

苏云金杆菌对松墨天牛幼虫的致死作用及其生物学特性

徐华潮¹ 徐金华^{1,2} 张立钦¹ 林海萍¹ 杨 萍³ 程剑明²

(1. 浙江林学院林业与生物技术学院 临安 311300; 2. 浙江省淳安县林业局姜家林业中心站 淳安 311712;
3. 浙江省现代森林培育技术重点实验室 临安 311300)

关键词: 苏云金杆菌; 松墨天牛; 生物防治; 松材线虫病

中图分类号: S763.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-7488(2010)04-0151-05

Virulence of *Bacillus thuringiensis* to *Monochamus alternatus* and Its biological Characteristics

Xu Huachao¹ Xu Jinhua^{1,2} Zhang Liqin¹ Lin Haiping¹ Yang Ping³ Cheng Jianming²

(1. School of Forestry and Bio-Technology, Zhejiang Forestry University Lin'an 311300;

2. Jiangjia Forestry Central Station, Chun'an Forestry Bureau Chun'an 311712;

3. Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province Lin'an 311300)

Abstract: The virulence of 17 *Bacillus thuringiensis* strains against 2-3 instar larvae of *Monochamus alternatus* were tested in indoor. The results showed that two strains (RBT-200701, RBT-200702) exhibited high poisonous activity, and the caused corrected mortality of 2-3 instar *M. alternatus* larvae were all more than 70%. A positive correlation was found between the corrected mortality and the concentration of the mixtures of spores and parasporal crystal ($125-2\ 000\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). The insecticidal effect increased with treatment time (0-20 d). The morphological changes of the two strains at various developmental stages were examined with microscopy on the cell smear. The optimal fermentation condition of strains was 30 °C, pH7.2, 200 r·min⁻¹, for 36 h. The two strains had the same protein spectrum after SDS-PAGE analysis.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *Monochamus alternatus*; biological control; pine wilt disease

苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*),简称 Bt,其在形成芽孢的同时会在菌体的 1 端或 2 端形成蛋白晶体,这种蛋白晶体被称为杀虫晶体蛋白(insecticidal crystalproteins, ICPs)或 δ -内毒素(delta-endotoxin)。因 ICPs 具有杀虫高效、广谱、对人畜无害等优点,Bt 已广泛应用于害虫防治,主要用来防治鳞翅目、双翅目和鞘翅目的某些种类的害虫(刘石泉,2008),近年来又发现 Bt 对其他目(如膜翅目、同翅目、直翅目、食毛目、虱目和蚤目)昆虫以及鞭毛虫、线虫、蜱螨、原生动物有毒杀活性,杀虫谱扩大到昆虫纲的 9 个目(Chattopadhyay *et al.*, 2004;Whalon *et al.* 2003)。但有关对蛀干害虫松墨天牛(*Monochamus alternatus*)有毒力的苏云金杆菌还未见报道。

松墨天牛是重大森林植物检疫性病害——松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)病的主要媒介昆虫和森林蛀干害虫。松材线虫病已累计给我国造成直接和间接损失超过 300 亿元(潘宏阳,2007)。防治

松墨天牛,切断松材线虫的侵染循环是松材线虫病综合治理中的主要技术。本文应用 17 个苏云金杆菌菌株对松墨天牛 2~3 龄幼虫进行室内致死效果测定,以寻找有明显毒杀活性的菌株,并对相关菌株生物学特性进行研究,以为松材线虫病的生物防治提供生物材料和理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 苏云金杆菌 RBT-200701, RBT-200702 引自俄罗斯国立应用微生物研究中心;其他菌株 CT-43, CT-43-55, CT-43-7, F15, UW85, 020, 4Aa1, HD-1, 1520, CTC, F-14-1, TR, 007, 1518, OF417 引自华中农业大学农业微生物学重点实验室。

1.2 供试松墨天牛 2~3 龄幼虫 从浙江余杭锦江木业有限公司的待处理检疫木段中劈出松墨天牛幼虫,人工松木屑培养基(针叶树锯末 260 g、蔗糖 20 g、酵母粉 12.5 g、琼脂 15 g、苯甲酸钠 2 g、山梨酸

