

文章编号: 1001-1498(2003)01-0019-07

我国不同森林立地带土壤中苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因资源研究*

张永安¹, 宋福平², 戴莲韵¹, 张杰², 李长友²

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091;

2. 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 利用 PCR-RFLP 鉴定体系和 SDS-PAGE 表达蛋白的分析方法, 分析了来自我国不同森林立地带(寒温带、中温带、暖温带、北亚热带、中亚热带、南亚热带、高原亚热带、热带)自然保护区森林土壤中分离的 72 株苏云金芽孢杆菌的 *cry1*、*cry2*、*cry3*、*cry4*、*cry5*、*cry8*、*cry9*、*cry10*、*cry11*、*cry11* 杀虫晶体蛋白基因类型, 表达蛋白和杀虫活性的生物测定。研究表明: 同时含有 *cry1*、*cry2*、*cry11* 3 类基因的有 21 株菌, 6 株菌含有 *cry1*、*cry2* 类基因, 4 株菌含有 *cry1* 和 *cry11* 基因, 只含有 *cry1* 基因的有 1 株, *cry2* 基因的 4 株, 36 株菌不含所鉴定的 10 类基因。同时证明: 绝大多数含有 *cry1* 基因的菌株表达了 130 kD 蛋白, 含有 *cry2* 基因的菌株表达了 60 kD 的蛋白。对不同农、林害虫棉铃虫、杨扇舟蛾、舞毒蛾、马尾松毛虫、黄粉甲、榆兰叶甲、落叶松叶蜂等幼虫的杀虫活性进行了生物测定。进一步证明了苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因, 表达蛋白及杀虫活性三者的相关性。为生产和科研提供了生物治虫、抗虫育种新的苏云金芽孢杆菌 *cry* 基因资源。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 杀虫晶体蛋白; *cry* 基因; PCR-RFLP; SDS-PAGE

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis* Berliner 简称 *B. t*) 杀虫剂, 由于对人畜无害, 不污染环境, 是目前世界各国害虫防治的重要手段之一。 *B. t* 使目的害虫致死的主要因子是它在生长发育过程中产生的杀虫晶体蛋白 (Insecticidal Crystal Protein 简称 ICP), 通称为 δ -内毒素。研究表明 *B. t* 菌株的杀虫活性与其携带的编码 ICP 的 *cry* 基因密切相关, 其杀虫活性范围从鳞翅目 (Lepidoptera) 已扩大到对双翅目 (Diptera)、鞘翅目 (Coleoptera)、直翅目 (Orthoptera)、膜翅目 (Hymenoptera) 等 9 个目昆虫有活性, 并已广泛地用于防治农、林、贮藏业及医学害虫^[1]。因此, 鉴定菌株的毒蛋白基因类型, 对于预测目的昆虫的杀虫谱, 筛选和构建高效、广谱、新型 *B. t* 杀虫剂及抗虫转基因植物有着十分重要的意义。

近 10 年来, 中国林科院 *B. t* 资源课题组从我国东部季风区不同森林立地带自然保护区森林土壤中收集了大量 *B. t* 资源^[2,3], 为了从中筛选出对农、林危害严重害虫的高毒力菌株和杀虫毒蛋白 *cry* 基因, 与中国农科院植物保护研究所“植物病虫害生物学国家重点实验室”合作, 应用已建立的 PCR-RFLP 体系及 SDS-PAGE 表达蛋白的分析方法, 对我国东部季风区不同

收稿日期: 2002-09-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (NO. 39970607)

