

研究报告

## 转异源 *chi* 基因的 Bt 工程菌株的生防潜力评价

张娜<sup>1Δ</sup> 李蓬飞<sup>1Δ</sup> 陈月华<sup>1,2\*</sup> 蔡峻<sup>1,2</sup> 史进<sup>1</sup> 边强<sup>3\*</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)

(3. 南开大学 农药国家工程研究中心 天津 300071)

**摘要:**【目的】构建增强抑制真菌能力兼杀虫的苏云金芽胞杆菌多功能生防菌株。【方法】将含有组成型高效表达启动子、地衣芽胞杆菌 *chiMY* 基因的重组质粒 pDM, 转化进杀虫活性高且有一定抑菌活性的 Bt519-1 菌株。酶谱分析方法确认 Bt519(pDM)组成型异源表达几丁质酶。室内测定工程菌株抑菌谱, 计算抑菌效率, 确定最敏感的植物病原真菌, 进行植物盆栽病害防治的应用潜力评价。将不同浓度的 Bt 粗酶液灌入甜椒幼苗根部, 12 h 后接种辣椒疫霉孢子液, 接种 2 d 后开始观察, 记录发病株数。自 7 d 起调查植株发病情况统计并分析防治效果。【结果】SDS-PAGE 及酶谱分析证明, Bt519(pDM)能够特异表达 68 kD 蛋白, 该蛋白为异源几丁质酶 ChiMY。抑菌谱测定证明, 工程菌抑制效率达到 90%以上的有 5 种真菌, 其中最明显的是辣椒疫霉。盆栽实验证明, Bt519(pDM) 7 d 的防效为 73.2%。工程菌株对棉铃虫的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)为 121.26 mg/L。【结论】Bt519(pDM)是一株有应用潜力的生防菌株。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌, 几丁质酶, 组成型表达, 广谱抑真菌, 辣椒疫霉

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31371979); Doctoral Foundation of Ministry of Education of China (No. 20120031110019); Tianjin Natural Science Foundation (No. 12JCYBJC198000)

**\*Corresponding author:** CHEN Yue-Hua: Tel: 86-22-23505964; E-mail: yhchen@nankai.edu.cn  
BIAN Qiang: E-mail: bianqiang@nankai.edu.cn

<sup>Δ</sup>These authors equally contributed to this work

**Received:** February 01, 2015; **Accepted:** June 23, 2015; **Published online** (www.cnki.net): October 30, 2015

**基金项目:** 国家自然科学基金项目(No. 31371979); 教育部博士点基金项目(No. 20120031110019); 天津市自然科学基金项目(No. 12JCYBJC198000)

**\*通讯作者:** 陈月华: Tel: 86-22-23505964; E-mail: yhchen@nankai.edu.cn  
边强: E-mail: bianqiang@nankai.edu.cn

<sup>Δ</sup>共同第一作者

**收稿日期:** 2015-02-01; **接受日期:** 2015-06-23; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2015-10-30

## Biocontrol potential of *Bacillus thuringiensis* strain Bt519-1 transformed with heterologous chitinase gene

ZHANG Na<sup>1Δ</sup> LI Peng-Fei<sup>1Δ</sup> CHEN Yue-Hua<sup>1,2\*</sup> CAI Jun<sup>1,2</sup> SHI Jin<sup>1</sup> BIAN Qiang<sup>3\*</sup>

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

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

(3. National Pesticide Engineering Research Center, Nankai University, Tianjin 300071, China)

**Abstract:** [Objective] To produce *Bacillus thuringiensis* Bt519-1 as biocontrol agent with enhanced antifungal and insecticidal activity. [Methods] A recombinant plasmid, pDM, containing a constitutive high expression promoter and the chitinase gene *chiMY* from *B. licheniformis*, was constructed and transferred into strain Bt519-1 by electroporation. Zymogram analysis was used to test the constitutive expression of chitinase of strain Bt519(pDM). Inhibitory activity of the engineered strain was measured against 10 species of fungi that are plant pathogens. The most sensitive fungus was selected to test in pot culture experiments. Roots of *Capsicum annuum* seedlings were irrigated with various concentrations of the Bt crude enzymes, inoculated with the fungal sporangial suspension 12 h later. The plant disease index and control efficacy were determined 7 d after inoculation. [Results] SDS-PAGE and zymogram analysis confirmed that strain Bt519(pDM) expressed chitinase (68 kD). Inhibitory of Bt519(pDM) was effective for 5 of the 10 tested fungi of which *Phytophthora capsici* was most sensitive. Pot culture experiments demonstrated that the control efficacy of Bt519(pDM) against *P. capsici* was 73.2%. The half lethal concentration ( $LC_{50}$ ) of Bt519(pDM) against the moth *Heliothis armigera* was 121.26 mg/L. [Conclusion] Bt519(pDM) has potential as an antifungal and insecticide.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, Chitinase, Constitutive expression, Broad-spectrum antifungal, *Phytophthora capsici*

对苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)的研究历史已超过 100 年。目前上百种 Bt 商品制剂在世界各地登记注册,成功用于多种农、林、果蔬和卫生害虫的防治<sup>[1-2]</sup>。为了加速昆虫的罹病进程、提高死亡率,近年来学者开始关注几丁质酶对 Bt 的增效作用。昆虫中肠围食膜的主要结构成分是几丁质,被几丁质酶破坏后,昆虫失去了抵御细菌和病毒的物理屏障,可明显提高 Bt 的杀虫活性。Reda 等报道,利用含有不同 *B. subtilis* 几丁质酶基因的重组质粒构建的 Bt 工程菌株,对供试的多种不同食性昆虫的杀虫活性有显著提高<sup>[3]</sup>。本实验室将苏云金芽胞杆菌中的 *chiA* 克隆,异源表达及纯化后与 Bt 杀虫剂混合进行棉铃虫及甜菜夜蛾杀虫实验,可明显降低半致死浓度<sup>[4]</sup>。

为了扩大 Bt 生防范围,国外在十多年前就开始了 Bt 抑制植物病原真菌的研究。Marrone 等在发

明专利中详细描述了 Bt AQ52 菌株具有广谱的抑真菌活性及其应用价值<sup>[5]</sup>。Moar 证明 Bt 突变菌株 AU634,不仅保留了原亲本菌株 Bt HD-548 对玉米螟的杀虫毒性,而且还对黄姜灰霉(*Botrytis cinerea*)、早疫病链格孢(*Alternaria solani*)和黄曲霉(*Aspergillus flavus*)等植物病原真菌具有较强的抑制作用<sup>[6]</sup>。这些发现可以使人们重新审视 Bt 在生防方面新的应用价值<sup>[7]</sup>。

本实验室前期研究发现,具有高酶活力的 Bt 菌株不多见,添加诱导物之后,绝大部分 Bt 菌株的诱导倍数仅在 0.3-2.9 倍之间。因此抑制真菌的活性也较低。本研究利用实验室前期获得的组成型表达 *chi* 的缺失启动子<sup>[8]</sup>,与来自地衣芽胞杆菌(*Bacillus licheniformis*) MY75 菌株的 *chiMY* 基因连接,获得能够在不诱导的条件下,组成型表达几丁质酶的重组质粒,将重组质粒转化到对棉铃虫高毒

力且抑真菌的 Bt519-1 菌株<sup>[9]</sup>中,从而获得一株抑真菌能力增强兼杀虫的苏云金芽胞杆菌多功能生防菌株,并进行了抑菌谱测试及防治辣椒疫病的应用潜能评价。研究结果有利于提高 Bt 生物农药的市场竞争力,提升传统生物农药在植物真菌病害防治领域的应用价值。近年来,多数构建转几丁质酶基因 Bt 工程菌株的目的是为了提高其杀虫活性<sup>[10-11]</sup>,而提高 Bt 抑真菌活性的实例鲜有报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

所用的菌株和质粒见表 1;化学农药烯酰吗啉原药(96%)购自巴斯夫欧洲公司;蛋白 Marker 购自 TIANGEN 公司;乙二醇几丁质(Glycol chitin)及荧光染料(Fluorescent Brightener 28)均购自 Sigma (美国)公司,其余生化试剂为国产分析纯。

进行室内盆栽实验的植物为茄门甜椒 (*Capsicum annuum*),来自天津蓟县保丰蔬菜种子站;杀虫活性测试昆虫为棉铃虫 (*Heliothis armigera*),由河北省农林科学院植保所提供。其余的实验菌株、质粒见表 1。

LB 培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0,酵母粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.2-7.4,用于 *E. coli* 和 Bt 的培养。SOC 培养基(g/L):蛋白胨 20.0,酵母粉 5.0, NaCl 0.5, KCl 0.2, MgCl<sub>2</sub> 2.0,葡萄糖 3.6,用于 Bt 电转化后的恢复培养。NB 培养基(g/L):牛肉膏 5.0,胰蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.2,固体培养基需加 1.5%的琼脂粉,用于 Bt 菌株的培养和保存。

### 1.2 组成型表达几丁质酶工程菌株 Bt519(pDM) 的获得

**1.2.1 pDM 质粒的构建:**以 pCB<sup>[13]</sup>为载体,将其报告基因 *bgaB* 通过 *Sal* I 和 *Sph* I 双酶切除,插入来自 *B. licheniformis*<sup>[14]</sup>的 *chiMY* ORF (EU822303),然后利用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切位点,再将启动子 *chiBpA4* 插入 *chiMY* 基因的上游,重组质粒 pDM 的构建图如图 1 所示。

