

# 一株抑真菌、对甜菜夜蛾高效的 苏云金芽胞杆菌菌株

韩苗苗<sup>1</sup> 肖亮<sup>1</sup> 蔡峻<sup>1,2</sup> 谢池楚<sup>1</sup> 陈月华<sup>1,2\*</sup>

(1. 南开大学生命科学学院微生物学系 天津 300071)

(2. 南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室 天津 300071)

**摘要:** 为了扩大苏云金芽胞杆菌的杀虫谱及生防范围, 通过抑真菌和杀虫生物活性测定, 筛选到一株抑真菌并对甜菜夜蛾高效的菌株Bt519-1。此菌株对所测试的小麦赤霉、黄瓜灰霉等8种真菌都有不同程度的抑制作用, 且完全抑制这些真菌孢子的萌发。通过室内生物测定发现该菌株对甜菜夜蛾具有很高的杀虫活性, 半致死浓度(LC<sub>50</sub>)仅为5.5 μg/mL。经特异引物检测, 证明该菌株含有6种杀虫蛋白基因: *cryIAa*、*cryIAb*、*cryIAc*、*cryII*、*cry2* 和*vip3A*。经SDS-PAGE分析, Bt519-1菌株分别产生分子量大约为135 kD~130 kD、95 kD、80 kD、70 kD和65 kD~60 kD的几种杀虫晶体蛋白。在有无几丁质的培养基中都能产生较高活性的几丁质酶。试验证明苏云金芽胞杆菌Bt519-1是一株既杀虫又拮抗真菌的多功能生防菌株。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌, 拮抗, 甜菜夜蛾, 棉铃虫

## The Characterization of an Antagonistic *Bacillus thuringiensis* Strain Against Crop Pathogens and Pests

HAN Miao-Miao<sup>1</sup> XIAO Liang<sup>1</sup> CAI Jun<sup>1,2</sup> XIE Chi-Chu<sup>1</sup> CHEN Yue-Hua<sup>1,2\*</sup>

(1. Department of Microbiology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071)

(2. Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071)

**Abstract:** *Bacillus thuringiensis* strain 519-1 was tested for the antagonistic activity against the growth of hyphae of eight fungi including *Aspergillum niger*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Physalospora piricola*, *Rhizoctonia solani*, *Rhizopus nigricans*. It could notably inhibit sporangia germination of all the tested fungi. The culture of 519-1 exhibited high toxicity against *Spodoptera exigua* and *Helicoverpa armigera*, with LC<sub>50</sub> values of 5.5 μg/mL and 12.5 μg/mL, respectively. PCR analysis with specific primers showed that the strain contained five insecticidal protein encoding genes: *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryII*, *cry2* and a vegetative insecticidal protein gene, *vip3A*. Cry proteins with molecular weight about 135 kD~130 kD, 95 kD, 80 kD, 70 kD and 65 kD~60 kD were detected using SDS-PAGE. The chitinase was expressed from the strain independent of any chitin. The results showed that Bt519-1 was a strain which had high activities of broad-spectrum antagonistic and high insecticidal toxicity against lepidopteran pests.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, Antagonistic, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera*

基金项目: 国家自然科学基金(No. 30570052, No. 30600015); 天津市自然科学基金(No. 06YFJMJC11200)

\* 通讯作者: Tel: 022-23505964; Fax: 022-23508800; ✉ yhchen@nankai.edu.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

收稿日期: 2008-04-23; 接受日期: 2008-07-29

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, 简称Bt)作为一种重要的农业微生物, 应用于生物防治领域已有近百年的历史。Bt作为生物农药, 主要用途是防治害虫。甜菜夜蛾是农作物重大害虫之一, 近年来对我国经济作物造成了严重危害<sup>[1]</sup>。但甜菜夜蛾对大多数Bt不敏感。国内外学者们一直没有放弃筛选对其高毒力的菌株<sup>[2-5]</sup>。

