

从广西蚕区分离的家蚕质型多角体病毒生物学特征研究

陆方苗^{1,2}, 方文暄³, 韦善教², 全诚², 韦魄², 董战旗³, 黄深惠¹, 蒋满贵¹, 陈小青¹, 黄旭华^{*1}

1 广西蚕业科学研究所, 广西 南宁 530007

2 环江毛南族自治县农业农村局, 广西 河池 547100

3 西南大学资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 重庆 400715

陆方苗, 方文暄, 韦善教, 全诚, 韦魄, 董战旗, 黄深惠, 蒋满贵, 陈小青, 黄旭华. 从广西蚕区分离的家蚕质型多角体病毒生物学特征研究[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 250-261.

LU Fangmiao, FANG Wenxuan, WEI Shanjiao, QUAN Cheng, WEI Po, DONG Zhanqi, HUANG Shenhui, JIANG Mangui, CHEN Xiaoqing, HUANG Xuhua. Biological characteristics of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV) isolated from the sericultural region of Guangxi[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 250-261.

摘要:【背景】家蚕中肠型脓病是一种传染性强、危害大的病毒病, 其病原为家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV), 该病原抗逆性强、宿主域广, 防控难度大。

【目的】调查广西蚕区家蚕中肠型脓病发生情况, 并研究家蚕质型多角体病毒的感染性、形态特征和分子鉴定, 为养蚕生产中有效防控该病提供参考依据。【方法】通过外观和解剖观察病症与显微镜检验相结合, 调查养蚕生产家蚕中肠型脓病的发生率; 采用生物试验方法测定多角体病毒对家蚕的半数感染浓度(IC_{50}); 利用光学显微镜和扫描电镜观察多角体病毒的外部形态, 利用透射电子显微镜观察多角体病毒的内部结构; 采用 PCR 扩增和测序进行分子鉴定。【结果】广西蚕区家蚕中肠型脓病普遍存在, 金城江蚕区和东兰蚕区的家蚕中肠型脓病平均发生率分别为 6.06%和 13.02%, 最高发生率达到 30.41%; 分离获得 2 株 BmCPV 病原(暂命名为 BmCPV-J 和 BmCPV-D), 它们的半数感染浓度(IC_{50})分别为 4.88×10^3 PIBs/mL 和 1.63×10^4 PIBs/mL, 都具有很强的致病性; 2 株 BmCPV 的形态均为六角形多角体, 大小有差异, 多角体直径为 1.0–3.4 μ m; 从 2 株 BmCPV 内部结构观察到球形病毒粒子, 直径为 30–50 nm, 有刺状突起; 可以扩增出 BmCPV-J 和 BmCPV-D 的 RNA 复制酶基因目的片段, BmCPV-J 的目的片段序列与 BmCPV 参考株一致, 而 BmCPV-D 的

资助项目: 国家自然科学基金(32060777); 广西壮族自治区桑蚕产业创新团队病虫害防治岗位项目(Nnycytxgxcxtd-2021-02-04); 广西壮族自治区农业科技项目(Z202041)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060777), the Project of Pests and Diseases Control Post of Innovation Team of Sericulture in Guangxi Zhuang Autonomous Region (Nnycytxgxcxtd-2021-02-04), and the Project of Agricultural Science and Technology in Guangxi Zhuang Autonomous Region (Z202041).

*Corresponding author. E-mail: hgjsoil@163.com

Received: 2023-06-09; Accepted: 2023-09-06; Published online: 2023-10-27

目的片段序列与参考株有 2 个碱基的差异。【结论】广西蚕区家蚕中肠型脓病危害严重，该病病原感染力强、分布广，多角体病毒具有典型的质型多角体病毒特征，属于家蚕质型多角体病毒。研究结果为养蚕生产中有效防控家蚕中肠型脓病提供重要依据。

关键词：家蚕；质型多角体病毒；感染性；生物学特征；分子鉴定

Biological characteristics of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV) isolated from the sericultural region of Guangxi

LU Fangmiao^{1,2}, FANG Wenxuan³, WEI Shanjiao², QUAN Cheng², WEI Po²,
DONG Zhanqi³, HUANG Shenhui¹, JIANG Mangui¹, CHEN Xiaoqing¹, HUANG Xuhua^{*1}

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

2 Bureau of Agriculture and Rural Affairs of Huanjiang Maonan Autonomous County, Hechi 547100, Guangxi, China

3 State Key Laboratory of Resource Insects, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Background] Silkworm (*Bombyx mori*) midgut polyhedrosis is a highly infectious and harmful viral disease caused by *B. mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV). Which virus has strong resistance, a wide host range, and is difficult to control and prevent. [Objective] To investigate the occurrence of silkworm midgut polyhedrosis in the sericultural region of Guangxi and study the pathogenicity, morphological characteristics, and molecular information of BmCPV, so as to provide a basis for the effective control of silkworm midgut polyhedrosis. [Methods] The anatomical and microscopic examinations of the diseased silkworm were combined to reveal the incidence of silkworm midgut polyhedrosis, and the median infectious concentration (IC_{50}) of BmCPV on silkworm was investigated via biological tests. The external morphology of BmCPV was observed by optical microscopy and scanning electron microscopy, and the internal structure by transmission electron microscopy. PCR amplification and sequencing were employed to identify the BmCPV. [Results] Silkworm midgut polyhedrosis was prevalent in the sericultural region of Guangxi, with the incidence rate of 6.06% and 13.02% in Jinchengjiang and Donglan, respectively, and the highest incidence of 30.41%. Two BmCPV strains, BmCPV-J and BmCPV-D, were isolated from the diseased silkworm in the two sericultural regions, with the IC_{50} of 4.88×10^3 PIBs/mL and 1.63×10^4 PIBs/mL, respectively, which indicated strong pathogenicity. BmCPV-J and BmCPV-D were hexagonal polyhedra with the diameters of 1.0–3.4 μm , differences in size between polyhedra, the spherical virion diameters of 30–50 nm, and spiny protuberances. PCR was conducted with the primers designed based on the RNA replicase gene of BmCPV. The fragment of BmCPV-J was identical with that of BmCPV reference strain, while that of BmCPV-D had two base differences. [Conclusion] Silkworm midgut polyhedrosis is a serious disease in the sericultural

region of Guangxi, and its pathogen has strong infectivity and wide distribution. BmCPV-J and BmCPV-D with typical characteristics of CPV which belong to BmCPV. The results provide an important basis for the effective control of silkworm midgut polyhedrosis.