1 g、0.5 mol·L⁻¹硫酸 10 mL、水 400 mL)饲养幼虫,羽化后,室内饲养至产卵,卵孵化后,将幼虫挑出,饲喂松木屑,待幼虫长到一定龄期后备用。

1.3 孢晶混合物粉剂制备 菌株活化培养后,液体发酵培养至 70%~90% 晶体脱落,发酵液在 5 000 r·min⁻¹、4 ℃ 离心 15 min 收集沉淀物,冷冻干燥,制成孢晶混合物粉剂。

1.4 菌株毒力测定 使用混合饲料感染法:称取灭菌人工松木屑培养基 300 g,各菌株孢晶混合物粉剂 300 mg,混合均匀,孢晶混合物含量为 1 000 μg·g⁻¹ 培养基,分装成 20 份于小试管中,每个小试管中装 1 头松墨天牛 2~3 龄幼虫,管口用封口膜封好,25 ℃、65%~75% 湿度下饲养观察,每隔 3 天统计 1 次死亡数,1 个菌株做 3 次重复,用未做处理人工松木屑培养基作对照。

1.5 从死虫中分离培养 Bt 死亡松墨天牛幼虫在无菌水中清洗 1 次,次氯酸钠(NaClO)消毒液中漂洗 1 次,无菌水清洗 3 次。将消毒后的死虫置于无菌、干燥的离心管中,加入无菌水,在超净工作台内研碎振荡制成悬液;取出活虫 1 头,制成悬液作为对照。用接种环取一环上述悬液在平板上划线接种,30 ℃ 恒温培养,每隔 12 h,用芽孢染色法,涂片镜检(钱存柔,1999),观察记录。

1.6 不同浓度孢晶混合物对松墨天牛的毒力影响 根据预试验测定的有效含量范围,配制一系列浓度孢晶混合物 2 000,1 000,500,250,125 μg·g⁻¹ 培养基。毒力测定方法同 1.4。

1.7 发酵条件筛选 1) 培养时间 将菌种活化后,按 1%(V/V)的接种量转接到 PM 发酵培养基(pH7.2)中,在 30 ℃、200 r·min⁻¹ 条件下分别培养 4,8,12,20,28,36,40,48 h,每处理重复 3 个,用血球计数板计数苏云金杆菌孢子含量(下同)。2) 培养温度 将菌种活化后,按 1%(V/V)的接种量转接到 PM 发酵培养基(pH7.2)中,分别于 15,20,25,30,35 ℃ 200 r·min⁻¹ 条件下培养 36 h 计数。3) 酸碱度 将菌种活化后,按 1%(V/V)的接种量转接到 pH 值分别为 4.8,5.6,6.4,7.2,8.0 的 PM 发酵培养基中,200 r·min⁻¹、30 ℃ 培养 36 h 计数。4) 震荡速度 将菌种活化后,按 1%(V/V)的接种量转接到 pH 值为 7.2 的 PM 发酵培养基中,转速分别为 140,160,180,200,220 r·min⁻¹ 下 30 ℃ 培养 36 h 计数。

1.8 毒力菌株形态和培养特征观察 将菌种活化后,按 1%(V/V)的接种量转接到 pH 值为 7.2 的 PM 发酵培养基中,在 30 ℃ 下,200 r·min⁻¹ 摇床上振荡培养,每隔 5 h 取样,通过石炭酸复红染色,芽

孢染色观察 1 次。

1.9 Bt 伴孢晶体蛋白制备及 SDS-PAGE 鉴定 Bt 伴孢晶体蛋白制备参考邹雪等(2001)、邓干臻(2004)试验方法,用 PM 培养基培养各菌株至孢晶完全分离,离心收集孢晶混合物。

SDS-PAGE 鉴定:3% 的浓缩胶,8% 的分离胶,浓缩胶采用 20 mA 的恒定电流,分离胶采用 10 mA 的恒定电流,直接用一步式蓝色 PAGE 染液(溶液 A、溶液 B 按 4:1 混合,溶液 A 在使用前要充分摇晃,溶液 A、B 购自绵阳高新区天泽基因工程有限公司)染色,用去离子水脱色,观察。

