

doi: 10.3969/j.issn.1674-0858.2016.03.19

五种细菌侵染后韭菜迟眼蕈蚊体内防御反应的研究

高欢欢¹, 翟一凡¹, 徐楠², 覃冬云¹, 葛温伯³, 于毅^{1*}

(1. 山东农业科学院植物保护研究所, 济南 250100; 2. 山东省产品质量检验研究院, 济南 250102;

3. 青岛农业大学植物保护学院, 山东青岛 266109)

摘要: 为了解韭蛆体内 5 种细菌对韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 的影响, 本研究将解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*、居泉沙雷氏菌 *Serratia fonticola*、恶臭假单胞杆菌 *Pseudomonas putida*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和节杆菌 *Arthrobacter nitroguajacolicus* 5 种细菌通过浸泡和针刺两种方式对韭蛆进行侵染, 观察韭蛆存活率、蛋白含量以及 3 种抗氧化酶活性的变化规律。结果显示, 与浸泡接种细菌相比, 针刺接种细菌后, 韭蛆整体的存活率和 SOD 酶活性下降, 而蛋白含量、POD 活性和 CAT 活性上升。其中, 居泉沙雷氏菌在针刺侵染后对韭蛆表现出致病性。因此, 机械损伤对于细菌的侵染具有重要的作用, 韭蛆则可通过改变抗氧化酶的活性来防御细菌的侵染。本研究为探索韭蛆与体内共生微生物之间的关系提供重要的基础, 为韭蛆的共生防治提供指导。

关键词: 韭蛆; 细菌; 侵染; 保护酶

中图分类号: Q965.8; S436.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-0858 (2016) 03-0582-07

Defensive responses of *Bradysia odoriphaga* to inoculation of five species of bacteria

GAO Huan-Huan¹, ZHAI Yi-Fan¹, XU Nan², QIN Dong-Yun¹, GE Wen-Bo³, YU Yi^{1*} (1. Institute of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; 2. Shandong Institute for Product Quality Inspection, Jinan 250102, China; 3. College of Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong Province, China)

Abstract: In order to understand the effect of bacteria on *Bradysia odoriphaga*, the survival rate, protein content and three oxidative enzymes of *B. odoriphaga* were examined after inoculation by five species of bacteria according to two inoculation methods (soak and wound). The bacteria were: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Serratia fonticola*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* and *Arthrobacter nitroguajacolicus*. The result showed that, compared to soak inoculation by bacteria, survival rate and SOD activity of *B. odoriphaga* decreased, and protein content, activity of POD and CAT increased after wound inoculation. The negative influence on *B. odoriphaga* was found after wound inoculation by *S. fonticola*. It was concluded that, could be affected by the mechanical injury could contributed to the infection of bacteria to *B. odoriphaga*. *B. odoriphaga* could produced defensive responds to the inoculation of bacteria through changing activity of oxidative enzymes. This study provided the theoretical foundation for exploring the co-evolution relationships between *B. odoriphaga* and microorganisms. And we hope that it will contribute to guiding for the symbiotic control of *B. odoriphaga*.

Key words: *Bradysia odoriphaga*; bacteria; infection; defensive enzyme

基金项目: 社会公益性研究项目 (201303027)

作者简介: 高欢欢, 女, 1986 年生, 山东禹城人, 博士, 主要从事韭蛆与微生物关系的研究, E-mail: gaohuanhuan368@126.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: robertyuyi@163.com

收稿日期 Received: 2015-07-06; 接受日期 Accepted: 2015-12-27

韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* Yang et Zhang, 幼虫称韭蛆, 属双翅目 Diptera 长角亚目 Nematocera 眼蕈蚊科 Sciaridae 迟眼蕈蚊属 (杨集昆和张学敏, 1985), 是韭菜上最重要的害虫, 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, 除中国以外, 中东、欧洲、北美以及东亚其它地区也有发生 (Imahori *et al.*, 2004; Misawa and Kuninaga, 2013; 张华敏等, 2013)。

