

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(7):909–916; 4 July 2010
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

松材线虫伴生细菌多样性的宏基因组分析

田雪亮^{1,2,3}, 张祺玲⁴, 陈国华², 茆振川², 杨家荣¹, 谢丙炎^{2*}

(¹ 西北农林科技大学植物保护学院, 杨陵 712100)

(² 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

(³ 河南科技学院, 新乡 453003)

(⁴ 湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128)

摘要:【目的】松材线虫是松材线虫病的病原,且与其伴生细菌之间存在互作关系,它们构成一个微生态系统。本研究旨在揭示松材线虫-伴生细菌群落细菌多样性。【方法】采用 16S rRNA 基因文库和 454 测序对伴生细菌群落的宏基因组进行初步分析。【结果】依据 97% 序列相似性划分 OTU (Operational Taxonomic Unit), 构建的 16S rRNA 文库包含 25 个 OTU, 分别属于 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria 和 Bacteroidetes, 其中优势菌群为 Gammaproteobacteria, 特别是 *Stenotrophomonas maltophilia* 为优势细菌。在伴生细菌优势种群上, 454 测序结果与 16S rRNA 基因文库结果基本一致。【结论】松材线虫的伴生细菌多样性较高, 这些细菌可能对松材线虫具有一定的生态意义。

关键词: 松材线虫; 伴生细菌; 16S rRNA 基因文库; 454 测序; 宏基因组

中图分类号: Q938 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 07-0909-08

自然界中腐生线虫、动物寄生线虫及植物寄生线虫和细菌之间存在多种互作关系, 包括共生、共栖、伴生和寄生等。昆虫病原线虫斯氏线虫属 *Steinernema* 和异小杆线虫属 *Heterorhabditis* 分别利用共生细菌 *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus* 分泌的毒素杀死昆虫寄主, 获得营养^[1]。香蕉穿孔线虫 (*Radopholus similis*) 存在昆虫共生细菌 *Wolbachia* 家族的新成员^[2], 该共生菌能够调控宿主的生长发育。大豆胞囊线虫的胞囊中也存在大量细菌, 这些细菌对胞囊在土壤中长期存活具有重要的生态作用^[3]。线虫和细菌互作是一种普遍的自然现象, 它们之间的生态互作机制已成为研究热点。

松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 是重要的外来有害生物, 引起松材线虫病, 造成松树大量死亡, 带来严重的经济损失和生态破坏。松材线虫病

发病致死速度快、传播蔓延迅速、防治难度大的特点, 被称为“松树癌症”^[4]。该病的发生和发展涉及到寄主 (松树)、媒介 (昆虫)、病原 (线虫) 以及伴生微生物 (真菌、细菌) 等多种生物因素。松材线虫与细菌存在伴生关系, 线虫体表粘附杆状细菌^[5], 且发病松树的树脂道内和薄壁组织细胞间也存在大量细菌^[6]。松材线虫的伴生细菌能够加速松树死亡, 未表面消毒的松材线虫造成松树发病快, 死亡率高, 而表面消毒的松材线虫造成松树发病慢, 死亡率低^[7]。多人研究也表明伴生细菌在松材线虫致病中起一定作用, 而且鉴定出多种能够致病的细菌^[8–10]。赵博光等研究认为松材线虫病是松材线虫和伴生细菌复合侵染造成的病害^[11]。

很多人持不同观点, 他们认为细菌不能单独致病, 且致病性测定所用材料为松树幼苗和愈伤组织,

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2009CB119201)

* 通信作者。Tel: +86-10-82109545; E-mail: xiebingyan2003@yahoo.com.cn

作者简介: 田雪亮 (1978–), 男, 河北保定人, 讲师, 在读博士, 从事植物病原线虫学研究, E-mail: tianxueliang@sohu.com

