

道县蚕桑家庭农场发展的现状和对策

何小玲

(湖南省蚕桑科学研究所, 长沙 410127)

摘要: 通过对道县蚕桑家庭农场发展情况的调研, 发现其存在桑园布局分散、发展模式单一、资金链短缺、土地流转和确权难度大、人才缺乏等问题, 建议做好健全土地流转机制、完善家庭农场金融制度、多元化发展蚕桑产业、加强专业型人才培养、利用龙头企业做好社会化服务等工作。

关键词: 道县; 蚕桑家庭农场; 现状; 问题; 对策

桑蚕产业是我国重要的传统产业, 如今“户有3亩桑, 脱贫奔小康”已成为贫困山区很多蚕农的真实写照。蚕桑家庭农场主要依靠家庭劳动力, 符合蚕桑生产的特点, 有利于蚕桑生产的精心饲养、稳产高产、降本增效, 是蚕桑产业提高生产力水平、转型升级的重要途径。东桑西移之后, 广西的蚕桑产业得到很大发展, 道县位于广西和湖南交界处, 在“一带一路”和“乡村振兴”背景下, 蚕桑家庭农场因周期短、回本快、绿色环保等因素在道县部分乡镇迅速发展起来, 但存在的问题也不容忽视。

1 道县蚕桑家庭农场概况

1.1 蚕桑家庭农场的概念

蚕桑家庭农场是以家庭为基本单位, 以家庭成员为主要劳动力, 从事蚕桑产业规模化、集约化、商品化生产经营, 以蚕桑家庭农场收入为家庭主要收入来源的农业经营主体^[1]。

1.2 道县的地理条件和气候特征

道县位于湖南南部, 属南岭地区, 西接

广西全州县、灌阳县。其四周环绕着高山, 中部是平川和丘陵地貌, 整体地势四周高中间低, 属于盆地结构。山地面积占44.7%, 丘陵占36.0%, 平原占14.9%。桑树生命力旺盛, 被誉为生命树, 所以在山区和丘陵地区都能生长。道县属中亚热带大陆性季风湿润气候区, 四季分明, 温度适宜, 非常适合种桑养蚕。

1.3 道县蚕桑家庭农场概况

2013年以来, 道县仙子脚、桥头、寿雁和乐福堂等乡镇30多户农民自发经营家庭农场种桑养蚕, 桑园面积达66.7hm²。因为道县得天独厚的地理条件和气候特征, 蚕农一年可养10批蚕, 即一批蚕从3龄养到结茧只需要十几天, 蚕期每个月基本可养两批。每666.7m²桑园养蚕的年收入在6000~8000元, 蚕茧质量特别高的可达10000元。2018年新增蚕农15户, 每个蚕桑家庭农场规模在1.3~2.0hm²左右, 基本上都是一对夫妻经营一个家庭农场, 大蚕5龄时请临时工采摘桑叶。同年, 湖南沅水河农牧生态有限公司在转型升级中新增44.0hm²桑园, 建立起小蚕共育室和自动化标准蚕房, 并统筹道县蚕桑资源进行规模化整合。

2 存在的主要问题

2.1 桑园布局分散,难以形成规模

道县各乡镇近 133.3hm² 桑园都分散在各地,要想规模化经营,还需流转周边土地连成一片。但是农民对土地包租持观望态度,土地流转存在一定困难。加上已流转的土地属于农业用地,要在农业用地上建设养蚕大棚,审批上存在困难,需当地政府协商解决。

2.2 发展模式单一,缺乏社会化服务

道县的蚕桑家庭农场主要以种桑养蚕为主,靠出售蚕茧获得收入,桑园套种和蚕桑资源多元化开发利用还未发展起来,发展模式单一。在社会化服务方面也相当欠缺,目前只有一两个蚕桑家庭农场组织负责采购桑苗、蚕种、肥料、消毒药品、蚕具等物资,统一收购蚕茧,大部分蚕桑家庭农场处于自我摸索和单打独斗的阶段。

2.3 基础设施不健全,资金链跟不上

道县属于山区,家庭农场承包的多为山地和荒田,水、电和道路等基础设施投入巨大,大部分蚕农难以承受。目前,道县蚕桑家庭农场仅一两家在桑园内修建完善的灌溉系统,大部分桑园只能依赖自然降雨。完善桑园基础设施建设,需要大量的资金投入和政策支持,一般蚕户很难从金融机构获得贷款,即使获得贷款,金额也较少,与投入相差较大,严重制约了蚕桑家庭农场的进一步发展。

2.4 土地流转和确权问题难以解决

一是农民土地流转意识较差。对农民来说,土地是赖以生存的保障,虽然中壮年外出务工收入比种田种地更高,但他们仍不愿意将土地流转给他人。二是土地流转机制不够完善。很多地区因缺乏完善的土地流转机制,土地流转和确权工作难以开展。三是土地流转程序不规范。很多土地流转协议未经相关部门审核,且未能留下流转档案,即使签订了合同也不具备法律效力^[2]。一旦发生

纠纷,蚕桑家庭农场的利益将受到损害,不利于蚕桑家庭农场的进一步发展。

2.5 专业人才缺乏,机械化水平低下

大部分蚕农在 50 ~ 60 岁之间,文化程度低,有个别中青年没有受过高等教育,更没有经过蚕桑专业知识的系统学习。大部分农村主要劳动力都在外务工,留在农村的基本上是老弱病残和妇孺儿童,他们无法掌握先进技术,也不能成为蚕桑家庭农场的主要力量。

3 对策和建议

3.1 健全土地流转机制,促进养蚕规模化

一是加快推进农村集体土地确权登记发证工作和土地流转平台建设,打消农民心中顾虑,保护租种土地的养蚕大户和家庭农场的利益。二是推进桑园土地依法有序流转。按照“依法、自愿、有偿、互惠”的原则,采取出租、转包、互换、转让、入股等方式,切实搞好土地流转,向优势区域、家庭农场和专业大户集中,为培育专业大户和家庭农场奠定基础。三是加大土地流转宣传教育的力度。针对现阶段我国农民缺乏土地流转意识问题现状,政府部门应积极开展各种宣传教育活动,向广大人民群众宣传与土地流转相关的法律法规,帮助人民群众正确认识土地流转工作。加大培训基层领导干部的力度,确保他们拥有更丰富的政策和法律知识,准确地向群众科普与土地流转相关的政策,提高广大人民群众对土地流转的支持度,推进土地流转工作的开展。

3.2 完善家庭农场金融制度,解决资金链问题

加大财政扶持力度,尤其是蚕桑家庭农场标准化蚕房、自动化养蚕设备、自动化伐桑机、自动化上簇设备和采茧机等方面的财政扶持力度,支持蚕桑家庭农场完善道路、水电、蚕房和设备等基础设施^[3]。完善风险

抵押机制,拓宽相应的担保物范围,将大型养蚕设备、蚕房、土地使用权等纳入贷款担保抵押物范围;开发适合蚕桑家庭农场的保险品种,建议实施保险费财政补贴。

3.3 多元化发展蚕桑产业,确保收入来源持续稳定

因地制宜地应用和推广湖南省蚕桑科学研究所提出的“222”蚕桑高效种养模式,由单一的种桑养蚕向多元化发展转变,即一个家庭,夫妻2人作为主要劳动力,承包经营一个1.3hm²(20亩)左右的蚕桑家庭农场,实现年综合收入20万元以上。除了种桑养蚕之外,还要经过多元化的经营:一是在桑园套种榨菜、土豆、花生、豇豆等蔬菜,或者套养鸡、鸭、鹅等家禽,既能增加收入又能一定程度地控制桑树病虫害;二是用桑枝打成粉做成菌包,在养蚕空闲期,通过持续供应菌菇增加收入;三是将蚕茧、食用菌等产品出售给当地的蚕桑龙头企业,统一包装、加工、销售,实现增值。

3.4 加强专业人才引进,提高机械化水平

地方政府和蚕桑企业要采取各种措施,引导高中生、中专生、大专生和大学生毕业后回农村发展蚕桑产业。大规模的桑园生产,必须要配套省力化高效养蚕技术、桑园的轻简化栽培与管理措施。大力推广省力化蚕桑机具和技术,桑园作业机械如微型旋耕机、施肥器、机动喷雾器、电动伐条机、运输车等。桑园省力化剪伐机使用方法以及与之相适应的桑树品种和栽培技术;桑叶采摘方法的改进与机器辅助;桑叶快速清洁技术与清洗机具;小蚕自动化饲育设备、大蚕的省力化饲育设备;自动上簇的蚕药与簇具。养蚕轻简化设施如电动消毒机、电动切桑机、温湿度自动控制器、简易蚕台等^[4]。通过运用省力

化机械,切实减轻蚕农的劳动强度,提高劳动效率。

3.5 建立以企业为主体的产业化联合体,做好社会化服务

以湖南沅水河农牧生态有限公司为主体,统一租赁村民土地建设桑园及养蚕基础设施,其中一部分桑园公司自用,作为技术培训及示范用,一部分桑园采用“返租倒包”的方式,返包给有技术、懂经营、会管理的蚕农管理,公司再按协议统一收购蚕茧,或委托周边的养蚕专业合作社及养蚕大户收购,发挥“中介组织”的“规模效应”和“整合效应”,带动道县蚕桑产业发展。同时,农业部门组织技术干部编印技术培训教材,并采取技术骨干划片包干,在生产关键时节进行桑园管理、小蚕共育、蚕病防治、桑园套种等技术培训,发放相关技术资料,同时提供信息服务等。

4 小结

在“一带一路”战略背景下,蚕桑产业将迎来新的发展。道县的蚕桑家庭农场在龙头企业的带动下,顺势而为,借助乡村振兴和精准扶贫的东风,推进蚕桑产业多元化发展,必将会成为道县新的产业风景线。

参考文献

- [1] 陈义安,王晓芬,张友洪,等.我国现代蚕业家庭农场发展对策思考[J].四川蚕业,2016,(03):1-5.
- [2] 张翊.家庭农场健康发展的途径分析[J].农业经济,2017,(04):22-23.
- [3] 孙孝龙,周卫红.江苏沿海地区蚕桑产业新业态新模式探讨[J].蚕桑茶叶通讯,2018,(03):6-8.
- [4] 胡剑戎,黄世荣,张鹏博.永康市蚕桑家庭农场建设现状与发展策略[J].蚕桑通讯,2017,(04):38-40.

3 种桑叶黑茶的饮用安全性评价

邵元元^{1,2,3} 颜新培¹ 李飞鸣¹ 肖建中¹ 邹湘月¹ 李霞¹ 叶添梅¹

(1 湖南省蚕桑科学研究所, 长沙 410127; 2 湖南农业大学茶学教育部重点实验室, 长沙 410128; 3 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 长沙 410128)

摘要:以桑叶茯砖、桑叶千两和桑叶天尖为研究对象, 采用食品安全国家标准测定方法对3种桑叶黑茶中致病菌、重金属和农药残留进行检测, 并按食品安全毒理评价程序对桑叶黑茶进行急性毒性试验, 以期探明桑叶黑茶的饮用安全性。检测结果显示, 桑叶茯砖、千两、天尖3种黑茶样品中不含致病菌, 重金属铅、镉、汞和砷的含量都远低于茶叶农业标准, 同时均未检测出农药残留, 符合国家标准对食品中污染物限量的要求。小鼠急性毒性试验结果显示, 桑叶茯砖、千两、天尖提取物对小鼠的LD₅₀分别为22.3g/kg、22.8g/kg、28.5g/kg, 均大于《保健食品评价技术与规范》中规定的无毒值; 灌胃3种黑茶提取物的小鼠脏器解剖未发现明显异常改变。研究表明, 3种桑叶黑茶属于无毒级食品, 符合食品安全要求。

关键词:桑叶黑茶; 安全性评价; 致病菌; 重金属; 农药残留; 致死中量

桑树在我国栽培有4 000多年历史, 广泛种植于全国各地, 桑叶作为桑树的主要经济产物, 每年可采摘多次, 占地上部分产量的60%左右^[1]。在《神农本草经》中桑叶被誉为“神仙叶”, 国家卫生与健康委员会也将其作为药食同源的植物资源。桑叶既是蚕的唯一食源, 也是劳动人民长期防病治病的良药。桑叶微苦、甘、寒, 具有疏风散热、清肝明目的功效, 常用于风热感冒、头痛咳嗽、目赤肿痛、迎风流泪等疾病治疗; 桑叶中含有生物碱、黄酮、多糖、植物甾醇、氨基酸、维生素等多种功能成分, 可起到降血糖、抗肿瘤、抗感染、抗氧化等保健作用^[2-3]。桑树的种植

要求不高、生物量大且具有一定的生态效益, 桑叶还具有极高的药用价值, 继而成为天然的物美价廉的功能性食品原料来源之一。对桑叶资源进行深入的开发与利用, 是传统蚕桑产业的延伸以及为蚕农增收的途径之一。

黑茶是我国六大茶类之一, 安化黑茶是湖南特有的地理标志产品, 近年来安化黑茶由于降脂减肥、调理肠胃等功效符合人们健康生活的需求, 畅销全国乃至全世界。基于这些优势, 本研究团队利用安化黑茶传统工艺, 将桑叶制作成桑叶毛茶, 与茶叶毛茶复配制作新型功能性黑茶——桑叶黑茶^[4]。由于制作毛茶的桑叶原料较粗老, 通过发酵和拼配之后其安全性还未知, 本研究以此为切入点, 对桑叶黑茶产品进行安全性评价, 为桑叶黑茶的安全饮用提供科学理论依据。

资助项目:湖南省重点研发计划课题(No.2015NK3054); 现代农业产业技术体系建设专项(No.CARS-18)。

第一作者:邵元元(1987—), 女, 初级农艺师。

E-mail: amiliyayuan@163.com

通讯作者:颜新培, 博士, 研究员。

E-mail: 776256205@qq.com

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂和仪器

1.1.1 桑叶黑茶样品 桑叶茯砖(FZ) T-1、桑叶千两(QL) T-2、桑叶天尖(TJ) T-3均由安化云天阁茶业有限公司提供。桑叶茯砖压制经过原料筛分、拼配、渥堆、压制、定型、发花干燥、成品包装等工序。桑叶千两采用纯手工制作工艺,其加工程序为选料、筛分、拣剔、紧压成型、晾至干燥。桑叶天尖制作经过原料拼配、筛分、风选、拣剔、高温汽蒸软化、烘培、拼堆、包装灌篓、压制定型、插丝透气、凉置、成品包装等工序。

1.1.2 实验小鼠 SPF级ICR小鼠160只,雌雄各半,体质量18.0~22.9g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(湘)2013-0004,实验动物使用许可证号SYXK(湘)2015-0016,实验动物质量合格证号No.43004700032173。SPF鼠料为全价颗粒饲料,由北京科澳协力饲料有限公司生产,经⁶⁰Co消毒,符合GB 14924.2—2001、GB 14924.3—2010等饲料行业国家标准。

1.1.3 实验试剂 氯化钠、氢氧化钠、盐酸、葡萄糖、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠(AR)等为国药集团化学试剂有限公司产品;酵母浸膏(BR)为国药集团化学试剂有限公司产品;琼脂为Biosharp公司产品;胰蛋白胨、蛋白胨、牛胆盐购自北京澳博星生物技术有限责任公司;牛肉膏(BR)、乳糖(AR)购自上海展云化工有限公司。

1.1.4 实验仪器 Alpha 1-4/LSC Plus 真空冷冻干燥仪(德国Christ公司),C22-RT2240电磁炉(广东美的生活电器制造有限公司),GIPP-13均质器(上海继谱电子科技有限公司),ABI04-N电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司),7890A FPD气相色谱仪、Agilent 7800电感耦合等离子体质谱仪[安捷伦科技(中国)有限公司]。

1.2 桑叶黑茶提取物干粉的制备

第1次提取,茶水比1:10,沸水保温

30min,过滤;第2次提取,茶水比1:5,沸水保温20min,再过滤;然后合并2次的滤液,旋转浓缩,冷冻干燥成粉末,备用。

1.3 桑叶黑茶提取物的微生物检测

菌落总数测定采用平板法,参照GB 4789.2—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定》^[5];大肠菌群计数采用平板法,参照GB 4789.3—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数》^[6];金黄色葡萄球菌分析采用平板法,参照GB 4789.10—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验》^[7];沙门氏菌分析采用平板法,参照GB 4789.4—2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》^[8]。

1.4 桑叶黑茶提取物的重金属残留检测

重金属铅、镉、汞、砷测定参照GB 5009.268—2016《食品安全国家标准 食品中多元素的测定》^[9]。

1.5 桑叶黑茶提取物的农药残留检测

参照GB/T 5009 110—2003《植物性食品中氯氰菊酯、氰戊菊酯和溴氰菊酯残留量的测定》^[10]、GB/T 5009.20—2003《食品中有机磷农药残留量的测定》^[11]、GB/T 5009.19—2008《食品中有机氯农药多组分残留量的测定》^[12]进行农药氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、六六六、滴滴涕、敌敌畏的残留检测。

1.6 桑叶黑茶提取物的急性经口毒性试验

按照国家卫生和计划生育委员会发布的《食品安全性毒理学评价程序和方法》^[13]和《保健食品检验与评价技术规范》^[14]的相关要求,对桑叶黑茶提取物的急性毒性进行评价。

1.6.1 动物饲养 饲养环境SPF级,温度20~26℃,相对湿度40%~70%,换气次数≥15次/h,动物照明时间每日12h/12h交替照明,工作照度200lx,动物照度15~20lx,环境符合GB 14925—2010中SPF级实验动物环境条件的要求。

1.6.2 剂量设置 根据预试验结果,选用ICR小

鼠 160 只, 雌雄各半, 体质量 18.0 ~ 22.9g, 以 42.9g/kg 为最大剂量组, 0.75g/kg 为组间距, 按体质量、性别随机分为 16 组, 设 1 个空白对照组, 每种黑茶样品分别设 5 个剂量组, 分别为 I 组 (42.9g/kg, 0.50g/mL)、II 组 (32.6g/kg, 0.38g/mL)、III 组 (24.9g/kg,

