昆虫病原线虫共生细菌的分子生物学鉴定*

王　欢[1]　董　辉[2]　丛　斌[2**]

（1. 沈阳农业大学生物科学技术学院　沈阳　110161；2. 沈阳农业大学植物保护学院　沈阳　110161）

Determined the taxonomic status of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria by 16S rDNA.

WANG Huan[1], DONG Hui[2], CONG Bin[2**] (1. *College of Biological Science and Technology*, *Shenyang Agricultural University*, Shenyang　10161, China; 2. *College of Plant Protection*, *Shenyang Agricultural University*, Shenyang　110161, China)

Abstract　Partial 16S rDNA genes sequences of 23 isolates and 5 reference strains of the genera *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* were determined by direct sequencing of PCR products. Aligned sequences against those from described species were subjected to phylogenetic analysis by DNAstar software. The results showed that 0396Y belonged to *X. bovinei*; 0312-4 belonged to *X. beddingii*.

Key words　*Xenorhabdus*, *Photorhadbus*, 16SrDAN, determine

摘　要　对来自全国各地的23个未鉴定的共生菌菌株和本室保存的5个菌株的部分16S rDNA序列进行PCR扩增和测序，与GenBank中已知种的共生菌及4个其它肠杆菌的同源序列比较，利用DNAstar软件绘制系统树，初步确定了这28个共生菌的分类地位。其中品系0396Y与*Xenorhabdus bovineii*的相似值为100%，可能是该种的一个品系；品系0312-4与*X. beddingii*的相似值为100%，可能是该种的一个品系。

关键词　昆虫病原线虫，共生菌，16S rDNA，鉴定

嗜线虫致病杆菌属*Xenorhabdus*和发光杆菌属*Photorhabdus*的昆虫病原线虫共生菌，能够产生杀虫毒素、各种抗生素，具有杀虫抑菌的双重活性，且杀虫毒素与目前应用的大多数毒素蛋白作用机理不同，因此昆虫很难对其形成抗性。自Bowen等从发光杆菌*P. luminescea* W-14菌株中分离纯化出一种高分子量外毒素蛋白复合体，并克隆出了表达这些外毒素蛋白的基因[1]后，有关昆虫病原线虫共生菌的研究已经成为人们关注的热点[2,6]。对于昆虫病原共生菌分类地位的确定，有助于确定杀虫基因的保守序列，是进一步进行杀虫基因改造、杀虫工程菌和转基因植物构建的基础。本研究立足于我国资源首次从全国范围内的不同地区土壤中分离昆虫病原线虫及其共生菌，得到了一批具有较高的杀虫活性的菌株，利用16S rDNA对高毒力菌株的分类地位进行了鉴定，以期为开发新的生物杀虫剂、杀虫毒素和杀虫新基因提供了新材料，也为共生菌的开发利用奠定良好的基础。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　共生菌品系：A24, HZ, NC34, otio, 15-2, Ht_1, 1, 2, 5, 8, 03100C, 03101Y, 03121H, 0312-4, 0321-2, 0355BC, 0355DJ, 0356H, 0361D, 0362W, 0384q, 0385D, 0386L, 0389, 0396Y, $0397C_2$, 0398B, 0399H由沈阳农业大学害虫生防实验室提供

1.1.2　引物：参照GenBank中昆虫病原线虫共生菌16S rDNA序列，根据资料，合成1对引物：Forward primer: 5′-CACGCTTTCGCACCTGA-3′

*国家自然科学基金(30170625)；国家"十五"攻关课题(2004BA509B04)；资助辽宁省自然科学基金(20022084)；沈阳农业大学青年教师科研基金资助项目(2005002)。

**通讯作者，E-mail: Cong_bin@21cn.com

重登收稿日期：2006-09-30，接受日期：2006-10-20

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

Reverse primer: 5′-ACACTGGGACTGAGACAC-3′。引物浓度是10 mmol/mL。

1.2 方法

(1)总 DNA 的提取: 总 DNA 的提取参照 Frederick 等提供的方法。

(2)PCR 扩增: ①PCR 反应体系。以总 DNA 为模板, 反应体系如下: dd water 31 μL, 10× PCR buffer 8 μL, Primer 1 2 μL, Primer 2 2 μL, dNTP 1 μL, 模板 5 μL, Taq 1 μL, Total Volume 50 μL。②PCR 反应条件。1× 94 ℃ 3 min, 35× 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min 30 s, 1× 72 ℃ 8 min

(3)电泳: 利用 1 %琼脂糖凝胶电泳(120 v, 20 min)检验总 DNA 的提取和 PCR 反应结果。

(4)测序: 由上海博亚公司完成。

(5)序列分析: 利用 DNAStar 软件, 根据 GenBank 中已知昆虫病原线虫共生菌的 16S rDNA 部分序列(表 1), 与测序得到的未知种的序列比较, 绘制系统发育树, 初步确定其系统发育关系和分类地位。

