

七种我国昆虫病原线虫共生菌的分离与鉴定

杨秀芬* 刘 峥 张 冉 杨怀文 袁京京 简 恒

(中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100081)

摘要: 昆虫病原线虫共生菌是一类具有广阔发展前景的生物防治资源, 由于这类菌的分类鉴定工作起步晚, 存在分类混乱和不系统的现象, 在本土资源十分丰富的我国尤为突出。本文对本实验室分离的7个共生菌菌株进行了分类描述, 建立了以生理形态, 生化特征为分类基础, 结合16S rDNA序列分析的有效鉴定方法。

关键词: 昆虫病原线虫共生细菌, 致病杆菌属, 光杆状菌属, 16S rDNA, 分类鉴定

Isolation and Identification of Seven Symbiotic Bacteria from Local Entomopathogenic Nematodes

YANG Xiu-Fen* LIU Zheng ZHANG Ran YANG Huai-Wen YUAN Jing-Jing JIAN Heng

(The State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academic of Agricultural Science, Beijing 100081)

Abstract: The symbiotic bacterium exists in the intestines of entomopathogenic nematodes and is a potential biological agent. Systematic classification of these bacteria is scarce in China. In this paper, seven strains of symbiotic bacteria from local entomopathogenic nematodes were identified by both observation of morphology, physiological, biochemical characteristics and sequence analysis of 16S rDNA fragments.

Keywords: Symbiotic bacterium of entomopathogenic nematode, *Xenorhabdus*, *Photorhabdus*, 16S rDNA, Identification

昆虫病原线虫共生菌包括致病杆菌属(*Xenorhabdus*)^[1]和光杆状菌属(*Photorhabdus*)^[2], 它们分别与斯氏线虫属(*Steinernema*)和异小杆线虫属(*Heterorhabditis*)的线虫共生, 属于肠杆菌科(Enterobacteriaceae)。在自然界, 共生菌存在于3龄侵染期线虫的肠道内^[3], 不能从自然界分离获得, 是昆虫病原线虫的主要致病因子。由于该类细菌发现较晚, 并且其分类地位随着寄主线虫分类地位的变化也经常发生变更。80年代以后随着共生菌种类

的增加以及研究的不断深入, 特别是发现共生菌产生多种抗虫、抗菌和抗癌等活性物质后^[4-9], 人们越来越重视对共生菌的采集、分离以及鉴定工作, 以期获得具有开发价值的新结构活性物质和新的功能基因。

由于共生菌菌株间在形态和生理生化指标上的相似性, 造成了传统分类方法难以进行准确分类, 近年来16S rDNA序列分析在昆虫病原线虫共生菌分类鉴定上的应用^[10,11], 促进了共生菌分类研究的

快速发展。本研究室从全国各地采集的昆虫病原线虫体内分离获得了 7 个共生细菌菌株, 本文应用形态、生化特征和 16S rDNA 序列测定相结合的分类鉴定方法, 对 7 个菌株进行了分类和鉴定, 以期为今后的进一步研究与利用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 共生细菌的分离

将线虫侵染致死的大蜡螟(*Galleria mellonella*) 幼虫用 75% 酒精和 0.1% 柳硫汞进行表皮消毒, 无菌水冲洗干净后, 用消毒剪刀剖开幼虫腹部, 取血淋巴划线到 NBTA(营养琼脂 45, 溴麝香百里酚兰(BTB)0.025, 氯化三苯基四氮唑(TTC)0.04)培养基平板上, 28 ℃ 下黑暗培养 48 h, 挑取蓝色单菌落再进行 2 次划线分离后, 于 NA 斜面培养基培养并用液体石蜡封存室温保存。

1.2 菌株及菌株培养

分离并保存的供试菌株见表 1。菌种在 NBTA 培养基上 28 ℃ 活化培养后, 挑取蓝色单菌落即初生型菌落用于菌株鉴定。液体培养用 LB 培养基在 28 ℃ 下振荡培养 24 h。

表 1 供试菌种

Table 1 Tested strains of symbiotic bacteria

菌种代码 Code	采集地 Origin	寄生线虫 Host nematode
15-2	内蒙古	<i>Heterorhabditis</i> sp.
NS-20	河南三门峡	<i>Heterorhabditis</i> sp.
NMA-54	黑龙江	<i>Steinernema</i> sp.
HHK-34	海南	<i>Steinernema</i> sp.
HDZ-1	海南	<i>Steinernema</i> sp.
HSY-22	海南	<i>Steinernema</i> sp.
CB-8602	秦皇岛	<i>Steinernema</i> sp.