Keywords: *Bombyx mori*; cytoplasmic polyhedrosis virus; infectivity; biological characteristics; molecular identification

家蚕中肠型脓病是养蚕生产中一种重要的病毒病,其病原为家蚕质型多角体病毒(*Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus, BmCPV),属于呼肠孤病毒科(Reoviridae)质型多角体病毒属(Cypovirus),是一种典型的单层衣壳 dsRNA 病毒^[1]。除了具有一般昆虫病毒的致病力强、抗逆性强和生产简便等特点^[2]外, BmCPV 病原还有一些重要的特征。(1) BmCPV 有多角体蛋白外壳保护^[3],能够较强抵御一些环境因子和消毒剂的破坏,如氯溴异氰尿酸药液(0.125 g/L)、二溴海因药液(0.5 g/L)等酸性消毒液对 BmCPV 无消毒效果^[4-5],所以 BmCPV 能够长时间残留在环境中。(2) BmCPV 专性寄生于家蚕中肠细胞,在细胞质内繁殖^[6],当病毒充满细胞后就破裂,使多角体、病毒粒子随蚕粪便排出体外,在家蚕群体内水平传播,即蚕座传染,而且家蚕中肠型脓病属于慢性传染病,病程长(7-12 d),病毒排出时间长,也增强了蚕座传染危害程度^[7]。(3) BmCPV 宿主域广,已经发现 BmCPV 能够感染 20 种昆虫,这些昆虫可以作为 BmCPV 的蓄池,使 BmCPV 能够重新感染家蚕;另外已经发现的约 250 种昆虫 CPV 中有 80%为鳞翅目昆虫病毒,其中 18 种以上昆虫 CPV 能够感染家蚕^[8],如日本胡椒蛾 CPV (BrCPV-24)^[9]、美国白蛾 CPV^[10]、棉铃虫 CPV^[11]等病原可以感染家蚕,形成交叉感染性,所以家蚕中肠型脓病病原来源广泛。综上可知,这些特征增强了 BmCPV 病原感染性,导致家蚕中肠型脓病对蚕业生产危害严重,该病害一旦发生就会给养蚕业造成重大的经济损失。

目前,广西是世界重要的蚕茧生产基地,家蚕饲养量占全国总量的 50%以上,是桑蚕业历史上少有的高度集中养蚕区域,所以家蚕传染病危害的风险很大。近些年,广西蚕区养蚕生产中经常出现一种蚕农称之为“铁蚕”的怪病,症状是蚕群体发育不齐、大小参差、越养越小、光吃叶不吐丝营茧,因染病蚕体瘦小、长不大、呈黄褐色,类似铁块而被称为“铁蚕”,“铁蚕”的发生造成养蚕损失惨重甚至绝收,经初步鉴定是家蚕中肠型脓病病蚕^[12]。忻城县也曾经大范围发生家蚕中肠型脓病,使 4 000 多户蚕农遭受了严重的经济损失^[13]。有关广西蚕区家蚕质型多角体病毒(BmCPV)的研究较少,鲜有 BmCPV 种类、生物学特征的报道,非常不利于养蚕生产中有效防治家蚕中肠型脓病。因此,本文在广西蚕区调查养蚕生产中“铁蚕”发生情况,并研究 BmCPV 感染性和生物学特征,以期对养蚕生产中控制家蚕中肠型脓病的危害提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

pEASY[®]-T1 Simple Cloning Kit, 天根生化科技(北京)有限公司; RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒和 PrimeScript[™] One Step RT-PCR Kit Ver. 2, TaKaRa 公司; PCR 引物,由北京六合华大基因科技有限公司合成;胶回收胶试剂盒,上海研拓生物科技有限公司。PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司; 相差显微镜, 尼康公司; 扫描电子显微镜和透射电子显微镜, 电子株式会社。

1.2 供试家蚕品种

试验家蚕品种为 932×芙蓉, 由广西壮族自治区蚕业技术推广站提供。

1.3 蚕区养蚕生产家蚕中肠型脓病发生率调查

2022 年 9 月在广西河池市金城江蚕区和东兰蚕区饲养的家蚕中调查“空头”、体躯瘦小、吐液及下痢等症状的病蚕, 并采集病蚕样品进行显微镜检测。每个蚕区选择 5 户蚕农进行调查, 在约 1.0 m² 蚕座面积里调查家蚕总数及病蚕头数, 调查各户饲养的家蚕中肠型脓病发生率。

1.4 多角体病毒分离、繁殖和纯化

将在 2 个蚕区收集获得的病蚕进行解剖, 获取白色褶皱的中肠组织, 用灭菌水冲洗干净, 研磨, 匀浆液经四层纱布过滤后用离心法(3 000 r/min, 5 min)收集离心管底部白色多角体病毒, 用灭菌水稀释, 将多角体病毒悬浮液接种家蚕 4 龄起蚕, 然后在常规条件下饲养, 观察家蚕发病症状。收集病蚕, 再解剖蚕体获取中肠组织, 研磨、过滤、离心收集多角体病毒^[14], 分别在 2 个蚕区的病蚕样品中取代表性多角体病毒各 1 株, 暂时命名为 BmCPV-J 和 BmCPV-D。

1.5 两株多角体病毒对家蚕食下感染力测定

分别将 BmCPV-J 和 BmCPV-D 配制成 10⁸ PIBs/mL 的多角体病毒悬浮液, 再利用无菌水以 10 倍倍比梯度稀释成 5 个系列稀释液(10⁷、10⁶、10⁵、10⁴ 和 10³ PIBs/mL)。分别取各种浓度的多角体病毒悬浮液 0.2 mL, 均匀涂抹于一片桑叶叶片(面积为 16.0 cm²)上, 饲喂一区 2 龄起蚕(30 头) 12 h, 重复 2 区。各区蚕吃完含有多角体病毒的桑叶后更换蚕座纸片, 改用洁净桑叶饲养, 每天饲喂桑叶 3 次, 饲喂桑叶前清除蚕粪, 利用新鲜石灰粉进行蚕体蚕座消毒。自接毒饲养后第 3 天始观察家蚕症状, 每 24 h 检查统计死亡数。饲养至 12 d (5 龄第 2 天), 对各区每头家

蚕(包括死蚕)进行显微镜检验, 计算各区家蚕的多角体病毒感染率, 用 Reed-Muench 法计算 BmCPV-J 和 BmCPV-D 对家蚕的半数感染浓度(IC₅₀)^[15]。

