

## Nosema bombycis의 母體傳染에 관한 卵面 및 卵內 經路 檢定

韓 明 世

慶北大學校 農科大學

### Maternal-mediated Transmission of *Nosema bombycis* Via the Surface and Internal Site of Silkworm Eggs

Myung Sae Han

College of Agriculture, Kyungpook National University, Daegu, Korea

#### Abstract

*Nosema bombycis* was found on the both of surface and inside of the silkworm eggs layed by infected female moth, maternal-mediated transmission of those pathogens via the surface or internal site of silkworm eggs were investigated.

All of the meconia from infected female moths contained pathogenic spores, those concentration were  $4.6(\pm 0.24) \times 10^6$  /ml. The pathogens on the surface of nondiapause eggs were transmitted to the progeny larvae at the rate of 54.5%, however, lost their activity before hatching for the case of overwintered eggs or acid treatment (16% HCl at 46.2°C for 6 min).

*N. bombycis* in the silkworm eggs was localized at the serosa, yolk, embryo except chorion tissue in the silkworm eggs layed by infected female moths. Development of the pathogens in the eggs was synchronized with embryogenesis, which secured the safety of pathogens against environmental condition, resulting in the high transmissibility of  $91.2 \pm 1.80\%$ .

Key words : Microsporidia, *Nosema bombycis*, vertical transmission

#### 緒 論

*Nosema bombycis*는 20종 이상의 곤충에 감염되며 (Machay 1957), 經卵전염성과 강한 病原力을 지닌 Microsporidia의 典型的인 존재로서, 집누에로부터는 이와 유사한 다수의 계통이 알려져 있다 (Han & Watanabe 1987). 經卵전염은 곤충병의 蔓延에 관여하며 익충의 보호나 해충방제상 매우 重視되는 疫學의 특성으로서 (Ignoffo *et al.* 1976, Steinhaus 1949), *N. bombycis* 感染症의 병태생리에 관하여 經卵傳達性 및 효소항체를 이용한 類似 Microsporidia의 同定法 등이 개선 또는 확립되었다 (Han & Watanabe 1988).

1857년 Osimo 에 의해 卵表面 및 卵內에서 병원체가 발견되고 經란전염이 확인된 후 (Pasteur 1870),

집누에의 경우 *N. bombycis*의 經란전달이 母體傳染으로서 父系와 무관한 이유에 관하여도 雌雄 生殖巢의 해부 및 조직병리학적으로 解明된 바 있다 (Han 1994). 그런데, 經卵傳染은 병원체가 卵內에 존재하는 상태로 전달되는 경우와 卵 외부에 부착된 상태로 전달되는 경우를 생각할 수 있다. 본 논문에서는 前者를 "卵內經路" 後者는 "卵面經路"로 定意하고, 卵期에 있어서 병원체의 거동 및 구체적인 존재부위를 확인하고 卵面經路 및 卵內經路를 검정하였다.

#### 材料 및 方法

##### 1. 병원체 및 生物檢定

접종용 병원체는 Percoll을 이용하여 정제한 포자를 이용하였으며 (Han & Watanabe 1988), 균주는 *N.*

*bombycis*를 사용하였으나, 필요에 따라서는 *Nosema* sp. M11 도 대조구로 供試하였다. 누에는 인공사료로 사육하고 5령 첫밥때 10%/cm<sup>3</sup>의 포자를 20시간 침식한 다음 5령 2일 이후는 표준 사육법에 따른 상엽육으로 전환하였다. 한편, 經卵전달된 病原胞子は 4-Cl-1-naphthol 발색에 의한 효소항체법(Han & Watanabe 1987, Sternberger 1974)으로 확인하였다.

**2. 세포조직학적 검사**

卵巢卵 및 산란 後의 休眠卵을 2% glutaraldehyde와 1% paraformaldehyde 혼합 고정액 중에서 안과용 메스로 난각을 제거하거나 또는 가로방향으로 자른 다음 Han (1994)의 방법에 따라 고정하고 Spurr 樹脂에 묻어서 굳혔다. 광학현미경 관찰은 0.5~1.0 μ의 절편을 만들고 toluidine blue 염색 또는 basic fuchsin-methylene blue 이중염색을 하였으며, 透過型 전자현미경 (TEM) 관찰을 위하여는 위의 樹脂 block 을 ultramicrotome 으로 黃金色 超薄切片을 만든 다음 uranyl acetate-lead citrate 이중염색을 하였다.

