

## 九香虫(椿象)体内可培养细菌的多样性分析

罗立华<sup>1,2</sup> 卢圣鄂<sup>1</sup> 梁煜桓<sup>1</sup> 张小平<sup>1</sup> 辜运富<sup>1\*</sup>

(1. 四川农业大学资源学院 微生物系 四川 成都 611130)

(2. 四川农业大学水稻研究所 四川 成都 611130)

**摘要:**【目的】认识药用昆虫九香虫(*Aspongopus chinesis* Dallas)成虫体内可培养细菌资源多样性。【方法】运用纯培养法、反转录重复因子扩增(BOXA1R-PCR)分析技术、16S rRNA 基因测序和系统发育分析对样品中可培养细菌进行多样性研究,测定了分离菌株的抗菌特性、吲哚乙酸(IAA)含量和产淀粉酶活性等指标。【结果】通过 6 种不同培养基共分离得到 52 株菌落特征不同的细菌菌株。基于菌落特征和 BOXA1R-PCR 图谱选取 12 株代表菌株用于 16S rRNA 基因序列测定。16S rRNA 基因序列系统发育分析显示,52 株菌株分属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*) 4 个属,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)为优势菌属。分离到的 52 株细菌有 44 株(占总分离菌株的 84.6%)表现出对供试病原菌具有较好的抑制作用,高达 94.2%的分离菌株能产 IAA,有 43 株(占总分离菌株的 82.7%)表现出淀粉酶活性。【结论】九香虫内细菌种群较为多样,具有潜在应用价值。

**关键词:** 九香虫, 可培养细菌, 生物多样性, 16S rRNA 基因

### Diversity of the culturable bacteria isolated from *Aspongopus chinesis* Dallas (Pantatomidae)

LUO Li-Hua<sup>1,2</sup> LU Sheng-E<sup>1</sup> LIANG Yu-Huan<sup>1</sup> ZHANG Xiao-Ping<sup>1</sup> GU Yun-Fu<sup>1\*</sup>

(1. Department of Microbiology, College of Resources, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Rice Research Institute, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

**Abstract:** [Objective] To obtain an overview of the diversity of culturable bacteria inside the imago *Aspongopus chinesis* Dallas. [Methods] Pure culture, reverse transcription factor amplification (BOXA1R-PCR), 16S rRNA gene sequencing and phylogeny analysis were used to analyze the diversity of culturable bacteria inside the *Aspongopus chinesis* Dallas. Moreover, the antimicrobial activities, indole-3-acetic acid (IAA) production and amylase activities of the isolates were also monitored. [Results] Totally, 52 bacteria strains with different colony phenotype were isolated from six different culture media. Based on the colony phenotype and BOXA1R-PCR patterns, 12 typical strains were selected for 16S rRNA gene sequencing. According to the phylogeny analysis based on

**Foundation item:** Key Technologies R&D Program of Sichuan Province (No. 2014NZ0044)

\*Corresponding author: E-mail: gungyf@163.com

**Received:** October 21, 2015; **Accepted:** January 22, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 03, 2016  
基金项目: 四川省科技支撑计划(No. 2014NZ0044)

\*通讯作者: E-mail: gungyf@163.com

收稿日期: 2015-10-21; 接受日期: 2016-01-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-02-03

the 16S rRNA gene sequence, the isolates were affiliated to 4 genera including *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Burkholderia*. *Bacillus* comprised the most dominant genus among all the isolates. 84.6% (44/52) of the isolates exhibited antimicrobial activities against the tested pathogens, 94.2% of the isolates showed abilities in producing IAA, and 43 strains (accounting for 82.7%) had amylase activities. **[Conclusion]** Diverse populations of bacteria were existed in the *Aspongopus chinesis* Dallas, and showed a potential application prospect.

**Keywords:** *Aspongopus chinesis* Dallas, Culturable bacteria, Biodiversity, 16S rRNA gene

昆虫是世界上种类最多的生物类群, 现存种类已超过 100 万种, 且许多昆虫本身具有极高的药用价值, 被认为是人类未来最大的生物资源<sup>[1]</sup>。有研究表明, 昆虫体内含有众多微生物群体, 形成了复杂的微生物群落, 这些微生物对宿主昆虫消化吸收营养物质和抵御致病微生物入侵具有重要作用<sup>[2-3]</sup>。刘娟等采用传统的分离纯化方法从中华蜂体内分离到 180 株放线菌, 分属于 3 个目、4 个科中的 4 个属, 其中 6 株为潜在新种, 有力地说明了昆虫体内微生物菌群具有多样性<sup>[4]</sup>。Poulsen 等从 33 只黄蜂 (*Chalybion californicum* 和 *Sceliphron caementarium*) 头胸腹 3 个部位中共分离到 200 多株放线菌, 有 11 株能产生不同的次级代谢产物, 并且大部分菌株表现抗菌活性, 可能具有帮助宿主昆虫抵御病原微生物入侵的作用<sup>[5]</sup>。目前, 昆虫体内微生物研究较为详细的主要集中在白蚁<sup>[6]</sup>、粉虱<sup>[7]</sup>等农作物害虫, 而对药用昆虫九香虫 (*Aspongopus chinesis* Dallas) 的研究主要针对其药用价值和食用价值, 尚无关于其体内微生物的研究报道。

