

林曼曼, 刘 琴, 韩光杰, 等. 嗜线虫致病杆菌 YZ011 对鳞翅目昆虫杀虫活性及比较基因组学分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(2): 258-267.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.02.006

嗜线虫致病杆菌 YZ011 对鳞翅目昆虫杀虫活性及比较基因组学分析

林曼曼¹, 刘 琴¹, 韩光杰¹, 黄立鑫¹, 夏 杨¹, 李传明¹, 张 楠², 陆玉荣¹,
徐 彬¹, 徐 健^{1,2}

(1. 江苏里下河地区农业科学研究所/国家农业微生物扬州观测实验站, 江苏 扬州 225007; 2. 扬州大学植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 昆虫病原线虫共生菌是一类重要的生物防治资源。为明确本单位分离自小卷蛾斯氏线虫共生菌 YZ011 对鳞翅目害虫的杀虫活性及机制, 本研究在测定菌株 YZ011 对小菜蛾和草地贪夜蛾血腔注射毒性的基础上, 进一步对其进行全基因组测序和比较基因组学分析。结果表明, 血腔注射 100 nL 1.0×10^6 CFU/mL 菌株 YZ011 24 h 后, 小菜蛾幼虫和草地贪夜蛾幼虫的死亡率分别为 75.0% 和 56.7%, 均显著高于血腔注射磷酸盐缓冲液 (PBS) 对照。全基因组测序结果显示菌株 YZ011 为嗜线虫致病杆菌, 其基因组含有 19 个次级代谢产物基因簇; 与其同源性最高的嗜线虫致病杆菌菌株 YL001 和菌株 S II 相比, 菌株 YZ011 含有 29 个特异基因簇。菌株 YZ011 基因组中共注释到 586 个毒力因子相关基因。本研究结果从基因组层面解析了嗜线虫致病杆菌 YZ011 的分子特征, 对菌株 YZ011 的综合利用具有重要意义。

关键词: 嗜线虫致病杆菌; 杀虫活性; 基因组; 次级代谢产物; 毒力因子

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)02-0258-10

Insecticidal activity and comparative genomics analysis of *Xenorhabdus nematophila* YZ011 against lepidopteran insects

LIN Manman¹, LIU Qin¹, HAN Guangjie¹, HUANG Lixin¹, XIA Yang¹, LI Chuanming¹,
ZHANG Nan², LU Yurong¹, XU Bin¹, XU Jian^{1,2}

(1. Institute of Agricultural Sciences of the Lixiahe District in Jiangsu Province/National Agricultural Experimental Station for Agricultural Microbiology in Yangzhou, Yangzhou 225007, China; 2. College of Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

Abstract: Entomopathogenic nematode symbionts are important biological control resources. In order to clarify the insecticidal toxicity and mechanism of the symbiotic bacteria YZ011 isolated from *Steinernema carpocapsae* on lepidopteran pests, the whole genome sequencing and comparative genomics analysis of strain YZ011 were further carried out on the basis

收稿日期: 2024-08-01

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2024YFD1400900); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(22)1009]; 江苏省国际合作项目 (BZ2020039); 扬州市科技计划项目 (YZ2023244); 农业基础性长期性科技工作项目 (NAES069AM04)

作者简介: 林曼曼 (1990-), 女, 江苏徐州人, 博士, 助理研究员, 主要从事农业害虫生物防治。(E-mail) lin.man.happy@163.com

通讯作者: 徐 健, (E-mail) bio-xj@163.com

of measuring the hemocoel injection toxicity of strain YZ011 to *Plutella xylostella* and *Spodoptera frugiperda*. The results showed that the mortality rates of *Plutella xylostella* larvae and *Spodoptera frugiperda* larvae were 75.0% and 56.7%, respectively, after hemocoel injection of 100 nL 1.0×10^6 CFU/mL strain YZ011 for 24 h, which were significantly higher than those of phosphate buffered saline (PBS) control. The whole genome sequencing results showed that YZ011 was a nematophagous pathogenic bacterium, and its

genome contained 19 secondary metabolite gene clusters. Compared with the most homologous strains YL001 and S II, YZ011 contained 29 specific gene clusters, and 586 virulence factor-related genes were annotated. The results of this study analyzed the molecular characteristics of *Xenorhabdus nematophila* YZ011 at the genomic level, which was of great significance for the comprehensive utilization of strain YZ011.

Key words: *Xenorhabdus nematophila*; insecticidal activity; genome; secondary metabolite; virulence factor

昆虫病原线虫是广泛存在于自然环境中的一类寄生性线虫,它与体内共生菌互惠共生,具有天敌昆虫兼病原微生物双重特点,能通过感染害虫,并利用其作为寄主进行繁殖和生存,最终导致昆虫死亡^[1]。昆虫病原线虫共生菌存在于昆虫病原线虫肠道,属革兰氏阴性菌,包括与斯氏线虫科(*Steinernema*)线虫共生的致病杆菌属(*Xenorhabdus*)菌和与异小杆线虫科(*Heterorhabditis*)线虫共生的发光杆菌属(*Photorhabdus*)菌^[2-3]。昆虫病原线虫共生菌与线虫专一性共生,线虫入侵昆虫血腔后致病杆菌由线虫肛门排出,发光杆菌被线虫反刍从口腔吐出。共生菌进入昆虫血腔后,产生的一系列次级代谢产物能导致昆虫死亡,分解昆虫组织,为线虫的生长与繁殖提供营养物质^[2,4]。作为一种重要的潜在生物杀虫资源,越来越多具有生物活性的昆虫病原线虫共生菌菌株被发现。截至 2024 年 7 月,美国国家生物技术信息中心(NCBI)分类数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>)中共收录了 32 个分类物种的致病杆菌菌株和 24 个分类物种的发光杆菌菌株,目前尚有 166 个致病杆菌菌株和 116 个发光杆菌菌株有待分类^[5]。

