

昆虫病原线虫4新种所携带共生菌的分子鉴定*

王 闻, 彭小明, 邱礼鸿, 庞 义

(中山大学有害生物控制及资源利用国家重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 以16S rDNA为分子标记对中山大学有害生物控制及资源利用国家重点实验室近年从我国采集到并描述发表的斯氏属昆虫病原线虫4个新种所携带的共生菌进行分类鉴定, 结果显示 *Steinernema akhursti* 所携带的共生菌很可能是 *Xenorhabdus* 属的一个新种, *S. aciari* 和 *S. leizhouense* 所携带的共生菌可能是 *Xenorhabdus* 属的两个近缘的新种或同一种的两个远缘菌株, 而 *S. beddingi* 所携带的共生菌可能是 *Xenorhabdus bovienii* 的一个新菌株。

关键词: 昆虫病原线虫共生菌; 分子鉴定; 16S rDNA; 致病杆菌属

中图分类号: Q939.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 06-0052-04

昆虫病原线虫是一类带有共生菌的专性昆虫寄生线虫, 现已描述的有斯氏 *Steinernematidae* 和异小杆 *Heterorhabditidae* 两个科, 共67种^[1], 隶属于动物界 *Animalia*, 线虫门 *Nematoda*, 尾感器纲 *Secernentea*, 小杆目 *Rhabditida*。每一种昆虫病原线虫的感染期幼虫肠道内均携带有一种特定的细菌并与之形成典型的共生关系。现已描述的有致病杆菌 *Xenorhabdus* 和发光杆菌 *Photorhabdus* 两个属, 均属于肠杆菌科。发光杆菌属现已描述了3个种: *P. luminescens*, *P. temperata* 和 *P. asymbiotica*^[2]; 致病杆菌属现已描述了20个种: *X. beddingii*、*X. bovienii*、*X. budapestensis*、*X. cabanillasii*、*X. doucetiae*、*X. ehlersii*、*X. griffiniae*、*X. hominickii*、*X. indica*、*X. innexii*、*X. japonica*、*X. koppenhoeferi*、*X. kozodoii*、*X. mauleonii*、*X. miraniensis*、*X. romanii*、*X. stockiae*、*X. szentirmaii*、*X. poinarii* 和 *X. nematophila*^[3-4]。

昆虫病原线虫已经被开发成为一类新型生物杀虫剂^[5]。共生菌通过产生多种次生代谢产物, 如杀虫毒素, 胞外酶, 抗生素等, 在线虫致杀害虫以及线虫的繁衍过程发挥重要的作用^[6]。共生菌产生的代谢产物具有非常广阔的开发利用前景, 已成为一类重要的生物资源, 因而共生菌的资源调查和分类研究也越来越受重视。本实验室近几年在云南和广东省进行的昆虫病原线虫资源调查中找到了400多号线虫, 其中有4号已被鉴定为斯氏属昆虫病原线虫的新种: *Steinernema aciari* GDh7^[7], *S. akhursti* YNb112^[8], *S. leizhouense* GDc328^[9] 和 *S.*

beddingii YNc174^[10]。这些线虫所携带的共生菌已被分离、纯化并保存在液氮中, 但还未进行分类鉴定。了解这些共生菌的分类地位是进一步研究和开发利用这些线虫和共生菌的前提。本研究以16S rDNA为分子标记对这4号线虫所携带的细菌进行了分子鉴定。

1 材料与方法

1.1 16S rDNA 的PCR扩增

用于扩增共生菌16S rDNA序列的DNA模板采用液氮沸水法提取得到^[11]; 引物根据 GenBank 中共生菌的16S rDNA序列, 利用 DNASTAR 的 Primer-Select 软件设计如下:

上游引物 16S - af: 5' - GGCTCAGATT-GAACGCTGGC - 3';

下游引物 16S - ar: 5' - AAGGAGGTGATC-CAACCGCAGG - 3'。

引物由上海博亚生物工程公司合成。扩增体系参照 Brunel 等^[11]描述的方法, 使用 MJ Research 的 PTC-100 PCR 仪完成。反应条件为: 预变性 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 2 min, 循环 34 次; 72℃ 10 min。反应产物用 1% 的琼脂糖电泳分离回收, 用 OMEGA BIO-TEK 的 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 试剂盒回收 PCR 产物。

