

# 苏云金芽孢杆菌 LY30 菌株对棉铃虫毒性的研究

许 森 (德州学院生物系, 山东德州 253023)

**摘要** [目的] 研究苏云金芽孢杆菌 LY30 菌株对棉铃虫的毒性作用。[方法] 初步比较 LY30 和 HD1 菌株的形态特征、生理生化特性, 并采用生物测定的方法, 比较它们对棉铃虫初孵、二龄、三龄幼虫的毒效差异。[结果] LY30 属于 H<sub>3a3b3c</sub> 血清型、kurstaki 亚种, 主要由 135、65 kD 2 种蛋白成分组成, 在菌株生长形态、发酵培养特征、生理生化特性方面与生产菌株 HD1 差别不大。LY30 菌株发酵液对棉铃虫初孵、二龄、三龄幼虫的 LC<sub>50</sub> 分别为 0.32、0.62、2.58 μl/ml。[结论] LY30 菌株对棉铃虫三龄以下的幼虫具有高毒力。

**关键词** 苏云金芽孢杆菌; LY30 菌株; 生物测定; 棉铃虫

中图分类号 S481+.9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)13-05505-02

## Study on the Toxicity of *Bacillus thuringiensis* LY30 to Cotton Bollworm

XU Ti-sen (Department of Biology, Dezhou University, Dezhou Shandong 253023)

**Abstract** The study aimed to explore the toxicity of *Bacillus thuringiensis* (Bt) LY30 to cotton boll worm. A high toxicity Bt strain against larvae of cotton boll worm named as LY30 was isolated from over 400 wild-type strains by bioassay. The initial comparison of LY30 with HD1 by morphological, physiological, biochemical features showed that LY30 belongs to H<sub>3a3b3c</sub> serotype. SDS PAGE electrophoresis atlas showed that they were composed of two kinds of protein of 135kD and 65kD components. There were no differences between growth morphology, fermentation culture features, physiological and biochemical characteristics between HD1 and LY30. However, toxicity difference between them was examined with bioassay, the result showed that LC<sub>50</sub> of LY30 fermented liquid against neonate, second and third instar larvae of cotton boll worm were 0.32, 0.62, and 2.58 μl/ml respectively. LY30 possesses high toxicity against larvae of cotton boll worm younger than third instar.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*; bioassay; cotton boll worm

苏云金芽孢杆菌(Bt)是目前应用最为成功的微生物杀虫剂,但仍存在许多问题。许多昆虫对Bt毒素不敏感,且杀虫谱过窄,成为影响Bt进一步推广使用的制约因素,对广谱高效Bt自然株的分离已成为世界性研究热点。为此,笔者对LY30菌株和HD1标准菌株进行了生物学特性初步比较。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** LY30菌株和HD1标准菌株均为德州学院生物系实验室保存。棉铃虫虫卵由德州市农业科学研究所提供,生物测定前在养虫缸中30℃孵化。

## 1.2 方 法

**1.2.1 生化反应。**除几丁质酶测定参照文献[1]进行外,各项生化反应试验均按文献[2]的方法进行。接种LY30到含有1%胶状几丁质的营养琼脂平板,3~5 d后观察,菌种周围伴有透明水解圈的为几丁质酶阳性。

**1.2.2 血清学鉴定。**参照文献[3]的方法进行。接种LY30到LB液体培养基,培养4 h左右,4℃,4 000 r/min离心10 min,洗涤2次后,0.6%甲醛处理,得到抗原,再与抗血清作用

进行检测。

**1.2.3 SDS-PAGE 凝胶电泳。**光学显微镜观察LY30和HD1菌株,确定全部有芽孢和晶体后,用无菌生理盐水洗涤3次,加入样品缓冲液,方法参考文献[4]。

**1.2.4 生物测定。**将菌株接种到LB固体斜面,30℃培养3 d后,转接于5 ml的无菌水中,60℃恒温30 min后,接种于发酵培养基,30℃恒温振荡培养至大部分芽孢晶体脱落时终止培养,调pH值为5.0左右,4℃存放。生物测定设5个浓度稀释梯度,每浓度48头幼虫,加无菌水的饲料为对照,26℃生物测定温育3 d后,统计死、活虫数,对棉铃虫三龄幼虫则温育5 d后。LY30和HD1菌株对棉铃虫的效价按下述公式计算:

$$\text{待测菌株的效价} = \frac{\text{标准品的 LC}_{50} \text{ 值} \times \text{标准品的效价}}{\text{待测菌株的 LC}_{50} \text{ 值}}$$

## 2 结果与分析

**2.1 LY30 和 HD1 菌株生化特性比较** 由表1可以看出,LY30菌株在菌膜和蔗糖2项下的表现与HD1不同;LY30明

表1 LY30 和 HD1 生化反应比较

Table 1 Comparison of biochemical characteristics between strains LY30 and HD1

菌株	VP 反应	卵磷脂酶	菌膜	甘露糖	纤维二糖	水杨苷	蔗糖	水解淀粉	明胶水解	精氨酸脱羧酶	几丁质酶
Strain	VP reaction	Lecithinase	Pellicle	Mannose	Gallobiose	Salicin	Sucrose	Hydrolyzed starch	Gelatin hydrolysis	Arginine decarboxylase	Chitinase
HD1	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
LY30	+	++	+	-	+	+	+	+	++	+	-

注:“+”表示阳性反应,“-”表示阴性反应。

Nte: +, positive reaction; -, negative reaction.

