

钱荷英,高丽,张月华,等. 分子标记技术检测家蚕品种抗 BmNPV 性能[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):41-43.

分子标记技术检测家蚕品种抗 BmNPV 性能

钱荷英,高丽,张月华,孙平江,徐安英

(江苏科技大学蚕业研究所,江苏镇江 212018)

摘要:通过经口添饲家蚕核型多角体病毒 BmNPV,比较家蚕新品种 871C、872C 及其杂交种和 871、872 及其杂交种对 BmNPV 抵抗性的强弱,结果表明,家蚕新品种具有很强的抗 BmNPV 性能。用分子标记技术对不同品种进行辅助选择,抗性品种 871C、872C 显示为阳性,而易感品种 871、872 显示为阴性;并在抗病品种中扩增出长度为 999 bp 的 DNA 片段,推测该分子片段与家蚕品种的抗 BmNPV 性能相关。

关键词:家蚕;BmNPV;抵抗力;分子标记

中图分类号:S884.5⁺1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)06-0041-03

家蚕核型多角体病毒病,俗称“血液型脓病”,是由于家蚕感染了家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)而引发的,是目前生产上主要的家蚕病害,对蚕茧生产造成了很大危害。自 1947 年 Bergold 分离纯化出家蚕脓病病毒^[1]以后,各国科学家对该病毒的结构、侵染方式和途径、遗传规律,以及针对该病毒提出的各种防病、抗病措施等进行了研究^[2-5],并取得了一定进展。从育种角度来说,培育对病原有强抵抗力的品种将是最有效、也是最环保低碳解决生产问题的途径。近年来,随着分子生物学技术的进步,各种分子标记的开发和利用在抗病育种中得到了很好的利用^[6-8]。

笔者从保存的家蚕种质资源中获得了一份抗病材料,经遗传分析所发现的抗病基因为显性主基因遗传模式^[9]。以春用蚕品种 871、872 和耐病主基因的载体品种为育种亲本,采用基因导入、杂交、回交、纯合固定等方法,导入耐病主基因获得蚕新品种,该品种于 2011 年通过四川省蚕品种审定委员会审定。

从已育成的抗性品种推广情况看,一般隔若干年后往往会因为基因漂流、新变异产生^[10]、地理环境的改变等原因造成品种的抗病能力降低。因此,每隔几年应该对品种的抗病性做测试,检验抗病能力是否下降,以便及时研究应对措施,防止因抗病基因的遗失给生产上带来消失。另外,用分子标记辅助育种的手段,从分子水平(DNA)上准确地追踪抗性基因或者与抗性基因连锁的 DNA 片段,则可以大大缩短育种年限,提高检测抗病性能的效率^[11]。

通过经口添毒的方法,比较抗病家蚕品种与原系统抗 BmNPV 能力,用分子标记技术开展抗病基因筛选,并用抗病基因(与抗病基因连锁的分子标记)检测家蚕品种的抗

BmNPV 能力,为培育优质、高产、具长久稳定抗 BmNPV 能力的实用新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 家蚕品种

供试的家蚕品种为 871、872、871 × 872、872 × 871、871C、872C、871C × 872C、872C × 871C(带 C 为抗 BmNPV 品种),均由中国农业科学院蚕业研究所品种资源室提供。

1.2 主要试剂及工具酶

蛋白酶 K、PCR 回收试剂盒、Taq DNA 聚合酶、PCR 配套缓冲液、4dNT 等购自 TaKaRa 公司, JM109 感受态细胞、*E. coli* 菌株等为上海生工生物工程公司产品。

1.3 引物合成

根据 GenBank 中已经公开的与家蚕 BmNPV 抗性基因连锁的 DNA 序列(A Y380833.1),用 Primer5.0 软件设计 1 对特异性引物 antiNPV - F(5' - TCACACAGTCAAAACCCGT - 3') 和 antiNPV - R(5' - TGTAGAAAATCCTCCCCT - 3')。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4 攻毒方法