**3. 卵 표면의 관찰**

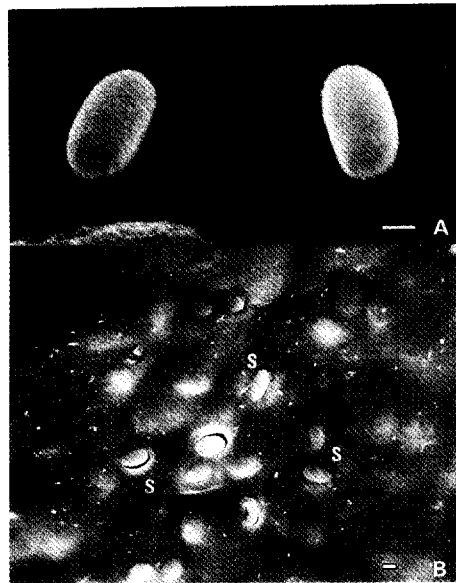
卵 표면에 3% formalin을 분무하여 건조하고, 위의 조직학적 검사에서와 같은 방법으로 1차 및 2차 고정을 하였으며, 50, 70, 90, 100 % ethanol 계열로 탈수한 다음 치환단계를 생략하거나 isoamyl acetate 로 치환한 시료를 액화탄산가스로 臨界點 건조 후, 黃金으로 coating 하여 常法에 따라 走査型 전자현미경 (SEM)으로 관찰하였다.

**結 果**

**1. 卵面經路**

감염된 집누에 암나방이 낳은 알을 주사형현미경으로 관찰하였을 때, 표면에 미립자 포자가 검출되는 사례가 있으므로, 포르말린 분무로 卵 표면의 포자가 유실되지 않도록 처리한 卵에 대한 정밀조사를 하였으나, 외관상 청결한 대부분의 卵에서는 病原胞子가

발견되지 않았다. 그러나, 蛾尿에 오염된 卵에 한하여 오염 부위에는 무수히 많은 포자가 관찰되었다 (그림 1). 그러므로 卵 표면에 존재하는 病原胞子は 감염된 나방의 尿에서 유래할 것으로 예상되었으며, 이를 확인하기 위한 蛾尿검사에서 *N. bombycis* 감염 암나방 50두의 100%가 蛾尿에서 포자가 검출되었으며, 蛾尿에서 포자가 검출되지 않은 나방은 마쇄후 현미경 검사에서도 감염이 인정되지 않았다. 감염구 및 건전구



**Fig. 1.** Scanning electron micrograph (SEM) of *Nosema bombycis* spores attached to the egg surface, showing contamination with meconia from infected male moths of the silkworm. bars=1 μ. S, *Nosema bombycis* spores.

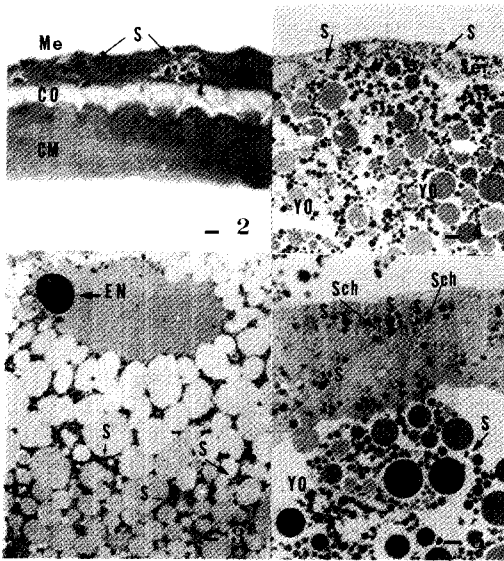
A : Egg surface was fixed with glutaraldehyde and O<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dehydrated, infiltrated with isoamyl acetate, critical point dried, and coated with gold.

B : Egg surface was sprayed with 3% formalin, air-dried, and processed for SEM observation by routine methods as described above except for the step of infiltration with isoamyl acetate.

**Table 1.** Concentration of microsporidian spores in the meconia discharged from female moth of the silkworm infected with *Nosema bombycis* or *Nosema* sp. M11

Microsporidia inoculated	No. Moths Inspected <sup>a</sup>	% Infection of Moths <sup>b</sup>	No. Spores × 10 <sup>6</sup> / Meconium,
<i>Nosema bombycis</i>	20	100	4.6 ± 0.24
<i>Nosema</i> sp. M11	20	100	2.4 ± 0.23
Control	20	0	0

<sup>a</sup>Peroral inoculation of spores to the 5th instar larvae. <sup>b</sup>Infection was detected by inspection of meconium



**Fig. 2.** Cross section of egg shell including microsporidian spores on its surface following contamination with meconia discharged from female moth of the silkworm infected with *Nosema bombycis*. bar=5  $\mu$ . CO, outer layer of chorion : CM, middle layer of chorion : Me, meconia : S, spores of *N. bombycis*.

