应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(5):1425—1430

杨扇舟蛾颗粒体病毒 fgf 基因的分析*

梁振普 许 锋 张小霞** 尹新明

(河南农业大学生命科学学院 郑州 450002)

摘 要 根据杨扇舟蛾颗粒体病毒(*Clostera anachoreta* Granulovirus,ClanGV)的全基因组序列,分析其基因组含有3个杆状病毒成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)的同源 ORFs。通过生物信息学软件及在线工具对 ClanGV-FGFs 进行了分析,包括同源性、一级结构、二级结构和进化分析等。分析结果显示,测序得到的3个 ClanGV-FGFs 转录方向不同,但都属于病毒转录早期基因;三者同源性相差较大;进化分析显示,ClanGV-FGF-3 和 NPV 的 FGFs 进化关系较近,而 ClanGV-FGF-1 和 ClanGV-FGF-2 则与其它 GV 相应的 FGF 进化关系更近。

关键词 杨扇舟蛾颗粒体病毒,成纤维细胞生长因子(FGF),序列分析

Sequence analysis of fgf genes of *Clostera anachoreta* Granulovirus

LIANG Zhen-Pu XU Feng ZHANG Xiao-Xia** YIN Xin-Ming

(College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract Based on the whole genome of *Clostera anachoreta* Granulovirus (ClanGV), the Fibroblast Growth Factor (FGF) genes of ClanGV were analyzed using biosoftware and online tools. The Results show that three ClanGV-FGFs, which are all early expression genes, had different transcription directions. These ClanGV-FGFs had low sequence homologies but shared a similar functional domain common to all identified FGFs. Evolutionary analysis proves that ClanGV-FGF-3 has a close relationship to NPV-FGFs, however, ClanGV-FGF-1 and ClanGV-FGF-2 are closer to GV-FGF-1 and GV-FGF-2 respectively.

Key words *Clostera anachoreta* Granulovirus, Fibroblast Growth Factor (FGF), sequence analysis

杆状病毒是一类具有囊膜包裹的双链环状 DNA 病毒,其基因组大小为 80~180 kb,在自然界中以节肢动物作为专一性宿主进行感染和传播。杆状病毒又分为颗粒体病毒(granulovirus,GV)和核型多角体病毒(nuclear polyhedrosis virus,NPV)(洪健和周雪平,2006)。杆状病毒可以有效地侵染多种农林害虫,近年来作为一种主要的生物杀虫剂正在被广泛的研究使用。

杨扇舟蛾,又名杨树天社蛾,属于鳞翅目 Lepidoptera、舟蛾科 Notodontidae、扇舟蛾属 *Clostera*。杨扇舟蛾专一的侵害杨树,严重时可以将杨树叶子吃光,对生态造成极大地破坏。杨扇舟蛾颗粒体病毒(*Clostera anachoreta* granulovirus, ClanGV)可以侵染杨扇舟蛾,造成虫体的死亡、液化,然后再释放出病毒粒子。

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)是一类通过与细胞膜特异性受体结合发挥作用,调节细胞生长的蛋白分子,最早在牛脑和脑垂体中发现(Armelin,1973)。在哺乳动物中,FGF 家族在促进胚胎发育、有丝分裂的发生、细胞生长和分化、组织形成与修复、炎症、血栓形成、肿瘤发生与转移等生理及病理过程中起重要作用。Ayres 等(1994)在 AcMNPV 中首次发现了与 FGF 蛋白家族同源的病毒 FGF(vFGF),后来的研究证明 FGF 在杆状病毒中普遍存在。Katsuma 等(2004, 2006a, 2006c)研究发现 BmNPV-FGF N 端的2个糖基化位点 Asn44 和 Asn171 对其分泌是至关重要的;并通过实验观察到缺失 FGF 的重组病毒与野生型病毒相比,BmNPV 出芽病毒(BV)产量下降。通过生物测定实验发现 *fgf* 缺失型病毒的传

