

昆虫病原线虫共生细菌致病机理的研究进展

王立霞¹ 杨怀文¹ 黄大昉²

(¹ 中国农业科学院生物防治研究所 北京 100081)

(² 中国农业科学院生物技术研究所 北京 100081)

PATHOGENIC MECHANISM OF ENTOMOPATHOGENIC BACTERIA— *XENORABDUS AND PHOTORHABDUS*

Wang Lixia¹ Yang Huaiwen¹ Huang Dafang²

(¹ Institute of Biological Control, CAAS, Beijing 100081)

(² Institute of Biotechnology, CAAS, Beijing 100081)

关键词 嗜线虫致病杆菌 发光杆菌 致病性

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2000)04-0448-51

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细菌,革兰氏染色呈阴性,属肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌^[1]。它包含两个属——嗜线虫致病杆菌属(*Xenorhabdus*)和发光杆菌属(*Photorhabdus*),它们分别与斯氏线虫(*Steinernema*)和异小杆线虫(*Heterorhabditis*)共生。这两种线虫由于杀虫能力强,是最有应用潜力的昆虫病原线虫。它们之间的共生关系可以概括为:共生菌存在于线虫的肠道内,线虫携带共生菌进入寄主昆虫体内,并将共生菌释放到昆虫的血腔中;共生菌在昆虫血腔内繁殖,产生毒素和抑菌物质,使昆虫患败血症,一般在 48h 内死亡;共生菌能分解营养物质,提供线虫繁殖发育所需的营养,同时共生菌产生的抗生素,能抑制其它杂菌的污染,为线虫的生长发育繁殖提供理想的环境。

为了更好地阐述昆虫病原线虫共生细菌的致病机理,在此简要地解释一下共生菌的“型态变异”。型态变异是共生菌的一个重要生物学特性。共生菌在琼脂培养基上产生两种形态的菌落,定为 I 型和 II 型^[2]。昆虫病原线虫共生菌的两型菌除了在菌落形态上有很大不同,它们之间的生理生化特征也有明显的区别。I 型菌具备的一些生理生化特性:如能吸收染料,分泌蛋白酶和脂酶,产生胞内晶体蛋白,产生抑菌物质,产生色素及荧光素(荧光素只对 *Photorhabdus* 而言);II 型菌皆不具备或仅有少量的上述代谢物产生^[3],而且侵染期线虫体内只携带 I 型菌,II 型菌则出现在 I 型菌的体外培养物中^[4]。

侵染期线虫携带共生菌进入寄主体腔,一般侵入 5h 就可在寄主昆虫的血腔内检测到释放的共生菌,通常昆虫(幼虫)在 48h 内死亡^[5]。多数昆虫病原线虫共生菌被引入寄主血腔时都有很高的致病力,通常 LD₅₀ 为 1~5 个菌细胞。昆虫病原线虫共生菌的致病性主要集中在以下几个方面:共生菌抵抗昆虫的防御机制;共生菌产生对昆虫有杀伤作用的内毒素和外毒素及一些胞外酶;共生菌产生的次生代谢物也有一定的杀虫作用;另外,线虫在共生菌的致病力方面起到了很大的作用。

作者简介 王立霞(1972—),女,河北省人,中国农业科学院在读博士生,主要从事昆虫病原线虫共生细菌的研究

收稿日期:1999-03-15,修回日期:1999-10-10 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

