

## 松材线虫和拟松材线虫体内细菌的透射电镜观察及分离鉴定

袁为敏, 吴小芹\*, 叶建仁, 田晓静

南京林业大学, 江苏省有害生物入侵预防与控制重点实验室, 南京 210037

**摘要** 【目的】松材线虫是松树萎蔫病的病原, 拟松材线虫在形态等方面与松材线虫极其相似。关于两种线虫与细菌的研究多集中于体表伴生细菌。本文要揭示松材线虫和拟松材线虫体内是否存在细菌。【方法】对松材线虫和拟松材线虫进行透射电镜观察; 并采用 1% 升汞和抗菌素混合液对两种线虫虫体进行体表消毒后研磨, 制备悬浮液涂布 NA 平板; 通过生理生化测定和 16S rDNA 序列分析鉴定细菌种类。【结果】松材线虫和拟松材线虫透射电镜照片显示在两种线虫肠道内均发现细菌; 体表无菌的松材线虫和拟松材线虫共分离到 3 株体内细菌; 这 3 株细菌分别属于寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 和爱文氏菌属 (*Ewingella*)。【结论】松材线虫和拟松材线虫体内均存在细菌; 这些细菌对这两种线虫可能具有一定的生理生态作用。本文是松材线虫和拟松材线虫体内存在细菌的首次报导。

**关键词:** 松材线虫, 拟松材线虫, 透射电镜, 体内细菌, 寡养单胞菌属, 爱文氏菌属

**中图分类号:** X172      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2011) 08-1071-07

在自然界, 动物的各个不同体系或器官分布着以细菌为主的微生物群, 内生的细菌群是宿主的组成部分, 是宿主不可缺少的一个生理系统<sup>[1]</sup>。研究表明, 自然界中多种线虫体内存在内生细菌, 并且这些细菌对宿主的营养及组织的发育具有重要的作用。昆虫病原线虫斯氏线虫属 (*Steinernema*) 和异小杆线虫 (*Heterorhabditis*) 属的内共生细菌可以分泌毒素杀死寄主昆虫, 从而为线虫提供营养<sup>[2]</sup>。大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines*) 胞囊中的细菌, 对胞囊在土壤中长期存活具有重要的生态作用<sup>[3]</sup>。最新研究发现植物寄生线虫香蕉穿孔线虫 (*Radopholus similis*) 存在昆虫共生细菌 *Wolbachia* 家族的新成员, 与宿主的生长发育有着密切的关系<sup>[4]</sup>。由此可见, 线虫与其内共生的细菌有着密不可分的关系。

松材线虫是一种重要的外来植物寄生线虫, 在

中国、日本等亚洲地区引起松树毁灭性传染病害。自 Oku 等<sup>[5]</sup>从松材线虫 (*B. xylophilus*) 体表和感病松树体内分离到一种认为与松苗萎蔫有关的细菌以来, 越来越多的研究表明细菌在松材线虫病中可能发挥一定的作用<sup>[6–10]</sup>。然而, 目前关于松材线虫和拟松材线虫 (*B. mucronatus*) 与细菌关系的研究多集中于体表携带的细菌, 有关两种线虫体内细菌的研究国内外尚未见报道。因此, 为探讨松材线虫和拟松材线虫体内是否存在细菌, 本实验采用透射电镜对松材线虫和拟松材线虫虫体进行了观察; 并对虫体采用体表消毒的方法进行了体内细菌的分离、纯化及鉴定。本实验以期为后续研究松材线虫体内细菌的生理生态功能奠定基础, 为松材线虫病的研究提供参考理论依据。

基金项目: 国家自然科学基金 (30972369)

\* 通信作者。Tel: +86-25-85427427; E-mail: xqwu@njfu.edu.cn

作者简介: 袁为敏 (1985–), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究。E-mail: yuanweimin\_18@163.com

收稿日期: 2010-12-20; 修回日期: 2011-04-25

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试线虫:** 选取来自安徽马尾松 (*Pinus massoniana*) 病死木中的松材线虫 (*B. xylophilus*) 和拟松材线虫 (*B. mucronatus*)。供试虫株保存于南京林业大学森林病理实验室。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 1% 升汞, 2% 抗菌素混合液 (硫酸链霉素和庆大霉素均购自上海生工生物工程技术服务有限公司); 超薄切片机 (瑞典 LKB-V 型), H-600A 透射电子显微镜 (Hitachi 公司), 体式显微镜 (江南 XTB-I 型), 细菌菌落计数仪 (synbiosis ProtoCOL), Biolog Identification System (Biolog, Hayward, CA), PCR 仪 (Eppendorf AG 22331 Hamburg)。

