

具菌异小杆线虫 (86H-1 品系) 的研究*

(小杆目: 异小杆线虫科)

王国汉 李小峰

(华南农业大学)

摘要 1986年5月我们从广东省阳江县海陵岛农作物土壤中分离到一种昆虫病原线虫, 编号(86H-1), 经鉴定为具菌异小杆线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* (86H-1 品系), 是我国新记录。该品系与原描述种主要不同为雌虫交合伞乳突数 7—9 对, 多为 8 对, 排列顺序为 1—2—3—2, 而原描述种正常下为 9 对, 罕见 8 对。(86H-1) 侵染期线虫携带的共生菌 *Xenorhabdus luminescens* 初生型和次生型均无发光现象。线虫侵染昆虫后, 寄主尸体变红褐色, 不发光。

1976年美国 Poinar 建立异小杆线虫科 *Heterorhabditidae* 以来, 国外对该科线虫及其共生细菌 *Xenorhabdus luminescens* 都做了许多研究 (Poinar 1976, Khan et al 1976, Thomas et al 1979, Akhurst 1983, 1986)。国内, 我们继 1982 年在广东省阳江县海陵岛的农作物土壤中分离到此类与有荧光的细菌共生的异小杆线虫 *Heterorhabditis* sp. 8204 (王国汉等 1986) 之后, 又于 1986 年 5 月在该岛采到一种携带无荧光的共生细菌的异小杆线虫 (86H-1)。我们对其形态、分类地位, 共生细菌等方面进行了研究, 结果报道如下:

材料与方 法

(一) (86H-1) 线虫的形态观察

(86H-1) 线虫, 采自广东省阳江县海陵岛的农作物土壤, 对照研究用的具菌异小杆线虫 *H. bacteriophora* 及大蜡螟 *Galleria mellonella* 幼虫均为广东省昆虫研究所赠送。

在垫有两层滤纸的大培养皿中, 放进健康的大蜡螟幼虫 (16 头/皿), 每皿滴进 400 条 (86H-1) 侵染期线虫, 放置 26°C、30°C 下培养, 重复三次, 并用线虫 *Heterorhabditis bacteriophora* 处理作对照。每天解剖被线虫侵染的大

蜡螟幼虫, 取出线虫, 用 0.7% 的生理盐水洗净, 在显微镜下观察其虫态, 确定发育阶段。进一步对其形态观察, 用热的林格氏液将线虫杀死, TAF 液固定, 然后转至酒精甘油中逐步脱水, 透明后封片。

(二) (86H-1) 线虫共生细菌的分离与特性测定

从 (86H-1) 线虫体内分离共生菌。作对照用的菌种 *Xenorhabdus luminescens* C₁ 品系与 Hb-1 品系分别由中国农科院生防室及广东省昆虫研究所赠送。

将 (86H-1) 侵染期线虫经 0.1% 的硫柳汞进行表面消毒后, 用无菌研磨器将线虫磨碎, 将研磨液涂布于 T-7+TTC 培养基、26°C 培养。以后不断分离, 纯化, 直至出现一致的菌落。对分离得到的细菌进行形态观察。并在 NA 培养基、MCKA 培养基、EMB 培养基和 T-7+TTC 培养基上进行培养与观察其特性。

对该种共生细菌生化特性, 如过氧化氢酶, 苯丙氨酸脱氨酶, 氧化酶, 硝酸盐还原, M. R.,

* 共生菌研究得到戴冠群教授指导, 唐依霖同志协助完成, 特此致谢。

本工作是科学基金(84) 生准字第 397 号资助项目的一部分。

糖还原,明胶水解,七叶苷水解,石蕊牛奶酪化,产酸等作测定,方法均按《一般细菌常用鉴定方法》及《昆虫病原物鉴定诊断手册》进行。菌落及被该线虫侵染致死的寄主在黑房无光条件下,多次重复观察是否发荧光、每次30分钟以上。

结 果

(一) 形态特征 成虫体表光滑,前部锥形,顶端钝圆,具六个唇瓣,六个乳突(图1)。咽的前端圆筒形,基食道球梨形,球瓣膜退化成痕迹状,神经环围绕在食道峡部。雌虫大小有变化,卵巢一对,转折,弯曲,前后对称排列,阴门位于身体中央偏前的部位。臀区突起,尾弯、端尖。雌雄同体的母虫体形大、阴门微突、前期卵生、后期卵胎生、排泄孔多位于神经环与基食道球底部之间(图3)。雌雄异体的母虫体形较雌

雄同体的母虫小、卵胎生。排泄孔多位于基食道球底部以后。

雄虫(图4)身体较透明,体形较母虫小,有一转折的精巢。交合刺成对,分离,稍弯曲。具引带、交合伞打开,通常有7—9对乳突支撑,前端第一对较小,第二、三对接近交合刺基部的水平位置,其余位于肛门之后。乳突的排列顺序多为1—2—3—2,少数虫体的排列为1—2—3—3和1—2—3—1(图5、6、7)。

