

对大黑鳃金龟甲幼虫高效的苏云金芽胞杆菌 筛选及 *cry* 基因鉴定

王小奇¹ 束长龙¹ 蒋 健¹ 张凤娇¹ 刘春琴² 张 杰^{1*}

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 河北省沧州市农林科学院, 沧州 061001)

摘要: 为获得对大黑鳃金龟甲幼虫具有较高杀虫活性的菌株, 利用拌土法测定了本实验室分离的 500 株苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 对大黑鳃金龟甲的杀虫活性, 建立 Bt 菌株比较鉴别技术来进行多样性分析, 并对菌株的晶体形态及幼虫感染 Bt 后的中肠组织切片进行观察。结果显示, 从 500 株 Bt 菌株中筛选到 42 株对大黑鳃金龟甲幼虫具有不同程度活性的菌株, 分属于 14 个菌株类型; 其中有 10 株校正死亡率大于 60%, 261-1 菌株杀虫活性最高, 7 d 校正死亡率达 100%。从 14 个菌株类型中各选取 1 个代表菌株进行基因鉴定, 仅 P65-1、1126-1、FCD114 和 78-2 菌株分别含有 *cry8Ma*、*cry8Ca*、*cry8Ab*、*cry8Ga*、*cry8Ea* 共 5 个 *cry8* 类新基因, 其它 10 个菌株均不含 *cry3*、*cry8*、*cry18*、*cry23*、*cry37*、*cry43* 等对鞘翅目害虫有效的杀虫基因。14 个菌株中, 78-3、127-2 和 1198-1 菌株能产生双锥体型晶体, 261-1、FCD114、P65-1、FTL84、78-2 和 1126-1 菌株能产生球形晶体。幼虫感染 261-1、1198-1、FCD114、1126-1、QDL40-2 菌株后, 中肠组织发生明显的病理变化: 2 d 时肠壁细胞明显出现空洞化, 排列疏松, 4 d 时受到严重破坏并脱离底膜。表明筛选到的 Bt 菌株具有防治大黑鳃金龟甲幼虫的潜力。

关键词: 苏云金芽胞杆菌; 多样性分析; 大黑鳃金龟甲; *cry8* 基因; 组织病理

Screening and identification of *cry* genes from *Bacillus thuringiensis* isolates highly toxic to the larvae of *Holotrichia oblita*

Wang Xiaoyi¹ Shu Changlong¹ Jiang Jian¹ Zhang Fengjiao¹ Liu Chunqin² Zhang Jie^{1*}

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Cangzhou Academy of Agricultural and

Forestry Sciences, Cangzhou 061001, Hebei Province, China)

Abstract: In order to obtain *Bacillus thuringiensis* (Bt) isolates with higher insecticidal activity for the larvae of *Holotrichia oblita*, 500 Bt isolates in the laboratory were investigated; the diversity analysis method was developed, and the crystal shapes were observed in Bt isolates. Furthermore, the histopathological changes were observed in the midgut of *H. oblita* larvae infected by a mixture of crystals and spores produced by tested isolates by using histopathological slice. The results showed that 42 isolates were found toxic to larvae of this pest, and these isolates were classified into 14 different types, of which ten isolates had a corrected mortality of over 60%, and the isolate 261-1 had the highest toxicity reaching 100% in seven days after infection. One isolate was selected from each type of isolates to identify *cry* genes. The results indicated that four isolates, P65-1, 1126-1, FCD114 and 78-2, contained five novel

cry8 genes, i. e. *cry8Ma*, *cry8Ca*, *cry8Ab*, *cry8Ga* and *cry8Ea*, and the other ten isolates, including the isolate 261-1, did not contain *cry* genes toxic to *H. obliqua* larvae, such as *cry3*, *cry8*, *cry18*, *cry23*, *cry37* and *cry43*. Three isolates, 78-3, 127-2 and 1198-1, contained double pyramid-shaped crystals, and spherical crystals were observed in six isolates, 261-1, FCD114, P65-1, FTL84, 78-2 and 1126-1. Isolates 261-1, 1198-1, FCD114, 1126-1 and QDL40-2 could cause obvious histopathological changes in larval midgut. The midgut cells became loose arrangement and appeared with obvious vacuolization, and were seriously damaged and even deviated from the membrane. The Bt isolates screened in this study may have applications in biological control of *H. obliqua* larvae.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; diversity analysis; *Holotrichia obliqua*; *cry8*; histopathology