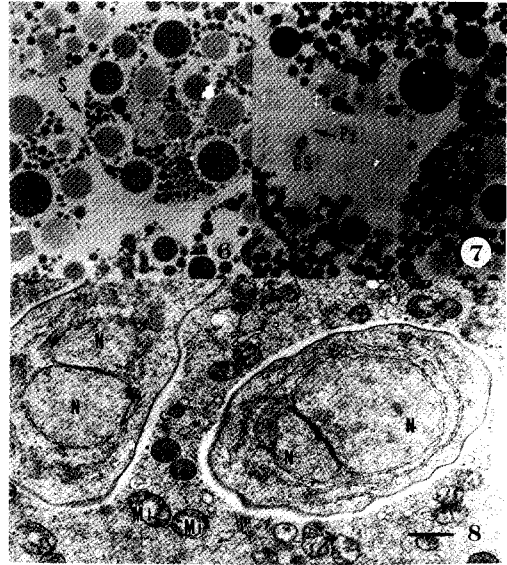
**Fig. 3.** Internal site of silkworm egg including *N. bombycis* from the section fixed soon after laying by infected female moth. bar=10  $\mu$ . EN, egg nucleus : S, spores of *N. bombycis*.

**Fig. 4.** Cross section of diapause egg in summer, 30 days after laid by the female moths infected with *N. bombycis*. bar=10  $\mu$ . S, spores of *N. bombycis* : Ser, serosa : Yo, yolk.

**Fig. 5.** *N. bombycis* transmitted into the embryo and yolk following transovarial infection of silkworm eggs. bar=5  $\mu$ . S, spores of *N. bombycis*: Sch, schizonts of *N. bombycis*: Yo, Yolk

의 암나방 각 20두로부터 채취한 아노 중에 함유된 병원孢子的 농도는 *N. bombycis* 감염구에서  $4.6(\pm 0.24) \times 10^7/mi$ , 대조인 *N. sp.* M11 감염구는  $2.4(\pm 0.23) \times 10^7/mi$  였다(표 1).

卵 표면에 부착된 병원孢자는 주로 蛾尿에 유래하는 것으로 판명되었으므로, *N. bombycis* 포자를 함유하는 蛾尿를 채취한 다음, 沈酸 (16% HCl, 46.2°C, 6 분) 및 표면소독을 한 직후의 건전한 非休眠卵에 塗抹하였을 때, 10일 정도 경과 후에 깨어난 次代蠶의 54.5%가 감염되었다. 그러나 春期 채종한 休眠卵에



**Fig. 6.** Feature of yolk tissue ended diapause in winter, from the time embryo develops for hatching under the condition of optimal temperature, the pathogen appears as a stage of resting spore. bar=5  $\mu$ . S, spores of *N. bombycis*.

**Fig. 7.** *N. bombycis* spore extruding their sporoplasms in the overwintered eggs following incubation for 4 to 5 hrs. bar=5  $\mu$ . GS, *N. bombycis* spore on its germination : Pf, polar filament extruded from the spore.

**Fig. 8.** Electron micrograph of schizont developing in the eggs following incubation after diapause in winter. bar=500 nm.

病原孢자를 함유하는 蛾尿를 塗抹 후 越年 보호한 경우에는 次代蠶의 감염이 인정되지 않았다. 또한, 표면에 感染蛾尿를 도달한 卵을 浸酸한 경우에는 經卵 전달이 성립되지 않았다. 따라서, 不越年卵에 한하여 卵面經路에 의한 經卵傳達가 확인되었으며, 次代蠶으로의 전염성도 상당히 높은 것으로 밝혀졌다. 그러나, 卵 表面에 존재하는 병원孢자는 인공부화 등의 처리에 병원체의 활성이 소실되며, 무처리에도 時日이 경과함에 따라 불활화가 진전된 결과 越年卵에서는 經卵傳染이 성립되지 않는 것으로 결론지을 수 있었다.

## 2. 卵內經路

*N. bombycis* 에 감염된 암나방이 낳은 卵의 조직 절편을 관찰하였을 때, 蛾尿에 오염된 경우에도 卵殼



Fig. 9. Various stage of *N. bombycis* developing in the ovariolar eggs of silkworm moth. bar=5 $\mu$ . EC, egg chamber : NC, nurse chamber : Sch, schizonts of *N. bombycis*.

