



研究报告

一株家蚕异型微孢子虫感染特征和分类地位

黄旭华¹ 龙江琼² 蒋满贵¹ 何强² 黄深惠¹ 董战旗² 夏青¹ 李田²
潘敏慧² 潘志新^{*1}

1 广西蚕业科学研究所 广西 南宁 530007

2 西南大学家蚕基因组生物学国家重点实验室 重庆 400715

摘要:【背景】家蚕微孢子虫病是一种对蚕业生产危害巨大的蚕病,该病病原是蚕种生产唯一检疫对象,而家蚕病原性微孢子虫种类多、来源复杂,给蚕种生产微孢子虫病的防控增加了难度。【目的】研究一株从蚕种检疫样品中分离的微孢子虫(命名为GXM15)的致病性和分类地位,鉴定并分析其来源,完善家蚕病原性微孢子虫分类和数据库,为蚕种生产控制家蚕微孢子虫病提供参考依据。【方法】采用生物试验方法测定GXM15微孢子虫对家蚕的半数感染浓度(IC₅₀)和胚种传染率;显微镜观察GXM15微孢子虫孢子形态,利用透射电子显微镜观察GXM15微孢子虫的超微结构;采用PCR扩增、T克隆和测序获得GXM15微孢子虫的SSU rRNA基因和ITS片段DNA序列,并利用MEGA 5.0和DNASar软件构建GXM15微孢子虫的系统发育树和遗传距离分析。【结果】GXM15微孢子虫对家蚕的IC₅₀为8.29×10⁴个/mL,是家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*, Nb)的2.28倍;GXM15微孢子虫对家蚕的胚种传染率为3.6%,明显低于Nb;GXM15微孢子虫形态呈短卵圆形,大小为(2.05±0.20)×(3.25±0.30) μm, GXM15微孢子虫体积是Nb微孢子虫的2.19倍;GXM15微孢子虫超微结构具双核,极丝13圈,极丝倾斜角约45°,符合*Nosema*属的特征;GXM15微孢子虫SSU rRNA基因在系统发育树中位于*Nosema*属分支中,遗传距离分析表明GXM15微孢子虫与Nb同属异种,是一株新微孢子虫。【结论】GXM15微孢子虫是一株家蚕病原性微孢子虫,根据GXM15微孢子虫致病性和分类地位研究,可以为蚕种生产防控家蚕微孢子虫病提供参考依据。

关键词: 家蚕, 微孢子虫, 感染性, 分类地位

Infection characteristics and classification of a microsporidian isolated from silkworm

HUANG Xu-Hua¹ LONG Jiang-Qiong² JIANG Man-Gui¹ HE Qiang² HUANG Shen-Hui¹
DONG Zhan-Qi² XIA Qing¹ LI Tian² PAN Min-Hui² PAN Zhi-Xin^{*1}

1 Guangxi Academy of Sericulture Sciences, Nanning, Guangxi 530007, China

2 State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Background] Silkworm pebrine is a serious disease that has caused great damage to the

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (32060777, 31560048, 31460035)

***Corresponding author:** Tel: 86-771-3278287; E-mail: pzx0815@126.com

Received: 26-11-2019; **Accepted:** 31-03-2020; **Published online:** 17-04-2020

基金项目: 国家自然科学基金(32060777, 31560048, 31460035)

*通信作者: Tel: 0771-3278287; E-mail: pzx0815@126.com

收稿日期: 2019-11-26; 接受日期: 2020-03-31; 网络首发日期: 2020-04-17

silkworm production and its pathogen is the unique quarantine object that for silkworm egg production. The sources of pathogenic microsporidan of silkworm *B. mori* are variety and complex, which increases the difficulty of controlling pebrine in the silkworm egg production. **[Objective]** The present study were conducted to investigate the pathogenicity and classification feature of a microsporidan which was isolated from the silkworm mother moths (name GXM15), and its source was analysed, which will improve the classification and database of silkworm pathogenic microsporidan and will be provide reference basis for the control of silkworm pebrine in silkworm egg production. **[Methods]** The 50% infectious concentration (IC_{50}) and the germinative infection rate of GXM15 were investigated with biological test methods. The spore morphology of GXM15 was observed with optical microscope, its internal structure was observed under transmission electron microscope, the SSU rRNA gene and ITS sequence of GXM15 were obtained by PCR amplification, clone and sequencing, the phylogenetic tree based on SSU rRNA sequences was constructed with the software of MEGA 5.0, and the genetic distance of SSU rRNA and ITS sequence were analyzed with software of DNASTar. **[Results]** The IC_{50} of GXM15 is 8.29×10^4 spores/mL, which is 2.28 times to that of *Nosema bombycis* (Nb) and the germinative infection rate of GXM15 is 3.60%, that is significantly lower than that of Nb. The spore of GXM15 is short oval in shape and $(2.05 \pm 0.20) \times (3.25 \pm 0.30) \mu\text{m}$ in size, and the volume of GXM15 is 2.19 times to that of Nb. There are binuclear and has 13 polar filament coils in the spores of GXM15, and its angles of polar filament is 45° , that is conform to the taxonomic features of *Nosema*. The SSU rRNA of GXM15 is grouped in the *Nosema* clade, and the genetic distance analysis of SSU rRNA and ITS show that GXM15 and other *Nosema* microsporidan are belong to different species of the same genus, GXM15 is a new microsporidan. **[Conclusion]** GXM15 is a new pathogenic microsporidan of *Bombyx mori*, and study on the pathogenicity and classification feature of GXM15 microsporidan can provide basis for prevention and control of the silkworm pebrine.