大黑鳃金龟甲 *Holotrichia obliqua* 属鞘翅目金龟总科,是我国东北、华北和黄淮海等地区主要地下害虫,其幼虫(蛴螬)为害植物地下部分,成虫取食植物地上部分(魏鸿钧等,1989),给我国农业生产造成巨大的经济损失。由于大黑鳃金龟甲趋光性较弱、栖居于地下、为害时间长以及卵分批产于土中的特点,传统的化学防治方法难以取得理想的效果(陈建明等,2004)。因此,亟需探索和建立新的防治技术和方法。

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种已被广泛用于农业害虫防治的昆虫病原细菌,随着芽孢的形成,在其一端或两端形成具有不同形态的伴胞晶体,即杀虫蛋白晶体,它主要是由 *cry* 或 *cyt* 基因编码(Schnepf et al., 1998; Bravo et al., 2011)。目前,国内外围绕 Bt 开展对地下害虫蛴螬防治技术的研究已有 20 余年,发现对蛴螬有活性的 Bt 基因有 *cry3* (Kurt et al., 2005)、*cry8* (Shu et al., 2007)、*cry23*、*cry37* (Donovan et al., 2000)、*cry43* (Yokoyama et al., 2004) 等,其中研究最多的是 *cry8* 类基因。2000 年,我国开始开展对蛴螬有效的 Bt 菌株筛选与杀虫基因发掘工作,如冯书亮等(2000)和 Shu et al. (2009a) 分别在国内筛选出对铜绿丽金龟甲 *Anomala corpulenta* 和大黑鳃金龟甲有活性的菌株 HBF-1 和 HBF18。随后 Shu et al. (2009b) 从 HBF18 菌株中克隆出 *cry8Ga1* 基因。Zhang et al. (2013) 也筛选出对大黑鳃金龟甲有活性的菌株 B-JJX, 并从中克隆出 *cry8Ab1* 基因。

近年来,随着高通量测序技术的更新换代,加快了杀虫基因克隆的速度(Ibrahim et al., 2010)。本实验室利用基因组高通量测序方法从 Bt 菌株 HBF18 中发现并克隆了对大黑鳃金龟甲等 3 种金龟子幼虫均具有高活性的 *cry8-like*、*vip1Ad* 和 *vip2Ag* 三种新基因(Bi et al., 2015)。在菌株基因组高通量测序之前,首先必须对供试菌株进行比较、鉴别,

去除冗余菌株,以免造成资金、人力、物力的巨大浪费。现有的菌株比较鉴别技术操作繁琐,且通量极低,难以对大量菌株进行准确分析。因此,鉴别、去除冗余菌株成为 Bt 杀虫基因发掘的一项重要工作。束长龙(2013)建立了新的菌株多样性分析技术,利用该技术对 888 株 Bt 菌株进行了多样性分析,去除了冗余菌株,获得了可用于高通量测序的 Bt 菌株 640 个。针对我国农业生产中大黑鳃金龟甲防治的重要需求,本研究从自主分离的 Bt 菌株对大黑鳃金龟甲幼虫的毒力测定入手,对筛选获得的高毒力菌株进行鉴定比较,去除冗余菌株;并在此基础上对所得筛选菌株的杀虫基因进行鉴定,以期为高效杀虫基因的分离克隆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:500 株供试 Bt 菌株为本实验室分离、筛选并保存;对照菌株中 HBF1 和 HBF18 由河北省农林科学院植物保护研究所提供, Bt185 和 BtSU4 为本实验室分离、筛选所得,其中, HBF1 菌株含有 *cry8Ca2* 基因, HBF18 菌株含有 *cry8Ga1*、*cry8like*、*vip1Ad* 和 *vip2Ag* 基因, Bt185 菌株含有 *cry8Ea1* 和 *cry8Fa1* 基因, BtSU4 菌株含有 *cry8Ha1* 和 *cry8Ia1* 基因。Bt 标准菌株中 HD73、HD12、T10A001、HD224、HD516、HBF-1、T03B001、T22001、HD11、Bti 菌株由美国俄亥俄州立大学的芽胞杆菌遗传资源保藏中心提供, Y41 和 FB 菌株为本实验室分离、筛选所得。Bt 标准菌株 HD73 的无晶体突变株 HD73⁻ 为本实验室构建并保存。

