

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2016.01.011

苏云金芽胞杆菌的鉴定及对椰子织蛾的致死作用

孙晓东^{1,2}, 阎伟¹, 李朝绪¹, 刘丽¹, 覃伟权^{1*}
¹中国热带农业科学院椰子研究所, 海南文昌 571339;
²东北农业大学生命科学学院, 黑龙江哈尔滨 150030

摘要:【背景】利用采集到的样品分离出苏云金芽胞杆菌菌株, 针对椰子织蛾幼虫进行室内生物活性测定, 以期获得对椰子织蛾幼虫具有高毒力菌株, 并为椰子织蛾的生物防控提供理论和技术依据, 同时为转 *Bt* 基因作物提供新的基因资源。【方法】在海南岛椰子织蛾潜在分布区采集样品, 利用温度法筛选苏云金芽胞杆菌并进行形态学和分子生物学鉴定, 采用浸叶法进行 *Bt* 菌株对椰子织蛾幼虫的生物活性测定。【结果】海南省保亭县土壤样品中筛选出 8 株菌株, 电子显微镜下观察到该批菌株含有菱形、球形、方形晶体; 通过分子生物学鉴定明确了 6 株菌株含有 *cry* 基因, 2 株没有鉴定出 *cry* 基因; 利用相同浓度菌悬液对椰子织蛾幼虫进行了生物活性测定, 结果表明, 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BAT10 菌株杀虫晶体蛋白对椰子织蛾幼虫的致死率达 100%, 同样浓度的 29-15-4 与 BAT20 菌株杀虫晶体蛋白对椰子织蛾幼虫的致死率超过 80%, 其余 5 株 *Bt* 的杀虫晶体蛋白致死率较低, 致死率小于 50%。【结论与意义】本试验筛选出 1 株高毒力菌株和 2 株效果较好的 *Bt* 菌株, 可应用于椰子织蛾的生物防控。

关键词: *Bt*; 椰子织蛾; 鉴定; 生物活性

Identification of *Bacillus thuringiensis* and insect activity against *Opisina arenosella* Walker

Xiao-dong SUN^{1,2}, Wei YAN¹, Chao-xu LI¹, Li LIU¹, Wei-quan QIN^{1*}

¹Coconut Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wenchang, Hainan 571339, China;

²College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China

Abstract: 【Background】The biological activity of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) strains collected from soil samples was tested against *Opisina arenosella* Walker, in order to obtain high insect activity strains that may help control the species. The second objective of this study was to provide new genetic resources for transgenic plant of *Bt* that could be more resistant to this species. 【Method】Soil samples were collected from different areas of Hainan Province potentially suitable for *O. arenosella*. The temperature screening method was used to isolate *Bt* strains, which were then identified based on their morphology and molecular biology. The toxicity of *Bt* strains to larvae of *O. arenosella* was tested by leaf immersion bioassay method. 【Result】Eight *Bt* isolates were obtained from Baoting soil samples, Hainan Province. The 8 *Bt* isolates included bipyrimal crystal, spherical crystal, square crystal types. PCR-RFLP analysis showed that *Cry1*, *cry1I* and *cry2* type genes were present in these isolates, but the *cry* gene-types of two isolates were unknown. The toxicity of the extracted insecticidal crystal proteins (ICP) of the 8 strains against larvae of *O. arenosella* was assayed. The results indicated that the use of ICP of BAT10 (50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) resulted in 100% mortality of the larvae. ICP of 29-15-4 and BAT20 resulted in more than 80% mortality while the ICP of the other five strains showed less than 50% mortality. 【Conclusion and significance】This study showed that effective *Bt* strains could be found in soil potentially suitable to *O. arenosella* and among them, two strains had the potential to be used as biological control against this species.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; *Opisina arenosella* Walker; identification; bioactivity

收稿日期 (Received): 2015-05-09 接受日期 (Accepted): 2015-06-21

基金项目: 海南省重大项目 (ZDZX2013008); 海南省重点项目 (ZDXM20130049、ZDXM20130004); 海南省基金 (311091); 中国热带农业科学院基本科研业务费 (1630041014002)

作者简介: 孙晓东, 男, 博士研究生, 助理研究员。研究方向: 棕榈植物病虫害防治。E-mail: sxd1949@163.com.