2 结果与分析

2.1 17 个苏云金杆菌菌株对松墨天牛的致死作用 17 个菌株孢晶混合物对松墨天牛 2~3 龄幼虫致死结果见表 1、图 1,从中发现作用 20 天后大部分菌株孢晶混合物对松墨天牛的活性比较低,死亡率在 40% 以下,仅有 2 个菌株(RBT-200701,RBT-200702)的孢晶混合物活性比较高,校正死亡率大于 70%。2 菌株对松墨天牛的 2~3 龄幼虫抑制作用明显,死亡幼虫身体发黑、僵直,体壁破后有黑色液体流出;未死亡幼虫不能正常取食、蜕皮、生长。

2.2 死虫 Bt 镜检情况 2 个菌株培养 12 h 后,平板上长出小而圆的乳白色菌落,其边缘不整齐,表面毛毡状,培养 24 h 以上,菌落渐变扁平,表面有放射状皱褶,无光泽,边缘不整齐。经芽孢染色,油镜下连续观察其特点(图版 I)。

2.3 菌株 RBT-200701,RBT-200702 对松墨天牛的致死作用 对 2 个菌株不同浓度孢晶混合物对松墨天牛的校正死亡率回归分析(表 2)。从表中可以看出不同菌株不同处理时间毒力回归方程的相关系数均大于 0.9,说明不同浓度孢晶混合物和松墨天牛的校正死亡率之间相关性很强;孢晶混合物浓度的对数和松墨天牛的校正死亡率成正相关,随着时间的延长杀虫效果提高。

2.4 发酵条件筛选结果 由图 2A 可知,培养 24~36 h 时是菌株 RBT-200701,RBT-200702 的菌落增长期,培养 36 h 后菌量降低,故确定培养 36 h 为菌株 RBT-200701,RBT-200702 最适培养时间。由图 2B 可知试验设计的 5 个温度中 30 ℃ 最有利于菌株孢子产生和积累;温度高于或低于 30 ℃ 均抑制孢子的产生;从图 2C 可看出菌株 pH 在 7.0~8.0 之间均可较好地生长,pH7.2 为菌株 RBT-200701,RBT-200702 发酵初期最适的培养酸碱度。由图 2D 可知,200 r·min⁻¹ 为供试菌株 RBT-200701,RBT-

200702 培养的最佳振荡速度。振荡速度大于或小 于 200 r·min⁻¹ 时孢子含量均下降。

表 1 17 个苏云金杆菌菌株对松墨天牛的致死作用

Tab. 1 Toxicity of Bt strains against *Monochamus alternatus*

菌株 Isolates	5 d		10 d		15 d		20 d	
	死亡数 Number of death	校正死亡率 Corrected mortality/%	死亡数 Number of death	校正死亡率 Corrected mortality/%	死亡数 Number of death	校正死亡率 Corrected mortality/%	死亡数 Number of death	校正死亡率 Corrected mortality/%
RBT-200702	6	30	14	70	16	80	16	80
RBT-200701	5	25	11	55	14	70	15	75
CT-43	3	15	5	25	6	30	8	40
CT-43-55	3	15	4	20	6	30	7	35
HD-1	2	10	3	15	3	15	4	20
CT-43-7	0	0	1	5	2	10	3	15
CTC	1	5	1	5	2	10	3	15
UW85	1	5	1	5	1	5	1	5
F15	0	0	0	0	0	0	1	5
4Aa1 ,1520 ,020 ,F-14-1 , TR ,007 ,1518 ,OF417 ,CK	0	0	0	0	0	0	0	0



图 1 死亡和对照松墨天牛

Fig.1 The dead and the control of *M. alternatus*

- 1 3 : 菌株 RBT-200701 致死松墨天牛 2~3 龄幼虫和对照松墨天牛
2~3 instar larvae of *M. alternatus* infected BRT-200701 and comparison ;
- 2 4 : 菌株 RBT-200702 致死松墨天牛 2~3 龄幼虫和对照松墨天牛
2~3 instar larvae of *M. alternatus* infected BRT-200702 and comparison.