### 1.2 透射电镜超薄切片的制备及观察

取单异活体灰葡萄孢培养的新鲜松材线虫和拟松材线虫样品立刻放入 4% 戊二醛溶液固定, 约 4h 以后, 磷酸缓冲液清洗 3 次, 每次 20 min, 然后 2% 锇酸固定至完全黑透。琼脂包埋样品, 待凝固后, 切成约  $2\text{ mm}^3 - 4\text{ mm}^3$  大小。用 30%、50%、70%、90% 浓度的丙酮逐级脱水后, 100% 丙酮脱水 2 次, 每级每次 30 min, 然后包埋剂逐级渗透, 包埋, 于恒温箱中  $37^\circ\text{C} \rightarrow 45^\circ\text{C} \rightarrow 60^\circ\text{C}$  温度段分别过夜聚合。采用超薄切片机进行超薄切片, 50 nm - 70 nm 厚度, 铀铅染色, 于透射电子显微镜观察。

### 1.3 松材线虫和拟松材线虫体表无菌化处理及分离体内细菌

1% 升汞和抗菌素混合液先后浸泡线虫虫体 (松材线虫和拟松材线虫各 2000 条虫体) 共 1 h, 无菌水换洗 3 次, 获得的线虫液定容至 1 mL。将处理过的线虫悬浮液混匀吸取 100  $\mu\text{L}$  至 NA 平板 (牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1000 mL) 检验, 以接无菌水为对照 (CK1)。分别吸取线虫悬浮液 100  $\mu\text{L}$  至无菌研钵加入适量无菌石英砂充分研磨, 将研磨液涂布至 NA 平板, 此操作重复 3 次, 以无菌水加无菌石英砂研磨为对照 (CK2)。将以上处理的 NA 平板放入  $30^\circ\text{C}$  恒温培养箱培养 2 d 观察 NA 平板的长菌状况。依不同的菌落颜色、形态特征、生长快慢等生理形状, 挑取一定数量的菌落, 用连续划线的方法在平板上划线纯化后, 用 NA

试管斜面培养基和添加 50% 甘油的培养基分别在低温下保存。

在体式显微镜下统计 NA 检验平板中的线虫数量, 运用细菌菌落计数仪统计细菌菌落数并记录不同菌落数之间的比例, 计算松材线虫和拟松材线虫平均每条线虫获得的体内细菌数量。

### 1.4 松材线虫和拟松材线虫体内细菌的鉴定

**1.4.1 细菌的形态及生理生化特性测定:** 对分离获得的细菌测定如下形态和生理生化指标: (1) 革兰氏染色; (2) KOH 拉丝试验; (3) 芽孢染色; (4)  $\text{H}_2\text{O}_2$  酶; (5) 氧化酶; (6) 硝酸盐还原; (7) 淀粉水解; (8) M. R. 反应; (9) V. P. 反应; (10) 吲哚; (11) 柠檬酸盐利用; (12) 产氨; (13) 产  $\text{H}_2\text{S}$ ; (14) 石蕊牛奶<sup>[11-12]</sup>。

**1.4.2 Biolog96 孔碳源鉴定获得的细菌:** 选用 Biolog 系统专用的 BUG + B 培养基富集培养后用 GN/GP-IF 接种液制成菌悬液, 调整成相应的浊度, 最后接种至鉴定板。4-6 h 第 1 次读数, 16-24 h 第 2 次读数。

**1.4.3 细菌 16S rDNA 基因序列的分析:** 细菌 DNA 的提取采用 CTAB 法。以 PrimerA (5'-AGAGTT-TGATCCTGGCTCAG-3') 和 PrimerB (5'-ACGGCTA-CCTTGTTACGACT-3') 作为引物扩增<sup>[13]</sup>。PCR 反应体系为 50  $\mu\text{L}$ , 扩增条件:  $94^\circ\text{C}$  3 min;  $94^\circ\text{C}$  30 s,  $52^\circ\text{C}$  30 s,  $72^\circ\text{C}$  1 min 30 s, 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  7 min。