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: qwq268@163.com

椰子织蛾 *Opisina arenosella* Walker 属鳞翅目 Lepidoptera 织蛾科 Qecophoridae, 英文名 coconut black-headed caterpillar, 又称椰子木蛾、黑头履带虫、椰柱蛾、食叶履带虫等, 主要分布于斯里兰卡、印度孟加拉、缅甸、印度尼西亚、巴基斯坦、泰国、马来西亚等地 (武怀恒等, 2014; Venkatesan *et al.*, 2009)。椰子织蛾幼虫取食叶片, 严重时入侵啃食整个树冠, 导致植株发育缓慢, 果实产量大幅减少。对椰子织蛾进行有害生物风险分析, 结果显示, 其属于高风险有害生物, 在我国多地易定殖 (阎伟等, 2013), 对我国的椰子、槟榔、蒲葵、中海枣、大王棕等棕榈作物 (刘向蕊等, 2014a) 威胁很大, 在我国具有严重的生态与经济危害性。

苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 是一种目前世界上应用最为广泛的微生物杀虫剂, 由于其高效、低毒、安全、经济, 是最具发展潜力的微生物杀虫剂。目前已发现的大多数 *Bt* 菌株均能产生多种类型的晶体蛋白, 对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等多种昆虫, 以及线虫、螨类和原生动物等具有特异性的杀虫活性 (蔡吉林等, 2013)。*Bt* 作为生防菌中最重要的一种, 在使用上有着靶标性强、对人类和牲畜不会造成毒害以及环境友好型的特点, 但是由于转 *Bt* 基因作物在全球的推广与种植, 使很

多靶标害虫产生了不同程度的抗性 (崔树松等, 2013; Gassmann *et al.*, 2014)。

目前, 针对椰子织蛾的生态学 (刘向蕊等, 2014b)、生物学鉴定 (李后魂等, 2014)、化学防控 (Shivashankar *et al.*, 2000)、天敌寄生蜂防控 (Venkatesan *et al.*, 2003) 等相关方面已有研究, 尚未见到利用 *Bt* 防控椰子织蛾的相关研究与报道。本文利用在椰子织蛾入侵风险区采集的样品并分离出的 *Bt* 菌株针对椰子织蛾幼虫进行室内生物活性测定, 以期获得对椰子织蛾幼虫具有高毒力的菌株, 为椰子织蛾的生物防控提供理论和技术依据, 同时为转 *Bt* 基因作物提供新的基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基 LB 固体与液体培养基、1/2 LB 固体与液体培养基, 培养基配制方法参见 Sambrook *et al.* (1989)。

