

一株对玉米螟高毒力的苏云金芽孢杆菌的鉴定及其杀虫活性

赵宇¹, 刘宏伟¹, 路杨¹, 王一平², 李娜²,
关宇², 张正坤¹, 杜茜¹

(1. 吉林省农业科学院/农业部东北作物有害生物综合治理重点实验室, 长春 130033;

2. 哈尔滨师范大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150025)

摘要: 从田间土壤中收集并分离获得野生菌株, 进行菌体、伴孢晶体形态学观察及分子生物学鉴定, 测定其对玉米螟及水稻二化螟的室内生物活性。结果表明, 该菌株革兰氏染色阳性, 产生的伴孢晶体形状多为不规则形。16S rDNA 序列与苏云金芽孢杆菌属的 BMB 171 同源性达 99%, 鉴定为苏云金芽孢杆菌, 命名为 JN002。该菌株对亚洲玉米螟具有较高毒力, 对水稻二化螟毒性不及玉米螟, 对黏虫几乎无毒力。该菌株是 1 株对亚洲玉米螟具有较强毒力的苏云金芽孢杆菌新菌株, 同时也具备防治水稻二化螟的潜力。

关键词: 玉米; 亚洲玉米螟; 水稻二化螟; 菌株鉴定; 微生物杀虫剂

中图分类号: S435.132

文献标识码: A

Identification and Toxicity Evaluation of A New *Bacillus thuringiensis* Strain

ZHAO Yu¹, LIU Hong-wei¹, LU Yang¹, WANG Yi-ping², LI Na²,

GUAN Yu², ZHANG Zheng-kun¹, DU Qian¹

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Key laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast Ministry of Agriculture, Changchun 130033;

2. College of Life Sciences and Technology, Harbin Normal University, Harbin 150025, China)

Abstract: A new wild strain was obtained from the experimental field by chessboard sampling method, its gram and parasporal crystals morphology and molecular biology identification were undertaken, furthermore, its biological activity against *O. furnacalis* and *Chilo suppressalis* were detected. The results showed that it was a gram-positive strain and produced irregular parasporal crystals mostly. The result of 16S rDNA analysis revealed that the strain was homologous to *B. thuringiensis* strain BMB 171 with 99% similarity. All these results suggested that the strain was a new member of *B. thuringiensis* and designated as *B. thuringiensis* JN002. It gave a high toxicity against *O. furnacalis*, and lower of that against *C. suppressalis*, while showed extremely low activity against *Mythimna separate*. It demonstrated that JN002 was a new strain for *O. furnacalis* control, and also was potential for *C. suppressalis* control.

Key words: Maize; *Ostrinia furnacalis* Guenée; *Chilo suppressalis*; Strain identification; Microbial pesticide

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一

种革兰氏阳性杆状细菌, 形成芽孢的同时会产生具有杀虫活性的伴孢晶体, 对多种害虫具有特异杀虫活性, 具有高效、安全及特异性强等特点^[1, 2], 已成为目前开发时间最长、产量最大、应用最广的生物杀虫剂^[3], 广泛应用于各种农业害虫等的防治^[4~7]。利用其毒力基因进行的转基因作物种质资源如棉花等已经在世界范围内种植^[8], 取得了巨大的经济、生态和社会效益。

为筛选和丰富生防微生物菌种资源, 本研究从试验田采集土样中分离到 1 株菌株进行鉴定, 测定

收稿日期: 2017-08-22

基金项目: 吉林省科技攻关计划重点科技攻关项目(20150204015NY)、吉林省农业科技创新工程重大项目(CXGC2017ZD006)

作者简介: 赵宇(1986), 男, 吉林公主岭人, 研究实习员, 从事生物防治研究。Tel: 13196271186

E-mail: 15844421155@163.com

刘宏伟同为本文第一作者。E-mail: lhw1979@163.com

张正坤和杜茜同为本文通讯作者。

其对东北地区主要作物害虫亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis* Guenée)和水稻二化螟(*Chilo suppressalis* Walker)的生物活性,为玉米螟和水稻二化螟等害虫的生物防治筛选具有潜在应用价值的生防新资源。

1 材料与方法

1.1 材料

土壤样品:采自吉林省农业科学院试验田。采用棋盘式采集法取土壤表层5 cm深处土壤5个点,每个点为50 g土样,装于自封袋内保存。

供试虫体:3龄亚洲玉米螟(*O. furnacalis* Guenée)、水稻二化螟(*C. suppressalis* Walker)和黏虫(*Mythimna separata*)均由吉林省农业微生物重点实验室提供。