1.2 16S rDNA 的克隆测序

克隆载体 pMD18-T Vector 购自宝生物工程(大连)公司。反应体系: pMD18-T Vector 0.5 μL, DNA (PCR 产物) 1 μL, ddH₂O 1 μL, Solu-

* 收稿日期: 2008-03-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30771457); 广东省科技计划资助项目(2007A060300001)

作者简介: 王闻(1985年生), 男, 研究生; 通讯联系人: 邱礼鸿; E-mail: qjulh@mail.sysu.edu.cn

tion I 2.5 μL 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 下连接 4 h。大肠杆菌 *E. coli* TG1 为本实验室保存, 连接产物使用热激法进行转化。转化后的大肠杆菌在含有 Amp + /IPTG/X-gal 的平板中进行培养。重组质粒采用 OMEGA BIO-TEK 的 E. Z. N. A plasmid kit 试剂盒提取并用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行酶切鉴定。16S rDNA 全序列的测序由上海博亚生物工程公司使用 3770 自动测序仪完成。

1.3 序列分析

利用 MEGA3.1 软件和 DNASTAR 软件包中的 MegAlign 软件对测序得到的共生菌的 16S rDNA 序列和从 GenBank 中下载的已描述共生菌同源序列进行比对, 计算遗传距离矩阵, 选择 Kimura-2-parameter 进化模式并采用 Complete deletion 位点进行分析, 最后用邻近法 (NJ) 构建系统树, 以分析其分类地位。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增及序列测定

使用所设计的引物对 4 株共生菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 得到长度约为 1 500 bp 左右的片段, 与预期片段的长度相符合。测序结果显示所扩增 4 株共生菌的 16S rDNA 的序列长度为 1 480 bp (不包括两端的引物)。

2.2 系统发育分析

下载 GenBank 上所有已定名致病杆菌属菌株的 16S rDNA 序列, 以发光杆菌属 *P. luminescens* sub. *laumondii* TT01 作为外群种, 采用邻接法构建基于该序列的致病杆菌属共生菌系统发育树, 结果见图 1。同时计算各序列之间的遗传距离与序列相似性, 由此得到的致病杆菌属细菌遗传距离与序列相似性矩阵显示, 不同种菌株之间的序列相似性介于 91.8% ~ 98.5%, 遗传距离介于 1.1 ~ 6.2 之间。以此为标准结合图 1 对待鉴定的 4 个菌株作出初步的判断如下: YNc174 与 *X. bovienii* 的所有菌株形成一个独立分支, 它与 *X. bovienii* 的标准菌株 DSM4766 之间的遗传距离为 0.4, 序列相似性为 99.2%, 可见 YNc174 是 *X. bovienii* 的一个新菌株; YNb112 在进化树中独处一支, 它与已定名种 *X. japonica* AB243426 相似性最大, 为 98.1%, 遗传距离为 1.9, YNb112 与其他菌株的相似性最大不超过 97.5%, 遗传距离大于 1.2, 显示 YNb112

很可能为 *Xenorhabdus* 属的一个新种; GDh7 和 GDc328 与已定名种 *X. griffinae*, *X. indica*, *X. poinarii* 处于同一分支中, 但它们与这 3 个种的相似性均小于 98%, 遗传距离分别大于 1.2, 显示 GDh7 和 GDc328 很可能也为 *Xenorhabdus* 属的新种, 而 GDh7 与 GDc328 之间的序列相似性为 98.8%, 遗传距离为 1.2, 它们可能为 *Xenorhabdus* 属的两个近缘种或同一种的两个远缘菌株, 需进行进一步的分析, 如 DNA 杂交和生理生化分析等, 才能最后确定。

本研究以近乎全长的 16S rDNA 作为分子标记对分离自昆虫病原线虫 4 个新种的 4 株共生菌 YNb112, GDc328, GDh7 和 YNc174 进行了初步鉴定, 结果显示这四株细菌的 16S rDNA 序列具有致病杆菌属的标志性序列 TTCGG, 与该属已描述种的同源序列的相似性在 90% 以上, 能够支持共生线虫的生长繁殖, 与线虫形成的共生体对大蜡螟有强致病力, 可以肯定它们均为致病杆菌属细菌。从 16S rDNA 序列的相似性和遗传距离可以初步推断 YNb112 很可能是致病杆菌属的一个新种, GDh7 和 GDc328 很可能是致病杆菌属的两个近缘新种或一个新种的两个远缘菌株, 而 YNc174 很可能分别是 *X. bovienii* 的一个新菌株。要确定该四个种的最终分类地位, 还需要做生理生化、DNA-DNA 杂交等有关方面一系列实验。

