

昆虫病原线虫共生菌筛选及其 发酵液抑菌活性初步研究^{*}

许 贤¹, 王永宏^{1,2}, 刘 霞¹, 李 骞¹, 冯俊涛^{1,2}, 张 兴^{1,2}

(1 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100;

2 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对分别采自陕西杨凌、汉中、渭南、太白4地区的315份土样进行了昆虫病原线虫筛选及其共生菌分离, 得到2种昆虫病原线虫及1株I型昆虫病原线虫共生菌。I型昆虫病原线虫共生菌经初步鉴定为致病杆菌属(*Xenorhabdus*)的嗜线虫致病杆菌种(*Xenorhabdus nematophilus*)内的一个变种; 对其抑菌活性研究结果表明, I型昆虫病原线虫共生菌发酵液对植物病原真菌菌丝生长具有不同程度的抑制作用, 其中对小麦纹枯病菌与辣椒疫霉病菌有强烈的抑制作用, 对番茄灰霉病菌孢子萌发有延缓作用。

[关键词] 昆虫病原线虫; 共生菌; 分离鉴定; 抑菌活性

[中图分类号] S154.38⁶

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)07-0050-05

昆虫病原线虫共生菌是存在于昆虫病原线虫肠道内的一类革兰氏阴性细菌, 属肠杆菌科(Enterobacteriaceae), 包含致病杆菌属(*Xenorhabdus*)和发光杆菌属(*Photorhabdus*)2个属, 其中致病杆菌属与斯氏线虫科(Steinernematidae)线虫共生, 发光杆菌属与异小杆线虫科(Heterorhabditidae)线虫共生^[1]。在自然界中, 昆虫病原线虫共生菌存在于侵染期线虫肠道内, 随线虫侵入寄主昆虫而进入昆虫血腔^[2], 在血腔内迅速繁殖, 从而降低寄主的免疫能力, 抑制寄主磷酸脂酶A2对自身的降解作用^[3-4], 分泌毒素并杀死寄主, 为线虫的繁殖提供必需的营养^[5]。近年来, 随着对昆虫病原线虫共生菌研究的不断深入, 共生细菌的多种生物学功能不断被发现, 如共生菌产生的多种抗生素对多种植物及人类病原菌有广泛的抑菌活性^[6-7]; 产生的杀虫毒素对许多害虫有较强的致死作用, 尤其是蛋白毒素的发现为生物农药的开发和抗虫基因工程提供了新的微生物杀虫资源和杀虫基因^[8-9]。由于共生菌具有广阔的开发利用前景, 世界各国对共生菌菌株的资源以及分类研究亦日趋重视。

本研究从陕西不同地区采集土样分离昆虫病原线虫, 进一步筛选其共生菌, 并检测共生菌离心发酵液的抑菌活性, 以获得新的昆虫病原线虫共生菌

株。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样 315份土样分别采自陕西杨凌、太白、渭南、汉中4地区的草地、森林和田田。土样采集参照张刚应等^[10]的方法。

1.1.2 供试菌种 番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、白菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)、辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、番茄叶霉病菌(*Fulvia fulva*)、小麦纹枯病菌(*Ceratobasidium cornigerum* Rogers)、小麦全蚀病菌(*Gaeum annamycetes graminis*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、南瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*), 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 发酵培养基(NB): 牛肉膏5.0g, 蛋白胨10.0g, 氯化钠5.0g, 水1000mL, pH值7.2~7.4。鉴别培养基(NBTA): 牛肉膏5.0g, 蛋白胨10.0g, 氯化钠5.0g, 营养琼脂20.0g, 溴麝香草酚兰0.025g, 氯化三苯基四氮唑0.040g, 水

^{*} [收稿日期] 2005-09-16

[基金项目] 国家“863”计划项目(2003AA241140); 国家“十五”攻关重大专项(2002BA516A04)

