

一株蝗虫病原菌的分离和鉴定*

刘世贵 朱 文 杨志荣 葛绍荣 何小仪

(四川大学草原生防工程国家专业实验室 成都 610064)

袁 兴 张丽珠

(重庆森林防治站 重庆 630000)

摘 要 从内地黄脊竹蝗自然病死虫尸内分离到一种病原菌,其纯培养物经 KOCK 病症律证明,并按《伯杰细菌鉴定手册》(第九版)的方法进行了生物学测定、生理生化实验,并测定了其 DNA 中 G+C mol 含量为 63.73%,确定该病原物为类产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)。经生物测定,该菌对草地蝗虫和黄脊竹蝗有较强的感染力,对草地其他害虫也有一定的感染力。

关键词 类产碱假单胞菌,分离,鉴定,蝗虫

蝗虫属直翅目(Orthoptera)蝗科(Locustidae),是一种世界性的有害昆虫。在我国是全国性分布和危害。尤其以北方最为严重,在北方草原,以其“种类多、数量大、分布广、危害重”等特点成为草地第一害虫^[1]。仅北方草原和青藏高原草地,每年发生并危害的面积近 1000 万公顷,严重危害牧草生长,使草地产草量下降 30—70%^[2],造成巨大经济损失。蝗虫的危害还是导致草地退化、沙化、自然生态环境条件恶化等的重要因素之一。

1991 年在重庆市歌乐山林场发现了许多黄脊竹蝗(*Ceracris kiangsu*)的自然病死虫,从虫尸内分离到一种病原菌,经回复感染原宿主,能引起原宿主致病并死亡,从虫尸体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。经感染主要草地害虫的初步试验结果表明,该病原菌对多种草地蝗虫具有较高的感染力,5 天的致死率高达 90%以上,对草地的草原毛虫(*Gynephora ruoergensis*)、粘虫(*Leucania separata*)也有一定的感染力。现将鉴定结果报道如下:

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源:从四川重庆歌乐山竹林中自然病死的黄脊竹蝗尸体中分离得到。

1.1.2 对照菌株:铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),由卫生部成都生物制品研究所提供。

1.1.3 供试昆虫:草地蝗虫、草原毛虫、粘虫均采自四川盐源县草地。黄脊竹蝗采自重

* 国家教育委员会重点资助项目。

本文于 1993 年 10 月 23 日收到。

庆歌乐山林场。均为健康无病的2—3龄幼虫。采回后在室内观察饲养5天后作感染用。

1.1.4 培养基:分离用培养基(%):牛肉膏0.5,蛋白胨1.0,NaCl 0.5,琼脂1.8,pH7.4,121℃灭菌30分钟。生理生化实验用培养基:参照文献[3,4]。

1.2 方法

1.2.1 病原菌分离:将病虫尸体浸入70%乙醇中2秒,消毒体表后,移入5.25%的次氯酸钠中3—5分钟,去掉游离氯,用无菌水清洗虫尸5次,将消毒好的虫尸移入无菌水试管中,搅烂稀释至 10^{-7} ,分别涂肉汁胨平皿,35℃培养24小时,挑取单菌落。

1.2.2 菌种纯化:挑取于35℃培养24小时的单菌落,用划线法和稀释涂布法纯化菌种,直到镜检菌体形态、大小及革兰氏染色反应均一为止。

1.2.3 回复感染试验:将纯化后经摇瓶发酵含有 10^9 细菌/ml的菌悬液涂布到玉米苗上,添食感染2—3龄黄脊竹蝗,每天观察记录感病蝗虫的症状,收集死虫,并进行病原菌分离,方法同前。

1.2.4 形态观察:菌落形态观察:将纯化的菌株接种于肉汁胨培养基平皿上,经35℃培养48小时后,观察其生长情况及菌落特征,并测量其大小。细胞形态观察:电镜标本的制备参照文献[5]的方法。光学显微镜标本经一般革兰氏染色及鞭毛染色后,使用Olympus光学显微镜观察。

1.2.5 生理生化试验:参照文献[3]、[4]、[6]的方法进行。

1.2.6 DNA的G+C mol%的测定:DNA的抽提参照文献[7]的方法进行,测定参考Tm法^[8,9]。

1.2.7 感染草地主要害虫试验:将含 10^9 个/ml的菌悬液分别涂布于玉米苗和沙草上,添食感染健康2—3龄草地蝗虫(土蝗、亚洲飞蝗、蚊蝗等)、草原毛虫、粘虫。每天观察其发病和死亡情况,收集死虫做致病菌的分离试验,方法同前。