* 资助项目:国家自然科学基金(30700540、30901152)、教育部新世纪优秀人才支持计划项目。

**通讯作者,E-mail: lzpbio@126.com

收稿日期:2011-02-11,接受日期:2011-03-31

染性并未降低，但是与野生型病毒相比，对家蚕的致死时间却延长了 20 h。进而推测，BmNPV 的 vFGF 对病毒的生成量有一定影响。Detvisitsakun 等(2005，2006，2007)对 AcMNPV 的 vFGF 进行了深入的研究。研究发现 AcMNPV-vFGF 可以和肝素结合，并可以分泌到细胞外。但是和野生型相比，缺失 FGF 的 BV 的生成量并未有明显变化，这一点和 Katsuma 等(2004，2006a，2006c)观察到的 BmNPV 不同。在所有感染鳞翅目昆虫杆状病毒中都发现了 fgf 基因的存在，然而目前却没有有关颗粒体病毒 fgf 基因功能的相关研究。本文对 GV-fgf 基因进行了结构、同源性及进化方面的分析，可以为以后的研究提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料

ClanGV 由作者所在实验室保存并增殖。通过碱裂解法提取病毒基因组。

1.2　方法

1.2.1　基因的测序　ClanGV 基因组由华大基因公司测序完成。

1.2.2　分析方法　通过 DNAStar 数据包，BLAST 和 Expasy 等在线工具进行氨基酸的一、二级结构分析及预测。

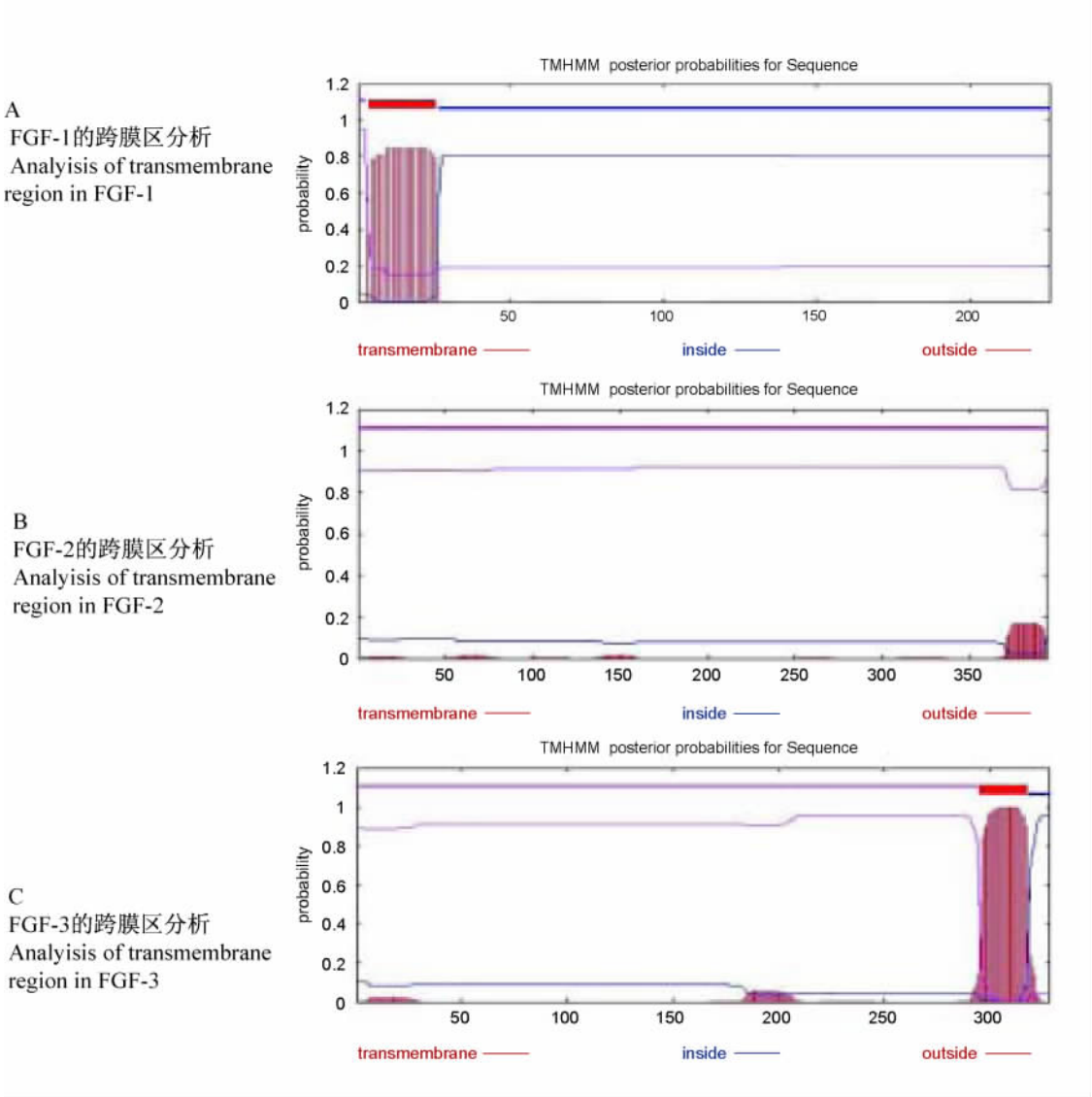

图 1　ClanGV-FGFs 的跨膜区预测

Fig. 1　Analyisis of transmembrane region of ClanGV-FGFs

2　结果与分析

2.1　序列分析

对 ClanGV 的全基因组进行了同源性分析，在 ClanGV 的 123 个 ORFs 中有 3 个 ORFs 与杆状病毒的 fgf 基因同源，在基因组中的位置分别是 48867 ~ 49547、88121 ~ 89305、97973 ~ 98595，分别命名为 *fgf-1*、*fgf-2* 和 *fgf-3*。