采用经口添毒的方式,将 1×10^9 NPV 多角体/mL 浓度的病毒逐级稀释成 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 多角体/mL,共 5 个浓度梯度;871、872 及其杂交种(正反交)用 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 多角体/mL 这 4 种病毒浓度添毒,871C、872 C 及其杂交种用 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 多角体/mL 这 4 种病毒浓度添毒。取 2 龄蚕,分别数 30 头于二重皿中,然后将不同浓度的病毒液涂抹于直径为 2 cm 的桑叶上,每张叶片 50 μ L,稍干燥后每个试验区给桑叶 4 张(可在二重皿盖上平铺湿纸补湿)。24 h 后饲喂新鲜桑叶,每天 2 次,统计病蚕头数,用 SPSS 16 计算半致死浓度(LC₅₀),调查抗病品种及原系统品种的抗病性。

1.5 基因组 DNA 的提取

参照夏庆友等的方法^[12],取试验品种的家蚕蛾子头部放入加有家蚕基因组 DNA 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris - HCl, pH 值 8.0;0.1 mol/L EDTA, pH 值 8.0;0.5% SDS)的 EP 管中,用匀浆器研磨;55 $^{\circ}$ C 水浴 5 ~ 7 h 后用酚、氯仿抽提,再用无水乙醇沉淀 DNA;将样品 DNA 溶解在 0.1 \times TE(pH 值 8 ~

收稿日期:2012-11-09

基金项目:江苏省镇江市科技支撑计划(农业)(编号:NY2010026)。

作者简介:钱荷英(1971—),女,江苏溧阳人,硕士,副研究员,主要从事家蚕遗传育种研究。Tel:(0511)85616613;E-mail:qianheyin@123@163.com。

通信作者:徐安英,研究员,硕士生导师,主要从事家蚕种质资源与遗传育种研究。Tel:(0511)85616575;E-mail:cysxay@126.com。

10)中,并用分光光度计检测 DNA 浓度及纯度($D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间表示纯度较高);将 DNA 样品 -20 ℃ 保存。

1.6 PCR 扩增及序列分析

以 antiNPV - F 和 antiNPV - R 为引物,分别以 871、872、871C、872C 家蚕基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,49 ℃ 50 s,72 ℃ 70 s,35 个循环;72 ℃ 7 min。反应结束后,PCR 产物经电泳鉴定,通过胶回收纯化目的片段,然后将目的片段与 pMD18 - T 载体连接,将其转化 JM109 感受态细胞,进行测序验证。用 BCBI 的 Blast 对测序结果进行比对。

2 结果与分析

2.1 抗性品种与原系统品种抗 BmNPV 性能差异

由表 1 可见,2012 年,家蚕原系统 871、872 及其杂交种经口添饲 BmNPV 病毒后,871、872、871 × 872、872 × 871 的 LC_{50} 依次为 3.004×10^7 、 7.654×10^6 、 1.890×10^7 和 3.701×10^6 多角体/mL,871、872 杂交种和原种之间没有差异;抗病系 871C、872C × 871C 在整个添饲过程中没有 1 头死亡,872C、871C × 872C 则在高浓度病毒攻毒时发病率仅为 3.3%。

表 1 2012 年不同家蚕品种对 BmNPV 的抵抗力比较

品种名	病毒浓度 (多角体/mL)	平均发病率 (%)	LC_{50} (多角体/mL)
871	1×10^5	10.0	3.004×10^7
	1×10^6	16.7	
	1×10^7	56.7	
	1×10^8	93.3	
872	1×10^5	16.7	7.654×10^6
	1×10^6	26.7	
	1×10^7	60.0	
	1×10^8	100.0	
871 × 872	1×10^5	6.7	1.890×10^7
	1×10^6	13.3	
	1×10^7	20.0	
	1×10^8	86.7	
872 × 871	1×10^5	6.7	3.701×10^6
	1×10^6	13.3	
	1×10^7	70.0	
	1×10^8	100.0	
871C	1×10^6	0	
	1×10^7	0	
	1×10^8	0	
	1×10^9	0	
	1×10^9	0	
872C	1×10^6	0	
	1×10^7	0	
	1×10^8	3.3	
	1×10^9	3.3	
	1×10^9	0	
871C × 872C	1×10^6	0	
	1×10^7	0	
	1×10^8	0	
	1×10^9	3.3	
	1×10^9	0	
872C × 871C	1×10^6	0	
	1×10^7	0	
	1×10^8	0	
	1×10^9	0	

