

家蠶에서 分離된 새로운 微孢子蟲 K79의 病理學的 研究

Ⅱ. 微孢子蟲의 病原性 및 發育經過

尹 在 洙·林 鍾 馨*

尙州農業專門大學·*慶北大 農科大學

Pathological Studies on the New Microsporidia K79 Isolated from the Silkworm, *Bombyx mori* L.

Ⅱ. Pathogenicity and Developmental Progress of the Microsporidia.

Jae Su Yun, and Iong Sung Lim*

Sangju Agricultural Junior College *College of Agriculture, Kyungpook National University

Summary

In order to clarify the taxonomic position of a new microsporidia K79 which was isolated from the silkworm larvae, *Bombyx mori* L. in Korea in 1979, the following several experiments such as estimation of pathogenicity in different instar, histopathological examination under light and electronic microscope and examination of fine structures of the spores were carried out and their results obtained are as follows.

In the test of pathogenicity by oral inoculation, the new microsporidia K79 was lower than *Nosema bombycis* and the susceptibility of the new microsporidia to silkworm was getting lower as the silkworm larvae grew. The lesion of Silkworms' tissue which was infected with the new microsporidia K79 was found in the epithelial cells of trachea, fat body and silk gland cells.

The developmental process of the new microsporidia K79 in vivo could be divided into the following five stages: sporoplasm, schizont, sporont, sporoblast, and spore. This process was just the same as that of *N. bombycis*, but its development was slower than that of *N. bombycis*.

Several differences in the fine structure of the spore under electron microscope, which could be important keys for the classification of microsporidia, were obtained. Anchoring disk and polaroplast lamella of the new microsporidian spore were disclosed to be different from those of *N. bombycis*. An average number of polar filament coils of the new microsporidian spore was 16 at an angle of 75°.

On the basis of various keys for the classification of microsporidia, the results obtained from various experiments proved that the newly isolated microsporidia should be classified into the Genus, "*Nosema*", but its further classification for species should be conducted in the future. Therefore, it may be reasonable that the new microsporidia is temporarily classified as *Nosema* sp. K79 considering the fact that it was discovered in Korea in 1979.

緒 論

누에 寄生의 病原性 微孢子蟲은 微粒子病原蟲이 주

종을 이루고 있으며 이 病原蟲의 感染經路는 經口感染, 經卵感染, 交接感染 및 傷處感染이 알려져있고 대체로 누에의 幼蟲期에 感染되고 있다. (川村, 1915; Nordin,

1975; 阿部, 1978)

微孢子蟲의 누에體內 感染狀態는 經口感染일 경우는 消化管內에서, 人工接種일 때는 接種部位에서 發芽하고 極絲를 通하여 寄主細胞內에 胞子の 原形質을 流入함으로써 感染이 이루어 진다. (瀧澤, 1977)

微孢子蟲의 昆蟲에 對한 病原力은 一般的으로 宿主範圍가 넓고(Liu, and McEwen, 1977) 昆蟲種에 따라서도 病原力이 다르며(有賀, 1973; Harzard and Lofgren 1971) 同種 寄主體인 境遇에도 微孢子蟲類에 따라 感染部位가 다르다. (青木, 1969; 渡邊, 1976)

누에 微孢子病原蟲의 生活史 및 누에의 組織學的 研究는 工藤(1915)가 胞子の 形態, Schizogony, 胞子の 形成을 報告하였으며, Kudo(1916)는 微孢子病原蟲의 生活史와 發育段階別 構造를 提示한 바 있고, 川村(1915) 및 Ishihara(1968a, 1969)는 누에 組織培養上에서 微孢子 胞子の 侵入, 感染, 分裂, 胞子形成等 發育段階別과 누에 生體 組織內에서 發育한 微孢子의 形態를 比較 考察하였다.

微孢子病原蟲의 微細構造에 관한 研究는 Ischihara(1968b)가 微孢子病原蟲의 胞子로부터 脫出한 芽體와 宿主에 流入된 直後 芽體의 微細構造를 밝혔고, 石原(1969a)는 微孢子蟲의 微細構造는 宿主에 寄生後 一定時間이 經過된 다음 觀察할 수 있다고 하였으며, 石原(1969b)는 宿主細胞內 侵入後 24時間 以後 *Nosema bombycis*(이하 *N. bombycis*로 略함) Schizont의 微細構造를 觀察할 수 있었다고 報告하였다.

또한 Sato等(1982)을 電子顯微鏡을 利用하여 누에로부터 分離한 4개의 微孢子蟲 *N. bombycis*, *Nosema sp.* M11, *Nosema sp.* M12, 및 *Pleistophora sp.* 등의 胞子 微細構造를 觀察하였고, 누에 以外 野外昆蟲에 寄生하는 微孢子蟲에 關하여도 많은 研究가 이루어져 있다.

最近에는 家蠶의 微孢子病原體인 *N. bombycis* 以外에 새로운 形態의 微孢子蟲이 發見되고 있다. 藤原(1969)는 家蠶에 寄生하는 새로운 微孢子蟲을 報告하였고, 石原等(1971)은 細型微孢子를, 田中等(1972)은 小型微孢子를, 阿部·藤原(1979)는 *Pleistophora sp.*에 관하여 記述하였다. 한편 藤原(1980)는 누에로부터 *Nosema sp.* M11, *Nosema sp.* M12 및 *Nosema sp.* M14 등을 分離하였고, 佐藤等(1981)은 *N. bombycis*의 變種인 No. 402, No. 408, No. 520, No. 611 및 *Pleistophora*屬의 M27 등을 報告하였다.

우리 나라에서는 林等(1980a, b, 1981a, b)이 慶北地方에서 發見한 새로운 微孢子蟲의 染色性, 組織內寄生部位, 病原性, 胞子の 크기와 形態, 感染地域의 分布 및 經卵傳達에 關한 研究報告를 하였으며 이를 假稱

새로운 微孢子蟲 K79(以下 K79라 略함)라 하였다. 또한 林等(1981)은 K79와 核多角體 virus를 同時에 接種하면 相互 感染을 抑制한다고 하였으며, 林·趙(1982)는 水原地方에서 發見된 새로운 形態의 微孢子蟲을 new microsporidia S80으로 假稱하였다.

本 試驗은 K79 胞子の 分離精製(前報), 螢光色素에 對한 染色性(前報), 病原性, 感染組織의 光學顯微鏡의 所見 및 發育過程의 電子顯微鏡의 所見等 具體的인 特性을 究明하고 同定하여 分類學的 位置를 밝히고자 한다.

