

具角斯氏线虫共生菌的分子鉴定*

颜 珣, 辛智海, 周 勇, 庞 义, 邱礼鸿

(中山大学生物防治国家重点实验室 广州 510275)

摘 要: 在我国的云南和贵州省进行昆虫病原线虫 (Entomopathogenic nematodes) 资源调查时从不同地区采集到4个品系的具角斯氏线虫 *Steinernema ceratophorum*, 以16S rDNA部分序列为分子标记对从这4个品系线虫中分离到的4株共生菌进行了初步的鉴定。测序结果显示, 4株菌的16S rDNA部分序列完全一样。基于该段序列所构建的系统发育树表明, 具角斯氏线虫共生菌属异杆菌属 *Xenorhabdus*, 很可能是该属的一个新种。

关键词: 昆虫病原线虫; 共生菌; 分子鉴定; 16S rDNA; *Steinernema ceratophorum*; *Xenorhabdus*

中图分类号: Q939.121 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 05-0116-03

昆虫病原线虫 (Entomopathogenic nematodes) 是一类带有共生细菌的专性昆虫寄生线虫, 已被开发成新型生物杀虫剂^[1]。现已描述的昆虫病原线虫有斯氏 Steinernematidae 和异小杆 Heterorhabditidae 两个科, 共约40种^[2]。它们所携带的共生菌分别属于肠杆菌科的异杆菌属 *Xenorhabdus* 和光杆菌属 *Photorhabdus*。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, 在线虫致死害虫以及随后的繁衍过程中发挥重要作用^[3]。

由于共生菌能够产生多种有生物活性代谢产物, 具有广阔的开发利用前景, 世界各国对其资源以及分类研究日趋重视。本实验室在云南和贵州省进行昆虫病原线虫资源调查中找到了200多号昆虫病原线虫, 其中有四号 GZ26, YNa38, YNa111 和 YNa170 经过分子生物学 (部分28S rDNA和ITS rDNA序列) 和形态学研究后被鉴定为具角斯氏线虫 *S. ceratophorum*。具角斯氏线虫最初是在我国的辽宁省采集到并描述的^[4], 目前还没有在其它国家发现这种线虫的报道。初步研究结果显示这种线虫的共生菌能够产生一些对某些植物病原真菌有强抑制作用的物质。该种线虫共生菌的分类地位目前还没见报道。本实验室采用分子生物学方法对以上四株细菌进行了初步鉴定, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 昆虫病原线虫的采集与分离 昆虫病原线虫 GZ26, YNa38, YNa111 和 YNa170 是用大蜡螟 *Galleria mellonella* 的幼虫诱集法^[5] 从采于贵州省和云南省的土样中分离得到。

1.2 共生菌的分离 参考 Poinar 的方法^[6] 分离共生菌, 以50头感染期线虫对1头幼虫的比例感染大蜡螟5龄幼虫, 幼虫死亡12h内将虫尸置于 $\varphi = 70\%$ 酒精浸泡2min, 再于无菌水中洗涤2次, 剪破第一对腹足, 取血淋巴涂布于NBTA平板, 28℃培养48h, 挑取初生型菌落再于NBTA平板上二次分离, 直到分离到稳定初生型菌落。挑取初生型单菌落接种到LB液体培养基, 28℃, 200 r/min 震荡培养至 A_{600} 约1.5, 培养液于 $\varphi = 15\%$ 甘油中在-70℃冰箱或液氮中保存备用。

1.3 共生菌基因组DNA的分离 共生菌基因组DNA的分离参照 Brunel 等^[7] 描述的方法。

1.4 PCR扩增引物 根据 GenBank 中共生菌的16S rDNA序列, 利用 DNASTAR 的 Primer-Select 计算机软件设计如下PCR引物: 上游引物 16s-for: 5'-GGGGGATAACCACTGGAACCG-3'; 下游引物 16s-rev: 5'-CCACATCTCTACGCATCTCACC-3', 用于扩增共生菌16S rDNA的128-765位片段 (GenBank accession No. X82248)。引物由上海博亚生物工程有限公司合成。

1.5 16S rDNA的PCR扩增及产物回收 16S rDNA的PCR扩增体系参照 Brunel 等^[7] 描述的方法, 使用 MJ Research 的 PTC-100 PCR 仪完成。反应条件为94℃变性5min, 再94℃30s, 55℃30s, 72℃1min, 循环35次, 于72℃延伸8min。反应产物用 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳分离回收, 使用 OMEGABIO-TEK 的 E.Z.N.A Gel Extraction Kit 胶回收PCR产物。