收稿日期: 2010-01-26; **修回日期:** 2010-03-27

不能代表自然条件下成年松树的感病性^[12-13]。伴生细菌是否具有致病性存在争议,但某些伴生细菌能够促进松材线虫生长、提高线虫产卵量^[14-15],进而能够提高松材线虫的适生性,另外松材线虫也能够促进某些细菌增殖^[16-17]。由此可见,松材线虫和伴生细菌之间存在生态互作,它们形成一个微生态系统。目前对松材线虫伴生细菌的研究集中于鉴定致病细菌,而对伴生细菌多样性、生态功能的研究较少。本研究采用 16S rRNA 文库和 454 测序对松材线虫-伴生细菌群落的宏基因组进行分析,以明确伴生细菌多样性,为后续研究伴生细菌的生态功能和互作机理奠定基础,这对全面认识松材线虫的致病机理和松材线虫-伴生细菌微生态系统具有十分重要的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 松材线虫培养及收集:松材线虫由北京师范大学生命科学院成新跃老师提供。松材线虫分离于浙江省台州发病马尾松木,培养于灰葡萄孢上,连续转接培养 20 代后,用无菌水将松材线虫洗入灭菌的 50 mL 离心管中,静置 2 h,再将沉淀于管底的线虫转移至 1.5 mL 无菌离心管中,8000 r/min 离心 2 min,使线虫和细菌沉淀于离心管底,去上清液,保留管底松材线虫和细菌备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:超低温离心机 (Sigma, Type:3k15), PCR 仪 (BIO-RAD, ALS—1296), 凝胶成像仪 (BIO-RAD, 76S/06413), 普通水平电泳仪 (BIO—RAD, PAC3000), 显微成像仪 (OLYMPUS, SZX12); 引物由上海生工生物技术有限公司合成。PGM-T 载体和 TOP10 感受态细胞购于北京天根生物试剂有限公司。克隆测序由北京诺塞基因公司完成, 454 测序由深圳华大基因公司完成。

1.2 松材线虫和伴生细菌总 DNA 提取

采用改进 Nycodenz 介质离心和 SDS 裂解方法富集 (结果另文发表) 松材线虫伴生细菌。向富集的伴生细菌菌体加入裂解液 300 μ L (200 mmol/L Tri-HCl pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 2% SDS, 500 mg/L 蛋白酶 K), 置于 65 $^{\circ}$ C 水浴中裂解 3 h, 每隔 20 min 振荡混匀一次。采用酚/氯仿抽提法提取 DNA, 用电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度。

1.3 16S rRNA 基因文库构建

采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG

GCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACTTGTACG ACTT-3') 从总 DNA 中扩增 16S rRNA 基因。PCR 反应体系 20 μ L, 具体如下: 1 μ L DNA 模板 (100 ng), 0.5 μ mol/L 引物, 0.2 mmol dNTPs, 5 units of EasyTaq DNA 聚合酶、1 \times 反应缓冲液, 13.7 μ L dd 水。为了减少扩增偏嗜性, 采用梯度 PCR 程序进行扩增, 且重复 5 次, 将 PCR 产物混合。PCR 反应程序如下: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 至 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

将 PCR 产物纯化, 连接入 PGM-T 载体, 转化 TOP10 感受态细胞, 在涂有 IPTG 和 X-gal 的安苄霉素 LB 平板上进行蓝白斑筛选, 随机 100 个挑取白色克隆构成 16S rRNA 基因文库, 将克隆培养于 LB 液体培养基 (安苄霉素 50 mg/L) 中振荡培养 8 h, 菌液 PCR 进行阳性克隆鉴定, 采用引物为 T7 和 SP6。随机挑取 75 个阳性克隆送诺塞基因公司测序。

1.4 宏基因组序列分析

将提取的总 DNA 进行 454 测序, 所得序列进行拼接组装成较长的 contig, 并将所有的 contig 在 NCBI 原核数据库进行比对。设定阈值为^[18]: HSP 长度 > 150 nt, 期望值 < e^{-15} , 序列相似性 > 90%, 将符合阈值的序列进一步分析。将 NCBI 返回的相似度最高值的序列所属种类做为 contig 的分类归属, 并在 NCBI 数据库分类浏览器 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/batchentrez.cgi?db=Taxonomy>) 进行分类地位划分。

1.5 文库细菌多样性分析

用 Chimera Check 程序将所得 16S rRNA 基因序列在 RDP (Ribosomal Database Project) 数据库进行嵌合体检验, 去除嵌合体序列。以 97% 为划定阈值, 用 DOTUR 软件包对 16S rRNA 基因序列划分操作分类单元 (OTU)^[19], 并构建稀缺性曲线。Shannon-Wiener 指数依据下列公式进行计算^[20]:

$$H = - \sum (p_i) (\log_2 p_i - i),$$
 p_i 代表每个物种样本数量占总样本数量的比例

均匀度 (E) = H/H_{\max} , $H_{\max} = \log_2 (S)$

丰富度 (S) 是样本中物种的数量, 这里等同 OTU 的数量

Good 覆盖度 = $[1 - (n/N)] \times 100$, n 代表单克隆 OTU 的数量, N 代表文库中克隆总数量^[21]。

1.6 构建系统进化树

将每个 OTU 代表序列在 NCBI 进行序列比对, 并下载一致性最高的序列作为参比序列构建系统进化树。采用 Mega4.0 软件包^[22], 以邻接法构建系统