韭蛆具有钻蛀性, 韭菜根部受到危害后易腐烂, 滋生大量微生物 (陈建华等, 2004)。韭蛆在微生物存在的环境中依然大量生存, 必定存在自身的防御机制。外界环境的变化会导致昆虫体内产生大量的活性氧, 利用抗氧化酶来消除这些活性氧是昆虫维持正常功能和代谢的必要条件。超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 是有机体内重要的抗氧化酶体系, 可以消除过量的活性氧 (Fuente and Victor, 2000; Campa – córdova *et al.*, 2002)。为了适应大量微生物滋生的腐烂环境, 韭蛆体内的抗氧化酶是否会发生变化则需要实验进行证明。在韭蛆体内、鳞茎、根部及其周围土壤中分离出 25 种微生物, 其中 23 种为细菌, 韭蛆体内较重要的细菌主要有居泉沙雷氏菌 *Serratia fonticola*、解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*、恶臭假单胞杆菌 *Pseudomonas putida*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 和节杆菌 *Arthrobacter nitroguajacolicus* 5 种细菌 (高欢欢等, 2015)。而 Bucher 早在 1959 年就已经发现沙雷氏菌不能在昆虫表皮生长, 但能通过表皮创口进入血淋巴内导致昆虫死亡, 相反, 经口摄入的沙雷氏菌通常不表现出致病性。但是, 这 5 种细菌是否对韭蛆是否产生影响, 是否也与表皮的损伤有直接的关系, 并没有相关研究, 微生物与韭蛆之间的关系也需要进一步的研究。

因此, 本研究以居泉沙雷氏菌、解淀粉芽孢杆菌、恶臭假单胞杆菌、枯草芽孢杆菌和节杆菌 5 种细菌作为研究对象, 通过浸泡和针刺浸泡两种处理方式, 使细菌分别通过韭蛆表皮气孔和表皮创口进入体内, 观察韭蛆存活率、蛋白含量以及 3 种保护酶活性的变化规律, 为研究微生物与韭蛆之间的关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

韭菜田间采集韭蛆老熟幼虫, 于山东农业科学院植物保护研究所养虫室 (温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; 相对湿度为 $65\% \pm 0.5\%$; 光周期为 24 h 全暗) 饲养 3 代, 以得到稳定的实验室种群。

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)。NB 培养, 考马斯亮蓝, PBS 缓冲液, SOD 试剂盒 (A001-3, 南京建成生物工程研究所), POD 试剂盒 (A084-3, 南京建成生物工程研究所) CAT 试剂盒 (A007-4, 南京建成生物工程研究所), 考马斯亮蓝 G-250, 牛血清蛋白。

蛋白提取缓冲液: Tris-HCl 0.158 g、乙二醇双乙胺醚-N, N-四乙酸 (EDTA) 0.038 g、蔗糖 8.56 g、苯甲基磺酰氟 (PMSF) 17 mg、亮抑蛋白酶肽 0.1 mg, 用去离子水配成 100 mL, 4°C 冰箱保存。

1.3 细菌菌液准备与韭蛆的处理

解淀粉芽孢杆菌、居泉沙雷氏菌、恶臭假单胞杆菌、枯草芽孢杆菌、节杆菌, 5 种细菌菌种由山东农业科学院植物保护研究所生防室提供, 所有菌株均在营养丰富的 NB 培养基上生长。经过划线、挑取单菌落、摇菌、测定浓度等步骤制备细菌悬浮液, 使其处于对数生长期 ($3 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$)。实验采取浸泡和针刺两种接种方式对韭蛆进行处理。具体处理方法如表 1 所示。

处理后的韭蛆幼虫置于培养箱中 (温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$; 相对湿度为 $65\% \pm 0.5\%$; 光周期为 24 h 全暗) 用无菌的饲料饲养。存活的韭蛆用于蛋白含量和酶活性的测定。

