence together leads to a significant enhancement. Notably, co-infection significantly influences metabolic pathways associated with reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) production in macrophages, activating the differential expression of related metabolic genes. This finding suggests that the observed synergistic activation in ALV-J and CIAV co-infection may play a role in immune response regulation through mechanisms involving oxidative stress.

Viruses exploit ROS and oxidative metabolic pathways to manipulate host immune responses, significantly influencing infection dynamics [12]. ROS are generated as by-products of oxidative metabolism in immune cells and serve as signaling molecules that modulate immune functions [13]. ROS are generated as by-products of oxidative metabolism in immune cells and serve as signaling molecules that modulate immune functions [14,15]. Numerous studies indicate that increased ROS levels can regulate immune responses by activating key signaling pathways critical for both innate and adaptive immunity. For instance, viruses like hepatitis B virus (HBV) and other pathogens stimulate ROS production through mechanisms such as mitochondrial dysfunction and p53 activation,

thereby affecting immune cell activity and survival [16]. HBV's manipulation of ROS pathways is associated with persistent infections, as it alters the effector functions of immune cells, including cytotoxicity and cytokine production, which are vital during infections and cancer development [17]. Additionally, CIAV enhances intracellular ROS through the apoptin protein, leading to the aggregation of the mitochondrial membrane protein Tom20 and ultimately triggering pyroptosis [18]. However, research on the role of ROS in ALV-J infection remains lacking. Furthermore, oxidative metabolism influences the functionality of key immune cells, such as macrophages and natural killer (NK) cells, which depend on ROS for activities like phagocytosis and cytotoxic responses [19,20]. The interplay between ROS and immune pathways, including the metabolic networks associated with phagosomal processes, underscores the complexity of immune regulation during viral co-infections involving ALV-J and CIAV.

The specific activation observed during co-infection pertains to functions that are not induced by either virus independently but are significantly enhanced when both viruses are present, underscoring the unique effects of co-infection. Our results indicate that the GO terms enriched by this specific activation include biological processes related to rRNA metabolism, cellular components associated with ribonucleoprotein complexes, and molecular functions involving RNA binding, highlighting the importance of rRNA metabolism in the context of co-infection.

Viral infections can strategically manipulate host ribosomal RNA (rRNA) metabolism to influence immune responses, promoting both viral replication and evasion of the host immune system [21,22]. Viral infections can strategically manipulate host ribosomal RNA (rRNA) metabolism to influence immune responses, promoting both viral replication and evasion of the host immune system [23,24]. This increased rRNA production supports the cellular machinery required for synthesizing viral proteins, while simultaneously compromising the host's capacity to mount effective immune responses by reallocating resources toward ribosome production rather than essential immune signaling molecules, such as interferons [25,26]. To date, no prior research has established a connection between immune regulation and the modulation of rRNA metabolism in the context of ALV-J and CIAV infections. Our results suggest that co-infection with ALV-J and CIAV may specifically activate this process, thereby regulating immune responses through modifications in rRNA metabolism. This finding offers new insights into the mechanisms underlying the severe immunosuppression linked to these co-infections and proposes a novel perspective for understanding how viral interference with ribosomal functions affects host immunity.

5. Conclusions

In conclusion, we conducted a thorough miRNA–mRNA enrichment analysis that clarified both synergistic and specific activations during the co-infection of ALV-J and CIAV. Our results suggest that the immune suppression observed in co-infected subjects may be influenced by increased utilization of ROS and oxidative stress pathways, which affect the host's immune responses. Furthermore, co-infection appears to adopt distinct immune evasion mechanisms through the modulation of rRNA metabolism, in contrast to single infections. These findings offer novel insights into the molecular underpinnings of immune suppression during viral co-infection and may help to develop targeted therapies and improve disease control in poultry, reducing economic losses.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms12122453/s1>; Table S1, Clean Reads; Table S2, all.diff.mRNA; Table S3, all.diff.miRNA; Table S4, Synergistic Activation_mRNA_miRNA; Table S5, Specific Activation_mRNA_miRNA; Table S6, Synergistic Activation_Reactome; Table S7, Synergistic Activation_GO; Table S8, Synergistic Activation_KEGG; Table S9, Specific Activation_Reactome; Table S10, Specific Activation_GO; Table S11, Specific Activation_KEGG.