供试昆虫:华北大黑鳃金龟甲幼虫由河北省沧州市农林科学院植物保护研究所提供。从田间采集到成虫后,用新鲜的榆树叶片为饲料,雌雄配对在室内进行人工饲养。温度为 25℃、相对湿度为 16% ~ 18%、光周期为 12 L:12 D。成虫产卵后,将卵置于

相对湿度为 18% ~ 20% 的土壤中进行孵育。孵化出来的幼虫用萌发的小麦种子在土中饲养。

培养基: LB (Luria-Bertani) 培养基: 1% 胰蛋白胨、0.5% 酵母粉、1% NaCl、1.3% 琼脂, pH 7.0, 121℃ 灭菌 20 min。

试剂: 抗生素购自美国 Amresco 公司; *Taq* Mix 聚合酶购自中国 BioMed 公司; PCR 产物回收试剂盒、质粒提取试剂盒、酶切纯化回收试剂盒购自美国 Axygen 公司; 限制性内切酶、连接试剂盒和 DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司和加拿大 Fermentas 公司; 蛋白 Marker 购自美国 Bio-Rad 公司; PCR 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

仪器: S-4800 扫描电子显微镜, 日本 Hitachi 公司; CX21 显微镜, 日本 Olympus 公司; Thermocycler PCR 仪, 德国 Biometra 公司; 新 JY300C 核酸电泳仪, 北京君意东方电泳设备有限公司; Mini Protein III 蛋白电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; GelDoc-It® 凝胶成像系统, 天美(中国)科学仪器有限公司; SPX 智能型人工气候箱, 宁波江南仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 Bt 菌株室内杀虫活性的测定

大黑鳃金龟甲幼虫室内杀虫活性测定参照茅洁瑜等(2011)方法进行。Bt 菌株接种于 1/2 LB 固体培养基上培养至 50% 以上菌体裂解, 刮取菌体悬浮于 10 mL 灭菌超纯水中, 将干燥马铃薯丝浸泡于菌悬液中 20 min 后, 连同菌悬液一起倒入经暴晒后的 100 g 土中, 搅拌均匀后, 分装于 6 孔生测板内, 每孔接 1 头试虫。以 5 ~ 7 日龄的健康、个体均匀的大黑鳃金龟甲幼虫作为试虫, 每处理 20 头, 重复 3 次, 设清水为空白对照。在人工气候箱中饲养, 温度 26℃、相对湿度 70%、光周期 12 L: 12 D, 分别在 7 d 和 14 d 后观察死亡和存活幼虫数量, 计算校正死亡率。利用针头刺激虫体, 无任何反应的视为死亡, 反之则为存活幼虫。校正死亡率 = (处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照死亡率) × 100%。

1.2.2 Bt 菌株的多样性分析

根据 Bt 菌株室内杀虫活性测定结果, 提取具有杀虫活性的 Bt 菌株基因组作为菌株多样性分析的模板, 设置已明确基因类型及其功能的 Bt 菌株 HBF18、Bt185、BtSU4、HBF1 为对照, Bt 基因组 DNA 的提取参考 Shu et al. (2013) 的方法。Bt 菌株在 LB 固体培养基中 30℃ 培养 15 h, 收集菌体约 100 mg 于 1.5 mL 离心管中, 加入 100 μL 混有溶菌酶的缓冲液(1 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris-HCl、1 mol/L