이 研究를 遂行함에 있어서 指導를 하여 주신 慶北大 農大 蠶絲學科 諸教授님, 日本 東京大學 農學部 養蠶學 研究室 教授 吉武成美博士, 助教授 渡部 仁博士 그리고 佐藤令一博士等 諸氏에게 衷心으로 感謝드립니다.

材料 및 方法

1. 微孢子蟲의 病原性

누에에 寄生한 *N. bombycis*와 K79 胞子를 接種 直前に 分離精製하여 0.85% 食鹽水로 $10^3 \sim 10^8$ spores/ml 浮遊液을 만들어(藤原, 1980) 2齡, 5齡起蠶(100頭)에 1頭當 0.03ml가 되도록(有賀, 1973) 人工飼料에 塗布後 10分間 室溫에서 陰乾한 후 24時間 給餌시키고 그 以後는 無菌狀態의 새로운 人工飼料을 給餌하면서(Brook & Kanfori, 1972) 溫濕度 및 諸環境 要件을 標準으로 맞추고 正常飼育하였다. 飼育中 病蠶이 發生되는 즉시 胞子 有無檢査를 實施함과 同時에 他菌의 混入 여부를 調査하였고 接種 15日 後에는 供試된 모든 누에를 採取하였다. 採取한 누에는 2倍量의 buffer液을 加하여 homogenizer(5,000rpm, 10min)로 磨碎하고 3겹의 gauze로 여과후 遠心分離(1,500rpm, 5min)한 다음 증류수를 加하여 2회 反復 遠心分離하였으며 沈澱物을 slide에 塗沫후 光學顯微鏡下에서 感染有無를 確認하고 感染力을 Bliss法에 따라 probit를 作成하고 Log ID₅₀을 求하였다.(菅原, 1968, 渡部, 1966)

2. 微孢子蟲 感染組織의 觀察

K79의 感染에 따른 感染組織의 變化를 光學顯微鏡으로 觀察하였다. K79 胞子の 10^6 spores/ml 浮遊液을 人工飼料에 塗布하여 2齡起蠶에 給餌하고 28°C, 80% RH의 환경에서 人工飼育을 하였다(岩野·石原, 1979, Kellen & Lindgren, 1973). 飼育中 24時間 마다 3頭씩 採取하여 稚蠶期는 누에 全身을, 壯蠶期는 中腸과 網絲線을 採取하여(Youssef, 1974) Carnoy液에 固定시킨후 paraffin으로 包埋하고, 두께 5~8 μ 切片을

만들어 Feulgen 染色法으로 染色한 다음 600~800倍의 光學顯微鏡下에서 觀察하였다. 한편 電子顯微鏡의 觀察은 K79 感染病蠶의 中腸과 絹絲線을 切取하여 2.5% glutaraldehyde (0.1M cacodylate, pH7.5)液에 24時間 1次 固定을 하고 2次 固定은 1% osmium tetroxide液으로 2時間 處理한 후 spurr's樹脂로 包埋하였다(Wilson & Burke, 1980; Purrini & Weiser, 1983). 包埋된 試料은 ultramicrotome(LKB 4801A)으로 銀色의 두께로 切片하여 uranyl acetate와 lead citrate로 染色한 후 電子顯微鏡(Hitachi HU-12)으로 觀察했다.

結 果

1. 微孢子蟲의 病原性

2齡起蠶에 微孢子蟲을 接種하여 病原性을 檢討한 結果(表 1, 2), K79孢子는 ID₅₀이 1.496×10⁵ spores/ml 이고 回歸直線 $\hat{Y}=0.4X+2.93$ 이었다.

한편 *N. bombycis*孢子는 ID₅₀이 8.786×10³ spores/ml, 回歸直線 $\hat{Y}=0.463X+3.174$ 이었다.

表 1, 2를 根據로하여 Bliss法에 따라 probit를 作成

Table 1. The pathogenicity of new microsporidia K79 in the 2nd instar larvae of silkworms, *Bombyx mori*.

Concentration spores/ml	No. of larvae tested	No. of larvae infected	Rate of infectivity (%)	Log concentration	Corrected probit
3.8×10 ⁸	100	100	100	8.6	6.7
3.8×10 ⁷	100	80	80	7.6	5.8
3.8×10 ⁶	100	65	65	6.6	5.4
3.8×10 ⁵	100	52	52	5.6	5.1
3.8×10 ⁴	100	47	47	4.6	4.8
3.8×10 ³	100	33	33	3.6	4.5

ID₅₀: 1.496×10⁵ spores/ml, $\hat{Y}=0.4X+2.93$.

Table 2. The pathogenicity of *Nosema bombycis* in the 2nd instar larvae of silkworm, *Bombyx mori*.

Concentration spore/ml	No. of larvae tested	No. of larvae infected	Rate of infectivity (%)	Log concentration	Corrected probit
3.8×10 ⁸	100	100	100	8.6	7.3
3.8×10 ⁷	100	98	98	7.6	6.8
3.8×10 ⁶	100	86	86	6.6	6.1
3.8×10 ⁵	100	78	78	5.6	5.8
3.8×10 ⁴	100	62	62	4.6	5.3
3.8×10 ³	100	45	45	3.6	4.9

ID₅₀: 8.786×10³ spores/ml, $\hat{Y}=0.463X+3.174$.

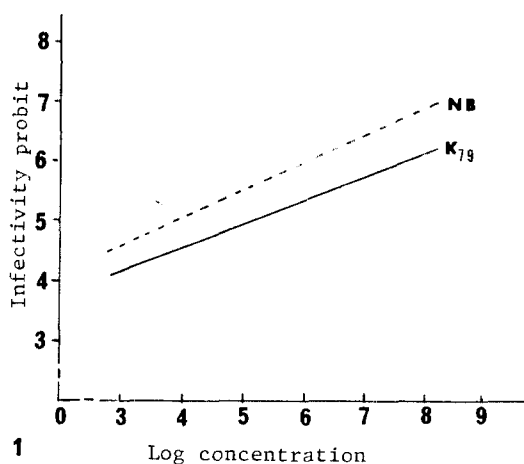


Fig. 1. Infective dose in 2nd instar larvae of the silkworm following ingestion of different concentration of microsporidia spores. NB: *Nosema bombycis*, K79: new microsporidia K79.

