

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.06.004

常用家蚕原种对家蚕微粒子的胚传特性分析

郑 宁¹, 董战旗^{1,2}, 胡 楠¹, 周 亮¹, 潘敏慧^{1,2}

1. 家蚕基因组生物学国家重点实验室 西南大学, 重庆 400715;

2. 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室 西南大学, 重庆 400715

摘要: 家蚕微粒子病是一种危害性极大的传染性疫病, 是蚕业生产上唯一的法定检疫对象。不同家蚕原种对家蚕微粒子的胚传特征分析可为家蚕微粒子病的综合防控提供理论支撑。为了充分了解现有主要实用家蚕原种对家蚕微粒子(*Nosema bombycis*)感染抗性的差异, 本研究利用流行病学和统计学方法选择产业中近 30 年主要分布于四川、重庆、江苏、广西及云南常用的 8 个高产优质亲本品种(871、872、芙蓉 932、湘 753、菁松 B×A、皓月 B×A、苏菊和云 7), 分别测定其对家蚕微粒子的抗性, 并分析了不同品种对家蚕微粒子的胚传规律。经研究发现 8 个现有生产中常用品种对微粒子抗性明显不同, 当母蛾带毒程度>100 时, 云 7 的子代感染率与感染强度分别为 54.4% 和 82, 均为最低; 相对于易感原种 871, 其子代感染率提高了 21.2%, 子代感染强度数值提高了 34, 子代感染率和感染强度的差异均十分明显; 同一原种感染程度不同的母蛾胚传存在差异, 一般胚传带毒与母蛾带毒呈正相关, 表明母蛾带毒程度是影响子代感染率和感染强度变化的主要因素。通过掌握母蛾感染程度与胚传带毒之间的规律, 可为原种间抗性差异的研究提供参考, 并对家蚕微粒子防控具有重要意义。

关键词: 家蚕原种; 家蚕微粒子; 胚种传染; 抗性

中图分类号: S881

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)06-0030-07

微粒子(Microsporidia)广泛分布于自然界, 是一类专性寄生的单细胞真核生物, 可以寄生于脊椎动物和无脊椎动物, 是一些动物和经济昆虫的常见病原, 危害极大^[1-2]。由于微粒子还能够机会性感染具有免疫缺陷的病人, 近年来备受关注^[3-4]。家蚕微粒子病(pébrine)是一种由家蚕微粒子(*Nosema bombycis*, Nb)感染、寄生引起的蚕病, 传播方式为食下传染和胚种传染, 是蚕丝业的重大威胁之一^[5-6]。家蚕微粒子曾给欧洲养蚕业带来毁灭性打击, 致使其一蹶不振^[7]。因此, 在蚕业生产上家蚕微粒子被定为唯一法定检疫对象。

在家蚕品种对微粒子的抗性研究中, 日本学者谷贤三郎于 20 世纪 30 年代就指出不同的家蚕品种对微粒子的抗性存在差异, 且这种差异会遗传给子代^[8]。刘仕贤等^[9]、张远能等^[10]研究了相关家蚕品种对微粒子的抗性差异, 结果表明这种差异有强弱之分, 且抗性强的品种可以作为宝贵的育种亲本材料。为了充分了解现有实用品种的抗性, 徐兴耀等^[11]研究学者对广东生产常用的品种进行微粒子抗性研究, 结果表明其均对微粒子敏感, 属于易感品种。沈中元等^[12]对中系、日系、欧洲系统和多化性系统进行微粒子抗性研究, 表明不同系统抗性存在差异, 少数品种间存在极显著差异。近些年各级蚕业科研单位及蚕种场均集中力量选育强健、优质、高产及易繁等家蚕素材, 致使实用品种的原种对微粒子抗性及其胚传规律研究相对较少。目前家蚕微粒子病胚种传染研究主要问题集中在以下 3 个方面: ① 当前微粒子防控主要通过药物消毒手段, 难以从源头切断微粒子传播; ② 对微粒子抗性研究目前主要集中于育种素材方面, 对生产的指导意义

收稿日期: 2020-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31872427); 重庆市自然科学基金项目(cstc2019jcyj-msxm2371)。

作者简介: 郑 宁, 硕士研究生, 主要从事病原与宿主互作研究。

通信作者: 潘敏慧, 教授, 博士研究生导师。

不大^[13]; ③ 现有实用品系微粒子抗性不强, 导致无法实施针对性防控微粒子。因此结合目前成品卵检疫标准, 迫切需要分析生产过程中家蚕常用实用品系对微粒子的抗性。