1.4 存活率

培养箱饲养 24 h 后记录韭蛆的存活情况, 每个处理 3 次重复, 观察细菌的侵染对韭蛆存活是否产生影响。

1.5 蛋白含量的提取与测定

1.5.1 蛋白含量提取

处理过的韭蛆在培养箱中饲养 24 h 后, 收集每个处理存活的虫体在 1.5 mL 离心管中并称量。

表 1 5 种细菌处理韭蛆的实验设计方案

Table 1 The experimental design method for *Bradysia odoriphaga* inoculated with five species of bacteria

处理名称 Name of treatments		3 龄韭蛆数量 (头) Number of 3 rd instar <i>B. odoriphaga</i> (heads)	细菌接种方式 Inoculation methods	重复数 Biological replicates
浸泡接种 Soak inoculation	处理 Treatment	50	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3
		50	<i>S. fonticola</i>	3
		50	<i>P. putida</i>	3
		50	<i>B. subtilis</i>	3
		50	<i>A. nitroguajacolicus</i>	3
	对照 CK	50	浸泡于 PBS 缓冲液中 30 min	3
伤口接种 Wound inoculation	处理 Treatment	50	<i>B. amyloliquefaciens</i>	3
		50	<i>S. fonticola</i>	3
		50	针刺腹部后, 浸泡于 细菌悬浮液中 10 min <i>P. putida</i>	3
		50	<i>B. subtilis</i>	3
		50	<i>A. nitroguajacolicus</i>	3
	对照 CK	50	针刺腹部后, 浸泡于 PBS 缓冲液中 10 min	3

从超低温冰箱中取出韭蛆, 加 1 mL 提前配制好的蛋白提取缓冲液, 在冰上充分研磨, 混匀, 再在 4℃ 冰箱内放置 1 h, 每隔 15 min 摇动一次, 超速冷冻离心 (12000 r/min, 4℃, 10 min), 取上清液至 1.5 mL 干净离心管中, - 20℃ 保存备用。

1.5.2 蛋白含量测定

称取 3 mg 牛血清白蛋白 (BSA) 标准品, 溶于蒸馏水并定容至 30 mL, 制成 100 μg/mL 的原液。再将配制好的原液用去离子水分别稀释成 0、20、40、60、80 和 100 μg/mL 6 个浓度。按表 2 加入试剂, 并做 2 个平行样。放置 2 min 后在 595 nm 波长下比色测定 (比色在 1 h 内完成), 记录 OD 值, 制作标准曲线。

每个样品取 0.1 mL 蛋白液加入 0.9 mL 去离子水作 10 倍稀释, 再加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 试剂, 充分混合, 放置 2 min 后, 以标准曲线 1 号试管做参比, 在 595 nm 波长下比色, 记录 OD 值, 重复 3 次, 根据标准曲线计算样品在该测定液中总蛋白浓度。

1.6 酶活性测定

1.6.1 酶液提取

处理过的韭蛆在培养箱中饲养 24 h 后, 收集

每个处理存活的虫体在 1.5 mL 离心管中并称重。加入 1 mL 磷酸缓冲液 (PB, 50 mmol/L, pH7.0) 和少许石英砂, 冰浴充分研磨, 混匀, 然后置于超声波仪中 5 min, 于 4℃ 冰箱内放置 15 min 后超速冷冻离心机离心 (12000 r/min, 4℃, 10 min)。取上清酶分装入 0.5 mL 的 Eppendorf 离心管中, 用于 SOD、POD 和 CAT 活性测定, 防止反复冻溶而导致酶液失活, - 20℃ 保存备用。

表 2 牛血清白蛋白的浓度配比

Table 2 The concentration rate of BSA

管号 Number of tubes	1	2	3	4	5	6
蛋白质标准液 (mL) Protein standard	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水 (mL) Distilled water	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0.0
考马斯亮蓝 (mL) G-250	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
蛋白质含量 (μg) Protein content	0.0	20.0	40.0	60.0	80.0	100.0