蔗糖, pH 7.0), 混匀, 37℃ 孵育 30 min, 加入细胞裂解液(1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0) 和 Tris 饱和酚轻轻混匀, 65℃ 孵育 1 h, 再加入 300 μL 氯仿, 混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 加入等体积的异丙醇, -20℃ 静置 20 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次, 最后溶于 200 μL 无菌水中。

根据现有杀虫基因序列, 通过聚类分析, 针对 Bt 蛋白中最大的一类杀虫蛋白(具有 3 个结构域的杀虫晶体蛋白)中最保守的 Block1 和 Block5, 设计可以扩增多个基因家族的通用引物, 设计上游简并引物 Fcon_1f: 5'-CTCGTAGACTGCGTACCATATGCWCAAGC-WGCCAATYTWCATYTT-3' 和下游简并引物 Fcon_5r: 3'-GACGATGAGTCCTGAGGRATAAATTC AATTYKRT CWA-3'。并利用 FastPCR 软件(<http://primerdigital.com/fastpcr.html>)进行模拟扩增来对引物的扩增效率进行评估。

30 μL PCR 反应体系: 2 × PCR Mixture 15 μL、0.1 μmol/L 上下游引物各 1 μL、DNA 模板 1 μL、超纯水 12 μL。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 38℃ 变性 2 min, 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 *Hinf* I 酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 Bt 菌株晶体的观察

根据 1.2.2 多样性分析结果, 并结合菌株对大黑鳃金龟甲幼虫的杀虫活性数据, 在每种类型的菌株中选取杀虫活性最高的作为代表菌株进行进一步鉴定。将选取的 Bt 代表菌株的胞晶混合液涂于载玻片上, 烘干固定, 石炭酸复红染液染色 30 s, 清水冲洗, 晾干后 100 倍油镜进行观察。胞晶混合液滴于盖玻片上, 涂抹均匀, 干燥, 将盖玻片粘在载物台上, 送往中国科学院植物保护研究所标本馆进行离子溅射喷金, 并进行晶体扫描电镜的观察和拍照。

1.2.4 Bt 菌株杀虫晶体蛋白的分析

选取的上述 Bt 代表菌株中杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析参照萨姆布鲁克和拉塞尔(2002)的方法进行。120 V 预电泳约 10 min, 取蛋白样品 40 μL, 加入 10 μL 5 × 加样缓冲液, 混匀, 再将上清和沉淀分别梯度稀释, 煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 10 μL 上清点样。80 V 恒压电泳至样品浓缩呈直线, 150 V 恒压电泳至指示的溴酚蓝到达凝胶底部。

1.2.5 Bt 菌株杀虫晶体蛋白基因的鉴定

本研究通过 *cry8* 类通用引物对菌株的 *cry8* 类基因进行鉴定, *cry8* 类通用引物参照 Yu et al.

(2006) 的方法设计合成; *cry3*、*cry23*、*cry18*、*cry37*、*cry43* 类基因的通用引物根据目前已公布的基因序列通过聚类分析设计合成(表 1)。

表 1 本研究中通用引物的设计与 PCR 扩增片段大小

Table 1 The general primers designed and the sizes of PCR amplification fragments in this study

基因类型 Gene type	引物序列 Primer sequence	PCR 产物大小 PCR product size (bp)
<i>cry3</i>	3F:GGGAGGAAGAAAAATGAATCC	1 530
	3R:GTCTACACTTCTATGTGTCCAAGT	
<i>cry8</i>	Sn3un8:GTCCAAATAATCAAAATGAATATG	2 100
	Sn5un8:CGTTTTCCTCTTTCACCTGCATC	
<i>cry18</i>	18F:CTCCAATAGATAACAAT	1 750
	18R:AAATTTTGAA CCATTGTCT	
<i>cry23</i>	23F:ATGGGAATTATTAATATCCAAG	810
	23R:GTTATTGGTG TCGAGCGACC	
<i>cry37</i>	37F:ATGACAGTATATAACGCAAC	390
	37R:TTATGCTGGA GTCAAGG	
<i>cry43</i>	43F:CCGCAACGTATGCAAATCATTG	1 800
	43R:TTGCATCGATCAAATTCACCGC	

