

## 目 次

### 试 验 研 究

- 家蚕细胞色素 P450 基因的研究进展 ..... 艾均文 薛 宏 何行健等(2)  
“野三元”家蚕新品种农村试养成绩简报 ..... 琚新丰 尹 钢 刘松亮(12)

### 综 述

- 家蚕病原菌检测诊断研究进展 ..... 周洪英 孙 波 叶建美等(15)

### 工 作 研 究

- 我县蚕桑产业现状、问题与对策 ..... 代仕林(23)  
夷陵区桑蚕产业优势资源调研报告 ..... 郭 云(26)  
修水县整合县级资金做强蚕桑产业 ..... 卢卫芳(29)

### 应 用 技 术

- 夏秋桑园管理技术 ..... 王启苗(30)  
桑园间作生姜优质高产栽培技术 ..... 李 勇 叶楚华 邓 文等(31)

### 综 合 利 用

- 实行桑园间作 提高经济效益 ..... 张永进(33)  
桑叶饮料的加工及分析 ..... 郭 云 王华斌(35)

### 信 息

- 梅克保副书记来我所考察调研 ..... 谈顺友(34)  
湖南省委副书记梅克保来省蚕桑科学研究所考察调研(图片) ..... 彭世岩摄影  
封面设计 ..... 廖熙选

## 家蚕细胞色素 P450 基因的研究进展

艾均文<sup>1,2,3</sup> 薛 宏<sup>1</sup> 何行健<sup>1</sup> 孟繁利<sup>1</sup> 朱 勇<sup>2</sup> 向仲怀<sup>3</sup>

(1 湖南省蚕桑科学研究所,长沙 410127;2 西南大学生物技术学院,重庆 400716;

3 西南大学蚕学与系统生物研究所,重庆 400716)

**摘要:**细胞色素 P450(P450s,CYPs)超基因家族是由数量众多、功能复杂的一类血红蛋白酶基因所组成,对许多结构多样的外源与内源化合物起着氧化代谢的作用。本文系统地综述了家蚕 *Bombyx mori* 基因组中 P450s 的数量与种类,其数量比食腐昆虫和杂食性的植食昆虫少,但比意大利蜜蜂 *Apis mellifera* 多,在基因组中大多呈串联重复排列,基因结构与系统进化树之间有着紧密的联系。家蚕与黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* P450s 的比较基因组学分析发现,存在 10 对直向同源基因,但 CYP3 与 CYP4 集团(Clan)的 P450s 表现出种属特异性扩增。家蚕 P450s 与其蜕皮激素和保幼激素合成代谢有关,并涉及到对氟化物与杀虫剂抗性。家蚕作为鳞翅目昆虫的代表,通过对其 P450s 的研究,可望为其他昆虫,特别是鳞翅目昆虫的生长发育研究和抗性治理提供理论依据和研究模式。

**关键词:**家蚕;细胞色素 P450;多样性;进化;模式昆虫

细胞色素 P450 超基因家族是由数量众多、功能复杂的一类血红蛋白酶基因所组成,广泛存在于动物、植物、真菌和细菌等生物中。它具有多功能氧化酶(mixed function oxidase,MFO)的作用,参与了生物体中许多重要生命过程,是自然界中最具功能多样性的生物催化剂。它对异生物质的代谢特性导致了昆虫对杀虫剂的抗药性和对植物有毒物质的耐受性,它还参与了昆虫体内保幼激素、蜕皮激素和脂肪酸等内源化合物的合成与代谢(Scott et al.,1998;郭亭亭等,2009)。家蚕 *Bombyx mori* 是鳞翅目昆虫的模式生物,鳞翅目是昆虫中的第二大目,其中许多种类是极

具破坏性的农业害虫,家蚕细胞色素 P450s 的研究将会为昆虫内源性与外源性化合物代谢及抗性产生机理探索提供重要的研究典范,也会促进鳞翅目害虫的生物防治技术发展。特别是家蚕是第一个进行了全基因组测序的鳞翅目昆虫,家蚕细胞色素 P450s 的研究也随之进入了基因组学研究时代。

### 1 家蚕 P450 的序列多样性

截止至 2011 年 4 月,在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上登录的家蚕 P450 基因已有 102 条蛋白质序列,其中包含有 85 条

基金项目:国家“863”计划项目(2006AA10A117);现代农业(蚕桑)产业技术体系建设专项(CARS-22);湖南省科学技术厅项目(2010NK3050);湖南省农业厅项目(2008-01-05)。

作者简介:艾均文,男,湖南常德人,1968 年生,博士,研究员,主要从事桑蚕种质资源与分子生物学研究。E-mail:[jwai718@sina.com](mailto:jwai718@sina.com)

通讯作者,E-mail:[zhuy@swu.edu.cn](mailto:zhuy@swu.edu.cn);[xbxzh@swu.edu.cn](mailto:xbxzh@swu.edu.cn)

表1 已克隆的家蚕 P450 基因

| 所属集团 Clan      | 基因名称 Gene name   |
|----------------|--|
| CYP2 Clan (5)  | <i>CYP307A1</i> , <i>CYP15C1</i> , <i>CYP18A1</i> *, <i>CYP306A1</i> , <i>CYP305B1</i> *   |
| Mito. Clan (4) | <i>CYP339A1</i> , <i>CYP302A1</i> , <i>CYP314A1</i> , <i>CYP315A1</i>  |
| CYP3 Clan (18) | <i>CYP366A1</i> , <i>CYP337A1</i> , <i>CYP332A1</i> , <i>CYP6A01</i> *, <i>CYP6A01</i> *, <i>CYP6A04</i> *, <i>CYP6A05</i> *, <i>CYP6A02</i> *, <i>CYP6A03</i> ,<br><i>CYP6A07</i> , <i>CYP6A08</i> *, <i>CYP6A09</i> *, <i>CYP6B29</i> *, <i>CYP9A19</i> *, <i>CYP9A20</i> *, <i>CYP9A21</i> *, <i>CYP9A22</i> *, <i>CYP9G3</i> |
| CYP4 Clan (5)  | <i>CYP4M5</i> *, <i>CYP4M9</i> *, <i>CYP4G22</i> , <i>CYP4G23</i> , <i>CYP4I6</i>  |

括号中为所属集团的已克隆基因数量,\*表明野蚕的 P450 等位基因也已克隆登录。由于 CYP6AE 的命名较为混乱,此处根据作者提交给 Nelson (dnelson@uthsc.edu) 的基因组序列进行了命名整理。

家蚕序列,17 条野桑蚕 *Bombyx mandarina* 序列。通过比对分析发现家蚕中已有 32 个基因得到克隆登录,野桑蚕中有 16 个基因也已克隆(表 1)。

随着家蚕基因组测序的完成,Li 等(2005)根据 6× 基因组数据进行基因组学分析,推测家蚕基因组中有 86 个 P450 基因,分布于 60 个 Scaffolds, 在每个 Scaffold 中不超过 2 个成员,未发现 P450 基因串联排列的现象,并认为这是由于基因组草图中存在许多 gap 所致。在此基础上,Nelson 根据基因组基因枪序列重新比对分析,认为家蚕中大约有 79 个 P450 基因(<http://drnelson. utmem. edu/silk-worm. html>,2004 年 7 月)。Ai 等(2011)根据 9× 基因组数据开展进一步的基因组学分析,结果发现家蚕基因组中共有 84 个 P450 基因,其中有 78 个功能基因,6 个可能的假基因。根据氨基酸序列的相似程度来确定所属家族与亚家族,这些功能基因可分为 26 个家族,47 个亚家族,提交国际 P450 命名委员会后分别给予了正式命名,构建了相应的进化树(图 1),其中基因数量最多的家族为 CYP6,它含有 7 个亚家族,14 个功能基因,2 个可能的假基因,CYP4,CYP340 和 CYP341 等家族基因数量次之。CYP6B,CYP6AE,CYP6AB,CYP9A,CYP340 和 CYP341 等家族或亚家族为鳞翅目昆虫所特有。通过对预测基因的序列延伸,共得到了 70 个全长基因。家蚕基因组 P450 基因数量比黑腹果蝇

*Drosophila melanogaster* 的 91 个略为减少,但比冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 的 112 个、埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 的 164 个、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 的 144 个则明显减少,比西方蜜蜂 *Apis mellifera* 的 48 个则明显增多(Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008)。这主要是因为家蚕是寡食性的植食昆虫,而冈比亚按蚊、埃及伊蚊与赤拟谷盗分别是杂食性的食腐昆虫和杂食性的植食昆虫,果蝇也是食腐性昆虫之一,需要更多的 P450 基因来应对相对复杂的生活环境,而西方蜜蜂的气味受体基因数量与其他昆虫比较存在明显扩增,加上它的高度社会性群居等生活行为导致了与昆虫代谢抗性相关的 3 个超基因家族数量明显减少(Claudianos et al., 2006;Robertson and Wanner,2006)。值得提出的是,杂食性的鳞翅目主要害虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 与草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 基因组中出现了比家蚕更多的 P450 复制现象(d,Alencon et al.,2010),我们推测其 P450 基因数量也应比家蚕多。

## 2 家蚕 P450 的功能多样性

P450 功能的多样性是其种类的多样性以及底物的广谱性所决定的。已有的研究表明,家蚕 P450 基因一方面催化包括蜕皮激素、保幼激素等在内的内源性物质的生物合成与降解,维持生物体正常的生理功能,另一

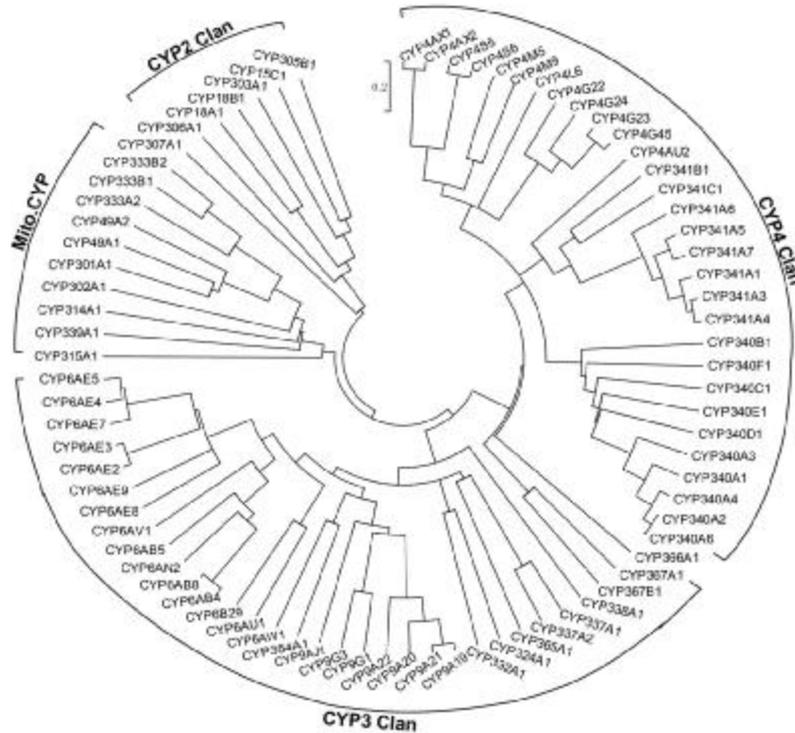


图1 家蚕 P450 功能基因的系统进化树

用 ClustalX1.83 和 MEGA4.0 进行序列比对和进化树构建, 进化树构建方法为 UPGMA 法, bootstrap 检验重复 1 000 次。圆弧外标明各基因所属的 4 个不同的昆虫 P450 集团 (Clan), 即: CYP2, CYP3, CYP4 和线粒体集团 (Ai et al., 2011)。CYP6AE3 已通过克隆表明为功能基因。

方面催化包括杀虫剂、植物次生物质、氟化物等在内的异生性物质的代谢, 使生物体适应生活环境或产生相应的抗性。

### 2.1 参与蜕皮激素的合成与代谢

蜕皮激素对昆虫生长、发育和繁殖有重要的调控作用, 尤其是对蜕皮和变态过程。目前一些研究表明昆虫细胞色素 P450 基因参与了蜕皮激素的合成与代谢。

对果蝇的 Halloween 突变家族基因的研究发现, 在线粒体集团和 CYP2 集团 (Clan) 中至少有 5 个 P450 基因分别参与了蜕皮激素合成的不同步骤 (图 2:A) (Rewitz et al., 2007)。Cyp306al (Pantom), Cyp302al (Disembodied), Cyp315al (Shadow) 和 Cyp314al (Shade) 分别参与了最后 4 个步骤, 即由

2,22,25-三脱氧蜕皮酮 (ketodiol, 2,22,25-dE, 2,22,25-trideoxycdysone) 合成具有催化活性的  $\beta$ -蜕皮素 (20E, 20-hydroxycdysone) 的反应过程。横向同源基因 (paralog) CYP307A1 (Spook), CYP307A2 (Sookier) 和 CYP307B1 (Sookiest) 参与了昆虫蜕皮激素合成过程中“黑匣子 (blackbox)”的某一步骤, 即中间产物 7-脱氢胆固醇 (7-dehydrocholesterol, 7de) 转化成另一中间产物 2,22,25-三脱氧蜕皮酮的过程 (Ono et al., 2006)。目前, 包括家蚕在内的多个昆虫 P450 基因中的直向同源基因 (ortholog) 得到测序与功能研究 (图 2:B)。Horike 等 (2000) 发现在家蚕早期胚胎发育过程中蜕皮激素 -20-单加氧酶的活性依赖于细胞色素 P450 还原酶的表达。Maeda 等

(2008)从家蚕卵中克隆得到了 *CYP314A1*, 它在未滞育卵原肠胚期的后期表达明显升高, 在器官发生期达到最高, 其后随胚胎发育完成又逐渐下降。进一步用杆状病毒表达系统在 Sf9 细胞中表达该蛋白, 该蛋白能将  $\alpha$ -蜕皮素(ecdysone, E)转化成  $\beta$ -蜕皮素, 表明该基因为 C-20-羟化酶(20-hydroxylase)基因。Niwa 等(2004)在家蚕前胸腺中克隆得到了 *CYP306A1*, Northern 杂交分析表明该基因表达与蜕皮激素代谢紧密相关, 通过 S2 细胞的转染试验发现了它能将 ketodiol 转换成 ketotriol, 直接表明该基因编码 C-25-羟化酶(25-hydroxylase)。Niwa 等(2005)利用营茧期幼虫的前胸腺建立全长 cDNA 文库克隆得到 *CYP302A1*, 该基因表达在家蚕 5 龄幼虫上簇第 1 天达到表达峰值, 而且能被促前胸腺激素(prothoracicotropic hormone, PTTH)所诱导, 同样 S2 细胞的转染方法能将 2,22-二脱氧蜕皮酮转化成 2-脱氧蜕皮酮, 表明该基因表达 C-22-羟化酶(22-hydroxylase)。Namiki 等(2005)利用荧光标记差异显示技术对在家蚕 5 龄幼虫到蛹期阶段的前胸腺表达基因进行表达分析克隆, 得到了另外一个 Halloween 家族基因 *CYP307A1*, 从基因表达、蜕皮激素与促前胸腺激素(FITH)诱导试验分析, 推测该基因应与家蚕蜕皮激素合成有关。Warren 等(2004)在对家蚕 *CYP306A1* 进行研究时, 也同时克隆得到了另一个 Halloween 家族基因 *CYP315A1*, 该基因的表达与家蚕体内蜕皮激素含量变化紧密一致(Namiki et al., 2005), 而该基因的直向同源基因在果蝇中能将 2-脱氧蜕皮酮(2dE)转化成  $\alpha$ -蜕皮激素(E)。

昆虫 P450 基因不仅与昆虫蜕皮激素合成有关, 而且还参与其代谢分解。Hurban 和 Trhummel(1993)通过蜕皮激素对果蝇进行诱导, 结合 cDNA 消减杂交得到一个与蜕皮激素代谢有关基因 *Eig-17*, 该基因为 *CYP18a1*

(Bassett et al., 1997)。Davies 等(2006)发现鳞翅目昆虫灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的直向同源基因 *CYP18A1* 能被非甾醇兴奋剂 RH-5992 诱导。Guittard 等(2011)利用 RNAi 与插入 P 元件(P element)方法分别沉默果蝇 *Cyp18a1*, 能产生幼虫发育时间延长, 死蛹显著增加的现象, 突变蛹的蜕皮激素因不能及时正常降解而出现一个延时的峰值。通过 GAIA/UAS 转基因系统使该基因超量表达, 可引起大量末龄幼虫死亡, 少量在蛹早期死亡。利用果蝇 S2 细胞的转染试验, 发现 *Cyp18a1* 能将有活性的  $\beta$ -蜕皮素转化成非活性的 20,26-二羟蜕皮酮(20,26E, 20,26-dihydroxyecdysone), 为 C-26 羟化酶(26-hydroxylase)。同时, 该基因还能进一步催化形成相应的蜕皮酸(20Eoie, 20-hydroxyecdysoneoieacid)。艾均文等(2008)通过家蚕基因组预测序列克隆得到了家蚕 *CYP18A1*, 该基因的表达变化与家蚕体内蜕皮激素的波动相一致, 且发现在营茧期的第 2 天出现表达峰值, 推测该基因应是 C-26-羟化酶基因。Hossain 等(2008)利用经过蜕皮激素诱导的家蚕 5 龄幼虫的头部建立 cDNA 文库克隆得到了家蚕 *CYP18A1*, 原位杂交发现该基因在前胸腺表达, 且同样在家蚕化蛹前达到一个表达峰值。

