



家蚕 CVDAR 品系对 BmNPV 的抗性特征分析

秦琪¹, 董战旗¹, 雷雪蛟¹, 曹明亚¹, 唐亮², 石美宁², 潘敏慧^{1*}

¹西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716

²广西壮族自治区蚕业技术推广总站, 广西 南宁 530007

摘要: 【目的】家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus, BmNPV)促使的血液型脓病是一种产业上非常严重的家蚕疾病, 目前有效的防控方法较少。本研究以大造和 CVDAR 家蚕品系(对 BmNPV 有较强抗性的品系)为试验材料, 通过分析 CVDAR 对 BmNPV 抗性特征, 以期确定 CVDAR 对 BmNPV 的抗性机制。【方法】本研究通过半致死剂量分析, 发现 CVDAR 品系比大造品系对 BmNPV 感染的半致死剂量提高 10 倍以上; 进一步 HE 染色分析大造与 CVDAR 品系病毒感染前后的中肠组织的变化, 具体解析抗性品系 CVDAR 的抗 BmNPV 机制。【结果】感染 BmNPV 72 h 后, 大造中肠细胞细胞核明显膨大, 着色变浅, 到 96 h 后, 细胞核持续增大有脱落趋势; 而 CVDAR 抗性品系只在感染 96 h 后有中肠部分细胞核膨大, 但排列整齐; 同时通过荧光定量分析大造与 CVDAR 品系病毒感染后的增殖情况, 结合各个时期代表病毒基因的转录水平分析比较发现, 感染 BmNPV 后 0–12 h 也没有发现抗性品系 CVDAR 和大造之间的病毒拷贝数以及病毒基因转录水平的不同, 但感染 24 h 后发现抗性品系 CVDAR 无论是病毒拷贝数还是病毒基因的转录表达水平都明显低于对照大造。【结论】证明 CVDAR 口服添毒后中肠中病毒基因的转录在第一轮复制期间不受影响, 之后转录水平降低。鉴定 CVDAR 品系抑制 BmNPV 增殖的关键时期是在感染 BmNPV 后的 24 h, 为解析抗性机制奠定基础。

关键词: 家蚕, 家蚕核型多角体病毒, CVDAR, 抗病毒

杆状病毒(Baculovirus)是现今昆虫病毒中所属的类群最大并且具有很大实用意义的一种杆状、有囊膜的双链 DNA 病毒^[1], 是节肢动物病原体且主要寄生于鳞翅目昆虫体内^[2]。它囊括核型多

角体病毒(nucleopolyhedrovirus, NPV)以及颗粒病毒(granulovirus, GV)科^[3]两类。由家蚕核型多角体病毒(BmNPV)造成的脓病在蚕业生产上是最常见的严重蚕病之一, 目前仍没有有效的防控方法。

基金项目: 国家自然科学基金(31872427); 国家蚕桑产业技术体系(CARS-18)

*通信作者。E-mail: pmh047@126.com

收稿日期: 2019-02-03; 修回日期: 2019-05-13; 网络出版日期: 2019-07-11

家蚕(*Bombyx mori*)是一种寡食性泌丝昆虫,蚕桑产业既是丝绸之路的文化载体,也是中国农业的重要组成部分。迄今为止出现的家蚕品系很多,而各个品系之间的抗病能力和经济性状等特征也不尽相同。而从上个世纪开始就不断有学者通过实验发现不同的家蚕品系对感染 BmNPV 存在抗性差异,但未发现有完全不感染的家蚕品系^[4-6]。1982 年,孟智启使用浓度-死亡率机率曲线法,确定了家蚕对 BmNPV 经口感染的抗性遗传规律方式,由一对主效显性基因和若干微效基因控制^[4]。随后朱勇等^[5]使用机率分析法分析鉴定了多个家蚕品系抗病能力;之后陈克平等对 344 个家蚕保存种进行 BmNPV 抗性实验^[6],发现仅有 4.9%的家蚕抗性品系,有 41.6%家蚕较抗品系,剩余 53.5%都是感性和较感性家蚕品系。

尽管经过很多蚕业学者的努力已经鉴定出来部分抗 BmNPV 能力的家蚕品种,并且近年来也不断有新的家蚕抗性品系被筛选出来,比如张远能^[7]研究多个代表性家蚕品系对多种家蚕蚕病的抗病力,得到其中 5 种家蚕品系有较强的抗病能力;陈克平等发现的家蚕品系 NB^[6];中国蚕业研究所选育的家蚕品系 871C×872C,又称“华康一号”^[8]等。近年来多位学者专家集中探求家蚕的抗病基因^[9-12]、解析抗性机制^[13-15]、培育家蚕抗性品种^[16-18],虽然在一些领域取得了一定进展,但关于家蚕抗性品系抗 BmNPV 的主效基因以及作用机制仍不清楚。

抗性育种作为防控 BmNPV 的有效方式,也是产业发展的急需解决的重要问题。而随着分子生物学技术的出现使得通过采用分子标记定位出调控家蚕抗 BmNPV 的基因这一想法得到可能。随着当前大数据时代来临,研究分析家蚕高抗和敏感品系

的基因组、转录组^[19-24]和蛋白质组等数据^[13]对剖析家蚕抗病毒机理提供便利。本研究中所用的抗性品系 CVDAR 是由费美华等筛选出来的^[25]。利用对 BmNPV 有抗性的 CVDAR 以及大造为材料,经口添食 BmNPV 后鉴定它们对 BmNPV 抗性差异,结合中肠石蜡切片、HE 染色和定量 PCR 技术,观察了两种家蚕品系感染 BmNPV 后中肠病理学变化和中肠中 BmNPV 增殖复制情况。通过分析 CVDAR、大造在感染 BmNPV 后中肠中病毒基因的转录水平,初步探索家蚕抗性品系 CVDAR 抗 BmNPV 机制,鉴定在对 BmNPV 侵染和增殖起关键作用的相关基因,以期为家蚕抗 BmNPV 研究提供基础依据,从而剖析更深一层家蚕抗性品系应对抵抗病毒侵染的机制。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