反应结束后取扩增产物各 5  $\mu\text{L}$  在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳 20 min, 电泳结束后用溴化乙锭 (EB) 染色, 凝胶成像仪观察结果。PCR 产物由南京金斯頓公司纯化测序。将测得的序列到 NCBI 上进行比对, 选取相似度最高代表性菌株的标准菌株 16S rDNA 序列, 并采用 MEGA4.1 进行多序列同源性分析, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树 (Bootstrap = 1000)。

## 2 结果和分析

### 2.1 松材线虫和拟松材线虫体内细菌透射电镜观察

使用透射电镜对松材线虫和拟松材线虫虫体进行纵向和横向切片观察, 结果在两种线虫的肠道内均观察到细菌 (图 1)。由图可清楚的看到被锇酸染成黑色的杆状或短杆状细菌 (图 1-A1) 以及细菌厚厚的细胞壁 (图 1-B1), 菌体大小约为  $(1.2 \times 0.4)\text{ }\mu\text{m} - (2.5 \times 0.35)\text{ }\mu\text{m}$ 。

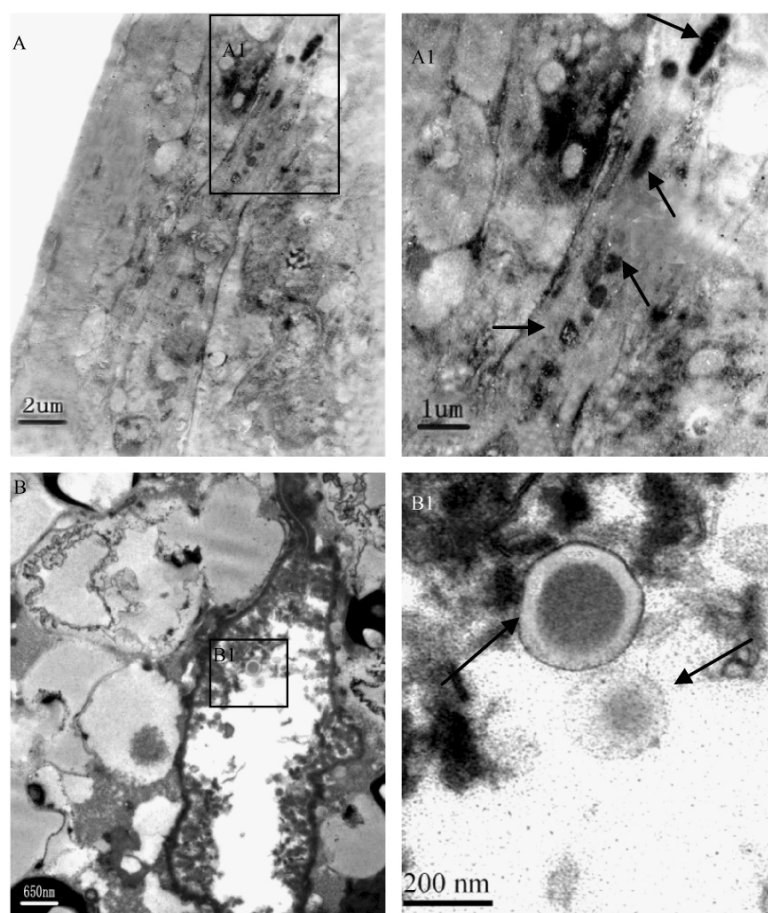


图1 松材线虫和拟松材线虫透射电镜照片

Fig. 1 TEM Photographs of *B. xylophilus* and *B. mucronatus*. A: longitudinal section of *B. xylophilus*; B: cross-section of *B. mucronatus*; Detailed pictures of endophytic bacteria (A1, B1); Endophytic bacteria are indicated with black arrows.

## 2.2 松材线虫和拟松材线虫体内细菌的分离和纯化

观测发现,松材线虫和拟松材线虫经体表消毒后置NA平板检验均未长菌(图2-A1、B1),局部放大NA平板在倒置显微镜下可见线虫未见细菌菌落(图2-A2、B2),这表明两种线虫虫体表面灭菌彻底;将体表无菌的线虫悬浮液分别研磨后涂布NA平板,重复均长出若干细菌菌落(图2-中的A3-A5和B3-B5);对照均没有长出菌落(图2中的CK1和CK2),说明本实验是严格的无菌操作。结果表明分离获得的细菌为松材线虫和拟松材线虫体内细菌。

