

家蚕核多角体病毒 *p10* 基因的克隆 和分子系统进化分析

孙京臣^{1*}, 姜丽华^{1*}, 龙 虎¹, 吴 钢², 徐兴耀¹, 钟万芳³, 蔡平钟³

(1 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2 四川省蚕业管理总站, 四川 成都 610041;
3 四川省农业科学院 生物技术核技术研究所, 四川 成都 610066)

摘要:根据 GenBank 中家蚕核多角体病毒 T3 株中 *p10* 基因的保守序列, 克隆得到了 8 个不同地区的家蚕核多角体病毒的 *p10* 基因, 并分别与 GenBank 中的 NPV *p10* 基因进行比对. 结果发现 *p10* 基因都含有 1 个 213 bp 的开放阅读框 (ORF) 共编码 70 个氨基酸, 8 株 P10 蛋白间氨基酸序列相似性为 95% ~ 100%, 相似性高. 与 GenBank 中 AcMNPV 和 BmNPV 的 P10 蛋白相比, 8 株 BmNPV P10 蛋白都缺失了 3 个保守结构域中的 C-端结构域, 只含有 2 个保守结构域, 即 N-端卷曲螺旋和 Pro 丰富区.

关键词:家蚕核多角体病毒; *p10* 基因; 基因克隆; 序列对比; 分子系统进化

中图分类号: S884.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)01-0064-05

Cloning and Molecular Phylogenetic Analysis of *p10* Gene from *Bombyx mori* Nucleopolyhedrovirus

SUN Jing-chen^{1*}, JIANG Li-hua^{1*}, LONG Hu¹, WU Gang², XU Xing-yao¹,
ZHONG Wan-fang³, CAI Ping-zhong³

(1 College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Sichuan Provincial Administration of Sericulture, Chengdu 610041, China;

3 Institute of Biotechnology and Nuclear Technique, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China)

Abstract: According to the sequence of *p10* gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus (BmNPV) isolate T3, eight *p10* genes of BmNPV collected from different areas were cloned and aligned respectively with relevant sequences in GenBankTM database. The open reading frame (ORF) of all *p10* genes from the 8 strains of BmNPVs include 213 nucleotides, encoding a putative protein of 70 amino acids. Multiple alignment of the P10 proteins indicated that the similarities between the 8 strains are 95% -100%. The *p10* genes in all of the 8 strains of BmNPVs also lacked the C-terminal structure domain when compared with AcMNPV *p10* gene and BmNPV *p10* gene. Therefore, the *p10* genes cloned only contains two conserved domains, namely the N-terminal coiled-coil domain, and a proline-rich domain.

Key words: *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus; *p10* gene; gene cloning; sequence alignment; molecular phylogenetic evolution

核多角体病毒 (Nuclear polyhedrosis virus, NPV) 基因组为 90 ~ 60 kb, 约编码 80 ~ 180 种蛋白质^[1-2].
属于杆状病毒科 Baculoviridae, dsDNA 病毒, 具囊膜, 目前已对鳞翅目、双翅目和膜翅目等多个杆状病毒基

收稿日期: 2008-04-10

作者简介: 孙京臣 (1971—), 男, 副教授, 博士; 姜丽华 (1975—), 女, 硕士; * 对本文具有同样贡献; 通讯作者: 蔡平钟 (1963—), 男, 研究员, 博士, E-mail: caipzhong@126.com

基金项目: 广东省自然科学基金 (7006695); 广东省科技计划项目 (2007B020710013)

基因组进行了全序列测定^[3]. 根据包涵体形成方式的不同杆状病毒可分为 NPVs 和 GVs. NPVs 主要存在于鳞翅目昆虫中,膜翅目、双翅目、鞘翅目、缨翅目(蓟马)和毛翅目昆虫中也鉴别到了 NPVs^[4]. 研究表明 P10 启动子是在昆虫细胞中克隆和大量生产外源蛋白质的合适位点^[5-6]. 1984 年 Kuzio 等^[7]完成了第一个 p10 基因 AcMNPV p10 基因的序列测定,目前已有棉贫夜蛾 SpliMNPV^[2]、甜菜夜蛾 SeMNPV^[8]、油桐尺蠖 BsSNPV^[9] 和家蚕 BmNPV^[10] 等多种单粒包埋型及多粒包埋型 NPV 的 p10 基因被鉴定和研究.