하면 *N. bombycis*가 K79보다 感染力이 强하게 나타났 다(圖 1).

5齡起蠶에 微孢子蟲을 接種하여 感染力을 檢討한 結

Table 3. The pathogenicity of new microsporidia K79 in the 5th instar larvae of silkworm, *Bombyx mori*.

Concentration spores/ml	No. of larvae tested	No. of larvae infected	Rate of infectivity (%)	Log concentration	Corrected probit
3.8×10 ⁸	100	88	88	8.6	6.2
3.8×10 ⁷	100	66	66	7.6	5.4
3.8×10 ⁶	100	37	37	6.6	4.6
3.8×10 ⁵	100	22	22	5.6	4.2
3.8×10 ⁴	100	13	13	4.6	3.9

ID₅₀: 7.71×10⁶ spores/ml, $\hat{Y}=0.582X+0.99$.

Table 4. The pathogenicity of *Nosema bombycis* in the 5th instar larvae of silkworm, *bombyx mori*.

Concentration spores/ml	No. of larvae tested	No. of larvae infected	Rate of infectivity (%)	Log concentration	Corrected probit
3.8×10 ⁸	100	97	97	8.6	6.6
3.8×10 ⁷	100	91	91	7.6	6.1
3.8×10 ⁶	100	77	77	6.6	5.7
3.8×10 ⁵	100	51	51	5.6	5.2
3.8×10 ⁴	100	31	31	4.6	5.1

ID₅₀: 5.39×10⁴ spores/ml, $\hat{Y}=0.39X+3.15$.

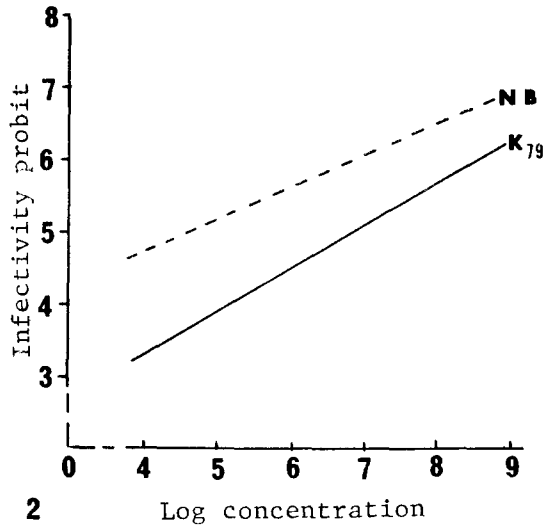


Fig. 2. Infective dose in 5th instar larvae of the silkworm following ingestion of different concentration of microsporidia spores. NB: *Nosema bombycis*, K79: new microsporidia K79.

果(表 3, 4) K79의 ID_{50} 은 7.71×10^6 spores/ml 이고 회귀直線 $\hat{Y} = 0.58X + 0.99$ 이었으나, *N. bombycis*의 ID_{50} 은 5.39×10^4 spores/ml 이고 회귀直線 $\hat{Y} = 0.39X + 3.15$ 였다.

表 3, 4를 根據로 作成된 probit에서는 *N. bombycis*가 K79보다 感染力이 强하였고 低濃度일수록 感染力의 差가 심하였다(圖 2).

2. 病理學的 所見

1) 感染蠶의 肉眼的 및 組織學的 所見

2齡起蠶에 K79胞子를 接種한 후 paraffine으로 組織을 包埋하여 光學顯微鏡下에서 觀察한 結果 接種後 5日째부터 中腸의 被膜組織, 血球(圖 3)등에 微孢子蟲의 侵入 現像이 나타났다. 外部의 病症은 皮膚의 表面에 작은 斑點이 認定되었으며 특히 가슴부위 등쪽과 가슴발, 배발의 基部에 많이 나타났다.

7日째에는 脂肪組織, 中腸의 筋肉組織, 氣管被膜細胞等에도 侵入現像이 認定되었으며(圖 4), 外部病症은 正常蠶 보다 크기가 작고 皮膚의 彈力性이 弱화 되었다.

15日째(5齡 6日)는 絹絲腺 細胞에도 成熟胞子が 發見되었다(圖 5), 이때의 外部症狀은 누에가 食餌를 中止한 狀態이었고 活動力이 둔화되어 있었으며 正常蠶에 比하여 萎縮症狀을 나타내고 죽어 있는 누에가 많았다.

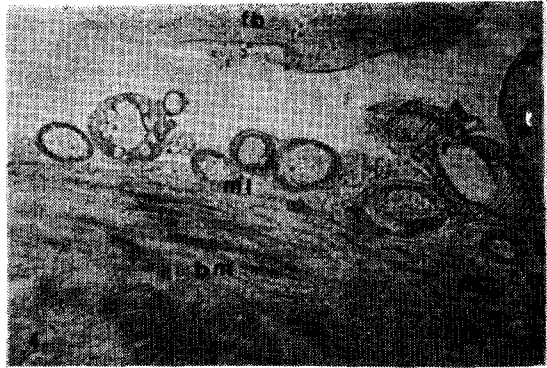
2) 微孢子蟲의 發育過程에 따른 電子顯微鏡의 所見
2齡起蠶에 K79胞子를 接種하여 24時間 마다 Spurr씨 樹脂로 包埋하고 超薄切片하여 胞子の 發育過程을 電子顯微鏡으로 觀察한 結果, 發育의 첫단계는 胞子로부터 噴出된 芽體가 寄主의 細胞內에 侵入 24時間 後 크기가 增大되고 2分裂法으로 增殖되고 있었다. 細胞內에 侵入한 芽體는 1核體, 2核體, 4核體가 觀察되었으며 分裂이 完了되고 核과 細胞質이 發達하여 schizont로 變化되고 있었다(圖 6).