1.2.6 大黑鳃金龟甲幼虫中肠病理切片观察

将选取的上述 Bt 代表菌株接种于 LB 平板,在 30℃ 恒温培养箱中培养至晶体产生,收集菌体即 Bt 胞晶混合物悬浮于 10 mL 灭菌 ddH₂O 中,通过 Bradford 法进行总蛋白定量。在 6 孔板中,每个孔中加入 2.5 g 灭菌后的 1.5% 固体琼脂颗粒及 Bt 胞晶混合物,终浓度为 10 μg/g 琼脂,阴性对照组分别为不含 Bt 和加入无晶体突变株 HD73⁻ 的处理,阳性对照组为加有对照菌株 HBF18 胞晶混合物的处理。每个处理 10 头大黑鳃金龟甲 2 龄幼虫,每处理 3 次重复。取处理后第 2 天和第 4 天的大黑鳃金龟甲幼虫,在解剖镜下解剖虫体,取出中肠,浸入

2.5%、pH 7.4 的戊二醛固定液中,室温固定 2~4 h。送武汉谷歌生物科技有限公司进行切片制作,并于光学显微镜下进行病理学观察。

2 结果与分析

2.1 对大黑鳃金龟甲幼虫有活性的 Bt 菌株

依据 500 株 Bt 菌株杀虫活性测定结果,接种 14 d 后,共筛选到 42 株菌株对大黑鳃金龟甲幼虫校正死亡率 ≥ 30%,其中校正死亡率达到 100% 的菌株仅有 1 株,为 261-1 菌株,校正死亡率达到 60% 以上的菌株有 10 株,其余菌株的校正死亡率在 30%~60% 之间(表 2)。

表 2 Bt 菌株对大黑鳃金龟甲幼虫杀虫活性的筛选统计结果

Table 2 Results of insecticidal activity of Bt isolates against *Holotrichia obliqua* larvae %

菌株 Isolate	校正死亡率 Corrected mortality		菌株 Isolate	校正死亡率 Corrected mortality	
	7 d	14 d		7 d	14 d
261-1	100.00	100.00	B8D6	23.33	40.00
1126-1	60.00	86.67	78-2	11.90	38.09
P65-1	60.00	83.33	QDL40-2	30.00	36.67
397-1	50.00	73.33	D2	10.00	36.67
78-3	30.00	73.33	C9	10.00	36.67
S12B4	30.00	70.00	QC6	36.67	36.67
S4F12	20.00	66.67	QC11	20.00	36.67
S10C6	43.33	60.00	PS8D1	23.33	36.67
S3B11	36.67	60.00	B8E2	26.67	36.67
S6D4	46.67	60.00	B8C9	13.33	36.67
FCD32	36.67	56.67	QDL47-1	11.90	33.33
FBN112	20.00	56.67	1198-1	16.67	33.33

续表 2 Continued

菌株 Isolate	校正死亡率 Corrected mortality		菌株 Isolate	校正死亡率 Corrected mortality	
	7 d	14 d		7 d	14 d
S10F10	23. 33	53. 33	S10A2	13. 33	33. 33
FCD114	40. 00	53. 33	C2	20. 00	33. 33
FTL84	30. 00	50. 00	C8	16. 67	33. 33
B8E12	10. 00	46. 67	B8E11	13. 33	33. 33
1126-3	16. 67	43. 33	QDD15-3	23. 33	30. 00
PS8B10	36. 67	43. 33	FSD14-1	23. 33	30. 00
127-2	13. 33	43. 33	405-3	10. 00	30. 00
B8F2	13. 33	43. 33	D5	10. 00	30. 00
FCD118	23. 33	40. 00	E2	30. 00	30. 00

