

# 中国苏云金芽孢杆菌的分布与 *cry* 基因的多样性\*

王津红 吴卫辉 陈月华 任改新

(南开大学生命科学学院微生物学系 天津 300071)

**摘要:** 采集全中国 27 个省、自治区及 4 个直辖市昆虫孳生地粉尘、土壤等样品 1080 份, 在其中的 406 份中分离到苏云金芽孢杆菌 965 株。镜检可观察到大菱形、小菱形、方形、长方形、圆形、椭圆形、镶嵌形和不规则形等 8 种主要形态的伴孢晶体; 采用 *cry* I、*cry* II、*cry* III、*cry* IV 和 *cry* V 基因的通用引物对 221 株 Bt 分离株进行的 PCR 检测结果表明: 各类基因的含量依次为 *cry* I > *cry* II > *cry* V > *cry* III 基因, 分别占被检菌株的 75.6%、67.9%、58.4% 和 14.5%, 没有检测到 *cry* IV 基因, 共得到 10 种基因组合类型。对其中含有 *cry* I 基因的菌株分别以 *cry* IAc、*cry* IC 和 *cry* IE 基因的特异性引物进行 PCR 检测, 得到 20 株同时含有 *cry* IAc、*cry* IC、*cry* II 和 *cry* V 优良基因组合的 Bt 分离株, 其中菌株 Bt-15A3 对棉铃虫、甜菜夜蛾及小菜蛾均表现出高毒力, 具有生产开发潜力。

**关键词:** 苏云金芽孢杆菌, 伴孢晶体形态, PCR, *cry* 基因

**中图分类号:** Q938.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 03-0050-06

\* 国家“九五”科技攻关项目 (No. 96-C01-02-01), 天津市“九五”重点资助项目 (No. 973102511)

Granted by Chinese National Science and Technology Key Project (No. 96-C01-02-01), Tianjin Important Project (No. 973102511)

收稿日期: 2000-01-10, 修回日期: 2000-04-20

## THE DISTRIBUTION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* AND *CRY* GENE DIVERSITY IN CHINA

WANG Jin-Hong WU Wei-Hui CHEN Yue-Hua REN Gai-Xin

(Department of microbiology, NanKai University, Tianjin 300071)

**Abstract:** 1080 samples were collected especially from pest habitats of dust, soil, et al from 27 provinces, municipalities and 4 directed cities all over China. From 406 samples of the collection 965 *Bacillus thuringiensis* strains were isolated. Eight mainly parasporal crystal shapes can be visualized by microscopic observation. 221 Bt isolates were identified by the PCR method with general primers of *cry I*, *cry II*, *cry III*, *cry IV* and *cry V* genes, the result is that *cry I* > *cry II* > *cry V* > *cry III* gene, they were found in 75.6%, 67.9%, 58.4% and 14.5% of the strains respectively, no *cry I V* gene was found, 10 *cry* gene combination types were concluded. The Bt isolates which contained *cry I* genes were further characterized by additional PCR detection with specific primers of the *cry I Ac*, *cry I C* and *cry I E* genes. 20 Bt isolates which contained *cry I Ac*, *cry I C*, *cry II* and *cry V* genes were found, among them the strain Bt-15A3 is high toxic to *Heliothis armigera*, *Spodoptera exigua* and *Plutella xylostella*, and has potential developing and applying value.