LB液体培养基:蛋白胨1.0%、酵母粉0.5%、NaCl 1.0%、pH值7.0;LB固体培养基:LB液体培养基中添加1.5%琼脂;双倍酵母蛋白胨(2×yeast extract tryptone, 2×YT)培养基:酵母粉1%、蛋白胨1.6%、NaCl 1.6%。

1.2 方法

1.2.1 菌株的取样与分离

将土样从自封袋取出,置于室温通风处2 d以上,待水分自然蒸发。取0.5 g土样放入装有10 mL灭菌水和玻璃珠的试管中,漩涡振荡器振荡3 min,将土粒打碎后置于200 r/min摇床上振荡20 min,75℃水浴20 min,杀死样品中的非芽孢菌。待稍静置后,选取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释度,分别吸取100 μL菌悬液于2×YT平板上,涂布均匀,于30℃培养3 d。挑取似芽孢杆菌状菌落涂片,用石碳酸复红染色镜检。将检出菌株于LB平板上划线培养,4℃保存^[9]。

1.2.2 菌体形态鉴定及伴孢晶体的制备

挑取单菌落接种于pH值7.0的LB液体培养基中,于30℃、200 r/min摇床中震荡培养48 h后革兰氏染色,在光学显微镜下观察菌体形态、颜色及大小。

用无菌水将Bt固体培养物从培养皿上冲洗下来,用磁力搅拌器搅拌,除去泡沫,多次重复操作尽量除去孢子。对所得溶液进行超声波处理,将处理过的发酵液在4℃冰箱中放置24 h。将裂解得到的溶液于4℃、8 000 r/min下冷冻离心15 min后除去上清液,用无菌水洗涤沉淀,离心后用0.5 mol/L NaCl洗涤沉淀,得到的悬液继续离心沉淀10 min,去除上清液,向沉淀中加入1 mol/L NaCl+0.01% Triton X-100制成孢晶悬液,在0~4℃静置24 h。将静置后的悬浮液离心,溶于0.001 mol/L NaH_2PO_4 +0.4 mol/L NaCl+0.01% Triton X-100+2%甘油中,静置10 min,

离心,沉淀制成水悬液。水悬液在冰箱中冷冻过夜,然后放入冷冻干燥机中冷冻干燥即得伴孢晶体粉末^[10],并进行形态观察拍照。

1.2.3 菌株16S rDNA分析

经30℃培养3 d的菌液采用细菌基因组提取试剂盒提取基因组DNA。采用细菌16S rDNA的通用引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R:5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'。以提取的基因组DNA为模板进行PCR扩增,扩增条件参照孟鑫睿等,PCR产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测定的序列提交到BLAST数据库中,与GenBank中已知的16S rDNA序列进行同源性比较,选取同源性较高的序列采用Clustal X软件进行多重比对。应用MEGA 5.1以邻接法构建系统发育树。

1.2.4 菌株的室内生物活性测定

挑取单菌落接种于LB液体培养基中,于30℃、200 r/min摇床中震荡培养48 h,分别以10倍比例稀释成菌体浓度为 1.0×10^9 、 1.0×10^8 、 1.0×10^7 、 1.0×10^6 、 1.0×10^5 个/mL培养基,各取20 mL不同浓度菌液拌入20 g饲料中饲3龄喂亚洲玉米螟幼虫,待其取食完毕及时添加无菌新饲料,每个浓度3次重复,每次重复为30头幼虫,以无菌培养基为对照,26℃、相对湿度60%~70%条件下饲养,分别于24、48、72 h后调查幼虫死亡情况,并计算其死亡率和校正死亡率。死亡率=死虫数/试虫数 $\times 100\%$;校正死亡率=(处理组死虫头数-对照组死虫头数)/(30-对照组死虫头数) $\times 100\%$ 。采用上述相同处理方法,饲料拌入 1.0×10^9 个/mL浓度的菌液20 mL,室内测定其对3龄黏虫幼虫、3龄水稻二化螟幼虫的活性,比较分析该菌株对3种鳞翅目幼虫的致死作用。

1.3 数据处理与分析

利用DPS 12.50统计软件计算 LT_{50} 并分析该菌株对供试幼虫的致死作用,应用Duncan氏新复极差法进行不同处理下校正死亡率之间的差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 菌体形态特点