外面에만 병원체가 관찰되었으며, 난각 조직 중에는 병원체가 존재하지 않았다 (그림 2). 産卵 직후의 感染卵에서 병원체가 확인되었으며 (그림 3), 장액막 조직 (그림 4) 을 비롯하여 胚子 및 卵黃 (그림 5) 에서 병원체가 관찰되었다. 따라서, 병원체의 卵內 존재부위는 卵殼조직을 제외한 漿液膜과 난황 胚子 등으로 밝혀졌다.

越冬중의 休眠卵에서는 休眠이 打破된 상태에서도 저온보호 중에는 休止상태인 成熟胞子が 관찰되었으며 (그림 6), 休眠卵은 夏期의 고온보호 중에도 병원체는 포자상태로 검출되었다. 그러나, 休眠을 깬 卵을 25°C에서 4~5시간 보호한 시기에 고정된 난의 조직 절편에서는 포자의 발아가 확인되었고 (그림 7), 그 후 催靑에 의해 胚 발육이 진전됨에 따라 卵內에는 발육중인 schizont 가 관찰되었고, 檢出頻度 또한 증가하였다 (그림 8). 休眠卵에서는 休止상태인 포자로 존재하였으나, 발육중인 卵巢卵의 卵室 및 營養室 내에서는 각종 발육단계의 병원체가 존재하였으며 (그림 9), 산란 후 10일경 까지의 胚發生 초기 및 휴면 打破 후 알깨기를 할 경우에도 卵巢卵의 경우와 같이 발육 증식중인 병원체가 다수 관찰되었다. 그러므로, 産卵후

卵內 병원체의 거동은 卵의 발육상태와 同調的인 것으로 판단되었고, 越年卵 10蠟區의 次代蠶을 대상으로 조사한 결과 卵內經路에 의한 經卵傳染性은  $91.2 \pm 1.80\%$  로서 卵面經路에 비하여 매우 높았다.

한편, 卵內經路에서 *N. Bombycis* 의 전자현미경 및 광학현미경 관찰을 병행한 결과, 전자현미경 관찰에서 전자밀도가 낮은 schizont 는 광학현미경 관찰에서 toluidine blue 염색성이 낮았고 (그림 9) 발육이 진전된 개체는 염색성이 증대하였다 (그림 8). 또한, basic fuchsin-methylene blue 二重염색에서도 발육 초기의 schizont는 methylene blue 에 염색되지 않고 basic fuchsin 염색성은 매우 낮았으며 발육이 진전됨에 따라 점차 증가를 보였으나, 포자 성숙단계에서는 basic fuchsin 염색성을 잃고 methylene blue 好染性을 나타내어 성숙된 포자는 진한 청색으로 염색되었다. 광학현미경으로 식별 가능한 *N. bombyccis* 의 발육 정도는, toluidine blue 염색의 경우 schizont 와 spore 였으며, basic fuchsin-methylene blue 二重염색에서는 schizont, sporont 또는 sporoblast, spore 의 3단계로 판단되었다.

## 考 察

*N. bombycis* 감염에서는 幼蟲의 치사율이 높고 (Han & Watanabe 1988) 성충에도 중증을 초래하므로 (Han 1994), 병원성이 약한 *N. sp.* M11 의 경우 보다 蛾尿 중의 포자농도 역시 *N. bombycis* 감염에서 높은 이유는 병원력의 차이 즉, 組織內 침입력과 傳播, 증식성, 감염組織의 파괴력 등과 관련이 있는 것으로 생각된다. *N. bombycis* 에 감염된 모든 암나방은 아노에서 多量의 病原胞子が 검출되기 때문에, 蛾尿 검사를 이용하면 암나방을 마쇄하거나 치사시키지 않고 산란 전이라도 감염 여부를 조기에 판별할 수 있을 것으로 思料되었다. 卵面經路를 통한 경란전염은 항상 발생하는 것이 아니라 蛾尿에 오염된 卵 표면의 병원체가 불활화 되기 전에 알이 孵化되므로써 성립되며, 次代에 미치는 영향이 微弱하고 단순한 오염의 경우와 類似하지만, 母系의 감염에 따른 垂直傳播 경로의 하나로 간주할 수 있었다. 난면에 부착된 病原포자는 불활화 되기 쉽고 越年 후에는 완전히 병원성이 완전히 소실되며, 不越年卵은 인공부화의 경우 필수적으로 수반되는 高溫浸酸처리로 卵面經路에 의한 경란전염은 쉽게 차단될 것으로 보인다.