共生菌产生的次级代谢产物主要为聚酮合成酶(PKS)、非核糖体肽合成酶(NRPS)和其他类似酶合成的非核糖体衍生肽、聚酮化合物和杂合天然产物,合成这些化合物的基因占共生菌基因组的 7.5%^[6-9]。由于共生菌次级代谢产物的抗菌和杀虫潜力,其在药品和生物农药的研制中广受关注。Palma 等^[10]对分离自斯氏线虫的 14 株致病杆菌进行生物活性测定和基因组分析,发现 14 株致病杆菌均对大蜡螟具有毒杀作用,基因组生物信息分析获得 110 种杀虫蛋白,包括 Tc、Txp、Mcf、Pra/Prb 和 App 同系物等,以及其他毒力因子,如杀线虫蛋白、几丁质酶和用于合成不同生物活性化合物的次级代谢产物。Wang 等^[11]分离的 122 株共生菌对玉米螟幼虫均有口服杀虫活性或生长抑制作用,其中,致病杆菌菌株 SY5 对小菜蛾、甜菜夜蛾、玉米螟、黏虫和

黄粉虫有较强的杀虫活性。共生菌产生的具有杀虫活性的蛋白类毒素根据其作用方式可分为血腔注射活性和胃毒活性两类。血腔活性毒素蛋白包括 Mcf 毒素^[12]、Txp40 毒素^[13]、XaxAB 毒素^[14]、XhlA 毒素^[15]、Pir 毒素^[16-17]和 RTX 毒素^[18]等,胃毒活性杀虫蛋白主要有 Tc 毒素^[19]、几丁质酶^[20]和 XnGroEL 毒素^[21]等。

刘琴等^[22]从罹死二化螟虫体中分离获得对二化螟、小菜蛾、草地贪夜蛾等具有广谱寄生活性的小卷蛾斯氏线虫及其共生菌 YZ011。为明确菌株 YZ011 功能基因、基因簇及杀虫活性物质,本研究在测定共生菌 YZ011 对小菜蛾幼虫和草地贪夜蛾幼虫杀虫活性的基础上,进一步对其进行全基因组测序及生物信息学分析,注释菌株 YZ011 基因功能,预测菌株 YZ011 的次级代谢产物基因簇及毒力因子,以期菌株 YZ011 在害虫生物防治中的应用提供基础和依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

共生菌菌株 YZ011 分离自罹死二化螟幼虫体内的小卷蛾斯氏线虫,以甘油-80℃保存于江苏里下河地区农业科学研究所^[22]。小菜蛾为扬州种群,室内用油菜苗饲养繁殖多代^[23]。草地贪夜蛾虫源引自中国农业科学院植物保护研究所,人工饲料室内多代饲养繁殖^[22]。

1.2 菌株 YZ011 对小菜蛾、草地贪夜蛾的杀虫毒力

取甘油保存的 YZ011 菌株 10 μL 转接至 1 mL 胰酪大豆胨液体培养基(TSB)^[22]中,28℃、220 r/min 振荡培养 16 h 后,取 500 μL 培养液转接至 50 mL TSB 培养基再在 28℃、220 r/min 振荡培养 24 h,利用平板计数法测定菌液中菌体含量。菌液离心后用磷酸盐缓冲液(PBS)重新悬浮菌体至 1.0×10^6 CFU/mL。选取 4 龄小菜蛾幼虫和草地贪夜蛾幼虫,于解剖镜下,利用 Nanoject III 显微注射器(美国 Drummond 公司产品)向虫体倒数第 2~3 腹节间分别注射 50 nL 和 100 nL 1.0×10^6 CFU/mL 共生菌,以

注射 100 nL 无菌 PBS 为对照。小菜蛾饲养于直径为 9.0 cm 盛有卷心菜的培养皿中,草地贪夜蛾单头饲养于盛有人工饲料的 24 孔细胞培养板内,每个处理 20 头幼虫,重复 3 次,生化培养箱 25 ℃ 培养,光照时间为 16 h/d,24 h 后进行存活小菜蛾和草地贪夜蛾计数,计算死亡率。利用 GraphPad Prism 9.5.0 和 IBM SPSS Statistics 21 软件进行数据统计和处理间差异显著性分析($P < 0.05$)。

1.3 菌株 YZ011 全基因组测序及组分与功能分析

取菌株 YZ011 培养液 50 μ L 转接至 5 mL TSB 培养基中,培养 16 h 离心收集菌体,采用细菌 DNA 提取试剂盒(美国 Omega 公司产品)制备 DNA 样本,委托南京集思慧远生物科技有限公司进行菌株的全基因组测序。

采用 Unicycler v0.4.8 软件组装测序数据,获得基因组序列。使用软件 Prokka v1.12 软件进行基因组组分分析,包括编码基因和非编码基因的注释,参数使用 --rfam--addgenes,其余参数取默认值。使用 RepeatMasker 4.1.0 软件进行重复序列预测。采用综合抗生素耐药性数据库(CARD)、碳水化合物活性酶数据库(CAZy)、病原与宿主互作数据库(PHI)进行基因功能注释。利用 EffectiveT3 软件预测Ⅲ型分泌系统效应蛋白,利用 SignalP 4.1 软件进行分泌蛋白信号肽预测。利用 BLAST 软件将预测的基因序列与非冗余蛋白质氨基酸序列数据库(NR)、Swiss-Prot 蛋白氨基酸序列数据库、京都基因与基因组百科全书(KEGG)、同源蛋白质簇(COG)数据库、真核生物同源基因组(KOG)数据库、基因本体(GO)数据库、蛋白质家族(Pfam)数据库进行比对,获得预测基因的注释信息。利用 Circos v0.69-5 软件(<https://circos.ca>)及 COG 注释绘制菌株 YZ011 基因组的全基因组圈图。

1.4 进化分析和比较基因组学分析

上传菌株 YZ011 全基因组序列至 Type Strain Genome Server(TYGS)平台(<https://tygs.dsmz.de>),分别以 16S rDNA 和全基因组构建系统发育树以确定菌株 YZ011 所属物种。基于系统发育树分析结果,从 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取具有全基因组序列的嗜线虫致病杆菌菌株基因组,上传至 TYGS 平台,分别以 16S rDNA 和全基因组构建系统发育树,分析获得同源性高的菌株。利用 Geneious 9.0.2 和 OrthoVenn3 软件(<https://orthovenn3.bioinfotoolkits.net/start/upload>)分别对菌株 YZ011

