

2株昆虫病原线虫共生菌的分离与初步分类鉴定^{*}

王永宏, 张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 从陕西杨凌采集的昆虫病原线虫 *S. teinernæ* sp. YL 001 和 *S. teinernæ* sp. YL 002 肠道内分别分离到1株具有较高杀虫和抑菌活性的共生菌菌株 YL 001 和 YL 002, 并对其从形态特征、培养特性及生理生化特征等方面进行了鉴定。结果表明, YL 001 和 YL 002 菌株分别为嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus nematophila*) 和伯氏致病杆菌 (*Xenorhabdus bovienii*)。

[关键词] 昆虫病原线虫; 共生菌; 共生菌分离; 共生菌鉴定

[中图分类号] S476⁺. 11

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)12-0174-07

昆虫病原线虫共生菌是寄生于昆虫病原线虫肠道内的一种革兰氏阴性细菌, 属肠杆菌科^[1], 包括致病杆菌 (*Xenorhabdus*) 和光杆菌 (*Photorhabdus*) 2个属, 分别与斯氏线虫 (*S. teinernæ*) 和异小杆线虫 (*Heterorhabditis*) 共生。线虫携带共生菌通过气门、肛门、节间膜等自然孔口进入昆虫体内, 将共生菌释放到昆虫血腔中, 并在其中大量繁殖, 产生毒素和抑菌物质, 使昆虫患败血症死亡。昆虫病原线虫共生菌一方面可直接作为线虫营养源, 同时可分解其他营养物质满足线虫繁殖发育所需; 另一方面共生菌可产生大量抑菌物质, 抑制其他杂菌的污染, 为线虫的生长发育繁殖提供理想的环境。

致病杆菌和光杆菌的次生代谢产物具有抑菌、杀虫和抗肿瘤等多种活性, 在医疗卫生和农业领域具有广阔的应用前景和较大的商业潜力^[2]; 其中光杆菌产生的毒素蛋白具有较高的杀虫活性, 毒力与苏云金芽孢杆菌 (*Bt*) 相当^[3]。毒素蛋白的发现拓展了共生菌单独作为生防剂的应用范围, 如可将毒素蛋白的基因转入植物的基因组中, 提高植物的抗虫性。因此, 昆虫病原线虫共生菌已成为具有极大开发潜力和应用前景的一类新型生物资源, 对共生菌菌株资源及其分类研究亦日益受到重视。

目前, 昆虫病原线虫共生菌的分类鉴定主要采用表型及生理生化特征分析^[4]、DNA/DNA 杂交^[5-6]和16S rDNA 分析^[7-9]等方法。尽管分子生物学分类等方法得到广泛的应用, 但表型特征对于新分离菌株的鉴定仍是重要的分类指标, 是菌株鉴定不可缺

少的部分, 特别是对共生菌产生的脂肪酶、蛋白酶、胞内晶体蛋白、色素、抗生素以及其他某些特征的研究, 会进一步加深对共生菌的了解和认识, 而且对编码上述物质的功能基因结构的研究, 有利于从分子生物学水平上揭示其差异。生理生化特征在种间的某些差异, 可以作为种间的分类依据, 如根据某些特异的生理生化特征可以将菌株进行归类。本研究从陕西杨凌采集的昆虫病原线虫 *S. teinernæ* sp. YL 001 和 *S. teinernæ* sp. YL 002 的肠道内分别分离到1株具有较高杀虫和抑菌活性的共生菌菌株 YL 001 和 YL 002, 并采用表型及生理生化特征分析法对这2个菌株进行初步分类鉴定, 以明确其分类学地位, 为进一步深入研究奠定基础, 并为其他共生菌株的分类鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试线虫和昆虫 供试昆虫病原线虫为 *S. teinernæ* sp. YL 001 和 *S. teinernæ* sp. YL 002, 供试昆虫为大蜡螟 (*Galleria mellonella*), 均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.1.2 供试病原菌 烟草赤星菌 (*Alternaria alternata*)、番茄早疫菌 (*Alternaria solani*)、辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*)、南瓜枯萎菌 (*Melon fusarium wilt*)、西瓜枯萎菌 (*Fusarium oxysporum f. sp. niveum*)、棉花枯萎菌 (*Verticillium dahliae*)、苹果炭疽菌 (*Clam erela cinyulate*)、黄瓜炭疽菌 (*Col-*

^{*} [收稿日期] 2006-01-06

[基金项目] 国家863项目(2003AA 241140)

