

对斜纹夜蛾高毒力的 Bt 新分离株及其特性的研究

蒋 冬 花

(浙江师范大学生物系 金华 321004)

邓日强 庞 义 龙紫新

(中山大学昆虫研究所 广州 510275)

摘要 对从德国禁止施用 Bt 杀虫剂地区的土壤中分离的 18 个 Bt 菌株,以斜纹夜蛾幼虫为靶子昆虫进行了筛选,结果表明,其中 6 个菌株对斜纹夜蛾有高毒性,当晶体蛋白浓度为 $4.5 \sim 5.0 \mu\text{g} / \text{ml}$ 时,48h 的校正死亡率高达 85%~90%, LD_{50} 范围为 $28.2 \sim 137.2 \mu\text{g}$ 晶体蛋白。对这 6 菌株的生化特性、鞭毛血清型以及质粒 DNA 的琼脂电泳图谱进行了研究。

关键词 苏云金芽孢杆菌,斜纹夜蛾,高毒力,生化特性,H 血清型

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, 以下简称 Bt) 是目前应用最广泛的微生物杀虫剂之一^[1]。它在形成芽孢的同时可产生对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等幼虫有毒杀作用的晶体蛋白^[2]。但目前对鳞翅目夜蛾科幼虫尤其是斜纹夜蛾有防治效果的 Bt 菌株仍未见有报道。本研

究针对上述问题,对从国外(德国)土壤中新分离的菌株以斜纹夜蛾幼虫为生测对象,力图从中筛选对之有高毒效的菌株,并对这些菌株的

广东省自然科学基金资助

1996-09-02 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

一些基本特性进行初步探讨,为生产高效的 Bt 杀虫剂提供菌株来源。现将研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌株、抗血清和供试昆虫

自德国水源保护区土壤中新分离纯化的菌株共计 18 个, BTK、BTI、BTt 为德国标准商品菌株, HD-1 为美国 Dipel 产品, 标准抗血清, 斜纹夜蛾 (*Prodenia litura*) 3 龄幼虫。以上材料均由中大昆虫所生物工程系提供。

1.2 培养基

LB 液体培养基(%) : 胰蛋白胨 1, 酵母抽提物 0.5, NaCl 1, pH 7.0。LB 固体培养基 : 含 1.8% 琼脂的 LB 液体培养基。LB 半固体培养基 : 含 0.2%~0.3% 琼脂的 LB 液体培养基。

1.3 晶体蛋白的分离、纯化和浓度的测定

晶体蛋白的分离、纯化和裂解参照文献 [3], 浓度的测定则按 Lowry^[4] 方法进行。

1.4 生物测定

LB 固体培养基上生长 5~7d 的 Bt 菌体, 双蒸水洗三次, 用生理盐水制成每毫升孢晶复合物中含 4.5~5.0mg 晶体蛋白的悬浮液, 取 200 μ l 滴于 1g 人工饲料表面饲喂幼虫, 空白对照滴等量生理盐水。每处理试虫为 15 头, 设三次重复, 48h 后观察结果, 计算校正死亡率和 LD₅₀。

1.5 生化测定

采用 Martin^[5] 的方法。测试项目包括 : 产生精氨酸脱羧酶、淀粉酶、Tw-酯酶、脲酶、几丁酶及卵磷脂酶, 利用七叶苷、发酵纤维二糖、甘露糖、蔗糖及水杨苷, 以及 VP 反应。

1.6 鞭毛血清型鉴定

1.6.1 菌体的活化及抗原制备 : 将 Bt 单菌落接种于 LB 半固体培养基上培养 15~20h, 取边缘生长旺盛菌体活化 2~3 代, 再转接到 LB 液体培养基上振荡培养 5h, 离心收集菌体用生理盐水稀释到浓度为 10⁶~10⁹ 细胞 / ml, 加入甲醛使终浓度为 0.5%, 此液即为抗原母液, 贮存于冰箱中备用。