[作者简介] 许 贤(1979-), 女, 山东济南人, 在读硕士, 主要从事昆虫病原线虫共生菌筛选研究。

[通讯作者] 冯俊涛(1967-), 男, 河南登封人, 副教授, 主要从事农药学与植物保护学研究。E-mail: jtfeng@126.com

1 000 mL^[11]。营养琼脂培养基(NA): 牛肉膏 50 g, 蛋白胨 100 g, 氯化钠 50 g, 营养琼脂 200 g, 水 1 000 mL。以上3种培养基均在121℃条件下灭菌30 min后备用。

1.2 昆虫病原线虫共生菌的分离

昆虫病原线虫分离参照文献[12]的方法。线虫繁殖参照文献[13]的方法。收集繁殖出的线虫, 用体积分数10%次氯酸钠消毒30 min, 然后用无菌水冲洗3次, 将消毒过的线虫直接散布于NBTA培养基上, 于28℃黑暗条件下培养3~4 d。

1.3 昆虫病原线虫共生菌发酵液的制备

将昆虫病原线虫共生菌单菌落接种至NB液体培养基中, 于28℃、180 r/min振荡培养18~20 h, 然后按体积分数3%接种量转接到同种培养基中, 同样条件下振荡培养48 h后得到共生菌发酵液, 将发酵液于10 000 r/min下离心15 min, 取上清液备用。

1.4 昆虫病原线虫共生菌的初步鉴定

1.4.1 形态特征的观察 将昆虫病原线虫共生菌分别划线接种于NBTA和NA培养基上, 在28℃条件下培养24 h后, 观察菌落形态及色素吸收情况。利用相差显微镜观察NA培养基上生长48 h后的菌体形状, 并进行革兰氏染色。

将昆虫病原线虫共生菌在NB液体培养基中振荡培养24 h后收集菌体细胞, 测量50个细胞的大小。

1.4.2 生理生化特征的测定 昆虫病原线虫共生菌的生理生化指标测定参照文献[11, 14-15]的方法进行。

1.5 昆虫病原线虫共生菌发酵液抑菌活性的测试

1.5.1 生长速率法测定 用融化的PDA培养基将1.3制备的昆虫病原线虫共生菌发酵液稀释10倍, 分别取10 mL稀释后的培养基倒入直径9.0 cm的灭菌培养皿内, 制成平板, 作为处理培养基; 用融化的PDA培养基将NB培养基稀释10倍后制得的培养基作为对照培养基。分别从培养5 d的番茄灰霉病菌、西瓜枯萎病菌、白菜黑斑病菌、辣椒疫霉病菌、油菜菌核病菌、番茄叶霉病菌、小麦纹枯病菌、小麦全蚀病菌、烟草赤星病菌、南瓜枯萎病菌、稻瘟病菌菌落边缘, 用打孔器切成直径4.0 mm的菌块, 分别置于处理培养基和对照培养基中央, 每处理重复3次, 于20℃黑暗条件下培养, 5 d后分别测量各菌落的直径, 计算抑制率^[16]。

1.5.2 孢子萌发法测定 将1.3制备的昆虫病原

线虫共生菌发酵液配成不同浓度水溶液, 与番茄灰霉病菌孢子(5×10^4 /mL)混合, 使发酵液最终浓度分别为3, 6, 12, 25和50 mL/L。以不加发酵液的孢子悬浮液作为对照。将各处理的孢子悬浮液置于室温下分别培养6, 24和48 h后镜检孢子萌发率。一般在低倍镜下, 每处理随机检查200个孢子, 每处理4个重复, 计算抑制率^[16]。

2 结果与分析

2.1 昆虫病原线虫及其共生菌的分离

分别从陕西杨陵、太白、渭南、汉中4地采集的315份土样经线虫筛选发现, 土样含线虫率为95.6%, 大蜡螟繁殖成功2种线虫。线虫侵染致死大蜡螟的尸体颜色为灰黑色。在相差显微镜下观察发现, 线虫有唇片3个, 每个唇片着生一短刚毛, 排列于口冠周围, 这与文献[17-18]中描述的斯氏线虫属(*Steinernema*)线虫形态较一致, 可初步断定其为斯氏线虫属线虫。