0.29g/mL)、IV 组 (18.9g/kg, 0.22g/mL)、V 组 (14.6g/kg, 0.17g/mL), 如表 1 所示。每组 10 只小鼠, 按 20mL/kg 经口灌胃给予蒸馏水或对应不同浓度的茶叶水提物, 实验前禁食不禁水 12h 以上, 给药当日给药 1 次。

表 1 试验剂量及分组

组 别	茶样质量浓度 / (g·mL ⁻¹)	灌胃剂量 / (g·kg ⁻¹)	灌胃体积 / (mL/kg ⁻¹)	每日给药次数 / 次	动物数量 / 只	
					♂	♀
CK	—	—	20	1	5	5
FZ(T-1) I	0.17	14.6	20	1	5	5
FZ(T-1) II	0.22	18.9	20	1	5	5
FZ(T-1) III	0.29	24.9	20	1	5	5
FZ(T-1) IV	0.38	32.6	20	1	5	5
FZ(T-1) V	0.50	42.9	20	1	5	5
QL(T-2) I	0.17	14.6	20	1	5	5
QL(T-2) II	0.22	18.9	20	1	5	5
QL(T-2) III	0.29	24.9	20	1	5	5
QL(T-2) IV	0.38	32.6	20	1	5	5
QL(T-2) V	0.50	42.9	20	1	5	5
TJ(T-3) I	0.17	14.6	20	1	5	5
TJ(T-3) II	0.22	18.9	20	1	5	5
TJ(T-3) III	0.29	24.9	20	1	5	5
TJ(T-3) IV	0.38	32.6	20	1	5	5
TJ(T-3) V	0.50	42.9	20	1	5	5

FZ (T-1) —桑叶茯砖, QL (T-2) —桑叶千两, TJ (T-3) —桑叶天尖。表 2 ~ 5 同。

1.6.3 观测时间与观测指标 在给药后 0 ~ 4h 内仔细观察记录各组动物的中毒表现和特点、毒性反应出现及恢复时间以及死亡情况等, 然后每天观察 1 次, 连续观察 14d, 观察指标包括动物外观、行为活动、分泌物、排泄物、饮食情况、死亡情况 (死亡时间、濒死前反应) 等。分别于给药前及给药后第 4 天、第 7 天、第 10 天和第 14 天对动物进行称量, 记录动物体质量变化及死亡情况。如发现动物死亡或濒死, 应按照相关标准操作流程规定及时对动物进行解剖观察。观察期结束时, 对剩余的试验动物进行大体解剖, 肉眼观察各主

要脏器如肝脏、肾脏、脾脏、心脏、脑的颜色、形状、位置和大小等, 并检查脏器表面和切面的质地, 大体解剖出现异常时, 均记录并对异常器官进行组织病理学检查。

1.7 数据处理

使用 SPSS 16.0 软件进行数据统计分析, 两两比较, 符合正态分布时采用独立样本 t 检验, 不符合正态分布时采用非参数 t 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义, $P < 0.01$ 表示所检验的差别有非常显著意义。采用 Bliss 法计算 LD_{50} 及 95% 置信区间。

2 结果与分析

2.1 桑叶黑茶样品中的微生物检测结果

样品中菌落及其致病菌的检测结果显示表 2, 样品中大肠菌群含量符合国家卫生标准 ($<0.3\text{MPN/g}$), 均没有检测到沙门氏菌和金黄色葡萄球菌。

表 2 3 种桑叶黑茶样品中的微生物检测结果

样 品	菌落总数 $/(CFU \cdot g^{-1})$	大肠菌 群数量 $/(MPN \cdot g^{-1})$	金黄色葡 萄球菌数 量 $/(CFU \cdot g^{-1})$	沙门氏 菌数量 $/(CFU \cdot g^{-1})$
FZ(T-1)	3.8×10^4	<0.3	—	—
QL(T-2)	5.7×10^4	<0.3	—	—
TJ(T-3)	1.3×10^4	<0.3	—	—

黑茶是一种独特的微生物发酵茶, 黑茶的加工过程分为初级加工和再加工阶段。黑茶初加工过程包括杀青、初揉、渥堆、复揉、干燥等工序, 其中关键工序渥堆是微生物以茶叶为基质, 利用自身活动产生的热量和茶叶本身的湿热作用, 促使茶叶发生复杂的化学反应, 在渥堆过程中微生物不断生长繁殖^[15], 微生物代谢分泌产生多酚氧化酶、纤维素酶、果胶酶等, 为茶叶内含物质转化提供有效的生化动力, 如氧化儿茶素、分解纤维素、水解果胶和蛋白质^[16], 促进黑茶内含物质的转化, 使茶汤变成棕红, 共同参与黑茶品质的形成。由于黑茶中微生物比较活跃, 所以菌落总数比较高。桑叶茯砖、桑叶千两和桑叶天尖三者的菌落总数有差异, 可能是在再加工过程中工艺差异影响形成。根据中华人民共和国农业行业标准 NY/T 556—2001《茉莉花茶》^[17], 每 100g 茶叶大肠菌群的最大可能数 (MPN) 不能超过 500 个。本研究桑叶黑茶样品中大肠菌群含量小于 0.3MPN/g , 都未超过该标准。根据 GB 29921—2013《食品安全国家标准 食品中致病菌限量》^[18], 饮料中沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的可接受水平限量分别为 0 和 100CFU/g 。3 种桑叶黑茶

样品中都没有检测到沙门氏菌和金黄色葡萄球菌, 饮用安全性较高。

2.2 桑叶黑茶样品中的重金属检测结果

重金属是影响茶叶质量安全的重要问题之一, 过量的重金属会影响人的正常生理机能。茶叶重金属主要来源于土壤、大气沉降或在加工过程中引入^[19]。根据农业行业标准 NY 659—2003《茶叶中铬、镉、汞、砷及氟化物限量标准》^[20], 茶叶中镉、汞、砷最高限量分别为 1mg/kg 、 0.3mg/kg 和 2mg/kg , 该标准对于铅没有规定, 所以根据 GB 2762—2017《食品安全国家标准 食品中污染物限量》^[21] 茶叶中铅最高含量为 5.0mg/kg 。桑叶茯砖、千两和天尖 3 种桑叶黑茶的重金属检测结果见表 3。

表 3 3 种桑叶黑茶样品中的重金属检测结果

[质量分数 $/(mg \cdot kg^{-1})$]				
样品或标准	铅	镉	汞	砷
FZ(T-1)	0.88	0.130	0.006	0.110
QL(T-2)	1.40	0.095	0.016	0.200
TJ(T-3)	0.65	0.090	0.012	0.074
NY 659—2003		1.000	0.300	2.000
GB 2762—2017	5.00	0.2000	0.020	0.500

3 种桑叶黑茶样品重金属检测结果都远低于农业标准和国家标准, 满足行业标准要求, 说明桑叶黑茶在重金属方面是安全的。天尖中重金属含量低于茯砖和千两, 这可能是因为天尖所用原料相对较嫩为一级黑毛茶。在桑叶黑茶生产过程中, 为了减少重金属的污染, 茶园和桑园选址应远离公路和工业区, 减少空气沉降污染; 改良茶园土壤状况, 优化栽培管理技术, 减少重金属富集; 调整制茶设备, 保持环境卫生, 杜绝制茶过程污染。

2.3 桑叶黑茶样品中的农药残留检测结果

利用药剂防治茶树病虫害已经成为茶农们的一项重要措施, 然而, 农药施用不当会使成品茶叶农药残留超标, 进而影响茶叶品质。根据 GB 2763—2016《食品安全国家标准

准食品中农药最大残留限量》^[22]，茶叶中氯氰菊酯、溴氰菊酯、氰戊菊酯、六六六、滴滴涕和敌敌畏最高限量分别为 20mg/kg、10 mg/kg、0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.2mg/kg 和 0.1 mg/kg。由表 4 可以看出，茯砖、千两和天尖 3 种桑叶黑茶均未检测到农药残留，符合安全标准。

表 4 3 种桑叶黑茶样品中的农药残留检测结果

样品或标准	[质量分数/(mg·kg ⁻¹)					
	氯氰菊酯	溴氰菊酯	氰戊菊酯	六六六	滴滴涕	敌敌畏
FZ(T-1)	—	—	—	—	—	—
QL(T-2)	—	—	—	—	—	—
TJ(T-3)	—	—	—	—	—	—
GB 2763—2016	20	10	0.1	0.2	0.2	0.1

2.4 桑叶黑茶的急性毒性试验结果

急性毒性试验是测定毒物的致死剂量以及其他急性毒性参数，以 LD₅₀ 为最主要的参数，并根据 LD₅₀ 值进行急性毒性分级，进一

步通过观察动物中毒表现、毒作用强度和死亡情况，初步评价毒物对机体的毒效应特征、靶器官、剂量—反应关系和对人体产生危害的危险性^[23]。经口灌胃桑香茯砖、桑香千两和桑香天尖后，小鼠死亡率和 LD₅₀ 测定结果见表 5。由表 5 可知，桑叶茯砖对小鼠的 LD₅₀ 为 22.3g/kg，95% 置信区间为 19.3 ~ 25.6 g/kg；桑叶千两对小鼠的 LD₅₀ 为 22.8g/kg，95% 置信区间为 18.7 ~ 27.2g/kg；桑叶天尖对小鼠的 LD₅₀ 为 28.5g/kg，95% 置信区间为 5.1 ~ 32.5g/kg。GB 15193.3—2014《食品安全国家标准 急性毒性经口试验》中规定 LD₅₀>5g/kg 属实际无毒级，《保健食品检验与评价技术规范》中规定 LD₅₀>15g/kg 属无毒级，3 种茶样对小鼠的 LD₅₀ 均大于 15g/kg，属无毒食品。

观察 3 种桑叶黑茶对小鼠生物学性能及脏器的影响，结果发现给药后 0 ~ 4h 内空白对照组小鼠未见异常，给药组小鼠均出现不同程度的运动减少、倦缩等症状，不同剂量

表 5 ICR 小鼠单次灌胃给予桑叶黑茶水提物死亡情况与 LD₅₀ 测定结果

组别 ¹⁾	剂量/g·kg ⁻¹	动物数量/只	死亡数量/只	死亡率/%	LD ₅₀ (95% 置信区间)/g·kg ⁻¹
CK		10	0	0	
FZ(T-1) I	14.6	10	0	0	
FZ(T-1) II	18.9	10	4	40	22.3(19.3 ~ 25.6)
FZ(T-1) III	24.9	10	5	50	
FZ(T-1) IV	32.6	10	10	100	
FZ(T-1) V	42.9	10	10	100	
QL(T-2) I	14.6	10	0	0	
QL(T-2) II	18.9	10	5	50	
QL(T-2) III	24.9	10	6	60	22.8(18.7 ~ 27.2)
QL(T-2) IV	32.6	10	7	70	
QL(T-2) V	42.9	10	10	100	
TJ(T-3) I	14.6	10	0	0	
TJ(T-3) II	18.9	10	0	0	
TJ(T-3) III	24.9	10	2	20	28.5(25.1 ~ 32.5)
TJ(T-3) IV	32.6	10	9	90	
TJ(T-3) V	42.9	10	9	90	

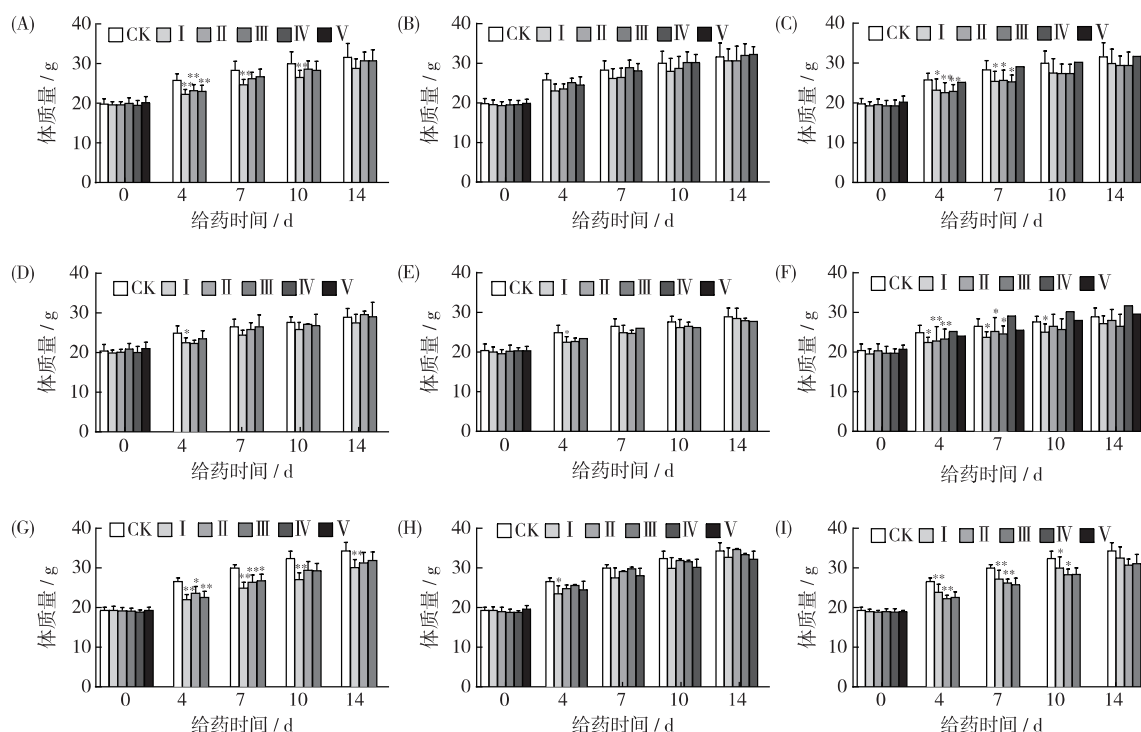
1) 试验分组情况见表 1。

组出现不同数量小鼠死亡, 给药后第 2 天存活的小鼠连续观察 14d 未见明显异常。给药后死亡的小鼠进行大体解剖检查, 肉眼观察脏器位置、大小、色泽、粘连等, 并检查脏器表面和切面的质地, 未见明显异常改变。试验结束后用 2% 戊巴比妥钠麻醉处死所有的试验小鼠, 大体解剖检查脏器, 也未见明显异常变化。

如图 1-A、D、G 所示, 经口灌胃桑叶茯砖水提物, I 组给药后第 4 天、第 7 天和第 10 天, II 组给药后第 4 天, III 组给药后第 4 天小鼠整体体质量相比于空白对照组显著下降 ($P \leq 0.01$); 雌性小鼠仅 I 组给药后第 4 天体质量相比于空白对照组显著下降 ($P \leq 0.05$); 雄性小鼠 I 组给药后第 4 天、

第 7 天、第 10 天和第 14 天, II 组和 III 组给药后第 4 天和第 7 天的体质量相比于空白对照组显著下降 ($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.05$)。说明本试验条件下灌胃给予桑叶茯砖水提物对雄性小鼠体质量可能具有影响。

如图 1-B、E、H 所示, 经口灌胃桑叶千两水提物, I 组给药后第 4 天小鼠体质量相比于空白对照组显著下降 ($P \leq 0.01$); 雌性小鼠仅 I 组给药后第 4 天体质量相比于空白对照组极显著下降 ($P \leq 0.05$); 雄性小鼠 I 组给药后第 4 天体质量相比于空白对照组显著下降 ($P \leq 0.05$)。以上结果未见明显的剂量依赖关系, 且小鼠体质量变化在正常范围内, 结合大体解剖检查结果认为这一现象可能是灌胃给予大剂量高浓度药液所致,



A. 桑叶茯砖对小鼠体质量的影响; B. 桑叶千两对小鼠体质量的影响; C. 桑叶天尖对小鼠体质量的影响; D. 桑叶茯砖对雌性小鼠体质量的影响; E. 桑叶千两对雌性小鼠体质量的影响; F. 桑叶天尖对雌性小鼠体质量的影响; G. 桑叶茯砖对雄性小鼠体质量的影响; H. 桑叶天尖对雄性小鼠体质量的影响; I. 桑叶天尖对雄性小鼠体质量的影响; I ~ V 试验组的分组情况见表 1。与空白对照组比较, * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ 。

图 1 3 种桑叶黑茶对小鼠体质量的影响

没有明显毒理学意义。

如图1-C、F、I所示,经口灌胃桑叶天尖水提物,仅Ⅰ组、Ⅱ组和Ⅲ组给药后第4天、第7天小鼠体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.05$);雌性小鼠仅Ⅰ组给药后第4天、第7天和第10天的体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.05$),Ⅱ组和Ⅲ组给药后第4天、第7天的体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.05$);雄性小鼠Ⅱ组和Ⅲ组给药后第4天、第7天和第10天,Ⅱ组和Ⅲ组给药后第4天和第7天的体质量相比于空白对照组显著下降($P \leq 0.01$ 或 $P \leq 0.05$)。说明本试验条件下灌胃给予桑叶天尖水提物对雌性和雄性小鼠的体质量可能具有影响。

3 讨论

黑茶的致病菌主要包括大肠菌群、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等,大肠菌群是粪便污染指标菌,主要是以该菌群的检出情况来表示食品中有否粪便污染;金黄色葡萄球菌是一种病原菌,会引起许多严重的感染;沙门氏菌是一种常见的食源性致病菌,容易引起食物中毒^[24]。茶叶中重金属污染物主要来自土壤、大气沉降以及农资投入,长期饮用重金属超标的茶叶可能会造成重金属在人体内蓄积引起慢性中毒^[25]。农药残留干扰人体内分泌失调,影响免疫系统和造血系统,易导致胎儿内脏发育不全和畸形^[26]。在传统黑茶研究中,王文光等^[27]对云南省普洱茶主产区的普洱熟茶从微生物的角度进行安全性评价研究,发现均没有检测到致病菌;王秋霜等^[28]对沉香普洱茶进行安全性评价,未检测出致病菌和农药残留。本试验选取桑叶茯砖、桑叶千两和桑叶天尖3款桑叶黑茶产品进行安全性评价研究,从安全性指标分析的结果来看,本研究中的桑叶黑茶茶样中菌落总数较高,这与黑茶加工工艺密不可分,特别是