家蚕 CVDAR 和大造(P50)蚕卵由本实验室提供。BmNPV 病毒株的多角体和家蚕卵巢培养细胞(BmN-SWU1)由本实验室保存。

切片石蜡(54-56 °C, 56-58 °C)购自重庆化学试剂厂;苏木素伊红(HE)染色液试剂盒购自碧云天(Beyotime);卡尔诺氏固定液(100%酒精:冰醋酸:氯仿=6:1:3)。全基因组/RNA 提取试剂盒/反转录试剂盒均购自宝日生公司。

1.2 家蚕品系的死亡率和半致死剂量测定

挑选叶面平整的新鲜桑叶剪裁成 1 cm×1 cm,定量添加不同梯度的病毒悬液(10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 PIBs/mL)以便每头蚕添食的病毒粒子相同,阴性对照桑叶上添食相同体积的水,选择每组 30 头个体体型相似的健康 CVDAR 和大造四龄起蚕,

待桑叶表面风干后进行单头蚕喂食,挑取完全吃完桑叶的家蚕进行正常饲养,统计喂食 4 d 后的连续 6 d 内的死亡率。利用 SPSS 软件计算半致死剂量。

1.3 家蚕幼虫中肠材料准备

吸取少量 10^9 PIBs/mL 的新鲜 BmNPV 悬液涂于桑叶背面,对照组使用双蒸水,桑叶风干后喂食 4 龄起家蚕,挑取完全吃完桑叶的家蚕进行正常饲养。

从家蚕吃完抹有病毒的桑叶后开始计时,分别在 6、12、24、48、72、96 hours post infection (h p.i.) 6 个时间点取 5–6 头家蚕的中肠。用于解剖的一系列工具要经过酒精消毒以及高温灭菌,用解剖针固定家蚕头和尾,用解剖针轻轻划破家蚕表皮,镊子将表皮向四周展开并用解剖针固定好,将干净的中肠组织取出,放置于置有 3 倍体积以上的标记好的固定液中保存,固定 1 d,用 70%乙醇换洗到没有其他杂质,最后放于包埋盒中保存于 70%乙醇中 -4°C 。

1.4 中肠石蜡切片制备与染色

将包埋盒进行脱水、透明、浸蜡、包埋以及切片等一系列的操作后,做好标记(名称,切片厚度,日期)置于展片板在 37°C 烘箱过夜或 60°C 烘烤 2 h。

将蜡片经过脱蜡、水化后进行染色,其中苏木精染细胞核,伊红染细胞质,染色后进行脱水和透明,镜检检查染色情况是否合格,最后封片,干燥后可以显微观察。

1.5 中肠组织全基因组和 RNA 的抽提、反转录

取灭菌后预冷过的干净研钵,依次加入中肠和液氮,进行研磨成细粉状即可(以防 RNA 酶污

染样品),收集到 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中。提取中肠组织的基因组和 RNA。提取基因组 DNA 步骤为:加 600 μL 核酸裂解液,剧烈振荡直到离心管内为流动液体;加 200 μL 蛋白质纯化液,振荡 20 s,置于冰上 5 min, 13400 r/min 离心 10 min;吸取上清到加有 600 μL 室温异丙醇的离心管中,轻轻颠倒混匀,出现白色线性 DNA, 13400 r/min 离心 5 min;弃上清后加 600 μL 70%乙醇,轻轻颠倒, 13400 r/min 离心 5 min,吸去上清;风干酒精后加入 30 μL DNA 再分化液 65°C 1 h,测浓度,根据所测浓度加水稀释至浓度为 100 ng/ μL 。

提取 RNA 步骤为:加 600 μL RNA solo regant,剧烈振荡直到离心管内为流动液体, 13400 r/min 离心 10 min;取上清加到有 200 μL 氯仿的离心管内,剧烈振荡后冰浴 10 min 再 13400 r/min 离心 10 min;取最上层液体加到有 2 倍体积的无水乙醇的离心管中混匀,转入吸附柱,室温 8000 r/min 离心 1 min,弃废液;加 400 μL Buffer1,静置 3 min, 8000 r/min 离心 1 min,弃废液;重复 1 次;加 300 μL Buffer11,静置 3 min, 8000 r/min 离心 1 min,弃废液;重复 1 次后,空离,静置风干酒精 5 min,加 DEPC 水 35 μL 后静置 5 min, 13400 r/min 离心 3 min,测浓度。

测的浓度的 RNA 进行合成 cDNA,步骤如下:稀释 RNA 浓度到 1000 ng/ μL ;样品 1 μL , ddH₂O 6 μL , 1 μL 试剂 I, 2 μL 试剂 II, 42°C 热激 2 min;加入 1 μL 试剂 3, 4 μL 试剂 4, 4 μL 试剂 5, 1 μL ddH₂O, 根据 37°C 30 min、 85°C 5 s、 12°C 保持体系合成 cDNA。而合成的 cDNA 模板的检测是以家蚕肌动蛋白基因 *actin3* 为内参基因,引物序列见表 1。反应体系(15 μL)如下: 1.5 μL 10 \times rTaq