为了进一步了解当前生产过程中常用家蚕原种对微粒子的抗性差异, 本文利用 8 个家蚕常用原种对微粒子胚传特性进行研究, 以期分析家蚕原种抗微粒子的规律, 进一步创新发展家蚕微粒子病防控技术体系。本研究一方面有助于确定微粒子具体检验标准, 进一步为家蚕微粒子病的风险评估和检测防控奠定理论基础, 另一方面为筛选高抗性低胚传的家蚕实用品系提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 家蚕微粒子与家蚕品系

家蚕微粒子 CQ1 分离株, 由西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室分离, 保存于中国兽医微生物菌种保藏管理中心(CVCC), 保藏号 CVCC102059。供试家蚕品系为 871 和 872(四川省农业科学院蚕业研究所提供)、芙蓉 932 和湘 753(广西蚕业推广总站提供)、菁松 B×A 和皓月 B×A(重庆市蚕业科学研究所提供)、苏菊(江苏大学提供)、云 7(云南省农业科学院蚕蜂研究所提供), 蚕种确认均未感染家蚕微粒子病。

1.2 方 法

1.2.1 带毒母蛾的准备

3 龄起蚕添食含有新鲜家蚕微粒子的桑叶, 添食剂量为 10^4 个/头蚕。取感染后 5 龄 4 d 幼虫的丝腺进行匀浆离心, 差速离心法获得家蚕微粒子粗提液, 再以不连续的 Percoll 梯度(25%, 50%, 75% 和 100% v/v)10 000 g 离心 20 min 后获得纯化孢子^[11]。

蚕种经催青后幼虫在 25 °C 用新鲜桑叶饲养, 在 5 龄眠起时添食纯化后的家蚕微粒子 5×10^5 个/头蚕, 待其化蛹成蛾备用。

1.2.2 母蛾带毒程度检测

母蛾产卵后研磨镜检, 每个样品观察 10 个视野, 并统计每个视野中微粒子的数目, 计算其平均值。将母蛾带毒情况分为 4 类: 平均值 < 1 粒、1~10 粒、10~100 粒、> 100 粒, 分析比较同一添食浓度下不同家蚕原种母蛾的带毒程度。

1.2.3 子代感染率和感染强度分析

为研究各家蚕原种中母蛾带毒与子代带毒情况的关系, 选取 8 个原种母蛾, 分别与不带毒的雄蛾交配, 母蛾产卵后研磨镜检, 根据镜检结果每个原种选取 4 种不同的带毒情况母蛾(单个视野平均微粒子数目: < 1/ 1~10/ 10~100/ > 100), 将每种带毒情况的母蛾每个原种选 3 头, 随机镜检所产蛾圈孵化的蚁蚕 90 头。样本总量为 $8 \times 4 \times 3 = 96$ 组, 对单独设置的检测组每天取 90 头蚁蚕镜检, 同时检测每个蛾圈每天的蚕沙是否带毒, 避免二次感染。

子代感染率分析: 将二次感染发生前的蚁蚕逐头镜检, 每个样品统计 10 个视野, 只要有一个视野微粒子 > 1 粒即计为阳性。

子代感染强度分析: 将二次感染发生前的蚁蚕逐头镜检, 同样每个样品统计 10 个视野, 感染强度按镜检时 10 个视野的平均孢子数计分(平均值 < 1 粒记 1 分; 1~10 粒记 2 分; 10~100 粒记 4 分; > 100 粒记 8 分)。

1.2.4 数据统计分析

利用 SPSS 19.0 软件对得到的数据进行处理, 采用方差分析进行差异显著性分析(ANOVA 分析和 Kruskal-Wallis 分析), 同时进行两两比较(Dunnett T3 法和 LSD 法)。

2 结果与分析

2.1 不同带毒母蛾的胚传特征

对 8 个感染微粒子的家蚕原种子代感染率和感染强度平均水平进行分析发现, 子代感染率及子代感染

强度与母蛾带毒程度呈正比(图 1)。在母蛾带毒程度分别为 <1 , $1\sim 10$, $10\sim 100$ 和 >100 这 4 种情况时, 其子代感染率分别为 10.4%, 17.7%, 47.6% 和 64.5%, 子代感染强度分别为 9.5, 20, 66 和 100。在 4 种不同带毒母蛾情况下子代感染率均值约为 35%, 子代感染强度均值约为 49。当母蛾带毒情况由 <1 上升到 $1\sim 10$ 时, 子代感染率和感染强度的变化不明显, 表明低带毒母蛾对胚传影响不大, 而当母蛾带毒情况由 $1\sim 10$ 上升到 $10\sim 100$ 时, 子代感染率和感染强度的变化最明显, 即此时母蛾的带毒程度对子代带毒造成的变化最为显著。虽然带毒程度相同的原种母蛾胚传会出现一定的差异, 但总体而言高带毒的原种母蛾胚传带毒也相应升高。

