



## 家蚕抗核型多角体病毒(BmNPV)相关基因的表达分析及其实用性分子标记的筛选

刘勇 艾均文\* 唐芸 薛宏 何行健 郑颖

湖南省蚕桑研究所, 长沙 410127

\*通讯作者, [jwai718@sina.com](mailto:jwai718@sina.com)

**摘要** 家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV)是一种对家蚕具有高致病性的病毒,会导致蚕业生产上的严重经济损失。迄今已在家蚕中发现了几种对BmNPV有抑制作用的蛋白,但各基因的表达水平与家蚕不同遗传类型材料BmNPV抗性的相关程度仍不清晰。本研究以高抗材料(highly resistant parent, R)和高感材料(highly susceptible parent, S)组配成F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>及回交等不同遗传类型材料,利用添毒实验与荧光定量PCR技术,检测家蚕不同遗传类型材料在不同感染条件下对BmNPV的抵抗能力及其相应的5个抗性相关基因(家蚕脂肪酶 I 基因(*Bmlipase-1*), 家蚕丝氨酸蛋白酶 II 基因(*serine protease II*, *BmSP-2*), 家蚕核糖体蛋白 S3A 基因(*ribosomal protein S3A*, *BmS3A*), 家蚕抑制蛋白酶 II 基因(*suppressor of profilin 2*, *BmSop2*), 家蚕烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化还原酶基因(*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidoreductase*, *BmNOX*)的相对表达量,分析其与抗性的关联性。结果表明:*Bmlipase-1*和*BmSP-2*在家蚕中肠特异表达,其他基因没有组织表达特异性;*Bmlipase-1*、*BmSP-2*、*BmNOX*和*BmSop2*四个基因在不同遗传类型材料中肠的相对表达量之间均存在明显差异,且抗性越强的遗传类型材料的相对表达量也越高,各基因的相对表达量与材料抗性呈正相关性。而*BmS3A*基因的表达差异在各遗传类型材料间没有呈现出一定的相关性;*Bmlipase-1*在不同遗传类型材料的相对表达量与其抗性水平的一致性最高,该基因的相对表达水平可以在家蚕育种过程中作为抗核型多角体病毒材料选择与鉴定的依据之一。

**关键词** 家蚕核型多角体病毒(BmNPV);抗性基因;荧光定量PCR;表达水平;相关性

**中图分类号** S881.2 **文献标识码** A

## Expression Analysis of Antiviral Genes Related to BmNPV in Silkworm (*Bombyx mori*) and Screening of Practical Molecular Markers

LIU Yong AI Jun-Wen\* TANG Yun XUE Hong HE Xing-Jian ZHENG Ying

The Sericultural Research Institute of Hunan Province, Changsha 410127, China

\* Corresponding author, [jwai718@sina.com](mailto:jwai718@sina.com)

**Abstract** *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV) is a highly pathogenic virus in the sericultural industry and often results in severe economic losses. Some proteins are found to show antiviral activity against BmNPV in previous studies, but little is known about the correlations between expression levels of these antiviral related genes and resistance abilities of different genetic materials against BmNPV. In this study, to explore the correlations, the highly resistant parent (R) was crossed with the highly susceptible parent (S) to generate different types of genetic materials such as F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, and backcrosses. The resistance to BmNPV and the

corresponding relative expression levels of 5 antiviral related genes including *Bmlipase-1*, serine protease II gene (*BmSP-2*), ribosomal protein S3A gene (*BmS3A*), suppressor of profilin 2 gene (*BmSop2*) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidoreductase gene (*BmNOX*) in different genetic materials were detected by BmNPV attack test and fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) technology. The results showed that *BmSP-2* and *Bmlipase-1* specifically expressed in midgut, other genes showed no tissue specificity. The relative expression levels of 4 genes (*Bmlipase-1*, *BmSP-2*, *BmNOX* and *BmSop2*) were higher in midguts of different types of genetic materials with stronger viral resistance, which had significant differences in different types of genetic materials, being consistent with their resistance abilities. However, there was no correlation among the expression levels of *BmS3A*. The highest level of consistency between expression levels of these antiviral related genes and resistance abilities of different types of genetic materials against BmNPV had been observed in *Bmlipase-1*. It was concluded that relative expression levels of *Bmlipase-1* could be one of the basis in selecting anti-BmNPV materials in silkworm breeding.

**Keywords** *Bombyx mori nucleopolyhedrovirus* (BmNPV); Resistance gene; Fluorescent quantitative PCR; Expression level; Correlation

家蚕(*Bombyx mori*)是有重要经济价值的鳞翅目昆虫,蚕业是我国加入世界贸易组织后,少数几个仍居国际垄断地位的农业产业之一。然而,在蚕业生产上经常会有多种病害可导致蚕茧减产,甚至绝收,其中特别以家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV)所引发的血液型脓病发生最广泛,危害最严重,其传染性极强,难以控制。据国家蚕桑产业技术体系产业经济岗位的研究者于2013年对14省91县的1782户蚕农进行调查,结果发现有86.92%的农户因该病造成过损失,是蚕农最担心发生的蚕病(李建琴,顾国达,2013)。有关家蚕抗BmNPV基因的筛选、抗性机制及遗传机理方面的研究,各国学者已作了大量工作,并取得了一定进展。