九香虫在分类学上属于昆虫纲 (Insecta)、半翅目 (Hemiptera)、兜蝽科 (Dinidoridae)、兜蝽属 (*Coridius*), 又称黑兜虫、瓜黑蝽、屁巴虫等。九香虫含脂肪、蛋白质、甲壳质, 尿嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、维生素, 以及 Fe、Cu 和 Zn 等微量元素, 具有较高的药用和营养价值, 并且有研究表明从九香虫中分离纯化到的抗菌肽 CcAMP1 对金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌和大肠杆菌等革兰氏阴性菌都有抗菌活性<sup>[8-9]</sup>。内(共)生微生物在与药用植物、药用昆虫长期协同进化过程中, 会产生与宿主植物、昆虫药用成分相似的物质, 对促进植物生长、防治病虫害有潜在作用<sup>[10]</sup>。本文以九香虫成虫为分

离材料, 通过纯培养方式进行虫体内部可培养细菌的分离, 结合 BOXA1R-PCR 和 16S rRNA 基因测序分析分离菌株的多样性和系统发育特征, 并测定了菌株的抗菌活性、IAA 含量和产淀粉酶活性等指标, 以期为充分认识九香虫体内细菌资源并开展相关应用提供基础理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品: 九香虫成虫, 购于四川荣县某养殖场。

1.1.2 培养基<sup>[11-14]</sup>: 选择 6 种分离培养基: NA、LB、TSA、TSB、ISP4、淡薄培养基。

1.1.3 指示菌株: 稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 与玉米纹枯病菌 (*Maize rhizoctonia solani*) 2 种病原菌由四川农业大学植物病理实验室提供。

1.1.4 主要试剂和仪器: ClO<sub>2</sub>、色氨酸、FeCl<sub>3</sub>、KI 等化学试剂均为国产分析纯试剂; 细菌基因组提取试剂盒、PCR 扩增相关试剂及引物测序等, 上海生工生物工程技术有限公司。PCR 仪、凝胶成像系统、电泳仪等, 美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 菌株分离

选取九香虫成虫 60 只, 随机均分成 3 组, 24 h 饥饿排空体内食物残渣, 具体消毒方法参考刘娟等<sup>[4]</sup>的报道。将研磨液稀释成 8 个梯度 10<sup>-1</sup>–10<sup>-8</sup>, 吸取稀释度为 10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> 的稀释液各 0.1 mL 涂于上述 6 种分离培养基平板上, 以最后一遍的洗涤水作对照, 以检测表面消毒是否彻底。在 28 °C 倒置培养 4–5 d, 根据菌落大小、形态和色泽等表现特征挑取单菌落并进行划线纯化。纯化后的菌株转接至 25% 的甘油管中, 于 -70 °C 保藏于四川农业大学微生物实验室。

### 1.3 吲哚乙酸含量测定

采用 Salkowski 比色法<sup>[15]</sup>测定分离菌株产吲哚乙酸(IAA)能力。取在牛肉膏液体培养基中培养到对数期的菌液 50  $\mu$ L 于含 0.5 g/L 色氨酸的牛肉膏液体培养基中, 每株细菌接 3 支试管, 然后 28  $^{\circ}$ C、140 r/min 培养 36 h 到对数期, 每支试管取 50  $\mu$ L 于洗净的白瓷板中, 加入 100  $\mu$ L Salkowski 显色剂(4.5 g/L FeCl<sub>3</sub>, 57.6% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 25  $^{\circ}$ C 下避光 30 min, 如果出现粉红色, 表明产 IAA, 以未接菌的含 0.5 g/L 色氨酸的牛肉膏液体培养基为对照。产吲哚乙酸菌株的 IAA 定量测定: 8 000 r/min 离心 5 min 获得培养物上清液 2 mL, 再加入 4 mL Salkowski 显色剂, 在 25  $^{\circ}$ C 下避光 30 min 后, 530 nm 下比色测定其吸光度 OD 值。实验重复 3 次。以空白培养基作对照, 并以 IAA 的标准样品对应的光密度做标准曲线, 计算 IAA 的产量(mg/L)=(OD<sub>530</sub>-固定值 B)/系数 K。

### 1.4 产胞外淀粉酶能力鉴定

将纯化后的菌株单菌落点种到淀粉筛选培养基上<sup>[16]</sup>, 37  $^{\circ}$ C 培养 48 h, 在菌落周围滴加卢戈氏碘液, 测定水解圈直径(HD)和菌落直径(CD), 每株菌重复 3 次, 通过比较 HD/CD 的比值来筛选产酶能力强的菌株。

### 1.5 抗菌活性测定

采用 Bascom-Slack 等<sup>[17]</sup>使用的平板对峙法测定分离菌株对上述 2 株病原菌指示菌的抑菌作用。测定抑菌圈直径(HD)与菌落直径(CD), 通过计算 HD/CD 的比值来筛选出有抑菌效果的菌株。