将以上2种线虫消毒后, 分别于NBTA培养基上培养72 h, 分别得到1株蓝绿色菌株和1株红色菌株。根据丛斌等^[6]的研究结果判断认为, 蓝绿色菌株为I型昆虫病原线虫共生菌; 红色菌株为II型昆虫病原线虫共生菌。蓝绿色菌株为目标菌株, 初步命名为TB。

2.2 昆虫病原线虫共生菌TB的初步鉴定

2.2.1 形态特征 将TB共生菌单菌落分别划线接种于NBTA和NA培养基上, 培养24 h后观察发现, TB菌落呈圆形、凸起, 暗蓝色, 菌落周围的培养基为浅蓝色; 在NA培养基上培养48 h后观察发现, 菌株革兰氏染色为阴性, 相差显微镜观察其形状为长杆状; 在NB液体培养基中培养24 h后观察发现, 细胞大小一般为($0.6 \sim 0.9$) $\mu\text{m} \times (2.2 \sim 7.1)$ μm , 平均长度为3.88 μm 。

2.2.2 生理生化特征 从表1可以看出, 昆虫病原线虫共生菌TB不能还原硝酸盐, 不能产生 H_2S 和吲哚, 甲基红试验和甲基乙酐甲醇试验呈阴性, 葡萄糖氧化为发酵型, 不水解淀粉, 明胶液化呈弱阳性。可利用葡萄糖、D-半乳糖、麦芽糖、甘露糖和纤维二糖产酸, 不能利用D-果糖、D-木糖、肝糖、甘油、水杨苷和七叶苷等产酸; 可利用甲酸盐、乙酸盐、丁二酸盐和乳酸盐为惟一碳源生长, 不能利用丙二酸盐、柠檬酸盐和葡萄糖酸盐, 不能产生 H_2O_2 酶、苯丙氨酸脱氨酶, 可水解三丁酸甘油酯、吐温-20、吐温-80及分解卵磷脂, 可产生分解牛奶的蛋白酶, 三铁糖琼

脂试验表明既可产酸又可产碱,可分泌活性较弱的脲酶、酪氨酸酶、色氨酸脱氨酶。上述昆虫病原线虫共生菌 TB 的部分生理生化特性,与文献[19-20]描述的致病杆菌属嗜线虫致病杆菌种(*Xenorhabdus*

nematophilus)的特性较一致,据此可初步判断菌株 TB 为致病杆菌属的嗜线虫致病杆菌种内的一个变种。

表 1 昆虫病原线虫共生菌 TB 的主要生理生化特征

Table 1 Biochemical characteristics of the TB symbiotic bacterium of Entomopathogenic

