

昆虫病原线虫共生细菌的分子鉴定及其培养特性的初步研究

方香玲^{a,b}, 郭琪^b, 易晓华^b, 王永宏^b, 张兴^b

(西北农林科技大学 a. 生命科学学院, b. 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] **【目的】**确定昆虫病原线虫共生细菌 YL001 和 YL002 菌株的分类及其系统进化地位,并为该类生物资源的后续研究及开发应用奠定基础。**【方法】**对 YL001 和 YL002 菌株进行分子鉴定,PCR 扩增并克隆其 16S rRNA 全序列,对其全序列进行了序列测定及系统进化分析,并采用参数测定法对其培养特性进行了初步研究。**【结果】**YL001 和 YL002 菌株与嗜线虫致病杆菌(*Xenorhabdus nematophila*)种内菌株形成一个类群,序列同源性大于 99%,与发光杆菌(*Photorhabdus*)属内菌株的序列同源性大于 94%。2 菌株的延缓期、对数生长期、稳定期和衰亡期分别为 0~6, 6~18, 18~66 和 66 h;培养 12 h 后, YL001 和 YL002 菌株发酵液的 pH 值分别降低至 5.70 和 5.56,此后逐渐上升,至发酵结束时其 pH 值分别为 7.74 和 8.07;培养 0~18 h 时 2 菌株发酵液中还原糖含量迅速降低,此后保持稳定;12 h 时氨基氮含量达到最低,此后开始缓慢上升;YL001 菌株培养 54 h 后及 YL002 菌株培养 42 和 66 h 后,其对番茄灰霉病菌和枯草芽孢杆菌的抑制作用最强。**【结论】**YL001 和 YL002 菌株属于嗜线虫致病杆菌种内的菌株;YL001 和 YL002 菌株的培养特性符合细菌生长和代谢的一般规律,其适宜的发酵周期分别为 54 和 66 h。

[关键词] 昆虫病原线虫;共生细菌;16S rRNA 全序列;系统发育树;培养特性

[中图分类号] S476.15

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)12-0199-06

Molecular identification and cultivation characteristics of entomopathogenic bacteria

FANG Xiang-ling^{a,b}, GUO Qi^b, YI Xiao-hua^b, WANG Yong-hong^b, ZHANG Xing^b

(a. College of Life Sciences, b. Research and Development Center of Biorational Pesticides, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】**The research determined the classification and systemic evolution status of entomopathogenic bacteria YL001 and YL002, and laid the foundation for further research, development and application of such biological resource. **【Method】**Molecular identification was done for YL001 and YL002 strain, the complete 16S rRNA sequence was amplified and cloned; Sequence and phylogenetical analysis were studied with parameters determination. **【Result】**Strains YL001 and YL002 formed a monophyletic clade with strains of *X. nematophilus* with sequence homology outweighing 99% and the sequence homology to genus *Photorhabdus* outweighing 94%. The lag, logarithmic, stationary and contabescence phase of the two bacteria were 0—6, 6—18, 18—66 and 66 h respectively; pH of strains YL001 and YL002 reduced to 5.70 and 5.56 at 12 h, respectively, and then rose gradually to 7.74 and 8.07 respectively when culture finished. Glucose content reduced quickly during 0—18 h, and then kept stable. Amido nitrogen content

* [收稿日期] 2007-12-11

[基金项目] 国家“863”计划项目(2003AA241140);西北农林科技大学青年学术骨干支持项目(52211241)

[作者简介] 方香玲(1984—),女,河南平顶山人,在读硕士,主要从事天然产物的研究与开发。E-mail:fxl840211@gmail.com

[通讯作者] 王永宏(1968—),男,陕西凤翔人,副教授,博士,主要从事生物农药及发酵技术研究。

reached the lowest at 12 h and then rose slowly. YL001 exhibited the highest inhibitory effects at 54 h and YL002 exhibited highest inhibitory effects at 42 and 66 h respectively on *B. cirerea* and *B. subtilis*.【Conclusion】 Strains YL001 and YL002 belonged to *X. nematophilus*. Cultivation characteristics of strains YL001 and YL002 were in accordance with the general disciplines of bacteria growth and metabolism, and the optimum fermentation period was 54 and 66 h respectively.