Author Contributions: Conceptualization, S.C., Q.X. and W.C.; Data curation, W.L. and Y.N.; Funding acquisition, Q.X. and W.C.; Investigation, W.C.; Methodology, H.X. and W.L.; Project administration,

Q.X. and W.C.; Visualization, H.X.; Writing—original draft, S.C.; Writing—review and editing, S.C. and W.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the Science and Technology Program of Guangdong Province (grant no. 2023B0202010029), the National Key R&D Program of China (Grant No. 2021YFD1300105), National Natural Science Foundation of China (grant no. 32272981, 31972659, and 32202847), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2021A1515011147 and 2022A1515012243).

Institutional Review Board Statement: The animal study protocol was approved by the South China Agricultural University Animal Care and Use Committee (permit no. SCAU2021b020).

Data Availability Statement: All the data generated or analyzed in this study are included in this paper.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

1. Hoerr, F.J. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis.* **2010**, *54*, 2–15. [[CrossRef](#)]
2. Gimeno, I.M.; Schat, K.A. Virus-Induced Immunosuppression in Chickens. *Avian Dis.* **2018**, *62*, 272–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Zheng, L.-P.; Teng, M.; Li, G.-X.; Zhang, W.-K.; Wang, W.-D.; Liu, J.-L.; Li, L.-Y.; Yao, Y.; Nair, V.; Luo, J. Current Epidemiology and Co-Infections of Avian Immunosuppressive and Neoplastic Diseases in Chicken Flocks in Central China. *Viruses* **2022**, *14*, 2599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Dong, X.; Ju, S.; Zhao, P.; Li, Y.; Meng, F.; Sun, P.; Cui, Z. Synergetic effects of subgroup J avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus co-infection on growth retardation and immunosuppression in SPF chickens. *Vet. Microbiol.* **2014**, *172*, 425–431. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chen, W.; Chen, S.; Nie, Y.; Li, W.; Li, H.; Zhang, X.; Chen, F.; Xie, Q. Synergistic Immunosuppression of Avian Leukosis Virus Subgroup J and Infectious Bursal Disease Virus Is Responsible for Enhanced Pathogenicity. *Viruses* **2022**, *14*, 2312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Xu, H.; Li, W.; Nie, Y.; Chen, S.; Li, H.; Zhang, X.; Xie, Q.; Chen, W. Synergy of Subgroup J Avian Leukosis Virus and Chicken Infectious Anemia Virus Enhances the Pathogenicity in Chickens. *Microorganisms* **2024**, *12*, 740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhang, J.; Ma, L.; Li, T.; Li, L.; Kan, Q.; Yao, X.; Xie, Q.; Wan, Z.; Shao, H.; Qin, A.; et al. Synergistic pathogenesis of chicken infectious anemia virus and J subgroup of avian leukosis virus. *Poult. Sci.* **2021**, *100*, 101468. [[CrossRef](#)]
8. Ma, L.; Zhang, Y.; Wang, J.; Wang, Y.; Chang, S.; Zhao, P. Synergistic pathogenicity of vertically transmitted chicken infectious anemia virus and avian leukosis virus subgroup J coinfection in chickens. *Poult. Sci.* **2024**, *103*, 103835. [[CrossRef](#)]
9. Paget, C.; Trottein, F. Mechanisms of Bacterial Superinfection Post-influenza: A Role for Unconventional T Cells. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Semrau, A.; Wibbelt, G.; Hilbe, M.; Lieckfeldt, D.; Hermes, R.; Müller, K.E.; Heckert, H.P.; Hoyer, M.J.; Frölich, K. Experimental superinfection of a Lesser Malayan mousedeer (*Tragulus javanicus*) persistently infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Zoo Wildl. Med.* **2008**, *39*, 124–127. [[CrossRef](#)]
11. Zhou, J.; Zhou, D.; Zhang, Q.; Zhang, X.; Liu, X.; Ding, L.; Wen, J.; Xu, X.; Cheng, Z. DCLK1 mediated cooperative acceleration of EMT by avian leukosis virus subgroup J and Marek's disease virus via the Wnt/ β -catenin pathway promotes tumor metastasis. *J. Virol.* **2024**, *24*, e0111224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. He, M.; Wang, M.; Xu, T.; Zhang, M.; Dai, H.; Wang, C.; Ding, D.; Zhong, Z. Reactive oxygen species-powered cancer immunotherapy: Current status and challenges. *J. Control. Release* **2023**, *356*, 623–648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sahoo, B.M.; Banik, B.K.; Borah, P.; Jain, A. Reactive Oxygen Species (ROS): Key Components in Cancer Therapies. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2022**, *22*, 215–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Wang, L.; Cao, Z.; Wang, Z.; Guo, J.; Wen, J. Reactive oxygen species associated immunoregulation post influenza virus infection. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 927593. [[CrossRef](#)]
15. Foo, J.; Bellot, G.; Pervaiz, S.; Alonso, S. Mitochondria-mediated oxidative stress during viral infection. *Trends Microbiol.* **2022**, *7*, 679–692. [[CrossRef](#)]
16. Kim, S.; Park, J.; Han, J.; Jang, K.L. Hepatitis B Virus X Protein Induces Reactive Oxygen Species Generation via Activation of p53 in Human Hepatoma Cells. *Biomolecules* **2024**, *14*, 1201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Jeong, Y.; Han, J.; Jang, K.L. Reactive Oxygen Species Induction by Hepatitis B Virus: Implications for Viral Replication in p53-Positive Human Hepatoma Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 6606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Liu, Z.; Li, Y.; Zhu, Y.; Li, N.; Li, W.; Shang, C.; Song, G.; Li, S.; Cong, J.; Li, T.; et al. Apoptin induces pyroptosis of colorectal cancer cells via the GSDME-dependent pathway. *Int. J. Biol. Sci.* **2022**, *18*, 717–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ganeshan, K.; Chawla, A. Metabolic regulation of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **2014**, *32*, 609–634. [[CrossRef](#)]
20. Van den Bossche, J.; Baardman, J.; Otto, N.A.; van der Velden, S.; Neele, A.E.; van den Berg, S.M.; Luque-Martin, R.; Chen, H.J.; Boshuizen, M.C.; Ahmed, M.; et al. Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep.* **2016**, *17*, 684–696. [[CrossRef](#)]