及其同源性高的菌株进行全基因组基因共线性分析和直系同源核心基因簇及特异基因簇分析。

1.5 次级代谢产物基因簇分析

将菌株 YZ011 基因组上传至 Anti-SMASH^[24](<https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>),对其进行次级代谢产物基因簇分析。

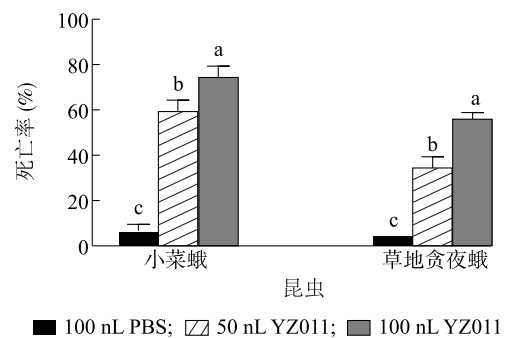
1.6 毒力因子分析

采用病原菌毒力因子数据库(Virulence Factor Database, VFDB)(<https://www.mgc.ac.cn/VFs>)对菌株 YZ011 进行毒力因子基因鉴定。利用 Blastall 2.2.26 软件对基因序列进行注释,期望值(E)设置为 1×10^{-10} 。

2 结果与分析

2.1 菌株 YZ011 对小菜蛾和草地贪夜蛾幼虫的杀虫活性

菌株 YZ011 对鳞翅目害虫小菜蛾和草地贪夜蛾幼虫均具有感染致死作用,显微注射 50 nL 和 100 nL 的 1.0×10^6 CFU/mL 共生菌 24 h 后,小菜蛾幼虫的死亡率分别为 60.0% 和 75.0%,均显著高于注射 PBS 对照;显微注射 50 nL 和 100 nL 的 1.0×10^6 CFU/mL 共生菌 24 h 后,草地贪夜蛾幼虫的死亡率分别为 35.0% 和 56.7%,亦显著高于注射 PBS 对照(图 1)。且注射 100 nL 1.0×10^6 CFU/mL 共生菌 24 h 后,小菜蛾和草地贪夜蛾幼虫的死亡率均显著高于注射 50 nL 1.0×10^6 CFU/mL 共生菌处理。



同一害虫图柱上不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

图 1 血腔注射共生菌株 YZ011 对小菜蛾幼虫和草地贪夜蛾幼虫死亡率的影响

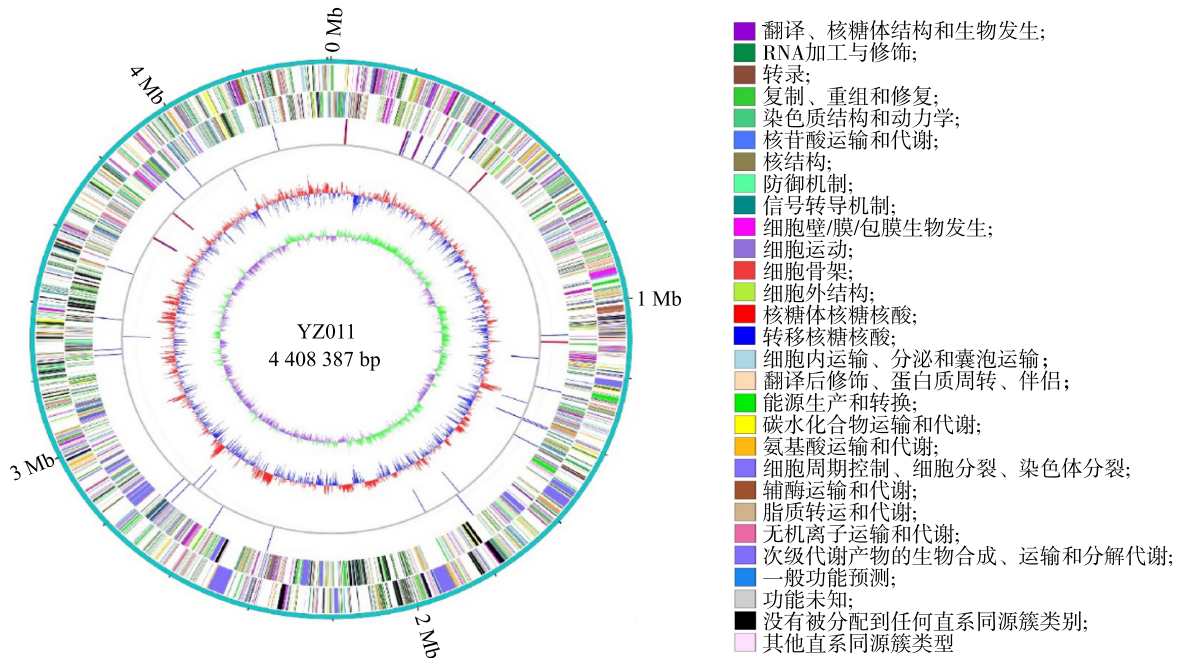
Fig.1 Effects of hemocoel injection of symbiotic strain YZ011 on the mortality of *Plutella xylostella* larvae and *Spodoptera frugiperda* larvae

2.2 菌株 YZ011 全基因组

菌株 YZ011 的全基因组图谱如图 2 所示。从

图中可以看出,共生菌菌株 YZ011 基因组大小为 4 408 387 bp (GenBank 登录号:CP158108),G+C 碱

基含量为 43.9%,预测得到3 985个编码基因、22 个 rRNA、76 个 tRNA、110 个 misc_RNA 和 1 个 tmRNA。



从外到内的 7 个圈依次为基因组大小的标识、正链上的编码序列 (CDS)、负链上的 CDS、正链上的 rRNA 和 tRNA、负链上的 rRNA 和 tRNA、G+C 碱基含量和 GC 偏移值。

图 2 菌株 YZ011 全基因组圈图

Fig.2 Genome circle diagram of strain YZ011

2.3 功能基因数

基于 KEGG、COG、Swiss-Prot、GO 和 KOG 等数据库注释得到的功能基因较多,分别为 3 933 个、2 907 个、2 871 个、2 678 个和 1 027 个,占基因总数的 99.37%、73.45%、72.54% 和 67.66% 和 25.95%;基于 CARD 数据库注释得到的基因有 254 个,占基因总数的 6.42%,而基于 CAZy 数据库注释得到的基因最少,仅 68 个,占基因总数的 1.72%。