昆虫病原线虫与细菌的共生关系有高度的稳定性和专一性且两者有一定程度的协同进化关系。在自然状况下, 一种线虫只与一种细菌共生, 其中致病杆菌属细菌均与斯氏属线虫共生, 发光杆菌属细菌均与异小杆属线虫共生^[12]。本研究显示基于 16S rDNA 序列相似性得到的四个菌株的分类地位与目前我们了解的斯氏属线虫和致病杆菌属细菌的系统发生和两者的协同进化规律基本符合。例如: 线虫 *S. aciari* GDh7 与 *S. glaseri* 属同一分支^[7], 该分支的所有线虫均具有感染期幼虫个体较大、有较强的主动寻找寄主能力等特点。*S. beddingii* YNc174 与 *S. affine* 和 *S. intermediun* 属于同一分支^[9], 而 *S. affine* 和 *S. intermediun* 均与细菌 *X. bovienii* 共生^[10], 本研究显示细菌 YNc174 很可能是 *X. bovienii* 的一个菌株, 这说明了该分支的线虫所携带的共生菌很可能均为 *X. bovienii*。

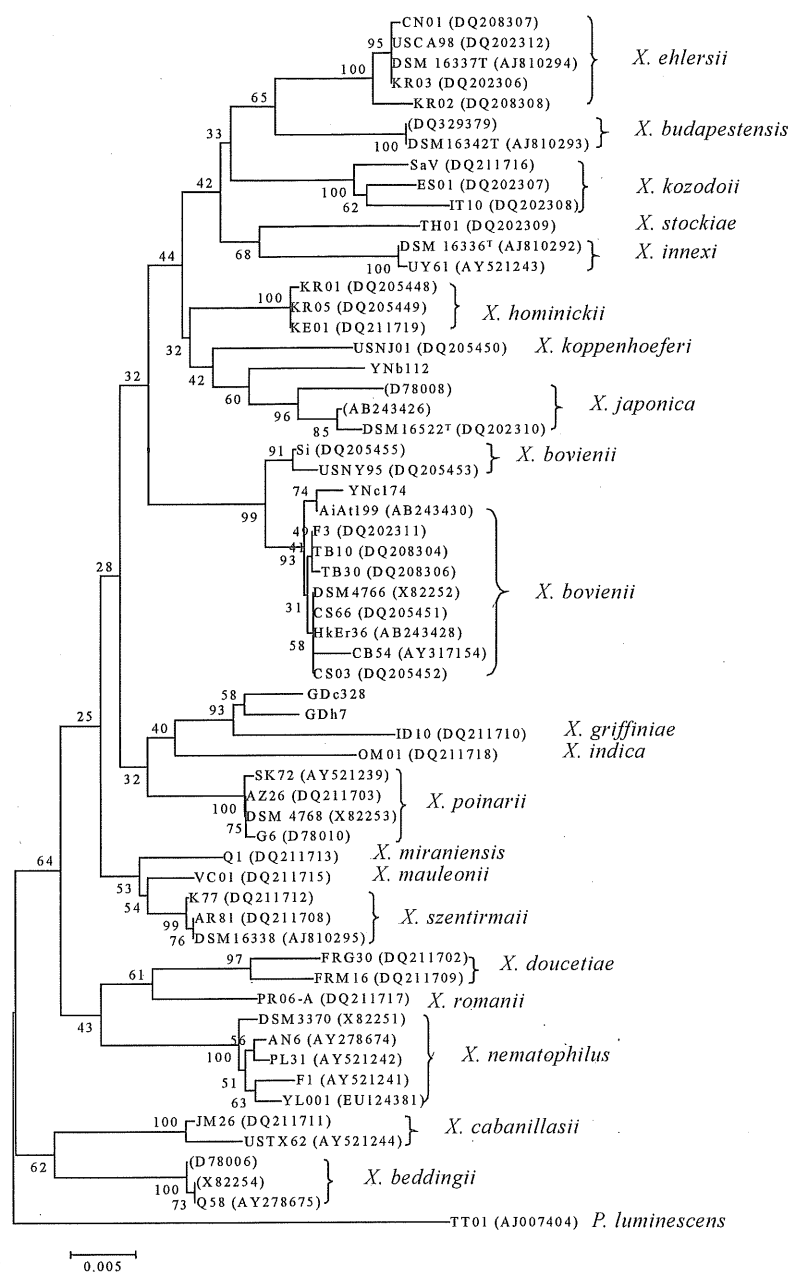


图 1 用邻接法所建立的基于 16S rDNA 全序列的致病杆菌属共生菌的系统发育树

Fig. 1 A phylogenetic tree of *Xenorhabdus* species, the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, inferred from 16S rDNA sequences and constructed by the neighbour-joining module
(各分支上的数字代表置信度; 括号外面的代码为菌株号, 括号里面的代码为各菌株 16S rRNA 基因在 GenBank 中的基因号; 标尺表示 0.5% 的序列差异)

参考文献:

- [1] NGUYEN K B. <http://kbn.ifas.ufl.edu/kbnstein.htm> [EB/OL]. 2008.
- [2] FISCHER-LE SAUX M, VIALARD V, BRUNEL B, et al. Polyphasic classification of the genus *Photobacterium* and proposal of new taxa: *P. luminescens* subsp. *luminescens* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *akhurstii* subsp. nov., *P. luminescens* subsp. *laumondii* subsp. nov., *P. temperata* sp. nov., *P. temperata* subsp. *temperata* subsp. nov. and *P. asymbiotica* sp. nov. [J]. Int J Syst Bacteriol, 1999, 49: 1645-1656.
- [3] LENGUEL K, LANG E, FODOR A, et al. Description of four novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus budapestensis* sp. nov., *Xenorhabdus ehlersii* sp. nov., *Xenorhabdus innexi* sp. nov., and *Xenorhabdus szentirmaii* sp. nov. [J]. Syst Appl Microbiol, 2005, 28(2): 115-122.
- [4] TAILLIEZ P, PAGES S, GINIBRE N, et al. New insight into diversity in the genus *Xenorhabdus*, including the description of ten novel species [J]. Int J Syst Evol Mi-

- crobiol, 2006, 56: 2805 – 2818.
- [5] WEBSTER J M, CHEN G, HU K, et al. Bacterial metabolites [C]//Entomopathogenic Nematology. GAUGLER R. CAB International, 2002: 99 – 114.