表 1. 本试验所用引物

Table 1. Primers used in this study

Gene	Primer	Sequence (5'→3')
<i>ie-1</i>	Forward	CGAGACGGCTGCACAAAA
	Reverse	TGCCCAAAGAAACCCACA
<i>dnapol</i>	Forward	GCCGATTTGCGTTTTTTGCC
	Reverse	GATTGCCATTTGTGCTTGTT
<i>vp39</i>	Forward	AGACACCACAAACCCGAACAC
	Reverse	TTGATCGCCAACACCACCT
<i>gp64</i>	Forward	CACCATCGTGGAGACGGACTAC
	Reverse	ACCTCGCACTGCTGCCTGA
<i>gp41</i>	Forward	ATGTTGATGTGCGGAAAGC
	Reverse	GTGGCGGAATCGGTGA
<i>actin3</i>	Forward	AACACCCCGTCCTGCTCACTG
	Reverse	GGGCGAGACGTGTGATTTCCT
<i>sw22934</i>	Forward	TTCGTA CTGGCTCTTCTCGT
	Reverse	CAAAGTTGATAGCAATTCCT

buffer (含 Mg^{2+}), 1.5 μ L dNTPs, 0.6 μ L *rTaq* 酶, 1 μ L cDNA 模板, 0.3 μ L Actin3-F/R, 双蒸水加至 15 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 12 $^{\circ}$ C 保持。反转出来的 cDNA 吸出 5–10 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 RT-PCR 检测家蚕品系的病毒增殖变化

以 BmNPV 病毒感染的相同浓度的中肠基因组

DNA 为模板, 进行 PCR 扩增检测病毒的拷贝数, 引物序列见表 1。反应体系为: 5 μ L SYBR, 5 μ L DEPC 水, 上下游引物均为 0.3 μ L, 模板 0.6 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 以上进行 40 个循环; 延伸 95 $^{\circ}$ C 10 s, 退火 15 s。

2 结果和分析

2.1 家蚕品系 CVDAR 对 BmNPV 的抗性检测

基于确定家蚕抗性品系 CVDAR 和家蚕大造品系之间的抗性差异, 本研究通过观察两种家蚕品系经口添食 BmNPV 后期的不同发病症状和发病程度, 结果表明了 CVDAR 家蚕品系经口添食含 BmNPV 的桑叶 72 h 后, 与正常对照家蚕的外形差异不明显; 而在 84 h p.i 发现家蚕体色乳白, 环节肿胀, 狂躁爬行; 在 120 h p.i 体壁破裂, 流脓而死, 尸体快速腐败, 镜检脓汁发现有大量病毒多角体存在。

对 CVDAR、大造品系经口添食 BmNPV 后, 观察到大造的发病高峰期是 5–6 d, CVDAR 的发病高峰期均推迟 1–2 d, 是在感染后 6–7 d (图 1)。

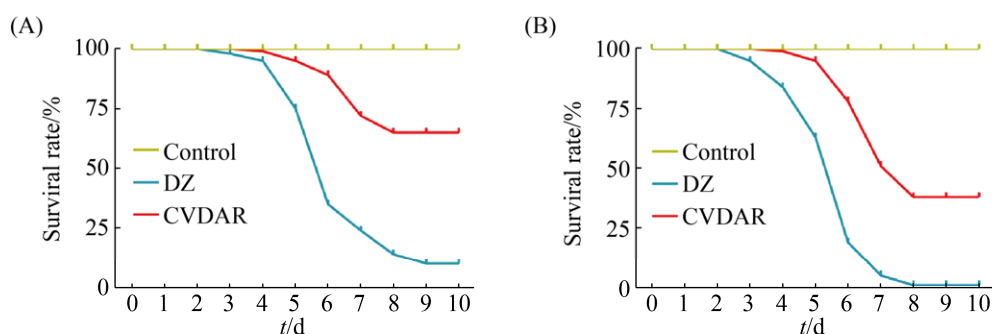


图 1. 添食不同浓度病毒后 CVDAR 品系、大造家蚕存活率

Figure 1. The survival rate of CVDAR and DaZao were obtained after feeding with different concentrations of virus. A: Survival curve of Fourth-instar of *Bombyx mori* by oral administration of 1×10^5 PIBs/mL virus particles; B: Survival curve of Fourth-instar of *Bombyx mori* by oral administration of 1×10^6 PIBs/mL virus particles. Control stands for the DaZao of viruses that have not been added.

统计经口添食不同病毒浓度后家蚕的死亡率(图2)。病毒浓度 1×10^8 PIBs/mL, CVDAR 的死亡率在 80% 以上; 浓度 1×10^7 PIBs/mL, CVDAR 的死亡率在 56% 以上; 浓度 1×10^6 PIBs/mL, CVDAR 的死亡率在 33% 以上, 此时大造的死亡率达到了 85% 以上; 浓度 1×10^5 PIBs/mL, 大造的死亡率在 77% 以上; 而浓度为 1×10^4 PIBs/mL, 大造的死亡率是 42% 以上。

利用 SPSS 软件得出 CVDAR、大造品系感染 BmNPV 后半致死剂量 LD_{50} (图2)。发现 CVDAR 的 LD_{50} 为 1.8×10^6 , 相比大造高出一个数量级。综上所述结果表明, CVDAR 品系经口添食 BmNPV 后的抗性水平高于对照品系大造。

2.2 家蚕感染 BmNPV 后中肠组织的病理学观察

基于之前中肠对 BmNPV 的抑制作用的研究, 为了探究中肠组织作为家蚕防御病毒屏障的一系列的生理特点。本研究制作感染 BmNPV 后 CVDAR、大造的中肠切片, 观察中肠的病理变化(图3)。无 BmNPV 的中肠切片图(图3-A, G)显示上皮细胞层排列完整且有秩序, 细胞外观形态光滑饱满, 其中形态大多为圆筒形以及杯状, 内面