1.6 两株多角体病毒外部形态观察

1.6.1 光学显微镜观察

分别将 BmCPV-J 和 BmCPV-D 多角体病毒悬浮液做成水玻片标本, 利用相差显微镜观察多角体病毒形状。

1.6.2 扫描电镜观察

多角体病毒样品处理过程: (1) 取材-固定: 分别取 BmCPV-J 和 BmCPV-D 多角体病毒悬浮液 1.0 mL (1.0×10⁸ PIBs/mL)离心(3 000 r/min, 5 min), 去掉上清, 加入 1.0 mL 3%戊二醛悬浮, 4 °C 保存 24 h。(2) 后固定: 用超纯水(ultrapure water, UP 水)清洗 3 次, 每次 10 min, 加入 1% 锇酸室温下固定 2 h, 再用 UP 水清洗 3 次, 每次 10 min。(3) 脱水: 酒精逐级脱水, 脱水剂浓度梯度为 30%→50%→70%→80%→90%→95%→100% (100%浓度换 3 次), 每次 15 min。(4) 导电处理: 用移液枪将样品滴加到玻片上, 将玻片轻轻粘在导电胶上, 将样品放入离子溅射仪进行喷镀处理。(5) 观察: 采用扫描电镜对样品进行图像采集, 选择要观察的区域采集图片, 观察具体结构。

1.7 两株多角体病毒内部结构观察

多角体病毒样品处理过程: (1) 取材-固定: 分别取 BmCPV-J 和 BmCPV-D 多角体病毒悬浮液 1.0 mL (1.0×10⁸ PIBs/mL), 3 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清, 加入 1.0 mL 3%戊二醛悬浮, 预固定 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) 后固定: 用 3%戊二醛浸泡 12 h, 用 UP 水清洗 6 次, 每次 10 min, 再加入 1%四氧化锇固定 24 h。(3) 脱水: 利用丙酮逐级脱水, 脱水剂浓度梯度为 30%→50%→

70%→80%→90%→95%→100% (100%浓度换3次)。(4) 渗透和包埋: 脱水剂和 Epon812 包埋剂体积比例分别为 3:1、1:1、1:3, 最后利用 Epon812 包埋。(5) 超薄切片: 采用超薄切片机制备约 60–90 nm 超薄切片, 展片, 再捞至铜网。(6) 染色: 先用醋酸铀染色 10–15 min, 再用柠檬酸铅染色 2 min, 室温下染色。(7) 观察: 采用透射电镜对铜网进行图像采集, 先用 6 000 倍观察, 选择适合的区域采集图片, 再放大观察具体结构。

1.8 两株多角体病毒分子检测

1.8.1 病毒基因组 dsRNA 的制备及 cDNA 合成

病毒基因组 dsRNA 的制备参照 RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒操作说明书进行。分别取 BmCPV-J 和 BmCPV-D 多角体病毒悬浮液 1.0 mL (1.0×10^8 PIBs/mL), 3 000 r/min 离心 5 min 后弃上清, 加入 600 μ L 的 TRIzol 振荡 30 min; 加入 120 μ L 氯仿, 充分混合, 静置 5 min。以 12 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 取上清液。加入 300 μ L 异丙醇, 充分混匀, 静置 10 min; 再以 12 000 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 弃上清, 加入 600 μ L 的 80% 乙醇(-20 $^{\circ}$ C 预冷), 清洗 RNA 沉淀及离心管壁, 再以 7 500 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 弃上清, 室温下干燥 5 min, 向离心管中加入 30 μ L 的 RNA-free 水溶解 RNA, -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

基因组 cDNA 合成按照 PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit Ver. 2 操作说明书进行。在无 RNA 酶的 PCR 管中加入 gDNA Eraser 1 μ L、5 \times gDNA Eraser Buffer 2 μ L、RNA 2 μ g, 再加入 RNase Free H₂O 补足 10 μ L。将反应体系置于 42 $^{\circ}$ C 恒温反应 2 min 后迅速置于 4 $^{\circ}$ C; 再在离心管中加入 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μ L、5 \times PrimeScript Buffer 24 μ L、RT Primer Mix 4 μ L、RNase Free H₂O 1 μ L。将离心管放入 PCR 仪中, 37 $^{\circ}$ C 30 min 后 85 $^{\circ}$ C 5 s, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.8.2 多角体病毒基因组目的片段克隆

参照文献[16]选择 RNA 病毒保守的 RNA 依

赖的 RNA 聚合酶(RDRP)基因(GenBank 序列号: GQ924586)为对象, 利用 Primer 5.0 软件(<http://www.premier-biosoft.com/primerdesign/index.html>)设计特异性引物 BmCPV-F (5'-GCGCTTTTAC TCATTATACG-3')和 BmCPV-R (5'-ATCCTCGC CACTGTAGTCCG-3')。以合成的 2 株多角体病毒 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): dNTP Mixture 4 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 10 \times ExTaq Buffer 5 μ L, ExTaq 酶(5 U/ μ L) 0.25 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ L, 模板 cDNA 0.75 μ L, ddH₂O 36 μ L。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 56 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 利用胶回收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北京六合华大基因科技有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 两个蚕区的家蚕质型多角体病发生率和症状

分别在河池市金城江蚕区和东兰蚕区各 5 户蚕农饲养的家蚕中调查多角体病毒感染的病害发生率。结果见表 1, 两个蚕区农户饲养的家蚕均发生一定程度的“空头”、体躯瘦小、吐液及下痢等症的病害(图 1A、1B), 金城江区的发生率为 3.65%–10.85%, 平均发生率为 6.06%; 东兰蚕区的发生率为 6.91%–30.41%, 平均发生率为 13.02%。

解剖观察到病蚕中肠空虚、乳白(图 1C), 有的病蚕中肠后端有乳白色褶皱, 显微镜检验可见大量六角形多角体; 但患病家蚕的血液澄清, 显微镜检验血液和肌肉组织均未发现多角体病毒。

表 1 广西蚕区家蚕中肠型脓病发生率

Table 1 The incidence of midgut polydhedrosis in Guangxi silkworm rearing area

District	Farmer	Number of silkworm	Number of infecting silkworm	Infected rate (%)
Jinchengjiang	Farmer 1	663	31	4.67
	Farmer 2	562	61	10.85
	Farmer 3	581	41	7.05
	Farmer 4	712	26	3.65
	Farmer 5	685	35	5.11
	Total	3 203	194	6.06
Donglan	Farmer 1	536	163	30.41
	Farmer 2	569	83	14.58
	Farmer 3	673	61	9.06
	Farmer 4	651	45	6.91
	Farmer 5	705	56	7.94
	Total	3 134	408	13.02

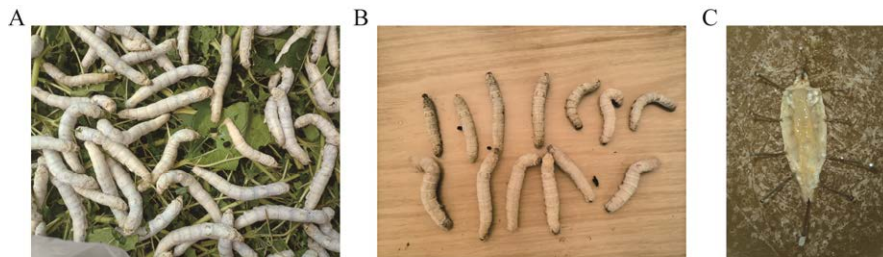


图 1 病蚕外部形态特征(A、B)和中肠病变(C)

Figure 1 Morphology (A, B) and midgut pathological changes (C) of diseased silkworms.