在渥堆过程中微生物大量繁殖,分泌出多种胞外酶,促进蛋白质、果胶以及纤维素的分解,形成黑茶特有的色、香、味品质特征^[29-33]。3个品种的桑叶黑茶中大肠菌群含量都很低且都没有检测到沙门氏菌和金黄色葡萄球菌。样品中铅、镉、汞和砷都远低于农业标准和食品安全国家标准,说明桑叶黑茶在重金属方面满足行业标准要求。3种桑叶黑茶均未检测出农药残留,符合食品安全国家标准。可以看出桑叶黑茶具有较高的饮用安全性。

急性毒性试验是经口一次性给与或24h多次给与受试物后,在短期内观察动物所产生的毒性反应,包括致死的和非致死的指标参数,致死剂量通常用致死中量 LD_{50} 表示。有研究表明^[34-37],利用小鼠评价普洱茶1年散茶、5年饼茶、10年散茶和云南烘青绿茶的急性毒性,对小鼠的 LD_{50} 分别为9.7g/kg、11.2g/kg、12.2g/kg、7.5g/kg;广西六堡茶对小鼠的 LD_{50} 为9.38g/kg;茯茶对雄性小鼠的 LD_{50} 为14.7g/kg,对雌性小鼠的 LD_{50} 为19.6g/kg。本试验结果显示,茯砖、千两和天尖3种桑叶黑茶对小鼠的 LD_{50} 分别为22.3、22.8和28.5g/kg。茶叶使小鼠中毒及死亡与过高浓度的咖啡碱和茶多酚有关,而桑叶黑茶由桑叶和茶叶两部分组成,其中茶叶原料含量要低于普通黑茶,因而咖啡碱和茶多酚的含量也要低于普通黑茶,所以桑叶黑茶对小鼠的 LD_{50} 大于茯茶、普洱茶、六堡茶和绿茶。综合以上实验表明桑叶黑茶无明显毒副作用,属无毒级,也不含有毒物质,可放心饮用。在试验过程中,我们还发现桑叶黑茶对小鼠体质量有影响,灌胃桑叶黑茶水提物后小鼠体质量增加情况与正常组相比呈现显著差异,这为我们后续研究提供了一定的基础。

参考文献

- [1] 赵丽珺,齐凤兰,瞿晓华,等.桑叶的营养保健作用及综合利用[J].中国食物与营养,2004,(2):22-25.
- [2] 李林,苏小军,李清明,等.桑叶在食品中的应用

- 研究[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(13): 217-220.
- [3] 欧阳臻, 陈钧. 桑叶的化学成分及其药理作用研究进展[J]. 江苏大学学报(自然科学版), 2003, 24(6): 39-44.
- [4] 李飞鸣, 颜新培, 龚昕, 等. 一种桑叶茯砖茶及其生产方法: ZL201310441068.9[P]. 2017-09-29.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定: GB 4789.2—2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 大肠菌群计数: GB 4789.3—2010[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验: GB 4789.10—2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验: GB 4789.4—2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [9] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中多元素的测定: GB 5009.268—2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- [10] 中华人民共和国卫生部, 中国标准化委员会. 植物性食品中氯氰菊酯、氰戊菊酯和溴氰菊酯残留量的测定: GB/T 5009.110—2003[S]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中有机磷农药残留量的测定: GB 5009.268—2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [12] 中华人民共和国卫生部, 中国标准化委员会. 食品中有机氯农药多组分残留量的测定: GB/T 5009.19—2008[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [13] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全性毒理学评价程序和方法: GB 15193.1—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [14] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [15] 金冬双, 龚淑英. 黑茶的微生物作用研究进展[J]. 茶叶, 2007, 33(4): 203-207.
- [16] LI Q, CAI S, LI Y, et al. Biochemical components associated with microbial community shift during the pile-fermentation of primary dark tea[J/OL]. Front Microbiol, 2018, 9: 1509[2018-12-17]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6048958/>. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01509.
- [17] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业行业标准 茉莉花茶: NY/T 456—2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [18] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品中致病菌限量: GB 29921—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [19] 韩宝瑜, 王梦馨. 试析茶叶重金属污染及其克服途径[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(24): 121-122.
- [20] 中华人民共和国农业部. 农业行业标准 茶叶中铬、镉、汞、砷及氟化物限量标准: NY 659—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.
- [21] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品中污染物限量: GB 2762—2017[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [22] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 中华人民共和国农业部, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中污染物限量标准: GB 2763—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [23] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 急性毒性经口试验: GB 15193.3—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [24] 彭争光, 何文斌, 朱金国. 湖南出口黑茶生产加工中有害微生物危害分析及控制措施研究[J]. 中外食品工业, 2014, 2(5): 13-16.
- [25] 王峰, 单睿阳, 陈玉真, 等. 闽中某矿区县茶园土壤和茶叶重金属含量及健康风险[J]. 中国环境科学, 2018, 38(3): 1064-1072.
- [26] 张飞鸽, 元艳, 任小荣, 等. 农产品重金属污染现状及检测方法[J]. 现代农业科技, 2017, 2(24): 172-173; 180.
- [27] 王文光, 袁唯, 许靖逸, 等. 普洱茶中微生物安全性的评价[J]. 普洱, 2012, (5): 86-89.
- [28] 王秋霜, 陈栋, 卓敏. 陈香普洱茶品质安全性评价与分析[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(11): 82-86.
- [29] 何煜波, 姜爱丽, 胡文忠, 等. 黑茶加工工艺与保健功能研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(27): 13595-13596.

(下转第34页)

桑椹肥大性菌核病化学防治试验与农药残留检测分析

曹 慧¹ 王 明¹ 朱建军² 宋冬波² 李章宝¹

(1 湖南省蚕桑科学研究所, 长沙 410127; 2 湖南省澧县农业农村局植保站, 湖南澧县 415500)

摘 要: 桑椹肥大性菌核病是桑椹的一种毁灭性真菌病害。目前, 控制该病最有效的方法是化学防治。不同药剂及组合对该病进行大田防治试验结果表明: 多菌灵、甲基硫菌灵、腐霉利、菌核净、咪鲜胺 5 种农药防治桑椹肥大性菌核病均有较好的效果, 校正防治效果达 83.3% ~ 100%。桑椹农药残留检测只有多菌灵超标, 达到 17.2mg/kg, 是 0.5mg/kg 标准的 34.4 倍。结合大田防治效果、桑椹农药残留及病原抗药性等因素综合分析, 25% 咪鲜胺乳油 500 倍液 + 40% 菌核净可湿性粉剂 750 倍液组合是控制该病的适宜的化学防治方法。

关键词: 桑椹; 肥大性菌核病; 化学防治; 农药残留; 分析

近几年来, 被誉为“二十一世纪的最佳保健果品”的桑椹因其具有生津止渴、滋阴补血、明目乌发、防止血管硬化、提高人体免疫能力等多种独特功效而越来越受到人们的青睐。目前, 我国各地果桑栽培迅速兴起, 呈现规模化发展趋势, 尤其是旅游区及城市周边果桑采摘体验园数量迅速增加, 随之而来的是桑椹菌核病的发生与危害也呈上升趋势, 且逐年加重。经调查, 湖南省大部分不及时防治的果桑园栽培后第 1 年桑椹菌核病发病率在 5% 左右, 第 2 年 10% ~ 15%, 第 3 年 30% ~ 50%, 第 4 年达 80% 以上。有油菜的区域发病率更高, 危害更重。桑椹菌核病已成为制约该省果桑产业发展的最重要因素。

桑椹肥大性菌核病是桑椹菌核病的优势种, 该病在我国大部分桑树栽培地区均有发生, 危害十分严重, 是桑椹的一种毁灭性真菌病害。目前, 控制该病最实用最有效的方法还是化学防治。因此, 2018—2019 年, 在实验室筛选出有效药剂的基础上, 在澧县试验示范基地果桑园开展了不同农药品种和农药组合进行桑椹肥大性菌核病大田防治试验

和桑椹农药残留检测分析, 为有效控制该病的发生与危害及桑椹食用安全提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试果桑园 湖南省蚕桑科学研究所澧县试验示范基地 0.2hm² 6 年生果桑园。

1.1.2 供试果桑品种 桑大 10, 栽植密度为 2.0 米 × 1.0 米。

1.1.3 供试桑椹 2018 年 4 月 25 日采摘各农药防治区成熟桑椹。

1.1.4 供试农药 80% 多菌灵可湿性粉剂 (一帆生物科技集团有限公司), 70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂 (江苏龙灯化学有限公司), 50% 腐霉利可湿性粉剂 [兴农药业 (中国) 有限公司], 40% 菌核净可湿性粉剂 (山东科大创业生物有限公司), 25% 咪鲜胺乳油 (江苏辉丰农化股份有限公司), 10% 丙硫唑悬浮剂 (贵州道元生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大田药剂喷雾防治 2018 年大田药剂喷

雾防治设置 6 个处理, 即 A: 80% 多菌灵可湿性粉剂 500 倍液, B: 70% 甲基硫菌灵可湿性粉剂 500 倍液, C: 50% 腐霉利可湿性粉剂 750 倍液, D: 40% 菌核净可湿性粉剂 750 倍液, E: 25% 咪鲜胺乳油 500 倍液, F: 10% 丙硫唑悬浮剂 500 倍液。每个处理区选择连续 10 株果桑, 设置 3 次重复, 各处理区随机排列, 分别在桑树始花期、盛花期和末花期 3 次对供试果桑的果、叶、枝进行均匀喷雾至滴水为止, 用清水处理做对照区。

2019 年, 根据 2018 年的试验结果进行优化, 大田药剂喷雾防治重新设置 3 个处理, 每个处理设置 3 次重复, 即 I: 25% 咪鲜胺乳油 500 倍液, II: 40% 菌核净可湿性粉剂 750 倍液, III: 25% 咪鲜胺乳油 500 倍液 +40% 菌核净可湿性粉剂 750 倍液组合。处理 I、II 按 2018 年大田防治方法进行, 处理 III 在桑树始花期用 25% 咪鲜胺乳油 500 倍液喷雾, 盛花期用 25% 咪鲜胺乳油 500 倍液 +40% 菌核净可湿性粉剂 750 倍液组合喷雾, 末花期用 40% 菌核净可湿性粉剂 750 倍液喷雾防治, 用清水处理做对照区。

1.2.2 药剂防治效果调查 每个处理随机选择有代表性的 3 株桑树, 每株桑树选择有代表性的 4 根枝条分别标记, 定点调查总果数和病果数, 当田间发现病果时即开始调查, 每

次调查时都将病果摘除集中处理, 每 3 天调查一次, 直至果期结束, 统计计算桑果发病率和桑椹肥大性菌核病校正防治效果。

发病率 = (病果数 / 总果数) × 100%,

校正防治效果 = [(对照区发病率 - 防治区发病率) / 对照区发病率] × 100%。

1.2.3 桑椹农药残留检测 桑椹农药残留检测委托湖南省食品测试分析中心检测, 检测方法按 GB/T 20769—2008 方法进行。

2 结果与分析

2.1 不同药剂对桑椹肥大性菌核病的田间防治效果

不同药剂对桑椹肥大性菌核病的田间防治效果试验结果见表 1。从表 1 可以看出, 除处理 F 外, 其它药剂对桑椹肥大性菌核病均有良好的防治效果, 校正防治效果达 83.3% ~ 100%。其中以 2018 年处理 E、2019 年处理 I 和处理 III 效果最好, 校正防治效果达到 95.6% ~ 100%。

2.2 桑椹农药残留检测结果

2018 年 4 月 25 日采摘各处理区成熟桑椹, 按 GB/T 20769—2008 方法进行桑椹农药残留检测结果见表 2。GB 2763—2014 中没有桑椹农药残留标准, 因此, 桑椹农药残留标准只

表 1 不同药剂防治桑椹肥大性菌核病的田间试验结果

年 份	处 理	总果数 / 个	病果数 / 个	发病率 / %	校正防效 / %
2018 年	A 多菌灵	494	42	8.5	83.3
	B 甲基硫菌灵	407	34	8.4	83.5
	C 腐霉利	477	35	7.3	85.7
	D 菌核净	413	25	6.1	88.0
	E 咪鲜胺	576	2	0.3	99.4
	F 丙硫唑	585	123	21.0	58.7
	CK 清水	564	287	50.9	0
2019 年	I 咪鲜胺	553	0	0	100.0
	II 菌核净	464	27	5.8	84.9
	III 咪鲜胺 + 菌核净	408	7	1.7	95.6
	CK 清水	507	195	38.5	0

能参照 GB 2763—2014 食品安全国家标准食品中农药最大残留限量中的鲜食水果农药残留标准对比,从表 2 中结果可知,甲基硫菌灵、咪鲜胺、腐霉利残留均未超标,而多菌灵残

留严重超标,达到 17.2mg/kg,是 0.5 mg/kg 标准的 34.4 倍(GB/T 20769—2008 内没有菌核净和丙硫唑的残留检测方法,故这两种农药没有检测)。

表 2 桑椹农药残留检测结果

样品名称	检测项目	计量单位	标准要求	实测值	备注
桑 椹	A 多菌灵	mg/kg	0.5	17.2	超标
桑 椹	B 甲基硫菌灵	mg/kg	2.0	1.65	合格
桑 椹	C 腐霉利	mg/kg	5.0	未检出	合格
桑 椹	E 咪鲜胺	mg/kg	2.0	0.13	合格

3 小结与讨论

桑椹肥大性菌核病大田药剂防治效果试验所用的农药是在实验室筛选出能有效抑制该病原菌的药剂基础上选择的,2 年的试验结果表明,6 种药剂及组合对桑椹肥大性菌核病都有较好的防治效果,其中以 2018 年处理 E 和 2019 年处理 I 及处理 III 效果最好,校正防治效果达到 95.6% ~ 100%,可以作为大田防治桑椹肥大性菌核病的参考方法。处理 E 中咪鲜胺属咪唑类高效、低毒、广谱型杀菌剂,具有快速渗透、吸收传导、预防保护和治疗作用,对子囊菌病害有特效,湖南地区首次在桑树上使用,效果非常好,而多菌灵等药剂已使用多年,病原菌可能产生了一定的抗药性,所以防治效果差一点。为了延缓该病原对咪鲜胺的抗药性,保持防治效果,选择两种不同种类的杀菌剂组合交替使用。结合大田防治效果、桑椹农药残留与病原抗药性等因素综合分析,处理 III 是控制该病的适宜的化学防治方法。

大田药剂的防治效果还与防治时间和防治时天气密切相关。桑椹肥大性菌核病最佳防治时期是桑树始花期、盛花期和末花期。在最佳防治时期内选晴天对果桑的果、叶、枝进行均匀喷雾防治。若遇连续雨天,则选

雨停间隙防治,喷药后至少保持 2 小时内不下雨,若喷药后即下雨则要补喷,也不能推迟时期防治,否则防治效果会有不同程度的降低。

通过桑椹农药残留检测结果(表 2)可以看出,甲基硫菌灵、咪鲜胺、腐霉利残留均未超标,而多菌灵残留严重超标,达到 17.2mg/kg,是标准的 34.4 倍,这可能与多菌灵的多次高剂量使用以及其特性具有内吸性和不易被降解等因素有关。因此,对桑椹肥大性菌核病防治应避免高剂量、多次重复使用同一种农药,要尽量交替使用不同种类的农药,且要在一定安全期内停止用药,防止桑椹农药残留超标,确保桑椹食用安全。

参考文献

- [1] 余茂德,楼程富. 桑树学 [M]. 北京:高等教育出版社,2016: 375-378.
- [2] 陈小青,宾荣佩,黄旭华,等. 4 种农药对桑椹肥大性菌核病的田间药效试验和农药残留检验 [J]. 广东蚕业,2016,50(2):4-6.
- [3] 王明,邵元元,黄仁志,等. 桑椹肥大性菌核病病原生长温度测定及抑菌药剂筛选 [J]. 蚕桑茶叶通讯,2017,190(4):1-3.
- [4] 危玲,黄盖群,李文学,等. 大田条件下桑树喷施 3 种杀菌剂后药剂在桑椹中的消解动态及残留检测 [J]. 蚕业科学,2016,42(4):0591-0597.