1.1.2 菌株 8 株 *Bt* 菌株分离自海南省保亭县土壤样品, 菌株 HD73 为中国农业科学院植物保护研究所赠送。

1.1.3 引物序列 参见表 1。

表 1 鉴定引物及序列
Table 1 Primer sequences

引物 Primer	序列 Sequences		来源 Source
<i>cry1</i>	5'-AGGACCAGGATTACAGGAGG-3'	5'-GCTGTGACACGAAGGATATAGCCAC-3'	苏旭东, 2005
<i>cry1I</i>	5'-GCTGTCTACCATGATTGCTTG-3'	5'-CAGTGCAGTAACCTTCTCTTGC-3'	宋福平等, 1998
<i>cry2</i>	5'-GGAAGAACTACTATTTGTGATGC-3'	5'-AATAGTTTGAATTACCGCGAGC-3'	宋福平等, 1998
<i>cry3</i>	5'-CGAACAATCGAAGTGAACATGATAC-3'	5'-CATCTGTTGTTTCTGGAGGCAAT-3'	苏旭东, 2005
<i>cry4</i>	5'-GTGTCAAGAGAACCAACAGTATG-3'	5'-ACTAAGTCTCCTCCTGTATGACCAG-3'	本试验 This research
<i>cry5</i>	5'-ATTGGAGGTGCTATTGCTGATAC-3'	5'-ATAAGATGAAGACAGTGCTGCTGGTGG-3'	本试验 This research
<i>cry6</i>	5'-CAACAAATCCTAGCAATGGTC-3'	5'-TAGAGAGTGGAACGACTTTACC-3'	本试验 This research
<i>cry7</i>	5'-GGATATGAAGATAGTAATAGAAC-3'	5'-GCTGTAGCATGACATAATCGATG-3'	本试验 This research
<i>cry8</i>	5'-CGGCAAACCTTAGTAGAATGC-3'	5'-CTGACTGATTCCACCATCAGC-3'	束长龙等, 2007
<i>cry9</i>	5'-AGGACCAGGATTACAGGAGG-3'	5'-CCCAATGCGAAAGAACTAAG-3'	本试验 This research
<i>cry10</i>	5'-CGATGGATAACAATCCGAAAATCCA-3'	5'-TACGACTTATTCTCCATAAGGAGTA-3'	本试验 This research

1.1.4 主要试剂 *Taq* 酶、限制性内切酶、PMD19-T 载体、JM109 感受态细胞、凝胶回收试剂盒均购自 Takara 公司; Byeotime 公司的 BAC 蛋白浓度定量试剂盒 (增强型)。

1.2 方法

1.2.1 *Bt* 扫描电镜样品的制备 分离纯化的 *Bt* 菌

株在 1/2 LB 固体培养基平板上划线, 置 30 ℃ 下培养 48 h, 在无菌工作台上刮取少许菌苔, 纯水清洗后再加入适当纯水充分悬浮, 将砸碎的细小碎片浸润在悬浮液中 2 min 后取出, 低温冷冻干燥后备用。

1.2.2 *Bt* 质粒的提取与鉴定 分离纯化后的 *Bt* 菌株在液体 LB 中 (230 r · min⁻¹、30 ℃) 培养 12 h, 采用 Narva *et al.* (1991) 的方法提取质粒。采用

PCR-RFLP 方法鉴定杀虫晶体蛋白基因,提取 *Bt* 菌株的质粒 DNA 进行 *cry1*、*cry2*、*cry3*、*cry4*、*cry5*、*cry6*、*cry7*、*cry8*、*cry9*、*cry10* 类基因的 PCR-RFLP 鉴定,鉴定引物参见表 1,鉴定方法参见宋福平等(1998)及苏旭东(2005)。

1.2.3 *Bt* 菌悬液所含蛋白的定量 先接种 1/2 LB 固体培养基至菌体裂解(30 ℃ 恒温,48 h);无菌操作刮取菌体,然后使用灭菌去离子水制备成菌悬浮液,使用 Byeotime BAC 蛋白浓度定量试剂盒(增强型)进行菌悬浮液的蛋白浓度定量。

1.2.4 *cry* 基因的克隆 使用凝胶回收试剂盒将 PCR 产物进行回收并纯化,纯化后的产物按照目的片段与 pMD19-T 载体 1 : 3 的比例 16 ℃ 连接 3 h,取 10 μL 连接产物加入到 100 μL JM109 感受态细胞中进行热激转化,具体转化方法参见束长龙等(2007)。转化完成后挑取阳性克隆在上海生工公司进行核酸测序。

1.2.5 杀虫活性测定 采用浸叶法(刘楠等,2010)。椰子织蛾幼虫为本实验室饲养,BAT-10 的

蛋白溶液设置为 40 μg · mL⁻¹。将椰子叶片用清水洗净晾干,选取鲜嫩一致的叶片切成 15 cm 的段状,在各个浓度的混合均匀的蛋白溶液(含 0.1%吐温-80)中浸泡 5 min,晾干,放入生测瓶中,每瓶接 4 龄幼虫 30 头,每个处理重复 3 次,28 ℃ 生化培养箱中保温,培养 72 h 后调查死、活虫数,并观察幼虫取食情况。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与形态鉴定

