

大分舌蜂巢穴病原微生物的鉴定^{*}

李 颜, 李晓兵, 黄敦元, 党晓群

(重庆师范大学 重庆市媒介昆虫重点实验室, 重庆 401331)

摘要:【目的】明确大分舌蜂(*Colletes gigas*)巢穴病原微生物的种属及系统发育学特征。【方法】从江西省新余市采集大分舌蜂巢穴样品,采用稀释涂布平板法进行病原微生物分离,通过形态特征观察,结合核糖体内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)和 16S rDNA 基因序列分析相结合的方法对病原微生物进行鉴定。【结果】从虫室样品中分离出 4 株细菌(CS1, CS2, CS3 和 CS4),从土壤样品中分离 1 株真菌(TR1)。TR1 在电子显微镜下可见菌丝间有球状孢子囊,孢子呈现圆形,TR1 的 ITS 序列与卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)的相似度为 100%。CS1 和 CS3 均能产生粉红色次生代谢物,CS1 和 CS3 聚为一支,它们的 16S rDNA 序列与粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的相似度达到 99%;CS2 的 16S rDNA 序列与少见无色杆菌(*Achromobacter spanius*)的相似度为 99%;CS4 的 16S rDNA 序列与紫金牛叶杆菌(*Phyllobacterium myrsinacearum*)的相似度为 95%。【结论】从大分舌蜂巢穴虫室样品分离出的病原细菌分别属于沙雷氏菌属(*Serratia*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)和叶杆菌属(*Phyllobacterium*),从土壤样品分离出的病原真菌属于毛霉属(*Mucor*)。

关键词:大分舌蜂;巢穴;粘质沙雷氏菌;少见无色杆菌;紫金牛叶杆菌;卷枝毛霉

中图分类号:Q93-3

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2021)03-0032-08

大分舌蜂(*Colletes gigas*)作为中国主要的油茶传粉蜜蜂之一,主要分布在中国湖南、江西、浙江等南方油茶主要生产区^[1],在分类学上属于膜翅目(Hymenoptera)分舌蜂科(Colletidae)分舌蜂属(*Colletes*)。大分舌蜂体型为中型;雄蜂长 14~16 mm,负责交尾,基本不具有授粉作用,有明显的雄性先熟现象;雌蜂长 18~20 mm^[2],具有特定采粉器官,承担筑巢、产卵等任务。大分舌蜂舌端部较宽、分叉,这种结构与它的巢穴构建密切相关^[3]。大分舌蜂的筑巢习性为地下筑巢类型^[4]。研究表明,大分舌蜂的虫室一般在深度为 60~120 cm 的土壤中,土壤类型主要以红壤为主,伴生植物主要是油茶(*Camellia oleifera*)、马尾松(*Pinus massoniana*)等。大分舌蜂巢穴由 1 个主道和相连虫室组成,虫室只分布在主道水平部分的两侧斜下方;虫室是由玻璃纸状的外膜包被,内膜共 3 层封闭虫室,虫道和未封闭的部分被土壤填充;大分舌蜂还有重新使用旧巢穴的习性^[5-6]。已有学者对大分舌蜂线粒体 DNA 进行了测序^[7],还有学者制作了高质量的大分舌蜂基因组草图,从生物信息学的角度为大分舌蜂的分类、系统发育、生物学及行为学提供更多的信息^[8]。目前,对大分舌蜂巢穴的基础研究仍然较为薄弱,已有研究主要集中在巢穴结构、室内容物等方面,还未有对巢穴中病原微生物进行鉴定的研究。而在过去的数十年中,由于环境污染、栖息地丧失和病原体的综合作用,自然界中蜜蜂数量已有所减少,依赖它们授粉的植物数量也相应地减少^[9-10]。因此,本研究对大分舌蜂巢穴进行了病原微生物鉴定,研究结果有望为大分舌蜂栖息地的保护提供思路,也为改善该蜂种的巢穴环境奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 大分舌蜂巢穴的采集

大分舌蜂巢穴样品于 2018 年 10 月采自江西省新余市(东经 114°54'36"、北纬 27°48'36")。将采集到的大分

^{*} 收稿日期:2020-12-16 修回日期:2021-01-08 网络出版时间:2021-05-20 09:24

资助项目:国家自然科学基金面上项目(No. 31970484);现代农业产业技术体系建设专项资金资助(No. CARS-44-KXJ21);重庆市自然科学基金面上项目(No. cstc2019jcyj-msxmX0564);重庆市留学人员回国创业创新项目(No. cx2019137)

第一作者简介:李颜,女,研究方向为昆虫病原微生物, E-mail: 1354240710@qq.com;通信作者:党晓群,女,副教授,博士, E-mail: dangxiaqun@126.com

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20210519.1608.022.html>

舌蜂腐败巢穴样品置于冻存管中,立即带回实验室分离备用。

1.2 微生物的分离和纯化

以采集的大分舌蜂巢穴中的土壤和虫室作为分离材料。于无菌条件下,在三角瓶中将 10 g 待测土壤样品和虫室样品与 90 mL 无菌水混合,振荡 30 min 后,倍比稀释成不同浓度悬液,吸取 100 μ L 悬液接种到 PDA(含氯霉素)和 LB 培养基上,分别放入 28 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱,观察菌落生长状况。经 3 次划线培养,分离获得单菌落。

