

韭菜迟眼蕈蚊体内及韭菜根际微生物的多样性分析*

高欢欢^{1**} 翟一凡¹ 王海艳^{1,2} 云雷¹ 覃冬云¹ 于毅^{1***}

(1. 山东农业科学院植物保护研究所, 济南 250100; 2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

摘要 【目的】 为了了解韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 生存环境中微生物的多样性。【方法】 本研究对韭蛆、韭菜鳞茎、根部以及土壤中的微生物进行分离纯化, 对部分代表性细菌进行了生理生化特征的分析, 并对分离得到的真菌及细菌分别采用 ITS 和 16S rDNA 基因分析的方法进行鉴定。【结果】 总共分离鉴定出 25 种微生物, 在韭菜鳞茎和土壤中分别分离出半知菌亚门 (Deuteromycotina) 的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和球孢虫草 *Cordyceps bassiana* 两种真菌, 在韭蛆体内、韭菜鳞茎、韭菜根部以及土壤中分别分离出 10、15、9、6 种细菌, 以变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 细菌为主, 其余的细菌分别属于放线菌门 (Actinobacteria) 和拟杆菌门 (Bacteroidetes)。【结论】 本研究可以为寻找韭菜、韭蛆和微生物三者之间的协同进化关系提供理论基础, 并期望为韭蛆的共生防治提供指导。

关键词 韭蛆, 韭菜, 微生物, 多样性

Microbial diversity of *Bradysia odoriphaga* and the rhizosphere microbes of chives

GAO Huan-Huan^{1**} ZHAI Yi-Fan¹ WANG Hai-Yan^{1,2} YUN Lei¹
QIN Dong-Yun¹ YU Yi^{1***}

(1. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract [Objectives] To understand microbial diversity in *Bradysia odoriphaga* and its environment. [Methods] Microorganisms in *B. odoriphaga*, and in the bulbs and roots of chives, and soil were separated, purified, and identified through ITS and 16S rDNA genetic analysis. Physiological and biochemical analyses was then carried out for some representative bacteria. [Results] 25 microbial species were identified from the environment of *B. odoriphaga*. *Beauveria bassiana* and *Cordyceps bassiana* (Deuteromycotina), were found in both chive bulbs and soil. Most bacterial species belonged to the Proteobacteria and Firmicutes, the rest belonged to Actinobacteria and Bacteroidetes. 10, 15, 9, 6 bacterial species were identified in *B. odoriphaga*, and in the chive bulbs, roots and soil, respectively. [Conclusion] This study provides a theoretical foundation for investigating coevolution among chives, *B. odoriphaga* and microorganisms. We hope that it will also contribute to the symbiotic control of *B. odoriphaga*.

Key words *Bradysia odoriphaga*, chives, microorganism, diversity

韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* Yang et Zhang 幼虫称韭蛆, 属双翅目, 长角亚目, 眼蕈蚊科, 迟眼蕈蚊属 (杨集昆和张学敏, 1985),

取食范围广。韭蛆除为害韭菜外, 还为害百合科、菊科、藜科、十字花科、葫芦科、伞形科等 7 科 30 多种蔬菜, 尤以北方保护地韭菜受害最重,

* 资助项目 Supported projects: 社会公益性研究项目 “作物根蛆类害虫综合防治技术与示范” (201303027)

**第一作者 First author, E-mail: gaohuanhuan368@126.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: robertyuyi@163.com

收稿日期 Received: 2014-12-06, 接受日期 Accepted: 2015-05-14

可造成 30%~80% 的产量损失(梅增霞等, 2003)。韭蛆分布也非常广泛, 全国各地均有发生, 主要分布在华北、东北、西北和山东等地(张华敏等, 2013)。韭蛆具有钻蛀性, 韭菜根部以及白色嫩茎、假茎、鳞茎均会受到危害后会出现腐烂, 韭菜倒伏枯黄, 产量下降(陈建华等, 2004)。腐烂部位会出现大量微生物, 韭蛆在微生物富集的环境中可以大量生存繁殖, 说明在韭蛆、韭菜以及微生物之间存在着密不可分的关系。