由于在各个浓度级攻毒时,抗病品种发病率等于(或接近)零,无法计算出 LC_{50} 来衡量 871C、872C 及其杂交种与 871、872 及其杂交种之间抗病力的倍数差异;但是,可以对照相同数量级病毒攻毒时,各品种的发病率来比较它们抗病力的强弱,抗病品种与原品种之间抗病力存在极显著差异,尤其是高浓度病毒攻毒时,抗病系几乎不受影响,而原品种全部发病。

对比表 1 和表 2 数据可见,抗病蚕品种 871C、872C 及其杂交种在用低浓度病毒($10^6 \sim 10^7$ 多角体/mL)攻毒时,表现出对 BmNPV 病毒的不感染性,而用高浓度病毒($10^8 \sim 10^9$ 多角体/mL)攻毒时,2008 年的死亡率呈上升趋势,达 40%,而 2012 年这些品种依然表现出不感染性。由此可见,871C、872C 及其杂交种对 BmNPV 的抵抗力没有随着推广年限的增加而减弱。

表 2 2008 年不同家蚕品种对 BmNPV 的抵抗力比较

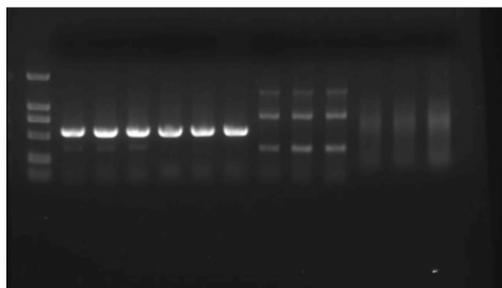
品种名	病毒浓度 (多角体/mL)	平均发病率 (%)	LC_{50} (多角体/mL)
871	1×10^5	28	2.782×10^5
	6×10^5	66	
	3.6×10^6	94	
	2.16×10^7	100.0	
	1.296×10^8	100.0	
872	1×10^5	11	2.7557×10^6
	6×10^5	25	
	3.6×10^6	49	
	2.16×10^7	77	
871 × 872	1.296×10^8	100.0	1.7346×10^5
	1×10^5	48	
	6×10^5	61	
872 × 871	3.6×10^6	75	1.3611×10^6
	2.16×10^7	92	
	1.296×10^8	98	
	1×10^5	16	
871C	6×10^5	35	1.0183×10^{10}
	3.6×10^6	66	
	2.16×10^7	85	
	1.296×10^8	98	
872C	1×10^6	0	8.108×10^9
	6×10^6	0	
	3.6×10^7	15	
	2.16×10^8	19	
	1.296×10^9	27	
871C × 872C	1×10^6	0	3.724×10^9
	6×10^6	0	
	3.6×10^7	0	
	2.16×10^8	2	
872C × 871C	2.16×10^8	2	1.8112×10^9
	1.296×10^9	22	
	1×10^6	0	
	6×10^6	0	
	3.6×10^7	0	
	2.16×10^8	7	
	1.296×10^9	40	

2.2 与 BmNPV 抗性基因连锁分子标记的筛选

以 antiNPV - F 和 antiNPV - R 为引物,分别以 871C、872C 及其原系统 871、872 的基因组 DNA 为模板,进行 PCR

扩增,结果(图1)表明,871C、872C扩增显示为阳性(第2~7泳道),871、872扩增显示为阴性(第8~13泳道),分子标记筛选的结果与实际添毒试验结果一致。871C和872C具有与BmNPV抗性基因连锁的分子片段,这2个品种在添毒试验中也表现了很强的抗BmNPV能力,而871和872中不能扩增出与BmNPV抗性基因连锁的分子片段,对BmNPV易感。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13



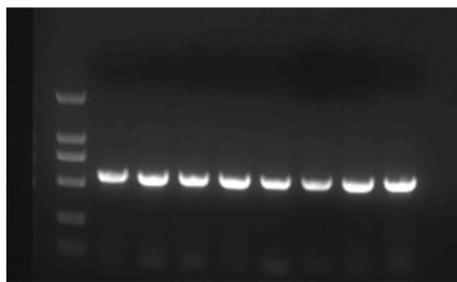
1—marker; 2~4—871C; 5~7—872C; 8~9—871; 11~13—872

