

## 线虫寄生菌巴斯德杆菌遗传多样性分析

连玲丽<sup>1,2</sup> 谢荔岩<sup>1</sup> 段永平<sup>1</sup> 林奇英<sup>1</sup> 吴祖建<sup>1\*</sup>

(1. 福建农林大学植物病毒研究所 福州 350002)

(2. 福建农林大学生命科学学院 福州 350002)

**摘要:** 应用 16S rDNA-PCR 技术快速检测不同根系样品中的巴斯德杆菌(*Pasteuria* spp.), 并采用 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 法初步分析这些样品中巴斯德杆菌群体的遗传多样性, 结果表明, 来自福建、广东的 30 份感染根结线虫病的根系中, 有 9 份样品含有巴斯德杆菌; PCR-RFLP 分析表明, 克隆子的 *Eco*HI 酶切带型分为 5 类, 其中 2 类占相对优势, PCR-SSCP 带型分类的情况与 PCR-RFLP 的基本一致, 但表现出更大的差异性。选取 12 个克隆子进行测序分析, 结果显示, 克隆子的 16S rDNA 序列与穿刺巴斯德杆菌(*Pasteuria penetrans*)的相应序列具有较高的同源性(97.8%~99.7%); 系统进化关系分析进一步表明, 不同根系样品中的巴斯德杆菌(*Pasteuria* spp.) 16S rDNA 序列与 GenBank 已收录的穿刺巴斯德杆菌(*P. penetrans*)序列形成 1 个主要分支和 7 个独立分支, 具有一定的遗传差异。

**关键词:** 巴斯德杆菌, 16S rDNA, PCR-RFLP, PCR-SSCP, 遗传多样性

## Genetic Diversity of Nematode Parasitic Bacteria *Pasteuria* spp.

LIAN Ling-Li<sup>1,2</sup> XIE Li-Yan<sup>1</sup> DUAN Yong-Ping<sup>1</sup> LIN Qi-Ying<sup>1</sup> WU Zu-Jian<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Plant Virology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

(2. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

**Abstract:** *Pasteuria* spp. was one of the highly potential biocontrol agents of plant-parasitic nematodes. Based on their 16S rDNA sequences, we developed simple PCR, PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) and PCR-SSCP (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism) methods for rapid detecting the genetic diversities of *Pasteuria* spp. in root samples. Using simple PCR, we detected *Pasteuria* spp. from nine out of thirty nematode-infected samples collected from different crops in Fujian and Guangzhou of China. The genetic diversities of *Pasteuria* spp. in root samples were examined by PCR-RFLP and PCR-SSCP. Two of the five variant RFLP patterns were predominant among the clones when they were digested by restriction enzyme *Eco*HI. The results from PCR-SSCP analysis were consistent with those of PCR-RFLP and showed greater gene diversities. Twelve clones were chosen and sequenced. The results indicated the sequences of clones shared 97.8%~99.7% similar identity with those of previously

reported *P. penetrans*, and the clones were further divided into one major clades and seven individual clades in the phylogenetic tree.

**Keywords:** *Pasteuria* spp., 16S rDNA, PCR-RFLP, PCR-SSCP, Genetic diversity

根结线虫病是一类重要的植物根部病害,危害茄科、瓜类等多种经济作物,给农业生产带来巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。近年来,在根结线虫病的综合治理中,生物防治为这类病害的控制开辟了一条新的途径,生防因子的开发和利用成为研究的热点之一。巴斯德杆菌(*Pasteuria* spp.)作为根结线虫的一类专性寄生细菌,能有效减少线虫群体数量,具有良好的生防前景。国外学者就这类细菌的生活史、分类地位、寄主范围、纯化培养及防病效果开展了大量研究<sup>[2]</sup>,国内的相关研究起步较晚,主要采用显微镜技术调查细菌资源,盆栽测定巴斯德杆菌的防线虫效果<sup>[3-5]</sup>,而对巴斯德杆菌资源多样性的研究尚未见报道。研究表明,不同来源的巴斯德杆菌在寄主亲和性方面存在较大差别<sup>[6]</sup>,有些巴斯德杆菌对多个根结线虫小种均有较强的亲和性,有些则专性侵染一个根结线虫小种,这种对寄主亲和力的差别直接影响这些细菌的防病效果和应用范围。因而,明晰我国巴斯德杆菌资源的多样性程度,对于进一步筛选广谱寄生且高效防病的菌源具有重要意义。基于此,本试验利用巴斯德杆菌 16S rRNA 基因的特异引物检测感病作物根系,同时采用PCR-RFLP和PCR-SSCP方法分析阳性样品的遗传差异,旨在揭示此类细菌的