家蚕对BmNPV的敏感性虽然受到不同内外环境的影响,但其遗传因素起到决定性作用(Watanabe, 1986)。Aratake (1973)对日本现行生产用蚕品种及其杂交原种的感染抵抗性进行比较,发现不同抗性材料差异可达10~100倍。陈克平等(1991, 1996)和钱荷英等(2006)先后用几率值分析法和浓度(对数)-死亡率几率关系曲线法进行遗传机理研究,结果表明家蚕的BmNPV抗性对感性呈不完全显性,至少由1对主效基因控制,有微效基因修饰与偏父遗传现象。相关研究人员在抗性材料筛选基础上,也尝试了家蚕抗性相关基因的进一步研究。因为BmNPV主要通过食下感染,家蚕中肠就成为了抵御BmNPV的第一道防线,在其肠液中也先后分离出了一批对BmNPV有抑制作用的活性蛋

白,其中就有红色荧光蛋白(red fluorescent proteins, RFPs)可以让NPV失活的报道(Funakoshi, Aizawa, 1989); Ponnuvel等(2003)和Nakazawa等(2004)先后在家蚕幼虫中肠肠液中分离出脂肪酶I (*Bmlipase-1*)和丝氨酸蛋白酶II (serine protease-2, *BmSP-2*),实验证明都具有抗BmNPV的包涵体衍生病毒(occlusion-derived virus, ODV)活性,同时都只在中肠组织中表达; Xu等(2005)和徐家萍等(2005)构建了家蚕近等位基因系,利用荧光差异显示技术获得了一些与抗性相关的差异片段,其中有家蚕核糖体蛋白S3A (ribosomal protein S3A, *BmS3A*)、家蚕抑制蛋白酶II (suppressor of profilin 2, *BmSop2*)和瘫痪肽结合蛋白(paralytic peptide binding protein, PP-BP)等片段。此外, Selot等(2007; 2010)发现家蚕烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化还原酶基因(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidoreductase, *BmNOX*)也与抗BmNPV有关。

不同家蚕品种对BmNPV的抗性有很大的差异,相关研究显示抗性基因的表达量与其抗性存在一定的相关性(陈杰, 2009; 张婷婷等, 2012; Cheng et al., 2014)。本研究在前人研究的基础上,选择高抗材料(highly resistant parent, R)和高感材料(highly susceptible parent, S)各1个,进一步组配成F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>及回交等不同遗传类型材料,通过荧光定量PCR技术,检测在添食与不添食BmNPV两种不同条件下,各遗传类型材料幼虫中*BmSP-2*、*Bmlipase-1*、*BmS3A*、*BmSop2*、*BmNOX*的表达水平,验证不同抗

性相关基因的相对表达量与其相应遗传类型材料抗性水平的关联性,并力求在这些基因中筛选到在正常饲养条件下其表达水平与对应遗传类型材料的抗性水平一致性仍然较高的基因,可作为新选育材料抗性检测的一种分子标记,以期家蚕抗性品种选育中的抗 BmNPV 新材料筛选提供一条更加简捷、准确的新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和主要试剂

本实验选择的高抗材料'KNC' (R)和高感材料'HYB' (S)均为湖南省蚕桑科学研究所在家蚕(*Bombyx mori*)抗性品种选育过程中经定向选择得到,并利用这 2 个材料进一步杂交组配成 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>及回交组合作为本次实验材料(刘勇等, 2016)。家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV)由该所蚕品种研究室保存。

DNase I、dNTP、Taq 酶、SYBR Premix Ex Taq™为 TaKaRa (日本)公司产品,一步法反转录试剂盒、总 RNA 抽提试剂盒为 OMEGA (美国)公司产品。

### 1.2 实验材料的组配和抗 BmNPV 能力的检测

以高抗材料 R 和高感材料 S 为基础,组配杂交 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>及回交组合(陈克平等, 1996),获得 R、S、R×S、S×R、R×(S×R)、(R×S)×R、R×(R×S)、(S×R)×R、(R×S)×S、S×(R×S)、(S×R)×S、S×(S×R)、(R×S) F<sub>2</sub>、(S×R) F<sub>2</sub>,共 14 种不同遗传材料。

从 2 龄幼虫起蚕开始添食 BmNPV 多角体悬浮液,添食浓度共分成 10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup> 个/mL 6 个梯度浓度和 1 个空白对照组,每组设置 3 个重复小区,每个小区 30 头蚕,添食的桑叶用打孔器打成标准大小的叶片,用移液器定量吸取病毒悬浮液于叶片上,涂抹均匀,放置阴凉处自然凉干。每个区饲喂 3 片涂抹好的叶片,待添食 10 h 后各区桑叶完全食尽,再改喂无毒桑叶。每天定时观察各区实验蚕的发育状况,及时清除已染病蚕,3 龄眠起后对各梯度浓度实验蚕的发病率持续调查 60 h,并用显微镜检测发病特征不明显的幼虫,依据是否有多角体病毒来判断 BmNPV 感染个体,统计各区发病率。利用 SPSS17.0 软件计算 BmNPV 对各实验材料的致死中浓度(lethal concentration 50, LC<sub>50</sub>)值。

### 1.3 实验材料的取材和总 RNA 的提取

将经添毒处理的每个实验材料各梯度浓度的处理区(包含对照区)幼虫继续饲养至 5 龄的第 3 天,以最高浓度的试验区幼虫为实验取材对象,分别解剖 9 头幼虫,数量不足时则补充以次高浓度的试验区幼虫为材料。高抗材料 R 取 7 个组织(表皮,脂肪体,中肠,马氏管,丝腺,生殖腺,血液),其他材料的处理组及对照组取中肠组织。各组织经干净滤纸吸干水分后装入离心管中,每个组织各取材 3 份,液氮速冻后放入 -80 ℃冰箱保存备用。