由真菌引起的植物病害, 严重影响农作物的产量和品质, 给农业生产带来巨大的损失。近年随着温室种植方法的普及, 相对高湿的环境更利于真菌的繁殖, 真菌病害日趋严重。为了拓展Bt在生防领域的应用范围, 国外较早开始Bt抑真菌的研究。2000年Marrone等发现BtAQ52菌株具有广谱的抑真菌活性<sup>[6]</sup>。随后Moar证明Bt突变菌株AU634, 不仅保留了原菌株HD-548对玉米螟的毒性而且还对黄姜灰霉、早疫病链格孢和黄曲霉等植物病原真菌具有较强的抑制作用<sup>[7]</sup>。在拮抗芽胞杆菌研究方面国内报道很多, 如陈红等人筛选到一株圆孢芽胞杆菌, 能够不同程度地抑制十种植物病原真菌, 且对水稻稻苞虫具有一定的毒杀作用<sup>[8]</sup>。但有关苏云金芽胞杆菌抑真菌的研究从未见报道。

针对大多数苏云金杆菌对害虫普遍作用谱窄、对甜菜夜蛾活性不高且无抑制真菌作用的弱势, 本室经筛选获得一株既广谱抑真菌又对甜菜夜蛾和棉铃虫高效的多功能菌株 Bt519-1。本文首次报道了该菌株在抑菌和杀虫等方面的测试结果。本研究拓展了Bt的生防领域, 并为开发多功能生物农药奠定了研究基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株及试虫

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)Bt519-1, 由本室分离自从云南采集的土壤样品。苏云金芽胞杆菌科默尔亚种(*B. thuringiensis* subsp. *colmeri*)15A3菌株, 对棉铃虫、甜菜夜蛾均有较高毒力<sup>[3]</sup>, 2004年获专利授权, 作为本文高效杀虫参比菌株。

8株供试病原真菌由本系刘方教授提供: 黑曲霉(*Aspergillum niger*)、黄瓜灰霉(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉(*Fusarium graminearum*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、苹果轮纹病菌(*Phylospora piricola*)、黑根霉(*Rhizopus nigricans*)及棉花立枯病菌

(*Rhizoctonia solani*)。

供试昆虫有甜菜夜蛾(*Spodoptera exigua*)和棉铃虫(*Heliothis armigera*), 均为本实验室饲养。

### 1.2 培养基

细菌培养用NB培养基: 牛肉膏10g, 蛋白胨10g, 氯化钠5g, 琼脂15g, 水1L, pH7.2。真菌培养用PDA培养基: 马铃薯200g, 蔗糖15g, 琼脂15g, 水1L, 自然pH。

### 1.3 方法

1.3.1 菌落对峙法测定抑真菌生物活性: 挑取少量真菌菌丝块置于PDA平板中央, 在距菌丝块约2cm处接种待测Bt菌株, 于28℃温箱中培养3d~4d, 观察并测量抑菌效果, 计算R值, 即抑菌圈直径与菌落直径之比。

1.3.2 抑制真菌孢子萌发: 利用杯碟法。在PDA平板上放置4个无菌牛津杯, 在牛津杯中依次加入20μL浓度为 $10^6$  CFU/mL的真菌孢子悬液和80μL相同浓度的Bt培养液, 设无菌水对照。将平板置于28℃温箱中培养2d~3d后观察抑菌效果<sup>[9]</sup>。

1.3.3 杀虫生物活性的测定: 将试验菌株和参比菌株在固体NB培养基中培养72h, 收集培养物制成冷冻干燥粉作为生测样品。按标准生物测定方法进行<sup>[10]</sup>。

1.3.4 杀虫蛋白编码基因的鉴定: 菌株全DNA提取参照文献方法<sup>[11]</sup>。利用特异引物PCR法, 检测菌株的10种对鳞翅目特异活性的杀虫蛋白编码基因。被检测基因包括: *cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cry1C*、*cry1D*、*cry1E*、*cry1F*、*cry1I*、*cry2*和*vip3A*。所用引物序列及PCR方法见表1及文献<sup>[12]</sup>。

1.3.5 杀虫晶体蛋白的检测: 晶体蛋白制备及SDS-PAGE均采用本实验室常规方法<sup>[13]</sup>。

1.3.6 几丁质酶活测定方法: 见文献<sup>[15]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 对8种植物病原真菌生长的抑制作用