进化树。

1.7 核酸序列登陆号

将 25 个 OTU 的代表序列登陆在 GenBank, 序列号为:GU563738-GU563762。

2 结果

2.1 16S rRNA 基因文库分析伴生细菌多样性

所得 75 个克隆序列经 Chimera Check 程序检测, 并去除 3 条嵌合体序列,将剩余的 72 条序列进行 OTU 划分。稀缺性曲线上幅度逐渐平缓,表明文库取样

数量趋近饱和(图 1)。Good 覆盖度为 86.3,也表明文库覆盖度较高,能够真实反应细菌多样性。16S rRNA 基因文库细菌多样性指数丰富度为 25,均匀度为 0.878,H 为 3.963。该文库包含 25 个 OTU,将每个 OTU 的代表序列在 NCBI 进行 BLAST 分析,文库克隆代表的细菌属于 4 个类群: Alphaproteobacteria (15.1%)、Betaproteobacteria (28.8%)、Gammaproteobacteria (45.2%) 和 Bacteroidetes (11.0%), 其中 Gammaproteobacteria 为优势菌群(见图 2)。

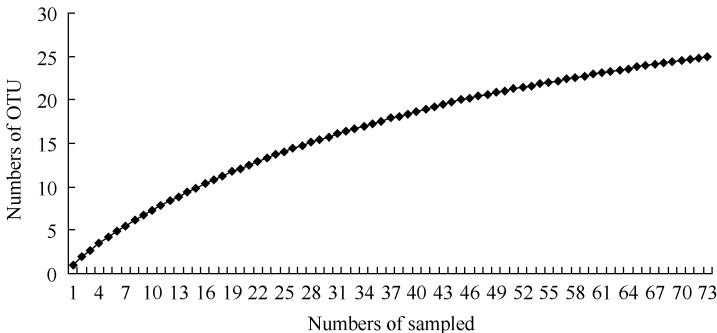


图 1 16S rRNA 基因文库稀缺性曲线

Fig.1 Rarefaction curves of 16S rRNA gene library.

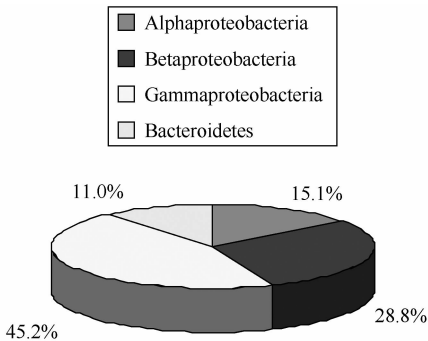


图 2 16S rRNA 基因文库中各纲细菌比例

Fig.2 Proportions of each class in 16S rRNA gene library.

在种水平上,各类群包含细菌种类数量存在差异(见图 3)。Alphaproteobacteria 包含 4 种细菌: *Novosphingobium* sp.、*Sphingomonas* sp.、Uncultured *alpha* proteobacterium 和 *Agrobacterium tumefaciens*,其中优势菌为 *A. tumefaciens*(5 个克隆)。Betaproteobacteria 包含 9 种细菌: *Variovorax* sp.、*Curvibacter gracilis*、*Delftia* sp.、*Pandoraea norimbergensis*、*Herbaspirillum chlorophenicum*、*Achromobacter xylosoxidans*、*Achromobacter* sp.、*Ralstonia* sp. 和 uncultured soil bacterium(T3_3),其中优势菌为 *A. xylosoxidans*(8 个克隆)。Gammaproteobacteria 包含 8 种细菌: *Pseudomonas poae*、*Yersinia* sp.、uncultured *Rahnella* sp.、*Pantoea agglomerans*、uncultured *Aquicella* sp.、*Dyella yejuensis*、

uncultured soil bacterium (T7_14)、*Stenotrophomonas maltophilia*,其中优势菌为 *S. maltophilia*(20 个克隆)。Bacteroidetes 包含 4 种细菌: *Chitinophaga* sp.、*Cytophaga* sp.、uncultured Bacteroidetes bacterium 和 *Pedobacter* sp.,其中优势菌为 uncultured Bacteroidetes bacterium(3 个克隆)和 *Pedobacter* sp.(3 个克隆)。

2.2 454 测序分析伴生细菌多样性

将 454 测序得到的序列进行拼接,然后拼接的 contig 在 NCBI 原核数据库进行 BLAST 比对分析,其中 2610 条序列符合设定的阈值,依照返回比对结果的最高相似种类作为序列的分类归属,并划分分类地位。所有的细菌属于 Alphaproteobacteria (26.2%), Betaroteobacteria (8.4%), Gammaroteobacteria(65.0%) 和 Bacteroidetes(0.3%), 优势菌群为 Gammaproteobacteria(见图 4)。