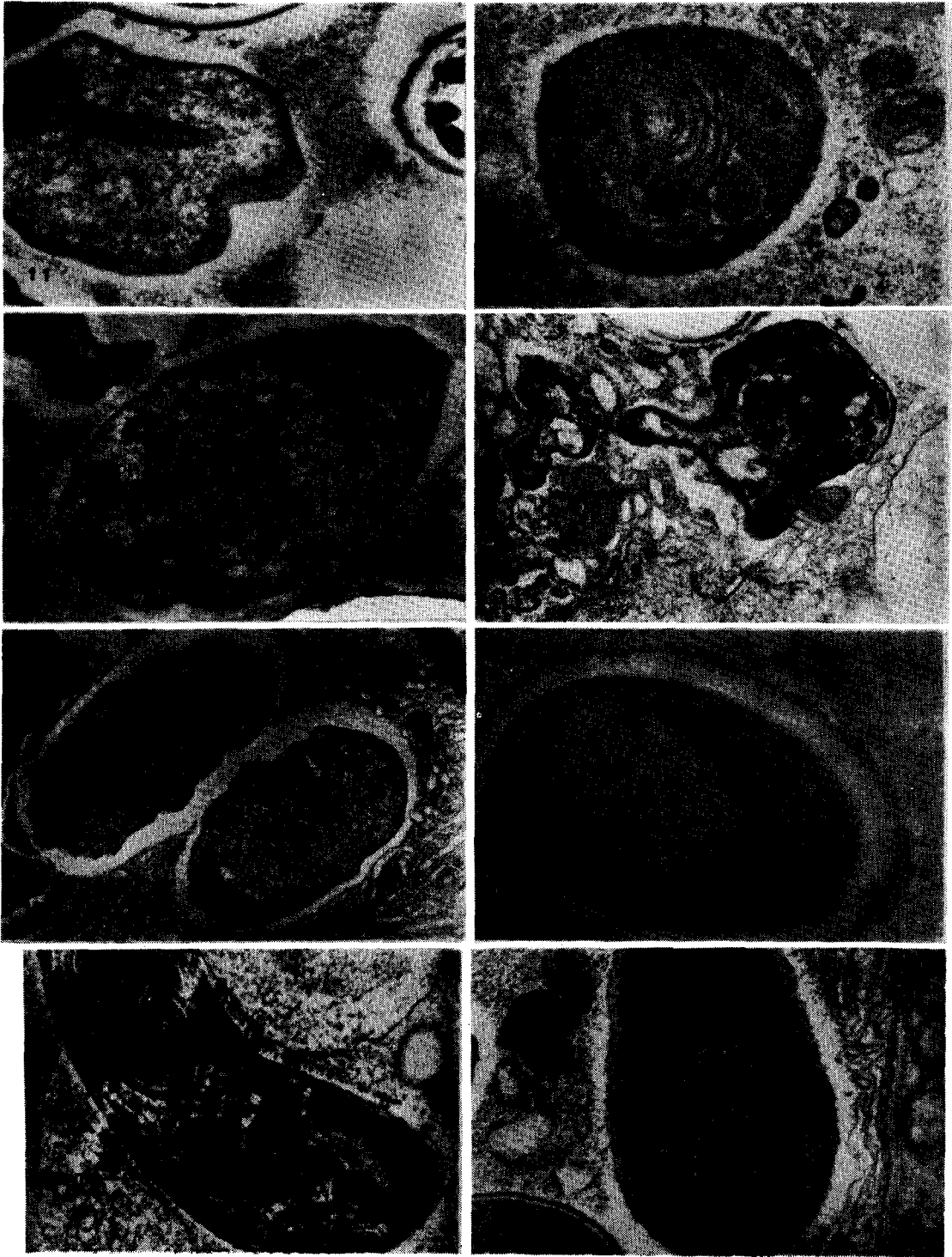
接種 48時間후는 1核體, 2核體 schizont가 觀察되었으며(圖 7) 또한 누에 中腸組織의 圓筒狀細胞 核에 隣接하여 schizont가 寄生着坐하고 있었으나 寄主細胞의 核膜은 健在하였다(圖 8). 일부의 schizont는 核膜이 退化되어 核과 原形質의 境界가 不分明하게 되고 더욱 發育하여 sporont로 成長하고 있었다(圖 9).

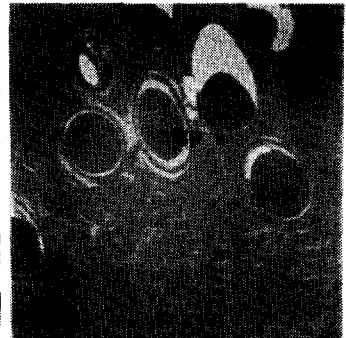
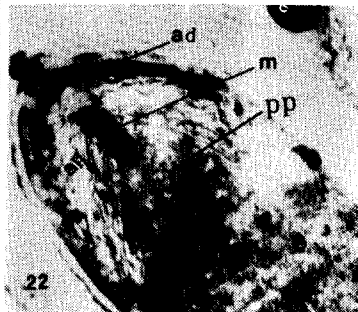
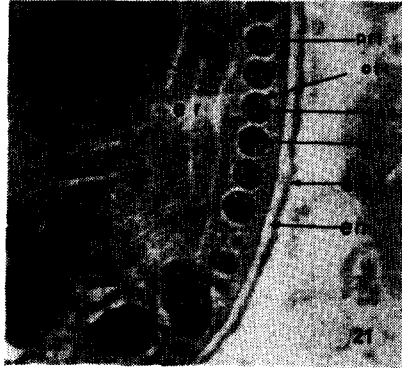
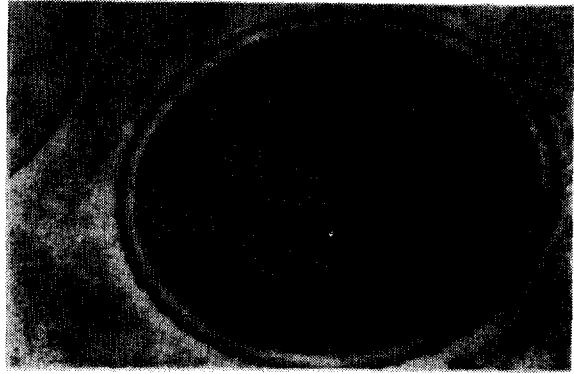
72時間째의 標本에서는 核膜이 거의 보이지 않고 內部器官의 發芽가 始作되고 細胞質 外面部는 突起되어 그 形態가 一定하게 固定되어 있지 않고 變形되고 있었다(圖 10). 일부 sporont 細胞質 앞쪽에 形成된 anchoring disk에서 極絲가 發芽되어 나오고 있었다(圖 11).