图2中的A1和B1 NA平板中的线虫数量和编号A3-A5和B3-B5 NA平板中的细菌数量以及每条线虫获得的细菌数量见表1。从表中统计的数据显示松材线虫AMA3和拟松材线虫ANL5分离的细菌种类数量较少且平均每条线虫分离的细菌数量很少,除去体表灭菌剂的影响,线虫个体的带菌量可能

也有很大的差异。所分离获得的细菌菌落经纯化后得到3个细菌菌株,其中松材线虫分离到1个菌株NSBx.1,拟松材线虫分离到两个菌株NSBm.1和NSBm.2。

## 2.3 松材线虫和拟松材线虫体内细菌的鉴定

### 2.3.1 细菌的形态及生理生化特性:

分离自松材线虫的细菌菌株NSBx.1在NA上菌落呈现黄色、圆形,边缘完整,直径2 mm-4 mm,半透明。菌苔表面光滑,有光泽,中央有突起。菌体长杆状,大小为 $(0.22-0.32) \mu\text{m} \times (0.34-1.2) \mu\text{m}$ ,不产芽孢(图3)。生理生化特性测定中,表现阳性反应的有:KOH、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 酶、吲哚反应、明胶水解、产氨、产 $\text{H}_2\text{S}$ 、硝酸盐还原;石蕊牛奶试验表现胨化和还原。参照文献[14],鉴定该菌株为嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)

分离自拟松材线虫的细菌菌株NSBm.1和NSBm.2在NA上菌落呈现白色或黄色、圆形,边缘

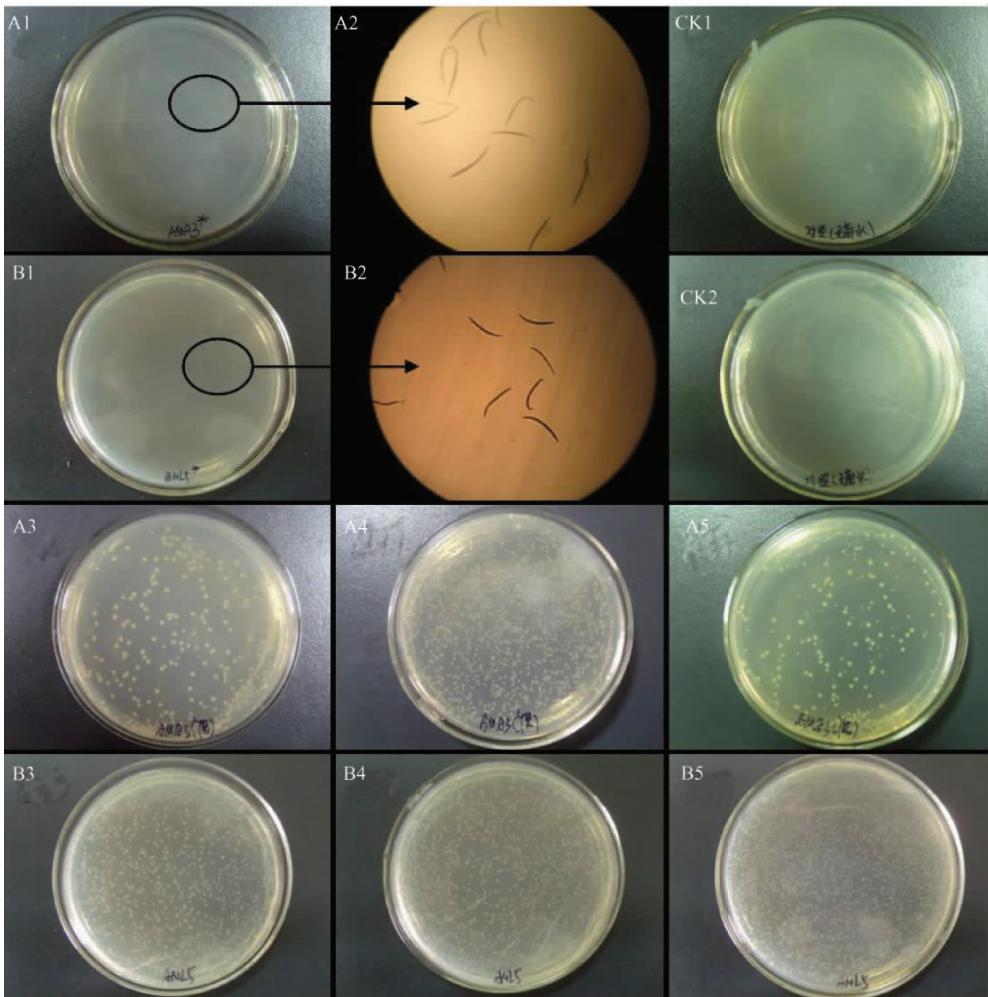


图 2 松材线虫和拟松材线虫体表灭菌及研磨后 NA 平板长菌状况

Fig. 2 Endophytic bacteria isolated from nematodes of surface sterilization.