以本室前期筛选的几丁质酶活性高、抑制小麦赤霉比较明显的Bt519-1及其它18株菌株为材料, 利用对峙法检测这些菌株对多种植物病原真菌生长的抑制作用。发现大部分菌株抑菌效果不是很明显(结果略)。仅有Bt519-1菌株表现出对8种真菌生长有明显的抑制作用, 而高效杀虫的参比菌株Bt15A3抑菌效果极差。试验结果见表2。

表1 PCR所用特异引物及特性  
Table 1 Characteristics of specific primers

引物名称 Primers	引物序列(5' 3') Sequence	检测基因 Gene	产物大小(bp) Product size	GenBank 登录号 GenBank Accession No.
<i>SPcry1Aa</i> (+) <i>UNcry1</i> (-)	ttccctttatttgggaatgc mdatyctaktacttgacta	<i>cry1Aa</i>	1286	M11250
<i>SPcry1Ab</i> (+) <i>UNcry1</i> (-)	cggatgctcatagaggagaa mdatyctaktacttgacta	<i>cry1Ab</i>	1371	M13898
<i>SPcry1Ac</i> (+) <i>UNcry1</i> (-)	ggaaacttcttttaaatgg mdatyctaktacttgacta	<i>cry1Ac</i>	844	M11068
<i>SPcry1C</i> (+) <i>UNcry1</i> (-)	attaatttacggtgttg mdatyctaktacttgacta	<i>cry1C</i>	1176	X07518
<i>SPcry1D</i> (+) <i>UNcry1</i> (-)	caggccttgacaattcaaat mdatyctaktacttgacta	<i>cry1D</i>	1138	X54160
<i>SPcry1E</i> (+) <i>UNcry1</i> (-)	tagggataaatgtagtacag mdatyctaktacttgacta	<i>cry1E</i>	1137	X53985
<i>SPcry1F</i> (+) <i>UNcry1</i> (-)	gatttcaggaagtgattcat mdatyctaktacttgacta	<i>cry1F</i>	967	M63897
<i>SPcry1I</i> (+) <i>UNcry1</i> (-)	acaatttacagctattaag mdatyctaktacttgacta	<i>cry1I</i>	1000	X62821
<i>UNcry2</i> (+) <i>UNcry2</i> (-)	gttattcttaatgcagatgaatggg cggataaaataatctgggaatagt	<i>cry2</i>	701	M31738 X55416 X57252
<i>SPvip3 A</i> (+) <i>SPvip3A</i> (-)	cctctatgttgagtgatgta ctatactcgcctcactga	<i>vip3A</i>	1000	AAC37036

表2 Bt519-1菌株对8种真菌的抑制效果<sup>a</sup>  
Table 2 Antifungal activity of Bt strains against 8 fungi

	小麦赤霉 <i>F. graminearum</i>	棉花立枯病菌 <i>R. solani</i>	苹果轮纹病菌 <i>P. piricola</i>	黑曲霉 <i>A. niger</i>	产黄青霉 <i>P. chrysogenum</i>	黄瓜灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	黑根霉 <i>R. nigricans</i>
Bt519-1	+++	++	++	++	+	+++	++	++
Bt15A3	-	+	+	-	+	+	-	-

注：+：有轻微的抑制作用；++：R=1.1；+++：R≥1.2；-：没有抑制作用  
Note: +: Slight inhibition; ++: R=1.1; +++: R≥1.2; -: No inhibition

## 2.2 抑真菌孢子萌发的活性测定

使用杯碟法检测 Bt 菌株对真菌孢子萌发的抑制作用。结果证明 519-1 菌株对 8 种供试真菌孢子萌发的抑制活性非常明显，且无强弱之分。（如图 1 所示）。培养 2 d~3 d 后，对照牛津杯中的孢子正常萌生长成大片的菌落，而加有 Bt519-1 菌悬液的牛津杯周围没有任何真菌生长现象。图 1 仅展示 3 株菌试验结果，其它 5 株菌完全相同。