21. Li, S. Regulation of Ribosomal Proteins on Viral Infection. *Cells* **2019**, *8*, 508. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rawlinson, S.M.; Zhao, T.; Ardipradja, K.; Zhang, Y.; Veugelers, P.F.; Harper, J.A.; David, C.T.; Sundaramoorthy, V.; Moseley, G.W. Henipaviruses and lyssaviruses target nucleolar treacle protein and regulate ribosomal RNA synthesis. *Traffic* **2023**, *24*, 146–157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Bianco, C.; Mohr, I. Ribosome biogenesis restricts innate immune responses to virus infection and DNA. *Elife* **2019**, *8*, e49551. [[CrossRef](#)]
24. Lee, A.J.; Feng, E.; Chew, M.V.; Balint, E.; Poznanski, S.M.; Giles, E.; Zhang, A.; Marzok, A.; Revill, S.D.; Vahedi, F.; et al. Type I interferon regulates proteolysis by macrophages to prevent immunopathology following viral infection. *PLoS Pathog.* **2022**, *18*, e1010471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Insua, J.L.; Llobet, E.; Moranta, D.; Pérez-Gutiérrez, C.; Tomás, A.; Garmendia, J.; Bengoechea, J.A. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. *Infect. Immun.* **2013**, *81*, 3552–3565. [[CrossRef](#)]
26. Beura, L.K.; Dinh, P.X.; Osorio, F.A.; Pattnaik, A.K. Cellular poly(c) binding proteins 1 and 2 interact with porcine reproductive and respiratory syndrome virus nonstructural protein 1 β and support viral replication. *J. Virol.* **2011**, *85*, 12939–12949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