2.4 菌株 YZ011 进化和全基因组比对

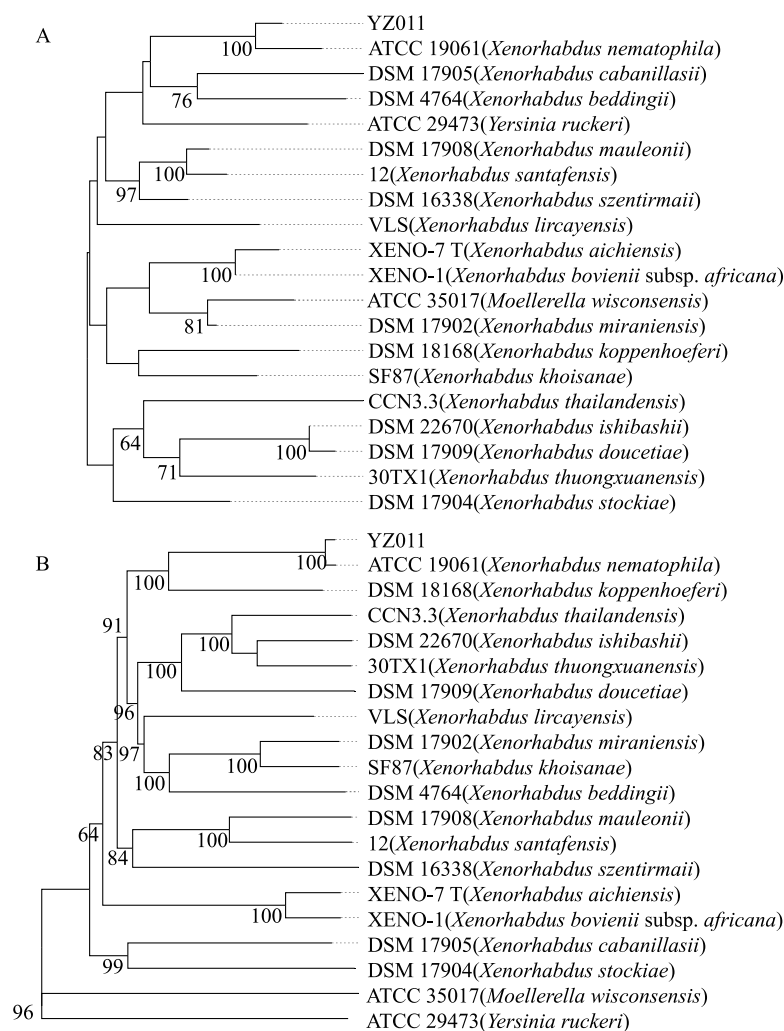
以菌株 YZ011 的 16S rDNA 和全基因组构建的系统发育树如图 3 所示。2 个系统发育树均显示,菌株 YZ011 与嗜线虫致病杆菌 (*Xenorhabdus nematophila*) 处于同一分支,因此,本研究认为共生菌菌株 YZ011 属于嗜线虫致病杆菌。

2.5 比较基因组

从 NCBI 获得 4 株具有全基因组序列的嗜线虫致病杆菌菌株,菌株 S II (*Xenorhabdus nematophila*, GenBank 登录号:CP060401)、菌株 YL001 (*Xenorhabdus nematophila*, GenBank 登录号:CP032329)、菌株

AN6/1 (*Xenorhabdus nematophila*, GenBank 登录号:LN681227) 和菌株 ATCC 19061 (*Xenorhabdus nematophila*, GenBank 登录号:FN667742)。将菌株 YZ011 的基因组序列与上述 4 株嗜线虫致病杆菌的基因组序列构建系统发育树 (图 4),从图中可见菌株 YZ011 与菌株 YL001 同源性最高,其次为菌株 S II。

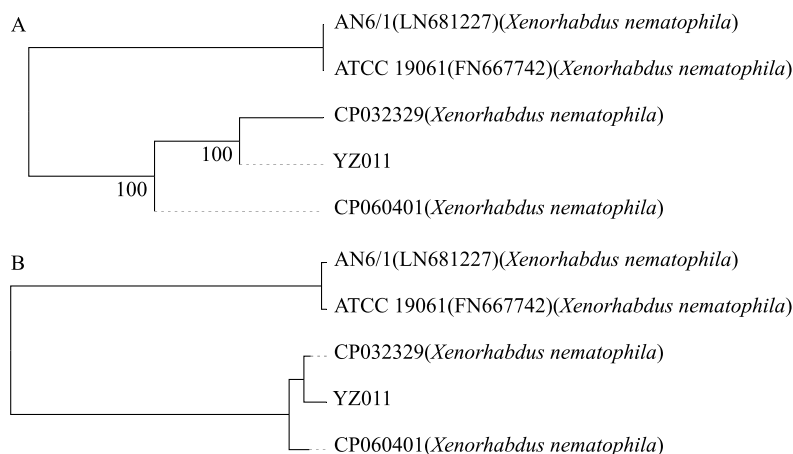
菌株 YZ011 与 4 株嗜线虫致病杆菌基因组的 DNA 同源性值、平均核苷酸一致性、基因组大小和 G+C 碱基含量见表 1。从表中可以看出,菌株 YZ011 与 4 个同源菌株的 DNA 同源性指数值 d_0 、 d_4 和 d_6 均在 88.4% 以上,表明菌株 YZ011 与 4 株同源菌株基因组的同源性均较高。菌株 YZ011 与 4 株同源菌株的平均核苷酸一致性值为 99.46%~99.98%,其中菌株 YZ011 与菌株 YL001 的平均核苷酸一致性最高 (99.98%),与菌株 S II 的平均核苷酸一致性次之 (99.96%)。这一结果也与图 4 结果相吻合。菌株 YZ011 与 4 株同源菌株的基因组大小和 G+C 碱基含量亦基本接近。



A: 基于 16S rDNA 构建的系统发育树; B: 基于全基因组构建的系统发育树。

图 3 基于 16S rDNA 和全基因组构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic trees based on 16S rDNA and whole genome