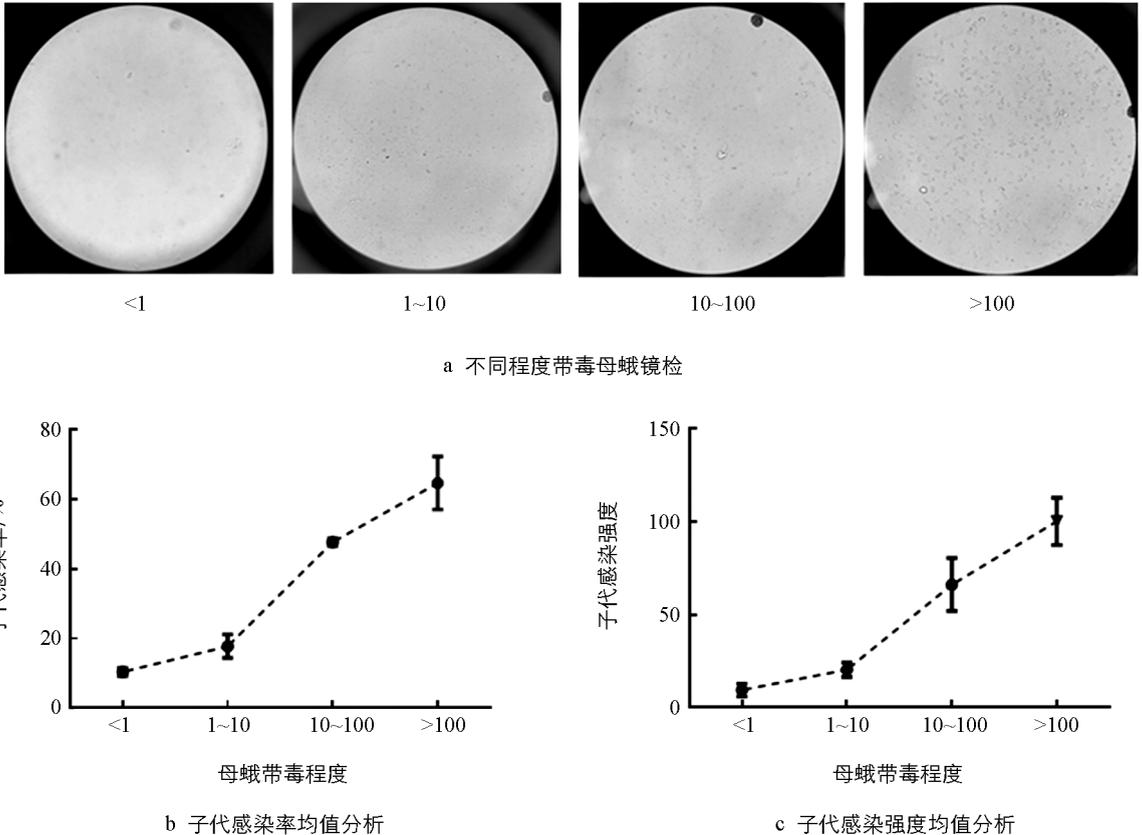


图 1 8 个家蚕原种感染微粒子胚传子代平均趋势分析

2.2 母蛾带毒 <1 时对子代感染率和子代感染强度的影响

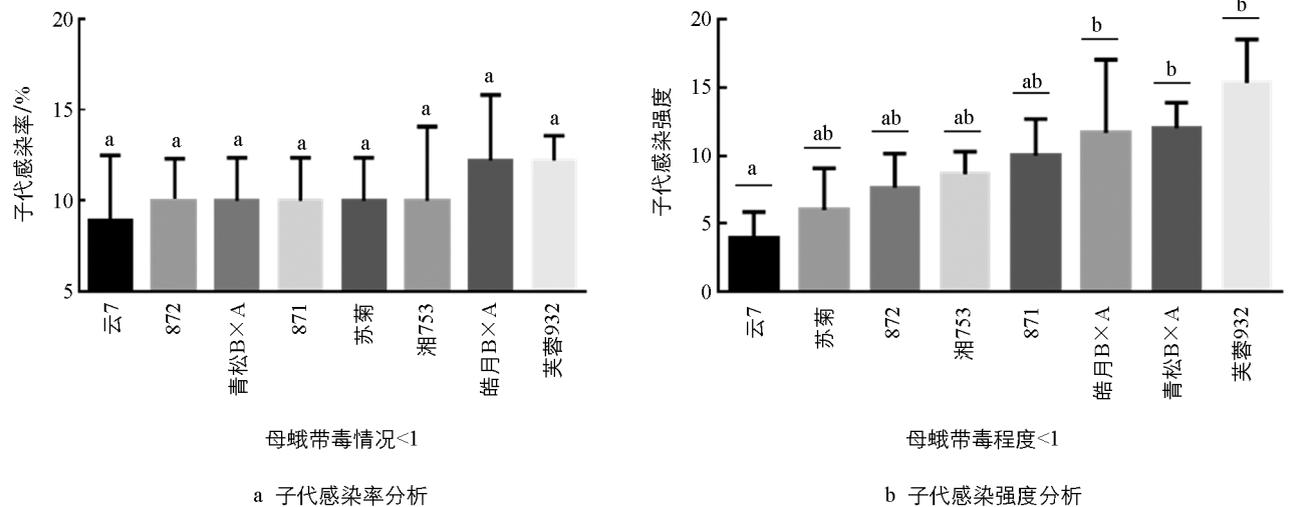
在母蛾带毒 <1 时, 各原种间子代的感染率均未超过 15%, 感染强度均未超过 15(图 2)。这些原种的子代感染率之间无显著差异, 但子代感染强度云 7 与其他原种存在显著差异。具体表现为: 与其他原种相比, 云 7 的子代感染率和子代感染强度均最低, 分别为 8.9% 和 4, 即云 7 在极低感染情况下表现出一定的抗性。相较于其他原种, 芙蓉 932、菁松 B \times A、皓月 B \times A 抗性较差。但在极低感染情况下, 当前生产实用原种间并不存在明显差异。

2.3 母蛾带毒 $1\sim 10$ 时对子代感染率和子代感染强度的影响

相较于母蛾带毒 <1 , 当母蛾带毒程度增大为 $1\sim 10$ 时, 子代感染率和子代感染强度均有一定升高(图 3)。云 7 依旧为相对抗性原种, 子代感染率和子代感染强度分别为 13.3% 和 15。其中 871 的子代感染率有显著上升, 达到和芙蓉 932 相同的子代感染率, 芙蓉 932、871 与云 7 存在显著性差异, 表明该带毒情况下 871 和芙蓉 932 胚传最为严重。但此时 871 的子代感染强度却低于芙蓉 932, 且存在显著性差异, 表明母蛾原种的类型也会影响微粒子在子代的增殖, 同时也暗示出在寻找家蚕抗性原种中, 子代感染强度也是一个重要的参考指标。除此之外, 在子代感染强度上, 云 7、菁松 B \times A、872 及 871 与皓月 B \times A、芙蓉 932 存在显著性差异。