1.3 微生物菌落的初步鉴别

细菌培养 1 d 后,在 Keyence-VEX-5000 型超景深显微系统和 OLYMPUS-IX71 型电子显微镜下观察细菌菌落质地、透明度、光滑度、颜色等;真菌培养 3~5 d 后,在上述型号电子显微镜下观察真菌的菌丝、孢子形态等。

1.4 微生物的分子生物学鉴定

真菌基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法,以真菌通用引物核糖体内转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)引物 ITS1/ITS4 (ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'/ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')对供试菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增^[11]。反应体系含有 24 μ L Premix Ex TaqTM酶、4 μ L 基因组 DNA 和 2 μ L 上下游引物,并加双蒸水至 50 μ L。反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,35 个循环的 95 $^{\circ}$ C 变性 40 s、56 $^{\circ}$ C 退火 40 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,于 4 $^{\circ}$ C 保存扩增产物。使用 AxyPrePTM DNA Gel Extraction Kit 回收目的片段扩增产物,与 pMD19-T 载体相连接、转化至 DH5 α 感受态细胞,通过 PCR 鉴定阳性菌株,并送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

细菌基因组 DNA 的提取采用 DNA 提取试剂盒,以细菌通用引物 16S rDNA 引物 7F/1540R (7F: 5'-CAGAGTTTGTATCCTGGCT-3'/1540R: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')或 27F/1492R (27F: 5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'/1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')对供试菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增。反应体系含有 2 μ L DreamTaq-TM DNA Polymerase 酶、0.5 μ L 模板、0.5 μ L 上下游引物、2.5 μ L 10 $\times$ Buffer 和 1 μ L dNTPs,并加双蒸水至 25 μ L。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min,30 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s、55 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,于 4 $^{\circ}$ C 保存扩增产物。扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行纯化回收及测序。

上述测序结果均提交 NCBI 的核酸数据库中进行 Blast 比对,选取 E 值大于或等于 1×10^{-5} 且一致性大于或等于 95% 的基因序列作为候选序列,使用 MEGA 7.0 软件构建系统进化树以明确病原微生物的分类学地位。细菌部分的分析采用邻接法^[12],Bootstrap 值设为 5 000;真菌部分的分析采用最大似然法^[13],Bootstrap 值设为 10 000;其余参数均不变。

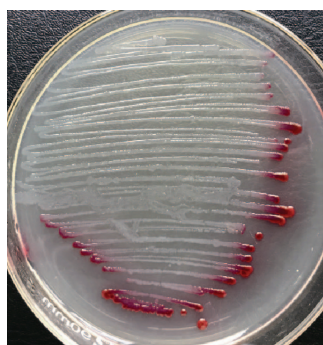
2 结果与分析

2.1 大分舌蜂巢穴中微生物的形态观察

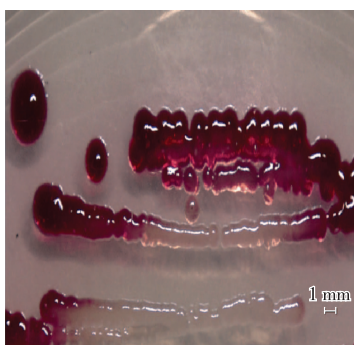
经单菌落纯化培养,从虫室样品分离出 4 株细菌,分别称为 CS1(图 1),CS2(图 2),CS3(图 3)和 CS4(图 4);从土壤样品分离出 1 株真菌,称为 TR1(图 5)。CS1 和 CS3 在 LB 培养基上形成圆形、淡黄色、不透明、表面光滑带有点臭味的菌落,边缘整齐,在低温环境下均能产生红色和淡粉色的次生代谢产物;CS2 在 LB 培养基上形成黄色、半透明并连接紧密的菌落;CS4 在 LB 培养基上形成淡黄色、半透明、表面湿润的菌落,培养一段时间后会大量粘液,菌落颜色偏浅灰色。TR1 在 PDA 培养基上产生了丰富的菌丝,菌落呈灰褐色,在电子显微镜下,可见菌丝间有球状孢子囊,孢子呈现圆形。

2.2 大分舌蜂巢穴中微生物的分子生物学鉴定

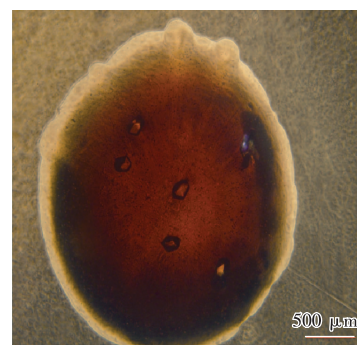
为了鉴定病原微生物的种属,以 16S rDNA 作为鉴定细菌种类的依据,CS1,CS2,CS3 和 CS4 细菌基因组 DNA 作为模板,经 PCR 扩增得到 4 条大小分别为 1 473,1 460,1 467 和 1 411 bp 的片段(图 6)。以 ITS 引物作为鉴定真菌种类的依据,TR1 真菌基因组 DNA 作为模板,经 PCR 扩增得到 1 条大小为 683 bp 的片段,将它连接至 pMD19-T。重组质粒 PCR 电泳结果显示,获得 ITS 特异性扩增条带和 2 000 bp 左右的 pMD19-T 质粒条带(图 7),说明重组质粒构建成功。由图 8 可知:CS1 和 CS3 与粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)聚为一支,相似度为 99%;CS2 与少见无色杆菌(*Achromobacter spanius*)聚为一支,相似度为 99%;CS4 与紫金牛叶杆菌(*Phyllobacterium myrsinacearum*)聚为一支,相似度为 95%。同时,TR1 与卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*)聚为一支,相似度为 100%(图 9)。