特征 Characteristics	结果 Results	特征 Characteristics	结果 Results
甲基红试验 Methyl red test	-	脂酶 Lipase	
甲基乙酞甲醇试验 Voges-Proskauer reaction	-	吐温-20 Tween-20	+
吡嗪产生 Indole production	-	吐温-80 Tween-80	+
H ₂ S 产生 H ₂ S production	-	脂酶(蛋黄) Egg yolk agar	+
葡萄糖氧化发酵 Oxidation and ferment of glucose		三丁酸甘油酯水解 Tributyrin hydrolyze	+
氧化型 Oxidation type	-	有机酸利用 Utilization of organic acid	
发酵型 Ferment type	+	乙酸钠 Acetate	+
碳源利用 Utilization of carbon		丙二酸钠 Sodium malonate	-
D-果糖 D-fructose	-	丁二酸钠 Succinate sodium	+
D-木糖 D-xylose	-	葡萄糖酸盐 Gluconate	-
葡萄糖 Glucose	+	乳酸钠 Lactate	+
D-半乳糖 D-galactose	+	甲酸钠 Formate	+
L-山梨糖 L-sorbose	-	柠檬酸钠 Citrate	-
乳糖 Lactose	-	葡萄糖酸盐的氧化 Oxidation of gluconate	-
麦芽糖 Maltose	+	三铁糖琼脂试验 Triple sugar iron agar TSI	
肌醇 Inositol	W	产酸 Acid production	+
甘露糖 Mannose	+	产碱 Alkali production	+
甘露醇 Mannitol	-	产 H ₂ S H ₂ S production	-
氨基葡萄糖 Glucosamine	-	精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolyse	+
纤维二糖 Cellobiose	+	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-
肝糖 Glycogen	-	色氨酸脱氨酶 Tryptophan deaminase	W
甘油 Glycerol	-	丙二酸盐利用 Utilization of malonate	-
水杨苷 Salicin	-	柠檬酸盐利用 Utilization of citrate	-
七叶苷 Aesculin	-	石蕊牛奶试验 Litmus milk	
明胶液化 Gelatin liquefaction	W	还原 Deoxidize	-
淀粉水解 Starch hydrolyze	-	胨化 Peptonization	-
蛋白水解 Protein hydrolyze	+	凝乳 Curd	-
油脂水解 Lipid hydrolyze	-	过氧化氢酶 Catalase	-
脲酶 Urease	W	卵磷脂酶 Lecithinase	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	-	酪氨酸酶 Tyrosinase	W

注：“+”为阳性;“-”为阴性;“W”为弱阳性。
Note: “+” is positive; “-” is negative; “W” is weak reaction.

2.3 昆虫病原线虫共生菌 TB 发酵液抑菌活性的测定结果

2.3.1 对病原真菌菌丝生长的抑制作用 表 2 表明,昆虫病原线虫共生菌 TB 发酵液对番茄灰霉病菌、辣椒疫霉病菌、小麦纹枯病菌、油菜菌核病菌、稻瘟病菌菌丝生长均有较强的抑制作用,抑制率均达到 90% 以上,尤其对辣椒疫霉病菌和小麦纹枯病菌的抑制率均达到 99.99%;对白菜黑斑病菌、小麦全蚀病菌、烟草赤霉病菌、南瓜枯萎病菌的抑制率为 40%~70%;对西瓜枯萎病菌和番茄叶霉病菌的抑制作用较低,抑制率均低于 23%。可见,昆虫病原线

虫共生菌 TB 发酵液对不同植物病原真菌的抑制作用存在较大差异。

2.3.2 对番茄灰霉病菌孢子萌发的抑制作用 由表 3 可见,昆虫病原线虫共生菌 TB 发酵液对番茄灰霉病菌孢子萌发有一定影响。处理 6 h 后,对照孢子萌发率达 81.64%,25 和 50 mL/L 昆虫病原线虫共生菌发酵液处理的孢子萌发率低于 2%;3.6 和 12 mL/L 昆虫病原线虫共生菌发酵液处理的孢子萌发率约为 58%~78%。24 h 后对照孢子萌发率达 100%,3.6 和 12 mL/L 昆虫病原线虫共生菌发酵液处理的孢子萌发率变化较大,均达 83% 以上,而

25 和 50 mL /L 昆虫病原线虫共生菌发酵液处理的孢子萌发率与处理 6 h 相比变化不大。48 h 以后, 3, 6 和 12 mL /L 昆虫病原线虫共生菌发酵液处理的孢子萌发率达 100%。72 h 后观察发现, 所有处理的孢子萌发率均为 100%。由此可见, 随着培养时间的延长, 各处理的孢子萌发率均有大幅度的提高。可见, 昆虫病原线虫共生菌 TB 发酵液对孢子萌发的抑制作用不大, 只是起到推迟孢子萌发的作用。