侵染期三龄幼虫身体带鞘,体表具纵纹,唇区具骨化的背齿。尾尖(图2、8)。

四龄幼虫体形较三龄宽,生殖原基开始发育。一龄幼虫在卵中发育。从卵中孵出成为二龄,体形较侵染期线虫短。

(86H-1)线虫的形态及生活史与具菌异小杆线虫 *H. bacteriophora* 的形态及生活史基本一致。形态上,虫体前端具六个唇瓣,六个唇

表1 (86H-1)线虫成虫的测量值 (n=30 单位:微米)

特 征	第一代母虫		第二代母虫		雄 虫	
	平均值	范 围	平均值	范 围	平均值	范 围
体长	4540	3750—5250	1689	1200—2150	977	850—1070
体宽	197	164—237	120	85—168	68	50—88
咽长	209	192—256	148	130—160	119	105—137
前端至排泄孔长	200	156—233	155	142—195	147	128—175
前端至神经环长	168	154—202	109	100—125	88	75—103
尾长	130	115—149	100	93—118	39	33—45
肛门位置体宽	61	51—71	36	28—45	36	30—43
口宽	8.23	7.5—10	8.1	7.5—10	2.74	2.5—3.75
头端距阴门与体长的百分比	42%	39—46%	48%	45—51%		
交合刺长					47	45—53
引带长					20	15—25

表2 侵染期线虫测量值比较(单位:微米)

特 征	<i>H. bacteriophora</i> * n = 15		86H-1	
	平均值	范 围	平均值	范 围
体长	570	520—600	578	540—600 (n = 100)
体宽	24	21—31	25	23—29 (n = 100)
前端至神经环长	83	81—88	84	80—90 (n = 30)
前端至排泄孔长	104	94—109	106	100—110 (n = 30)
咽长	125	119—130	127	125—131 (n = 30)
尾长	91	83—99	87	83—100 (n = 100)

* Poinar (1976) 数据。

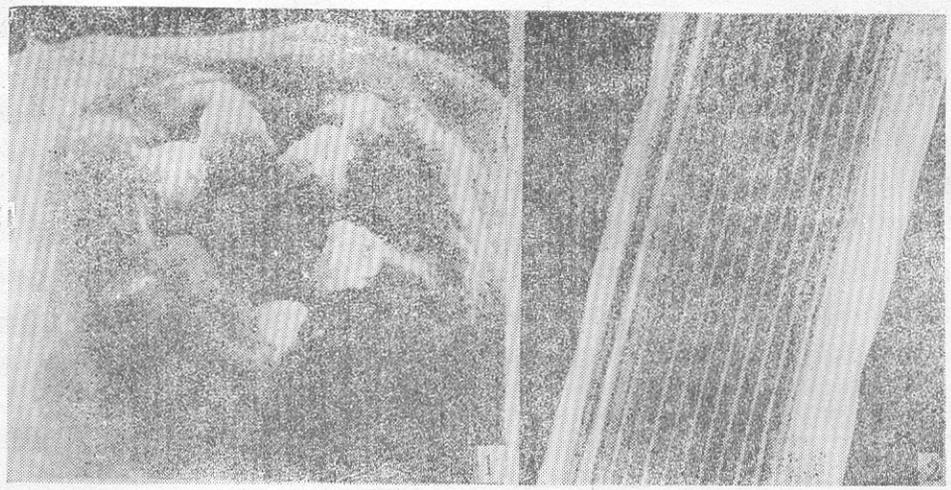


图 1—2 (86H-1) 线虫扫描电镜观察

1. 第一代母虫前端示六个唇瓣 (7000 倍) 2. 侵染期线虫体表纵纹 (3000 倍)

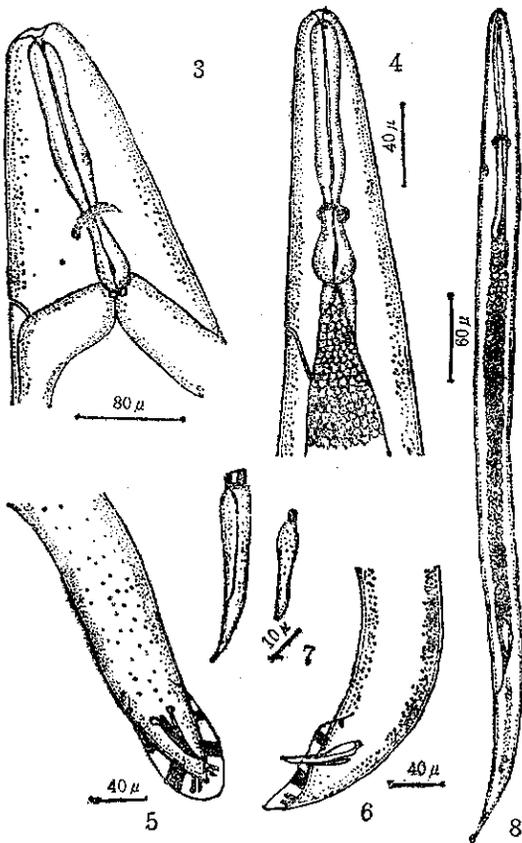


图 3—8 具菌异小杆线虫 (86H-1)

