

# 一株蝗虫病原菌的鉴定及其毒力和病理研究

金 虹<sup>1</sup> 葛绍荣<sup>1</sup> 陶 勇<sup>1</sup> 冉红艳<sup>1</sup> 刘世贵<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>四川大学生命科学学院 成都 610064)

(<sup>2</sup>四川大学创新生物技术研究所 成都 610064)

**摘 要:**从蝗虫自然病死虫尸中分离到一株病原菌 HR-3,其纯培养物的致病性被科赫原理证明。为确定该菌在分类学上的地位,经生理生化测定和分子鉴定,此病原菌为粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)。通过口服感染测定了该菌对蝗虫的毒力,毒力回归方程为  $y = 1.067 + 0.809x$ ,致死中浓度  $LC_{50} = 1.164 \times 10^8$  cfu/mL。为探讨 HR-3 对蝗虫致病的作用机理,对 HR-3 感染蝗虫后的组织病理进行了研究,结果表明感染初期蝗虫的中肠上皮细胞受到破坏,继而出现局部变性坏死。感染 48h 后,消化细胞层大部分区域被空泡状物充盈。

**关键词:**粘质沙雷氏菌 鉴定 毒力 病理 蝗虫

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)02-0172-05

蝗虫属于昆虫纲直翅目蝗科。它们是农作物和其他植物的害虫,蝗虫的踪迹遍布全世界,是农业生产的一大害<sup>[1]</sup>。近年来,我国蝗区范围扩大,发生面积增加,暴发频率提高,对农业生产构成了严重威胁。“九五”期间,全国飞蝗[*Locusta migratoria manilensis*(Mey)]发生面积累计达 1.2 亿亩次,特别是 2000 年飞蝗发生涉及 12 个省市区的 160 个县,发生总面积超过 3000 万亩次。据专家分析,蝗虫发生呈现不断加重趋势<sup>[2]</sup>。蝗虫的防治已成为一项非常紧迫的任务。

随着化学杀虫剂大量而长期的使用所暴露出的许多缺点,作为一种防治农林害虫的新技术手段,微生物农药在世界范围内受到广泛重视。在害虫的生物防治中利用昆虫的病原微生物便是很重要的一部分。蝗虫微孢子虫是我国研究生物防治方法控制蝗害的第一个成功例子,但是由于其历时长,不能短时间控制大规模发生的蝗灾。利用昆虫病原真菌包括白僵菌、绿僵菌和黄绿僵菌等开发的真菌灭蝗制剂经过田间实验也显示出良好的发展势头。除此之外,还有些昆虫病原细菌[类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等]制成的杀蝗剂也有一定的防治效果。本文从一自然病死的周身发红的蝗虫虫尸中分离得到一种病原菌,经回复感染蝗虫,能引起蝗虫致病并死亡,并且从虫尸中分离到同样的病原菌,证明该病原菌为蝗虫自身的致病菌,对该病原菌进行了菌种鉴

定和初步的毒力及病理学研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种来源和供试昆虫

病原菌 HR-3 分离自一自然病死的周身发红的蝗虫虫尸。供试蝗虫采自四川省盐源县草地和蒲江县等地,虫龄为 2~3 龄,虫种为宽须蚁蝗[*Myrmeleotettix Polpalis*(Zub)]。试前在室内观察 3~4d 后作感染用。

### 1.2 试剂

Taq 酶购自 TaKaRa 公司,pGEM-T 载体购于 Promega 公司,其它生化试剂均为国产分析纯。

### 1.3 培养基

肉汤胨培养基:每升含牛肉膏 3g,蛋白胨 10g,NaCl 5g,琼脂 18~20g,pH7.4~7.6,121℃ 灭菌 30min。发酵培养基:每升含蔗糖 10g,蛋白胨 20g,NaCl 3g,pH 7.4~7.6,121℃ 灭菌 30min。生理生化鉴定培养基参照文献[3]。