1 抗免疫反应

除了突破寄主的结构障碍,有效的昆虫病原物必须能抵制寄主的防御反应。一般昆虫病原物,主要有以下几种对策:能忍受寄主的防御反应,避免寄主的识别和反应系统;破坏或抑制寄主对异物的识别和防御。而昆虫被线虫侵染后,昆虫能进行细胞抵御,其血细胞产生吞噬作用及包被作用;另外昆虫还可进行体液防御,产生杀菌蛋白、杀菌肽及一些酶类,来抵抗线虫-共生菌的侵入。针对寄主昆虫这些不同的防御机制,昆虫病原线虫共生菌有不同的抵御方式,归纳以下几类:(1)共生菌能忍受和破坏寄主的体液包被。最初共生菌被昆虫的血细胞包被,但随后共生菌使血细胞丧失活性,而能继续在昆虫的血腔中迅速繁殖^[6]。(2)共生菌能避开寄主的识别和防御。有些共生菌侵入寄主昆虫体内,既没有血细胞对共生菌的包被和溶解,也没有发现凝集块的形成,这些表明共生菌能避开寄主的识别。(3)共生菌能抑制寄主酚氧化酶的活性,从而阻止了寄主血细胞的黑化过程。对于嗜线虫致病杆菌和发光杆菌而言,菌细胞壁的脂多糖(LPS)组分均能起到这一作用^[7]。(4)共生菌能抵御寄主昆虫分泌的溶菌酶的溶菌作用及蛋白酶和糖酶的作用。共生菌侵入昆虫的血腔后,能诱导昆虫分泌溶菌酶、蛋白酶、糖酶等酶类,这些酶促使昆虫血细胞粘附在共生菌的周围,能溶解和破坏细菌,然而共生菌能破坏这一作用而迅速繁殖^[8]。

关于共生菌的防御机制,目前尚不明了。最近研究发现,共生菌的外膜特性和其抗免疫反应有关。Dunphy^[9]报道,通过化学诱变方法得到的 *X. nematophilus* 菌株,对大蜡螟的致病性降低。研究发现,突变株的细胞外膜特性发生了很大的变化,如疏水性增强,LPS含量增多,表面阳离子电荷减少及外膜蛋白(OMP)含量降低。另外,研究发现,改变野生型的细胞外膜特性,也能降低其对寄主昆虫的致病性。而对于 *P. luminescens* 而言,通过化学诱变产生的突变株,菌细胞的外膜特性也发生了很大的变化,它的疏水性增强,血细胞的粘着力增强,外膜蛋白含量减少,LPS含量增加,突变株同野生型相比杀虫活力增强^[10]。由此可见,发光杆菌菌细胞外膜在共生菌抗免疫机制中的作用可能不同于嗜线虫致病杆菌。从以上两个属共生菌的研究结果可以看出,共生菌的细胞外膜和抵御寄主血细胞以免受寄主防御反应的影响有关。二者间的关系有待于进一步研究,外膜蛋白的研究也许有助于揭示其中的奥秘。

2 共生菌的毒素——内毒素的外毒素

2.1 共生菌的内毒素

和许多革兰氏阴性细菌一样,昆虫病原线虫共生细菌能产生内毒素。其内毒素是脂多糖类物质(LPS),是细菌细胞壁的组成成分之一,能抑制原酚氧化酶转化为有活性的酚氧化酶,从而使得酪氨酸不能转化成多巴,抑制了寄主血细胞的黑化作用;同时LPS能刺激寄主血细胞的降解,引起寄主脂肪体的解离。所以,共生菌进入寄主血细胞后,寄主的免疫反应受到了抑制^[11,12]。

Dunphy & Webster^[7]通过鲎变形细胞溶解产物试验(Limulus amoebocyte lysate assay)发现,分别用共生菌的活菌细胞和死菌细胞去侵染大蜡螟(*Galleria mellonella*)的血淋巴和其它不含昆虫血淋巴的环境,LPS既可以从活菌细胞也可从死菌细胞内释放出来,但是它需要在寄主昆虫的体液环境刺激下才能释放。对于 *Xenorhabdus* spp. 而言,纯化的LPS能致死大蜡螟^[7],而 *Photorhabdus* 纯化的LPS对大蜡螟没有致死性^[13]。LPS作为血细胞毒素,其毒性部分是其类脂A,LPS通过D-氨基葡萄糖苷残基结合外源凝集素包围寄主的血细胞,最终溶解寄主的血细胞,起到破坏寄主防御反应的作用。

2.2 共生菌产生的外毒素

昆虫病原线虫共生菌能产生许多胞外酶,分解培养基或昆虫血淋巴中的营养物质,为自身所利用,使得昆虫更易患败血症;另外,共生菌还能产生有杀虫活性的外毒素蛋白。

2.2.1 胞外酶:昆虫病原线虫共生菌的I型菌能产生许多胞外酶,如:蛋白酶、脂酶、磷酸脂酶和DNA酶。共生菌的I型菌在对数生长期分泌这些胞外酶,这一现象恰恰和胞外酶为线虫发育提供营养的想