家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)是家蚕主要病原之一,伴随家蚕 5 000 多年漫长的进化,在自然界也形成了许多地理隔离株. 迄今为止,已克隆了 BmNPV 中国镇江株(BmNPVZh)^[6]、中国台湾株(BmNPVTa)、韩国株(BmNPVK)^[9]、日本株(BmNPVT3)和印度株(BmNPVIn)的 p10 基因. 已克隆的 BmNPV p10 有编码 94Aa 的(如: BmNPVZh、BmNPVK1、BmNPVK2 和 BmNPVK3)及编码 70Aa 的基因(如 BmNPVTa、BmNPVD1、BmNPVK4 和 BmNPVIn 等). 笔者克隆了 8 个不同地区的 BmNPV p10 基因,并比较了他们与已报道的 p10 基因的相似性,对加深 BmNPV 基因组的认识和分析 BmNPV 的地理分化具有一定的意义.

1 材料与方法

1.1 病毒、载体和受体菌株

BmNPV 分离株由华南农业大学蚕丝科学系收集、繁殖、保存. 试验所用病毒株有埃及株(BmEg)和中国的镇江株(BmZj)、山东株(BmSd)、安徽株(BmAh)、徐闻株(BmXw)、遂溪株(BmSx)、翁源株(BmWy)、广州株(BmGz). 克隆载体质粒 pGEM-T Easy Vector 为 Promega 公司产品. *Escherichia coli* TOP10 为 Invitrogen 公司产品.

1.2 DNA 的提取纯化

采用碱裂解法提取纯化 BmNPV 的基因组 DNA. 质粒 DNA 的提纯采用常规方法^[11].

1.3 p10 基因 PCR 引物设计合成

根据 BmNPV T3 株(GenBank 登录号为 L33180) p10 基因的保守序列,用 GeneFisher 软件设计一对特异引物,由上海生物工程技术有限公司(Sangon)合成. p10 上游引物(Fp10)为 5'-AGCTAGTTTCGGTTGTGA-3',对应 BmNPV T3 株基因组 DNA 的第 108 069 ~ 108 086 个核苷酸. 下游引物(Rp10)为 5'-ATGGGTTTGTGCAACA-3',对应 BmNPV T3 株基因组 DNA 的第 108 940 ~ 108 957 个核苷酸,预期扩增产物大小约为 900 bp.

1.4 PCR 反应及产物的回收、连接和转化

50 μ L 的 PCR 反应体系包括:4 \times dNTP(各 2.5 mmol/L) 4 μ L, Fp10 (25 pmol/ μ L) 和 Rp10 (25 pmol/ μ L) 各 1 μ L,各 BmNPV 基因组 DNA 分别为 1 μ L(5 ng), *Taq* DNA polymerase 1 μ L(3 U), 10 \times Reaction buffer 5 μ L, ddH₂O 37 μ L. PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,48 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min. PCR 产物回收按华美生物工程公司 RESIN ColumnTM 琼脂糖 DNA 纯化系统的方法操作. PCR 产物与载体连接、转化参考 Promega 公司试剂盒说明进行,连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α 或 TOP10, X-gal、IPTG 蓝白斑筛选法获得阳性克隆.

1.5 扩增产物 DNA 序列的测定

重组克隆经 PCR 鉴定后,阳性克隆由上海生物工程技术服务有限公司进行 DNA 序列测定. 利用引物 SP6、T7 及 M13 +、M13 - 测序引物对重组质粒进行测序,为保证测序的准确性,在第 1 次测序反应基础上,又设计中间引物进行测序. 基因探索者软件进行拼接得到全序列.