Keywords: *Bombyx mori*, Microspofidia, Infectivity, Classification

家蚕微粒子病是由微孢子虫感染家蚕引起的一种病害,微孢子虫对家蚕既能够食下传染,也能够胚种传染,是蚕种质量的重要检验对象,行业法规规定所有生产蚕种必须通过检疫合格后才能应用于蚕业生产^[1]。家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*, Nb)是引发家蚕微粒子病的主要病原,但在蚕种质量检验中经常发现一些与 Nb 孢子形态有差异的异型微孢子虫,这些异型微孢子虫感染力和分类地位未明确,极大影响蚕种检疫和防病工作^[2]。因此,在蚕种繁育过程中调查一些异型微孢子虫来源,并掌握这些微孢子虫的感染力和分类地位,对蚕种生产控制家蚕微粒子病具有重要指导作用。

微孢子虫寄主非常广泛,可感染从无脊椎动物到脊椎动物的几乎所有动物类群^[3],至今已经发现的微孢子虫超过 150 个属,有 1 400 多种^[4-5]。同时,微孢子虫是一种嗜昆虫的病原,据记载可感染各个目的昆虫,其中双翅目和鳞翅目的昆虫感染危害严重,很多种昆虫受到一种以上微孢子虫感染^[6-7]。家

蚕病原性微孢子虫种类多、来源复杂,如 20 世纪 60-70 年代日本科学家相继从家蚕体内分离到具褶孢虫属的 M25、M27 和泰罗汉孢虫 M32 及变形孢虫 M12 等异型微孢子虫^[8];国内学者也对不同蚕区感染家蚕的异型微孢子虫进行了研究,如:方定坚等(1991)研究了 MG1 和 MG2 微孢子虫^[9];万永继等(1995)研究了 SCM6 和 SCM7 微孢子虫^[10];沈中元等(2001)研究了 MZ1 微孢子虫^[11];潘敏慧等(2002)研究了 SCM8 微孢子虫^[12];时连根等(2002)研究了 SLN1 微孢子虫^[13];罗梅兰等(2012)研究了 GXM1 微孢子虫^[14];Meng 等(2018)研究了 *Vairimorpha necatrix* BM,发现其对家蚕没有胚种传染性^[15]。其中,万永继^[16]研究了 SCM6 和 SCM7 微孢子虫,发现这 2 种微孢子虫的胚种传染力很低或没有,提议蚕种检疫中对 SCM6 和 SCM7 微孢子虫进行分类检验处理,累计挽回蚕种损失 110 多万张。

因此,深入调查蚕种质量检验发现的异型微孢子虫,调查其感染性和遗传系统发育情况,可深入

了解家蚕病原性微孢子虫对蚕种生产的危害, 可以提高蚕业生产中家蚕微孢子病的防控技术水平。广西是一个新兴蚕区, 在蚕业生产中分布着一些家蚕病原性微孢子虫, 但有关广西蚕区家蚕异型微孢子虫的研究较少; 而蚕种微孢子病检疫是生产过程的关键环节, 跟踪广西蚕种检疫发现的异型微孢子虫, 将有助于完善家蚕微孢子病病原种类和数据库。本文研究了一株从广西蚕种检疫样品中分离获得的微孢子虫的感染性和遗传系统发育情况, 有助于了解家蚕病原性微孢子虫对蚕种生产的危害性, 掌握家蚕微孢子病病原来源, 为蚕业生产中控制家蚕微孢子病的危害提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 供试微孢子虫来源和纯化

从广西蚕种检疫样品(母蛾)中分离获得一株异型微孢子虫, 编号为 GXM15; 家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*, Nb)由广西蚕业技术推广总站提供, 分别取 GXM15 和 Nb 微孢子虫感染 2 龄起蚕, 饲养 12 d 后(5 龄第 2 天), 并分别取发病蚕体进行提取、纯化与精制 GXM15 微孢子虫和 Nb^[17]。

1.2 主要试剂和仪器

植物基因组 DNA 提取试剂盒、pEASY[®]-T1 Simple Cloning Kit, 天根生化科技(北京)有限公司; HiFi 酶, 北京普凯瑞生物科技有限公司; PCR 引物, 重庆华大基因科技有限公司; 回收胶试剂盒(gel extraction kit 200), 上海研拓生物科技有限公司。PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 珠磨式研磨器, MPBIO 公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 相差显微镜, 尼康公司; 透射电子显微镜, 日立公司。

1.3 供试家蚕品种

试验应用的家蚕品种为 932×芙蓉。

1.4 GXM15 微孢子虫对家蚕食下感染和胚种传染

1.4.1 食下感染力测定

将 GXM15 微孢子虫配制成 1.0×10^8 个/mL 的孢子悬浮液, 再利用无菌水以 10 倍梯度稀释成 5 个系列稀释液(10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 和 10^3 个/mL),

分别取各种浓度的孢子悬浮液 0.2 mL, 均匀涂抹于 1 片的桑叶片(面积为 16.0 cm^2)上, 饲喂一区 2 龄起蚕(30 头) 12 h, 重复 2 区。各区蚕儿吃完含有孢子的桑叶后更换蚕座纸片, 改用洁净桑叶饲养 12 d (5 龄第 3 天), 对各区每头家蚕进行显微镜检验, 计算各区家蚕的 GXM15 微孢子虫感染率, 以 Nb 作为对照^[14]。2 种微孢子虫对家蚕的半数感染浓度(IC₅₀)用 Reed Muench 法计算^[1]。