表 2 昆虫病原线虫共生菌 TB 发酵液对 11 种病原真菌菌丝生长的抑制作用

植物病原真菌 Plant pathogenic fungi	菌落直径/cm Diameter of colony		抑制率/% Inhibition rate
	对照 Control	处理 Treatment	
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	4 70	0 04	99 11
西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	3 90	3 02	22 65
白菜黑斑病菌 <i>A. brassicae</i>	4 00	1 08	72 92
辣椒疫霉病菌 <i>P. capsici</i>	6 00	0 01	99 99
油菜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	8 60	0 86	90 02
番茄叶霉病菌 <i>F. fulva</i>	1 15	1 02	11 30
小麦纹枯病菌 <i>C. cornigerum</i> Rogers	4 20	0 01	99 99
小麦全蚀病菌 <i>G. graminis</i>	1 60	0 73	54 17
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	4 95	1 45	70 71
南瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	4 95	2 80	43 43
稻瘟病菌 <i>P. oryzae</i>	3 25	0 32	90 15

注: 菌落直径为 3 次重复的平均值。

Note: The diameter of colony was the average of repeating three times

表 3 昆虫病原线虫共生菌发酵液对番茄灰霉病菌孢子萌发的抑制作用

供试发酵液 浓度/(mL · L ⁻¹) Concentration of tested fermented liquid	6 h		24 h		48 h	
	孢子萌发率 Germination rate	相对抑制率 Relative inhibition rate	孢子萌发率 Germination rate	相对抑制率 Relative inhibition rate	孢子萌发率 Germination rate	相对抑制率 Relative inhibition rate
3	77.84	4.66	98.04	1.96	100	0
6	76.32	6.52	94.30	5.70	100	0
12	57.99	28.97	83.52	16.48	100	0
25	1.82	97.77	3.72	96.28	3.72	96.28
50	1.40	98.29	1.65	98.35	1.65	98.35
CK	81.64		100		100	

3 讨 论

3.1 昆虫病原线虫共生菌 TB 的鉴定

昆虫病原线虫共生菌是研究较晚的一类细菌。在自然界中, 昆虫病原线虫与其共生菌专一共生, 并不是每种线虫都携带共生菌, 只有侵染期线虫才携带共生菌。线虫侵入寄主昆虫体内, 将共生菌释放到寄主昆虫血腔内, 1~ 4 d 杀死寄主。在线虫共生菌筛选过程中, 1 种线虫不一定能筛选到 1 种共生菌; 有的线虫共生菌被释放到体外立刻会发生型变, 只能筛选到 II 型共生菌, 而得不到 I 型共生菌, 造成这种现象的原因可能是线虫及其共生菌为了适应周围环境, 以利于自身的生存所致。

昆虫病原线虫共生菌传统的分类主要依据形态学和生理生化特征。本研究主要以形态学和生理生

化特征为依据对 TB 菌株进行了初步分类鉴定, 试验结果与文献[19]报道的嗜线虫致病杆菌种的特征较一致, 所以初步认为 TB 菌株为嗜线虫致病杆菌种内的一个变种。昆虫病原线虫共生菌不同菌株之间存在非常相似的表型特征, 且在培养过程中极易发生变异, 导致某些生理生化特征的改变。因此, 仅依靠形态学和生理生化特征来分类存在较大误差, 应进一步从表观现象逐步深入至基因本质, 采用表型特征和基因型特征为基础的多相分类, 确定其准确的分类地位, 以推动共生菌分类的发展。总之, 随着对共生菌分类研究的不断深入, 目前将共生菌分为致病杆菌属和光杆状菌属^[1], 但对共生菌的分类学地位、种的亲缘关系以及进化历程还未得到很好的解释, 甚至共生菌的许多菌株仍未被定名。随着分类技术的不断改进和多相分类方法的应用, 对共

