

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(4):530-536; 4 April 2010  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 醉马草内生菌的分离、鉴定及杀虫效果

张雪兵<sup>1,2</sup>, 史应武<sup>2</sup>, 王晓霞<sup>2,3</sup>, 张伟<sup>2</sup>, 娄恺<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 新疆农业大学食品学院, 乌鲁木齐 830052)

(<sup>2</sup> 新疆农业科学院微生物研究所, 乌鲁木齐 830091)

(<sup>3</sup> 新疆大学生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046)

**摘要:**【目的】探明醉马草内生菌的种类, 筛选对农作物虫害有毒杀作用的菌株。【方法】采用研磨法从健康醉马草植物的根、茎、叶和种子中进行菌种分离; 通过对其形态、培养特征、生理生化及其他生物学特性的研究; 16S rDNA 及 ITS 序列的系统发育学分析进行鉴定; 用玻片浸渍法和喷雾法筛选产杀虫活性物质菌株。【结果】获得细菌 89 株, 分别属于枯草芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、叶杆菌属 (*Phyllobacterium*)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*)、类芽孢杆菌 (*Paenibacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 8 个属; 真菌 2 株, 分别属于麦角菌属 (*Claviceps*) 和毛壳菌属 (*Chaetomium*)。经初筛及复筛, 内生菌娄彻氏链霉菌 *Streptomyces rochei* (GA) 和黑麦麦角菌 *Claviceps purpurea* (PF-2) 发酵液粗提物对棉蚜虫 (*Aphis gossypii*) 致死率达 85% 以上。【结论】醉马草内生菌株 PF-2 和 GA 的粗提代谢物对棉蚜虫有明显的毒杀作用, 为开发新的生物源农药提供了生物源物质。

**关键词:** 醉马草; 内生菌; 娄彻氏链霉菌; 麦角菌; 棉花

**中图分类号:** Q938    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0530-07

自 1898 年 Vogl 从黑麦草种子内分离出第一株内生真菌以来, 植物内生菌作为一种新的微生物资源受到了广泛关注<sup>[1-2]</sup>。内生菌在植物体内具有独立繁殖和传导特性, 有可能成为生物防治中有潜力的微生物农药和增产菌。因此, 利用内生菌控制作物病虫害、开发有益内生菌以提高作物产量和品质, 对农业可持续发展具有重要意义。我国已从棉花、水稻、马铃薯、番茄、辣椒等植物中分离到内生菌, 证明内生菌对棉花黄萎病、马铃薯环腐病、番茄青枯病、辣椒炭疽病等植物病害具有防治效果, 对植株有增产效果<sup>[3]</sup>。

目前, 在各种农作物及果树中发现的内生细菌已超过 120 种 (隶属于 54 个属)。这些内生细菌大多为土壤微生物种类, 其中假单胞菌属 (*Pseudom-*

*onas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、肠杆菌属 (*Eterobacter*) 以及土壤杆菌属 (*Agrobacterium*) 为最常见的属<sup>[4]</sup>。邹文欣等从黄花蒿 (*Artemisia alllila*) 和蒙古蒿 (*Artemisia mongolica*) 分离到一株内生真菌刺盘孢霉 (*Colletorichum sp.*) 能产生炭疽菌酸 (colletotrichtnn acid) 等 3 种新的抗菌活性物质, 对枯草芽孢杆菌, 金黄色葡萄球菌和八叠球菌都有良好的抑制作用。Strobel 研究小组从澳大利亚北部一种有叶蕨类植物 (*Grevillea pteridifolia*) 中分离到一株新内生链霉菌 *Streptomyces sp.* NRRL 30566。它能产生一种新型抗菌素 kakadumycins, 对炭疽芽孢杆菌, 疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 具有抑杀活性。内生菌产生的活性物质还有亚油酸 (GLA)、防风湿物质以及蛋白酶类和杀虫活性化合物等<sup>[5]</sup>。