2.2 两株多角体病毒对家蚕的半数感染浓度 IC_{50}

两株 BmCPV 对家蚕的食下感染力见表 2。BmCPV-J 和 BmCPV-D 的 IC_{50} 分别为 4.88×10^3 PIBs/mL 和 1.63×10^4 PIBs/mL, 有一定差

异, BmCPV-J 感染力较强; 2 株 BmCPV 在 10^4 PIBs/mL 浓度添食区, 第 3 天即有大小差异群体症状; 在 10^6 PIBs/mL 浓度添食区第 5 天即有大量死蚕。因此, BmCPV-J 和 BmCPV-D 对家蚕具有较强的食下感染力。

表 2 BmCPV-J 和 BmCPV-D 对家蚕的食下感染力调查

Table 2 Peroral infection of BmCPV-J and BmCPV-D to silkworm (*Bombyx mori*)

Number of silkworm	Dilution factor of BmCPB-J (PIBs/mL)	Infected rate of BmCPV-J (%)	Dilution factor of BmCPB-D (PIBs/mL)	Infected rate of BmCPV-D (%)
90	3.21×10^7	100.00	7.90×10^7	100.00
90	3.21×10^6	100.00	7.90×10^6	100.00
90	3.21×10^5	100.00	7.90×10^5	100.00
90	3.21×10^4	90.00	7.90×10^4	86.67
90	3.21×10^3	44.44	7.90×10^3	35.56

2.3 两株多角体病毒形态

2.3.1 光学显微镜观察结果

由图 2 可知, BmCPV-J 和 BmCPV-D 多角体病毒的形状均为六角形, 有大小不一的情况; 在相差显微镜下折光性强, 呈淡黄色。

2.3.2 扫描电镜观察结果

由图 3 可知, 通过扫描电镜观察进一步确定

BmCPV-J 和 BmCPV-D 多角体病毒的形状均为六角形, 形态完整, 轮廓清晰, 呈正二十面体球形, 但大小存在差异。BmCPV-J 多角体直径为 1.0–3.4 μm , BmCPV-D 多角体直径为 1.0–2.7 μm ; 2 株多角体病毒的表面有不规则圆形小孔和颗粒突起。

2.4 两株多角体病毒内部结构

由图 4 可知, BmCPV-J 和 BmCPV-D 多角

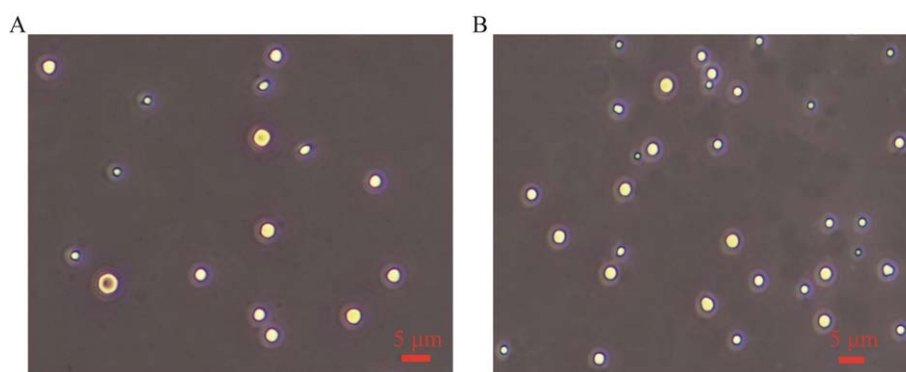


图 2 相差显微镜观察 BmCPV 形态 A: BmCPV-J 形态. B: BmCPV-D 形态

Figure 2 Observation of BmCPV morphology under phase contrast microscope. A: The shape of BmCPV-J. B: The shape of BmCPV-D.

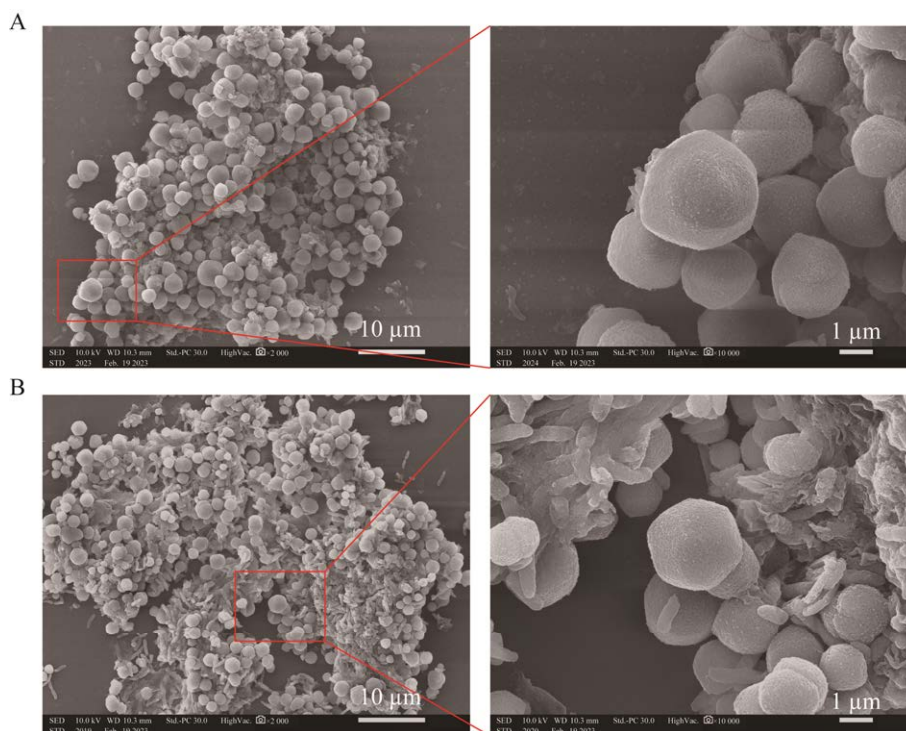


图 3 扫描电子显微镜观察 BmCPV 形态 A: BmCPV-J 形态. B: BmCPV-D 形态

Figure 3 Morphology of BmCPV observed by scanning electron microscope. A: The shape of BmCPV-J. B: The shape of BmCPV-D.

