

館存

昆虫微生物学与 昆虫病理学实验指导

马蒂格诺尼、史泰奥斯著
苏德明译 忻介六校



.185405

11

1.1

高等教育出版社

昆虫微生物学与 昆虫病理学实验指导

马蒂格诺尼、史泰奥斯著
苏德明译 忻介六校

高等教育出版社

本书是根据马蒂格诺尼与史泰奥斯(Martignoni, M. E. and Steinhäus, E. A.)两氏著的“昆虫微生物学与昆虫病理学实验指导(Laboratory Exercises in Insect Microbiology and Insect Pathology, 1961)翻译的。

本书共包括十二个实验, 比较全面地叙述了研究昆虫与微生物之间的关系, 以及昆虫的细菌病、真菌病、病毒病、原生动物病及线虫病等; 并以其他各种基本操作方法与昆虫病原的分类阶梯列为附录。本书是系统地研究昆虫微生物学与昆虫病理学的一本指导书, 可供综合大学和高等师范院校生物系、农学院植保系以及有关科学工作者的参考。

昆虫微生物学与昆虫病理学实验指导

马蒂格诺尼、史泰奥斯著

苏德明译 忻介六校

北京市书刊出版业营业许可登记证字第119号

高等教育出版社出版(北京景山东街)

人民教育印刷厂印装

新华书店北京发行所发行

各地新华书店经售

统一书号K13010·1214 开本 590×1168 1/32 印张 8 1/16

字数 80,000 印数 0,001—2,000 定价(5) 0.34

1965年11月第1版 1965年11月北京第1次印刷

前 言

本书企图给予学生熟悉昆虫和微生物之间存在的若干关系的机会。实验课的前半部分用实物对学生说明昆虫与微生物之间的一般关系(昆虫作为其体外微生物的偶然寄主);其次探讨其间较亲密的关系(作为细胞内外共生物的互惠共生性原生动植物;蜚蠊的细胞内共生物);最后,则侧重于昆虫的致病微生物、疾病本身的性质及由病原与寄主间相互作用所造成的病理变化。可惜,昆虫病理学的某些方面(例如疾病对昆虫种群的影响)无法在实验室内进行示范或实验。

在使用本书时,学生应牢记,它只是概要。在每一实验中学生所能完成的与其说是有赖于其是否遵循条文行事,还不如说取决于其是否具有由此充分学习的愿望,与是否反复思考面临的问题。除严格的科学客观性外,想象、创造以及判断能力都是优秀学生的特色。完成本书中所列的工作只是达到了课程的最低要求。除此之外,究竟能完成多少主要取决于学生本人。

由于实验室工作的进度主要决定于有关活体的性质,所以实验室工作不能都和讲课衔接。当然,在可能时就尽量与讲课配合。无论如何,学生应经常参考“昆虫病理学”(1949)的教科书及其他文献,而其多数已作为与学生实验工作有关的知识列举于本书中。

最后,希望学生体谅教师,对于偶然出现的前后矛盾和反复无常的情况需有耐心,这些都是活体实验工作中不可避免的。我们应当牢记,微生物和昆虫两种生物虽然不象某些歌剧女高音手那么神经质,但是微生物、昆虫和人们的最完备的策划“也会出差错,而带给我们的只是对于那有待实现的快慰所感到的悲伤和痛苦而已。”

对教师的建议

本书所包括的实验是按照一学期内学习完毕的要求而制订的。每次实验时间为3小时,每周一次,课堂讲授应安排在实验之先。教师应合理安排实验与讲授的材料,使学生在进入实验室时已详知实验内容。实验的顺序则不一定要按本书进行(虽然在加州大学开设的课程中已证明其极为适用)。

本课程目的之一是使学生尽量全面熟悉昆虫与微生物之间存在的关系,每次实验最好准备额外的材料(组织制片,培养物等),并用不同的病例,互惠共生等之间的异同进行示范。这将扩大学生对昆虫微生物学和昆虫病理学的知识面。一般在学期末可用一次实验时间就整个昆虫病理学领域进行考试并讨论组织制片。学生应对未标记的制片加以描述,并指出病因。这次实验极为紧张,教师可从此判断学生对本领域的理解、归纳和演绎的能力,同时这也是一次复习课。

教师的最重要任务之一是准备实验用的活材料。为简化此项任务,应只选用实验室条件下易饲养、或由田间易采集的几种昆虫反复使用。这样对学生也有好处,由此可以熟悉昆虫寄主,并便于鉴别各种综合的病症。例如,在下列的表内,四次实验使用斑色夜盗虫(*Peridroma margaritosa* (Haworth)),面粉蝶(*Pieris rapae* (Linnaeus))则使用三次。