### 1.4 病原菌分离和回复感染试验<sup>[4]</sup>

将采集自田间一自然死亡的周身发红的蝗虫尸体浸入 70% 乙醇 2s,消毒体表后,无菌条件下将其已腐烂的内脏制成匀浆,用无菌水稀释至适当浓度,涂肉汤胨平皿,28℃ 培养 24h,挑取单菌落。将纯化后并经摇瓶发酵的菌悬液( $10^9$  个/mL)喷洒到玉米苗上,舔食感染 2~3 龄蝗虫。每天观察记录染病蝗虫的症状。收集死虫,并进行病原菌分离,方法同前。

\* 通讯作者。Tel 86-28-85225123;E-mail tyseu@hotmail.com

作者简介 金 虹(1978-),女,四川内江人,硕士研究生,主要从事微生物学方面的研究。E-mail jinh04280@yahoo.com.cn

其他作者 陶 科,龙章富

收稿日期 2004-07-26,修回日期 2004-12-30

## 1.5 形态观察

**1.5.1 菌落形态观察** 纯化的菌株接种于肉汤胨平皿上, 28℃培养 48h 后观察生长情况及菌落特征。

**1.5.2 细胞显微形态观察** 扫描电镜标本采用临界点干燥标本, 其制备方法参照文献 [5, 6]。用 JSM-840 扫描电镜在加速电压 10~15kV 下观察。

## 1.6 生理生化试验

参照文献 [3, 7] 的方法进行。

## 1.7 16S rDNA 的 PCR 扩增和产物测序

取对数生长期新鲜菌液, 离心收集细菌, 按文献 [8] 的方法提取基因组 DNA。依据细菌 16S rDNA 中最保守的序列设计引物, 由北京赛百盛基因公司合成。正向引物: 5'-ATGGATCCGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物: 5'-TATCTGCAGTGGTGTGACGGCGGTGT-3'。PCR 反应体系 (50 $\mu$ L): 40ng DNA 模板, 0.2 $\mu$ mol/L 引物, 200 $\mu$ mol/L dNTPs, 2.5U *Taq* 酶和 5 $\mu$ L 10 $\times$  *Taq* 酶缓冲液。PCR 反应条件: 94℃ 2min; 94℃ 1min, 53℃ 1min, 72℃ 1min, 共 30 个循环; 72℃ 7min。PCR 扩增产物克隆进入 pGEM-T 载体, 送上海联合基因公司测序。

## 1.8 系统发育分析

测序得到 1428bp 的 16S rDNA 序列。结果输入核酸数据库 (RDP II) [9] 进行序列比较, 将与之同源性最高的 14 株细菌模式株的 16S rDNA 序列, 采用 DNAMAN5.2 软件的 Multiple Sequence Alignment 进行 16S rDNA 同源性分析, 并构建系统发育树, 发育树的构型和稳定性用 DNAMAN5.2 软件取样分析 1000 次, 进行 Bootstrap 值分析和评价。

## 1.9 毒力测定

田间采集健壮且个体大小基本一致的蝗虫, 菌液 (10<sup>9</sup> 个/mL) 用无菌水稀释至适当浓度, 共设 5 个测试浓度, 每个浓度试虫 20 头, 设 3 次重复, 空白对照用无菌水。口服处理后蝗虫放于特制纱笼中, 48h 后进行检查, 统计死虫数, 进行统计分析 [10, 11], 采用统计分析软件 SPSS (V11.0), 以校正死亡率值法求毒力回归方程。

## 1.10 蝗虫感染该病原菌后的组织病理变化 [12~14]

用分离到的病原菌培养液对供试蝗虫进行滴口感染, 以无菌水为对照。分别从菌液处理后 12h、24h、48h 的蝗虫中取样解剖, 取中肠组织浸于固定液中。正常对照于 24h 后从对照组 (无菌水滴口) 中取样。按常规石蜡切片方法进行洗涤、脱水、透明、渗蜡、包埋、切片、粘片、染色等操作程序, 将封好的玻片在普通光学显微镜下观察并拍照。