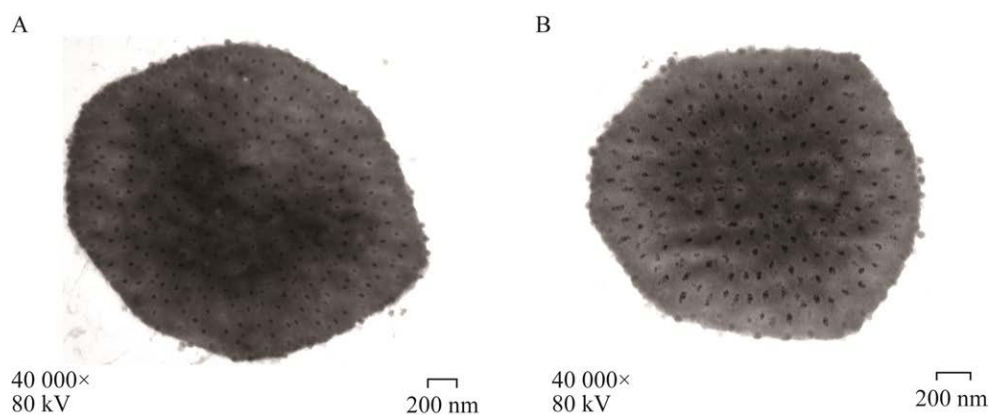


图4 透射电镜观察 BmCPV 内部结构 A: BmCPV-J 内部结构. B: BmCPV-D 内部结构.

Figure 4 Observation of the ultrastructure of BmCPV by transmission electron microscopy. A: Ultrastructure of BmCPV-J. B: Ultrastructure of BmCPV-D.

体中均包埋着许多呈球形的病毒粒子,大小基本一致,直径约 30–50 nm,有序规则排列于呈二十面体的多角体内,每个病毒粒子占据空间宽度约 112.5 nm、空间体积约 $7.455 \times 10^5 \text{ nm}^3$,因此以 BmCPV 多角体直径 1.0–3.4 μm 范围计算,则每个多角体内有 700–28 000 个病毒粒子,由多角体大小而定;在多角体内部结构平面图上观察到每个病毒粒子有 1–2 个刺状突起,这些刺状突起是病毒感染寄主细胞的关键结构;病毒粒子无囊膜。由超微结构观察发现 BmCPV-J 和 BmCPV-D 病毒均具有典型的质型多角体病毒(CPV)特征。

2.5 两株 BmCPV 分子鉴定结果

以 BmCPV 特异性引物进行 PCR 扩增获得目的条带(图 5),测序后获得 BmCPV-J 和 BmCPV-D 目的片段的碱基长度分别为 203 bp 和 204 bp。经过比对, BmCPV-J 目的片段序列与已知 BmCPV 一致,而 BmCPV-D 与已知 BmCPV 序列有 2 个碱基差异(图 6),进一步证明 2 株多角体病毒属于家蚕质型多角体病毒(BmCPV),而且是不同株 BmCPV。

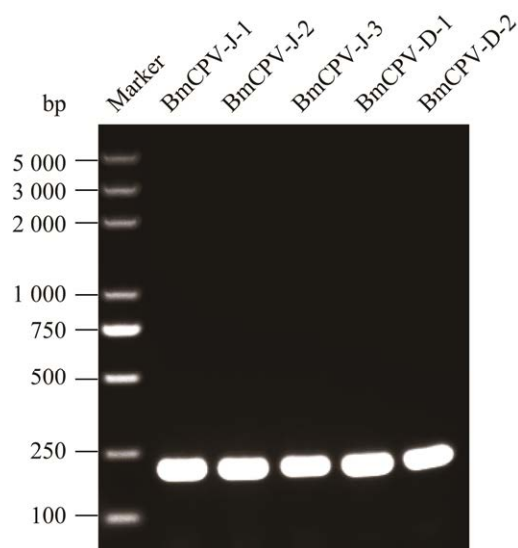


图5 BmCPV-J 和 BmCPV-D 的 PCR 扩增产物电泳图

Figure 5 Electrophoresis of PCR amplified products of BmCPV-J and BmCPV-D.

3 讨论与结论

2022 年秋蚕饲养期,在桂北蚕区发现一种“空头”症状的病蚕,100%调查户有“空头”病蚕发生,而且“空头”病蚕发生率明显高于江苏省蚕区报道的家蚕中肠型脓病发病率^[17]。具有“空头”