2 结果

2.1 回复感染和病死虫特征

根据KOCK病症律,用分离的病原菌纯培养物回复感染2—3龄黄脊竹蝗,蝗虫于24小时后开始死亡,72小时达到死亡高峰,幼虫感病后行动迟缓不活跃,基本停食,并有轻微的痉挛现象。病死虫后半部松软,24小时后虫尸微发红,5天后虫尸渐变为黑色,挤出的液体呈褐色并有臭味。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,确证此病菌为致死蝗虫的病原菌。

2.2 菌体细胞形态和培养特征

2.2.1 个体形态特征:细胞呈直杆状,两端钝圆,两侧平行,菌体长 $0.9—3.3\mu\text{m}$,宽 $0.6—0.8\mu\text{m}$,具单极生鞭毛,无芽胞,通常革兰氏染色为阴性(图1)。

2.2.2 培养特征:在肉汁胨平皿上培养48小时后,菌落呈圆形,边沿整齐,直径约1.5—2mm,表面隆起,乳黄色,菌落光滑湿润,半透明。该菌株在肉汁胨液体培养液中培养不形成菌璞,呈均一混浊状,有轻微臭味。

2.3 生理生化特性

鉴定结果表明,分离株和对照株接触酶、氧化酶和反硝化作用均为阳性,二者均不

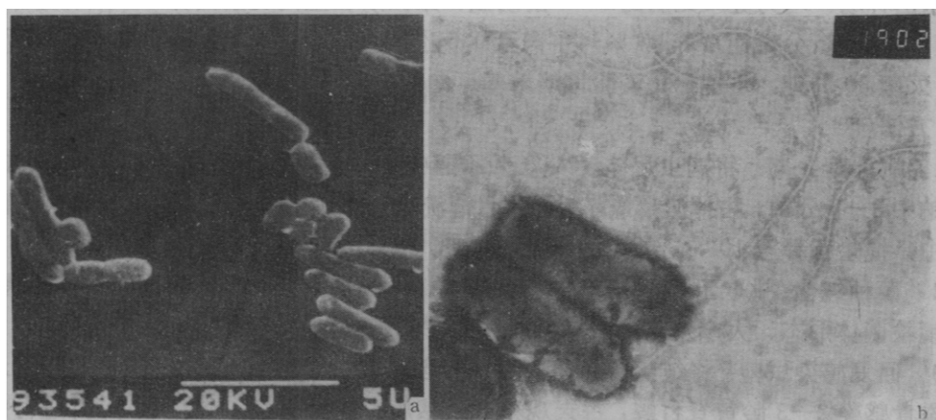


图1 分离株的电镜观察

Fig. 1 Electron microscopic observation on isolated bacterial strains

- a. 扫描电镜：示培养 24 小时的菌体形态 (4,200×)；
- b. 透射电镜：示培养 24 小时的菌体鞭毛 (19,000×)。
- a. SEM: The microscopic morphology of 24h culture cells;
- b. TEM: The flagella of 24h culture cells.

产生果聚糖，胞外 PHB 水解和 PHB 聚积均为阴性，均不产生荧光色素和类胡萝卜素，在 10—41℃ 均能生长，在 4℃ 和 42℃ 均不能生长，最适生长温度为 35℃。不同之处，分离株精氨酸双水解酶阴性，不能水解淀粉和明胶，不产生脓青素，而对照株精氨酸双水解酶阳性，能水解淀粉和明胶，产生脓青素。分离株营呼吸代谢，不发酵，利用的碳源较少，包括果糖、β-苯丙氨酸、DL-精氨酸，不利用葡萄糖、木糖、淀粉、甘油、间肌醇、槐牛儿醇、赤藓醇、L-脯氨酸、色胺、2-酮基葡萄糖酸盐等 10 多种碳源，而对照株能利用的碳源较多，仅 D-木糖、间肌醇、赤藓醇和色胺不能利用。

2.4 DNA 的 G+C mol% 含量

用热变性温度法测得该菌株 DNA 的 T_m 值为 80.0 (0.1×SSC 溶液)，G+C mol 含量为 63.73%。

2.5 感染草地主要害虫

用该菌株感染草地蝗虫，24 小时后开始死亡，72 小时后进入死亡高峰，感染 5 天后的致死率达 92%。病死虫的特征与原宿主的病死虫基本一致。感染草原毛虫的致死率为 18.4%。感染草地粘虫的致死率为 27.4%。后两种昆虫死后，虫尸变软，发黑，体液有臭味。从这三种昆虫尸体中均分离到病原菌，经鉴定与原病原物为同一种致病菌。未分离到其他致病菌，表明为同一病原菌致死。