1.4.2 胚种感染力测定

将 GXM15 微孢子虫配制成 3.0×10^5 个/mL 的孢子悬浮液, 取洁净桑叶浸泡 5 min 到孢子悬浮液中, 稍微晾干, 饲喂给 5 龄起蚕 12 h, 再利用洁净桑叶饲养; 当家蚕结茧、出蛾后, 获得感染 GXM15 微孢子虫的蛾, 使雌雄蛾交配, 雌蛾产下蚕卵; 利用显微镜检验产卵的雌蛾, 将严重感染 GXM15 微孢子虫的雌蛾(每个视野的微孢子虫检出密度 > 100 个)所产的蚕卵, 进行即时浸酸处理、催青、孵化蚁蚕, 饲养至 3 龄起蚕, 再利用显微镜检验各头家蚕的 GXM15 微孢子虫感染情况, 以 Nb 作为对照, 分别计算 GXM15 微孢子虫和 Nb 对家蚕的胚种传染率^[14]。

1.5 GXM15 微孢子虫形态观察

分别将 GXM15 微孢子虫和 Nb 悬浮液做成水玻片标本, 利用相差显微镜以 600 倍观察, 并利用测微尺软件分别测量 2 种微孢子虫的长轴与短轴, 计算各种微孢子虫的体积, 比较其形状差异^[14]。

1.6 GXM15 微孢子虫感染家蚕组织观察

将 GXM15 微孢子虫配制成浓度为 1×10^7 个/mL 的孢子悬浮液, 取洁净桑叶浸泡到孢子悬浮液中, 稍微晾干, 饲喂给 2 龄起蚕添食 12 h, 再利用洁净桑叶饲养至 5 龄期第 3 天。在立体显微镜下解剖蚕体, 用镊子轻取家蚕中肠、丝腺、马氏管、性腺等组织, 在无菌水中冲洗数次, 再分别涂抹玻片, 利用显微镜(600 倍)观察有无 GXM15 微孢子虫^[14]。

1.7 GXM15 微孢子虫内部结构观察

微孢子虫样品处理过程^[18]: (1) 预处理: 取 1.0 mL 的 GXM15 微孢子虫孢子悬浮液(浓度为 5.0×10^8 个/mL), 3 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清,

加入 1.0 mL 戊二醛固定液(6%, 体积比)溶解, 在 4 °C 下放置 24 h, 再次离心后去掉上清, 加入适量琼脂液(2.5%)预包埋成块状。(2) 固定: 用戊二醛固定液(6%)浸泡 12 h, 再用 0.1 mol/L 二甲胂酸钠缓冲液冲洗 6 次; 用 1% 锇酸浸泡处理 2 h, 再用 0.1 mol/L 二甲胂酸钠缓冲液冲洗 6 次; 用 0.5% 高锰酸钾浸泡 2 h, 再用 9 g/L NaCl 溶液冲洗 6 次。(3) 脱水: 依次利用浓度为 50%、70%、80% 和 90% 的乙醇溶液处理。(4) 包埋和切片: 利用环氧树脂渗透、包埋, 制成超薄切片。(5) 染色: 利用醋酸铀-柠檬酸铅进行双重电子染色, 再利用透射电子显微镜观察孢子内部结构。

1.8 GXM15 微孢子虫分子系统发育分析

1.8.1 GXM15 微孢子虫基因组提取

取 1.0 mL GXM15 微孢子虫孢子悬浮液(浓度约 1×10^9 个/mL), 12 000 r/min 离心 5 min; 加入 700 μ L 植物基因组 DNA 提取试剂盒内的 GP1 悬浮, 转入专用破碎管中(装有 0.2 g 大玻璃珠和 0.2 g 小玻璃珠), 利用组织破碎仪破碎 3 次(40 s/次)。然后按照试剂盒说明书提取 GXM15 微孢子虫基因组 DNA^[19]。

1.8.2 GXM15 微孢子虫 SSU rRNA 基因和 ITS 序列的 PCR 扩增、克隆与测序^[20]

选择引物 18f/1537r 用于 GXM15 微孢子虫的 SSU rRNA 扩增(表 1)。PCR 反应体系(50 μ L): dNTPs (10 mmol/L) 1 μ L, 18f 和 1537r 引物(10 mmol/L)各 2 μ L, 10 \times HiFi buffer 5 μ L, HiFi 酶(5 U/ μ L) 1 μ L, 模板 DNA 2 μ L, ddH₂O 37 μ L。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min 10 s, 循环 30 次; 72 °C 10 min。通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 利用回收胶试剂盒对目的条带进行回收; 再利用 pEASY[®]-T1 Simple Cloning Kit 对目的产物进行克隆, 取阳性菌落的菌液送华大基因公司测序。微孢子虫 rRNA ITS 序列的扩增采用引物 ILSUF/S33R (表 1), PCR 反应体系同 SSU rRNA 扩增(除引物外)。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 56 °C 45 s, 72 °C 45 s, 循环 30 次; 72 °C 10 min。同样进行目的序列回收、克隆和测序。

表 1 GXM15 微孢子虫 SSU rRNA 基因和 ITS 序列的 PCR 引物

Table 1 The PCR primer of SSU rRNA and ITS for GXM15 microsporidian

Gene name	Primers name	Primers sequence (5'→3')
SSU rRNA	18f	CACCAGGTTGATTCTGCC
	1537r	TTATGATCCTCCTAATGGTTC
ITS	ILSUF	TGGGTTTAGACCGTCGTGAG
	S33R	ATAGCGTCTACGTCAGGCAG

1.8.3 构建 GXM15 微孢子虫分子系统发育树及遗传距离分析

以测序获得的 GXM15 微孢子虫 SSU rRNA 序列与 GenBank 上属于 *Nosema*、*Amblyospora*、*Endoreticulatus*、*Vairimorpha*、*Pleistophora* 和 *Glugea* 属的已知微孢子虫 SSU rRNA 序列进行比较分析, 利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树; 再利用 DNASTar 软件分别对 GXM15 微孢子虫 SSU rRNA 基因与 ITS 片段序列进行同源序列相似性和分化度分析^[21]。

