

## 三株杀粘虫放线菌的分类鉴定

吴文龙 段淑蓉 李文均 段若玲 徐丽华\*

(云南大学 云南省微生物研究所 教育部微生物资源重点实验室 昆明 650091)

**摘 要** 菌株 YIM31331、YIM31333、YIM31355 是从云南省丽江、中甸采集的土壤样品中分离得到的具有产杀粘虫活性物质菌株。根据其形态学特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析结果,认为菌株 YIM 31331 属于链霉菌属的 *Streptomyces subrutilus*, YIM31333 属于指孢囊菌属 *Dactylosporangium aurantiacum*, YIM31355 属于链孢囊菌属 *Streptosporangium vulgare*。

**关键词** 粘虫,链霉菌属,指孢囊菌属,链孢囊菌属,多相分类

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)05-0567-04

粘虫属鳞翅目,夜蛾科,是一种为害水稻、小麦、玉米、甘蔗等禾本科作物及牧草的主要害虫。幼虫取食稻、麦叶片,能大部或全部吃光叶片,严重影响植株的生长发育;在稻、麦抽穗后则咬断小穗,落粒满田,造成减产或绝收,给农业生产造成巨大损失。目前粘虫防治以化学防治为主,通常防治用敌百虫、甲敌粉、杀螟松粉、辛硫磷、杀螟松西维因等。化学农药用量大,残留量高、毒性高、对环境和人体健康都有不良影响。长期使用不仅会使粘虫的耐药性增强,也会造成生态环境的污染。尽快改变我国农药用药结构,开发新型替代生物农药具有重大意义。

从云南丽江、中甸采集的土壤样品中分离得到菌株 YIM31331、YIM31333、YIM31355,我们在农用抗生素筛选研究过程中,发现它们产具有杀粘虫活性化合物,其发酵液杀虫活性均很高,而且药效持久、稳定,具有从中开发新型微生物农药的巨大潜力。本文报道了通过多相分类,所确定的这 3 株菌的分类地位。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源** 从云南丽江、中甸采集土壤样品,风干土样后,以 120℃ 预处理 1h,用添加 50mg/L 重铬酸钾的 HV 琼脂培养基<sup>[1]</sup>进行菌种分离,28℃ 培养 3~4 周。经纯化后,用 ISP2 琼脂培养基培养。编号为 YIM31331、YIM31333、YIM31355。

**1.1.2 试剂** PCR 所用的 DNA 聚合酶和 dNTP 购自 TaKaRa 公司,测序反应应用 Big Dye™ terminator cycle sequencing ready reaction kit (PERKIN ELMER) 试剂盒。

### 1.2 形态观察

用酵母浸汁—麦芽浸汁琼脂和甘油天门冬酰胺琼脂埋片培养,28℃ 培养 7~28d,取埋片。用光学显微镜和扫描电子显微镜观察形态特征。

### 1.3 培养特征和生理生化特性

按 Shirling 和 Gottlieb<sup>[2]</sup>的方法观察并记录培养特征和生理生化特性,碳源的利用。用 ISCC COLOR CHARTS 色谱<sup>[3]</sup>记录颜色。

### 1.4 细胞壁化学组成分析

全细胞水解液化学组分分析以 Hasegawa<sup>[4]</sup>和王平<sup>[5]</sup>改进的 TLC 方法进行。

### 1.5 16S rDNA 序列分析

DNA 的提取按徐平等<sup>[6]</sup>的方法。PCR 引物: Primer A: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; Primer B: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 所使用的引物由 TaKaRa 公司合成。PCR 反应体系(总体积 50μL): 10 × Buffer 5.0μL, dNTP (2mmol/L) 4.0μL, Primer A (10pmol/L) 1.0μL, Primer B (10pmol/L) 1.0μL, Taq 酶 (2U/μL) 0.4μL, DNA 模板 (50ng ~ 1μg) 1.0μL, 去离子水 37.4μL。PCR 扩增条件: 95℃ 5min, 95℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 3min, 35 个循环; 72℃ 5min。测序用的 3 个引物为: PA 5'-AGAGTTT-

基金项目 科技部基础研究重大项目前期研究专项(2002C0001P),国家自然科学基金项目(30260004, 30270004)

\* 通讯作者。Tel 86-871-5034139; E-mail lihxu@ynu.edu.cn

作者简介 吴文龙(1976-)男,云南人,硕士,研究方向为微生物生态。E-mail: wlvu-123@sina.com

其他作者 姜成林

收稿日期 2003-12-01, 修回日期 2004-05-24

GATCCTGGCTCAG-3'; PB: 5'-TTAAGGTGATC-CAGCCGCA-3'; PC: 5'-AGGTTGCGCTCGTTG-3', 用 ABI PRISM TM 377 DNA sequencer 全自动测序仪测序。