Key words: Entomopathogenic nematode; symbiotic bacterium; 16S rRNA complete sequence; phylogenetic tree; cultivation characteristic

昆虫病原线虫共生细菌是寄生于昆虫病原线虫肠道内的一种革兰氏阴性细菌,包括致病杆菌(*Xenorhabdus*)和发光杆菌(*Photorhabdus*)属,分别与斯氏线虫(*Steinernema*)和异小杆线虫(*Heterorhabditis*)共生。肠杆菌科(Enterobacteriaceae)^[1]存在于侵染期线虫的肠道内,在昆虫血腔内繁殖,产生毒素并分解昆虫的营养物质,使其患败血症而死亡^[2-3]。该共生菌可直接作为线虫营养源,并分解其他营养物质且产生大量抑菌成分,为线虫提供理想的生长发育和繁殖环境^[1]。由于共生菌具有多种生物学功能,如能产生抑菌物质^[4-5]、杀虫物质^[6]、抗癌物质^[7]及胞外酶、胞内晶体蛋白、色素和荧光素^[1]等,故其在农业和医药卫生领域具有广阔的应用前景。

随着细菌分类学的发展,以生理生化为主的分类体系已被以生理生化为基础结合分子生物学技术的多相分类所取代。16S rRNA 作为一个分子指标已被广泛应用于共生菌的遗传特征和分子差异研究^[8-10]。大量已知共生菌的 16S rRNA 序列已输入到国际基因数据库,成为该类共生菌鉴定和分类的非常有用的参照系统。

昆虫病原线虫共生菌 YL001 和 YL002 菌株是从陕西杨凌采集的昆虫病原线虫的肠道内分离得到的,王永宏等^[11]已对其生理生化等特征进行了初步研究,认为 YL001 和 YL002 菌株分别为嗜线虫致病杆菌(*X. nematophila*)和伯氏致病杆菌(*X. bovienii*)种内的菌株。为进一步确定其分类及系统进化地位,本研究进一步对 YL001 和 YL002 菌株进行了分子鉴定,并对其培养特性进行了初步研究,以期对共生细菌这一生物资源的后续研究及开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 昆虫病原线虫共生菌 YL001 和 YL002 菌株,由西北农林科技大学无公害农药研究

服务中心提供。

1.1.2 供试病原菌 番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.1.3 培养基 (1)菌种活化培养基。NB 培养基(牛肉膏 3.00 g,蛋白胨 5.00 g,蒸馏水 1 000 mL)。(2)鉴别培养基。NBTA 培养基(NB 培养基,氯化三苯基四氮唑(TTC)0.04 g,溴麝香草酚蓝(BTB)0.025 g,琼脂 12.00 g,蒸馏水 1 000 mL)。(3)发酵培养基。葡萄糖 6.13 g,蛋白胨 21.29 g, MgSO₄ 1.50 g, (NH₄)₂SO₄ 2.46 g, KH₂PO₄ 0.86 g, K₂HPO₄ 1.11 g, Na₂SO₄ 1.72 g, 蒸馏水 1 000 mL。以上 3 种培养基的 pH 为 7.2~7.4。(4)病原真菌培养基。PDA 培养基。

1.2 YL001 和 YL002 菌株的分子鉴定

1.2.1 共生菌的培养 挑取共生菌单菌落于 NB 培养基,在 28 ℃ 180 r/min 活化 24 h 后划线于 NB-TA 平板,28 ℃ 培养 48 h,取蓝色初生型单菌落置于含有 20 mL NB 培养液的三角瓶中,同样条件下振荡培养 16 h。

1.2.2 总 DNA 的提取及 16S rRNA 的 PCR 扩增

总 DNA 的提取参照 Brunel 等^[8]描述的方法进行。引物对为 P1(5'-GGA GAG TTA GAT CTT GGC TC-3')和 P2(5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3')。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。反应体系为 25 μL:40 ng 模板 DNA 2.0 μL, 10×PCR Buffer(Mg²⁺) 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL, 2 μmol/L 引物对 5.0 μL, 1 U Taq 酶 0.2 μL。扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 90 s, 共 35 个循环,最后 72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 扩增产物的电泳、回收、克隆及测序 扩增产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测,用 H. Q. &. Q. 凝胶回收试剂盒回收目标片段,回收产物与 pGEM-T easy 载体连接过夜。42 ℃ 热击法转化 JM109 感受态细胞,与 X-gal 和 IPTG 一同涂于