a 在 LB 培养基上的菌落形态



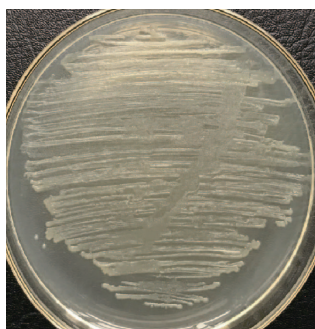
b 在超景深显微系统下的菌落观察结果



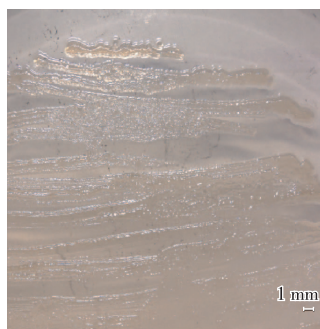
c 在电子显微镜 500 μm 下的单菌落观察结果

图 1 虫室样品细菌 CS1 分离株菌落形态

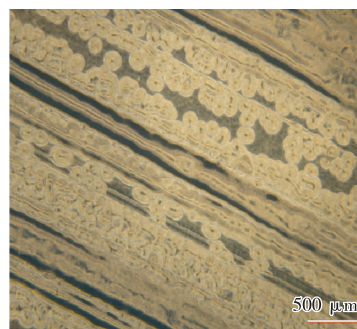
Fig. 1 Colony morphology of CS1 isolated from the brood cells samples



a 在 LB 培养基上的菌落形态



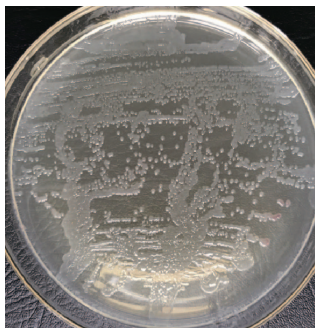
b 在超景深显微系统下的菌落观察结果



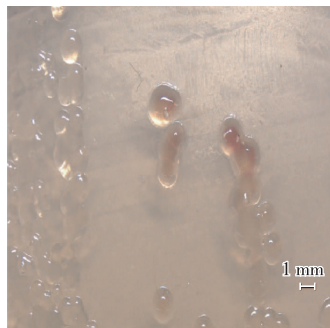
c 在电子显微镜 500 μm 下的单菌落观察结果

图 2 虫室样品细菌 CS2 分离株菌落形态

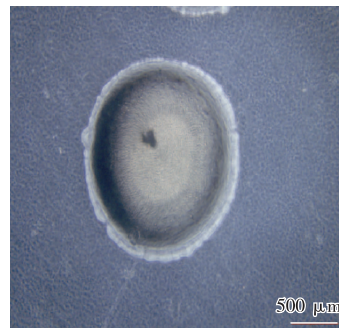
Fig. 2 Colony morphology of CS2 isolated from the brood cells samples



a 在 LB 培养基上的菌落形态



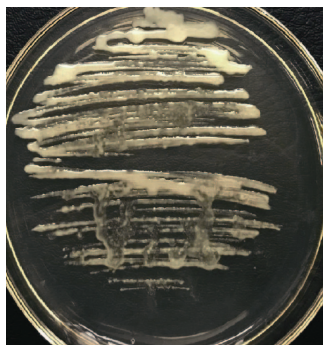
b 在超景深显微系统下的菌落观察结果



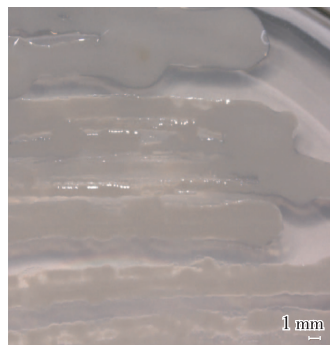
c 在电子显微镜 500 μm 下的单菌落观察结果

图 3 虫室样品细菌 CS3 分离株菌落形态

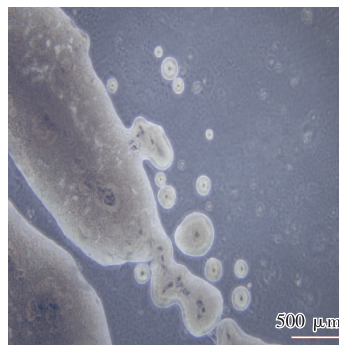
Fig. 3 Colony morphology of CS3 isolated from the brood cells samples