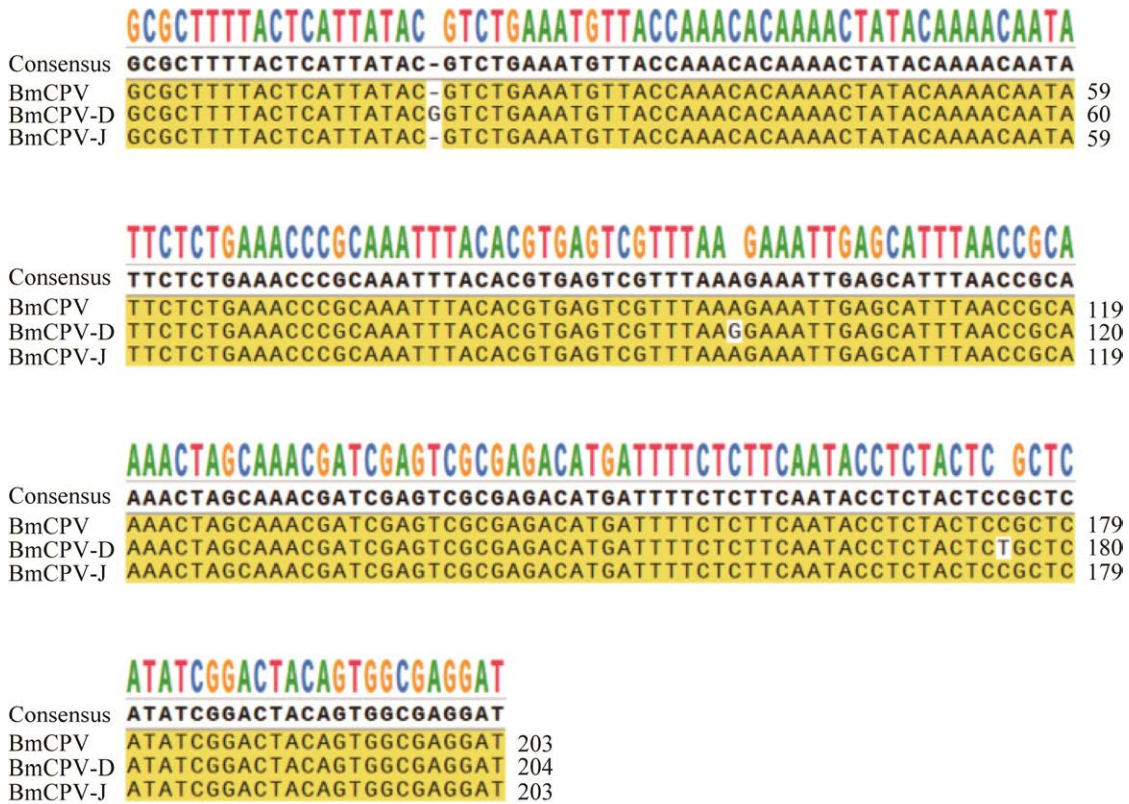


图 6 BmCPV-J 和 BmCPV-D 与已知 BmCPV 的序列比对图

Figure 6 The alignment diagram of objective sequence of BmCPV-J, BmCPV-D and reference BmCPV strain.

症状的蚕病种类有家蚕浓核病、中肠型脓病、微粒子病和细菌性肠道病^[18]，为了准确验证该病害种类，从“空头”病蚕中分离到了 2 株质型多角体病毒株，2 株质型多角体病毒对家蚕感染力显著高于广西蚕区实验室保存株^[19]，说明养蚕生产上收集的多角体病毒具有更强的致病力，可能是病毒连续性感染后使基因组变异或重组而增强毒力^[20]。相比长江流域蚕区全年只养蚕 4-5 批^[21]，广西蚕区全年可以养蚕 10-12 批，形成养蚕批次密、经常有多批蚕在时间上存在重叠饲养的情况，使环境中病原不断累积污染，在家蚕群体中形成严重的垂直感染或水平感染^[22]，增强家蚕质型多角体病毒的感染性。

BmCPV 基因组由 10 个 RNA 片段组成，其中 S10 片段编码多角体蛋白(polyhedrin)^[23]，多角体蛋白组成三聚体结构，各个三聚体再通过非

共价相互作用交联形成超稳定和密封的三维立方晶体，保护内部病毒粒子免受环境损害，可以长期存在养蚕环境中并保存传染性，这是造成养蚕生产大量损失蚕茧的原因^[3]。BmCPV 多角体有六角形、四角形和三角形等形态，是由多角体基因的 N-末端和 C-末端突变而改变多角体形态和结晶方式^[24]。六角形多角体被认为是野生株，四角形、三角形多角体是变异株，病毒变异株和野生株之间的生物学特性、超微结构及组成有差异^[25]。因此，BmCPV-J 和 BmCPV-D 属于野生株，而 2004 年广西忻城蚕区发生的家蚕中肠型脓病病原呈四角形多角体^[13]，属于变异株，可见在广西蚕区已经长期分布有 BmCPV 野生株和变异株。BmCPV-J 和 BmCPV-D 的多角体均呈现大小差异大的情况，因为 CPV 病毒基因组为 dsRNA，突变率较大，表达的多角体蛋白也

容易发生变异,造成BmCPV多角体形状多态性^[26]。多角体内 BmCPV 病毒粒子呈六角形正二十面体球形,在二十面体顶点上具有12条塔状突起^[27],观察到BmCPV-J和BmCPV-D病毒粒子呈球状,平面图上也观察到1-2个刺状突起,这些刺状突起是病毒识别、感染寄主细胞的关键结构。因此,根据形态和结构观察可以看出 BmCPV-J 和 BmCPV-D 均具有质型多角体病毒(CPV)典型特征,属于昆虫 CPV 病毒。

在生物界,病原跨种交叉感染会加大病害暴发和流行风险^[28],据报道质型多角体病毒(CPV)在各种昆虫间存在交叉传染性^[8],特别是广西蚕区家蚕饲养量大,桑园害虫和野外昆虫繁殖旺盛,会增大病原交叉感染概率^[29]。质型多角体病毒(CPV)传统生物学分类方法是根据基因组dsRNA的电泳图谱分成20种类型^[30]。目前,对病毒RNA序列进行分子鉴定已经是重要的CPV分类方法^[31],有助于判定家蚕是2株CPV病毒的原始宿主还是替代宿主的重要方式。有研究已经完成 BmCPV1-I^[32]、BmCPV1-Yunnan^[33]和 BmCPV-SZ^[34]全基因组序列测序分析,松毛虫^[35]、日本胡椒蛾^[9]、冬蛾毛虫^[36]和夹竹桃天蛾^[37]等很多昆虫 CPV 基因组也已经完全或部分测序,有助于开展昆虫 CPV 分子鉴定。质型多角体病毒(CPV) RNA 复制酶基因序列高度保守,是病毒株系间分子鉴定的候选基因^[16],选择该基因序列为模板设计特异性引物,并对 BmCPV-J 和 BmCPV-D 病毒核酸进行 PCR 检测,获得与预期目标片段相符的特异性扩增带,进一步证明这2株多角体病毒为 BmCPV 病毒,家蚕是2株病毒的原始宿主。BmCPV-D 和与 BmCPV-J 和参考株的目的片段上有2个位点发生突变,推测是2株不同的家蚕质型多角体病毒。在广西蚕区家蚕和其他昆虫间的质型多角体病毒(CPV)是否存在交叉感染有待进行 BmCPV 病毒全基因组

测序及深入调查昆虫 CPV 种类。

通过本研究确定该蚕病为家蚕中肠型脓病,根据 BmCPV 病原特征采取针对性的防控措施为:养蚕生产前、后应用碱性消毒药(如漂白粉、石灰粉等)进行消毒有效杀灭 BmCPV 病原;养蚕生产过程中使用石灰粉进行蚕体蚕座消毒阻断 BmCPV 病原蚕座传染;加强桑园虫害防治,切断野外昆虫携带多角体病毒交叉感染家蚕等,才能有效防控家蚕中肠型脓病发生,保障养蚕安全生产。