表 1 试验所用的 GenBank 中的已知 16S rDNA 序列

菌株	编号	序列长度
Xenorhabdus nematophila	D78009	297~647
X. pionarii	D78010	297~647
X. bovineii	D78007	297~647
X. beddingii	D78006	297~647
X. japonica	D78008	297~647
Photorhabdus luminescens	X82248	409~660
P. asymbiotica	AY217761	271~622
P. temperata	X82249	292~643
Erwinia carotovora	M59149	324~675
Escherichia coli	M24911	323~674
Serratia marcescens	M59160	325~676
Treponema sp.	M59294	346~691

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 部分片段的 PCR 扩增

为比较各菌株间的系统发育关系, 利用同 1 对引物对本实验室分离保存的 28 个共生菌品系的部分 16S rDNA 片段进行 PCR 扩增, 均扩增出 1 条约为 500 bp 的片断(图 1)。

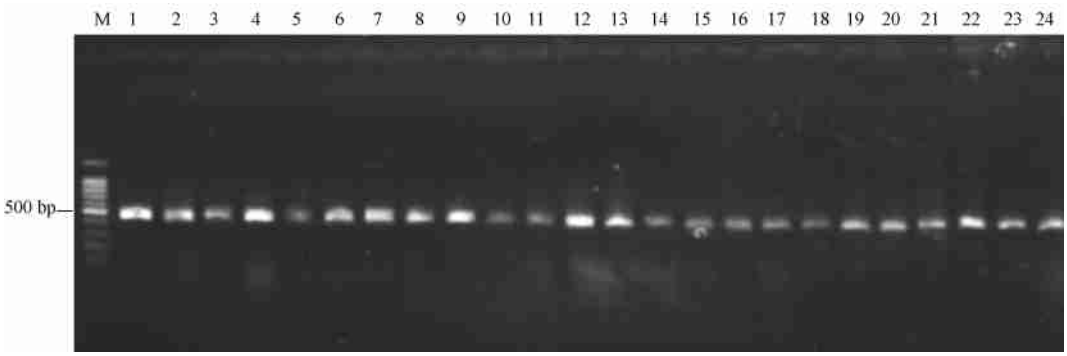

图 1 共生菌菌株 16S rDNA PCR 扩增结果

1. A24-6R 2. Ht1-1R 3. 1-1R 4. 2-2R 5. 5-5B 6. 8-3B 7. 03100C-2R 8. 03101Y-2R 9. 0399H-2R 10. 03121H-3B 11. 0312-4-2B 12. 0321-2-1B 13. 0355BC-1B 14. 0355DJ-3R 15. 0356H-2R 16. 0361D-2R 17. 0362W-1B 18. 0384q-1R 19. 0385D-1B 20. 0386L-3B 21. 0389-2R 22. 0396Y-5B 23. 0397C2-1B 24. 0398B-2R

2.2 共生菌 16S rDNA 部分测序分析

24 个未鉴定品系的共生菌菌株的部分 16S rDNA 测序后, 取约 420 bp 的片段与 GenBank 中已知种的共生菌及 4 个其它肠杆菌的同源序列比较, 利用 DNAstar 软件绘制系统树(图 2)。

40 个细菌的部分 16S rDNA 的系统树明显分成 3 簇, 其中 2 簇分别由来自昆虫病原线虫共生菌的嗜线虫致病杆菌属和发光杆菌属组成, 另一簇则由 *Erwinia carotovora*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* 和 *Treponema* sp. 4 个非昆虫病原线虫共生菌细菌组成, 可作为昆虫病原线虫共生菌的外群。昆虫病原线虫共生菌的嗜线虫致病杆菌和发光杆菌 2 个属间的相似值在 80%~90%之间, 发光杆菌属内种间的相似

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n

值为 85%～95%，嗜线虫致病杆菌属内种间的相似值为 92%～100%，种内品系间的相似值均在 90%以上。区别嗜线虫致病杆菌和发光杆菌 2 个属的 DNA 碱基差别在 16S rDNA 上的第 387 和 620 位置（*Escherichia coli numbering*），所有的嗜线虫致病杆菌为 G 和 C，而发光杆菌则为 A 和 A。