将所有组织研磨成粉末后,用 RNA 试剂盒提取总 RNA,经超微量分光光度计测定所提总 RNA 的浓度和纯度,再通过一步法反转录试剂盒进行反转录,反应条件:37 ℃ 60 min, 85 ℃ 5 s;将 cDNA 样品稀释 50 倍后用于后续的定量 PCR 检测。

### 1.4 抗性相关基因的荧光定量 PCR 检测

引物序列见表 1;根据已公布的 *Bmlipase-1* (GenBank No. DQ286554)、*BmSP-2* (GenBank No. AB117641)、*BmS3A* (GenBank No. AY705974)、*BmSop2* (GenBank No. AY763110)、*BmNOX* (GenBank

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequence

引物名称	引物序列(5'~3')
Primer name	Primer sequence
Bmlipase-1-F	ACAAATGGCAATGTCAACTCTATC
Bmlipase-1-R	CCACGCCAGTCTACAACAATAA
BmSP-2-F	CCAGGATTGTGGGTGGTTCT
BmSP-2-R	CAAAAGCGAGGGTGAAGTGA
BmNOX-F	CGACGAGCGACTAACCCAAA
BmNOX-R	GAGCTCATACGGACTCAACCTG
BmSop2-F	GCCACAGCTGCATTCCGTTAT
BmSop2-R	ACCTCTCCAAAGTGTTCCAAGTCC
BmS3A-F	ATGGCGGTCGGGAAAAATA
BmS3A-R	ACGGTTGACAAGCGTGGTG
TIF-4A-F	TTCGTACTGGCTCTTCTCGT
TIF-4A-R	CAAAGTTGATAGCAATTCCCT

Bm: 家蚕; lipase-1: 脂肪酶 I; SP-2: 丝氨酸蛋白酶 II; NOX: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化还原酶; Sop2: 抑制蛋白酶 II; S3A: 核糖体蛋白 S3A; TIF-4A: 转录启动因子-4A; 下同  
Bm: *Bombyx mori*; SP-2: Serine protease II; NOX: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidoreductase; Sop2: Suppressor of profilin 2; S3A: Ribosomal protein S3A; TIF-4A: Translation initiation factor 4A; The same below

No. EF025315) 基因 CDS 序列, 用 Primer Premier 5.0 进行定量引物设计; 以家蚕转录启动因子-4A (translation initiation factor 4A, TIF-4A; GenBank No. DQ443290) 作为内参基因。用荧光定量 PCR 方法检测各实验材料不同提取组织中各相关抗性基因的表达量。

在 LightCycler® 96 System 上进行荧光定量 PCR 反应。PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 10  $\mu\text{L}$  2  $\times$  SYBR Green Realtime PCR Master Mix, 10  $\mu\text{mol/L}$  上、下游引物各 0.8  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  cDNA 模板, 6.4  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR 热循环程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s, 然后

95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 扩增 45 个循环; 熔解曲线分析: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 s, 65  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 97  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 s; 37  $^{\circ}\text{C}$  退火 0 s 终止反应。每个样品进行 3 次重复。用定量 PCR 仪配置软件处理定量数据。

## 2 结果与分析

### 2.1 实验材料对 BmNPV 的抗性比较及其遗传特点

实验材料的病毒添食结果如表 2 和图 1 所示。从表中的  $LC_{50}$  值可以看出两亲本的抗性差异很大, 其  $LC_{50}$  值相差近 5 000 倍,  $F_1$  代介于两亲之间, 表现

表 2 高抗材料(R)和高感材料(S)组配的各杂交世代添食不同浓度 BmNPV 后的病死率

Table 2 Mortality of various hybrid generations of highly resistant parent (R) and highly susceptible parent (S) after feeding with different concentrations of BmNPV

品种组合 Variety combination	不同浓度 BmNPV 的致死率/% Feeding concentration of BmNPV							$LC_{50}/(\text{个} \cdot \text{mL}^{-1})$
	0 个/mL	10 <sup>4</sup> 个/mL	10 <sup>5</sup> 个/mL	10 <sup>6</sup> 个/mL	10 <sup>7</sup> 个/mL	10 <sup>8</sup> 个/mL	10 <sup>9</sup> 个/mL	
S	0.00	18.33	36.67	66.67	78.33	100.00	100.00	2.731E+05
(R·S)×S	0.00	0.00	16.27	33.33	58.33	98.41	100.00	2.681E+06
S×(S·R)	0.00	0.00	10.00	28.33	66.36	98.25	100.00	2.849E+06
S×(R·S)	0.00	0.00	8.51	37.54	61.67	95.00	100.00	2.957E+06
(S·R)×S	0.00	0.00	3.33	26.67	68.33	91.75	100.00	4.025E+06
(R×S)F <sub>2</sub>	0.00	0.00	0.00	25.53	55.00	78.33	98.33	8.875E+06
(S×R)F <sub>2</sub>	0.00	0.00	0.00	16.67	56.67	73.33	90.00	1.491E+07
(S×R)F <sub>1</sub>	0.00	0.00	0.00	18.33	43.33	61.67	88.33	2.645E+07
(R×S)F <sub>1</sub>	0.00	0.00	0.00	13.33	36.67	51.67	83.33	5.454E+07
R×(S·R)	0.00	0.00	0.00	13.33	28.86	51.67	73.33	8.836E+07
(R·S)×R	0.00	0.00	0.00	8.33	33.33	49.12	71.92	9.922E+07
(S·R)×R	0.00	0.00	0.00	10.00	31.03	50.79	70.00	1.030E+08
R×(R·S)	0.00	0.00	0.00	6.67	20.00	50.96	71.67	1.289E+08
R	0.00	0.00	0.00	0.00	8.33	23.33	45.00	1.228E+09