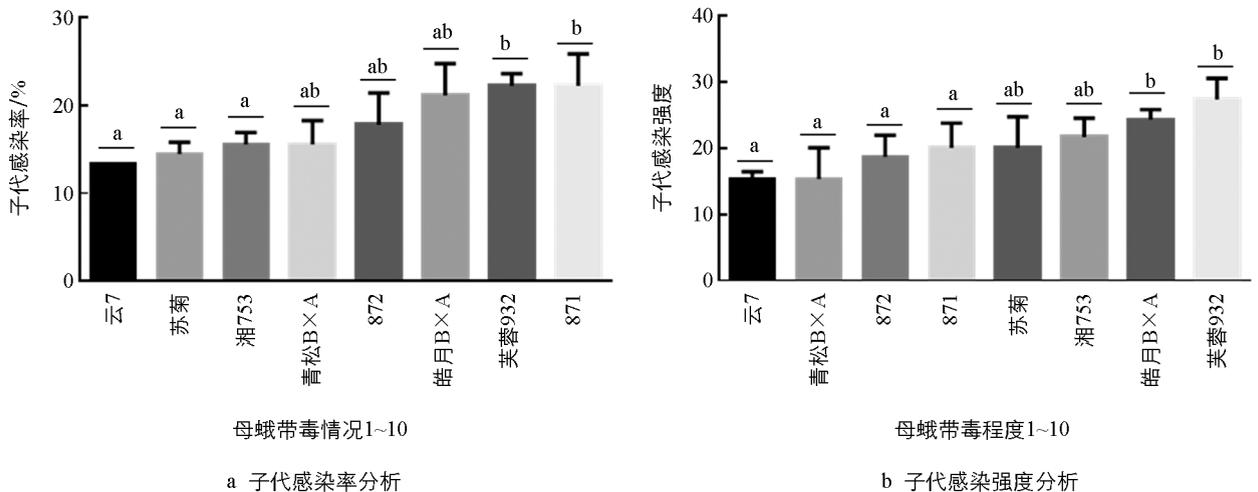
2.4 母蛾带毒 10~100 时对子代感染率和子代感染强度的影响

当母蛾带毒程度为 10~100 时,子代的感染率和感染强度均表现出相对一致的趋势,由低到高分别为苏菊、872、湘 753、云 7、871、芙蓉 932、皓月 B×A 和菁松 B×A. 子代感染率数据表明,871、芙蓉 932、皓月 B×A 和菁松 B×A 与苏菊、872 和湘 753 具有显著性差异;其中皓月 B×A、菁松 B×A 与苏菊、872、湘 753 和云 7 在子代感染强度上具有显著性差异(图 4). 在母蛾带毒程度 <1 和 1~10 时,表现出抗性的原种云 7 在该带毒程度下子代感染率和感染强度均低于苏菊,表明相对抗性原种在母蛾带毒程度改变时,其子代感染率、子代感染强度也均会改变,表现为不显著抗微粒子. 该带毒程度下母蛾原种的部分子代间感染率具有显著性差异,但在子代感染强度上却表现不明显.



字母 a, b 代表差异原种, 含有相同字母的原种间差异不显著(如 a 与 a, a 与 ab, b 与 ab); 不同字母原种间差异显著(a 与 b).

图 2 母蛾带毒 <1 时的子代带毒分析

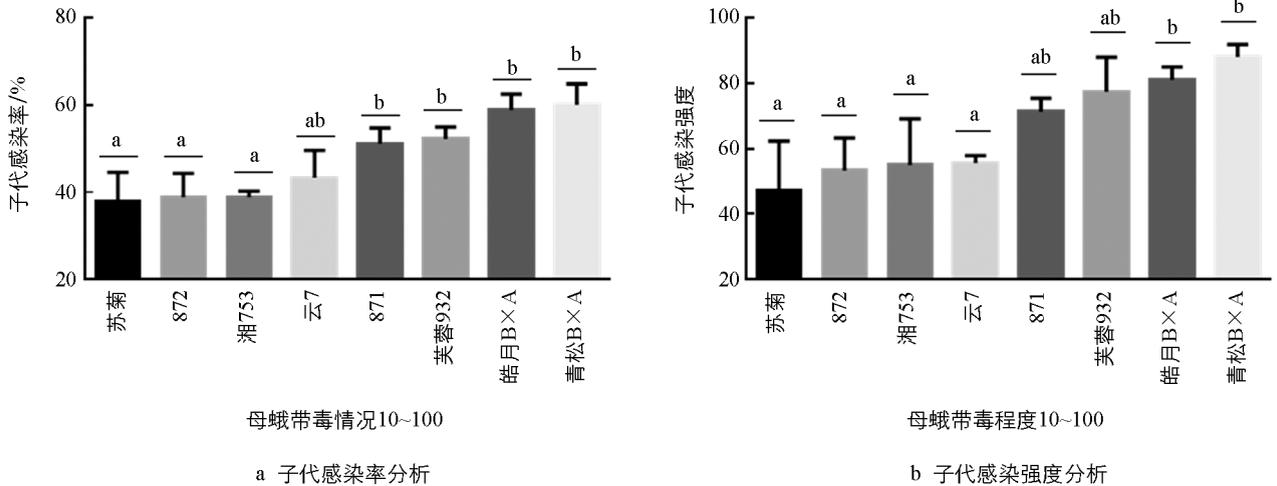


字母 a, b 代表差异原种, 含有相同字母的原种间差异不显著(如 a 与 a, a 与 ab, b 与 ab); 不同字母原种间差异显著(a 与 b).