含氨苄青霉素的 LB 平板上。37 ℃ 培养 8~12 h。采用碱裂解法提取少量重组质粒 DNA,经 PCR 鉴定,筛选出含有目标外源片段的重组质粒,送上海英俊生物技术有限公司测序。

1.2.4 序列分析及系统进化树的构建 将 YL001 和 YL002 菌株的 16S rRNA 序列,与从 GenBank 核酸序列数据库(NCBI)中经 Blast 比对获取的 11 株致病杆菌属菌株的 16S rRNA 进行比较,以 3 株发光杆菌属菌株为外群种。用 DNAMAN 6.0 软件进行多序列同源性分析,并构建系统发育树。

1.3 YL001 和 YL002 菌株的培养特性

将 1.2.1 培养好的共生菌以 9%的接种量转接于装有 200 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,同样条件下连续培养 72 h,每隔 6 h 取样,置 4 ℃ 冰箱备用。

1.3.1 生长曲线的绘制 将不同培养时间的发酵液稀释 10 倍后,用分光光度计测其在 620 nm 波长处的吸光值,以培养时间为横坐标,以吸光值为纵坐标绘制生长曲线。

1.3.2 pH 值的测定 用 pH 计测定不同培养时间发酵液的 pH 值。

1.3.3 培养液中主要营养成分的测定 采用 3,5-二硝基水杨酸法^[12],测定不同培养时间发酵液中的还原糖含量,采用甲醛滴定法^[12]测定不同培养时间

发酵液中的氨基氮含量。

1.3.4 抑菌活性的测定 采用生长速率法^[13-14]测定不同培养时间菌株发酵液对番茄灰霉病菌的抑制作用。用融化的 PDA 培养基将不同培养时间的菌株发酵液稀释 10 倍,分别取 10 mL 倒入直径 90 mm 的灭菌培养皿内,制成平板,每处理 3 次重复,以发酵培养基为对照。在培养 3 d 的番茄灰霉病菌菌落周围打直径 4 mm 的菌块,置于平板中央,于 25 ℃ 黑暗条件下培养 72 h,测量菌落直径,计算抑制率。

采用琼脂扩散法^[4]测定不同培养时间的菌株发酵液对枯草芽孢杆菌的抑制作用。在带菌平板上打 3 个直径 7.5 mm 的孔,每孔加入 100 μL 发酵液,每处理 3 次重复,以发酵培养基为对照,28 ℃ 培养 48 h,用十字交叉法测量抑菌圈直径。

2 结果与分析

2.1 YL001 和 YL002 菌株的分子鉴定

2.1.1 总 DNA 的提取、16S rRNA 序列 PCR 扩增及胶回收产物 从 YL001 和 YL002 菌株提取的总 DNA 约为 23 kb(图 1-A)。对其 16S rRNA 序列进行 PCR 扩增后,均可扩增出 1 条约 1 500 bp 的片段(图 1-B)。将得到的 PCR 产物纯化后可得到明亮且单一的目标条带(图 1-C)。

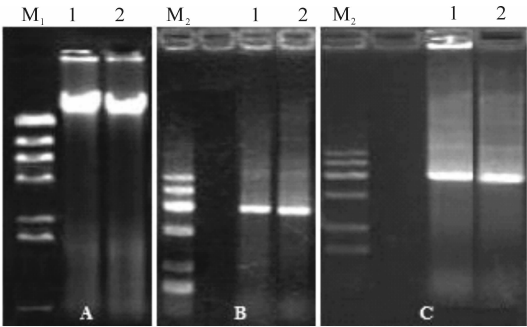


图 1 YL001 和 YL002 菌株的总 DNA、16S rRNA 序列 PCR 扩增和胶回收产物

M₁. λ DNA/Hind III; M₂. Maker VII; 1. YL001; 2. YL002

Fig.1 Total DNA,16S rRNA PCR amplification and gel extraction results of strains YL001 and YL002

M₁. λ DNA/Hind III; M₂. Maker VII; 1. YL001; 2. YL002

2.1.2 PCR 扩增产物的克隆、鉴定及测序 纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T easy 载体连接后,可得到约 4 000 bp 的条带(图 2-A)。重组质粒经 PCR 扩增鉴定后,均可得到与总 DNA 16S rRNA 扩增产物相同的片段(图 2-B),说明该克隆含有目标外源