胶水解和卵磷脂酶2项呈现强阳性。

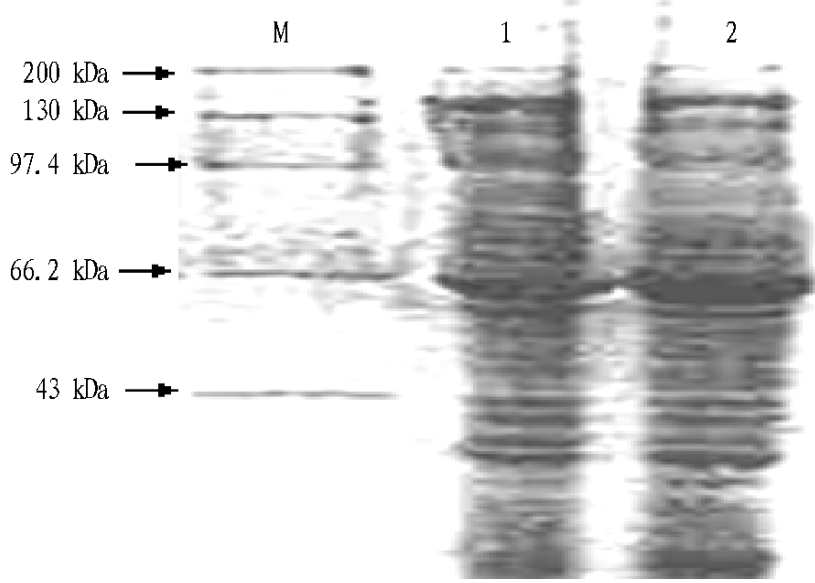
**2.2 LY30 和 HD1 菌株的凝集吸收试验** HD1的抗血清被LY30鞭毛抗原饱和后不再与HD1的鞭毛抗原发生反应。同样,LY30的抗血清被HD1鞭毛抗原饱和后不再与HD1的鞭

毛抗原发生反应,因此LY30属血清型H<sub>3a3b3c</sub>、kurstaki亚种,饱和和吸收试验与HD1相同。

**2.3 LY30 和 HD1 菌株的芽孢、伴孢晶体混合物的 SDS PAGE 电泳图谱** 从图1可以看出,LY30和HD1菌株的芽孢、伴孢晶体混合物的SDS PAGE电泳图谱之间无明显的差别,都主要由135、65 kD 2种蛋白成分组成,它们之间有关杀虫活性的差异可能是由于组成伴孢晶体的蛋白质氨基酸不

作者简介 许 森(1969-),男,山东德州人,硕士,副教授,从事微生物学方面的研究与教学工作。

收稿日期 2008-01-11



注: M. 次高分子量; 1. HD1; 2. LY30。

Note: M, molecular weight markers proteins; 1, HD1; 2, LY30.

图1 LY30 和 HD1 芽孢和伴孢晶体 SDS PAGE 电泳图谱

Fig.1 SDS PAGE analysis of spore and parasporal crystal from LY30 and HD1

同, 或者排列顺序的不同以及其他因素所造成。

#### 2.4 LY30 和 HD1 菌株对棉铃虫幼虫的生物测定结果

LY30 和 HD1 菌株的发酵原液按比例稀释后, 分别感染棉铃虫初孵、二龄和三龄幼虫, 一定时间后统计死、活虫数, 进行生物统计分析。从表 2 可知, LY30 菌株发酵液对棉铃虫初孵、二龄、三龄幼虫的  $LC_{50}$  分别为 0.32、0.62、2.58  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ; 对棉铃虫初孵幼虫的毒效是同时进行生物测定的 HD1 菌株发酵液的 7 倍; 棉铃虫三龄以下幼虫对 LY30 菌株高度敏感, 毒效高。

#### 3 小结

通过对 LY30 菌株和对照菌株 HD1 生物学特性间的比较, 发现二者在生物学特性上具有较多的相似之处。如具有

(上接第 5504 页)

达, 而几丁质是真菌细胞壁的重要组成部分, 从而导致了对其病原菌细胞壁几丁质的降解, 同时产生的寡糖作为激发子, 增强了诱导抗性<sup>[14]</sup>。

(4) 根际促生菌 HRO C48 与壳聚糖组合可显著提高植株的诱导系统抗病性和生防效率, 下一步将测定不同生防因子组合对植物防御相关酶及其化合物的影响, 以期从分子水平进行相关机制的研究。