2.2 Bt 菌株的多样性分析

引物模拟扩增结果显示,简并引物对 Fcon_1f 和 Fcon_5r 能够扩增 *cry1*、*cry3*、*cry4*、*cry7*、*cry8*、*cry9*、*cry17*、*cry19*、*cry20*、*cry21*、*cry24*、*cry25*、*cry27*、*cry28*、*cry29*、*cry30*、*cry32*、*cry38*、*cry40*、*cry41*、*cry42*、*cry43*、*cry44*、*cry47*、*cry48*、*cry50*、*cry52*、*cry53*、*cry54*、*cry57*、*cry59*、*cry61*、*cry67* 共 33 个基因家族,比较广泛,可用于菌株杀虫基因多样性的检测。进一步选取了 12 株典型的含有 *cry1*、*cry3*、*cry4*、*cry8*、*cry9*、*cry10*、*cry11*、*cry30*、*cry40*、*cry50* 等基因的菌株对该兼并引物进行测试,结果显示均可以检测到预期扩增条带(图 1),表明该引物对可用于 Bt 菌株的检测。

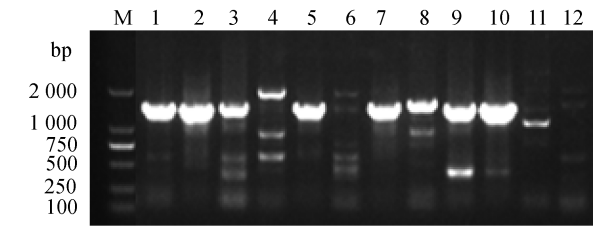


图 1 简并引物 Fcon_1f/Fcon_5r 的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of the degenerate primers Fcon_1f/Fcon_5r

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1 ~ 12: 分别为菌株 HD73、HD12、T10A001、HD224、HD516、HBF-1、T03B001、T22001、Y41、FB、HD11 和 Bti。M: DNA marker DL2000; 1 ~ 12: amplification of HD73, HD12, T10A001, HD224, HD516, HBF-1, T03B001, T22001, Y41, FB, HD11, and Bti, respectively.

利用设计的引物 Fcon_1f 和 Fcon_5r 对 42 株对大黑鳃金龟甲幼虫有活性的菌株进行扩增,发现有 33 个菌株获得预期大小的扩增条带,其余菌株无此扩增条带。对这 33 个菌株和 4 个对照菌株获得预期大小的扩增条带进一步酶切、电泳分析显示,除对照菌株的 4 个类型外,待测 33 个菌株共分为 14 个

类型(图 2);其中,菌株 397-1 和 S10C6 与对照菌株 HBF18 带型相同;菌株 C9 和 QC10 与对照菌株 Bt185 带型相同;没有发现与菌株 BtSU4 和 HBF1 带型相同的菌株;有 5 个类型包含多个菌株;菌株 QDL47-1、261-1、78-3、1198-1、S10A2、B8E12、QDL40-2、FCD114、B8E11 类型各只有 1 株。结合对大黑鳃金龟甲的杀虫活性,在 14 种菌株类型中分别选 1 株代表性菌株 1126-1、P65-1、QDL47-1、261-1、FTL84、78-2、127-2、78-3、1198-1、S10A2、B8E12、QDL40-2、FCD114、B8E11 进行进一步的鉴定。

2.3 Bt 菌株的杀虫蛋白晶体形态

对选择的 14 株代表菌株首先进行普通光学显微镜观察,QDL47-1、QDL40-2、B8E11、B8E12 和 S10A2 五个菌株没有观察到晶体存在,而其它 9 个菌株有典型的晶体存在。将这 9 个菌株样品进行扫描电子显微镜观察,78-3、127-2 和 1198-1 菌株能产生双锥体型晶体;261-1、FCD114、P65-1、FTL84、78-2 和 1126-1 菌株能产生球形晶体(图 3)。

2.4 Bt 菌株杀虫晶体蛋白的 SDS-PAGE 分析

14 株代表菌株表达蛋白的 SDS-PAGE 分析结果显示,P65-1、1126-1、127-2、78-3、261-1、FCD114、1198-1 和 78-2 菌株能表达典型的约 130 kD 的 Bt Cry 蛋白,QDL47-1 和 B8E11 菌株表达了约 97 kD 的蛋白,其余菌株表达了少量 60 kD 的蛋白(图 4)。