此外, 我们利用基因组预测序列与家蚕 EST 数据库比对搜索, 发现了一个线粒体基因在精巢中高量表达, 而该基因主要与昆虫内源物质代谢有关, 进而克隆了该基因 *CYP339A1*(GenBank 登录号: NP\_001121192.1)。高瑞娜等(2010)对经蜕皮激素诱导后的家蚕部分 P450 基因进行检测, 结果在脂肪体中检测到了该基因的高转录活性, 与对照组相比转录水平上调了 421 倍, 可以推测该基因可能与家蚕蜕皮激素代谢有密切联系。

## 2.2 参与保幼激素的合成

保幼激素(juvenile hormone, JH)是节肢动物的重要内激素, 具有保持幼虫形态、性

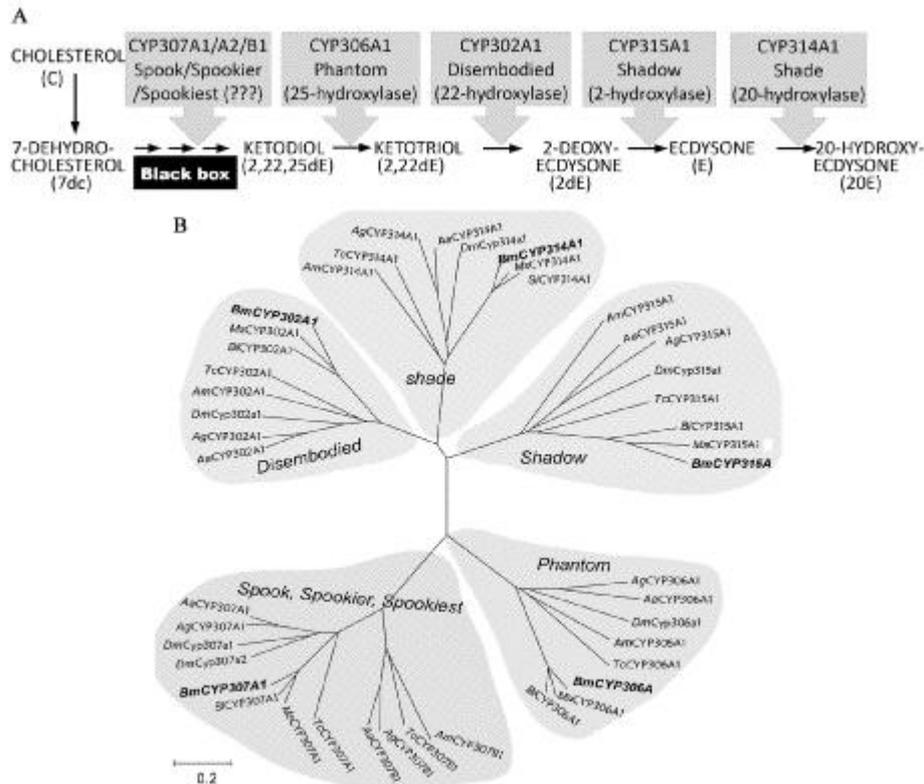


图2 Halloween 家族直向同源 P450 基因参与昆虫蜕皮激素合成的过程 (A) 及其系统进化树 (B) (引自 Rewitz et al., 2007)

Bm: 家蚕 *Bombyx mori*; Ms: 烟草天蛾 *Manduca sexta*; Sl: 灰翅夜蛾 *Spodoptera litoralis*; Dm: 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*; Ag: 冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae*; Aa: 埃及伊蚊 *Aedes aegypti*; Te: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; Am: 西方蜜蜂 *Apis mellifera*。除家蚕外的所有 P450 序列均从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载。

状,促进生殖腺成熟、成虫滞育和产生信息素等功能。Helvig 等 (2004) 从太平洋折翅蛾 *Diploptera punctata* 咽侧体的 900 多条 ESTs 中拼接出一条 P450 基因序列,被命名为 *CYP15A1*;该基因与果蝇的 P450 还原酶等组成重组酶系,能将 2E-6E- 甲基法尼酸酯 (2E,6E-methyl. farnesoate) 转化成 JH III,起环氧化作用;该基因在咽侧体中表达变化和保幼激素合成时间吻合,这些结果表明该基因表达产物为保幼激素合成的环氧化酶 (epoxidase)。通过家蚕 P450 基因组学分析发现,家蚕中存在一个直向同源基因 *CYP15C1*,它的氨基酸序列和 *CYP15A1* 有 43% 的同一性 (艾均文,2008),现在它已从家蚕咽

侧体中得到了克隆 (GenBank 登录号: NM\_001146725.1)。该基因在许多昆虫基因组中呈现 1:1 的直向同源关系,其在家蚕中的功能有待于下一步实验证实。

### 2.3 与氟化物抗性相关功能

工业化造成的氟化物污染对蚕业生产的严重危害已引起蚕业界广泛关注。米智等 (2010) 发现家蚕氟化物抗性品系 T6 在诱导后,中肠组织的细胞色素 P450 含量比对照组高 3~7 倍,而对敏感品系 734 诱导作用不明显,说明 P450 与家蚕的抗氟性紧密相关。该酶系的组成之一细胞色素 b5 含量的变化还与 P450 具有较高的一致性,表明 P450 酶的活性也与之相关。陈玉华等 (2006) 通过

Northern 杂交方法发现野桑蚕的 *CYP305Blvl* 能被氟化物诱导而表达量增高。Zhou 等(2008)利用荧光差异显示技术对家蚕抗性品系与敏感品系中肠组织进行比较分析,结果从只存在于抗性品系中的一条特异性电泳条带克隆得到一个家蚕 P450 基因 *CYP306A1*, 实时定量 PCR 表明该基因在抗性品系中具有高转录活性;对包括中肠、血液、卵巢、丝腺、脂肪体在内组织进行半定量 PCR 分析,结果表明该基因只在中肠和卵巢中表达。有趣的是该基因还是 C-25- 羟化酶基因,与家蚕蜕皮激素合成有关,进一步表明了 P450 基因的底物广谱性与功能的多样性。

#### 2.4 杀虫剂的诱导表达

人类对昆虫杀虫剂抗性研究一般目的是昆虫的抗性治理,但对家蚕而言主要目的是提高对杀虫剂的抵抗力。王燕红等(2009)对野桑蚕进行溴氰菊酯诱导,发现 *CYP4M5* 在中肠和脂肪体中表达量分别增加 1.1 倍和 4.4 倍。赵华强等(2010)利用氯氰菊酯诱导野桑蚕,以硝基苯甲酰脱甲基酶(PNOD)活性检测 P450 酶,结果表明诱导 24 h 后 PNOD 在中肠中的活性增加了 12.2%,在脂肪体中的活性增加了 18.7%;对 *CYP9* 基因的表达水平进行半定量 PCR 方法分析发现,*CYP9A21* 在中肠的 mRNA 表达量是对照的 2.1 倍,*CYP9A20*,*CYP9A21*,*CYP9G3* 在脂肪体中 mRNA 表达量分别是对照的 1.9,3.5 和 1.4 倍。这些结果表明 P450 酶活性增强与表达上调可能与野桑蚕对菊酯类杀虫剂代谢解毒增强有关。Yamamoto 等(2010)利用二嗪农(di-azinon)、吡虫啉(imidacloprid)、苄氯菊脂(permethrin)等不同类型的农药分别对家蚕进行诱导,微阵列分析表明二嗪农与 *CYP4M5*,*CYP4G22*(*CYP4 G25*)和 *CYP333A2* (BGIBMGA005356),吡虫啉与 *CYP9A20*,*CYP4G22* 和 *CYP333A2*,苄氯菊脂与 *CYP4 G22* 和 *CYP333A2* 之间呈现出诱导表达上调

的联系,其中 *CYP4G22* 可在吡虫啉、苄氯菊脂诱导下分别上调表达 8.3 和 8.9 倍。

### 3 家蚕 P450 的进化

Gotoh(1993)认为 P450 酶存在于所有原核与真核生物体内,该酶系应是相当古老的酶系之一,目前所有 P450 基因应是从一个古老基因进化而来。在线虫 *Caenorhabditis elegans* (Gotoh,1998)、黑腹果蝇(Tijet *et al.*,2001)等基因组中,基因复制是 P450 基因进化的普遍现象,其内含子结构呈现普遍保守。

#### 3.1 家蚕 P450 的串联重复排列

Ai 等(2011)利用家蚕 P450 预测序列与家蚕基因组序列进行比对发现,84 个 P450 基因分布于 36 个不同的 Scaffolds,其中 80 个可定位到 19 条不同染色体上。50 个 P450 基因呈现出头尾相连的串联排列,如果将 3 个基因串联定义为基因簇,则家蚕存在 8 个基因簇,包含了 38 个基因,6 个假基因中的 5 个也位列其中,说明这些假基因产生与基因复制过程中的不均等交换有关(Nelson *et al.*,2004)。同时,复制基因的部分多重拷贝未能获得进一步的新功能或亚功能化,失去选择压力,突变频率会加快,进而产生各种形式的突变而成假基因(Force *et al.*,1999)。最大的基因簇位于 26 号染色体上的 *CYP340* 基因簇,共有 7 个功能基因,2 个假基因。此外,还发现了一个混合基因簇,即包含 2 个线粒体基因 *CYP333B1*,*CYP333B2* 与一个微粒体基因 *CYP4L6*,它们之间还有一个相同的 1 相内含子,而这一内含子为 *CYP3* 集团与 *CYP4* 集团的 P450 基因所共有,这是昆虫中混合基因簇的首次发现,进一步证明了线粒体 P450 是由微粒体 P450 进化而来的推断(Omura,1993)。Ai 等(2010)首次实验证实了位于家蚕 17 号染色体上 *CYP9A* 基因簇,其中 3 个同转录方向的基因串联重复,另一个反方向转

录基因被4个串联的乙醇脱氢酶基因所间隔,而且这4个基因具有完全相同大小的开放阅读框,基因结构也完全保守,均具有9个内含子,10个外显子,经历了3次复制事件,其中1次为反向复制。

### 3.2 家蚕 P450 的内含子

Gilbert(1987)曾提出现在基因内含子中一定带有古老基因的进化遗迹。Ai等(2011)利用 wise2 程序对家蚕 P450 基因进行基因结构分析,发现基因结构与系统进化树之间存在紧密联系,即:进化距离越近,基因结构越相似,进化距离越远,基因结构差异越大。家蚕 P450 基因的内含子与果蝇的相比,家蚕内含子(平均 200~1 250 bp)比果蝇(平均 50~70 bp)的大,其内含子密度(每 kb CDS 所含的内含子个数)与内含子比例(每 kb CDS 所含的内含子总 kb 数)均有增大趋势,这应与基因组致密性有关(Rogozin *et al.*, 2003)。Ai等(2011)还发现了家蚕 P450 基因保守的3个古老内含子,它们分别被不同昆虫集团 P450 基因所共有,表明这些不同集团 P450 基因在起源上存在着一定的联系。果蝇中难以发现这种保守内含子(Tijet *et al.*, 2001),这主要与果蝇的 P450 基因普遍存在内含子丢失现象有关。

### 3.3 与其他昆虫基因 P450 的比较分析

利用家蚕与果蝇的 P450 基因进行基因组学比较分析(Ai *et al.*, 2011),主要与外源化合物代谢相关 CYP3 集团与 CYP4 集团的 P450 基因均存在大量扩增。其中 CYP3 集团主要与外源化合物代谢相关, CYP4 集团则主要与植物次生物质代谢有关(Feyereisen, 2006)。果蝇 CYP3 集团的 P450 基因数量比家蚕多,但 CYP4 集团的 P450 基因数量比家蚕少,它们在系统进化分析中均表现出了种属特异性,难以发现它们之间共同的直向同源基因,这是它们应对各自不同的生存环境与取食对象的选择压力所致。但在主要与内源物质代谢相关的 CYP2 集团与线粒体集团的 P450 基因数量上大致相等,在进化树上可以发现包括 Halloween 家族在内的 10 对直向同源基因(CYP18A, CYP303A, CYP305A, CYP306A, CYP307A, CYP315A, CYP301A, CYP302A, CYP314A 和 CYP49A),说明这些基因的结构与功能保守性。特别是还在线粒体集团中发现了果蝇 CYP12 与家蚕 CYP333 的直向同源基因对, CYP333 应与 CYP12 一样与异生物质代谢有关。

通过昆虫基因组之间的微共线性(microsynteny)分析(Ai *et al.*, 2011),家蚕、果蝇和蜜蜂的 CYP18A1 与 CYP306A1 存在线性保守,它们分别位于家蚕的 10 号、西方蜜蜂的

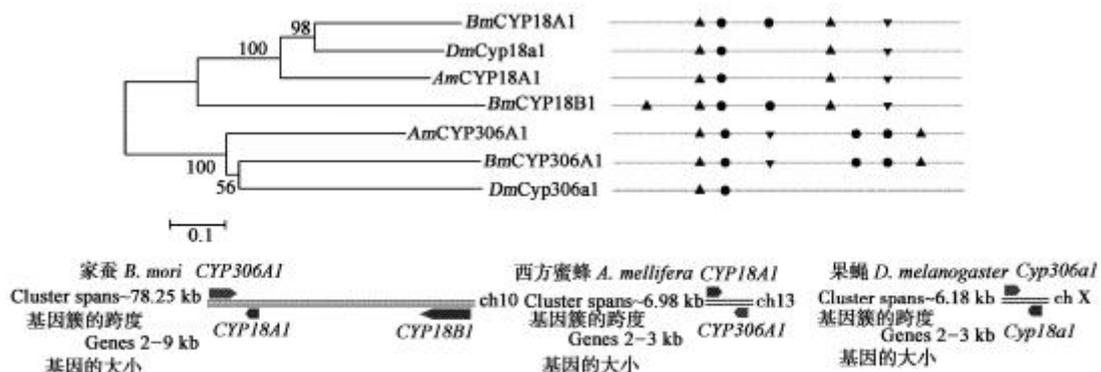


图3 昆虫 CYP306 与 CYP18 的基因结构与共线性示意图(引自 Ai *et al.*, 2011)

0, 1 和 2 相内含子分别用“●”、“▲”和“▼”表示。

13号 and 果蝇的x染色体上,内含子结构也高度保守(图3),暗示了它们功能上的同一性。在家蚕中,CYP18产生了一次独立的基因复制,家蚕基因组表达芯片数据显示CYP18B1只在雌蛹后期与成虫期表达,推测可能与雌发育或家蚕生殖有关(Ai et al.,2011)。

#### 4 小结与展望

细胞色素P450作为昆虫中三大与代谢抗性相关的超基因家族之一,对昆虫抗性起着非常重要的作用,同时又对昆虫生长发育有着十分关键的功能。由上述内容可以看出,在P450基因的进化过程中,与昆虫生长发育相关的基因功能相对保守,与代谢抗性相关的基因作用则和昆虫特殊的生长环境及取食习性相适应。家蚕84个P450基因中主要与代谢抗性相关的CYP3和CYP4集团的P450基因产生大量的串联复制,数量众多,往往它们之间存在一定程度的底物相似性或重叠性,在功能上表现出一定程度的冗余,使其介导的昆虫抗性在应对外部选择压力时具有较强的弹性(Scott and Kasai,2004)。该类P450基因能被多种不同异生物质所诱导,这些数量众多的横向同源基因及突变等位基因组成了生物体为应对外界环境的不断变化而选择表达的基因储备库(Feyereisen,2005),其一定种类和数量的P450基因在一定条件诱导下表达对昆虫来说也是一种能量节省的适应机制(Snyder et al.,1993)。

昆虫在与植物的协同进化过程中,一方面它能改变取食策略或调节生长发育节律对植物的防御进行抵抗,另一方面它又能利用自身的生理调节机制与解毒酶降解植物产生的有毒物质来进行主动地反防御。昆虫P450基因不仅能直接参与植物次生有毒物质的代谢降解,而且已有研究表明它还参与了窃听(eavesdrop)植物的分子信号来活化自身解毒

酶活性的过程,如:美洲棉铃虫*Helicoverpa zea*的CYP6B基因(Li et al.,2002)。加强P450基因参与昆虫反防御机制的研究,一定会推动害虫治理向分子水平的技术进步。家蚕作为重要的经济昆虫和实验动物,是第一个完成了全基因组测序的鳞翅目昆虫,其基因组中P450基因已经得到序列分析与功能的初步预测,利用微阵列等基因组学研究技术对其数量众多与功能多样的P450基因进行功能验证与深入研究已成为可能(Hemingway et al.,2002)。鳞翅目昆虫间存在广泛的线性保守(d'Alencon et al.,2010),如CYP9A,CYP332A1等就在家蚕与其他几种鳞翅目昆虫基因组中表现出线性保守关系。通过比较基因组学研究可为农林害虫主要类群鳞翅目建立研究模式,家蚕P450基因的更深入研究可望为鳞翅目昆虫的生长发育、抗性治理提供理论依据。

#### 参考文献

- [1] 艾均文,2008,家蚕(*Bombyx mori*)全基因组细胞色素P450基因结构与进化分析及CYP18A1克隆与功能研究.重庆:西南大学博士学位论文.47~93.
- [2] 艾均文,王根洪,李艳红,等.2008.家蚕P450基因CYP18A1的克隆、序列分析及转录活性.昆虫学报,51(3):237~245.
- [3] Ai JW,Yu QY,Cheng TC,et al.2010.Characterization of multiple CYP9A genes in the silkworm,*Bombyx mori*.*Mol. Biol. Rep.*,37:1657~1664.
- [4] Ai JW,Zhu Y,Duan J,et al.2011.Genome-wide analysis of cytochrome P450 monooxygenase genes in the silkworm,*Bombyx mori*.*Gene*,480:42~50.
- [5] Bassett MH,McCarthy JL,Waterman MR,et al.1997.Sequence and developmental expression of Cyp18,member of new and developmental expression of Cyp18,member of a cytochrome P450 family from *Drosophila*.*Mol. Cell. Endocrinol.*,131:39~49.
- [6] 陈玉华,卫正国,李兵,等.2006.野桑蚕CYP30581V1基因的克隆与序列分析.蚕业科学,32(2):32~36.