作者简介: 张永安 (1959—), 男, 陕西西安人, 研究员。

* 参加本职工作的还有袁强、吴燕。

森林立地带森林土壤中分离的 72 株 *B. t* 资源的杀虫毒蛋白 *cry* 基因及杀虫谱进行了研究。

1 材料和方法

1.1 菌株及来源

本研究所用 *B. t* 菌株及来源见表 1。

表 1 菌株来源

编号	菌株 代号	来源(森林土壤)		编号	菌株 代号	来源(森林土壤)		编号	菌株 代号	来源(森林土壤)	
		立地带	自然保护区			立地带	自然保护区			立地带	自然保护区
1	Da ₁	寒温带	根河潮查	25	B ₂₀	暖温带	百花山	49	卧龙 ₁	高原热带	卧龙
2	Da ₂			26	B ₂₁			50	卧龙 ₂		
3	Dai ₁	中温带	带岭	27	Qi ₁	暖温带	千佛山	51	卧龙 ₃	卧龙 ₄	卧龙 ₅
4	Dai ₂			28	Qi ₂			52	卧龙 ₄		
5	Dai ₃			29	Qi ₃			53	卧龙 ₅		
6	Dai ₄			30	Qi ₄			54	J ₇		
7	Ch ₁	中温带	长白山	31	Qi ₅	北亚热带	黄山	55	J ₈	热带	尖峰岭
8	Ch ₂			32	Hu ₁			56	J ₉		
9	Ch ₃			32	Hu ₂			57	J ₁₀		
10	Ch ₄			34	Z ₁			58	J ₁₁		
11	Ch ₅			35	Z ₂			59	J ₁₂		
12	Ch ₆			36	Z ₃			60	J ₁₅		
13	Ch ₈			37	Z ₄			61	Xi ₁		
14	Ch ₉			38	Wu ₁			62	Xi ₂		
15	Ch ₁₀			39	Wu ₂			63	Xi ₃		
16	B ₁₁			暖温带	百花山			40	Wu ₃		
17	B ₁₂	41	Wu ₄			65	Xi ₅				
18	B ₁₃	42	Wu ₅			66	Xi ₆				
19	B ₁₄	43	Wu ₆			67	Xi ₇				
20	B ₁₅	44	D ₂			68	Xi ₈				
21	B ₁₆	45	D ₃			69	Xi ₉				
22	B ₁₇	46	D ₄			70	Xi ₁₀				
23	B ₁₈	47	D ₅			71	Xi ₁₁				
24	B ₁₉	48	D ₆	72	Xi ₁₂						

1.2 培养基

(1) LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g 加水定容至 1 000 mL,pH 值 7.2,15 磅灭菌 20 min。

(2) LB 固体培养基:LB 液体培养基加入 1.3%琼脂粉。

(3) 1/2 LB 液体培养基。

1.3 苏云金芽孢杆菌质粒 DNA 的提取

见参考文献[4]。

1.4 PCR-RFLP 分析

分别用 K5un2/ K3un2 和 K5un3/ Kun3^[5]、S5un2/ S3un2、S5un3/ S3un3、S5un4/ S3un4^[6] S5un5/ S3un5、S5un8/ S3un8、S5un9/ S3un9、S5un11/ S3un11 和 S5uni/ S3uni (待发表资料) 共 10 对引物鉴定 *B. t* 菌株 *cry*₁、*cry*₂、*cry*₃、*cry*₄、*cry*₅、*cry*₈、*cry*₉、*cry*₁₀、*cry*₁₁ 和 *cry*₁₁ 等 10 类基因。方法见参考文献[7]。

1.5 杀虫晶体蛋白 SDS-PAGE 分析

将 *B. t* 菌株接种于牛肉膏蛋白胨培养基于 30 ℃, 220 r·min⁻¹ 培养 40 h, 取 100 μL 菌悬液离心, 菌体悬浮于 100 μL 无菌水中, 加入 25 μL 0.5 mol·L⁻¹ NaOH 混匀, 室温裂解 5 min, 加入 65 μL 3 × 样品缓冲液混匀, 煮沸 10 min, 14 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析, 方法见参考文献[8, 9]。