**Key words:** *Bacillus thuringiensis*, Parasporal crystal shapes, PCR, *cry* gene

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt) 作为目前世界上应用最广泛的微生物杀虫剂, 由于避免了化学农药所带来的环境污染和抗性问题的, 在害虫防治的换代产品开发应用中一直备受关注。根据 Crickmore 等依据氨基酸序列同源性对 Bt 杀虫晶体蛋白基因进行的新命名系统<sup>[1]</sup>, 截止到 2000 年 4 月的最新网上数据, 目前已有 184 个 Bt 杀虫晶体蛋白基因被克隆和测序, 分为 28 类 *cry* 基因和两类 *cyt* 基因<sup>[2]</sup>, Bt 的 H 血清型也已增至 62 个共 75 个亚种。尽管如此, 仍有许多世界性重要农业害虫对已存在的 Bt 毒素不敏感, 且现有商品株杀虫谱过窄, 工程株遗传性状不稳定以及各类害虫对已有 *cry* 基因抗性的不断产生, 都将成为影响 Bt 进一步成功推广使用的制约因素, 因此对广谱高活性 Bt 自然株的分离已成为世界性研究热点, 许多国家都对其本国的 Bt 资源进行了广泛调查<sup>[3]</sup>。由于对新 Bt 分离株进行生物测定费时费力, 并且目前普遍认为血清型与杀虫毒力之间没有直接的关系, 如最近发表的 5 个血清型的新亚种均无杀虫活性<sup>[4]</sup>, 而对未知菌 *cry* 基因的鉴定却可以预测其杀虫活性范围, 因此墨西哥、韩国、以色列及我国台湾省等地的学者近年来开展了 Bt 分离株基因型鉴定及对其中潜在新 *cry* 基因的研究与开发<sup>[5]</sup>。我国在过去的几十年中, 对森林及部分地区土壤中 Bt 资源及分布进行了调查研究<sup>[6,7]</sup>, 但未见系统地有关全国 Bt 分布与 *cry* 基因多样性方面的报道。本文首次对采自包括西藏和香港特区在内的全国所有省、区及直辖市的多类样品进行了分离筛选, 并运用 PCR 的方法对其中部分 Bt 分离株的基因型进行了检测, 以期了解不同样品来源的 Bt 及其 *cry* 基因在中国的分布特点并获得具有潜在新 *cry* 基因或优良基因组合的高毒力菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 样品: 采自中国 27 个省、自治区及 4 个直辖市。包括 638 份菜园、耕地等的土壤, 342 份各种谷物、食品、饲料等的储库粉尘, 70 份死虫体或虫粪以及 30 份带有虫网或虫粪的植物叶片等样品共计 1080 份, 样品多采自害虫的孳生地并均用无菌牛皮纸

信封分装。

### 1.1.2 PCR对照 Bt 标准菌株：见表 1。

表 1 PCR对照 Bt 标准菌株

Bt 标准菌株	<i>cry</i> 基因类型	来源
subsp. <i>kurstaki</i> HD-1	IAa, IAb, IAc, IIA, IIB, V	美国 Dulmage H. T. 赠
subsp. <i>kurstaki</i> HD-73	IAc	美国 Dulmage H. T. 赠
subsp. <i>kenyae</i> -Ag 7404	IAc, IE, II, V	本室分离保藏
9510	IC, II, V	本室分离保藏
subsp. <i>israelensis</i> t-1897	IV, <i>cyt</i>	本室分离保藏
subsp. <i>kumamotoensis</i> H18a 18b	III	法国巴斯德所 M. M. Lacadet 赠

表 2 中国各省、自治区及直辖市样品的来源与分布

地区 (省、市、区)	样品来源				总计		
	土壤	储库	死虫	叶片			
华北	北京	47	15	4	66	341	
	天津	31	55	30	2		118
	河北	27	6	2	5		40
	内蒙古	30	34	7			71
	山西	22	20	4			46
东北	黑龙江	16	8		3	27	103
	吉林	9	1	1		11	
	辽宁	44	20		1	65	
华东	上海	21				21	191
	山东	55	11			66	
	江苏	16	23	1	2	42	
	江西	23	14	3	3	43	
	浙江	9	8	1	1	19	
华南	福建	16	4			20	66
	广东	22	11			33	
	海南	2	1			3	
	香港	10				10	
西北	陕西	30	3	1		34	74
	甘肃	12		2		14	
	青海	3	3			6	
	宁夏	5	5			10	
	新疆	5				5	
	西藏	3	2			5	
西南	四川	16	12			28	93
	重庆		3			3	
	贵州	23	3	2	2	30	
	云南	11	8			19	
	广西	7	6			13	
华中	湖南	32	18	2	6	58	212
	湖北	18	12	7	2	39	
	河南	50	19	3	2	74	
	安徽	23	17		1	41	
总计	638	342	70	30	1080		

1.1.3 PCR 引物：*cry* I, *cry* II, *cry* III, *cry* I V 和 *cry* V 基因的通用 PCR 引物及 *cry* I Ac, *cry* I C, *cry* I E 基因的特异 PCR 引物参见文献 [5, 8, 9]。PCR 引物合成及所用试剂均为上海 Sangon 产品。PCR 仪为新加坡产 NJ-4800DNA 热循环仪。

