

柞蚕蛹期灵菌败血病 *Serratia marcescens* C3 菌株分离鉴定

程瑞春 崔建国* 王洪魁 高国平 孙守慧 祁金玉 王月

(沈阳农业大学林学院 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 以柞蚕(*Antheraea pernyi*)蛹为替代寄主繁殖白蛾周氏啮小蜂(*Chouioia cunea*)技术在辽宁、北京、天津、上海、河北、山东等地美国白蛾(*Hyphantria cunea*)的生物防治中发挥了重要作用。利用柞蚕蛹繁殖白蛾周氏啮小蜂时,柞蚕蛹期软化病是繁蜂的主要障碍。通过对利用柞蚕蛹繁蜂时蛹内组织液化后呈粉红色这一未知软化病的典型症状进行病原细菌的分离和纯化,得到C3菌株。经 Biolog 系统和 16S rRNA 序列分析,鉴定 C3 菌株为灵菌(*Serratia marcescens*),经过柯赫法则检验,确定灵菌 C3 菌株是导致柞蚕蛹期灵菌败血病的病原菌。描述了繁蜂时柞蚕蛹期灵菌败血病发病期的识别特征。

关键词: 柞蚕, 白蛾周氏啮小蜂, 细菌性病害, 病原细菌, 黏质沙雷氏菌

Isolation and Identification of *Serratia marcescens* C3: The Pathogen Causing an *Antheraea pernyi* Pupal Bacterial Disease

CHENG Rui-Chun CUI Jian-Guo* WANG Hong-Kui GAO Guo-Ping
SUN Shou-Hui QI Jin-Yu WANG Yue

(College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China)

Abstract: The technique of using the pupae of Chinese tussah, *Antheraea pernyi*, as a surrogate host to artificially rear *Chouioia cunea* has been playing an important role in the biological control of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, in Liaoning, Beijing, Tianjin, Shanghai, Hebei, Shandong Provinces or Municipalities and other places of China. Bacterial diseases of Chinese tussah pupae are the main obstacle to mass rearing *C. cunea*. Based on the fact that the tissue in some pupae turned pink after liquefying during rearing *C. cunea*, which is a typical symptom of an unknown bacterial disease, a bacterium was isolated and purified, and C3 was obtained. C3 was identified as a strain of *Serratia marcescens* by conventional techniques, Biolog system and 16S rRNA analysis, and was determined as the pathogenic bacterium causing the disease to Chinese tussah pupae by a test based on Koch's postulates. The identification characteristics were described of the disease in its incidence in the process of rearing *C. cunea*.

Keywords: *Antheraea pernyi*, *Chouioia cunea*, Bacterial disease, Pathogenic bacterium, *Serratia marcescens*

白蛾周氏啮小蜂(*Chouioia cunea*)是最先发现于美国白蛾(*Hyphantria cunea*)蛹内的寄生性天敌昆虫^[1],以柞蚕(*Antheraea pernyi*)蛹为中间寄主(替代寄主)繁殖白蛾周氏啮小蜂技术^[2-5]在辽宁、北京、天津、上海、河北、山东等地的美国白蛾生物防治中发挥了重要作用^[2,4,6-8]。

人工大规模繁殖白蛾周氏啮小蜂时,对柞蚕蛹期病害的控制措施主要是从接蜂前挑选没有病害症状的柞蚕蛹,接蜂后及时淘汰病蛹和对繁蜂场所、器具和蚕蛹(茧)消毒等 3 个方面进行预防^[2-3,9],然而,采取上述措施不能完全控制病害。据调查,在导致繁蜂失败的病害中,柞蚕蛹期软化病约占 70%~90%,该病是繁蜂的主要障碍。