* 收稿日期: 2004-09-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170143); 广东省自然科学基金团队资助项目 (000594232172)

作者简介: 颜珣 (1980年生), 女, 硕士研究生; 通讯联系人: 邱礼鸿; E-mail: ls76@zsu.edu.cn

1.6 16S rDNA PCR 产物测序 采用 PCR 产物直接测序法，测序试剂盒 BigDye Terminator Kit v3.1 购自 PE ABI 公司，使用 ABI377 自动测序仪进行 DNA 测序。每条序列至少正反双向各测一次。

1.7 序列分析 利用 DNASTar 软件，用 Clustal 方法对本室测序得到的具角斯氏线虫共生菌的 16S rDNA 序列和从 GenBank 中下载的已描述共生菌的同源序列进行比对，计算距离矩阵并用邻接法绘制系统树，以分析其分类地位。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增及序列测定 使用引物对 4 株共生菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增，得到长度约为 570bp 的片段，与预期片段长度相符。测序结果显示 4 株共生菌的 16S rDNA 部分序列完全相同，长度为 524bp（不包括两端引物）。

2.2 构建系统发育树 以普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* 作为外群种（Outgroup）用邻接法构建基于 16S rDNA 序列的共生菌系统发育树（图 1），具角斯氏线虫共生菌

品系 GZ26，YNa38，YNa111 和 YNa170 与同属的其他 5 个种分开，独立为一个分支。各序列之间的序列相似性和遗传距离见表 1。从表 1 可看出，*X. japonicus* 与 *X. nematophila* 的序列相似性为 96.9%，具角斯氏线虫共生菌与 *X. nematophila* 的序列相似性最高，也仅为 96.6%，可推断具角斯氏线虫共生菌为 *Xenorhabdus* 属的一个新种。

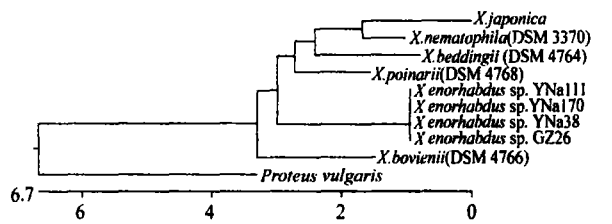


图 1 基于 16S rDNA 部分序列所构建的斯氏属线虫的共生菌的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of *Xenorhabdus* species, the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp., inferred from partial 16S rDNA sequences

表 1 *Xenorhabdus* 属共生菌 16S rDNA 部分序列的序列相似性和距离矩阵
Tab.1 The percent similarity (upper triangle) and divergence (lower triangle) of partial 16S rDNA sequences of the symbiotic bacteria of *Xenorhabdus*

种名	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. <i>X. japonica</i>	***	96.9	96	95	93.5	93.5	93.5	93.5	94.3	88
2. <i>X. nematophila</i> (DSM 3370)	2.3	***	95.8	95.6	96.6	96.6	96.6	96.6	95.4	88.5
3. <i>X. beddingii</i> (DSM 4764)	3.4	3.7	***	96.8	94.8	94.8	94.8	94.8	94.1	90.1
4. <i>X. poinarii</i> (DSM 4768)	3.8	3.3	2.9	***	95.4	95.4	95.4	95.4	95.6	89.5
5. <i>Xenorhabdus</i> sp. GZ26	5.2	3.5	4.3	3.5	***	100	100	100	95.4	90.2
6. <i>Xenorhabdus</i> sp. YNa38	5.2	3.5	4.3	3.5	0	***	100	100	95.4	90.2
7. <i>Xenorhabdus</i> sp. YNa111	5.2	3.5	4.3	3.5	0	0	***	100	95.4	90.2
8. <i>Xenorhabdus</i> sp. YNa170	5.2	3.5	4.3	3.5	0	0	0	***	95.4	90.2
9. <i>X. bovienii</i> (DSM 4766)	5.2	4.5	5.4	3.1	4.1	4.1	4.1	4.1	***	90.1
10. <i>Proteus vulgaris</i>	10.4	9.6	8.3	8.6	9.2	9.2	9.2	9.2	8.6	***