的围食膜为一层厚薄均匀、表面光滑有弹性的丝状薄膜。相比 CVDAR 的围食膜, 大造的围食膜更单一紧实。观察病毒感染 12 h 和 24 h (图3-B, C, H, I)后, 两个品系的中肠细胞的形状和细胞核的大小无明显差异。CVDAR、大造品系在感染 48 h 后(图3-D, J), 发现上皮细胞分泌物增多, 但形态大小没有明显变化。病毒感染 72 h 后(图3-E, K), 两个品系的围食膜变薄并十分松散。大造上皮细胞大小缩减, 细胞核体积增大且着色变浅,

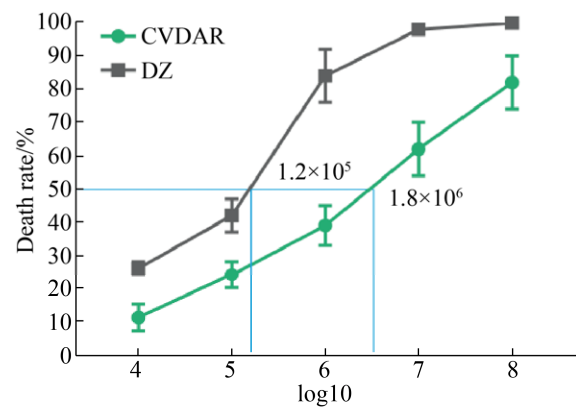


图2. 经口添食不同病毒浓度后家蚕的死亡率

Figure 2. Death rate of silkworm after oral feeding with different virus concentrations. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$.

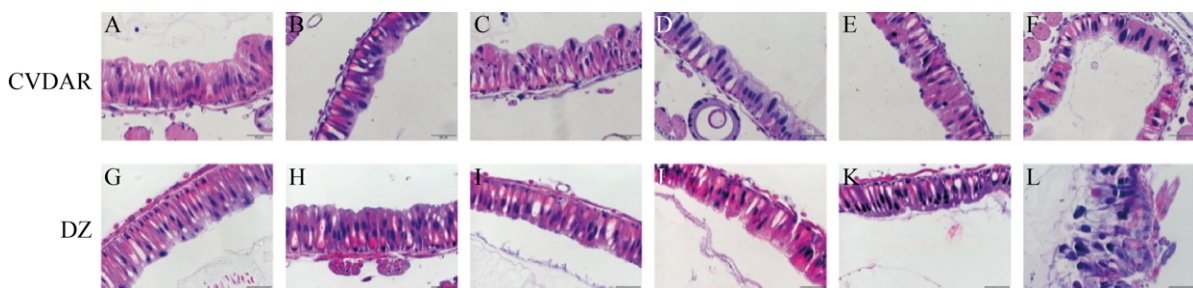


图3. BmNPV 感染后家蚕品系 CVDAR、大造中肠组织切片观察(400 倍)

Figure 3. Histological section of midgut after Fourth-instar silkworm CVDAR and BmNPV infection (400 \times). A, G were midgut tissue section of the Fourth-instar of CVDAR and DaZao; B, C, D, E, F were the midgut sections of CVDAR at the fourth age of 12, 24, 48, 72, and 96 h p.i, respectively; H, I, J, K, L were the midgut sections of DaZao at the fourth age of 12, 24, 48, 72 and 96 h p.i, respectively.

并迁向肠腔一边。CVDAR 上皮细胞形态较整齐, 出现少量红色颗粒。而感染 96 h (图 3-F, L)后, CVDAR、大造品系的上皮细胞形状均观察到显著异常。其中作为对照的大造上皮细胞层中柱状细胞形态杂乱, 细胞核一直膨胀而且也出现了一部分有脱落趋向细胞核, 剩余部分几乎没有细胞质。CVDAR 上皮细胞形态对比大造而言相对整齐, 只有一些柱状细胞核增大, 另外一些细胞里面有较多红色颗粒物。

2.3 经口添食的家蚕中肠组织 BmNPV 复制增殖差异

由于家蚕中肠上皮是病毒经口感染遇到的第一个组织, 为了进一步分析家蚕抗性品系 CVDAR 和对照大造品系的抗性, 分析在经口添食条件下家蚕 CVDAR 的中肠组织对 BmNPV 的作用。本试验模板为经口添食 BmNPV 后的大造和 CVDAR 品系的中肠材料, 根据实验设计定量引物(表 1) *gp41* 进行实时荧光定量 PCR, 从而检测中肠中 BmNPV 病毒的拷贝数(图 4)。

经口添食 BmNPV 的 6 h 后, 发现 CVDAR、大造的中肠病毒拷贝数差异不明显, 表明抗性品系 CVDAR 抗 BmNPV 作用不体现在抵制病毒入侵方面; 大造中肠的病毒拷贝数在 12 h 和 24 h p.i. 上升, CVDAR 抗性品系相较于大造是缓慢增殖, 说明 CVDAR 在添毒 12 h 和 24 h p.i 时病毒在中肠的复制受到遏制; 抗性品系中肠的病毒拷贝数在 48 h p.i 明显低于大造; 而在之后的 72 和 96 h p.i 仍呈现此趋势。由此可知, 经口添食 BmNPV 后, 抗性品系 CVDAR 的中肠对病毒增殖的抑制时期和病毒早期 DNA 第一轮复制时期无关, 是在病毒第一轮复制增殖后的时期即 24–48 h p.i.