繁蜂时,柞蚕蛹期软化病都是由哪些种类的病原细菌所致,未见相关报道。本研究通过对繁蜂后柞蚕蛹内组织液化并呈粉红色这一未知软化病典型症状进行病原细菌分离和纯化,得到 C3 菌株。采用常规方法, Biolog 系统和 16S rRNA 序列分析技术,鉴定 C3 菌株为黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*),即灵菌。经过柯赫法则(Koch's postulates)检验,确定灵菌 C3 菌株是导致柞蚕蛹期灵菌败血病的病原菌,描述了繁蜂时柞蚕蛹期灵菌败血病发病期的识别特征。

1 实验材料和方法

1.1 菌株分离

柞蚕蛹采用河南省产的商品蛹,购自辽宁省沈阳市批发商;白蛾周氏啮小蜂由课题组繁育;繁蜂方法采用裸蛹群体接蜂法;小蜂发育温度为 22℃~28℃(以格力牌室内挂式空调调温)。对接蜂后表现出柞蚕软化病的病蛹连续观察约 2~4 d,详细记录病蛹症状,直至蛹体壁软化,内部组织液化。选取繁蜂时表现出软化病症状,蛹体内溃败组织液呈粉红色、有恶臭难闻气味的柞蚕病蛹做分离细菌的试验材料。在无菌操作条件下,用接种针蘸取少量病蛹组织液,在牛肉膏蛋白胨固体培养基上采用平板划线分离法^[10]分离细菌,在 30℃ 培养,选取红色典型菌落用如上方法进行纯化,得到 C3 菌株。

1.2 C3 菌株鉴定

1.2.1 细菌常规鉴定:观察菌落在不同培养温度下的形态特征和颜色变化。通过革兰氏染色^[10],观察菌体形状、大小;取幼龄菌苔与 2%葡萄糖溶液和等量的吕氏美蓝染色液的混合液制成菌悬液,在光学显微镜下直接观察细菌的运动性,并测量活菌大小;鞭毛染色,观察鞭毛。

依照《常见细菌鉴定手册》^[11]进行生理生化试验,如葡萄糖氧化发酵试验,接触酶(过氧化氢酶)试验,氧化酶试验,油脂水解试验,明胶液化试验,卵磷脂酶试验,柠檬酸盐试验,乙酰甲基甲醇(V-P)试验,甲基红(M. R)试验,苯丙氨酸、色氨酸脱氨酶试验等。

1.2.2 细菌自动化鉴定:根据革兰氏染色实验结果,采用 Biolog 系统,选用 GN2 细菌鉴定板(Biolog, USA) 30℃ 培养 16~24 h,通过读数仪对 C3 菌株的碳源利用情况进行读数,根据 Biolog MicroLog3 4.20 软件比对 Biolog GN2 数据库得出的鉴定结果确定 C3 所在属或种。

1.2.3 16S rRNA 序列扩增和系统发育分析:采用热裂解法提取基因组 DNA,PCR 采用细菌通用引物,正向引物为 27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为 1492r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3',扩增片段约 1.5 kb,采用 ABI3730 型自动测序仪完成序列测定^[12-13]。获得 16S rRNA 序列经校对后用 BLAST 程序与 GenBank (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中的数据做相似性分析,得到同源性相近的菌种序列。根据文献[14]和 RDP (Ribosomal Database Project, <http://rdp.cme.msu.edu/>)数据库^[15]选取模式菌株(Type strain)的 16S rRNA 序列,通过 ClustalX 1.83 程序多重比对,采用 MEGA 4.0 软件,用邻接法(Neighbor-joining)进行聚类分析,构建进化树,系统进化矩阵根据 Kimura 双参数模型估计,采用 1000 次自展值(Bootstrap value)分析评估系统进化树拓扑结构的稳定性^[16]。