家蚕抗核型多角体病毒 (BmNPV) 相关基因的表达分析及其实用性分子标记的筛选

刘 勇 艾均文 唐 芸 薛 宏 何行健 郑 颖

(湖南省蚕桑科学研究所, 长沙 410127)

摘 要: 家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV) 是一种对家蚕具有高致病性的病毒, 会导致蚕业生产上的严重经济损失。迄今已在家蚕中发现了几种对 BmNPV 有抑制作用的蛋白, 但各基因的表达水平与家蚕不同遗传类型材料 BmNPV 抗性的相关程度仍不清晰。本研究以高抗材料 (highly resistant parent, R) 和高感材料 (highly susceptible parent, S) 组配成 F_1 、 F_2 及回交等不同遗传类型材料, 利用添毒实验与荧光定量 PCR 技术, 检测家蚕不同遗传类型材料在不同感染条件下对 BmNPV 的抵抗能力及其相应的 5 个抗性相关基因 [家蚕脂肪酶 I 基因 (*Bmlipase-1*)、家蚕丝氨酸蛋白酶 II 基因 (serine protease II, *BmSP-2*)、家蚕核糖体蛋白 S3A 基因 (ribosomal protein S3A, *BmS3A*)、家蚕抑制蛋白酶 II 基因 (suppressor of profilin 2, *BmSop2*)、家蚕烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化还原酶基因 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidoreductase, *BmNOX*)] 的相对表达量, 分析其与抗性的关联性。结果表明: *Bmlipase-1* 和 *BmSP-2* 在家蚕中肠特异表达, 其他基因没有组织表达特异性; *Bmlipase-1*、*BmSP-2*、*BmNOX* 和 *BmSop2* 四个基因在不同遗传类型材料中肠的相对表达量之间均存在明显差异, 且抗性越强的遗传类型材料的相对表达量也越高, 各基因的相对表达量与材料抗性呈正相关性。而 *BmS3A* 基因的表达差异在各遗传类型材料间没有呈现出一定的相关性; *Bmlipase-1* 在不同遗传类型材料的相对表达量与其抗性水平的一致性最高, 该基因的相对表达水平可以在家蚕育种过程中作为抗核型多角体病毒材料选择与鉴定的依据之一。

关键词: 家蚕核型多角体病毒 (BmNPV); 抗性基因; 荧光定量 PCR; 表达水平; 相关性

家蚕 (*Bombyx mori*) 是有重要经济价值的鳞翅目昆虫, 蚕业是我国加入世界贸易组织后, 少数几个仍居国际垄断地位的农业

产业之一。然而, 在蚕业生产上经常会有多种病害可导致蚕茧减产, 甚至绝收, 其中特别以家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV) 所引发的血液型脓病发生最广泛, 危害最严重, 其传染性极强, 难以控制。据国家蚕桑产业技术体系产业经济岗位的研究者于 2013 年对 14 省 91 县的 1 782 户蚕农进行调查, 结果发现有 86.92% 的农户因该病造成过损失, 是蚕农最担心发生的蚕病^[1]。有关家蚕抗 BmNPV 基

资助项目: 湖南省自然科学基金项目(No.2017JJ2137); 现代农业产业技术体系建设专项(No.CARS-18)。

第一作者: 刘勇(1986—), 男, 湖南邵阳人, 助理研究员, 主要从事家蚕品种选育。

E-mail: 137241546@qq.com

通讯作者: 艾均文(1968—), 男, 湖南鼎城人, 研究员, 主要从事桑、蚕种质资源研究与品种选育。

E-mail: jwai718@sina.com

因的筛选、抗性机制及遗传机理方面的研究,各国学者已做了大量工作,并取得了一定进展。

家蚕对 BmNPV 的敏感性虽然受到不同内外环境的影响,但其遗传因素起到决定性作用^[2]。Aratake^[3]对日本现行生产用蚕品种及其杂交原种的感染抵抗性进行比较,发现不同抗性材料差异可达 10~100 倍。陈克平等^[4-5]和钱荷英等^[6]先后用几率值分析法和浓度(对数)-死亡率几率关系曲线法进行遗传机理研究,结果表明家蚕的 BmNPV 抗性对感性呈不完全显性,至少由 1 对主效基因控制,有微效基因修饰与偏父遗传现象。相关研究人员在抗性材料筛选基础上,也尝试了家蚕抗性相关基因的进一步研究。因为 BmNPV 主要通过食下感染,家蚕中肠就成为了抵御 BmNPV 的第一道防线,在其肠液中也先后分离出了一批对 BmNPV 有抑制作用的活性蛋白,其中就有红色荧光蛋白(red fluorescent proteins, RFPs)可以让 NPV 失活的报道^[7]; Ponnuvel 等^[8]和 Nakazawa 等^[9]先后在家蚕幼虫中肠肠液中分离出脂肪酶 I (Bmlipase-1) 和丝氨酸蛋白酶 II (serine protease-2, BmSP-2), 实验证明都具有抗 BmNPV 的包涵体衍生病毒 (occlusion-derived virus, ODV) 活性,同时都只在中肠组织中表达; Xu 等^[10]和徐家萍等^[11]构建了家蚕近等位基因系,利用荧光差异显示技术获得了一些与抗性相关的差异片段,其中有家蚕核糖体蛋白 S3A (ribosomal protein S3A, BmS3A)、家蚕抑制蛋白酶 II (suppressor of profilin 2, BmSop2) 和瘫痪肽结合蛋白 (paralytic peptide binding protein, PP-BP) 等片段。此外, Selot 等^[12-13]发现家蚕烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化还原酶基因 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidoreductase, BmNOX) 也与抗 BmNPV 有关。

不同家蚕品种对 BmNPV 的抗性有很大的差异,相关研究显示抗性基因的表达量

与其抗性存在一定的相关性^[14-16]。本研究在前人研究的基础上,选择高抗材料 (highly resistant parent, R) 和高感材料 (highly susceptible parent, S) 各 1 个,进一步组配成 F₁、F₂ 及回交等不同遗传类型材料,通过荧光定量 PCR 技术,检测在添食与不添食 BmNPV 两种不同条件下,各遗传类型材料幼虫中 BmSP-2、Bmlipase-1、BmS3A、BmSop2、BmNOX 的表达水平,验证不同抗性相关基因的相对表达量与其相应遗传类型材料抗性水平的关联性,并力求在这些基因中筛选到在正常饲育条件下其表达水平与对应遗传类型材料的抗性水平一致性仍然较高的基因,可作为新选育材料抗性检测的一种分子标记,以期在家蚕抗性品种选育中的抗 BmNPV 新材料筛选提供一条更加简捷、准确的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

本实验选择的高抗材料 ‘KNC’ (R) 和高感材料 ‘HYB’ (S) 均为湖南省蚕桑科学研究所在家蚕 (*Bombyx mori*) 抗性品种选育过程中经定向选择得到,并利用这 2 个材料进一步杂交组配成 F₁、F₂ 及回交组合作为本次实验材料^[17]。家蚕核型多角体病毒 (*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV) 由该所蚕品种研究室保存。

DNase I、dNTP、Taq 酶、SYBR Premix Ex TaqTM 为 TaKaRa (日本) 公司产品,一步法反转录试剂盒、总 RNA 抽提试剂盒为 OMEGA (美国) 公司产品。

1.2 实验材料的组配和抗 BmNPV 能力的检测

以高抗材料 R 和高感材料 S 为基础,组配杂交 F₁、F₂ 及回交组合^[5],获得 R、S、R×S、S×R、R×(S×R)、(R×S)×R、R×(R×S)、(S×R)×R、(R×S)×S、

$S \times (R \times S)$ 、 $(S \times R) \times S$ 、 $S \times (S \times R)$ 、 $(R \times S)F_2$ 、 $(S \times R)F_2$, 共 14 种不同遗传材料。

从 2 龄幼虫起蚕开始添食 BmNPV 多角体悬浮液, 添食浓度共分成 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 个/mL 6 个梯度浓度和 1 个空白对照组, 每组设置 3 个重复小区, 每个小区 30 头蚕, 添食的桑叶用打孔器打成标准大小的叶片, 用移液器定量吸取病毒悬浮液于叶片上, 涂抹均匀, 放置阴凉处自然晾干。每个区饲喂 3 片涂抹好的叶片, 待添食 10h 后各区桑叶完全食尽, 再改喂无毒桑叶。每天定时观察各区实验蚕的发育状况, 及时清除已染病蚕, 3 龄眠起后对各梯度浓度实验蚕的发病率持续调查 60h, 并用显微镜检测发病特征不明显的幼虫, 依据是否有多角体病毒来判断 BmNPV 感染个体, 统计各区发病率。利用 SPSS17.0 软件计算 BmNPV 对各实验材料的致死中浓度 (lethal concentration 50, LC_{50}) 值。

1.3 实验材料的取材和总 RNA 的提取

将经添毒处理的每个实验材料各梯度浓度的处理区 (包含对照区) 幼虫继续饲养至 5 龄的第 3 天, 以最高浓度的试验区幼虫为实验取材对象, 分别解剖 9 头幼虫, 数量不足时则补充以次高浓度的试验区幼虫为材料。高抗材料 R 取 7 个组织 (表皮, 脂肪体, 中肠, 马氏管, 丝腺, 生殖腺, 血液), 其他材料的处理组及对照组取中肠组织。各组织经干净滤纸吸干水分后装入离心管中, 每个组织各取材 3 份, 液氮速冻后放入 -80°C 冰箱保存备用。

将所有组织研磨成粉末后, 用 RNA 试剂盒提取总 RNA, 经超微量分光光度计测定所提总 RNA 的浓度和纯度, 再通过一步法反转录试剂盒进行反转录, 反应条件: 37°C 60min, 85°C 5s; 将 cDNA 样品稀释 50 倍后用于后续的定量 PCR 检测。

1.4 抗性相关基因的荧光定量 PCR 检测

引物序列见表 1; 根据已公布的 *Bmlipase-I*

(GenBank No.DQ286554)、*BmSP-2* (GenBank No.AB117641)、*BmS3A* (GenBank No.AY705974)、*BmSop2* (GenBank No.AY763110)、*BmNOX* (GenBank No.EF025315) 基因 CDS 序列, 用 Primer Premier 5.0 进行定量引物设计; 以家蚕转录启动因子 -4A (translation initiation factor 4A, TIF-4A; GenBank No.DQ443290) 作为内参基因。用荧光定量 PCR 方法检测各实验材料不同提取组织中各相关抗性基因的表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'~3')
Bmlipase-1-F	ACAAATGGCAATGTCAACTCTATC
Bmlipase-1-R	CCACGCCAGTCTACAACAATAA
BmSP-2-F	CCAGGATTGTGGGTGTTCT
BmSP-2-R	CAAAAGCGAGGCTGAAGTGA
BmNOX-F	CGACGAGCGACTAACCCAAA
BmNOX-F-R	GAGCTCATACGGACTCAACCTG
BmSop2-F	GCCACAGCTGCATTCCGTTAT
BmSop2-R	ACCTCTCCAAAGTGTCCAAGTCC
BmS3a-F	ATGGCGGTGCGGGAATAA
BmS3a-R	ACGTTGACAAGCGTGCTG
TIF-4A-F	TTCGTAAGTCTCTTCTCCT
TIF-4A-R	CAAAGTTGATAGCAATTCCCT

Bm: 家蚕; lipase-1: 脂肪酶 I; SP-2: 丝氨酸蛋白酶 II; NOX: 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化还原酶; Sop2: 抑制蛋白酶 II; S3A: 核糖体蛋白 S3A; TIF-4A: 转录启动因子 -4A; 下同。

在 LightCycler® 96System 上进行荧光定量 PCR 反应。PCR 反应体系为 20μL: 10μL $2 \times$ SYBR Green Realtime PCR Master Mix, 10μmol/L 上、下游引物各 0.8μL, 2μL cDNA 模板, 6.4μL ddH₂O。PCR 热循环程序: 95°C 预变性 30s, 然后 95°C 变性 5s, 60°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 扩增 45 个循环; 熔解曲线分析: 95°C 变性 10s, 65°C 退火 1min, 97°C 变性 1s; 37°C 退火 0s 终止反应。每个样品进行 3 次重复。用定量 PCR 仪配置软件处理定量数据。

2 结果与分析

2.1 实验材料对 BmNPV 的抗性比较及其遗传特点

实验材料的病毒添食结果如表 2 和图 1 所示。从表中的 LC_{50} 值可以看出两亲本的抗

性差异很大, 其 LC_{50} 值相差近 5 000 倍, F_1 代介于两亲之间, 表现杂种优势现象; F_2 中杂种优势减弱; F_1 回交高抗材料 R 后代抗性强, 回交高感材料 S 后代抗性减弱, 说明基因有累加效应, 提示着经过不断的迭代选择, 能提高家蚕品种的抗性。

表 2 高抗材料 (R) 和高感材料 (S) 组配的各杂交世代添食不同浓度 BmNPV 后的病死率

品种组合	不同浓度 BmNPV 的致死率 /%							LC_{50} / 个 $\cdot$ mL ⁻¹
	0 个 /mL	10 ⁴ 个 /mL	10 ⁵ 个 /mL	10 ⁶ 个 /mL	10 ⁷ 个 /mL	10 ⁸ 个 /mL	10 ⁹ 个 /mL	
S	0.00	18.33	36.67	66.67	78.33	100.00	100.00	2.731E+05
(R·S) × S	0.00	0.00	16.27	33.33	58.33	98.41	100.00	2.681E+06
S × (S·R)	0.00	0.00	10.00	28.33	66.36	98.25	100.00	2.849E+06
S × (R·S)	0.00	0.00	8.51	37.54	61.67	95.00	100.00	2.957E+06
(S·R) × S	0.00	0.00	3.33	26.67	68.33	91.75	100.00	4.025E+06
(R × S) F_2	0.00	0.00	0.00	25.53	55.00	78.33	98.33	8.875E+06
(S × R) F_2	0.00	0.00	0.00	16.67	56.67	73.33	90.00	1.491E+07
(S × R) F_1	0.00	0.00	0.00	18.33	43.33	61.67	88.33	2.645E+07
(R × S) F_1	0.00	0.00	0.00	13.33	36.67	51.67	83.33	5.454E+07
R × (S·R)	0.00	0.00	0.00	13.33	28.86	51.67	73.33	8.836E+07
(R·S) × R	0.00	0.00	0.00	8.33	33.33	49.12	71.92	9.922E+07
(S·R) × R	0.00	0.00	0.00	10.00	31.03	50.79	70.00	1.030E+08
R × (R·S)	0.00	0.00	0.00	6.67	20.00	50.96	71.67	1.289E+08
R	0.00	0.00	0.00	0.00	8.33	23.33	45.00	1.228E+09

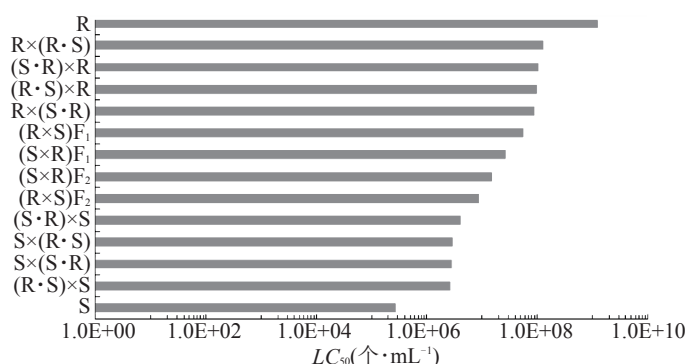


图 1 BmNPV 对高抗材料 (R) 和高感材料 (S) 组配的各杂交世代的致死中浓度 (LC_{50})

2.2 抗性相关基因在各实验材料 5 龄幼虫不同组织中的表达差异

利用高抗材料 R 的 7 个组织进行荧光定

量 PCR 检测分析, 其检测结果如图 2 所示。*Bmlipase-1* 和 *BmSP-2* 只在中肠中特异表达, 其他 3 个基因则在所有检测组织中均有表达,

各组织间虽有差异, 没有特异性。*BmS3A* 在丝腺中表达量最高, 是其他组织的 2 倍多;*BmSop2* 在血液中表达量最高, 丝腺和中肠次

之, 脂肪体和表皮中的表达量最低;*BmNOX* 在丝腺中最高, 血液和生殖腺次之, 中肠和表皮略低。

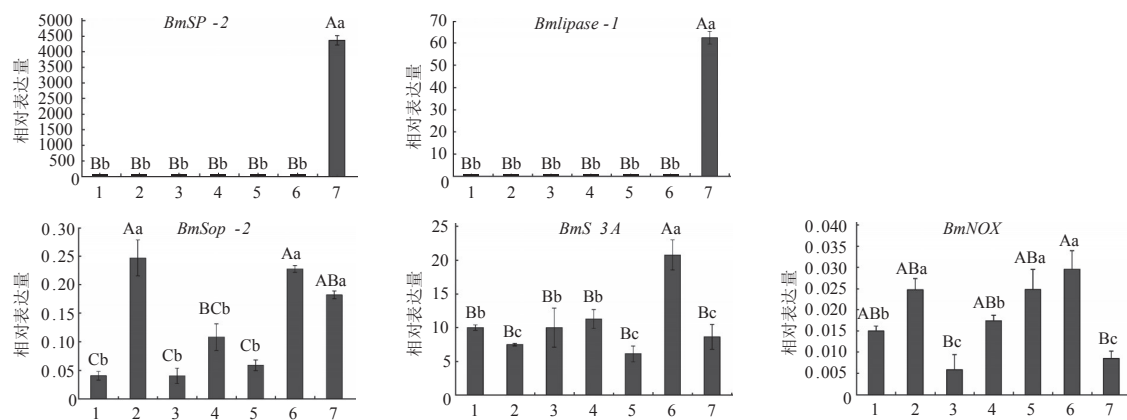


图 2 抗性相关基因在 5 龄第 3 天幼虫各组织的相对表达量

1: 脂肪体; 2: 血液; 3: 表皮; 4: 马氏管; 5: 生殖腺; 6: 丝腺; 7: 中肠; 不同小写字母表示不同组织差异显著 ($P < 0.05$), 不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$); 内参基因: 转录启动因子-4A 基因 (*TIF-4A*), $n=3$; 下同。

2.3 抗性相关基因在各实验材料 5 龄幼虫中肠组织的表达检测

取各实验材料的处理组和对照组的中肠组织进行荧光定量 PCR 实验, 其实验数据分析结果如图 3 所示。处理组的 4 个基因 *Bmlipase-1*、*BmSP-2*、*BmNOX* 和 *BmSop2* 的中肠相对表达量要高于对照组, 说明经病毒诱导后表达量均会有不同程度的上调; 相同基因在抗性越高的相同遗传类型材料 (相同遗传类型指抗性基因频率值一致) 中的相对表达量也会越高, 高抗材料 R 和高感材料 S 间表达差异最为明显 ($P < 0.01$), 说明以上 4 个基因在中肠里的相对表达量与其遗传类型材料的抗性存在显著的一致性; *BmS3A* 基因不仅在添毒组与对照组之间没有显现出相应的诱导表达关联性, 而且各类型遗传材料相对表达量与各自的抗性也没表现出相应的一致性。