植物根际微生物中除了致病菌以外, 也包括大量对植物生长和健康具有促进作用的有益微生物, 被称为植物根际促生微生物(Plant growth promoting microbiology, PGPM)(赵官成等, 2011)。其中根际促生细菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)包括固氮微生物、荧光假单胞菌、芽孢杆菌、根瘤菌、沙雷氏菌属等 20 多个种属(Xia *et al.*, 2014)。而微生物与昆虫之间存在的也不仅仅是致病的关系, 还包括互利的非致病关系, 甚至有些微生物是昆虫生长发育、繁殖所必需的(Dillon and Charnley, 2002; Brummel *et al.*, 2004)。由此说明, 在长期进化的过程中, 宿主植物、昆虫以及微生物之间形成了协同进化的关系。Durvasula 等早在 1997 年就利用此协同进化的关系提出了共生防治(Symbiont control)的策略, 利用媒介昆虫体内共生菌表达的抗菌物质来清除媒介体内的病原菌, 以控制昆虫媒介传播的病害。而寻找到对昆虫具有致死效应的靶标基因后, 昆虫体内的微生物也可以成为其表达的理想场所, 从而达到害虫防治的目的(杨焯, 2012)。

本研究利用 ITS 和 16S rDNA 基因分析的方法对韭蛆体内以及韭菜根际微生物进行鉴定, 为寻找韭菜、韭蛆和微生物三者之间的协同进化关系提供理论基础, 并为韭蛆的共生防治提供指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

韭蛆老熟幼虫、韭菜以及周围土壤均于 2014

年 4 月采自济南济阳韭菜田。

1.2 实验仪器与试剂

超净工作台(SW-Cj-ZFD, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司), 培养箱(RXZ-328A 型, 宁波江南仪器厂), 离心机(D-78532, 德国 Tuttlingen), PCR 仪(EPS301, 美国 Pharmacia), 电泳仪(JY3000, 北京君意东方电泳设备有限公司), 凝胶成像系统(JY04S-3C, 北京君意东方电泳设备有限公司)。NB 培养基, 孟加拉红培养基, PBS 缓冲液, DNA 提取试剂盒 DV811A (Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0, 天根生化科技有限公司), 2×Taq Plus PCR Master Mix (天根生化科技有限公司)。

1.3 微生物的分离纯化

选取韭蛆老熟幼虫、韭菜鳞茎、根部和根际土壤四个部位进行微生物的分离。取韭菜的部分鳞茎和根部以及土壤用无菌 PBS 缓冲液浸泡, 吸取液体分别稀释 10^3 、 10^4 和 10^5 倍。另取 30 头韭蛆用 75% 的酒精浸泡 1 min 以消除韭蛆体表的微生物, 无菌 PBS 缓冲液清洗干净后, 在 PBS 缓冲液中匀浆, 吸取匀浆液稀释 10^3 、 10^4 和 10^5 倍, 即为韭蛆体内的微生物混合液。吸取 100 μ L 各个部位不同浓度的微生物混合液分别涂布于 NB 板和孟加拉红培养基平板上, 每个浓度 3 个重复。涂板后放置 25℃ 培养箱中培养 48 h。

选择孟加拉红培养基平板中有代表性的真菌, 挑取菌落在新的孟加拉红平板中纯化 3 次, 纯化好的真菌保存到 1.5 mL 离心管孟加拉红培养基斜面上, 放置在 4℃ 保存备用。

选择有代表性的细菌单菌落进行划线纯化, 25℃ 培养箱中培养, 菌落出现后, 连续划线培养 4~5 次, 对纯化好的菌落进行编号, 挑取纯化好的各细菌菌落在 LB 液体培养基中过夜摇菌, 加等体积 60% 的甘油保存于 -20℃ 备用。

1.4 微生物分离物的基因鉴定

1.4.1 细菌分离物的 16S rDNA 鉴定 对于分离纯化后的细菌采用 16S rDNA 鉴定法。按照 DNA

提取试剂盒 DV811A (Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0) 提取各个细菌的 DNA, 提取的 DNA 样品取 5 μ L 通过 1% 琼脂糖凝胶电泳来检测质量, 检测合格后保存于 -20℃ 备用。

PCR 反应体系如下: DNA 模板 1 μ L, 2 $\times$ Taq Plus PCR Master Mix 12.5 μ L, 上下游引物各 1 μ L, 加入 ddH₂O 补充至 25 μ L。

PCR 反应按照如下程序进行: 94℃ 预热 3 min, 94℃ 热变性 30 s, 54℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72℃ 反应后延伸 5 min。