2.4 经口感染 BmNPV 后病毒基因在中肠中的转录水平

为了确定在经口感染病毒后在中肠中被遏制的主要病毒基因, 本研究选择多个病毒基因作为检测的目标基因, 利用 RT-PCR 方法检测中肠中不同时期病毒基因的转录水平。下图中各基因的定量引物见表 1。

经口添毒后检测中肠中不同时期的病毒基因的转录水平, 发现在添毒 24 h p.i, 抗性品系 CVDAR 中肠病毒基因的转录水平达到最高值, 而在 48 h p.i 有一个降低趋势(图 5)。

结合之前对中肠拷贝数分析, CVDAR 中肠中病毒在 48 h p.i 前被抑制, 而在 24 h p.i 病毒基因的转录水平达到最高值, 说明在经口添毒后在第一轮病毒复制期间, CVDAR 中肠中的各个不同时期病毒基因的转录水平没有受到影响, 而在之后这些基因的转录水平降低。

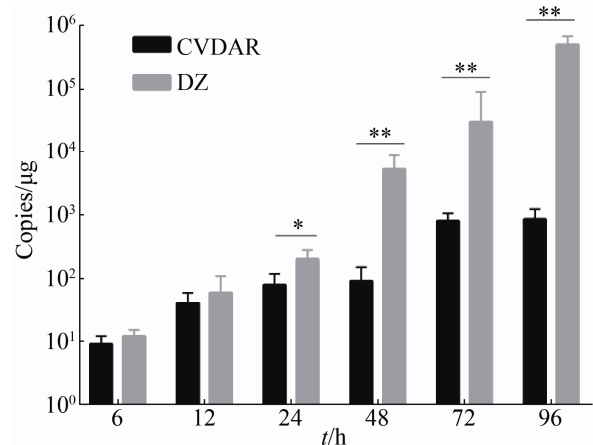


图 4. 经口添食 BmNPV 后家蚕品系中肠组织拷贝数情况

Figure 4. Expression of virus in the midgut of *Bombyx mori* after oral infection with NPV. The error line represents the criterion deflection; *: express extremely significant, $P < 0.05$; **: express extremely significant, $P < 0.01$.

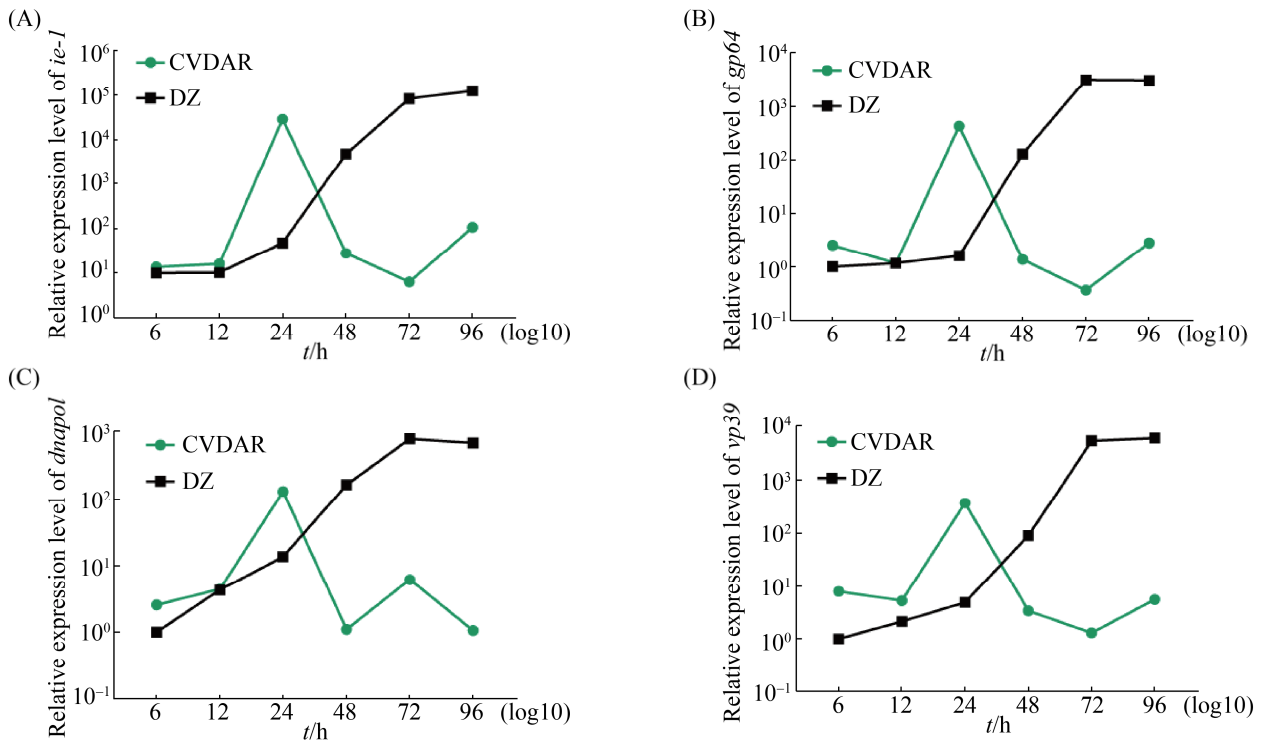


图 5. 经口感染 BmNPV 后家蚕中肠中病毒基因持续表达情况

Figure 5. Persistent expression of virus genes in midgut of silkworm after oral infection with BmNPV. *ie-1* is a very early viral gene; early viral gene *gp64*; DNA polymerase gene *dnapol*; late gene *vp39* is the capsid protein. The error bars indicate the standard deviations; *: express extremely significant, $P < 0.05$; **: express extremely significant, $P < 0.01$.