A: 基于 16S rDNA 构建的嗜线虫致病杆菌系统发育树; B: 基于全基因组构建的嗜线虫致病杆菌系统发育树。

图 4 基于 16S rDNA 基因和全基因组构建的嗜线虫致病杆菌系统发育树

Fig.4 Phylogenetic trees of *Xenorhabdus nematophila* based on 16S rDNA and whole genome

表 1 菌株 YZ011 与同源的 4 株嗜线虫致病杆菌的基因组比较

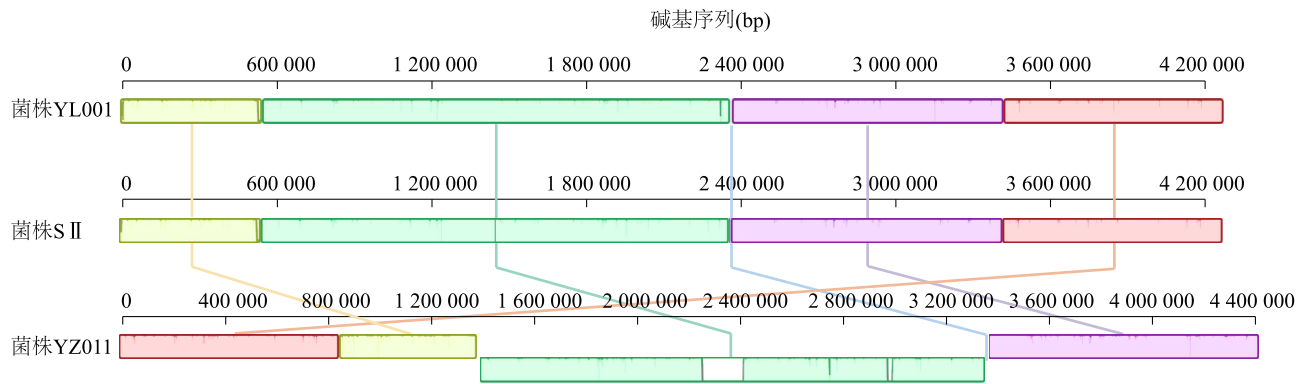
Table 1 Genome comparison between YZ011 and four homologous strains of *Xenorhabdus nematophila*

菌株	基因组大小 (bp)	G+C 碱基含量 (%)	与菌株 YZ011 的 DNA 同源性 & 平均核苷酸一致性			
			DNA 同源性 d_0 (%)	DNA 同源性 d_4 (%)	DNA 同源性 d_6 (%)	平均核苷酸一致性 (%)
YL001	4 288 892	43.8	98.6	99.8	99.4	99.98
S II	4 275 642	43.8	98.6	99.6	99.3	99.96
ATCC 19061	4 432 590	44.2	88.4	92.8	91.8	99.46
AN6/1	4 432 103	44.2	88.4	92.8	91.8	99.47

d_0 : 2 个菌株基因组基于局部比对算法的搜索工具计算后所有高得分片段的长度与总基因组长度的比值; d_4 : 高得分片段中相同基因的长度与高得分片段基因总长度的比值; d_6 : 高得分片段中相同基因的长度与总基因组长度的比值。

将菌株 YZ011 与同源性较高的菌株 YL001 和菌株 S II 进行共线性分析, 结果如图 5 所示。从图中可以看出, 菌株 YZ011 与菌株 YL001 和菌株 S II

有较多大片的共线性, 也存在基因颠倒重排和共线性较低的区域。



每一个彩色区代表一个共线区, 白色部分代表共线性程度较低。

图 5 菌株 YZ011 与菌株 YL001 和菌株 S II 的共线性分析

Fig.5 Collinearity analysis of strain YZ011 with strain YL001 and strain S II

菌株 YZ011 与菌株 YL001 和菌株 S II 的全基因组直系同源基因簇分析结果如图 6 所示。菌株 YZ011 与菌株 YL001 和菌株 S II 的核心基因簇有 3 254 个、非必须基因簇有 269 个以及特异基因簇 42 个(菌株 YZ011 29 个、菌株 YL001 13 个)。GO 分析发现菌株 YZ011 的 29 个特异基因簇涉及 2 个条目 (GO: 0006313 和 GO: 0032196), 其中 GO: 0006313 的基因簇数量为 20 个, GO: 0032196 基因簇数量为 9 个, 主要参与转座和 DNA 介导。

2.6 菌株 YZ011 次级代谢产物合成基因簇

菌株 YZ011 基因组次级代谢产物基因簇分析结果如表 2 所示。从表中可以看出, YZ011 基因组含有 19 个次级代谢产物基因簇, 包括 8 个非核糖体合成酶基因簇 (NRPS)、2 个类非核糖体合成酶基因簇 (NRPS-like)、1 个 I 型聚酮化合物合酶基因簇

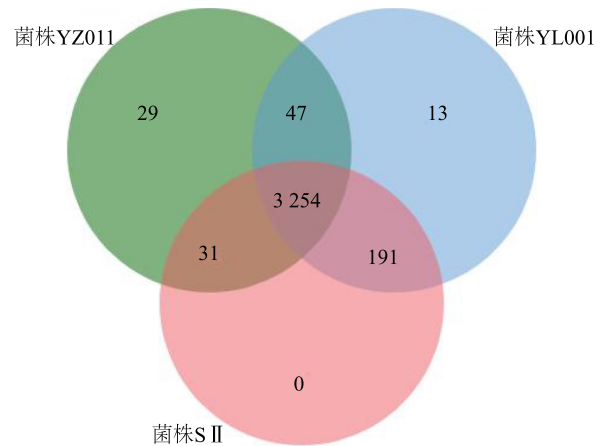


图 6 菌株 YZ011、YL001 和 S II 全基因组直系同源基因簇的韦恩图

Fig.6 Venn diagram of the whole genome orthologous gene clusters of strains YZ011, YL001 and S II