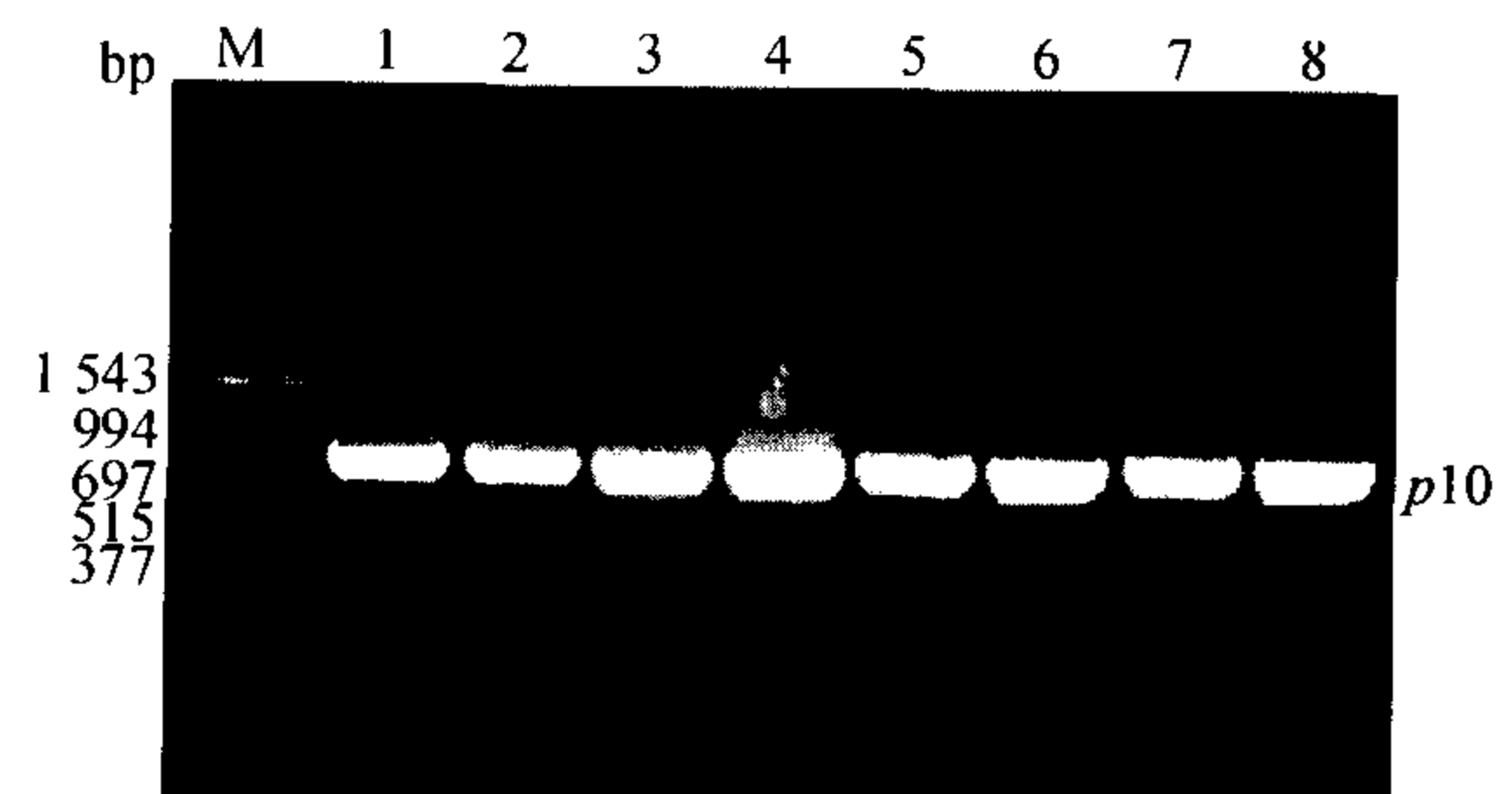
1.6 DNA 序列分析及氨基酸的对比分析

用 BLAST 软件在 GenBank 数据库中进行序列比较分析,基因探索者软件及 NCBI 上的 ORF finder 进行 ORF 分析,利用 Clustal W(European Bioinformatics Institute) 和 Dialign 进行多序列的相似性比对. 根据 NPV p10 基因编码区氨基酸序列的相似性,用 Treeview 软件绘制 P10 蛋白分子进化系统树.