2.1.1　3 个 fgf 基因序列的一级结构分析　*fgf-1* 长 681 bp，CG 含量 48.46%，编码 226 个氨基酸，分子量为 26.15 ku; *fgf-2* 长 1 185 bp，CG 含量 46.33%，编码 394 个氨基酸，分子量为 44.82 ku; *fgf-3* 长 987 bp，CG 含量 44.98%，编码 328 个氨基酸，分子量为 36.75 ku。对 3 个 *fgf* 编码的氨基酸 (vFGF) 进行比对，结果显示 3 个 FGF 因子同源性较低(4% ~ 11%)。序列分析显示在 3 个 *fgf* 的上游都有典型的转录起始位点 TATA-BOX，说明 3 个 fgf 基因都是 ClanGV 转录的早期基因。

由测序结果推导的氨基酸序列分析中 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc)，FGF-1 的 116 ~ 119(NYSD)、152 ~ 155(NASS)、160 ~ 163(NVTT) 位氨基酸是可能的 N 糖基化位点，FGF-2 的 54 ~ 57(NKTL)、67 ~ 70(NGTV)、87 ~ 90(NSTY)、173 ~ 176(NETI)、227 ~ 230(NSTN)、251 ~ 254(NTTL)、352 ~ 355(NGSV)、370 ~ 373(NSSA) 位氨基酸是可能的 N 糖基化位点，FGF-3 的 24 ~ 27(NLTT)、33 ~ 37(NLTT)、69 ~ 72(NDSV)、95 ~ 98(NLTT)、122 ~ 125(NETV)、191 ~ 194(NLTL)、237 ~ 240(NESA) 位氨基酸是可能的 N 糖基化位点。

应用在线工具 ProtParam (http://www.expasy.ch/tools/protparam.html) 对 3 个 fgf 基因编码的氨基酸疏水性分析，发现 3 个 FGF 的疏水性不同，FGF-3 呈疏水性，而 FGF-1 和 FGF-2 呈亲水性。

2.1.2　3 个 FGF 因子的二级结构分析　用 SignalP3.0 对 3 个 FGF 序列进行信号肽分析，发现 3 个 FGF 因子均含有信号肽。FGF-1 的信号肽最长，有 25 个氨基酸，序列为 MSSFISWLTLLWWTSLTCGTGTLGP; FGF-2 和 FGF-3 的信号肽较短，分别有 18 和 19 个氨基酸。

用 TMHMM Server. V. 2.0 在线工具对 3 个 FGF 因子进行跨膜区分析，发现 FGF-1 和 FGF-3 有 1 个跨膜区，FGF-2 没有跨膜区(图 1)。