在属水平上,454 测序结果包含的细菌属于 21 个属(见表 1), Alphaproteobacteria 包含 8 个属, *Agrobacterium* 优势菌属(577 条序列)。Betaproteobacteria 包含 10 个属, *Bordetella* 为优势菌属(122 条序列)。Gammaroteobacteria 包含 2 个属, *Stenotrophomonas* 为优势菌属(1667 条序列)。Bacteroidetes 仅包含 1 个属, *Pedobacter* (7 条序列)。

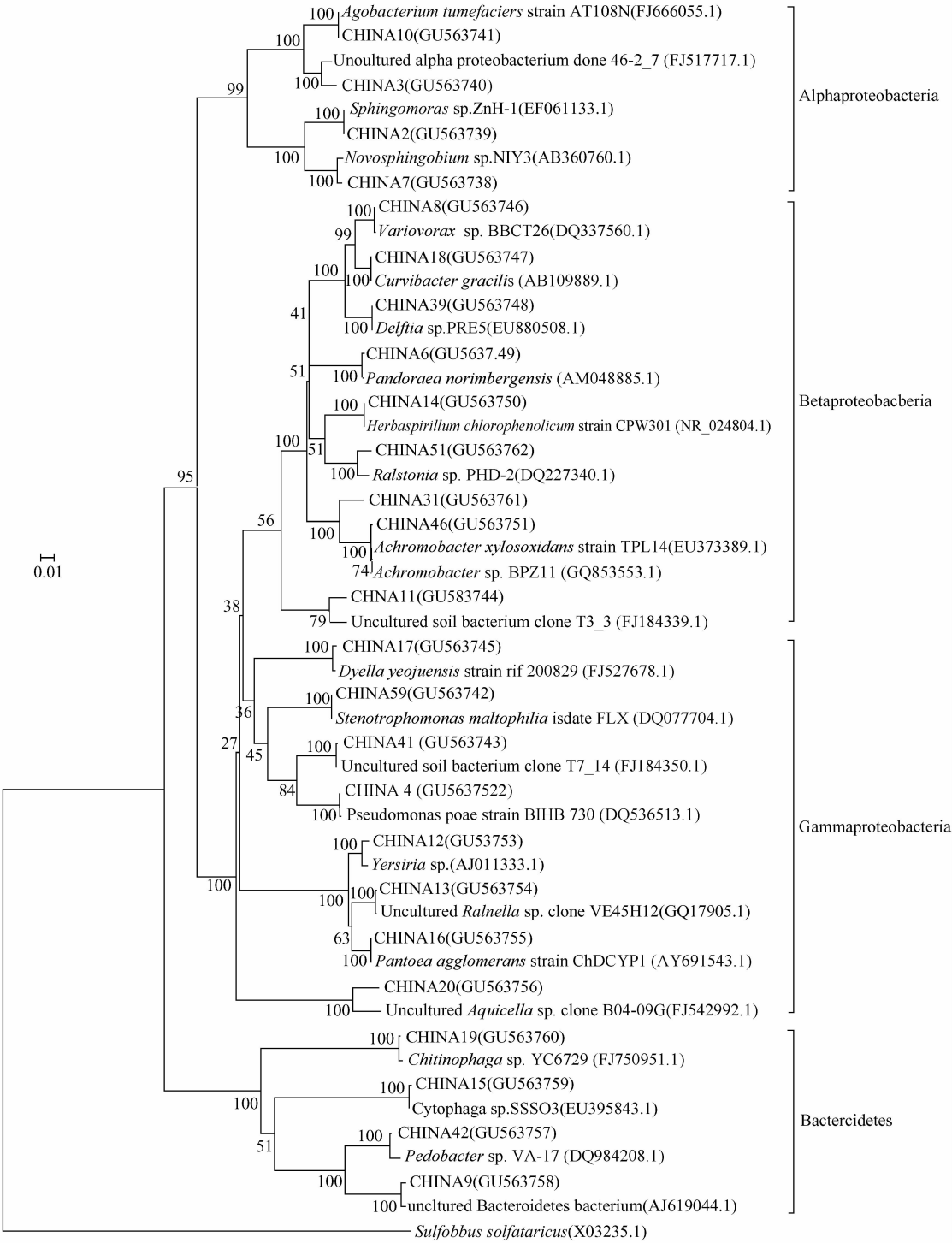


图 3 16SrRNA 基因系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic trees from analysis of full length of 16S rRNA gene sequences of clones in the library. The numbers at the roots indicate bootstrap support based on a neighbor-joining analysis of 1,000 resampled datasets. The scale bar represents 0.01 substitutions per nucleotide position. The sequence of 16S rRNA gene from *Sulfolobus solfataricus* served as an outgroup.