2 结果与分析

2.1 p10 基因克隆和筛选

用碱裂解法从 8 株纯化 BmNPV 多角体中提取的基因组 DNA 为模板,用 Fp10 和 Rp10 引物进行 PCR 克隆 p10 基因,12 g/L 琼脂糖凝胶检测(图 1).



M: PCR Marker(1 543, 994, 697, 515, 377, 231 bp); 1: BmSd; 2: BmZj; 3: BmEg; 4: BmAh; 5: BmGz; 6: BmXw; 7: BmWy; 8: BmSx

图 1 PCR 克隆 BmNPV p10 基因的电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of BmNPV p10 gene products amplified by PCR

由图1可见,以Fp10、Rp10为引物,从8株BmNPV中均扩增到了长度约为900 bp的片段,与BmNPV T3株(L33180)p10基因大小相符.回收目的PCR产物,经RESIN Column™琼脂糖DNA纯化系统纯化、克隆,然后从菌液中提取重组质粒为模板进行PCR检测.结果8个重组质粒均能得到约为900 bp的片段,显示重组质粒中均成功插入了p10基因.

2.2 p10基因序列测定及相似性对比分析

序列拼接后,经相似性比对,克隆到的PCR产物分别为完整的p10基因和部分p26、p74基因.p10基因的大小分别是:BmEg(AF533970)为877 bp; BmXw(AF536206)、BmGz(AF533971)、BmWy(AF533972)和BmSx(AY163811)为888 bp; BmZj

(AF533973)、BmAh(AF533974)、BmSd(AF533975)为889 bp,ORF均为213 bp,编码70个氨基酸,与BmNPV T3株(BmT3, L33180)克隆的p10基因编码氨基酸长度相同,而Zhang等^[6]以江苏省镇江分离的BmNPV株得到的p10基因(BmZh)编码94个氨基酸.根据序列测定结果进行核苷酸相似性分析的结果见表1.从表1可以看出,克隆的BmNPV p10基因间核苷酸相似性为98%~99%,其中BmSd和BmZj的相似性为100%,与已报道BmT3、BmZh、AcMNPVC6(Ac6)之间的相似性为93%~99%.因而笔者克隆的8株BmNPV p10基因编码蛋白质在已克隆的昆虫p10基因中是较短的.

表1 NPV p10基因核苷酸相似性的比较

Tab.1 Similarity of NPV p10 gene Nucleotide sequence

p10 基因	BmXw	BmEg	BmGz	BmWy	BmZj	BmAh	BmSx	BmSd	BmZh	AcC6	%
BmT3	98	99	98	98	98	98	99	98	95	94	
BmXw		98	98	99	99	99	99	99	95	93	
BmEg			98	98	98	99	99	98	95	94	
BmGz				98	98	99	98	98	95	93	
BmWy					98	99	99	98	95	94	
BmZj						98	99	100	95	94	
BmAh							99	98	95	94	
BmSx								99	96	94	
BmSd									95	94	
BmZh											93

利用Clustal W软件对本试验的8株BmNPV的P10蛋白与其他NPV的P10蛋白氨基酸序列进行比较(图2).从图2可知,NPV p10基因编码的氨基酸残基数目差别较大,最长的编码105个氨基酸^[12],最短的编码70个氨基酸.其中本研究从8株BmNPV中扩增的p10基因及BmT3、BmIn、BmK4、SIIn的p10基因都编码70个氨基酸,而BmZh、BmK1、BmK2、BmK3的p10基因都编码94个氨基酸,前者与后者相比少了末端的24个氨基酸,在P10蛋白的3个保守结构域中,前者比后者缺少碱性C-端结构域,有研究表明C-端结构域为P10纤维体形成所需要的^[13],这种C-端缺失对P10蛋白的影响有待进一步的研究.本研究获得的8株BmNPV p10基因编码的氨基酸相似性较高,仅有几处差异.其中,BmXw和BmGz的相似性最低,为95%,但与Zhang等^[6]克隆的P10蛋白的相似性为91%~92%,与BmK1、BmK3的相

似性为85%~88%,与BmK2的相似性较低,为67%~70%;与McA、McBSICh、SIIn、Spli之间的相似性都低于50%.而BmNPV与AcMNPV之间的P10蛋白的相似性达85%~88%.