生菌的认识也会逐步深入,建立共生菌的形态、生理生化特征、分子以及生态的研究数据库,是对共生菌的系统发育进行正确分类的重要前提。

3.2 昆虫病原线虫共生菌 TB 发酵液的抑菌活性

本研究结果表明,昆虫病原线虫共生菌 TB 发酵液对 11 种植物病原真菌均有不同程度的抑菌活性,其中对辣椒疫霉病菌和小麦纹枯病菌的抑制作用最强。微生物之间拮抗作用机制包括寄生作用、竞争作用和抗生素作用,共生菌的抑菌机制主要是竞争作用和抗生素作用,所以昆虫病原线虫共生菌 TB 发酵液对病菌菌丝的毒杀作用很小,主要是抑制其生长,在田间可能有效控制病菌进一步侵染,减轻病害

的发生和流行。由于不同供试菌对抑菌物质敏感性不同,所以抑菌物质对供试菌抑制作用存在一定差异,这与前人的研究结果^[21]一致。

本试验生物活性测定所用的发酵液未经浓缩及加入其他药剂,如果改进昆虫病原线虫共生菌 TB 产生内毒素与外毒素等抗菌素的发酵工艺,线虫共生菌 TB 的代谢产物将有可能成为新型的、能有效控制植物病原真菌生长与侵染的生物制剂,这在以前的文献中也有相关报道^[22]。本试验只是室内试验初步的结果,尚需进一步试验 TB 生长代谢物对植物病原真菌的田间效果,才能更好地证明其抑菌作用。

[参考文献]

- [1] Han R, Ehlers R U. Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the *in vivo* and *in vitro* development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae* [J]. *Microbiology Ecology*, 2001, 35: 239-247.
- [2] Kaya H K, Gaugler R. Entomopathogenic nematodes [J]. *Ann Rev Entomol*, 1993, 38: 181-206.
- [3] Park Y, Kim Y. Eicosanoids rescue *Spodoptera exigua* infected with *Xenorhabdus nematophilus*, the symbiotic bacteria to the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* [J]. *Insect Physiology*, 2000, 46: 1469-1476.
- [4] Park Y, Kim Y, Putnam S M, et al. The bacterium *Xenorhabdus nematophilus* depresses nodulation reactions to infection by inhibiting eicosanoid biosynthesis in tobacco hornworms, *Manduca sexta* Arch. [J]. *Insect Biochem Physiology*, 2003, 52: 71-80.
- [5] 杨秀芬, 杨怀文, 简恒, 等. 嗜线虫杆菌发酵液对苾麻疫霉的抑制作用 [J]. *中国生物防治*, 1998, 14(1): 21-24.
- [6] 丛斌, 王希华, 王洪平. 昆虫病原线虫的共生细菌 [J]. *中国病毒学*, 2000(15): 24-30.
- [7] 杨秀芬, 张志铭, 杨怀文, 等. 嗜线虫致病杆菌代谢物对马铃薯晚疫病菌的抑制作用 [J]. *中国生物防治*, 2000, 16(3): 111-113.
- [8] Morgan J A W, Sergeant M, Ellis D, et al. Sequence analysis of insecticidal genes from *Xenorhabdus nematophilus* PM F1296 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2062-2069.
- [9] Waterfield N, Dowling A, Shama S. Oral toxicity of *Photorhabdus luminescens* W14 toxin complexes in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 5017-5024.
- [10] 张刚应, 杨怀文, 张善稿, 等. 北京地区昆虫病原线虫的自然发生情况初步调查 [J]. *生物防治通报*, 1992, 8(4): 157-159.
- [11] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2003: 251.
- [12] 刘维志. 植物病原线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 371-372.
- [13] Selcuk H, Patricia S S, Harry K K, et al. Koppenhofer and nevin keskin development temperature effects on five geographic isolates of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) [J]. *Invertebrate Pathology*, 2001, 77: 243-250.
- [14] 张纪忠. 微生物分类学 [M]. 上海: 复旦大学出版社, 1990: 93-106.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] 慕立义. 植物化学保护研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 79-81.
- [17] 李小峰, 王国汉, 闽奥. 海南地区的斯氏线虫科及异小杆线虫科分布调查 [J]. *动物学杂志*, 1989, 24(3): 1-4.
- [18] 李福春. 昆虫线虫学 [M]. 北京: 农业出版社, 1989: 163.
- [19] Boemare N E, Akhurst R J. Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae) [J]. *J Gen Microbiol*, 1988, 134: 751-761.
- [20] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Ninth Edition) [M]. USA: Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1994.
- [21] Ng K K, Webster J M. Antimycotic of *Xenorhabdus bovienii* (Enterobacteriaceae) metabolites against phytophthora infestans on potato [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1997, 19(2): 21-24.
- [22] 杨秀芬, 杨怀文, 简恒, 等. 高毒力杀虫细菌嗜线虫致病杆菌 CB6 菌株的培养基优化 [J]. *中国生物防治*, 2004, 20(2): 118-121.