a 在 LB 培养基上的菌落形态



b 在超景深显微系统下的菌落观察结果



c 在电子显微镜 500 μm 下的单菌落观察结果

图 4 虫室样品细菌 CS4 分离株菌落形态

Fig. 4 Colony morphology of CS4 isolated from the brood cells samples

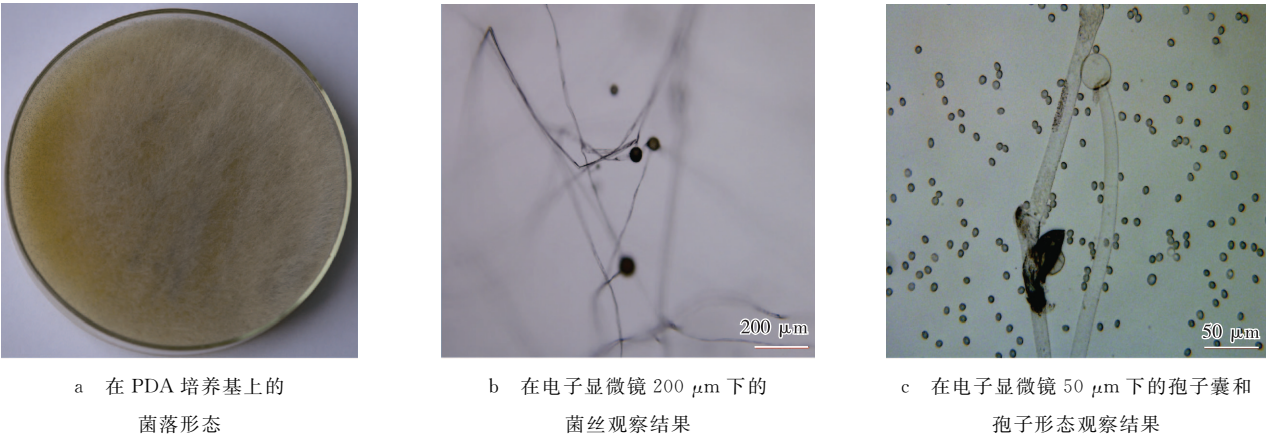
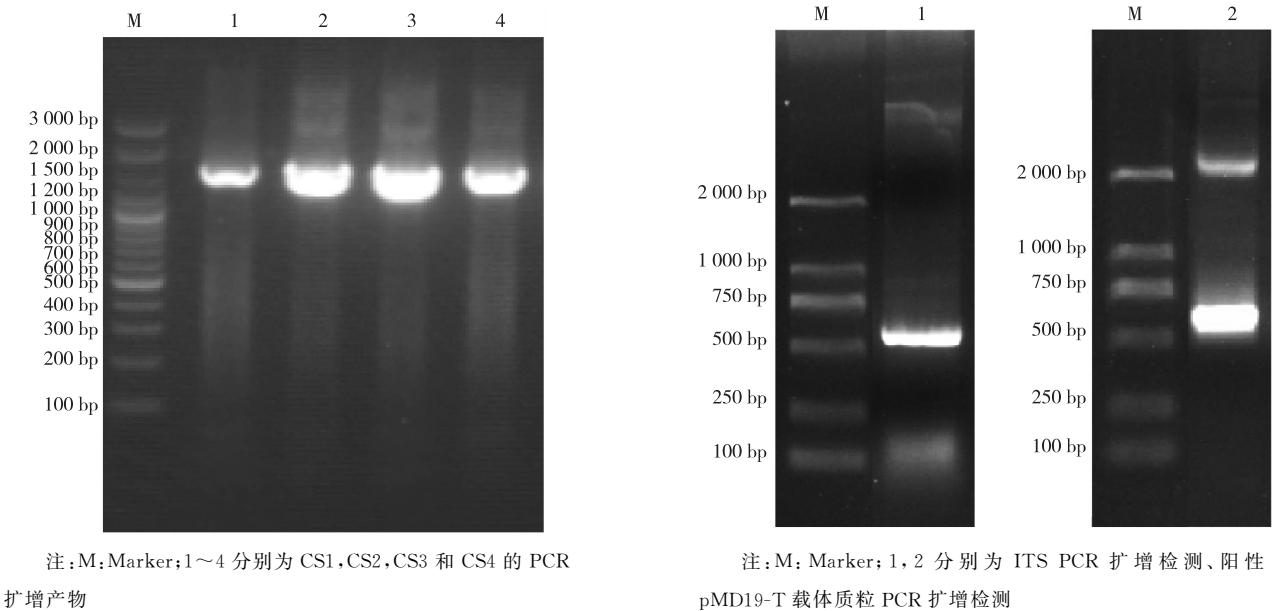


图 5 土壤样品真菌 TR1 分离株菌落和孢子形态

Fig. 5 Colony morphology and spore of TR1 isolated from the soil samples



注:M; Marker; 1~4 分别为 CS1, CS2, CS3 和 CS4 的 PCR 扩增产物

图 6 虫室分离细菌的 16S rDNA PCR 扩增产物电泳图

Fig. 6 Electropherogram of the PCR product of 16S rDNA in four bacteria isolated from the brood cells