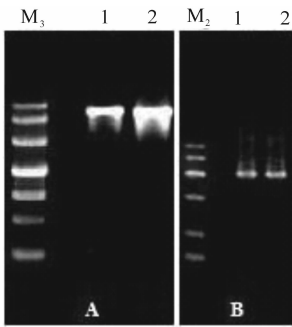


图 2 YL001 和 YL002 菌株的 16Sr RNA 重组质粒及其鉴定

M₂. Maker VII; M₃. Maker III; 1. YL001; 2. YL002

Fig.2 16Sr RNA recombine plasmid and identification of strains YL001 and YL002

M₂. Maker VII; M₃. Maker III; 1. YL001; 2. YL002

片段。将双向测序后的序列用 DNAMAN 6.0 软件进行拼接,去掉引物区后可得到 16S rRNA 全序列。YL001 和 YL002 菌株 16S rRNA 序列的大小分别为 1 496 和 1 497 bp,在 GenBank 的注册号分别为 EU124381 和 EU124383。

2.1.3 参比菌株的系统发育分析及 16S rRNA 序列相似性的比较 以 11 株致病杆菌属菌株为参比菌株,以 3 株发光杆菌属菌株为外群种,用 DNA-MAN 6.0 软件构建的系统发育树见图 3(所用参比菌株的信息均来自 GenBank)。由图 3 可见,YL001 和 YL002 菌株与嗜线虫致病杆菌种内的菌株

ATCC 19061 和 DSM 3370 的亲缘关系最近,形成了 1 个族群,序列同源性为 99.1%~99.5%;与致病杆菌属内其他 9 个种的代表菌株的序列同源性为 95.1%~98.1%;与发光杆菌属内 3 个种的代表菌株的序列同源性为 94.2%~95.6%。

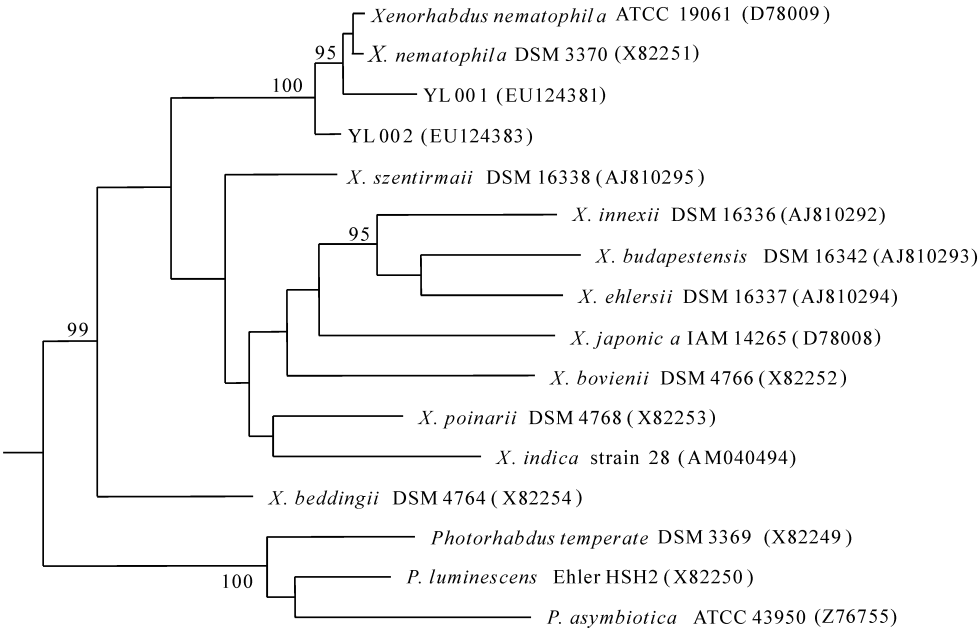


图 3 利用 16S rRNA 序列构建的菌株 YL001 和 YL002 与致病杆菌属和发光杆菌属各种间的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on the homology of 16S rRNA sequences of strains YL001 and YL002 and members of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*

2.2 YL001 和 YL002 菌株的培养特性

2.2.1 菌株生长曲线分析 由图 4 可见,2 菌株呈现出相似的生长趋势,延缓期为 0~6 h,对数生长期

为 6~18 h,于培养 24 h 后 2 菌株的生长均达到稳定期,66 h 后二者均进入衰亡期。培养 12 h 后, YL001 菌株的生长速度明显高于 YL002 菌株。