### 1.6 DNA 提取及 BOXA1R-PCR 分析

将镜检纯化的菌株接种到 LB 液体培养基中, 28  $^{\circ}$ C、140 r/min 振荡培养 3 d, 8 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。利用生工细菌基因组提取试剂盒提取 DNA, 琼脂糖凝胶检测后于-20  $^{\circ}$ C 保存。选取 BOXA1R 单引物(5'-CTACGGCAAGGCGAC GCTGACG-3')进行 PCR 扩增<sup>[18]</sup>。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 4 min ;95  $^{\circ}$ C 1 min ;53  $^{\circ}$ C 1 min ;65  $^{\circ}$ C 8 min , 35 个循环 ;65  $^{\circ}$ C 16 min。扩增产物以 2 000 bp DNA ladder 作分子量标准, 在 90 V 电压下经 1.0%琼脂

糖凝胶电泳 1 h, 用凝胶成像系统拍照检测。

### 1.7 16S rRNA 基因测序及系统发育树构建

基于菌落特征和 BOXA1R-PCR 图谱分析结果, 选取代表菌株以 P1 (5'-AGAGTTTGATCCTGG TCAGAACGCT-3')和 P6 (5'-TACGGCTACCTTGTA CGACTTCACCCC-3')为引物扩增 16S rRNA 基因片段, 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ PCR Mix 10  $\mu$ L; 引物 P1 (50  $\mu$ mol/L)和 P6 (50  $\mu$ mol/L)各 1.0  $\mu$ L; 模板 DNA (50 mg/L) 2.0  $\mu$ L; 双蒸水补足至 20  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 4 min ;94  $^{\circ}$ C 1 min , 55  $^{\circ}$ C 1 min , 72  $^{\circ}$ C 2 min , 35 个循环 ;72  $^{\circ}$ C 10 min ;4  $^{\circ}$ C 保存。扩增产物送上海生工公司测序。测序结果提交到 NCBI 上进行 BLAST 检索, 从 GenBank 数据库中下载相似度较高的参比菌株序列, 利用 ClustalX 软件进行多序列比对<sup>[19]</sup>, 用 MEGA 5.0 软件按照邻接法(Neighbor-Joining)聚类, 选择 1 000 个重复做 Bootstrap 值分析, 构建系统发育树。序列信息查询号为: KT601040-KT601049, KT601051-KT601052。

## 2 结果与分析

### 2.1 九香虫体内细菌分离

采用 6 种分离培养基从九香虫成虫体内共分离到 52 株菌落形态不同的细菌菌株(图 1)。其中从 NA、LB、TSA 培养基中分别分离得到 6、6、7 株;

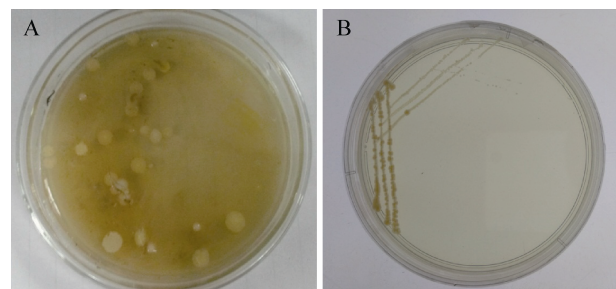


图 1 九香虫体内部分可培养细菌的菌落形态图

Figure 1 Colony morphology of partial culturable bacteria from *Aspongopus chinensis* Dallas

注:A: 采用组织研磨法在 LB 培养基上分离到的细菌菌落形态; B: L5 菌株的菌落特征。

Note: A: Colony morphology of bacteria from LB medium with organization grinding method; B: Colony characteristic of strain L5.

分离得到菌株数目较多的培养基为淡薄培养基 (18 株)和 ISP4 (11 株); 而从 TSB 培养基中分离到菌株数目较少, 为 4 株。

## 2.2 菌株产 IAA、淀粉酶活性和抗菌特性

对供试 52 株菌株进行产 IAA、淀粉酶活性和抗菌特性测定(表 1)。促生长指标结果表明: 有 51 株菌株在产 IAA 能力或淀粉酶活性上表现良好, 占供试菌

株的 98.1%; 能产 IAA 的有 49 株, 占总分离菌株的 94.2%, 产量在 2.39–25.93 mg/L 之间; 43 株(占 82.7%)具有产淀粉酶能力; 41 株在产 IAA 和淀粉酶活性上表现良好。测定分离菌株的抗菌活性, 拮抗效果见图 2。拮抗结果显示: 84.6%的分离菌株对指示病原菌有抑制效果。抑制稻瘟病菌的菌株有 43 株, 占分离菌株的 82.7%; 25 株(占 48.1%)对玉米纹枯病菌有拮抗

表 1 九香虫体内可培养细菌产 IAA、淀粉酶活性及抗菌特性测定结果  
Table 1 IAA production, amylase activities and antimicrobial properties of the culturable bacteria from *Aspongopus chinesis* Dallas