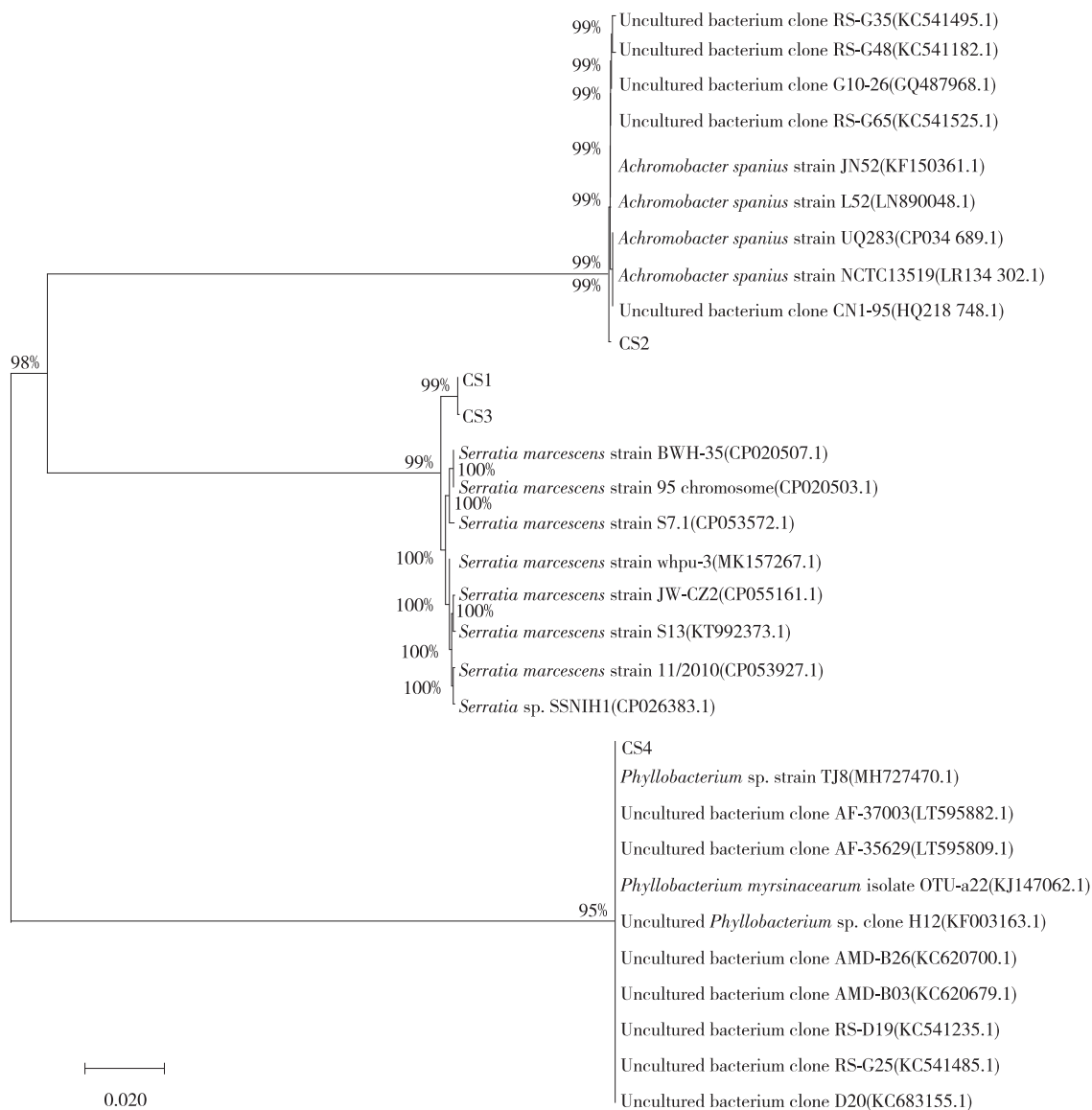
注:M; Marker; 1, 2 分别为 ITS PCR 扩增检测、阳性 pMD19-T 载体质粒 PCR 扩增检测

图 7 土壤分离真菌 TR1 的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 7 Electropherogram of the PCR product of TR1 isolated from the soil sample

3 讨论

受栖息地的片段化、全球气候变化、病原微生物等多种因素的影响,当前中华蜜蜂(*Apis cerana cerana*)、意大利蜜蜂(*Apis mellifera*)以及野生蜜蜂的种群数量不断下降。在采集大分舌蜂巢穴的过程中,发现该蜂种的大量巢穴遭到破坏,由此导致幼虫死亡,蛹也未能羽化,严重影响了蜂群数量。因此,本研究通过对大分舌蜂巢穴虫室和土壤样品进行病原微生物的分离筛选、形态特征和分子生物学序列分析,鉴定出虫室样品中的 CS1 和 CS3 属于沙雷氏菌属(*Serratia*),CS2 属于无色杆菌属(*Achromobacter*),CS4 属于叶杆菌属(*Phyllobacterium*);土壤样品中分离出的 TR1 属于毛霉属(*Mucor*)。由于大分舌蜂 1 年内只发生 1 代,幼虫发育比较迟缓,从卵期到成虫出巢活动需历经 300 多天,整个发育过程均在地下虫室中完成。现虽有研究人员对大分舌蜂栖息地环境进行了研究,但它的虫室适应温度、湿度等培养条件都未有报道,这给实验室培养及体外接种带来了巨大挑战。因此,本研究分离鉴定出的病原微生物是否对大分舌蜂幼虫存在致病性还需依赖后续体外培养体系的建立。



注:括号内编号为 GenBank 登录号,下同

图 8 基于细菌 16S rDNA 序列采用邻接法构建的系统发育进化树

Fig. 8 Phylogenetic tree constructed by neighbor joining method based on 16S rDNA gene sequence of bacterial