- [6] MCINERNEY B V, TAYLOR W C, LACEY M J, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 2. Benzopyran-1-one derivatives with gastroprotective activity[J]. Nat Prod, 1991, 54(3): 785 – 795.
- [7] QIU L H, YAN X, ZHOU Y, et al. *Steinernema aciari* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Guangdong, China[J]. Inverteb Pathol, 2005, 88(1): 58 – 69.
- [8] QIU L H, HU X, ZHOU Y, et al. *Steinernema akhursti* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae) from Yunnan, China[J]. Inverteb Pathol, 2005, 90: 151 – 160.
- [9] NGUYEN K B, QIU L H, ZHOU Y, et al. *Steinernema leizhouense* sp. n. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from southern China. Russian Journal of Nematology 2006 [J], 14: 101 – 118.
- [10] QIU L H, HU X, ZHOU Y, et al. *Steinernema beddingii* sp. (Nematoda: Steinernematidae), a new entomopathogenic nematode from Yunnan, China[J], Nematology, 2005, 7(5): 737 – 749.
- [11] BRUNEL B, GIVAUDAN A, LANOIS A, et al. Fast and accurate Identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63: 574 – 580.
- [12] OWUAMA C I. Entomopathogenic symbiotic bacteria, *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* of nematodes[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17: 505 – 515.

Molecular Identification of the Symbiotic Bacteria of Four Recently Described Species of Entomopathogenic Nematode

WANG Wen, PENG Xiao-ming, QIU Li-hong, PANG Yi

(State Key Laboratory of Biocontrol, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The taxonomic status of the symbiotic bacteria of four recently described species of entomopathogenic nematode was determined preliminarily using 16S rDNA as molecular marker. The results indicated that the symbiotic bacterium of *Steinernema akhursti* is likely to be a new species of *Xenorhabdus*, and those of *S. aciari* and *S. leizhouense* perhaps are two new relative species or two distant strains of a new species of *Xenorhabdus*, while that of *S. beddingii* is a new strain of *X. bovienii*.

Key words: entomopathogenic nematodes; molecular identification; 16S rDNA; *Xenorhabdus*