群体遗传多样性,明确我国巴斯德杆菌的系统发育地位,并为其资源的开发利用奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 感病根系样品

感染根结线虫病的植物根系分别采自福建省南平顺昌(PS)、漳州(PZ)、龙岩(PL)和福州(PF)等地区的线虫多发地,分别编号(括号内为寄主植物)为PS1(包菜)、PS2(南瓜)、PS3(黄瓜)、PS4(苦瓜)、PS5(丝瓜)、PS6(白菜)、PS7(芹菜)、PS8(香菜)、PS9(茄子)、PS10(番茄)、PS11(蜜桔)、PS12(雪柑)、PS13(玉米);PZ1(苦瓜)、PZ2(黄瓜)、PZ3(四季豆)、PZ4(香蕉)、PZ5(芦柑)、PZ6(麦冬)、PZ7(朱顶红);PL1(菜豆)、PL2(姜)、PL3(丝瓜)、PL4(空心菜);PF1(白菜)、PF2(菜豆)、PF3(黄瓜)、PF4(番茄)、PF5(烟草)。样品 P3 来自广州市竹料镇人和村,寄主植物为丝瓜。

### 1.2 引物

参考Duan等<sup>[7]</sup>和GenBank收录的序列,设计并合成了2对引物,A1引物对39F/1166R用于巴斯德杆菌 16S rDNA 基因的扩增克隆和PCR-RFLP分析,A2引物对40F/423R用于PCR-SSCP分析(表1),引物均由上海博亚生物技术有限公司合成。

表1 巴斯德杆菌 16S rDNA 序列扩增引物

Table 1 Primers used for the amplification of 16S rDNA partial sequence of *Pasteuria* spp.

编号(Code)	引物(Primers)	产物长度(bp) (Product length)	参考文献(Reference)
A1	39F: 5 - GCGGCGTGCCCTAATACA-3 1166R: 5 -CGCCGGCTGTCTCTCCAA-3	1100	[7]
A2	40F: 5 -GCGGCGTGCCCTACTACA-3 423R: 5 -CTTCCCGATGAACAGGG-3	400	本研究

### 1.3 根系总 DNA 提取

称取 0.2 g 根样,剪碎后于液氮中充分研磨,加入 1 mL 抽提缓冲液(7 mol/L 脲, 0.35 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 20 mmol/L EDTA, 1% sarkosyl),移入 2 mL 离心管中,加入 1 mL 酚 氯仿 异戊醇(25 : 24 : 1, V/V/V)混合溶液,充分混匀,6000 r/min 室温离心 5 min;取上清用等体积氯仿 异戊醇(24 : 1, V/V)混合溶液抽提,9000 r/min 室温

离心 5 min;取上清,移入新管,加入等体积异丙醇, -20 保存 1 h, 12000 r/min 离心 20 min(可见 DNA 沉淀),弃上清;加入 1 mL 70% 乙醇, 12000 r/min 离心 1 min;弃上清,真空干燥,用 50  $\mu$ L TE 缓冲液溶解沉淀, -20 保存备用。