2.3 两种方法细菌多样性比较

在纲分类水平上,16S rRNA 基因文库和 454 结果中得到的细菌都属于 Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria 和

Bacteroidetes,但各类群的比例有差别(图 2 和图 4)。16S rRNA 基因文库中, Bacteroidetes 占 11.0%,而在 454 结果中仅为 0.3%; Betaproteobacteria 细菌比例为第二位,

Alphaproteobacteria 细菌比例为第三位,而在 454 结果中, Alphaproteobacteria 细菌比例为第二位, Betaproteobacteria 细菌比例为第三位。优势菌群均为 Gammaproteobacteria, 在 16S rRNA 基因文库和 454 结果中的比例分别为 45. 2% 和 65. 0%。

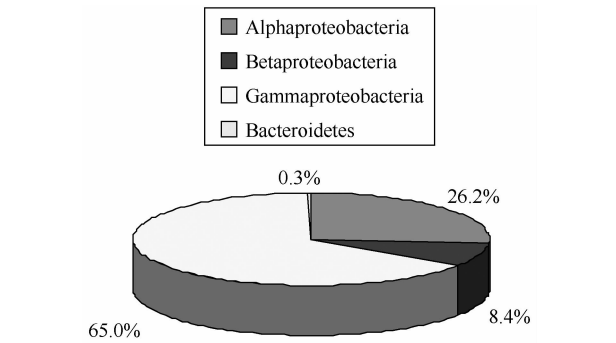


图 4 454 结果各纲细菌比例

Fig. 4 Proportions of each class in the results of 454 sequencing.

在属水平上,16S rRNA 基因文库和 454 结果都包含 21 个属,但在每个纲中属的数目有所差别(表 2)。在 Gammaproteobacteria 和 Bacteroidetes 中,454 结果包含的属数目少于 16S rRNA 基因文库。在 Alphaproteobacteria 和 Betaproteobacteria 中,454 结果包含的属数目多于 16S rRNA 基因文库。在 Alphaproteobacteria、 Gammaproteobacteria 和 Bacteroidetes 中,两种方法得到的优势菌属相同,分别 *Agrobacterium*、*Stenotrophomonas* 和 *Pedobacter*, 而在 Betaproteobacteria 中,16S rRNA 基因文库优势菌属为 *Achromobacter*,454 结果优势菌属为 *Bordetella*。

表 1 各纲中细菌属分布			
Table 1 Distribution of genus in each class			
Class	Genus	Number of OTU	Number of sequences
Alphaproteobacteria	<i>Agrobacterium</i>	5	577
	<i>Bradyrhizobium</i>	—	2
	<i>Caulobacter</i>	1	1
	<i>Novosphingobium</i>	2	5
	<i>Rhodopseudomonas</i>	—	3
	<i>Sinorhizobium</i>	—	3
	<i>Sphingomonas</i>	2	17
	<i>Xanthobacter</i>	—	7
	<i>Rhizobium</i>	2	644
Betaproteobacteria	<i>Achromobacter</i>	9	3
	<i>Acidovorax</i>	—	26
	<i>Bordetella</i>	—	122
	<i>Burkholderia</i>	—	2
	<i>Burkholderiales</i>	—	15
	<i>Cupriavidus</i>	1	15
	<i>Delftia</i>	1	10
	<i>Herbaspirillum</i>	3	—
	<i>Pandoraea</i>	1	—
	<i>Rhodferax</i>	—	2
	<i>Variovorax</i>	3	2
	<i>Verminephrobacter</i>	—	6
Gammaproteobacteria	<i>Aquicella</i>	1	—
	<i>Dyella</i>	2	—
	<i>Enterobacter</i>	1	—
	<i>Pseudomonas</i>	4	16
	<i>Stenotrophomonas</i>	21	1667
	Unclassified	2	—
	<i>Enterobacteriaceae</i>	—	—
Bacteroidetes	<i>Chitinophaga</i>	1	—
	<i>Flavobacterium</i>	1	—
	<i>Pedobacter</i>	3	7
	<i>Sphingobacterium</i>	3	—

表 2 各纲中优势细菌属和各属数目				
Table 2 Dominant genus and numbers of genus in each class				
Class	Dominant genus		Number of genus	
	16S rRNA gene library	454 sequencing	16S rRNA gene library	454 sequencing
Alphaproteobacteria	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium</i>	5	8
Betaproteobacteria	<i>Achromobacter</i>	<i>Bordetella</i>	6	10
Gammaproteobacteria	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas</i>	6	2
Bacteroidetes	<i>Pedobacter</i>	<i>Pedobacter</i>	4	1