1.6.2 抗原抗体凝集反应 : 参照文献 [6] 的方法

进行。

1.7 质粒 DNA 的提取

将 Bt 单菌落接种于 LB 固体培养基上, 28℃ 培养过夜, 再活化 6h, 然后参照文献 [7] 的方法提取质粒 DNA, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

1.8 琼脂糖凝胶电泳

用电泳缓冲液配制 0.5% 琼脂糖凝胶, 质粒 DNA 与 1/5 体积样品缓冲液混合, 取 DNA 制备物 30 μ l 加入样品孔中进行电泳^[8]。同时以 Gonzalez^[9] 用电泳测出的 HD-1 菌株 (分子量为 120、110、52、44、27、9.4、5.4、5.2、4.9MD) 作标准分子量, 估算出各菌株的质粒 DNA 分子量。

2 结果与讨论

2.1 斜纹夜蛾感染 Bt 后的症状

斜纹夜蛾感染 Bt 后, 食欲减退, 行动迟缓, 反应失灵, 中肠发黑, 后整个消化道变黑呈腐烂状, 虫体内充满乳糜状液样物, 死后不久整个虫体呈黑色, 死虫明显小于健康虫体。表明 Bt 新分离株对斜纹夜蛾幼虫具有毒杀和抑制虫体生长双重作用, 用死虫的肠液可以分离出与原菌株相同的 Bt 菌。

2.2 对斜纹夜蛾高毒效菌株的筛选

在所测试的 18 个 Bt 菌株中, 有 6 个对斜纹夜蛾有很强的毒杀作用, 48h 校正死亡率达 85%~90% (表 1), 而商品菌株 BTK、BTI、BTt 对斜纹夜蛾均无效。6 个菌株对斜纹夜蛾的 LD₅₀ 范围为 28.2~137.2 μ g 晶体蛋白, 其中以 S18-4 毒力最强。经反复多次测定结果基本相同。表明这 6 个菌株对斜纹夜蛾有稳定的高毒性。

表 1 6 个 Bt 菌株对斜纹夜蛾的毒效

菌株号	S18-4	S11-11	S10-1	S20-1	S21-1	S12-2	BTK
校正死亡率 (%)	91.1	88.9	88.9	86.7	84.4	84.4	0
LD ₅₀ (μ g)	28.2	79.2	95.4	100.8	115.5	137.2	/

2.3 生化测定

以所测结果对照已发表的 Bt 亚种的生化测定结果推断测试菌株的生化亚种^[10], S₁₀₋₁, S₁₂₋₂ 和 S₁₈₋₄ 同属于 Kur 生化亚种, 而 S₂₁₋₁, S₂₀₋₁, S₁₁₋₁₁ 则分别属 Kyu, Ten 和 Thu 亚种。

2.4 鞭毛(H)血清型

6个菌株的鞭毛血清型,经初步鉴定结果如表2。有4个属H3ab,2个属H5ab。

表2 6个Bt菌株的鞭毛血清型

菌株号	S ₁₈₋₄	S ₁₁₋₁₁	S ₁₀₋₁	S ₁₂₋₂	S ₂₀₋₁	S ₂₁₋₁
鞭毛血清型	H3ab	H3ab	H3ab	H3ab	H5ab	H5ab