### 1.4 PCR 扩增与克隆

以根系总DNA为模板,采用A1引物对扩增巴斯德杆菌 16S rDNA 基因。PCR扩增反应体系为总体

积 25  $\mu\text{L}$ , 包括DNA模板 2  $\mu\text{L}$ , 引物(10 pmol/L)各 1  $\mu\text{L}$ 、dNTP (10 mmol/L)0.5  $\mu\text{L}$ 、0.5  $\mu\text{L}$ 牛血清白蛋白 BSA(10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )、10 $\times$ Buffer 4  $\mu\text{L}$ 、H<sub>2</sub>O 15.5  $\mu\text{L}$ 、Taq DNA聚合酶(2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为: 94 预变性 7 min; 94 变性 60 s, 61 退火 60 s, 72 延伸 60 s, 共 37 个循环; 72 延伸 10 min。反应于 T3 热循环仪内完成。

PCR 产物用 UltraClean 15 DNA Purification Kit(Mo Bio Labs 产品)回收后, 与 pMD-18T 载体 (TaKaRa 公司产品)连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 挑取白斑, 用双酶切法进行鉴定, 所有鉴定为阳性的克隆子全部保存备用。

### 1.5 阳性克隆子的 PCR-RFLP 分析

以阳性克隆为模板, 用 A1 引物对扩增获得 1100 bp 的目的片段(扩增条件同 1.4), 分别用 *Hha*、*Hae* 和 *EcoH* I 内切酶(Promega 公司产品)酶切目的片段。反应体系为 20  $\mu\text{L}$ , 其中扩增产物和酶分别为 17.5  $\mu\text{L}$  和 5 U, 37  $^{\circ}\text{C}$  温育 3 h~4 h 或过夜后, 2%的琼脂糖凝胶电泳分析酶切产物。

### 1.6 阳性克隆子的 PCR-SSCP 分析

以阳性克隆为模板, 用 A2 引物对扩增获得 400 bp 的目的产物, 扩增条件为: 94 预变性 4 min; 94 变性 30 s, 65 退火 45 s, 72 延伸 45 s, 35 个循环; 72 延伸 10 min。反应体系同 1.4。

取扩增产物 4  $\mu\text{L}$ , 加入 8  $\mu\text{L}$  DNA 变性剂(95% 去离子甲酰胺、0.5%溴酚兰、0.5%二甲苯氰 FF); 混匀后, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min, 冰浴 5 min, 迅速上样至 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺 二甲叉双丙烯酰胺=30 0.8, W/W)中电泳, 4  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 以 150 V 电泳 4 h, 经银染后观察拍照。

### 1.7 序列处理和系统进化树构建

根据RFLP和SSCP分析结果, 从中选择具有不同酶切图谱或带型的 12 个克隆, 进行测序分析。阳性克隆送交上海博亚生物技术有限公司测定序列。所获序列经DNAman编辑去除末端的不完整碱基片段, 对序列同源性进行初步分析; 再利用Clustal W 软件(Version 1.83)<sup>[8]</sup>进行序列对位排列, Clustal W 软件参数设置为: slow/accurate, gap opening penalty: 15.00, gap extension penalty: 6.66, delay divergent sequences: 30%, DNA transitions weight: 0.50, negative matrix: off, DNA weight matrix: IUB, 序列以phy格式输出。输出文件导入tree-puzzle(5.2)<sup>[9]</sup>

软件构建 Maximum-likelihood(ML)进化树, 各项参数设置如下: Tree search procedure: Quartet puzzling, Number of puzzling steps: 10000, Display as outgroup: *Thermoactinomyces dichotomicus*, Parameter estimation: accurate (slow), Parameter estimation uses: neighbor-joining tree<sup>[10]</sup>, Model of substitution: HKY<sup>[11]</sup>, Transition/transversion parameter and Nucleotide frequencies: Estimated from data set, Model of rate heterogeneity: uniform rate, 由此生成的out-tree 文件, 在 Treeview 软件中编辑输出。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增