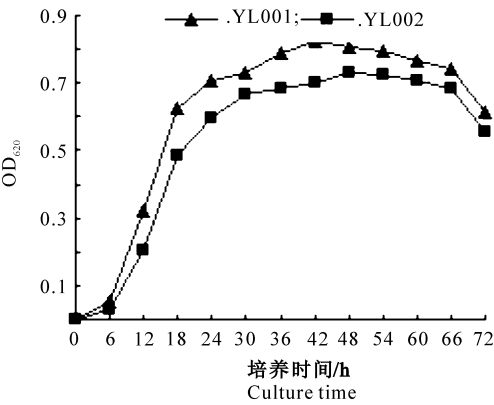


图 4 YL001 和 YL002 菌株的生长曲线
Fig. 4 Growth curve of strains YL001 and YL002

2.2.2 培养过程中 pH 值的变化 由图 5 可知,培养 12 h 后, YL001 和 YL002 菌株发酵液的 pH 值分别降低至 5.70 和 5.56,此后 pH 值开始上升;培养 48 h 后, YL001 菌株的 pH 值稳定在 7.7 左右;

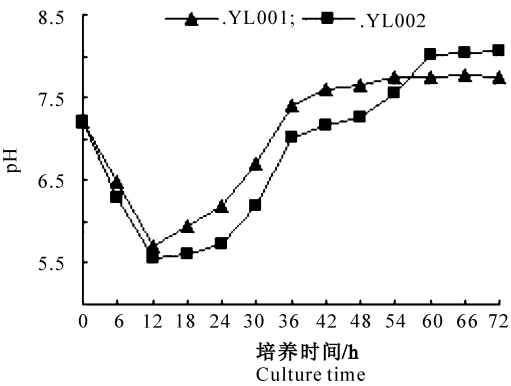


图 5 YL001 和 YL002 培养过程中 pH 的变化
Fig. 5 pH variety of strains YL001 and YL002

培养 60 h 后, YL002 菌株的 pH 值稳定在 8.0 左右。发酵结束时, YL001 和 YL002 菌株发酵液的 pH 值分别为 7.74 和 8.07。

2.2.3 培养过程中主要营养成分含量的变化 由

图 6 可以看出, YL001 和 YL002 菌株发酵液中还原糖含量的变化趋势基本相似。在培养的 0~18 h, 二者还原糖含量均迅速降低, 这一阶段 2 菌株消耗了 80% 左右的总糖; 培养 18 h 后, 还原糖含量保持稳定; 至发酵结束时, YL001 和 YL002 菌株发酵液中残糖含量分别为 0.89 和 1.05 g/L。由图 7 可见,

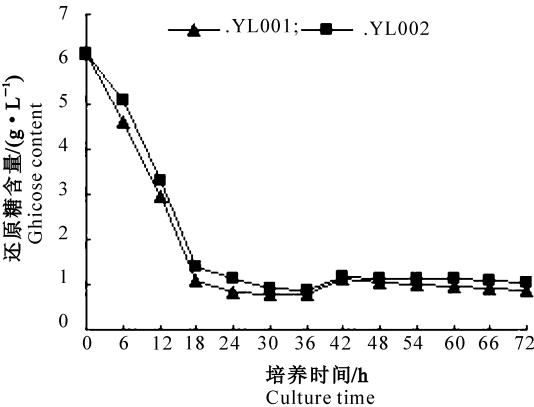


图 6 YL001 和 YL002 菌株培养过程中
还原糖含量的变化

YL001 和 YL002 菌株发酵液中氨基氮含量的变化也表现出相似的趋势, 在培养 0~12 h, 二者氨基氮含量迅速降低, 随后缓慢上升。培养后期随氮源分解速度的下降, 氨基氮利用速度降低, 从而使培养液中的氨基氮含量保持相对稳定。