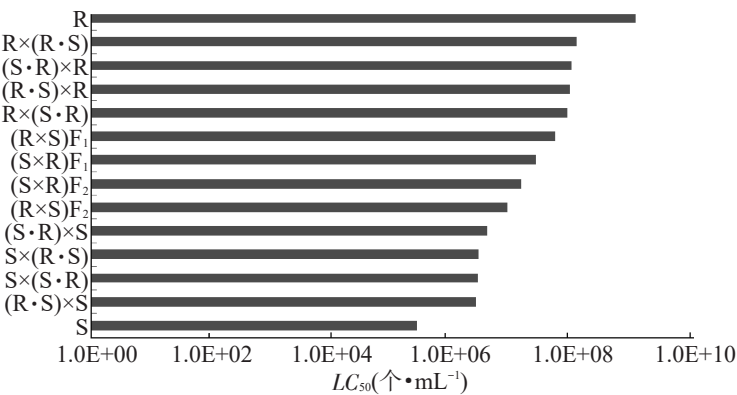


图 1 BmNPV 对高抗材料(R)和高感材料(S)组配的各杂交世代的致死中浓度( $LC_{50}$ )

Figure 1 Median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of BmNPV to different hybrid generations of highly resistant parent (R) and highly susceptible parent (S)



杂种优势现象;F<sub>2</sub>中杂种优势减弱;F<sub>1</sub>回交高抗材料R后代抗性强,回交高感材料S后代抗性减弱,说明基因有累加效应,提示着经过不断的迭代选择,能提高家蚕品种的抗性。

## 2.2 抗性相关基因在各实验材料5龄幼虫不同组织中的表达差异

利用高抗材料R的7个组织进行荧光定量PCR检测分析,其检测结果如图2所示。*Bmlipase-1*和*BmSP-2*只在中肠中特异表达,其他3个基因则所有检测组织中均有表达,各组织间虽有差异,没有特异性。*BmS3A*在丝腺中表达量最高,是其他组织的2倍多;*BmSop2*在血液中表达量最高,丝腺和中肠次之,脂肪体和表皮中的表达量最低;*BmNOX*在丝腺中最高,血液和生殖腺次之,中肠和表皮略低。

## 2.3 抗性相关基因在各实验材料5龄幼虫中肠组织的表达检测

取各实验材料的处理组和对照组的中肠组织进行荧光定量PCR实验,其实验数据分析结果如图3所示。处理组的4个基因*Bmlipase-1*、*BmSP-2*、*BmNOX*和*BmSop2*的中肠相对表达量要高于对照组,说明经病毒诱导后表达量均会有不同程度的上

调;相同基因在抗性越高的相同遗传类型材料(相同遗传类型指抗性基因频率值一致)中的相对表达量也会越高,高抗材料R和高感材料S间表达差异最为明显( $P<0.01$ ),说明以上4个基因在中肠里的相对表达量与其遗传类型材料的抗性存在显著的一致性;*BmS3A*基因不仅在添毒组与对照组之间没有显现出相应的诱导表达关联性,而且各类型遗传材料相对表达量与各自的抗性也没表现出相应的一致性。

## 2.4 抗性相关基因相对表达量与抗BmNPV水平一致性的比较

*Bmlipase-1*、*BmSP-2*、*BmNOX*和*BmSop2*这4个基因的相对表达量虽然与BmNPV抗性水平均存在一定的正相关性,但其相关性也存在一定差异性。为了更好地比较4个基因的相对表达量随不同遗传类型材料的BmNPV抗性不同的变化趋势,找出一致性相对较高的抗性基因,将14种遗传材料根据含有抗性基因理论频率值相同的原理分成以下5组不同遗传类型,即:'R×R×S'组包含4个遗传材料,分别是R×(S×R)、(R×S)×R、R×(R×S)、(S×R)×R;'R×S'组包含4个遗传材料,分别是R×S、S×R、(R×S)F<sub>2</sub>、(S×R)F<sub>2</sub>;'S×S×R'组包含4个遗传材料,分别是(R×S)×S、S×(R×S)、(S×R)×S、S×(S×R);亲本R与S分别