- [7] Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, et al. 2006. A deficit of detoxication enzymes: pesticide sensitivity and environmental the honeybee. *Insect Molecular Biology*, 15: 615 ~ 636.
- [8] Coon MJ, 2005. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 1 ~ 25.
- [9] Davies L, Williams DR, Turner PC, et al. 2006. Characterization in relation to development of an ecdysteroid agonist-responsive cytochrome P450, *CYP18A1*, in Lepidoptera. *Arch. Biochem. Biophys.* 453(1): 2 ~ 10.
- [10] d'Alençon E, Sezutsu H, Legeai F, et al. 2010. Extensive synteny conservation –holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107(17): 7680 ~ 7685.
- [11] Feyereisen R, 2005. Insect cytochrome P450. In: Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Vol. 4. Elsevier, Oxford. 1 ~ 77.
- [12] Feyereisen R, 2006. Evolution of insect P450. *Biochemical Society Transactions*, 34: 1252 ~ 1255.
- [13] Force A, Lynch M, Pickett FB, et al. 1999. Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations. *Genetics*, 151: 1531 ~ 1545.
- [14] 高瑞娜, 卫正国, 张婷, 等. 2010. 蜕皮激素诱导下家蚕 *CYP3* 基因家族的表达变化. *昆虫学报*, 53(9): 943 ~ 948.
- [15] Gilbert W, 1987. The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 52: 901 ~ 905.
- [16] Gotoh O, 1998. Divergent structures of *Caenorhabditis elegans* cytochrome P450 genes suggest the frequent loss and gain of introns during the evolution of nematodes. *Mol. Biol. Evol.*, 15(11): 1447 ~ 1459.
- [17] Gotoh O, 1993. Evolution and differentiation of P-450 genes. In: Omura T, Ishimura Y, Fuji-Kuriyama Y eds. *Cytochrome P-450*. 2nd ed. Kodansha, Tokyo. 255 ~ 272.
- [18] Guittard E, Blais C, Maria A, et al. 2011. *CYP18A1*, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Developmental Biology*, 349: 35 ~ 45.
- [19] 郭亭亭, 姜辉, 高希武. 2009. 昆虫细胞色素 P450 基因的多样性、进化及表达调控. *昆虫学报*, 52(3): 301 ~ 311.
- [20] Helvig C, Koener JF, Unnithan GC, et al. 2004. *CYP15A1*, the cytochrome P450 that catalyzes epoxidation of methyl farnesoate to juvenile hormone III in cockroach *Corpora allata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 4024 ~ 4029.
- [21] Hemingway J, Field L, Vontas J, 2002. An overview of insecticide resistance. *Science*, 298: 96 ~ 97.
- [22] Horike N, Takemori H, Nonaka Y, et al. 2000. Molecular cloning of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase from silkworm. Its involvement in 20-hydroxyecdysone biosynthesis during embryonic development. *European Journal of Biochemistry*, 267(23): 6914 ~ 6920.
- [23] Hossain M, Shimizu S, Matsuki M, et al. 2008. Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic development. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38: 1001 ~ 1007.
- [24] Hurban P, Thummel C, 1993. Isolation and characterization of fifteen ecdysone-inducible *Drosophila* genes reveal unexpected complexities in ecdysone regulation. *Mol. Cell. Biol.*, 13: 7101 ~ 7111.
- [25] Li B, Xia QY, Lu C, et al. 2005. Analysis of cytochrome P450 genes in silkworm genome (*Bombyx mori*). *Science in China*, 48: 414 ~ 418.
- [26] Li X, Schuler MA, Berenbaum MR, 2002. Jasmonate and salicylate induce expression of herbivore cytochrome P450 genes. *Nature*, 419(6908): 712 ~ 715.
- [27] Maeda S, Nakashima A, Yamada R, et al. 2008. Molecular cloning of ecdysone 20-hydroxylase and expression pattern of the enzyme during embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 149(3): 507 ~ 516.
- [28] 米智, 柳照应, 朱勇, 等. 2010. 添食氟化物对家蚕中肠组织细胞色素 P450 和 b5 含量的影响. *蚕业科学*, 36(3): 539 ~ 543.

- [29] Namiki T, Niwa R, Sakudoh T, et al. 2005. Cytochrome P450 CYP307 A1 / Spook: a regulator for ecdysone synthesis in insects. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337: 367 ~ 374.
- [30] Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, et al. 2004. Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature. 11 recommendations for genes. Pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics*, 14 (1): 1 ~ 18.
- [31] Niwa R, Matsuda T, Yoshiyama T, et al. 2004. CYP306A1, a cytochrome P450 enzyme, is essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic glands of *Bombyx* and *Drosophila*. *Journal of Biological Chemistry*, 279: 35942 ~ 35949.
- [32] Niwa R, Sakudoh T, Namiki T, et al. 2005. The ecdysteroidogenic P450 Cyp302a1 / disembodied from the silkworm, *Bombyx mori*, is transcriptionally regulated by prothoracicotropic hormone. *Insect Molecular Biology*, 14: 563 ~ 571.
- [33] Omura T, 1993. Localization of cytochrome P450 in membranes: mitochondria. In: Schenkman JB, Greim H eds. Cytochrome P450. Springer, Berlin. 61 ~ 69.
- [34] Ono H, Rewitz KF, Shinoda T, et al. 2006. Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera. *Developmental Biology*, 298: 555 ~ 570.
- [35] Rewitz KF, O'Connor MB, Gilbert LI, 2007. Molecular evolution of the insect Halloween family of cytochrome P450s: phylogeny, gene organization and functional conservation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 37(8): 741 ~ 753.
- [36] Robertson HM, Wanner KW, 2006. The chemoreceptor superfamily in the honey bee, *Apis mellifera*: expansion of the odorant, but not gustatory, receptor family. *Genome Research*, 16: 1395 ~ 1403.
- [37] Rogozin IB, Wolf YI, Sorokin AV, et al. 2003. Remarkable interkingdom conservation of intron positions and massive, lineage-specific intron loss and gain in eukaryotic evolution. *Curr. Biol.*, 13: 1512 ~ 1517.
- [38] Scott JG, Kasai S. 2004. Evolutionary plasticity of monooxygenase-mediated resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 78(3): 171 ~ 178.
- [39] Scott JG, Liu N, Wen Z, 1998. Insect cytochromes P450: diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 121: 147 ~ 155.
- [40] Snyder MJ, Hsu EL, Feyereisen R, 1993. Induction of cytochrome P450 activities by nicotine in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Chem. Ecol.*, 19(12): 2903 ~ 2916.
- [41] Tijet N, Helvig C, Feyereisen R, 2001. The cytochrome P450 gene superfamily in *Drosophila melanogaster*: annotation, intron-exon organization and phylogeny. *Gene*, 262: 189 ~ 198.
- [42] Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, 452: 949 ~ 955.
- [43] 王燕红, 王东, 李兵, 等. 2009. 野桑蚕细胞色素 P450 家族 CYP4 M5 基因的克隆和诱导表达. *蚕业科学*, 35(1): 78 ~ 83.
- [44] Warren JT, Petryk A, Marques G, et al. 2004. Phantom encodes the 25-hydroxylase of *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*: a P450 enzyme critical in ecdysone biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 34: 991 ~ 1010.
- [45] Yamamoto K, Ichinose, H, Aso Y, et al. 2010. Expression analysis of cytochrome P450s in the silk moth, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97: 106.
- [46] 赵华强, 宋丽莉, 李兵, 等. 2010. 野桑蚕细胞色素 P450 氧化酶活性测定及 CYP9 家族基因的诱导转录. *浙江农业学报*, 22(3): 287 ~ 291.
- [47] Zhou HL, Chen KP, Yao Q, et al. 2008. Molecular cloning of *Bombyx mori* cytochrome P450 gene and its involvement in fluoride resistance. *J. Hazard. Mater.*, 160: 330 ~ 336.

## “野三元”家蚕新品种农村试养成绩简报

据新丰 尹 钢 刘松亮

(山西省阳城县蚕桑服务中心,山西阳城 048100)

随着阳城县桑园面积的不断增加,养蚕规模大户的不断涌现,对家蚕品种强健好养、高产稳产的特性要求越来越高。为此,2011年秋,我们从中国农业科学院蚕业研究所引进了家蚕新品种“野三元”,并在农村布点和现行品种进行对比试验,现将试养结果报告如下。

### 1 材料、方法

#### 1.1 供试蚕品种

参试品种“野三元”,由中国农业科学院蚕业研究所提供,它具有抗性非常强的野蚕血缘。

对照品种“871×872”,由山西省阳城县兴阳蚕种场提供,为目前我县主推品种。

#### 1.2 试验内容

调查孵化率、眠性、食桑量、龄期经过、发育情况、发病情况、蚕茧产量和质量及缫丝成绩等。

#### 1.3 试验方法

1.3.1 地点、时间、数量 2011年秋季,选择寺头乡董家岭村、东冶镇东轩村、次营镇陶河村、芹池镇芹池村四个村作为试验点,在各点设二个试验户。每户在同一饲养条件下分设对照区和试验区进行对比试养。每户饲养对照种0.5张,试验种0.5张。共设试验户8户,设置对照区8个,试验区8个。试验种“野三元”4张,参试对照种“871×872”4张。

1.3.2 催青、养蚕、上蔟 催青由山西省阳城

县兴阳蚕种场统一进行,小蚕采用温湿自控小蚕饲养棚或塑料薄膜覆盖育,大蚕采用室外大棚或地蚕育,上蔟采用方格蔟自动上蔟技术。

1.3.3 收烘缫丝 试验蚕茧进行专门收购、烘干,由阳城县佳美茧丝绸有限公司进行缫丝鉴定。

### 2 试养结果

#### 2.1 孵化率

“野三元”品种的一日孵化率达到94.6%以上,实用孵化率达到97.33%,与“871×872”相仿(见表1)。

表1 蚕种孵化率调查表(%)

| 比试地点 | 一日孵化率 |         | 实用孵化率 |         |
|------|-------|---------|-------|---------|
|      | 野三元   | 871×872 | 野三元   | 871×872 |
| 次营   | 94.8  | 94.5    | 97.8  | 98      |
| 寺头   | 95.6  | 94.8    | 98    | 96.5    |
| 东冶   | 94.5  | 95.1    | 97.5  | 97.6    |
| 芹池   | 93.5  | 94      | 96    | 97.5    |
| 平均   | 94.60 | 94.60   | 97.33 | 97.40   |

#### 2.2 食桑情况

“野三元”的食桑特点是蚕儿对叶质要求不高,食桑快猛,特别是盛食期食桑旺盛,且盛食期较长,而且在食桑过程中不踏叶、残桑少。张种食桑量857.5kg,比“871×872”多43.4kg(见表2)。

表2 各龄食桑情况(kg)

| 比试地点  | 品种        | 一龄   | 二龄    | 三龄    | 四龄    | 五龄    | 全龄食桑  |
|-------|-----------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 次营    | 野三元       | 1.8  | 6     | 25    | 115   | 715   | 862.8 |
|       | 871 × 872 | 1.8  | 6.5   | 24.6  | 108.5 | 665   | 806.4 |
| 寺头    | 野三元       | 1.6  | 6.8   | 26.5  | 115   | 697   | 846.9 |
|       | 871 × 872 | 1.6  | 7     | 25.8  | 117.4 | 650   | 801.8 |
| 东冶    | 野三元       | 1.8  | 6.6   | 25.5  | 119   | 718   | 870.9 |
|       | 871 × 872 | 1.8  | 7     | 27.2  | 115.5 | 679   | 830.5 |
| 芹池    | 野三元       | 1.5  | 6.6   | 24.8  | 106.6 | 710   | 849.5 |
|       | 871 × 872 | 1.5  | 6.8   | 25.5  | 112.2 | 672   | 818   |
| 平均    | 野三元       | 1.7  | 6.5   | 25.5  | 113.9 | 710.0 | 857.5 |
|       | 871 × 872 | 1.7  | 6.8   | 25.8  | 113.4 | 666.5 | 814.2 |
| 与对照相比 |           | 0.0  | -0.3  | -0.3  | 0.5   | 43.5  | 43.4  |
| %     |           | 0.00 | -4.76 | -1.26 | 0.44  | 6.53  | 5.32  |

### 2.3 龄期经过

野三元全龄经过 27:01(d:h)左右,其中五

表3 龄期经过(d:h)

| 地点    | 品种        | 一龄   | 二龄   | 三龄   | 四龄   | 五龄   | 全龄经过  |
|-------|-----------|------|------|------|------|------|-------|
| 次营    | 野三元       | 4:20 | 3:08 | 4:15 | 5:23 | 8:10 | 27:04 |
|       | 871 × 872 | 4:15 | 3:12 | 4:16 | 5:18 | 8:16 | 27:05 |
| 寺头    | 野三元       | 4:18 | 3:10 | 4:15 | 5:13 | 8:22 | 27:06 |
|       | 871 × 872 | 4:15 | 3:14 | 4:23 | 5:16 | 9:05 | 28:01 |
| 东冶    | 野三元       | 4:16 | 3:06 | 4:19 | 5:09 | 8:08 | 26:10 |
|       | 871 × 872 | 4:18 | 3:10 | 4:22 | 5:15 | 8:13 | 27:06 |
| 芹池    | 野三元       | 4:22 | 3:08 | 4:12 | 5:15 | 8:22 | 27:07 |
|       | 871 × 872 | 4:18 | 3:12 | 4:18 | 5:16 | 8:15 | 27:07 |
| 平均    | 野三元       | 4:19 | 3:08 | 4:15 | 5:15 | 8:15 | 27:01 |
|       | 871 × 872 | 4:16 | 3:12 | 4:19 | 5:16 | 8:18 | 27:11 |
| 与对照相比 |           | 0:3  | -0:4 | -0:4 | -0:1 | -0:3 | -0:10 |

龄期 8:15(d:h)左右,全龄经过较“871 × 872”少 10h 左右(见表 3)。

### 2.4 眠起情况

“野三元”各龄蚕入眠快,眠起齐一,三龄和大眠蚕体重与对照相仿(见表 4)。

表4 眠蚕体重(g)

| 比试地点 | 三眠蚕  |           |       | 大眠蚕  |           |       |
|------|------|-----------|-------|------|-----------|-------|
|      | 野三元  | 871 × 872 | 与对照相比 | 野三元  | 871 × 872 | 与对照相比 |
| 次营   | 0.12 | 0.11      | 0.01  | 1.13 | 1.1       | 0.03  |
| 寺头   | 0.09 | 0.12      | -0.03 | 1.12 | 1.13      | -0.01 |
| 东冶   | 0.12 | 0.11      | 0.01  | 0.98 | 1.08      | -0.1  |
| 芹池   | 0.12 | 0.11      | 0.01  | 1.14 | 0.95      | 0.19  |
| 平均   | 0.11 | 0.11      | 0.00  | 1.09 | 1.07      | 0.03  |

### 2.5 发病情况

从发病情况看,“野三元”比“871 × 872”的发病头数少,发病时间延迟,在次营和芹池两个试验点表现尤为明显,次营点的“野三元”发病头数为 238 头,“871 × 872”发病头数为 2 018 头。芹池点“野三元”发病头数为 260 头,“871 × 872”发病头数为 1 811 头。蚕病种类以血液型脓病居多,间有细菌性肠胃病和病毒性软化病发生(见表 5)。

### 2.6 饲养成绩

“野三元”平均收蚁量为 12.9g,公斤茧粒数为 587 粒,较“871 × 872”低 5 粒;张种产茧 44.7kg,较“871 × 872”高出 4.7kg;“野三元”的克蚁产茧 3.46kg,较“871 × 872”高 0.32kg;“野三元”的公斤茧用桑量较“871 × 872”低 1.35kg(见表 6)。

### 2.7 茧质调查

“野三元”的鲜茧茧层率为 23.2%,较对照种“871 × 872”低 0.7%,干茧茧层率也较“871 × 872”低 1.54%，“野三元”的上茧率却较“871 × 872”高 1.79%(见表 7)。

### 2.8 丝质调查

从缫丝成绩看,“野三元”的茧丝长较“871 × 872”短 16m,但“野三元”的解舒丝长

表5 发病头数

| 比试地点 | 三 龄 |         |       | 四 龄  |         |       | 五 龄 |         |       | 合 计    |         |         |
|------|-----|---------|-------|------|---------|-------|-----|---------|-------|--------|---------|---------|
|      | 野三元 | 871×872 | 与对照相比 | 野三元  | 871×872 | 与对照相比 | 野三元 | 871×872 | 与对照相比 | 野三元    | 871×872 | 与对照相比   |
| 次营   | 0   | 3       | -3    | 0    | 15      | -15   | 238 | 2000    | -1762 | 238    | 2018    | -1780   |
| 寺头   | 0   | 0       | 0     | 1    | 0       | 1     | 590 | 300     | 290   | 591    | 300     | 291     |
| 东冶   | 0   | 0       | 0     | 0    | 1       | -1    | 100 | 500     | -400  | 100    | 501     | -401    |
| 芹池   | 0   | 1       | -1    | 0    | 10      | -10   | 260 | 1800    | -1540 | 260    | 1811    | -1551   |
| 平均   | 0   | 1       | -1    | 0.25 | 6.5     | -6.3  | 297 | 1150    | -853  | 297.25 | 1157.5  | -860.25 |