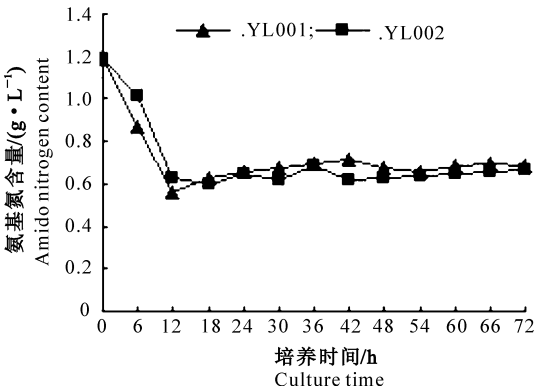


图 7 YL001 和 YL002 菌株培养过程中
氨基氮含量的变化

Fig. 6 Glucose content of the culture broth of strains YL001 and YL002 during the culture

2.2.4 YL001 和 YL002 不同培养时间发酵液的抑菌活性 由图 8,9 可以看出, YL001 菌株培养 54 h 后, 其对番茄灰霉病菌(抑制率 95.6%)和枯草芽孢杆菌(抑菌圈直径 26.8 mm)的抑制作用均最强。

Fig. 7 Amido nitrogen content of the culture broth of strains YL001 and YL002 during the culture

YL002 菌株培养 42 h 后, 其对番茄灰霉病菌的抑制作用最强, 抑制率为 100%; 培养 66 h 后, 其对枯草芽孢杆菌的抑制作用最强, 抑菌圈直径为 25.0 mm。

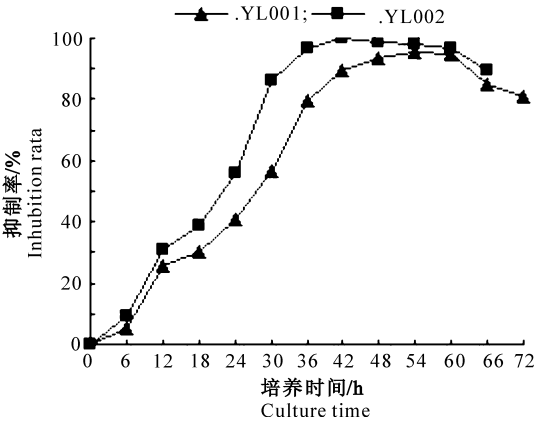


图 8 YL001 和 YL002 菌株不同培养时间
发酵液对番茄灰霉病菌的抑制作用

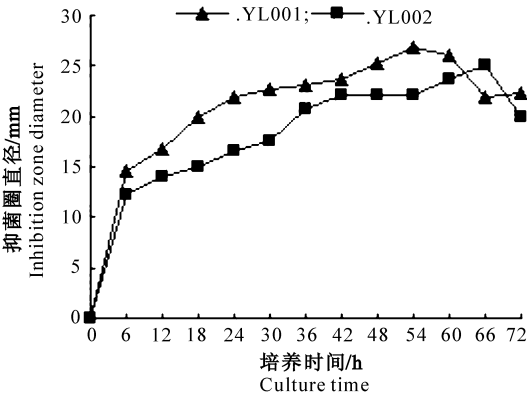


图 9 YL001 和 YL002 菌株不同培养时间
发酵液对枯草芽孢杆菌的抑制作用

Fig. 8 Inhibitory effect of the culture broth of strains YL001 and YL002 on *B. cinerea*

Fig. 9 Inhibitory effect of the culture broth of strains YL001 and YL002 on *B. subtilis*

3 讨论

昆虫病原线虫共生细菌的传统分类主要依靠其生理生化等特征来进行, 但共生菌菌株之间存在非

常相似的表型特征, 同时在培养过程中的形态变异亦会导致某些生理生化特征的改变, 因此仅依靠生理生化等特征准确区分不同菌株较为困难。基于 16S rRNA 序列分析的系统发育学, 对共生菌的鉴

定具有很好的参考价值^[8-10]。从本研究构建的系统发育树和 16S rRNA 序列同源性分析可知,YL001 和 YL002 菌株属于嗜线虫致病杆菌种内的菌株,该结果与王永宏等^[11]通过生理生化等特征对 YL001 菌株的鉴定结果一致。王永宏等^[11]通过生理生化等特征分析认为,YL002 菌株属于伯氏致病杆菌种内菌株。而本研究表明,YL002 菌株与嗜线虫致病杆菌种内的菌株形成一个类群且序列同源性大于 99%,亦应属于该种内的菌株。这说明同一菌株,依据 16S rRNA 序列的鉴定结果和依据生理生化等特征的鉴定结果并不一定完全一致,因此应采用不同的方法对菌种进行更为准确系统的鉴定。