**基金项目:** 国家 973 计划前期研究专项 (2008CB417214); 新疆特殊环境微生物实验室开放课题 (XJYS0203-2008-03)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-991-4521590; E-mail: loukai02@mail.tsinghua.edu.cn

**作者简介:** 张雪兵 (1983-), 女, 新疆人, 硕士研究生, 研究方向为生物技术。Tel: +86-991-4525891; E-mail: zhangxuebing1983.student@sina.com.cn

**收稿日期:** 2009-10-30; **修回日期:** 2010-01-19

醉马草 [*Achnatherum inebrians* (Hance) Keng.] 别名醉马茛苳, 为茛苳草属 (*Achnatherum Beauv*), 禾本科多年生草本植物, 它是我国北方天然草原主要的烈性毒草之一, 牲畜在误食该草后往往会产生一系列中毒症状, 重者会导致死亡。李保军等人采用玫瑰红染色法, 对醉马草植物内生菌进行了镜检, 发现种子和鲜组织中均含有丰富的内生菌<sup>[6]</sup>。本研究对新疆醉马草不同组织内生菌进行了分离和鉴定, 筛选出对棉蚜等农作物害虫具有毒杀作用的菌株, 为开发新型生物农药奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品:** 样品采于2008年5月和7月, 采样地位于乌鲁木齐南山, 海拔1074-1700 m, 东经87°21'31", 北纬43°36'49"。采用间隔10米的5点取样法(东、南、西、北、中), 每点选取供试草1株, 每株草取根、茎、叶、种子(成熟期), 每种器官取样2个。将样品装入无菌食品保鲜袋, 带回实验室4℃保藏。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** Masteryler ep PCR仪(上海艾本德生物技术国际贸易有限公司), Eppendorf Centrifuge 5417R离心机(上海艾本德生物技术国际贸易有限公司), 摇床 TH2-C-1(广东省医疗器械厂), 旋转蒸发仪 RE-2(广东省医疗器械厂), 生化培养箱 LRH-250A(广东省医疗器械厂)。

**1.1.3 培养基:** ①分离培养基: 马铃薯葡萄糖培养基(PDA), 牛肉膏蛋白胨培养基(NA), 高氏一号培养基。②种子培养基(1000 mL): 葡萄糖10 g, 玉米粉10 g, 黄豆粉20 g, 磷酸二氢钾1 g, pH自然。③发酵培养基(1000 mL): 可溶性淀粉20 g, 黄豆粉15 g, 酵母粉5 g, 蛋白胨2 g, 碳酸钙4 g, 氯化钠4 g, pH 7.0-7.2。

### 1.2 内生菌的分离和纯化

取植株根、茎、叶和种子各0.5 g 无菌水冲洗, 根据参考文献[7]进行表面灭菌, 检查灭菌效果。各加入1 mL 无菌水研磨, 吸取研磨液, 稀释平板涂布法分别涂布于NA培养基、高氏1号培养基、PDA培养基上, NA和高氏一号平板置于37℃培养箱中, PDA平板置于27℃培养箱中培养。划线分离法对菌株进一步的纯化分离, 斜面4℃保存。根据形态特征对内生菌进行初步鉴定<sup>[8-10]</sup>。

### 1.3 细菌分子鉴定

采用SDS-CTAB结合法提取基因组DNA<sup>[11]</sup>。用于16S rDNA的PCR反应的引物为一对通引物

27F:5'-AGAGTTTTATCNTGGCTCAG-3'和1492R:5'-GGYTACCTTGTACGACTT-3'<sup>[12]</sup>。PCR反应体系为:25 μL Premix Taq, 各0.5 μL引物(20 μmol/L), 0.5 μL DNA(100 ng), 23.5 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR反应条件为94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 52℃ 40 s, 72℃ 1.5 min, 30个循环; 72℃ 7 min。PCR产物的纯化和测序由上海生工生物技术公司完成。序列提交GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 用Blast软件在GenBank网站上进行相似性搜索, 获取相近典型菌株的16S rDNA基因序列, 用CLUSTAL-X<sup>[13]</sup>进行多重序列比对。基因登录号为GU370903、GU124640至GU124690。