菌株在 1/2 LB 培养基上培养 48 h 后形成单菌落,菌落乳白色,圆形或近圆形,边缘整齐,菌落中间较厚,向四周逐渐变薄。扫描电镜下观察到菌株菌体为长杆状,芽孢为长圆棒状,晶体有菱形、球形、方形等形状(图 1),其中菌株 BAT10、BAT20、1-11、BAT7、BAT17、8-12 的伴孢晶体为菱形,29-15-4 晶体为球形,BAT35 晶体为菱形和方形,初步鉴定为苏云金芽胞杆菌。

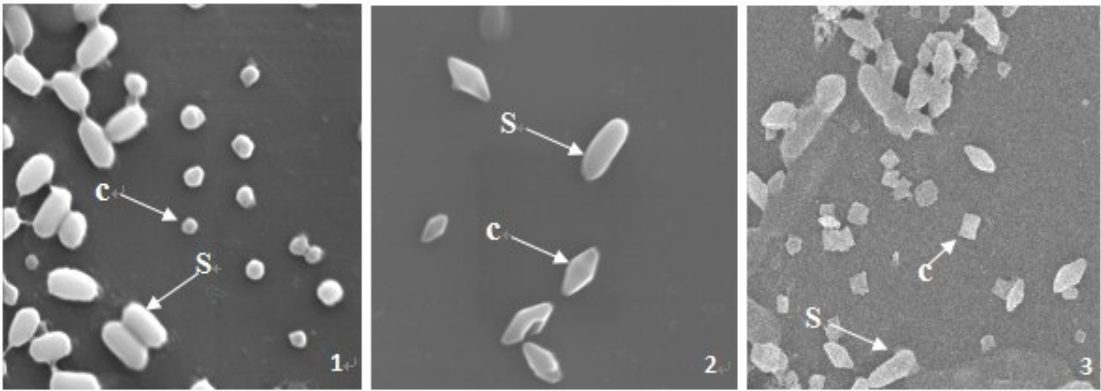


图 1 *Bt* 菌株的扫描电镜图片

Fig.1 The SEM photo of *Bt*

1:球形晶体; 2:菱形晶体; 3:方形晶体; S:芽孢; C:伴孢晶体。

1: Spherical crystal; 2: Diamond crystal; 3: Square crystal; S: Spore; C: Crystal.

2.2 分子水平的鉴定

分别提取 *Bt* 菌株的质粒 DNA 并以表 1 中 *cry* 基因鉴定引物进行 *cry* 基因的鉴定,PCR 扩增产物经凝胶回收试剂盒(Takara)纯化后连接 T 载体(Takara)进行克隆,挑取阳性单克隆送样上海生工进行测序,具体结果见表 2,其中 6 株含有 *cry* 基因,2 株没有鉴定出已知基因型。结果表明,BAT10、BAT20、1-11、BAT7、BAT17 同时含有 *cry1*、*cry1I*、*cry2* 类的基因;菌株 29-15-4 只含有 *cry8* 类的基因;BAT35 和 8-12 未鉴定出已知基因型。菌株基因型

的多样性与土壤状况、样品海拔无明显规律性。

2.3 *Bt* 菌株对椰子织蛾的毒力

生物测定结果显示,8 株菌株对椰子织蛾 4 龄幼虫具有一定的杀虫活性,具体结果见表 3。其中,菌株 BAT10 对椰子织蛾幼虫的校正致死率达 100%,与对照及其他菌株有显著差异,杀虫效果最显著;菌株 BAT20 与菌株 29-15-4 校正致死率为 80%~90%,2 株菌株间差异不显著,杀虫效果较显著;8-12、BAT7、BAT35、BAT17、1-11 校正致死率低于 50%,杀虫效果不显著。