1.6 生物活性测定

1.6.1 试虫 鳞翅目: 棉铃虫 (*Helicoverpa armigera* (Hübner)) 初孵幼虫, 杨扇舟蛾 (*Clostera anachoreta* (Fabricius)) 2 龄幼虫, 舞毒蛾 (*Lymantria dispar* (Linnaeus)) 2 龄幼虫, 马尾松毛虫 (*Dendrolimus punctatus* (Walker)) 幼虫; 鞘翅目: 黄粉甲 (*Tenebrio molitor* (Linnaeus)) 幼虫, 榆兰叶甲 (*Pyrrhalta aenescens* (Fairm)) 幼虫; 膜翅目: 落叶松叶蜂 (*Pristiphora erichsonii* (Hartig)) 幼虫。

1.6.2 方法 棉铃虫幼虫测定见参考文献[10]。杨扇舟蛾、舞毒蛾、马尾松毛虫、黄粉甲、榆兰叶甲、落叶松叶蜂生物测定见参考文献[2]。

2 结果和讨论

2.1 *B. t* 资源 *cry* 基因类型鉴定

采用已建立的 PCR-RFLP 方法, 对我国东部季风区不同森林立地带(寒温带、中温带、暖温带、北亚热带、中亚热带、南亚热带、高原亚热带和热带等) 森林土壤中分离的 72 株 *B. t* 菌株进行了杀虫晶体蛋白 *cry* 基因类型鉴定, 结果列入表 2。在所鉴定的菌株中, 同时含有 *cry1*、*cry2*、*cry1I3* 类基因的 21 株, 含有 *cry1*、*cry2* 类基因的 6 株, 含有 *cry1* 和 *cry1I* 类基因的 4 株, 只含有 *cry1* 基因的 1 株, *cry2* 类基因的 4 株, 36 株不含所鉴定的 10 类 *cry* 基因。

2.2 杀虫晶体蛋白 SDS-PAGE 分析

通过 SDS-PAGE 方法, 测定了 72 株 *B. t* 菌株所表达的 ICP 分子量, 结果见表 2, 有 28 株菌表达约 130 kD 的蛋白; 32 株菌表达约 60 kD 的蛋白; 3 株表达约 90 kD 的蛋白(1、2、5 号菌株); 2 株表达 140 kD 的蛋白(16、53 号菌株)。研究表明: 苏云金芽孢杆菌 *cry1* 基因表达的杀虫晶体蛋白的分子量大部分在 130—140 kD 之间, *cry2* 基因表达蛋白在 60 kD 左右。但也有个别菌株例外, 如 19 号菌株虽表达了 60 kD 的蛋白, 而没有鉴定出 *cry2* 基因, 还有些菌株表达了 90 kD 和 140 kD 蛋白(1、2、5、16、53 号菌株), 经 *cry* 基因鉴定均不含有所鉴定的 10 类 *cry* 基因类型, 这些问题尚待进一步研究。

2.3 杀虫活性的生物测定

对 67 株 *B. t* 菌株进行了供试幼虫的室内生物测定, 结果(表 3) 看出, 同时含有 *cry1*、*cry2* 基因组合及表达蛋白在 130—140 kD 及 60 kD 的菌株多数对鳞翅目害虫具有较强的杀虫性, 这些菌株在所测的菌株中杀虫死亡率在 60%—100% 的占 60% 以上, 这一结果为 *B. t* 的制剂生产和应用提供了丰富的菌种和基因资源。对膜翅目害虫——落叶松叶蜂幼虫杀虫死亡率在 60% 以上的 9 株菌 Dai₂、Dai₃、Dai₄、Ch₁、Ch₁₀、Qi₅、Wu₁、Wu₄、Wu₆ 所测得的 *cry* 基因和表达蛋白没有一定的规律性, 有含多个基因的, 如: Dai₄、Wu₄、Wu₆; 有含 1 个 *cry2Aa* 基因的; 还有未测出所设定 10 类 *cry* 基因的, 如: Dai₃、Ch₁、Wu₁。所测的 67 株菌对两种鞘翅目害虫均未显示一定的杀虫活性。