## 1.2 方法

1.2.1 样品的采集及 Bt 菌株的分离筛选：按常规方法进行<sup>[10]</sup>。

1.2.2 Bt 菌株 *cry* 基因的 PCR 检测、分析与鉴定：本文为方便研究比较 Bt 分离株的杀虫特异性与 *cry* 基因之间的关系，仍沿用 1989 年 Höfte 和 Whiteley 根据寄主特异性与氨基酸序列同源性对 Bt 杀虫晶体蛋白基因进行的分类系统<sup>[11]</sup>。Bt 菌株 *cry* 基因的 PCR 检测、分析与鉴定方法参见文献 [5]。

1.2.3 特异 Bt 菌株的生物测定：按农业部标准方法进行，供试虫种为本室饲养。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品来源与分布

本次分离所用样品来源丰富并密切联系害虫的栖息孳生地，范围遍及全国，尤其是首次从海拔高达 4000 多米的西藏地区也分别采集到土壤和粮食粉尘样品

(见表 2), 为进一步深入研究中国苏云金芽孢杆菌的生物学多样性及其分布状况提供了宝贵资料。

## 2.2 苏云金芽孢杆菌的分离筛选

利用选择性双抗平板法对所采集的 1080 份样进行了 Bt 的分离筛选, 通过镜检从其中 406 份样品中分离到 Bt 菌株共计 965 株。Bt 在不同地区各类样品中的检出率及分离率见表 3, 统计方法参见文献 [6]。由表中数据可知, 从全国地理环境与气候特点不同的各地区多种来源的样品中都分离到了大量的 Bt 菌株, 再次证明 Bt 是一种自然界广泛存在的微生物, 同时也表明中国的苏云金芽孢杆菌资源十分丰富。

表 3 中国不同地区各类样品中 Bt 的检出率与分离率

样品种类	东北	华北	华东	华中	西北	西南	华南
<b>土壤</b>							
样品总数	69	157	124	123	58	57	50
检出率%	26.1	32.5	33.9	26.0	24.1	35.1	26.0
分离率%	3.7	4.3	3.1	3.0	3.0	5.6	2.7
<b>储库粉尘</b>							
样品总数	29	130	56	66	13	32	16
检出率%	48.3	47.7	42.9	48.5	76.9	43.8	37.5
分离率%	9.0	7.8	9.4	8.7	23.0	10.2	11.7
<b>死虫</b>							
样品总数	1	47	5	12	3	2	
检出率%	100	55.3	40	58.3	66.7	100	
分离率%	3.3	10.6	4	10.6	11.1	20.0	
<b>叶表</b>							
样品总数	4	7	6	11		2	
检出率%	25.0	57.1	33.3	54.5		50.0	
分离率%	3.3	7.6	5.6	4.2		13.3	

## 2.3 我国不同地区 Bt 的分布

从表 3 数据可以看出, Bt 在我国不同地区的土壤和储库中分布规律不同: 总体看来, 我国东半部的东北、华北、华东、华中和华南各地区 Bt 的丰度在土壤中呈现出北方高于南方, 而在储库中呈现出南方高于北方的现象。这种差异主要与土壤和储库不同的环境特点及我国东半部地区南北方的气候差异密切相关: 土壤是处于全开放性的生态系统之中, 易受环境气候的影响, 南方的高温多雨导致土壤潮湿、芽孢存活力差, 而北方干燥的气候却利于芽孢的存活, 因此北方土壤 Bt 的分离率高于南方; 但储库是一种半封闭的环境, 受外界因素变化的影响小, 与北方相比, 南方常年的高温气候为昆虫的孳生和细菌的生长和繁殖提供了更为良好的生存条件, 从而使南方储库中 Bt 的分离率高于北方。但我国西半部的西北和西南地区中 Bt 的分布却与东半部各地区的情况相反; 即土壤中西南地区 Bt 的丰度高于西北地区; 而储库中西北地区 Bt 的丰度高于西北地区; 而储库中西北地区 Bt 的丰度高于西南地区; 这种差异是否与西部高原地区复杂的地理生态环境特点有关还有待进一步研究。