采用巴斯德杆菌 16S rDNA 的特异引物 39F 和 1166R, 对 30 份根系 DNA 样品进行 PCR 扩增, 经电泳后, 9 份样品的扩增产物中出现约 1100 bp 的目的片段(图 1), 说明这些样品中含有巴斯德杆菌。其中, 采自南平顺昌的样品 PS1、PS2、PS3、PS4、PS7 和 PS9 中均检测到目的片段, 采自其它地区的样品中只有 1~2 个样品为阳性, 分别是采自漳州的 PZ2 样品、采自福州市的 PF4 样品及采自广州市的 P3 样品。检测为阳性的根系样品多属瓜类和茄科类作物, 可能与这些寄主植物易受根结线虫侵染有关。

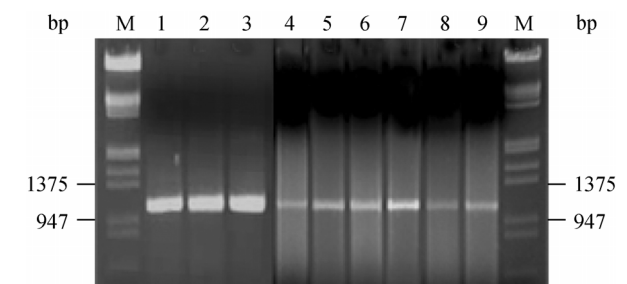


图 1 根样 16S rDNA 的 PCR 扩增结果

Fig.1 16S rDNA PCR results of root samples

M: DNA marker 1( DNA/*Hind* III+*EcoR* I); 1: PS1; 2: PS2; 3: PS3; 4: PS4; 5: PS7; 6: PS9; 7: P3; 8: PZ2; 9: PZ4

### 2.2 PCR-RFLP 分析

采用 PCR-RFLP 法分析 PS1、PS2、PS4、PS7、PS9 和 P3 等 6 份根样中巴斯德杆菌的遗传差异。以 A1 引物扩增阳性克隆, 再分别用 *Hha* I、*Hae* 和 *EcoH* 三种内切酶酶切 PCR 扩增产物, 结果显示(图 2), 经 *Hha* 酶切后, 大多数克隆得到约 500 bp、

350 bp 和 170 bp 的 3 个片段, 少数克隆得到 600 bp 和 350 bp 的 2 个片段, 如克隆 PS4-K19(图 2a 泳道 5); 经 *Hae* III 酶切后, 多数克隆得到的酶切条带为 500 bp、250 bp 和 170 bp; 极少数克隆的酶切带型较为特殊, 如 PS7-C39(图 2b 泳道 5), 这些结果说明 *Hha* I 和 *Hae* III 的酶切图谱所表现的多态性比较有限。相比而言, *Eco*H I 的酶切图谱表现出 5 种不同的带型(图 2c, 表 2), 较好地反映根样中巴斯德杆菌群体的多态性。

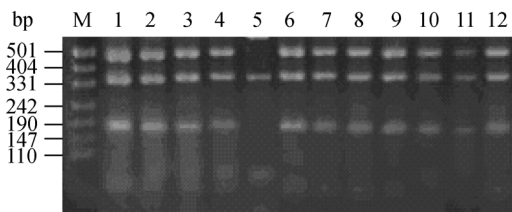


图 2a 部分克隆的 *Hha* I 酶切电泳图谱  
**Fig. 2a RFLP patterns of partial clones by *Hha* I**  
 M: DNA Marker 2; 1: PS1-A4; 2: PS1-E19; 3: PS1-G16; 4: PS4-B7; 5: PS4-K19; 6: PS4-I2; 7: PS7-A47; 8: PS7-C39; 9: PS7-D5; 10: PS9-E9; 11: PS9-E36; 12: PS9-H22