1.3 C3 菌株的柯赫法则(Koch's postulates)检验

按照柯赫法则检验侵染性病害病原物的操作程序^[17]进行试验。以河南产发育程度低的健康柞蚕蛹

为试验材料, 将蛹体表面用 70%–75% (V/V)酒精消毒后, 在无菌操作下, 用接种针挑取在平板固体培养基上培养的菌苔, 刺入蛹腹部, 深约 2 mm–3 mm, 用接种针直接刺入相同部位和相同深度的同批蛹作为对照。放于 30℃ 下培养, 分别在 1、2、3、4 d 后观察, 记录发病率, 对表现出软化病症状的蛹进行解剖, 选取蛹体内容物最先变成粉红色的蛹, 在牛肉膏蛋白胨固体培养基上对细菌分离, 30℃ 培养后, 根据菌落颜色、气味等特征确定是否为接种菌株。

1.4 C3 菌株所致软化病症状观察

繁蜂时, 对表现出软化病初期症状病蛹置于观察室观察, 直至蛹体壁触之即溃为止, 记录症状变化特征。

2 结果与分析

2.1 细菌鉴定

2.1.1 常规鉴定特征: C3 菌株, 革兰氏阴性短杆菌, 周生鞭毛, 端圆, 能够运动, 活菌大小约为 (0.98–1.34) μm \times (2.94–4.22) μm , 固定后大小约为 (0.7–0.97) μm \times (2.66–3.51) μm 。在牛肉膏蛋白胨固体培养基、PDA 固体培养基或察贝克固体培养基上能够正常生长, 25℃ 培养 2 d 后, 菌落圆形, 约 4 mm–4.5 mm, 垫状隆起, 表面润滑, 不透明, 有光泽, 边缘整齐, 粉红色、红色或深红色。当温度高于

37℃ 时, 菌落边缘呈白色, 14℃–20℃ 的变温条件有时不产生色素。pH < 5 时不能生长。

发酵葡萄糖产酸; 接触酶阳性; 氧化酶阴性; 苯丙氨酸、色氨酸脱氨酶阴性; 乙酰甲基甲醇阳性(33℃), 甲基红阴性(33℃)。能够利用柠檬酸盐作为唯一碳源生长, 分解油脂产生酸(脂肪酸), 利用卵磷脂, 液化明胶。

2.1.2 Biolog 系统鉴定: 根据 Biolog GN2 系统 C3 菌株 95 种碳源利用情况的试验结果, 30℃ 培养 16–24 h, C3 不能利用的唯一碳源有 26 种, 利用较差的唯一碳源有 8 种, 可利用的唯一碳源有 61 种(表 1)。Biolog 系统根据 C3 代谢指纹图谱比对数据库给出鉴定结果(表 2): C3 菌株与 *Serratia marcescens* 同种的可能性为 99%, 相似性大于 0.5, 鉴定结果较好。

2.1.3 系统发育分析: 对 C3 菌株的 16S rRNA 进行 PCR 扩增、序列测定, 得到长度为 1445 bp 的 16S rRNA 部分基因序列, 其 GenBank 登录号为 GU212864。基于 16S rRNA 基因序列, 构建 C3 和相关参比菌株的系统发育树(图 1), C3 菌株与 *S. marcescens* 模式菌株 DSM 30121^T (AJ23321)^[14–15] 和 ATCC 13880^T (M59160)^[14]同在一个系统发育亚枝上, 三者合并后与模式菌株 KRED^T (AB061685)^[15]聚成一簇, C3 菌株与上述模式菌株 16S rDNA 序列相似性均高于 98%。

表 1 C3 菌株的 Biolog GN2 碳源利用结果
Table 1 Results of strain C3 using 95 carbon resources determined by Biolog GN2 system