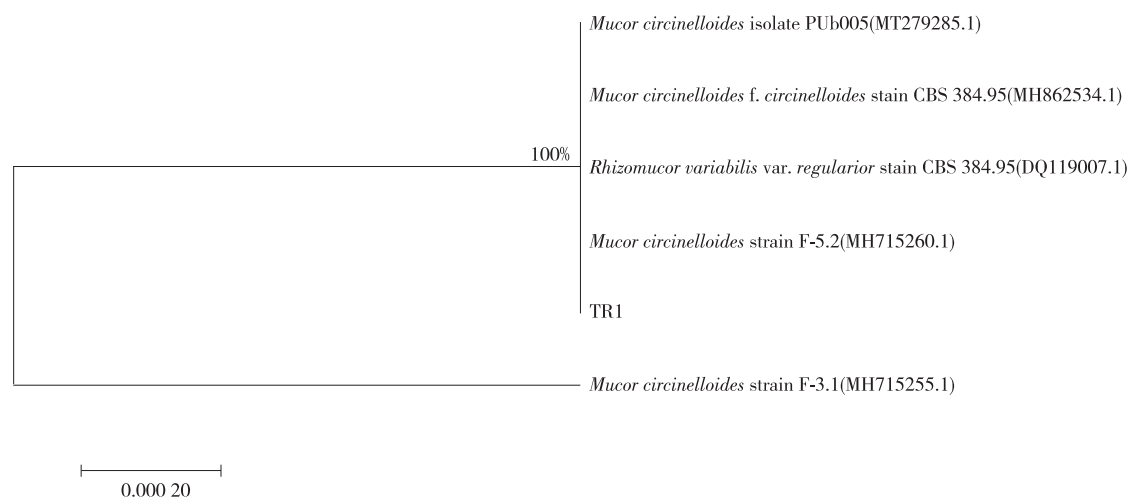


图 9 基于真菌 ITS 序列采用最大似然法构建的系统发育进化树

Fig. 9 Phylogenetic tree constructed by maximum likelihood method based on ITS gene sequences of fungi

粘质沙雷氏菌为肠杆菌科(Enterobacteriaceae)沙雷氏菌属细菌,与其他肠道菌相比形态较小,菌落光滑、圆形、不透明,带有些许恶臭气味,培养温度较低时可产生一种红色、粉红色的次生代谢产物灵菌红素^[14-15]。粘质沙雷氏菌能感染昆虫等节肢动物并导致它们患上致病性败血症^[16],具体致病机制是由于它的代谢产物之一几丁质酶可直接和间接水解昆虫幼虫体表和围食膜结构,最终导致后者被感染乃至死亡^[17-18]。Burritt 等人^[19]发现粘质沙雷氏菌可攻击意大利蜜蜂的血细胞,从而导致血细胞损失,引起败血症,最终导致蜂群数量减少。

少见无色杆菌属于肠杆菌科无色杆菌属^[20],为寄生于昆虫病原线虫肠道中的一种共生细菌,对鳞翅目(Lepidoptera)的大多数害虫均有毒杀作用^[21]。该菌种主要通过线虫携带进入昆虫食道,然后在体腔或血腔内释放,并分泌毒素蛋白使昆虫中肠中的酶失活,破坏血淋巴细胞,引发败血症从而导致昆虫死亡^[22-24]。

紫金牛叶杆菌为叶杆菌科(Phyllobacteriaceae)叶杆菌属细菌,主要分布在植物根表^[25]。该菌种主要用于修复有机物污染的土壤和水体,对它的致病性研究非常少^[26-27],但 Hughes 等人^[28]报道了人类感染紫金牛叶杆菌将导致严重的炎症和脓毒症的事例。

卷枝毛霉属于毛霉科(Mucoraceae)毛霉属,菌丝发达,生长繁密,在腐殖质富集的土壤以及植物内生、腐烂的瓜果蔬菜中较为常见^[29-30]。目前对卷枝毛霉的产油机制及应用方面有较多研究,对它的病原性研究还比较薄弱^[31-32],袁孟娟等人^[33]在研究中指出天南星(Araceae)根腐病是由卷枝毛霉引起的一种土传病害。另外有研究表明在某些条件下卷枝毛霉具有感染人和动物的潜力^[34]。

本研究从大分舌蜂腐烂巢穴中分离鉴定出的细菌和真菌均为致病菌,大分舌蜂作为地下筑巢的野生蜜蜂,巢穴中幼虫死亡和蛹未能羽化极有可能与上述病原微生物相关——后者作为病害感染了虫室中的幼虫,进而不断传播至其他虫室,最终导致大分舌蜂巢穴被大量破坏。对大分舌蜂巢穴病原微生物的深入研究不仅有利于防控大分舌蜂巢穴的病原感染,同时也为大分舌蜂种群的保护提供了新的研究思路,这对于地下筑巢型野生蜜蜂的种质资源保护同样具有重要意义。

参考文献:

- [1] 黄敦元,谷平,苏田娟,等.大分舌蜂主要生物学特性研究[J].环境昆虫学报,2015,37(1):133-138.
HUANG D Y, GU P, SU T J, et al. The study on bionomics character of *Colletes gigas* (Hymenoptera, Colletidae)[J]. Journal of Environmental Entomology, 2015, 37(1): 133-138.
- [2] 黄志松.油茶授粉蜂主要种类的生活习性及其引放技术[J].安徽林业,2010(4/5):94-96.
HUANG Z S. Living habits and release techniques of major species of *camellia* pollinator[J]. Anhui Linye, 2010(4/5): 94-96.
- [3] 韩宁林,尤海量.大分舌蜂(*Colletes gigas* Ckll.)利用的研究[J].林业科学,1979(3):215-218.
HAN N L, YOU H L. A study on the use of *Colletes gigas* Ckll[J]. Scientia Silvae Sinicae, 1979(3): 215-218.
- [4] 周十锋,韩春叶.油茶传粉昆虫研究现状和保护策略[J].河南农业科学,2011,40(9):8-10.
ZHOU S F, HAN C Y. Research progress and conservation strategies of insect pollinators of *Camellia oleifera* Abel[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2011, 40(9): 8-10.
- [5] 赵延会,丁亮,袁峰,等.大分舌蜂营巢生物学[J].昆虫学报,2010,53(11):1287-1294.
ZHAO Y H, DING L, YUAN F, et al. Nesting biology of *Colletes gigas* Cockerell (Hymenoptera: Colletidae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2010, 53(11): 1287-1294.
- [6] 黄敦元,谷平,余江帆,等.大分舌蜂的栖息地环境和访花规律[J].环境昆虫学报,2014,36(3):315-321.
HUANG D Y, GU P, YU J F, et al. The habitats and foraging behaviors of *Colletes gigas* (Hymenoptera, Colletidae)[J]. Journal of Environmental Entomology, 2014, 36(3): 315-321.
- [7] HUANG D Y, SU T J, QU L, et al. The complete mitochondrial genome of the *Colletes gigas* (Hymenoptera: Colletidae: Colletinae)[J]. Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2016, 27(6): 3878-3879.
- [8] ZHOU Q S, LUO A R, ZHANG F, et al. The first draft genome of the plasterer bee *Colletes gigas* (Hymenoptera: Colletidae: *Colletes*)[J]. Genome Biology and Evolution, 2020, 12(6): 860-866.
- [9] PROCHÁZKOVÁ M, FÜZIK T, ŠKUBNÍK K, et al. Virion structure and genome delivery mechanism of sacbrood honeybee virus. [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(30): 7759-7764.
- [10] 刘秀徽, Douglas Chesters, 武春生, 等. 环境变化对中国野生蜜蜂多样性的影响[J]. 生物多样性, 2018, 26(7): 760-765.
LIU X W, CHESTERS D, WU C S, et al. A horizon scan of the impacts of environmental change on wild bees in China[J]. Biodiversity Science, 2018, 26(7): 760-765.

- [11] 刘佳. 河北廊坊大豆枯萎病病原真菌的分离与鉴定[D]. 秦皇岛:河北科技师范学院, 2016.
LIU J. Isolation and identification of soybean *Fusarium* wilt pathogenic fungi in Langfang[D]. Qinhuangdao: Hebei Normal University of Science & Technology, 2016.
- [12] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [13] TAMURA K, NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, 10(3): 512-526.
- [14] 张叶飞. 产色素粘质沙雷氏菌的分离鉴定及含灵菌红素合成酶的载体构建[D]. 成都: 成都理工大学, 2019.
ZHANG Y F. Isolation and identification of pigmented *Serratia marcescens* and construction of plasmid containing prodigiosin synthetase[D]. Chengdu: Chengdu University of Technology, 2019.
- [15] 万秀秀. 粘质沙雷氏菌对褐飞虱的亚致死效应[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
WAN X X. Sublethal effects of *Serratia marcescens* on brown planthopper[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [16] 李精华. 家蚕病原粘质沙雷氏菌无色突变株的鉴定及致病性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2015.
LI J H. Study on the pathogenicity of *Serratia marcescens* nonpigmented mutants in silkworm, *Bombyx mori*[D]. Chongqing: Southwest University, 2015.
- [17] 赵晓峰. 粘质沙雷氏菌 PS-1 菌株对甜菜夜蛾幼虫杀虫机理的初步研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
ZHAO X F. Preliminary study on the insecticidal mechanism of *Serratia marcescens* PS-1 strains against *Spodoptera exigua* larvae[D]. Guangzhou: South China Agriculture University, 2016.
- [18] 陶科. 粘质沙雷氏菌杀虫蛋白的分离纯化及其基因的克隆与表达研究[D]. 成都: 四川大学, 2006.
TAO K. Studies on purification, Gene cloning and expression of insecticidal protein[D]. Chengdu: Sichuan University, 2006.
- [19] BURRITT N L, FOSS N J, NEENO-ECKWALL E C, et al. Sepsis and hemocyte loss in honey bees (*Apis mellifera*) infected with *Serratia marcescens* strain sicaria[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(12): e0167752.
- [20] 洪跃辉. 无色杆菌 HZ01 降解石油烃和合成生物表面活性剂的遗传基础[D]. 广州: 中山大学, 2017.
HONG Y F. Genetic basis for petroleum hydrocarbon degradation and biosurfactant production in *Achromobacter* sp. HZ01 [D]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University, 2017.
- [21] 邓海滨, 朱西儒, 田世尧. 杀虫微生物: 无色杆菌的研究新进展[J]. 广州大学学报(自然科学版), 2003, 2(2): 117-121.
DENG H B, ZHU X R, TIAN S R. Advance in the studies on pesticidal microbe: *Photorhabdus luminescens* [J]. *Journal of Guangzhou University (Natural Science Edition)*, 2003, 2(2): 117-121.
- [22] 田世尧, 王晓容, 潘建平, 等. 无色杆菌毒蛋白对菜粉蝶中肠的组织病理学影响[J]. 华南农业大学学报, 2000, 21(4): 36-39.
TIAN S R, WANG X R, PAN J P, et al. Histopathological effects of the protein toxin from *Photorhabdus luminescens* on the midgut of *Pieris rapae*[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2000, 21(4): 36-39.
- [23] 王兵. 无色杆菌产生的抗菌活性次生代谢产物的分离与鉴定[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2018.
WANG B. Isolation and identification of the secondary metabolites with antimicrobial activity from *Achromobacter* sp. [D]. Changsha: Hunan Normal University, 2018.
- [24] 廖美德, 梁世中. 昆虫病原线虫共生菌无色杆菌的研究概况[J]. 湖北农学院学报, 2001, 21(3): 285-288.
LIAO M D, LIAO S Z. A survey of researches on *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes[J]. *Journal of Hubei Agricultural College*, 2001, 21(3): 285-288.
- [25] 栾敏, 胡江, 杨兴明, 等. 土壤叶杆菌和红球菌菌株的分离鉴定及其自生固氮作用[J]. 土壤学报, 2009, 46(3): 541-546.
LUAN M, HU J, YANG X M, et al. Isolation and identification of *Phyllobacterium* and *Rhodococcus* strains from soils and their free-living nitrogen-fixation[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(3): 541-546.
- [26] 宋芳, 涂晨, 朱濛, 等. 紫金牛叶杆菌 RC6b 及其诱变菌株对二苯砷酸的降解特征[J]. 微生物学通报, 2017, 44(11): 2557-2566.
SONG F, TU C, ZHU M, et al. Diphenylarsinic acid degradation by *Phyllobacterium myrsinacearum* RC6b and its mutants [J]. *Microbiology China*, 2017, 44(11): 2557-2566.
- [27] 董湘熔, 王雁萍, 李月艳, 等. 紫金牛叶杆菌 F2 对吡啶酮降解条件的研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(25): 13908-13909.
DONG X R, WANG Y P, LI Y Y, et al. Study on conditions for degrading isatin by *Phyllobacterium myrsinacearum* F2[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(25): 13908-13909.
- [28] GARETH H, CHRISTOPHER P, SWARUPSINH C, et al. The first case report of human infection with *Phyllobacterium myrsinacearum* causing spondylodiscitis[J]. *Clinical Infection in Practice*, 2020, 7/8: 100029.
- [29] 张映瞳. 卷枝毛霉生物合成番茄红素的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.