**1.2.2 制备 Bt519-1 感受态细胞:**将 Bt519-1 接入 LB

表 1 实验所用菌株及质粒  
Table 1 The strains and plasmids used in this work

菌株和质粒 Strains and plasmids	来源 Source
<b>Bacteria</b>	
<i>Bacillus thuringiensis</i> 519-1	Lab collection
<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt519(pDM)	This study
<b>Fungi</b>	
<i>Fusarium graminearum</i>	Lab collection
<i>Phytophthora infestans</i>	Lab collection
<i>Cercospora arachidicola</i>	Lab collection
<i>Frusarium oxysporum</i>	Lab collection
<i>Physalospora piricola</i>	Lab collection
<i>Phytophthora capsici</i>	Lab collection
<i>Botrytis cinerea</i>	Lab collection
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Lab collection
<i>Rhizoctonia solani</i>	Lab collection
<i>Alternaria solani</i>	Lab collection
<b>Plasmids</b>	
pDM (pCB with <i>chiBA4</i> promoter, <i>chiMY</i> ORF, Ap <sup>r</sup> and Er <sup>r</sup> )	Lab collection <sup>[12]</sup>

培养基中 30 °C、200 r/min 活化 12 h,再将活化好的菌种转接至新培养基中,相同条件下培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6-0.8 后,将菌液冰浴 20 min,5 000 r/min 离心 20 min,弃上清。用适量的 SG 缓冲液(272 mmol/L 蔗糖、15%甘油)洗涤菌体 4 次后,用 50-100 μL 20% 无菌 PEG6000 重悬菌体,现用现制备。

**1.2.3 电转化法:**提前预冷经紫外灭菌的电击杯,将 100 μL Bt519-1 感受态细胞与 5-10 μL pDM 质粒混匀加入其内,冰浴 10 min 后,1 800-2 000 V 电压下电击,随后迅速向电击杯中加入 1 mL SOC 培养基,用移液器将其混匀并吸出至 EP 管中,30 °C 恢复培养 2.5 h。在含有 50 mg/L 的红霉素 LB 平板上涂布,30 °C 培养 12 h。筛选阳性转化子 Bt519(pDM)。

### 1.3 SDS-PAGE 及酶谱分析

SDS-PAGE 采用本室常用方法<sup>[12]</sup>。酶谱分析:在 SDS-PAGE 分离胶中加入可溶性底物乙二醇几丁质,电泳后将胶浸入含 0.1% TritonX-100 的复性缓冲液(0.1 mol/L 乙酸钠,乙酸调节 pH 至 5.0),37 °C、

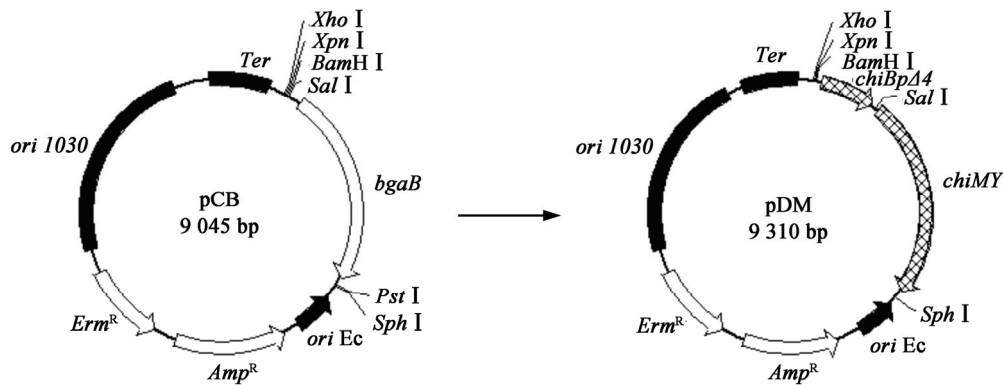


图 1 重组质粒 pDM 构建图

Figure 1 The construction of recombinant plasmid pDM

80 r/min 振荡过夜, 去除 TritonX-100, 荧光染料(荧光染色缓冲液: 0.5 mol/L Tris-HCl, pH 8.9)染色 30 min, 紫外灯观察特异性水解带。

#### 1.4 工程菌的几丁质酶合成及生长特性

将实验用菌株分别在液体 LB 中活化 12 h 后, 以 1% 的接种量转接无诱导物 LB 培养基, 30 °C、200 r/min 培养, 每 12 h 取样一次, 测定几丁质酶酶活, 同时用血球计数板计数并观察每时段菌数和细胞形态, 绘制生长曲线及计算菌体裂解率, 酶活力的测定及数据处理参照文献[14]。

#### 1.5 工程菌质粒遗传稳定性的检测

接种单菌落于含红霉素的 LB 培养基中活化, 以 1% 接种量转接到无红霉素的 LB 培养基, 30 °C 振荡 12 h, 取样测定菌落数。再以 1% 接种量转接相同培养基继续培养。随后每隔 12 h 取样并转接一次, 直至 72 h。将取样的菌液稀释至  $10^{-6}$  后, 分别涂布 LB 平板和含红霉素的 LB 平板, 各 3 个重复, 30 °C 培养 24 h 后计数菌落数并进行统计分析。

#### 1.6 抑真菌谱测定

在无菌条件下, 将菌株发酵上清浓缩粗酶液, 与冷却至适宜温度的 PDA 固体培养基以一定比例均匀混合, 制成不同浓度的含酶液平板待用。将培养好的 10 种病原真菌用直径 4 mm 的灭菌打孔器, 自真菌菌落边缘切取菌饼, 接种于前述含酶液平板上, 每个浓度做 3 个重复, 置 26 °C, 培养 72 h 后,