革兰氏染色结果显示该菌体呈紫色,革兰氏阳性,菌体杆状,长度约5 μm。将纯化得到的伴孢晶体在显微镜下观察可以看出该菌伴孢晶体形状多为不规则形(图1)。

2.2 菌株分子鉴定

16S rDNA PCR扩增片段大小为1 500 bp左右,

经测序其大小为 1 465 bp。将 16S rDNA 序列与 GenBank 中已发表的 16S rDNA 序列进行同源性比对发现,该菌株与苏云金芽孢杆菌 BMB171 菌株非

常相近,同源性达 99%(图 2),可初步认为该菌株在分类学上属于苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*),命名为 *B. thuringiensis* JN002。

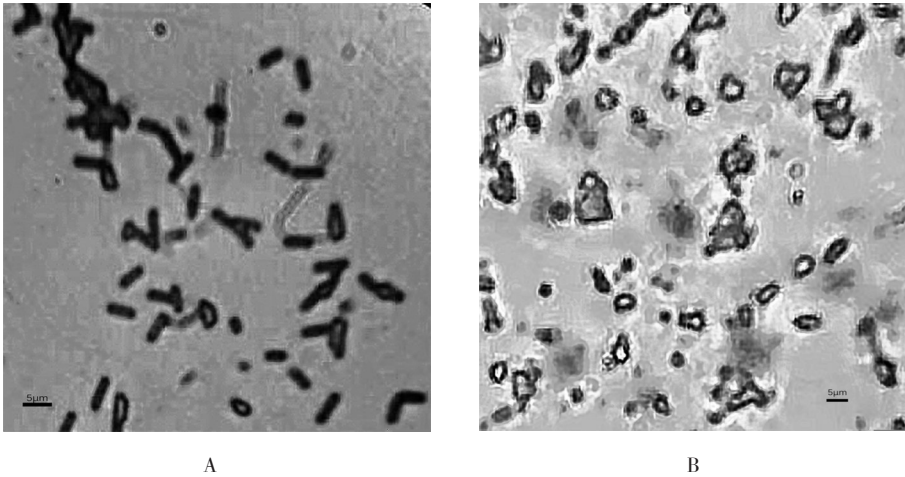


图1 菌体革兰氏染色(A)及伴孢晶体形态(B×1 000)
Fig.1 Gram stain(A) and parasporal crystal morphology(B×1 000) of thalline

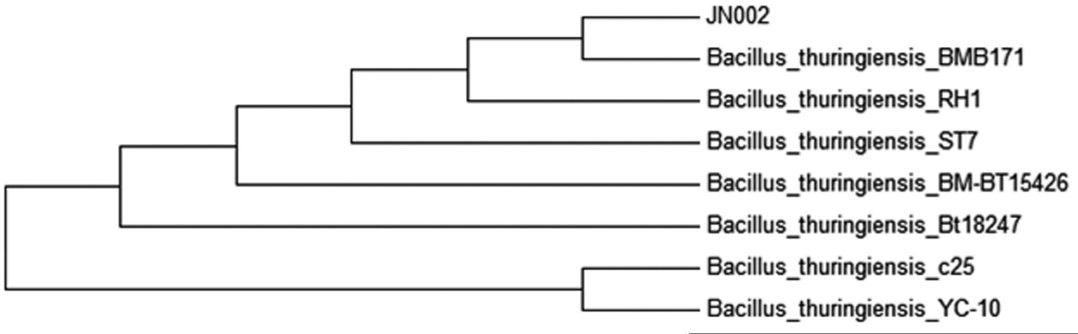


图2 菌株的 16S rDNA 同源性分析
Fig.2 16S rDNA sequence phylogenetic tree of the strain

2.3 室内生物活性测定

表1 菌株 JN001 对亚洲玉米螟 3 龄幼虫的致死作用

Table 1 Toxicity of JN001 strain against Asian corn borer larvae

浓度(个/mL) Concentration	校正死亡率(%) Adjusted mortality of 24h	48 h 校正死亡率(%) Adjusted mortality of 48h	72 h 校正死亡率(%) Adjusted mortality of 72h	LT ₅₀ (h)
1.0×10 ⁵	3.61±3.61 b	30.03±3.45 c	62.47±7.20 c	62.64
1.0×10 ⁶	5.12±3.36 ab	31.01±6.43 c	68.80±3.50 c	59.32
1.0×10 ⁷	10.94±3.65 ab	38.31±6.65 b	81.35±3.29 b	52.41
1.0×10 ⁸	11.34±5.80 ab	45.28±3.45 ab	83.05±6.91 b	50.30
1.0×10 ⁹	12.70±3.65 a	49.72±3.65 a	93.56±5.28 a	46.82