1.6.2 酶活性测定

严格按照 SOD、POD 和 CAT 活性测定试剂盒中的组织样本的检测方法进行测定, 测定波长分别为 450 nm、420 nm 和 405 nm。均以每毫克组织蛋白单位时间内催化单位质量 (体积) 底物的酶量定义为一个酶活力单位 (U/mg. prot) 。

1.7 数据分析

不同种类的细菌浸泡处理和针刺处理后, 对韭蛆存活率、蛋白含量、SOD、POD 和 CAT 活性分别采用单因素方差分析。采用 S-N-K 法测验区分平均值, 显著水平为 0.05, 数据分析所用的软件为 SPSS 17.0。

2 结果与分析

2.1 韭蛆的存活率

由表 3 可知, 细菌浸泡并未明显降低其存活率, 但经针刺接种不同种细菌的韭蛆的存活率差异明显。其中, 针刺接种解淀粉芽孢杆菌、居泉沙雷氏菌和枯草芽孢杆菌后韭蛆存活率显著低于对照, 尤其后两种已经低于 60%。另外, 在不接种细菌的前提下, 针刺处理后韭蛆的存活率明显低于未经针刺的韭蛆, 说明机械损伤对于韭蛆的存活率有一定的影响, 而上述 3 种菌会通过机械损伤降低韭蛆的存活率。

表 3 5 种细菌不同侵染方式下韭蛆的存活率
Table 3 Survival rate of *Bradysia odoriphaga* after inoculation with five species of bacteria

侵染方式 Inoculation methods	细菌种类 Bacteria	存活率 Survival rate
浸泡接种 Soak inoculation	对照 CK	0.958 ±0.022 e
	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.858 ±0.022 cde
	居泉沙雷氏菌 <i>Serratia fonticola</i>	0.925 ±0.029 de
	恶臭假单胞杆菌 <i>Pseudomonas putida</i>	0.850 ±0.029 cde
	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	0.892 ±0.033 de
	节杆菌 <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	0.811 ±0.029 bcd
针刺接种 Wound inoculation	对照 CK	0.789 ±0.011 cd
	解淀粉芽孢杆菌 <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.711 ±0.022 b
	居泉沙雷氏菌 <i>Serratia fonticola</i>	0.556 ±0.040 a
	恶臭假单胞杆菌 <i>Pseudomonas putida</i>	0.811 ±0.011 d
	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	0.567 ±0.051 a
	节杆菌 <i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i>	0.733 ±0.038 bc

注: 数据后不同字母表示处理间差异显著 (SNK 检验: $P < 0.05$, 单因素方差分析)。Note: Different letters after data indicate significant difference of survival rate among different treatments (SNK test: $P < 0.05$, following one-way ANOVA) .

2.1 细菌侵染后韭蛆的蛋白含量

韭蛆在 5 种细菌侵染后, 蛋白含量发生了显著的变化, 由图 1 显示, 浸泡接种细菌后, 韭蛆的蛋白含量明显低于针刺接种细菌后韭蛆的蛋白含量。其中节杆菌在两种侵染方式处理之后, 导致韭蛆的蛋白含量均有所提高。而浸泡接种恶臭假单胞杆菌后, 韭蛆蛋白含量与对照相比显著增加, 但是在针刺接种后却明显下降。韭蛆的蛋白含量在枯草芽孢杆菌针刺侵染后才明显上升, 同时发现, 在不接种细菌的前提下, 针刺处理后韭

蛆的蛋白含量明显高于未经针刺的韭蛆。说明, 枯草芽孢杆菌需要通过机械损伤才能进入韭蛆体内并对其产生影响, 而针刺造成的机械损伤本身也会增加韭蛆体内蛋白质的含量。

2.2 细菌侵染后韭蛆的 SOD 活性

在不接种细菌的前提下, 针刺处理后韭蛆 SOD 的活性与未经针刺的韭蛆相比并无差异 (图 2), 说明机械损伤与否并未影响韭蛆体内 SOD 活性的变化。针刺接种细菌之后, 韭蛆 SOD 的活性整体来说比浸泡接种后的 SOD 活性偏低,