[作者简介] 王永宏(1968-), 男, 陕西凤翔人, 副教授, 博士, 主要从事生物农药及发酵技术研究。E-mail: yhwang68@126.com

letotrichum lagenarium)、番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*)、杨树溃疡菌(*Dothiorella gregaria*)、苹果干腐菌(*Botryosphaeria berengeriana*)、稻瘟菌(*Pyricularia oryzae*)、小麦纹枯菌(*Rhizoctonia cerealis*)、水稻白叶枯菌(*Xanthomonas campestris*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和沙门氏菌(*Salmonella typhi*)，均由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.1.3 培养基 (1)斜面及平板培养基。NA培养基(牛肉膏3.0 g, 蛋白胨5.0 g, 营养琼脂20 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.2~7.4)。

(2)共生菌鉴别培养基。NBTA培养基(NA培养基+氯化三苯基四氮唑(TTC)0.040 g+溴麝香草酚兰(BTB)0.025 g);麦康凯培养基(MacConkey)。

(3)摇瓶发酵培养基。YS培养基($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 5.0 g, 酵母提取物5.0 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 7.0)。

1.2 昆虫病原线虫共生菌的分离

用体积分数0.1%甲醛溶液将侵染期线虫(IIs)浸泡消毒3次, 30 min/次, 每次消毒完后用无菌水冲洗。随后用1 g/L乙汞硫代水杨酸钠将线虫浸泡30 min, 消毒完后用无菌水冲洗3次, 最后将侵染期线虫接种到NBTA培养基平板上, 在28℃、黑暗条件下培养3~5 d, 线虫释放出共生菌, 形成蓝绿色菌落, 经反复纯化, 得到昆虫病原线虫共生菌菌株YL 001和YL 002。共生菌4℃下保存于NA斜面培养基中, 每隔2周继代1次。

1.3 昆虫病原线虫共生菌的培养

取菌种管保存的共生菌, 划线接种于NA培养基平板上, 28℃培养24~48 h后, 挑取单菌落划线接种于NBTA培养基平板上, 28℃培养24~48 h, 观察菌落的颜色变化, 区分初生型和次生型共生菌。菌落为蓝色, 周围培养基中的染料被吸收变为黄色的为初生型共生菌; 菌落为红色, 周围培养基中的染料不被吸收而保持蓝色的为次生型^[6]。用接种环挑取初生型共生菌, 接种于摇瓶发酵培养基中, 28℃、180 r/min振荡培养16 h; 按体积分数5%的接种量转接于含40 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中, 28℃、180 r/min培养48~72 h。

1.4 昆虫病原线虫共生菌的鉴定

1.4.1 形态及培养特征观察 将菌株YL 001和YL 002接种在NA, NBTA和麦康凯(MacConkey)培养基上, 在28℃下培养24 h后观察菌落形态及色素吸收情况。利用显微镜观察NA培养基上生长36 h的菌体形状、革兰氏染色结果和鞭毛。菌体在YS培养基中振荡培养20 h, 收集菌体细胞, 测量细胞大小。

1.4.2 生理生化指标的测定 各项生理生化指标的测定均参照文献[6, 10-13]的方法。

1.4.3 对大蜡螟幼虫的致病性 取昆虫病原线虫共生菌培养48 h的发酵液, 在14 000 r/min、4℃离心10 min, 上清液经0.22 μm滤膜过滤除菌, 得发酵液无菌滤液。将大蜡螟幼虫低温(4℃)处理30 min, 从第1对腹足之间, 用微量注射器(10 μL)将共生菌无菌滤液注射到血腔内, 每处理3个重复, 每重复注射20头试虫, 每头注射10 μL。对照组试虫注射相同剂量的无菌培养基。处理后将试虫置于26℃培养室饲养, 每隔24 h检查试虫的死亡情况, 连续观察3 d, 计算死亡率。

1.4.4 抑菌活性 取昆虫病原线虫共生菌培养72 h的发酵液, 分别采用琼脂扩散法和生长速率法测定其对病原细菌和植物病原真菌的抑菌活性。

2 结果与分析

2.1 昆虫病原线虫共生菌的形态与培养特征

2.1.1 形态特征 YL 001和YL 002菌株的形态特征见表1。由表1可知, 2种昆虫病原线虫共生菌均为阴性G⁻, 细胞呈杆状, 不产生芽孢; 初生型和次生型的形态特征有一定差异, 初生型均有周生鞭毛和内含体, 而次生型无鞭毛和内含体。