图 3 母蛾带毒 1~10 时的子代带毒分析

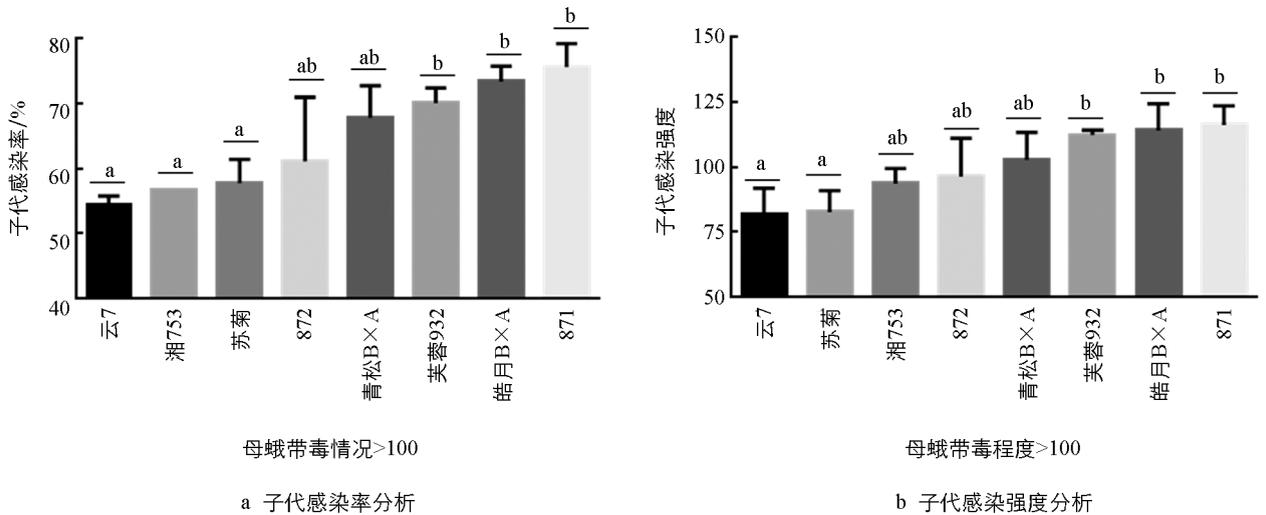
2.5 母蛾带毒 >100 时对子代感染率和感染强度的影响

在母蛾带毒 >100 时,子代感染率由低到高依次是云 7、湘 753、苏菊、872、菁松 B×A、芙蓉 932、皓月 B×A 和 871, 而子代感染强度具有较为一致的趋势(图 5). 高程度带毒母蛾(>100)子代感染率均高于 50%, 感染强度均大于 80, 两项数据皆高于低程度带毒母蛾组; 其中云 7、苏菊与芙蓉 932、皓月 B×A 和 871 在子代感染率和子代感染强度上存在显著性差异. 相较于母蛾带毒 10~100 时,871 子代感染率和子代感染强度急剧上升且明显高于其他组,为最易感品系,云 7 和苏菊为相对抗性品系,表明不同原种间对微粒子的抗性确实存在差异.



字母 a, b 代表差异原种, 含有相同字母的原种间差异不显著(如 a 与 a, a 与 ab, b 与 ab); 不同字母原种间差异显著(a 与 b)。

图 4 母蛾带毒 10~100 时的子代带毒分析



字母 a, b 代表差异原种, 含有相同字母的原种间差异不显著(如 a 与 a, a 与 ab, b 与 ab); 不同字母原种间差异显著(a 与 b)。

图 5 母蛾带毒 >100 时的子代带毒分析

3 讨论

家蚕微粒子病对蚕业生产具有毁灭性危害, 是检疫蚕种质量的唯一指标^[14]。当前, 家蚕微粒子病在蚕种生产上有抬头的趋势^[15], 该疫病一方面通过食下水平传播, 另一方面利用胚传垂直传播。在防控家蚕微粒子方面, 首先应做到严防胚种传染, 其次对卵、蚕、茧、蛹、蛾进行筛选, 最后要做好消毒防病工作^[16]。在胚种传染中, 母蛾的带毒程度是次代蚕遗传毒率的重要影响因素^[17], 因此掌握母蛾感染程度与胚传带毒之间的规律, 了解原种间的抗性差异对防控家蚕微粒子具有重要的意义^[18]。

微粒子检疫方法众多, 为生产无毒蚕种, 杜绝胚种传染, 生产上常用母蛾镜检法, 通过淘汰带毒母蛾杜绝带毒卵的产生达到目的。因单蛾检验的工作量大、时间性强, 且需要耗费大量的人力、物力, 在省时效率上不可避免地存在缺点。目前以显微镜能否看到微粒子来判断母蛾是否带毒, 而能否观察到微粒子, 则受观察人员技术水平及经验等诸多因素的影响。在此情况下, 逐渐发展出母蛾集团检验, 根据统计概率学原理计算母蛾感染率。1979 年在日本编著的《微粒子病检查指南》中规定, 允许病蛾率为 0.5%。在现有母蛾检测的抽样方案和判别标准下, 因家蚕微粒子病实际流行程度(母蛾感染率或感染程度)的不同, 所以同一判断标准(允许病蛾率 0.5%, 30% 的平均胚传率)对检测结果也有不同的影响^[8]。由 8 个家蚕原种感染