2.5 Bt 菌株中杀虫晶体蛋白基因的鉴定

利用 *cry3*、*cry8*、*cry18*、*cry23*、*cry37*、*cry43* 的保守引物对 14 株代表菌株的鉴定结果显示,从 P65-1、1126-1、FCD114 和 78-2 菌株中可以扩增到 2.1 kb 的 *cry8* 类基因目的片段;而所有供试菌株中均无 *cry3*、*cry18*、*cry23*、*cry37*、*cry43* 的目的片段扩增出来。进一步 PCR-RFLP 结果显示(图 5),P65-1、1126-1、FCD114、78-2 等菌株酶切带型与已知菌株不同。分别对上述扩增片段克隆测序,序列比对分析结果显

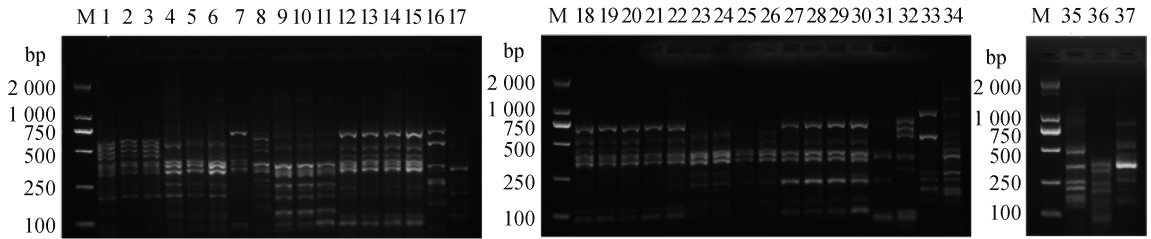


图 2 37 个 Bt 菌株 PCR 产物经 *Hinf* I 消化后的 PCR-RFLP 图谱

Fig. 2 Analysis of PCR-RFLP products of the 37 Bt isolates digested with *Hinf* I

M: DNA marker DL2000; 1 ~ 37: HBF18、397-1、S10C6、Bt185、C9、QC10、HBF1、BtSU4、1126-1、1126-3、B8C9、P65-1、B8F2、QC6、B8E2、QDL47-1、261-1、C2、C8、FCD118、E2、FTL84、D5、QC11、78-2、D2、127-2、405-3、FSD14-1、C13B11、78-3、1198-1、S10A2、B8E12、QDL40-2、FCD114 和 B8E12; 1 ~ 3: 类型 I; 4 ~ 6: 类型 II; 7: 类型 III; 8: 类型 IV; 9 ~ 11: 类型 V; 12 ~ 15: 类型 VI; 16: 类型 VII; 17: 类型 VIII; 18 ~ 22: 类型 IX; 23 ~ 26: 类型 X; 27 ~ 30: 类型 XI; 31: 类型 XII; 32: 类型 XIII; 33: 类型 XIV; 34: 类型 XV; 35: 类型 XVI; 36: 类型 XVII; 37: 类型 XVIII。M: DNA marker DL2000; 1 ~ 37: HBF18、397-1、S10C6、Bt185、C9、QC10、HBF1、BtSU4、1126-1、1126-3、B8C9、P65-1、B8F2、QC6、B8E2、QDL47-1、261-1、C2、C8、FCD118、E2、FTL84、D5、QC11、78-2、D2、127-2、405-3、FSD14-1、C13B11、78-3、1198-1、S10A2、B8E12、QDL40-2、FCD114, and B8E12, respectively; 1 ~ 3: type I; 4 ~ 6: type II; 7: type III; 8: type IV; 9 ~ 11: type V; 12 ~ 15: type VI; 16: type VII; 17: type VIII; 18 ~ 22: type IX; 23 ~ 26: type X; 27 ~ 30: type XI; 31: type XII; 32: type XIII; 33: type XIV; 34: type XV; 35: type XVI; 36: type XVII; 37: type XVIII.