3. 第一代母虫前部 4. 雄虫前部 5. 雌虫交合伞腹面观
6. 雌虫交合伞侧面观 7. 交合刺及引带 8. 侵染期线虫

育成雌雄同体的巨母虫为第一世代。第二世代为雌雄异体的两性世代。这些都是异小杆线虫属 *Heterorhabditis* 的基本特征。

异小杆线虫属中已知种有 *H. hambletoni* (Pereira) 1937; *H. hoptha* (Turco) 1970; *H. bacteriophora* Poinar 1976; *H. heliothidis* (Khan, brooks and Hirshmann,) 1976; *H. megidis* Poinar et al. (1987) 五种。Poinar (1978) 认为, 根据侵染期线虫的长度及排泄孔位置可以将具菌异小杆线虫 *H. bacteriophora* 与其他已描述种区别。Poinar 1987 年发表的新种 *H. megidis* 亦是以侵染期线虫的长度作为定种的主要特征之一。从(表 2) 86H-1 线虫与 *H. bacteriophora* 的侵染期线虫比较, 体长均在 600 微米以下, 尾长都不超过 100 微米, 排泄孔, 神经环, 咽长的测量值基本一致。再比较两种虫的其他虫态的各项测量值 (表 1), 除雌雄同体巨母虫的排泄孔位置稍高 (即多数位于神经环与基食道球底部之间, 少数位于基食道球以下的位置) 略有差异外, 其余测量值均与原描述种 *H. bacteriophora* Poinar 1976 较为接近, 故鉴定 (86H-1) 线虫为 *H. bacteriophora* 种内的一个品系。

(二) (86H-1) 线虫共生细菌的分离及特性测定

乳突。雄虫具交合伞, 通常有 7—9 对乳突支撑。生活史上, 侵染期线虫进入昆虫寄主后, 发

从 (86H-1) 侵染期线虫及被该线虫侵染致

死的大蜡螟幼虫体内均分离到同一种杆菌,该菌株的形态,培养特性及生化特性等见表3。

将(86H-1)线虫的共生细菌注射大蜡螟幼虫,幼虫死后,仍能从其体内分离出该种细菌。

(86H-1)线虫的共生细菌与 *X. luminescens* 的 C₁ 品系及 Hb-1 品系的区别见表4。

从表3、4说明,(86H-1)线虫共生菌的特性与 Poinar et al (1977) 描述原种 *X. luminescens* 比较,除荧光反应、水解七叶苷的反应

不同,以及 NA 培养基上, MCKA 培养基上菌落特性稍有差异外,其余特性基本一致,故认为(86H-1)线虫的共生菌与 *X. luminescens* 为同种。

讨 论

自 Poinar (1976) 建立异小杆线虫科、异小杆线虫属及发表新种具菌异小杆线虫 *H. bacriophora* 以来,都提到该类群线虫与荧光现象

表3 (86H-1) 线虫共生细菌的特性

项 目	特 性	项 目	特 性
革兰氏染色	—	苯丙氨酸脱氨酶	—
长芽孢	—	精氨酸双水解酶	—
菌体形态	周生鞭毛,棒状,长1—3.7微米,宽0.5—0.8微米	糖还原	—
运动	+	硝酸盐还原	—
培养特性:		M. R.	—
NA (24小时)	菌落圆形、直径约为1毫米,黄白色,半透明。	V. P.	—
MCKA (24小时)	菌落橙黄色	淀粉水解	—
EMB (3天)	菌落黑色或具一大黑色中心	明胶水解	+
T-7 + TTC (3天)	菌落绿色	酪蛋白水解	+
牛肉浸膏上生长	+	七叶苷水解	+, —
简单的蛋白胨上生长	+	石蕊牛奶	陈化,产酸
马铃薯斜面生长	+, 黄色	三糖铁琼脂(产 H ₂ S)	—
在老的培养基上	产生鼠体内含物	吲哚	+
生理生化特性:		KCN 耐性	+
兼性厌氧	+	糖发酵:	
化能有机营养型	+	葡萄糖	+
荧光反应	—	木糖	—
(在无光黑房中观察30分钟)		山梨糖	—
氧化酶与细胞色素		乳糖	—
氧化酶	—	阿拉伯糖	—
酪氨酸酶	—	麦芽糖	+, —
脲酶	+	蔗糖	—
过氧化氢酶	+	海藻糖	—
脱氧核糖核酸酶	—	细菌的自然栖地	线虫肠道
卵磷脂酶	—	感染寄主的血淋巴	+