表 2 2 菌株对松墨天牛的毒力分析

Tab. 2 The analysis of the virulence effect of two strain on *M. alternatus*

处理 Treatment	时间 Time/d	毒力回归方程 Virulence regression equation	LC ₅₀ /(μg·mL ⁻¹)	LC ₉₅ /(μg·mL ⁻¹)	r
RBT-200701	5	y = 0.000 1 x + 0.039 6	4 604	9 104	0.995 5
	10	y = 0.000 1 x + 0.309 2	190 8	6 408	0.934 8
	15	y = 0.000 2 x + 0.418 8	406	2 656	0.921 1
	20	y = 0.000 2 x + 0.486 9	65. 5	2 315. 5	0.928 0
RBT-200702	5	y = 0.000 2 x + 0.049 5	2 252. 5	4 502. 5	0.973 7
	10	y = 0.000 2 x + 0.302 7	986. 5	3 236. 5	0.904 3
	15	y = 0.000 2 x + 0.412 3	438. 5	2 688. 5	0.918 6
	20	y = 0.000 2 x + 0.495 6	22	2 272	0.956 2

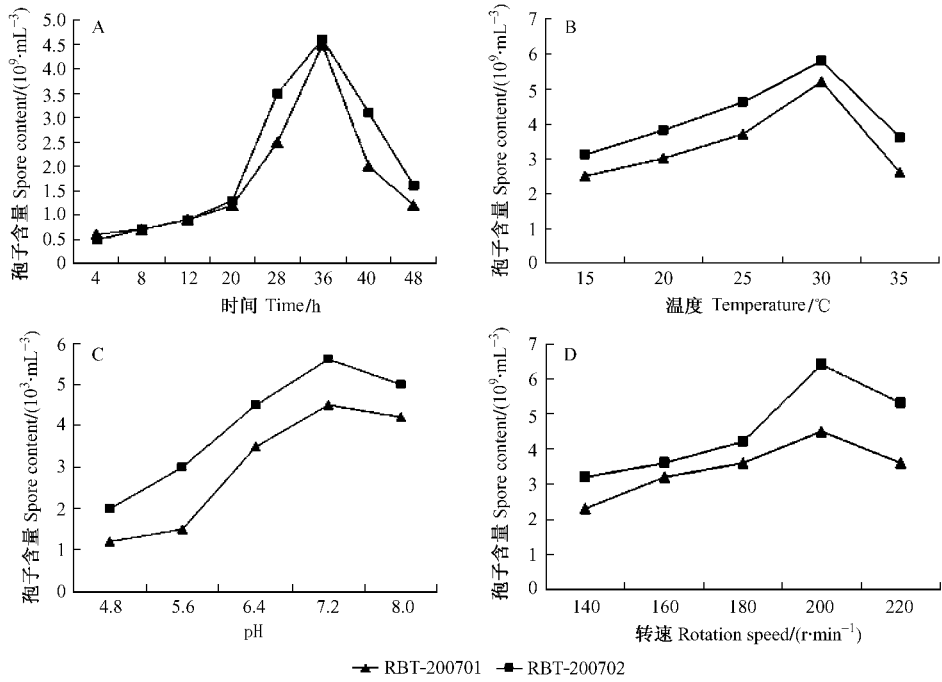


图 2 不同发酵条件对菌株孢子含量的影响

Fig. 2 Influence of different fermentation conditions on spore content

2.5 菌株的形态特征 从表 3 可知这 2 个菌株营养细胞特征、芽孢特征、菌落特征基本是相同的,主要的区别是营养细胞平均长度 RBT-200702 比 RBT-