2.3 NPV p10基因的分子系统进化关系

根据NPV p10基因编码氨基酸序列,利用Treeview软件绘制了36种昆虫P10蛋白的分子进化系统树.由图3可以看出,编码70个氨基酸的BmNPV P10(BmK4-BmSd)系统聚类的距离都小于0.1.其中,BmK4、BmSx、BmAh、BmWy、BmT3、BmEg和BmZj、BmSd的距离系数为0,说明它们在进化上亲缘关系非常近;BmXw又与BmSd、BmZj亲缘关系较接近.BmK1与BmK3、BmK2三者之间的关系非常接近;在系统树中处于最接近的分支的依次还有McA和McB、SICh和Spli,它们的相似性分别为89%、96%、53%、98%.

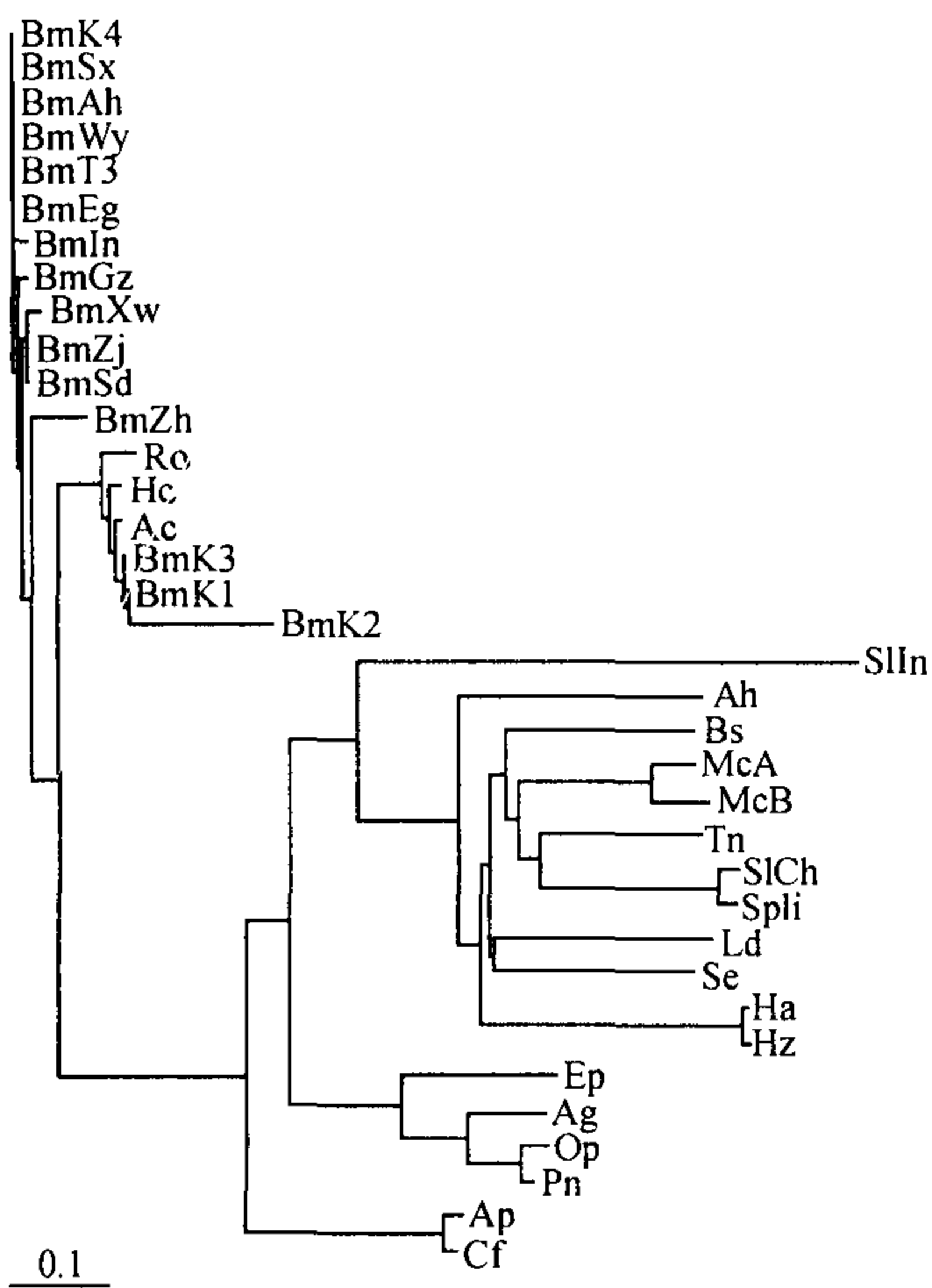
McA	MAQQNILLIRADIKALDDKVTSLQGGVDDVR-----TNLPDVTEINSKLDGQATTL	53	McA	SISN-----SVNIINDILNPEIPEV-----PDPVPLQNKHKK-----	85
McB	MAQQNILLIRADIKALDDKVTSLQGGVDDVR-----TNLPDVTEINSKLDGQATTL	53	McB	SISN-----SVNIINDILNPEIPDV-----P--LQQNKHKK-----	83
SlCh	-MSQNIILVIRQDIKNSDQVTALQGVDDVR-----ANLPDVTEINDKLDQAQNLV	52	SlCh	SLEASNEASTLVQSLSEAVQNI TDILTDPDIPDL-----P-IPDPPLGNKKNNGGVNKK	105
Sp1i	-MSQNIILVIRQDIKNSDQVTALQGVDDVR-----ANLPDVTEINDKLDQAQNLV	52	Sp1i	SLEASNEASTLVQSLSEAVQNI TDILTPEIPDL-----P-IPNPPLG-KKNNGGINKK	104
BmK1	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmK1	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmK2	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----KNHPAFGRLLPAQLTDLN	53	BmK2	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmK3	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmK3	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmEg	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmEg	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmZj	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmZj	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmSd	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmSd	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmAh	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmAh	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmXw	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmXw	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmSx	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmSx	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmWy	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmWy	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmGz	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmGz	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmK4	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmK4	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmIn	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmIn	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
BmZh	MSKPNVLTQIILDAVTEETNTKVDSVQTQLNGLE-----ESFQLLDGLPAQLTDLN	53	BmZh	EIQS-----ILTGDIVPDLPDSLKPKLKSQAFELSDARRGKRSSK-----	94
Ep	MSKPSVLTQIILEAVKAVDDKLVALQTQVDQLT-----EDSKTLEAITDQLGELDNKVT	53	Ep	DIQS-----MLNVDD-LPVPVPPQLLSG-----HDAEARRNRK-----	85
SlIn	MFAFNEDIRIVYSFN-IAPYLKLLRHFTYPACR-----YDENAI FVVVKMSFLCFEARVT	54	SlIn	LCYP-----YFDENAI FVVVID-----	70

“:”表示有保守的置换;“.”表示有半保守的置换;“-”表示与其他序列相比有缺失

BmIn: BmNPVIn (U46757); BmK1: BmNPVK1 (AF247681); BmK2: BmNPVK2 (AF247682); BmK3: BmNPVK3 (AF247683); BmK4: BmNPVK4 (AF247684); BmZh: BmNPVZh (S76783); Ep: EpNPV (AY043265); McA: NPV (U59461); McB: NPV (U75930); SlCh: SlChNPV (AF037263); SlIn: SlChNPV (X92713); Sp1i: Sp1iMNPV (X99377)