注:表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。
Note: Data were mean±SD. Different letters in the same column indicated significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

该菌株对亚洲玉米螟3龄幼虫表现出较高毒性,其校正死亡率随浓度的升高而增加, 1.0×10^9 个/mL 浓度时校正死亡率达 93.56%; 不同浓度菌液对亚洲玉米螟幼虫的致死时间不同,致死中时间(LT_{50})随浓度的升高而缩短,即浓度越高,死亡越快,在 1.0×10^9 个/mL 浓度时 LT_{50} 为 46.82 h(表 1)。在 $1.0 \times$

10^9 个/mL 浓度下菌液处理水稻二化螟幼虫时,其 LT_{50} 为 55.64 h(图 3), 1.0×10^9 个/mL 浓度的菌液处理黏虫幼虫 24、48 h 后,其校正死亡率分别均低于 10%, 72 h 仅为 19.63。表明该菌株对亚洲玉米螟的致死作用远高于水稻二化螟,该菌株对黏虫基本不具备毒力。

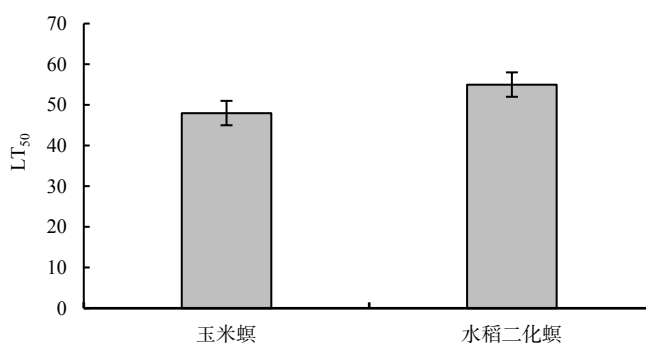


图3 菌株JN002对玉米螟幼虫及水稻二化螟幼虫 LT_{50} 比较

Fig.3 LT_{50} of the JN002 strain against *O. furnacalis* and *C. suppressalis*

3 结论与讨论

高效特异性杀虫微生物的筛选,特别是针对高效或专化性强的Bt菌株的筛选和产业化开发,是微生物杀虫剂研发的热点^[11]。近几年,国内很多学者分离到多种对不同害虫具有高毒力的Bt菌株,害虫种类包含了农业害虫及卫生害虫中的鳞翅目、鞘翅目、双翅目等^[12,13]。

我国东北地区是我国主要的商品粮基地,玉米和水稻是该地区主要作物。亚洲玉米螟和水稻二化螟是东北玉米和水稻主产区的最重要害虫,导致作物严重减产及品质下降,造成巨大的经济损失并危害食品安全。自2004年以来,吉林等省开展了利用微生物制剂球孢白僵菌防治亚洲玉米螟的工作,并于2016年开始进行水稻二化螟的生物防治工作,取得了良好的防治效果,在长期使用过程中也暴露出制剂单一、作用周期长、环境要求高、菌株易退化等问题。苏云金芽孢杆菌作为一种广谱性强、杀虫速度快、毒力高的生防微生物,在全世界范围内已得到广泛应用,筛选高毒力的苏云金芽孢杆菌与白僵菌联合防控玉米螟,能够加强生物防治资源多样化,解决单一应用白僵菌防治过程中存在的问题。

针对国家加快土地流转,进行集约化生产及病虫害绿色、可持续防控的农业发展方向,需要寻找更多的玉米螟生物防治资源,将其应用到亚洲玉米螟防治实践中,提高生物防治的持续效果。东北地区自然环境中存在丰富的苏云金芽孢杆菌菌种资源。本

研究从玉米田中筛选到1株Bt菌株,对其进行生物学特性研究及分子鉴定,相比本实验室筛选到的JN001菌株,发现其同样对亚洲玉米螟幼虫具有高毒力,且该菌株对水稻二化螟具有一定的毒力,与JN001相似,该菌株对黏虫毒力不明显。因此,该菌株可作为为玉米螟防治中新的生防菌株,也可应用于水稻二化螟防治。