国科奖社证字第0191号

2023年中国产学研合作创新与促进奖
产学研合作创新成果奖
获奖证书

为表彰在产学研深度融合中取得的重要科技创新成果，
特颁发此证书。

项目名称：种鸡禽白血病遗传抗性选育技术创新及应用

奖项等级：一等奖

完成单位：华南农业大学
广东省农业科学院动物科学研究所
温氏食品集团股份有限公司
广东爱健康生物科技有限公司
佛山市南海种禽有限公司

主要完成人：谢青梅、陈伟国、曹伟胜、张新珩、舒鼎铭、
严专强、陈峰、邦智祥、严霞、郑煦灿

证书号：20236076

中国产学研合作促进会

2024年1月

荣誉证书

为表彰第八届广东省畜牧兽医学会奖“大华农杯”获奖项目,特发此证,
以资鼓励。

奖励名称：广东省畜牧兽医学会奖

奖励奖项：先进科技成果奖（家禽科技类）

获奖项目：种鸡禽白血病抗性选育技术创新及新品种培育

完 成 人：谢青梅、陈伟国、曹伟胜、张德祥、舒鼎铭

广东省畜牧兽医学会

2024年6月27日



广东省农业技术推广奖

获奖证书

为表彰在农业技术推广工作中做出贡献
的单位和个人，特颁发此证书，以资鼓励。

获奖项目：优质鸡 A、B、J 亚群禽白血病抗性选育技
术的推广与应用

奖励等级：一等奖

获 奖 者：陈伟国

奖励日期：2018 年 09 月 27 日

证 书 号：2017-1-X01-R02

广东省农业技术推广奖
评审委员会



广东省农业技术推广奖

获奖证书

为表彰在农业技术推广工作中做出贡献的单位和个人，特颁发此证书，以资鼓励。

获奖项目：蛋鸡无抗养殖技术的推广与应用

奖励等级：二等奖

获奖者：陈伟国

奖励日期：2021年12月8日

证书号：2020-2-X11-R09

广东省农业技术推广奖
评审委员会





广东省农业技术推广奖

获奖证书

为表彰在农业技术推广工作中做出贡献的单位和个人，特颁发此证书，以资鼓励。

获奖项目：H9N2 亚型禽流感病毒继发肉鸡细菌感染的控制技术推广与应用

奖励等级：二等奖

获奖者：陈伟国

奖励日期：2020 年 12 月 17 日

证书号：2019-2-X07-R07





Rijksdienst voor Ondernemend
Nederland

OCTROOINUMMER 2033652

Octrooiencentrum Nederland verklaart dat op grond van octrooiaanvraag 2033652 , ingediend op 1 december 2022 octrooi is verleend aan:

South China Agricultural University te Guangzhou City, China

Uitvinder(s):

Qingmei Xie te Guangzhou City, China
Weiguo Chen te Guangzhou City, China
Wenxue Li te Guangzhou City, China
Yu Nie te Guangzhou City, China
Liqin Liao te Guangzhou City, China
Xinheng Zhang te Guangzhou City, China

Voor:

MOLECULAR MARKER FOR GENETIC RESISTANCE OF CHICKEN AVIAN
LEUKOSIS VIRUS SUBGROUPS A AND K (ALV-A AND ALV-K) AND USE
THEREOF

Een recht van voorrang werd ingeroepen, gebaseerd op octrooiaanvraag:
202210321583 .2, ingediend op 30 maart 2022 in China.

Aan dit bewijs is een exemplaar van het octrooischrift gehecht met nummer 2033652 en
dagtekening 25 oktober 2023.

De maximale beschermingsduur van dit octrooi loopt tot en met 30 november 2042.

Uitgereikt te Den Haag, 26 oktober 2023

De Directeur van Octrooiencentrum Nederland,

dr M.H. Spigt



证书号第7418153号



专利公告信息

发明专利证书

发明名称：一种鸡B亚群禽白血病遗传抗性分子标记tvb^{3215-3216insCC}及其应用

专利权人：华南农业大学
岭南现代农业科学与技术广东省实验室河源分中心
地址：510640 广东省广州市天河区五山

发明人：谢青梅;陈伟国;李文雪;陈胜;徐慧娟

专利号：ZL 2023 1 0247372.3 授权公告号：CN 116411087 B

专利申请日：2023年03月14日 授权公告日：2024年10月01日

申请日时申请人：华南农业大学
岭南现代农业科学与技术广东省实验室河源分中心
申请日时发明人：谢青梅;陈伟国;李文雪;陈胜;徐慧娟

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，并予以公告。
专利权自授权公告之日起生效。专利权有效性及专利权人变更等法律信息以专利登记簿记载为准。