与对照的差异更为显著。其中,节杆菌均无显著影响,恶臭假单胞杆菌采用两种方式侵染韭蛆,均会导致 SOD 活性显著下降,但是枯草芽孢杆菌在针刺侵染后才明显低于对照,说明对于枯草芽孢杆菌来说,针刺处理造成的机械损伤加剧了 SOD 酶活性的降低。

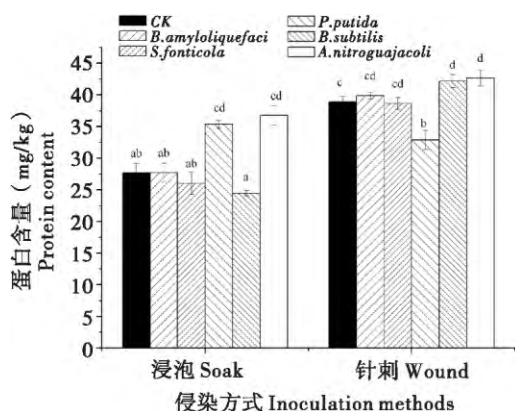


图 1 5 种细菌不同侵染方式下韭蛆的蛋白含量

Fig. 1 Protein content of *Bradysia odoriphaga* after inoculation with five species of bacteria

注: 不同字母代表不同处理间差异显著 (SNK 检验: $P < 0.05$, 单因素方差分析), 下图同。Note: Different letters above bars indicate significant difference among different treatments (SNK test: $P < 0.05$, following one-way ANOVA), the same below.

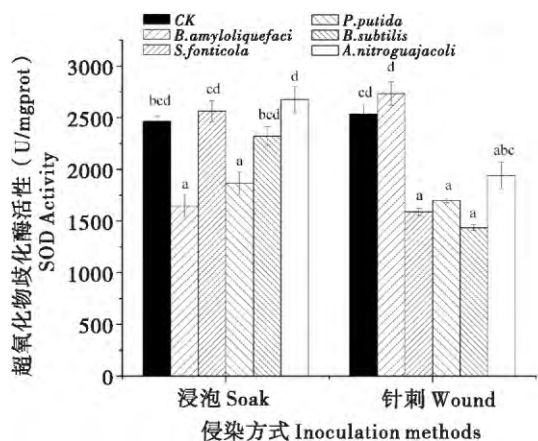


图 2 5 种细菌不同侵染方式下韭蛆的 SOD 酶活性

Fig. 2 SOD activity of *Bradysia odoriphaga* after inoculation with five species of bacteria

2.3 细菌侵染后韭蛆的 POD 和 CAT 活性

针刺接种细菌后韭蛆的 POD 活性整体高于浸泡侵染后的活性 (图 3)。在两种侵染方式下,居泉沙雷氏菌、恶臭假单胞杆菌和枯草芽孢杆菌并

没有引起韭蛆 POD 活性的变化,解淀粉芽孢杆菌和节杆菌则使韭蛆 POD 活性显著提高。同时,研究发现,在不接种细菌的前提下,针刺处理后韭蛆 POD 的活性明显高于未经针刺的韭蛆。说明针刺造成的机械损伤本身提高了过氧化物酶的活性。