### 1.4 真菌分子鉴定

采用二次沉淀法提取DNA<sup>[14]</sup>。选用ITS1和ITS4一对通用引物: ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'和ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'<sup>[15]</sup>。PCR反应体系为:25 μL Premix Taq, 各2 μL引物(20 μmol/L), 2 μL DNA(100 ng), 19 μL ddH<sub>2</sub>O。PCR反应条件为94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35个循环; 72℃ 10 min。PCR产物的纯化和测序由上海生工生物技术公司完成。序列比对方法同细菌分子鉴定。基因登录号为GU138647、GU138648。

### 1.5 杀虫菌株的筛选

将发酵液稀释50倍, 采用玻片浸渍法和喷雾法<sup>[19]</sup>进行杀虫活性菌株的初筛, 供试昆虫来自新疆农业科学院植物保护研究所所提供的生长7天的棉蚜。每处理3个重复, 设发酵培养基为对照, 对照死亡率控制在5%以内。计算方法: 死亡率 = (死亡虫数/供试总虫数) × 100%。校正死亡率 = [(处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率)] × 100%。

### 1.6 杀虫菌胞外代谢产物的活性检测和毒力的生物测定

根据文献[17-18]进行杀虫菌发酵, 发酵液4℃冰箱保存。浸提液的制备采用系统溶剂冷浸法进行提取。发酵液依次用石油醚、乙醚、氯仿、95%乙醇按65℃回流煮沸3 h的方法提取, 溶剂用量为样品的10倍重量。前一种溶剂处理完后, 用滤纸抽滤出浸提液并挥干溶剂, 再换下一种溶剂提取, 方法相同, 依次进行。将石油醚、乙醚、氯仿、乙醇浸提液的滤液减压浓缩后以蒸馏水定容, 按浸提液质量换算, 4种粗提物均制备成质量浓度为0.02 mg/mL的浸提液。采用浸渍法, 棉蚜和鲜嫩棉叶分别放入自制

的小培养皿状滤网中,浸没于石油醚、乙醚、氯仿、乙醇浸提液(4种药液均加入少量吐温80以确保药液与棉蚜充分接触)中处理20s后迅速取出,将棉蚜放入杯底垫有3层保湿滤纸烧杯中,每个处理100头棉蚜,重复3次,对照用原发酵液做同样处理。将烧杯置于温度(22±2)℃,相对湿度60%–75%,光照强度500lx的培养箱内,于24、48h后观察棉蚜的死亡情况,统计并计算死亡率。

采用浓度为1.0、0.5、0.1、0.05、0.02mg/mL乙醇浸提液,进行毒力的生物测定,方法同上。统计死亡虫数。

### 1.7 杀虫菌株的形态学特征及生理生化特性

细菌简单染色用显微镜观察菌体形态,参照文献<sup>[20–23]</sup>进行。真菌扞片培养后制作菌丝压片,经显微观察菌丝和孢子形态结构特征,并测定其生理生化特性,进行初步鉴定和分类<sup>[24]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 醉马草内生菌的分离鉴定

由醉马草内生菌分离鉴定结果表明,醉马草根、

茎、叶、种子中分离菌株合并归类为91株,种类较为丰富,其中内生细菌和内生真菌分别为89株和2株。大多数为细菌类群,其次是放线菌和真菌。根据形态学与分子鉴定技术进一步将其分别鉴定为以下12个细菌种群(表1):B1 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、B2 短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)、B3 坚硬芽孢杆菌(*B. firmus*)、B4 藓样芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、B5 蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、B6 巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、B7 类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)、B8 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、B9 洛菲不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)、B10 鞘脂单胞菌(*Sphingomonas maltophilia*)、B11 叶杆菌(*Phyllobacterium ifriqiyense*)、B12 棒状杆菌(*Corynebacterium xerosis*);1个放线菌类群:A 娄彻氏链霉菌 *Streptomyces rochei*;2个真菌种群:F1 黑麦角菌(*Claviceps purpurea*)、F2 球毛壳菌(*Chaetomium globosum*)。在醉马草内生菌属水平上枯草芽孢杆菌属(*Bacillus*)分离频率最高,占内生细菌总数的58.4%。醉马草不同组织器官中内生细菌种类不同,叶中内生细菌种类最为丰富。