3 讨论

从古至今, 种桑养蚕, 缫丝织绸, 不但解决了人们的穿衣问题, 还推进了对外贸易, 开拓了丝绸之路。而由病毒病引发的蚕病是威胁蚕桑产业发展的重要危害, 每年因病毒性疾病所造成的蚕病损失, 约占总蚕病损失的 70%–80%, 而 BmNPV 病是危害蚕业生产最严重的一种病毒病, 生产上常有暴发。而生产上对 BmNPV 的防控只能基于对外界养蚕环境和工具进行及时消毒, 但这种方式可以减小 BmNPV 感染几率, 没有在根源上控制其发生, 一旦暴发仍旧很难抑制。

培育抗性品系的现有方式主要有遗传育种

和传统育种, 随着现代科技的进步, 蚕桑生产上也朝着省力化、轻简化的方向进行, 从而对培育的家蚕品系 NPV 抵抗力也提出更高的要求, 而利用分子育种技术来增强家蚕抗病力也成为重点。先前利用家蚕核型多角体病毒高抗品系和高感品系及其近等基因系成功获得了与家蚕抗 NPV 相关的分子标记, 比如刘晓勇等^[26], 李木旺等^[27], 姚勤等^[15]。本研究获得的 CVDAR 抗性品系是利用这种方法筛选获得, 费美华等^[25]通过多年的实验, 选育出一种 CVDAR 家蚕抗 NPV 品系, 结果发现以它为亲本材料进行杂交后, 检测后代对 NPV 抵抗力指标 LD₅₀, 比家蚕常规生产品系高 5–6 个数量级。近年学者研究员利用人工转基

因技术不受生物体间亲缘关系限制的优点, 筛选得到品种良好的新抗性品系^[28]。家蚕转基因育种一般分两种方式, 一种是依靠 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)、CRISPR/Cas9 基因编辑技术抑制病毒复制基因阻止其表达, 进而可以增强家蚕抗病毒能力。另一种是利用转基因技术将已经鉴定到的抗病基因导入蚕体内, 得到具备抵抗性的家蚕, 然后使用常规育种方法选育抗病品种。近年来涌现出很多涉及家蚕方面对 BmNPV 抗性的实验研究, 期望解析出家蚕对 BmNPV 的抗性遗传规律, 进而选育出抗 BmNPV 的家蚕品系以便投入生产使用。

当前围绕抗 NPV 的家蚕研究的重心大都放在家蚕抗 NPV 过程中宿主和病毒基因的响应应答以及发挥的功能上^[29-31], 关于家蚕抗 BmNPV 品系对 BmNPV 作用机制仍未有突破性进展。本研究围绕抗 BmNPV 家蚕品系在感染 NPV 后的抗性特征, 以期解析抗性品系抗 BmNPV 的关键作用。首先对大造、CVDAR 喂食不同梯度浓度的 BmNPV, 统计家蚕的个体死亡率和半致死剂量, 证实 CVDAR 家蚕品系对 BmNPV 的抗性。进而通过制作正常家蚕中肠和大造、CVDAR 品系病变后中肠石蜡切片以及利用荧光定量 PCR 方法检测大造、CVDAR 中肠中多个病毒基因复制情况, 发现两种品系病毒基因转录水平在感染早期基本一致, 说明在抵抗病毒的入侵方面, CVDAR 和对照大造并无差异。而侵染 24 h 后, 抗性品系 CVDAR 在中肠中的病毒基因转录水平达到最高; 在侵染 48-96 h 后, CVDAR 品系中肠中的病毒基因转录水平都明显低于大造, 说明 CVDAR 在经口添毒后中肠中病毒基因的转录在第一轮复制期间没有受到影响。

4 结论

通过检测大造、CVDAR 家蚕品系对 BmNPV 的半致死剂量确定了品系 CVDAR 属于高抗品系, 进一步利用荧光定量 PCR 技术检测病毒初次感染中肠后病毒基因的表达情况发现在经口添毒后 CVDAR 中肠中病毒基因的转录在第一轮复制期间没有受到影响, 为解析抗性机制奠定基础。

参考文献

- [1] Meng QF, Liu XY. Research progress in the interactions of baculoviruses with host insects. *Acta Entomologica Sinica*, 2013, 56(8): 925-933. (in Chinese)
孟庆峰, 刘晓勇. 杆状病毒与昆虫宿主相互作用的研究进展. *昆虫学报*, 2013, 56(8): 925-933.
- [2] Gao JM, Peng JX, Hong HZ. The genomic structure and characteristics of baculovirus. *Microbiology China*, 2003, 30(4): 99-103. (in Chinese)
高建明, 彭建新, 洪华珠. 杆状病毒基因组结构及其特征. *微生物学通报*, 2003, 30(4): 99-103.
- [3] Luo J, Zhou GY, Zhu JY. Progress in nuclear polyhedrosis virus genomics. *Forest Research*, 2014, 27(4): 551-556. (in Chinese)
罗辑, 周国英, 朱积余. 核型多角体病毒基因组学研究进展. *林业科学研究*, 2014, 27(4): 551-556.
- [4] Meng ZQ. Study on resistance of silkworm to nuclear polyhedral virus disease. *Acta Sericologica Sinica*, 1982, 8(3): 133-138. (in Chinese)
孟智启. 家蚕对核型多角体病毒病抗性遗传规律的研究. *蚕业科学*, 1982, 8(3): 133-138.
- [5] Zhu Y, Lu C, Chen P, Yu GL, Zeng HM, Ran XZ, Zhao BM. Genetic studies on the resistance to npv in silkworm (*Bombyx mori* L.). *Journal of Southwest Agricultural University*, 1998, 20(2): 100-103. (in Chinese)
朱勇, 鲁成, 陈萍, 余贵玲, 曾华明, 冉小曾, 赵邦美. 家蚕对核型多角体病毒(NPV)抗性的遗传学研究. *西南农业大学学报*, 1998, 20(2): 100-103.
- [6] Chen KP, Lin CQ, Yao Q. Resistance of silkworm conservation species to nuclear polyhedral disease. *Acta*