下表列举昆虫寄主及其有关的微生物。表中并附有关于准备材料的说明,系经加州大学昆虫病理学课几年使用所制定的。虽然所选的生物对该课程似甚适用,但其他生物也可望成功。教师可根据季节(冬季或春季课程)、虫种分布、有无病原等条件决定采用的生物。

实 验	虫 种	准 备 工 作 及 注 意 事 项
第 一 次	斑色夜盗虫	用苜蓿和马铃薯喂饲。用第五龄幼虫(倒数第二龄)试验。杀菌剂为 Hyamine 10-x 0.4%水溶液。
第 二 次 第 二 节	斑色夜盗虫, 乳草蛾 (<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Dallas)), 或其他种类	把幼虫分为两组: 一组仅喂饲马铃薯, 另一组则喂饲苜蓿。这样, 学生即可获得不同类型的平板培养。这些平板培养(于第三次实验检视)与以乳草蛾为材料所制备的不同。
第 二 次 第 三 节	白蚁 <i>Termopsis angusticollis</i> Hagen, 披发虫属 (<i>Trichonympha</i>), 毛滴虫属 (<i>Trichomonas</i>), 曲鞭虫属 (<i>Streblomastix</i>), 三鞭虫属 (<i>Trimastix</i>) 与巨鞭虫属 (<i>Dinenympha</i>) 的各种原生动物	只应使用刚采集的昆虫。在实验室内只可保存数日。白蚁长期饲养在不良条件下就会失去部分或全部的原生动物。
第 三 次 第 二 节	德国姬蜂 (<i>Blattella germanica</i> (Linnaeus))	以供犬吃的饼干饲养昆虫。
第 四 次	斑色夜盗虫, 大肠杆菌, 苏芸金杆菌	实验课前 2—4 小时用高剂量的大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i> (Migula) Castellani and Chalmers) 悬液或苏芸金杆菌 (<i>Bacillus thuringiensis</i> Berliner) 的新鲜培养物 (2天) 悬液注射接种在几只幼虫血管内, 以示吞噬现象。
第 五 次	家蚕 (<i>Bombyx mori</i> (Linnaeus)), 苏芸金杆菌	用桑叶喂饲昆虫, 在实验课前 24—48 小时使口服苏芸金杆菌孢子培养物悬液进行感染。用玻璃注射针与微量注射器。
第 六 次		第五次实验课后 3—4 天, 教师和学生应尽可能检视该课内所制备的平板培养, 并从平板分离出两支菌株至琼脂斜面。教师

续前表

实 用	虫 种	准 备 工 作 及 注 意 事 项
		应让每位学生挑取一个苏芸金杆菌培养物和一个非病原的培养物。
第七次	粉蝶,白僵菌(<i>Beauveria bassiana</i> (Balsamo) Vuillemin)	用芥菜叶片喂饲幼虫,实验课前4—5天将真菌孢子的菌粉涂抹于两组粉蝶上使其感染。为获取大量孢子可用马铃薯葡萄糖琼脂培养真菌。最迟在第七次实验课前两周制备培养物。为提高真菌感染的死亡率,需将幼虫保持在极高的相对湿度中。
第八次	粉蝶,颗粒病毒	粉蝶与其颗粒病毒是教师示范病毒测定试验结果的极好生物。教师应查阅文献,了解方法的细节,但也可将本书所列的虚构数据供学生使用而无需示范。
第九次	斑色夜盗虫,核多角体病毒	用草片喂饲幼虫,以口服方法使两组幼虫感染,一组在第九次实验课前16天,另一组在前8—10天。
第十次 第一节	斑色夜盗虫,粉蝶,两种颗粒病毒	在第十次实验课前7—9天用口服方法感染两种幼虫。这两种昆虫和两种病毒可以验证两种类型的病毒特性:单器官嗜性和多器官嗜性。
第十一次	地中海粉蛾 (<i>Anagasta kuhniella</i> (Zeller)), 双孢马特簇虫 <i>Mattesia diaspore</i> Naville, 这段期间自然界中可以采到的各种昆虫微孢子虫	以“Zoom”牌或其他类似的当月新出厂麦片喂饲幼虫。感染的种群在实验室中不须长期饲养。教师应于本实验课前几天到外界勘察,寻找感染的幼虫。为使长期在活体中保存微孢子虫的孢子,并在实验室内感染幼虫不是经常能顺利成功的,因此教师应使用自然界中微孢子虫的贮存源。
第十二次	蜡蛾(<i>Galleria mellonella</i> (Linnaeus)), DD-136 线虫	以下列混合物喂饲幼虫(按体积计):蜂蜜10份,甘油10份,水5份,“Fabrum”饲料120份。经拌和后保存于冰箱内待用。依照本书所述方法在实验课前5—7天感染的幼虫体内通常有线虫的雄虫、雌虫及幼体。万一受感染的蜡蛾幼虫体内的线虫幼体尚未产生围鞘,则应准备因鞘幼体的悬液。