参考文献:

- [1] Bravo A, Gómez I, Porta H, et al. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity[J]. Microbial Biotechnology, 2013, 6(1): 17–26.
- [2] Diego H. Sauka, Graciela B. Benintende. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina[J]. Rev. Argent Microbiol, 2017, 49(3): 273–281.
- [3] Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, et al. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide[J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2011, 41(7): 423–431.
- [4] Melisa P. Pérez, Diego H. Sauka, María I. Onco, Marcelo F. Berretta, Graciela B. Benintende. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to cotton boll weevil(*Anthonomus grandis*, Coleoptera: Curculionidae) larvae[J]. Rev Argent Microbiol. 2017, 49(3): 264–272.
- [5] 李青,刘华梅,丁咏梅,等. 几株具有杀虫特异性的苏云金芽孢杆菌菌株的生物活性及杀虫蛋白基因型的鉴定[J]. 现代农业科学, 2009, 16(4): 9–11, 18.
- [6] Li Q, Liu H M, Ding Y M, et al. Insecticidal activity and cry gene identification of several *Bacillus thuringiensis* strains[J]. Modern Agricultural Sciences, 2009, 16(4): 9–11, 18. (in Chinese)
- [7] 张灵玲,关怡,黄勤清,等. 武夷山土壤中分离的Bt杀蚊新菌株[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2008, 15(2): 82–85.
- [8] Zhang L L, Guan Y, Huang Q Q, et al. New mosquito cidal Bt

- strain isolated from the soil of WUYI mountain[J]. *Acta Parasitologica et Medica Entomologica Sinica*, 2008, 15(2): 82–85. (in Chinese)
- [7] 束长龙, 谷少华, 窦黎明, 等. 对小地老虎具有杀虫毒力的苏云金芽孢杆菌菌株的分离及鉴定[J]. *植物保护*, 2007, 33(5): 41–44.
- Shu C L, Gu S H, Dou L M, et al. Isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Agrotis ypsilon* [J]. *Plant Protection*, 2007, 33(5): 41–44. (in Chinese)
- [8] Wu K, Y. Lu, H. Feng, Y. Jiang, and J. Zhao. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton[J]. *Science*, 2008, 321(5896): 1676–1678.
- [9] 孟鑫睿, 路 杨, 刘艳微, 等. 苏云金芽孢杆菌一新菌株的鉴定及其杀虫活性[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(3): 410–417.
- Meng X R, Lu Y, Liu Y, et al. Identification and toxicity evaluation of a new *Bacillus thuringiensis* strain[J]. *Journal of Plant Protection*, 2015, 42(3): 410–417.
- [10] 王子佳, 李红梅, 弓爱君, 等. 苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的制备[J]. *化学与生物工程*, 2009, 26(9): 56–58.
- Wang Z J, Li H M, Gong A J, et al. Preparation of crystal protein from *Bacillus thuringiensis*[J]. *Chemistry & Bioengineering*, 2009, 26(9): 56–58. (in Chinese)
- [11] 谭芙蓉, 郑爱萍, 周华强, 等. 一株对鳞翅目高毒力的苏云金芽孢杆菌亚种的分离与鉴定[J]. *四川农业大学学报*, 2006, 24(2): 152–155.
- Tan F R, Zheng A P, Zhou H Q, et al. Isolation and identification of one *Bacillus thuringiensis* subsp. highly toxic to Lepidoptera[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2006, 24(2): 152–155. (in Chinese)
- [12] 董 明, 杜立新, 王容燕, 等. 一株对美国白蛾高毒力苏云金芽孢杆菌的杀虫基因鉴定[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(3): 242–244.
- Dong M, Du L X, Wang R Y, et al. Characterization of one *Bacillus thuringiensis* strain highly toxic to *Hyphantria cunea*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(3): 242–244. (in Chinese)
- [13] 胡晓婷, 宋 健, 王容燕, 等. 对铜绿丽金龟幼虫有活性的苏云金芽孢杆菌菌株的分离及鉴定[J]. *华北农学报*, 2008, 23(6): 81–83.
- Hu X T, Song J, Wang R Y, Du L X, et al. Isolation and identification of *Bacillus thuringiensis* strains toxic to *Scarabaeoidae* larvae [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2008, 23(6): 81–83. (in Chinese)

(责任编辑:姜媛媛)