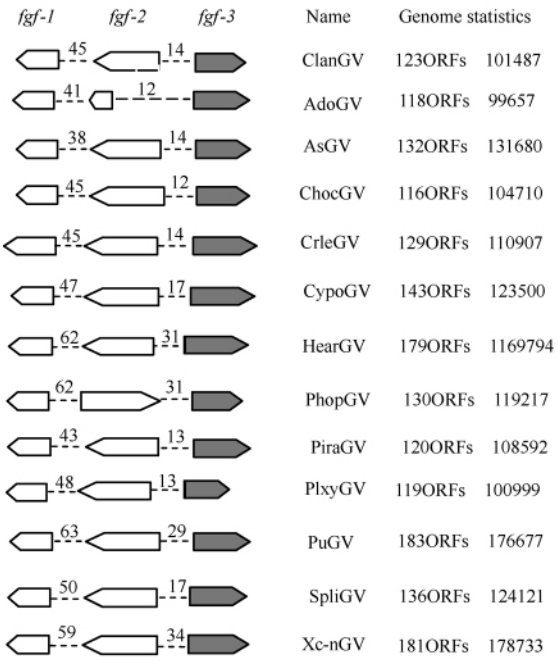

图 2　GV *fgfs* 转录方向分析

Fig. 2　Analysis of GV *fgfs* translation direction

箭头的方向表示基因转录的方向，分别对应 3 个 *fgf*; 箭头的长短表示 *fgf* 的相对长度; 虚线上的数字表示间隔的 ORF 数。

The arrows represent the relative length and direction of the ORFs; the arabic numerals on lines indicate the ORF number between two genes.

通过对跨膜区的预测显示，FGF-1 的 1 ~ 3 位氨基酸位于膜外，4 ~ 26 位氨基酸是跨膜区，27 ~ 226 位氨基酸位于膜内; FGF-3 的 1 ~ 294 位氨基酸位于膜外，295 ~ 317 位氨基酸是跨膜区，318 ~ 328 位氨基酸位于膜内。也就是说 ClanGV-FGF-1 的跨膜区在 N 端，而 ClanGV-FGF-3 跨膜区在 C 端; ClanGV-FGF-2 没有跨膜区，但通过在线工具分析，推测其有信号肽结构。

应用在线软件 Expasy 数据库中的工具 SOPMA 对 3 个 FGF 序列进行二级结构分析，结果显示 3 个 FGF 氨基酸序列的二级结构由 α-螺旋、延伸链、β-转角和无规则卷曲组成，但是所占比例不同(表 1)。

2.1.3　杆状病毒 FGF 比较分析　在所有感染鳞翅目昆虫杆状病毒的基因组中都发现有 fgf 基因的存在。为了进一步了解杆状病毒 FGFs 的特点，

表 1 ClanGV-FGFs 的二级结构分析

Table 1 Analysis of Secondary structure of ClanGV-FGFs

FGF 蛋白 Protein of FGF	二级结构 Secondary structure(%)			
	α-螺旋 α-helix	延伸链 β-sheet	β-转角 β-turn	无规则卷 Random coil
FGF-1	23.01	30.97	8.41	37.61
FGF-2	6.09	39.59	9.41	45.18
FGF-3	25.61	30.79	4.57	39.02

登陆 NCBI 对 3 个 ClanGV-FGFs 进行了 blast。将结果进行分析,发现在 NPV 中只有 1 个 fgf 基因,而在 GV 中都含有 3 个 fgf 基因。同源比对显示,在杆状病毒基因组中,FGF 的同源性相差较大。例如:在 NPV 中,AcMNPV 与 SlNPV 的同源性高达 99%,而 SlNPV 与 TnNPV 同源性只有 9%(表 2)。比较分析 GV 的 3 个 FGF,发现 GV-FGFs 同源性较低。例如黄地老虎颗粒体病毒(*Agrotis segetum* GV,AsGV)的 FGF-2 与其他 GV 的 FGF-2 的同源性只有 2% ~4%(表 3)。

表 2 几种 NPV-FGFs 的同源性比较

Table 2 Homology of several NPV FGFs

病毒名称 Name of virus	编号 Number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
AcMNPV	1		45	11	89	43	14	40	11	11	15	10	34	11	99	15	10	11
AnpeNPV	2			12	44	56	14	54	10	14	15	10	51	11	44	18	11	13
AsNPV	3				11	12	15	12	34	12	13	34	12	15	11	12	40	21
BmNPV	4					42	14	40	11	11	14	10	34	11	88	15	10	11
ChfuNPV	5						16	56	12	12	14	11	56	9	43	17	11	13
EcobNPV	6							17	16	12	16	16	16	15	14	14	10	14
EppoNPV	7								12	14	16	12	48	11	40	18	10	12
HaNPV	8									13	13	99	11	13	11	11	30	19
LeseNPV	9										15	13	13	14	11	25	11	11
LyxyNPV	10											13	18	15	15	18	13	17
MacoNPV	11												11	13	10	11	29	19
OpNPV	12													12	34	20	11	13
OrleNPV	13														11	11	15	16
PlxyNPV	14															15	10	11
SlNPV	15																9	12
SpexNPV	16																	21
TnNPV	17																	