菌株 Strain	促生长指标 Index of growth promotion		指示菌株 Indicate strain		菌株 Strain	促生长指标 Index of growth promotion		指示菌株 Indicate strain	
	IAA (mg/L)	AP (HD/CD)	1	2		IAA (mg/L)	AP (HD/CD)	1	2
N1	6.24	++	+	+	I4	4.20	++	++	-
N2	13.93	+	++	+	I5	9.86	++	+++	-
N3	6.16	+	++	-	I6	14.84	+	+++	+
N4	19.29	+	++	++	I7	5.71	++	+++	+
N5	10.69	+	++	-	I8	4.58	+	++	-
N6	8.57	++	+	-	I9	3.67	+	+	-
L1	Nd	-	-	+	I10	7.07	++	+	-
L2	9.86	-	++	+	I11	2.46	++	+++	-
L3	9.33	+	-	-	D1	3.90	+	++	+
L4	11.52	-	+	+	D2	7.59	++	++	-
L5	19.06	++	++++	+	D3	6.84	+	++	+
L6	18.38	+	+	+	D4	2.99	+	-	-
S1	Nd	+	-	-	D5	4.50	+	+++	+
S2	9.48	+	++	+	D6	6.16	+	-	-
S3	4.65	++	++	+	D7	3.29	+	++	-
S4	5.71	-	+++	-	D8	3.22	+	++	-
S5	8.12	+	+++	-	D9	2.39	+	+	-
S6	15.67	+	+	-	D10	4.80	+	++	+
S7	10.39	++	++	+	D11	7.52	-	-	-
T1	10.54	+	++	+	D12	16.35	-	-	-
T2	25.93	+	+	+	D13	15.82	-	++	-
T3	10.54	+	++	+	D14	18.98	-	++	-
T4	11.44	++	++	+	D15	16.35	-	-	-
I1	10.23	+	++	+	D16	5.63	++	+	+
I2	8.73	+	++	+	D17	3.97	+	-	-
I3	Nd	++	++	+	D18	8.80	++	+++	-

注: IAA: 吲哚-3-乙酸产量; AP: 淀粉酶产量; Nd: 未测定。指示菌株: 1: 稻瘟病菌; 2: 玉米纹枯病菌。++++: HD/CD 值大于 4; +++: HD/CD 值介于 3–4; ++: HD/CD 值介于 2–3; +: HD/CD 值介于 1–2; -: HD/CD 值小于 1。

Note: IAA: Indole-3-acetic acid production; AP: Amylase production; Nd: Not detected. Indicate strain: 1: *Magnaporthe grisea*; 2: *Maize rhizoctonia solani*. ++++: HD/CD value is above 4; +++: HD/CD value ranges from 3–4; ++: HD/CD value is from 2–3; +: HD/CD value varies from 1–2; -: HD/CD value is below 1.

效果;24株菌株对稻瘟病菌和玉米纹枯病菌都具有抑制作用;大多数能抑制玉米纹枯病菌的菌株同时也对稻瘟病菌有抗菌效果。并且有21株菌表现出产IAA能力、淀粉酶活性和抗菌特性,占供试菌株的40.4%。

2.3 BOXA1R-PCR分析与系统发育分析

为认识九香虫成虫体内可培养细菌的遗传多样性,以BOXA1R引物对供试细菌基因组进行PCR扩增,遗传图谱类型见表2,52株菌被分成12种不同的遗传图谱类型。

基于BOXA1R遗传图谱和菌落特征,选取12株代表菌株进行16S rRNA基因片段测序,长度约1500 bp。所得序列提交NCBI数据库,用ClustalX软件进行多序列比对,MEGA 5.0软件构建系统发育树(图3)。结果表明,代表菌株分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。革兰氏阳性菌仅有*Bacillus* 1个属,共9株菌,是九香虫成虫体内优势菌属,占代表菌株的75%。而革兰氏阴性菌有3株,占代表菌株的25%,分属于*Stenotrophomonas*、*Burkholderia*

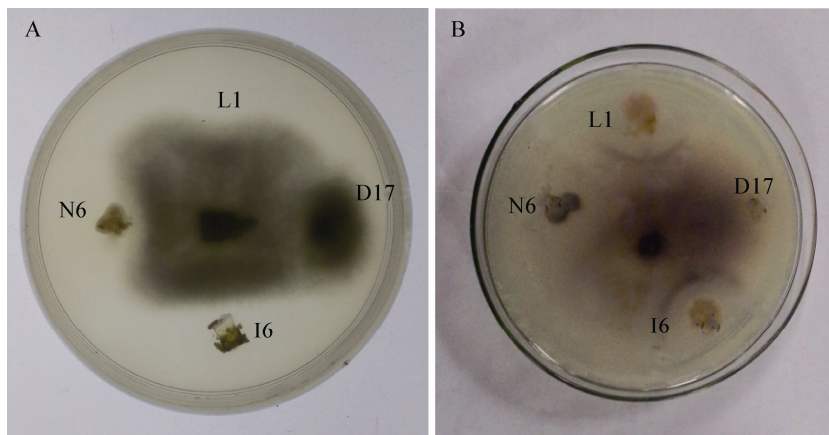


图2 部分代表菌株对病原真菌的拮抗效果

Figure 2 The antagonism of partial representative strains to pathogen fungi

Note: A: *Magnaporthe grisea*; B: *Maize rhizoctonia solani*.