3 讨论

16S rRNA 基因文库和 454 测序分析表明松材线虫伴生细菌多样性较高。16S rRNA 基因文库包含 25 个 OTU, 分别属于 21 个属, 宏基因组中序列代表的细菌属也为 21 个属。伴生细菌属于 4 大类群: Alphaproteobacteria、 Betaproteobacteria、 Gammaproteobacteria 和 Bacteroidetes, Gammaproteobacteria 为

优势菌群。前人从松材线虫体表分离的伴生细菌多属于 Gammaproteobacteria^[8-9,23], 但其他纲中的细菌很少。松材线虫伴生细菌优势种群为 *S. maltophilia*, 而用可培养法从国内松材线虫分离的伴生细菌优势种群分别为 *Pseudomonas* sp.、 *Pantoea*^[8]。日本地区松材线虫优势伴生细菌种群为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*B. cerus*)和巨大芽孢杆菌(*B. egaterium*)^[24]。尽管

中国地区松材线虫大部分由日本传播而来,但本研究中并未发现芽孢杆菌属细菌。*S. maltophilia* 与 *Pseudomonas maltophilia*、*Xanthomonas maltophilia* 同名,与 *Pseudomonas* sp. 亲缘关系较近,生化生理特性也较相似。它们在松材线虫-伴生细菌互作系统中可能起相似的作用。优势种群的差异可能由于松材线虫样品来源不同或采用方法不同。

本研究采用 2 种分子方法对松材线虫伴生细菌多样性进行分析。在属分类水平上,优势菌属基本一致,但低丰度属存在差异,可能由于 2 种方法的本质差异造成的。16S rRNA 基因文库方法存在偏嗜性及扩增异常,出现嵌合基因、异源双链和突变,会影响结果的准确性和真实性。另外,该方法会造成含 16S rRNA 基因拷贝数多的细菌数量偏高,且使得那些由于难以裂解细胞壁而释放 DNA 少的细菌数量偏低。宏基因组学利用高通量测序技术对环境样品中微生物的基因组进行功能和序列分析,从群落水平上认识微生物的互作。454 技术是新一代高通量测序技术,在基因表达、注释和突变筛查等方面显示了强大的应用前景。本研究采用 454 技术对伴生细菌总 DNA 进行初步测序,以序列片段的高阈值 BLAST 比对结果来分析伴生细菌多样性^[18],这样就克服的 16S rRNA 基因文库方法中 PCR 偏嗜性的缺点。454 测序结果中 *Bordetella* 属细菌序列为 122 条(表 1),属于丰度较高的细菌,但 16S rRNA 基因文库并未发现该属细菌,这可能该属细菌 16S rRNA 区域对 27F 和 1492R 引物特异性较低造成的。另外,在 454 测序结果中并未发现 16S rRNA 基因文库中 *Herbaspirillum*、*Sphingobacterium*、*Dyella* 和 unclassified *Enterobacteriaceae* 等属细菌,这表明 454 测序丰度没有完全覆盖松材线虫伴生细菌的群落多样性,需要增加测序数量。

在松材线虫和伴生细菌的微生态系统中,优势或次优势伴生细菌种群生物量高,可能与松材线虫的互作关系更为密切,起着重要的生态作用。松树红小蠹(*Ips Pini*)肠道优势菌群为 *S. maltophilia*,该菌能够促进红小蠹消化吸收^[25]。松材线虫和红小蠹的食物都为松树韧皮部组织及松树内部寄生的真菌,食物相同可能是二者的优势菌群一致的原因,该细菌在 2 种寄主中的起相同作用。*Pseudomonas* sp. 松材线虫伴生细菌中分离频率较高的致病相关细菌,且致病性强的荧光假单胞菌能够明显促进松材线虫生长繁殖^[15]。松材线虫可能利用该细菌提高致病性或降低松树的抗病性及促进繁殖能力来提高

自身的适生性,以利于自身的定殖、扩展。*Agrobacterium* sp. 是植物常见的病原菌,可能也会协同线虫造成寄主发病。其他种类细菌对松材线虫的生态功能有待进一步研究。