图 2 已克隆杆状病毒 NPV p10 基因编码氨基酸序列的相似性比较

Fig. 2 Similarity of NPV p10 amino acid sequences



Ac: AcMNPVC6 (L22858), Ag: AgMNPV (AY055828), Ah: AhMNPV (AP006270), Ap: ApMNPV (AB106130), Bs: BsNPV (AF034410), Cf: CfMNPV (AF512031), Ep: EpNPV (AY043265), Ha: HaNPV (AF265354), Hc: HcNPV (AF302233), Hz: HzNPV (AF334030), Ld: LdMNPV (AF081810), Op: OpMNPV (U75930), Pn: PnNPV (U50441), Ro: RoMNPV (AY145471), Se: SeMNPV (AF169823), Tn: TnSNPV (AF150991).

图 3 NPV P10 蛋白分子进化系统树

Fig. 3 Molecular phylogenetic tree constructed based on NPV P10 amino acid sequences

3 讨论

本试验克隆的 8 株 BmNPV p10 基因在 ORF 的第 209 bp 后缺失了一个 dATP, 产生了终止密码子 TAA(G), 从而使翻译提前终止, 导致编码区减少了 24 个氨基酸残基. 缺失部分是 P10 蛋白 3 个保守结构中的 C-端结构域, 有研究表明, C-端结构域是 P10 纤维体形成所需要的^[13], 这种缺失所带来的杆状病毒在形态、毒性上的变化及导致这种缺失形成的原因条件等有待进一步的研究. BmEg 株 p10 基因在终止密码子 TAA 后 66 ~ 67 bp 处缺失了 1 个 10 bp 的序列, 其中包括 poly(A) 信号序列. 在 BmZh 和 AcC6 相应序列中, 这 10 个核苷酸的位置恰好包含了终止密码子 TAA. 8 株 p10 基因的终止密码子也有差别, 其中 BmZj 株、BmSd 株、BmXw 株 p10 基因的终止密码子为 TAG, 其余 5 株的为 TAA. 用 Treeview 软件绘制了 P10 蛋白的分子进化树, 它在一定程度上反映了这些杆状病毒 NPV 的亲缘关系, 但不能代表整个 NPV 的分子系统发育状况, 只有通过多个基因甚至整个基因组的进化分析, 才能准确地确立杆状病毒的分子进化系统树^[14].

农林害虫的防治是 21 世纪面临的最重要的研究课题之一. 随着生活水平的提高, 无公害农产品的生产和消费越来越受人们的关注. 而杆状病毒杀虫剂等生物农药的研究和应用可以为无公害农产品生产提供物质保障. 多角体蛋白和 P10 蛋白不是病毒复制所必需的, 杆状病毒表达系统利用杆状病毒这 2 个病毒

蛋白在昆虫细胞感染的晚期能大量复制的能力,它们的启动子能驱动外源基因的高水平表达^[15]. 因而 *p10* 基因的强启动子在构建杆状病毒表达载体,外源、昂贵、稀有蛋白表达和生产及杆状病毒杀虫剂的改造方面有广泛的应用,日益受到人们的重视.

参考文献:

- [1] MURPHY F A, FAUQUET C M, BISHOP D H, et al. Virus taxonomy: Six report of the international committee on taxonomy of viruses[J]. Arch Virol, 1995, 144(Suppl 10): 2065-2070.
- [2] TOISTER-ACHITUV M, FAKTOR O. Transcriptional analysis and promoter activity of the *Spodoptera littoralis* multicapsid nucleopolyhedrovirus ecdysteroid UDP-glucosyltransferase gene[J]. J Gen Virol, 1997, 78(2): 487-491.
- [3] LAUZON H A M, LUCAROTTI C J, KRELL P J, et al. Sequence and organization of the *Neodiprion lecontei* nucleopolyhedrovirus genome [J]. J Virol, 2004, 78(13): 7023-7035.
- [4] FEDERICI B A. The Baculoviruses [M]. New York: Plenum Press, 1997: 33-60.
- [5] MILLER L K. Baculoviruses: high-level expression in insect cells[J]. Current Opinion in Genetics and Development, 1993, 3(1): 97-101.
- [6] ZHANG Yao-zhou, WU Xiang-fu, LI Zai-ping. *p10* genes of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus [J]. Science in China: Ser B, 1995, 38(1): 50-59.
- [7] KUZIO J, ROHEL D Z., CURRY C J. Nucleotide sequence of the *p10* polypeptide gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus [J]. Virology, 1984, 139(2): 414-418.
- [8] ZUIDEMA D, VAN OERS M M, VAN STRIJEN E A, et al. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *p10* gene of *Spodoptera exigua* nuclear polyhedrosis virus [J]. J Gen Virol, 1993, 74(6): 1017-1024.
- [9] VAN OERS M M, HU Z, ARIF B M, et al. The single-nucleocapsid of nucleopolyhedrovirus of *Buzura suppressaria* encodes a P10 protein [J]. J Gen Virol, 1998, 79(6): 1553-1562.
- [10] HONG H K, WOO S D, CHOI J Y, et al. Characterization of four isolates of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus [J]. Arch Virol, 2000, 145(11): 2351-2361.
- [11] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 译. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] WEI Yong-jie, LONG Qi-xin, CHEN Shang-wu. Nucleotide sequence and characterization of the *p10* gene of *Spodoptera litura* nuclear polyhedrosis virus [J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1998, 30(6): 550-555.
- [13] WILSON J A, HILL J E, KUZIO J, et al. Characterization of the baculovirus *Choristoneura fumiferana* multicapsid nuclear polyhedrosis virus *p10* gene indicates that the polypeptide contains a coiled-coil domain [J]. J Gen Virol, 1995, 76(12): 2923-2932.
- [14] 姜丽华, 钟万芳, 蔡平钟, 等. 家蚕核型多角体病毒埃及株 *p10* 基因的克隆及结构特征分析 [J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(5): 483-487.
- [15] SCHEPER G C, VRIES R G, BROERE M, et al. Translational properties of the untranslated regions of the *p10* messenger RNA of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus [J]. J Gen Virol, 1997, 78(3): 687-696.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 63 页)

- [11] 陶国祥. 云南省秃杉气候区划的研究 [J]. 林业调查规划, 2001, 26(4): 9-15.
- [12] 陈建新, 王明怀, 殷祚云, 等. 广东省秃杉引种栽培效果及栽培区划分研究 [J]. 林业科学研究, 2002, 15(4): 399-405.
- [13] 罗良才, 徐莲芳. 秃杉木材物理力学性质的研究 [J]. 云南林业科技, 1982(10): 5-20.
- [14] 林金国, 陈瑞英, 彭彪, 等. 福建秃杉木材物理力学性质的研究 [J]. 福建林学院学报, 1997, 17(3): 223-226.
- [15] 张连翔, 梅秀艳, 姜镇荣. 小叶杨生长规律的研究 [J]. 防护林科技, 2001(2): 10-12.
- [16] 全国杉木种源试验协作组. 杉木种源早期选择研究 [J]. 林业科学研究, 1994, 7(专刊): 93-100.
- [17] 全国马尾松种子园课题协作组. 马尾松种子园建立技术论文集 [M]. 北京: 学术书刊出版社, 1990: 1-7.
- [18] 黄少伟, 谢维辉. 实用 SAS 编程与林业试验数据分析 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2001: 36-196, 214-233.
- [19] 美国 SAS 软件研究所. SAS 系统 SAS/STAT 软件使用手册 [M]. 高惠璇等编译. 北京: 中国统计出版社, 1997: 1-706.
- [20] 杨大应. 秃杉扩大栽培与苗期试验 [J]. 贵州林业科技, 1996, 24(4): 52-54.
- [21] 吴玉斌, 睦国荣, 华自忠, 等. 秃杉播种育苗试验初报 [J]. 江苏林业科技, 1989(1): 22, 35.
- [22] 孙光钦, 周绪平, 卢清, 等. 秃杉播种育苗试验研究 [J]. 山东林业科技, 1994(4): 14-16.

【责任编辑 李晓卉】