REFERENCES

- [1] GUO R, CAO GL, XUE RY, KUMAR D, CHEN F, LIU W, JIANG Y, LU YH, ZHU LY, LIANG Z, KUANG SL, HU XL, GONG CL. Exogenous gene can be expressed by a recombinant *Bombyx mori* cypovirus[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(3): 1367-1379.
- [2] 周利飞, 杨德军. 昆虫病毒杀虫剂的研究概况[J]. 植物医生, 2007, 20(3): 8-9.
ZHOU LF, YANG DJ. Generalsituation of research on insect virus insecticides[J]. Plant Doctor, 2007, 20(3): 8-9 (in Chinese).
- [3] COULIBALY F, CHIU E, IKEDA K, GUTMANN S, HAEBEL PW, SCHULZE-BRIESE C, MORI H, METCALF P. The molecular organization of cypovirus polyhedra[J]. Nature, 2007, 446(7131): 97-101.
- [4] 李云芝, 刘文光, 石瑞常, 顾寅钰, 胡自江, 衣葵花, 朱红. 氯溴异氰尿酸及其复配药液对家蚕主要病原体的消毒效果试验[J]. 蚕业科学, 2013, 39(1): 76-80.
LI YZ, LIU WG, SHI RC, GU YY, HU ZJ, YI KH, ZHU H. Disinfection effect of chloroisobromine cyanuric acid and its compound drug solution on main pathogens of silkworm, *Bombyx mori*[J]. Science of Sericulture, 2013, 39(1): 76-80 (in Chinese).
- [5] 李云芝, 刘文光, 石瑞常, 衣葵花, 顾寅钰, 胡自江. 二溴海因药液对家蚕真菌病和病毒病主要病原体的消毒效果试验[J]. 蚕业科学, 2010, 36(6): 1052-1055.
LI YZ, LIU WG, SHI RC, YI KH, GU YY, HU ZJ. Disinfection effect of dibromodimethyl hvdantoin on the main pathogens of fungous and viral diseases in silkworm, *Bombyx mori*[J]. Science of Sericulture, 2010, 36(6): 1052-1055 (in Chinese).
- [6] GUO JY, WANG YS, CHEN T, JIANG XX, WU P, GENG T, PAN ZH, SHANG MK, HOU CX, GAO K, GUO XJ.

- Functional analysis of a miRNA-like small RNA derived from *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. *Insect Science*, 2020, 27(3): 449-462.
- [7] 唐旭东, 沈中元. 家蚕中肠型脓病的发生规律及防治技术[J]. *中国蚕业*, 2010, 31(3): 86-88.
TANG XD, SHEN ZY. Occurrence regularity and control techniques of midgut purulent disease in silkworm[J]. *China Sericulture*, 2010, 31(3): 86-88 (in Chinese).
- [8] 赵同海, 陈昌洁, 徐静, 张青文. 松毛虫质型多角体病毒的宿主域与交叉感染[J]. *昆虫学报*, 2004, 47(1): 117-123.
ZHAO TH, CHEN CJ, XU J, ZHANG QW. Host range and cross infection of cytoplasmic polyhedrosis viruses from *Dendrolimus* spp.[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2004, 47(1): 117-123 (in Chinese).
- [9] TAKATSUKA J. A new cypovirus from the Japanese peppered moth, *Biston robustus*[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2020, 174: 107417.
- [10] 郑小坚, 张爱华. 家蚕质型多角体病毒研究的若干新进展[J]. *江苏蚕业*, 2004, 26(2): 14-17.
ZHENG XJ, ZHANG AH. New advances in the study of silkworm cytoplasmic polyhedrosis viruses[J]. *Jiangsu Sericulture*, 2004, 26(2): 14-17 (in Chinese).
- [11] 洪靖君, 彭辉银, 段家龙. 昆虫质多角体病毒研究的若干新进展[J]. *昆虫学报*, 2002, 45(6): 815-821.
HONG JJ, PENG HY, DUAN JL. New advances in the study of insect cytoplasmic polyhedrosis viruses[J]. *Acta Entomologica Sinica*, 2002, 45(6): 815-821 (in Chinese).
- [12] 莫显风, 覃家旺, 潘汉清. 宜州“铁蚕”现象剖析及对策[J]. *广西蚕业*, 2007, 44(4): 24-26.
MO XF, QIN JW, PAN HQ. Analysis of the phenomenon of “iron silkworm” in Yizhou and its countermeasures[J]. *Guangxi Sericulture*, 2007, 44(4): 24-26 (in Chinese).
- [13] 朱方容, 卢继球. 家蚕中肠型脓病流行的原因及防治对策[J]. *广西蚕业*, 2004, 41(3): 25-30.
ZHU FR, LU JQ. Causes and control countermeasures of midgut purulent disease in silkworm[J]. *Guangxi Sericulture*, 2004, 41(3): 25-30 (in Chinese).
- [14] 邵榆岚, 张一川, 唐芬芬, 张永红, 朱峰, 白兴荣. 云南蚕区58个家蚕品种对家蚕质型多角体病毒的抗性调查及聚类分析[J]. *西南农业学报*, 2019, 32(9): 2253-2258.
SHAO YL, ZHANG YC, TANG FF, ZHANG YH, ZHU F, BAI XR. Resistance investigation and cluster analysis of infecting *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV) of 58 silkworm varieties from Yunnan sericultural areas[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2019, 32(9): 2253-2258 (in Chinese).
- [15] 浙江大学. 家蚕病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
ZHEJIANG UNIVERSITY. *Silkworm Pathology*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001 (in Chinese).
- [16] BRUENN JA. A closely related group of RNA-dependent RNA polymerases from double-stranded RNA viruses[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(24): 5667-5669.
- [17] 魏仙, 菲迎春, 殷安亮, 缪梅玲, 王连芳. 2020年射阳县蚕病发生状况调查[J]. *四川蚕业*, 2022, 50(1): 32-34.
WEI X, MAO YC, YIN AL, MIAO ML, WANG LF. Investigation of silkworm diseases in Sheyang County in 2020[J]. *Sichuan Sericulture*, 2022, 50(1): 32-34 (in Chinese).
- [18] 黄旭华, 朱方容, 石美宁, 汤庆坤. 家蚕细菌性肠道病、中肠型脓病、浓核病和微粒子病的初步比较[J]. *广西蚕业*, 2009, 46(1): 1-7.
HUANG XH, ZHU FR, SHI MN, TANG QK. A preliminary comparison of bacterial bowel disease, midgut polyhedrosis, densovirus and pebrine disease in *Bombyx mori*[J]. *Guangxi Sericulture*, 2009, 46(1): 1-7 (in Chinese).
- [19] 黄旭华, 潘志新, 黄深惠, 王霞, 唐亮, 安春梅, 胡文娟. 家蚕微孢子虫与其他蚕病病原的联合感染试验[J]. *广西蚕业*, 2016, 53(2): 16-19.
HUANG XH, PAN ZX, HUANG SH, WANG X, TANG L, AN CM, HU WJ. Investigation on the co-infection of *Nosema bombycis* with other silkworm pathogens[J]. *Guangxi Sericulture*, 2016, 53(2): 16-19 (in Chinese).
- [20] ZHANG ZD, LI N, HOU CX, GAO K, TANG XD, GUO XJ. Analysis of reassortant and intragenic recombination in *Cypovirus*[J]. *Virology Journal*, 2020, 17(1): 1-5.
- [21] 何珊珊, 韦红群, 夏青, 李燕飞, 胡文娟, 黄艺, 莫云霞, 余武昌, 潘志新. 广西蚕区主推家蚕品种在不同区域及不同批次饲养的适应性调查[J]. *蚕学通讯*, 2021, 41(2): 1-9.
HE SS, WEI HQ, XIA Q, LI YF, HU WJ, HUANG Y, MO YX, YU WC, PAN ZX. Investigation on the adaptability of mainly silkworm varieties in different areas and batches in Guangxi[J]. *Newsletter of Sericultural Science*, 2021, 41(2): 1-9 (in Chinese).
- [22] 鲁兴萌. 家蚕传染病的流行与控制[J]. *蚕桑通报*, 2008, 39(4): 5-8.
LU XM. Epidemic of silkworm infection diseases and their control[J]. *Bulletin of Sericulture*, 2008, 39(4): 5-8 (in Chinese).
- [23] SINHA-DATTA U, CHAVALI VRM, GHOSH AK. Molecular cloning and characterization of *Antheraea mylitta* cytoplasmic polyhedrosis virus polyhedrin gene and its variant forms[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 332(3): 710-718.
- [24] IKEDA K, NAKAZAWA H, ALAIN R, BELLONCIK S, MORI H. Characterizations of natural and induced