## 2.3 杀虫活性的生物测定

用 Bt519-1 和参比菌株 Bt15A3 的菌体培养物冻干粉为材料，进行的室内甜菜夜蛾和棉铃虫生物测定证明，Bt519-1 对甜菜夜蛾的毒力很高，其 LC<sub>50</sub> 仅为 5.5 μg/mL，是 15A3 菌株毒力的 3 倍。该菌株对棉铃虫也有较高的毒力，但不如参比菌株高。结果列于表 3。杀虫生测证明 Bt519-1 对鳞翅目害虫具有很高的活性。

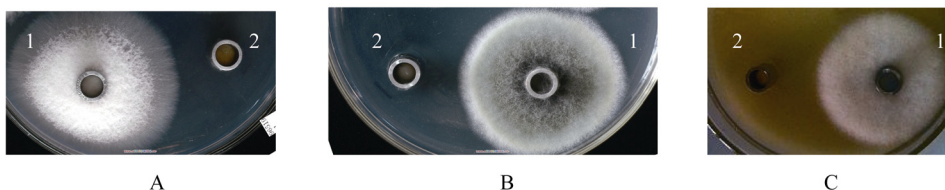


图1 Bt519-1对3种真菌孢子萌发的抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of Bt519-1 against spore germination of three fungi

注：A：尖孢镰刀菌；B：黑根霉；C：小麦赤霉；1：对照(孢子悬液+无菌水)；2：孢子悬液+Bt519-1 培养液

Note: A: *Fusarium oxysporum*; B: *Rhizopus nigricans*; C: *Fusarium graminearum*; 1: Control (sterilized water and spores); 2: The culture of Bt519-1 and spores

### 2.4 杀虫晶体蛋白编码基因检测

10 对特异引物 PCR 检测证明, Bt519-1 菌株至少含有 5 种晶体蛋白编码基因和一种营养期杀虫蛋白基因, 它们是 *cry1Aa*、*cry1Ab*、*cry1Ac*、*cryII*、

*cry2* 和 *vip3A*。这些基因都有 PCR 特异扩增产物且大小正确(见图 2)。而另外 4 种晶体蛋白编码基因 *cry1C*、*cry1D*、*cry1E* 和 *cry1F* 均无特异引物的扩增产物。

表 3 Bt519-1 菌株对甜菜夜蛾和棉铃虫的 LC<sub>50</sub>  
Table 3 Bioassay of strain Bt519-1 against *S. exigua* and *H. armigera*

样品 Samples	供试昆虫 Insect species	浓度梯度 Gradient doses (μg/mL)	Probit 分析 Probit analysis				LC <sub>50</sub> (μg/mL)及 95%置信限 LC <sub>50</sub> (μg/mL)with 95% fiducial limits
			se	x <sup>2</sup>	df	p	
Bt519-1	<i>S. exigua</i>	30-3.95	0.428	2.947	3	0.400	5.5(4.1-6.7)
Bt15A3		40-7.9	0.240	1.517	3	0.678	
Bt519-1	<i>H. armigera</i>	53.3-12.27	0.500	2.056	3	0.561	12.8(9.9-15.0)
Bt15A3		40-9.2	0.597	1.589	4	0.811	

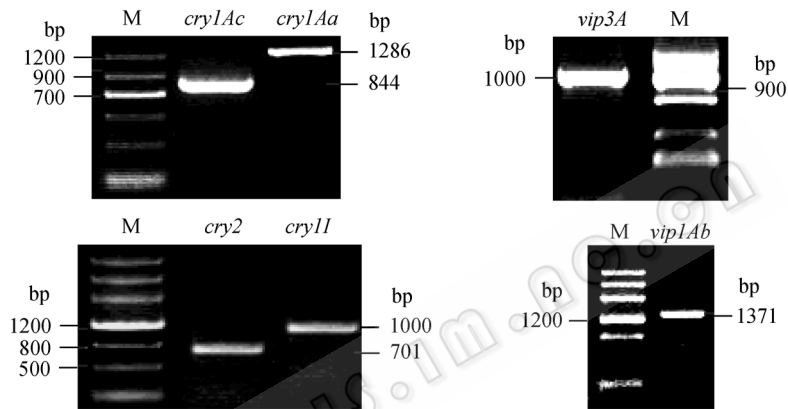


图 2 Bt519-1 杀虫蛋白编码基因 PCR 产物的琼脂糖电泳检测  
Fig.2 The spectram of PCR product amplification from Bt519-1 with specific primers