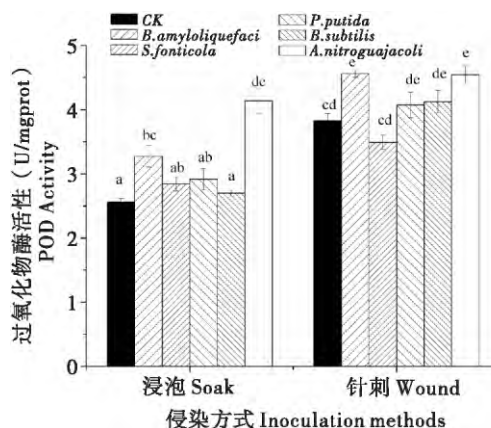


图 3 5 种细菌不同侵染方式下韭蛆的 POD 酶活性

Fig. 3 POD activity of *Bradysia odoriphaga* after inoculation with five species of bacteria

通过图 4 可知,针刺侵染处理后韭蛆的 CAT 活性也整体高于浸泡侵染后的活性。在不接种细菌的前提下,针刺处理后韭蛆 CAT 的活性明显高于未经针刺的韭蛆。在 5 种细菌浸泡处理后,韭蛆的 CAT 活性并未产生显著的变化,但经过机械损伤后,恶臭假单胞杆菌的侵染导致韭蛆 CAT 活性显著下降,而节杆菌则明显增大了其活性。因此,机械损伤本身提高了过氧化氢酶的活性,而对于恶臭假单胞杆菌和节杆菌来说,机械损伤则加剧了其 CAT 活性的影响。

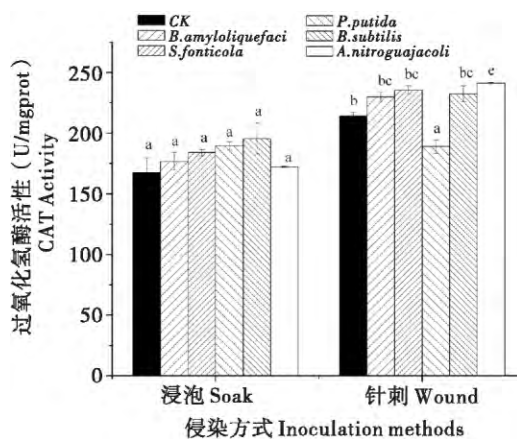


图 4 5 种细菌不同侵染方式下韭蛆的 CAT 酶活性

Fig. 4 CAT activity of *Bradysia odoriphaga* after inoculation with five species of bacteria

3 结论与讨论

本研究利用韭蛆生境中常见的 5 种细菌, 并采用浸泡和针刺两种方式侵染韭蛆, 研究了韭蛆存活率、蛋白含量和 3 种保护酶活性的变化规律。在不接种细菌的前提下, 与未针刺的韭蛆相比, 针刺处理后韭蛆的存活率降低, 而蛋白含量、POD 和 CAT 的活性明显上升, 说明机械损伤本身对韭蛆会造成一定的影响。

同时机械损伤对于细菌的侵染也具有重要的作用。与浸泡接种细菌相比, 在针刺接种细菌后韭蛆的各项指标整体的变化规律均发生了改变, 存活率和 SOD 酶活性下降, 而蛋白含量、POD 活性和 CAT 活性上升。居泉沙雷氏菌在机械损伤的前提下, 使韭蛆的存活率显著降低, 这与 Bucher (1959) 的结论是一致的。沙雷氏菌不能在昆虫表皮生长, 经口摄入的沙雷氏菌不会对昆虫造成影响, 通过表皮创口进入血淋巴内才会表现出致病性, 韭蛆的抗氧化酶活性与对照相比并没有升高, 因此可以确定居泉沙雷氏菌对于韭蛆是具有致病性的, 可作为防治韭蛆的新的致病菌。Tasic 等 (2013) 也分析了水中居泉沙雷氏菌具有致病性的特征。但与居泉沙雷氏菌同属于沙雷氏菌属的粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* (Thayer, 1978) 已经证明是一种纤维素酶产生菌, 作为肠道细菌参与了纤维素的消化过程, 因此居泉沙雷氏菌除了作为致病菌以外, 是否也参与韭蛆体内的纤维素分解, 则需要通过测定其纤维素酶的含量来进一步地验证。恶臭假单胞杆菌是一种致病菌, 且具有谷氨酰胺转氨酶活性 (郝学忠, 2005), 本研究中, 针刺浸泡恶臭假单胞杆菌后, 蛋白含量、SOD 和 CAT 活性均显著下降, 但存活率均没有发生变化, 说明韭蛆自身对于恶臭假单胞杆菌具有一定的抵抗机制, 细菌通过机械损伤之后对韭蛆的影响更为明显。