2.1.2 培养特征 YL 001和YL 002菌株在NA, NBTA和麦康凯(MacConkey)培养基上的培养特征见表2。由表2可见, 在NA培养基上, 2种共生菌初生型的菌落颜色分别为灰白色和浅黄色, 说明YL 001菌株不能产生色素, 而YL 002菌株可产生黄色色素; 2种共生菌的初生型在鉴别培养基NBTA上均为蓝绿色, 菌落周围有透明圈, 次生型为红色, 菌落周围无透明圈, 表明初生型可以吸收NBTA中的溴麝香草酚兰, 而次生型不能; 在麦康凯培养基上, 2种共生菌初生型的菌落为红褐色或红色, 表明初生型可以吸收麦康凯培养基中的中性红。两种共生菌的初生型和次生型均不产生荧光, 且与*Steinernema*属线虫共生, 故这2株共生菌不属于*Phor*

torhabdus 属。2 种共生菌的初生型可在穿刺线周围观察到明显的云雾状扩散, 次生型的穿刺线较清晰, 说明初生型具有较好的运动性, 而次生型不具运动性。

表1 昆虫病原线虫共生菌 YL 001 和 YL 002 株的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of YL 001 and YL 002 strain associated with *S teinernem a* sp. YL 001 and *S teinernem a* sp. YL 002

共生菌株 Symbiotic bacteria	分型	革兰氏染色 Gram	菌体形状 Shape	大小/ μm Size	鞭毛 Flagellum	芽孢 Spore	内含体 Protoplasmic crystalline inclusions
YL 001	初生型 Phase I variant	阴性 G ⁻	杆状 Rod	0.5×1.3~1.7×9.5	周生 Peritrichous	无 None	有 Have
	次生型 Phase II variant	阴性 G ⁻	杆状 Rod	0.6×1.1~1.0×6.7	无 None	无 None	无 None
YL 002	初生型 Phase I variant	阴性 G ⁻	杆状 Rod	0.8×1.9~2.0×7.6	周生 Peritrichous	无 None	有 Have
	次生型 Phase II variant	阴性 G ⁻	杆状 Rod	0.6×1.5~1.6×5.3	无 None	无 None	无 None

表2 昆虫病原线虫共生菌 YL 001 和 YL 002 株的培养特征

Table 2 Culture characteristics of YL 001 and YL 002 strain associated with *S teinernem a* sp. YL 001 and *S teinernem a* sp. YL 002

培养基 Culture	YL 001		YL 002	
	初生型 Phase I variant	次生型 Phase II variant	初生型 Phase I variant	次生型 Phase II variant
NA	菌落乳白色到灰白色, 凸起, 不透明, 有粘性 White to off-white, bulge, opacity, with viscosity	菌落灰白色, 扁平, 半透明状, 无粘性 Off-white, flat, translucence, without viscosity	菌落灰白色到浅黄色, 凸起, 有粘性 Off-white to buff, with viscosity	菌落灰白色, 微凸, 半透明, 无粘性 Off-white, translucence, without viscosity
NBTA	菌落为蓝绿色到暗绿色; 菌落周围有蓝色的透明圈, 凸起, 有粘性 Cyan to sap green; with blue clarity ring around colony, bulge, with viscosity	菌落颜色由浅灰色逐渐变为红色, 暗红色, 扁平, 菌落周围无透明圈 French grey to red or dark red, flat, without clarity ring around colony	菌落为蓝绿色, 菌落周围有蓝色的透明圈, 凸起, 有粘性 Cyan; with blue clarity ring around colony, bulge, with viscosity	菌落中间为深红色, 四周颜色较浅, 不透明, 微凸, 无粘性 Crimson in the center of colony, slightly bulge, opacity, without viscosity
麦康凯 MacConkey	菌落中间为红褐色, 四周有黄白色晕圈, 圆形凸起, 不透明, 有粘性 The center of colony henna, with buff frait ring around colony, bulge, opacity, with viscosity	菌落为无色透明, 无粘性 without color, clarity, without viscosity	菌落为红色, 凸起, 不透明 Red, bulge, opacity	菌落浅黄色, 微凸, 微粘, 半透明 Buff, slighty bulge, with slighty viscosity, translucence

2.2 昆虫病原线虫共生菌的生理生化特征

YL 001 和 YL 002 菌株的主要生理生化特征见表 3。由表 3 可以看出, 两种共生菌初生型和次生型的过氧化氢酶、氧化酶、脲酶、硝酸还原酶和苯丙氨酸还原酶反应均为阴性, 不能产生 H₂S 和吲哚, 不水解淀粉和七叶苷, 可水解三丁酸甘油酯, 可利用柠檬酸盐; 初生型的卵磷脂酶、蛋白酶均为阳性, 次生型卵磷脂酶均为阴性, YL 001 菌株次生型的蛋白酶为弱阳性, 而 YL 002 菌株次生型的蛋白酶为阴性。YL 001 菌株的初生型不能产生脂酶, 而次生型可以产生; YL 002 菌株的初生型可以产生脂酶, 而次生