表 1 松材线虫和拟松材线虫获得的体内细菌的种类和数量

Table 1 The number of species and quantity of endophytic bacteria

Nematode strains	Quantity of nematodes	The number of species ( isolation ratio/%)	The quantity of endophytic bacteria			Average quantity of endophytic bacteria of each nematode
			Plate 1	Plate 2	Plate 3	
AMA3	104	1	268	726	220	3. 89 ± 2. 68
ANL5	80	2( 8: 2)	586	622	714	8. 01 ± 0. 82

完整,直径2 mm -4 mm ,不透明或半透明。菌苔表面光滑 ,有光泽 ,扁平或有突起。菌体短杆或长杆状 ,大小为 ( 0. 24 - 0. 35)  $\mu\text{m}$   $\times$  ( 0. 39 - 0. 70)  $\mu\text{m}$  或 ( 0. 25 - 0. 33)  $\mu\text{m}$   $\times$  ( 0. 38 - 1. 1)  $\mu\text{m}$  ,不产芽孢 ( 图 3) 。生理生化特性测定中 ,NSBm. 1 表现阳性反应的有: KOH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶、M. R. 、V. P. 、柠檬酸盐、产氨、产 H<sub>2</sub>S、硝酸盐还原;石蕊牛奶试验表现还原。NSBm. 2 表现阳性反应的有: KOH、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 酶、吲哚反应、明胶水解、产氨、产 H<sub>2</sub>S、硝酸盐还原;石蕊牛奶试验表现脲化和还原。参照《伯杰细菌鉴定手册》

第 8 版<sup>[14]</sup> , 鉴定这两株菌分别为美洲爱文氏菌 ( *Ewingella americana* ) 和嗜麦芽窄食单胞菌 ( *S. maltophilia* )

2. 3. 2 Biolog96 孔碳源鉴定: 相似性 ( SIM) 和位距 ( DIS) 是 BIOLOG 系统表示测试结果与数据库相应数据匹配程度的 2 个重要的参数。当 SIM > 0. 75 , DIS < 5. 0 时 ,为良好匹配; SIM 值越接近于 1 ,鉴定结果的可靠性越好。通常在 SIM 值  $\geq$  0. 5 时 ,就可以确定菌株的分类。NSBx. 1、NSBm. 1 以及 NSB. m. 2 Biolog Microbial Identification System 鉴定结果、

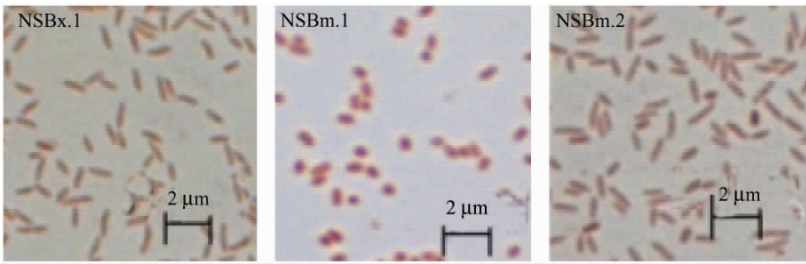


图3 NSBx. 1、NSBm. 1 和 NSBm. 2 的菌体形态

Fig. 3 Optical micrograph of strain of NSBx. 1、NSBm. 1and NSBm. 2 showing the cell morphology. Bar ,2 μm.