2 结果与分析

2.1 GXM15 微孢子虫对家蚕的致病性

2.1.1 对家蚕的半数感染浓度(IC₅₀)

分别利用 GXM15 微孢子虫和 Nb 的梯度浓度孢子悬浮液感染家蚕 2 龄起蚕, 经计算 GXM15 微孢子虫的 IC₅₀ 为 8.29×10^4 个/mL, Nb 的 IC₅₀ 为 3.63×10^4 个/mL, GXM15 微孢子虫的 IC₅₀ 是 Nb 微孢子虫的 2.28 倍(表 2), 说明 GXM15 微孢子虫对家蚕也具有较强的食下感染力, 但比 Nb 的感染力偏低。

2.1.2 对家蚕胚种传染力的测定

利用 GXM15 微孢子虫感染家蚕 5 龄起蚕, 检测感染 GXM15 微孢子虫严重的母蛾产下的蚕卵孵化的后代感染孢子情况。结果表明 GXM15 微孢子虫对家蚕的胚种传染率为 3.60%, 而同时期 Nb 微孢子虫的胚种传染率为 41.60%, 证明 GXM15 微孢子虫对家蚕具有较低胚种传染力。

表 2 GXM15 微孢子虫和 Nb 对家蚕的食下传染力调查

Table 2 Peroral infection of GXM15 and Nb to silkworm, *Bombyx mori*

Dilution factor of microsporidia (spores/mL)	Number of silkworm	Infected rate of GXM15 (%)	Infected rate of Nb (%)
10^7	90	100.00	100.00
10^6	90	93.33	100.00
10^5	90	51.11	68.89
10^4	90	13.33	21.11
10^3	90	0	3.33
IC ₅₀ (spores/mL)		8.29×10^4	3.63×10^4

2.2 GXM15 微孢子虫的基本形态

通过显微镜观察出 GXM15 微孢子虫(图 1A)明显比 Nb 微孢子虫(图 1B)偏大, 对两种微孢子虫的长轴和短轴进行测量(表 3), GXM15 微孢子虫体积为 $7.20 \mu\text{m}^3$, 是 Nb 孢子体积的 2.19 倍, 与 Nb 差异明显。GXM15 微孢子虫与 Nb 微孢子虫具有相似的折光性。

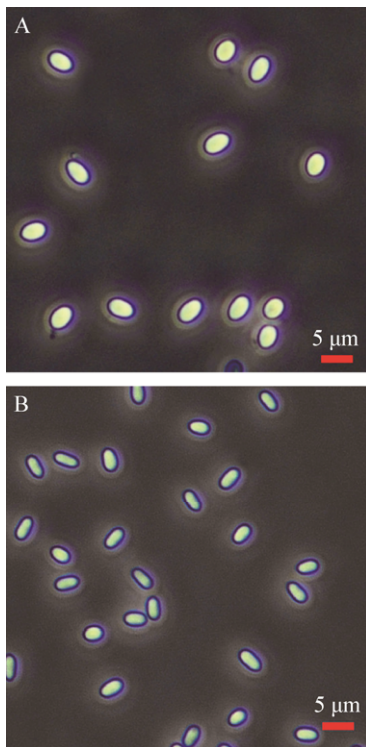


图 1 GXM15 微孢子虫和 Nb 的孢子形态(600×)

Figure 1 Morphology of GXM15 and Nb spores (600×)

注: A: GXM15 微孢子虫; B: 家蚕微孢子虫(Nb).

Note: A: GXM15 microsporidian; B: *Nosema bombycis*.

表 3 GXM15 微孢子虫与 Nb 的孢子形态比较

Table 3 Comparison on morphology of microsporidian spores between GXM15 and Nb

微孢子虫	GXM15	Nb
Microsporidian		
形状 Shape	短卵圆形 Short oval	卵圆形 Oval
大小 Size (μm)	$(2.05 \pm 0.20) \times (3.25 \pm 0.30)$	$(1.48 \pm 0.18) \times (2.84 \pm 0.25)$
体积 Volume (μm^3)	7.20	3.29
长短轴比	1.59	1.91
Length/Width		

注: $V = \pi/6 \times \text{长轴} \times \text{短轴}^2$.

Note: $V = \pi/6 \times \text{Length} \times \text{Width}^2$.

2.3 GXM15 微孢子虫感染家蚕的组织情况

利用显微镜观察感染 GXM15 微孢子虫的家蚕的各种组织, 发现家蚕丝腺有大量 GXM15 微孢子虫, 尤其是前部丝腺最多; 而家蚕气管上皮肌肉组织也有较多 GXM15 微孢子虫; 家蚕中肠、马氏管、生殖腺、脂肪组织等组织有少量 GXM15 微孢子虫。说明 GXM15 微孢子虫能够对家蚕全身性感染。

2.4 GXM15 微孢子虫的超微结构

利用透射电子显微镜观察 GXM15 微孢子虫的内部结构, GXM15 微孢子虫纵剖面呈马蹄形; 孢子壁结构清晰, 由外壁、内壁、原生质膜 3 层组成; 极丝 13 圈, 极丝倾斜角约为 45° ; 孢子具双核(图 2), 核周围有大量的粗糙内质网, 属于典型的 *Nosema* 属微孢子虫特征。

2.5 GXM15 微孢子虫的 SSU rRNA 基因和 ITS 序列分析

通过 PCR 扩增、T 克隆和测序获得 GXM15 微

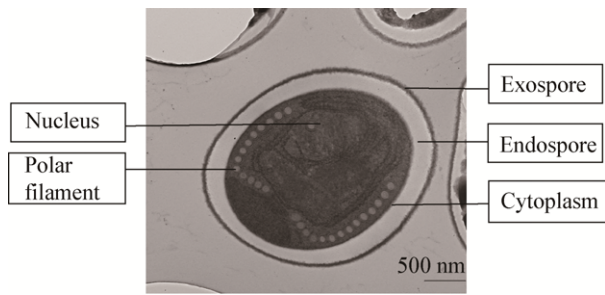


图2 GXM15微孢子虫的超微结构(30 000×)