表1 醉马草不同组织器官内生菌的分布

Table 1 The species and distribution of endophyte in different parts of *Achnatherum inebrians*

Isolate	Genus	Species	Root	Stem	Leaf	seed	Total
B1	<i>Bacillus</i>	<i>subtilis</i>	9	2	14	1	26
B2	<i>Bacillus</i>	<i>pumilus</i>	6	0	11	3	20
B3	<i>Bacillus</i>	<i>firmus</i>	1	0	1	1	3
B4	<i>Bacillus</i>	<i>licheniformis</i>	0	0	2	0	2
B5	<i>Bacillus</i>	<i>cereus</i>	1	0	0	0	1
B6	<i>Bacillus</i>	<i>megaterium</i>	3	0	8	0	11
B7	<i>Paenibacillus</i>	<i>polymyxa</i>	1	0	3	0	4
B8	<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	1	1	1	0	3
B8	<i>Acinetobacter</i>	<i>lwoffii</i>	0	0	1	0	1
B10	<i>Sphingomonas</i>	<i>maltophilia</i>	0	0	1	0	1
B11	<i>Phyllobacterium</i>	<i>ifriqiyense</i>	1	1	0	0	2
B12	<i>Corynebacterium</i>	<i>xerosis</i>	1	0	1	0	2
A	<i>Streptomyces</i>	<i>rochei</i>	0	0	1	1	2
F1	<i>Claviceps</i>	<i>purpurea</i>	0	0	0	1	1
F2	<i>Chaetomium</i>	<i>globosum</i>	0	0	0	1	1
W	Unknown		4	0	6	1	11
Total			28	4	50	10	91

### 2.2 杀虫活性菌株的筛选

2.2.1 杀虫菌株初筛:以棉蚜作为靶标生物,对分离到的91个内生菌株进行拮抗作用测定,发现有5个菌株对棉蚜有很好的杀虫作用,占总菌株数的5.56%,分别为:GA、PF-2、2N153、2N185、2P118(表2)。其余棉蚜死亡率在40%–60%和40%以下的菌株分别为10个和75个菌株。

表2 初筛结果

Table 2 The result of primary screening assay

Mortality/%	Number of strains
80–100	2
60–80	3
40–60	10
<40	76

Note: the data are the means of three replicates. The same below.

**2.2.2 杀虫活性菌株的复筛:**对初筛所得 5 株杀虫活性较高菌株进行棉蚜毒力测试,48 h 后观察记录结果,见表 3。在 5 株杀虫菌株中,菌株 GA、PF-2 对

棉蚜杀虫效果最好,死亡率高,死亡快。运用统计学最小显著极差法(LSR法)进行比较,可看出 GA、PF-2 为比较理想菌株,作为本实验的出发菌。

表 3 复筛结果

Table 3 The result of second screening assay

Strain	Number of <i>Aphis gossypii</i>	Total insects	Dead mortality/%	Significance	
				0.05	0.01
GA	100	88	88	a	A
PF-2	100	90	90	a	A
2N153	100	73	73	b	B
2N185	100	73	73	b	B
2P118	100	78	78	b	B
CK	100	5	5	c	C

### 2.3 杀虫菌株发酵浸提液杀虫活性测定

石油醚、乙醚、氯仿、乙醇 4 种有机溶剂浸提醉马草内生菌 GA 和 PF-2 发酵液杀虫活性物质对棉蚜的死亡率分别为 46.89%、47.67%、55.75%、

80.40% 和 78.71%、73.87%、70.45%、94.82%、85.36%,与对照发酵原液初步检测结果表明(表 4)醉马草内生菌 GA 和 PF-2 发酵液的有毒成分主要集中在亲水部位,即乙醇提取液中。