96時間째의 標本에서는 anchoring disk가 상당히 크게 形成되었고 그 아래쪽에는 잘려진 極絲體가 보이며 中央部에 極膜層의 元基가 나타나 極膜層의 形成이 進行되고 있었다(圖 12). 또한 極膜層의 發達과 同時에 細胞質膜 周邊部가 굳어지면서 被殼이 形成되어 微孢子蟲의 形態가 長橢圓形으로 되었고 極絲의 成長이 이루어 지고 있었다(圖 13). 이때까지도 被殼의 外形이 完全히 固定되지는 않았으며 形態의 變形을 보이는 個體도 많이 發見되었다(圖 14). 形態的 變形을 이룬 個體는 內部에 空胞가 여러개 內在하고 있었으며 成長을 계속하여 極絲의 coil數가 增加되고 細胞質膜 周邊部에서 寄主의 細胞質과의 사이에 空隙이 이루어 지고 있었다(圖 15).

接種 120時間후에서는 成長한 sporoblast가 內部器官의 發育을 促進하여 앞쪽에 anchoring disk가 完全한 形態를 나타내고 極膜層의 形成이 進行되고 있었으며 極絲가 상당히 發達成長되어 coil數도 많아져서 極絲의 形成이 거의 마무리 段階에 達하였고 被膜도 상당히 두꺼워져 있었다(圖 16). 이 시기가 끝나면 被膜이 얇아지고 細胞質內에 2개의 核과 核周邊에는 粗面小胞體가 形成된 未成熟 胞子が 인정되었고 그 內部에는 體內代謝로 生成된 老廢物이 後方으로 移動되고 있었으며(圖 17, em) 그후 未成熟 胞子は 極絲의 形成을 끝내고 老廢物을 完全히 後方으로 移動시켰고 後極







胞가 形成되어 있었으며(圖 18) 極絲의 形成이 끝나고 後極胞가 完成되어 完成形의 胞子를 形成하였다(圖 19).

完成된 胞子は 長橢圓形이고 被殼은 電子密度가 높고 凹凸이 完滿하게 分布되어 물결모양을 이룬 外殼(exospore), 電子密度가 낮아 白色으로 보이는 두꺼운 層의 內殼(endospore)과 그 內쪽에 原形質膜이 構成되어 있었다. 內部 構造는 양쪽 頂端部 바로 밑에 anchoring disk가 우산모양으로 位置하고 이 anchoring disk의 아래 部分에 붙어 있는 manubroid의 表面 周圍에 lamella가 붙어 極膜層을 形成하고 있었으며 이 極膜層은 lamella가 길게 뻗어 있는 앞쪽部分과 lamella가 짧게 뻗어 있는 뒤쪽 部分으로 나누어져 있다(圖 19, 22). 極膜層 아래쪽에는 커다란 2개의 核이 隣接하여 胞子의 縱軸方向으로 놓여 있으며 核은 原形質에 둘러싸여 있고 原形質內에 粗面小胞體가 核 周圍에 整然히 排列되어 있었으며(圖 19, 20) 核과 粗面小胞體를 極絲가 감고 있었다(圖 19).

極絲의 構造는 最外層에 電子密度가 낮은 極絲細胞膜鞘가 있고 그 內쪽에 極外絲管이 存在하였고 極絲의 中心部는 極絲腔이 있으며 그 周圍를 極內絲管이 둘러싸고 있었고 그 사이에 極絲質層이 位置하고 있었다

(圖 21).

胞子의 後端에는 極絲의 下部에 小囊胞가 位置하고 末端內에 後極胞가 存在하고 있었으며(圖 19, 21) 成熟된 胞子가 盃狀細胞의 microvilli 部附近에 寄生하고 있는 境遇가 많았다(圖 23).

考 察

1. 微胞子蟲의 病原性

病原微生物의 感染力, 病原力에 關한 檢定은 病原微生物의 性狀, 感染病學 및 被害狀況등을 解明하는 研究手法으로서 重要하다.

微胞子蟲의 感染傳播는 주로 胞子에 依하여 이루어지고 있으므로 이 試驗에서는 微胞子蟲을 2齡起蠶時 飼料에 塗布하여 經口接種하고 *N. bombycis*와 K79와 의 感染力을 比較한 結果(表 1, 2, 圖 1)에 따르면 ID₅₀이 *N. bombycis*는 8.786×10^3 spores/ml였고 K79는 1.496×10^5 spores/ml였다. 이와 같은 사실은 K79 胞子가 *N. bombycis*胞子보다 病原性이 弱하다는 것을 의미하며 林等(1980, 1981a, 1981b)이 桑葉育으로 試驗한 結果와도 一致하고 있다.

5齡起蠶에 微胞子蟲을 經口接種한 境遇는 ID₅₀가 *N.*

*bombycis*는 5.39×10^4 spores/ml, K79가 7.71×10^6 spores/ml로 나타나 5齡起蠶 接種의 境遇도 2齡起蠶과 같은 傾向을 보이고 있다.

蠶齡別로 感染力을 비교하면 *N. bombycis*나 K79에서 모두 2齡起蠶이 5齡起蠶 보다 感受성이 높았다. 一般的으로 昆蟲에 있어서 病原微生物 感染은 幼蟲 齡期에 따라 다르고 若齡 幼蟲일수록 感受성이 높은 傾向이라는 有賀(1973)의 報告와 같은 現象이고 누에에 대한 微孢子蟲類의 感染도 類似한 樣相을 나타낸다는 藤原(1979)의 報告와도 一致한다. 이와 같은 現象은 누에 消化液의 殺蟲力은 幼蟲 齡이 進前함에 따라 強해지고 抵抗力도 增加된다는 石原(1975)의 報告와도 關聯이 있다고 생각된다.

以上에서와 같이 2齡起蠶의 幼蟲은 兩 微孢子蟲(*N. bombycis*와 K79)에 對하여 抵抗力이 비교적 弱하므로 소량의 孢子 接種에도 용이하게 感染되었고 感染蠶은 化蛹前 幼蟲態로 죽었다. 따라서 微孢子蟲의 病原力 檢定에는 2齡起蠶에 接種함이 適當하다고 思料된다.

2. 組織學的 所見

1) 微孢子蟲 感染組織

K79孢子 接種後 5日째 採取한 消化管 皮膜組織과 體液의 血球에서 처음으로 孢子蟲의 侵入을 確認할 수 있었다. 이 사실은 林·金(1980)이 桑葉에 K79孢자를 塗沫하여 給與한 結果 接種 4日後 中腸後部 腹部 附近의 筋肉組織, 脂肪體 및 氣管의 基底膜에서도 孢子를 觀察할 수 있었다는 報告 보다 1日쯤 늦게 發見되었다. 또한 *N. bombycis*孢자의 接種後 70時間 後에 sporoblast가 出現한다는 Ishihara(1968)의 報告 보다는 늦게 感染됨을 確認할 수 있었다.