型无脂酶活性或脂酶活性很弱。YL 001 和 YL 002 菌株的生理生化特征分别与嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) 和伯氏致病杆菌 (*X. bovienii*) 种的特征基本一致^[4, 10-11], 只是 YL 002 与 *X. bovienii* 在脂酶产生等方面存在某些差异, 其原因可能是由不同地域来源的菌株之间的差异造成的。

2.3 昆虫病原线虫共生菌的致病性

由表 4 可见, YL 001 和 YL 002 菌株的初生型对大蜡螟幼虫均具有较强的注射活性, 2 菌株培养不同时间的发酵液无菌滤液对大蜡螟 48 h 的死亡率均为 100%。次生型对大蜡螟幼虫均无致病性。

表3 昆虫病原线虫共生菌 YL 001 和 YL 002 株主要生理生化特征

Table 3 Biochemical characteristics of YL 001 and YL 002 strain associated with *S teinernem a* sp. YL 001 and *S teinernem a* sp. YL 002

特征 Biochemical characteristics	YL 001		YL 002	
	初生型	次生型	初生型	次生型
	Phase I variant	Phase II variant	Phase I variant	Phase II variant
过氧化氢酶 Catalase	—	—	—	—
氧化酶 Oxidase	—	—	—	—
脲酶 U rease	—	—	—	—
卵磷脂酶 Lecithinase	+	—	+	—
蛋白酶 Protease	+	w	+	—
明胶水解 Gelatin	+	—	+	—
脂酶 Lipase: egg yolk agar	—	+	+	—
Tween 80	—	w	+	w
硝酸还原酶 Nitrate reduction	—	—	—	—
吲哚产生 Indole production	—	—	—	—
H ₂ S 产生 H ₂ S production	—	—	—	—
伏-普反应 Voges-Prokauer test	—	—	—	—
Hugh & Leifson 开管 Hugh & Leifson open tube	+	+	+	+
Hugh & Leifson 闭管 Hugh & Leifson closed tube	+	+	+	+
淀粉水解 Starch hydrolysis-soluble	—	—	—	—
苯丙氨酸还原酶 Phenylalanine deaminase	—	—	—	—
色氨酸还原酶 Tryptophan deaminase	—	—	+	—
七叶苷水解 Esculin hydrolysis	—	—	—	—
三丁酸甘油酯 D,L -Glycerate	+	+	+	+
柠檬酸盐 Simmon's citrate	+	+	+	+

注: + . 阳性反应; - . 阴性反应; w. 弱阳性反应。

Note: + . positive reaction; - . negative reaction; w. a weak reaction

表4 昆虫病原线虫共生菌 YL 001 和 YL 002 株初生型对大蜡螟的致病性

Table 4 Pathogenity of the phase I variant of YL 001 and YL 002 strain for *Galleria mellonella*

菌株 Strain	培养时间/h Culture time	死亡率/% Mortality		菌株 Strain	培养时间/h Culture time	死亡率/% Mortality	
		24 h	48 h			24 h	48 h
YL 001	24	100.0		YL 002	24	100.0	
	48	0.0	100.0		48	60.0	100.0
	72	0.0	100.0		72	33.0	100.0
				CK		0.0	0.0

2.4 昆虫病原线虫共生菌的抑菌活性和细菌的抑菌活性见表5和表6。

YL 001 和 YL 002 菌株初生型对植物病原真菌

表5 昆虫病原线虫共生菌 YL 001 和 YL 002 株初生型的抗细菌活性

Table 5 Antibiotic activity of the phase I variant of YL 001 and YL 002 strain

供试细菌 Bacteria	抗细菌活性 Antibacterial activity		供试细菌 Bacteria	抗细菌活性 Antibacterial activity	
	YL 001	YL 002		YL 001	YL 002
金黄色葡萄球菌 <i>S taphy lococcus aureus</i>	++++	+++	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	+	+
水稻白叶枯菌 <i>X antho nas campestris</i>	+++	++++	沙门氏菌 <i>S almonella typhi</i>	+	+
蜡状芽孢杆菌 <i>B acillus cereus</i>	++	++			

注: + + + + . 抑菌圈直径> 25mm; + + + . 25mm ≥ 抑菌圈直径> 20mm; + + . 20mm ≥ 抑菌圈直径> 15mm; + . 15mm ≥ 抑菌圈直径。

Note: + + + + . Diameter of the zone by antibiotic activity > 25mm; + + + . 25mm ≥ diameter of the zone by antibiotic activity > 20mm;

+ + . 20mm ≥ diameter of the zone by antibiotic activity > 15mm; + . 15mm ≥ diameter of the zone by antibiotic activity.