## 2 结果

### 2.1 回复感染和病死虫特征

根据科赫病定律, 用分离的病原菌 HR-3 纯培养物回复感染 2~3 龄蝗虫, 蝗虫于 24h 后开始死亡, 72h 达到死亡高峰, 幼虫感病后行动迟缓不活跃, 基本停食。死亡后躯体逐渐变红, 挤出的液体呈红色并有臭味。回复感染原宿主后的病死虫病症与以前相同。并从回复感染致死的虫尸中重新分离到了相同的病原菌, 确证 HR-3 为致死蝗虫的病原菌。

### 2.2 HR-3 菌体细胞形态和培养特征

HR-3 细胞呈短杆状, 菌体长 1.19~1.77 $\mu$ m, 宽 1.08~1.20 $\mu$ m, 无芽胞 (图 1)。在肉汤平皿上培养 48h 后菌落呈圆形, 光滑湿润, 边沿整齐, 表面隆起, 菌落红色。

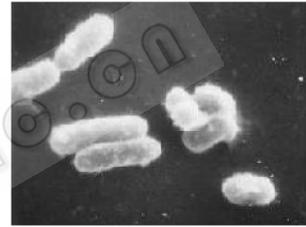


图 1 HR-3 扫描电镜图 (7000 $\times$ )

Fig.1 Scanning electron microscope photo of HR-3 (7000 $\times$ )

### 2.3 HR-3 的生理生化特性

鉴定结果 (表 1) 表明, HR-3 为革兰氏阴性, 兼

表 1 HR-3 的主要生理生化特征

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of HR-3

Characteristics	HR-3	<i>Serratia marcescens</i>
Oxidase	-	-
Gram-negative rod-shaped	-	-
V-P	+	+
M. R	-	-
Indole	+	-
Citrate	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-
Phenylalanine deaminase	-	-
Lysine decarboxylase	+	+
Motility	+	+
Glutin liquefaction (22 $^{\circ}$ C)	+	+
Acid from glucose	+	+
Gas from glucose	-	d
Lactose	-	-
Utilization of		
Sucrose	+	+
Mannitol	+	+
L-Arabinose	-	-
Xylose	+	-
DNase	+	+

+ . Positive ; - . Negative ; d. Positive between 11.9% ~ 89% .

性好氧 ;V-P (Voges-Proskauer reaction) 过氧化氢酶反应阳性 ;M.R (Methyl Red test, 甲基红试验) 氧化酶、苯丙氨酸反应阴性 ;能利用蔗糖、葡萄糖、木糖、甘露醇产酸 ,不能利用阿拉伯糖、乳糖产酸 ;能还原硝酸盐 ,利用柠檬酸盐和使明胶水解 ;不能在 TSI 上产生 H<sub>2</sub>S。

2.4 病原菌的系统发育分析

HR-3 的 16S rDNA 序列测定结果表明 ,扩增的 DNA 序列全长 1428bp ,该序列在 GenBank 中的登录号为 AY538657。根据测序结果用 Ribosomal Database Project (RDP-II) [15] 核酸数据库进行序列比对 ,从 RDP 数据库中选择 14 个同源性最高的模式菌与 HR-3 进行进化树分析(图 2)。结果表明 HR-3 与 *Serratia marcescens* 和 *Serratia marcescens* subsp. *sakuensis* 形成一个簇群 ,同源性分别为 99.2% 和 99.3%。因此确定该分离株属于粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)。