局长
申长雨

申长雨



证书号第4710316号



发明专利证书

发明名称：一种鸡A亚群禽白血病抗性分子标记 tva^{260G^A} 及其应用

发明人：谢青梅;陈伟国;张翔宇;张新珩;廖立钦

专利号：ZL 2019 1 0240246.9

专利申请日：2019年03月27日

专利权人：华南农业大学

地址：510642 广东省广州市天河区五山街道483号

授权公告日：2021年09月28日

授权公告号：CN 109797228 B

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发发明专利证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。专利权期限为二十年，自申请日起算。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



第1页(共2页)

其他事项参见背面



扫描全能王 创建



扫描全能王 创建

510642



XQ47835748011

广东省广州市天河区五山街道 483 号

胡彩平(18811848039)



2019102402469

申请号: 2019102402469

证书号第 3078769 号



发明专利证书

发明名称: 鸡 B 亚群禽白血病抗性分子标记 tvb^{3731-3732insA} 及其分子诊断方法

发明人: 谢青梅; 陈伟国; 蔺文成; 舒鼎铭; 李昕健

专利号: ZL 2015 1 1005987.7

专利申请日: 2015 年 12 月 29 日

专利权人: 华南农业大学

地址: 510642 广东省广州市天河区五山路 483 号

授权公告日: 2018 年 09 月 18 日

授权公告号: CN 105441552 B

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查, 决定授予专利权, 颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年, 自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 12 月 29 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的, 专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



证书号第 3078770 号



发明专利证书

发明名称: 鸡 B 亚群禽白血病抗性分子标记 tvb^{3667-3668insAG} 及其分子诊断方法

发明人: 谢青梅; 陈伟国; 蔺文成; 舒鼎铭; 李昕键

专利号: ZL 2015 1 1005988.1

专利申请日: 2015 年 12 月 29 日

专利权人: 华南农业大学

地址: 510642 广东省广州市天河区五山路 483 号

授权公告日: 2018 年 09 月 18 日

授权公告号: CN 105506088 B

本发明经过本局依照中华人民共和国专利法进行审查, 决定授予专利权, 颁发本证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。

本专利的专利权期限为二十年, 自申请日起算。专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 12 月 29 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的, 专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



证书号第5274313号



发明专利证书

发明名称：一种鸡 A、K 亚群禽白血病遗传抗性分子标记及其应用

发明人：谢青梅；陈伟国；李文雪；聂瑜；廖立钦；张新珩

专利号：ZL 2022 1 0321583.2

专利申请日：2022 年 03 月 30 日

专利权人：华南农业大学

地址：510642 广东省广州市天河区五山路 483 号

授权公告日：2022 年 07 月 01 日

授权公告号：CN 114410808 B

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发发明专利证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。专利权期限为二十年，自申请日起算。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



证书号第5274313号

专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年03月30日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

申请日时本专利记载的申请人、发明人信息如下：

申请人：

华南农业大学

发明人：

谢青梅；陈伟国；李文雪；聂瑜；廖立钦；张新珩

证书号第 4839044 号



发明专利证书

发明名称：一种阻断鸡禽白血病病毒垂直传播的方法及其应用

发明人：谢青梅；廖立钦；陈伟国；蔺文成；张新珩

专利号：ZL 2019 1 0391512.8

专利申请日：2019 年 05 月 08 日

专利权人：华南农业大学

地址：510642 广东省广州市天河区五山街道 483 号

授权公告日：2021 年 12 月 07 日

授权公告号：CN 110036976 B

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发发明专利证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。专利权期限为二十年，自申请日起算。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



第 1 页 (共 2 页)