引物序列: 16S rDNA-27F: 5'-AGAGT TTGATCCTGGCTCAG-3'; 16S rDNA-1492R: 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'。

1.4.2 真菌的 ITS 鉴定 对于分离纯化后的真菌采用 ITS 鉴定法。收集真菌的菌丝, 提取 DNA 并进行 PCR 扩增反应 (DNA 提取方法及 PCR 反应体系同 1.5.1)。

PCR 反应按照如下程序进行: 94℃ 预热 3 min, 94℃ 热变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72℃ 反应后延伸 5 min。

引物序列: ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCT GCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'。

1.4.3 测序分析 将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 观察 16S rDNA 和 ITS 的条带是否分别为 1 500 kb 左右和 500 kb 左右。切胶回收后送山东农业科学院测序中心测序, 其中 16S rDNA 为双向测序, ITS 为单向测序。将测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST 分析, 以确保是 16S rDNA 和 ITS 基因序列, 并以此来判断微生物的分类地位。

1.5 部分微生物的生理生化鉴定

选择有代表性的细菌进行生理生化分析, 选择的依据, 一是各个部位均具有的菌类, 二是并未大量研究过的菌类, 期望可以从中发现更多有价值的信息。分析指标包括革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色、细菌游动性、接触酶实验、淀粉水解实验、油脂水解实验、尿素实验、V-P 实验、柠檬酸盐实验、H₂S 实验、吲哚实验、糖酵解实

验 (葡萄糖)、乳糖、麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、硝酸盐实验、明胶实验和石蕊牛乳实验。所有方法参照东秀珠和蔡妙英 (2001) 的生理生化特征测定方法。

2 结果与分析

2.1 韭蛆及韭菜根际微生物的分离鉴定

在韭蛆体内、韭菜鳞茎、韭菜根部和土壤四个部位分离出的微生物见表 1。真菌分离出两种, 只在韭菜鳞茎和土壤中分别分离出半知菌亚门 (Deuteromycotina) 的球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 和球孢虫草 *Cordyceps bassiana*。而细菌种类较多, 共分离出 23 种, 主要隶属于变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes), 其中包括变形菌门 γ -变形菌纲的居泉沙雷氏菌 *Serratia fonticola*、多食鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium multivorum*、泡囊短波单胞菌 *Brevundimonas vesicularis*、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae*、奥克西托克雷伯杆菌 *klebsiella oxytoca*、不动杆菌 *Acinetobacter guillouiae* 和 6 种假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. 细菌, 以及厚壁菌门芽孢杆菌纲的 7 种芽孢杆菌 *Bacillus* sp.。另外节杆菌 *Arthrobacter nitroguajacolicus* 隶属于放线菌门 (Actinobacteria) 放线菌纲, 香味黄杆菌 *Myroides odorayus* 则为拟杆菌门 (Bacteroidetes) 黄杆菌纲的一种。

据表中所示, 虫体和韭菜鳞茎中分别分离出 10 种和 15 种, 分离所得的菌类以变形菌门的细菌为主, 分别占到 70% 和 60%; 根部分离出 9 种细菌, 以厚壁菌门的芽孢菌为主, 占到 77.8%, 土壤中则没有明显的优势菌群, 分离出 6 种细菌。而在所有的部位均分离到了居泉沙雷氏菌 *S. fonticola* 和解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。

2.2 基因同源性比对及系统发育分析

微生物基因同源性比对结果如表 1 所示, 两种真菌的 ITS 序列分别与球孢白僵菌 *B.*

bassiana (KF766522.1) 和球孢虫草 *C. bassiana* (EF411229.1) 的同源性均达到 99%, 因此可以确定为两种真菌。

细菌采用 16S rDNA 基因鉴定的方法, 通过序列比对, 发现与 NCBI 核苷酸数据库中序列的同源性均达到 99% 以上, 其中不动杆菌 *Acinetobacter guillouiae*、炭疽芽孢杆菌 *Bacillus anthracis*、高地芽孢杆菌 *Bacillus altitudinis* 和节杆菌 *A. nitroguajacolicus* 分别与 KF749283.1、JN999847.1、KM083101.1 和 KF358262.1 的序列完全吻合, 达到 100% 的同源性。证明所鉴定的属种名称完全符合。系统发育树见图 1。

表 1 韭蛆及韭菜根际微生物种类
Table 1 Microorganisms in *Bradysia odoriphaga* and rhizosphere microbe of chives