- Sericologica Sinica*, 1991, 17(1): 45–46. (in Chinese)
陈克平, 林昌麒, 姚琴. 家蚕保存种对核型多角体病的抗性. *蚕业科学*, 1991, 17(1): 45–46.
- [7] Zhang YN, Liu SX, Huo YM, Ou SR. Identification of resistance of several Silkworm varieties to six major Silkworm diseases. *Acta Sericologica Sinica*, 1982, 8(2): 94–97. (in Chinese)
张远能, 刘仕贤, 霍用梅, 欧少容. 若干家蚕品种对六种主要蚕病的抗性鉴定. *蚕业科学*, 1982, 8(2): 94–97.
- [8] Li WX, Qing XG, Liu JF, Liu G, Xiao JS, Xu AY. Appraisal study on *Bombyx mori* breed '871C×872C' Resistance to BmNPV. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24(2): 779–781. (in Chinese)
李文学, 青学刚, 刘俊凤, 刘刚, 肖金树, 徐安英. 家蚕品种 871C×872C 对 BmNPV 抗性鉴定研究. *西南农业学报*, 2011, 24(2): 779–781.
- [9] Gomi S, Majima K, Maeda S. Sequence analysis of the genome of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 1999, 80(5): 1323–1337.
- [10] Okano K, Shimada T, Mita K, Maeda S. Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in BmNpv-infected BmN cells. *Virology*, 2001, 282(2): 348–356.
- [11] Ishikawa H, Ogasawara T, Ikeda M, Kobayashi M. A recombinant *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus possessing *hrf-1* gene replicates in nonpermissive *Lymantria dispar* IPLB-Ld652Y cell line. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 2006, 75(1): 31–38.
- [12] Chen CJ, Quentin ME, Brennan LA, Kukul C, Thiem SM. *Lymantria dispar* nucleopolyhedrovirus *hrf-1* expands the larval host range of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 1998, 72(3): 2526–2531.
- [13] 刘晓勇. 家蚕核型多角体病毒与家蚕抗病毒相关的蛋白质组分析. 江苏大学博士学位论文, 2009.
- [14] Cao JR, Zhou WL, Weng HB, Ye AH, Wang YQ. Molecular markers-assisted breeding for silkworm resistant variety to BmNPV. *Bulletin of Sericulture*, 2008, 39(3): 19–22. (in Chinese)
曹锦如, 周文林, 翁宏飏, 叶爱红, 王永强. 家蚕抗核型多角体病毒病分子标记辅助新品种选育研究. *蚕桑通报*, 2008, 39(3): 19–22.
- [15] Yao Q, Liu XY, Tang XD, Chen KP. Molecular markers-assisted breeding for silkworm resistant variety to BmNPV. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(4): 537–542. (in Chinese)
姚勤, 刘晓勇, 唐旭东, 陈克平. 家蚕抗核型多角体病毒病分子标记辅助育种. *分子植物育种*, 2005, 3(4): 537–542.
- [16] Chen SQ, Hou CX, Bi HL, Wang YQ, Xu J, Li MW, James AA, Huang YP, Tan AJ. Transgenic clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9-mediated viral gene targeting for antiviral therapy of *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of Virology*, 2017, 91(8): e02465-16.
- [17] Zhang F, Chen X, Zhao Y, Qi GR, Huang JT, Lu CD. Transgenic silkworm of anti-NPV ribozyme. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 1999, 31(3): 331–333. (in Chinese)
张峰, 陈秀, 赵昀, 祁国荣, 黄君霆, 陆长德. 抗 NPV-核酶转基因蚕的研究. *生物化学与生物物理学报*, 1999, 31(3): 331–333.
- [18] Jiang L, Sun Q, Jin SK, Xu MX, Cheng TC, Xia QY. An investigation on main traits of transgenic silkworm overexpressing bmlipase-1. *Science of Sericulture*, 2012, 38(5): 822–824. (in Chinese)
蒋亮, 孙强, 金盛凯, 徐美茜, 程廷才, 夏庆友. 增量表达 Bmlipase-1 的转基因家蚕的主要经济性状调查. *蚕业科学*, 2012, 38(5): 822–824.
- [19] Oomens AGP, Blissard GW. Requirement for GP64 to drive efficient budding of *Autographa californica* multicapsid nucleopolyhedrovirus. *Virology*, 1999, 254(2): 297–314.
- [20] Monsma SA, Oomens AG, Blissard GW. The GP64 envelope fusion protein is an essential baculovirus protein required for cell-to-cell transmission of infection. *Journal of Virology*, 1996, 70(7): 4607–4616.
- [21] Ono C, Kamagata T, Taka H, Sahara K, Asano S I, Bando H. Phenotypic grouping of 141 BmNPVs lacking viral gene sequences. *Virus Research*, 2012, 165(2): 197–206.
- [22] Braunagel SC, Russell WK, Rosas-Acosta G, Russell DH, Summers MD. Determination of the protein composition of the occlusion-derived virus of *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(17): 9797–9802.
- [23] Kool M, Ahrens CH, Goldbach RW, Rohrmann GF, Vlak JM. Identification of genes involved in DNA replication of the *Autographa californica* baculovirus. *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994, 91(23): 11212–11216.
- [24] Gomi S, Zhou CE, Yih W, Majima K, Maeda S. Deletion analysis of four of eighteen late gene expression factor gene homologues of the baculovirus, BmNPV. *Virology*, 1997, 230(1): 35–47.
- [25] Fei MH, Shi MN, Bi LH, Gu JD, Luo J, Wei BY, Feng ZQ, Lu RH, Hu LS, Huang JT. Breeding test of Silkworm varieties resistant to NPV infection. *Guangxi Sericulture*, 2006, 43(2): 1–6. (in Chinese)
费美华, 石美宁, 闭立辉, 顾家栋, 罗坚, 韦博尤, 冯振强, 陆瑞好, 胡乐山, 黄君霆. 抗 NPV 感染蚕品种选育试验. *广西蚕业*, 2006, 43(2): 1–6.
- [26] Liu XY, Yao Q, Chen KP. Studies on RAPD markers for NPV resistance in silkworm (*Bombyx mori*) using RAPD method. *Journal of Jiangsu University (Natural Science Edition)*, 2004, 25(1): 17–20. (in Chinese)
刘晓勇, 姚勤, 陈克平. 利用 RAPD 技术筛选家蚕抗核型多角体病分子标记. *江苏大学学报(自然科学版)*, 2004, 25(1): 17–20.
- [27] Li MW, Hou CX, Yao Q, Xu AY, Zhang YH, Chen KP. *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and breeding of resistant races. *Jiangsu Sericulture*, 2002, (2): 1–4. (in Chinese)
李木旺, 侯成香, 姚勤, 徐安英, 张月华, 陈克平. 家蚕核型多角体病毒及抗病育种. *江苏蚕业*, 2002, (2): 1–4.
- [28] Chen JE, Weng HB, Meng ZQ. Progress of the research on silkworm transgenic. *Bulletin of Sericulture*, 2008, 39(3): 5–8. (in Chinese)
陈金娥, 翁宏飏, 孟智启. 家蚕转基因研究进展. *蚕桑通报*, 2008, 39(3): 5–8.
- [29] Kamita SG, Majima K, Maeda S. Identification and characterization of the p35 gene of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus that prevents virus-induced apoptosis. *Journal of Virology*, 1993, 67(1): 455–463.
- [30] Singh CP, Singh J, Nagaraju J. bmnvp-miR-3 facilitates BmNPV infection by modulating the expression of viral P6.9 and other late genes in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2014, 49: 59–69.
- [31] Liu LH, Shen WD, Li B, Wang WB. Effect of BmNPV on BmN cell cycle and expression level of cyclin in silkworm. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2014, 42(2): 41–45. (in Chinese)
刘丽华, 沈卫德, 李兵, 王文兵. BmNPV 对家蚕 BmN 细胞周期及周期蛋白基因表达水平的影响. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(2): 41–45.