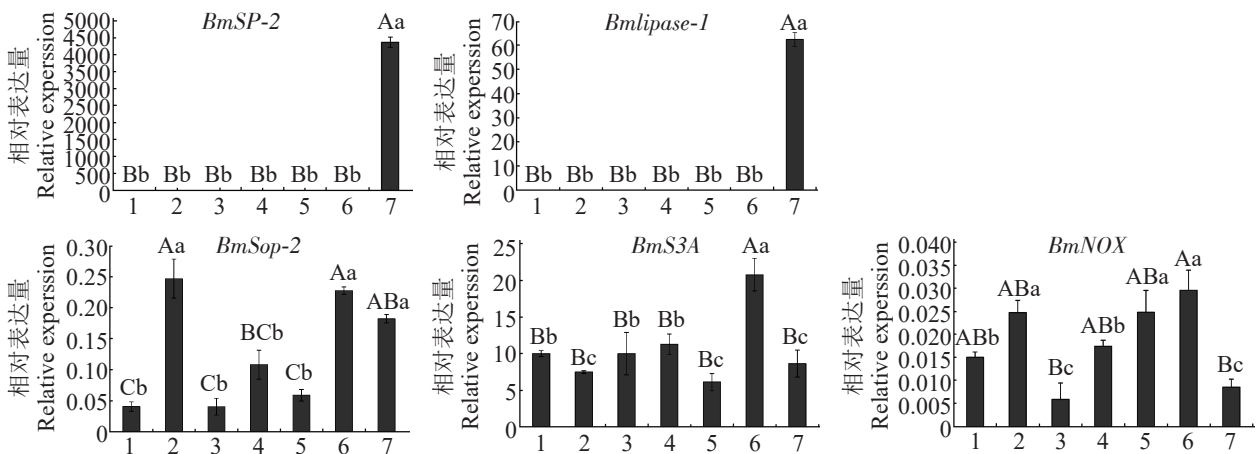


图2 抗性相关基因在5龄第3天幼虫各组织的相对表达量

Figure 2 Relative expression levels of antiviral related genes in various tissues of day 3 larvae of the 5th instar of silkworm varieties

1: 脂肪体;2: 血液;3: 表皮;4: 马氏管;5: 生殖腺;6: 丝腺;7: 中肠;不同小写字母表示不同组织差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著( $P<0.01$ );内参基因: 转录启动因子-4A基因(*TIF-4A*),  $n=3$ ;下同

1: Fat body; 2: Hemolymph; 3: Epidermis; 4: Malpighian; 5: Genital gland; 6: Silk gland; 7: Midgut; Different lowercase letters indicate significant differences ( $P<0.05$ ), different capital letters indicate extremely significant differences in different tissues ( $P<0.01$ ); Reference gene: Translation initiation factor 4A (*TIF-4A*),  $n=3$ ; The same below