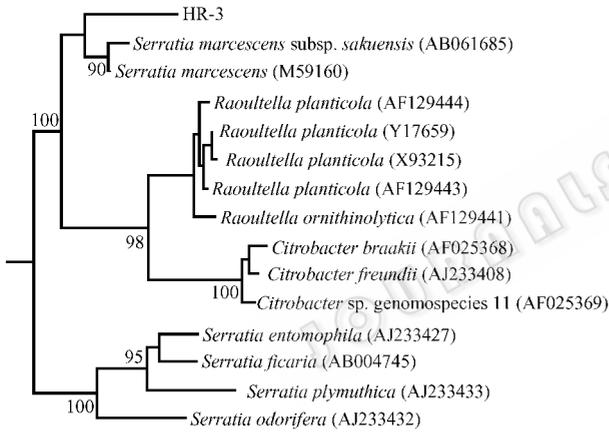


图 2 以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树状图

Fig.2 The phylogenetic tree based on HR-3 16S rDNA sequence. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. Bootstrap values , expressed as percentages of 100 replications , are given at branch points. Bar , 5% sequence divergence.

2.5 毒力测定

毒力测定结果显示 HR-3 菌液对蝗虫有明显的致死作用。48h 时 HR-3 的致死中浓度 LC<sub>50</sub> 为 1.164 × 10<sup>8</sup> cfu/mL ,毒力回归方程为 y = 1.066 + 0.809x ,相关系数 R = 0.93(表 2)。

2.6 组织病理学变化

正常的蝗虫中肠细胞(杯状细胞和柱状细胞)排列整齐细密(图 3-A)。经口感染的蝗虫 ,在 12h 后杯状细胞明显增多(图 3-B) ;感染 24h 后 ,消化细胞层细胞细胞核浓缩 ,溶解 ,局灶性变性坏死 ,呈丝网状(图 3-C) ;感染 48h 后 ,整个消化细胞层完全变性 ,坏死 ,大部分区域被空泡状物充盈(图 3-D)。

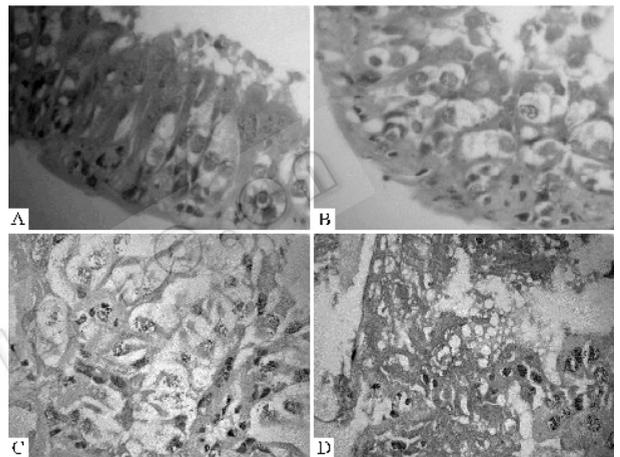


图 3 蝗虫中肠的组织病理变化

Fig.3 The histopathological changes of grasshopper midgut. A :Control , midgut epithelium of a 24-h-old grasshopper fed sterile water ; B :Section after 12h infection , goblet cells increased ; C :Nucleus condensed , the appearance of degeneration and cytolysis in epithelia ; D : Vacuoles appeared in most region of midgut epithelia.

3 讨论

根据生理生化测定 ,基本可将病原物 HR-3 归属于沙雷氏菌属。但是其中有两个生化指标(对木

表 2 HR-3 对蝗虫的毒效

Table 2 Toxicity of HR-3 to grasshoppers

Concentration of bacterium( 10 <sup>7</sup> /mL )	Grasshoppers tested	Number of killed			Mortality/%	Corrected mortality/%	Log(X Y)	Fatal probability(X X)
		Test1	Test2	Test3				
1 × 10 <sup>2</sup>	20	17	19	18	90	89.09	2	1.23
1/2 × 10 <sup>2</sup>	20	15	17	15	78.33	76.36	1.7	0.72
1/4 × 10 <sup>2</sup>	20	10	12	13	58.33	54.55	1.4	0.11
1/8 × 10 <sup>2</sup>	20	14	9	11	56.67	52.73	1.1	0.07
1/16 × 10 <sup>2</sup>	20	7	11	13	51.67	47.28	0.8	-0.07
CK	20	2	1	2	8.33			

y = 1.066 + 0.809x ; LC<sub>50</sub> = 1.164 × 10<sup>8</sup> .

