一株侵染美国白蛾的黏质沙雷氏菌的分离鉴定及其致病性分析

Isolation, identification and pathogenicity analysis of a strain of bacterium *Serratia marcescens* infecting fall webworm *Hyphantria cunea*

陈 林[1] 胡宇欣[1] 李 茵[2] 黄丽莉[1*]

（1. 豫章师范学院生态与环境学院，南昌 330103；2. 南昌海关技术中心，南昌 330038）

Chen Lin[1] Hu Yuxin[1] Li Yin[2] Huang Lili[1*]

（1. College of Ecology and Environment, Yuzhang Normal University, Nanchang 330103, Jiangxi Province, China; 2. Technology Center of Nanchang Customs, Nanchang 330038, Jiangxi Province, China）

美国白蛾*Hyphantria cunea*是一种世界性检疫害虫，对我国农林业生产与生态安全构成严重威胁。当前，化学农药仍是防控该害虫的主要手段，但长期使用易导致其抗药性增强，且还会污染环境及损伤非靶标生物。因此，挖掘环境友好型的生物防治资源具有重要意义。黏质沙雷氏菌*Serratia marcescens*是一种广泛存在于自然界的昆虫病原细菌，其代谢产物灵菌红素对多种农林害虫均有致病性（Zhang et al.，2023），但目前关于该菌对美国白蛾致病性的研究很少。本研究从自然感病美国白蛾幼虫中分离获得1株菌株，对其进行鉴定和致病性评价，以期为美国白蛾的生物防治提供微生物资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试虫源：美国白蛾幼虫样本于2024年9月采集自湖北省孝感市，从中挑选有体色变红、虫体干瘪萎缩等典型感染症状的幼虫用于分离致病菌，挑选健康幼虫于温度（25±1）℃、相对湿度（70±5）%、光周期16 L∶8 D条件下以人工饲料（曹利军等，2014）饲养繁殖，取子代健康3龄幼虫供试。

试剂及仪器：细菌基因组DNA提取试剂盒、PCR试剂，生工生物工程（上海）股份有限公司；营养琼脂（nutrient agar，NA）固体和液体培养基，北京陆桥技术股份有限公司；其余试剂均为国产分析纯。ABI ProFlex PCR仪，美国Applied Biosystems公司；Axio Imager 2生物显微镜，德国Zeiss公司；KBWF720人工气候箱，德国Binder公司。

1.2 方法

病原菌分离及形态学鉴定：将感病幼虫用75%乙醇表面消毒30 s，无菌水冲洗3次。取幼虫血淋巴及内部组织研磨制成悬液，涂布于NA固体平板上，28 ℃培养24~48 h。挑取形态明显且呈粉红色的单菌落，划线培养纯化3次以上获得纯培养物，命名为YZNUH-02，保存于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心。将该菌株接至NA固体平板上，28 ℃培养3 d，观察菌落形态、颜色、光泽等特征，并经革兰氏染色后于光学显微镜下观察菌体形态。

病原菌分子生物学鉴定：采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取纯化菌株的DNA。利用引物27F（5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′）和1492R（5′-GGTTACCTTGTTACGACTT-3′）扩增*16S rDNA*基因。25 μL PCR反应体系：DNA模板1 μL、上下游引物各1 μL、2×*Taq* PCR Master Mix 12.5 μL，用双蒸水补足。反应程序：94 ℃预变性5 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸1 min，35个循环；72 ℃终延伸10 min。产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后测序，测序结果在NCBI数据库进行BLAST比对，下载相似度高的相关序列，用MEGA 11.0软件以邻接法构建系统发育树，bootstrap设为1 000。引物合成和测序委托生工生物工程（上海）股份有限公司完成。

致病性验证：将供试菌株接至NA液体培养基中，28 ℃、180 r/min振荡培养24 h，以1 000 r/min离心3 min收集菌体，用生理盐水调浓度至1.0×10^4、1.0×10^5、1.0×10^6、1.0×10^7、1.0×10^8 CFU/mL。选取健

基金项目：国家自然科学基金项目（32360270），江西省大学生创新训练项目（S202513774021），豫章师范学院科研创新团队建设计划项目（YZTD202305）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：121120328@qq.com

收稿日期：2026-03-31

康且大小一致的美国白蛾3龄幼虫，饥饿4~6 h。将人工饲料浸入菌悬液中10 s，以浸入生理盐水为对照，取出晾干后饲喂幼虫。每个处理30头幼虫，3次重复。每日观察并记录幼虫死亡情况，计算累计校正死亡率。采用SPSS 26.0软件Probit模块进行毒力分析，计算致死中浓度LC_{50}和致死中时LT_{50}。

2 结果与分析

2.1 分离菌株的形态学和分子生物学鉴定结果

菌株YZNUH-02在NA固体培养基上的菌落为圆形，边缘规整，表面光滑湿润；培养初期呈白色，后期变为粉红色至红色，并显现金属光泽。革兰氏染色为阴性，菌体呈杆状，大小约（0.5~1.0）μm×（1.0~2.0）μm。初步鉴定属于沙雷氏菌属*Serratia* sp.。