由表5 可以看出, 2 株菌初生型对所测定的病原细菌均有不同程度的抑制作用, 其中对金黄色葡萄球菌和 水稻白叶枯菌的抑菌活性最高。由表6 可知, YL 001 菌株初生型对黄瓜炭疽菌、苹果干腐菌和小

麦纹枯菌无抑制作用, YL 002 菌株初生型对黄瓜炭疽菌、小麦赤霉菌和小麦纹枯菌无抑制作用; 2 株菌对其余供试植物病原真菌均具有不同程度的抑制作用, 其中对辣椒疫霉菌的抑制作用最强。YL 001 和 YL 002 次生型共生菌对供试病原细菌和植物病原真菌均无抑制作用。

表 6 昆虫病原线虫共生菌 YL 001 和 YL 002 株初生型的抗真菌活性

Table 6 Antifungi activity of the phase I variant of YL 001 and YL 002 strain

供试植物病原真菌 Pathogenic fungi	抗真菌活性 Antifungi activity		供试植物病原真菌 Pathogenic fungi	抗真菌活性 Antifungi activity	
	YL 001	YL 002		YL 001	YL 002
烟草赤星菌 <i>A lternaria alternata</i>	+	+	黄瓜炭疽菌 <i>Colletotrichum lagenarium</i>	-	-
番茄早疫病 <i>A lternaria solani</i>	+	+	番茄灰霉菌 <i>B otty tis cirerea</i>	+	+
辣椒疫霉菌 <i>P hytophthora capsici</i>	+	+	小麦赤霉菌 <i>Fusarium gram inearum</i>	+	-
南瓜枯萎菌 <i>M elon fusarium Wilt</i>	+	+	杨树溃疡菌 <i>D othiorella gregaria</i>	+	+
西瓜枯萎菌 <i>Fusarium oxysporum f sp. niveum</i>	+	+	苹果干腐菌 <i>B ottyosphaeria berengeriana</i>	-	+
棉花枯萎菌 <i>Verticillium dahliae</i>	+	+	稻瘟菌 <i>P yricularia oryzae</i>	+	+
苹果炭疽菌 <i>C lamerela cinulate</i>	+	+	小麦纹枯菌 <i>R hizoctonia cerealis</i>	-	-

注: - . 无抑菌作用; + . 抑菌率在 0~ 25%; + + . 抑菌率在 25%~ 50%; + + + . 抑菌率在 50%~ 75%; + + + + . 抑菌率在 75%~ 100%。
Note: - . No inhibition; + . inhibition rate was 0- 25%; + + . inhibition rate was 25%- 50%; + + + . inhibition rate was 50%- 75%; + + + + . inhibition rate was 75%- 100%.

2 5 YL 001, YL 002 菌株与 *X enorhabdus* 属共生菌的比较

目前, 致病杆菌属 (*X enorhabdus*) 包括 5 个种^[11]。YL 001 和 YL 002 菌株与 *X enorhabdus* 属不同种的形态及生理生化特征的比较见表 7。YL 001 和 YL 002 菌株分别是从 *S teinernem a* sp. YL 001 和 *S teinernem a* sp. YL 002 线虫中分离的共生菌, 2 菌株均可产生型态变异, 其初生型革兰氏反应均为阴性, 细胞呈杆状, 周生鞭毛, 不产生芽孢, 不产生荧光, 细胞内具有内含体; 硝酸盐还原酶、氧化酶、过氧化氢酶、脲酶反应均为阴性, 可产生卵磷脂酶、蛋白酶; 不能水解七叶苷; 可利用柠檬酸盐; 对大蜡螟

(*G. mellonella*) 幼虫均具有较强的注射活性, 且有较强的抑菌活性。YL 001 和 YL 002 菌株之间有一定差异, YL 001 菌株初生型不能产生色素、脂酶和色氨酸还原酶, 而 YL 002 菌株初生型可产生黄色素、脂酶和色氨酸还原酶。YL 001 和 YL 002 菌株的这些主要特征分别与嗜线虫致病杆菌 *X. nem atophila* 和伯氏致病杆菌 *X. bovienii* 的特征基本一致。

综上所述, 从形态特征、培养特征及生理生化特征等多方面分析, YL 001 菌株应是嗜线虫致病杆菌种内的一个菌株; YL 002 菌株是伯氏致病杆菌种内的一个菌株。