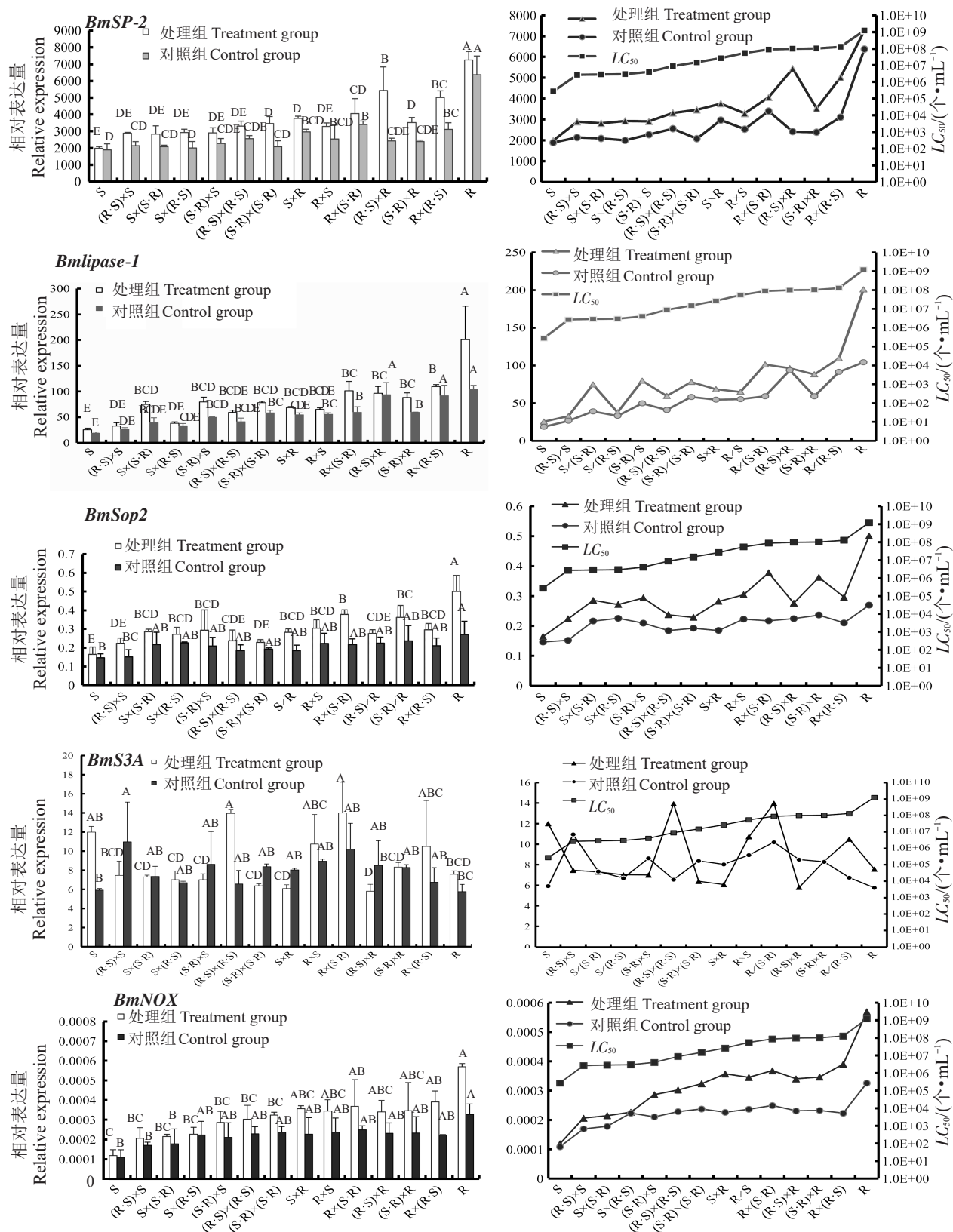


图3 qRT-PCR检测各实验材料5龄第3天幼虫中肠组织各基因的相对表达量及各实验材料相应的 $LC_{50}$

Figure 3 Relative expression of antiviral related genes in midgut on day 3 of the 5th instar of all test materials by qRT-PCR and their corresponding  $LC_{50}$  of all test materials

不同大写字母表示不同遗传材料之间差异极显著( $P < 0.01$ )

Different capital letters indicate extremely significant differences among different genetic materials ( $P < 0.01$ )

代表不同组别的遗传材料。取各组数据的平均值以及把相对表达量简化(去掉科学计数位)到同一水平上作图。现有的遗传研究表明家蚕的BmNPV抗性对感性呈不完全显性,且抗BmNPV主效基因的作用具有基因的剂量效应(刘勇等, 2016),所以杂交和回交组合的变化斜率要较之两头平缓,实验结果与理论预期相符。其中各组材料间*Bmlipase-1*的相对表达量差异最显著,抗性材料的相对表达量比感性材料的最高差异达8倍,其余基因仅有3~4倍的差距(表3),而且无论在添毒还是不添毒的条件下,*Bmlipase-1*在不同组遗传类型材料中相对表达量的变化斜率与不同组遗传类型材料所对应的 $LC_{50}$ 值的变化斜率最为接近,其一致性最高(图4)。

3 讨论

本研究以高抗材料R和高敏材料S及其组配杂交的 $F_1$ 、 $F_2$ 与回交组合为实验材料,进行BmNPV病毒梯度添食,统计结果和陈克平等(1996)的研究结论基本一致。再对所有不同遗传类型材料的5

龄第3天幼虫进行5个抗BmNPV相关基因(*Bmlipase-1*, *BmSP-2*, *BmS3A*, *BmNOX*和*BmSop2*)的荧光定量PCR检测,分析各基因在添毒与不添毒条件下的相对表达量与抗BmNPV能力的相关性。结果表明,无论在诱导还是未诱导条件下,*Bmlipase-1*、*BmSP-2*、*BmNOX*和*BmSop2*相对表达量与各实验材料本身抗BmNPV能力存在较为显著的一致性,即在抗性越强的实验材料中,这4个基因的相对表达量(包括诱导表达量)也会越高。然而,另一个基因*BmS3A*相对表达量的变化既不与不同遗传类型材料自身抗性水平存在一致性,也不与各实验材料诱导与否存在关联性,这与徐家萍等(2005)的结果有明显差异。

有关*Bmlipase-1*的研究已积累了一定的前期基础(刘勇等, 2016),发现该抗性主效基因的作用具有基因的剂量效应,但由于只是涉及2个亲本及其正反交 $F_1$ 等4种遗传材料,不能确定其与其他各种不同遗传材料之间的相关性,因此,本实验继续对其开展研究。由于BmNPV抗性主效基因至今还是未知,而包括*Bmlipase-1*在内的其他基因本身具有

表3 5组材料的 $LC_{50}$ 和各抗性相关基因在对应材料组中的相对表达量

Table 3  $LC_{50}$  of 5 groups materials and the relative expression of antiviral genes related to BmNPV in the corresponding groups

品种组合 Variety combination	处理组 Treatment group					对照组 Control group				
	com- $LC_{50}/(\text{个}\cdot\text{mL}^{-1})$	<i>BmNOX</i>	<i>BmSop2</i>	<i>Bmlipase-1</i>	<i>BmSP-2</i>	$LC_{50}/(\text{个}\cdot\text{mL}^{-1})$	<i>BmNOX</i>	<i>BmSop2</i>	<i>Bmlipase-1</i>	<i>BmSP-2</i>
S	2.731E+05	1.19	1.64	2.54	1.98	2.731E+05	1.09	1.46	1.85	1.89
S×S×R	3.13E+06	2.33	2.69	5.62	2.89	3.130E+06	1.95	2.01	3.71	2.12
R×S	2.619E+07	3.32	2.63	6.74	3.46	2.619E+07	2.32	1.96	5.21	2.53
R×R×S	1.05E+08	3.61	3.28	9.88	4.51	1.050E+08	2.34	2.22	7.58	2.83
R	1.228E+09	5.69	5.00	20.10	7.26	1.228E+09	3.26	2.70	10.40	6.38

