

昆虫病原线虫共生细菌的代谢产物

王立霞¹ 杨秀芬¹ 简 恒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)

METABOLITES PRODUCED BY BACTERIA OF *XENORHABDUS* AND *PHOTORHABDUS*

Wang Lixia¹ Yang Xiufen¹ Jian Heng¹ Yang Huaiwen¹ Huang Dafang²

(¹ Institute of Biological Control, CAAS Beijing 100081;

² Biotechnology Research Institute, CAAS, Beijing 100081, China)

关键词: 嗜线虫致病杆菌, 发光杆菌, 代谢产物

中图分类号: 939.1 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2001) 06-0753-04

昆虫病原线虫共生细菌寄生于昆虫病原线虫肠道内, 二者互惠共生。该菌革兰氏染色阴性, 属肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*), 包含两个属——嗜线虫致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 和发光杆菌属 (*Photorhabdus*)。其中嗜线虫致病杆菌与斯氏线虫 (*Steinernema*) 共生, 发光杆菌与异小杆线虫 (*Heterorhabditis*) 共生。

近几年, 随着对共生菌研究的逐渐深入, 发现共生菌能产生许多有应用潜力的代谢产物, 如杀虫蛋白、抑菌物质、抗癌物质、胞外酶、胞内晶体蛋白、色素及荧光素等。特别是杀虫蛋白、抗癌物质及抑菌物质的发现, 使得昆虫病原线虫共生细菌的研究越来越为人们所重视。现在国内外的许多学者已经认识到昆虫病原线虫共生细菌是一种既能杀虫、防病, 又具有医用价值的生物资源。

形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^[1]。同一菌株的两型菌除了在菌落形态上有很大不同, 生理生化特征也有明显区别。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 (荧光素只对发光杆菌而言), II 型菌皆不产生或仅有少量的上述代谢物产生^[2]。本文在对共生菌的代谢产物进行阐述时, 主要是指共生菌的 I 型菌。

1 杀虫物质

1.1 杀虫毒蛋白

Bowen 等^[3]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, 表现出这种外毒素活性的共生菌有: *P. luminescens*, *X. nematophilus* 及 *X. bovienii*。Ensign^[3]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, 也不是磷酸脂酶, 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^[4]从 *X. nematophilus* 分离出分子量为 31kD 的外毒素蛋白, 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血腔毒性的外毒素蛋白。最近, Bowen 等^[5,6]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

作者简介: 王立霞 (1972 -), 女, 河北省人, 博士。攻读博士学位期间从事昆虫病原线虫共生细菌杀虫物质的研究, 现在北京大学生命学院做博士后, 主要从事 Cre 重组酶结构与功能的研究。

收稿日期: 2000-08-09, 修回日期: 2000-11-03

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、磷酸脂酶及血溶素活性,只是略微表现出一点脂酶活性。Guo等(1999)进一步研究发现,*P. luminescens*的W-14菌株能产生分子量均约为860kD的两种杀虫蛋白—毒蛋白A和B,它们对南部玉米叶甲初孵幼虫均有很高的口服活性,LD₅₀分别为5ng/cm²和87ng/cm²;其中毒蛋白A对烟草天蛾幼虫也有很高的毒性,毒蛋白B只对烟草天蛾幼虫的生长有抑制作用。这两种蛋白在非变性凝胶电泳上呈现单一一条带,变性凝胶电泳分析表明它们都是多亚基组成的,而且均含有分子量为208kD和63kD两种多肽。N-末端氨基酸序列分析和Western分析结果表明,这两种蛋白虽然不同,但它们有很大的相似性^[7]。以上这些新的杀虫蛋白的相继发现,使得昆虫病原线虫共生细菌这一资源越来越为国内外学者所重视。

目前,细菌杀虫剂主要是苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*),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。现在害虫对Bt基因的抗性已经出现,为此,人们正试图寻找新的杀虫微生物、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。

1.2 其它杀虫代谢产物

共生菌的I型菌在代谢过程中能产生多种抑菌物质。这些抑菌物除了能抑制许多种细菌、真菌之外,有些抑菌物对昆虫还有毒杀作用。McInerney等^[8]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150μg/cm²时,对细点突夜蛾(*Heliothis punctigera*)有100%的致死作用;浓度为37.5μg/cm²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;致死中浓度为59.5μg/cm²。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。

2 抑菌物质

早于1959年,Dutky研究发现昆虫病原线虫共生细菌能分泌有抗菌活性的物质,这些物质能防止被线虫侵染的昆虫尸体腐烂,共生菌的这一特性在线虫完成生活史方面起到了重要的作用。现在已知,产生抗菌素是共生菌的普遍特征。共生菌在代谢过程中可产生多种抑菌物质,阻止来自肠道和土壤环境中的微生物对虫尸的二次感染,保证线虫的生长和繁殖。共生菌产生的抑菌物质可抑制多种微生物(如细菌、真菌、酵母菌)生长,而且共生菌之间也有相互抑制作用。