3 讨论

昆虫病原线虫共生菌是 20 世纪 60 年代才发现的，是肠杆菌科中研究较晚的一类特殊细菌。目前已描述的共生菌分为两个属：*Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus*^[8]。其中 *Xenorhabdus* 属有 5 个种：*X. nematophila*，*X. bovienii*，*X. poinarii*，*X. beddingii* 和 *X. japonica*^[9-11]。16S rDNA 已经成为细菌系统分类研究中最常用也是最有效的分子指标，被广泛的应用于各种微生物的遗传特性和分子差异的研究，同时国际上也建立了多个微生物 16S rDNA 序列数据库，成为对微生物鉴定分类非常有用的参照系统^[12]。对 GenBank 中 *Xenorhabdus* 属的这几个种的 16S rDNA 部分序列截取本实验所用片

段的序列进行比较，能够将 5 个种区别开来，这说明所选 16S rDNA 部分序列对共生菌的初步鉴定具有较高的参考价值。

具角斯氏线虫所携带共生菌的 16S rDNA 部分序列具有异杆菌属的标志性序列：208 - 211 位的 TTCG，与该属的 5 个已描述种的同源序列相似性在 95% 左右（表 1），系统发育树显示其处于 *X. bovienii* 和 *X. poinarii* 之间，与该属的其他种明显分开，可以推断具角斯氏线虫共生菌很可能为异杆菌属的一个新种。

我国有丰富的共生菌资源，目前已发现许多具有开发应用价值的新菌株，但对这些菌株尚未进行系统的分类鉴定，不利于其进一步的开发研究。本

文用分子分类方法对菌株 GZ26, YNa38, YNa111 和 YNa170 进行了分子鉴定, 确定了其分类学地位, 为以后其他共生菌的分类鉴定提供技术资料。

参考文献:

- [1] WEBSTER J M, HU C K, LI J. Bacterial metabolites[M]. CAB International, 2002: 99 - 114.
- [2] McINERNEY B V, GREGSON R P, LACEY M J, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., Part 1. Dithiolopyrrolone derivatives with antibiotic activity [J]. Journal of Natural Products, 1991, 54: 774 - 784.
- [3] 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]. Journal of Natural Products, 1991, 54: 785 - 795.
- [4] JIAN H, REID A P, HUNT D J. *Steinernema ceratophorum* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) a new entomopathogenic from northeast China [J]. Systematic Parasitology, 1997, 37: 115 - 125.
- [5] BEDDING R A, AKHURST R J. A simple technique for the determination of insect parasitic rhabditid nematodes in soils [J]. Nematology, 1975, 21: 109 - 110.
- [6] POINAR G O, THOMAS G M. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar & Thomas (Achromobacteraceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD - 136 (*Neoaplectana*: Steinernematidae) [J]. Parasitology, 1966, 56: 385 - 390.
- [7] 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.
- [8] 庞在堂, 杨怀文. 昆虫病原线虫共生菌的分类 [J]. 微生物学报, 2003, 43(4): 527 - 533.
- [9] AKHURST R J. Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1983b, 33: 38 - 45.
- [10] AKHURST R J, BOEMARE N E. A numerical taxonomic study of the genus *Xenorhabdus* (Enterobacteriaceae) and proposed elevation of the subspecies of *X. nematophilus* to species [J]. Journal of General Microbiology, 1988, 134: 1835 - 1845.
- [11] NISHIMURA Y, HAGIVARA A, SUZUKI T, et al. *Xenorhabdus japonicus* sp. nov. associated with the nematode *Steinernema kushidai* [J]. World Journal of Microbiological Biotechnology, 1994, 10: 207 - 210.
- [12] 曾润颖, 李根, 林昱. 一株具抗肿瘤活性的北极细菌的筛选及分子鉴定 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(6): 800 - 803.

Molecular Identification of the Symbiotic Bacteria of *Steinernema ceratophorum*

YAN Xun, XIN Zhi-hai, PANG Yi, QIU Li-hong

(State Key Laboratory for Biocontrol, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The taxonomic status of the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematode *Steinernema ceratophorum* was determined preliminarily using a fragment of 16S rDNA as molecular marker. The partial 16S rDNA sequences of the symbiotic bacteria obtained from four strains of *S. ceratophorum* collected from different localities in Guizhou and Yunnan provinces, respectively, were identical to each other. The resulting phylogenetic tree showed that the symbiotic bacteria of *S. ceratophorum* formed a distinct clad among *Xenorhabdus* spp., indicating that it is probably a new species of the genus.

Key words: Entomopathogenic nematodes; symbiotic bacteria; molecular identification; 16S rDNA; *Steinernema ceratophorum*; *Xenorhabdus*