### 2.4 不同样品来源中 Bt 的分布

图 1 表明, Bt 在死虫或虫粪中的检出率 (57.1%) 与分离率 (10.8%) 都远高于其它各类样品, 充分证明了 Bt 是昆虫病原细菌这一生物学特性; 而储库粉尘中较高的分别为 47.4% 和 9.3%, 其次是植物叶片为 46.6% 和 5.8%, 而土壤中的最低, 仅为 29.8% 和 3.6%。过去许多研究都曾表明昆虫和储库是高毒 Bt 菌株的最佳分离来源, 如 *thuringiensis* 亚种即是分自德国苏云金省一个面粉厂的地中海粉螟; 而 Kurstak 在法国的粮食仓储物中首次发现了 Kurstake 亚种, 该亚种的高毒株 HD-1 则是分自死棉红铃虫; 我国的 Bt 高毒菌株 *kenyae*-Ag 也是从米仓中的一点谷螟分离到的<sup>[12,13]</sup>.....。

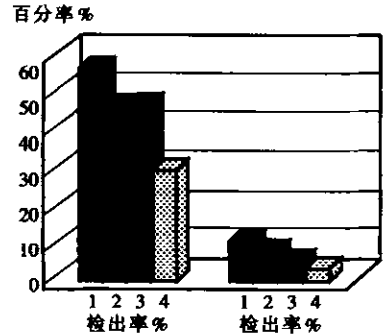


图 1 不同样品来源 Bt 的检出率与分离率  
1 死虫或虫粪, 2 储库粉尘, 3 植物或叶表, 4 土壤

### 2.5 Bt 分离株晶体形态及其与 cry 基因的关系

从镜检的约 16, 000 多个芽孢杆菌状菌落中得到 965 个 Bt 菌株, 晶体形态主要可分为大菱形、小菱形、方形、长方形、圆形、椭圆形、镶嵌形和不规则形等八种, 此外还发现一株含有十分少见的三角形晶体。其中菱形晶体的含量最高约占 50% 且与 *cryI* 基因相对应; 其次为圆形晶体约占 40%; 而方形和长方形晶体约占 30% 且与 *cryII* 基因相对应; 不规则形和镶嵌形晶体含量较少仅占 14% 和 5%。大多数菌株存在多种形态的晶体则具有多种 *cry* 基因组合, 只有少数 Bt 分离株仅含 1 种晶体而其基因型也较为特异。

### 2.6 Bt 分离株的 cry 基因多样性

本文首次对分自全国各地不同来源的 Bt 菌株进行了 *cry* 基因的 PCR 检测与分析, 结果表明中国苏云金芽孢杆菌的 *cry* 基因具有多样性。

2.6.1 Bt 分离株的 *cry* 基因分布: 以 *cryI*、*cryII*、*cryIII*、*cryIV* 和 *cryV* 基因的通用引物对 221 株 Bt 分离株进行的 *cry* 基因检测结果表明: 其中 *cryI* 基因含量最高占 75.6%, 这与其他国家的研究结果一致; 而处于第二位的是 *cryII* 基因, 其次为 *cryV* 和 *cryIII* 基因, 分别占 67.9%、58.4% 和 14.5%, 这一结果与目前已发表的相关报道有所区别: 如 Bravo 等人发现墨西哥的 Bt 分离株中第二丰富的是 *cryIII* 基因, 其次是 *cryIV* 和 *cyt* 基因; 而 Ben-Dov 等人对以色列、哈萨克斯坦及乌兹别克斯坦 Bt 分离株的基因鉴定结果表明 *cryIV* 基因含量处于第二位, 而没有检测到 *cryIII* 基因<sup>[5]</sup>。由此可见, 中国 Bt 和 *cry* 基因分布具有自己的特点。另外, 在本次分离的 Bt 菌株中没有检测到 *cryIV* 基因, 可能是由于缺少水塘或

表 4 Bt 分离菌株的 *cry* 基因组合类型

类别	<i>cry</i> 基因组合	菌株数	百分率 (%)
1	<i>cryI</i> 、 <i>cryII</i> 和 <i>cryV</i>	113	51.1
2	没有阳性 PCR 产物	45	20.4
3	<i>cryI</i> 和 <i>cryII</i>	17	7.7
4	<i>cryI</i> 、 <i>cryII</i> 、 <i>cryIII</i> 和 <i>cryV</i>	12	5.4
5	<i>cryI</i>	10	4.5
6	<i>cryI</i> 、 <i>cryII</i> 和 <i>cryIII</i>	8	3.6
7	<i>cryIII</i>	8	3.6
8	<i>cryI</i> 和 <i>cryV</i>	4	1.8
9	<i>cryI</i> 和 <i>cryIII</i>	3	1.4
10	<i>cryIII</i> 和 <i>cryV</i>	1	0.5