表 4 4 种溶剂提取物对棉蚜虫的杀虫活性测定

Table 4 Four extractives insecticidal activities against *Aphis gossypii glover*

Samples	Mortality/%			
	GA		PF-2	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Petroleum ether extraction	38.27	46.89	73.08	78.71
Aether extraction	31.13	47.67	69.63	73.87
Chloroform extraction	48.53	55.75	66.61	70.45
Ethanol extraction	76.47	80.40	90.67	94.82
CK(Fermentation broth)	75.48	76.12	82.94	85.36

### 2.4 GA 和 PF-2 菌株对棉蚜的毒力生物测定结果

以棉蚜为生测对象,GA 和 PF-2 菌株发酵乙醇浸提液处理 24 h 后,棉蚜个体开始死亡,48 h 后的死亡率、机率值见表 5。通过  $LC_{50}$  的 Excell 运算<sup>[25]</sup>,结果得到菌株 GA 和 PF-2 对棉蚜死亡率(用机率值)与处理浓度(用对数值)的直线回归方程分

别为  $y = 5.9460 + 0.5379x$ ,  $LC_{50} = 0.0174$ , 0.95 置信限为  $0.0047 - 0.0286$ , 经方差分析,  $F = 50.2084 > F_{0.05} = 0.0058$ , 线性回归显著,  $R^2 = 0.94362$ ;  $y = 6.6499 + 0.7095x$ ,  $LC_{50} = 0.0047$  mg/mL, 0.95 置信限为  $0.0005 - 0.0113$  mg/mL, 经方差分析,  $F = 50.2084 > F_{0.05} = 0.0058$ , 线性回归显著,  $R^2 = 0.94362$ 。

表 5 GA 和 PF-2 对棉蚜虫的杀虫活性测定

Table 5 GA and PF-2 insecticidal activities against *Aphis gossypii glover*

Isolate	Concentration	Number of <i>Aphis gossypii</i>	Total dead insects	Mortality/%	Corrected mortality	Odds score of inhibition rate
GA	1.00	100	86	86	85.42	6.055
	0.50	100	75	75	73.96	5.642
	0.10	100	67	67	65.63	5.402
	0.05	100	63	63	61.46	5.291
	0.02	100	53	53	51.04	5.026
PF-2	1.00	100	96	96	95.83	6.731
	0.50	100	91	91	90.63	6.318
	0.10	100	82	82	81.25	5.887
	0.05	100	82	82	81.25	5.887
	0.02	100	66	66	64.58	5.374
CK		100	4	4		

## 2.5 菌株 GA 和 PF-2 形态学特征

菌株 GA 显微观测呈长杆状,中生芽孢。菌株 PF-2 菌丝较细、褐色、分枝、有横隔;分生孢梗不分枝,褐色;产孢细胞全部芽式产孢,分生孢子多单生,也有串生,孢子椭圆形(图 1)。不同培养基上,GA 的气生菌和基内菌丝稍有变化,而且有可溶性色素产生,PF-2 的气生菌和基内菌丝变化均不是很明显,而且均无可溶性色素产生(表 6)。