表6 饲养成绩

| 比试地点 | 收蚁克数(g) |         |       | 公斤茧粒数(个) |         |       | 单张产茧(kg) |         |       | 克蚁产茧(kg) |         |       | 公斤茧用桑(kg) |         |       |
|------|---------|---------|-------|----------|---------|-------|----------|---------|-------|----------|---------|-------|-----------|---------|-------|
|      | 野三元     | 871×872 | 与对照相比 | 野三元      | 871×872 | 与对照相比 | 野三元      | 871×872 | 与对照相比 | 野三元      | 871×872 | 与对照相比 | 野三元       | 871×872 | 与对照相比 |
| 次营   | 13      | 13.3    | -0.3  | 586      | 592     | -6    | 45.2     | 35      | 10.2  | 3.48     | 2.63    | 0.85  | 19.09     | 23.04   | -3.95 |
| 寺头   | 12.7    | 12.5    | 0.2   | 603      | 595     | 8     | 42.5     | 43.4    | -0.9  | 3.35     | 3.47    | -0.13 | 19.93     | 18.47   | 1.45  |
| 东冶   | 12.7    | 12.5    | 0.2   | 575      | 584     | -9    | 46.4     | 44.5    | 1.9   | 3.65     | 3.56    | 0.09  | 18.77     | 18.66   | 0.11  |
| 芹池   | 13.2    | 12.7    | 0.5   | 585      | 597     | -12   | 44.5     | 37      | 7.5   | 3.37     | 2.91    | 0.46  | 19.09     | 22.11   | -3.02 |
| 平均   | 12.9    | 12.8    | 0.1   | 587      | 592     | 5     | 44.7     | 40      | 4.7   | 3.46     | 3.14    | 0.32  | 19.22     | 20.57   | -1.35 |

表7 茧质调查表

| 品种      | 鲜茧茧层率(%) | 干茧茧层率(%) | 上茧率(%) |
|---------|----------|----------|--------|
| 野三元     | 23.2     | 50.84    | 95.16  |
| 871×872 | 23.9     | 52.38    | 93.37  |
| 对 照     | -0.7     | -1.54    | 1.79   |

表8 丝质调查表

| 品种      | 茧丝长(m) | 解舒丝长(m) | 解舒率(%) | 茧丝纤度(D) | 清洁(分) | 洁净(分) |
|---------|--------|---------|--------|---------|-------|-------|
| 野三元     | 1068   | 729     | 68.28  | 3.125   | 97.6  | 90    |
| 871×872 | 1084   | 724     | 66.79  | 2.641   | 97.8  | 90    |
| 与对照相比   | -16    | 5       | 1.49   | 0.484   | -0.2  | 0     |

却达到 729 m,较“871×872”长 5m,解舒率达到 68.28%,较“871×872”高 1.49%。其它各项指标也均表现优良,可缫出 4A 级以上优良茧丝(见表 8)。

### 3 小结

“野三元”新蚕品种在饲养性状上表现为

品种孵化齐一,眠起迅速,食桑旺盛,大蚕期对叶质的要求不高,蚕体健壮,病弱蚕少,具有耐粗放饲养、抗逆性强的特点。在经济性状上“野三元”在茧层率、茧丝长较对照种略低,但新品种的上茧率、解舒率、解舒丝长均高于对照种。建议秋蚕可适当扩大试养面积,为今后全县大面积推广作好准备。

## 家蚕病原菌检测诊断研究进展

周洪英 孙波 叶建美 许淑琼 吴洪丽 吴恢

(湖北省农业科学院经济作物研究所,湖北武汉 430064)

茧丝绸是中国的传统产业,在世界上占据着主导地位。至2009年,我国桑园面积约80万公顷,栽桑养蚕农户1000万户,蚕茧收入约190亿元,涉及全国26个省市区。蚕病的发生给蚕桑生产带来了很大的损失,据有关调查研究,全国各种蚕病发生率在5%~10%左右,经济损失达到了19亿元以上。不同地区、不同年份、不同养蚕水平蚕病发生率不一样,湖北省蚕病发生率约在12%左右,每年损失约3000万元以上。病害发生初期检测诊断家蚕病原微生物,在争取时间控制病情、减少蚕农损失方面,具有重要意义。

### 1 家蚕病原种类

#### 1.1 微粒子

家蚕微粒子病(Pebrine disease)由家蚕微孢子虫(*Nosema bombycis*, N. b)寄生而引起,家蚕微粒子病是一种古老的、分布很广的传染性蚕病,世界各养蚕国都有发生,是一种世界性的检疫病害,也被列入我国进境动物二类传染病。家蚕微孢子虫是专性寄生于家蚕的微孢子虫,也是*Nosema*属微孢子虫的代表种之一,现被归于真菌类的“古怪”寄生虫(odd parasites)<sup>[1-4]</sup>。由于其特殊的经卵传染方式,对蚕业生产,尤其是蚕种生产造成严重损失。

#### 1.2 病毒病

家蚕病毒病分血液型脓病、中肠型脓病、病毒性软化病和浓核病四种,分别由核型多角体病毒(BmNPV)、质型多角体病毒(BmCPV)、病毒性软化病病毒(BmFV)和浓核病病毒(BmDNV)感染引起。病蚕排泄物、体液、尸体均可成为传染源,具有传染源广泛,发病迅速的特点,是蚕桑生产中发生率最高的病害,占整个蚕病发生率的60%~70%,是目前家蚕病害中继家蚕微粒子病之后,又一被列为动物疫病的病种。

#### 1.3 细菌病

家蚕细菌病有败血病、卒倒病和细菌性胃肠病三种。

常见的败血病有黑胸败血病,由芽孢杆菌属黑胸败血病菌(*Bacillus* sp.)引起而发病,尸体胸部及腹部1~3环节出现墨绿色的尸斑;灵菌败血病,由粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)引起发病,尸体为嫣红色;青头败血病,由弧菌科气单孢菌属(*Aeromonas* sp.)引起发病,尸体胸部背面出现绿色有气泡尸斑。

卒倒病即细菌性中毒病,是由于家蚕食下苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)及其变种产生的伴孢晶体中 $\delta$ -内毒素引起的,常见于五龄蚕,主要为急性。

细菌性肠道病也称细菌性软化病、细菌性胃肠病,俗称空头病或起缩病,本病是细菌性疾病中最慢性的蚕病。以肠球菌属(*Enterococcus*)的*faecalis* (*Ent. faecalis*),*faecium*

作者简介:周洪英(1980-),女,湖北,硕士,助理研究员。E-mail: cordyceps.m@163.com

通信作者:吴洪丽,女,研究员。Tel: 027-87374527, E-mail:wuhl001@163.com

(*Ent. faecium*) 和两者的中间型为主的多种细菌在蚕儿中肠内繁殖所致病<sup>[5]</sup>。

#### 1.4 真菌病

家蚕真菌病中, 主要是由半知菌类真菌分生孢子萌发, 分泌蛋白酶水解家蚕体表几丁质, 穿透蚕皮侵入蚕体, 或经口感染幼蚕在消化管内萌发生长, 引发家蚕真菌病。根据蚕尸体上长出的菌丝颜色不同, 分为白僵菌、黄僵菌、绿僵菌和曲霉病等。

白僵病主要致病菌是球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill), 其次是卵孢白僵菌(*Beauveria tenella* (Delacr.) Siem), 黄僵病的病原菌与白僵病的相同, 分属不同的血清型。绿僵病致病菌为莱氏野村菌(*Nomuraea rileyi*), *Nomuraea* 也称为绿僵菌属, 多为昆虫寄生菌。曲霉病的致病菌有黄曲霉(*Aspergillus flavus* Link)、米曲霉(*A. oryzae* Cohn)、寄生曲霉(*A. parasiticus* Speare)、溜曲霉(*A. tamari* Kita)、赭曲霉(*A. ochraceus* Wilhelm)等, 黄曲霉和米曲霉病害较普遍。此外, 黑僵菌由绿僵菌属金龟子绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*)引起, 灰僵菌由粉拟青霉菌(*Paecilomyces farinosus*)引起, 赤僵菌由玫烟色拟青霉(*Paecilomyces fumosoroseus*)引起, 草僵病由多毛菌属草僵菌(*Hirsutella patouillard*)引起。

此外, 由镰孢属(*Fusarium*)的 *F. semitectum*, *F. acridiorum*, *F. sp* 和 *F. spp.* 等非特异性致病菌引发的镰刀菌病, 以及由子囊菌红酵母属(*Rhodotorula*)引发的酵母菌病, 在生产上也有零星发生。

## 2 检测诊断技术

### 2.1 镜检技术等表型观察

2.1.1 微粒子 光学显微镜检验家蚕微粒子孢子, 是蚕业生产上的主要手段。家蚕微粒子孢子在光镜下一般为卵圆形, 大小 2.9~4.1  $\mu\text{m} \times$  1.72~2.1  $\mu\text{m}$ , 群体较整齐, 表面光滑, 呈上下

摆动状, 有强折光性。刘仁华等人经研究, 认为样品中微粒子孢子数目低于  $3 \times 10^3$  个/ml 时, 镜检到孢子的概率接近于 0; 当样品中微粒子虫数目等于或大于  $4 \times 10^4$  个/ml 时, 镜检到孢子的概率为 1<sup>[6]</sup>。唐顺明等采用铬变素 2R 法(*Cluromotrope 2R*)染色家蚕微孢子虫孢子和绿僵(*Nomuraea rileyi*)孢子、曲霉(*Asperillus flavus*)孢子、花粉粒(*Pollengranule*)等与 *N.b* 孢子形状相似物, *Chrotrnotrope 2R* 法特异性地将 *N. b* 孢子染成粉红色, 绿僵孢子、曲霉孢子、花粉粒未被染成红色, 初步认为该法可应用于母蛾镜检的 *N. b* 鉴定, 能明显提高 *N. b* 的检出率与准确性<sup>[7]</sup>。张香琴、蔡健荣用计算机图像识别技术来检测微粒子病, 以替代人工镜检。对拍摄的原始图像进行对比处理, 用快速 Otsu 自动阈值分割法进行二值化, 实现了微粒子与背景和杂质的分离, 对微粒子进行分层识别<sup>[8]</sup>。黄宏华、蔡健荣利用数学形态学的方法根据微粒子图像的形状特征来检测微粒子区域, 实现微粒子和背景的分割, 运用基于遗传算法的 BP 网络进行了识别和分类<sup>[9]</sup>。

2.1.2 病毒病 400~600 倍显微镜观察病蚕血液或者中肠, 可观察到病毒粒子。BmNPV 镜检时, 取病蚕血经苏丹 III 染色法, 或加等量乙醇乙醚混合液, 将 BmNPV 多角体与脂肪球相区别。BmCPV 镜检病蚕中肠后部组织, 滴加用 4% 稀盐酸消除干扰杂质后, 可清晰检测到多角体。BmFV、BmDNL 取病蚕中肠, 用卡诺氏固定液固定, 焦宁—甲基绿染色。BmFV 病蚕镜检圆筒状细胞的细胞核处可见桃红色的 A 型球状体和单独存在的 B 型球状体; BmDNL 病蚕镜检, 可见大量双球菌和球菌, 无多角体, 圆筒状细胞的细胞核显著膨大, 染色性较正常细胞核明显降低。

电镜负染技术、观察、诊断家蚕病毒病。方琦等应用电镜技术, 从病蚕中肠上皮细胞检测到两种家蚕主要病毒 CPV 和 NPV<sup>[10]</sup>。

2.1.3 细菌真菌病 细菌性败血症家蚕的血

淋巴镜检,可见大量的细菌;卒倒病镜检病蚕消化道内容物,可见大量杆菌和芽孢,镜检到伴孢晶体时可确诊;细菌性肠道病病蚕消化液镜检,可见大量球菌,死前的病蚕消化液因二次感染还能检出杆菌等。

真菌病害症状不明显时,可取濒死病蚕,镜检血液或病灶处体壁,根据检出的孢子形态或菌丝体,确定病原菌。

另外还可将病蚕体内的细菌真菌分离得到纯培养物,进行传统的表型检测方法,使用菌体菌落形态观察及生化反应等技术,成本低,但需要较多的人力和多种辅助实验,难以区分到种以下,溯源性不够。

## 2.2 免疫学技术

2.2.1 微粒子 血清学检测特异性强、灵敏度高,已建立的免疫学检测法有:酶联免疫吸附法、荧光抗体法、凝聚法、单克隆抗体法、免疫过氧化酶染色法等。不同种属的微孢子虫,表面的抗原决定簇不同,应用血清学方法鉴别家蚕微孢子虫,首先要制备出针对微孢子虫表面抗原的抗血清。

梅玲玲等用 SPA - 协同凝集反应来快速鉴别微孢子虫孢子,在 *N.b* 孢子浓度为  $1.1 \times 10^4$  个/ml 时,即可产生肉眼可见的凝集现象,浓度超过  $4.4 \times 10^4$  个/ml 时,形成大块凝集体,借助显微镜观察时,检测灵敏度可到  $1.1 \times 10^3$  个/ml,可将家蚕微孢子与桑尺蠖微孢子、柞蚕微孢子特异区别<sup>[11]</sup>;万嘉群用酶标抗体间接法和酶标抗体 PAP 法检测家蚕微孢子,并对两种方法进行对比研究<sup>[12]</sup>;以上检测方法及陈租佩等人所研究的碳素凝集法<sup>[13]</sup>、黄自然等人做的荧光抗体检验技术初步研究<sup>[14]</sup>,都是在多抗血清的基础上进行的,由于天然抗体系统的复杂性,存在交叉反应等的缺点。

随着单克隆抗体技术的广泛应用,在蚕种检测上也有了大量的研究。Shamim、三毛明人应用制备出来的单克隆抗体进行胶乳凝集实验的研究,并用单克隆抗体致敏胶乳和精

制孢子研究了致敏条件和反应条件,但此单抗有交叉反应;陈建国等人制备出家蚕微孢子孢子单克隆抗体,用间接 ELISA 法对其在检测上的初步应用做了研究,建立了以完整的家蚕微孢子虫为抗原的 ELISA 检测方法,最低检测量为 700 个孢子,个别抗体与柞蚕微孢子虫有交叉反应<sup>[15]</sup>;而万国富、卢铿明等用单克隆抗体直接 ELISA 法检测家蚕微孢子虫,经比较认为,直接法和间接法检测的灵敏度和特异性二者差异不大,但直接法操作简单。

研究者针对孢子所特有的孢子壁构造,开发了几种特异性的染色法,其原理在于一些化学荧光增亮剂可特异地快速结合到孢子的含几丁质的孢子内壁,与微孢子结合的增亮剂在紫外光激发下,发出可见光。如刘吉平等用单抗免疫金银染色法诊断家蚕微孢子虫;徐兴耀等也建立了抗家蚕微孢子虫单抗细胞株,使用抗家蚕微孢子虫的单克隆抗体,结合免疫金银染色法(IGSS)进行检测,并找到了该细胞株单抗直接 IGSS 法最佳工作条件<sup>[16]</sup>。

万森用纯化的家蚕微孢子虫抗兔多抗包被,作为捕获抗原,加入检测样品,然后用辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体作为检测抗原,建立双抗体夹心 ELISA 检测方法,并对各步实验条件进行优化。该法对纯化孢子的检测量为  $3.125 \times 10^5$  个/ml,对“添毒”蚕卵的检测量为  $5 \times 10^6$  个/ml。可以用于实际生产中的检测,灵敏度有待于进一步研究加以提高<sup>[17]</sup>。

制备抗 *N.b* 孢子表面抗原的抗血清和单克隆抗体,用乳胶凝集法、酶标抗体法、碳素凝集反应等检测 *N.b*;新构建了用抗 *N.b* 的单克隆抗体结合免疫金银染色(IGSS)的方法检测 *N.b*<sup>[18]</sup>。

2.2.2 病毒病 应用双向免疫扩散(CIEP)检测家蚕病毒病。双向免疫扩散实验是相应的抗原与抗体在琼脂凝胶板中的相应孔内,分别向周围自由扩散。在抗原和抗体孔之间,扩

散的抗原与抗体相遇时发生特异性反应,在浓度比例合适处出现可见的白色沉淀线。根据沉淀线的位置、形状以及对比关系,可对抗原或抗体进行定性分析。此法可在感病后27~39小时左右检出,室温或者37℃培养一天,即可读出结果。如果沉淀带不清晰,可将琼脂板表面紧贴一张湿滤纸,40~45℃烘干,1%氨基黑染色,再脱色,沉淀带被染成蓝色,易于识别。

应用对流免疫电泳(CIEP)检测家蚕病毒病。对流免疫电泳法(Counter immuno-electrophoresis)是琼脂凝胶内扩散法的一种。蛋白质是一种两性电解质,在碱性缓冲液中带负电荷,在电场中向正极移动。家蚕病毒抗原为蛋白质,而其相应的抗体为分子量较大的免疫球蛋白G(IgG)。IgG在碱性缓冲液中所带的电荷甚少,同时由于琼脂的电渗作用,使IgG不能向正极移动,反而向负极移动,因此可以达到抗原与抗体“对流”即作相对移动的状态。当抗原与抗体在琼脂薄板上相遇时,即产生特异的白色沉淀,以此可以检测抗原的存在。应用对流免疫电泳法,可迅速而且准确地诊断家蚕病毒病。

应用酶标抗体法检测家蚕病毒病。把抗原抗体的免疫反应原理和酶的高效催化作用相结合,大大提高免疫检测的灵敏度。酶标抗体在抗原形成免疫复合物后,经酶的底物显色,从而检出病毒抗原。有酶标电泳法(EL-CIEP),酶标组化法(IEHC),可溶性酶—抗酶法(PAP),斑点免疫结合测定法(DIBA)。