表 7 昆虫病原线虫共生菌 YL 001 和 YL 002 株初生型与 *X enorhabdus* 属不同种特征的比较

Table 7 Characteristics comparison between the isolated strain and different strain of *X enorhabdus*

特征 Characteristics	YL 001	YL 002	嗜线虫 致病杆菌 <i>X. nem atophila</i>	伯氏 致病杆菌 <i>X. bovienii</i>	波氏 致病杆菌 <i>X. poinarii</i>	贝氏 致病杆菌 <i>X. bedding ii</i>	日本 致病杆菌 <i>X. japonica</i>
共生线虫 Nematode:							
<i>S teinernem a</i> sp. YL 001	+	-					
<i>S teinernem a</i> sp. YL 002	-	+					
<i>S. carpocapsae</i>			+	—	—	—	—
<i>S. feltiae</i> , <i>S. intermedium</i> , <i>S. affine</i> , <i>S. kraussei</i>			—	+	—	—	—
<i>S. glaseri</i> , <i>S. cubanum</i>			—	—	+	—	—
<i>S teinernem a</i> spp.			—	—	—	+	—
<i>S. kushidai</i>			—	—	—	—	+
最高生长温度/ Upper threshold for growth	37	35	35	32	40	39	35
致病性 Pathogenicity	+	+	+	+	+	+	+
色素 Pigmentation	灰白色 Off white	黄色 Yellow	灰白色 Off white	黄色 Yellow	褐色 Brown	浅褐色 Light brown	黄褐色 Yellowish brown
鞭毛 Flagellum	+	+	+	+	+	+	+

续表 7 Continued of Table 7

特征 Characteristics	YL 001	YL 002	嗜线虫 致病杆菌 <i>X. nematophila</i>	伯氏 致病杆菌 <i>X. bovienii</i>	波氏 致病杆菌 <i>X. poinarii</i>	贝氏 致病杆菌 <i>X. beddingii</i>	日本 致病杆菌 <i>X. japonica</i>
原生质内含体 Protoplasmic crystalline inclusions	+	+	+	+	+	+	+
染料吸收 Dye adsorption	+	+	+	+	+	+	+
过氧化氢酶 Catalase	—	—	—	—	—	—	—
氧化酶 Oxidase	—	—	—	—	—	—	—
脲酶 U rease	—	—	—	—	—	—	—
卵磷脂酶 Lecithinase	+	+	d	d	-	d	d
脂酶 Lipase	—	+	d	+	+ ^w	+ ^w	—
蛋白酶 Protease	+	+	+	+	+	+	+
硝酸还原酶 Nitrate reduction	—	—	—	—	—	—	—
苯丙氨酸还原酶 Phenylalanine deaminase	—	—	d	[-]	[-]	—	d ^w
色氨酸还原酶 Tryptophan deaminase	—	+	-	+	-	+ ^w	-
柠檬酸盐 Simmon's citrate	+	+	+	+	+	+	—
七叶苷水解 Aesculin hydrolysis	—	—	—	—	d	+	—

注: +. 90% ~ 100% 菌株为阳性反应; d 26% ~ 75% 菌株为阳性反应; [-] 11% ~ 25% 为阳性反应; - . 0~ 10% 菌株为阳性反应。 +^w 表示弱阳性反应。

Note: +. 90% - 100% of strains are positive; d 26% - 75% are positive; [-] 11% - 25% are positive; - . 0- 10% are positive The superscript w indicates a weak positive reaction.

3 讨 论

致病杆菌和光杆菌属细菌仅存在于斯氏线虫 (*S teinernæa*) 和异小杆线虫 (*H eterorhabditis*) 的肠腔中, 在自然环境中不能存活。昆虫病原线虫共生菌的分离主要采用从线虫侵染致死的昆虫血淋巴中分离的方法^[14], 这种分离方法虽然简单, 但杂菌较多。本研究采用从线虫中直接分离共生菌的方法, 分离时杂菌较少, 且一般分离的是初生型共生菌。在线虫和细菌的共生关系中, 细菌仅寄生于侵染期线虫的肠腔中, 侵染期线虫处于休眠状态, 其体表包被一层外鞘, 在表皮与外鞘之间可能存在其他细菌。 Jackson 等^[15]和Babic 等^[16]分别从异小杆线虫中分离出雷氏普罗威登斯菌 (*P rovidencia rettgeri*) 和苍白杆菌 (*O chrobactrum* spp.), 推测这 2 种细菌可能存在于侵染期线虫的表皮和外鞘之间。因而在利用该方法时, 应对线虫进行充分的消毒。

