

文章编号: 1001-1498(2003) 04 0511-04

青杨楔天牛病原细菌——链球菌致病性研究

阿地力·沙塔尔, 蒋萍, 施登明

(新疆农业大学林学院, 新疆 乌鲁木齐 830052)

关键词: 青杨楔天牛; 病原菌; 致病性; 链球菌属

中图分类号: S763.3 文献标识码: A

青杨楔天牛(*Saperda populnea* Linnaeus) 是新疆维吾尔自治区杨树(*Populus* spp.) 的主要蛀干性害虫。在调查青杨楔天牛的过程中发现了在虫瘿内自然感病死亡的天牛幼虫, 从感病幼虫体上分离培养的细菌经鉴定为链球菌属(*Streptococcus* Rosebach) 的一种细菌。

据国外有关资料报道, 属于链球菌属的普鲁东球菌(*Streptococcus pluton* Bailey et Collins) 是蜜蜂(*Apis* sp.) 的专性病原体, 是引起欧洲腐蛆病(European foulbrood) 的原因。粪链球菌(*Streptococcus faecalis* Andrewes et Horder) 在蜜蜂等数种昆虫的肠管内也常存在。舞毒蛾(*Lymantria dispar* L.) 幼虫体内粪链球菌运动性菌株成为舞毒蛾野外流行病的原因。如果幼虫食下这种细菌污染的饲料 3~ 15 d 后死亡^[1]。国内有关资料报道^[2] 链球菌属在西北地区只在甘肃、陕西等地区分布。宿主昆虫是大袋蛾(*Clania variagata* Snellen) 和细胸金针虫(*Agriotes subruttatus* Motschlsky)。目前为止还没有见到该菌在新疆分布的报道, 经光盘检索国内近 10 a 以来的资料均没见到链球菌属在天牛幼虫上寄生的报道。

昆虫病原资源研究是生物防治学科发展的前提, 但新疆目前已知的和正在利用的生防资源相当有限, 这与林业可持续发展的要求是不相适应的。生防资源的调查、收集、筛选、改良等这一过去被忽视的基础性研究领域, 已重新得到了国内外生防界的认识。为此, 进行了有关青杨楔天牛致病链球菌致病性的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

自然感病青杨楔天牛幼虫在 2000 年 4 月采集于乌鲁木齐鸿雁池的新疆杨(*Populus alba* var. *pyramidalis* Bge.) 林中, 健康幼虫在 2001 年 3 月采集于新疆农业大学校园内, 分离培养用牛肉膏蛋白胨琼脂培养基^[3], 菌种鉴定用叠氮化物葡萄糖肉汤培养基^[4]。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离培养 将感病天牛幼虫浸入 75% 的酒精内 2 min, 然后移入 0.1% 升汞内 3~ 5 min, 再置于 10% 的硫代硫酸钠溶液中 3~ 5 min 后用无菌水冲洗 4 次, 置于灭菌纸上吸干表面水, 然后把灭菌注射器插入体腔内吸取体液, 并将其用无菌水稀释, 用划线分离法接

收稿日期: 2003-03-13

作者简介: 阿地力·沙塔尔(1968—), 男, 维吾尔族, 新疆莎车人, 讲师, 在读硕士研究生。

种到培养基上,放入 27 ℃ 恒温培养箱中培养,并观察菌落形态特征^[3]。

1.2.2 菌种鉴定 将划线分离法纯化所得的细菌根据形态特征及用简单染色、革兰氏染色、叠氮钠葡萄糖肉汤培养基培养、VP 反应等细菌学测定方法将纯化的细菌鉴定到属^[4]。

1.2.3 致病力试验

1.2.3.1 菌悬液的制备 从自然感病死亡的幼虫体分离纯化所得的菌落上加上 20 mL 无菌水,用小勺轻轻刮取分散的细菌菌落,并用血球记数板统计每毫升中的细菌数量(该菌液称原液,每毫升含 1.33×10^9 个细菌),备用。

1.2.3.2 供试幼虫的准备 从野外采集有天牛幼虫寄生的杨树枝条(长 30 cm),把虫瘿用刀纵向劈开,取出健康天牛幼虫。

1.2.3.3 接种 将健康天牛幼虫放在解剖镜下,用微量注射器吸取制备的菌悬液,经口接种,接种完后将天牛幼虫放回原虫瘿内,用细绳捆紧虫瘿,用蜡封住虫瘿缝隙后,将枝条下部浸入装有水的瓶内定期观察感病情况,一直观察到成虫羽化为止。

1.2.4 病原菌的再次分离培养 将人工接种感病死亡的幼虫同 1.2.1 的方法处理,然后用划线分离法纯化菌种,放入 27 ℃ 的恒温培养箱内培养并观察菌落形态特征。

1.2.5 病原物的再鉴定 将 1.2.4 分离纯化所得细菌进行鉴定,鉴定方法与 1.2.2 相同。

2 结果

2.1 症状比较

从自然感病幼虫症状与人工接种感病幼虫症状比较的结果(见表 1 及图 1、2)看出,自然感病幼虫与人工接种感病幼虫症状是一致的。

表 1 自然感病幼虫症状与人工接种感病幼虫症状比较

供试幼虫	感病症状
自然感病幼虫	感病中期行动迟缓,虫体变软,内脏器官解体,体壁颜色由浅黄色变为褐色,前胸褐色,后期虫体干缩变为黑褐色。
人工接种感病幼虫	初期虫体灰褐色,体内细胞开始液化,体表上有不规则斑点,虫体变软,腹部末段变灰色,后期虫体干缩变为黑褐色。