利用十字交叉法垂直测量菌落直径各一次, 取平均值。抑菌率的计算公式如下<sup>[15]</sup>: 抑菌率(%)=[(对照菌落扩散直径-处理菌落扩散直径)/对照菌落扩散直径]×100。

#### 1.7 抑制辣椒疫霉孢子萌发半抑制剂量( $IC_{50}$ )测定

取辣椒疫霉孢子, 将浓度调整为  $10^5$  CFU/mL, 将浓缩粗酶液与孢子悬液按 1:1 的体积比混合加入凹玻片的中央, 用盖玻片密封后置于灭菌的培养皿中, 26 °C 培养 2 d 后, 用 40 倍显微镜观察 10 个视野中孢子萌发数量, 同时设野生菌对照。使用 SPSS 软件计算  $IC_{50}$ 。

#### 1.8 辣椒疫病盆栽防效实验

**1.8.1 Bt 粗酶液的制备:** 发酵上清冷冻干燥制备冻干粉, 用 10 mL 50 mmol/L、pH 6.0 的磷酸钾缓冲液溶解制成母液, 将 2 菌株母液用相同方法分别稀释成 3 个浓度梯度的粗酶液备用。工程菌株分别为: 20.58、10.29、2.1 U/mL, 野生菌株为: 8.97、4.48、0.91 U/mL。

**1.8.2 辣椒疫霉孢子悬液的制备及侵染办法:** 取在 PDA 平板活化 3 d 的辣椒疫霉菌, 转至燕麦培养基光照培养 7 d 左右, 用无菌水洗下孢子囊得到悬浮液, 4 °C 放置 60 min, 配成  $10^6$  CFU/mL 的孢子悬浮液储存备用。

**1.8.3 盆栽实验方法:** 辣椒疫病的供试侵染植株为

茄门甜椒幼苗。取 3 种试验材料：工程菌粗酶液、野生菌粗酶液和农药烯酰吗啉。每材料 3 个浓度，3 次重复。将不同浓度的粗酶液和农药灌入辣椒根部，每个重复 6 株健康的辣椒幼苗。12 h 后接种辣椒疫病菌，于距离植株根部 1 cm 处打一小孔，注入 1 mL 孢子囊悬浮液，覆土浇水，接种后正常管理；接种 2 d 后开始观察，记录发病株数。7 d 后调查植株发病情况及其防治效果。

**1.8.4 发病情况的调查：**依据文献报道的病害分级标准<sup>[16]</sup>，记录植株发病情况。根据各处理的病情指数来计算防治效果。利用公式<sup>[17]</sup>及 SPSS 软件的 Duncan's 新复极差法对实验数据进行统计分析：病情指数(%)=[ $\sum$ (病级数值×该病级病株数)×100]/(病级最高值×调查株数)；防效(%)=[(对照平均病情指数-处理平均病情指数)/对照平均病情数]×100。

### 1.9 菌株的杀虫效果测定

将工程菌株和野生菌株在固体 NB 培养基中培养 96 h，收集培养物制成冷冻干燥粉作为生测样品。将干燥粉配成 5 个浓度悬液，分别混进棉铃虫感染饲料，对照组加入等量的缓冲液，待彻底干燥后，接入棉铃虫初孵幼虫。其他均按标准生物测定方法进行<sup>[18]</sup>。30 °C 培养 72 h 后统计结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 工程菌鉴定及特异表达外源蛋白的检测

将构建的重组表达质粒 pDM 通过电转化法转入受体菌株 Bt519-1 获得转化子。经特异基因引物扩增后检测到预期大小的 *chiMY* 基因片段(图略)，证明重组质粒 pDM 已转入受体，重组菌株命名为 Bt519(pDM)。

收集不添加诱导物培养 4 d 的野生菌株与 Bt519(pDM)菌株发酵上清粗酶液，将蛋白浓度调至一致，进行 SDS-PAGE 检测目的蛋白，结果如图 2A 所示。与野生菌对照比较发现，工程菌粗酶液于 68 kD 处有一条特异性表达条带。野生菌自身含有的几丁质酶 ChiB 约为 70 kD，由于是无诱导物培养表达量低，SDS-PAGE 未检测出。为验证工程菌特

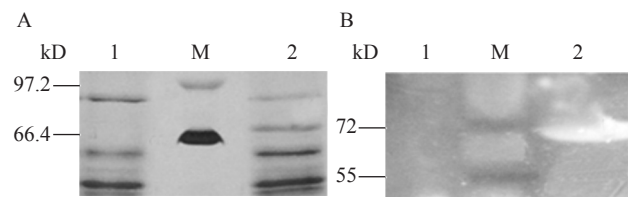


图 2 两株菌发酵液上清特异蛋白表达的 SDS-PAGE 及酶谱分析

**Figure 2 SDS-PAGE and zymogram analysis of specific expressed protein in fermentation broth of Bt519-1 and Bt519(pDM)**