图1 不同品种BmNPV抗性基因分子标记的扩增结果

2.3 序列分析

用1对特异性引物 antiNPV-F 和 antiNPV-R 扩增871C和872C品种中的抗性片段,将其和 pMD18-T 载体相连接,转化至 JM109 感受态细胞,然后挑斑、摇菌,菌液 PCR(引物为 M13)的结果如图2所示,最后进行测序。测定序列长度为 999 bp,与 AY380833 中对应序列的同源性为 99.90%,仅有 1 个不同碱基:AY380833 序列 611(C)位点上对应的序列是 508(T),与 AY380834 中对应序列的同源性为 100%。

1 2 3 4 5 6 7 8 9



1—marker; 2~5—871C; 6~9—872C

图2 871C和872C菌液PCR扩增结果

3 小结与讨论

家蚕对 BmNPV 的抵抗力因品种不同呈现显著性差异^[13]。通过适当的方法,将抗性基因导入实用品种,可快速育成对 BmNPV 具有高抗性的家蚕品种,并且,经过多年饲养后,其抗性依然保持不变。2012 年的试验结果表明,不管是原系统还是抗病系对 BmNPV 的抵抗力都比 2008 年增强了,

推测可能是由于所用病毒保存期稍长,致使其致病力降低的缘故。

结合已报道的 BmNPV 抗性基因连锁分子标记 (AY380833),利用分子标记技术,检测了实用品种 871、872 及其抗病系 871C、872C 中与 BmNPV 抗性相关的基因,结果表明,该分子标记 (AY380833) 在不同品种间表现出差异,并且与 BmNPV 的抗性紧密相关,即添毒病毒后易感的品种检测结果为阴性,具有高抗的品种 871C、872C 检测结果显示阳性。871C、872C 之所以具有很强的抗 BmNPV 能力,是由于导入了抗病主效基因,这与笔者以前的研究结果^[9]吻合。通过检测品种是否含有与主效基因连锁这一 DNA 片段来判断该品种对 BmNPV 的抵抗力强弱,与曹锦如等的研究结果^[11]不太相同,这可能是家蚕 BmNPV 抗性遗传相对复杂,所用研究材料不同造成的。

参考文献:

- [1] 吕鸿声. 昆虫病毒分子生物学[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,1998:149-151.
- [2] 荒武义信. 家蚕不同品种抗 NPV 性能的差异[J]. 日本蚕丝学杂志,1973,42(4):279-284.
- [3] 孟智启. 家蚕对核型多角体病的抗性遗传规律的研究[J]. 蚕业科学,1982,8(3):133-138.
- [4] 陈克平,林昌麒,姚勤. 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,1996,22(3):160-164.
- [5] Khurad A M, Mahuliker A, Rathod M K, et al. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L. [J]. Journal Invertebrate Pathology, 2004, 87(1): 8-15
- [6] 李木旺,侯成香,姚琴,等. 家蚕核型多角体病毒及抗性育种[J]. 江苏蚕业,2002(2):1-4.
- [7] Chen K P, Yao Q, Wang Y, et al. Genetic basis of screening of molecular markers for nuclear polyhedrosis virus resistance in *Bombyx mori* L. [J]. Int J Indust Entomol, 2003, 7: 5-10
- [8] 刘晓勇,姚琴,陈克平. 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,2004,25(1):17-20.
- [9] 钱荷英,徐安英,林昌麒,等. 家蚕对核型多角体病毒病抵抗力及遗传规律的研究[J]. 河北农业大学学报,2006,29(4):77-79.
- [10] 李振岐. 我国小麦品种抗条锈性丧失原因及其控制策略[J]. 大自然探索,1998,17(66):21-24.
- [11] 曹锦如,周文林,翁宏飏,等. 家蚕抗核型多角体病毒病分子标记辅助新品种选育研究[J]. 蚕桑通报,2008,39(3):19-22.
- [12] 夏庆友,周泽扬,鲁成,等. 家蚕 RAPD 的扩增条件、重复性及遗传模型研究[J]. 蚕业科学,1996,22(1):20-25.
- [13] 陈克平,林昌麒,吴冬秀,等. 家蚕保存种对核型多角体病的抗性[J]. 蚕业科学,1991,17(1):45-46.