200701 大 10 μm 左右, RBT-200702 产生的伴孢晶体少数游离,主要是长方形,而 RBT-200701 产生的伴孢晶体大多数游离,主要是菱形。

表 3 2 个苏云金芽孢杆菌菌株的形态特征

Tab. 3 The biological characteristics of 2 strains of *B. thuringiensis*

菌株 Isolates	营养细胞 Nutrition cell	芽孢 Spore	伴孢晶体 Parasporal crystal	菌落 Colony
RBT-200702	杆状 两端钝圆 单生、双联体或短链状(一般 4~10 个细胞)排列。大小为:6.922 3~19.771 5~24.504 9 μm Rod, smooth at both ends, single cell, two cells in line or lined a chain (4-10 cells normally). Cell size: 6.922 3-19.771 5-24.504 9 μm	椭圆形 不使细胞膨大 菌体中间生、偏端生或极端生 呈透明状。大小为:1.40~1.79~2.21 μm Oval-shaped, no inflatable in the middle, spored formed in the middle, or at the end, apparent, size: 1.40-1.79-2.21 μm	大多数与芽孢相连,少数游离。长方形 极少数菱形 Mostly linked to endospore, less free from endospore, square, rectangle, rarely square	较厚 表面毛毡状,乳白色,边缘不齐整。 Thick, coactus on the surface, milky white, unorderly in the edge
RBT-200701	杆状 两端钝圆 单生、双联体或短链状(一般 4~10 个细胞)排列。大小为:8.384 9~9.656 8~15.902 9 μm Rod, smooth at both ends, single cell, two cells in line or lined a chain (4-10 cells normally). Cell size: 8.384 9-9.656 8-15.902 9 μm	椭圆形 不使细胞膨大 菌体中间生、偏端生或极端生 呈透明状。大小为:1.54~1.73~2.05 μm Oval-shaped, no inflatable in the middle, spored formed in the middle, or at the edge, apparent, size: 1.54-1.73-2.05 μm	大多数游离,菱形,极少数不规则形状 Mostly free from endospore, square, rarely non-shaped	较厚 表面毛毡状,乳白色,边缘不齐整 Thick, coactus on the surface, milky white, unorderly in the edge

① 细胞与芽孢大小的表示方法:任意选取测定 10 个细胞或芽孢的长度,以最短~平均~最长来表示其大小。Using the length (shortest-mean-longest) for cell size measurement (10 random cells or endospores).

2.6 Bt 晶体蛋白 SDS-PAGE 电泳分析 将 2 菌株的伴孢晶体蛋白分离纯化后,进行 SDS-PAGE 电泳,从图 4 中可以看出 2 个菌株的电泳图谱相同,都有 2 条明显的条带,其分子量分别为 65,125 ku 左右。

3 结论与讨论

Bt 的杀虫毒力活性大多或完全依赖于 ICPs(依昆虫而定),但芽孢起着致病作用,当中肠受伴孢晶

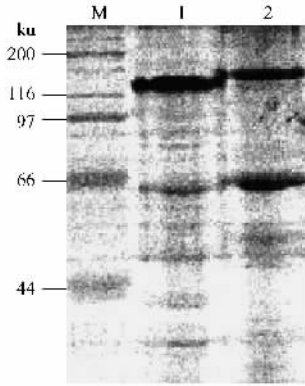


图3 菌株晶体蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig.3 Parasporal crystal protein profile of nematocidal Bt

M:标准蛋白 Standard protein;1:RBT 200703;2: RBT 200702.