微生物名称 Names of microorganisms	比对序列号 Blast accession	分离部位 Separated position			
		虫体 Insect body	鳞茎 Bulbs	根 Root	土壤 Soil
球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	KF766522.1 (99%)	-	+	-	-
球孢虫草 <i>Cordyceps bassiana</i>	EF411229.1 (99%)	-	-	-	+
居泉沙雷氏菌 <i>Serratia fonticola</i>	JN596121.1 (99%)	+	+	+	+
沙雷氏菌属 <i>Serratia</i> sp.	KM117223.1 (99%)	-	-	+	-
多食鞘氨醇杆菌 <i>Sphingobacterium multivorum</i>	EF423371.1 (99%)	+	+	-	-
泡囊短波单胞菌 <i>Brevundimonas vesicularis</i>	KC494327.1 (99%)	+	-	-	-
阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	HM585374.1 (99%)	+	-	-	-
奥克西托克雷白杆菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	JX848323.1 (99%)	-	+	-	-
不动杆菌 <i>Acinetobacter guillouiae</i>	KF749283.1 (100%)	-	+	-	+
恶臭假单胞杆菌 <i>Pseudomonas putida</i>	KF640247.1 (99%)	+	+	-	-
弯曲假单胞 <i>Pseudomonas geniculata</i>	JF460769.1 (99%)	+	-	-	+
假单胞杆菌属 <i>Pseudomonas mosselii</i>	DQ073452.1 (99%)	+	+	-	-
假单胞杆菌属 <i>Pseudomonas koreensis</i>	HQ589332.1 (99%)	-	+	-	+
假单胞杆菌属 <i>Pseudomonas extremorientalis</i>	KJ748601.1 (99%)	-	+	-	-
假单胞杆菌属 <i>Pseudomonas brassicacearum</i>	KF475874.1 (99%)	-	+	-	-
解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	KJ438703.1 (99%)	+	+	+	+
同温层芽孢杆菌 <i>Bacillus stratosphericus</i>	KC172055.1 (99%)	+	+	-	-
短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pumilus</i>	KM265464.1 (99%)	-	+	-	+
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	KJ699394.1 (99%)	-	-	+	+
炭疽芽孢杆菌 <i>Bacillus anthracis</i>	JN999847.1 (100%)	-	-	+	+
蕈状芽孢杆菌 <i>Bacillus mycoides</i>	JX856133.1 (99%)	-	-	+	-
高地芽孢杆 <i>Bacillus altitudinis</i>	KM083101.1 (100%)	-	-	+	-
节杆菌属 <i>Arthrobacter</i> sp.	KF956555.1 (99%)	-	+	+	-
节杆菌 <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	KF358262.1 (100%)	+	+	+	-
香气黄杆菌 <i>Myroides odorayus</i>	NR_112976.1 (99%)	-	+	-	-

每种微生物后的符号“+”代表在相应的部分能够分离到此种微生物, 符号“-”则代表没有分离到。

Symbol “+” indicates that the correspondent microorganism is separated in this position, “-” indicates no correspondent microorganism in this position.