表2 九香虫体内代表菌株的鉴定结果  
Table 2 Identification of the representative strains inside the *Aspongopus chinesis* Dallas

种属 Genus	代表菌株 Representative strain (accession No.)	谱带类型 rDNA type	16S rRNA 基因比对分析 16S rRNA gene BLAST analysis	
			近缘菌株 Nearest type strain (accession No.)	相似性 Similarity (%)
<i>Bacillus</i>	I10 (KT601047)	6	<i>Bacillus subtilis</i> strain PPL-SC9 (KM226924)	99
	D2 (KT601052)	3	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain EC6 (KP334987)	100
	N6 (KT601044)	7	<i>Bacillus subtilis</i> strain CU12 (JX489167)	99
	D17 (KT601041)	11	<i>Bacillus aryabhatai</i> isolate PSB57 (HQ242770)	99
	S1 (KT601045)	12	<i>Bacillus</i> sp. 7B-579 (KF441687)	98
	S4 (KT601046)	8	<i>Bacillus megaterium</i> strain B-21 (KJ126915)	98
	L1 (KT601042)	4	<i>Bacillus cereus</i> (AF176322)	99
	D9 (KT601049)	2	<i>Bacillus subtilis</i> strain Z-10 (KP318826)	98
	L5 (KT601043)	1	<i>Bacillus subtilis</i> strain M15-10-1 (HM030749)	99
<i>Burkholderia</i>	D14 (KT601040)	5	<i>Burkholderia</i> sp. B64 (JN975060)	99
<i>Stenotrophomonas</i>	D7 (KT601048)	9	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain KS 46 (JX262392)	98
<i>Pseudomonas</i>	I6 (KT601051)	10	<i>Pseudomonas</i> sp. SCU-B112 (KJ000868)	100

注:图谱类型根据BOXA1R-PCR扩增条带片段来划分。

Note: rDNA types were defined based upon the amplification fragment of BOXA1R-PCR.