从不同地区松材线虫伴生细菌多样性差异来看,松材线虫-伴生细菌是一个开放体系,松材线虫能够从环境中获得对自身有利的细菌,来克服寄主反应,提高自身适应环境的能力。这可能也是松材线虫成功入侵的一个重要原因。松材线虫作为外来有害物种入侵新生态系统同时,作为媒介将原产地的伴生细菌一并带入新系统,进一步引起新物种的入侵,增加了对生态系统的威胁,也可以迅速与入侵地细菌结合成伴生关系的微生态系统,提高了适应新环境的能力。这种协同伴生微生物入侵的现象在其他外来入侵物种中也有报道^[26,27]。松材线虫从环境中获得伴生细菌的机制还不清楚,可能与 *Pristionchus* 线虫能够特异识别并吸引对自身有利的细菌,逃避有害细菌的机制相似^[28]。

参考文献

- [1] Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Reviews in Microbiology*, 1997, 51(1):47-72.
- [2] Haegeman A, Vanholme B, Jacob J, Vandekerckhove TTM, Claeys M, Borgonie G, Gheysen G. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: Member of a new Wolbachia supergroup. *International journal for parasitology*, 2009, 39(9):1045-1054.
- [3] Nour SM, Lawrence JR, Zhu H, Swerhone GDW, Welsh M, Welacky TW, Topp E. Bacteria associated with cysts of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(1):607-615.
- [4] 万方浩, 郑小波, 郭建英. 重要农林外来入侵物种的生物学与控制. 第一版. 北京: 科学出版社, 2005.
- [5] 赵博光, 郭道森, 高蓉. 松材线虫携带细菌部位的电镜观察. 南京林业大学学报 (*Journal of Nanjing Forestry University*), 2007, 24(4):69-71.
- [6] Kusunoki M. Symptom development of pine wilt disease histopathological observation with electron microscope. *Ann Phytopath Soc Jpn*, 1987, 53(5):622-629.
- [7] Li Hongmei. Identification and pathogenicity of *Bursaphelenchus* species (Nematoda: Parasitaphelenchidae). GHENT UNIVERSITY + DoctoralTheses. 2008.
- [8] Han ZM, Hong YD, Zhao BG. A study on pathogenicity of bacteria carried by pine wood nematode. *Journal of Phytopathology*, 2003, 151:683-689.

- [9] 洪英娣, 曹越, 赵博光, 韩正敏. 松材线虫携带细菌的鉴定和毒性研究. 南京林业大学学报 (*Journal of Nanjing Forestry University*), 2002, 26(5):37-40.
- [10] 洪英娣, 赵博光, 曹越, 韩正敏. 松材线虫携带细菌的致病性. 南京林业大学学报 (*Journal of Nanjing Forestry University*), 2003, 27(2):45-48.
- [11] 赵博光, 郭道森. 松材线虫携带的一株细菌分离及其致病性. 北京林业大学学报 (*Journal of Beijing Forestry University*), 2004, 26(1):57-61.
- [12] John T, Jones, Maurice M, Manuel M. *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host - parasite interactions. *MOLECULAR PLANT PATHOLOGY*, 2008, 9(3):357 - 368.
- [13] 杨宝君. 松材线虫致病机理的研究进展. 中国森林病虫 (*Forest Pest and Disease*), 2002, 21(1):27-32.
- [14] 林峰, 赵博光. 细菌对松材线虫繁殖的影响. 北京林业大学学报 (*Journal of Beijing Forestry University*), 2006, 28(4):135-138.
- [15] 赵博光, 刘玉涛, 林峰. 松材线虫与其携带细菌之间的相互影响. 南京林业大学学报 (*Journal of Nanjing Forestry University*), 2005, 29(3):1-4.
- [16] 郭道森, 赵博光, 李荣贵. 松材线虫对其携带的一株细菌繁殖和致病性的影响. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied & Environmental*), 2006, 12(4):523-527.
- [17] 林峰, 赵博光. 松材线虫对其携带的细菌繁殖的影响. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2005, 16(12):2476 -2478.
- [18] Chaysavanh Manichanh, Charles E. Chapple, Lionel Frangeul, Karine Gloux, Roderic Guigo, Dore J. A comparison of random sequence reads versus 16S rDNA sequence for estimating the biodiversity of a metagenomic library. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(16):5180-5188.
- [19] Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3):1501-1506.
- [20] Rani A, Porwal S, Sharma R, Kapley A, Purohit HJ, Kalia VC. Assessing microbial diversity by culture-dependent and independent approaches for efficient functioning of effluent treatment plants. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15):7098-7107.
- [21] Good IJ. The population frequencies of species and the estimation of population parameters. *Biometrika*, 1953, 40(3):237-264.
- [22] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution*, 2007, 24(8):1596-1599.
- [23] Zhao BG, Wang HL, Han SF. Distribution and pathogenicity of bacteria species carried by *Bursaphelenchus xylophilus* in China. *Nematodology*, 2003, 5(6):899-906.
- [24] Kawazu K. Changes in constituent of pine wood by infection of pine wood nematode. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, 1990, 64(7):1262-1264.
- [25] Delalibera Jr I, Vasanthakumar A, Burwitz BJ, Schloss PD, Klepzig KD, Handelsman J, Raffa KF. Composition of the bacterial community in the gut of the pine engraver, *Ips pini* (Say) (Coleoptera) colonizing red pine. *SYMBIOSIS*, 2007, 43(2):97-104.
- [26] Paine TD, Raffa KF, Harrington TC. Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review of Entomology*, 1997, 42(1):179-206.
- [27] Vasanthakumar A, Handelsman J, Schloss PD, Bauer LS, Raffa KF. Gut microbiota of an invasive subcortical beetle, *Agrilus planipennis* Fairmaire, across various life stages. *Environmental Entomology*, 2008, 37(5):1344-1353.
- [28] Rae R, Riebesell M, Dinkelacker I, Wang Q, Herrmann M, Weller AM, Dieterich C, Sommer RJ. Isolation of naturally associated bacteria of necromenic *Pristionchus* nematodes and fitness consequences. *Journal of Experimental Biology*, 2008, 211(12):1927-1936.