注：A：SDS-PAGE，考马斯亮蓝 R-250 染色。B：酶谱分析，荧光染料染色，并在紫外光下观察，亮区代表凝胶中的乙二醇几丁质被几丁质酶水解。1：Bt519-1；2：Bt519(pDM)；M：蛋白 Marker。

Note: A: SDS-PAGE. Proteins were stained with Coomassie brilliant blue R-250. B: Zymogram analysis. Proteins were stained with Fluorescent Brightener 28 and observed under UV light. The light zone represents the hydrolysis of glycol chitin in the gel. 1: Bt519-1; 2: Bt519(pDM); M: Protein marker.

异表达的蛋白是否几丁质酶，进一步进行了酶谱分析，结果如图 2B 所示。工程菌表达的地衣芽胞杆菌几丁质酶 ChiMY 可以分解凝胶中的可溶性几丁质底物，显示出明显的荧光带，分子量大小与 SDS-PAGE 图特异表达的蛋白条带大小一致，而且与本室前期在 *E. coli* 中异源表达的 ChiMY 分子量也完全相同<sup>[12]</sup>。野生菌自身的几丁质酶由于表达量低未检测出。

### 2.2 工程菌株的几丁质酶合成及生长特性

在无诱导物条件下分别培养两菌株，定时取样分析几丁质酶合成及群体生长特性，结果见图 3。酶活力曲线的测定结果可以看出，工程菌株的几丁质酶表达量一直高于野生菌株，至发酵终止时达到 3.3 U/mL，几乎是野生型菌株的 3 倍，显示出组成型表达启动子的特点。

培养前期，两菌株几丁质酶几乎没有分泌，至 24 h 细胞生长稳定期才开始检测到酶活性，随后酶的表达量开始出现明显不同，并持续地增加直至 60 h。各时期细菌细胞形态的光学显微镜观察证明，48 h 开始出现游离的芽胞和晶体。野生菌的菌体裂解率基本维持恒定至发酵终止。而工程菌在培养



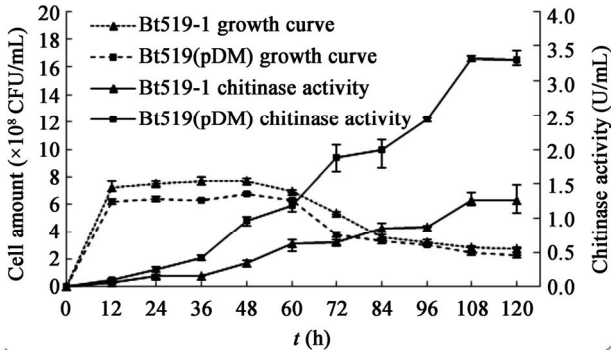


图 3 Bt519-1 和 Bt519-1(pDM)在非诱导条件下酶合成及生长曲线

Figure 3 Enzymatic synthesis and growth curve of Bt519-1 and Bt519(pDM) in the medium without inducer

60 h 之前的菌体裂解率基本与野生菌相同, 但培养至 96 h, 由于工程菌代谢负担较重, 加之菌体生长已处于衰亡期后期, 其裂解率明显高于野生菌, 几丁质酶释放量也相应大量提高。

从生长曲线可以看出, 工程菌的生物量一直略低于野生菌, 但发酵结束时, 取两菌株等体积上清液测定可溶性蛋白总量, 工程菌为 68.57 mg/L, 明显高于野生菌株的 47.96 mg/L。

### 2.3 工程菌重组质粒 pDM 的遗传稳定性

采用稀释涂板法测定多次传代的工程菌株, 在有和无选择压力培养下的平板菌落数, 其比值结果见图 4。经连续转接 8 次培养至 96 h, 其质粒保存率比值最低为 91%, 无显著性差异, 表明该质粒遗传稳定性较好。

### 2.4 工程菌抑真菌谱及活性

采用菌丝生长速率法, 测定了工程菌和野生菌对 10 种植物病原真菌的抑制作用。利用抑菌率的计算公式, 将被处理真菌菌落直径大小的测量值与该菌对照菌落测量值之间进行统计处理, 转换成抑菌率, 结果见图 5。

首先可以肯定, 对于检测的大多数真菌, 除番茄早疫病菌(*A. solani*)外, Bt519(pDM)的抑菌活性较原菌株 Bt519-1 都有不同程度的提高。提高到 90%及以上抑制率的有 4 种真菌, 其中提高幅度最

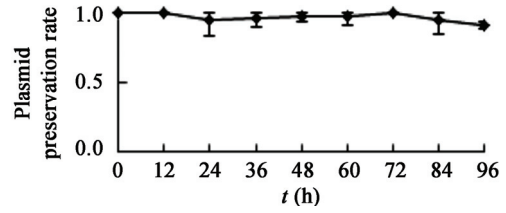


图 4 无红霉素选择压力下连续传代中的质粒遗传稳定性

Figure 4 Plasmid genetic stability of Bt519(pDM) in serial culture without Erythromycin