糖的利用和吡啉的实验)与模式菌株不同。从分子水平上对该菌进行 16S rRNA 序列分析和同源性比较,HR-3 菌株 16S rRNA 与 RDPII 数据库中 *Serratia macescens* 的 16S rRNA 的序列具有 99.2% ~ 99.3% 的同源性。根据上述研究结果,将 HR-3 菌株鉴定为粘质沙雷氏菌。根据对该菌的形态学观察,粘质沙雷氏菌在加有 1% 蔗糖的培养基中长势更为良好,其菌体浓度比在普通肉汤蛋白胨培养基上高两个数量级。此外,斜面保存菌种放置 4℃ 冰箱,一个月后接种时发现菌落边缘呈现白色,红色变淡。

粘质沙雷氏菌是一类普遍存在自然界的腐生小杆菌,侵染昆虫种类有 6 个目之多<sup>[16]</sup>。该菌可感染棉铃虫、地老虎、粘虫、菜青虫和马铃薯块茎害虫<sup>[17]</sup>。粘质沙雷氏菌可从水、土壤、牛奶、面包中分离出来。从自然病死的蝗虫体内直接分离到粘质沙雷氏菌在国内尚属首次报道。作者用病原菌 HR-3 感染蝗虫的重复实验结果表明,该菌株对蝗虫有较强的感染力,毒力测定结果表明致死率与菌液的浓度成正相关,进一步确证此菌对蝗虫的致病性。

沙雷氏属中仅粘质沙雷氏菌认为是昆虫病原菌,粘质沙雷氏菌有可能在多种昆虫的肠管中增殖,在宿主昆虫蜕皮期,肠管壁薄弱时期,细菌侵入体腔中,昆虫感染这种细菌后,主要引起败血症<sup>[18]</sup>。本文的组织病理研究结果表明,病原菌 HR-3 对蝗虫的致病机理与上述过程基本相符。因此,初步推测 HR-3 对蝗虫致病机理主要是将中肠作为攻击的靶标,破坏中肠的结构,影响正常的消化和吸收,达到杀死蝗虫的目的。但更为详细的机理还有待进一步研究。

该病原菌易于培养,在普通的肉汤胨培养基上长势良好,生长迅速,其 24h 的培养液含菌量可达  $10^9$  个/mL。并且对蝗虫有较强的毒力,其培养液 ( $10^9$  个/mL) 感染蝗虫后,48h 内致死率达 85% 以上。这些特点表明 HR-3 在蝗虫的生物防治领域具有潜在的应用前景。目前,我们正在进行该菌的杀虫谱