2.4 抗性相关基因相对表达量与抗 BmNPV 水平一致性的比较

Bmlipase-1、*BmSP-2*、*BmNOX* 和 *BmSop2*

这 4 个基因的相对表达量虽然与 BmNPV 抗性水平均存在一定的正相关性, 但其相关性也存在一定差异性。为了更好地比较 4 个基因的相对表达量随不同遗传类型材料的 BmNPV 抗性不同的变化趋势, 找出一致性相对较高的抗性基因, 将 14 种遗传材料根据含有抗性基因理论频率值相同的原则分成以下 5 组不同遗传类型, 即: ‘R×R×S’ 组包含 4 个遗传材料, 分别是 R×(S×R)、(R×S)×R、R×(R×S)、(S×R)×R; ‘R×S’ 组包含 4 个遗传材料, 分别是 R×S、S×R、(R×S)F₂、(S×R)F₂; ‘S×S×R’ 组包含 4 个遗传材料, 分别是 (R×S)×S、S×(R×S)、(S×R)×S、S×(S×R); 亲本 R 与 S 分别代表不同组别的遗传材料。取各组数据的平均值以及把相对表达量简化 (去掉科学计数位) 到同一水平上作图。现有的遗传研究表明家蚕的 BmNPV 抗性对感性呈不完全显性, 且抗 BmNPV 主效基因的作用具有基因的剂量效应^[17], 所以杂交和回交组合的变化斜率要较之两头平缓, 实验结果与理论预期相符。

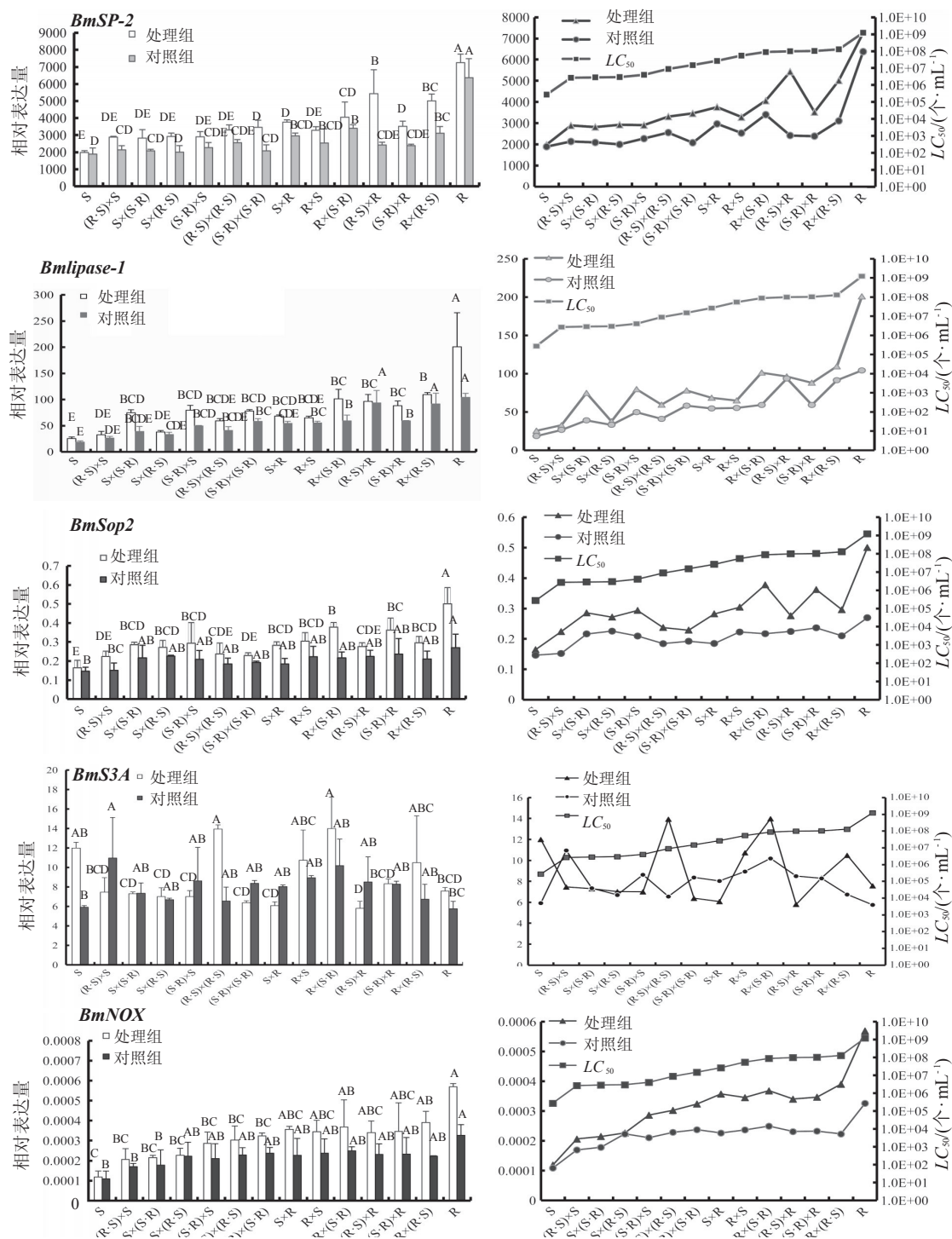


图 3 qRT-PCR 检测各实验材料 5 龄第 3 天幼虫中肠组织各基因的相对表达量及各实验材料相应的 LC_{50}

不同大写字母表示不同遗传材料之间差异极显著 ($P < 0.01$)

其中各组材料间 *Bmlipase-1* 的相对表达量差异最显著, 抗性材料的相对表达量比感性材料的最高差异达 8 倍, 其余基因仅有 3~4 倍的差距 (表 3), 而且无论在添毒还是不添毒

的条件下, *Bmlipase-1* 在不同组遗传类型材料中相对表达量的变化斜率与不同组遗传类型材料所对应的 LC_{50} 值的变化斜率最为接近, 其一致性最高 (图 4)。

表 3 5 组材料的 LC_{50} 和各抗性相关基因在对应材料组中的相对表达量

品种组合	处理组					对照组				
	LC_{50} /(个 $\cdot$ mL $^{-1}$)	<i>BmNOX</i>	<i>BmSop2</i>	<i>Bmlipase-1</i>	<i>BmSP-2</i>	LC_{50} /(个 $\cdot$ mL $^{-1}$)	<i>BmNOX</i>	<i>BmSop2</i>	<i>Bmlipase-1</i>	<i>BmSP-2</i>
S	2.731E+05	1.19	1.64	2.54	1.98	2.731E+05	1.09	1.46	1.85	1.89
S $\times$ S $\times$ R	3.13E+06	2.33	2.69	5.62	2.89	3.13E+06	1.95	2.01	3.71	2.12
R $\times$ S	2.619E+07	3.32	2.63	6.74	3.46	2.619E+07	2.32	1.96	5.21	2.53
R $\times$ R $\times$ S	1.05E+08	3.61	3.28	9.88	4.51	1.05E+08	2.34	2.22	7.58	2.83
R	1.228E+09	5.69	5.00	20.10	7.26	1.228E+09	3.26	2.70	10.40	6.38

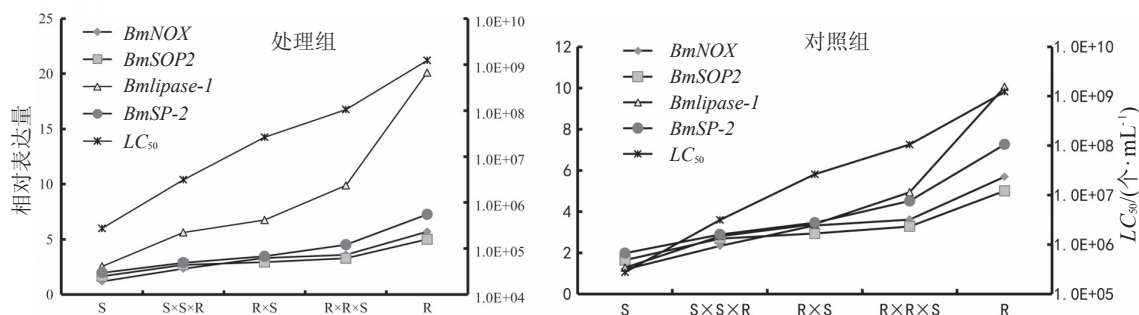


图 4 抗性基因的相对表达量与 5 组材料的 LC_{50} 一致性比较

3 讨论

本研究以高抗材料 R 和高敏材料 S 及其组配杂交的 F_1 、 F_2 与回交组合为实验材料, 进行 BmNPV 病毒梯度添食, 统计结果和陈克平等^[5]的研究结论基本一致。再对所有不同遗传类型材料的 5 龄第 3 天幼虫进行 5 个抗 BmNPV 相关基因 (*Bmlipase-1*, *BmSP-2*, *BmS3A*, *BmNOX* 和 *BmSop2*) 的荧光定量 PCR 检测, 分析各基因在添毒与不添毒条件下的相对表达量与抗 BmNPV 能力的相关性。结果表明, 无论在诱导还是未诱导条件下, *Bmlipase-1*、*BmSP-2*、*BmNOX* 和 *BmSop2* 相对表达量与各实验材料本身抗 BmNPV 能力存在较为显著的一致性, 即在抗性越强的实

验材料中, 这 4 个基因的相对表达量 (包括诱导表达量) 也会越高。然而, 另一个基因 *BmS3A* 相对表达量的变化既不与不同遗传类型材料自身抗性水平存在一致性, 也不与各实验材料诱导与否存在关联性, 这与徐家萍等^[11]的结果有明显差异。

有关 *Bmlipase-1* 的研究已积累了一定的前期基础^[17], 发现该抗性主效基因的作用具有基因的剂量效应, 但由于只是涉及 2 个亲本及其正反交 F_1 等 4 种遗传材料, 不能确定其与其他各种不同遗传材料之间的相关性, 因此, 本实验继续对其开展研究。由于 BmNPV 抗性主效基因至今还是未知, 而包括 *Bmlipase-1* 在内的其他基因本身具有抵抗 BmNPV 感染的活性, 因此选取一些活性表达与 BmNPV 抗性有直接相关性的抗性基因或

活性蛋白,可作为抗病育种辅助选择的一种分子标记。

为了开展家蚕抗 BmNPV 品种选育现代技术研究,利用抗性材料、敏感材料和近等位基因系,刘晓勇等^[18]通过随机扩增多态性 DNA 标记(random amplified polymorphic DNA, RAPD)技术获得 3 个分子标记,姚勤等^[19]将其进一步转换成了特异序列扩增区域(sequence characterized amplified region, SCAR)标记。冯凡^[20]利用上述实验材料,通过染色体步移获得紧密连锁的 R736 标记,对其进行 PCR 扩增得到了 1 条 700bp 左右的条带,并在一些材料中得到验证。钱荷英等^[21]利用华康系列材料进行简化基因组测序,结果在第 27 群上发现了 50 个与抗 BmNPV 相关的 SNP 分子标记,但这些 SNP 仅作为鉴定和判别华康系列品种的分子标记。这些分子标记多为重复序列,与之有抗性相关的基因信息还不明确,在目前家蚕基因组中没有标记序列的相关信息。因此,连锁性强、可靠性高的理想分子标记还需进一步的深入研究,还有大量探索需继续开展。

4 结论

本研究利用高抗材料 R 和高敏材料 S 构建了在遗传育种中各种不同的遗传类型材料,分别测定各自的 LC_{50} ,用荧光定量 PCR 的方法检测了 5 个已报道的与抗 BmNPV 相关基因(*Bmlipase-1*, *BmSP-2*, *BmS3A*, *BmNOX*, *BmSop2*)的相对表达量。4 个基因(*Bmlipase-1*, *BmSP-2*, *BmNOX*, *BmSop2*)的表达水平和蚕体对 BmNPV 的抗性水平存在显著一致性,另一个基因 *BmS3A* 相对表达量的变化既不与不同遗传类型材料自身抗性水平存在一致性,也不与各实验材料诱导与否存在关联性。抗性相关基因 *Bmlipase-1* 在各组遗传类型材料间的相对表达量差异最显著,与不同组遗传类型材料自身抗性水平的一致性也最高,可

在家蚕抗性育种过程中利用荧光定量 PCR 检测分析,在诱导或不诱导情况下均可检测出相应蛾区的抗性基因是否导入或纯合,并由此筛选到目的蛾区进行选择继代。

参考文献

- [1] 李建琴,顾国达.养蚕意愿、蚕业风险与应对措施——基于 14 个省 91 个县 1782 个农户的问卷调查[J].蚕业科学,2013,39(2):355-364.
- [2] WATANABE H. Resistance of the silkworm, *Bombyx mori*, to viral infection[J]. Agriculture Ecosystems & Environment, 1986, 15: 131-139.
- [3] ARATAKE. Differences in NPV resistance of different silkworm varieties[J]. Japanese Journal of sericulture, 1973, 42(3): 230-238.
- [4] 陈克平,林昌麒,吴冬秀,等.家蚕保存种对核型多角体病的抗性[J].蚕业科学,1991,17(1):45-46.
- [5] 陈克平,林昌麒,姚勤.家蚕对核型多角体病的抗性及其遗传规律的研究[J].蚕业科学,1996,22(3):160-164.
- [6] 钱荷英,徐安英,林昌麟,等.家蚕对核型多角体病毒抵抗性及遗传规律的研究[J].河北农业大学学报.2006,29(4):77-91.
- [7] FUNAKOSHI M, AIZAWA K. Antiviral substance in the silkworm gut juice against a nuclear polyhedrosis-virus of the silkworm, *Bombyx mori*[J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1989, 53(1): 135-136.
- [8] PONNUVEL K M, NAKAZAWA H, FURUKAWA S, et al. A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus[J]. Journal of Virology, 2003, 77(19): 10 725-10 729.
- [9] NAKAZAWA H, TSUNEISHI E, PONNUVEL K M, et al. Antiviral activity of a serine protease from the digestive juice of *Bombyx mori* larvae against nucleopolyhedrovirus[J]. Virology, 2004, 321(1): 54-62.
- [10] XU J P, CHEN K P, YAO Q, et al. Identification and characterization of an NPV infection-related gene *Bmsop2* in *Bombyx mori* L.[J]. Journal of applied entomology, 2005, 129(8): 425-431.
- [11] 徐家萍,陈克平,姚勤,等.利用荧光差异显示技术分离的家蚕抗 NPV 相关基因 *s3a*[J].昆虫学报,2005,48(3):347-352.

(下转第 36 页)

湖南长株潭地区果桑大棚栽培技术

张 仟¹ 任 毅² 艾均文¹ 王江玲² 何行健¹ 肖建中¹

(1 湖南省蚕桑科学研究所, 长沙 410127; 2 湖南省任龙农业科技有限公司, 长沙望城 410218)

长株潭城市群是“两型社会”建设综合配套改革试验区, 它不仅是湖南省经济发展的核心增长极, 而且也是湖南集观光、休闲、旅游于一体的城市农业、休闲农业发展最为迅猛区域之一。近10年来, 桑果因其营养丰富、口感鲜美和康养保健等特点倍受人们的青睐, 成为果品中的新贵, 同时4—5月也刚好处于湖南鲜果上市的空窗期, 促进了以休闲体验为特色的桑果采摘园在该区域的蓬勃发展。但桑树易受到霜冻、菌核病危害, 桑果成熟时间晚, 采摘时间短, 采摘期时常多雨^[1], 这助推了目前果桑大棚栽植形式的快速推广。为此, 我们与位于长沙市望城区格塘镇格塘村的湖南省任龙农业科技有限公司在前期合作开展露地栽培的基础上, 从2014年起又继续合作开展了大棚栽培技术试验。结果显示桑果成熟时间比露地栽培提早了12d以上, 实现了试验品种在“五一”前一周就可盛熟上市的目标, 并利用休闲体验与蚕桑文旅之间的深度融合, 大棚栽植取得了良好的经济效益与社会效益。现将几年来有关果桑大棚栽植试验的具体做法与技术措施总结如下。

1 果桑的栽植

1.1 果桑园选址

湖南省任龙农业科技有限公司所在地格塘村与国家AAAA级景区千龙湖生态旅游度假区仅相距1.5~2.5km, 区位优势, 交通便利, 周围环境无污染。对休闲采摘园的建址选择了距千龙湖大道约350m的熊家湾西南侧成

片地块, 土壤pH值6.5, 耕作层厚度在30cm左右。地下水位3~4m左右, 周围有溪沟流水环绕, 便于灌溉排涝, 是一个十分理想的规模化种植与打造桑果田园综合体的地方。

1.2 品种选择

为了突出桑果园的特色, 选择了引进“台湾长果桑”, 该品种又名超级果桑、秀美果桑。果形细长, 果长10.0~16.0cm, 果径0.5~0.9cm, 单果重8.0~10.0g, 最大果重可达20.0g, 成熟果紫黑偏红, 外观漂亮, 口感好, 糖度高, 含糖量18.0%~20.0%, 甘甜无酸, 每667m²产1500kg以上^[2], 春果成熟期为5月上中旬。果实不耐贮运, 易受早春寒流冻害, 北方寒冷地区不适宜栽培。因桑果特别细长, 也易受自然风、雨水等天气因素影响而导致经常性严重落果, 今后还将继续完善其它品种。

1.3 栽植方法

桑基鱼塘系统是具有2500多年历史的人工生态循环农业景观, 体现了中国农耕文化的智慧^[3], 2017年11月成功入选全球重要农业文化遗产。在果桑园土地规划整理过程中, 开展了桑基鱼塘微型生态循环系统的人工构建, 桑基栽果桑, 树下养禽, 桑果采摘, 桑叶养蚕, 蚕沙养鱼, 塘泥肥桑。其基塘面积比约为3:1, 即2001m²(3亩)桑基配置667m²(1亩)鱼塘。基面宽17m, 塘宽4m, 基坡向沟面倾斜, 坡面约12°, 基面内侧边沿距塘水面高度约45cm, 塘水深约为2.5~3m, 并列式渠形挖塘, 塘与塘通过2~3m宽的水渠相连, 并建好进出水总渠及2~3m宽的主