PROB、SIM 及 DIS 值见表 2。Biology 鉴定结果 NSBx. 1、NSBm. 1 以及 NSB. m. 2 分别为 *Stenotrophomonas maltophilia*、*Ewingella americana* 和 *S. maltophilia*。

表 2 两种线虫体内细菌 Biolog 鉴定结果与各参数

Table 2 Identification results and the parameters from Biolog				
Plate number	Species ID	PROB	SIM	DIS
NSBx. 1	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	97%	0. 629	5. 00
NSBm. 1	<i>Ewingella americana</i>	100%	0. 673	5. 41
NSBm. 2	<i>S. maltophilia</i>	100%	0. 560	6. 92

2. 2. 3 细菌 16S rDNA 基因序列: 提取 3 株细菌的基因组作为模板 ,用细菌通用引物 PCR 扩增 ,扩增产物经 1. 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 ,结果如图 4 所示: 基因组 DNA 中扩增出 16S rDNA 核苷酸片段与 DL2000 Mark 比较 ,约在 1500 bp 处有明亮的 PCR 特征条带 ,其分子量大小与菌株 16S rDNA 的理论值基本相符。

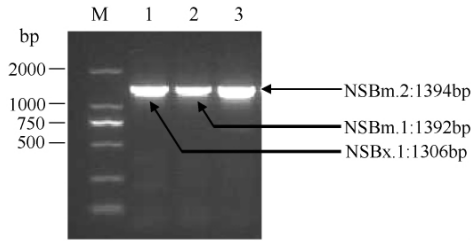


图 4 松材线虫和拟松材线虫体内细菌 16SrDNA 扩增产物  
Fig. 4 PCR products of 16S rDNA of endophytic bacteria in *B. xylophilus*. and *B. mucronatus*. . 1. NSBx. 1; 2. NSBm. 1; 3. NSBm. 2.

测序得到菌株 NSBx. 1、NSBm. 1 以及 NSB. m. 2 的 16S rDNA 基因序列 ,分别含有 1306 bp、1392 bp 和 1394 bp ,其 GenBank 登录号为 JF330155、JF330156 和 JF330157。将 3 个体内细菌菌株测得的序列在 NCBI 上进行 Blast 比对发现 ,菌株 NSBx. 1 和 NSBm. 2 与寡养单胞菌属( *Stenotrophomona*) 具有

较高的序列相似性; 菌株 NSBm. 2 与爱文氏菌属( *Ewingella*) 具有较高的序列相似性; 用 Mega4. 1 软件采用 Neighbor-Joining 法选取不同来源菌株的序列进行多重比较并构建系统进化树( 图 5) 。结果表明 ,测定的 NSBx. 1 和 NSBm. 2 菌株与 *S. maltophilia* ( AB294553) 以 99% 置信度聚在一起 ,结合菌株的形态学以及生理生化特性 ,确定为 *S. maltophilia*; NSBm. 1 与 *E. americana* ( DQ383802) 以 95% 置信度聚在一起 ,结合菌株的形态学以及生理生化特性 ,确定为 *E. americana*。

3 结论和讨论

本研究首次报导了松材线虫( *B. xylophilus*) 和拟松材线虫( *B. mucronatus*) 体内存在细菌 ,试验利用透射电镜在两种线虫虫体内均观察到细菌 ,并且通过体表消毒分离并鉴定出不同种属的体内细菌 ,嗜麦芽窄食单胞菌( *S. maltophilia*) 和美洲爱文氏菌( *E. americana*) 。有文献曾经报导 ,植物寄生线虫的口针比较小 ,所以体内没有细菌<sup>[15]</sup> ,以往的研究也未报导松材线虫和拟松材线虫体内存在细菌。赵博光等<sup>[16]</sup> 曾使用透射电镜观察松材线虫虫体切片 ,未能在虫体内观察到细菌 ,并且对线虫头部的口针、尾腺管和肛门内径进行了测量发现均小于线虫体表细菌的直径 ,细菌又不能从其厚角质体壁进入 ,从而认为松材线虫携带细菌的部位是体表。Annelies 等<sup>[4]</sup> 通过克隆 *Wolbachia* 的基因发现香蕉穿孔线虫( *R. similes*) 体内存在 *Wolbachia* 的新成员; 另外在此基础上采用相同的方法研究了松材线虫 ,但未找到类似的基因。本试验通过分离的方法得到两种线虫的体内细菌。嗜麦芽窄食单胞菌( *S. maltophilia*) 广泛存在于水、土壤、动物体内; 田雪亮等<sup>[17]</sup> 曾对松材