表 3 ClanGV-FGFs 基因与其他 12 种 GV-FGFs 同源性比对结果

Tabel 3 Homologies of ClanGV-FGFs and other 12 GV-FGFs

	Ado	As	Choc	Crle	Cypo	Hear	Phop	Pira	Plxy	Pu	Spli	Xc-n
FGF-1	29	25	42	37	30	20	33	46	22	21	27	20
FGF-2	20	3	30	30	32	19	31	35	8	19	22	19
FGF-3	22	23	33	32	32	16	26	34	14	17	17	16

目前,GeneBank 收录的全基因组已测序的 12 种 GV 中,均存在 3 个不同的 fgf 基因,且 3 个 fgf 基因的转录方向不一致(图 2)。GV-FGFs 之间的同源性相对较低,但是明显高于 NPV-FGFs 之间的同源性(表 2,3)。

在整体分布上看,ClanGV-FGFs 与 ChocGV、CrleGV、CypoGV、PiraGV 以及 PlxyGV 的 *fgfs* 似乎有更接近的基因组织方式。

2.1.4　FGF 进化分析　为进一步了解 3 个 ClanGV-FGFs 与其它杆状病毒 FGF 之间的进化关系,从 GeneBank 中获取了 NPV 和 GV 的 FGF 序列,果蝇的 *bnl* 以及线虫的 *let756*、*egl17* 氨基酸序列,将它们与 ClanGV-FGFs 进行进化分析。分析结果显示: 3 个 ClanGV-FGFs 与其它 GV-FGFs 都有较近的进化关系。由于 3 个 GV-FGFs 之间、GV-FGFs 与 NPV-FGFs 差异较大,这个进化树并不能十分直观的表明杆状病毒 FGF 因子之间的进化关系。但是我们可以得出,GV-FGF-3 与 NPV-FGF 进化关系更近一些,而 GV-FGF-1 和 GV-FGF-2 在进化上关系更近一些(图 3)。

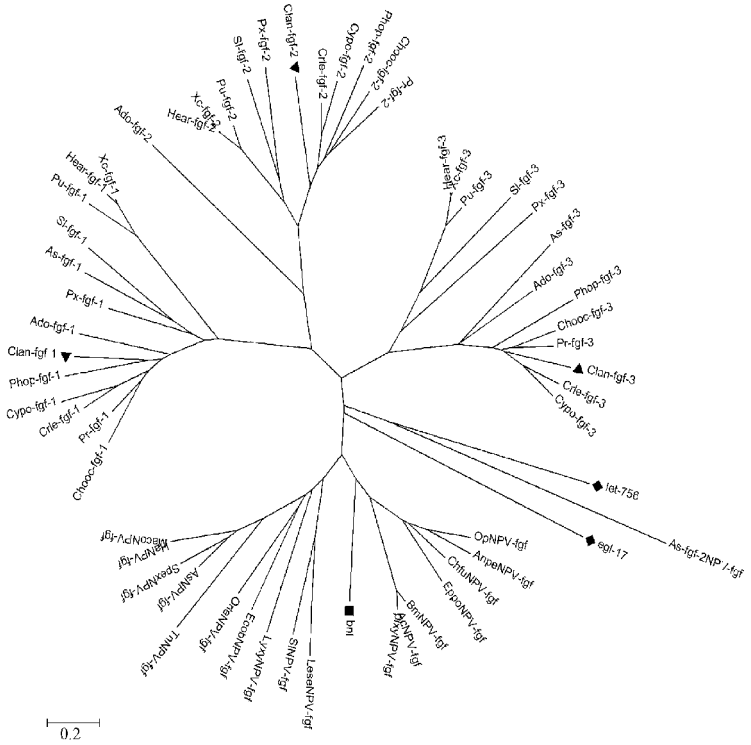

图 3　杆状病毒 FGF 因子进化分析

Fig. 3　Phylogenetic analysis of concatenated amino acid sequence alignments.