菌株YZNUH-02经PCR扩增获得约1 000 bp的*16S rDNA*序列，BLAST比对显示其与黏质沙雷氏菌的相似度达99%以上，且其在系统发育树中与已报道的黏质沙雷氏菌聚于同一分支，最终将其鉴定为黏质沙雷氏菌*S. marcescens*。

2.2 分离菌株的致病性验证结果

菌株YZNUH-02对美国白蛾3龄幼虫有较强的致病性，接种幼虫活动能力下降，取食减少，体色逐渐变为暗红色，后期虫体呈红棕色、柔软、脓状溃烂，并伴有明显异味。随着菌悬液浓度升高，幼虫累计校正死亡率显著增加，1.0×10^8 CFU/mL处理后10 d的累计校正死亡率达90.00%，13 d时达93.33%。该菌株对美国白蛾3龄幼虫的LC_{50}随接种时间延长而降低，13 d时为9.44×10^2 CFU/mL；1.0×10^8 CFU/mL处理下LT_{50}为4.12 d（表1）。

表1 黏质沙雷氏菌YZNUH-02对美国白蛾3龄幼虫的LC_{50}及LT_{50}

Table 1 LC_{50} and LT_{50} of *Serratia marcescens* YZNUH-02 against the 3rd instar larvae of *Hyphantria cunea*

时间 Time/d	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LC_{50}（95%置信区间） LC_{50} (95% confidence interval)/(CFU/mL)	浓度 Concentration/(CFU/mL)	毒力回归方程 Toxicity regression equation	LT_{50}（95%置信区间） LT_{50} (95% confidence interval)/d
2	$y=-10.272+0.526x$	1.04×10^{10}（1.13×10^9–4.07×10^{12}）	1×10^8	$y=-6.906+0.348x$	4.12（3.15–5.24）
4	$y=-8.082+0.322x$	3.65×10^9（4.73×10^8–2.05×10^{11}）	1×10^7	$y=-7.083+0.303x$	5.85（4.42–7.36）
6	$y=-7.426+0.324x$	3.10×10^7（1.10×10^7–1.45×10^8）	1×10^6	$y=-7.292+0.279x$	7.68（6.25–9.31）
8	$y=-7.135+0.371x$	5.73×10^5（2.53×10^5–1.22×10^6）	1×10^5	$y=-7.666+0.280x$	9.24（7.68–11.05）
10	$y=-6.893+0.411x$	4.07×10^4（1.34×10^4–9.25×10^4）	1×10^4	$y=-7.724+0.251x$	11.52（9.85–13.76）
12	$y=-6.576+0.436x$	4.13×10^3（7.31×10^2–1.24×10^4）			
13	$y=-6.345+0.452x$	9.44×10^2（7.98×10^1–3.85×10^3）			

y为死亡率的概率值，x为菌悬液浓度对数值。y denotes the mortality probability, and x represents the logarithm of bacterial suspension concentration.

3 讨论

本研究将从自然感病美国白蛾幼虫中分离获得的菌株YZNUH-02鉴定为黏质沙雷氏菌，3龄幼虫感染该菌后活动减弱，取食减少，体色逐渐变为暗红色，后期组织液化呈脓状，与程瑞春等（2020）报道黏质沙雷氏菌侵染柞蚕*Antheraea pernyi*蛹引起的症状相似。黏质沙雷氏菌的致病性与其分泌的几丁质酶、蛋白酶等胞外水解酶密切相关，这些酶可破坏昆虫中肠围食膜结构，促进病原菌侵入血腔；且其代谢产物灵菌红素有免疫抑制作用。Zhang et al.（2023）通过转录组分析发现黏质沙雷氏菌侵染可显著下调美国白蛾幼虫免疫相关基因表达，干扰黑化反应，削弱宿主防御能力。本研究观察到的病理变化与上述研究结果相符，表明菌株YZNUH-02具有开发为微生物杀虫剂的潜力。后续应进一步开展田间应用效果、环境适应性及规模化生产工艺等研究，为其产业化应用提供技术支撑。

参 考 文 献（References）

Cao LJ, Yang F, Tang SY, Chen M. 2014. Development of an artificial diet for three lepidopteran insects. Chinese Journal of Applied Entomology, 51(5): 1376−1386 (in Chinese) [曹利军, 杨帆, 唐思莹, 陈敏. 2014. 适合三种鳞翅目昆虫的一种人工饲料配方. 应用昆虫学报, 51(5): 1376−1386]

Cheng RC, Cui JG, Wang HK, Gao GP, Sun SH, Qi JY, Wang Y. 2010. Isolation and identification of *Serratia marcescens* C3: the pathogen causing an *Antheraea pernyi* pupal bacterial disease. Microbiology China, 37(6): 829−833 (in Chinese) [程瑞春, 崔建国, 王洪魁, 高国平, 孙守慧, 祁金玉, 王月. 2010. 柞蚕蛹期灵菌败血病*Serratia marcescens* C3菌株分离鉴定. 微生物学通报, 37(6): 829−833]

Zhang L, Tang XY, Wang ZQ, Tang F. 2023. The transcriptomic response of *Hyphantria cunea* (Drury) to the infection of *Serratia marcescens* Bizio based on full-length SMRT transcriptome sequencing. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 13: 1093432

（责任编辑：李美娟）