研究证明枯草芽孢杆菌菌体自身可以合成 α -淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶等酶类, 在消化道中与昆虫体内的消化酶类一同发挥作用, 并且可以产生抑菌物质, 对小麦赤霉病 (Rytter *et al.*, 1989)、玉米小斑病 (彭兵等, 2011)、青枯病 (Algama *et al.*, 2006) 炭疽病 (Ryu *et al.*, 2014) 等多种植物病害具有拮抗作用。在本研究中, 韭蛆经过针刺浸泡枯草芽孢杆菌之后, SOD 酶

活性显著降低, 而蛋白含量则明显升高, 说明韭蛆自身存在与枯草芽孢杆菌相互作用的机制, 同时表皮的机械损伤更有利于菌体在韭蛆体内发挥作用。另外, 韭蛆在只浸泡解淀粉芽孢杆菌后, SOD 活性显著降低, 但针刺处理之后与对照相比差异并不显著, 两种方式处理下的 CAT 活性均有所提高, 因此解淀粉芽孢杆菌对韭蛆的影响与机械损伤无关, 可经口进入韭蛆体内。而这种菌除了具有产生纤维素酶的作用之外, 还具有抑制其他细菌和真菌的作用, 孙力军 (2006) 从中药植物黄芩中分离的解淀粉芽孢杆菌 ES-2 菌株所产生的抗菌物质抑菌谱较广, 不仅能明显抑制革兰氏阳性菌, 而且对革兰氏阴性菌及部分霉菌和酵母也有显著的抑菌作用。解淀粉芽孢杆菌 BZ6-1 菌株对花生青枯病 *Ralstonia solanacearum* (BW) 也具有明显的抑制作用 (Wang and Liang, 2014)。枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌均属于芽孢杆菌属, 其重要的抑菌作用则是研究韭蛆与微生物之间关系的关键环节。

通过研究与韭蛆密切相关的 5 种细菌对韭蛆的影响, 可以明确的是, 除了居泉沙雷氏菌, 韭蛆对其他 4 种菌均能产生一定的防御作用, 对韭蛆机械损伤后, 细菌的侵染效果以及韭蛆的防御作用则表现地更显著。但本研究只限于单种细菌对韭蛆的影响, 因此, 多种微生物之间的关系、多种微生物与韭蛆之间的关系, 以及韭蛆代谢活动的变化规律均需要进一步的研究, 为探索微生物与韭蛆之间的关系并利用微生物防治韭蛆提供重要的基础和方向。

参考文献 (References)

- Algama S, Xie GL, Li B, *et al.* Biological control of bacterial wilt of tomato by *Bacillus* spp. Under greenhouse environment [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2006, 36 (1): 80-85. [Algama S, 谢关林, 李斌, 等. 利用枯草芽孢杆菌在温室环境中控制番茄青枯病 [J]. 植物病理学报, 2006, 36 (1): 80-85]
- Bucher GE. Bacteria of grasshoppers of western Canada, III. Frequency of occurrence, pathogenicity [J]. *Journal of Insect Pathology*, 1959, 1: 391-405.
- Campa-córdova AI, Hernández-saavedra NY, Philippis RD, *et al.* Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to β -glucan and sulphated polysaccharide [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2002, 12: 353-366.
- Chen JH, Mu LQ, Jiang GX, *et al.* Occurrence regularity and integrated control of *Bradysia odoriphaga* [J]. *Journal of Henan Agricultural*