(T1PKS)、1 个独立于 NRPS 的铁载体基因簇 (NI-siderophore)、1 个吩嗪生物合成基因簇 (Phenazine)、1 个丁内酯生物合成基因簇 (Butyrolactone)、1 个含有 β -内酯的蛋白酶抑制剂生物合成基因簇 (Betalactone)、1 个核苷生物合成基因簇 (Nucleo-

side) 和 3 个未知功能的基因簇。Region 11 的 NRPS 基因簇和 Region 12 未知功能基因簇位于菌株 YZ011 与菌株 YL001 和菌株 S II 共线性较低的区域。

表 2 菌株 YZ011 次级代谢产物合成基因簇

Table 2 Gene clusters of the secondary metabolites of YZ011

基因簇所在区域	基因簇类型	最相似的已知基因簇	基因相似度 (%)
Region 1	NRPS-like	Safracin A, Safracin B	20
Region 2	NRPS	Tilivalline、9-deoxy tilivalline、Dihydroxy tilivalline、Dehydro tilivalline、Di-hydroxy-dehydro tilivalline	50
Region 3	Butyrolactone	Gamexpeptide A、Gamexpeptide B、Gamexpeptide E、Luminmide B、Luminmide D、Luminmide E、Luminmide F、Luminmide G	5
Region 4	Betalactone	Lipopolysaccharide	5
Region 5	NI-siderophore	Putrebactin、Avaroferrin	100
Region 6	NRPS	Xenoamicin A、Xenoamicin B	25
Region 7	NRPS	Xenematide	100
Region 8	NRPS, NRPS-like	Endopyrrole B、Endopyrrole A	50
Region 9	NRPS	Odilorhabdin NOSO-95A、Odilorhabdin NOSO-95B、Odilorhabdin NOSO-95C	88
Region 10	NRPS	Nematophin	26
Region 11	NRPS	Nematophin	100
Region 12	NRPS, NRPS-like, T1PKS	-	-
Region 13	NRPS	Xenoamicin A、Xenoamicin B	54
Region 14	T1PKS, NRPS-like, NRPS	Xenocoumacin I、Xenocoumacin II	100
Region 15	NRPS-like, Thiopeptide	O-antigen	14
Region 16	NRPS-like	-	-
Region 17	Phenazine	Griseoluteic acid、Demethoxygriseoluteic acid、Phenaszentine A、Phenaszentine C、Phenaszentketide C、Phenaszentketide D	66
Region 18	PpyS-KS	-	-
Region 19	Nucleoside	Berninamycin K、Berninamycin J、Berninamycin A、Berninamycin B	22

2.7 菌株 YZ011 毒力因子

基于 VFDB 数据库, 菌株 YZ011 基因组序列中共注释到 586 个毒力因子相关基因, 如大多数革兰氏阴性病原细菌感染宿主的重要分泌系统Ⅲ型分泌系统 (T3SS)、Ⅵ型分泌系统 (T6SS)、脂多糖、抗菌物质、溶血素、毒力增强因子、穿孔毒素、毒素重复序列 RTX 等类型的基因。部分毒力因子与其他革兰氏阴性昆虫病原菌的杀虫蛋白具有一定的相似性, 如溶血素 HlyA 与嗜水气单胞菌溶血素 AhlA^[25] 的相似度为 59.6%, 穿孔毒素与耶尔森氏菌 YaxAB 毒

素^[26] 的相似度为 53.8%。

3 讨论与结论

嗜线虫致病杆菌是与小卷蛾斯氏线虫共生的昆虫病原细菌, 其产生的次级代谢产物具有抗真菌、抗细菌和杀虫等活性^[27]。本团队从二化螟罹死虫体中分离获得的小卷蛾斯氏线虫 N-Yz1 对二化螟幼虫和草地贪夜蛾幼虫均有较高感染致死作用^[28], 进一步从小卷蛾斯氏线虫体内分离获得了共生菌菌株 YZ011, 生物活性测定结果表明菌株 YZ011 对小菜

蛾幼虫和草地贪夜蛾幼虫均具有较高的毒力。在全基因组测序基础上,基于 16S rDNA 和全基因组序列构建的系统进化树均表明菌株 YZ011 属于嗜线虫致病杆菌,且该菌株基因组大小、G+C 碱基含量与其他已报道的嗜线虫致病杆菌菌株一致。通过与 4 株已有全基因组序列的嗜线虫致病杆菌进行基因组比较分析发现,菌株 YZ011 与嗜线虫致病杆菌菌株 YL001 相似度最高。菌株 YL001 不仅对马铃薯晚疫病病原菌 (*Phytophthora infestans*)、玉米大斑病病原菌 (*Exserohilum turcicum*)、水稻纹枯病病原菌 (*Rhizoctonia solani*) 等具有较强抗菌活性^[29],其发酵上清液中还含有水溶性苯并茚类化合物 Xenocoumacins 和酰胺类化合物 Nematophin 等杀虫活性物质,而在其他嗜线虫致病杆菌中亦分离得到 Xenocoumacins、Nematophin、PAX 肽 (Peptide-antimicrobial-Xenorhabdus)、Benzylideneacetone、Xenommatides 和 Xenematides 等^[8,30-31] 杀虫活性物质,但嗜线虫致病杆菌代谢产物中发挥杀虫作用的具体化合物还不明确。

嗜线虫致病杆菌不能独立于其宿主长时间存活,因此很难将共生菌直接用作生物农药。基于全基因组测序技术和生物信息学方法,对致病杆菌的毒力因子进行分析对推进共生菌在害虫防控领域的应用具有重要意义。本研究对菌株 YZ011 次级代谢产物合成基因簇及其毒力因子进行了分析,为后续克隆相关基因获得对鳞翅目害虫具有杀虫活性的毒素提供基础。聚酮类化合物 (Polyketide, PK) 和非核糖体多肽 (Nonribosomal peptide, NRP) 是目前研究最多的两类重要的次级代谢产物,其生物合成需要 PK 和 NRP。PK 合成多种聚酮化合物,包括抗生素、抗肿瘤物质、免疫抑制剂等,NRP 则合成多种天然多肽,如免疫抑制剂、抗生素、抗癌和抗病毒因子、杀虫剂、铁载体和生物表面活性剂等^[6-7]。对菌株 YZ011 预测得到的 19 个次级代谢产物基因簇中 NRP 基因簇达 9 个,表明菌株 YZ011 中可能存在毒素物质合成基因。值得注意的是,次级代谢产物基因簇中 Region 11 的 NRP 基因簇位于菌株 YZ011 与菌株 YL001 和菌株 S II 共线性较低的区域,该共线性较低的区域还包括 Region 12 这一未知功能基因簇,说明该区域可能存在新的潜在活性物质基因。基于 VFDB 数据库,菌株 YZ011 基因组中注释到多种毒素、胞外酶和抗菌剂基因,其中一些同源基因在