本研究采取表型及生理生化特征分析法对昆虫病原线虫 *S teinernæa* sp. YL 001 和 *S teinernæa* sp. YL 002 的共生菌 YL 001 和 YL 002 菌株进行了鉴定, 确定其分别为嗜线虫致病杆菌 (*X. nematophila*) 和伯氏致病杆菌 (*X. bovienii*), 结果与线虫和共生菌的共生具有高度的专化性和特异性的特点相一致, 即致病杆菌属细菌只能和斯氏属线虫共生, 光杆菌属细菌与异小杆属线虫共生^[11]。YL 001 和 YL 002 菌株具有致病杆菌和光杆菌的共同特征, 特别是具有致

病杆菌属的显著特点 (即硝酸还原酶和过氧化氢酶反应呈阴性), 据此可将 YL 001 和 YL 002 菌株与光杆菌属共生菌和其他肠杆菌区分开。这是由于光杆菌所有菌株的过氧化氢酶阳性, 初生型细胞能发光; 而肠杆菌科的其他菌株硝酸还原酶和过氧化氢酶均为阳性, 这进一步证实了 YL 001 和 YL 002 菌株为 *X enorhabdus* 属共生菌。而 YL 001 和 YL 002 菌株之间又具有明显的区别。在 NA 培养基上, YL 001 菌株的菌落颜色为灰白色, YL 002 菌株为浅黄色, 这分别与嗜线虫致病杆菌和伯氏致病杆菌的特征相一致, 据此可确定 YL 001 和 YL 002 菌株分别属于嗜线虫致病杆菌和伯氏致病杆菌。

YL 001 和 YL 002 菌株的某些生理生化特征分别与嗜线虫致病杆菌和伯氏致病杆菌存在一定的差异。 Akhurst^[4]和Boemare 等^[10]报道, 伯氏致病杆菌初生型无脂酶活性, 次生型可产生脂酶, 这与本研究的结果正好相反, 而本研究结果与 Gaugler^[11]的研究结果一致, 但在 YL 001 和 YL 002 菌株的最高生长温度上与 Gaugler^[11]的研究结果不一致, 这些差异可能是由于菌株的地理分布差异造成的, 这种生化上的微小差异在种内的分类上是允许的。

形态变异是昆虫病原线虫共生菌的普遍特征。通过染料的吸收和抑菌素的产生, 可以很容易的发现共生菌的形态变化^[17]。初生型共生菌仅从侵染期线虫中分离得到, 在离体培养过程中部分共生菌在菌落和细胞形态^[10], 运动性^[18], 内源、外源酶的产生

及呼吸酶的活性^[19]和次生代谢物的产生^[17,20]上发生了改变。本研究结果显示, YL 001 和 YL 002 菌株的初生型和次生型在培养基 NA, NBTA 和 M ac-Conkey 上菌落颜色、形态和粘性明显不同。菌落形态、培养特征的型变与抑菌能力相吻合, 即 YL 001 和 YL 002 菌株的初生型具有较强的抑菌作用, 而次生型无抑菌能力, 这与 Boemare 等^[10]的研究结果完

全一致。初生型和次生型共生菌生理生化特征的差异可能使不同研究者得出不同的分类结果^[1,4]。Boemare 等^[10]认为, 对共生菌进行分类时应将菌株的初生和次生型同时进行研究, 尤其是形态和生理生化特征, 以获得更可靠的数据。本研究同时对 YL 001 和 YL 002 菌株初生型和次生型的生理生化特征进行了测定, 并将其应用到分类中。

[参考文献]