项目 Item	碳源 Carbon resource
不能利用的唯一碳源, 共 26 种 26 carbon resources can not be used by strain C3	α -Cyclodextrin, D-Arabitol, D-Cellobiose, Gentiobiose, α -D-Lactose, Lactulose, D-Melibiose, D-Raffinose, L-Rhamnose, D-Galactonic acid lactone, D-Glucosaminic acid, γ -Hydroxybutyric acid, Itaconic acid, α -Keto butyric acid, α -Keto valeric acid, Malonic acid, Quinic acid, D-Saccharic acid, Sebacic acid, L-Leucine, L-Phenylalanine, L-Pyroglutamic acid, D,L-Carnitine, Phenethylamine, 2-Aminoethanol, 2,3-Butanediol
利用较差的唯一碳源, 共 8 种 8 carbon resources can be used poorly by strain C3	Glycogen, Tween 40, Turanose, α -Hydroxybutyric acid, Propionic acid, Succinamic acid, Glucuronamide, Hydroxy-L-Proline
可利用的唯一碳源, 共 61 种 61 carbon resources can be used by strain C3	Dextrin, Tween 80, N-Acetyl-D-Galactosamine, N-Acetyl-D-Glucosamine, Adonitol, L-Arabinose, i-Erythritol, D-Fructose, D-Fucose, D-Galactose, α -D-Glucose, m-Inositol, Maltose, D-Mannitol, D-Mannose, β -Methyl-D-Glucoside, D-Psicose, D-Sorbitol, Sucrose, D-Trehalose, Xylitol, Pyruvic acid methyl ester, Succinic acid mono-Methyl-Ester, Acetic acid, Cis-Aconitic acid, Citric acid, Formic acid, D-Galacturonic acid, D-Gluconic acid, D-Glucuronic acid, β -Hydroxybutyric acid, p-Hydroxy phenylacetic acid, α -Keto glutaric acid, D,L-Lactic acid, Succinic acid, Bromisuccinic acid, L-Alaninamide, D-Alanine, L-Alanine, L-Alanylglycine, L-Asparagine, L-Aspartic acid, L-Glutamic acid, Glycyl-L-Aspartic acid, Glycyl-L-Glutamic acid, L-Histidine, L-Ornithine, L-Prolone, D-Serine, L-Serine, L-Threonine, γ -Amino butyric acid, Urocanic acid, Inosine, Uridine, Thymidine, Putrescine, Glycerol, D,L- α -Glycerol phosphate, α -D-Glucose- 1-Phosphate, D-Glucose-6-Phosphate

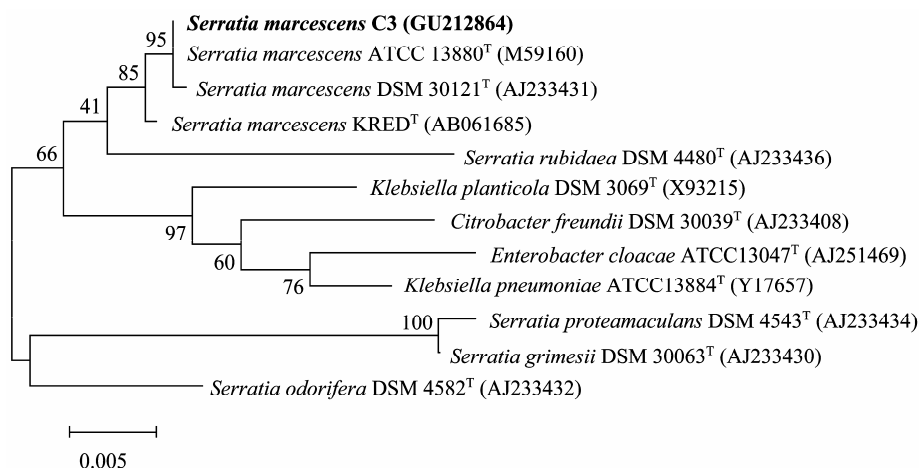


图 1 邻接法构建的 C3 和参比菌株 16S rRNA 序列的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain C3 and species of related genera

Note: Bootstrap percentages (based on 1000 replicates) are showed at nodes. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bar, 0.005 nucleotide substitutions per site.