"▲"标示的是 ClanGV-FGFs (▲represent the ClanGV-FGFs); 带"◆"标示的是线虫的 FGF 因子(◆indicate the 2 FGFs of Nematode *let-756* and *egt-17*); "■"标示的是果蝇的 FGF 因子(■represent the FGF of Drosophilidae).

3　讨论

迄今为止,在所有感染鳞翅目昆虫的杆状病毒中都发现了 FGF 的存在。这说明它们在病毒的生活史上可能有十分重要的作用。FGF 可以和其受体 FGFr 特异性的结合,在配体的共同作用下,调节信号通路行使一定的功能(Ornitz and Itoh, 2001)。相关研究人员通过分子生物学手段研究了 NPV-FGF 的结构和功能,并预测了 FGF 在 NPV 的生活史上可能存在的作用(Detvisitsakun *et al*, 2005; Katsuma *et al.*, 2006b, 2006c)。Li 等(2008)进一步证实 vFGF 存在于 BV 上,而不存在于 ODV 上; 由于杆状病毒在次级感染产生 BV 的时候,才对昆虫形成系统感染,因此作者认为 vFGF 的缺失使得 BV 无法和受体结合,从而影响了 BV 的趋化作用,延长病毒的系统感染时间,导

致昆虫的致死时间延长。

目前，在 NPV 中只发现一个 FGF 因子的存在，而 Popovici 等(2005)发现很多颗粒体病毒编码 2 个不同的 FGF。通过比较分析，作者发现在 GeneBank 已收录的 12 种颗粒体病毒的全基因组中都含有 3 个 fgf 基因，因此我们推测这在颗粒体病毒中很可能是一个普遍的现象。杆状病毒 FGF 因子的同源性不高，这和哺乳动物 FGF 家族类似，但通过在线工具 SWISS-MODEL 的预测，它们都有其它 FGF 相同的功能结构域，比如肝素结合位点等。Ornitz 和 Itoh(2001)研究人类 FGF 家族之间的关系后，认为 FGF 家族成员之间差异较大的原因是由基因穿梭或者基因组复制造成的。因此，颗粒体病毒 3 个 fgf 基因之间的关系，以及它们与 NPV-FGFs 之间的关系将是一个值得研究的方向。

参考文献

Armelin HA, 1973. Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. *PNAS*, 7(9): 1091—1101.

Ayres MD, Howard SC, Kuzio J, Lopez-Ferber M, Possee RD, 1994. The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 202(2): 586—605.

Detvisitsakun C, Berretta MF, Lehiy C, Passarelli AL, 2005. Stimulation of cell motility by a viral fibroblast growth factor homolog: Proposal for a role in viral pathogenesis. *Virology*, 336(2): 308—317.

Detvisitsakun C, Cain EL, Passarelli AL, 2007. The *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus fibroblast growth factor accelerates host mortality. *Virology*, 365(1): 70—78.

Detvisitsakun C, Hutfless EL, Berretta MF, Passarelli AL, 2006. Analysis of a baculovirus lacking a functional viral fibroblast growth factor homolog. *Virology*, 346(2): 258—265.

洪健，周雪平，2006. ICTV 第八次报告的最新病毒分类系统. 中国病毒学，21(1): 84—96.

Katsuma S, Daimon T, Horie S, Kobayashi M, Shimada T, 2006a. N-linked glycans of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus fibroblastgrowth factor are crucial for its secretion. *BBRC*, 350(4): 1069—1075.

Katsuma S, Daimon T, Mita K, Shimada T, 2006b. Lepidopteran ortholog of Drosophila breathless is a receptor for the baculovirus fibroblast growth factor. *Journal of Virology*, 80(11): 5474—5481.

Katsuma S, Horie S, Daimon T, Iwanaga M, Shimada T, 2006c. In vivo and in vitro analyses of a *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus mutant lacking functional *vfgf*. *Virology*, 355(1): 62—70.

Katsuma S, Shimada T, Kobayashi M, 2004. Characterization of the baculovirus *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus gene homologous to the mammalian FGF gene family. *Virus Genes*, 29(2): 211—217.