1.3 形态及生理生化特征观察

均参照(常见细菌系统鉴定手册)方法进行^[12]。

1.4 生物荧光的观察

菌种划线 NA 斜面, 28 ℃ 暗箱培养 48 h, 在黑暗条件下观察菌落是否产生荧光。

1.5 PCR 扩增 16S rDNA 序列

按照北京赛百盛公司 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌总 DNA。分别以 *E. coli* 16S rRNA 的 6 - 25 位核苷酸和 1540-1521 位核苷酸为上游引物和下游引物, 以 DNA 为模板进行 PCR 扩增。Sense: 5 - GAAGAGTTTGATCATGGCTC-3'; Antisense: 5 - AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。扩增总体积 25 μL, 95 ℃ 变性 3 min, 94 ℃ 1 min, 63 ℃ 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 进行 31 个循环。用北京赛百盛公司 PCR 产物回收试剂盒进行产物回收, 1% 琼脂糖凝胶检测。

1.6 产物测序

用 PCR 扩增产物与 PMD18-T vector 载体进行连接, 并转化到 *E. coli* DH5α 感受态细胞中, 筛选后的阳性克隆进行菌体 PCR 检测后, 由英俊生物技术有限公司用 3770 核酸测序仪完成序列测定。

2 结果与分析

2.1 形态特征

7 株供试菌株革兰氏染色均为阴性, 短杆状, 鞭毛周生, 能运动; 细胞大小均在 0.7 μm~1.5 μm × 1.7 μm~6.4 μm 范围之内。

2.2 培养及生理生化特征

7 株供试菌株在 NBTA 培养基上培养 40 h, 均形成圆形菌落, 大小为 1 mm~3 mm, 不同菌株的菌落形态存在差异(表 2)。

表 2 不同菌株的菌落特性

Table 2 Character of colony

菌株 Strains	菌落形状及边缘 Shape and margin of colony	光泽 Luster	颜色 Color
NMA-54	圆形突起、规则而透明	有	蓝色
15-2	突起, 稍不规则, 边缘不透明	有	黄褐色
NS-20	菌落突起, 边缘规则, 透明	有	黄绿色
HHK-34	菌落扁平, 边缘不规则, 不透明	有	蓝色晕圈
HDZ-1	菌落稍突起, 边缘透明、规则	有	蓝色
HSY-22	边缘不规则, 色浅不透明	无	蓝绿色
CB-8602	圆形突起, 边缘规则不透明	无	绿色

表3 生理生化特征
Table 3 Biochemical character of the tested strains

指标 Characteristics		15-2	NS-20	NMA-54	HHK-34	HDZ-1	CB-8602	HSY-22
生长温度	34	+	-	-	+	+	+	+
	40	-	-	-	-	+	-	+
生物荧光		+	w	-	-	-	-	-
BTB 吸收(NBTA)		+	+	+	+	+	-	+
中性红吸收(MacConkey)		+	+	×	×	×	+	+
丙二酸盐利用		-	-	-	-	-	-	-
过氧化氢酶		+	+	-	-	-	-	-
硝酸盐还原		-	-	-	-	-	-	-
淀粉水解		-	-	-	-	-	-	-
卵磷脂酶		+	+	-	+	+	+	-
脂酶(蛋黄)		+	+	w	-	-	+	+
脲酶		+	-	-	-	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶		-	-	-	-	-	-	-
色氨酸脱氨酶		-	-	-	-	-	-	-
吲哚产生		-	-	-	-	-	-	-
精氨酸双水解酶		-	-	-	-	-	-	-
七叶苷水解		+	+	-	+	+	+	+
脂酶	Tween40	+	w	+	+	+	+	w
	Tween80	+	-	-	-	-	w	-
油脂水解(大豆油)		+	-	-	-	-	-	-
葡萄糖氧化发酵	开管	+	+	+	+	+	+	+
	闭管	+	+	+	+	+	+	+
酪蛋白水解		+	+	+	+	+	w	+
石蕊牛奶	还原	+	+	-	+	+	+	+
	胨化	+	+	+	+	+	w	+
	产酸	-	-	-	-	-	-	-
	产碱	-	-	-	-	-	-	-
	酶凝	+	+	+	+	+	-	+
M-R 反应		-	-	-	-	-	-	-
V-P 反应		+	-	-	-	-	-	-
磷酸酶		+	+	w	w	+	-	+
糖醇发酵	D-果糖	+	+	+	+	+	+	+
	D-木糖	+	-	-	+	+	-	+
	D-半乳糖	+	+	+	+	+	+	+
	L-山梨糖	-	-	-	-	-	-	-
	甘露糖	+	+	+	+	+	+	+
	乳糖	-	-	-	-	-	-	-
	海藻糖	+	+	+	+	+	+	+
	蔗糖	+	+	+	+	+	+	+
	糊精	+	+	+	+	+	+	+
	甘露醇	-	+	+	-	-	-	-
	甘油(丙三醇)	+	+	+	+	+	+	+
	纤维二糖	+	+	-	+	+	+	+
	水杨素(水杨苷)	+	+	-/w	+	-	w	+