表4 (86H-1) 线虫的共生菌与 *X. luminescens* 的特性比较

特性 项目	菌株 (86H-1) 线虫的共生细菌	<i>Xenorhabdus luminescens</i>	
		C ₁	Hb-1
NA 培养基上菌落	黄白色,半透明	黄色,不透明	灰黄色、不透明
MCKA 培养基菌落	橙黄色	红色	红色
荧光反应	无	有	有
七叶苷水解	—, +	+	+

的共生菌 *Xenorhabdus luminescens* 密切相关,特别是该菌的初生型,荧光明显,线虫寄生昆虫后、寄主尸体早期都产生荧光。而从 Akhurst (1986) 首次发现 *X. luminescens* 的无荧光品系以后,我们继 Akhurst 于 1986 年 5 月又在国内采到携带无荧光共生菌的具菌异小杆线虫,故本研究再一次证明共生菌的荧光现象不宜作为一项鉴定 *X. luminescens* 的主要特征。

原描述种 *H. bacteriophora* Poinar 1976 的共生菌具有荧光,而 (86H-1) 线虫经鉴定与 *H. bacteriophora* 为同一物种,但所携带的共生菌初生型与次生型均不产生荧光,这是共生菌的特性差异。

从 (86H-1) 线虫分离出来的共生菌 *X. luminescens* (86H-1) 究竟和 Akhurst (1986) 发现的 non-luminescent strain of *X. luminescens* 是否完全一样,还有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 王国汉等 1986 一种昆虫病原异小杆线虫的初步研究 昆虫天敌 8(4)244-245
 [2] Akhurst R. J 1983 Taxonomic study of *Xenorhabdus*,

a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33 :38—45.
 [3] ——— et al. 1986 A Non-luminescent Strain of *Xenorhabdus luminescens* (Enterobacteriaceae). *Journal of General Microbiology*, 132: 1917—1922.
 [4] Kban, A. Brooks, W. M. and H. Hirschmann, 1976 *Chromonema heliothidis* n. gen., n. sp. (Steinernematidae, Nematoda), a Parasite of *Heliothis zea* (Noctuidae, Lepidoptera), and Other Insects. *Journal of Nematology*, 8: 159—168.
 [5] Poinar Jr. G. O 1976 Description and Biology of a new Insect Parasitic Rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen., n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditidae n. fam.) *Nematologica*, 21: 463—470.
 [6] ——— 1979 Nematodes for Biological Control of Insects. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida 33431.
 [7] ——— 1987 *Heterorhabditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae: Rhabditida), Parasitic in the Japanese Beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera), in Ohio. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 54(1): 53—59.
 [8] Thomas G. M. and Jr. G. O. Poinar 1979 *Xenorhabdus* gen. nov., a Genus of Entomopathogenic, Nematophilic Bacteria of the Family Enterobacteriaceae. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 29: 352—360.
 [9] ——— and Jr. G. O. Poinar 1983 Amended Description of the Genus *Xenorhabdus* Thomas and Poinar. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33: 878—879.

黑龙江省佳木斯地区华枝睾吸虫 第二中间宿主的调查*

温桂芝 王国志 孙颜辉

杨 富 何振芳 关新华

(佳木斯医学院寄生虫学教研室)

(绥滨农场防疫科)

摘要 作者对华枝睾吸虫病爆发流行区的鱼体囊蚴进行了现场调查。共检查 15 种 385 尾淡水鱼,用鱼肉压片法发现 9 种 255 尾鱼感染了华枝睾吸虫囊蚴,阳性鱼种的检出率为 60%(9/15),阳性鱼的感染率为 66.2%(255/385),其中麦穗鱼和青鲇的感染率为 100%,感染度分别为 233.57 个/克和 106.8 个/克。对严重感染的麦穗鱼、黑龙江鲌、鲈塘鳢、青鲇等 4 种鱼进行了囊蚴数的测定。对感染度高的麦穗鱼、黑龙江鲌、青鲇等 3 种鱼做了囊蚴分布的调查,发现鱼皮内和鱼肉内囊蚴最多,各部位囊蚴的数量是否与检查季节有关,须进一步探讨。

* 本院公共卫生教研室魏忠副教授协助统计学处理,本院医疗系 85 级学生:安子森、邢国峰、韦利民、马丽芳等 14 名同学参加调查工作,特此一并致谢。