表 2 *Bt* 菌株 *cry* 基因型鉴定
Table 2 Indentify of *cry* genes

样品 Strain	土样海拔 Elevation (m)	分离土壤状况 Soil conditions	晶体类型 Crystal type	基因型 Gene type
BAT10	56.1	黄土 Yellow soil	菱形 Pyramid	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Gb</i> , <i>cry1Ia</i> , <i>cry2Af</i>
BAT20	71.3	棕红土 Red brown soil	菱形 Pyramid	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ba</i> , <i>cry1Ia</i> , <i>cry2Aa</i>
29-15-4	12.4	棕红土 Red brown soil	球形 Spherical	<i>cry8Aa</i>
8-12	49.2	黄土 Yellow soil	菱形 Pyramid	—
1-11	43.5	黄土 Yellow soil	菱形 Pyramid	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ia</i> , <i>cry2Ad</i>
BAT7	7.3	棕红土 Red brown soil	菱形 Pyramid	<i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ba</i> , <i>cry1Ia</i> , <i>cry2Ad</i>
BAT35	13.2	棕红土 Red brown soil	菱形/方形 Pyramid/square	—
BAT17	15.1	棕红土 Red brown soil	菱形 Pyramid	<i>cry1Da</i> , <i>cry1Ia</i> , <i>cry2Aa</i>
HD73(+)				<i>cry1Ac</i>

(+) 阳性对照;苏云金芽孢杆菌库斯塔克亚种标准菌株 HD73。
(+) Positive control; *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD73.

表 3 *Bt* 菌株对椰子织蛾的杀虫活性 (72 h)
Table 3 Activity of *Bt* against *Opisina arenosella* Walker

样品 Strain	浓度 Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	校正死亡率 Corrected mortality (%)	标准误差 SE	$\alpha=0.05$
BAT10	50	100.0	0.0	a
BAT20	50	85.6	2.9	b
29-15-4	50	83.3	1.9	b
8-12	50	40.2	1.9	c
1-11	50	18.4	2.6	d
BAT7	50	5.6	4.0	e
BAT35	50	3.8	4.4	e
BAT17	50	4.3	3.1	e
CK		0.0	0.0	

不同英文字母表示差异显著 ($P<0.05$)。
Letters denote significant differences among strains ($P<0.05$) .

3 讨论

本文采用 PCR-RFLP 法对 8 株菌株进行了 *cry* 基因鉴定,但是有 2 株未鉴定出 *cry* 基因,不过在光学显微镜下可以确定其产生晶体,推测原因可能是菌株含有的 *cry* 基因的序列比较新,现有的鉴定引物尚不能发现其基因型,因此需要通过更多的克隆方法来明确其菌株内的基因型。

迄今为止,我国对苏云金芽孢杆菌的研究主要针对农业害虫,如倪万潮等(1998)在 20 世纪 90 年代研发并推广的转 *Bt* 基因抗虫棉,可用来防控农业害虫棉铃虫,朱勋等(2011)发现了对小菜蛾高毒力的 *Bt* 菌株。另外,*Bt* 在大田应用方面也取得了良好的生态效益和经济效益,而在林业害虫的防治和研究方面相对缓慢,将 *Bt* 菌株应用到防治林业害虫椰子织蛾的研究还未见相关报道,离市场化还有很大的差距。

本试验通过 *Bt* 菌株对椰子织蛾幼虫的生物活

性测定筛选出 1 株高毒力菌株和 2 株效果较好的 *Bt* 菌株,下一步将把这几株菌株进行大规模的发酵培养并研发 *Bt* 粉剂与油剂,在进行科学的田间试验后逐步推向市场,这将会大大提高我国对椰子织蛾的防控效果,促进林业害虫的生物防治技术的稳步发展。

参考文献

蔡吉林,束长龙,宋福平,黄勃,张杰,2013. 对小菜蛾协同增效的 *cry1* 和 *cry9* 类蛋白组合的筛选. 植物保护, 39 (1): 66-70.
崔树松,仪登霞,杨丽梅,方智远,刘玉梅,庄木,张扬勇,孙培田,2013. *cry1Ac* 青花菜对小菜蛾的抗性和产卵行为的影响. 中国蔬菜 (16): 43-48.
李后魂,尹艾芸,蔡波,李伟东,卢兆山,2014. 重要入侵害虫——椰子木蛾的分类地位和形态特征研究(鳞翅目,木蛾科). 应用昆虫学报, 51(1): 283-291.
刘楠,王少丽,宋福平,束长龙,高继国,张杰,2010.

cry1Ba3、cry1Ia8 蛋白对 *cry1Ac* 抗性小菜蛾的杀虫活性研究. 植物保护, 36(2): 66–70.