体损伤后,活芽孢便萌发成营养体,穿透肠壁进入血液,并在那里大量繁殖,使害虫患败血症死亡(Schnepf *et al.*, 1998);下一步将从菌株 RBT-200701, RBT-200702 孢晶混合物中分离提取纯伴孢晶体和活芽孢,按不同比例混合对松墨天牛毒力测定,并结合病理切片电镜分析技术,分析 2 菌株活芽孢是否起致病作用。

在以往的研究中大多数 Bt 菌株是对马铃薯甲虫(*Leptinotarsa decemlineata*)、柳蓝叶甲(*Plagiodera versicolora*)、金龟幼虫等鞘翅目昆虫或鳞翅目害虫有作用(李平, 1994;程建新等, 2000;竺莉红, 2002;蔡鸿娇等, 2002)。杜孟芳(2002)曾经筛选出 1 株对光肩星天牛(*Anoplophora glabripennis*)有高毒力的 Bt886 菌株;任桂芳(1991)利用苏云金杆菌对双条杉天牛(*Semanotus bifasciatus*)幼虫进行了防治试验,取得了良好的杀虫效果。但尚未报道对松墨天牛害虫有高毒力的 Bt 菌株。本文筛选的 2 种对松墨天牛 2~3 龄幼虫有高毒力 Bt 菌株,又填补了 Bt 杀虫谱上的一项空白,为松材线虫病的防治提供了一个新的途径,将为 Bt 毒蛋白基因工程和林木抗虫育种研究提供一定的理论基础。

Bt 毒蛋白对松墨天牛 2~3 龄幼虫表现较高的杀虫活性,而 Bt 毒蛋白对松墨天牛 2~3 龄幼虫引起的明显拒食现象,进而影响幼虫正常的生长发育,

同样起到了阻碍害虫取食危害。SDS-PAGE 蛋白分析发现这 2 个菌株的晶体蛋白图谱不同,都有 2 条明显的条带,分子质量分别为 65, 125 ku 左右;其中是哪一分子质量蛋白在毒杀中起着决定性作用,还需要进一步分析。

2 个菌株最优发酵条件为 30 ℃、pH7.2、振荡速度 200 r·min⁻¹、培养时间 36 h。为菌株继续深入研究和以后产业化扩大培养提供了理论基础。

参 考 文 献

- 蔡鸿娇,侯有明,尤民生. 2002. 应用 Bt 控制鞘翅目害虫的研究现状. 武夷科学, 18: 259-260.
- 程建新,雷满香. 2000. Bt 菌株对小猿叶甲的活性筛选. 湖南化工, 30(5): 59-60.
- 邓干臻. 2004. 苏云金芽孢杆菌伴孢晶体蛋白对猪蛔虫作用效果的研究. 华中农业大学动物科技学院博士学位论文.
- 杜孟芳. 2002. 杀光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*(Motsch.) Bt 菌株的筛选及其杀虫基因的克隆. 河南农业大学植物保护学院硕士学位论文.
- 刘石泉. 2008. 苏云金芽孢杆菌高效价杀虫剂的研究进展. 微生物学通报, 35(7): 1091-1095.
- 李平. 1994. 苏云金杆菌新菌株 EG4961 对黄瓜十一星叶甲和马铃薯甲虫的幼虫和成虫的杀虫活性. 农药译丛, 16(1): 40-43.
- 潘宏阳. 2007. 松树寄生线虫的收集与保存. 南京林业大学学报: 自然科学版, 31(4): 135-136.
- 钱存柔. 1999. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社.
- 任桂芳. 1991. 苏云金杆菌防治双条杉天牛试验简报. 山东林业科技, (2): 61.
- 邹雪,余子全,孙明,等. 2004. 利用染色方法筛选对根结线虫高毒力的苏云金芽孢杆菌. 武汉大学学报: 理学版, 50: 127-130.
- 竺莉红. 2002. 苏云金芽孢杆菌 Ba9808 对鞘翅目害虫的生物活性. 浙江农业学报, 14(6): 331-333.
- Chattopadhyay A, Bhatnagar N B, Bhatnagar R. 2004. Bacterial insecticidal toxins. Crit Rev Microbiol, 30(1): 33-54.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, *et al.* 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Molec Biol Rev, 62: 775-806.
- Whalon M E, Wingerd B A. 2003. Bt: mode of action and use. Arch Insect Biochem Physiol, 54(4): 200-211.

(责任编辑 朱乾坤)