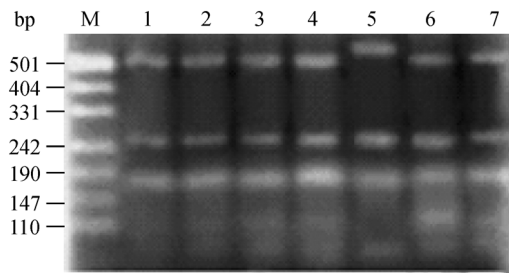


图 2b 部分克隆的 *Hae* III 酶切电泳图谱  
**Fig. 2b RFLP patterns of partial clones by *Hae* III**  
 M: DNA Marker 2; 1: PS1-A25; 2: PS1-E19; 3: PS1-G16; 4: PS7-A47; 5: PS7-C39; 6: PS7-D5; 7: PS9-E9

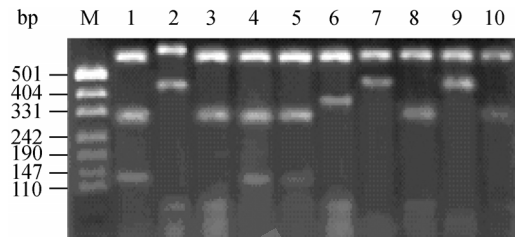


图 2c 部分克隆的 *Eco*H I 酶切电泳图谱  
**Fig. 2c RFLP patterns of partial clones by *Eco*H I**  
 M: DNA Marker 2; 1: PS1-A4; 2: PS1-E19; 3: PS1-G16; 4: PS4-B7; 5: PS4-K19; 6: PS7-C39; 7: P3-4; 8: PS2-D12; 9: PS2-E42; 10: PS9-E9

表 2 PCR-RFLP 的 *Eco*H I 酶切结果和 PCR-SSCP 结果比较  
 Table 2 Comparison of results from PCR-RFLP *Eco*H I patterns and PCR-SSCP patterns

<i>Eco</i> H I 酶切结果( <i>Eco</i> H I pattern)			SSCP 电泳结果(SSCP pattern)	
类型 (Type)	谱带 (Band profiles)	样品 (Samples)	类型 (Type)	样品 (Samples)
1	600 bp、300 bp 和 120 bp	PS1 和 PS4 的克隆, 如 PS1-A4(lane1)、PS1-G25、PS4-A32、PS4-B7 (lane4)、PS4-D4、PS4-K19(lane5)和 P3-11	I	PS1 和 PS4 的多数克隆, 如 PS1-A4 (lane 2)、PS1-E6(lane 4)、PS1-E19(lane 5)、PS1-G36(lane 7)、P3-11(lane 10)、PS4-A32(lane 11)、PS4-B7 和 PS4-K19
2	600 bp、450 bp 和 50 bp	PS2、PS7、PS9 和 P3 的绝大多数克隆, P3-4(lane 7)、P3-15、PS2-E42(lane 9)	II	P3、PS2、PS7 和 PS9 克隆 P3-4(lane 8)、P3-15 (lane 9)、PS2-A22(lane 13)、PS2-E42(lane 14)、PS2-E43(lane 15)及部分 PS1 克隆, 如 PS1-B5(lane 3)
3	600 bp、300 bp、70 bp 和 50 bp	PS1-G16(lane 3)和 PS9-E9(lane 8)		PS9-E9(lane 1)和 PS1-G16
4	600 bp、350 bp 和 50 bp	PS7-C39(lane 6)		PS1-G25(lane 6)、PS7-C39(lane 16)
5	620 bp 和 450 bp	PS1-E19(lane 2)、PS1-A25		PS4-D4(lane 12)

2.3 PCR-SSCP 分析

SSCP 技术适合于短片段的多态性分析, 因此本试验采用 A2 引物扩增阳性克隆, 获得约 400 bp 的目的片段, 用于 SSCP 电泳分析。结果显示(图 3), 目的片段呈现出 5 种不同的泳动带型。总的看来(表 2), SSCP 分析结果与 RFLP 中 *Eco*H I 酶切结果基本相符, 但表现出更大的差异, 如有些 *Eco*H I 酶切位点相同的 PS1 克隆(类型 1)经 SSCP 分析后, 得到两组不同的带型(类型 I 和类型 II)。