K79는 接種後 7日째에는 脂肪組織, 中腸의 筋肉組織, 氣管皮膜組織등에도 感染되어 있음을 確認할 수 있었고, 孢子 接種後 15日째에는 絹絲腺細胞에 孢子가 發見되고 細胞의 破壞現象이 보이며 孢子가 流出되고 있는 狀態도 觀察할 수 있었다. 이러한 事實은 *N. bombycis*孢子 接種後 10~12日만에 大部分의 組織이 成熟孢子로 充滿되어 破壞되고 孢子가 細胞外로 流出되며 外部病征이 뚜렷하게 出現하였다는 報告(林·金, 1980)와 比較할 때 K79의 病原性은 *N. bombycis*보다 弱한 것으로 생각된다.

2) 電子顯微鏡的 所見

微孢子蟲 孢子는 屈光性이 크기 때문에 內部構造를 光學顯微鏡으로는 觀察하기가 어렵고 電子顯微鏡으로 觀察할 수 있다. 電子顯微鏡으로 觀察한 K79孢자의 最外部인 孢子殼은 電子密度가 높은 外層과 密度가 낮은 內層으로 區別된다. 外層의 表面은 凹凸狀態이었으

며 돌출부와 돌출부 사이가 44.28nm였고 完만한 물결 모양을 이루고 있었다. 이에 比하여 *N. bombycis*는 돌출부와 돌출부 사이가 29.07nm로 예리한 톱날 모양이 있었다. 그러나 光學顯微鏡으로 보아 形態가 K79와 가장 類似한 M12孢子는 凹凸이 不規則하게 배열되어 있었다.

內層은 뚜께가 얇은 頂端部를 除外하고는 거의 均一한 뚜께(28.56nm)로 이루어지고 있었으며, *N. bombycis*는 37.21nm, M12는 59.17nm로서 이들은 모두 K79보다 두꺼웠다. 따라서 孢子殼 外層의 狀態와 內層의 뚜께로서 이들 種의 分類에 應用될 수 있을 것으로 생각 된다. K79孢子殼 內層의 內側에는 限界膜에 싸여 있었으며 그 앞쪽에는 anchoring disk가 限界膜의 바로 밑에 우산형으로 位置하고 있어서 *N. bombycis*와 類似한 形態를 하고 있지만 M12는 乳頭狀이므로 形態的인 差異를 認定할 수 있었다. anchoring disk의 中央部에서 後方으로 뻗어 나온 manubroid가 原形質의 中心部에 突出하여 있고 이 周圍에 lamellae가 對稱으로 規則整然하게 層狀으로 배열되어 있어서 魚類의 아가미 모양을 하고 있었으며(圖 22) manubroid의 中央軸은 孢子의 前後部를 連結하는 中心軸으로 極絲의 coil 角度를 測定하는 基準이 될 수 있었다. lamella의 附着狀態는 K79孢子에 있어서는 manubroid의 上端部에 附着되어 있었고 *N. bombycis*孢子는 中間部位에, M12孢子는 下端部에 附着되어 있어서 이들간에 差異點이 認定되었다. 이 極膜層이 構成되어 있는 面積은 全孢子 內部面積에 比하여 K79는 약 1/4정도, *N. bombycis*는 약 1/2정도, M12는 1/3정도였다.

極膜層의 아래 부위에는 核이 있으며 核의 數는 微孢子蟲의 分類에 重要な 役割을 하고 있으나 K79, *N. bombycis* 및 M12는 모두 똑 같이 2개의 連核을 가지고 있었으며 核周圍에는 粗面小胞體가 K79와 M12는 잘 보이나 *N. bombycis*는 그렇지 못하였다.

極絲는 孢子의 앞쪽에 있는 anchoring disk에서 出發하여 極膜層部分은 다른 部位보다 짧고 거의 수직상대로 되어 있으며 manubroid의 下端부터 coil狀으로 감겨있고 이 coil의 回轉數와 角度는 孢子 分類의 要點이 되고 있다(Sato, et al., 1982). 極絲의 coil回轉數는 K79가 15.92 ± 0.19 회, *N. bombycis*는 12.21 ± 0.15 회이고 M12는 14.17 ± 0.81 회이어서 K79孢자의 coil回轉數가 약간 많았다. 極絲 coil의 角度는 K79孢자가 75° , *N. bombycis*孢子는 49° 이며, M12孢子는 43° 이어서 K79孢자가 가장 둔각을 이루고 있다. 極絲 coil의 아래쪽에 있는 小囊體는 K79孢자와 *N. bombycis*孢子에서 分明하게 볼 수 있지만 M12에서는 보이지 않았

다.

胞子の 가장 뒷쪽 끝부분에는 後極胞이 存在하며 이들의 形態는 微胞子蟲의 種類에 따라 相異하다고 阿部(1978)는 報告하고 있으나 K79, *N. bombycis*, M12胞子が 모두 同一한 形態인 空胞로 되어 있었다.

完熟된 胞子の 長短徑比는 K79가 2.76, *N. bombycis*는 2.07, M12는 2.75로서 K79와 M12는 長橢圓形이고 *N. bombycis*는 短橢圓形이었다.

胞子は 적당한 환경이 주어지면 發芽를 하는데 이 試驗에서는 中腸 盃狀細胞에서 胞子 接種後 24時間째 sporoplasm이 發見되었으며 2核體, 4核體 및 分裂直後 狀態도 볼 수 있었다.

其他 schizont, sporont, sporoblast, immature spore, mature spore의 發育段階를 觀察하였으나 一般의인 微胞子蟲의 生活史와 같았다.

3. K79의 分類 및 同定

微胞子蟲의 分類同定은 胞子の 形態, 크기, cyst內 胞子數, 核의 數, pansporoblast의 形成 有無, 極絲基 部의 型, 極絲의 길이, coil 回轉數와 角度, 生活史, 感染組織, 寄主範圍, 經卵傳染의 有無, 發生地域等에 따라서 微胞子蟲의 科, 屬, 種을 구별하여 왔다. 여러 微胞子蟲 分類方法中 信賴性이 있는 國際原生動物學會가 提示한 原生動物의 分類法에 따라 K79의 分類學的 位置를 찾아보면 *Nosema*屬에 속하고 지금까지 발견된 것과 다른 別種으로 思料된다. 따라서 K79는 *Nosema sp.* K79로 記載하는 것이 妥當하다고 생각한다.