根据测序结果,利用 BLAST 搜索软件从 GenBank 与 EMBL 等数据库中调出的相关放线菌菌株的 16S rDNA 序列,随后用 CLUSTALW 1.8<sup>[7]</sup>进行多序列比对,并采用 Neighbor-joining 法<sup>[8]</sup>进行系统进化树的构建和同源性比较。

## 2 结果

### 2.1 形态和培养特征

菌株 YIM31331 基内菌丝分枝不断裂、黄褐色,

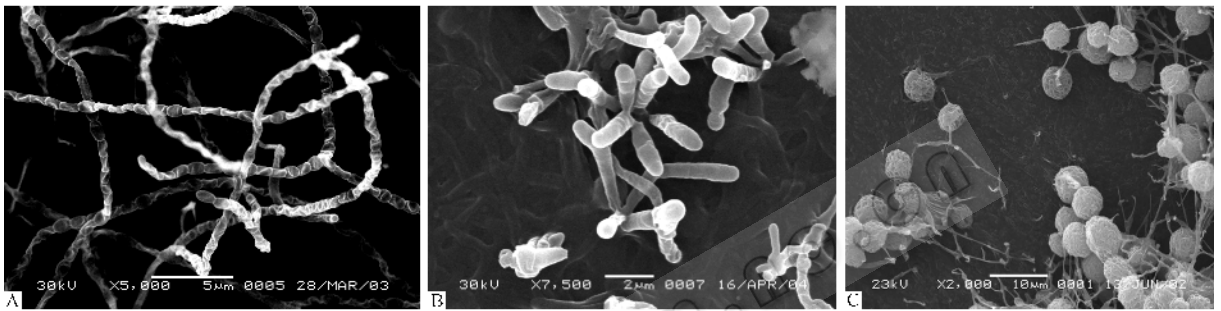


图 1 菌株在酵母膏-麦芽膏琼脂培养基及燕麦片琼脂培养基培养 14d 的电镜照片

Fig.1 Morphological characteristics of strains on yeast-malt extract agar medium and oatmeal agar medium for 14 days

A. YIM31331(Yeast-malt extract agar 5000 × );B. YIM31333(Oatmeal agar 7500 × );C. YIM31355(Yeast-malt extract agar 2000 × )

菌株 YIM31333 的生理生化特性结果为:明胶液化、硝酸还原均呈阳性,牛奶凝固和脲化以及淀粉水解、纤维素分解呈阴性,产黑色素、不产硫化氢。能利用所有供试碳源;代谢产物对粘虫有很强的杀虫活性,致死率为 72%。

菌株 YIM31355 的生理生化特性结果为:黑色素的产生呈阳性,牛奶凝固和脲化以及明胶液化、硝酸还原、淀粉水解、纤维素分解呈阴性,产硫化氢。能利用大部分供试碳源;代谢产物对粘虫有很强的杀虫活性,致死率为 82%。

### 2.3 胞壁分析

菌株 YIM 31331 细胞壁含有 L,L-DAP 和 Glycine 胞壁 I 型,全细胞水解物含有核糖和葡萄糖,糖型 C;菌株 YIM 31333 细胞壁含有 meso-DAP 和 Glycine 胞壁 II 型,全细胞水解物含有阿拉伯糖和木糖,糖型 D;菌株 YIM 31355 细胞壁含有 meso-DAP,胞壁 III 型,全细胞水解物含有马杜拉糖,葡萄糖,核糖,糖型 B。

### 2.4 16S rDNA 序列分析

菌株 YIM31331、YIM31333 与 YIM31355 的 16S rDNA 核苷酸序列全长分别为 1460bp、1434bp 和

气生菌丝丰富、浅黄色,孢子链长、波曲,孢子表面光滑、短棒状,菌株 YIM31333 基内菌丝分枝不断裂、橙黄色,基丝上着生大单孢子状球体,有指状孢囊(燕麦片琼脂培养基),无气丝;菌株 YIM31355 气生菌丝稀少,气丝上着生球形孢囊,基内菌丝不断裂、红褐色,孢子球形、表面光滑(图 1)。

### 2.2 生理生化特性

菌株 YIM31331 的生理生化特性结果为:明胶液化呈阳性,牛奶凝固和脲化以及硝酸还原、淀粉水解、纤维素分解呈阴性,产黑色素、不产硫化氢。能利用大部分供试碳源;代谢产物对粘虫具有很强的杀虫活性,致死率为 50.85%。