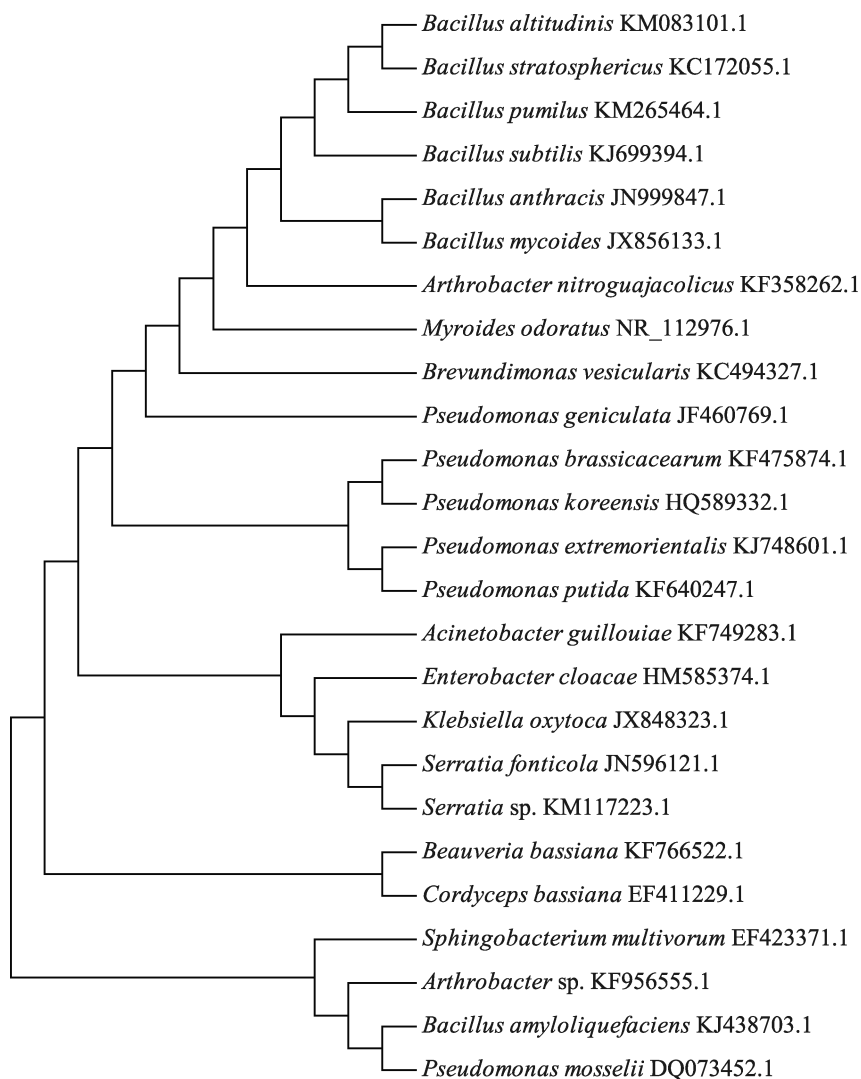


图 1 韭蛆及韭菜根际分离微生物的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of microorganisms in *Bradysia odoriphaga* and rhizosphere microbe of chives

2.3 生理生化鉴定

在细菌的 16S rDNA 基因鉴定结果中选择有代表性的菌株进行生理生化特征的分析,所选择的细菌如下:居泉沙雷氏菌 *S. fonticola*、沙雷氏菌属 *Serratia* sp.、多食鞘氨醇杆菌 *S. multivorum*、泡囊短波单胞菌 *B. vesicularis*、恶臭假单胞杆菌 *P. putida*、假单胞杆菌属 *P. extremorientalis*、同温层芽孢杆菌 *B. stratosphericus*、高地芽孢杆菌 *B. altitudinis* 和节杆菌属 *Arthrobacter* sp. 共 9 种,其生理生化特征如表 2 所示。

3 结论与讨论

本研究对韭菜迟眼蕈蚊(韭蛆)及韭菜鳞茎根际微生物进行分离纯化,并对分离得到的真菌及细菌分别采用 ITS 和 16S rDNA 基因分析的方法进行鉴定,总共分离鉴定出 25 种微生物,在韭菜鳞茎和土壤中分别分离出半知菌亚门的球孢白僵菌 *B. bassiana* 和球孢虫草 *C. bassiana* 两种真菌,在韭蛆虫体内、韭菜鳞茎、韭菜根部以及土壤中分别分离出 10、15、9、6 种细菌。

本研究中韭蛆体内大多数细菌属于变形菌

表 2 部分细菌的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics analysis of some microorganisms