应用生物素—亲和素系统(Avidin-Biotin system, ABS)检测家蚕病毒病。生物素(biotin, B)广泛分布于动、植物组织中,有两个环状结构, I环为咪唑酮环,是与亲和素结合的主要部位; II环为噻吩环,是结合抗体和其他生物大分子的惟一结构,经化学修饰后,生物素可成为带有多种活性基团的衍生物——活化生物素。亲和素(avidin, AV)亦称抗生物素蛋白、卵白素,耐热并耐受多种蛋白水解酶的

作用。尤其是与生物素结合后,稳定性更好。每个亲和素能结合4个分子的生物素,二者之间的亲和力极强,比抗原与抗体间的亲和力至少高1万倍,因此二者的结合特异性高和稳定性好。亲和素以结合1 μg生物素所需的量作为其活性单位,1mg纯的亲和素的活性约为13—15U。BAS即可用于微量抗原、抗体及受体的定量、定性检测及定位观察研究,亦可制成亲和介质用于上述各类反应体系中反应物的分离、纯化,灵敏度高,特异性强,稳定性强,适用性广等优点。可在家蚕接种浓核型病毒8小时后检出。

应用乳胶凝集法(LAT)检测家蚕病毒病。载体为聚苯乙烯乳胶,具有良好的吸附蛋白质的性能,与抗DNV免疫球蛋白混合后致敏,致敏乳胶悬液与带毒样品混合后,发生凝集反应,检出时间较早,检出阳性率较高,最大特点是检测时间短。可检测的DNV最小量为 $1 \times 10^{-4}$ O.D。

钱元骏等1989年以上述五种方法,检测纯化的家蚕浓核病毒(DNV),灵敏度为 $1 \times 10^{-1} \sim 1 \times 10^{-4}$ O.D,以DIBA法检测灵敏度最高,分别为LAT法、ELCIEP法、CIEP法的10倍、160倍、1000倍。检测蚕体内的DNV时,可以在经口接种DNV后8~40小时检出阴性反应,以ABS法检出阳性反应最早。在同样接种病毒条件下,要到感染后5~6天才表现出明显的外观症状,这些手段可作为有效手段诊断家蚕浓核病<sup>[19]</sup>。

李卫党等2000年建立家蚕核型多角体病毒蛋白的dot-ELISA检测方法,此法与人血清和兔血清无交叉反应,可检测微量多角体病毒蛋白,灵敏度达10ng,操作简便,可用于感染家蚕的血清检测<sup>[20]</sup>。

单克隆抗体用于许多病毒病的诊断,具有快速、灵敏和特异性强等优点,并可用于强毒、弱毒的鉴别。家蚕病毒性软化病是家蚕四种病毒病之一,朱宏杰(2006)对从中国浙江桐乡蚕区分离的一株疑似家蚕病毒性软化病

病毒(BmIFV)的非包含体病毒进行了研究,利用杂交瘤技术获得了2株仅对BmIFV有特异性反应的单抗,而与家蚕浓核病毒(BmDNV)无特异性反应,用于浙江省桐乡蚕区的病毒性软化病检测<sup>[21]</sup>。

NPV、CPV和DNV的兔抗血清以及抗DNV的单克隆抗体,通过酶抗体间接(II P法)诊断法、乳胶凝集反应、偶联单克隆抗体的乳胶蛋白A(PALMAL)、免疫双扩散、对流免疫电泳、免疫荧光技术、ABC-ELISA法等可进行病毒鉴定、检测、定位、早期诊断等方面的研究;还制备了家蚕DNV的诊断试剂盒,将单克隆抗体与双向免疫技术结合,诊断家蚕浓核病;将此单克隆抗体与免疫酶技术或荧光抗体技术结合,能在感染后16~18h的家蚕中肠组织内检测到病毒抗原<sup>[22]</sup>。

**2.2.3 细菌真菌病** 家蚕白僵菌的分生孢子和芽生孢子都有良好的抗原性,芽生孢子比分生孢子抗原性好;不同株系的白僵菌芽生孢子之间既存在免疫交叉反应,也表现免疫特异性<sup>[23]</sup>。

## 2.3 分子检测技术

**2.3.1 微粒子** 随着分子生物学的快速发展,其应用也越来越广泛,微粒子的分子生物学检测技术随之发展起来。微孢子的分子生物学检测方法是利用多种PCR技术建立起来的,通过扩增SSU、LSUrRNA等保守基因序列的不同区域、基因间隔区以及各种微孢子的核苷酸特异性序列设计种属特异性引物和探针,再通过PCR技术和原位杂交技术等手段进行检测,多是基于微孢子虫16SrRNA基因设计引物进行的检测。

1996年,陈秀等首先在国内报道了用PCR技术,利用微粒子DNA的高度保守序列,设计了1对引物,对微粒子进行定性PCR检测,并取得了成功<sup>[24]</sup>。

蔡平钟等设计合成一对引物,对家蚕微孢子虫及其近缘种孢子的DNA进行PCR检测,结果表明只有家蚕微孢子虫孢子DNA

获得特异性扩增区带,大小为317bp,可区别于Nosema sp. MG1和MG2、柞蚕微孢子虫<sup>[25]</sup>。

邱宝利等为了将家蚕微孢子虫(N.b)从蚕业生产中流行的10多种病原性微孢子虫中鉴定出来,并对其发病程度进行检测,用PCR技术合成了一段317bp的DNA片段,将其克隆到大肠杆菌E.coliDH5a中,并大量制备该片段,用地高辛(DIG)标记成探针,经点杂交和Southern杂交检测,发现该片段为N.b.所特有。该探针为N.b.的特异性检测探针,灵敏度可达1ng DNA水平。对蚕业生产上的带毒蚕蛾和蚕卵的模拟检测证明,该DIG探针可将N.b.发病初期的带毒蚕蛾和蚕卵检出,从而可以避免微粒子病的大发生<sup>[26]</sup>。

韦亚东等根据N.b.的rRNA基因高度保守的特点,设计合成了1对PCR引物,从N.b.基因组DNA上扩增出1个112bp片段,用同位素标记后作为检测N.b.的特异性探针。采用原位杂交的方法,对家蚕卵及感染N.b.4、6和10d的幼虫进行原位杂交检测。结果证明了原位杂交技术诊断家蚕卵及幼虫体内N.b.的可行性,为蚕种质量检测及家蚕微孢子虫病的早期诊断探索新的途径做了有意义的尝试。以上可以看出,对微孢子的PCR检测多是基于微孢子虫16SrRNA基因设计引物进行的检测<sup>[27]</sup>。

刘吉平等选用了一对根据N.b.孢子及其相近种属微孢子的SSU-rRNA保守区段设计的有效引物VIF/530R,从模拟感染不同浓度N.b.孢子母蛾、蚕卵的角度,较系统地研究了PCR诊断技术的可检测灵敏度和对模拟感染家蚕微粒子病的诊断效果,为PCR分子诊断家蚕微粒子病的实用化研究提供参考。对N.b.纯孢子DNA模板,PCR可检测灵敏度为 $3 \times 10^4 \text{N.b.} \cdot \text{ml}^{-1}$ (弱检测信号可到 $3 \times 10^2 \sim 3 \text{N.b.} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),对模拟染毒N.b.孢子的蚕蛾DNA模板,PCR可检测灵敏度为 $3 \times 10^5 \text{N.b.} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,两者分别已超过或达到目前生产上用显微镜的检毒水平。对模拟染毒N.b.孢子的蚕

卵 DNA 模板, VIF/530R 引物不能有效地检出蚕卵中染毒的 N.b 孢子, 推测在蚕卵 DNA 抽提物里可能含有抑制 PCR 扩增的未明因素, 而蚕蛾 DNA 抽提物里则无此抑制因素<sup>[28]</sup>。该课题组还筛选出一对可以鉴定典型家蚕微孢子虫 N.b 的引物, 经过比较六种不同昆虫微孢子虫表面蛋白的不同, 通过 SDS-PAGE 电泳将家蚕微孢子虫和斜纹夜蛾微孢子虫 (*N. liturae*) 和小菜蛾微孢子虫 (*N. xylostella*), 但难以区别柞蚕微孢子虫 (*N. pernyi*), 蝗虫微孢子虫 (*N. locustae*) 和桑尺蠖微孢子虫 (*N. atrilineata*)<sup>[29][30]</sup>。

Hatakeyama 等及汪琳基于家蚕微孢子虫生长因子基因、近缘种属微孢子虫核糖体小亚基 rRNA 基因、热激蛋白 hsp70 基因设计的多引物 PCR 实验, 用 N.b 孢子接种 5 龄幼虫获得感病母蛾的蚕卵, 抽样 5 粒蚕卵可检出 N.b 孢子弱信号, 抽样 10 粒蚕卵可检出强信号, 可同时检测出蚕体感染的 4 种重要微孢子, 简单快速灵敏度高。可见分子检测的 DNA 模板抽提、PCR 引物设计、反应体系条件等因素, 是分子检测法适用范围和灵敏度的关键<sup>[28]</sup>。

王见杨等利用 60 个随机引物构建了 8 种微孢子虫的 DNA 指纹图谱。结果表明: RAPD 技术可以区分不同来源的微孢子虫, 并可探求它们的亲缘关系<sup>[31]</sup>。

目前, 分子生物学技术在微孢子虫检测上的应用还有所限制, 一方面是因为用于进行引物和探针设计的基因序列还太少, 另一方面对检测方法标准体系的建立还需进一步摸索。但分子生物学检测方法与其他检测方法相比, 特异性和灵敏度都很高, 且操作方便。今后, 无论是对微孢子虫的检测还是对其他病原微生物的检测, 分子生物技术将得到广泛的应用。

环介导等温扩增法 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP), 2000 年开发的一种新颖的恒温核酸扩增方法, 是在 PCR

基础上发展而来, 其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物, 利用一种链置换 DNA 聚合酶在等温条件 (63℃ 左右) 保温 30~60 分钟, 即可完成核酸扩增反应。与常规 PCR 相比, 不需要模板的热变性、温度循环、电泳及紫外观察等过程, 扩增模板可达 10 拷贝或更少。LAMP 是一种全新的核酸扩增方法, 具有简单、快速、特异性强的特点。该技术不依赖任何专门的仪器设备, 实现现场高通量快速检测, 检测成本远低于荧光定量 PCR。华南农业大学蚕桑系将 LAMP 法应用于 N.b 的快速检测, 设计一组特异性引物 (F12/B12、F2/B2), 选择 N.b 拟假基因 rDNA 序列 (登陆号 D14632) 作为检测靶基因, 建立了家蚕微孢子虫 LAMP 检测方法, 开发出快速诊断试剂盒, 具有鉴定、快捷、方便的优势。

2.3.2 病毒病 核酸分子杂交技术迅速灵敏, 特异性强, 对病毒装配前的核酸也能检测, 可用于家蚕病毒病的早期诊断。糜克永等建立了家蚕质型多角体病毒 (CPV) 双链核糖核酸 (dsRNA) 分子杂交技术, 可用于 CPV 的早期检测。

PCR 技术可用于诊断家蚕核型多角体病毒。感染 BmNPV 的家蚕血淋巴样品抽取 DNA, 通过 PCR 扩增, 能看到清晰的 240bp 扩增片段, PCR 技术也适用于检测 BmNPV, 且具有微量、快速、灵敏、特异性强、样品处理简便等优点; 还可通过 PCR 法从蚕粪中检测 NPV 和 DNV。

姚勤等通过荧光定量 PCR, 研究家蚕核型多角体病毒 BmNPV 在其宿主幼虫体内不同组织中的增殖动态。对幼虫经口定量滴注病毒, 在接种后 9 个时间点, 对中肠、血淋巴和脂肪体进行取样。以 BmNPV DNA 聚合酶基因 (dnapol) 指示病毒拷贝数, 同时以家蚕细胞质肌动蛋白 A3 (actin A3) 基因作为参比基因, 用荧光定量 PCR 的方法分别检测各个时间点的中肠、血淋巴和脂肪体中病毒的拷贝数<sup>[32]</sup>。

2.3.3 细菌真菌病 随着分子生物学的飞速发展,对病原微生物的鉴定已不再局限于对他的外部形态结构及生理生化特性等一般检验上,而是从分子生物学水平上研究生物大分子,特别是核酸结构及其组成成分。在此基础上建立的众多技术中,PFGE(脉冲凝胶电泳)、RFLP(限制性酶切片断多态性)、ChipTechnology(芯片技术)、16S SEQUENCING(16S基因测序)、Ribotyping(rRNA基因指纹技术)依据其不同的性能特点及实验室的具体情况等因素,业已逐步应用于细菌检验。

脉冲场凝胶电泳(Pulsed Field Gel Electrophoresis、PFGE)优势:高辨别力,用于菌株同源性研究。缺点:实验结果重复性差;需要很高的操作技术;耗工耗时(3~5天);没有鉴定细菌的功能。

限制性酶切片断多态性 Restricted Fragment Length Polymorphism(RFLP):优势:比PFGE省时,用于菌株同源性研究。缺点:非标准化,非自动化,比PFGE的识别力差;需要操作人员具备高水平的操作技术;没有鉴定细菌的功能。

芯片技术 Chip Technology:优势:可以揭示大量信息;具备自动化的优势;快速。缺点:非常昂贵;非标准化;还未能应用于食品安全和公共卫生领域,目前主要在科研、新药研究等领域使用。

16S基因测序 16S SEQUENCING 优势:具备属、种的鉴定功能。缺点:难于区分亲缘关系很近的菌种;不能进行种水平以下的分型、溯源;样品制备时间为一天,分析需时3~5天;对操作人员有较高的要求,人为因素会影响鉴定结果。

全自动 rRNA 基因指纹(核糖体分型)技术 Automated Ribotyping。1965年国际上开始研究生物体内核糖体 RNA 基因序列的关系,1983年美国杜邦公司 John Webster 申请欧洲专利:用基因指纹表现微生物的特色,1995年,

杜邦 Qualicon 建立了全自动的 rRNA 基因指纹(核糖体分型)技术,开发出自动化的设备即 RiboPrinter R 系统,通过全自动地产生、分析 rRNA 基因指纹对细菌进行快速鉴定、分型,以表现出不同菌株的分子特征。

### 3 展望

新型免疫学技术的发展,也为建立新的家蚕病原菌的检测提供更多的技术支持。如荧光纳米标记与编码技术可用于几种重要病原菌的检测;基于硅壳荧光纳米颗粒的间接免疫荧光显微镜法,可用于结核杆菌的快速检测(FNP-IIFM);基于硅壳荧光纳米颗粒和 SYBR Green I 的双色流式细胞术(FS-iNP@SG-FCM),对样品中病原菌的核酸进行染色,从而将病原菌与样品中的碎片杂质区分,通过多参数流式细胞术对样品中双染色的病原菌进行测定与分析<sup>[33]</sup>。

分子生物学技术因其灵敏度高、特异性强、可早期诊断等优势,将普遍运用于家蚕病原微生物的实验室检测诊断之中。但分子技术的试验条件要求较高,对操作人员专业素质要求较高,是该技术在生产上普及的瓶颈,有待突破。LAMP 技术,因其快速、简便、特异性强、灵敏度高、成本低等优点,广泛应用于细菌或病毒的定性定量检测、临床疾病诊断、动植物致病微生物检测等相关领域,在家蚕病原微生物的检测中,将有广泛的应用前景。

蛋白质组学研究的日益完善成熟,也为家蚕病原菌的检测诊断提供另一新思路。开展健康家蚕与染病家蚕比较蛋白质组学研究,通过比较不同病原菌感染的家蚕血液的蛋白质组差异,发现新型分子靶标,作为不同病原菌检测诊断的依据。基于这些分子靶标可以应用于新型快速检测试剂盒的研制,为家蚕病原菌的快速准确检测与诊断提供有效的解决方案。

有待建立完善家蚕病原微生物资源库,

有利于更好的寻找分子靶标,为家蚕病害检测提供有力支撑。家蚕病原菌检测诊断中,核心问题在于确定分子靶标。当分子靶标是特异性核酸序列时,作为特异引物或者分子探针运用于分子检测技术,当分子靶标是特异性蛋白时,可以作为特异抗原用于免疫学诊断。

自动快速微生物鉴定系统,可望用于家蚕真菌细菌病害的快速诊断检测。该系统利用细菌、真菌对不同碳源代谢率的差异,针对每一类微生物筛选95种不同碳源或其他化学物质,配合四唑类显色物质(如TTC、TV),固定于96孔板上,接种菌悬液后培养,通过检测微生物生长过程中产生的氧化还原酶与显色物质发生反应而导致的颜色变化(吸光度),以及浊度差异,与标准数据库比对,得出最终鉴定结果。能鉴定常见的细菌、酵母、丝状真菌等2152种,几乎覆盖所有与人类、动物、植物相关的重要微生物。