表 2 C3 菌株的 Biolog MicroLog3 4.20 鉴定试验结果
Table 2 Results of strain C3 identified by Biolog MicroLog3 4.20 software

菌种名 Name	可能性(%) Probability (%)	相似性 Similarity	距离 Distance	类型 Type
<i>Serratia marcescens</i>	99	0.639	5.56	GN-ENT
<i>Vibrio fluvialis</i>	0	0	10.99	GN-ENT OXI+
<i>Vibro furnissii</i>	0	0	12.36	GN-ENT OXI+

注: 省略 C3 菌株可能性为 0 的另外 7 个种。

Note: 7 bacteria were omitted because strain C3 impossibly belongs to them determined by Biolog MicroLog3 4.20 software.

2.1.4 C3 菌株鉴定结果: 根据 C3 菌株的形态特征和生理生化特性, 参照相关文献^[11,14,18], 初步鉴定该菌株属于肠菌科(Enterobacteriaceae)沙雷氏菌属(*Serratia*); 经过 Biolog 系统和 16S rDNA 序列分析所得的鉴定结果相互吻合, 由此进一步确定 C3 为黏质沙雷氏菌(*S. marcescens*), 即灵菌。

2.2 柯赫法则检验结果

柯赫法则检验试验结果表明, 灵菌 C3 菌株到接菌后 4 d 约 80%的柞蚕蛹发病, 其中有 50%的蛹表现出溃败组织液呈粉红色这一典型症状。对液化组织最先表现为粉红色的病蛹用划线培养法进行分离, 得到大量红色菌落, 经过比较, 确定为所接种的 C3 菌株。对照组柞蚕蛹未表现出发病症状, 未能从血淋巴中分离到细菌。试验结果说明, C3 菌株是导致繁殖白蛾周氏啮小蜂时柞蚕蛹组织液化并呈粉红色这一典型软化病发生的病原细菌。

2.3 灵菌 C3 菌株导致柞蚕蛹期败血病症状特征

繁蜂时, 灵菌 C3 菌株导致的柞蚕蛹期败血病发病迅速, 25°C 时, 一般从症状出现到体壁触之即破, 只需要 3-4 d 时间。发病初期症状主要是颅顶板发黑, 很难和其它种类软化病相区分。25°C, 接蜂后 3-4 d, 解剖表现出软化病初期症状的柞蚕蛹, 在解剖镜下(放大 40 倍), 一般能够找到正在取食的小蜂幼虫。到发病末期, 发育程度低的柞蚕蛹颅顶板呈粉红色; 发育程度高的柞蚕蛹, 因蛹体内蛾头部的发育, 蛹体的颅顶板不再呈粉红色, 而为浅黑色, 可以分辨出颅顶板本身的颜色, 整个蛹体不是全部呈乌黑色, 而是一部分蛹体保持原有的颜色, 透过蛹体壁或节间膜可以看见里边液化的组织, 可以闻到从蛹体内透出的恶臭味, 触破蛹腹部体壁后, 流出的液体粉红色, 有难闻的恶臭味。

繁蜂时, 应注意柞蚕蛹期败血病症状与柞蚕蛾即将羽化的特征相区别。柞蚕蛾即将羽化时颅顶板亦可呈粉红色, 蛹体壁均匀软化但无臭味, 触动蛹体无汁液流出, 按压蛹体壁时有轻微响声, 蛹内蛾腹部有弹性。

3 讨论

根据柞蚕学的研究, 柞蚕蛹期主要软化病是柞蚕空洞病, 其病原菌是柞蚕链球菌(*Streptococcus pernyi*), 灵菌败血病多发生柞蚕的蚕期或蛾期^[19-20]。然而, 繁蜂时, 灵菌败血病总是发生在小蜂寄生之后并且导致小蜂败育, 其发病条件可能与