测定及安全性实验,以期能早日研制开发出一种灭蝗微生物制剂。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] 刘举鹏. 浅谈我国一些重要代表性蝗虫. 生物学通报, 1996, 31 (10): 8 - 10.
- [ 2 ] 赵文臣. 防治蝗虫问题的反思. 科技交流, 2000, 10: 32 - 34.
- [ 3 ] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 370 - 391.
- [ 4 ] 刘世贵, 袁兴, 朱文, 等. 一株蝗虫病原菌的分离和鉴定. 微生物学报, 1995, 35(2): 86 - 90.
- [ 5 ] 林加涵, 魏文铃, 彭宣宪. 现代生物学实验(上册). 北京: 高等教育出版社, 2000, 70 - 76.
- [ 6 ] 傅崎湘. 浅谈电子显微镜和亚细胞技术. 北京: 科学普及出版社, 1980.
- [ 7 ] 周德庆. 微生物实验手册. 上海科技出版社, 1983, 137 - 163.
- [ 8 ] Weisburg W G, Bams S M, Pelletier D A, et al. 16S rDNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 1991, 173 (2): 696 - 703.
- [ 9 ] Maidak B L, Cole J R, Lilburn T G, et al. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Res* 2001, 29: 173 - 174.
- [ 10 ] 张宗炳. 杀虫药剂的毒力测定: 原理, 方法, 应用. 北京: 科学出版社, 1988.
- [ 11 ] 杜荣骞. 生物统计学. 北京: 高等教育出版社, 1999, 177 - 211.
- [ 12 ] 甘雅玲, 郭中伟. 蝗虫消化系统的超微结构. 电子显微学报, 2002, 21(5): 582 - 583.
- [ 13 ] 王晓容. 昆虫中肠生理与病理研究进展. 仲恺农业技术学院学报, 2000, 13(1): 58 - 68.
- [ 14 ] 钟慈声. 细胞和组织的超微结构. 北京: 人民卫生出版社, 1984.
- [ 15 ] <http://irdp.cme.msu.edu/html>. June 10th 2002.
- [ 16 ] Buckner G E. Nonsporulating bacterial pathogens. In Stenhaus E A, ed. "Insect Pathology". New York and London: Academic Press, 1963, 2: 117 - 146.
- [ 17 ] 李荣森, 罗绍彬, 张用梅, 等著. 微生物防治害虫. 北京: 科学出版社, 1983, 19 - 27.
- [ 18 ] 黄大昉, 林敏. 农业微生物基因工程. 北京: 科学出版社, 2001, 175 - 188.

## Identification of a pathogenic strain of locusts and its toxicity and pathology

JIN Hong<sup>1</sup> GE Shao-rong<sup>1</sup> TAO Yong<sup>1</sup> RAN Hong-yan<sup>1</sup> LIU Shi-gui<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> Life Science College, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

(<sup>2</sup> Institute of Chuangxin Biotechnology, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

**Abstract** : A pathogen was isolated from naturally dead grasshoppers. Its pathogenicity was testified by law of KOCH. It was identified as *Serratia marcescens* by physiological, biochemical test and molecular systematic analysis. Toxicity of HR-3 to grasshoppers was assayed by means of oral infection. The results show that the linear regression relationship between the logarithm( $y$ ) of HR-3 concentration and the probability( $x$ ) of corrected grasshopper mortality is  $y = 1.067 + 0.809x$ , and the median lethal concentration is  $LC_{50} = 1.164 \times 10^8$  cfu/mL. The infection mechanism of HR-3 to grasshoppers were also studied. The histopathological studies show that midgut epithelia are damaged at the beginning of infection, and then partial denaturalization and putrescence occur in this area. After 48h infection, vacuoles appear in most regions of midgut epithelia.

**Key words** : *Serratia marcescens*, Identification, Toxicity, Pathology, Locusts

\* Corresponding author. Tel 86-28-85225123, E-mail: tyscu@hotmail.com

Other authors: TAO Ke, LONG Zhang-fu

Received date: 07-26-2004

## The Eighth Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

### EDITOR-IN-CHIEF

LI Ji-lun Academician

(College of Biology, Chinese Agricultural University, Beijing 100094, China)

### VICE-EDITOR-IN-CHIEF

TAN Hua-rong Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

LU De-ru Professor

(Institute of Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

WANG Ao-quan Professor

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

QU Yin-bo Professor

(School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

XU Jian-guo Professor

(National Institute of Communicable Diseases Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

### MEMBERS OF THE BOARD

CAI Yong-feng

CHEN Yong-qing

CHENG Chi

DONG Xiu-zhu

FAN Yun-liu

GUO Jun

HU Fu-quan

HU Yuan-yang

HUANG Li

LU Cheng-ping

MIN Hang

QIAN Shi-jun

SHAO Yi-ming

SHENG Jun

TANG Hong

TIEN Po

WANG Ping

WANG Hua-ming (USA)

XIE Hong

YANG Su-sheng

ZHAI Zhong-he

ZHANG Yao-ping (USA)

ZHENG Tian-ling

ZHU Bao-quan

ZHUGE Jian

### MANAGING EDITORS

WANG Jin-fang

WANG Min