表2 不同森林立地带土壤中72株苏云金芽孢杆菌基因型及表达蛋白

立地带		自然保护区	菌株编号及代号	表达蛋白/kD	立地带	自然保护区	菌株编号及代号	表达蛋白/kD	立地带	自然保护区	菌株编号及代号	表达蛋白/kD	
			基因型				基因型					基因型	
			σy1, σy2, σy11, σy3, 4, 5, 8, 9, 10, 11				σy1, σy2, σy11, σy3, 4, 5, 8, 9, 10, 11					σy1, σy2, σy12, σy3, 4, 5, 8, 9, 11	
寒温带	带岭	根河满查	D _{h1}	90	高原亚热带	卧龙	卧龙 ₁	—	—	—	—	—	
			D _{h2}	90			卧龙 ₂	—					—
			D _{h3}	—			卧龙 ₃	—					—
			D _{h4}	60			卧龙 ₄	σy2Aa					60
中温带	长白山		D _{h5}	90			卧龙 ₅	σy1Aa, σy1Ac, σy1Aa, σy2Aa, σy11a	130.60				
			D _{h6}	130.60			J ₁	—	—				
			D _{h7}	—			J ₈	σy1Aa, σy1Ac, σy2Aa, σy11a	130.60				
			D _{h8}	130			J ₆	σy1Aa, σy1Ac, σy2Aa, σy2Ab, σy11a	130.60				
暖温带	百花山		D _{h9}	—	北亚热带	尖峰岭	J ₁₀	—	—	—	—	—	
			D _{h10}	130.60			J ₁₁	—	140				
			D _{h11}	—			J ₁₂	σy1Aa, σy1Ac, σy2Ab, σy11a	130.60				
			D _{h12}	—			J ₁₅	—	—	—			
亚热带	武夷山		D _{h13}	—	亚热带	—	X ₁	σy1Aa, σy1Ac, σy2Aa, σy2Ab, σy11a	130.60				
			D _{h14}	60			X ₂	σy1Aa, σy1Ac, σy2Ab, σy11a	130.60				
			D _{h15}	60			X ₃	—	—	—			
			D _{h16}	—			X ₄	—	—	—			
南亚热带	鼎湖山		D _{h17}	—	西双版纳	—	X ₅	—	—	—	—	—	
			D _{h18}	—			X ₆	σy1Aa, σy1Ac, σy2Ab, σy11a	130.60				
			D _{h19}	—			X ₇	—	—	—			
			D _{h20}	—			X ₈	σy1Aa, σy2Ab	60				
热带	—		D _{h21}	130	—	—	X ₉	σy1Aa, σy1Ac, σy2Ab, σy11a	60				
			D _{h22}	—			X ₁₀	σy1Aa, σy1Ac, σy2Aa, σy2Ab	130.60				
			D _{h23}	—			X ₁₁	σy2Aa	60				
			D _{h24}	130			X ₁₂	—	—	—			