微粒子胚传子代平均趋势分析可知,4种不同程度的带毒母蛾子代感染率均值约为35%(图1),高于现行30%的平均胚传率,所以需要制定更加合理的成品卵检疫标准。目前生产实践中母蛾检验大多只统计感染率,但在一定程度上感染率只是一个定性标准,其受到样本与本体不一致、自身的可变性、显微镜检验技术和带毒雄蛾等诸多因素的影响^[19]。在王裕兴等^[20]对家蚕成品卵检疫技术的可靠性分析研究中,发现成品卵毒率、微粒子病遗传毒率、当代母蛾毒率以及蚕茧质量间存在明显的相关性,且成品卵检疫可基本排除人为因素对蚕种检疫结果错判的影响,比母蛾检疫更具有质量保证。在本研究中母蛾带毒1~10时,871和芙蓉932的子代感染率均为22.22%,但871的子代感染强度却低于芙蓉932。因此与先前研究不同,本文在母蛾检验时将孢子密度(子代感染强度)也作为蚕种质量判断因素之一。目前,微粒子检疫在分子生物学方面展现出巨大潜力,利用PCR反应设计家蚕微粒子特异引物以达到检测微粒子的目的,且逐渐向快速、灵敏、低成本靠拢^[21-22]。在免疫学方面,利用抗原抗体特异性结合的原理,研制家蚕微粒子单克隆抗体,设计出对微粒子高灵敏的检测试纸^[23]。在药物治疗方面,除了防微灵等传统的农药,目前也向高效、广谱及安全等方面发展^[24]。

在本研究中母蛾带毒程度为<1和1~10时,云7的子代带毒率和子代感染强度均最低,表现出相对明显的抗性。当母蛾带毒程度增大为10~100时,云7对微粒子的抗性则有所减弱。这表明当前研究中的8个实用品系,没有一个品系在任何带毒程度下可以达到对微粒子的最大抗性,即母蛾带毒情况不同时,有不同的原种相对抗性较强。这与王裕兴等^[20]研究结果一致:不同家蚕原种、不同母蛾带毒情况均会对胚传产生影响。母蛾带毒程度是影响胚传最为关键的因素,且在不同带毒情况下母蛾带毒与子代带毒呈正相关^[25]。总体而言,本研究8个实用品系中871抗性相对较弱,若针对性防控微粒子应尽量选用云7、苏菊等抗性较强的品系。通过把现有实用品系中抗性较强的原种当作育种素材,培育抗性品系还任重道远。值得思考的是,不同的家蚕原种与母蛾感染程度对胚传造成的影响是否存在一定的关系?即低胚传的原种是否也具有高抗性,两者之间是否有必然联系?相关问题还需要进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 刘吉平,徐兴耀.家蚕微粒子病流行发生的历史和现状[J].中国蚕业,2000(1):9-11.
- [2] 鲁兴萌,邵勇奇.家蚕微粒子病防控技术研究的发展现状与趋势[J].蚕业科学,2016,42(6):945-952.
- [3] 周泽扬,潘国庆,李田,等.家蚕微孢子虫基因组生物学[M].北京:科学出版社,2014.
- [4] GHOSH K, WEISS L. T Cell Response and Persistence of the Microsporidia [J]. FEMS Microbiol Rev, 2012, 36(3): 748-760.
- [5] CHEN G, WANG W, CHEN H, et al. Functional Characterization of an Aquaporin from a Microsporidium, *Nosema bombycis* [J]. PloS one, 2017, 12(7): e0181703.
- [6] 周泽扬,潘国庆,向仲怀.家蚕微孢子虫研究10年回眸[J].蚕业科学,2014,40(6):949-956.
- [7] DRENSTEIN J M, DIETERICH D T, KOTLER D P. Systemic Dissemination by a Newly Recognized Intestinal Microsporidia Species in AIDS [J]. AIDS, 1992, 6(10): 1143-1150.
- [8] 谷贤三郎.最近蚕病学[M].东京:东京明文堂藏版,1930.
- [9] 刘仕贤,张远能,欧少容.家蚕抗微粒子病性状的遗传研究[J].广东农业科学,1981(3):11.
- [10] 张远能,刘仕贤,霍用梅,等.若干家蚕品种对六种主要蚕病的抗性鉴定[J].蚕业科学,1982,8(2):94-97.
- [11] 徐兴耀,谭佩婵,孙京臣,等.家蚕品种对微粒子病抗性测定[J].广东蚕业,1998(2):30-34.
- [12] 沈中元,徐莉,徐安英,等.家蚕品种资源对微粒子病的抗性调查[J].蚕业科学,2003,29(4):421-426.
- [13] 顾家栋,闭立辉,罗坚,等.家蚕育种目标和素材的思考[J].广东蚕业,2007(3):1-4.
- [14] 汤庆坤.家蚕平附种母蛾微粒子病集团抽样检验方法改进研究[D].南宁:广西大学,2011.
- [15] 潘沈元,陶鸣,李掌林,等.增加家蚕微粒子病母蛾抽样检查集团蛾数的探讨[J].蚕业科学,2004,30(1):64-68.
- [16] 汤世艳.浅谈原蚕区家蚕微粒子病防控措施[J].四川蚕业,2018,46(1):50-51,22.
- [17] 王裕兴,沈新娥,陈志德.对家蚕微粒子病胚种传染规律的研究[J].江苏蚕业,1998(2):9-12.
- [18] 黄嫔,彭丽红,邱国祥,等.家蚕微病母蛾与下一代微粒子孢子检出率关系的初探[J].广东蚕业,2014,48(4):22-24.
- [19] 万永继,唐良彤,潘敏慧,等.3种微孢子虫对家蚕致病性和胚胎传染的研究[J].西南农业大学学报[J].1998,