卵內經路는 經卵傳達의 보편적인 經路로서, 곤충병의 蔓延에 중요한 점에 관하여는 이미 조사된 바 있

으나 (Ignoffo *et al.* 1976, Steinhaus 1949), 본 연구는 卵內의 각종 조직에 있어서 병원체의 존재부위를 보다 정밀하게 관찰하는 동시에 卵內 병원체의 발육상태에 관하여 조사한 결과, 卵內 병원체의 거동이 卵의 발육과 同調인 관계임을 입증하였다. *N. bombycis*의 발육 증식이 胚發生 및 分化와 非同調인 경우에는 卵期의 감염 치사율이 높고 次代에 미치는 영향이 오히려 적을 것이나, 同調이기 때문에 감염된 상태로 孵化될 가능성이 높고 병원체는 次代蠶으로 확실하게 전달되며, 次代 집단 내에서의 2차감염으로 수평전파에 의한 질병의 만연을 초래하는 것으로 설명할 수 있다. 卵內經路는 卵面經路에 비하여 안정된 상태로서 오랜 時日을 경과하는 越年卵에서도 병원체의 활성이 消失되지 않았기 때문에 경란전달율이 높았던 것으로 밝혀졌으나, 前報 (Han & Watanabe 1988)의 100% 보다 다소 낮은 점은 생물검정 조건의 차이에 기인하는 것으로 간주할 수 있다. 본 연구의 부가적인 결과로서, *N. bombycis*의 발육정도에 따른 特異 염색성은 병원체의 발육단계에 관한 簡易識別 및 廣視野의 광학현미경 관찰을 요하는 경우에 유용할 것이다.

## 摘 要

*Nosema bombycis*의 經卵傳染은 집누에의 경우 卵內 및 卵面の 두가지 經路가 존재하는 것으로 입증되었다. 卵內에서 병원체가 존재하는 부위는 卵殼 조직을 제외한 漿液膜, 卵黃, 胚子 등이었다. 卵內에 침입한 병원체는 卵의 발육과 同調으로 발육 증식하므로써 오랜 시일이 경과하여도 불활화 되지 않는 동시에 感染卵의 치사를 줄일 수 있으며, 병원체가 안전하고 확실하게 次代의 幼蟲으로 전달되므로 卵內經路는 經卵傳染率이 높은 것으로 밝혀졌다.

卵面經路는 感染 母體의 蛾尿에 의한 卵 표면의 오

염이 주 원인으로서, *N. bombycis* 감염蛾는 100%가 蛾尿에 병원체가 검출되며,  $4.6(\pm 0.24) \times 10^6/ml$ 의 포자를 함유하는 것으로 밝혀졌다. 卵 표면에 부착된 病原孢子는 非休眠卵에 塗抹하였을 때, 10일 정도 경과 후 孵化된 幼蟲의 54.5%가 감염되었으나, 越年 보호하거나 浸酸한 경우 次代蠶의 감염은 인정되지 않았다. 따라서, 집누에 越年卵의 경우 經卵傳染에 의한 질병의 蔓延에는 卵內經路가 主要한 것으로 결론지었다.

## 引用 文 獻

- Han, M. S. (1994) Transovarial transmission and histopathology on the gonad infection with *Nosema bombycis* in the silkworm, *Bombyx mori*. Korean J. Seric. Sci. 36 : 69-75.
- Han, M. S. and Watanabe, H. (1987) Immunoperoxidase-staining methods for discrimination of microsporidian spores in the pebrine inspection of silkworm mother moths. J. Seric. Sci. Japan 56 : 431-435.
- Han, M. S. and Watanabe, H. (1988) Transovarial transmission of two microsporidia in the silkworm, *Bombyx mori*, and disease occurrence in the progeny population. J. Invertebr. Pathol. 51 : 41-45.
- Ignoffo, et al. (1976) Natural biotic agents controlling insect pests of Missouri soybeans. World Soybean Res. Sept. 561-568.
- Machay, M. L. (1957) Occurrence of *Nosema bombycis* Naegeli among wild lepidoptera. Folia Entomol. Hungarica 10 : 359-363.
- Pasteur, L. (1870) Etudes sur la maladie des a soie, vol. 1, Gauthier- Villars, Paris, pp.1-322.
- Steinhaus, E. A. (1949) Principles of insect pathology, McGraw-Hill Book Co., New York, pp. 1-16
- Sternberger, L. A. (1974) Immunocytochemistry, Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 123-171.