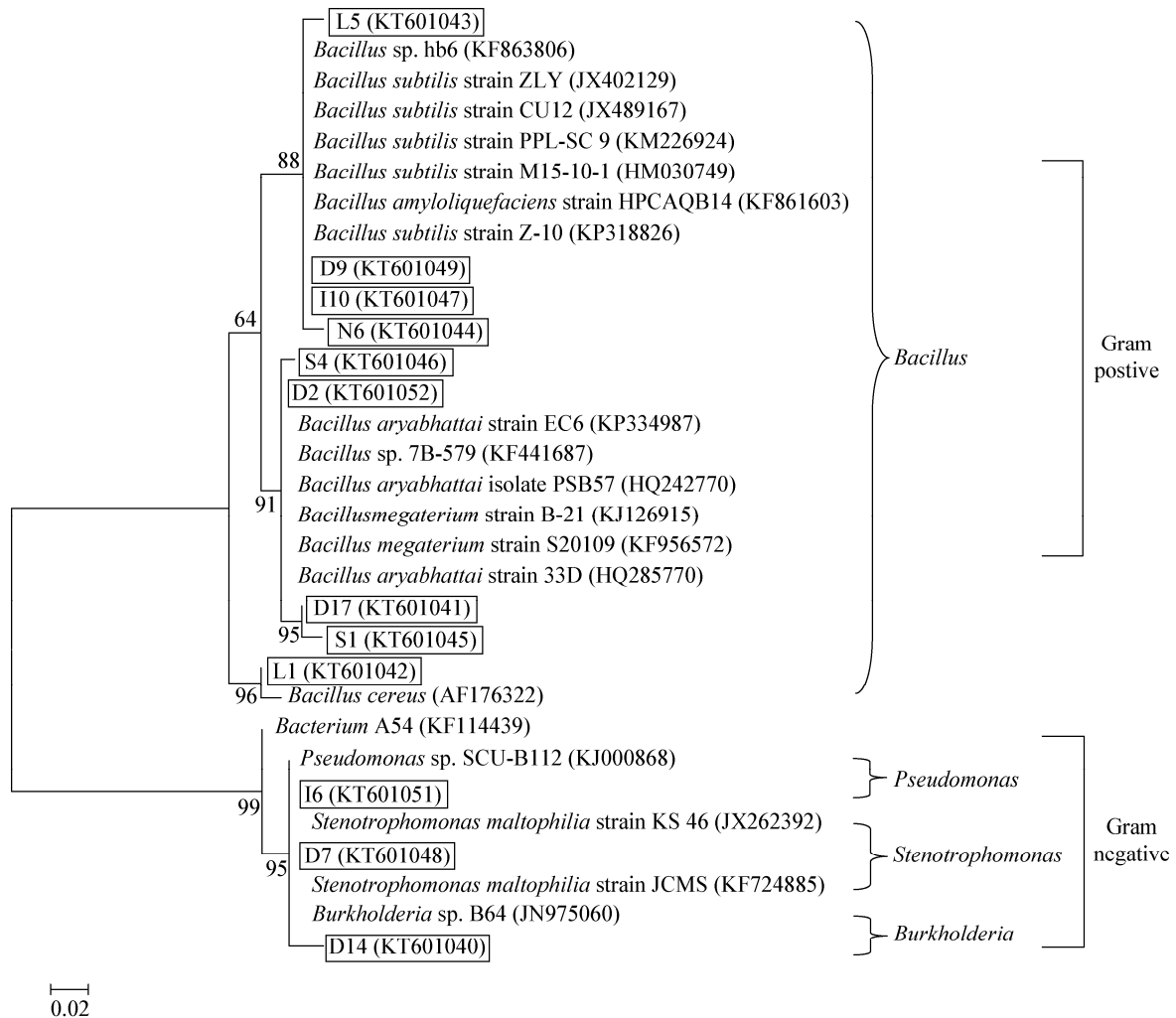


图3 九香虫体内代表菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

**Figure 3** Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences of representative strains inside the *Aspongopus chinesis* Dallas  
 注：节点的数字表示基于 1 000 重取样数据集的 Bootstrap 支持率(%)；只有超过 50%才显示出来。比例栏对应于每个核苷酸位置的 0.02 个替换。

Note: The number at the nodes indicate the level of bootstrap support (%) based on 1 000 resampled data sets; only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position.

和 *Pseudomonas* 等 3 个属。革兰氏阴性菌的 D7 与 *Stenotrophomonas* 中的 *Stenotrophomonas maltophilia* strain KS 46 相似性为 98%；另外 2 株菌株 I6 和 D14，分别与 *Pseudomonas* sp. SCU-B112 和 *Burkholderia* sp. B64 相似，相似性为 100%和 99%。

### 3 讨论

九香虫是一种富含粗蛋白、粗脂肪、多种维生素和矿质元素的药用食用昆虫，能提高紫芝胞内多糖物质等有效成分产量、抑制多种病原菌和抗肿瘤

等<sup>[8]</sup>。有研究表明，从昆虫体壁、肠道或者体腔内分离到的微生物具有较强的纤维素分解能力、对多种致病病原菌有良好拮抗效果以及能产生良好的次级代谢产物等，具有潜在应用价值<sup>[20-22]</sup>。因此，本实验以九香虫为对象，对其体内可培养细菌资源多样性和应用特点进行分析。

Hirose 等发现南部绿椿象 *Nezara viridula* 的前肠、中肠和后肠中存在着多样性明显的细菌，且大多数可培养细菌存在于肠道消化系统前端<sup>[23]</sup>；随

后, 科研人员对采自不同地域的 *N. viridula* 中肠微生物进行研究, 发现来源不同的 *N. viridula* 肠道微生物种群表现高度的遗传相似性并且大多数属于  $\gamma$ -变形菌, 且许多肠道内共生菌与幼虫的成活率和成虫的健康状况相关<sup>[24-26]</sup>。由此可见, 椿象体内分布着多样的微生物种群并具有潜在应用价值, 然而关于药用昆虫九香虫体内微生物多样性的研究尚未见报道。本试验从九香虫成虫体内分离到的菌株分属于 *Bacillus*、*Burkholderia*、*Stenotrophomonas*、*Pseudomonas* 4 个属。刘玉升研究表明芽孢杆菌是药用昆虫斑衣蜡蝉(*Lycorma delicatula*)成虫肠道消化道内的主要细菌类群, 共分离鉴定了 4 种兼性厌氧芽孢杆菌, 分别为多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)<sup>[27]</sup>。*Bacillus* sp. 是九香虫体内的优势细菌, 测序的 12 株代表菌株中有 9 株(占 75%)属于该属, 这与刘玉升等的研究结果相符。芽孢杆菌种类众多, 可产生细菌素、酶类、脂肽等多种代谢产物, 且对多种病原微生物均表现出抑菌效果<sup>[28]</sup>, 这些优势芽孢细菌是否有助于九香虫抵抗外界环境尚需进一步研究。

研究证明, 微生物的次生代谢产物可能是抵抗病原菌入侵的重要屏障<sup>[29]</sup>。本研究表明, 52 株分离菌株中有 24 株(占 46.2%)对供试稻瘟病菌和玉米纹枯病菌都表现出拮抗特性, 这些菌株分别属于 *Bacillus*、*Pseudomonas* 和 *Bacterium* 等属。假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)可产生多种抗生素化合物, 能有效防治由植物病原细菌、真菌引起的土传病害, 被称为植物病害生防菌<sup>[30]</sup>。测定微生物菌株产吡啶乙酸能力和淀粉酶活性指标是评价菌株具有促生长作用的重要参数<sup>[31]</sup>。从九香虫分离到的大多数菌株(占 78.8%)都能产 IAA 和淀粉酶, 而 IAA 的产生与胞外淀粉酶的产生并不受限于单一的分离菌株。12 株测序菌株中有 9 株产生淀粉酶活性, 包括 7 株芽孢杆菌、1 株寡养单胞菌和 1 株假单胞菌; 7 株革兰氏阳性菌和 3 株革兰氏阴性菌具有产 IAA 能