其他事项参见背面

证书号第7489870号



专利公告信息

发明专利证书

发明名称：一种与ALV逆转录酶RT结合的结构域、疫苗及用途

专利权人：华南农业大学

地址：510642 广东省广州市天河区五山路483号

发明人：谢青梅;陈胜;陈丽怡;陈伟国;张新珩

专利号：ZL 2024 1 1002989.X

授权公告号：CN 118546229 B

专利申请日：2024年07月25日

授权公告日：2024年11月01日

申请日时申请人：华南农业大学

申请日时发明人：谢青梅;陈胜;陈丽怡;陈伟国;张新珩

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，并予以公告。
专利权自授权公告之日起生效。专利权有效性及专利权人变更等法律信息以专利登记簿记载为准。

局长
申长雨

申长雨



证书号第7375191号



专利公告信息

发明专利证书

发明名称: LEDGF基因在抗禽白血病性状选育中的应用

专利权人: 华南农业大学

地址: 510640 广东省广州市天河区五山路483号

发明人: 谢青梅;陈丽怡;陈胜;陈伟国;张新珩

专利号: ZL 2024 1 0783530.1

授权公告号: CN 118360416 B

专利申请日: 2024年06月18日

授权公告日: 2024年09月17日

申请日时申请人: 华南农业大学

申请日时发明人: 谢青梅;陈丽怡;陈胜;陈伟国;张新珩

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查, 决定授予专利权, 并予以公告。
专利权自授权公告之日起生效。专利权有效性及专利权人变更等法律信息以专利登记簿记载为准。

局长
申长雨

申长雨



证书号第6539659号



发明专利证书

发明名称：一种与鸡J亚群禽白血病抗性相关的分子标记及其应用

发明人：谢青梅;张新珩;严一铭;廖志宏;陈伟国

专利号：ZL 2019 1 0264872.1

专利申请日：2019年04月02日

专利权人：华南农业大学

地址：510642 广东省广州市天河区五山街道483号

授权公告日：2023年12月05日

授权公告号：CN 109811064 B

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发发明专利证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。专利权期限为二十年，自申请日起算。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



证书号第 4355222 号



发明专利证书

发明名称：一种表达鸡传染性贫血病毒 VP1、VP2 基因重组鸡痘病毒活载体疫苗

发明人：谢青梅；周庆丰；雷小亚；李鸿鑫；蔺文成；陈伟国

专利号：ZL 2018 1 0951471.9

专利申请日：2018 年 08 月 21 日

专利权人：华南农业大学

地址：510000 广东省广州市天河区五山路 483 号

授权公告日：2021 年 04 月 13 日

授权公告号：CN 109136198 B

国家知识产权局依照中华人民共和国专利法进行审查，决定授予专利权，颁发发明专利证书并在专利登记簿上予以登记。专利权自授权公告之日起生效。专利权期限为二十年，自申请日起算。

专利证书记载专利权登记时的法律状况。专利权的转移、质押、无效、终止、恢复和专利权人的姓名或名称、国籍、地址变更等事项记载在专利登记簿上。



局长
申长雨

申长雨



证书号 第 4355222 号



专利权人应当依照专利法及其实施细则规定缴纳年费。本专利的年费应当在每年 08 月 21 日前缴纳。未按照规定缴纳年费的，专利权自应当缴纳年费期满之日起终止。

申请日时本专利记载的申请人、发明人信息如下：

申请人：

华南农业大学

发明人：

谢青梅；周庆丰；雷小亚；李鸿鑫；蔺文成；陈伟国

中华人民共和国国家版权局 计算机软件著作权登记证书

证书号： 软著登字第13309023号

软件名称： 禽白血病分型智慧平台软件
1.0

著作权人： 华南农业大学

权利取得方式： 原始取得

权利范围： 全部权利

登记号： 2024SR0905150

根据《计算机软件保护条例》和《计算机软件著作权登记办法》的规定，经中国版权保护中心审核，对以上事项予以登记。



2024年07月01日

获奖证书



华南农业大学

聂瑜 李文雪 谢姿 赵琪琪 陈胜 王玘 何丹琳 钟文迪 李迪江 胡兆莹 同学：
你（们）的作品《鸡A、B、K亚群禽白血病遗传抗性分子标记的
发掘及其应用》荣获第十六届“挑战杯”广东大学生课外学术科技作
品竞赛

三等奖

指导老师：陈伟国 谢青梅 何冬梅
特颁此证，以兹鼓励。



二〇二一年七月