- [1] Thomas G M, Poinar G O. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1979, 29: 352-360
- [2] Webster J M, Li J, Chen G. Xenomins novel heterocyclic compounds with antimicrobial and antineoplastic [P]. 1998
- [3] Bowen D J, Rocheleau T A, Blackburn M, et al. Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens* [J]. Science, 1998, 281: 2129-2132
- [4] Akhurst R J. Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1983, 33: 38-45
- [5] Boemare N E, Akhurst R J, Mourant R G. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1993, 43: 249-255
- [6] Akhurst R J, Mourant R G, Baud L, et al. Phenotypic and DNA relatedness study between nematode symbionts and clinical strains of the genus *Photorhabdus* (Enterobacteriaceae) [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46: 1034-1041
- [7] Suzuki T, Yabusaki H, Nishimura Y. Phylogenetic relationships of entomopathogenic nematophilic bacteria: *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. [J]. Journal of Basic Microbiology, 1996, 36: 351-354
- [8] Brunel B, Givaudan A, Lanois A, et al. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA genes [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 574-580
- [9] Fischer-Le SM, Mauléon H, Constant P, et al. PCR-ribotyping of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* isolates from the Caribbean region in relation to the taxonomy and geographic distribution of their nematode hosts [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 4246-4254
- [10] Boemare N E, Akhurst R J. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) [J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134: 751-761
- [11] Gaugler R. Entomopathogenic nematology [M]. Wallingford U K: CAB International, 2002
- [12] 沈萍, 范秀蓉, 李广武. 微生物学实验 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999
- [13] Peter H A, Sneath N, Mair S, et al. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. Beijing: Science Press, 1984
- [14] 庞在堂, 杨怀文, 杨秀芬, 等. 一株高毒力致病杆菌 CB6 的鉴定 [J]. 微生物学报, 2004, 44(2): 131-134
- [15] Jackson T J, Wang H, Nugent M J, et al. Isolation of insect pathogenic bacteria, *Providencia rettgeri*, from *Heterorhabditis* spp. [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1995, 78: 237-244
- [16] Babic I, Fischer-Le SM, Giraud E, et al. Occurrence of natural dioxenic associations between the symbiont *Photorhabdus luminescens* and bacteria related to *Ochrobactrum* spp. in tropical entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. (Nematodermatida) [J]. Microbiology, 2000, 146: 709-718
- [17] Akhurst R J. Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoplectana* and *Heterorhabditis* [J]. Journal of General Microbiology, 1980, 121: 303-309
- [18] Givaudan A, Baghdigian S, Lanois A, et al. Swimming and swimming changes concomitant with phase variation in *Xenorhabdus nematophilus* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61: 1408-1413
- [19] Smigielski A J, Akhurst R J, Boemare N E. Phase variation in *Xenorhabdus nematophilus* and *Photorhabdus luminescens*: differences in respiratory activity and membrane energization [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60: 120-125
- [20] Akhurst R J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae [J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128: 3061-3065

(下转第 184 页)

本研究结果表明,阿维菌素在田间枸杞上使用,在采收前7 d 按推荐质量浓度6 mg/L 施药,其残留量均低于国际上制定的MRL 值,说明阿维菌素在推荐

剂量下使用对枸杞果实的食用是安全的,但对其药有效成分的影响,还需要进一步试验验证。

[参考文献]

- [1] 梁振益,李嘉诚,罗盛旭,等. 高效液相色谱法测定蔬菜与水果中阿维菌素残留量[J]. 现代农药, 2005, 4(4): 20-22
- [2] 张少华,皇甫伟国,何新华,等. 高效液相色谱法检测葱中阿维菌素的残留量[J]. 农药, 2006, 45(4): 263-264
- [3] 陈勇达,张少军,钱训,等. 1.8%阿维菌素乳油在黄瓜上的消解动态研究[J]. 河北农业科学, 2004, 8(2): 113-115

Residues of abamectin in wolfberry by HPLC

ZHANG Yi, ZHANG Zong-shan, WANG Fang, ZHANG Rong

(Institute of Plant Protection, Academy of Ningxia Agricultural and Forestry Science, Yinchuan, Ningxia 750002, China)

Abstract: The studies on the final residue and dynamic degradation of 1.8% abamectin EC in wolfberry were carried out by HPLC. and the results showed that abamectin dissipated rapidly in wolfberry fruit. Spraying at 6 and 12 mg/L with an interval of 7 d, the residue was 0.008 and 0.010 mg/kg in wolfberry fruit, the half life of Abamectin in wolfberry fruit was 1.34- 1.50 d and abamectin was not detected after 7 d of last spray at dilution of 6 mg/L. Thus, this pesticide is safe when applied on wolfberry fruit at recommended rates

Key words: abamectin; wolfberry; residue dynamic; HPLC

(上接第180页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)12-0174-EA

Isolation and identification of symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes

WANG Yong-hong, ZHANG Xing

(Biorational Pesticides Research and Service Center, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The phenotypes and biochemical characteristics of the symbiotic bacteria associated with *Steinernema* sp. YL001 and *Steinernema* sp. YL002 were studied to determine the taxonomic classification. These characteristics of both symbiotic bacteria were consistent with other strains of *X. nematophila* and *X. bovienii* in morphological and biochemical properties respectively. On the basis of the phenotypes and biochemical characteristics analysis, both symbiotic bacteria should belong to the species of *X. nematophila* and *X. bovienii*

Key words: entomopathogenic nematodes; symbiotic bacteria; isolation of symbiotic bacteria; identification of symbiotic bacteria