M: DNA marker

### 2.5 Bt519-1 不同培养时期杀虫晶体蛋白 SDS-PAGE 检测

通过 SDS-PAGE 对杀虫晶体蛋白的电泳分析, 发现 Bt519-1 菌株培养至 20 h 的芽胞期时, 可检测到分子量大约为 135 kD~130 kD、95 kD、80 kD、70 kD 和 65 kD~60 kD 的几种晶体蛋白, 这与以往报道的 Cry1A 类、CryII 和 Cry2 类蛋白分子量基本一致。从图 3 可以看出 130 kD~135 kD 蛋白在培养至 14 h~18 h 浓度不高, 20 h 后表达量骤增。约 60 kD~65 kD 的蛋白也是同样, 从 18 h 后表达量明显增加。约 95 kD 蛋白也是芽胞期特异蛋白。约 70 kD 和 80 kD 的蛋白表达量一直很稳定, 24 h 培养物中 2 种蛋白合成量也稍有增加。Bt 的伴胞晶体都是在芽胞期才开始大量合成和积累的, 因此在这一时期表达量明显增加的蛋白大多应该是杀虫晶体蛋白。

### 2.6 几丁质酶活性的测定

采用本实验室常规检测几丁质酶活性的方法, 分别检测了 Bt519-1 菌株在有/无诱导物的 NB 培养基

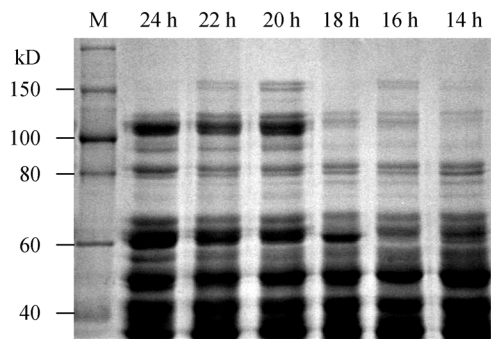


图 3 14 h~24 h 培养物杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 图谱分析

Fig. 3 The patterns of insecticidal crystal proteins from Bt519-1 14 h~24 h by SDS-PAGE

M: Marker

中几丁质酶的活性, 并以几丁质酶活性较高的 Bt15A3 菌株<sup>[15]</sup>作为酶活参比菌株。由表 4 中的结果可以看出 Bt519-1 在不含几丁质的培养基中几丁质酶活性已经很高了, 但对几丁质的诱导仍有一定的反应, 在诱导情况下酶活性明显增加。

表4 Bt 519-1 在不同培养基中的几丁质酶活性(U/mL)  
Table 4 The chitinase activity of Bt 519-1 in different medium(U/mL)

Strains	NB + chitin	NB
Bt519-1	2.53	1.71
Bt15A3(CK)	2.0	1.63

### 3 讨论

长期以来苏云金芽胞杆菌作为一种生防细菌主要用于防治作物虫害,随着农业和环境可持续发展的需要,对多功能 Bt 菌株的筛选变得尤为重要。

对各类拮抗芽胞杆菌及其抑菌机制的报道非常多,但国内尚无有关 Bt 抑真菌的报道。本文证明 Bt519-1 菌株对所测试的 8 种植物病原真菌菌丝的生长具有不同程度的抑制作用,而抑制这些真菌孢子萌发的能力却没有强弱之分,表现为全部抑制。陈曼等<sup>[4]</sup>发现地衣芽胞杆菌对黑腐病菌孢子萌发抑制率高于对菌丝生长的抑制率。国外报道枯草杆菌的抑菌物质主要作用在抑制孢子的萌发上。这些报道与本文的结果一致。已报道的芽胞杆菌抑菌物质种类很多,有细菌素、脂肽、小分子蛋白及几丁质酶等。目前我们仅发现 Bt519-1 菌株可以产生大量的几丁质酶,抑菌作用主要来自几丁质酶还是有其它物质仍需深入研究。