法相吻合。昆虫的血腔是一个富含大分子营养物质的环境,或许正是由于这些酶的水解消化作用,将昆虫血淋巴中不能为线虫直接利用的营养物质转变为小分子的营养物,从而能为线虫所吸收利用。而且,对于大部分共生菌而言,Ⅱ型菌不能分泌这些胞外酶或分泌的很少,这可能是线虫不能在只有Ⅱ型菌存在的环境中进行正常繁殖发育的原因。总之,共生菌分泌的胞外酶能分解昆虫血淋巴中的营养物质,为自身和线虫的生长发育提供营养,从而使昆虫更易患败血症。虽然这些胞外酶在其它昆虫病原细菌中起到外毒素的作用,但在共生菌中尚未发现其对昆虫有直接的毒性,通过化学诱变得到 *X. nematophilus* 的无毒突变株,表明胞外酶的分泌和直接杀死昆虫没有明显的关系^[14]。

2.2.2 外毒素蛋白 Bowen等^[15]将共生菌培养液的上清液注射到昆虫体内,发现上清液对昆虫有毒性,表现出这种外毒活性的共生菌有:*P. luminescens*、*X. nematophilus*及*X. bovienii*。Ensign^[15]从*P. luminescens*中分离出一种分子量为40kD的外毒素蛋白。这种毒素既不是蛋白水解酶,也不是磷脂酶,通过喂食发现该毒素对昆虫没有毒性,然而注射毫微克纯化的毒素蛋白即可在24h内杀死烟草天蛾(*Manduca sexta*)的5龄幼虫。Akhurst^[15]从*X. nematophilus*分离出分子量为31kD的毒素蛋白,这种外毒素蛋白在注射昆虫后能有效地杀死昆虫。由此可见,两个属的共生菌均能产生对昆虫有毒性的外毒素蛋白。最近,Bowen等^[16]在Science报道,*P. luminescens*的W-14菌株能分泌一种高分子量的蛋白复合体。该蛋白在注射或喂食条件下均表现出杀虫活性,对4个目(鳞翅目、鞘翅目、蜚蠊目、膜翅目)的昆虫都表现出毒性。研究分析表明,该蛋白是由4个蛋白复合体构成,这4个复合体分别由4个基因(*tca*、*tcb*、*tcc*、*tcd*)编码的,其中*tca*和*tcd*编码的蛋白复合体对烟草天蛾有很高的口服毒性,该蛋白没有蛋白酶、磷脂酶及血溶素活性,只是略微表现出一点脂酶活性。

目前,在抗虫基因工程中应用广泛的抗虫基因是Bt毒蛋白基因。Bt毒蛋白种类多、杀虫效果好,但一种毒蛋白只能对少数几种害虫有毒性,因而昆虫对转Bt基因植物的抗性引起学者们的极大关注。人们正试图寻找新的杀虫毒蛋白和新的杀虫基因。昆虫病原线虫共生菌的外毒素蛋白由于杀虫效果好、杀虫谱宽,是很有应用前景的杀虫毒蛋白。

3 共生菌次生代谢产物的杀虫作用

共生菌的Ⅰ型菌在代谢过程中能产生多种抑菌物质。这些抑菌物除了能广泛抑制细菌、真菌和酵母菌之外,有些抑菌物对昆虫还有毒杀作用。McInerney等^[17]从*X. bovienii*的T319菌株代谢物中分离出了5种二硫吡咯类的抑菌物,发现其中的组分Ⅱ具有杀虫活性。在浓度为 $150\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时,对*Heliothis punctigera*有100%的致死作用,浓度为 $37.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 时,死亡率为18.8%,而且未死亡的昆虫有64.7%的个体与对照相比体重明显减轻,致死中浓度(LC_{50})为 $59.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。这些说明该组分有杀伤昆虫的作用。尽管这种作用比一般的杀虫剂弱,但它可能参与了共生菌的致病作用。