支干道路。栽桑前除草、翻耕、平整,挖宽0.4m、深0.5m的栽植沟,每667m²施入人畜粪、腐熟厩肥等有机肥1500kg以上,再覆盖10cm厚的细土。为了方便采摘体验,宜采取偏稀密度,综合多地经验^[4-5],按每667m²栽111株建园,行距4m,株距1.5m。定植时拉线定点,株行整齐,株距相等,深浅一致,根颈埋入土中不超过6cm,壅土稍高于地面。栽植当天淋定根水,以后保持土壤湿润。

1.4 树型养成

第1年定植后,在距地面约2cm处剪低苗干,使发壮芽,培养1枝作为主干;待主干长至80~90cm时,在距离地面60~70cm处平剪,进行定干;当主干上萌发新芽长至10~15cm时,疏芽选留3~4个分布合理的壮芽,培养成一级支干。第2年春季采果后,距离地面90~100cm对一级支干夏伐定干,待枝条长成10~15cm时,疏芽选留2~3个分布合理的壮芽,培养成二级支干。至7月上中旬,在距离地面115~125cm对二级支干定干,当二级支干萌发新芽长至10~15cm时,疏掉下垂、重复的枝条,留下分布合理的壮芽培养为翌年的坐果枝。每株约留坐果枝20~25根,每667m²留坐果枝2500根以上。以后每年在二级支干剪伐处夏伐成拳。

2 大棚的构建

2.1 建棚时间

2014年栽植果桑,按667m²栽111株,二级支干养型,2016年即进入成林期,产量可达900kg/(667m²)左右,此时开始建棚。

2.2 棚型选择

果桑大棚设施类型及其建造的质量会直接影响温度控制、湿度调节和采光的效果。为此,选择新建了保温保湿、调控简单的连栋圆拱型温室大棚,其主体钢结构构件采用热镀锌材料,由厂家配套供应,专人组装。

大棚长27m、宽16m,棚内面积432m²。其主体跨度为9m,横梁间距为4m,拱顶高5.3m,天沟高3.5m,拱间距1m,外遮阳高度5.8m。大棚的自然通风系统由门、侧窗与卷膜系统组成,在大棚四面通过卷膜系统开窗,下部卷膜开窗高度为1.8m,采用手动卷膜器,大棚的开放处加装大棚专用防虫网。大棚安装有多个下水槽可将雨水排到大棚边的排水沟,也安装了雾滴喷灌系统。大棚每一跨顶部安装4条喷灌PEΦ20支管,每条支管安装喷头11套,折射式喷头间距1.5m,折射式喷头把水喷射到空中并散成水雾。雾化既可增加水分,又可提高空气湿度,起到调节小气候的作用。其外遮阳系统由具有特定遮阳率幕布、控制箱、驱动电机、传动轴、联轴器、推杆、驱动杆及外遮阳网等组成。由于阻挡了大量光线的进入,有效减少了温室内部热量的积聚,从而拥有比内遮阳系统更好的降温保温效果。此型大棚的风载、雪载与最低作物荷载性能指标分别达0.5KN/m²、0.35KN/m²、0.2KN/m²,具有棚体坚固,使用年限长,棚内空间大,操作方便,通风透光好,外型齐整美观等优点,但一次性投入较大。

3 果桑的管理

3.1 适时覆膜

桑树解除自然休眠要经过一个自然低温过程。在晚秋、初冬夜间的低温期,要最大可能性升高卷膜,打开所有侧窗,尽量使大棚内果桑感受自然温湿度,以尽早解除桑树的休眠。湖南中东部一般从1月中下旬至2月初开始密闭升温为宜,此时白天外温为5~8℃,而棚内日温可达15~18℃。从1月初开始,如出现连续偏高温的暖冬天气,桑芽鳞片松开而渐露青,则应提前覆膜^[5]。

3.2 棚内温湿度控制

建大棚的主要目的是通过人造高温环境使桑果成熟期提早,因此大棚内温湿度调

节与控制是影响大棚栽培试验能否成功的关键。大棚在覆膜前要浇1次透地水,以保证桑树正常的水分需求与大棚内的湿度要求。在大棚果桑生长发育过程中,对大棚温湿度的要求是不断变化的。果桑萌芽前,大棚内相对湿度一般应保持在80%~85%以上;开花期要主动降低棚内的相对湿度,一般掌握控制在55%~60%;谢花后至果实膨大期则要适当提高棚内的相对湿度,一般掌控在80%~85%,注意桑果膨大期的灌水,桑果着色期保持在75%~80%。与此同时,大棚温度也应随果桑生长逐步升温。开始升温时,白天棚内温度一般维持在15~18℃,最高不超过25℃,夜间温度应在6~10℃;整个花期白天温度应控制在20~25℃,但夜间温度应在10~15℃,并防止夜间温度过低导致冻害;开始显露果穗时,大棚内适宜温度为白天25℃左右,最高不超过32℃,夜间15~18℃,加大昼夜温差,提高果实含糖量^[6-7]。当外温高于10℃时每日白天应打开南北卷膜短时间通风排湿;当棚内温度达27~30℃时,加强通风降温;当棚内温度达32℃以上时,应升起四面卷膜强制通风降温。

3.3 落果预防

预防落果,提高果桑坐果率,应做到:首先,要适时覆膜,如覆膜升温偏早,果桑萌芽会不整齐,萌芽期延长,坐果率低。其次,防止棚内温度过高,特别是要通过花期的温度管理分别达到白天与夜间的目标温度,以确保提早开花的同时,又能保证花器发育质量,提高果桑坐果率^[6]。第三,防止因枝叶徒长而引起大量落果,待春季抽出的新梢长至有6~7片开叶时就摘芯,如中后期营养生长依旧过旺,还可适当剪去部分新梢,按自下而上果桑最后一个坐果点的上部嫩叶予以全部摘除。第四,在N、P、K配合施肥的同时,加强根外追肥。在桑果膨大期每667m²施钾肥20kg,同时用0.5%磷酸二氢钾根外追肥2~3次,最好在傍晚喷施。

3.4 菌核病防控

菌核病是由子囊菌侵染而引起的一种真菌性毁灭性病害。大棚栽植虽然为果桑生长发育构建了一个相对独立的空间,可以减少周围病虫害的危害,药防也不受雨水影响,但大棚内高温多湿环境会更易诱发菌核病,对其防控应充分重视,坚持农业防控与化学防控相结合。首先,大棚覆膜前先进行清园深耕,再覆上地膜,既保温又防病,去年更换成地布后,则更能抑制杂草生长^[8]。其次,于覆膜后桑芽露青前,用含量为200mg/L的二氧化氯对大棚内桑树、土壤及大棚周围进行彻底消毒,土壤保持浸润状态。于初花期,用70%甲基硫菌灵(甲托)可湿性粉剂1000倍液,或40%菌核净可湿性粉剂1000倍液,或50%多菌灵可湿性粉剂800倍液,或50%腐霉利可湿性粉剂1200倍液,或10%苯醚甲环唑700倍液等药剂交替防治。其后在盛花期、谢花期还分别喷洒1次,连续3次药杀时间隔约一周^[9]。在采摘前一月停止使用有残留药剂,保证食用安全。

参考文献

- [1] 邓真华,杜贤明,彭晓虹,等.大10果桑冻害情况调查与分析[J].中国蚕业,2016,37(1):23-26.
- [2] 四川省蚕业管理总站.果桑品种台湾长果桑介绍[J].四川蚕业,2017,(3):59.
- [3] 廖森泰.桑基鱼塘话今昔[M].中国农业出版社,2016:1-3.
- [4] 黄世荣,张鹏博,陈乐阳.永康市果桑产业技术提升的实践与思考[J].中国蚕业,2019,40(3):31-35.
- [5] 叶武光,杜贤明,曾菊根,等.“大十”果桑在江西省大棚栽培与效益初探[J].中国蚕业,2012,33(4):22-25.
- [6] 孙孝龙,童朝亮.江苏沿海地区果桑高效设施栽培技术探讨[J].中国蚕业,2013,34(3):67-70.
- [7] 田红莲,郭海军,梁玉俊.河北衡水大棚果桑高产栽培技术[J].设施栽培,2018,(2):13-15.
- [8] 邓真华,杜贤明,彭晓虹,等.果桑地布覆盖栽培试验效果研究[J].中国蚕业,2017,38(4):6-10.
- [9] 胡剑戎,黄世荣,陈乐阳,等.桑椹菌核病发病特点及其防治对策[J].蚕桑通报,2018,49(1):40-41.

家蚕过氧化氢酶研究进展

吴 凡¹ 李德臣¹ 肖胜武² 陈登松³

(1 湖北省农业科学院经济作物研究所, 武汉 430064; 2 湖北省农业科学院果树茶叶研究所, 武汉 430064; 3 湖北省罗田县三宝蚕种有限公司, 湖北罗田 438600)

摘 要: 过氧化氢酶在家蚕 (*Bombyx mori*) 的生长发育中发挥重要作用, 参与家蚕免疫系统的调节, 与家蚕的抗逆性、抗病性、滞育等重要的生命活动相关。综述了近几年国内外对家蚕过氧化氢酶的研究状况, 并简要分析了过氧化氢酶研究的发展趋势。

关键词: 家蚕 (*Bombyx mori*); 过氧化氢酶; 生物学功能; 研究进展

生物体内有多种抗氧化酶, 这些酶可提高生物的抵抗力, 帮助生物应对外界的不良环境条件^[1]。过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 又被称为触酶, 是一种重要的抗氧化酶之一, 在生物体内起防御保护作用, 广泛存在于各种生物体内。过氧化氢酶在生物体内的作用是清除生命活动中产生的多余自由基。主要催化过氧化氢分解为水和分子氧, 避免过氧化氢的积累对生物体造成伤害^[2]。家蚕 (*Bombyx mori*) 作为重要的经济昆虫和研究鳞翅目昆虫的模式生物, 在长期的进化过程中也不例外地形成了保护酶系, 以抵御外界不良环境条件的影响。家蚕体内有许多与家蚕免疫能力和抗逆性相关的酶类, 其中超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶组成了重要保护酶系。目前, 过氧化氢酶被认为是家蚕最重要的保护酶之一, 参与到家蚕的

各种生命活动中, 特别是在帮助家蚕应对各种生物和非生物的胁迫中起重要的作用。

在家蚕体内的各种保护酶中, CAT 是已知的催化能力最强的关键酶, 可以清除家蚕体内代谢产生的活性氧 H_2O_2 。 H_2O_2 能氧化破坏蛋白质、核酸和脂类等分子, 积累时可导致细胞损伤, 甚至凋亡, 严重影响家蚕的生长与发育, 而 CAT 能把有毒的 H_2O_2 催化降解成水和分子氧, 从而维持蚕体正常的生理活动, 因此, CAT 在家蚕的生长发育中起至关重要的作用。对国内外学者近几年在家蚕过氧化氢酶上的研究进展进行了综述, 为利用过氧化氢酶进行家蚕品种的选育及农林害虫的生物防治提供参考。

1 过氧化氢酶分类

过氧化氢酶是在 1811 年被发现的, 在 1901 年被 Loew 命名, 催化过氧化氢产生氧气, 广泛存在于植物、动物和微生物体内, 具有活性中心, 其活性可被氰化物抑制。过氧化氢酶有 3 种, 根据序列、结构和功能的不同, 可分为单功能 CAT、双功能 CAT 和假 CAT; 根据其物理和化学特性的不同, 分为 3 种类

资助项目: 湖北省农业科技创新中心资助项目(2016-620-000-001-013)。

第一作者: 吴凡(1980—), 女, 山东汶上人, 副研究员, 主要从事家蚕品种选育研究。
E-mail: wufan996 @ 163.com

通讯作者: 陈登松(1968—), 男, 研究员, 主要从事家蚕品种选育研究。
E-mail: hbcds816 @ 126.com

型：过氧化氢酶-过氧化物酶、典型的过氧化氢酶及非典型的过氧化氢酶。该酶的活性中心含有卟啉结构，根据卟啉结构含有的金属离子的不同，又可以分为铁卟啉酶和锰过氧化氢酶。

2 家蚕过氧化氢酶的生物学功能研究

2.1 家蚕过氧化氢酶的性质研究

对家蚕过氧化氢酶的研究开始的比较早，1963年孙本忠等^[3]研究发现家蚕CAT的活性与品种、化性有关，品种、化性不同，该酶的活力相差很大，随着化性的增加，该酶的活力增加，即一化性品种<二化性品种<多化性品种。CAT的活性还与家蚕的性别有关，在同一发育时期，雄蚕的CAT活性大于雌蚕的。秦凤等^[4]的研究也证实CAT的活性在家蚕品种间存在差异。吴载德等^[5]发现同一家蚕品种，催青温度不同，引起家蚕化性变化时，家蚕幼虫血液CAT的活性不同。Yamamoto等^[6]克隆并分析了家蚕*Cat*基因和活性，发现CAT mRNA分布非常广泛，但CAT mRNA水平的表达与CAT活性变化趋势不完全一致，并且发现家蚕的*Cat*基因与黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）和白腹果蝇（*Apis mellifera*）的同源性分别为71%和66%。Yuan等^[7]的研究结果也表明，家蚕CAT的活性与其在mRNA表达水平是有差异的，不具有严格的相关性。还有学者研究证明，还原型磷酸吡啶核苷酸（NADPH）是家蚕过氧化氢酶维持活性所必需的。时桂芹^[8]研究发现，家蚕CAT亚家族基因具有物种特异性，*BmCat4*基因是真正的家蚕*Cat*基因，其编码的蛋白质很有可能是一类分泌型蛋白质。Shi等^[9]研究也证实，*BmCat4*缺失信号肽和跨膜结构域，可能是一个假定分泌蛋白质。

家蚕所处的生长发育阶段不同，CAT的活性也是不同的。阮氏茉莉等^[10]比较了原种新九、黄白限及其杂交后代F₁蚕卵蛋白质的

CAT活性，发现杂交后代的CAT活力在两个亲本之间或低于亲本，杂种优势不明显，同时还发现黄白限品种中，雄蛹血淋巴中CAT的活力比雌蛹中要高。吴小锋等^[11]发现随着家蚕的生长发育，其血液中的CAT活性呈规律性变化，幼虫期，以龄初、龄末较高，化蛹后，酶活先升高后降低，直至化蛾。家蚕血液中CAT活性的高低可以作为评价家蚕抗逆性的一项生理指标。陈萍等^[12]的研究结果表明，家蚕血液CAT活性与5龄历期、同宫率不具有相关性，而与全龄期、死笼率、普茧率具有负相关性，与全茧量、茧层量、茧层率、万蚕产茧量、万蚕茧层量、虫蛹率、幼虫生命率呈正相关。

2.2 过氧化氢酶在家蚕抗逆性中的作用

家蚕的过氧化氢酶在家蚕抗逆性中起至关重要的作用，可帮助家蚕提高对外界环境的抵抗力，应对突发状况，提高家蚕的强健性，而家蚕的强健性直接关系到养蚕业的生产效益。陈志伟等^[13]研究表明，家蚕氟中毒后，其体内的CAT活性显著增强，且CAT的活性大小与氟的浓度呈正相关。米智等^[14]的研究也证实，家蚕CAT活性与家蚕对氟的耐受性相关。唐文超等^[15]对家蚕5龄幼虫添食不同浓度NaF溶液浸泡的桑叶，发现家蚕幼虫生殖腺中CAT的活性与对照相比明显升高，且家蚕生殖腺中*Cat*基因在mRNA转录水平的表达也升高，但超过其耐性阈值时，CAT的活性会逐渐下降。Micheal等^[16]研究了低温、低氧、病毒感染对家蚕抗氧化酶的诱导作用，发现在低温、缺氧和病毒感染24h后，家蚕中肠和血液中过氧化氢酶、超氧化物歧化酶的活性明显升高。

CAT也参与家蚕对农药的耐受过程。Gu等^[17]在家蚕有机磷中毒后对中肠基因表达的变化进行了qRT-PCR分析，结果表明CAT在转录水平的表达下降了3.51倍。张蒙蒙等^[18]从家蚕3龄起蚕开始，持续添食啉虫脒药液，发现当啉虫脒药液的质量浓度达到一定程度

时,5龄第六天的家蚕幼虫中肠内CAT的活性受到显著抑制。Gao等^[19]在5龄家蚕添食乙酰半胱氨酸后,让家蚕接触吡虫啉,发现添加乙酰半胱氨酸能显著提高吡虫啉中毒家蚕的体重、存活率、全茧量、茧层量和茧层率,增强家蚕中肠内超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物谷胱甘肽等抗氧化酶的活性。

2.3 过氧化氢酶在家蚕抗病性中的作用

研究表明,过氧化氢酶参与到家蚕抗病性反应中,提高了家蚕对细菌、病毒等的抵抗力。Zhang等^[20]研究表明,家蚕被铜绿假单胞菌感染后,其中肠上皮细胞中CAT的活性被上调表达。王树昌等^[21]研究发现,家蚕幼虫在感染白僵菌后,家蚕血淋巴、脂肪体、中肠和马氏管中CAT活性显著降低,*BmCat*基因在脂肪体、中肠和马氏管中的表达水平显著下降,而在血淋巴中的表达水平变化不大,添食CAT抗氧化剂能显著延长家蚕的存活时间。Fang等^[22-23]研究了添食4-甲基伞形酮对家蚕的影响,发现在添食后,家蚕体内过氧化氢酶的活性显著升高,家蚕对细菌的抵抗力增强。

目前,由家蚕核型多角体病毒(*Bombyx mori nucleopolyhedrovirus*, BmNPV)引起的家蚕病毒病,严重影响蚕业生产效益。选育对BmNPV有抗性的家蚕品种是防治该病最有效的措施,CAT参与了家蚕对BmNPV的应激反应。Vessaro-Silva等^[24]对5龄家蚕添食BmNPV悬浊液后,对其中肠的抗氧化系统进行分析,发现中肠中CAT活性发生了变化,表明CAT参与了阻止病毒感染过程。Hu等^[25]研究了BmNPV感染引起家蚕消化液蛋白的变化,发现家蚕感染BmNPV 6h后,过氧化氢酶基因的表达没有显著的变化。Li等^[26]分析了家蚕在添食二氧化钛纳米颗粒后对BmNPV的抗性变化,发现添食后,家蚕体内过氧化氢酶基因的表达升高,家蚕对BmNPV的抵抗力增强。Li等^[27]在家蚕的人工饲料中添加CeCl₃,喂食5龄家蚕后,家蚕