总的说明

1. 选读昆虫病理学的学生应向教师报到，然后分配实验台与显微镜。
2. 学生应自备记录本、绘图纸、铅笔、解剖器械(直镊子、弯头镊子及小剪刀各一把，和二支解剖针)、载玻片与盖玻片。
3. 学期开始时发给学生最常用的实习材料与设备：本生灯、染色盘、试管架及接种环各一只，消毒器械用酒精一瓶、染色缸一套、洗瓶一只、盛于滴瓶内的染色液一套、蜡笔一支、貯放培养物的 0.56 升装纸盒与麻醉昆虫用的 0.28 升装纸盒各一只。均盛装在一只托盘内，贴上标签，写上姓名，每一实验结束时将托盘放入橱内。
4. 根据情况领用其他设备与材料。
5. 学生对于发给的设备应妥为保养。
6. 学生应熟悉所研究的机体性质、实验的技术和原理。在每次实验前应研读本实验指导。实验中产生的许多问题可在这本指导中找到答案。
7. 实验结果应逐日仔细记录，并将自己的观察写成报告。必要时可将记录和绘图，结合本指导在每一实验后进行。实验室工作的成绩主要根据其质量、记录的优劣和齐整程度，以及创造性来评定。
8. 由于选修本课程的学生已修毕细菌学或其他微生物学课程，故此处对微生物学技术不再作详细说明。如学生对于各种消毒设备的使用、微生物学玻璃器皿的准备和使用原理已忘却，希望对此仔细复习。

实验台与设备的保养

1. 病理学工作中对双手、实验台与设备务宜严守清洁。因其他班级也将共同使用实验台,故于工作前应将台面揩净,并经常保持实验台和设备整洁,使随时可以使用。
2. 为免受微生物污染,揩擦台面应使用杀菌液。每一组四位学生可共同使用一瓶杀菌液与一把拖帚。
3. 所有器械皆需按 Gey 氏方法消毒。备用的器械应浸渍在 95% 酒精内,每件器械在使用前才从容器中取出,用火烧去酒精。这个消毒措施并应重复进行一次。
4. 由于制备培养物时无法配备接种室或接种罩,应采取适当的预防办法避免再度污染。应学会如何用火烧灼设备,避免交谈或在外露的培养材料上方作不必要的动作。已消毒的试管或瓶在开启时应经常斜放。
5. 本课程使用的微生物一般虽对人体并不传染,但仍应认为所有培养物与感染材料对人体有感染潜力,并按此进行操作。
6. 所有已使用的污染材料和玻璃器皿应按教师的指示集中于盘中,并预备消毒容器(盛有杀菌液)一只,以处理有致病微生物所污染的材料。
7. 为免混淆,所有培养、冷藏或贮存的培养试管等物应明显加以标签或以蜡笔标记,并写上学生的姓名。

显微镜的保养

1. 在分配给学生的实验台每一座位上都有两架显微镜（立体显微镜与单物镜显微镜）。此外，每一学生或一组学生配给有油镜头的显微镜一架。学生对配给的仪器需要仔细保养。
2. 提取显微镜时应手持镜臂。不用时就放置在镜箱内。
3. 应保持镜头滴尘不染。揩擦镜头时只可使用擦镜纸，普通棉布会刮伤光学玻璃，不可使用。目镜上的灰尘在转动目镜观察时成为点点斑痕。物镜上的污物也妨碍观察，使物体模糊不清。若有湿润制备物触及物镜时需揩净镜头才能观察清楚。
4. 需用液体揩净干燥的物镜、聚光器与目镜时可使用蒸馏水，油镜与聚光器上方的透镜则应使用二甲苯。揩擦时所用的溶剂不宜过多，且在事后应立即以新的擦镜纸揩干透镜。
5. 每次实验结束后，应以擦镜纸仔细揩净透镜，尤应注意聚光器与油镜头，切勿留下油迹。最后将显微镜放入同一编号的镜箱内。