图 **2**　供试共生菌的 **16**S rDNA 系统树

在发光杆菌中，品系 2，15-2 和 HZ 与 *P. luminescens* 关系密切，其中 15-2 和 HZ 是本室保存的已知品系，均属 *P. luminescens*。在嗜线虫致病杆菌中，7 个共生菌品系（A24，0355BC，otio，03100C，03121H，03101Y 和 0355DJ）与 *X. nematophila* 的关系密切，其中品系 A24 和 0355BC 与 *X. nematophila* 的相似值分别为 100%和 99.7%，可能是该种的一个品系，而品系 03100C 与 *X. nematophila* 的相似值仅为 94.6%，其分类地位还很难确定，品系 A24 是本室保存的已知种，属 *X. nematophila*，其它品系与 *X. nematophila* 的相似值均在 99%以上；品系 0396Y 与 *X. bovineii* 的相似值为 100%，可能是该种的一个品系；4 个共生菌品系（5，8，0321-2 和 NC34）与 *X. pionarii* 的同源性均很高，其中品系 NC34 是本室保存的已知种，属 *X. pionarii*，其它 3 个品系与 *X. pionarii* 的相似值均在 99%以上，而高毒力品系 5 与 *X. pionarii* 的同源性可达 99.7%，可能为该种的一个品系；品系 0397C2 和 0356H 与 *X. japonica* 的相似值分别为 100%和 99.7%，可能均为该种的一个品系；8 个未知共生菌品系（1，0312-4，0384q，0385D，0386L，0389，0398B 和 0399H）与 *X. beddingii* 关系密切，其中品系 0312-4 与 *X.*

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.n

beddingii 的相似值为 100%，可能是该种的一个品系，其它 7 个品系与 *X. beddingii* 相似值均在 99%以上；品系 0361D 和 0362W 仅与 *X. bovineii* 的关系稍近，相似值分别为 95.5%和 91.9%，与 *X. nematophila* 的相似值分别为 94.9%和 91.2%，与 *X. japonica* 的相似值分别为 92.9%和 90.9%，与 *X. pionarii* 的相似值仅为 91.2%和 91.4%，其分类地位还无法确定；Ht1 与任何一个已知品系的同源性均不高，相似值均在 90%以下，有可能是一个新种或新亚种，其分类地位尚无法确定。

3 讨论与结论

近年来，随着分子生物学的迅速发展，特别是聚合酶链式反应(PCR)技术的出现及核酸测序技术的不断完善，产生了许多新的分类方法，这些方法从遗传的角度去认识细菌，从分子水平进行分类与鉴定，使细菌的分类越来越科学和精确。目前，利用 16S rDNA 进行细菌鉴定已广泛用于临床诊断及农业[2]、环保等多种微生物的鉴定。

最近利用 16S rDNA 对昆虫病原线虫共生菌进行种类的鉴定也得到广泛的应用。Liu 等研究昆虫病原线虫共生菌的系统发育关系时所采用的部分 16S rDNA 序列均包含有明确区 *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus* 2 个属的位于 208～211(*E. coli numbering*)信号片段，所有的 *Xenorhabdus* 种类此位置的序列为 UGAAAG[3]。本研究利用 16S rDNA 中 323～647(*E. coli numbering*)约 420 bp 的片段，并不包含此位置的序列，但在 387 和 620 位置(*E. coli* numbering)也有区别 *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus* 2 个属的信号碱基，所有的嗜线虫致病杆菌为 G 和 C，而发光杆菌则为 A 和 A。

对来自全国各地的 23 个未鉴定的共生菌菌株和本室保存的 5 个菌株的部分 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增和测序，与共生菌的已知种的同源序列进行比较分析，构建了系统树，初步确定了这 28 个共生菌的分类地位，同时也表明系统树可以正确的区分属和种的关系，与 Liu 等人的研究结果一致。这些菌株明显的分成嗜线虫致病杆菌和发光杆菌 2 个簇，其中高毒力品系 5 与 *X. pionarii* 的同源性可达 99.7%，可能为同一种。

尽管很多研究已证实仅对部分 16S rDNA 测序进行比较就足以建立系统进化关系，并能够成功地区别不同的属和种。但也有关于 DNA-DNA 杂交与 16S rDNA 序列结果不一致的报道[4]，因此本研究中各品系共生菌分类地位的最后确定，还需结合共生线虫的鉴定、细菌形态特征及生理生化特征等方法做进一步的分析。

在 23 个未鉴定的共生菌品系中，以辽宁省内土样中分离得到的品系最多(共 11 个品系)，而且根据 16S rDNA 系统树，与这些品系共生菌共生的线虫均属斯氏线虫属。王勤英报道，自河北省内采集的 719 份土样中分离得到了 28 个线虫品系，其中 25 个品系属异小杆线虫属，而仅有 3 个品系属斯氏线虫属[5]，说明不同地区，土壤中线虫的种类不同，这可能与各地区的气候、土质及植被等因素有关。我国地域宽广，气候复杂多样，有丰富的昆虫病原线虫资源，其中一定还存在着具有较高杀虫活性的共生菌菌株，发展前景广阔。

参 考 文 献

1 Bowen D. J., Rocheleau T. A., Blackburn M., Andreev O., Golubeva E. *Science*, 1998, **6**: 2 129～2 132

2 彭桂香, 陈文新. 微生物学通报, 2000, **4**: 237～241.

3 Liu J., Berry R. E., Blouin M. S. *J. Invertb. Pathol.*, 2001, **77**: 87～91.

4 Sneath P. H. A. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1993, **43**: 626～629

5 王勤英. 博士学位论文. 保定: 河北农业大学, 2004.

6 夏颖伟, 韩日畴, 李瑞军. 昆虫知识, 2006, **43**(3): 284～287.

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.n