(下转第 60 页)

- [10] 魏秀敏. 15% 敌力脱乳油防治小麦黑胚病效果显著[J]. 植物保护, 2001, 27(5): 49
- [11] 李洪连, 邢小萍, 袁虹霞, 等. 小麦黑胚病药剂防治研究[J]. 麦类作物学报, 2005, 25(5): 100-103
- [12] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1998: 151-154
- [13] 李健强, 张洪斌, 刘西莉, 等. 5 种杀菌剂对小麦光腥黑穗病菌的毒力和孢子萌发形态结构的影响[J]. 农药学报, 2000, 2(1): 41-46
- [14] Buchenauelr H, Iry H. Modern Selective fungicides, properties, application and mechanism of action[C]. Essex: Longman Scientific and Technical, 1987: 205-232

Control of 3 fungicides against wheat black point *in vitro* and *in vivo*

WANG Chun-ming, HAN Qing-mei, HUANG Li-li, KANG Zhen-sheng

(College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effects of 3 fungicides on conidia germination and mycelium growth of the pathogen, *Bipolaris sorokiniana* and *Alternaria alternata* and the cause of wheat black point were investigated *in vitro* and *in vivo*. The results showed that conidia germination and colony diameters were strongly inhibited by 3 fungicides in test concentration. The highest inhibitions were got from treatment of Propiconazole. Its EC_{50} values were very low. Carbendazim had less effect on the pathogens. Control of black point of wheat in greenhouse experiment and field trial by 3 fungicides revealed that Propiconazole and Mancozeb could effectively reduce the rate of diseased kernels compared with Carbendazim as well as untreated control after inoculation. Furthermore, much higher efficiency of disease control were found in 3 fungicides treatment 4 days after inoculation than that 2 days before inoculation.

Key words: black point of the wheat; conidia germination rate; colony diameter; *Bipolaris sorokiniana*; *Alternaria alternata*

(上接第 54 页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)07-0050-EA

Preliminary study on the inhibition activity of fermented liquid and screening of entomopathogenic nematodes symbiotic bacterium

XU Xian^{1,2}, WANG Yong-hong^{1,2}, LIU Xia¹, LI Qian¹, FENG Jun-tao^{1,2}, ZHANG Xing^{1,2}

(1 Research and Development Center of Biorational Pesticide, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Shaanxi Research Center of Biopesticide Technology and Engineering, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to select new entomopathogenic nematodes symbiotic bacteria and obtain new material to control insect and inhibit the growth rate of plant pathogenic fungi, 315 soil samples were collected from Yangling, Taibai, Hanzhong and Weinan in Shaanxi province. As a result, two kinds of entomopathogenic nematodes and one species of phase I-type symbiotic bacteria was collected from the soil samples. By preliminary identification, the symbiotic bacteria belonged to *Xenorhabdus* spp. The inhibitory activity results demonstrated that the growth rate of hypha of the 11 species of plant pathogenic fungi were inhibited at different levels by fermented liquid of the symbiotic bacteria, above all, *Phytophthora capsici* and *Ceratobasidium cornigerum* Rogers were nearly completely inhibited. At the same time, fermented liquid could put off the germination of sporangia of *Botrytis cinerea*.

Key words: entomopathogenic nematodes; symbiotic bacteria; isolation and identification; inhibitory activity