理化特性 Physiological and biochemical characteristics	居泉沙雷 氏菌 <i>S.</i> <i>fonticola</i>	沙雷氏 菌属 <i>S.</i> <i>Serratia</i> sp.	多食鞘氨 醇杆菌 <i>S. multivorum</i>	泡囊短波 单胞菌 <i>B. vesicularis</i>	恶臭假单 胞杆菌 <i>P. putida</i>	假单胞 杆菌属 <i>P. extremorientalis</i>	同温层芽 孢杆菌 <i>B. stratosphericus</i>	高地芽 孢杆菌 <i>B. altitudinis</i>	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i> sp.
革兰氏染色 Gram staining	+	+	+	-	-	-	+	+	+
芽孢染色 Spore staining	+	+	+	-	+	+	+	-	+
鞭毛染色 Flagella staining	+	+	+	+	+	+	+	+	+
细菌游动性	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Bacterial motility									
接触酶实验	+	+	+	+	+	+	+	+	
Catalase reaction									
淀粉水解实验	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis test									
油脂水解实验	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oil hydrolysis test									
尿素实验 Urease test	+	-	+	-	-	-	-	-	-
V-P 实验 V-P test	-	+	-	-	-	+	+	-	-
柠檬酸盐实验	-	+	-	-	+	+	+	-	-
Citrate test									
H ₂ S 实验 H ₂ S test	+	+	+	+	+	+	+	+	+
吡啉实验 Benzpyrole test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
糖醇解实验 (葡萄糖)	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Glycolysis test (Glucose)									
乳糖 Lactose	+	+	+	+	-	+	+	+	-
麦芽糖 Maltose	-	-	+	+	-	+	+	-	-
蔗糖 Saccharose	+	-	+	-	-	+	+	+	-
阿拉伯糖 Arabinose	+	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸盐实验 Nitrate test	+	+	+	+	-	+	+	+	+
明胶实验 Gelatin test	-	-	-	-	-	-	-	-	-
石蕊牛乳实验									
Litmus milk test	还原 Reduction	还原 Reduction	还原 Reduction	还原 Reduction	还原 Reduction	还原 Reduction	还原 VReduction	碱性 Alkalinity	碱性 Alkalinity

每种微生物后的符号“+”代表此种微生物在相应的生理生化反应中显示阳性, 符号“-”则表示显示阴性。
Symbol “+” indicates that microorganism is positive in this the correspondent physiological and biochemical reaction, “-” indicates negative in this reaction.

门, 其他则是放线菌门的节杆菌 *A. nitroguajacolicus* 和厚壁菌门的解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 以及同温层芽孢杆菌 *B. stratosphericus*, 这跟前人的研究是一致的。已有研究表明, 昆虫共生菌最多的属于变形菌门, 其他许多分布在拟杆菌门、放线菌门、衣原体门 (Chlamydiae) 和厚壁菌门 (Kikuchi, 2009)。例如, 在鳞翅目昆虫贡嘎蝠蛾 *Hepialus gonggaensis* (刘莉等, 2008)、棉铃虫 *Helicoverpa armigera* (Xiang et al., 2006) 和家蚕 *Bombyx mori* (相辉等, 2007) 体内以及直翅目昆虫东亚飞蝗 (刘玉升和李明立, 2007) 体内的优势细菌属于变形菌门和壁厚菌门, 半翅目昆虫日本龟蜡蚧 (贝绍国等, 2005) 和斑衣蜡蝉 (刘玉升等, 2006) 体内分离出地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌等厚壁菌门细菌。

本研究分离出的某些微生物具有抑菌作用, 可以为昆虫消除有害微生物的影响, 例如多种芽孢杆菌, 对于有害于韭蛆生长的微生物可能也具有抑制作用。而有些微生物还在宿主的生理过程中起到重要的作用, 已经有相关的研究进行了报道。例如, Bucher (1959) 发现沙雷氏菌能通过表皮创口进入昆虫血淋巴内, 造成败血症并导致昆虫死亡, 而经口摄入的沙雷氏菌通常不表现出致病性, 这可能也是韭蛆体内含有沙雷氏菌却没有致病的原因。从黄胸散白蚁 *Witermes speratus* 后肠中分离到的另一种沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 参与了纤维素的消化过程 (Thayer, 1978)。而解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 也是一种纤维素酶产生菌, 对于取食韭菜这种纤维素含量较多的植物的昆虫来说, 这两种菌的存在可能恰恰有助于其消化。另外, 恶臭假单胞杆菌具有谷氨酰胺转氨酶活性 (郝学忠等, 2005), *K. oxytoca* BAS-10 菌株具有较强的耐受重金属的能力, 胞外多糖具有较好地去除 Pb^{2+} 和 Cd^{2+} 的能力 (Baldi et al., 2001), 多食鞘氨醇菌 *S. multivorum* ED 菌株对生活污泥具有较好的生物降解作用 (陆源源, 2012), *P. koreensis* JDM-2 株具有较高的 ACC 脱氢酶活性和明显的抑菌活性 (龚凤娟等, 2013); 对于致病菌, 昆虫自身

可以启动免疫机制, 产生抗菌肽类物质 (相辉和黄勇平, 2008)。果蝇饲料中添加植物病原菌胡萝卜软腐欧氏杆菌 *Erwinia carotovora* 后, 引起了免疫反应 (Basset et al., 2000), 这种植物病原菌的大量存在也加速了果实的腐败, 恰好有利于这种果蝇取食腐败果实。从进化的角度看, 这些植物病原菌进化出一些机制使媒介昆虫也成为其一个寄主 (相辉和黄勇平, 2008)。