目 录

前言	iii
对教师的建议	iv
总的说明	vii
实验台与设备的保养	viii
显微镜的保养	ix
实验一	1
1. 实验台和显微镜的分配: 总的说明	1
2. 昆虫体表消毒	1
实验二	3
1. 昆虫体表消毒	3
2. 正常昆虫的细菌区系	3
3. 白蚁的互惠共生性原生动植物	5
实验三	9
1. 正常的昆虫细菌区系	9
2. 蜥蜴的胞内共生	12
实验四	14
血液学技术	14
实验五	20
昆虫的细菌感染	20
实验六	24
1. 昆虫的细菌感染	24
2. 微量注射和微量喂饲	26
实验七	28
1. 昆虫的细菌感染	28
2. 昆虫的真菌感染	28
实验八	32
平均致死剂量的估计	32

实验九	40
鳞翅目昆虫的核多角体病	40
实验十	42
1. 鳞翅目昆虫的颗粒体病	42
2. 电子显微镜术	44
实验十一	45
昆虫原生动植物病	45
实验十二	49
昆虫线虫病	49
附录一 方法	52
附录二 昆虫病原的分类阶梯	62

实验一

1. 实验台和显微镜的分配:

总的说明

2. 昆虫体表消毒

说 明

许多微生物和正常的健康昆虫有关连。微生物种类的变化主要决定于昆虫的环境。土栖昆虫体表上的多数细菌都是常见的土壤细菌，而动物体外生活的昆虫则有与动物毛皮有关的细菌。假若昆虫习性随季节改变，则其微生物区系在数量与质量上都会改变。研究昆虫体内微生物的区系、关于昆虫体壁或血淋巴的无菌工作(例如组织培养)均须消毒虫体外表。

步 骤

1. 将一条幼虫与一团浸有乙醚的棉花同时放入加盖的小瓶内，麻醉一二分钟，如有必要，时间可稍长些。
2. 自瓶中取出幼虫，并用丝线或棉线结扎口孔和肛门。
3. 将幼虫在杀菌液中浸渍5分钟。同时充分摇动。
4. 以无菌蒸馏水将幼虫漂洗三次。
5. 将幼虫浸入盛有氢硫酸盐培养液的试管内，摇动，再用烧灼过的铂丝环取出幼虫。必

需用器材

幼虫一条
加盖的小瓶一只
棉花
乙醚
镊子一把
缝纫用丝线或棉线
加塞指管，盛以10毫升杀菌液
指管3只，各盛30毫升杀菌液
铂丝接种环一只
试管一支，盛以12毫升氢硫酸盐培养液

要时可將昆蟲放置在無菌培養皿中，在冰箱中保存。

6. 將培養基在室溫中培育。記錄其結果。
7. 用另一條幼蟲重複步驟 1—6。勿搖動幼蟲(參看步驟 3)。

0.56 升紙盒一只，貯放試管用

参考文献

- Angus, T. A. 1952. The aerobic bacteria associated with the eastern hemlock looper *Lambdina fiscellaria* (Gn.). *Canad. J. Zool.* 30:208—212.
- Difco Manual. 1953. Difco Laboratories, Detroit, ninth ed., 350 pp. (Sterility test media: pp. 195—203).
- McCulloch, E. C. 1946. Disinfection and sterilization. Lea and Febiger, Philadelphia, second ed., 472 pp.
- Martignoni, M. E., and J. E. Milstead. 1960. Quaternary ammonium compounds for the surface sterilization of insects. *J. Insect Pathol.* 2:124—133.
- Reddish, G. F., ed. 1957. Antiseptics, disinfectants, fungicides, and chemical and physical sterilization. Second edition. Lea and Febiger, Philadelphia, 975 pp. (Chapter by J. H. Brewer: pp. 158—174).
- Steinhaus, E. A. 1946. Insect microbiology. Comstock Publishing Co., Ithaca, x+763 pp. (Methods and procedures: pp. 573—601).
- Steinhaus, E. A. 1949. Principles of insect pathology. McGraw-Hill Book Co., New York, xi+757 pp. (External microbiota: pp. 84—97).
- Steinhaus, E. A. 1953. Diseases of insects reared in the laboratory or insectary. *Calif. agric. Exper. Sta., Extension Service, Leaflet No. 9*, 26 pp. (Chemical sterilization and disinfection: pp. 12—19).
- Sykes, G. 1953. Disinfection and sterilization. D. Van Nostrand Company, Inc., Princeton, New Jersey. xviii+396 pp.