- ZHANG Y T. The study of lycopene biosynthesis in *Mucor circinelloides*[D]. Wuxi:Jiangnan University,2017.
- [30] STEWART N J, MUNDAY B L, HAWKESFORD T. Isolation of *Mucor circinelloides* from a case of ulcerative mycosis of platypus (*Ornithorhynchus anatinus*), and a comparison of the response of *Mucor circinelloides* and *Mucor amphibiorum* to different culture temperatures. [J]. Medical Mycology, 1999, 37(3):201-206.
- [31] 储林芳. 木糖代谢在卷枝毛霉脂质积累中的作用机制[D]. 无锡:江南大学,2017.
- CHU L F. The mechanism of Xylose Metabolism lipid accumulation in *Mucor circinelloides*[D]. Wuxi:Jiangnan University, 2017.
- [32] 顾琼, 金文标, 陈远清, 等. 利用卷枝毛霉成球特性高效收获微藻[J]. 环境科学, 2017, 38(2):688-696.
- GU Q, JIN W B, CHEN Y Q, et al. Highly efficient bioflocculation of microalgae using *Mucor circinelloides*[J]. Environmental Science, 2017, 38(2):688-696.
- [33] 袁孟娟, 张薇, 董慧钧, 等. 中药材天南星根腐病原菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1):153-154.
- YUAN M J, ZHANG W, DONG H J, et al. Isolation and identification of pathogenic bacteria of root rot of Araceae from China [J]. Jiangxi Agriculture, 2015, 43(1):153-154.
- [34] PATIÑO-MEDINA J A, VARGAS-TEJEDA D, VALLE-MALDONADO M I, et al. Sporulation on blood serum increases the virulence of *Mucor circinelloides*[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 137:103737.

Animal Sciences

Identification of the Pathogenic Microorganisms in the Nesting Site of *Colletes gigas*

LI Yan, LI Xiaobing, HUANG Dunyuan, DANG Xiaoqun

(Chongqing Key Laboratory of Vector Insects, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: [Purposes] To clarify the species and multigene phylogenetic characteristics of the pathogenic microorganisms in the nesting site of *Colletes gigas*. [Methods] Corruption nests of *C. gigas* were collected from Xinyu city, Jiangxi province. By using spread plate method, the pathogenic microorganisms were isolated from the samples. Observing its morphologic features and sequencing of internal transcribed spacer (ITS) regions and 16S rDNA gene were combined to identify the pathogenic microorganisms. [Findings] The results showed that four bacterial species (CS1, CS2, CS3, and CS4) were isolated from the brood cells samples and one fungal species (TR1) was isolated from the soil sample. Through the electron microscope, the TR1 sporangia located in the hyphae were spherical and spores were round. The molecular identification showed that ITS of TR1 had 100% similarity with *Mucor circinelloides*. Both the bacteria CS1 and CS3 samples could produce pink secondary metabolites. Phylogenetic analysis revealed CS1 and CS3 were fell into one clade and their 16S rDNA sequence had 99% similarity with *Serratia marcescens*, the 16S rDNA of CS2 showed 99% similarity with *Achromobacter spanius*, the 16S rDNA of CS4 showed 95% similarity with *Phyllobacterium myrsinacearum*. [Conclusions] The pathogenic bacteria isolated from the brood cells in the *C. gigas* nest were *Serratia*, *Achromobacter*, *Phyllobacterium*, and the fungus isolated from the soil samples was *Mucor*.

Keywords: *Colletes gigas*; nest; *Serratia marcescens*; *Achromobacter spanius*; *Phyllobacterium myrsinacearum*; *Mucor circinelloides*

(责任编辑 方 兴)