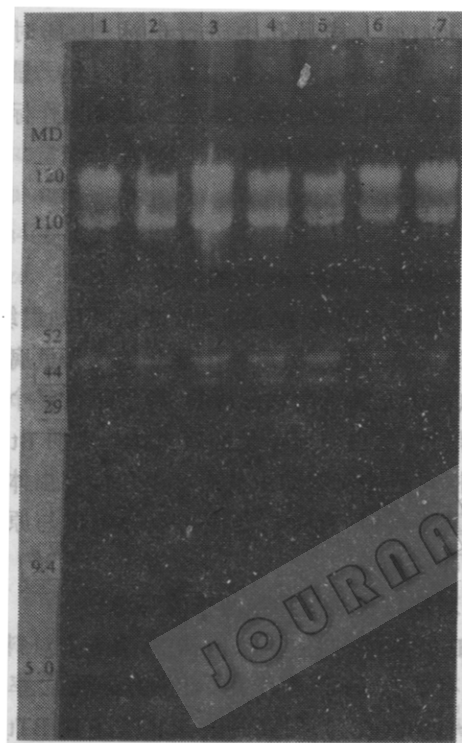


图1 6个Bt菌株的质粒DNA琼脂糖凝胶电泳图谱

1. HD-1, 2. S₁₀₋₁₁, 3. S₁₁₋₁₁, 4. S₁₂₋₂,
5. S₁₈₋₄, 6. S₂₀₋₁, 7. S₂₁₋₁.

2.5 质粒DNA的大小和数目

由图1可知,6个Bt菌株的质粒DNA在琼脂电泳水平上至少可见7条质粒带,根据电泳迁移率,以HD-1菌株质粒DNA大小为标准,得出6个Bt菌株自上而下质粒大小分别为120、

110、52、44、29、9.4和5.0MD。表明Bt菌株中含有相当丰富的质粒DNA,且不同菌株所含的质粒DNA分子量及数目基本相同。

斜纹夜蛾属鳞翅目夜蛾科,此虫分布广泛,遍及全国,是杂食性害虫,为害植物达99科290种以上。长期以来,为了防治斜纹夜蛾的危害一直以化学农药为主,现已产生了抗药性。而目前所使用的Bt杀虫剂中包括应用最广泛的HD-1及德国的标准商品菌株(BTk, BTi, BTc)对斜纹夜蛾均无效。

本研究从所测试的18个新分离株中,筛选到6个菌株对斜纹夜蛾有高毒效,为生产实践提供理论依据及菌种来源,具有一定的推广应用价值。

参考文献

- [1] 蒲蛰龙. 昆虫病理学. 广州: 广东科技出版社, 1994, 217~338.
- [2] Hofte H, Whiteley H R. Microbiol Rev, 1989, 53: 342~355.
- [3] Patricia N, Pietrantonio V, Sarjeet S. J Invert Pathol, 1992, 59:295~302.
- [4] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. J Biol Chem, 1951, 193:265~275.
- [5] Martin P A W, Haransky E B, Traver R S, et al. Bio Techniques, 1985, 3:386~392.
- [6] Krywienycz J, Dulmage H T, Fast P G. J Invert Pathol, 1989, 31:372~375.
- [7] Katman Sue Kristine L, Kiehne J L Libs, Takashi Yamamoto. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(4): 1131~1137.
- [8] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular Cloning, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, 232~298.
- [9] Gonzalez J M J, Dulmage H T, Carlton B C. Plasmid, 1981, 5:351~365.
- [10] De Bajae H, Frachon E. Entomophaga, 1990, 35(2): 233~240.

THE NEW *BACILLUS THURINGIENSIS* ISOLATES HIGHLY TOXIC TO *PRODENIA LITURA* LARVAE AND THEIR CHARACTERIZATION

Jiang Donghua

(Biological Department, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004)

Deng Riqiang Pang Yi Long Qixin

(Research Institute of entomology, Zhongshan University, GuangZhou 510275)

Abstract Six *Bacillus thuringiensis* isolates highly toxic to *Prodenia litura* larvae were obtained. They were isolated from soil samples collected at the water protection areas close to Gross-Gerae in South Hessen of Germany. The corrected mortality reached 85%~90% within 48h when a concentration of 4.5~5.0 μ g / ml crystal protein was used. The LD₅₀ was between 28.2~137.2 μ g crystal protein. In addition, the biochemical reactions, the H serotypes and the pattern of plasmids DNA agarose gel electrophoresis of the six Bt isolates were also studied.

Key words *Bacillus thuringiensis*, *Prodenia litura*, High toxicity, Biochemical characteristics, H-serotypes