实验二 1. 昆虫体表消毒

检视实验一所制备的培养物。记录其结果。

2. 正常昆虫的细菌区系

说 明

虽然昆虫的环境能决定昆虫体表的微生物种类，但正常消化道的微生物区系则常表现不同程度的特化现象。学生在本实验中仅学习一类微生物，即细菌。

通常最简单的消化道有极单纯的细菌区系，和体表细菌区系的情况一样，由偶然性的种类所组成。消化道较复杂的昆虫在其支囊内常有极特化的微生物区系，如半翅目昆虫胃盲囊中。取食习性对细菌区系组成在质量与数量上均有很大影响。食腐昆虫的区系较食性特化的昆虫更多样化。某些吸血昆虫的消化道是无菌的。另一些昆虫，如丝光绿蝇 (*Lucilia sericata*) 幼虫的部分消化道(一般是后段)是无菌的。就几种鳞翅目昆虫幼虫的好气性肠道细菌所进行的若干研究证明，这类区系主要是偶然性的。然而，由于鳞翅目昆虫中肠的碱性可能对某些食入的细菌不利，中肠贲门部和幽门部的细菌区系可出现差异。

本实验的目的在于培养昆虫体表和肠道的细菌，以确定这两种细菌种群之间有无差异，若有差异，就进行详细研究。

步 驟

1. 将一条幼虫与一团浸有乙醚的棉花同时放入加盖的小瓶内，麻醉1或2分钟，如有必要，时间可稍长。
2. 从瓶中取出幼虫，封闭其口孔和肛门(以丝线或棉线扎结，或用融化的石蜡和石蜡油的混合物堵塞)。
3. 将幼虫放入盛有1毫升无菌盐水的无菌试管中，充分摇动使各种细菌洗落盐水中。
4. 将接种环消毒，浸入有细菌洗落的盐水中后，在营养琼脂平板上划线接种(参看附录一的方法)。
5. 重复步骤4，以增加接种量。
6. 从盐水中取出昆虫，移至盛有杀菌液的玻管内，充分振荡5分钟。
7. 将幼虫在无菌蒸馏水中洗涤三次。
8. 将幼虫放在无菌培养皿中，沿背中线或侧线剪开体壁，露出肠管。切勿剪破肠管上皮。
9. 切断前肠和后肠，使中肠与虫体其余部分分离。手术时剪刀要擦干净，并用火烧灼。将中肠移入无菌培养皿中。

需用器材

加盖小瓶一只
棉花
乙醚
镊子一把
缝纫用丝线或棉线
石蜡与石蜡油比例为3比1，已融化的
试管一支，内盛无菌盐水(0.85% NaCl) 1毫升
接种环
培养皿一只，盛有固体培养基(营养琼脂)
与步骤4相同
加塞指管(30×90毫米)一只，内盛杀菌液10毫升
指管(30×90毫米)三只，各盛无菌蒸馏水30毫升
无菌培养皿一只
剪刀一把
镊子一把
无菌培养皿一只
细布

假若中肠是从极小型的昆虫中取出，则对此器官的整个好气性细菌区系制成一个单独的标本进行研究。

但若中肠相当大，则可分段加以研究。

10. 将中肠剪为三段，分别将贲门部与幽门部放在培养皿内未污染处，并抛弃其中段。在手术过程中必须把所有的器械用火烧灼，并尽可能将培养皿盖住。
11. 用无菌操作分别将两段中肠移入两只无菌试管内。为避免混淆，应立即标记。
12. 用无菌玻棒将中肠研碎。斜持玻管。仅于必要时才加入一滴无菌盐水。
13. 划线接种于营养琼脂平板上（参看附录一的方法）。
14. 倒置平板，在室温内培育。

封口的无菌试管二只

无菌玻棒二支

(盐水)

(移液管)

接种环

培养皿两只，内盛固体培养基(营养琼脂)

参考文献

- Angus, T. A. 1952. The aerobic bacteria associated with the eastern hemlock looper *Lambdina fiscellaria* (Gn.). *Canad. J. Zool.*, 30: 208—212.
- Steinhaus, E. A. 1946. *Insect microbiology*. Comstock Publishing Co., Ithaca, x+763 pp. (Extracellular bacteria and insects: pp. 9—37.
- Steinhaus, E. A. 1949. *Principles of insect pathology*. McGraw-Hill Book Co., New York, xi+757 pp. (Internal extracellular bacteria: pp. 98—106).

3. 白蚁的互惠共生性原生动物

说 明

白蚁与各种鞭毛虫之间的关系是最有趣的昆虫与微生物共生