对BmNPV的抵抗力增强,体内CAT活性升高。在家蚕品种选育中,能否利用CAT来提高家蚕对细菌、病毒的抵抗力,还有待于进一步研究。

2.4 过氧化氢酶在家蚕滞育中的作用

家蚕以卵滞育,关于滞育的机理、机制还未完全阐明。有研究表明,在家蚕的滞育过程中也有CAT的参与。韩武梅等^[28]研究发现,与15℃暗催青处理相比,在25℃明催青可以显著提高蚕卵滞育诱导和决定时期的CAT mRNA的表达水平和CAT活性。Zhao等^[29]研究发现,在家蚕卵进入滞育时,CAT活性急剧升高。但是当家蚕卵进入滞育期后,CAT的活性比较低且变化不大^[30-32]。有学者发现,滞育卵经过即时浸酸处理后,卵内的CAT活性升高^[33],当对滞育卵进行低温冷藏(5℃)处理,解除滞育,CAT在转录水平的表达和活性均显著增加^[34]。Sima等^[35]在家蚕产卵后20h进行蚕种浸酸处理,阻止蚕卵进入滞育状态,同时用5℃低温处理滞育蚕卵,终止蚕卵的滞育过程,比较这两种处理蚕卵和滞育卵之间CAT的表达变化,发现CAT表达的变化与家蚕卵滞育的起始和终止有关。Zhao等^[36]对同一个家蚕品种的滞育卵和非滞育卵在5℃冷藏30d以上,测定滞育卵与非滞育卵之间CAT活性的变化,发现滞育卵的CAT活性明显低于非滞育卵。

2.5 家蚕过氧化氢酶其他的生物学功能

CAT作为防御性保护酶,可以帮助家蚕应对各种环境变化,如重金属胁迫、抗辐射等。袁红霞等^[37]的研究发现,在家蚕受到辐射胁迫时,家蚕体内CAT的活性先升高后下降,且雌性家蚕脂肪体中CAT的活性变化与*cat*基因在mRNA水平上的表达具有正相关性。Chen等^[38]研究表明家蚕脂肪体、中肠和血液中的CAT活性可以被玫瑰(红景天)提取液所诱导。Suman等^[39]发现家蚕体内的CAT还参与对辐射的耐受过程中。Ogawa等^[40]研究发现,CAT与家蚕马氏管的发育有关,

在马氏管朱砂酸的形成过程中发挥重要作用。

3 家蚕过氧化氢酶的研究展望

过氧化氢酶在家蚕的生长发育中起重要作用,家蚕一生要经历卵、幼虫、蛹和蛾四个变态发育阶段,在变态发育过程中,家蚕体内的氧化还原反应处于不断的发展变化过程中,CAT作为家蚕体内广泛存在的抗氧化酶,参与到家蚕的各个发育过程中。CAT与家蚕的抗性相关,在家蚕体内起重要的防御和保护作用,研究CAT在其中所起的具体的作用机制,可以为家蚕抗性品种的选育提供参考和指导作用。

增强家蚕的抗逆性,对于蚕桑产业的发展具有重要意义,目前对于家蚕CAT的作用已经有了很多的研究报道,专家学者们对家蚕的CAT研究主要集中在免疫系统中,即该酶对环境、病毒、细菌等抗性的作用方面,而对其他方面的作用机制研究较少,还有许多问题未阐明。比如家蚕体内的转录调控因子是怎样与CAT酶相互作用,CAT在家蚕体内完整的催化机制,是否可以在家蚕体内过表达*Cat*基因提高家蚕对环境的抗性,来培育优质抗性的家蚕新品种等,这些都有待于进一步探讨和研究。随着分子生物学技术的发展,必将对家蚕CAT作用的分子机制有更深层次的了解,使CAT更好地应用于蚕桑产业,为鳞翅目害虫的防治和家蚕抗性品种的选育提供更好的思路。

参考文献

- [1] MAITY S,ROY S,CHAUDHURY S,et al.Antioxidant responses of the earthworm *Lampito mauritii* exposed to Pb and Zn contaminated soil[J].Environmental pollution,2008,151(1):1-7.
- [2] ZHANG Q M,ZHU L S,WANG J,et al.Oxidative stress and lipid peroxidation in the earthworm *Eisenia fetida* induced by low doses of fomesafen[J].Environmental science and pollution Research,2013,20(1):201-208.
- [3] 孙本忠,宋翠娥.家蚕体液内过氧化氢酶(Catalase)活性与几个性状的关系研究[J].蚕业科学,1963,1(1):12-14.
- [4] 秦凤,石凉,张彦,等.高温胁迫下家蚕基础品种抗性选择[J].安徽农业科学,2016,44(36):79-80,106.
- [5] 吴载德,王金德.不同化性家蚕(*Bombyx mori*)幼虫血液过氧化氢酶活性的研究[J].浙江农业科学,1963,6(4):169-173.
- [6] YAMAMOTO K,BANNO Y,FUJII H,et al.Catalase from the silkworm,*Bombyx mori*:Gene sequence,distribution,and overexpression[J].Insect biochemistry and molecular biology,2005,35(4):277-283.
- [7] YUAN H,QIN F,GUO W,et al.Oxidative stress and spermatogenesis suppression in the testis of cadmium-treated *Bombyx mori* larvae[J].Environmental science and pollution research,2016,23(6):5763-5770.
- [8] 时桂芹.家蚕抗氧化基因注释及功能研究[D].重庆:重庆大学,2013.
- [9] SHI G Q,YU Q Y,ZHANG Z. Annotation and evolution of the antioxidant genes in the silkworm,*Bombyx mori*[J].Archives of insect biochemistry and physiology,2012,79(2):87-103.
- [10] 阮氏茉莉,林健荣.家蚕品种间及杂交后代超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活力的探索研究[J].中国蚕业,2012,33(4):31-34.
- [11] 吴小锋,徐俊良,崔为正.家蚕血液过氧化氢酶活力及其与蚕体抗逆性的关系[J].昆虫学报,1998,41(2):124-129.
- [12] 陈萍,朱勇,鲁成.家蚕血液过氧化氢酶遗传性及其与经济性状相关性研究[J].西南大学学报(自然科学版),1999,21(3):262-265.
- [13] 陈志伟,贾秀英,林敏抒.氟中毒家蚕过氧化氢酶活性的变化[J].生态与农村环境学报,2002,18(1):31-34.
- [14] 米智,阮成龙,李姣蓉,等.氟化钠对家蚕血液丙二醛物质的量浓度和过氧化氢酶活性的影响[J].西南大学学报(自然科学版),2013,35(4):39-45.
- [15] 唐文超,肖媛媛,杨成飞,等.氟化物导致的家蚕生殖损伤及氧化应激反应[J].昆虫学报,2016,59(12):1308-1316.
- [16] MICHEAL A S,SUBRAMANYAM M V.V.Antioxidant enzymes as defense mechanism against oxidative stress in midgut tissue and hemocytes of *Bombyx mori* larvae subjected to various stressors[J].Archives of insect biochemistry and physiology,2013,84(4):222-234.
- [17] GU Z Y,ZHOU Y J,XIE Y,et al.The adverse effects of phoxim exposure in the midgut of silkworm,*Bombyx*

- mori*[J].Chemosphere,2014,96:33-38.
- [18] 张蒙蒙,孙永亮,赵艳燕,等. 啉虫脒对家蚕生长发育及中肠抗氧化酶活性的影响[J]. 蚕业科学,2018,44(1):94-99.
- [19] GAO H J,SUN Y L,SONG G Z,et al.Preventive effects of N-acetyl-L-cysteine against imidacloprid intoxication on *Bombyx mori* larvae[J].Archives of insect biochemistry and physiology,2018,99(2): e21497.
- [20] ZHANG L,WANG Y,LU Z Q.Midgut immune responses induced by bacterial infection in the silkworm,*Bombyx mori*[J].Journal of Zhejiang University-science B,2015,16(10):875-882.
- [21] 王树昌,赫荣帆,陆敏泉,等. 球孢白僵菌感染对家蚕抗氧化水平的影响[J]. 热带作物学报,2017,38(11):145-153.
- [22] FANG Y,WANG H,ZHU W,et al.Antioxidative properties of 4-methylumbelliferone are related to antibacterial activity in the silkworm (*Bombyx mori*) digestive tract[J].Journal of comparative physiology B,2014,184(6):699-708.
- [23] FANG Y,WANG H,ZHU W,et al.Antioxidative capacity in the fat body of *Bombyx mori* is increased following oral administration of 4-methylumbelliferone [J].Comparative biochemistry and physiology part C:toxicology & pharmacology,2014,159:31-37.
- [24] VESSARO-SILVA S A,NETO M,HUBNER M,et al.Antioxidant systems as a response to midgut cellular of *Bombyx mori* Lineu, 1758 (Lepidoptera:Bombycidae)infection for baculoviruses [J].Journal of economic entomology,2019,112(3): 1089-1097.
- [25] HU X,ZHU M,WANG S,et al.Proteomics analysis of digestive juice from silkworm during *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection[J].Proteomics, 2015,15(15):2691-2700.
- [26] LI B,XIE Y,CHENG Z,et al.BmNPV resistance of silkworm larvae resulting from the ingestion of TiO₂ nanoparticles[J].Biological trace element research,2012,150(1-3):221-228.
- [27] LI B, XIE Y,CHENG Z,et al.Effects of added CeCl₃ on resistance of fifth-instar larvae of silkworm to *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus infection[J].Biological trace element research,2012,146(3):318-324.
- [28] 韩武梅,时连根,赵林川. 不同催青方式对二化性家蚕过基因表达的影响[J]. 昆虫学报,2009,52(6): 604-609.
- [29] ZHAO L C,SHI L G.Metabolism of hydrogen peroxid in univoltine and polyvoltine strains of silkworm(*Bombyx mori*)[J].Comparative biochemistry and physiology part b:biochemistry and molecular biology,2009,152(4):339-345.
- [30] 江志勇,陈伟炼,曾淑欢. 过氧化氢对盐酸解除家蚕滞育的促进作用研究[J]. 广东蚕业,2005,39(3): 38-40.
- [31] SGOLASTRA F,BOSCH J,MOLOWNY-HORAS R,et al.Effect of temperature regime on diapause intensity in an adult-wintering hymenopteran with obligate diapause[J].Journal of insect physiology,2010,56(2):185-194.
- [32] 沈爱英,赵林川,刘慧婷. 外源 H₂O₂ 活化家蚕滞育性卵的研究[J]. 蚕业科学,2003,29(3):311-313.
- [33] 范兰芬,钟杨生,林健荣. 家蚕滞育卵与非滞育卵中几种关键酶活性的比较[J]. 昆虫学报,2011,54(11):1258-1263.
- [34] 侯宜胜,王丽,姚金美,等. 冷藏期家蚕滞育卵和即时浸酸卵的 H₂O₂ 含量及过氧化氢酶基因表达的变化[J]. 蚕业科学,2010,36(4):697-701.
- [35] SIMA Y H,YAO J M,HOU Y S,et al.Variations of hydrogen peroxide and catalase expression in *Bombyx* eggs during diapause initiation and termination[J].Archives of insect biochemistry and physiology,2011,77(2):72-80.
- [36] ZHAO L C,SHI L G.Metabolism of hydrogen peroxide between diapause and non-diapause eggs of the silkworm,*Bombyx mori* during chilling at 5℃ [J]. Archives of insect biochemistry and physiology,2010, 74(2):127-134.
- [37] 袁红霞,褚峰,秦粉菊,等. 镉胁迫对家蚕脂肪体脂质过氧化物含量及抗氧化酶活性和 mRNA 表达的影响[J]. 昆虫学报,2014,57(2):168-175.
- [38] CHEN C,SONG J,CHEN M,et al.Rhodiola rosea extends lifespan and improves stress tolerance in silkworm,*Bombyx mori*[J].Biogerontology, 2016,17(2):373-381.
- [39] SUMAN S,SETH R K,CHANDNA S.Mitochondrial antioxidant defence in radio-resistant Lepidopteran insect cells[J].Bioinformation,2009,4(1):19-23.
- [40] OGAWA H,NAGAMURA Y,ISHIQURO I.Cinnabaric acid formation in Malpighian tubules of the silkworm,*Bombyx mori*.participation of catalase in cinnabaric acid formation in the presence of manganese ion [J].Hoppe-seyler's zeitschrift für physiologische chemie,1983,364(8):1059-1066.

桑叶蛋白营养价值与开发利用

李霞¹ 刘耕¹ 肖建中¹ 叶添梅¹ 颜新培¹ 李飞鸣¹ 罗安乐²

(1 湖南省蚕桑科学研究所, 长沙 410127; 2 湖南桑叶加农业科技有限公司, 宁乡 410604)

摘要: 桑叶蛋白作为桑叶深加工产物, 其营养价值高、氨基酸丰富, 现已被业界所熟知。本文针对桑叶蛋白营养价值、制备方法及开发利用前景作一综述, 为桑叶多元化利用提供参考。
关键词: 桑叶蛋白; 营养价值; 制备方法; 利用前景

近年来, 我国桑产业面临诸多困境和挑战, 种桑养蚕模式过于单一、栽采人工成本较高、桑资源利用效率低、科技水平落后, 严重制约了我国桑产业的可持续发展。因此, 利用现代科学技术大力开发桑资源, 深入研究桑叶功能成分及其提取工艺, 实现桑叶多元化利用, 对于我国蚕桑产业转变发展方式具有重要的意义。桑叶蛋白属植物叶蛋白的一种, 从桑叶中提取桑叶蛋白, 不仅可拓宽桑资源开发利用途径, 而且对丰富我国蛋白质资源起重要补充作用。本文对桑叶蛋白营养价值、制备方法以及开发利用前景作一综述, 以期桑叶多元化(蛋白)开发利用提供参考。

1 桑叶蛋白营养价值

1.1 桑叶中蛋白质含量

植物叶蛋白是世界上最大的可再生蛋白质资源之一, 其营养均衡且不含胆固醇, 具

有不可估量的经济价值^[1]。植物叶中蛋白质的含量直接影响植物叶蛋白提取率^[2]。桑叶营养丰富且叶中蛋白质含量较高。王雯熙等^[3]采集 29 种桑叶并测定其营养成分发现, 桑叶中粗蛋白含量在 222.1~323.8g/kg (干物质, DM)。紫花苜蓿、多年生黑麦草、羊草与桑叶中蛋白质含量(干物质)对比结果显示(见表 1), 桑叶中粗蛋白略高于紫花苜蓿, 明显高于多年生黑麦草和羊草。

表 1 紫花苜蓿、多年生黑麦草、羊草与桑叶中蛋白质含量对比(干物质)

单位: g/kg DM				
项目	紫花苜蓿 ^[4]	多年生黑麦草 ^[5]	羊草 ^[6]	桑叶
蛋白质含量	123.0~261.0	192.0	71.4	222.1~323.8

1.2 桑叶蛋白氨基酸组成

现代营养学表示, 蛋白质营养在很大程度上是氨基酸营养, 为保证合理蛋白质营养, 一方面要有足够数量的必需氨基酸和非必需氨基酸, 另一方面还须注意各种必需氨基酸之间以及必需氨基酸与非必需氨基酸之间的比例。王芳等^[7]研究表明, 桑叶蛋白富含 17 种氨基酸, 其中谷氨酸和天冬氨酸比例最高,

资助项目: 湖南省科技计划项目(No.2016NK2168, No.2018NK2083); 现代农业产业技术体系专项(No.CARS-18)。

第一作者: 李霞(1989—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事蚕桑资源利用研究。

分别占其总氨基酸的 13.7% 和 12.3%，必需氨基酸占总氨基酸的 34.7%，桑叶蛋白的氨基酸比例系数为 69.71，属品质较高的蛋白质原料。谷氨酸属风味氨基酸，其与肌苷酸（IMP）有协同提鲜味作用，同时可改善肌肉生长代谢。天冬氨酸普遍参与机体各种代谢，它可作为 K^+ 、 Mg^{2+} 的载体向心肌输送电解质，从而改善心肌收缩功能，同时降低氧消耗，在冠状动脉循环障碍缺氧时，对心肌有保护作用；

它还参与鸟氨酸循环，促进氧和二氧化碳生成尿素，降低血液中氮和二氧化碳含量，增强肝脏功能，消除疲劳。表 2 所列为桑叶蛋白、黑麦草叶蛋白、苜蓿叶蛋白、玉米蛋白氨基酸组成及 WHO 推荐蛋白氨基酸最佳模式。如表 2 所示，在粗蛋白水平一致情况下，桑叶蛋白赖氨酸、蛋氨酸水平优于玉米蛋白和黑麦草叶蛋白，但较苜蓿草粉和 WHO 推荐蛋白氨基酸最佳模式有一定差距。

表 2 苜蓿、黑麦草、玉米与桑叶蛋白必需氨基酸组成与 WHO 推荐蛋白氨基酸最佳模式对比

单位：%

项 目	苜蓿叶蛋白 ^[8]	黑麦草叶蛋白 ^[9]	玉米蛋白	桑叶蛋白	WHO 比例
赖氨酸	3.6	2.1	2.00	2.5	5.5
苯丙氨酸	4.6	3.7	3.20	2.2	6.0
蛋氨酸	1.5	0.9	0.8	1.0	3.5
苏氨酸	3.8	2.1	4.1	1.7	5.0
异亮氨酸	3.4	2.1	4.2	1.0	4.0
亮氨酸	6.6	4.2	14.6	2.7	7.0
缬氨酸	4.6	2.9	5.7	1.3	1.0