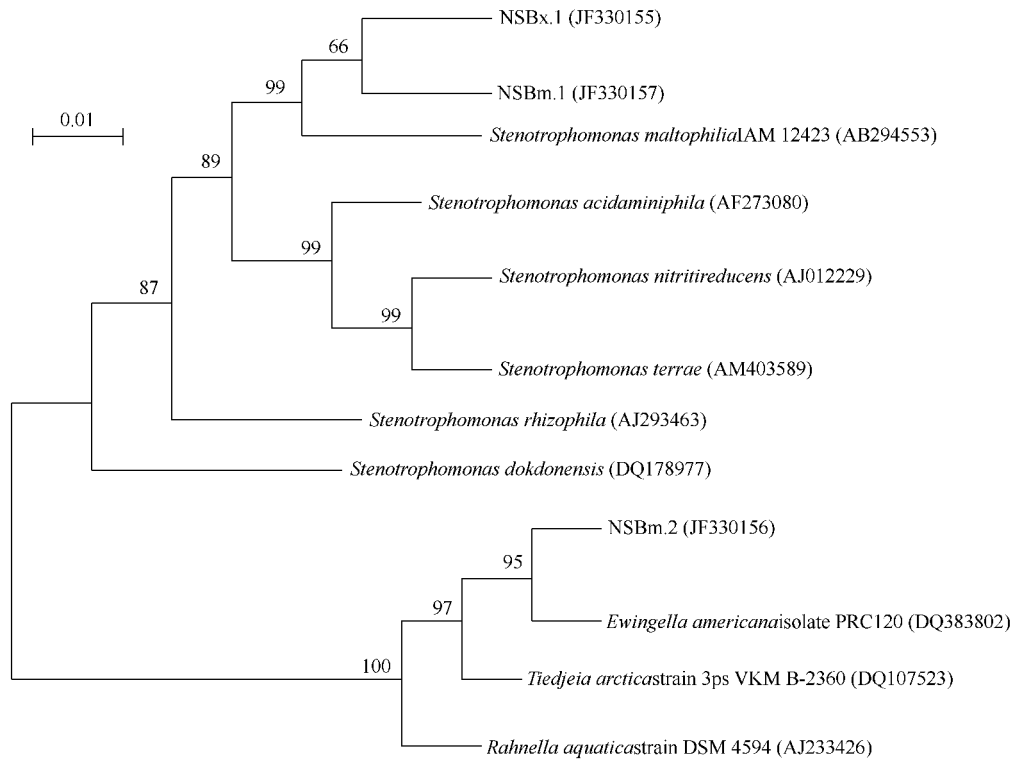


图5 依据 16SrDNA 基因序列构建的松材线虫和拟松材线虫体内细菌的系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic trees of endophytic bacteria in *B. xylophilus* and *B. mucronatus* based on 16S rDNA. Numbers at the nodes are the bootstrap confidence values obtained after 1000 replicates. Support values lower than 50% are not indicated. The number of substitutions per site is indicated by the bar at the top left of phylogeny. Bar, 1% sequence divergence. The GenBank accession numbers for nucleotide sequence data are shown in the brackets.

线虫所携带的细菌构建了 16S rRNA 基因文库也发现该菌占很大的比例 为优势种群 ,但其无法说明这些细菌是线虫体表携带的还是体内存在的。美洲爱文氏菌( *E. americana*) 一般是一种动物肠道细菌。本研究获得的两种细菌菌体大小 [( 0.25 – 0.35)  $\mu\text{m} \times$  ( 0.39 – 1.2)  $\mu\text{m}$ ] 均小于赵博光等<sup>[16]</sup>报道的松材线虫自然孔口的内径( 不大于 0.4  $\mu\text{m}$ )。此外本文试图采用分子生物学的方法研究体内细菌 ,但是鉴于灭菌后很难保证细菌死体细胞能够全部脱离线虫体表 ,这部分研究还有待于探索。本试验获得的体内细菌均为可培养的 ,关于线虫获得这些细菌的途径以及这些细菌对松材线虫及拟松材线虫具有何种生态功能尚待进一步研究。