3 讨论

该菌株为革兰氏阴性，细胞为杆状，无芽胞，化能异养。以极生鞭毛运动，呼吸代谢，细胞单个生长，氧化酶和接触酶均为阳性，能利用单碳水化合物以外的碳水化合物

作碳源，据此应归于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。

根据分离株不能聚积 PHB 作为细胞内的碳源储存物，该菌株可归入假单胞菌属的 RNA 组 I。从不产生荧光色素，不能利用葡萄糖等，将该菌株与同组的除产碱假单胞菌和类产碱假单胞菌以外的菌区别开来。类产碱假单胞菌与产碱假单胞菌的特征很相近，这两种假单胞菌的主要区别在 DNA 中 G+C 的 mol 百分含量和营养特征上。该致病菌果糖是其唯一能利用的碳源，DNA 中的 G+C mol 含量为 63.73%，精氨酸双水解酶反应为阴性，据此可与产碱假单胞菌分开。在《伯杰细菌鉴定手册》(第九版)有关类产碱假单胞菌的描述中曾提到，Staniner 等 (1966) 所描述的种，似乎是异源的，至少包括了两个组，其中一组的菌株能储存 PHB，精氨酸双水解酶反应阳性；另一组的菌株则不能储存 PHB，精氨酸双水解酶反应阴性。我们分离到的这株蝗虫致病菌与后一组的特征相似，故根据该菌株的生物学、生理生化特性及 DNA 中 G+C mol 含量，按《伯杰细菌鉴定手册》(第九版)，将从蝗虫体内分离到的致病菌定为类产碱假单胞菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)。它是否为类产碱假单胞菌的一个新亚种，还有待进一步的试验证明。曾有人从昆虫体内分离到六种假单胞菌，但从蝗虫体内以至昆虫体内分离到类产碱假单胞菌尚属首次报道^[10]。

用类产碱假单胞菌感染草地蝗虫、草原毛虫和粘虫的结果表明，该菌株对草地蝗虫有较强的感染力，对草原毛虫和粘虫也有一定的感染力，因此该菌株很有可能成为防治草地蝗虫的一种新药。经四川省科技情报所联机检索查新表明，利用假单胞菌属的细菌防治蝗虫以至防治农田害虫，在国内外尚无报道。

参 考 文 献

- [1] 刘世贵. 四川大学学报, 1992, 29: 2—8.
- [2] 李克夫, 马 耀, 杜文亮. 中国草地, 1992, (1): 50—52.
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法. 北京: 科学出版社, 1978. 127—145.
- [4] 周德庆. 微生物实验手册. 上海: 上海科技出版社, 1983. 137—163.
- [5] 王鲁平、谢念铭、童少清, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1989, 9 (2): 132—133.
- [6] Krieg N R. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984. 150—175.
- [7] Marmur J, Doty P. *Molec Biol*, 1962, 5: 109—118.
- [8] Murry M G, Thompson W F. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8: 4321.
- [9] 林万明、郭兆彪、高树德, 等. 微生物学通报, 1981, 8 (5): 245.
- [10] 吕鸿声, 钱纪放. 昆虫病理学. 杭州: 浙江科技出版社, 1982. 72—73.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A PATHOGEN OF GRASSHOPPERS

Liu Shigui Zhu Wen Yang Zhirong Ge Shaorong He Xiaoyi

(National Laboratory for Grassland Biological Control of Sichuan University, Chendu 610064)

Yuang Xing Zhang Lizhu

(Forest Protection Station of Chongqin, Chongqin 630000)

Abstract A pathogen was isolated from natural dead pests of *Ceracris kiangsu* in Geleshan farm of Chongqin. Its pathogenecity was confirmed by the law of KOCK. It was identified as *Pseudomonas pseudoalcaligenes* according to its physiological and biochemical properties as well as the G+C content of DNA (63.73mol%). The results of preliminary bioassay show that the pathogen can infect the grasshoppers and *Ceracris kiangsu*, and also can infect other pests of grassland in a certain extent.

Key words *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, Isolation, Identification, Grasshoppers