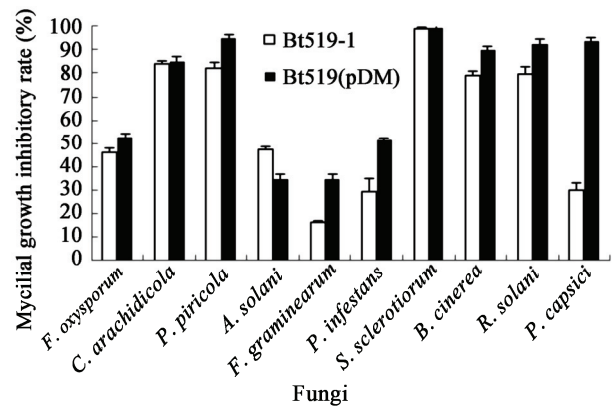


图 5 两株菌发酵液对 10 种真菌的菌丝生长抑制率

Figure 5 The mycelial growth inhibitory rates of ten species of fungi by fermentation broth of Bt519-1 and Bt519(pDM)

大的是辣椒疫霉(*P. capsici*), 抑制率从 30%提高到 90%, 证明辣椒疫霉菌对几丁质酶非常敏感。上述结果表明工程菌株在保持了野生型菌株原抑菌谱的基础上, 组成型表达的几丁质酶增强了其抑菌活性。油菜菌核病菌(*S. sclerotiorum*)对野生菌株和工程菌株都非常敏感, 被处理的菌落几乎无生长现象。

### 2.5 对辣椒疫霉孢子萌发的半抑制浓度(IC<sub>50</sub>)

工程菌比较野生菌株在对辣椒疫霉孢子萌发的活性上明显大幅度提高, 半抑制浓度分别是 68.1 mg/L 和 117 mg/L, 工程菌的 IC<sub>50</sub> 较野生菌株降低了 40%, 这一结果与上述抑制菌丝生长效果是一致的。相关统计结果见表 2。

## 2.6 盆栽辣椒疫病的防治效果

根据抑真菌的结果,选择工程菌株抑菌率提高幅度最大的辣椒疫霉,作为盆栽实验供试真菌,以野生菌和化学农药为对照,检测工程菌对辣椒疫病的防治效果。

称取相同重量的工程菌株和野生型菌冻干粉,制备成3个浓度梯度的悬液,分别测定不同浓度悬液的几丁质酶活力,工程菌株酶活力由高到低依次是20.58、10.29和2.10 U/mL,野生型菌株依次是8.97、4.48和0.91 U/mL。化学农药烯酰吗啉两个浓度梯度是12.50 mg/L和6.25 mg/L,侵染辣椒疫霉孢子的浓度为 $10^6$  CFU/mL。

表3数据为各个处理在其最高浓度下,对盆栽辣椒苗疫病在7、10和14 d的病情指数及其防治效果的统计分析。CK为仅接种病原菌的负对照。

盆栽植株生长至第7天时,负对照的病情指数已达96.72,此时工程菌处理的防效较明显,达到73.17%,而野生菌为35.27%。第10天时负对照全部发病,工程菌与野生菌相比,防效有显著差别。到第14天,野生型菌株处理的植株完全发病,而工程菌株仍有14%的防效。

图6为工程菌处理第10天的温室辣椒苗疫病防治效果图。发病对照植株全部患病倒伏、叶片萎蔫干枯。结果表明,同一菌株防治效果随酶活力的升高而增强,在每一个对应稀释浓度下,工程菌的防治效果均比野生型明显好,但是在药效持久性上不如化学农药。

## 2.7 杀虫活性检测

收集2菌株固体培养物,制成冷冻干燥粉,对棉铃虫初孵幼虫进行了半致死浓度测定。结果及相关统计分析见表4。

以上数据显示,Bt519(pDM)的 $LC_{50}$ 值相对于Bt519-1有一定程度的降低,但两者在置信区间上有重叠,表明工程菌对棉铃虫的毒力活性也是不低的。研究结果显示工程菌Bt519(pDM)是一株能够抑菌及杀虫的多功能菌株。

## 3 讨论

Bt是应用最广泛的农业杀虫细菌,构建Bt工程菌株的主要目的大多为了提高杀虫活性,而高效抑真菌兼杀虫的Bt多功能菌株几乎没有报道。Bt519-1是前期筛选出的一株高效杀虫且抑真菌的

表2 2株菌发酵粗酶液对辣椒疫霉孢子的半抑制剂量

Table 2 The  $IC_{50}$  of the fermentation broth of Bt519-1 and B519(pDM) against spore germination of *P. capsici*

菌株 Strains	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	半抑制剂量 $IC_{50}$ (mg/L)	置信区间 Confidence interval
Bt519-1	$Y=3.08X-6.37$	0.959	117.006	106.200-143.412
Bt519(pDM)	$Y=2.15X-3.03$	0.988	68.106	57.804-94.198