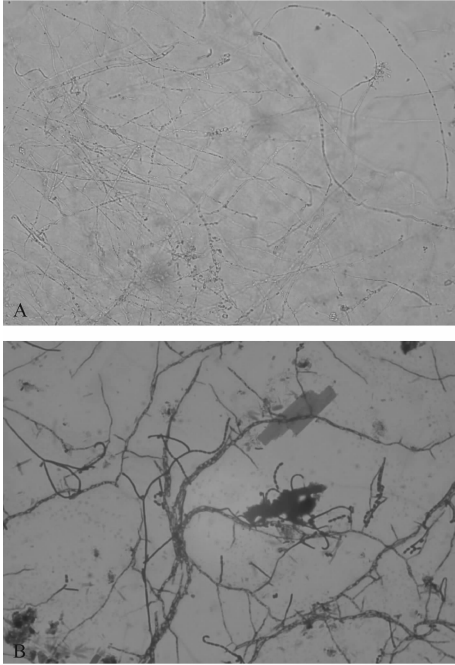


图 1 菌株的产孢丝形态

Fig.1 Shape of the spore producing chains of the strain. A: strain PF-2(20 × );B: strain GA(400 × ) .

表 6 菌株 GA 和 PF-2 在不同培养基上的培养特征

Table 6 Cultural characteristics of the strain GA, PF-2 in different medium

Strain	Medium	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Soluble pigment
GA	Czapek	White	Yellow	-
	PDA	Snow white	Deep yellow	-
	Sydowi	White	Brown	-
PF-2	Gause 1	Snow hite	yellowy	+
	Glucose Asparamide	White	Ivory-White	-
	Starch ammonium salt	White	Ivory-White	-
	Starch inorganic salt	Ivory white;	yellowy	+

PF-2 在 NaCl 浓度 1% - 8% 的 PDA 培养基上均能生长。菌株 GA 的耐碱能力较强,在 pH5.0 - 10.0 的环境中均能较好生长;菌株 PF-2 在 pH7.0 - 8.0 的环境中能够生长。菌株 GA 在 25℃ - 50℃ 范围内可以生长,最适温度为 37℃;菌株 PF-2 在 20℃ - 45℃ 范围内可以生长,最适温度为 28℃。

## 2.6 菌株 GA 和 PF-2 生理生化特征

菌株生理生化特征见表 7。菌株 GA 可利用除天冬氨酸以外的其余碳氮源,使明胶液化,牛奶无凝固但有酪化现象,能水解脂肪,产生硫化氢,黑色素,淀粉酶和尿素酶,吲哚,甲基红和伏-普反应阴性,不能利用柠檬酸盐。菌株 PF-2 明胶液化,牛奶无凝固但有酪化现象,淀粉无水解现象,不能水解脂肪,不产生硫化氢和黑色素,产生尿素酶,吲哚和伏-普反应阳性,甲基红反应阴性,不能利用柠檬酸盐。菌株 GA 和 PF-2 对氨基青霉素不敏感。菌株 GA 在 NaCl 浓度 1% - 9% 的高氏一号培养基上能够生长;菌株

表 7 PF-2 和 GA 菌株的生理生化特征

Table 7 Physiological and biochemical characteristics of the strain PF-2, GA

Characteristic	GA	PF-2
Hydrolysis of starch test	+	-
Hydrolysis of lipids test	+	+
Litmus milk test	cg	cg
Gelatin of liquefaction test	+	+
Urea test	+	+
Indole test	-	+
Voges-prokauer test	-	+
Hydrogen sulfide test	+	-
Methyl red test	-	-
Citrate test	+ -	+ -
Sugar fermentation test		
Glucose	-	-
Lactose	-	-
Sucrose	-	-

Note: +: positive reaction; -: negative reaction; c: peptonization; g: discoloration.

## 3 讨论

植物内生菌作为植物微生态系统中重要的组成部分,对增强宿主植物对环境适应能力具有重要意义。利用植物内生菌防治作物虫害是一个潜力巨大的新型领域。研究表明醉茅草组织内存在多种内生菌,绝大多数是细菌类群,与其它植物内生菌的研究

结果一致<sup>[26-27]</sup>。本研究发现,醉马草不同器官内生菌种类变化很大,叶片内生菌种类最为丰富,根、种子、茎的内生菌种类依次减少,这可能是内生菌对宿主的选择性及适应性所导致的结果。从醉马草中分离出两种内生菌 GA 和 PF-2,经形态学结合 16S rDNA 和 ITS 基因序列分析,将其归为放链霉菌 (*Streptomyces*) 和麦角菌属 (*Claviceps*)。