## 参考文献

- [ 1 ] Guarner F , Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003 361: 512-519.
- [ 2 ] Forst S , Dowds B , Boemare N , Stackebrandt E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp. : bugs that kill bugs. *Annual Reviews in Microbiology* ,1997 51( 1) : 47-72.
- [ 3 ] Nour SM ,Lawrence JR ,Zhu H ,Swerhone GDW ,Welsh M ,Welacky TW ,Topp E. Bacteria associated with cysts of the soybean cyst nematode ( *Heterodera glycines* ) . *Applied and Environmental Microbiology* ,2003 ,69 ( 1) : 607-615.
- [ 4 ] Haegeman A , Vanholme B , Jacob J , Vandekerckhove TTM , Claeys M , Borgonie G , Gheysen G. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: Member of a new *Wolbachia* supergroup. *International journal for parasitology* 2009 39( 9) : 1045-1054.
- [ 5 ] Oku H , Shiraishi T , Ouchi S. Pinewilt toxin , the metabolite of a bacterium associated with a nematode. *Naturwissenschaften* ,1980 67: 198-199.
- [ 6 ] 赵博光 李良. 荧光假单胞菌培养的无细胞滤液导致松萎蔫的病状观察. 江西农业大学学报 ( *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis* ) ,2008 ,30 ( 4) : 575-580.

- [7] 赵博光,刘玉涛,林峰. 松材线虫与其携带细菌之间的相互影响. 南京林业大学学报(自然科学版) [Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition)] 2005 29(3): 1-4.
- [8] Kawazu K, N Kaneko. Asepsis of the pinewood nematode isolate OkD-3 causes it to lose its pathogenicity. *Jpn. J. Nematol.* 1997 27(2): 76-80.
- [9] Kawazu K, Yamashita H, Kanzaki H. Isolation of pine wilting bacteria accompanying pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* and their toxic metabolites. *Scientific Reports of the Faculty of Agriculture, Okayama University*, 1998 87: 1-7.
- [10] 谈家金,向红琼,冯志新. 松材线虫伴生细菌的分离鉴定及其致病性. 林业科技开发(China Forestry Science and Technology) 2008 22(2): 23-25.
- [11] 沈萍,范秀蓉,李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社, 1999.
- [12] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [13] Hyeok R K, Gyung J Ch, Yong Ho Ch, Kyoung S J, Nack-Do S, Mun S K, Yilseong M, Seung K L, Jin-Cheol K. Suppression of pine wilt disease by an antibacterial agent oxolinic acid. *Society of Chemical Industry* 2009.
- [14] Buchanan RE, Gibbon NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8<sup>th</sup> eds. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984.
- [15] Southey JF. *Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes* (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Technical bulletin). 6<sup>th</sup> eds. London: H. M. Stationery Off. 1986.
- [16] 赵博光,郭道森,高蓉. 松材线虫携带细菌部位的电镜观察. 南京林业大学学报(Journal of Nanjing Forestry University) 2000 24(4): 69-71.
- [17] 田雪亮,张祺玲,陈国华,茆振川,杨家荣,谢丙炎. 松材线虫伴生细菌多样性的宏基因组分析. 微生物学报(Acta Microbiologica Sinica) 2010 50(7): 909-916.

## Observation by transmission electron microscope and identification of endophytic bacteria isolated from *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*

Weimin Yuan, Xiaoqin Wu\*, Jianren Ye, Xiaojing Tian

Nanjing Forestry University, Key Laboratory of Pest Prevention and Control of Jiangsu Province, Nanjing 210037, China

**Abstract** [Objective] The pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, morphologically similar to *B. mucronatus*, is the pathogen of pine wilt disease. This study was focused on the endophytic bacteria present in these nematodes. [Methods] Detailed observations were made on sections of all parts of the two types of nematodes by transmission electron microscope. The nematodes were surface-sterilized by soaking in 1% mercuric chloride and antibiotic mixture, and then ground and cultured on nutrient agar plate. The physiological and biochemical characteristics combined with molecular characterization of bacteria were analyzed and identified. [Results] Endophytic bacteria were found in intestines of the two nematodes by transmission electron microscope observations. On the basis of surface sterilization, total three bacteria strains were obtained from *B. xylophilus* and *B. mucronatus*. These bacteria belong to *Stenotrophomonas* and *Ewingella*. [Conclusion] It confirms the presence of endophytic bacteria in *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus* and these bacteria may play a physical and ecological roles in nematodes.

**Keywords:** *Bursaphelenchus xylophilus*, *B. mucronatus*, transmission electron microscope (TEM), endophytic bacteria, *Stenotrophomonas*, *Ewingella*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30972369)

\* Corresponding author. Tel: +86-25-85427427; E-mail: xqwu@njfu.edu.cn

Received: 20 December 2010 / Revised: 25 April 2011