- Sciences, 2004, 9 (4): 74. [陈建华, 慕留奇, 姜国霞, 等. 大田韭菜地蛆发生规律与综合防治 [J]. 河南农业科学, 2004, 9 (4): 74]
- Fuente MDL, Victor VM. Anti-oxidants as modulators of immune function [J]. *Immunology and Cell Biology*, 2000, 78: 49–54.
- Gao HH, Zhao YF, Wang HY, et al. Microbial diversity of *Bradysia odoriphaga* and rhizosphere microbe of chives [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2015, 53 (4): 1006–1013. [高欢欢, 翟一凡, 王海艳, 等. 韭菜迟眼蕈蚊体内及韭菜根际微生物的多样性分析 [J]. 应用昆虫学报, 2015, 52 (4): 1006–1013]
- Hao XZ, Xue F, Zhu YM, et al. Cloning and construction of the transglutaminase gene and its prokaryotic expression vector from *Pseudomonas putida* H76 [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 27 (1): 21–24. [郝学忠, 薛飞, 朱远茂, 等. 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 [J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27 (1): 21–24]
- Hojin Ryu, Hoon Park, Dong-Sang Suh, et al. Biological control of *Colletotrichum panacicola* on *Panax ginseng* by *Bacillus subtilis* HK-CSM-1 [J]. *Journal of Ginseng Research*, 2014, 38: 215–219.
- Imahori Y, Suzuki Y, Uemura K, et al. Physiological and quality responses of Chinese chive leaves to low oxygen atmospheres [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 31: 295–303.
- Mei ZX, Wu QJ, Zhang YJ, et al. The biology, ecology and management of *Bradysia odoriphaga* [J]. *Entomological Knowledge*, 2003, 40 (5): 396–398. [梅增霞, 吴青君, 张友军, 等. 韭菜迟眼蕈蚊的生物学、生态学及其防治 [J]. 昆虫知识, 2003, 40 (5): 396–398]
- Misawa T, Kuninaga S. First report of white leaf rot on Chinese chives caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-1 [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2013, 79: 280–283.
- Peng B, Zhang SB, Jia Y, et al. Purification and antifungal mechanism of a kind of antifungal protein from strain A of *Bacillus subtilis* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44 (1): 67–74. [彭兵, 张树斌, 贾宇, 等. 枯草芽孢杆菌菌株 A 抗菌蛋白的分离纯化及抗真菌机理 [J]. 中国农业科学, 2011, 44 (1): 67–74]
- Rytter JL, Lukezic FL, Craig R, et al. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis* [J]. *Disease Control and Pest Management*, 1989, 79: 367–370.
- Tasic S, Obradovic D, Tasic I. Characterization of *Serratia fonticola*, an opportunistic pathogen isolated from drinking water [J]. *Archives of Biological Science*, 2013, 65 (3): 899–904.
- Thayer DW. Carboxymethyl cellulase produced by facultative bacteria from the hindgut of the termite *Reticulitermes hesperus* [J]. *Microbiology*, 1978, 106: 13–18.
- Wang XB, Liang GB. Control efficacy of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain BZ6-1 against peanut bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum* [J]. *BioMed Research International*, 2014, 465435.
- Yang JK, Zhang XM. Identification of two new species of *Byadysia* (Diptera: Sciaridae) [J]. *Journal of Beijing Agricultural University*, 1985, 11 (2): 153–156. [杨集昆, 张学敏. 韭菜蛆的鉴定迟眼蕈蚊属二新种 (双翅目: 眼蕈蚊科) [J]. 北京农业大学学报, 1985, 11 (2): 153–156]
- Zhang HM, Yin SH, Zhang M, et al. Research progress on control techniques of *Bradysia odoriphaga* [J]. *Journal of Henan Agricultural Science*, 2013, 42 (3): 6–9. [张华敏, 尹守恒, 张明, 等. 韭菜迟眼蕈蚊防治技术研究进展 [J]. 河南农业科学, 2013, 42 (3): 6–9]