4 线虫在共生菌致病力方面所起的作用

共生菌的致病力也取决于它与线虫的相互作用。线虫除了作为载体携带共生菌进入寄主昆虫体内,并将共生菌释放到昆虫的血腔以外,线虫还能在抵御昆虫的防御系统中起到保护共生菌的作用。昆虫被线虫-共生菌侵染后,能产生杀菌肽以抵御这一复合体,而有些线虫能产生毒素或诱导酶抑制因子,破坏杀菌肽起到保护共生菌的作用。Gotz等^[8]研究发现,线虫*S. carpocapsae*的株系DD-136能产生一种丝氨酸蛋白酶,这种酶能破坏寄主昆虫产生的杀菌肽,从而起到保护其共生菌*X. nematophilus*的作用。但是对于其它线虫而言,尚未发现有此类蛋白酶的产生。另外,有些种类的线虫必须和其共生菌协同作用才能杀死昆虫,这一协同作用在格氏线虫*S. glaseri*及其共生菌*X. poinarii*中表现最为突出。*S. glaseri*-*X. poinarii*这一复合体对大蜡螟有很高的致病力,但二者单独作用对大蜡螟都没有致病力,有研究指出,分别用无菌的线虫*S. glaseri*和注射1150个*X. poinarii*菌细胞并不能致死供测试的大蜡螟幼虫,但同时注射115个菌细胞和1条线虫就能杀死75%的大蜡螟幼虫^[18]。由上述内容可以看

出 线虫—共生菌这一复合体协同作用,能更为有效地杀死寄生昆虫。

总之,昆虫病原线虫共生细菌是一类特殊的肠杆菌科细菌,与其主线虫互惠共生;共生菌与其主线虫协同作用,对昆虫有很强的致病力;昆虫病原线虫共生细菌的致病机理是非常复杂的,有许多问题尚待进一步明确。利用现代分子生物学和遗传学手段可能是解决这些疑点的有效途径。

参 考 文 献

- [1] Thomas G M ,Poinarii G O. *Int J Syst Bacteriol* ,1979 **29** :352~360.
- [2] Akhurst R J. *Journal of Genetic Microbiology* ,1980 **1** :~23.
- [3] Boemare N E ,Akhurst R J. *Journal of Genetic Microbiology* ,1988 **134** :751~761.
- [4] Akhurst R J ,Boemare N E. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In :Gaugler R ,et al. ed. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. Boston :CRC press ,1990. 75~90.
- [5] Akhurst R J ,Dunphy G. Tripartite interactions between symbiotically associated entomopathogenic bacteria ,nematodes and their insect hosts. In :Beckage N. S et al. ed. *Federici Parasite and Pathogens of Insect* ,New York :Academic press ,1993. 1~23.
- [6] Brehelin M A ,Akhurst R J ,Boemare N E. *J Invertebr Pathol* ,1993 **61** :188~191.
- [7] Dunphy G B ,Webster J M. *Int J Parasitol* ,1988 **18** :729~737.
- [8] Gotz P ,Boman A ,Boman H. *Proceedings of the Royal Society of London* ,1981 **212** :333~350.
- [9] Dunphy G B ,Webster J M. *J Invertebr Pathol* ,1991 **58** :40~51.
- [10] Dunphy G B. *J Invertebr Pathol* ,1995 **65** :25~34.
- [11] Dunphy G B. Webster J M. *J Insect Physiol* ,1988 **30** :883~889.
- [12] Dunphy G B ,Webster J M. *J Gen Microbiol* ,1988 **134** :1017~1028.
- [13] Clarke D J ,Dowds B C A. *J Invertebr Pathol* ,1995 **66** :149~155.
- [14] Xu J ,Olson M E ,Kahn M L. *Appl Environ Microbiol* ,1991 **57** :1173~1180.
- [15] Forst S ,Nealson K. *Microbiol Rev* ,1996 **60** :21~43.
- [16] Bowen D J ,Rocheleau T A ,Blackburn M. *Science* ,1998 **6** :2129~2132.
- [17] McNerney B V ,Taylor W C ,Lacey M J. *Journal of Natural Products* ,1991 **54** :785~795.
- [18] Akhurst R J. *Syst Appl Microbiol* ,1986 **8** :142~147.

《微生物学报》第七届编辑委员会名单

The Seventh Editorial Board of Acta Microbiologica Sinica

主 编 李季伦

副主编 陆德如 朱关福 李阜棣 王敖全 谭华荣

编 委 王修垣 邓子新 田 波 刘志恒 朱庆裴 孙志浩 李焕娄

陈世平 陈永青 杨苏声 周培瑾 范云六 范孝用 钱新民

钱世钧 诸葛健 徐怀恕 翟中和

顾 问 张树政