20(1): 95-99.

- [20] 王裕兴, 祁力言, 李掌林, 等. 对家蚕成品卵检疫技术的可靠性分析 [J]. 苏州大学学报(自然科学), 2002(1): 97-100, 107.
- [21] 刘吉平, 杨思佳, 程 伟. 适用于家蚕蚕卵微孢子虫的 LAMP 检测引物及快速检测方: CN105671144A [P]. 2016-06-15.
- [22] 贡成良, 潘中华, 郑小坚, 等. 家蚕成品卵中微孢子虫病卵及病卵率的检测方法: CN1687767 [P]. 2005-10-26.
- [23] 芦 琨. 家蚕微孢子虫病免疫学快速检测试纸条的研制 [D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- [24] 刘吉平. 一种防治家蚕微孢子虫病的药物组合物及其应用: CN103828841A [P]. 2014-06-04.
- [25] 王裕兴, 金 珏. 对家蚕微孢子虫病感染规律的研究 [J]. 蚕业科学, 1998, 24(3): 156-161.

Analysis of the Embryonic Transmission Characteristics of Common *Bombyxmori* Original Species to *Nosemabombycis*

ZHENG Ning¹, DONG Zhan-qi^{1,2}, HU Nan¹,
ZHOU Liang¹, PAN Min-hui^{1,2}

1. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Key Laboratory of Sericulture and Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture and Rural Affairs,

Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: As an extremely destructive silkworm disease, pébrine (*Nosemabombycis*) is the only legal quarantine object in the production of sericulture. Analysis of the embryo transfer characteristics of *N. bombycis* (*N. b*) from different silkworm (*Bombyxmori*) original species may provide a theoretical support for the integrated management of this disease. In order to fully understand the differences in the resistance of the existing prevailing parent silkworm varieties to *N. b* infection, epidemiological and statistical methods were adopted in this study to test the resistance of eight high-yield and high-quality silkworm parental varieties (871, 872, Furong 932, Xiang 753, Jingsong B×A, Haoyue B×A, Su Ju and Yun 7) commonly used in Sichuan, Chongqing, Jiangsu, Guangxi and Yunnan in the past 30 years, and the embryo transfer of *N. b* of these silkworm varieties was analyzed. The results indicated that the resistance of the eight varieties to *N. b* was significantly different. When the degree of toxicity of the female moth was >100, the progeny of Yun 7 had the lowest infection rate and infection intensity, being 54.4% and 82, respectively. Compared with that of susceptible stock variety 871, the infection rate of the progeny increased by 21.2%, and the progeny infection intensity increased by 34, the differences being significant statistically. A difference was detected in embryo transmission among female moths with different degrees of infection of the same stock, and the general embryo infection was positively correlated with that of the female moth, indicating that the infection degree of the female moth was the main factor affecting the changes in the infection rate and infection intensity of the progeny. In conclusion, understanding the relationship between the degree of infection of female moths and embryo infection not only may provide reference for the study of resistance differences between the parent silkworm varieties, it also is of significance for the prevention and control of pébrine.

Key words: *Bombyxmori* original species; *Nosemabombycis*; embryo infection; resistance