YL001 和 YL002 菌株在培养 18 h 后,其培养液中还原糖和氨基氮含量保持稳定,这与 2 菌株的稳定生长期基本吻合。在培养过程中,pH 均表现出先下降后上升的趋势,这与李明华等^[15]、刘洪敏等^[16]对共生细菌的研究结果相似。在培养前期,菌体有一个适应过程,培养液中大量的碳源被共生菌所利用,同时产生酸性物质,导致培养液 pH 下降;适应期过后,培养液 pH 逐渐上升,过高的 pH 值既影响了细菌的生长,又可能使抑菌成分降解,从而导致培养后期 2 菌株的抑菌活性下降。YL001 菌株培养 54 h 后及 YL002 菌株分别培养 42 和 66 h 后,对番茄灰霉病菌和枯草芽孢杆菌的活性均可达到最高。因此,YL001 和 YL002 菌株的适宜发酵周期分别为 54 和 66 h,该研究结果为 YL001 和 YL002 菌株的后续研究和开发应用奠定了基础,但关于其抑菌机理及抑菌活性成分,将是下一步研究的主要内容。

4 结 论

本研究利用分子生物学方法确定了 YL001 和 YL002 菌株的分类地位,结果表明,YL001 和 YL002 菌株属于嗜线虫致病杆菌种内的菌株,这为今后其他共生细菌的分类鉴定提供了技术资料。YL001 和 YL002 菌株的培养特性,符合细菌生长和代谢的一般规律,其适宜发酵周期分别为 54 和 66 h。

[参考文献]

[1] Gaugler R. Entomopathogenic nematology [M]. New York: CABI Publishing,2002.

[2] Martens E C, Heungens K, Goodrich-Blair H. Early colonization events in the mutualistic association between *Steinernema carpocapsae* nematodes and *Xenorhabdus nematophila* bacte-

ria [J]. J Bacteriol,2003,185:3147-3154.

[3] Waterfield N R, Bowen D J, Fetherson J D, et al. The toxin complex genes of *Photorhabdus*: a growing gene family [J]. Trends Microbiol,2001,9:185-191.

[4] Ji D, Yi Y, Kang G H, et al. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major pant-pathogenic bacteria [J]. FEMS Microbiology Letters,2004,239:241-248.

[5] Saacson P J, Webster J M. Antimicrobial activity of *Xenorhabdus* sp. PIO (Enterobacteriaceae), symbiont of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* (Rhabditida: Steinernematidae) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2002,79:146-153.

[6] Hffrench R, Dowlingb A, Waterfieldb N R. Insecticidal toxins from *Photorhabdus bacteria* and their potential use in agriculture [J]. Toxicon,2007,49:436-451.

[7] Webster J M, Li J, Chen G. Anticancer property of dithiopyrrolones; US,6020360 [P]. 2000-02-01.

[8] 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]. Appl Environ Microbiol,1997,63:574-580.

[9] liu J, Berry R E, Blouin M S. Identification of symbiotic bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema ore-gonense* based on 16S rDNA sequence [J]. Journal of Invertebrate Pathology,2001,77:87-91.

[10] Somvanshi S S, Lang E, Ganguly S, et al. A novel species of *Xenorhabdus*, family Enterobacteriaceae: *Xenorhabdus indica* sp. nov, symbiotically associated with entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum* Ganguly and Singh, 2000 [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29: 519-526.

[11] 王永宏, 张 兴. 2 株昆虫害病原线虫共生菌的分离与初步分类鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34 (12): 174-180.

Wang Y H, Zhang X. Isolation and identification of symbiotic bacteria associated with entomopathogenic nematodes [J]. Jour of Northwest A&F University: Nat Sci Ed, 2006, 34 (12): 174-180. (in Chinese)

[12] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 97-100, 188-191.

Chen Y Q. Experimental methodology and technology of biochemistry [M]. Beijing: Science Publishing, 2002: 97-100, 188-191. (in Chinese)

[13] 农业部农药检定所. NY/T 1156. 2—2006 农药室内生物测定试验准则 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.

Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture. NY/T 1156. 2—2006 Pesticides guidelines for laboratory bioactivity tests [S]. Beijing: China Agricultural Publishing, 2006. (in Chinese)