1474 bp,将其与 GenBank 等数据库调集的链霉菌属、指孢囊菌属、链孢囊菌属的相关菌株 16S rDNA 序列进行比较。采用 CLUSTALW 1.8 软件<sup>[7]</sup>进行多序列匹配排列,通过 TreeView 软件进行系统进化树的构建。所构建的系统进化树见图 2,是根据 Neighbor-Joining 法<sup>[8]</sup>和 Kimura<sup>[9]</sup>双参数校正模型建立起来的。

## 3 讨论

菌株 YIM31331 具有典型的链霉菌属的特征, YIM31333 具有典型的指孢囊菌属的特征, YIM31355 具有典型的链孢囊菌属的特征, 16S rDNA 序列分析结果显示,菌株 YIM31331 与 *Streptomyces subrutilus* 聚在进化树的同一个分支上,其相似性为 99.2%,这表明菌株 YIM31331 应属于 *Streptomyces subrutilus* 相同种。YIM31333 与 *Dactylosporangium aurantiacum* 相似性为 99.5%,并聚在进化树的同一个分支,我们认为 YIM31333 应属于 *Dactylosporangium aurantiacum* 相同种。YIM31355 与 *Streptosporangium vulgare* 相似性为 98.1%,聚在进化树的相同分支,根据这个结果我们认为 YIM31355 应属于 *Streptosporangium*

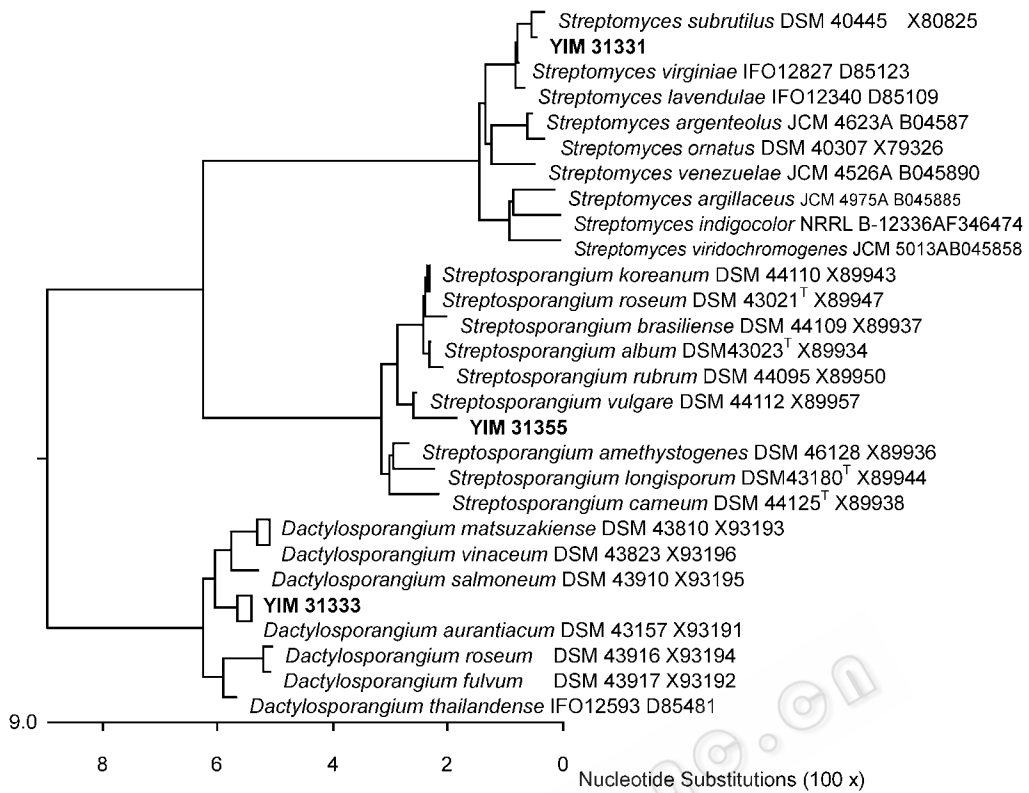


图 2 基于 16S rDNA 序列构建的系统进化树状图

Fig. 2 Phylogenetic tree showing the relationships among type strains and experimental Strains based on 16S rDNA sequences

*vulgare* 相同种。综合对 3 菌株的形态学、培养特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析结果,我们认为 YIM31331 应属于 *Streptomyces subruttilus*, YIM31333 应属于 *Dactylosporangium aurantiacum*, YIM31355 应属于 *Streptosporangium vulgare*。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol*, 1987, **65**: 501 - 509.
- [ 2 ] Shirling E B, Gottlieb D. Methods for characterization of Streptomyces species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, **16**: 313 - 340.
- [ 3 ] Kelly K L. Inter-Society Color Council-National Bureau of Standards Color-Name Charts Illustrated with Centroid Colors. Washington DC: US Government Printing Office, 1964.
- [ 4 ] Hasegawa T. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol*, 1983, **29**: 319 - 322.
- [ 5 ] 王 平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法. *微生物学通报*, 1986, **13**: 228 - 230.
- [ 6 ] 徐 平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA. *微生物学通报*, 2003, **30**(4): 73 - 75.
- [ 7 ] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**: 4673 - 4680.
- [ 8 ] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406 - 425.
- [ 9 ] Kimura M. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.