毒杀昆虫、营养获取和免疫逃避等方面发挥重要作用^[32-33]。毒力因子与特定的分泌系统有关,革兰氏阴性菌特有的分泌机制可以将蛋白质直接从细胞质分泌到细胞外或直接进入靶细胞,包括 I 型分泌系统 (T1SS)、T3SS 和 T6SS。其中,T1SS 能产生相对分子量较大的毒素蛋白,如 RTX 蛋白家族的蛋白^[34]。菌株 YZ011 注释到 9 个由 T1SS 分泌的 RTX 家族蛋白。T3SS 在致病杆菌侵染宿主过程中发挥着重要作用,病原菌通过 T3SS 将效应蛋白注射到宿主细胞中,进而调控其致病力。目前已报道发光杆菌菌株均编码至少 1 个 T3SS,而致病杆菌却不一定存在 T3SS^[9, 35-38]。另外,致病杆菌通过 T6SS 分泌系统将毒素分子直接递送到靶细胞,致病杆菌基因组至少编码 1 个 T6SS,具有多个 T6SS 的菌株在与宿主的相互作用中更具有竞争优势^[35,39]。本研究中,菌株 YZ011 基因组中预测得到 5 个 T3SS 效应蛋白基因和 32 个 T6SS 效应蛋白基因,说明菌株 YZ011 在害虫防控领域具有较高的应用潜力。

不同菌株的分泌系统存在一定差异,菌株分泌的活性物质亦变化较大,甚至在相同物种的菌株之间亦是如此^[40]。菌株 YZ011 毒力因子注释结果表明,菌株 YZ011 中含有多个已报道嗜线虫致病杆菌毒力因子,同时也存在一定差异。Txp40 是一种在昆虫病原线虫共生菌中普遍存在且高度保守的杀虫毒素蛋白,可导致昆虫中肠肠壁细胞间排列紊乱,对多种鳞翅目和双翅目昆虫具有毒杀作用,Kinkar 等^[13] 研究结果表明重组 Txp40 对大蜡螟幼虫具有致死毒性。本研究在菌株 YZ011 没有注释到 Txp40 毒素蛋白,但是菌株 YZ011 对小菜蛾和草地贪夜蛾幼虫的血腔注射毒性预示其必然存在某些毒力物质,对注释到的其他毒力因子 XhlA、Cytolysin 等在 Cowles 等^[15]、Mcquade 等^[41] 研究中已有报道。共生菌菌株 YZ011 对小菜蛾幼虫和草地贪夜蛾幼虫的杀虫毒力受哪些毒力基因调控尚需进一步分析与验证。

综上,本研究对分离自小卷蛾斯氏线虫的嗜线虫致病杆菌 YZ011 进行了全基因组序列分析,对其潜在的毒力基因进行了预测,后续将进一步克隆毒力基因进行异源表达以及对靶标昆虫生物活性测定,以期有害虫生物防治开发新型生物农药提供技术支持。

参考文献:

- [1] KOPPENHÖFER A M, SHAPIRO-ILAN D I, HILTPOLD I. Entomopathogenic nematodes in sustainable food production [J]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2020, 4: 125.
- [2] CIMEN H R, TOURAY M, GULSEN S H, et al. Natural products from *Photorhabdus* and *Xenorhabdus*: mechanisms and impacts [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2022, 106 (12): 4387-4399.
- [3] 段秀峰, 林茂松, 李红梅, 等. 伯氏致病杆菌 (*Xenorhabdus bovienii* BE) 杀虫活性物质的分离和生物测定 [J]. *江苏农业学报*, 2009, 25 (1): 59-67.
- [4] ABD-ELGAWAD M M M. *Xenorhabdus* spp.: an overview of the useful facets of mutualistic bacteria of entomopathogenic nematodes [J]. *Life*, 2022, 12 (9): 1360.
- [5] SCHOCH C L, CIUFO S, DOMRACHEV M, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools [J]. *Database*, 2020, 2020: baaa062.
- [6] SHI Y M, BODE H B. Chemical language and warfare of bacterial natural products in bacteria-nematode-insect interactions [J]. *Natural Product Reports*, 2018, 35 (4): 309-335.
- [7] CAI X F, NOWAK S, WESCHE F, et al. Entomopathogenic bacteria use multiple mechanisms for bioactive peptide library design [J]. *Nature Chemistry*, 2017, 9 (4): 379-386.
- [8] TOBIAS N J, WOLFF H, DJAHANSCHIRI B, et al. Natural product diversity associated with the nematode symbionts *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* [J]. *Nature Microbiology*, 2017, 2 (12): 1676-1685.
- [9] CHASTON J M, SUEN G, TUCKER S L, et al. The entomopathogenic bacterial endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: convergent lifestyles from divergent genomes [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (11): e27909.
- [10] PALMA L, FRIZZO L, KAISER S, et al. Genome sequence analysis of native *Xenorhabdus* strains isolated from entomopathogenic nematodes in Argentina [J]. *Toxins*, 2024, 16 (2): 108.
- [11] WANG H, DONG H, QIAN H T, et al. Isolation, bioassay and characterisation of *Xenorhabdus* sp. SY5, a highly virulent symbiotic bacterium of an entomopathogenic nematode isolated from China [J]. *Nematology*, 2013, 15 (2): 153-163.
- [12] DABORN P J, WATERFIELD N, SILVA C P, et al. A single *Photorhabdus* gene, makes caterpillars floppy (mcf), allows *Escherichia coli* to persist within and kill insects [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99 (16): 10742-10747.
- [13] KINKAR O U, PRASHAR A, KUMAR A, et al. Txp40, an insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus nematophila*: purification, toxicity assessment and biophysical characterization [J]. *Toxicon*, 2022, 218: 40-46.
- [14] VIGNEUX F, ZUMBIHL R, JUBELIN G, et al. The *xaxAB* genes encoding a new apoptotic toxin from the insect pathogen *Xenorhabdus nematophila* are present in plant and human pathogens [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282 (13): 9571-9580.
- [15] COWLES K N, GOODRICH-BLAIR H. Expression and activity of a *Xenorhabdus nematophila* haemolysin required for full virulence towards *Manduca sexta* insects [J]. *Cellular Microbiology*, 2005, 7 (2): 209-219.
- [16] 杨 晴, 张 杰, 李天慧, 等. 嗜线虫致病杆菌属 Pir 毒素基因克隆和生物信息学分析 [J]. *中国植保导刊*, 2017, 37 (9): 5-11.
- [17] AHANTARIG A, CHANTAWAT N, WATERFIELD N R, et al. PirAB toxin from *Photorhabdus asymbiotica* as a larvicide against dengue vectors [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (13): 4627-4629.
- [18] SATCHELL K J F. Structure and function of MARTX toxins and other large repetitive RTX proteins [J]. *Annual Review of Microbiology*, 2011, 65: 71-90.
- [19] RODERER D, BRÖCKER F, SITSEL O, et al. Glycan-dependent cell adhesion mechanism of Tc toxins [J]. *Nature Communications*, 2020, 11 (1): 2694.
- [20] LIU J, NANGONG Z Y, ZHANG J, et al. Expression and characterization of two chitinases with synergistic effect and antifungal activity from *Xenorhabdus nematophila* [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2019, 35 (7): 106.
- [21] SHI H X, ZENG H M, YANG X F, et al. An insecticidal protein from *Xenorhabdus ehlersii* triggers prophenoloxidase activation and hemocyte decrease in *Galleria mellonella* [J]. *Current Microbiology*, 2012, 64 (6): 604-610.
- [22] 刘 琴, 黄立鑫, 陆玉荣, 等. 小卷蛾斯氏线虫 N-Yz1 对草地贪夜蛾的致毒作用和感染特性 [J]. *中国生物防治学报*, 2023, 39 (3): 542-549.
- [23] 祁建杭, 刘 琴, 刘雪梅, 等. KNO₃ 提高苏云金芽胞杆菌 Bt-8 发酵液杀虫活性的作用分析 [J]. *扬州大学学报 (农业与生命科学版)*, 2022, 43 (5): 136-141.
- [24] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN H E, et al. AntiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation [J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51 (W1): 46-50.
- [25] WILSON J S, CHURCHILL-ANGUS A M, DAVIES S P, et al. Identification and structural analysis of the tripartite α -pore forming toxin of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Nature Communications*, 2019, 10 (1): 2900.
- [26] WAGNER N J, LIN C P, BORST L B, et al. YaxAB, a *Yersinia enterocolitica* pore-forming toxin regulated by RovA [J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81 (11): 4208-4219.
- [27] 张 媛, 王 芳, 赵紫华. 斯氏线虫-致病杆菌共生体侵染昆虫的生物标志物 [J]. *植物保护学报*, 2023, 50 (5): 1227-1236.
- [28] 刘 琴, 韩光杰, 李传明, 等. 昆虫病原线虫 N-Yz1 对水稻二化螟的控制作用 [J]. *中国生物防治学报*, 2024, 40 (5): 1015-1021.

- [29] ZHANG S J, LIU Q, HAN Y F, et al. Nematophin, an antimicrobial dipeptide compound from *Xenorhabdus nematophila* YL001 as a potent biopesticide for *Rhizoctonia solani* control[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1765.
- [30] INCEDAYI G, CIMEN H R, ULUG D, et al. Relative potency of a novel acaricidal compound from *Xenorhabdus*, a bacterial genus mutualistically associated with entomopathogenic nematodes[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 11253.
- [31] DREYER J, MALAN A P, DICKS L M T. Bacteria of the genus *Xenorhabdus*, a novel source of bioactive compounds[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3177.
- [32] CALDAS C, CHERQUI A, PEREIRA A, et al. Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(3): 1297-1304.
- [33] DARSOUEI R, KARIMI J, DUNPHY G B. Functional characterization of outer membrane proteins (OMPs) in *Xenorhabdus nematophila* and *Photorhabdus luminescens* through insect immune defense reactions[J]. *Insects*, 2019, 10(10): 352.
- [34] KANONENBERG K, SCHWARZ C K W, SCHMITT L. Type I secretion systems-a story of appendices[J]. *Research in Microbiology*, 2013, 164(6): 596-604.
- [35] SILVA C P, WATERFIELD N R, DABORN P J, et al. Bacterial infection of a model insect: *Photorhabdus luminescens* and *Manduca sexta*[J]. *Cellular Microbiology*, 2002, 4(6): 329-339.
- [36] OGIER J C, PAGÈS S, BISCH G, et al. Attenuated virulence and genomic reductive evolution in the entomopathogenic bacterial symbiont species, *Xenorhabdus poinarii*[J]. *Genome Biology and Evolution*, 2014, 6(6): 1495-1513.
- [37] MURFIN K E, WHOOLEY A C, KLASSEN J L, et al. Comparison of *Xenorhabdus bovienii* bacterial strain genomes reveals diversity in symbiotic functions[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16: 889.
- [38] HINCHLIFFE S J. Insecticidal toxins from the *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* bacteria[J]. *The Open Toxinology Journal*, 2013, 3(1): 101-118.
- [39] KIM I H, ARYAL S K, AGHAI D T, et al. The insect pathogenic bacterium *Xenorhabdus innexi* has attenuated virulence in multiple insect model hosts yet encodes a potent mosquitocidal toxin[J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 927.
- [40] BODE E, ASSMANN D, HAPPEL P, et al. EasyPACId, a simple method for induced production, isolation, identification, and testing of natural products from proteobacteria[J]. *Bio-protocol*, 2023, 13(13): e4709.
- [41] MCQUADE R, STOCK S P. Secretion systems and secreted proteins in gram-negative entomopathogenic bacteria: their roles in insect virulence and beyond[J]. *Insects*, 2018, 9(2): 68.

(责任编辑:石春林)