Figure 2 Ultrastructure of microsporidian spores of GXM15 (30 000×)

孢子虫的 SSU rRNA 基因的部分序列(GenBank 登录号 MN744318)和 ITS 片段序列(GenBank 登录号 MN747890)。GXM15 微孢子虫的 SSU rRNA 序列

长度为 1 110 bp, 片段的(G+C)mol% 含量为 33.96%; ITS 序列长度为 339 bp, 片段的(G+C)mol% 含量为 39.53%。基于 SSU rRNA 基因序列, 利用 MEGA 5.0 软件对 GXM15 微孢子虫和已知的 25 株微孢子虫一起构建系统发育树, 以白僵菌(*Beauveria bassiana*) (EU334679)作为外群。结果发现 GXM15 微孢子虫位于 *Nosema* 属的类群中(图 3), 说明 GXM15 微孢子虫是一株 *Nosema* 属微孢子虫, 与超微结构观察等传统分类方法一致。采用 DNASTar 软件的 MegAlign 对 GXM15 微孢子虫微孢子虫和其他 14 株已知微孢子虫的 SSU rRNA 基因序列进行相似性和分化度分析(表 4), 发现 GXM15 微孢子虫的 SSU rRNA 与其他微孢子虫的 SSU rRNA 序列的最小分

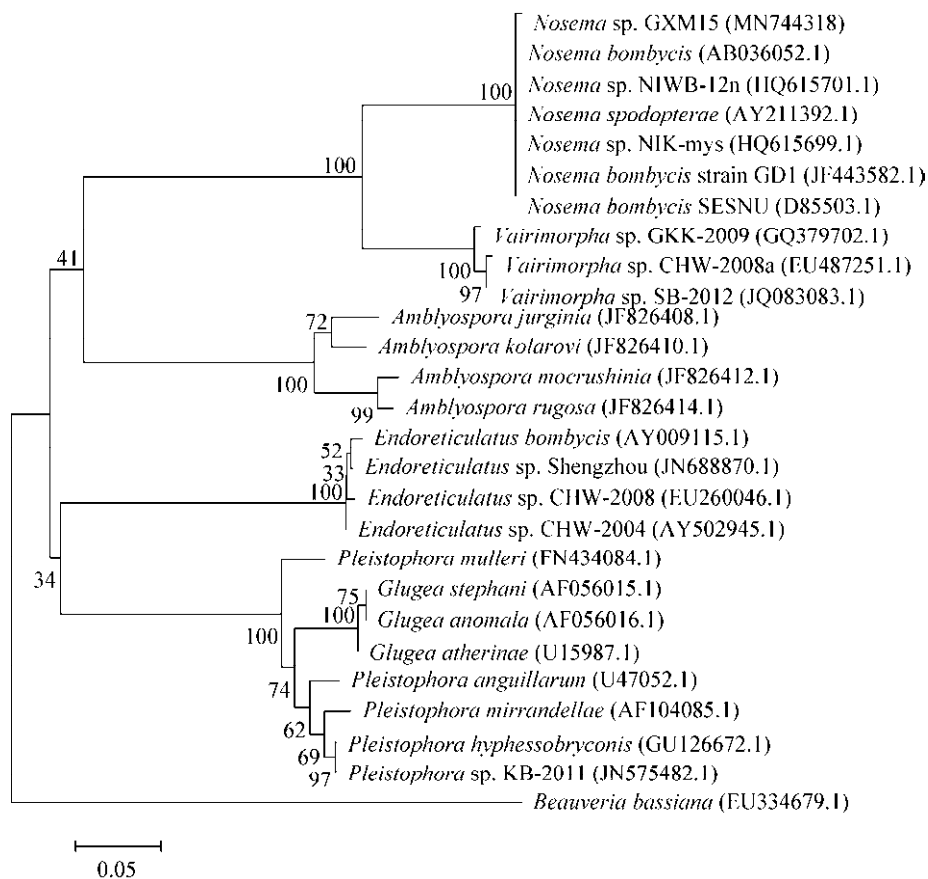


图3 GXM15微孢子虫与其他微孢子虫基于 SSU rRNA 基因序列的系统发育进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of SSU rRNA gene sequences of GXM15 and other microsporidian strains

注: 分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算形成该节点的百分比; 标尺长度代表 1% 的 SSU rRNA 基因序列的进化差异。

Note: The bootstrap values (%) presented at the branch points were calculated from 1 000 replications; The ruler length means a 1% SSU rRNA sequence difference.

表 4 GXM15 微孢子虫与其他微孢子虫的 SSU rRNA 基因序列相似性和遗传距离

Table 4 The similarity and genetic distance of SSU rRNA gene sequences of GXM15 and other microsporidian strains