力, 显示出这些分离菌株的潜在应用特点。已有研究表明 *Burkholderia* 能产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-Aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶, 该酶通过催化分解乙烯前体 ACC 从而减少过量乙烯形成, 实现促进植物生长的作用<sup>[32]</sup>。本文从九香虫体内分离到了 *Burkholderia* 的近似菌株 D14, 能够产生相对较高量的 IAA, 显示出较强应用价值。此外, 分离菌株中有 1 株与 *Bacillus subtilis* strain M15-10-1 相似性为 99%的 L5 菌株, 在抗菌特性、产 IAA 能力和淀粉酶活性上都表现良好, 并且抑制稻瘟病菌的 HD/CD 值大于 4 和测定的 IAA 含量高达 19.06 mg/L, 为后续应用研究提供了良好材料。

本文对药用昆虫九香虫进行了体内可培养细菌的多样性分析。获得的 52 株菌株可以划分为 12 种遗传图谱类型且分属于 *Bacillus*、*Burkholderia*、*Stenotrophomonas*、*Pseudomonas* 4 个属, 表现出一定的遗传多样性。其中有 41 株(占 78.8%)表现出产 IAA 能力和淀粉酶活性; 84.6%菌株对供试病原菌表现出明显拮抗效果, 表现出潜在的应用价值。在后续研究中, 可以结合非培养手段(如 Illumina MiSeq 高通量测序技术)来全面深入认识药用昆虫九香虫体内微生物资源多样性。

## 参 考 文 献

- [1] Stamopoulos DC. Stored-product insect resource[J]. International Journal of Food Science & Technology, 2010, 45(11): 2440
- [2] Douglas AE. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*[J]. Annual Review of Entomology, 1998, 43: 17-37
- [3] Vorwerk S, Martinez-Torres D, Forneck A. *Pantoea agglomerans*-associated bacteria in grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*, Fitch)[J]. Agricultural and Forest Entomology, 2007, 9(1): 57-64
- [4] Liu J, Liu XF, Guan TW, et al. Isolation, diversity and antibiotic activity of actinomycetes from *Apis cerana cerana* Fabricius[J]. Microbiology China, 2014, 41(12): 2410-2422 (in Chinese)  
刘娟, 刘晓飞, 关统伟, 等. 中华蜂体内放线菌的分离、多样性及抗菌活性研究[J]. 微生物学通报, 2014, 41(12): 2410-2422
- [5] Poulsen M, Oh DC, Clardy J, et al. Chemical analyses of wasp-associated *Streptomyces* bacteria reveal a prolific potential for natural products discovery[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16763
- [6] Wei G, Ruan FX, Zheng XL, et al. Symbiotic types and mechanisms between termites and animals and microorganisms[J]. Journal of Environmental Entomology, 2014, 36(5): 790-804 (in Chinese)  
韦戈, 阮付贤, 郑霞林, 等. 白蚁与动物及微生物的共生类型及其机制[J]. 环境昆虫学报, 2014, 36(5): 790-804
- [7] Tan ZJ, Xie BY, Zhou QM, et al. Studies on characteristics of