蚊子幼虫孳生地的样品。

**2.6.2 Bt 分离株的 *cry* 基因组合类型:** PCR 分析表明, 在被测的 Bt 分离株中存在 10 种 *cry* 基因组合类型, 见表 4。

由表中数据可见, 组合 1 最为普遍, 这可能说明 *cryI*、*cryII* 和 *cryV* 3 类基因之间存在着某种联系; 在被测菌株中还存在许多优良的 *cry* 基因组合类型, 如组合 4、6、9 和 10 中 Bt 分离株同时含有对鳞翅目和鞘翅目高效的 *cryI/cryV* 和 *cryIII* 基因, 为广谱高活性 Bt 杀虫剂的研制提供了极具价值的开发资源; 而组合 2 中的 45 个分离株不含任何被检基因, 但它们都含有晶体而且基本上仅有一种晶形, 其中近 90% 为极小的菱形或圆形晶体, 也有的菌株含有小椭圆形、大圆形和不规则形晶体。Ohba 等人曾报道日本的一些对鳞翅目和双翅目无毒的 Bt 分离株却对人类某些癌细胞具有活性<sup>[14]</sup>, 因此这些未检测到任何基因的 Bt 株很可能具有潜在的新 *cry* 基因或新的生物活性, 还有待进一步的研究。

## 2.7 Bt 分离株中高效 *cry* 基因的检测

由于目前普遍认为 *cryIaC* 和 *cryIC* 基因对棉铃虫、甜菜夜蛾和小菜蛾均具有高毒力, 而这 3 种昆虫都是我国的重要农业害虫, 因此我们对含有 *cryI* 基因的分离株又分别进行了 *cryIaC*、*cryIC* 和 *cryIE* 基因的特异引物 PCR 检测。结果表明含有 *cryIC* 基因的菌株最为丰富占 59.3%, 其次是 *cryIaC* 基因占 28.1%, 而 *cryIE* 基因的含量较低仅占 10.2%。另外, 我们同时还得到 20 株含有 *cryIaC*、*cryIC*、*cryII* 和 *cryV* 优良基因组合的 Bt 分离株, 生测结果显示其中一株 Bt-15A3 对上述 3 种鳞翅目害虫均表现高活性, 该菌株及具开发应用前景, 目前正在对其进行各方面深入研究与开发 (有关内容另文发表<sup>[15]</sup>)。

## 参 考 文 献

- [1] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, *et al.* In program and abstracts of the 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Society for Invertebrate Pathology. Bethesda, Md. 1995, 14.
- [2] Crickmore N, Zeigler D R, Feitelson J, *et al.* [http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil\\_Crickmore/Bt/index.html](http://www.biols.susx.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/index.html) 2000.
- [3] Ohba M, Aizawa K. *J Invertebr Pathol*, 1986, 47: 12~20.
- [4] 李荣森, 高梅影, 戴顺英, 等. 微生物学报, 1999, 39 (2): 154~159.
- [5] Bravo A, Sarabia S, Lopez L, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64: 4965~4972.
- [6] 戴莲韵, 王学聘, 杨光澄, 等. 微生物学报, 1994, 34 (6): 449~456.
- [7] 戴顺英, 高梅影, 李小刚, 等. 微生物学报, 1996, 36 (4): 295~302.
- [8] Shin B S, Park S H, Choi S K, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61: 2402~2407.
- [9] Carozzi N, Kramer V C, Warren G W, *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57: 3057~3061.
- [10] 喻子牛主编. 苏云金杆菌. 北京: 科学出版社 1990, 444.
- [11] Höfte H, Whiteley H R. *Microbiol Rev*, 1989, 53: 242~255.
- [12] Dulmage H T, Aizawa K. In *Microbia and Viral pesticides*, Kurstark E ed, Marcel Dekker Inc, New York, 1982, 209~237.
- [13] 任改新, 刘霞, 熊海山, 等. 微生物学报, 1995, 35 (4): 303~308.
- [14] Mizuki E, Ohba M, Akao T, *et al.* In Meeting program and abstracts of IV<sup>th</sup> international conference on *Bacillus thuringiensis*. Society of Invertebrate Pathology, Sapporo, Japan, 1998, 41.
- [15] Chen Y H, Wang J H, Li H X, *et al.* In *Biotechnology of Bacillus thuringiensis of 3<sup>rd</sup> Pacific Rim conference on the Biotechnology of Bacillus thuringiensis*, Wuhan, China, 1999, 48.