Li X, Liang CY, Song JH, Chen XW, 2008. The ORF 113 of *Heliocoverpa armigera* single nucleopolyhedrovirus encodes a functional fibroblast growth factor. *Virologica Sinica*, 23(5): 321—329.

Ornitz DM, Itoh N, 2001. Fibroblast growth factors. *Genome Biology*, 2(3): 3005.

Popovici C, Roubin R, Coulier F, Birnbaum D, 2005. An evolutionary history of the FGF superfamily. *Bioessays*, 27(8): 849—857.

应用昆虫学报 *Chinese Journal of Applied Entomology* 2011,48(5):1431—1436

绿盲蝽取食与机械损伤对棉花叶片内防御性酶活性的影响*

毛 红** 陈 瀚 刘小侠 张青文***

(中国农业大学农学与生物技术学院 北京 100193)

摘 要 为探明绿盲蝽 *Apolygus lucorum*(Mayer-Dür) 取食和机械损伤对不同抗性棉花叶片内主要防御酶活性的影响以及防御酶与棉花抗绿盲蝽性的关系,以棉花 3 个不同抗性品系为材料,室内条件下测定绿盲蝽取食和机械损伤处理后棉叶中苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)的活性。结果表明:对于健康植株,抗性品种 PAL、POD 和 PPO 的活性均显著高于感性品种防御酶的活性;在绿盲蝽取食诱导条件下,不同抗性棉叶的 PAL、POD 和 PPO 活性增加,且抗性品种比感性品种达到最大值的时间早;在机械损伤处理后,不论是抗性品种还是感性品种,PAL、POD 和 PPO 活性变化都不及绿盲蝽取食诱导明显。本研究说明,棉叶中 PAL、POD 和 PPO 活性对棉花的抗绿盲蝽性有一定的影响,这些酶活性的变化与逆境条件、胁迫时间以及棉花的品种有关。

关键词 绿盲蝽,棉花,取食,机械损伤,防御酶活性

Effects of *Apolygus lucorum* feeding and mechanical damage on defense enzyme activities in cotton leaves

MAO Hong** CHEN Han LIU Xiao-Xia ZHANG Qing-Wen***

(College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract Active changes in the levels of the defensive enzymes phenylalanine aminolyase(PAL), peroxidase(POD) and polyphenol oxidase(PPO), were evaluated in the leaves of various cotton varieties that had either been fed on by *Apolygus lucorum* (Mayer-Dür), or subject to mechanical damage, under laboratory conditions. The results indicate that PAL, POD and PPO activity were significantly higher in resistant than in susceptible varieties. PAL, POD and PPO activity increased in each variety following damage by *A. lucorum* but peaked in resistant varieties earlier than in susceptible varieties. However, changes in PAL, POD and PPO activity following mechanical damage were not as obvious as those observed following feeding by *A. lucorum*. These results suggest that PAL, POD and PPO activities are associated with the resistance of cotton to *A. lucorum* and that changes in defensive enzyme activity depend on the cotton variety and the kind of damage plants are subject to.

Key words *Apolygus lucorum*, cotton, feeding, mechanical damage, defense enzyme activity

绿盲蝽 *Apolygus lucorum* (Mayer-Dür) 属半翅目 Hemiptera 盲蝽科 Miridae,是为害棉花的优势盲蝽种群之一,在我国南北棉区均有发生(马晓牧等,2004;郭文艳和傅春梅,2009)。绿盲蝽主要以成、若虫刺吸顶芽、嫩叶、花蕾及幼铃汁液为害棉花,严重影响其生长发育、开花结实以及产量品质。1997 年以来,随着我国大规模商业化种植转 Bt 基因抗虫棉,化学农药使用大幅度减少,导致棉田盲蝽种群数量增加、为害加剧,逐渐成为转 Bt 基因棉上的主要害虫(Wu *et al.*, 2002)。因此,棉田盲蝽的防控成为目前急需解决的问题。

植物在其生长发育过程中,经常会遭受机械

* 资助项目:公益性行业(农业)科研专项(20080311)。

** E-mail: maohong2008@163.com

*** 通讯作者,E-mail: zhangqingwen@263.net

收稿日期:2010-11-15,接受日期:2011-03-26