续表

指标 Characteristics	15-2	NS-20	NMA-54	HHK-34	HDZ-1	CB-8602	HSY-22
有机酸利用							
乙酸钠	+	w	+	+	+	-	+
酒石酸钠	-	-	-	-	-	-	w
山梨酸	-	-	-	-	-	w	w
草酸铵	-	-	-	-	-	-	-
DL-苹果酸	+	+	+	+	+	+	+
顺丁烯二酸	-	-	-	-	-	-	-
反丁烯二酸	+	+	-	+	+	+	+
肌酸	-	-	-	-	-	-	-
甲酸钠	+	w	+	+	+	-	+
D-葡萄糖酸钠	-	+	-	+	+	+	+
丙酸钠	+	+	-	-	+	+	+

注：×：菌株在该种培养基上不生长；w：反应微弱；-：阴性反应；+：阳性反应
 Note：×：No growth；w：Weak reaction；-：Negative reaction；+：Positive reaction

2.3 生理生化特征

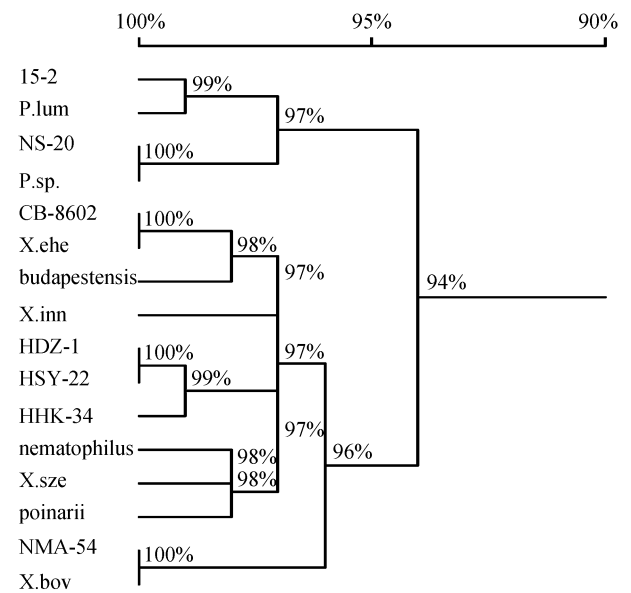
从不同菌株的生理生化特征看(见表 3)，供试菌株符合昆虫病原线虫共生菌的基本特征。其中 15-2 和 NS-20 产生生物荧光，过氧化氢酶阳性，属于光杆杆菌属，其他菌株属于致病杆菌属。

2.4 系统发育树的构建

以总 DNA 为模板，PCR 扩增均得到约为 1500 bp 的条带。将待测菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 核酸序列数据库中的 9 株致病杆菌属和光杆状菌属菌株 16S rDNA 序列进行比较(表 4)，采用 DNAMAN 软件 Multiple Sequence Alignment 进行多序列同源性分析，用邻接法构建系统发育树(图 1)。

从系统发育聚类分析结果显示，15-2、NS-20 菌株与光杆状菌属 *Photorhabdus* 的 2 个有效发表的种形成一个聚类群，其中菌株 15-2 与 *P. luminescens* subsp. *Kayaii* 的序列相似性达 99%，菌株 NS-20 与未定名的 *Photorhabdus* sp. 序列相似性 100%。CB-8602 和 NMA54 分别与 *X. ehersii* 和 *X. bovienii* 的相似性为 100%和 99.5%。HDZ-1、HHK-34 和 HSY-22 3 个菌株与 GenBank 登记的 *Xenorhabdus* 属已知种相似性仅为 97%，它们之间的 16S rDNA 序列相似性高达 99%，说明这 3 个菌株有可能是一个未定名的新种，需要进一步进行鉴定。