随着生物技术的飞速发展,更多的检测手段将用于家蚕病害的检测诊断,准确、高效、方便的鉴别家蚕病原微生物,更好的为蚕业生产服务。

#### 参考文献

- [1] Embley, T.M., Hirt, R.P.. Early branching eukaryotes [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8: 624 ~ 629.
- [2] Katinka MD, Duprat S, Cornillot E, et al. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*[J]. *Nature*, 2001, 414: 450 ~ 453.
- [3] Corradi N, Keeling P J. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions[J] *Fungal Biol Rev*. 2009, 23: 1 ~ 8.
- [4] Keeling P. Five Questions about Microsporidial[J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5(9): e1000489
- [5] 浙江大学家蚕病理学[M] 中国农业出版社, 2000.
- [6] 刘仁华, 刘强波, 万永继, 等. 成品卵微孢子孢子检出度的研究[J] *蚕桑通报*, 2003, 34(2): 13 ~ 15.
- [7] 唐顺明, 张志芳, 李奕仁, 等. 用铬变素 2R 法对家蚕微孢子虫孢子染色的研究[J] *蚕业科学*, 2002, 28(1): 72 ~ 74.
- [8] 张香琴, 方如明, 汪萍, 等. 家蚕微孢子病的图像识别技术研究[J] *农业机械学报*, 2001, 32(5): 65 ~ 68.
- [9] 黄宏华, 蔡健荣. 利用计算机视觉检测家蚕微孢子病的改进研究[J] *江苏大学学报(自然科学版)*, 2003, 24(2): 43 ~ 46.
- [10] 方琦, 丁铭, 董占鹏, 等. 应用电镜技术研究云南家蚕病毒[J] *电子显微学报*, 2000, 19(3): 337 ~ 338.
- [11] 梅玲玲, 金伟. SPA - 协同凝集反应快速鉴别微孢子虫孢子的研究[J] *蚕业科学*, 1989, 14(2): 110 ~ 111.
- [12] 万嘉群. 用酶标抗体法检测蚕微孢子孢子[J] *中国动物检疫*, 1998, 15(1): 6 ~ 7.
- [13] 陈祖佩. 家蚕微孢子病血清学检验技术的研究: 碳素凝集反应法(I) 碳素凝集反应及特异性[J] *杭州蚕桑*, 1990, (1): 10 ~ 11.
- [14] 黄自然, 郑祥明, 卢蕴良. 家蚕微孢子孢子荧光抗体检验技术初步研究[J] *蚕业科学*, 1982, 9(1), 59 ~ 60.
- [15] 陈建国, 胡萃, 金伟. 家蚕微孢子孢子单克隆抗体的研制及其在检测上的初步应用[J] *蚕业科学*, 1985, 11(2): 99 ~ 102.
- [16] 徐兴耀, 孙京臣. 家蚕微孢子虫单抗金银染色法检测技术的研究[J] *蚕业科学*, 1998, 24(1): 11 ~ 14.
- [17] 万森. 家蚕成品卵微孢子虫 McAb-ELISA 检测方法的研究[D] 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2008.5.
- [18] 刘挺, 黄可威. 蚕病及其防治研究进展 *蚕业科学*, 2000, 增刊: 60 ~ 68.
- [19] 钱元骏, 胡雪芳, 王裕兴, 等. 家蚕浓核病的血清学诊断方法 *蚕业科学*, 1989, 15(4): 217 ~ 222.
- [20] 李卫党, 何家禄, 许化溪, 等. Dot-ELISA 法检测家蚕核型多角体病毒蛋白组分方法的建立及应用 *免疫学杂志*, 2005, 16(3): 223 ~ 224.
- [21] 朱宏杰. 病毒性软化病病原(桐乡株)的分离鉴定及 ELISA 检测方法的初步应用[D] 浙江大学, 2006.5.
- [22] 刘挺, 黄可威. 蚕病及其防治研究进展 *蚕业科学*, 2000, 增刊: 60 ~ 68.
- [23] 时连根, 陶涛. 家蚕病原白僵菌和黄僵菌的血清学研究初报 *蚕业科学*[J], 1993, 4(19): 47 ~ 48.
- [24] 陈秀, 黄可威, 沈中元, 等. 家蚕微孢子病的 PCR 诊

(下转第 25 页)

# 我县蚕桑产业现状、问题与对策

代仕林

(湖北省南漳县农业局,湖北南漳 441500)

栽桑养蚕在我县具有悠久的传统,曾经为我县经济发展创造了辉煌的成就,做出了巨大贡献。近年来,由于茧丝价格波动大,生产风险高,我县蚕桑业进入了历史低迷期,如何应对当前危机,增强抗风险能力,做到低谷期不萎缩,光明期有基础,高峰期有效益,成为目前我县蚕桑业首要的研究课题。

## 1 我县蚕桑业现状

### 1.1 生产基础

我县现有桑园面积3万亩,主要集中于西南河谷的东巩、巡检镇和西北区的薛坪、板桥镇。2011年共计发放蚕种18542盒,产鲜茧738吨,经济总收益达到1880万元。在全省蚕桑明星乡镇巡检镇现有的24个行政村均有桑蚕面积,其中面积过千亩的有3个村,过五百亩的有12个村,2011年发放蚕种8000盒,产鲜茧36.8万公斤,实现收入789.8万元。在西北桑蚕生产大镇板桥镇,广大群众利用空闲地,广栽“四边桑”,桑蚕已经成为农民收入的重要支柱,全镇22个村,2011年发放蚕种7200盒,产鲜茧30.6万公斤,实现收入713.3万元。目前在我县山区形成了生产基础厚实、产业优势明显的桑蚕专业板块。

### 1.2 科技基础

我县蚕桑业高峰期在县镇村三级建立了网络架构明晰、覆盖范围广泛的桑蚕技术服务体系。目前,县级拥有以农业局、蚕种场为主的技术指导力量,主产乡镇都有桑蚕技术

服务干部,养蚕村有农民技术员。全县现有蚕桑专业技术服务干部20人,农民技术员68人,在蚕桑主产区推广了大棚养蚕技术、小蚕共育技术、蚕病综合防治技术、省力化养蚕技术等实用养蚕技术,培育出了一大批专业户、小蚕共育户、党员致富带头人等,促进了我县科学种桑养蚕水平,单位蚕茧产量和质量得到全面提升。

### 1.3 营销基础

我县蚕茧收购一直是以县缫丝厂为龙头,以镇区外贸站为载体。随着缫丝厂改制,龙头企业逐步失去了带动作用,各镇区外贸站各自为战,由于资金缺乏、渠道不畅,服务功能弱化,有的甚至压级压价,与蚕农争利。在新的形势下,巡检镇成立了蚕桑生产专业合作社,不仅在生产上给予了养蚕户技术支持,而且在营销方面为广大养蚕户提供产供需求与流通信息,为将产业优势转化为经济优势发挥了重要作用。

## 2 存在的困难与问题

近几年来市场低迷、劳力短缺、引导缺失、技术落后等原因严重制约了我县蚕桑产业的发展,致使全县蚕种饲养量逐步下滑。2011年全县发种量、产茧量、蚕农直接收入较我县高峰期分别下降62.2%、53.1%和29.8%。总的来说,我县蚕桑业面临以下4个方面的困难与问题。

### 2.1 市场萎靡不振,比较效益下降

茧丝绸行业属劳动密集型产业,其产品价格受国际市场影响很大,呈周期性波动规律。2006年下半年以来,受美元贬值、人民币升值以及国内劳动力价格大幅上涨等因素影响,茧丝绸行情持续低迷,特别是2008年暴发的次贷经济危机,对茧丝绸行业是巨大的冲击,波及到产业的源头,农民种桑养蚕比较效益下降,蚕桑生产投入减少,蚕种饲养量下降,甚至出现弃桑不管及毁桑现象。2008年全县春茧平均收购价约15元/公斤,特别是夏、秋茧平均收购价不足8元/公斤,农民连养蚕成本都难以收回,开始出现养蚕贴钱现象。

## 2.2 青壮劳力短缺,技术更新迟缓

区域经济发展不均,打工收入与务农收入的巨大差异,导致农村青壮劳动力大量外出务工,有的甚至举家外出务工,使栽桑养蚕这一需要大量劳力的工作缺乏人力,留守人员不仅体力无法应对,在技术应用上也是严峻的挑战。据调查我县目前留守青壮年劳力仅占所有青壮年劳力的30%左右,除少数专业养蚕户外,一般在家养蚕的大多是中老年人和妇女。养蚕智力不足,对新技术的接受速度慢,理解应用能力较差,遇到特殊情况时往往措施不及时,诱发蚕病,造成较大损失。蚕室多为住房改造而成,保温、保湿状况差,通风透气条件不良,甚至存在人蚕共室的现象,不利消毒防病。

## 2.3 信息引导弱化,投入信心不足

我县桑园分布广,种桑养蚕经营方式属一家一户分散粗放生产,偏远区域的信息覆盖较其他发达地区往往慢半拍,经常与销售价位高峰期错位,经济效益下降。一些蚕农只把种桑养蚕作为一项副业,对提高养蚕技术水平、提高蚕茧的单产和质量缺乏内在动力。由于蚕农的投入不足,小蚕共育、省力化蚕台育、方格簇上簇等一些先进实用技术得不到推广应用,蚕茧产量、质量得不到提高,比较效益越发下降,陷入恶性循环。

## 2.4 缺乏龙头牵引,抗风浪能力差

我县蚕桑企业改制以后,龙头企业的生产经营困难重重,由于劳动力价格大幅上涨、白厂丝价格持续走低、销售不畅等多种原因,茧丝加工已处于停产状态,蚕茧价格处于低谷,甚至无人收购,致使收购方与蚕农矛盾日益增多,严重制约了我县蚕桑产业的发展。如果有龙头企业的引导作用,在蚕茧价格低迷时期,依然坚持保护价收购,就能极大地稳定蚕桑产业,促进行业的发展。

## 3 应对的措施与对策

针对目前我县蚕桑业面临的困难和存在的问题,我县蚕桑业发展,应坚持“稳定面积,争取支持,板块提升,持续发展”的指导思想,完善技术服务体系建设,完善信息服务体系建设,完善购销服务体系建设,努力实现蚕农增收、产业发展的整体目标,推进我县桑蚕业又好又快发展。

### 3.1 加强领导,统一认识,巩固桑蚕产业基础

蚕桑业是我县传统优势产业,是我县山区农民收入的主要来源。近几年来,县农业部门、各镇区政府及各蚕桑专业村,不断加大宣传和引导力度,积极指导蚕农,在蚕茧行情低迷时理性对待,不轻易动摇养蚕信心而出现毁桑现象。蚕桑是我县经济效益和社会效益较高的优势经济作物,在市场经济的作用下,产品价格波动是正常的,行情好转会为广大蚕农带来丰厚的收入。蚕桑业在农民增收中发挥了重要作用,应鼓励蚕农管好桑、订足种、养好蚕,引导蚕农利用眼前低谷期,搞好桑园更新改造,指导蚕农在利用现有桑园资源多养蚕、养好蚕的基础上,实现立体套种,以短养长,增加蚕农收益。

### 3.2 确定板块,重点建设,积极争取上级政策支持

充分利用我县多年来形成的栽桑养蚕基础,以板块建设的模式,划定桑蚕优势区域,

积极争取政策与项目支持,将重点产区的蚕桑业发展与当前正在实施的双低改造、退耕还林(后续产业发展)、东桑西移以及以工代赈等项目相结合,集中建设好桑蚕主产乡镇,加大投入,巩固拓展现有基础,蓄势待发,等待新一轮发展机遇。

### 3.3 推广技术,积极引导,提高栽桑养蚕经济效益

树立“三农”意识,提高服务水平,进一步加大技术服务和推广力度,切实解决生产中的实际问题。积极引导蚕桑生产合作组织建设,增加蚕桑业规避市场风险和技术风险的能力,提高蚕桑生产组织化程度,通过正式登记、建章立制、规范运行等一系列措施把蚕桑合作组织建设成蚕农的市场代言人和集体事物的代理人,发挥蚕桑生产技术二传手的作用,帮助蚕农及时而准确地了解市场信息,制

定发展规划,整体进入市场,规避市场风险。

### 3.4 积极招商,引进资本,培植蚕茧加工龙头企业

长期以来,我县的蚕桑生产一直以县缫丝厂为龙头。县缫丝厂破产改制后,对我县蚕桑生产的发展影响很大。要想把蚕桑产业做大做强,必须走培植龙头企业之路,只有通过拓展加工和销售渠道,才能从根本上解决我县蚕茧销售问题。2010年我们通过招商引资,在开发区建设新的缫丝厂,必将对缓冲市场波动,稳定蚕农收入发挥重要作用,为我县蚕桑产业发展壮大提供强有力的基石。目前蚕桑市场正在回升,桑蚕生产的春天即将来临,蚕桑这一传统产业一定会为推进社会主义新农村建设、全面实现小康社会作出新的贡献。

(上接第22页)

- 断技术研究[J].蚕业科学,1996,22(4):229~234.
- [25] 蔡平钟,徐兴耀,黄自然,等.家蚕微孢子虫PCR检测的研究[J].蚕业科学,1997,23(4):207~210.
- [26] 邱宝利,徐兴耀,牟志美,等.核酸分子杂交技术鉴别和检测家蚕微孢子虫的研究[J].山东农业大学学报(自然科学版),2002,33(1):14~18.
- [27] 韦亚东,张国政,陆长德,等.家蚕微孢子虫原位杂交诊断技术研究[J].蚕业科学,2005,31(1):64~68.
- [28] 刘吉平,曹阳,Smith J. E. 徐兴耀.模拟感染家蚕微孢子虫病的PCR分子诊断技术研究.中国农业科学2004,37(12):1925~1931.
- [29] Li J, Liu J. Screening a specific set of PCR primers for the identification of species of *Nosema bombycis* [J]. International Symposium on *Bombyx mori* Functional Genomics and Modern Silk Road Abstract, 2009: 47.
- [30] Yan D, Liu J. Comparative study of the surface proteins of six insect microsporidians[J]. International Symposium on *Bombyx mori* Functional Genomics and Modern Silk Road Abstract, 2009: 89.
- [31] 王见杨,黄可威.用RAPD技术检测不同来源微孢子虫基因组DNA多态性[J].蚕业科学,1999,

25(3):195~197.

- [32] 姚勤,高路,陈克平,等.荧光定量PCR检测家蚕核型多角体病毒在其宿主体内的增殖动态.昆虫学报,2005,48(6):871~875.
- [33] 秦迪岚.荧光纳米标记与编码技术用于几种重要病原菌检测的研究[D].湖南长沙湖南大学博士学位论文2008,10.



# 夷陵区桑蚕产业优势资源调研报告

郭云

(湖北省宜昌市夷陵区特产技术推广中心,湖北宜昌 443100)

“水至此而夷,山至此而陵”,故名为“夷陵”。夷陵地处大巴山东麓与江汉平原的结合部,横跨美丽的长江西陵峡东部两岸,环抱世界最大水电工程—三峡大坝,素有“渝鄂咽喉”和“三峡门户”之称。全区面积3 424平方公里,人口53万人,其中农村人口40万人。辖11个乡镇,1个街道办事处,1个省级经济开发区,是中国水电旅游名城宜昌市面积最大,人口最多的市辖区。近几年,夷陵区借助“东桑西移”的大好机遇,将蚕桑产业确定为特色产业,给予政策扶持和资金支持,使这一传统产业得到了长足的发展。

## 1 产业发展现状

### 1.1 现状

到2011年底,夷陵区桑园面积达到3.6万亩,主要分布在3个乡镇。牵涉栽桑养蚕村29个,养蚕农户16 000多户。2011年全区春、夏、秋三季共发蚕种0.8万张,产鲜茧320吨,蚕茧全年总收入达768多万元。

1.1.1 优惠政策推动了产业发展 2005—2009年,夷陵区连续五年实施集中连片、整村推进策略,新发展桑园10 500亩,得益于每亩桑园区政府补贴200元/亩,调动了广大蚕农的积极性。仅樟村坪镇新发展桑园达3 500亩,至此该镇面积已达到6 550亩。该镇十分重视农业生产发展,对桑蚕生产发展给予了大量补贴:实施先进户进行补助和奖励;规定2004—2007年新发展桑园面积达2亩以上的户,每亩补助50元的桑树专用肥;养蚕达

1张蚕种以上的户,每张补助50元的蚕种、蚕药与蚕具款。

1.1.2 项目带动推动了产业发展 2007年,我区三斗坪镇启动“东桑西移”工程项目。项目实施期内共建设桑园12 993亩,其中新发展桑园10 214亩,改造老园2 779亩,超额完成项目标准任务,建成了10 035亩规模的优质密植桑园。建立了核心示范园9个,连片面积达到8 500亩。并分别在10个核心桑园醒目位置树立了“东桑西移”工程核心示范桑园宣传牌。在项目实施期内,共建设养蚕室150个,总面积共计9 130平方米。每个改建蚕室的蚕具,按照“统一标准、统一质量、统一订做、统一验收”的要求,由政府统一招标采购,免费发给改建农户。还建设小蚕共育室51个,总面积为2 560平方米,完成项目建设面积要求的102.4%。基地共推广应用纸板方格簇150万片。确定了基地配套蚕种场为远安县蚕种场。种场已投入设备设施更新改造资金30万元,其中场区环境整治投入2万元,项目实际共支出30.9万元。

1.1.3 示范区的建立起到了示范带动作用 夷陵区三斗坪镇头顶石村现有桑园面积1 884亩,2009年被列为国家蚕桑产业技术体系武汉综合试验站五个试验点之一。该村地处三峡坝区,平均海拔700~800米,是黄牛岩极顶风景区所在地。全村面积12.25平方公里,耕地面积1 158亩,下设6个村民小组,共1 137人。该村是夷陵区桑蚕基地之一,也是三斗坪镇桑蚕大村,国家“东桑西移”项目重点村。武汉综合试验站在头顶石村开展千亩优质高效

桑蚕生产配套技术试验示范、蚕桑新品种试验示范、蚕病综合防治试验示范、桑树高产栽培技术试验示范;培训基层农技人员、管理人员和农民种植户,接受咨询,加速科技成果的推广应用。并且从2009年8月开始,在头顶石村进行桑园套种间作蔬菜的试验。