杀虫活性试验表明,菌株 GA 和 PF-2 的 4 种不同溶剂粗提物均具有一定的灭蚜活性,其中乙醇粗提物灭蚜效果明显,发酵液粗提物含有能有效杀灭棉蚜的化学成分,且这类化学成分存在于乙醇粗提物中,其中主要的灭蚜活性成分可能是低极性化学成分,具体杀虫活性成分需有待进一步分离和纯化。对本研究结果及相关的研究报道<sup>[28]</sup>进行综合分析,发现 GA 和 PF-2 发酵粗提物中含有能有效杀灭多种害虫的化学成分,但其杀虫谱还不明确,有待进一步的深入研究。GA 和 PF-2 发酵粗提物灭蚜活性强,对供试棉蚜均有较好的杀灭效果,是一种不可多得的生物源灭蚜剂。因此,利用醉马草内生菌制备微生物源农药,通过对醉马草内生菌发酵粗提物灭蚜活性组分进行分离纯化并对其构效关系、杀虫谱和剂型等进行深入研究,找出适当的增效方式提高药效,同时探明其杀虫机理,进而研究出一类新型的高效灭蚜剂,不但在生态环境保护方面具有重要意义,而且可以扩大对醉马草资源的综合利用,使这一产业具有更广阔的发展前景。

目前,研究者仅研究了两株具有杀虫活性的醉马草内生菌菌株,其杀虫活性成分化合物的结构及其合成代谢机制,以及安全性评价有待进一步研究。

## 参考文献

- [ 1 ] 何劲,刘蕴哲,康冀川. 植物内生菌及其在农业和医学上的用途. 贵州农业科学 ( *Guizhou Agricultural Sciences* ), 2006, 34(3) : 113-115.
- [ 2 ] 姜怡,杨颖,陈华红,等. 植物内生菌资源. 微生物学通报 ( *Microbiology* ), 2005, 32(6) : 146-147.
- [ 3 ] 朱育菁. 茶叶内生菌的分离鉴定及其生防功能初探. 福建农林大学学报 ( *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* ), 2009, 38(2) : 129-130.
- [ 4 ] 洪翔鹏,邱思鑫,陈航,等. 4 种茄科作物内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. 福建农林大学学报 ( *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University* ), 2007, 36(4) : 347-351.
- [ 5 ] 余波. 植物内生菌活性物质研究进展. 安徽农学通报 ( *Auhui Agricultural Science Bulletin* ), 2008, 14(3) : 32-84.
- [ 6 ] 李保军. 植物内生菌检查. 食草家畜 ( *Herbivorous cattle* ), 1996, 增刊:13-14.
- [ 7 ] 杜慧娟. 药用植物内生菌的分离及抗菌活性的初步研究. 氨基酸和生物资源 ( *Amino Acids And Biotic Resource* ), 2008, 30(1) : 61-62.
- [ 8 ] H. L Barnett, B. B Hunt. 半知菌属图解. 北京: 科学出版社, 1997, 1-240.
- [ 9 ] Ellis MB. More Dematiaceous Hyphomycetes Commonwealth Institute. England; Surrey, 1976.
- [ 10 ] 谭悠久. 毛壳菌科 ( *Chaetomiaceae* ) 分类及分子系统发育研究. 第一版. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005, 1-83.
- [ 11 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金东雁, 黎孟枫, 等译. 第二版, 北京: 科学出版社, 1999.
- [ 12 ] Gordon Webster, Carole J. Newberry, et al. Assessment of bacterial community structure in the deep sub-seafloor biosphere by 16S rDNA-based techniques: a cautionary tale. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 55: 155-164.
- [ 13 ] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [ 14 ] Hoffmann CS, Winston F. Aten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 1987, 57(2-3) : 267-272.
- [ 15 ] 曾莉. 放线菌活性产物对烟草赤星病抑制作用的初步筛选研究. 西南农业学报 ( *Southwest China Journal of Agricultural Science* ), 2006, 19(5) : 890.
- [ 16 ] 张伟. 醉马草毒性成分的提取研究. 生物技术 ( *Biotechnology* ), 2006, 16(6) : 60.
- [ 17 ] 王伟. 核桃内生菌的分离及代谢产物活性研究. 西北农业学报 ( *Acta Agriculturae Borealioccidentalis Sinica* ), 2008, 17(1) : 78.
- [ 18 ] 郭尚彬. 金钱松内生真菌 JJ18 灭螺活性与菌株鉴定. 中国媒介生物学及控制杂志 ( *Chinese journal of vector biology and control* ) 2008, 19(5) : 442.
- [ 19 ] 徐树兰. 海洋真菌 1893 发酵培养条件及杀虫活性物质的初步研究. 中山大学硕士论文, 2007.
- [ 20 ] Gordon RE, Haynes WC, Pang CHN. 芽孢杆菌属. 蔡妙英, 等译. 北京: 农业出版社, 1983, 96.
- [ 21 ] Sneath PHA. Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore; Williams & Wilkins, 1986.
- [ 22 ] Holt JG, Krieg NR, Peter HA, et al. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th ed. Baltimore; Williams & Wilkins, 1994.