Nosema sp. K79의 分類學的 位置를 要約하면 아래와 같다.

Phylum	Microspora
Class	Microsporea
Order	Microsporidia
Suborder	Apansporoblastina
Family	Nosematidae
Genera	<i>Nosema</i>

要 約

1979年 慶北地方에서 發生한 病蠶으로 부터 分離된 새로운 微胞子蟲 K79의 形態, 性狀, 發育經過 및 分類學的 位置를 究明하기 위하여 胞子の 病原性, 光學顯微鏡에 依한 感染組織의 所見, 電子顯微鏡的 所見을 調査한 結果는 다음과 같다.

K79胞子の 病原性은 *N. bombycis*보다 弱하였고 누에에 대한 K79의 感染部位는 中腸被膜細胞, 血球, 氣管被膜, 脂肪組織, 絹絲腺이었다.

K79의 發育過程은 sporoplasm, schizont, sporont, sporoblast, spore의 段階로서 *N. bombycis*와 類似하였으나 發育速度는 늦었다.

微胞子蟲 胞子の 電子顯微鏡的인 微細構造는 胞子 外殼의 돌출부와 돌출부사이가 44.28nm로 완만하였으며, 胞子殼內層의 두께는 28.56nm였다. 또한 anchoring disk는 우산형이었고 polaroplast, lamellae는 manubroid上端部에 附着되어 있었다. 極絲의 coil回轉數는 K79 16회이고 coil角度는 75°였고, 核은 두개의 連核으로 되어 있어 分類學적으로 보면 *Nosema*屬에 속하는 新種의 微胞子蟲이라고 思料되며 그 標記는 *Nosema sp.* K79로 記錄함이 妥當하다고 본다.

參 考 文 獻

阿部芳彦(1978a) 微粒子病原蟲의 胞子の 消化管内における 發芽後의 變化. 日蠶雜. 47(3), 221-225.

阿部芳彦(1978b) 카이코幼蟲における 微粒子病原蟲의 傳播樣式. 日蠶雜. 47(4), 279-284.

阿部芳彦, 藤原公(1979) 카이코幼蟲의 中腸上皮細胞에 寄生する 原蟲 *pleistophora sp.* の 增殖樣式. 日蠶雜. 48(1), 19-23.

青木清(1969) 蠶桑害蟲論. 日本蠶絲廣報協會. 東京. pp. 252-254.

有賀久雄(1973) 昆蟲病理汎論. 養賢堂. 東京. pp. 522-569.

Brooks, W.M. and Kanfori, J.D. (1972) Microsporidiosis of the *Hymenopterous parasites*, larval parasites of *Heliothis sp.* J. Invertebr. Pathol., 20, 77-94.

Hazard, E.I. and Lofgren, C.S. (1971) Tissue specificity and systematics of a *Nosema* in some species of aedes, anopheles, and culex. J. Invertebr. Pathol., 18, 16-24.

藤原公(1969) 蠶에 寄生する 新らしい 微粒子蟲について. 日本蠶絲學會關東支部講演要旨集. 20, 9.

藤原公(1979) 카이코幼蟲에 對する 微粒子病原蟲의 感染性および 病原性. 日蠶雜. 48(5), 376-380.

藤原公(1980) 카이코에서 分離された 3種의 微胞子蟲について. 日蠶雜. 49(3), 229-236.

Ishihara, R. (1968a) A growth of *N. bombycis* in primary cell cultures of mammalian and chicken embryo. J. Invertebr. Pathol., 11, 328-329.

Ishihara, R. (1968b) Some observations on the fine structure of sporoplasm discharged from spores of