Characteristic analysis of resistance to BmNPV in CVDAR strain of silkworm

Qi Qin¹, Zhanqi Dong¹, Xuejiao Lei¹, Mingya Cao¹, Liang Tang², Meining Shi², Minhui Pan^{1*}

¹ State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China

² Guangxi Zhuang Autonomous Region Silkworm Technology Promotion Station, Nanning 530007, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Abstract: [Objective] *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus (BmNPV) induced hematogenous sepsis is a common severe disease of silkworm, and there are few effective prevention and control methods. In this study, CVDAR and DaZao (lines with strong resistance to BmNPV) silkworm strains were used as experimental materials. By analyzing the resistance characteristics of CVDAR silkworm, the resistance mechanism of CVDAR to BmNPV was determined. [Methods] In this study, we found that the lethal dose of CVDAR strain to BmNPV infection was more than 10 times higher than that of DaZao through semi lethal dose analysis. Further HE staining was performed to analyze the changes of midgut tissues before and after the infection of CVDAR and DaZao strains, and analyzed the anti-BmNPV mechanism of the resistant CVDAR strain. [Results] The results showed that after 72 hours of infection with BmNPV, the nucleus of large intestinal cells was enlarged and the staining became lighter; after 96 hours, the nuclei continued to increase and tended to fall off. The CVDAR-resistant strains only had enlarged nuclei in part of midgut after 96 hours of infection, but they were well arranged. At the same time by fluorescence quantitative analysis of the CVDAR and DaZao strain proliferation after virus infection, combined with the analysis and comparison of the transcriptional levels of the representative virus genes in each period, no difference in virus copy number and viral genes transcription level between the resistant CVDAR strain and the DaZao strain were found between 0–12 h after BmNPV infection. However, 24 hours after infection, we found that the CVDAR of the resistant strain was significantly lower than that of the control strain, regardless of the number of viral copies or the transcriptional expression level of viral genes. [Conclusion] Our study demonstrated that during the first round of replication after oral addition of CVDAR, the transcription of midgut virus genes was not affected; and later the transcription level was reduced. The critical period for the inhibition of BmNPV proliferation by CVDAR strain was identified to be 24 h after BmNPV infection, laying a foundation for the analysis of the resistance mechanism.

Keywords: *Bombyx mori*, *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, CVDAR, antiviral

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872427) and by the National Silkworm Industrial Technical System (CARS-18)

*Corresponding author. E-mail: pmh047@126.com

Received: 3 February 2019; Revised: 13 May 2019; Published online: 11 July 2019