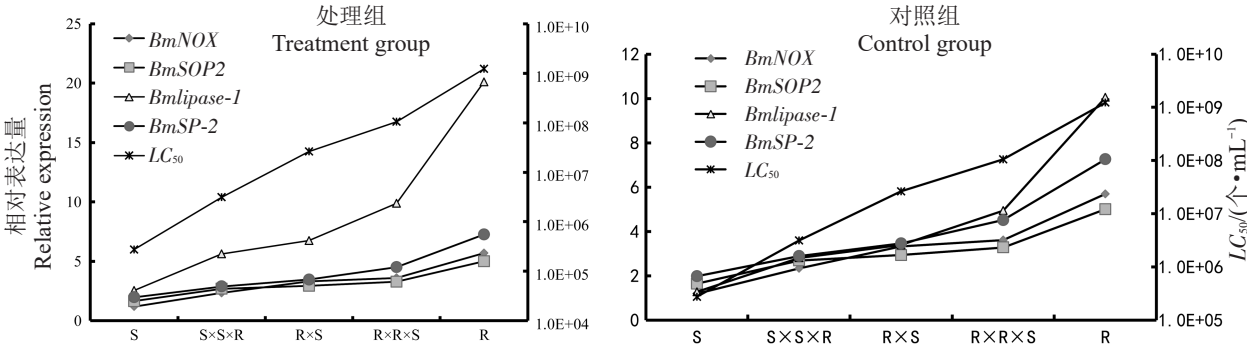


图4 抗性基因的相对表达量与5组材料的 $LC_{50}$ 一致性比较  
Figure 4 Consistent comparison between relative expression levels of antiviral related genes and  $LC_{50}$  of 5 groups of test materials

抵抗 BmNPV 感染的活性,因此选取一些活性表达与 BmNPV 抗性有直接相关性的抗性基因或活性蛋白,可作为抗病育种辅助选择的一种分子标记。

为了开展家蚕抗 BmNPV 品种选育现代技术研究,利用抗性材料、敏感材料和近等位基因系,刘晓勇等(2004)通过随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术获得 3 个分子标记,姚勤等(2005)将其进一步转换成了特异序列扩增区域(sequence characterized amplified region, SCAR)标记。冯凡(2012)利用上述实验材料,通过染色体步移获得紧密连锁的 R736 标记,对其进行 PCR 扩增得到了 1 条 700 bp 左右的条带,并在一些材料中得到验证。钱荷英等(2018)利用华康系列材料进行简化基因组测序,结果在第 27 群上发现了 50 个与抗 BmNPV 相关的 SNP 分子标记,但这些 SNP 仅作为鉴定和判别华康系列品种分子标记。这些分子标记多为重复序列,与之有抗性相关的基因信息还不明确,在目前家蚕基因组中没有标记序列的相关信息。因此,连锁性强、可靠性高的理想分子标记还需进一步的深入研究,还有大量探索需继续开展。

## 4 结论

本研究利用高抗材料 R 和高敏材料 S 构建了在遗传育种中各种不同的遗传类型材料,分别测定各自的  $LC_{50}$ ,用荧光定量 PCR 的方法检测了 5 个已报道的与抗 BmNPV 相关基因(*Bmlipase-1*, *BmSP-2*, *BmS3A*, *BmNOX*, *BmSop2*)的相对表达量。4 个基因(*Bmlipase-1*, *BmSP-2*, *BmNOX*, *BmSop2*)的表达水平和蚕体对 BmNPV 的抗性水平存在显著一致性,另一个基因 *BmS3A* 相对表达量的变化既不与不同遗传类型材料自身抗性水平存在一致性,也不与各实验材料诱导与否存在关联性。抗性相关基因 *Bmlipase-1* 在各组遗传类型材料间的相对表达量差异最显著,与不同组遗传类型材料自身抗性水平的一致性也最高,可在家蚕抗性育种过程中利用荧光定量 PCR 检测分析,在诱导或不诱导情况下均可检测出相应蛾区的抗性基因是否导入或纯合,并由此筛选到目的蛾区进行选择继代。