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1		94.1	93.9	94.0	93.5	95.7	93.5	93.0	93.0	91.9	90.3	71.7	46.6	42.1	37.0
2	0.9		99.8	99.9	99.4	99.4	99.4	99.0	99.4	97.1	96.3	76.6	45.8	43.3	36.3
3	1.1	0.2		99.8	99.3	99.2	99.3	98.8	99.3	96.9	96.3	76.6	45.7	43.4	36.0
4	1.0	0.1	0.2		99.5	99.5	99.5	99.1	99.5	97.2	96.4	76.5	45.8	43.3	36.3
5	1.0	0.1	0.2	0.0		99.9	99.9	99.5	99.9	97.6	96.8	76.9	47.0	42.3	36.3
6	0.8	0.1	0.3	0.0	0.0		99.9	99.4	99.9	98.1	96.6	75.8	45.3	43.5	37.5
7	1.0	0.2	0.3	0.1	0.1	0.0		99.4	99.9	97.6	96.8	76.9	47.2	42.3	36.3
8	1.5	0.6	0.7	0.5	0.5	0.5	0.6		99.5	97.2	96.2	76.9	46.7	42.1	36.0
9	2.3	0.1	0.2	0.0	0.1	0.0	0.1	0.5		94.3	96.8	76.0	46.3	39.8	18.0
10	2.6	0.5	0.7	0.4	0.5	0.3	0.5	0.7	3.3		94.6	74.3	47.7	39.3	16.8
11	3.1	2.0	2.0	1.9	1.9	2.0	2.0	2.4	1.9	2.2		78.2	44.7	42.9	36.4
12	16.7	15.8	15.9	15.9	15.9	16.7	16.0	15.9	15.9	16.3	15.3		51.2	45.8	37.9
13	52.4	52.2	53.0	52.2	52.2	51.4	52.1	51.8	48.0	47.3	55.5	52.3		50.1	33.1
14	56.4	56.1	56.1	56.5	56.5	55.5	56.8	56.8	49.1	49.9	56.6	57.0	43.6		34.5
15	107.9	105.7	105.7	105.2	105.2	107.2	105.4	105.1	98.0	96.3	107.3	120.4	114.6	119.6	

Note: 1: *Nosema* sp. GXM15; 2: *Nosema* sp. PA (EU864528.1); 3: *Nosema bombycis* strain GD8 (JF443589.1); 4: *Nosema trichoplusiae* (U09282.1); 5: *Nosema spodopterae* (AY211392); 6: *Nosema bombycis* (AB036052); 7: *Nosema bombycis* (D85503); 8: *Nosema antheraeae* (EU864526); 9: *Nosema heliothidis* (FJ772435); 10: *Nosema fumiferanae* (HQ457432); 11: *Nosema furnacalis* (U26532); 12: *Vairimorpha* sp. (JQ083083); 13: *Endoreticulatus* sp. (AY502945); 14: *Amblyospora jurginia* (JF826408); 15: *Beauveria bassiana* (EU334679). Data in upper right half of the table were of sequence similarity (%) and the bottom left half were of genetic distance.

化度为 0.8, 最高相似度为 95.7%, 说明 GXM15 微孢子虫与其他微孢子虫有一定差异性。另外, 基于微孢子虫 ITS 基因序列进行相似性和遗传距离分析结果表明, GXM15 微孢子虫和熊蜂微孢子虫 (MF998087) 相似度最高达到 97.1%, 遗传距离也只有 1.8, 而 GXM15 微孢子虫与其他微孢子虫相似度很低, 均低于 50%, 遗传距离也在 12.0 以上(表 5), 说明 GXM15 微孢子虫是一种与熊蜂微孢子虫亲缘关系较近的微孢子虫, 暂时命名为 *Nosema* sp. GXM15。

3 讨论

微孢子虫传统生物学分类标准主要以孢子形态及大小、内部结构、生活史以及感染性等特征为依据, 其中极丝是微孢子虫的重要标志, *Nosema* 属微孢子虫具有主要感染寄主细胞的胞质、成熟孢子为卵圆形、有双核等特征^[22]。微孢子虫 SSU rRNA 基因和 ITS 序列是开展微孢子虫分子分类研究的重要标志 DNA 序列, 其中 SSU rRNA 基因适合用于分析微孢子虫属间的亲缘关系, 而 ITS 序列

适用于微孢子虫种的水平上的分类研究^[23]。

本实验利用微孢子虫传统生物学分类方法与分子分类信息相结合对 GXM15 微孢子虫进行分类研究。通过感染试验发现 GXM15 微孢子虫对家蚕具有较强的食下感染力, 其 IC₅₀ 为 8.29×10⁴ 个/mL, 与 Nb 处于同一级别, 但比 Nb 微孢子虫稍低; GXM15 微孢子虫对家蚕只有轻微胚种感染力, 明显低于 Nb; 而且 GXM15 微孢子虫对家蚕具有全身性感染情况, 因此说明 GXM15 微孢子虫对家蚕具有一定感染性, 是一种家蚕病原性微孢子虫。GXM15 微孢子虫形态呈短卵圆形, 体积明显比 Nb 微孢子虫大, 是一种大孢子; GXM15 微孢子虫超微结构有极丝(13 圈)和双核结构, 有 *Nosema* 属微孢子虫典型结构特征。基于 SSU rRNA 和 ITS 基因序列进行系统发育分析进一步确定 GXM15 微孢子虫是一株新的 *Nosema* 属微孢子虫, 而且 GXM15 微孢子虫与熊蜂微孢子虫具有很高的亲缘关系。同时根据蚕种生产方式以及病原性和分类地位分析推测 GXM15 微孢子虫的原始寄主不是家蚕, 而是

表5 GXM15 微孢子虫与其他微孢子虫的 ITS 片段序列相似性和遗传距离

Table 5 The similarity and genetic distance of ITS gene sequences of GXM15 and other microsporidian strains