从 PCR-RFLP 和 PCR-SSCP 分析结果可以看出,

6 份根系样品中的巴斯德杆菌群体可以归为两个大类, 第一大类由 PS2、PS7、PS9 和 P3 绝大多数克隆

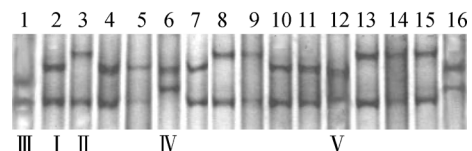


图 3 部分克隆子的 SSCP 电泳带型  
**Fig. 3 SSCP patterns of partial clones**  
 1: PS9-E9; 2: PS1-A4; 3: PS1-B5; 4: PS1-E6; 5: PS1-E19; 6: PS1-G25; 7: PS1-G36; 8: P3-4; 9: P3-15; 10: P3-11; 11: PS4-A32; 12: PS4-D4; 13: PS2-A22; 14: PS2-E42; 15: PS2-E43; 16: PS7-C39

子组成, 它们所表现的酶切带型(类型 2)及 SSCP 泳动带型(类型 )一致; 第二大类由根样 PS1 和 PS4 的多数克隆组成, 其带型(RFLP 类型 1 和 SSCP 类型 )一致。其中, 第一大类在根系样品中所占比例较大, 是本试验检测到的巴斯德杆菌的主要类群。比较不同根系样品, 可以看出 PS1 的巴斯德杆菌遗传变异最大, 群体内存在丰富的多样性, 而其它 5 个根系的细菌遗传变异较小, 种类较为单一。

#### 2.4 序列分析

根据 RFLP 和 SSCP 分析结果, 选择 12 个来自不同根样的阳性克隆进行测序分析, 应用 DNAMAN 软件分析序列的同源性, 结果表明 12 条序列均与穿刺巴斯德杆菌(*Pasteuria penetrans*)的同源性最高(97.8%~99.7%)。系统进化分析中, 序列对位排列后的片段长度为 1142 bp, 序列中 A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 22.5%、18.6%、23.2%和 35.7%, G/C 含量较高。在所有特征值中, 包括 840 个恒定位点(Constant site, 占总数的 73.6%), 总位点模式达 193 个, 恒定位点模式仅 4 个。从构建的进化树

图(图 4)可以看出, 12 条序列和 GenBank 中已收录的穿刺巴斯德杆菌序列(AF375881, AF077672; 寄主为根结线虫)共同组成一个大分支(置信度达 92), 与巴斯德杆菌 *Pasteuria nishizawae* 种(寄主为胞囊线虫)相邻, 而与其它种如 *P. goettingianae* (AF515699)和 *P. ramosa*(DEU34688)等遗传距离较远, 表明本实验检测到的巴斯德杆菌群体中穿刺巴斯德杆菌小种占绝对优势。

根据进化树图, 又可将本实验检测的穿刺巴斯德杆菌小种分为 1 个主要类群和 7 个独立分支, 主要类群与前述 *EcoH I* 内切酶的 RFLP 类型 2 及 SSCP 类型 基本相符; P3-11 和 PS4-B7 位于同一小分支, PS7-C39、PS4-D4、PS9-E9 分别形成独立分支, 这些均与 SSCP 显示出特异带型的结果一致; 而 RFLP 和 SSCP 分析中归为同一类型的 PS1-A4、PS4-A32 和 PS4-K19 也分别形成了独立分支, 说明这些克隆的序列中存在 RFLP 和 SSCP 没有检测出来的差异特征。