### 1.2 存在主要问题

“十一五”期间,我区桑蚕产业实现了跨越式发展,但是随着市场经济的不断发展,市场竞争日益激烈,困扰我区桑蚕产业持续发展的问题越来越突出。一是蚕茧行情波动大,桑蚕市场行情不稳定,比较效益不高。二是建园水平较低。我区近三分之一的桑园有不同程度的老化现象出现,桑叶产量、质量不高。与此同时,受桑园立地条件、管理措施所限,生产水平不高,农桑矛盾日益突出。三是蚕桑一线科技人员不足,导致技术指导不到位,桑蚕行情不能及时传递给蚕农。四是企业实力不强。我区桑蚕产业还没有较强实力的龙头企业,缺乏桑蚕综合开发的技术和资金。

## 2 产业优势资源分析

### 2.1 优势条件

夷陵区地处亚热带北部,年均气温16.9℃,日照时数1800小时,年降雨量1100mm,无霜期270天,≥10℃的有效积温5100℃~5400℃。气候温和,光照充足,雨量充沛的气候特点十分有利柑橘、茶叶、桑树等特产经济作物的生长。我区基本形成“东边柑橘西边茶,中部桑蚕果药杂,全区畜牧及其他”的产业格局。其生产的蚕茧享有“茧丝”的美誉,以茧丝长、茧层厚、解舒好等特点。

### 2.2 市场潜力分析

2.2.1 蚕茧市场需求分析 夷陵区现有桑园面积3.6万亩,年发蚕种0.8万张,产鲜茧320吨,有制作蚕丝产品的原料,便于就地取材。夷陵素有“渝鄂咽喉”和“三峡门户”之称,有宜万铁路、宜巴高速、汉宜高速、三峡机场,水陆空交通方便,蚕丝产品可运往全国各地。可发

挥宜昌旅游城市的功能。每年到三峡旅游的中外游客有几百万人,成千上万的游客把优质蚕丝产品等信息带往全国和海外。

近几年国际丝绸市场的好转,蚕丝用途的扩大和蚕丝产品的热销,企业对蚕茧原材料的需求大幅度增长,造成蚕茧收购价的迅速上涨,创历史最高蚕茧收购价,良好的经济效益激发蚕农养蚕的积极性。

2.2.2 精深加工产品市场分析 随着生活水平的提高,化纤,以前被认为高级的东西,已经放在一边,人们最关注的是自己的健康,因为健康比任何东西更重要。蚕丝产品渐渐开始流行,这也适应了当前人们追求回归自然的心愿,特别是随着环境污染的严重,人们更加向往那些纯自然的东西。蚕丝被,作为新兴绿色生活用品代表,越来越得到消费者的青睐,具有不可估量的市场潜力。

## 3 产业发展思路、重点和目标

### 3.1 发展原则及思路

以市场为导向,以科技创新为支撑,以质量求生存,以效益求发展,以提高竞争力为目标,充分发挥区域优势,改善基础设施,强化标准化生产,实施优质茧工程,建设优质蚕茧基地,不断推进桑蚕业产业升级,延长产业链,构建特色产业化体系,提高桑蚕业综合效益,保持产业平稳较快发展。

### 3.2 发展重点

发展标准化生产,建设优质蚕茧基地为重点。延长产业链以桑枝食用菌和丝绵被为重点。建设技术服务中心和农民专业合作社。

### 3.3 发展目标

确定优势发展区域,整合优势资源,建立技术创新平台,优化结构、提高质量、增加效益,实现平稳增长,避免“大起大落”。到2015年,桑蚕产业综合收入在2011年768万元的基础上,到2015年增加到2000万。

### 3.4 经济、社会和生态效益

栽桑养蚕不会对环境造成污染,在桑树

管理过程中,使用高效低毒、残留期短的农药,而且用量小、次数少,有效减少了农药残留量和毒害,对环境影响趋于零。相反植桑养蚕既能对环境保护有积极作用,又能提高植被覆盖率,有利于水土保持。

发展蚕桑业、搞好综合利用,完成小生产与大市场的衔接,变个体分散优势为群体规模经营优势,促进本地经济朝着系统化、产业化方向发展。拉长桑蚕产业的链条,完成产业由小到大、由少到多、由零散到系统、由农业向工业的转变,形成龙头企业。在实际中具体体现“围绕农业办工业、工业办好促农业”这一政策理论。形成植桑—养蚕—加工系列生产线,这条线,上联龙头企业,下联千家万户,集管理、服务、经营于一体,走出“农、工、贸一体、产销一条龙”的新路子。蚕桑业加工增值,促进了资源的深度开发和利用,带动了众多的农民朝致富的方向发展,实现了农民与财政的双增收。区域规模经济的形成,便于推广实用新技术,能够采用先进设备,增强了各种技术的可操作性,加快了科技注入经济的步伐。

## 4 产业化发展的主要措施及政策建议

### 4.1 主要措施

4.1.1 组织保障 夷陵区为确保桑蚕产业持续健康发展,成立了桑蚕产业发展领导小组和专家顾问组。同时聘请湖北省知名的桑蚕岗位科学家——湖北省农科院经作所的胡兴明所长为我区桑蚕产业发展顾问,对全区桑蚕产业发展规划、品种引进、质量提升等方面进行专业指导。

4.1.2 技术保障 一是加强基础设施建设。重点是养蚕设备,实现省力化养蚕。二是实施老园改造。通过毁园重建、抽槽改土等措施改造现有老桑园,提高桑叶产量和品质。三是抓好桑园标准化生产技术的推广。四是加强市场信息引导,及时印发技术资料。区特产中心将通过《桔都茶乡信息》资料及时向全区蚕农传

递桑蚕种植技术和生产销售信息。

4.1.3 资金保障 加大资金投入,推动产业又快又好发展,建议政府近几年在支持发展标准化生产,建设优质蚕茧基地等项目上投入200万元支持产业发展,其中发展标准化生产,建设优质蚕茧基地投资100万元;桑枝食用菌和丝绵被加工投资100万元,合计200万元。建设优质蚕茧基地,实施老园改造,通过毁园重建、抽槽改土、购买优良品种的桑苗,每亩投资2千元,改造200亩优质高效桑园共投资40万元;每亩施桑蚕配方专用肥60元,投资60万元可施一万亩桑园;建设优质蚕茧基地投资100万元后,可使我区桑蚕增产达到一千万元收入。桑枝食用菌投资50万元,用于兴建厂房和购买桑枝粉粹机等设备我区每年修剪的大量桑枝可利用起来做食用菌,可产生100万元收入。丝绵被加工投资50万元,我区现有茧丝加工企业1个,即:宜昌银罡桑蚕科技有限公司。该公司于2010年10月成立,年生产能力达蚕丝被3万床,需要茧丝原料3万公斤。由于资金不足,到目前仅生产蚕丝被5千多床,销售均价达600元/床,销售收入300万元,投资50万元用于生产流动资金,可产生900万元收入。实施该投资后,我区桑蚕产业综合收入可达2000万元。

### 4.2 政策建议

夷陵区区委、区政府已将桑蚕列为全区农业的特色产业之一。区委、区政府对桑蚕特色产业的发展,一是应设立专项建设资金。每年从财政资金中列出专项资金扶持桑蚕产业发展,鼓励农民进行产业结构调整,改造老园。二是实施项目捆绑。将争取的国家、省、市以及对口支援的农业、基础设施类项目使用经费,尽量向桑蚕产业倾斜,解决桑蚕生产中的突出问题。三是出台扶持政策。今后几年,政府将重点扶持龙头企业,发展和壮大农村专业合作经济组织,按照“扶面先扶点、扶弱先扶强”的原则出台扶持标准。

## 修水县整合县级资金做强蚕桑产业

卢卫芳

(江西省修水县蚕桑局,江西修水 332400)

近年来,修水县始终把蚕桑产业作为农民增收致富的第一产业、支撑县域经济的品牌产业、农业产业结构优化的首选产业来抓。然而,作为一个财政基础相对薄弱的农业大县,如何把蚕桑产业做大做强?修水人一直在思索出路。

我们采取“财政整合一块,企业和合作社拿出一块,蚕农自筹一块,信贷支持一块”的融资方式,按照“效益为先、渠道不乱、用途不变、统筹安排、集中使用、形成合力、部门配合”的基本原则,整合各方财力,全力推进蚕桑产业的发展。去年一年,全县整合财政资金12项共2740余万元,引导社会投入4285余万元,蚕桑产业总投入达7025万元。零散的资金如片片雪花,一旦整合成“球”,便会产生雪球效应。按照连片开发,整体推进的要求,我县不断做大做强蚕桑产业。县农业开发、扶贫、财政等部门安排资金514万元扶持全县新扩低改桑园3000亩;水利和农业部门支持资金679万元,配套改造排灌水渠25千米;交通和农业开发部门投入资金476万元,建设蚕桑村级公路55公里;县财政、科技、扶贫等部门筹集资金261万元,新建标准化小蚕共育点34个,建设养蚕大棚108只,配套小蚕木框叠式蚕台和大蚕省力化蚕台等物具,推广方格簇100万片。与此同时,我县通过整合资金,还建设了20个蚕桑村新村点,并推行了“蚕沙—沼—桑”生态农业模式,配套建设沼气池1500只,并完善蚕桑生态科技园后续工程建设。

与此同时,我县积极探索“龙头企业+合作社+基地”产业经营体制,调动多方参与蚕桑产业发展的积极性,县扶贫部门整合资金9万元,重点培植蚕桑生产专业合作社4家,

改造收烘场房4幢。县扶贫、财政部门整合项目资金50万元,扶助蚕桑龙头企业做大做强,加强了“养蚕人实业”和“一家实业”两个茧丝绸亿元项目建设力度。不断优化科技服务,通过基层农业技术体系、蚕桑技术推广经费、扶贫开发、科技三项经费和财政整合奖励资金等多种渠道整合资金80.5万元,切实加强技术服务体系建设。集腋成裘,多方受惠。通过蚕桑标准化示范基地建设,有力地改善了蚕农的生产条件,增强蚕桑基地综合实力,提高蚕业规模化、标准化和产业化水平,使产业得到巩固和发展壮大。全县高产优质桑园达9.3万亩,占江西省桑园面积的“半壁江山”,成为全省蚕桑产业的“龙头”;覆盖蚕农户2.6万户,千亩蚕桑村达到15个,万亩乡镇1个,10亩以上大户达305户。该县茧丝绸龙头企业通过扩大建设规模,完善产业链条,引进先进生产工艺,进一步提升了生产效益,实现年销售收入6.5亿元,带动就业1500多人;“一家实业”和“养蚕人实业”已成为全省农业产业化龙头企业,正向国家级农业产业化龙头企业行列迈进。

“财政专项资金对蚕农进行直接补贴,相关部门也在技术、管理等方面提供了良好的服务,让我们受益很大。去年仅蚕桑一项,我家就增收2万多元。”修水县马坳镇黄溪村村民陈先富高兴地说。据该村支部书记徐万年介绍,该村现有桑园800亩,并培植了江西省蚕种场制种基地,去年全村蚕桑产业共创收100万元。2011年,全县蚕农养种11.8万张,产茧10.5万担,创收1.7亿元;全县平均亩桑养种量增加0.2张,张种单产提高1.2公斤,蚕茧质量得到大幅度提升,蚕农亩桑收入增加800元。

# 夏秋桑园管理技术

王启苗

(安徽省宁国市农业技术推广中心,安徽宁国 242300)

夏秋桑园管理不仅关系到秋季生产是否能够取得丰收,还直接影响到来年春季的桑叶产量,因此加强夏秋桑园管理措施,十分重要。

桑园夏秋管理包括土壤管理和桑树管理两个方面。其中土壤管理包括翻耕除草、施肥、排涝抗旱等;桑树管理包括及时夏伐、适时疏芽、虫害防治等。

## 1 土壤管理

### 1.1 翻耕除草

桑园土壤经过春期采叶等田间作业,土壤结构被破坏而板结,不利于根的生长;桑园中杂草不仅与桑树争夺养分,而且影响桑树通风透光,抑制桑树生长,同时又会助长害虫和病菌的滋生蔓延,危害桑树,因此必须进行夏耕除草。桑园夏耕除草必须及时,要在桑树夏伐后进行,夏耕宜浅,一般深度为12厘米~15厘米,避免伤根太多;除草以人工除草为主,少用化学除草,最好不用除草剂,因为除草剂既易对桑树植株造成药害,影响树势,又易引起养蚕时,蚕儿农药微量中毒。如采用除草剂要注意避免药液溅到桑树的枝叶上,至于用叶,要在半个月后才能采叶喂蚕。

### 1.2 重施夏肥 追施秋肥

为争取桑园高产,要重视施用夏伐肥,施用量约占全年施肥量45%,分两次施入。以有机肥为主,无机肥为辅,无机肥偏重磷钾肥。第一次夏肥,又称夏伐肥、谢桑肥,在桑树夏伐施入,667m<sup>2</sup>施农家肥1500公斤~2500

公斤或有机复合肥50公斤或粪水4000公斤~5000公斤。第二次夏肥,又称长条肥,在7月中旬进行,667m<sup>2</sup>施50公斤碳铵或25公斤尿素。秋肥施用量约占全年施肥量15%,以速效性肥料为主,在8月下旬前施入,667m<sup>2</sup>施15公斤碳铵,有促进枝叶继续生长,延迟秋叶硬化,增产秋叶的作用。

### 1.3 防涝抗旱

疏通桑园沟系,做到旱能灌、涝能排。桑树受旱,桑叶提早硬化、发黄脱落,枝条提前封顶,停止生长;桑树受涝,根系呼吸困难,地上部枝叶生理缺水,叶色发黄。所以桑园必须建立排灌系统,要求三沟配套,能排能灌。

## 2 桑树管理

### 2.1 及时夏伐

结合春蚕后期收获条桑在5月底6月初及时夏伐,最好不要迟于6月上旬,有利于桑树尽快转入重新发芽阶段,促进夏秋桑树枝叶生长良好。夏伐一般选在晴天、中午前后伐条较好,可减少伤流,避免损失营养。

### 2.2 疏芽

疏芽有利于养分集中,改善通风透光条件,从而提高桑叶的产量和质量,一般在7月中旬结合养夏蚕进行。因为我市无养夏蚕习惯,所以疏芽时期应提早。只要新芽长势强弱已经明显,就可以确定去留(要在新梢有20厘米左右时),进行疏芽。疏芽程度以护理桑树为前提,留芽每拳2~4根,(下转第32页)

# 桑园间作生姜优质高产栽培技术

李 勇 叶楚华 邓 文 胡兴明

(湖北省农业科学院经济作物研究所,武汉 430064)

**摘 要:**阐述了桑园间作生姜的栽培技术,包括整地、选种、播种、田间管理及采收等,以为桑园间作生姜提供技术参考。

**关键词:**桑园;间作;生姜

生姜简称姜,又称黄姜,古名姜。原产于中国及东南亚等热带地区。现在已广泛栽培于世界各亚热带、热带地区,以亚洲、非洲为主,欧洲栽培较少。生姜以其地下根状茎供食用,内含多种营养成分。它除含有碳水化合物、蛋白质、多种维生素及矿物质外,还含有姜辣素、姜油酮、姜烯酚和姜醇等,因而具有特殊的香辣味,是我国人民普遍采用的香辛调味蔬菜,可生食,可炒,可加工成多种食品,有“菜中之祖”的称号。由此可知,生姜是集调味品,加工食品原料,药用蔬菜为一体的多用途蔬菜。

2009—2010年,我们在鄂西南蚕区宜昌市夷陵区三斗坪头顶石村开展了桑园间作生姜试验,完善了桑园间作生姜栽培管理技术,以为桑园间作生姜模式推广提供依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验区概况

试验桑园位于宜昌市夷陵区三斗坪头顶石村,该村地处三峡坝区,平均海拔 700 米~800 米,多年实际平均日照时数为 1 100 小时~1 400 小时,年均气温 16.5℃,最冷月(1 月)

均温 4.7℃,最热月(7 月)均温 29℃,日平均气温 $\geq 10^{\circ}\text{C}$ 的年活动积温 5 350℃,无霜期 270 天左右,年均降水量 1 200mm,主要集中在 4 月~10 月。土壤成土母质主要是红砂岩、黄色泥质页岩及近代河流冲积物,质地较疏松。桑树品种为湖桑 32 号,中干养成,树龄 15 年,株行距 0.5m $\times$ 2m。

### 1.2 试验方法

桑树/生姜间作模式行比为 2:3,为减少地形、土壤等外界因素对试验结果的影响,试验采用完全随机区组设计,设 3 个重复,小区面积 20m<sup>2</sup>(2m $\times$ 10m),试验面积共 60 m<sup>2</sup>。生姜品种为当地品种,4 月下旬播种,起垄栽培,垄高 0.15 m,垄底宽 0.3m。

## 2 栽培技术

### 2.1 桑园整地

在桑园进行冬耕的基础上,于 4 月上旬及早进行精细整地,使土壤达到无明暗坷位,上松下实。增施有机肥,以优质鸡粪,无病残体圈肥、饼肥和草木灰配合施用,结合整地撒施优质腐熟鸡粪或优质圈肥 5 000kg~10 000kg 做基肥。按桑树/生姜行比 2:3,按 50cm 行距

资助项目:现代农业产业技术体系建设专项。

作者简介:李勇(1980-)男,硕士。Tel:027-87106001,E-mail:liyong8057@163.com

通讯作者:胡兴明(1963-)男,研究员,硕士生导师。Tel:027-87380366,E-mail:hxmbsgs@hbaas.com

开沟备插,沟施豆饼 100kg,三元复合肥 50kg,硫酸钾 50kg,锌肥 2kg,硼肥 1kg 做种肥。

## 2.2 精选姜种,培育壮芽

2.2.1 精心选种 播种前 30d 左右,取出种姜,用清水冲洗,去掉姜块上的泥土,选用姜块肥大,丰满、皮色光亮、肉质新鲜不干缩、不腐烂、未受冻、质地硬、无病虫的健康姜块作种。严格淘汰姜块瘦弱干瘪、肉质变褐及发软的种姜,要求种姜块重达 75g 左右。