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		97.1	24.5	25.0	28.3	27.6	25.5	26.1	23.0	27.7	40.1
2	1.8		26.0	25.5	29.3	28.1	24.5	26.1	23.5	28.7	37.8
3	13.9	13.9		96.9	90.6	95.8	88.0	85.6	87.2	71.9	91.7
4	13.9	13.9	3.2		91.6	96.9	88.5	85.6	88.2	73.4	90.6
5	13.9	13.9	6.6	5.4		94.8	87.4	86.7	86.6	73.8	84.3
6	13.9	13.9	4.3	3.2	2.7		87.5	85.1	87.2	72.9	89.6
7	13.9	13.9	3.2	2.7	6.6	3.8		88.3	84.0	77.6	81.8
8	16.1	16.1	4.5	4.5	5.0	4.4	3.9		92.0	76.6	86.7
9	16.1	16.1	5.0	3.9	7.4	5.0	5.1	5.0		74.9	85.0
10	16.1	16.1	7.5	4.2	9.8	5.2	3.1	6.4	4.2		71.3
11	14.8	13.5	6.6	7.7	11.4	8.9	7.8	6.2	6.7	8.3	

Note: 1: *Nosema* sp. GXM15; 2: *Tubulinosema* sp. Bpas2 (MF998087); 3: *Nosema bombycis* strain GD5 (JF443623); 4: *Nosema bombycis* clone 9 (EU350402); 5: *Nosema bombycis* strain GX2 (JF443601); 6: *Nosema bombycis* strain YN18 (JF443664); 7: *Nosema bombycis* clone NA6 (GQ334403); 8: *Nosema bombycis* strain GX18 (JF443617); 9: *Nosema* sp. HA (EU864524); 10: *Nosema antheraeae* (EU864521); 11: *Nosema sopdopterae* (AY747307). Data in upper right half of the table were of sequence similarity (%) and the bottom left half were of genetic distance.

某种野外昆虫, 是否是熊蜂等昆虫携带 GXM15 微孢子虫交叉感染家蚕还有待进一步的分析研究。

蚕业法规规定所有蚕种必须进行微孢子虫病检疫, 而蚕种生产中家蚕经常受到一些异型微孢子虫的感染, 这些异型微孢子虫感染力不同, 可以进行微孢子虫分类判定处理, 如广东蚕种检疫部门也依据 MG1、MG2、MG4 微孢子虫的生物学和病理学特性, 对这些异型微孢子虫采取 3-4 个有毒点作为 1 点或全部不计入毒率的方式进行分类处理, 为挽回蚕种损失起到很好的作用^[24]。因此, 根据 GXM15 微孢子虫对家蚕病原性和分类地位, 在桑蚕一代杂交种的蚕种检疫样品中检查 GXM15 微孢子虫可以采取适当的分类判定技术措施, 以达到降低蚕种淘汰率的目的; 同样地, 也可以对其他一系列异型微孢子虫进行病原性和分类地位研究, 建立分类检验判定技术, 这将对蚕种生产防控家蚕微孢子虫病具有重要意义。

4 结论

GXM15 微孢子虫是一株感染家蚕的异型微孢子虫, 其形态偏大, 与家蚕微孢子虫(Nb)形态差异明显; GXM15 微孢子虫对家蚕具有较强食下感染力, 但对家蚕胚种感染力较低; 分类鉴定表明 GXM15 微孢子虫是一株新的 *Nosema* 属微孢子虫;

在桑蚕一代杂交种蚕种检疫中 GXM15 微孢子虫适用于分类检验判定技术进行检疫判断, 将有利于减少蚕种生产损失。

REFERENCES

- [1] Zhejiang University. Histopathology of Silkworm[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 148-173 (in Chinese)
浙江大学. 家蚕病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 148-173
- [2] Lu XM, Shao YQ. A review on current status and development trend of pebrine prevention and control technology[J]. Science of Sericulture, 2016, 42(6): 945-952 (in Chinese)
鲁兴萌, 邵勇奇. 家蚕微孢子虫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] Mathis A. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms[J]. International Journal for Parasitology, 2000, 30(7): 795-804
- [4] Zhou ZY. Genome Biology of *Nosema Bombycis*[M]. Beijing: Science Press: 2014: 2-3 (in Chinese)
周泽扬. 家蚕微孢子虫基因组生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2014: 2-3
- [5] Franzen C. Microsporidia: a review of 150 years of research[J]. The Open Parasitology Journal, 2008, 2(1): 1-34
- [6] Liu JP, Zeng L. An overview of research on the microsporidian biodiversity[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2006, 43(2): 153-158 (in Chinese)
刘吉平, 曾玲. 微孢子虫生物多样性研究的述评[J]. 昆虫知识, 2006, 43(2): 153-158
- [7] Chen SL, Gao X, Zhang JX, et al. Pathogenicity of