代码 Code	菌种名称 Species	注册号 Registration number
X. ehe	<i>Xenorhabdus ehersii</i>	AJ810294
budapestensis	<i>Xenorhabdus budapestensis</i>	AJ810293
X. inn	<i>Xenorhabdus innexi</i>	AJ810292
nematophilus	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	X82251
X. sze	<i>Xenorhabdus szentirmaii</i>	AJ810295
poinarii	<i>Xenorhabdus poinarii</i>	X82253
X. bov	<i>Xenorhabdus bovienii</i>	AY317154
P. lum	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>Kayaii</i>	AJ560631
P. sp.	<i>Photorhabdus</i> sp.	AY278671



构建的系统发育树(图 1)包括 16 个菌株，其中有 7 株致病杆菌、2 株光杆状菌和 7 株待测菌株。

图 1 根据 16S rDNA 序列同源性构建的系统发育树
 Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences homology

3 结论与讨论

光杆状菌属和致病杆菌属的一个明显区别特征即产生生物荧光, 产生吡啶也是属的特性, 但 15-2 和 NS-20 菌株能产生生物荧光, 不产生吡啶, 16S rDNA 序列与光杆状菌的同源性高达 100%和 99%, 这种生化差异可能是由于菌株生态差异造成的。

HHK-34、HDZ-1 和 HSY-22 菌株间 16S rDNA 序列相似性极高, 但与致病杆菌属内的已知菌株 16S rDNA 序列相似性小于 97%, 一般认为同源性小于 98%, 可以认为属于不同种, 因此这 3 个菌株可能为未知新种。

综合形态、生理生化特征以及 16S rDNA 序列相似性分析, 供试菌株的鉴定结果如下:

表 5 供试菌株分类鉴定结果
Table 5 The identification of tested strains

菌种代码 Code	拉丁学名 Species
15-2	<i>Photorhabdus luminescens</i> subsp. <i>Kayaii</i>
NS-20	<i>Photorhabdus</i> sp.
NMA-54	<i>Xenorhabdus bovienii</i>
CB-8602	<i>Xenorhabdus ehersii</i>
HDZ-1	<i>Xenorhabdus</i> sp.
HSY-22	<i>Xenorhabdus</i> sp.
HHK-34	<i>Xenorhabdus</i> sp.

许多学者根据共生线虫种类推断其共生细菌的分类, 缺乏系统分类研究, 本文完成了本土分离的 7 株共生菌的分类鉴定工作, 为今后更多共生菌资源的鉴定工作奠定了基础, 同时对我国共生菌资源的研究和利用具有一定的理论与实践意义。

参 考 文 献

- [1] Thomas GM, Poinar GO. *Xenorhabdus* gen. nov. a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae. *Bacteriol*, 1979, **29**(4): 352-360.
- [2] Boemare NE, Akhurst RJ, Mourant RG. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and a

proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus. *Photorhabdus* gen. Nov. *Bacteriol*, 1993, **43**: 249-255.

- [3] Poinar GO, Thomas GM. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar & Thomas (*Achrombacteraceae*: Eubacteriales) in the development of the nematode DD136 (*Neoplectana* sp.: *Steinernematidae*). *Parasitology*, 1996, **56**: 385-390.
- [4] 刘 峥, 简 恒, 杨秀芬, 等. 昆虫病原线虫共生细菌对棉铃虫和菜青虫的口服毒性. *植物保护学报*, 2003, **30**(1): 19-23.
- [5] 杨怀文, 张志铭, 杨秀芬, 等. 嗜线虫杆菌代谢物对马铃薯晚疫病的抑制作用. *中国生物防治*, 2000, **16**(3): 111-113.
- [6] 孟亚莉, 丛 彬, 王 欢, 等. 昆虫病原线虫共生菌对玉米螟幼虫的杀虫活性. *沈阳农业大学学报*, 2004, **35**(2): 97-100.
- [7] Yang XF, Zhang ZM, Yang HW, *et al.* Inhibition of metabolites from *Xenorhabdus nematophilus* against *Phytophthora infestans*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2001, **24**(2): 65-68
- [8] Bowen D, Rocheleau TA, Blackburn M, *et al.* Novel insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science*, 1998, **280**(6): 2129-2132.
- [9] Paik S, Park YH, Suh S. Unusual cytotoxic phenethylamides from *Xenorhabdus nematophilus*. *Bull Korean Chem Soc*, 2001, **22**(4): 372-374
- [10] J Liu, Berry RE, Poinar G, *et al.* A Moldenke Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* species and strains as determined by comparison of partial 16S rDNA gene sequence. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**: 948-951
- [11] Liu J, Berry RE, Blouin MS. Identification of symbiotic bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* based on 16S rDNA sequence. *J Invertebr Pathol*, 2001, **77**: 87-91.
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1999, p.143.