表3 工程菌 Bt519(pDM)对辣椒苗疫病的生防效果

Table 3 The control efficacy of fermentation broth of Bt519(pDM) against *P. capsici*

处理 Treatment	7 d		10 d		14 d	
	病情指数 Disease index	防效 Control efficacy	病情指数 Disease index	防效 Control efficacy	病情指数 Disease index	防效 Control efficacy
Bt519(pDM)	11.94	73.17ab	33.85	56.07b	87.13	14.27b
Bt519-1	60.42	35.27b	83.47	16.90c	100.00	-
Dimethomorph	0.44	99.30a	1.26	97.90a	4.17	94.77a
CK	96.72	-	100.00	-	100.00	-

注:同列数据后不同字母表示 $P<0.05$ 水平上显著差异(Duncan's新复极差测验)。

Note: Values followed by different lowercase letters in the same column indicate significance difference at 0.05 level (Duncan's new multiple range test).



图 6 第 10 天工程菌对温室辣椒疫病的防治效果

Figure 6 The control efficacy of fermentation broth of Bt519(pDM) against *P. capsici* on 10<sup>th</sup> day

注: ACE: 野生菌粗酶液高中低 3 个浓度; BDF: 工程菌粗酶液高中低 3 个浓度; GH: 化学农药烯酰吗啉高低两个浓度; I: 自然生长的辣椒苗状态; J: 仅接种病原真菌辣椒疫霉的对照。

Note: ACE: Low/middle/high concentrations of crude enzyme of Bt519-1; BDF: Low/middle/high concentrations of crude enzyme of Bt519(pDM); GH: Dimethomorph: high/low concentration; I: Natural growth; J: Negative control (inoculated with *P. capsici* only).

表 4 2 株菌对棉铃虫的半致死浓度测定  
Table 4 The  $LC_{50}$  of Bt519-1 and Bt519(pDM) against the moth *Heliothis armigera*

菌株 Strains	Probit 分析 Probit analysis				$LC_{50}$ 及 95%置信区间 $LC_{50}$ (mg/L) (95% confidence interval)	回归方程 Regression equation
	$s_{\bar{x}}$	$\chi^2$	df	P		
Bt519(pDM)	0.192	2.554	3	0.466	121.26 (93.19–154.03)	$Y=-3.063+1.470X$
Bt519-1	0.198	1.400	3	0.706	82.07 (59.79–105.28)	$Y=-2.812+1.469X$

发明专利授权菌株<sup>[9]</sup>, 几丁质酶 ChiMY 来自地衣芽胞杆菌, 通过置换组成型启动子, 改变其原有的诱导表达方式, 使 Bt 不需诱导便可以大量表达几丁质酶<sup>[13]</sup>。本研究结果证明, 由于过量合成几丁质酶, 工程菌株 Bt519(pDM)对辣椒疫病防效明显。本文中的供试真菌为实验室目前保藏的所有植物病原真菌, 抑菌结果显示工程菌对 3 种真菌的菌丝生长抑制效果较野生菌株有明显提高, 其中辣椒疫霉最为明显, 说明这 3 种真菌对几丁质酶比较敏感。而

核盘菌(油菜菌核病菌)对实验的 2 株 Bt 菌都相当敏感, 其菌丝生长几乎完全被抑制, 工程菌并未显示出优势。该结果说明不同真菌菌株对各种类型的抑菌物质的敏感程度有一定差异。另一方面也证明野生菌 Bt519-1 含有除几丁质酶外的其他抑菌物质。近期我们对该菌株抑真菌物质进行了初步研究, 结果表明, 发酵液中含有的粗蛋白及脂肽类物质有较强的抑菌作用。目前已报道的脂肽类抑菌物质大多发现于其它芽胞杆菌中, 而苏云金芽胞杆菌中为数



不多。

疫病是辣椒的一种毁灭性土传病害，在全世界蔬菜产区造成辣椒减产，甚至大面积绝收，该病也是我国辣椒生产的重大病害之一。基于抑真菌谱测试结果，我们选择辣椒疫霉病进行室内盆栽的应用评价试验。从药效的持久性方面，一般来讲生物农药都远远不如化学农药，这是生物活性物质的特点，从盆栽实验中可以证明工程菌株的防效明显比野生菌持续时间长。此外，我们也进行了油菜菌核病的室内盆栽试验，结果显示野生菌与工程菌对此真菌病害的抑制效果相当，与抑真菌谱测试结果相吻合，因此，抑真菌谱测试结果对盆栽材料选择有一定的指导意义。

研究工作中我们系统地检测了野生菌和工程菌各种杀虫晶体蛋白合成量的差异。从培养 14 h 开始，每 2 h 取样一次直至 24 h，进行杀虫晶体蛋白的提取和 SDS-PAGE 检测(结果略)。实验发现两个菌株 80 kD 和 60 kD 的杀虫晶体蛋白合成量相同，而工程菌 130 kD 左右杀虫晶体蛋白的表达量略有降低。可能原因是异源几丁质酶的高表达会竞争利用细胞内能量和资源，造成晶体蛋白表达的减少。但是生物测定结果显示，工程菌对棉铃虫的毒力活性也是不低的，推测应该是过量表达的几丁质酶起到了杀虫增效作用，进而弥补了晶体蛋白的损失。本研究获得的工程菌中的 pDM 质粒含有抗性基因，若田间使用会产生环境压力，故进一步计划将其抗性基因敲除，以便该菌株的安全应用。