表 3 苏云金芽孢杆菌对不同害虫室内生物测定

森 林 立地带	自然 保护区	菌 株 编号及 代号	对不同害虫的杀虫死亡率/%						
			杨扇舟 蛾幼虫 (4 d)	舞毒蛾 幼虫 (3 d)	马尾松毛 虫幼虫 (6 d)	黄粉甲 幼虫 (9 d)	榆兰叶 甲幼虫 (5~7 d)	落叶松叶 蜂幼虫 (3 d)	棉铃虫 幼虫 (7 d)
北亚 热带	紫金山	Z ₁	70	100	100	0	10	-	20.8
		Z ₂	80	100	100	0	10	-	16.7
		Z ₃	0	0	10	0	10	-	4.2
		Z ₄	0	0	10	0	0	-	0
中亚 热带	武夷山	W _{W1}	80	100	100	0	0	80	33.3
		W _{W2}	15	5	0	0	0	40	4.2
		W _{W3}	95	100	100	0	0	30	25.0
		W _{W4}	55	5	100	0	0	80	37.5
		W _{W5}	20	95	15	0	0	40	33.3
		W _{W6}	90	95	85	0	0	80	16.7
南亚 热带	鼎湖山	D ₂	100	-	100	0	0	-	29.2
		D ₃	100	-	100	0	0	-	45.8
		D ₄	65	-	5	0	10	-	4.2
		D ₅	95	-	100	0	0	-	29.2
		D ₆	100	-	100	0	0	-	29.2
		J ₇	0	-	5	0	0	-	8.3
热带	尖峰岭	J ₈	0	-	30	0	0	-	33.3
		J ₉	5	-	0	0	0	-	41.7
		J ₁₀	0	-	0	0	0	-	0
		J ₁₁	0	-	0	0	0	-	25
		J ₁₅	100	-	100	0	0	-	0
		X ₁₁	100	100	100	10	0	-	41.7
热带	西双版纳	X ₂	95	20	100	0	0	-	41.7
		X ₃	40	50	5	10	0	-	0
		X ₄	25	100	0	10	0	-	12.5
		X ₅	95	100	100	10	0	-	16.7
		X ₆	90	100	100	0	0	-	45.8
		X ₇	100	100	100	10	0	-	8.3
		X ₈	85	20	100	0	0	-	37.5
		X ₉	10	100	0	30	0	-	4.2
		X ₁₀	95	100	100	0	0	-	33.3
		X ₁₁	70	100	100	10	0	-	38.3
		X ₁₂	100	100	100	0	0	-	0
		寒温带	根河清查	D _{H1}	0	10	10	0	0
D _{H2}	0			5	5	0	0	-	12.5
D _{H3}	5			5	30	0	0	10	0
D _{H4}	85			100	100	0	0	70	20.5
中温带	长白山	C _{H1}	15	10	15	0	0	60	8.3
		C _{H2}	100	100	100	0	0	60	37.5
		C _{H3}	80	-	100	0	0	60	25.0
		C _{H4}	55	-	100	0	0	-	33.3
暖温带	百花山	C _{H5}	90	-	100	0	10	-	41.7
		C _{H6}	0	-	10	0	20	30	29.2
		C _{H7}	0	-	30	0	-	-	4.2
		C _{H8}	0	-	90	0	0	-	25.0
		C _{H9}	40	-	90	5	0	30	41.7
		C _{H10}	60	-	100	10	0	-	16.7
暖温带	千佛山	B ₁	75	-	95	0	0	70	4.2
		B ₂	100	-	100	0	0	-	16.7
		B ₃	5	-	0	0	20	-	8.3
		B ₄	50	-	95	0	-	-	8.1
		B ₅	60	-	100	0	-	-	50
		B ₆	30	-	100	0	0	40	50
		B ₇	5	-	100	0	10	-	41.7
		B ₈	70	-	100	0	-	-	16.7
		B ₉	100	-	0	0	10	0	25
		B ₁₀	50	-	15	5	-	-	0
暖温带	千佛山	Q ₁	20	-	15	0	0	-	4.2
		Q ₂	90	-	5	0	0	-	12.5
		Q ₃	95	95	95	0	0	50	20.8
		Q ₄	90	100	85	0	0	-	45.8
暖温带	千佛山	Q ₅	70	100	100	0	0	50	45.8
		Q ₆	85	100	100	0	0	-	25.0
		Q ₇	85	100	100	0	0	80	33.3
		Q ₈	20	5	5	0	0	50	0
北亚 热带	黄山	H ₁	100	100	100	0	0	40	33.3
		H ₂							

从不同森林立地带所分离的菌株所含 *cry* 基因和表达蛋白表明:寒温带和中温带带岭分离的菌株 Dai₁、Dai₂ 及 Dai₃,均未测出所设定的 10 类 *cry* 基因类型,但它们均含有 90 kD 表达蛋白,其余各森林立地带均含有对鳞翅目害虫具有较强杀虫活性的含有 *cry1* 和 *cry2* 类基因组合,表达蛋白为 130 kD 和 60 kD 的菌株。