- microsporidium isolated from *Pieris rapae* L. on silkworm in Yunnan[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(2): 913-917 (in Chinese)
- 陈世良, 高翔, 张金祥, 等. 云南菜粉蝶微孢子虫感染家蚕的病原性研究[J]. 西南农业学报, 2015, 28(2): 913-917
- [8] Kawarabata T. Biology of microsporidians infecting the silkworm, *Bombyx mori*, in Japan[J]. Journal of Insect Biotechnology and Sericulture, 2003, 72(1): 1-32
- [9] Fang DJ, Liao ST, Zheng XM, et al. Studies on morphology, pathogenicity and infection path of new *Nosema bombycis* MG₁ and MG. I. Morphology, pathogenicity and infection path[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 1991(2): 35-38 (in Chinese)
- 方定坚, 廖森泰, 郑祥明, 等. 家蚕新微孢子虫 MG₁、MG 的研究 I. 形态、病原性和传染途径[J]. 广东农业科学, 1991(2): 35-38
- [10] Wan YJ, Zhang L, Chen ZP, et al. Study of a pathogenic microsporidium SCM₇ (*Endoreticulatus* sp.) isolated from the larvae of silkworm, *Bombyx mori*[J]. Acta Sericologica Sinica, 1995, 21(3): 168-172 (in Chinese)
- 万永继, 张琳, 陈祖佩, 等. 家蚕病原性微孢子虫 SCM₇ (*Endoreticulatus* sp.) 的分离和研究[J]. 蚕业科学, 1995, 21(3): 168-172
- [11] Shen ZY, Xu L. Studies on the pathogenicity of a microsporidium MZ₁ (*Nosema* sp.) to the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Science of Sericulture, 2001, 27(3): 197-199 (in Chinese)
- 沈中元, 徐莉. 从家蚕蛾中分离的微孢子虫 MZ₁ (*Nosema* sp.) 对家蚕的病原性研究[J]. 蚕业科学, 2001, 27(3): 197-199
- [12] Pan MH, Wan YJ, Zhu RY. Studied on a microsporidium (SCM₈) pathogenic for the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Science of Sericulture, 2002, 28(2): 115-119 (in Chinese)
- 潘敏慧, 万永继, 祝仁英. 家蚕病原性微孢子虫 SCM₈ 的研究[J]. 蚕业科学, 2002, 28(2): 115-119
- [13] Shi LG, Liu SM, Xu JL. Study on a new microsporidium SLN1 isolated from the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Acta Sericologica Sinica, 2002, 28(3): 211-214 (in Chinese)
- 时连根, 刘淑梅, 徐俊良. 从家蚕体分离的一种新微孢子虫 SLN1 的研究[J]. 蚕业科学, 2002, 28(3): 211-214
- [14] Luo ML, Huang XH, Pan ZX, et al. Biological characters and molecular phylogenetic analysis of a microsporidian isolate pathogenic to *Bombyx mori*[J]. Science of Sericulture, 2012, 38(5): 856-863 (in Chinese)
- 罗梅兰, 黄旭华, 潘志新, 等. 一株家蚕病原性微孢子虫的生物学特性与分子系统发育分析[J]. 蚕业科学, 2012, 38(5): 856-863
- [15] Meng XZ, Luo B, Tang XY, et al. Pathological analysis of silkworm infected by two microsporidia *Nosema bombycis* CQ1 and *Vairimorpha necatrix* BM[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2018, 153: 75-84
- [16] Wan YJ. Study and control on several population of pathogenic microsporidian in the silkworm, *Bombyx mori* (*Bombycidae*, *Lepidoptera*)[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of University of China Agriculture, 2005: 66-72 (in Chinese)
- 万永继. 家蚕病原性微孢子虫若干种群的研究与控制[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2005: 66-72
- [17] Huang XH, Qi GJ, Tang QK, et al. Biological characters and molecular phylogenetic analysis of a microsporidium strain isolated from *Cnaphalocrocis medinalis*[J]. Science of Sericulture, 2013, 39(3): 543-550 (in Chinese)
- 黄旭华, 祁广军, 汤庆坤, 等. 从稻纵卷叶螟分离的一株微孢子虫的生物学特性与分子系统发育分析[J]. 蚕业科学, 2013, 39(3): 543-550
- [18] Huang XH, Qi GJ, Tang QK, et al. Biological characters and molecular phylogenesis of five microsporidian isolates from field insects[J]. Science of Sericulture, 2012, 38(5): 864-872 (in Chinese)
- 黄旭华, 祁广军, 汤庆坤, 等. 从野外昆虫体内分离的 5 株微孢子虫的生物学特性与分子系统发育研究[J]. 蚕业科学, 2012, 38(5): 864-872
- [19] Cai SF, He XY, He XK, et al. A protocol for fast and efficient preparation of genomic DNA and total proteins of *Nosema bombycis*[J]. Science of Sericulture, 2011, 37(6): 1019-1024 (in Chinese)
- 蔡顺风, 何欣怡, 何祥康, 等. 一种快速高效制备家蚕微孢子虫基因组 DNA 和总蛋白的方法[J]. 蚕业科学, 2011, 37(6): 1019-1024
- [20] Huang WF, Tsai SJ, Lo CF, et al. The novel organization and complete sequence of the ribosomal RNA gene of *Nosema bombycis*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41(5): 473-481
- [21] Dong SN, Zhu F, Xu L, et al. Sequence and phylogenetic analysis of SSU rRNA gene of seven microsporidia[A]//Proceedings of Sixth Youth Academic[C]. Yangling: Chinese Society of Sericultural Science, 2009: 1-23 (in Chinese)
- 董世楠, 朱峰, 徐莉, 等. 七种微孢子虫核糖体小亚基基因 (SSU rRNA) 的克隆及其系统发育分析[A]//中国蚕学会第六届青年学术研讨会论文集[C]. 杨凌: 中国蚕学会, 2009: 1-23
- [22] Kakuda T, Shiki M, Kubota S, et al. Phylogeny of benign *Theileria* species from cattle in Thailand, China and the U.S.A. based on the major piroplasm surface protein and small subunit ribosomal RNA genes[J]. International Journal for Parasitology, 1998, 28(8): 1261-1267
- [23] Niu QL, Luo JX, Yin H. Advances and application of rDNA-ITS in the molecular taxonomy of parasite[J]. Chinese Journal of Veterinary Parasitology, 2008, 16(4): 41-47 (in Chinese)
- 牛庆丽, 罗建勋, 殷宏. 转录间隔区 (ITS) 在寄生虫分子生物学分类中的应用及其进展[J]. 中国兽医寄生虫病, 2008, 16(4): 41-47
- [24] Zheng XM, Yang Q, Huang BH, et al. Study on a microsporidian *Vairimorpha* MG₄ separated from silkworm, *Bombyx mori*[J]. Acta Sericologica Sinica, 1999, 25(4): 225-229 (in Chinese)
- 郑祥明, 杨琼, 黄炳辉, 等. 家蚕分离的微孢子虫 *Vairimorpha* sp. MG₄ 的研究[J]. 蚕业科学, 1999, 25(4): 225-229