- polyhedrin gene mutants of *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis viruses[J]. Archives of Virology, 1998, 143(2): 241-248.
- [25] 徐兴耀, 谭佩娟, 李兆平. 家蚕四角形质型多角体病毒的研究[J]. 广东蚕业, 1996, 30(1): 1-6.
XU XY, TAN PC, LI ZP. Studies on *Bombyx mori* tetragonal cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. Guangdong Cane, 1996, 30(1): 1-6 (in Chinese).
- [26] 贺倩, 刘小侠, 张青文. 昆虫质型多角体病毒的研究进展[J]. 昆虫知识, 2010, 47(5): 834-840.
HE Q, LIU XX, ZHANG QW. Progresses of insect cytoplasmic polyhedrosis virus[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2010, 47(5): 834-840 (in Chinese).
- [27] YU XK, LU XY, ZHANG H, ZHOU ZH, ZHANG QF, ZHANG X, ZHANG JQ. Structure of cytoplasmic polyhedrosis virus from *Bombyx mori*[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 1999, 31(5): 563-566.
- [28] 张知彬. 野生动物疫病暴发成因及其防控对策[J]. 中国科学院院刊, 2021, 36(2): 188-198.
ZHANG ZB. Factors affecting outbreaks and prevention and control strategies of wildlife infectious diseases[J]. Bulletin of the Chinese Academy of Sciences, 2021, 36(2): 188-198 (in Chinese).
- [29] 黄旭华, 汤庆坤, 罗梅兰, 黄深惠, 蒋师东, 夏青, 黄景滩, 李安华, 鲁成, 陈小青, 毛洪斌, 潘志新. 广西昆虫微孢子虫资源调查及其特性分析[J]. 南方农业学报, 2018, 49(8): 1541-1547.
HUANG XH, TANG QK, LUO ML, HUANG SH, JIANG SD, XIA Q, HUANG JT, LI AH, LU C, CHEN XQ, MAO HB, PAN ZX. Investigation on resource of insect microsporidan in Guangxi and its characters[J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(8): 1541-1547 (in Chinese).
- [30] KING AMQ, ADAMS MJ, CARSTENS EB, LEFKOWITZ EJ. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses[M]. London: Elsevier Academic Press, 2012: 537-536.
- [31] GREEN TB, SHAPIRO A, WHITE S, RAO S, MERTENS PPC, CAMER G, BECNEL JJ. Molecular and biological characterization of a *Cypovirus* from the mosquito *Culex restuans*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2006, 91(1): 27-34.
- [32] HAGIWARA K, RAO SJ, SCOTT SW, CARNER GR. Nucleotide sequences of segments 1, 3 and 4 of the genome of *Bombyx mori* cypovirus 1 encoding putative capsid proteins VP1, VP3 and VP4, respectively[J]. Journal of General Virology, 2002, 83(6): 1477-1482.
- [33] 张永红, 唐芬芬, 邵榆岚, 朱峰, 白兴荣. 从云南蚕区分离 BmCPV 病毒株的全基因组克隆与系统发育分析[J]. 蚕业科学, 2015, 41(6): 1036-1043.
ZHANG YH, TANG FF, SHAO YL, ZHU F, BAI XR. Whole-genome cloning and phylogenetic analysis of a new BmCPV strain isolated from sericultural region of Yunnan[J]. Acta Sericologica Sinica, 2015, 41(6): 1036-1043 (in Chinese).
- [34] CAO GL, MENG XK, XUE RY, ZHU YX, ZHANG XR, PAN ZH, ZHENG XJ, GONG CL. Characterization of the complete genome segments from BmCPV-SZ, a novel *Bombyx mori* cypovirus 1 isolate[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(7): 872-883.
- [35] HONG JJ, DUAN JL, ZHAO SL, XU HG, PENG HY. Nucleotide sequences of genome segments S6, S7 and S10 of *Dendrolimus punctatus* cypovirus 1[J]. Archives of Virology, 2003, 149(1): 183-190.
- [36] GRAHAM RI, RAO S, SAIT SM, ATTOUI H, MERTENS PPC, HAILS RS, POSSEE RD. Sequence analysis of a reovirus isolated from the winter moth *Operophtera brumata* (Lepidoptera: Geometridae) and its parasitoid wasp *Phobocampe tempestiva* (Hymenoptera: Ichneumonidae)[J]. Virus Research, 2008, 135(1): 42-47.
- [37] ZHAN ZG, GUAN LM, WANG JC, LIU ZR, GUO Y, XIAO YZ, WANG HX, JIN L. Isolation and genomic characterization of a cypovirus from the oleander hawk moth, *Daphnis nerii*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2019, 163: 43-47.