共生菌不同种或同种不同菌株产生的抑菌物质是不相同的。据报道,共生菌产生的抑菌物质有6种类型:①二硫吡咯类抑菌物,从共生菌*X. nematophilus*和*X. spp.*的Q1菌株中分离得到^[9]。该类抑菌物对革兰氏阳性菌有效,对革兰氏阴性菌效果差些。在不同的共生菌菌株中分离得到的该类抑菌物结构也不尽相同。②水溶性的苯并芘类(benzopyrene),又称为异香豆素,从*X. nematophilus*的ALL菌株及*X. spp.*的Q1菌株中分离得到两种不同结构的抑菌物^[8]。③羟化二苯乙烯类,由发光杆菌产生的,到目前为止共发现有两种结构的该类抑菌物^[10]。其作用机制是通过刺激核苷酸ppGpp的合成积累,来抑制RNA的合成。④吡啶类,在嗜线虫致病杆菌中分离得到。Sundar^[11]研究发现,在*X. bovienii*中,该类抑菌物在共生菌生长期的稳定期末期产量达到最高值;通过向培养基中加入色氨酸,能提高其抑菌活性。这类抑菌物的作用机制也是通过增加核苷酸ppGpp的合成,抑制革兰氏阴性、阳性菌RNA的合成。⑤葱醌类,是由发光杆菌产生的色素类抑菌物^[12],该类物质有抑制真菌的活性。⑥细菌素(bacteriocin),共生菌的I型、II型菌均能产生,其主要功能是抑制亲缘关系较近的其他共生细菌的生长^[13]。⑦几丁质酶,昆虫病原线虫共生菌能分泌产生几丁质酶,该酶能抑制真菌菌丝体的生长和分生孢子的萌发^[14]。

3 抗癌物质

在对共生细菌的代谢产物进行研究的过程中,发现共生菌 *X. bovienii* 产生一种二硫吡咯类(Xenomins)物质,该类物质除了对一些细菌有抑制作用,还对结肠癌、乳腺癌、子宫颈癌等癌症的癌细胞有不同程度的抑制作用^[15]。其中组分 I (Xenomin 1)、II (Xenomin 2)对结肠癌细胞 HT29 的作用效果最好,亚致死中浓度(LC₅₀)分别为 0.14 μ g/mL 和 0.34 μ g/mL;对子宫颈癌的癌细胞 Hela 的亚致死中浓度分别为 0.24 μ g/mL 和 0.65 μ g/mL;对乳腺癌的癌细胞 MCF-7 效果差些,亚致死中浓度分别为 1.37 μ g/mL 和 1.74 μ g/mL。由此可见,共生菌产生的此类代谢物具有很好的抗癌活性,因而昆虫病原线虫共生细菌是一种具有医用价值的细菌。

4 胞外酶

昆虫病原线虫共生菌产生许多胞外酶,如:蛋白酶、脂酶、磷脂酶和 DNA 酶。Schmidt 等^[16]从发光杆菌 Hm 株系中分离纯化出分子量为 60kD 的蛋白酶,它是一种碱性蛋白水解酶。该菌株仅仅分泌这一种蛋白水解酶,而且只有 I 型菌分泌。而有些共生菌则能表现出多种蛋白酶活性,Bowen(1999)^[17]发现 *P. luminescens* 能产生三种不同的金属蛋白酶,这些蛋白酶没有杀虫活性。另外,通过水解琼脂培养基上的特殊底物(如吐温-80、卵磷脂),能够检测到共生菌脂酶的活性,不同共生细菌产生的脂酶种类有所不同^[18];Wang^[19]已在发光杆菌中克隆出编码脂酶的基因。共生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营养物,从而能为线虫所吸收利用。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;最近,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^[20]。

5 其它代谢产物

5.1 胞内晶体蛋白

共生菌同其它肠杆菌科细菌的一个区别特性在于: I 型菌能产生胞内晶体蛋白,此物质在共生菌生长期的稳定期产生,而不是在对数生长期的菌细胞内产生^[21]。众所周知,苏云金芽孢杆菌及球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)所产生的晶体蛋白具有杀虫活性,而共生菌产生的晶体蛋白尚未发现有杀虫活性。在 *X. nematophilus* 菌细胞内可产生两种晶体蛋白,一个分子量为 26kD,另一个分子量为 22kD;在其它嗜线虫致病杆菌中尚未发现这两种晶体蛋白的产生。发光杆菌也可产生两种晶体蛋白,但不同于上述 *X. nematophilus* 产生的两种蛋白,其分子量分别为 11.6kD 和 11.3kD,编码这两种蛋白合成的 *cipA* 和 *cipB* 基因已经克隆并测序。晶体蛋白在共生菌中的作用尚不明了。

5.2 色素(pigment)