#### 参考文献

- [1] KURZES, BAHL H, DAHL R, et al. Biological control of fungal strawberry diseases by *Serratia plymthica* HRO C48[J]. *Hort Disease*, 2001, 85: 529-534.
- [2] LIUX G, HMEREW M, MAY X, et al. Quorum sensing signaling is required for production of the antifeedant pyrrolizidine in a rhizospheric biocontrol strain of *Serratia plymthica*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 270: 299-305.
- [3] 马迎新, 刘晓光, 高克祥, 等. 根际细菌 *Serratia plymthica* HRO C48 的生防作用初探[J]. *云南农业大学学报*, 2007, 22(1): 49-53.
- [4] LIU J, TIAN S P, MENG X H, et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2007, 44: 300-306.
- [5] BAUISTA BANOSA S, HERNANDEZ LAUZARDO A N, VELAZQUEZ DEL VALLE M G, et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities[J]. *Gop Protection*, 2006, 25: 108-118.

表2 LY30 和 HD1 菌株对棉铃虫幼虫的毒力测定

Table 2 Toxicity test of strains LY30 and HD1 against cotton boll worm larvae

菌株 Strain	虫龄 Instar	感染天数 Days after infection	$LC_{50}$ $\mu\text{l}/\text{ml}$ 95% 置信范围	$LC_{90}$ $\mu\text{l}/\text{ml}$ 95% 置信范围
LY30	初孵 Newly hatched	3	0.32(0.23 ~ 0.38)	1.18(1.00 ~ 1.85)
	二龄 Second instar	3	0.62(0.57 ~ 0.81)	2.33(1.75 ~ 3.24)
	三龄 Third instar	5	2.58(1.90 ~ 3.53)	6.13(5.33 ~ 8.36)
HD1	初孵 Newly hatched	3	2.10(1.74 ~ 2.29)	3.41(3.00 ~ 4.56)
	二龄 Second instar	3	3.45(1.89 ~ 3.10)	4.32(3.78 ~ 4.78)
	三龄 Third instar	5	4.18(2.05 ~ 4.22)	4.81(4.66 ~ 5.65)

相同的血清型, 同属于  $H_{3a3b3c}$ 、kurstaki 亚种; 芽孢和伴孢晶体蛋白 SDS PAGE 电泳图谱观察无明显差异; 在菌株生长形态、生理生化特性方面也只略有差异, 其主要差异表现在杀虫谱和杀虫毒力上。LY30 对棉铃虫初孵幼虫的毒效是对照菌 HD1 发酵液的 7 倍。因此, 可以看出 LY30 是对棉铃虫害虫具有高毒力的 B 菌株, 在实际的生产应用中, 更具有开发和利用价值。

#### 参考文献

- [1] BRIEN MAND, COLWELL R R. A rapid test for chitinase activity uses 4-nitrophenylumbelliferyl-N-acetyl-D-glucosaminide[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 1718-1720.
- [2] 卢振祖. 细菌分类学[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1994.
- [3] 张用梅. 球形芽孢杆菌及其杀蚊原理和应用[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1992.
- [5] WJAHATULLAH K, BALAKRISHNAN P, DONALD L S. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves[J]. *Hort Physiology*, 2003, 160(8): 859-863.
- [6] BELL A A, HUBBARD J C, HULL, et al. Effects of chitin and chitosan on the incidence and severity of Fusarium yellow of celery[J]. *Hort Disease*, 1998, 82(3): 322-328.
- [7] EL GHOUTH A, ARUL J, PONNAMPALAM R. Use of chitosan coating to reduce water loss and maintain quality of cucumber and bell pepper fruits[J]. *Food Processing and Preservation*, 1991, 15: 359-368.
- [8] EL GHOUTH A. Biologically based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1997, 19: 160-162.
- [9] BENHAMOUN. Potential of the mycoparasite, *Verticillium lecanii*, to protect citrus fruit against *Penicillium digitatum*, the causal agent of green mould: a comparison with the effect of chitosan[J]. *Phytopathology*, 2004, 94(7): 693-705.
- [10] LAFLAMME P, BENHAMOUN, BUSSERES G, et al. Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1999, 77(10): 1460-1468.
- [11] BENHAMOUN, BLANGER R, REY P, et al. The elicitor-like protein produced by the mycoparasite *Pythium digandrum*, induces systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants[J]. *Hort Physiol Biochem*, 2001, 39: 681-696.
- [12] ATT BARKA E, ELLAFFROY P, CLEMENT C, et al. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Borytis cinerea*[J]. *Hort Cell Rep*, 2004, 22: 608-614.
- [13] 黎军英, 李红叶. 壳聚糖对桃褐腐病菌的抑菌作用[J]. *电子显微学报*, 2002, 21(2): 138-140.