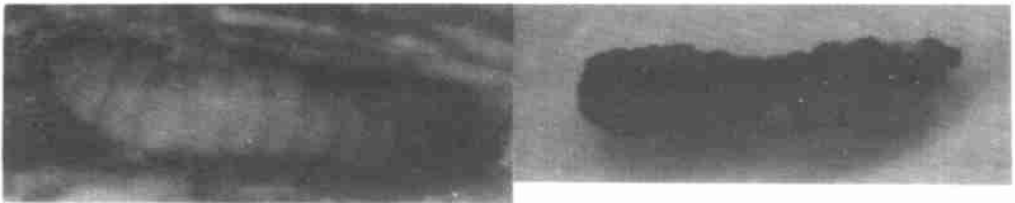


图 1 青杨楔天牛幼虫被链球菌感染后的症状:初期症状(左),后期症状(右)

2.2 培养性状比较

对感病天牛病原物分离培养成功后,于次年将培养所得的病原物人工接种到青杨楔天牛幼虫上,待幼虫发病死亡后进行了再次分离培养,进行了菌落形态特征比较,从结果(表 2)看,两次分离培养的病原物培养性状一致,说明为同一个病原物。

表 2 两次分离培养的细菌菌落形态特征比较

分离次序	菌落特点
第 1 次	纯化后第 1 d 长出的菌落乳白色透明, 表面光滑, 隆起, 构造为不规则状, 颜色加深, 不透明
第 2 次	纯化后菌落乳白色, 光滑, 隆起, 不透明, 后颜色纯乳白色, 表面光滑, 不透明

2.3 病原物的鉴定

经两次分离培养所得细菌, 在菌落形状、菌体大小及形状、革兰氏反应、VP 反应及在叠氮钠葡萄糖肉汤培养基上的形态特征等方面进行了对比, 从结果(表 3)看, 经两次分离培养所得细菌的形态特征、细菌学特性与链球菌属的特征相符合, 因此确认该菌属于链球菌属(图 2)。

图 2 链球菌的形态($\times 1350$), 链状营养体

表 3 两次分离培养的细菌主要特征及鉴定结果

分离次序	菌体形状	菌体大小/ μm	芽孢	鞭毛	革兰氏染色	VP 反应	叠氮钠葡萄糖肉汤培养基上的培养形状
第 1 次	菌落颜色乳白色, 菌体球状	0.5~1.0	无	无	阳性	阳性	生长良好, 形成椭圆形链状营养细胞
第 2 次	菌落颜色乳白色, 菌体球状	0.5~1.0	无	无	阳性	阳性	生长良好, 形成椭圆形链状营养细胞

2.4 致病性的确认

从表 1~3 可知, 自然感病幼虫的症状与人工接种感病幼虫的症状是完全一致的, 人工接种感病幼虫体上分离培养的细菌的特征与自然感病幼虫体上分离培养的细菌的特征是十分一致的, 因而认为该菌是青杨楔天牛的致病细菌。

2.5 致病性测定

将原液稀释到 50、100 倍菌悬液。按原液、50 倍、100 倍 3 种浓度对青杨楔天牛幼虫进行了致病性测定, 从结果(表 4)看出:

(1) 链球菌对青杨楔天牛幼虫有一定的致病力, 其致病力随稀释倍数增大而减小。如使用细菌原液处理的天牛幼虫的死亡率为 66.7%, 而稀释到 100 倍时, 则死亡率降到 26.7%。

(2) 接种浓度越高幼虫的感病高峰期出现越早, 当浓度降低时, 感病高峰期出现也晚。如细菌原液处理时, 在第 3 d 就出现了感病高峰期, 当稀释到 100 倍时, 则在 15 d 才出现感病高峰期。由此可见幼虫的死亡速率与菌液浓度成正比。

3 小结

据调查, 在林间自然条件下青杨楔天牛幼虫被该菌感染的死亡率达 13%。在自然状况下该天牛的自然寿命为 10~15 d 左右, 而本次处理组的羽化成虫寿命明显缩短, 即羽化的成虫 2

表 4 致病性测定结果

处理	供试幼虫数/头	各观察日期感病幼虫数/头						感病率/%
		3 d	6 d	9 d	12 d	15 d	18 d	
细菌原液	30	10	5	2	2	1	0	66.7
稀释 50 倍	30	3	5	4	2	0	0	46.7
稀释 100 倍	30	0	1	2	1	4	0	26.7
CK	30	0	0	0	0	0	0	0

~ 3 d 内全部死亡。可见, 该链球菌是一种非常有效的防治青杨楔天牛的病原微生物之一, 从本次试验看有着广阔的应用前景, 今后还需要在自然界中的传播途径、成虫的死亡机理、生物学特性等方面作进一步研究。

参考文献:

- [1] 吕鸿声, 钱纪放. 昆虫病理学[M]. 浙江: 浙江科学技术出版社, 1981. 71~ 72
- [2] 樊美珍, 郭超, 王成祥, 等. 西北地区主要林木害虫致病微生物种类初报[J]. 西北林学院学报, 1987, 2(1): 120- 126
- [3] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1987
- [4] G. O. 小波因纳, G. M. 托马斯著. 昆虫病原物鉴定诊断手册[M]. 段道怀, 胡明峻, 等译. 北京: 农业出版社, 1984.

Pathogenicity Research on *Streptococcus* sp. to *Saperda populnea*

ADIL • Sattar, JIANG Ping, SHI Deng-ming

(Forestry College, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China)

Abstract: The article describes the culture character and others major features of a pathogenic bacteria obtained from the larvae of *Saperda populnea*. The bacteria was identified as *Streptococcus* sp. The test to the larvae showed that the bacteria was pathogenic to the larvae of *Saperda populnea* and had higher pathogenicity.

Key words: *Saperda populnea*; pathogen; pathogenicity; *Streptococcus* sp.