共生菌的另一普遍特性是能产生色素,现发现的所有发光杆菌的菌株及嗜线虫致病杆菌的部分菌株均能在培养基上产生这一次生代谢产物,颜色从浅黄色到桔红色。

色素在发光杆菌中研究较多。Roberts^[22]从发光杆菌不同菌株中分离得到的色素均为萘醌类物质。Richardson 等^[11]研究发现色素的颜色和环境 pH 值有关:当 pH \geq 9.0 时,色素为红色;而在 pH \leq 8.0 时,为黄色或无色。过去曾一度以色素的颜色作为共生菌的分类依据,以上研究结果说明,此种分类方法并不可靠。控制色素合成的基因已在发光杆菌 Hb 菌株中得到分离,并且在大肠杆菌中克隆和表达^[23]。

5.3 荧光素 (bioluminescence)

在共生菌中,荧光素是由发光杆菌分泌产生的一种次生代谢产物,嗜线虫致病杆菌不能产生荧光素。在昆虫被异小杆线虫侵染或将发光杆菌注射到昆虫血腔内,48h后均可观察到虫尸在黑暗中发出的荧光。然而并不是所有的发光杆菌均可产生荧光素,Akhurst发现一种不发光的菌株。荧光素由一种荧光素酶催化合成,控制该荧光素合成的 *lux* 基因已测序,并在大肠杆菌中表达;而且已经证明 *P. luminescens* 的 *lux* 基因和其它发光细菌的 *lux* 基因相似。该基因的鉴定将有助于共生菌其它特性的研究。

关于荧光素在共生菌中所起到的作用,现在尚不明了。Poinar等^[24]认为:共生菌所产生的荧光素和色素可能均有吸引昆虫到已被侵染的昆虫尸体处的作用,从而更利于线虫的入侵;然而,在土壤中,这两个因素作为吸引昆虫的因素,其发挥的作用是十分有限的。Akhurst^[25]认为:由于荧光素在线虫正成熟和繁殖时其产量达到最高值,而这时被侵染的昆虫受到的破坏最大,虫尸很容易被其它微生物入侵,那么可能由于荧光素的存在,对腐食性的微生物有驱避性,从而使虫尸不会再次受到其它微生物的感染,这样就更有利于线虫的生长繁殖。*Lux* 基因的发现及其深入研究或许有助于揭示这一奥秘。

参 考 文 献

- [1] Akhurst R J. *J Gen Microbiol*, 1980, **121**: 303 - 309.
- [2] Boemare N E, Akhurst R J. *J Gen Microbiol*, 1988, **134**: 751 - 761.
- [3] Bedding R A, Akhurst R J, Kaya H K. *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. Australia: CSIRO press, 1994. 137 - 145.
- [4] Forst S, Nealson K. *Microbiol Rev*, 1996, **60**(1): 21 - 43.
- [5] Bowen D J, Rocheleau T A, Blackburn M. *Science*, 1998, **6**: 2129 - 2132.
- [6] Bowen D J, Ensign J C. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**: 3029 - 3035.
- [7] Guo L N, Fatig R O, Orr G L, et al. *J Bacteriol*, 1999, **274**(14): 9836 - 9842.
- [8] McInerney B V, Taylor W C, Lacey M J. *Journal of Natural Products*, 1991, **54**: 785 - 795.
- [9] McInerney B V, Gregson R P, Lacey M J, et al. *J Gen Microbiol*, 1991, **54**: 744 - 784.
- [10] Richardson W H, Schmidt T M, Nealson K H. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 1602 - 1605.
- [11] Sundar L, Chang F N. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 3139 - 3148.
- [12] Sztaricskai F, Denya Z, Batta G, et al. *Acta Chim Hung Models Chem*, 1992, **129**: 697 - 707.
- [13] Boemare N E, Boyer-Giglio M H, Thaler J O, et al. The phages and bacteriocins of *Xenorhabdus* spp., symbiont of the nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. In: Bedding R A, et al. *Nematodes and the Biological Control of Insect Pests*. Australia: CSIRO press, 1994. 137 - 145.
- [14] Webster J M. The role of metabolites from the bacterial symbionts during nematode development. In: VIIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control Japan, 1998. 136.
- [15] Webster J M, Li J X, Chen G H. United States Patent No. 701834 1996.
- [16] Schmidt T M, Bleakley B, Nealson K H. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **54**: 2793 - 2798.
- [17] Bowen D J, Blackburn M E, Rocheleau T, et al. *Insect Biochem Mol Biol*, 2000, **30**: 69 - 74.
- [18] Thaler J O, Duvic B, Givaudan A, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **64**(7): 2367 - 2373.
- [19] Wang H, Dowds B C. *J Bacteriol*, 1993, **175**: 1665 - 1673.
- [20] Xu J, Olsen M E, Kahn M L, et al. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 1173 - 1180.
- [21] Couche G A, Gregson R P. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 5279 - 5288.
- [22] Roberts D L, Bennett D, Forst S. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 8728 - 8733.
- [23] Frackman S, Anhalt M, Nealson K H. *J Bacteriol*, 1990, **172**: 5767 - 5773.
- [24] Poinar G O, Thomas J, Haygood G, et al. *Soil Biol Biochem*, 1980, **12**: 5 - 9.
- [25] Akhurst R J, Boemare N E. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In: Gaugler R, Kaya K H. *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*, CRC Press, 1990. 75 - 87.