柞蚕蛹内部环境的改变有关。

灵菌导致柞蚕蛹期败血病发病的最典型症状是蛹体内组织液化并呈粉红色, 然而这一典型症状出现的时间晚于颅顶板变黑、腹部软化、蛹体壁没有破裂即可闻到臭味等软化病症状, 因此, 繁蜂时在发病初期就将病蛹淘汰, 依据粉红色组织液这一典型特征得出的统计结果就会低于灵菌败血病实际的发病率, 会使生产者低估灵菌败血病造成的损失。

繁蜂时, 柞蚕蛹软化病发病早, 发病快, 症状多样, 和正常贮藏或发育时软化病不完全相同。柞蚕蛹期软化病发病后, 会降低繁蜂成功率和单蛹出蜂量、增加繁蜂成本、为管理带来不便, 甚至影响美国白蛾等农林食叶害虫的防治工作。因此加强对柞蚕蛹期软化病发病规律和防治技术研究, 有助于提高白蛾周氏啮小蜂产业化水平。

致谢: 感谢中国农业科学院农业资源与农业区划研究所张晓霞博士在细菌鉴定上给予的指导和帮助。

参 考 文 献

- [1] 杨忠岐. 中国寄生于美国白蛾的啮小蜂—新属—新种(膜翅目, 姬小蜂科, 啮小蜂亚科). 昆虫分类学报, 1989, **11**(1/2): 117–130.
- [2] 王洪魁, 许国庆, 戚凯, 等. 利用柞蚕蛹人工繁殖白蛾周氏啮小蜂的研究. 沈阳农业大学学报, 1997, **28**(1): 16–21.
- [3] 王桂清, 王洪魁. 利用柞蚕蛹繁殖白蛾周氏啮小蜂技术. 沈阳农业大学学报, 1999, **30**(3): 317–319.
- [4] 韩国昇, 王建国, 赫伟, 等. 白蛾周氏啮小蜂人工繁殖及应用技术的研究. 森林病虫通讯, 2000(1): 26–28.
- [5] Tian XL, Wang HK, Jiang FY. Reproduction and biological characteristic of *Chouioia cunea*. *Journal of Forestry Research*, 2002, **13**(4): 331–333.
- [6] 杨忠岐, 张永安. 重大外来入侵害虫——美国白蛾生物防治技术研究. 昆虫知识. 图版 I. 2007, **44**(4): 465–471, 622.
- [7] Yang ZQ, Wei JR, Wang XY. Mass rearing and augmentative releases of the native parasitoid *Chouioia cunea* for biological control of the introduced fall webworm *Hyphantria cunea* in China. *BioControl*, 2006, **51**(4): 401–418.
- [8] Yang ZQ, Wang XY, Wei JR, *et al.* Survey of the native insect natural enemies of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae) in China. *Bulletin of Entomological Research*, 2008, **98**(3): 293–302.
- [9] 程瑞春, 崔建国, 李永民, 等. 柞蚕病害对人工繁殖白蛾周氏啮小蜂的影响及其防控措施. 辽宁林业科技, 2008(4): 40–42.
- [10] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002: 38–271.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 66–127, 364–398.
- [12] Zhang XX, Sun L, Qiu FB, *et al.* *Rheinheimera tangshanensis* sp. nov., a rice root-associated bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008(58): 2420–2424.
- [13] Lane DJ. 16S/23S rRNA Sequencing//Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester, UK: Wiley, 1991: 115–175.
- [14] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria.//Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second edition. New York: Springer, 2005: 587–850.
- [15] Cole JR, Wang Q, Cardenas E, *et al.* The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*, 2009, **37**(Database issue): 141–145.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596–1599.
- [17] Hogg S. *Essential Microbiology*. Chichester, UK: Wiley, 2005: 3–16.
- [18] 布坎南 RE, 吉布斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 382–474, 1341–1387.
- [19] 秦利. 中国柞蚕学. 北京: 中国科学文化出版社, 2003: 335–356.
- [20] 辽宁省蚕业科学研究所. 中国柞蚕. 沈阳: 辽宁科技出版社, 2003: 551–561.