刘向蕊, 吕宝乾, 金启安, 温海波, 李朝绪, 阎伟, 彭正强, 冯雨艳, 李晓飞, 2014a. 新入侵害虫椰子织蛾飞行能力测定. 热带作物学报, 35(8): 1610–1614.

刘向蕊, 吕宝乾, 金启安, 温海波, 阎伟, 彭正强, 冯雨艳, 方旭元, 2014b. 5 种杀虫剂对入侵害虫椰子织蛾的室内毒力测定. 生物安全学报, 23(1): 13–17.

倪万潮, 张震林, 郭三堆, 1998. 转基因抗虫棉的培育. 中国农业科学, 31(2): 8–13.

宋福平, 张杰, 黄大昉, 谢天健, 杨自文, 戴莲韵, 李国勋, 1998. 苏云金芽胞杆菌 *cry* 基因 PCR-RFLP 鉴定体系的建立. 中国农业科学, 31(3): 13–18.

束长龙, 谷少华, 窦黎明, 陆琼, 张杰, 张永军, 赵虎基, 宋福平, 2007. 对小地老虎具有杀虫毒力的苏云金芽胞杆菌菌株的分离及鉴定. 植物保护, 33(5): 41–44.

苏旭东, 2005. 苏云金芽胞杆菌菌株的分离和 *cry* 基因的鉴定. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学.

武怀恒, 万鹏, 黄民松, 2014. 毒力回归计算方法及相应软件使用介绍. 安徽农业科学 (27): 9335–9338.

阎伟, 吕宝乾, 李洪, 李朝绪, 刘丽, 覃伟权, 彭正强, 骆有庆, 2013. 椰子织蛾传入中国及其海南省的风险性分析. 生物安全学报, 22(3): 163–168.

朱勋, 吴青君, 张友军, 刘春光, 刘岩林, 余亚军, 景伟, 薛原, 杨峰山, 2011. 小菜蛾高效 *Bt* 菌株的分离、生化特性及基因型鉴定. 应用昆虫学报, 48(2): 285–290.

Gassmann A J, Petzold-Maxwell J L and Clifton E H, 2014. Field-evolved resistance by western corn rootworm to multiple *Bacillus thuringiensis* toxins in transgenic maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14): 5141–5146.

Narva K E, Payne J M and Schwab G E, 1991. *Novel Bacillus thuringiensis Microbes Active Against Nematodes and Genes Encoding Novel Nematodes Active Toxins Cloned From Bt Isolates*. EP 0462721A2.

Sambrook J, Fritsch E F and Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Shivashankar T, Annadurai R S, Srinivas M, Preethi G, Sharada T B, Paramashivappa R, Rao A S, Prabhu K S, Ramadoss C S, Veeresh G K and Rao P V S, 2000. Control of coconut black-headed caterpillar (*Opisina arenosella* Walker) by systemic application of ‘Soluneem’ — A new water-soluble neem insecticide formulation. *Current Science*, 78(2): 176–179.

Venkatesan T, Jalali S K, Srinivasa Murthy K, Rabindra R J and Rao N S, 2003. A novel method of field release of *Goniozus nephantidis* (Muesebeck), an important primary parasitoid of *Opisina arenosella* Walker on coconut. *Journal of Biological Control*, 17(1): 79–80.

Venkatesan T, Kumar Jalali S and Srinivasa K, 2009. Competitive interactions between *Goniozus nephantidis* and *Bracon brevicornis*, parasitoids of the coconut pest *Opisina arenosella*. *International Journal of Pest Management*, 55(3): 257–263.

(责任编辑:郭莹)