- 16S rDNA sequences from endosymbionts in *Bemisia tabaci*[J]. Microbiology China, 2007, 34(3): 487-491 (in Chinese)  
谭周进, 谢丙炎, 周清明, 等. 烟粉虱内共生菌 16S rDNA 的特性研究[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 487-491
- [8] Zhang Y, Chen JW, Gao Y. Research progress on the resource identification, chemistry, pharmacology and application of medicine and food of *Aspongopus chinensis* Dallas[J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2009, 5(9): 44-47 (in Chinese)  
张颖, 陈建伟, 高原. 九香虫资源鉴定、化学、药理与药食应用研究[J]. 亚太传统医药, 2009, 5(9): 44-47
- [9] Li SW, Zhao BS, Du J. Isolation, purification and detection of the antimicrobial activity of the antimicrobial peptide CcAMP1 from *Coridius chinensis* (Hemiptera: Dinidoridae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2015, 58(6): 610-616 (in Chinese)  
李尚伟, 赵柏松, 杜鹃. 九香虫抗菌肽 CcAMP1 的分离纯化和抗菌活性检测[J]. 昆虫学报, 2015, 58(6): 610-616
- [10] Li XJ. Chemical constituents & their bioactivities of five symbionts[D]. Xianyang: Doctoral Dissertation of Northwest A & F University, 2012 (in Chinese)  
李晓君. 五种共生菌化学成分与生物活性研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学博士学位论文, 2012
- [11] Zhu YJ, Su MX, Huang SF, et al. Effect of cultural condition on fatty acid composition of *Ralstonia solanacearum*[J]. Microbiology China, 2009, 36(8): 1158-1165 (in Chinese)  
朱育菁, 苏明星, 黄素芳, 等. 培养条件对青枯雷尔氏菌脂肪酸组成的影响[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1158-1165
- [12] Chen MB, Guo JH, Yao Q, et al. Isolation and identification, and biological characteristics of cadmium-tolerant bacteria from the Dabao Mine[J]. Microbiology China, 2012, 39(12): 1720-1733 (in Chinese)  
陈美标, 郭建华, 姚青, 等. 大宝山矿区耐 Cd<sup>2+</sup>细菌的分离鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2012, 39(12): 1720-1733
- [13] Yao XL, Kang QJ, Xiong SZ, et al. Isolation and identification of endophytic actinomycetes from the seeds of *Camptotheca acuminata* Decne. and isolation of antimicrobial substances from those endophytic actinomycetes[J]. Microbiology China, 2014, 41(6): 1109-1120 (in Chinese)  
姚晓玲, 康前进, 熊顺子, 等. 喜树种子内生放线菌的分离鉴定及抗菌活性物质初分离[J]. 微生物学通报, 2014, 41(6): 1109-1120
- [14] Yu FJ, Chen WL. Effects of culture conditions on the production of antagonistic substance produced by *Bacillus cereus* 357[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences), 2006, 32(4): 396-400 (in Chinese)  
于飞进, 陈卫良. 培养条件对 *Bacillus cereus* 357 生长及产生拮抗物质的影响[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32(4): 396-400
- [15] Bric JM, Bostock RM, Silverstone SE. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(2): 535-538
- [16] Li Y, Pan WB, Yang LL. Research on separation characteristics of the extracellular algae-lysing components from three algae-lysing bacteria[J]. Microbiology China, 2008, 35(2): 171-177 (in Chinese)  
李燕, 潘伟斌, 杨丽丽. 三株溶藻细菌胞外溶藻活性物质若干分离特性的研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2): 171-177
- [17] Bascom-Slack C, Ma C, Moore E, et al. Multiple, novel biologically active endophytic *Actinomycetes* isolated from upper Amazonian rainforests[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(2): 374-383
- [18] Yang FH, Li ZN, Ji XZ, et al. Applications of BOX-PCR technique in diversity study of microorganisms[J]. Microbiology China, 2008, 35(8): 1282-1286 (in Chinese)  
杨凤环, 李正楠, 姬惜珠, 等. BOX-PCR 技术在微生物多样性研究中的应用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1282-1286
- [19] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [20] Vilanova C, Marco G, Domínguez-Escribà L, et al. Bacteria from acidic to strongly alkaline insect midguts: potential sources of extreme cellulolytic enzymes[J]. Biomass and Bioenergy, 2012, 45: 288-294
- [21] Wang H, Dong H, Qian HT, et al. Laboratory assessment of entomopathogenic nematode symbiotic bacteria to control maize pest, *Ostrinia furnacalis*, and fungi diseases, *Bipolaris maydis* and *Curvularia lunata*[J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2014, 17(4): 823-827
- [22] Oh DC, Scott JJ, Poulsen M, et al. Discovery of new secondary metabolites mediating insect-microorganism symbioses[J]. Planta Medica, 2008, 74(9): SL2
- [23] Hirose E, Panizzi AR, de Souza JT, et al. Bacteria in the gut of southern green stink bug (Heteroptera: Pentatomidae)[J]. Annals of the Entomological Society of America, 2006, 99(1): 91-95
- [24] Tada A, Kikuchi Y, Hosokawa T, et al. Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae)[J]. Applied Entomology and Zoology, 2011, 46(4): 483-488
- [25] Prado SS, Almeida RPP. Phylogenetic placement of pentatomid stink bug gut symbionts[J]. Current Microbiology, 2009, 58(1): 64-69
- [26] Prado SS, Golden M, Follett PA, et al. Demography of gut symbiotic and aposymbiotic *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae)[J]. Environmental Entomology, 2009, 38(1): 103-109
- [27] Liu YS, Chen YX, Lü F, et al. Study on the primary identification of intestinal bacteria in *Lycorma delicatula* (White)[J]. Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science), 2006, 37(4): 495-498 (in Chinese)  
刘玉升, 陈艳霞, 吕飞, 等. 斑衣蜡蝉成虫肠道细菌的鉴定研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2006, 37(4): 495-498
- [28] Ye JJ, Cao NN, Wu JM, et al. Research progress on application of biocontrol *Bacillus*[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2014, 42(8): 185-190 (in Chinese)  
叶晶晶, 曹宁宁, 吴建梅, 等. 生防芽孢杆菌的应用研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2014, 42(8): 185-190
- [29] Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites[J]. Natural Product Reports, 2001, 18(4): 448-459
- [30] Haas D, Défago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(4): 307-319
- [31] Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. Microbiological Research, 2008, 163(2): 173-181
- [32] Compant S, Reiter B, Sessitsch A, et al. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth promoting bacterium *Burkholderia* sp. strain PsJN[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(4): 1685-1693