1.3 桑叶蛋白生物活性物质

桑叶含多种生物活性物质，是我国历史悠久的传统中药。据《本草纲目》等古代医书记载，桑叶具有润肺热、止咳等疗效，于 1993 年被卫生部认定为药食同源品种。其含有的桑叶黄酮和桑叶多酚具有很强的还原性，可消除动物体内代谢产生的自由基^[10-11]。日本科学家最早从桑叶中分离出 1-脱氧野尻霉素（1-deoxynojimycin, DNJ）这种生物碱，有较强的降血糖功能^[12]。桑叶蛋白是桑叶进一步浓缩的产物，相对于桑叶其生物活性物质更为丰富。杨晶等^[13]发现，采用盐酸沉淀法和真空冷冻干燥制备出的桑叶蛋白中桑叶黄酮、桑叶多糖和 1-脱氧野尻霉素的含量分别达到 61.27mg/g、22.32mg/g 和 147μg/g，显著高于桑叶粉中桑叶多糖（36.42mg/g）、桑叶多酚（18.06mg/g）和 1-脱氧野尻霉素（42.34μg/g）。

2 桑叶蛋白制备工艺

2.1 桑叶蛋白制备基本流程

提取桑叶蛋白基本工艺为先将桑叶打碎磨浆，通过浸提剂浸提将桑叶蛋白从桑叶中分离，后过滤脱色脱味，最终经沉淀分离干燥后获得高纯度桑叶蛋白。在整个工艺环节中第一步的浸提和最后一步的沉淀分离对桑叶蛋白品质和提取率影响最大。

2.2 浸提影响因素

浸提环节是利用相似相溶原理将桑叶蛋白通过浸提剂从桑叶中分离。选取不同浸提剂对桑叶蛋白提取率有一定影响。通常情况下，浸提剂多为蒸馏水、稀盐缓冲液和弱碱性溶液。王桃云等^[14]采用以蒸馏水为浸提剂提取桑叶蛋白，桑叶蛋白获取率为 5.17%，并

发现当浸提剂 pH 为 8 时, 桑叶蛋白溶出率最高。杨晶等^[15]研究发现, 相较蒸馏水、5g/L NaCl 溶液, 而用 5g/L NaOH 溶液浸提桑叶所获得的桑叶蛋白溶出率显著提高, 达到 3.51%。杨田等^[16]研究发现, 在浸提液中加入 5mmol/L EDTA-2Na 可极大程度降低在浸提环节中桑叶蛋白的降解。因稀盐缓冲液对蛋白质结构的保护作用且溶解度大, 理论上是最理想的蛋白质提取液, 但在实际生产上, 考虑成本和环保因素, 多采用水作为浸提剂提取桑叶蛋白。

2.3 不同沉淀分离方式对桑叶蛋白的影响

沉淀分离是整个桑叶蛋白制备最重要的环节, 直接影响桑叶蛋白提取率。目前分离沉淀的主要方式有: 加热法、沉淀法和发酵分离法。以上不同方式方法, 直接影响桑叶蛋白品质和提取率。

2.3.1 加热法 加热法是通过直接对浸提液加热, 使浸提液中桑叶蛋白迅速变性絮凝, 与此同时蛋白分解酶失活, 可极大地保留桑叶蛋白。加热法是一种最简单、成本最低的生产方法。因直接加热所带来的蛋白质结构的改变以及部分功能性成分的失活, 会影响桑叶蛋白品质。通常情况下, 加热温度为 70℃。

2.3.2 沉淀法 沉淀法包括酸沉淀法和盐沉淀法。酸沉淀法是在浸提液中加入 pH 为 2~5 的酸性提取剂使浸提液中桑叶蛋白分离沉淀。此法操作简单, 但在实际生产中产生大量酸性废液, 污染环境。盐沉淀法主要是利用蛋白质的溶解度在等电点时通常是最低的原理, 通过无机盐调节提取剂的等电点, 最终产生盐析现象获得桑叶蛋白。此法较酸沉淀法更加安全环保, 但由于蛋白质结构复杂, 往往多种蛋白结合而使其等电点各不相同, 因此此法的提取率不及酸沉淀法。张敏娟等^[17]研究不同蛋白沉淀方法对桑叶粉营养价值的影响, 发现采用酸沉淀法 (1mol/L HCl) 制备出的桑叶蛋白, 其氨基酸种类和含量优于盐

沉淀法 (硫酸铵饱和溶液), 且酸沉淀法提取率 (14.42%) 高于盐沉淀法 (13.78%)。

2.3.3 发酵分离法 发酵分离法是利用微生物发酵产生的乳酸使叶蛋白絮凝沉淀, 乳酸作为叶蛋白的沉淀剂, 其蛋白聚沉可分成叶蛋白絮凝和絮凝物沉降两个阶段。乳酸的 H^+ 使叶蛋白在等电点絮凝, 酸性液体具有较强的缓冲容量和较高的电导率, 能增加其絮凝效果; 酸液含有的微生物和生物活性大分子均有促进叶蛋白絮凝的作用, 制备的酸液越新鲜, 菌体越多, 大分子活性越高, 絮凝效果越好^[18]。常用的微生物种类为乳酸菌、枯草芽孢杆菌等菌种。该方法环保高效, 但工艺难以控制且制备时间长成本较高。微生物发酵时, 需要消耗一部分营养物质因而发酵时间过长会造成营养物质的过度流失。屈红森等^[19]研究发现, 利用枯草芽孢杆菌发酵桑叶粉提取桑叶蛋白最佳模型为: 桑叶粉质量浓度 2.64mg/mL、装液量 105mL、蔗糖质量浓度 22mg/mL、发酵时间 45h。在此模式下, 桑叶蛋白获得率的预测值为 16.43%。

3 桑叶蛋白利用前景

当前, 人们越来越重视抗生素作为饲料添加剂而引发的畜禽产品药物残留、病毒耐药性增强及环境污染等诸多问题。近期, 我国农业农村部开展兽用抗菌药减量化行动, 其目的在于减少畜禽饲养过程中抗生素的使用。“替抗”产品迎来了难得的发展机遇。桑叶富含多种生物活性物质, 作为替抗产品, 在提高动物抗应激、抗疾病能力, 改善动物生产性能方面有明显效果, 具有增强机体免疫功能, 以及无 (低) 残留、不易产生耐药性等诸多优点。桑叶蛋白是桑叶进一步浓缩的产物, 相对于桑叶其生物活性物质更为丰富, 此外桑叶蛋白氨基酸种类丰富, 尤以谷氨酸和天冬氨酸含量最多。理论上, 谷氨酸和天冬氨酸属风味氨基酸, 对改善畜禽肉质

品质有一定作用。现阶段, 由于桑叶蛋白生产规模小、生产工艺提取率较低, 桑叶蛋白饲料化利用鲜有报道。综上所述, 桑叶蛋白是一种极具开发价值的植物蛋白资源, 随着生产工艺的不断改进、桑叶蛋白提取率的不断提升, 桑叶蛋白将会得到广泛应用, 并为桑叶高效综合利用探索出一条可行道路。

参考文献

- [1] 王震, 乔天磊, 霍乃蕊, 等. 植物蛋白提取及应用前景 [J]. 山西农业科学, 2015, 43(12): 1727-1731.
- [2] 邱业先, 黄长干, 蒋伦伟, 等. 植物叶蛋白提取效率研究 [J]. 中国饲料, 1995, (14): 19.
- [3] 王雯熙, 杨红建, 薄玉琨, 等. 不同品种桑叶营养成分分析与代谢能值评定研究 [J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(03): 41-45.
- [4] 李润林, 王占彬, 杜玉杰, 等. 紫花苜蓿的营养特性及在猪生产中的应用研究进展 [J]. 饲料博览, 2018, (05): 19-25.
- [5] 陈艳, 王之盛, 张晓明, 等. 常用粗饲料营养成分和饲用价值分析 [J]. 草业学报, 2015, 24(05): 117-125.
- [6] 姬奇武, 韩汝旦, 董宽虎, 等. 不同生长期白羊草的营养成分及绵羊瘤胃降解特性 [J]. 草地学报, 2015, 23(06): 1295-1302.
- [7] 王芳, 乔璐, 张庆庆, 等. 桑叶蛋白氨基酸组成分析及营养价值评价 [J]. 食品科学, 2015, 36(01): 225-228.
- [8] 刘青广, 田丽萍, 姜红, 等. 苜蓿叶蛋白中氨基酸的含量及营养分析 [J]. 河南工业大学学报 (自然科学版), 2005, (02): 36-39.
- [9] 宋葆华, 李法曾, 贺新强, 等. 30 种植物叶蛋白中氨基酸组成及含量的测定与营养价值评价 [J]. 植物资源与环境学报, 2000, (01): 59-60.
- [10] 王芳, 乔璐, 谈小艳, 等. 桑叶黄酮的提取及抗氧化研究 [J]. 广东农业科学, 2011, 38(15): 76-79.
- [11] 何新苗, 孟磊, 李欣, 等. 药桑叶多糖的体外抗氧化活性研究 [J]. 新疆医科大学学报, 2018, 41(06): 747-750.
- [12] 许永东. 桑叶中 1- 脱氧野尻霉素应用分析 [J]. 湖北农业科学, 2018, 57(22): 8-10.
- [13] 杨晶. 桑叶蛋白粉制备工艺研究及营养价值评价 [D]. 陕西: 西北农林科技大学, 2015.
- [14] 王桃云, 王金虎. 桑叶叶蛋白提取工艺的研究 [J]. 食品研究与开发, 2006, (02): 79-81.
- [15] 杨晶, 张敏娟, 薛忠民, 等. 桑树叶蛋白提取及蛋白粉制备工艺 [J]. 蚕业科学, 2015, 41(03): 518-524.
- [16] 杨田, 张天宝, 冀华, 等. 桑叶蛋白的提取及 EDTA-2Na 对其浸提过程的影响 [J]. 中国农学通报, 2014, 30(10): 57-61.
- [17] 张敏娟, 杨晶, 苏维磊, 等. 不同的蛋白沉淀和干燥工艺对桑叶蛋白粉营养价值的影响分析 [J]. 北方蚕业, 2016, 37(01): 7-10.
- [18] 刘鹏, 黄虎, 罗翠兰, 等. 乳酸发酵酸聚沉叶蛋白的反应过程与机理 [J]. 湖南农业大学学报, 1999, (02): 41-46.
- [19] 屈红森, 游朵, 吴琼英, 等. 用发酵法制备桑叶蛋白的工艺优化和产品的体外消化率测定 [J]. 蚕业科学, 2012, 38(05): 885-892.
- [30] 温琼英. 黑茶渥堆的微生物学研究 [J]. 湖南农学院学报 (自然科学版), 1985, 1(3): 67-74.
- [31] 文杰宇, 李宗军, 王远亮, 等. 黑茶中微生物及其相关保健功能研究进展 [J]. 食品科学, 2010, 31(9): 329-332.
- [32] 杨抚林, 邓放明, 赵玲艳, 等. 黑茶微生物学研究进展 [J]. 微生物学杂志, 2006, 26(1): 81-84.
- [33] 温志杰, 张凌云, 吴平, 等. 黑茶加工中微生物作用的研究 [J]. 茶叶通讯, 2010, 37(2): 26-29.
- [34] 吴文亮, 林勇, 刘仲华, 等. 六堡茶急性和亚急性毒性安全性评价研究 [J]. 茶叶科学, 2017, 37(2): 173-181.
- [35] 刘勤晋, 陈文品, 白文祥, 等. 普洱茶急性毒性安全性评价研究报告 [J]. 茶叶科学, 2003, 23(2): 141-145.
- [36] 肖文军, 付冬和, 任国谱, 等. 茯茶毒理学试验报告 [J]. 茶叶科学, 2007, 27(4): 307-310.
- [37] 陈娜, 侯艳, 徐昆龙, 等. 云南普洱茶急性毒性研究 [J]. 云南农业大学学报 (自然科学版), 2008, 23(2): 233-237, 244.

(上接第 11 页)

13597;13600.

《蚕丝科技》2019 年度总目录索引

产 业 发 展

阳城县蚕桑产业发展路径探讨

..... 刘学兵 (1-2)

研 究 报 告

发酵桑饲料对改良型宁乡花猪生长性能、屠宰性能及肉品质的影响

..... 李飞鸣等 (1-5)

镉铅复合胁迫对桑苗生长与桑叶重金属含量的影响..... 黄仁志等 (1-12)

湖南省主栽桑品种桑叶生物碱含量的测定分析

..... 张 俊等 (1-19)

家蚕春用四元杂交天然绿色茧品种湘彩绿 1 号的选育..... 艾均文等 (2-2)

用不同蛹虫草菌株和家蚕品种幼虫覆土栽培蚕蛹虫草的试验..... 张 俊等 (2-8)

家蚕杂交新组合实验室饲养鉴定试验

..... 吴 凡等 (2-14)

桑椹糖酸积累及相关酶活代谢特征研究

..... 李 勇等 (2-17)

用不同分析方法评价家蚕品种锦·绣 × 潇·湘的丰产性和稳产性及丝质性状

..... 艾均文等 (3-2)

夏季高温条件下桑树大树移栽试验

..... 莫荣利等 (3-9)

家蚕黄、绿黄色限性种质材料创新及其杂交组合主要性状评价..... 王先燕等 (3-15)

MnMTP1 在 2 个桑树品种间差异表达的分析

..... 蒋诗梦等 (3-19)

桑枝秀珍菇优良菌株的筛选试验

..... 邹湘月等 (3-25)

发酵桑叶对新晃黄牛生长性能、血液生化指标、屠宰性能和肉品质的影响

..... 肖建中等 (4-2)

食用鲜家蚕蛹冷藏模式的研究

..... 李丽蓉等 (4-8)

斑纹全限性家蚕新品种锦·绣 × 潇·湘的夏秋季试繁..... 薛 宏等 (4-14)

家蚕新品种华·康 × 湘·泰对家蚕核型多角体病毒的抗性鉴定..... 唐 芸等 (4-18)

综 述

蚕沙的多元化利用研究进展

..... 蒋勇兵等 (4-21)

生 产 技 术

夏秋用斑纹全限性家蚕品种锦·绣 × 潇·湘

..... 艾均文等 (1-26)

家蚕春秋兼用限性品种南·岳 × 星·辰

..... 唐 芸等 (2-27)

行 业 探 索

手摇缫丝车的设计与应用

..... 陈 璐等 (1-30)

4QZ-2200S 型饲料桑收获机械研发初报

..... 徐清波等 (3-29)

蚕桑文化

古典蚕桑诗词审美价值探微

..... 雷国新 (2-30)

古典蚕桑诗词的情感文化... 雷国新 (3-32)

湘绣的文化蕴涵..... 雷国新 (4-29)

信 息

湖南省“222”蚕桑高效种养模式与技术研讨
培训班在长沙举办..... 何小玲 (1-封二)

蚕桑知识问答 (十五) ... 王桃武等 (1-33)

湖南省“222”蚕桑高效种养模式与技术研讨
培训班在长沙举办..... 何小玲 (1-34)

《蚕丝科技》2018 年度总目录索引

..... (1-35)

征稿启事..... (1-37)

湖南省首届蚕桑科技文化产业大会开幕 蚕
桑湘军“222”模式探索创新发展

..... 何小玲 (2-35)

2019 年度湖南省棉麻丝专家指导组工作部署
会在长沙召开..... 何小玲 (3-36)

种桑养蚕有望成为长江经济带生态修复重要
模式..... 任富丽 (3-37)

蚕桑知识问答 (十六) 王 明 (4-33)

栽桑养蚕 前景看好 张尚武 (4-34)

袁延文厅长调研省蚕科所、棉科所试验示范
基地建设及蚕桑产业..... 何小玲 (4-35)

“蚕博士”再次亮相乡村产业博览会 “222”
模式助推乡村产业兴旺... 何小玲 (4-35)

全国蚕种生产技术经验交流会在长沙召开

..... 何小玲 (4-36)

(上接第 22 页)

[12] SELOT R,KUMAR V,SHUKLA S,et al.Identification
of a soluble NADPH oxidoreductase (*BmNOX*) with
antiviral activities in the gut juice of *Bombyx mori*[J].
Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2007,
71(1):200-205.

[13] SELOT R,KUMAR V,SEKHAR S C,et al.Molecular
characterization and expression analysis of *BmNOX*
in two strains of *Bombyx mori* with contrasting
viral resistance phenotype[J].Archives of Insect
Biochemistry and Physiology,2010,73(3):163-175.

[14] 陈杰.增量表达抗病毒蛋白 *Bmlipase-I* 的家
蚕转基因系统的建立 [D].重庆:西南大学,
2009:55-59.

[15] 张婷婷,夏定国,赵巧玲,等.家蚕脂肪酶基因
Bmlipase-I 在不同 *BmNPV* 抗性水平家蚕品种间
的表达差异 [J].蚕业科学,2012,38(4):665-672.

[16] CHENG Y,WANG X Y,DU C,et al.Expression
analysis of several antiviral related genes to *BmNPV*

in different resistant strains of silkworm,*Bombyx
mori*[J].Journal of Insect Science.2014,14(76):1-9.

[17] 刘勇,艾均文,薛宏,等.家蚕脂肪酶 *Bmlipase-I*
基因在抗血液型脓病不同遗传类型材料中的
表达分析及其在育种中的应用 [J].中国农学通
报,2016,32(23):32-36.

[18] 刘晓勇,姚琴,陈克平.利用 RAPD 技术筛选家
蚕抗核型多角体病分子标记 [J].江苏大学学报 (自
然科学版),2004,25(1):17-20.

[19] 姚勤,刘晓勇,陈克平,等.家蚕抗核型多角
体病毒病分子标记辅助育种 [J].分子植物育
种,2005,3(4):537-542.

[20] 冯凡.家蚕 *NPV* 抗性遗传分析及其双抗病毒病
分子标记辅助育种 [D].镇江:江苏大学,2012:30-
33.

[21] 钱荷英,李刚,李龙,等.基于家蚕抗血液型脓病
新品种的 SNP 分子标记开发 [J].河北农业大学学
报,2018,41(1):76-82.