## 参考文献

陈克平,林昌麒,吴冬秀,等. 1991. 家蚕保存种对核型多角

- 体病的抗性[J]. 蚕业科学, 17(1): 45-46. (Chen K P, Lin C Q, Wu D X, et al. 1991. Resistance of preserved species of silkworm, *Bombyx mori*, to nucleopolyhedrovirus [J]. Science of Sericulture. 17(1): 45-46.)
- 陈克平,林昌麒,姚勤. 1996. 家蚕对核型多角体病的抗性及其遗传规律的研究[J]. 蚕业科学, 22(3): 160-164. (Chen K P, Lin C Q, Yao Q. 1996. Studies on the resistance to NPV and its hereditary regularity in the silkworm (*Bombyx mori* L.)[J]. Science of Sericulture, 22(3): 160-164).
- 陈杰. 2009. 增量表达抗病毒蛋白 Bmlipase-1 的家蚕转基因系统的建立[D]. 硕士学位论文, 西南大学, 导师: 赵萍, 夏庆友, pp. 55-59. (Chen J, 2009. Enhanced expression of antiviral factor Bmlipase-1 by piggyBac-based transgenic technology in silkworm, *Bombyx mori*[D]. Thesis for M.S., Southwest University, Supervisor: Zhao P, Xia Q Y. pp. 55-59.)
- 冯凡. 2012. 家蚕 NPV 抗性遗传分析及其双抗病毒病分子标记辅助育种[D]. 硕士学位论文, 江苏大学, 导师: 陈克平, pp. 30-33. (Feng F. 2012. Genetic analysis of nuclear polyhedrosis virus resistance in silkworm, *Bombyx mori* L. and double molecular markers-assisted breeding of silkworm, *Bombyx mori*, resistant to the virus, BmNPV and BmDNV-Z[D]. Thesis for M.S., Jiangsu University, Supervisor: Chen K P, pp. 30-33.)
- 刘勇, 艾均文, 薛宏, 等. 2016. 家蚕脂肪酶 *Bmlipase-1* 基因在抗血液型脓病不同遗传类型材料中的表达分析及其在育种中的应用[J]. 中国农学通报, 32(23): 32-36. (Liu Y, Ai J W, Xue H, et al. 2016. *Bmlipase-1* gene: Expression in different genetic materials against nucleopolyhedrovirus and application in breeding[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 32(23): 32-36.)
- 刘晓勇, 姚勤, 陈克平. 2004. 利用 RAPD 技术筛选家蚕抗核型多角体病分子标记[J]. 江苏大学学报(自然科学版), 25(1): 17-20. (Liu X Y, Yao Q, Chen K P. 2004. Studies on RAPD markers for NPV resistance in silkworm (*Bombyx mori*) using RAPD method[J]. Journal of Jiangsu University (Natural Science Edition), 25(1): 17-20.)
- 李建琴, 顾国达. 2013. 养蚕意愿、蚕业风险与应对措施-基于 14 个省 91 个县 1782 个农户的问卷调查[J]. 蚕业科学, 39(2): 355-364. (Li J Q, Gu G D. 2013. Silkworm-rearing willingness, sericulture risk and prevention measures-A questionnaire survey based on 1782 rural households in 91 counties of 14 provinces[J]. Science of Sericulture, 39(2): 355-364.)
- 钱荷英, 李刚, 李龙, 等. 2018. 基于家蚕抗血液型脓病新品种的 SNP 分子标记开发[J]. 河北农业大学学报, 41(1): 76-82. (Qian H Y, Li G, Li L, et al. 2018. Development



- of SNP markers in new silkworm variety for resistance to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) [J]. Journal of Hebei Agricultural University, 41(1): 76-82.)
- 钱荷英, 徐安英, 林昌麟, 等. 2006. 家蚕对核型多角体病毒抵抗性及遗传规律的研究[J]. 河北农业大学学报, 29(4): 77-91. (Qian H Y, Xu A Y, Lin C Q, et al. 2006. Studies on the resistance to NPV and its hereditary regularity in the silkworm (*Bombyx mori* L) [J]. Journal of Hebei Agricultural University, 29(4): 77-91.)
- 徐家萍, 陈克平, 姚勤, 等. 2005. 利用荧光差异显示技术分离的家蚕抗 NPV 相关基因 *s3a* [J]. 昆虫学报, 48(3): 347-352. (Xu J P, Chen K P, Yao Q, et al. 2005. Fluorescent differential display analysis of the gene *s3a* related to NPV resistance in *Bombyx mori* L [J]. Acta Entomologica Sinica. 48(3): 347-352.)
- 姚勤, 刘晓勇, 陈克平, 等. 2005. 家蚕抗核型多角体病毒病分子标记辅助育种[J]. 分子植物育种, 3(4): 537-542. (Yao Q, Liu X Y, Chen K P, et al. 2005. Molecular markers-assisted breeding for silkworm resistant variety to BmNPV [J]. Molecular Plant Breeding, 3(4): 537-542.)
- 张婷婷, 夏定国, 赵巧玲, 等. 2012. 家蚕脂肪酶基因 *Bmli-pase-1* 在不同 BmNPV 抗性水平家蚕品种间的表达差异[J]. 蚕业科学, 38(4): 665-672. (Zhang T T, Xia D G, Zhao Q L, et al. 2012. Differential expression of *bmlipase-1* gene in *Bombyx mori* varieties with different resistance levels against BmNPV [J]. Science of Sericulture, 38(4): 665-672. )
- Aratake. 1973. Differences in NPV resistance of different silkworm varieties [J]. Japanese Journal of sericulture, 42(3): 230-238.
- Cheng Y, Wang X Y, Du C, et al. 2014. Expression analysis of several antiviral related genes to BmNPV in different resistant strains of silkworm, *Bombyx mori* [J]. Journal of Insect Science, 14(76): 1-9.
- Funakoshi M, Aizawa K. 1989. Antiviral substance in the silkworm gut juice against a nuclear polyhedrosis-virus of the silkworm, *Bombyx mori* [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 53(1): 135-136.
- Nakazawa H, Tsuneishi E, Ponnuel K M, et al. 2004. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus [J]. Virology, 321(1): 54-62.
- Ponnuel K M, Nakazawa H, Furukawa S, et al. 2003. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus [J]. Journal of Virology, 77(19): 10725-10729.
- Selot R, Kumar V, Shukla S, et al. 2007. Identification of a soluble NADPH oxidoreductase (BmNOX) with antiviral activities in the gut juice of *Bombyx mori* [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 71(1): 200-205.
- Selot R, Kumar V, Sekhar S C, et al. 2010. Molecular characterization and expression analysis of BmNOX in two strains of *Bombyx mori* with contrasting viral resistance phenotype [J]. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 73(3): 163-175.
- Xu J P, Chen K P, Yao Q, et al. 2005. Identification and characterization of an NPV infection-related gene *Bmsop2* in *Bombyx mori* L [J]. Journal of Applied Entomology, 129(8): 425-431.
- Watanabe H. 1986. Resistance of the silkworm, *Bombyx mori*, to viral infection [J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 15: 131-139.

(责任编辑 崔学平)