在进化过程中, 生物体周围的环境提供了强大的选择压。昆虫和宿主植物体内均存在多种微生物, 而在如此复杂的环境条件下, 韭蛆、韭菜与微生物则可以稳定的生存, 三者的协同进化机制对于三者之间关系的研究可以提供重要的遗传基础。而从害虫防治的角度出发, 打破韭蛆的共生环境, 将成为一种新型的共生防治方法。

参考文献 (References)

- Baldi F, Minacci A, Pepi M, Scozzafava A, 2001. Gel sequestration of heavy metals by *Klebsiella oxytoca* isolated from ironmat. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 36(2/3): 169–174.
- Basset A, Khush RS, Braun A, Gardan L, Boccard F, Hoffmann JA, Lemaitre B, 2000. The phytopathogenic bacteria *Erwinia carotovora* infects *Drosophila* and activates an immune response. *PNAS*, 97(7): 3376–3381.
- Bei SG, Liu YS, Cui JX, 2005. Isolation and identification of bacteria from gastrointestinal tract of ceroplastes japonicas green. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 36(2): 209–212. [贝绍国, 刘玉升, 崔俊霞, 2005. 日本龟蜡蚧肠道细菌分离及鉴定研究. 山东农业大学学报(自然科学版), 36(2): 209–212.]
- Brummel T, Ching A, Seroude L, Simon AF, Benzer S, 2004. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *PNAS*, 101(35): 12974–12979.
- Bucher GE, 1959. Bacteria of grasshoppers of western Canada. . Frequency of occurrence, pathogenicity. *J. Insect Pathol.*, 1: 391–405.
- Chen JH, Mu LQ, Jiang GX, Lu ZF, 2004. Occurrence regularity and integrated control of *Bradysia odoriphaga*. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 9(4): 74. [陈建华, 慕留奇, 姜国霞, 鲁自芳, 2004. 大田韭菜地蛆发生规律与综合防治. 河南农业科学, 9(4): 74.]
- Dillon RJ, Charnley K, 2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res. Microbiol.*,