Diversity of bacteria associated with pine wood nematode revealed by metagenome

Xueliang Tian^{1,2,3}, Qiling Zhang⁴, Guohua Chen², Zhenchuan Mao², Jiarong Yang¹, Bingyan Xie^{2*}

(¹ College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)
(² Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)
(³ College of Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China)
(⁴ School of Biology Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: [**Objective**] The pine wood nematode (PWN), *Bursaphelenchus xylophilus*, which collaborates with its associated bacteria to form ecosystem and has interaction among them, is the pathogen of pine wilt disease. This study focused on revealing the bacterial diversity of ecosystem of pine wood nematode and its associated bacteria. [**Methods**] The metagenome of ecosystem of bacteria associated with the PWN was analyzed by 16S rRNA gene library and 454 sequencing. [**Results**] The results showed that 25 OTUs(Operational Taxonomic Units) were obtained from the library according to sequences similarity of 97%, which affiliated to Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria and Bacteroidetes. The dominant bacteria were belonged to Gammaproteobacteria, especially *Stenotrophomonas maltophilia* in this class dominated the library. In terms of dominant bacteria, the results revealed by metagenome were similar to that of 16S rRNA gene library. [**Conclusion**] The diversity of bacteria associated with the PWN is high and these bacteria maybe have ecological role to the PWN.

Keywords: pine wood nematode; associated bacteria; 16S rRNA gene library; 454 sequencing; metagenome
(本文责编:张晓丽)

Supported by the Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2009CB119201)
* Corresponding author. Tel: +86-10-82109545; E-mail: xiebingyan2003@ yahoo. com. cn
Received: 26 January 2010/ Revised: 27 March 2010

《微生物学报》2010 年栏目调整

近年来,随着期刊建设的需要、以及期刊的编辑出版出现的问题,在 2010 年对《微生物学报》的栏目进行调整。

1. 设立一个新的栏目——“专论”

随着期刊建设的需要,为了丰富学报的内容,编辑部需要争取一些特约稿。这些稿件的内容会有别于本刊 57 年来贯有的模式,另立一个“专论”栏目,与“研究报告”和“研究简报”并列。将不定期试行,欢迎国内、外微生物研究领域的专家们为本刊撰文! 这个栏目的稿件来源如下:

(1) 本刊新增的“专论”栏目,作者范围定位在:① 国内、外的知名专家;② 国家基金委等部门的管理者;③ 国家 973、863 等重大项目专家组的专家。邀请他们结合自己的研究领域、各自的工作为学报撰文。

(2) 考虑到“编委投稿综述”计划,也接受编委个人撰写的另外形式的文章,不必按照《微生物学报》综述要求的撰写。

2. 将每月一篇的“学科先贤”变更为每两个月刊出一篇

(1) 创建过程:为了让人们了解我国微生物领域的开拓者,从 2005 年 4 月开始《微生物学报》增加了一个新的栏目——“学科先贤”,每期刊出一篇人物传记。这个栏目出现后备受人们的关注。

(2) 变更原因:从 2008 年开始《微生物学报》改为月刊(每期 144 页),已运行两年。先贤的简介内容虽说只有短短 4000 多字,但是其内容涵盖了先贤们详尽的历史资料,特约撰稿人需要通过多方渠道搜集,每个月完成一篇实属不易。因此编辑部决定进行调整,由每月一篇变更为两个月一篇,在偶数期上刊出。