## 参 考 文 献

- [1] Crickmore N. The spore—past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 101(3): 616-619
- [2] Guo R. Extension, application and developmental strategies of biopesticides in China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(1):124-127 (in Chinese)  
郭荣. 我国生物农药的推广应用现状及发展策略[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(1):124-127
- [3] Reda RA, Noha AS, Ghanim NM. Improving efficacy of *Bacillus thuringiensis* against insects of different feeding habits by plasmid transfer technique of chitinase[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2014, 24(1): 37-44
- [4] Liu D, Cai J, Xie CC, et al. Purification and characterization of a 36kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri* and its biocontrol potentials[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(3): 252-256
- [5] Marrone PG, Denise C, Manker SD, et al. Strain of *Bacillus* for controlling plant disease: United States, No. 6077506[P]. 2000
- [6] Moar WJ. Antifungal *Bacillus thuringiensis* strains: United States, No. 6280722[P]. 2001-08-28
- [7] Zhou Y, Choi YL, Sun M, et al. Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant disease[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2008, 80(4): 563-572
- [8] Chen YH, Luo Y, Xie CC, et al. Deletion mutant promoter and its application in expressing protein constitutively: China, ZL 201210408862.9[P]. 2013-12-18 (in Chinese)  
陈月华, 罗洋, 谢池楚, 等. 缺失突变的 *chiB* 启动子及其组成型表达蛋白的应用: 中国, ZL 201210408862.9[P]. 2013-12-18
- [9] Chen YH, Han MM, Cai J, et al. *Bacillus thuringiensis* strain against crop pathogens and pests and its application: China, ZL 200810052439.3[P]. 2010-03-24 (in Chinese)  
陈月华, 韩苗苗, 蔡峻, 等. 一株杀虫、抑真菌的苏云金芽孢杆菌菌株及其应用: 中国, ZL 200810052439.3[P]. 2010-03-24
- [10] Driss F, Rouis S, Azzouz H, et al. Integration of a recombinant chitinase into *Bacillus thuringiensis* parasporal insecticidal crystal[J]. Current Microbiology, 2011, 62(1): 281-288
- [11] Hu SB, Zhang X, Li YS, et al. Constructing *Bacillus thuringiensis* strain that co-expresses Cry2Aa and chitinase[J]. Biotechnology Letters, 2013, 35(7): 1045-1051
- [12] Li PF, Luo Y, Xie CC, et al. Construction and characteristic of a constitutive expression *chi* of engineered Bt strains[J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 891-900 (in Chinese)  
李蓬飞, 罗洋, 谢池楚, 等. 组成型表达 *chi* 基因的 Bt 工程菌株构建及其特性[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 891-900
- [13] Xie CC, Luo Y, Chen YH, et al. Construction of a promoter-probe vector for *Bacillus thuringiensis*: the identification of *cis*-acting elements of the *chiA* locus[J]. Current Microbiology, 2012, 64(5): 492-500
- [14] Xiao L, Cai J, Lin ZJ, et al. Identification and characteristics of a chitinase-produced *Bacillus* strain MY75[J]. Journal of Biotechnology, 2008, 136(S): 609-610
- [15] Yang XN, Han J, Zhao LJ, et al. Sensitivity of *Botrytis cinerea* strain to quaternary ammonium cationic surfactants[J]. Agrochemicals research and application, 2010(5): 24-26 (in Chinese)  
杨晓楠, 韩君, 赵丽静, 等. 季铵盐阳离子表面活性剂对三种灰葡萄孢菌的敏感性测定[J]. 农药研究与应用, 2010(5): 24-26
- [16] Luo DX, Gong ZH, Li DW, et al. Study on molecular identification technology of pepper resistance to *Phytophthora Blight*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2008, 17(5): 76-80 (in Chinese)  
罗德旭, 巩振辉, 李大伟. 辣椒疫病抗病性分子鉴定技术研究[J]. 西北农业学报, 2008, 17(5): 76-80
- [17] Peng HX, Liu BW, Li W. Biological characteristic and identification method of pepper resistance to *Phytophthora capsici* in Sichuan[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2005, 20(1): 140-145 (in Chinese)  
彭化贤, 刘波微, 李薇. 四川辣椒疫霉菌生物学特性和辣椒抗疫病菌鉴定方法初探[J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(1): 140-145
- [18] Zhong LS, Xie TJ, Wu JX, et al. A study on bioassay for toxicity of *Bacillus thuringiensis* preparations using cotton bollworm as test insect[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1990, 6(S): 1-5 (in Chinese)  
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[J]. 生物防治通报, 1990, 6(增刊): 1-5