2.2.2 晒姜困姜 选晴天,中午八九点钟,将精选好的姜种放在阳光充足的地上晾晒,晚上收进屋内,重复 2~3 次,使姜皮发白发亮,种姜晒困结束。在晒困过程中,还应注意病症不明显的姜块,经晒困失水后,严格淘汰表皮干瘪皱缩,色泽灰暗的姜块,确保姜种质量。

2.2.3 催芽播种 对精选、晒后的姜种,用药肥素、姜瘟散、生姜宝、绿霸等农药 200 倍液进行浸种 10min,起到杀菌灭菌作用,晾干后上炕催芽,催芽温度掌握在 22℃~25℃,并掌握前高后低,20d 后,待姜芽生长至 0.5cm~1cm 时,按姜芽大小分批播种。一般株行距 20×50cm,每 667m<sup>2</sup> 桑园用种姜 250kg 左右。

## 2.3 田间管理

2.3.1 轻施捉苗肥,重施合枝肥 一般于 6 月上中旬结合土壤墒情,每 667m<sup>2</sup> 桑园施尿素 25kg,以促进姜苗生长。7 月上中旬每 667m<sup>2</sup>

施用三元复合肥 50kg。至 8 月 20 日前每 667m<sup>2</sup> 补施硫酸钾 30kg。9 月中旬可根据姜苗长势,适量追施钾肥或氮肥,并对地上部进行叶面追肥,每 7d~10d 喷一次,连喷 3~4 次,起治病防早衰作用,延长生育后期叶片功能期。

## 2.4 病虫害防治

2.4.1 姜瘟病 是一种毁灭性病害,也是制约生姜发展的一大因素。应以综合防治措施为主,即:轮作换茬;挖好排水沟,排水防涝;搞好药剂防治。可用药肥素、生姜宝、姜瘟散、绿霸等 1 500~2 000 倍液液浸根,发现病株及时拔除,用以上药液进行土壤处理,并用石灰打点做标,待生姜收获后,将此处土壤深埋处理。

2.4.2 虫害 生长期间主要虫害有生姜螟虫、甜菜夜蛾、生姜蓟马等,要及时搞好虫情观测,在大发生前搞好药剂防治。可用夜蛾必杀、快杀灵和吡虫等药剂喷雾防治,每 7d~10d 防治 1 次。

2.5 延时收获,提高产量 当秋末气温在 8℃~18℃时,秋高气爽,光照充足,昼夜温差大,正是形成产量的关键时期,可依据桑树长势适当延长生长期,提高产量。本试验每 666.7m<sup>2</sup> 桑园间作生姜收获鲜生姜 1 017.6kg,每 666.7m<sup>2</sup> 桑园全年产叶量达 1 167.8kg,有效能量产投比达 3.6:1。生姜的采收,给桑园松了土,为桑园丰产奠定了基础。

(上接第 30 页) 每株 8~10 根(8 000 根/667m<sup>2</sup>)。一般疏去生长势弱的横枝和下垂芽叶,同时摘除新梢下部 4~5 片脚叶。如幼龄桑园,则按树形养成要求进行。

## 2.3 防治害虫

夏秋季高温多湿,是虫害极易蔓延和暴发的季节,因此,夏伐后要认真治虫,具体做法是:1、夏伐后,用 50%的乙酰甲胺磷 1 500 倍液或用 80%敌敌畏和 50%辛硫磷各 1 000 倍混合液喷雾,进行白拳杀虫,可有效杀灭桑象虫、桑螟等。2、土壤撒药,在 6 月下旬和 7

月下旬,每 667m<sup>2</sup> 用 3%甲基异柳磷颗粒剂 2.5 公斤或 40%乐果乳油 2.5 公斤拌干细土 30 公斤~50 公斤配成毒土撒入桑园,然后浅锄,使农药和土壤充分接触,可有效杀死桑瘿蚊等。蚕期要注意毒土不要撒在桑树枝条和叶片上,以防家蚕中毒。3、顶梢喷药,受桑毛虫、桑尺蠖、野蚕等危害严重的田块,用 80%敌敌畏 1 000 倍液或 40%乐果 1 000 倍液或灭蚕蝇 300 倍液喷顶芽,可有效杀死顶芽内的幼虫,虫口密度较大的田块,可隔 5 天~7 天再喷杀一次。

# 实行桑园间作 提高经济效益

张永进

(江苏省淮安市农业委员会,江苏淮安 223001)

桑树是多年生落叶木本植物,绿叶期和落叶期交替循环。桑树当前只是在绿叶期采叶养蚕,经济效益得不到充分发挥。在桑树落叶期和桑园投产以前进行合理间作,可以有效提高桑园的利用率,从而实现农业增产农民增收。

## 1 桑园主要间作物的栽培技术

### 1.1 间作食用菌

在桑园的生态环境条件下,春季可套种草菇,秋季可套种平菇。栽培料可因地制宜选用稻草、麦秆、棉籽壳、甘蔗渣、蚕沙等。

1.1.1 草菇 采用隔行种植,种植前于行间开栽植沟,沟底铺一层石灰粉。栽培料在栽种前先用石灰水(每100kg水加石灰6kg)浸泡10小时~12小时,呈强碱性,pH值达到10以上。栽培料捞出后在向阳的场所堆料,促使堆料发热发酵。在每平方米沟内摊料14kg、菌种6瓶。栽种后料面要用木板压实,并在栽种沟上撑起竹环,覆盖塑料薄膜及草帘。草菇栽种要求强碱、高温多湿条件。一般从7月中旬开始栽种,至8月中下旬结束,可采菇3~4批。

1.1.2 平菇 在栽种前1天~2天用清水浇湿栽培料后堆闷,将多菌灵、过磷酸钙、石灰膏等均匀拌入其内,并加适量的水。栽培料均匀的铺在栽种沟内,厚约10cm。菌种均匀的

铺在栽培料上,用木板轻轻压实,上面覆盖一层报纸后,再覆盖塑料薄膜及草帘。待20天后料面上已有子实体,改塑料薄膜及草帘的平覆盖为环状覆盖。栽后重点做好控温、保湿、通风和防病虫害工作。平菇栽种期从10月中下旬开始,至次年3月下旬结束,可采菇4~6批。

### 1.2 间作浙贝母

选地势高、易排水、土质松且肥沃的桑园种植,忌连作。在中秋蚕后进行翻耕、施肥、细整畦面。10月中下旬于桑园行间开沟,沟内施泥灰肥、饼肥或磷钾肥后,将贝母的芽眼朝上,按株距10cm~15cm排于沟内,然后覆土盖没。翌年2月初出苗,3月上旬~4月中旬旺盛生长,4月下旬~5月上旬茎叶枯萎,即可收获。应加强肥水管理,后期防止多施氮肥。其繁殖系数为1:2~2.5。

### 1.3 间作草莓

草莓耐阴喜湿、忌干旱,与桑树生长条件吻合。间作地要施足底肥,每亩需施腐熟有机肥1000kg~1500kg,多施磷钾肥。江浙一带以9月下旬~10月上旬为移栽的适期。一年一栽的密度667m<sup>2</sup>以3000~4000株为宜。种后即浇水,维持土壤潮湿,以提高成活率。冬前、春后加强管理,促进植株生长。4月中下旬为盛花期,5月中下旬为采果盛期。结果期需施长果肥,防治病虫害和霉烂。

## 梅克保副书记来我所考察调研

4月5日,湖南省委副书记梅克保在省农业厅田家贵厅长、省委政研室张伟达副主任、省委办公厅欧阳天然副巡视员、省发改委欧阳彪副主任、省科技厅杨治平副厅长、省财政厅郭秀宏副厅长的陪同下,来湖南省蚕桑科学研究所考察调研。先后考察了家蚕遗传育种实验室、国家桑蚕改良中心长沙分中心、桑树品种资源圃、科技成果展览室、蚕丝文化墙、“兰洁”牌系列蚕丝被及其新产品展室,听取了我所工作情况汇报,与部分干部职工进行了亲切交谈。梅克保副书记要求省蚕科所要有力推进蚕桑特色产业发展,加强产学研的结合,加速实用技术推广。还特别强调:省蚕桑科学研究所要抓住搬迁长沙的机遇,抓好基地建设,抓好新产品的研发,为湖南蚕桑事业的发展作出新贡献。

(谈顺友 供稿)

### 1.4 间作苏丹草

苏丹草耐阴、耐割,易栽培,宜间作,是鱼的优质饲料。一般于4月下旬在桑园开沟播种,每当长至50cm~60cm时在天气晴朗时收割。收割后次日进行松土除草和施肥,以利于加速生长,提高产量,全年可收获6~8次。11月上中旬随气温下降,逐渐停止生长。

### 1.5 间作蔬菜

间作型桑园常年四季均可间作;专用密植桑园主要在桑园的休眠期进行。间作蔬菜的品种很多,秋冬季节有青菜、包心菜、大白菜、花菜、榨菜、菠菜、大头菜、雪菜、苋菜、萝卜、大蒜、葱、莴苣等;春夏季节有马铃薯、番茄、青椒、茄子、毛豆、绿豆等。秋冬期于9月下旬起中秋蚕采叶后,在桑树行间翻耕整地,进行播种、育苗或移栽苗秧。榨菜宜选地势高爽、土质疏松的田块育苗。在10月上旬播种,出苗后35天左右下田定植。期间要加强肥水管理,管理原则是栽后促、冬前控、春后促,并

用40%乐果乳剂1500倍液防治蚜虫。特别是3月中旬要施重肥,促进块茎生长。在清明后至谷雨前收割。

## 2 体会和建议

桑园间作首先要综合考虑桑树及间作物的特点,做到在不影响桑树生长的前提下,因地制宜的确定间作物种类和间作模式。如桑园内间作药材—生姜;间作蔬菜—鱼草;间作蔬菜—食用菌;间作食用菌—鱼草等。

桑园间作的经济效益因间作物种类、产量及市场价格而异,特别是受市场价格的影响较大。因此,选择间作的品种,应当考虑市场的需求,以获得较高的效益。

桑园间作也存在一些不利因素,诸如由于间作致使春季地温偏低,桑树发芽延迟,桑园空气湿度增加,易发生病虫害等,必须在间作期加强管理,注意克服。

# 桑叶饮料的加工及分析

郭云<sup>1</sup> 王华斌<sup>2</sup>

(1 湖北省宜昌市夷陵区特产技术推广中心,湖北宜昌 443100;2 湖北稻花香绿色食品股份有限公司)

**摘要:**利用现代工业把桑叶制成饮料,通过脱苦脱涩,让人们更容易更方便接受桑叶饮料,充分发挥桑叶的营养价值和药用价值。开发桑叶饮料对于拓宽桑蚕产业链,提高蚕农的经济效益具有重要作用。

**关键词:**桑叶饮料;加工工艺及分析

桑叶为桑树的营养器官。性寒,气微,味淡、微苦、涩;有着极高的营养价值和药用价值。桑叶中含有17种氨基酸、脂肪、维生素C、B1、B2以及叶酸、胡萝卜素、钙、磷、铁、锰、钠等。桑叶的这些特点成为食品和医药界关注的热点,1993年被国家卫生部正式归入“既是食品又是药品”之列。近年来,人们对桑叶的化学成分、药理作用、加工利用方面进行了较深入的研究,桑叶在医药和食品领域中得到了广泛的应用。

桑叶除具有传统的药用价值外,还具有抗应激素、抗衰老、增强机体耐力、降低血清胆固醇、调节肾上腺功能、降血脂、降血糖、抑制癌细胞等功能,经常饮用桑叶饮料对人体具有较好的保健作用。

## 1 市场前景

随着人民生活水平不断提高及消费口味的多元化,快速消费品的性价比高,安全、健康、营养、绿色、天然药食同源的纯本草植物饮料、野菜复合果蔬汁、五谷杂粮(粗粮饮料)越来越受到广大消费者的青睐,并成为居家旅行、酒宴之佳品、改善亚健康人身体的必需品。有13亿多人口的发展中国家,中国果蔬汁饮料的人均年消费量还不到1kg,而发达国家

的人均年消费量为:美国52kg、法国54.3kg、德国46kg、日本和新加坡16kg~19kg,世界人均消费量已达到7kg,这说明我国有巨大的市场空间。

## 2 市场的优势和机会点

### 2.1 桑叶饮料深受亚健康消费群体的喜爱

2.2 消费者需求多元化为桑叶饮料开发提供广阔的市场空间。使用价值,如疏散风寒、清肺润燥、平肝明目、凉血、解渴。消费者的心理及健康需求,如身份、地位和审美、天然健康、绿色环保和降血糖、降血压、降血脂、抗衰老、抗肿瘤等心理需求。

2.3 日益细分化的消费群体为饮料企业开展目标营销提供机会,差异表现在对口味、品牌、价格、包装、促销和广告风格等一切消费者接触产品及信息的领域,高度细分化的市场为饮料企业进行市场拓展提供无限空间。

2.4 饮料产品生命周期的差异为成长型饮品创造无限市场潜量,即经历产品的四个阶段:产品导入期、产品成长期、产品成熟期和产品衰退期。桑叶饮料作为新饮料,将是一个新亮点。

在对饮料行业的前景分析中,桑叶饮料必须充分利用其自身优势,民族地域特色优势、价格优势、中小城市和农村市场的网络优势、

不同地域的文化背景和消费习惯的差异从而有针对性地开展,趋利避害,发展和壮大公司饮料实力。

### 3 桑叶饮料生产的工艺流程及工艺描述

#### 3.1 桑叶饮料生产的工艺流程

原料验收→清洗、去杂→浸提萃取→除渣→脱苦脱涩→调配定容→双联过滤→灌装→封口。

#### 3.2 工艺描述

**原料验收:**参照公司原料入库标准和中药饮片部分质量标准验收,供应商提供产品合格证明(检测农残、重金属报告)。

**清洗、去杂:**预处理好的桑叶用常温 RO 水清洗,在茶叶未泡开前去杂,捞起滤干暂存。

**浸提萃取:**①、用 75%食用级酒精浸泡桑叶 1h,保温 60℃,全程容器密闭。②、将酒精浸提液回收至蒸发器中,真空压缩回收乙醇。③、加入 80℃ RO 热水浸泡 5 分钟,保温 75℃~80℃。

**除渣:**桑叶茶汁经卧式离心机除去碎渣,冷却后由高速碟片式离心机除去凝固物,保持茶汁清澈,输送至调配罐。

**脱苦脱涩:**将称量好的 β 环状糊精和明胶混合溶解,然后过滤输送到调配罐。

**调配定容:**根据调配要求和罐里的液位加热水和辅料进行定容,温度 70℃~75℃,开动搅拌器搅拌约 10 分钟左右,理化检测合格后进入下工序。

**双联过滤:**将调配液经过高效过滤设备进行过滤(一级 1 200 目滤袋,二级硅藻土过滤器过滤),输送至高位罐。

**灌装:**灌装容量≥规定容量,根据不同的灌装形式选用不同设备。

**封口:**封口平整,密封良好,牢固,瓶口不变形和划伤,美观。

### 4 经济效益

桑叶饮料项目定位及全面优化实施完成并产后,有利于实现安全、优质、高效、低耗、低碳循环经济,有利于充分发挥三峡库(坝)区乃至湖北大区丰富的桑叶资源和中草药优势,用先进设备和饮料生产技术,合理开发桑叶系列本草植物饮料、合理搭配、营养互补,提升附加值系列产品。对解决三农发展缓慢的矛盾,转移农村剩余劳动力,提高种植农户年均收入超万元、三峡库(坝)区农民就业,确实有促进农民增收,财政增长,企业增效有着推动低碳循环经济发展的重大作用。桑叶饮料项目实施不产生影响环境的工业“三废”,同时能有效促进农民增收,财政增长,企业增加就业机会,具有好的生态和巨大的社会效益。

基本使用量如下表:

桑叶饮料的加工及分析

| 序号      | 名称         | 单耗(t)    | 年耗量(t)  | 备注           |
|---------|------------|----------|---------|--------------|
| 一 主要原辅料 |            |          |         |              |
| 1       | 桑叶         | 0.05     | 250     | 以年产 5 000 吨计 |
| 2       | 木糖醇        | 0.025    | 125     | 以年产 5 000 吨计 |
| 3       | 麦芽糖醇       | 0.06     | 300     | 以年产 5 000 吨计 |
| 4       | 复合茶粉       | 0.005    | 25      | 以年产 5 000 吨计 |
| 5       | 其他辅料       | 0.03     | 150     | 以年产 5 000 吨计 |
| 二 包材    |            |          |         |              |
| 1       | 500mlPET 瓶 | 0.2(万瓶)  | 500(万瓶) | 以年产 2 500 吨计 |
| 2       | 三匹罐        | 0.33(万套) | 825(万套) | 以年产 2 500 吨计 |
| 3       | 纸箱         | 0.0133   | 66.67   | 以年产 5 000 吨计 |

从上表中可以看出,年产 5 000 吨桑叶饮料系类需要消耗桑叶干茶 250 吨。因间作套种原因,我区 1 亩成龄的桑园年产桑叶量约为 1 000 公斤,发种量仅为 1 张,剩余浪费桑叶在 400 公斤左右。按 5 公斤制干桑叶茶 1 公斤来计算,1 亩桑园还可制 80 公斤桑叶茶。按 20 元/公斤的价格,1 亩桑园可增收 1 600 元;由桑叶茶再制成桑叶饮料,又可产生 1 600 元的经济效益。这样 1 亩桑园总共可以增产值 3 200 元,经济效益十分可观。