Bt519-1 菌株对甜菜夜蛾、棉铃虫均有很高的活性。依据多年的研究结果,学者们一致认为晶体蛋白 Cry1Ac 是对棉铃虫最高效的杀虫蛋白。而对于甜菜夜蛾,大多数学者认为 Cry1C 和 Cry1D 是较为特异的。也有学者报道 Cry1Ab<sup>[4]</sup> 和 Vip<sup>[16]</sup> 也对甜菜夜蛾有较高活性。另外, Thamthiankul S 等人证明几丁质酶可以使 Bt 对甜菜夜蛾的杀虫活性提高 1.8 倍~2.4 倍<sup>[17]</sup>。Bt519-1 菌株不具备 Cry1C 和 Cry1D 蛋白,推测其毒杀甜菜夜蛾的高活性应该来自 Cry1Ab、Vip 和几丁质酶的共同作用。寻找具有新的生防功能及特异高活性的 Bt 菌株,对于大力发展生物农药,延缓害虫对 Bt 的抗性都有积极的意义。

### 参考文献

[1] 江幸福,曹雅忠,罗礼智. 甜菜夜蛾发生危害特点及其趋势分析. 植物保护, 2002, 36(3): 32-34.  
[2] 阎建平,牛桂兰,郑大胜,等. 一种杀甜菜夜蛾的苏云金芽胞杆菌菌株及制备方法. 中国发明专利, ZL

02115581.X, 2004.

- [3] 陈月华,任改新,吴卫辉,等. Bt科默尔亚种 15A3 株的 cry 基因分析及杀虫特性. 微生物学报, 2002, 42(2): 169-174.  
[4] Moar WJ, Masson L, Brousseau R, et al. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(8): 2480-2483.  
[5] Visser B, Munsterman E, Stoker A, et al. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *J Bacteriol*, 1990, 172(12): 6783-6788.  
[6] Marrone PG, Denise C, Manker SD, et al. Strain of *Bacillus* for controlling plant disease. US Patent, No. 6077506, 2000.  
[7] Moar WJ. Antifungal *Bacillus thuringiensis* strains. US Patent, No 6280722, 2001.  
[8] 陈红,李平,郑爱萍,等. 广谱抗病虫几丁质酶产生菌 X2-23 的筛选与鉴定. 植物病理学报, 2003, 33(4): 368-372.  
[9] Whipps JM, Magan N. Effect of nutrient status and water potential of media on fungal growth and antagonist-pathogen interaction. *Bulletin OEPP/Eppo Bulletin*, 1987, 17: 581-591.  
[10] 钟连胜,谢天键,吴继星,等. 棉铃虫作供试虫的苏云金杆菌制剂毒力生物测定的研究. 生物防治通报, 1990, 6(增刊): 1-5.  
[11] 郑维,权春善,朴永哲,等. 一种快速提取细菌总 DNA 的方法研究. 中国生物工程杂志, 2006, 26(4): 75-80.  
[12] Seifinejad A, Salehi Jouzani GRS, Hosseinzadeh A, et al. Characterization of *Lepidoptera*-active cry and vip genes in Iranian *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Biological Control*, 2007, 44(2): 216-226.  
[13] Cai J, Liu RB, Ren GX. The toxicity of *Bacillus thuringiensis* 9816C to *Spodoptera exigua* related to the binding sites on BBMV. *Insect Science*, 2005, 12: 401-412.  
[14] 陈曼,李赤,邱逸斯,等. 富贵竹黑腐病拮抗菌 H5 的抑菌机制及相关特性. 微生物学通报, 2008, 35(4): 529-532.  
[15] 陈艳玲,卢伟,陈月华,等. 苏云金芽胞杆菌 *chiA*, *chiB* 全基因的克隆、表达及其序列分析. 微生物学报, 2007, 47(5): 843-848.  
[16] Estruch JJ, Warren GW, Mullins MA, et al. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc Natl Acad Sci*, 1996, 93: 5389-5394.  
[17] Thamthiankul S, Moar WJ, Miller ME, et al. Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65: 183-192.