- 153(8): 503–509.
- Dong XZ, Cai MY, 2001. Common Bacteria Identification Manual. Beijing: Science Press. 364–370. [东秀珠, 蔡妙英, 2001. 常见细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社. 364–370.]
- Durvasula RV, Gumbs A, Panackal A, Kruglov O, Aksoy S, Merrifield RB, Richards FF, Beard CB, 1997. Prevention of insect-borne disease: an approach using transgenic symbiotic bacteria. *PNAS*, 94 (7): 3274–3278.
- Gong FJ, Borrathybay E, Zhang YF, Nazierbieke, W, 2013. Isolation and antibacterial activity of ACC deaminase-containing endophytic bacteria from *Eucommia ulmoides* Oliver. *Microbiology China*, 8(10): 1526–1532. [龚凤娟, 恩特马克·布拉提白, 张宇凤, 吾鲁木汗·那孜尔别克, 2013. 具有 ACC 脱氢酶活性的杜仲内生细菌的分离鉴定及其抗菌活性. 微生物学通报, 8(10): 1526–1532.]
- Hao XZ, Xue F, Zhu YM, Ma Y, Li JP, 2005. Cloning and construction of the transglutaminase gene and its prokaryotic expression vector from *Pseudomonas putida* H76. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 27(1): 21–24. [郝学忠, 薛飞, 朱远茂, 马莺, 李景鹏, 2005. 恶臭假单胞杆菌转谷氨酰胺酶基因的克隆及原核表达载体的构建. 中国预防兽医学报, 27(1): 21–24.]
- Kikuchi Y, 2009. Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes. Environ.*, 24(3): 195–204.
- Liu L, Wang ZK, Yu HW, Chen SJ, Yan GF, Xia, YX, Yin YP, 2008. Analysis of the bacterial diversity in intestines of *Hepialus gonggaensis* larvae. *Acta Microbiologica Sinica*, 48(5): 616–622. [刘莉, 王中康, 俞和伟, 陈仕江, 阎光凡, 夏玉先, 殷幼平, 2008. 贡嘎蝠蛾幼虫肠道细菌多样性分析. 微生物学报, 48(5): 616–622.]
- Liu YS, Chen YX, Lv, F, He H, 2006. Study on the primary identification of intestinal bacteria in *Lycorma delicatula* (White). *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*, 37(4): 495–498. [刘玉升, 陈艳霞, 吕飞, 何华, 2006. 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌的鉴定研究. 山东农业大学学报(自然科学版), 37(4): 495–498.]
- Liu YS, Li ML, 2007. Study on the intestinal bacteria in *L. migratoria manilensis*. *Chinese Journal of Microecology*, 19(1): 34–39. [刘玉升, 李明立, 2007. 东亚飞蝗肠道细菌的研究. 中国微生态杂志, 19(1): 34–39.]
- Lu YY, 2012. Study on degradation of steroidestrogens by activated sludge and a *Sphingo. multivorum* bacterium. Master dissertation. Nanjing: Nanjing University of Science & Technology. [陆源源, 2012. 多食鞘氨醇菌活性污泥法降解水中甾体雌激素机理研究. 硕士学位论文. 南京: 南京理工大学.]
- Mei ZX, Wu QJ, Zhang YJ, Hu L, 2003. The biology, ecology and management of *Bradysia odoriphaga*. *Entomological Knowledge*, 40(5): 396–398. [梅增霞, 吴青君, 张友军, 花蕾, 2003. 韭菜迟眼蕈蚊的生物学、生态学及其防治. 昆虫知识, 40(5): 396–398.]
- Thayer DW, 1978. Carboxymethyl cellulase produced by facultative bacteria from the hindgut of the termite *Reticulitermes hesperus*. *Journal of genetic Microbiology*, 106: 13–18.
- Xia Y, Xu Q, Lin Y, Chen ZH, Kong, FY, Zhang CX, 2014. Research progress of mechanism of action of plant growth promoting rhizobacteria. *Agricultural Science & Technology*, 15(1): 87–90.
- Xiang H, Huang YP, 2008. Symbiosis between gut microbiota and insects. *Chinese Bulletin of Entomology*, 45(5): 687–693. [相辉, 黄勇平, 2008. 肠道微生物与昆虫的共生关系. 昆虫知识, 45(5): 687–693.]
- Xiang H, Li MW, Zhao Y, Zhao LP, Zhang YH, Huang YP, 2007. Bacterial community in midguts of the silk worm larvae estimated by PCR DGGE and 16S rDNA gene library analysis. *Acta Entomologica Sinica*, 50(3): 222–233. [相辉, 李木旺, 赵勇, 赵立平, 张月华, 黄勇平, 2007. 家蚕幼虫中肠细菌群落多样性的 PCR-DGGE 和 16SrDNA 文库序列分析. 昆虫学报, 50(3): 222–233.]
- Xiang H, Wei GF, Jia S, Huang J, Miao XX, Zhou Z, Zhao LP, Huang YP, 2006. Microbial community in the larval midgut of laboratory and field populations of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Can. J. Microbiol.*, 52(11): 1085–1092.
- Yang H, 2012. Diversity of gut bacteria in larval of four lepidopteran insect species. Master dissertation. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [杨焊, 2012. 四种鳞翅目害虫肠道细菌多样性分析. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.]
- Yang JK, Zhang XM, 1985. Identification of two new species of *Byadysia* (Diptera: Sciaridae). *Journal of Beijing Agricultural University*, 11(2): 153–156. [杨集昆, 张学敏, 1985. 韭菜蛆的鉴定迟眼蕈蚊属二新种(双翅目: 眼蕈蚊科). 北京农业大学学报, 11(2): 153–156.]
- Zhang HM, Yin SH, Zhang M, Chen ZF, 2013. Research progress on control techniques of *Bradysia odoriphaga*. *Journal of Henan Agricultural Science*, 42(3): 6–9. [张华敏, 尹守恒, 张明, 陈中府, 2013. 韭菜迟眼蕈蚊防治技术研究进展. 河南农业科学, 42(3): 6–9.]
- Zhao GC, Liang J, Dan JY, Wang J, Qin Y, Zhang WH, 2011. Review of studies on relationship between soil microbes and plants. *Journal of Southwest Forestry University*, 31(1): 83–88. [赵官成, 梁健, 淡静雅, 王静, 秦源, 张武会, 2011. 土壤微生物与植物关系研究进展. 西南林业大学学报, 31(1): 83–88.]