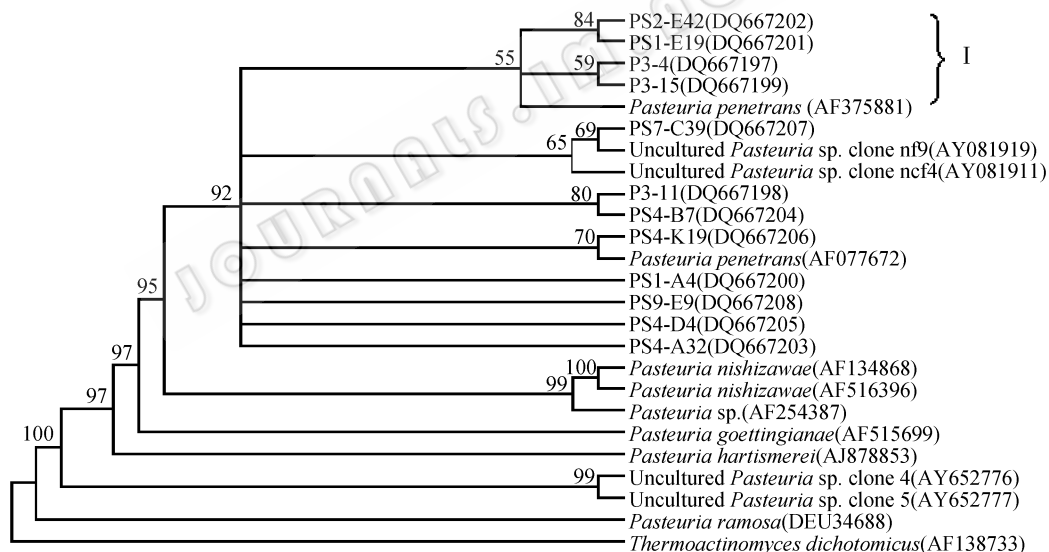


图 4 巴斯德杆菌 16S rDNA 序列的系统进化树图

Fig.4 Phylogenetic tree of *Pasteuria* spp. based on 16S rDNA sequences

### 3 讨论

本试验通过 PCR 法从 PS 系列的 6 个样品及其它采集地的 PZ2、PF4 和 P3 样品中检测到巴斯德杆菌的存在, 其中, 南平顺昌采集地的多个样品呈阳性, 而其它 4 个采集地除了零星几个样品外, 多数检测为阴性, 这可能是由于南平顺昌 PS1~PS10 样品产自同一片长年受根结线虫侵害的大田, 而其它

几个采集地的线虫病是近年内发生的。

本试验进一步对阳性样品进行 PCR-RFLP、PCR-SSCP 及序列分析, 可以看出, 南平顺昌采集地的多个样品, 尤其是 PS1 和 PS4 样品内巴斯德杆菌 16S rDNA 电泳带型或序列存在较大差别, 仅 PS3 样品和 PZ2、PF4 样品一样, 它们的克隆电泳带型高度一致(结果未显示), 没有明显差别, P3 样品克隆子之间电泳带型表现出一定的差别, 表明 PS 系列多数样

品的巴斯德杆菌群体遗传多样性较其它样品的更为丰富,这一情况可能也与几个采集地根结线虫的种类及为害期长短不同有关。Sayre和Starr<sup>[12]</sup>研究分析巴斯德杆菌形态与其寄主的相关性,说明了细菌与其寄主之间存在形态上的适应性进化。研究还表明<sup>[13]</sup>,巴斯德杆菌的生理生化多样性与其寄主群体异质性有关。基于此,推测南平顺昌采集地的巴斯德杆菌遗传多样性可能是在细菌与寄主长期共存相互适应的过程中产生的,也可能与当地土壤或根系内根结线虫种类的多样性较大有关。

对巴斯德杆菌群体多样性的RFLP分析中,Duan等<sup>[7]</sup>曾利用Hha 内切酶检测出土壤和线虫内巴斯德杆菌群体的多样性,本试验采用Hha、Hae和EcoH 三种内切酶分析根样中巴斯德杆菌的差异,结果发现,克隆的Hha和Hae酶切图谱基本相同,仅EcoH酶切图谱存在较多的变化,这说明不同地域的巴斯德杆菌群体可能在酶切位点的分布和保存性上存在差别,是否我国分离物的EcoH酶切位点存在较大变异性,值得深入研究。