- a microsporidian, *Nosema bombycis*. J. Invertebr. Pathol., 12, 245-258.
- 石原廉(1969a) 小胞子蟲類に關する最近の知見. 日蠶雜. 38, 176-183.
- 石原廉(1969b) 發育中の *Nosema bombycis*の 微細構- I. 造日本大學農獸醫學部學術研究報告. 27, 84-91.
- Ishihara, R.(1969) The life cycle of *N. bombycis* as revealed in tissue culture cell of *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol., 14, 316-320.
- 石原廉(1975) 原蟲の研究史と展望, 昆蟲病理談話會報 27, 3-4.
- 石原廉・小林正彦・藤原公(1971) 家蠶の新原蟲病. 日本蠶絲學會講演要旨. 40, 48.
- 岩野秀俊・石原廉(1984) スジキリヨトウから分離された微胞子蟲 *Pleistophora sp.* について. 日本文學農獸醫學部學術研究報告. 41, 25-33.
- 川村福治(1915) 微粒子の生態に就いて. 日本蠶絲會報 278, 256-258.
- 菅原寛夫(1968) 昆蟲實驗法. 日本植物防疫協會. 東京. pp.700-707.
- Kellen, W.R. and Lindegren, J.E.(1973) Transovarian transmission of *Nosema plodidae* in the indian-meal moth, *Plodia lutea punctella*. J. Invertebr. Pathol., 21, 248-254.
- Kellen, W.R. and Lindegren, J.E.(1973) *Nosema invadens sp.*, a pathogen causing inflammatory response in Lepitoptera. J. Invertebr. Pathol. 21, 293-300.
- Kudo, R.(1916) Contributions to the study of parasitic protozoa. Bull. Imper. Seric. Ezpt. Stst., 1(31-51).
- 林鍾聲・金鍾聲(1980) 家蠶에 寄生하는 새로운 微胞子蟲에 關한 研究. 慶北大學校 大學院論文. pp.1-50.
- 林鍾聲・孫海龍・韓明世, 1981) 새로운 微胞子の 누에에 대한 病原性 및 徑卵傳達에 關한 研究. 農村振興廳 産學協同. 81-5, 1-27.
- 林鍾聲・趙世衍(1982) 누에로부터 分離된 새로운 Microsporidia(S80)의 特性. 慶北大學校 大學院論文 pp.1-37.
- 林鍾聲・韓明世(1981) 家蠶에 寄生하는 Nuclear-polyhedrosisvirus와 새로운 微胞子蟲 *Nosema sp.* (M12) 間의 相互作用. 慶北大學校 大學院論文. pp.1-53.
- 林鍾聲・韓明世(1981) 李永根, 趙世衍: 家蠶에서 分離된 새로운 微胞子蟲에 關한 研究. 大韓蠶絲會. pp.1-36.
- 林鍾聲・韓明世・李永根・趙世衍・金鍾聲・金炳準(1980) 韓國에서 發見된 새로운 微胞子蟲에 關한 研究. 韓國蠶絲學會. 學術研究發表要旨. 2, 1-3.
- Liu, H.J. and McEwen, F.L.(1977) *Nosema blissi sp. n.* (Microsporida; Nosematidae), a pathogen of the chinch bug, *Blissus leucopterus hirtus* (Hemiptera; Lygaeidae). J. Invertebr. Pathol., 29, 141-146.
- Nordin, G.L.(1975) Transovarial transmission of *Nosema sp.* infecting malacosuma americanum. J. Invertebr. Pathol., 25, 225-228.
- Purrini, K. and Weiser, J.(1983) *Octosporea collembolae n. sp.*: A new microsporidian parasite of springteal, *Omychiurus quadricellatus*. J. Invertebr. Pathol., 42, 135-142.
- 佐藤令一, 小林正彦, 渡部仁(1981) 家蠶から分離された微胞子蟲の性狀の比較. 昆蟲病理談話會會報. 39, 2-3.
- Sato, R., Kobayashi, M. and Watanabe, H.(1982) Internal ultrastructure of spores of microsporidians isolated from the silkworm, *Bombyx mori*. J. Invertebr. Pathol., 40, 260-265.
- 田中茂男, 清水考夫, 小林正彦, 石原廉(1972) 家蠶の新原蟲病について. 日蠶雜. 41(2), 89-95.
- 瀧澤寛三(1977) カイコの微胞子病原蟲の増殖に關する 研究, 蠶絲試驗場報告. 27(2):297-352.
- 渡邊均(1976) ノゼマ屬小胞子蟲の寄生によるハスモンヨトウ幼蟲の攝食量の減少. 昆蟲病理談話會會報. 31, 3-4.
- 渡部仁(1966) 家蠶における細胞質多角體病 virusに對する抵抗性のプロビント法による檢定. 日蠶雜. 35(4), 289-295.
- Wilson, J.P. and Burke, J. (1980) Development and ultrastructure of a microsporidian parasite in mid-gut cells of the larch sawfly, *Pristiphora trichsonii*. J. Invertebr. Pathol., 39, 49-59.
- Youssef, N.N.(1974) Biology and pathogenicity of the microsporidian *Perezia hyperae sp. n.*, a pathogen of the alfalfa weevil, *Hypera postica*. J. Invertebr. Pathol., 24, 282-300.

Explanation of Plates

- Fig. 3.** New microsporidia K79 spores observed in globules of 4th instar larvae, *Bombyx mori*.
- Fig. 4.** New microsporidia K79 spores observed in the fat body(fb), muscular layer (ml), basement membrane (bm) and trachea (tr) of the 4th instar larvae, *bombyx mori*. ($\times 600$)
- Fig. 5.** New microsporidia K79 spores (M) are seen in the silk gland cell of the 5th instar. ($\times 600$).
- Fig. 6.** Each schizont is limited by a plasma membrane and contains ribosome. ($\times 34,000$)
- Fig. 7.** Schizonts observed in the infected epithelial cell of mid-gut. Dividing schizont with one nucleus in one lobe. dsc: dividing schizont, sc: schizont, n: schizont nucleus, R: ribosome. ($\times 60,000$)
- Fig. 8.** Spront located nearly nucleus of cylinder cell of the mid-gut. hn: host nucleus, sc: schizont, n: schizont nucleus cc: cylinder cell. ($\times 60,000$)
- Fig. 9.** The golgi apparatus which will form the polar tube, polar sac. Showing pores in the out coat (po), the endoplasmic reticulum (er), the primitive golgi type body (ga). n: nucleus, sc: schizont. ($\times 80,000$)
- Fig. 10.** Spront (sp) showing development at rigid cell wall. ($\times 40,000$)
- Fig. 11.** Advanced sporoblast bearing polar filament (pf) at the periphery. Note ridges on development spores wall. ad: anchoring disk. ($\times 60,000$)
- Fig. 12.** Advanced sporoblast. The lamellar polaroplast (lp) is forming by progressive folding of the vacuole. ad: anchoring disk, pf: polar filament, er: endoplasmic reticulum. ($\times 60,000$)
- Fig. 13.** Developed sporoblast. Polar filament (pf) is formed, a little. ($\times 80,000$)
- Fig. 14.** Cross section of sporoblast. ($\times 30,000$)
- Fig. 15.** Immature spore has been formed a large number of polar filament (pf) ($\times 5,000$)
- Fig. 16.** Immature spore. Anchoring disk (ad), lamellar polaroplast (lp), polar filament (pf), is formed. m: manubroid. ($\times 30,000$)
- Fig. 17.** Immature spore is formed 2 nucleus (n). Endoplasmic reticulum (er) densely populated with ribosome. em: effect matter. ($\times 30,000$)
- Fig. 18.** Immature spore observed posterior vacuole (pv), posterior body. em: effect matter, pf: polar filament. ($\times 40,000$)
- Fig. 19.** Mature spore. ad: anchoring disk, ap: anterior part of polaroplast, pp: posterior part of polaroplast, n: nucleus, sm: sporoplasmic membrane, er: endoplasmic reticulum, en: endospore, ex: exospore, pf: polar filament, pv: posterior vacuole. ($\times 34,000$)
- Fig. 20.** Cross section of mature spore. ex: exospore, en: endospore, n: nucleus, er: endoplasmic reticulum. ($\times 69,000$)
- Fig. 21.** Section of the posterior portion of a new microsporidia K79 spore showing vesicles separation from the posterior vacuole. pf: polar filament lumen, fcs: filament cytoplasmic sheath, oft: out filament tube, ift: inner filament tube, ex: exospore, en: endospore, n: nucleus, er: endoplasmic reticulum, v: vesicle beside the posterior vacuole, pv: posterior vacuole. pf: polar filament.
- Fig. 22.** The polaroplast in the anterior part of a new microsporidia K79. ad: anchoring disk, m: manubroid, ap: anterior polaroplast, pp: posterior polaroplast. ($\times 40,000$)
- Fig. 23.** New microsporidia K79 spore (sp) located in the microvilli (mf). ($\times 10,000$)