- [23] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001.
- [24] 方中达. 植病研究法. 第三版. 北京:中国农业出版社,1998,214.
- [25] 马桢红,马良才. 生物测定中 LC50 或 LD50 的 Excell 运算方法. 医学动物防制 (*Chinese Journal Of Pest Control*), 1999, 15(11):612-614.
- [26] Li XM, Xu ZG, Mew TW. Colonization of antagonistic bacteria on rice plants and their influence on native bacteria. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28 ( 8 ): 3868-3874.
- [27] Xie FX, Ren AZ, Wang YH, et al. A comparative study of the inhibitive effect of fungal endophytes on turf grass fungus pathogens. *Acta Ecologica Sinica*, 2008, 28 ( 8 ): 3913-3920.
- [28] 李静,吴芬宏,陈延燕,等. 麻疯树种子提取物对几种害虫的杀虫活性. 农药 (*Pesticides*), 2006, 45 ( 1 ): 57-58.

## Isolation, identification and insecticidal activity of endophyte from *Achnatherum inebrians*

Xuebing Zhang<sup>1,2</sup>, Yingwu Shi<sup>2</sup>, Xiaoxia Wang<sup>2,3</sup>, Wei Zhang<sup>2</sup>, Kai Lou<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Food Science of Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

(<sup>2</sup>Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

(<sup>3</sup>Xinjiang University, College of Life Science, Urumqi 830046, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] To study endophyte species of *Achnatherum inebrians* and to screen strains with insecticidal activity against cotton insect. [ **Methods** ] We isolated endophytic from roots, stems, leaves and seeds of health *A. inebrians* by grinding separation method and identified by a dual approach of morphological and physiological observation and 16S rDNA gene (for bacteria) and ITS sequence (for fungi) based molecular identification. Then, those endophytes were inoculated into liquid media for fermentation and the crude extracts were used to test insecticidal activities by slide disc immersion and nebulization methods. [ **Results** ] We isolated bacteria species classified into 8 genera of *Bacillus*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Phyllobacterium*, *sphingomonas*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and 2 fungi of *Claviceps purpure* and *Claviceps Chaetomium*. Of them, the strain *Streptomyces rochei* (GA) and *Claviceps purpurea* (PF-2) had more than 85% of mortality to cotton aphid. [ **Conclusion** ] Two strains of PF-2 and GA associated within the *A. inebrians* had significant insecticidal activity to cotton aphid (*Aphis gossypii*), which may provide a new biological resource to explore new microbial insecticide.

**Keywords:** *Achnatherum inebrians*; endophyte; *Streptomyces rochei*; *Claviceps purpurea*; cotton

(本文责编:张晓丽)