根据本试验中PCR-RFLP和PCR-SSCP结果来比较两种遗传差异的分析手段,不难看出,RFLP虽能针对性地鉴别出酶切位点的变化,但需多次试验寻找合适的限制性内切酶,较为耗时费力。相对而言,PCR-SSCP更能灵敏、简便且较为充分地检测出克隆子间的差异,适合于大批量样品的分析。因此,PCR-SSCP作为一种快速检测遗传差异的方法,优于PCR-RFLP,对于大批量样品的基因变异研究,在测序之前以此法初步筛选差异基因,不失为一种经济有效的分析手段。

巴斯德杆菌具有较强的寄主专化性,即一个种通常只寄生于特定的线虫属。如*P. penetrans*主要寄生根结线虫属(*Meloidogyne* spp.),*P. nishizawae*则分离自胞囊线虫属(*Heterodera* spp.)等。本试验中,所得序列与*P. penetrans*高度同源,这可能与我们的样品均为带有根结的根系(其中根结线虫为主要寄生线虫)有关。从系统发育关系来看,这些序列也与已报道的*P. penetrans*共同形成一个大的分支,这与同源性分析结果一致;同时,在大分支内又形成若干小分支,同份根样的克隆子序列分布于不同的分支中,如PS4-B7和PS4-K19,这与PCR-SSCP的多样性分析结果略有不同,进一步说明了根样中穿刺巴斯德杆菌群体的遗传多样性。

后期实验对巴斯德杆菌寄主群体的多样性及巴

斯德杆菌专化寄生性加以分析,将进一步为筛选广谱寄生的巴斯德杆菌菌株提供实践基础;同时为明析巴斯德杆菌寄主专化性的生理生化及分子机制,进而为解决巴斯德杆菌寄主专化性这一制约其生防应用的关键问题提供一些信息。

## 参 考 文 献

- [1] 张绍升. 植物线虫病害诊断与治理. 福州: 福建科学技术出版社, 1999, pp. 101-102.
- [2] Chen ZX, Dickson DW. Review of *Pasteuria penetrans*: biology, ecology, and biological control potential. *Journal of Nematology*, 1998, **30**(3): 313-340.
- [3] 韩平, 高学彪. 穿刺巴氏杆菌在我国自然发生的初步调查. *植物病理学报*, 2001, **31**(2): 189-190.
- [4] 张拥华, 李世东, 刘杏忠. 在中国发现巴氏杆菌寄生柑桔根线虫. *植物病理学报*, 2002, **32**(3): 284.
- [5] 樊荣. *Pasteuria penetrans* 生活史和生物学特性的研究. 华中农业大学, 2000.
- [6] DAVIES K. Spore attachment and host specificity in the bacterium *Pasteuria penetrans*. <http://www.iacr.bbsrc.ac.uk>, 2001-06-14.
- [7] Duan YP, Castro HP, Hewlett TE, et al. Detection and characterization of *Pasteuria* 16S rRNA gene sequences from nematodes and soils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, **53**(1): 105-112.
- [8] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 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**(22): 4673-4680.
- [9] Strimmer K, von Haeseler A. Quartet puzzling: a quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol Biol Evol*, 1996, **13**(7): 964-969.
- [10] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**(4): 406-425.
- [11] Hasegawa M, Kishino H, Yano K. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, 1985, **22**(2), 160-174.
- [12] Sayre RM, Starr MP. *Pasteuria penetrans* (ex Thorne, 1940) nom.rev, comb.n, sp. n, a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic in plant-parasitic nematodes. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*, 1985, **52**(2): 149-165.
- [13] Chen SY, Charnocki J, Preston JF, et al. Antibodies from chicken eggs as probes for antigens from *Pasteuria penetrans* endospores. *Journal of Nematology*, 1997, **29**(3): 268-275.