3 结 论

综上所述:通过对我国东部季风区不同森林立地带森林土壤中所分离的 72 株 *B. t* 菌株 *cry* 基因鉴定和表达蛋白的分析及室内生物测定研究结果表明:三者之间存在着一定的相关性,大部分共同含有 *cry1Aa*,*cry1Ac* 和 *cry2A* 基因,表达蛋白在 130 kD 和 60 kD 的菌株,对所测的鳞翅目农、林害虫具有较强的杀虫活性,含有单一基因和未测出 *cry* 基因的菌株均无明显的杀虫活性,因此,将 PCR-RFLP 和 SDS-PAGE 方法结合起来作为快速、准确、简便预测 *B. t* 菌株的杀虫活性,为筛选高效、广谱、特异 *B. t* 菌株 *cry* 基因资源及其开发利用(生物治虫、抗虫育种等)提供了科学、有效的方法。

参考文献:

- [1] 喻子牛,孙明,刘子铎,等. 苏云金芽孢杆菌的分类及生物活性蛋白基因[J]. 中国生物防治,1996,12(2):85-89
- [2] 戴莲韵,王学聘. 苏云金芽孢杆菌研究进展[M]. 北京:科学出版社,1997
- [3] 戴莲韵,王学聘,杨光滢,等. 我国四个自然保护区森林土壤中苏云金芽孢杆菌的分布[J]. 林业科学研究,1993,6(6):621-626
- [4] 张杰,宋福平,左雅慧,等. 31 株苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因型鉴定及表达产物研究[J],微生物学报,2000,40(4):372-378
- [5] Kuo,Chak. Identification of novel *cry*-type genes from *Baillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 80-86
- [6] 宋福平,张杰,戴莲韵,等. 苏云金杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立[J]. 中国农业科学,1998,31:13-18
- [7] 李长友,袁强,张永安,等. 我国不同森林立地带 *B. t* 分离株杀虫晶体蛋白及基因分析[J]. 林业科学,2002,38(3):102-105
- [8] J 萨姆布鲁克,EF 弗里奇,T 曼尼阿蒂斯. 分子克隆试验指南(第二版)[M]. 金冬雁,黎孟枫,等译. 北京:科学出版社,1992
- [9] 柏锡,张杰,宋福平,等. 国内 *B. t* 分离株 ICP 基因鉴定及表达产物研究[J]. 武汉大学学报,1998,44:56-58
- [10] 郭予元. 棉铃虫的研究[M]. 北京:中国农业出版社,1998. 326

Studies on Resources of Cry-type Genes of *Bacillus thuringiensis* from Different Soil of Forest Site Zone in China

ZHANG Yong-an¹, SONG Furping², DAI Liar-yun¹, ZHANG Jie², LI Chang-you²

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, CAF, Beijing 100091, China;

2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China)

Abstract : Cry genes, express protein and bioassay of 72 isolations of *Bacillus thuringiensis* from different forest site zones (cool temperate zone, temperate zone, warm temperate zone, north subtropical zone, subtropical zone, south subtropical zone, high plateau subtropical zone, tropical zone) in China were analyzed by the methods of PCR-RFLP and SDS-PAGE. The results showed that 21 strains contained three *cry*-type genes: *cry1*, *cry2* and *cry1*; 6 strains contained both *cry1* and *cry2* genes, 4 strains contained both *cry1* and *cry1I* type genes; 1 strain contained *cry1* type gene, 4 strains contained *cry2* type gene, 36 strains did not contain the ten *cry*-type genes. Most *cry1* genes encoded 130 kD protein that is toxic to Lepidopteron pest, and most *cry2* gene encoded 60 kD protein. The isolates of containing *cry1Aa*, *cry1Ac* and *cry2A* type genes had higher toxicity to *Helicoverpa armigera*, *Clostera anachoreta*, *Lymantria dispar*, *Dendrolimus punctatus* larvae, but isolations of containing one or no *cry* gene had low toxicity to these pests.

Key words : *Bacillus thuringiensis*; ICP; *cry* gene; PCR-RFLP; SDS-PAGE