## Isolation and Identification of Three Actinomycete Strains with Strong Insecticidal Activity for Armyworm

WU Wen-Long DUAN Shu-Rong LI Wen-Jun DUAN Ruo-Ling XU Li-Hua\*

(Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education of China, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** Actinomycete strains YIM 31331, YIM 31333, YIM 31355, which had strong insecticidal activity for armyworm, *Mythimna separata* (Walker), were isolated from the soil samples collected from Lijiang and Zhonodian, Yunnan.

Province. Based on the polyphasic studies, including its morphology, physiological and biochemical characteristics, chemotaxonomy and 16S rDNA sequence analysis, they were proposed as known species of genus *Streptomyces*, *Dactylosporangium* and *Streptosporangium* namely *Streptomyces subrutilus* (YIM31331), *Dactylosporangium aurantiacum* (YIM31333), *Streptosporangium vulgare* (YIM31355).

**Key words:** Armyworm, *Streptomyces*, *Dactylosporangium*, *Streptosporangium*, Polyphasic taxonomy

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation (30260004, 30270004) Fundamental Research Programs Ministry of Science and Technology of China (2002C0001P)

\* Corresponding author. Tel 86-871-5034139; E-mail lihxu@ynu.edu.cn

Other author: JIANG Cheng-Lin

Received date: 12-01-2003

## 科学出版社生命科学编辑部新书推介

### 《细胞生物学导学》

主 编 李先文、张苏锋、袁正仿、陈世锋

2004年6月出版

ISBN 7-03-013319-6/Q.1412

B5开,定价 28.00元

本书是高等院校细胞生物学专业的教学辅导书。本书以当今最有影响的几部《细胞生物学》教科书的知识体系为基本框架,首先用简洁的文字概括地介绍了细胞生物学各个领域的基本知识及其研究状况。进而,站在学科发展与专业人才培养的高度上拟定了学习要求、重点难点等学习指导性纲要。然后,在明确基本概念的基础上,提出有启发性的问题并给予解答,尤其对有歧义的问题作出了合理的分析。每章都配有要点提示及强化练习。书末还配有自测题和研究生的招生模拟试题,所有题目均备有参考答案。

本书适合作为高等院校生命科学专业的初学者及考研生的参考书,也适合教师教学参考。

### 《组织工程》(影印)

2004年6月出版

ISBN 7-03-013407-9/Q.1425

大16开,定价:¥55.00

本书是 Prentice Hall 出版社新近推出的生物工程原理与应用丛书之一,全面阐释了主要生理组织的当前生物医学工程研究,包括心血管、内分泌、神经、视觉、听觉、消化和呼吸

系统。主要分为四部分:定量细胞和组织生物学,包括组织块、组织动力学、形态发生、干细胞、细胞程序与调和等;细胞和组织分化,包括高通量生物学数据、细胞和组织特性、细胞和组织培养和基因转移等;工程学方法与设计,包括时间常数、缩放比例、细胞分离、生物材料成型与制作等;临床应用,包括常规方式、宿主适应和治疗性组织的生产等。

本书为读者提供了众多实用的定义、生理基础数据表格以及参考书目、索引,同时还介绍了骨髓、骨骼肌和软骨等组织器官的组织工程。此外,还提出了组织工程研究中的一些难点和重点问题。通过阅读本书,读者会对组织工程及其细胞生物学基础有一个全面清晰的了解,也会获得更多创新的想法来进一步探索这一日益发展并且壮大的研究领域。

本书适合生物工程、生物材料、生物医学、生物化学、分子生物学以及医学等相关研究领域的高年级本科生、研究生以及教学科研人员参考使用。

### 《用于蛋白质组学的蛋白质纯化实验指南》(影印)分子克隆实验指南系列

Cold Spring Harbor Lab (CSHL) Press

2004年6月出版

ISBN 7-03-013387-0/Q.1423

16开,定价 98.00元

本书详细论述了用于蛋白质组学研究的蛋白质纯化实验技术。

欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址:100717 北京东黄城根北街16号科学出版社科学分社,联系人:阮芯 联系电话:010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目 010-64012501