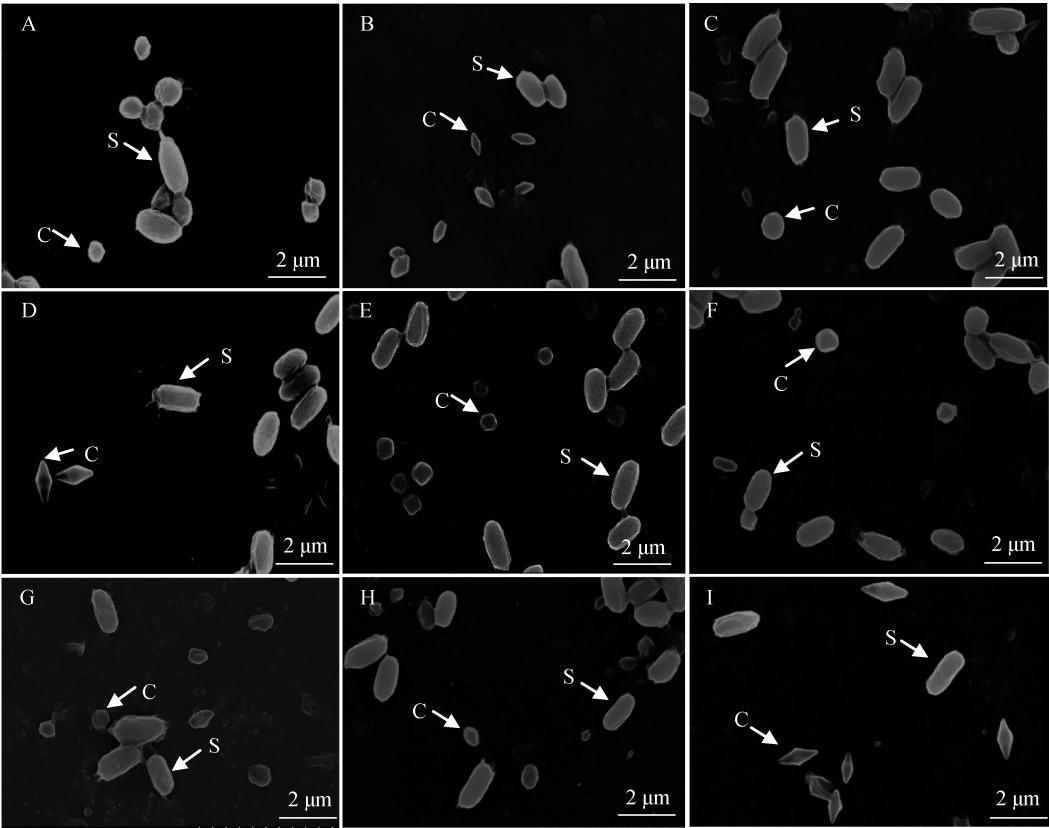


图 3 Bt 菌株芽孢和晶体形态的扫描电镜观察结果

Fig. 3 Observation of Bt isolates under scanning electron microscope

S: 芽孢; C: 晶体; A ~ I: 分别为 78-1、1198-1、FTL84、78-3、261-1、FCD114、P65-1、1126-1 及 127-2 菌株。S: Spores; C: crystal; A ~ I: 78-1, 1198-1, FTL84, 78-3, 261-1, FCD114, P65-1, 1126-1, and 127-2 isolates, respectively.

示, P65-1 菌株扩增出 1 个基因, 与 Cry8Ma1 相似性 最高, 氨基酸序列一致性为 94%; 78-2 菌株扩增出 2

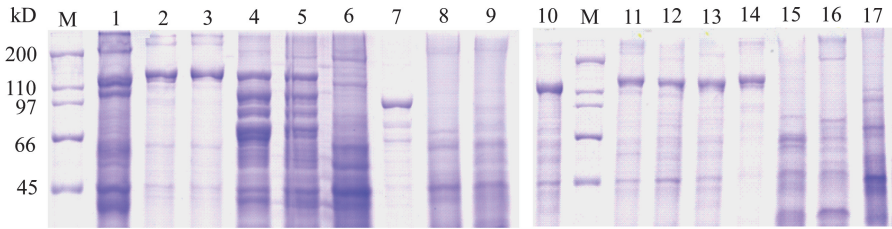


图 4 Bt 代表菌株杀虫晶体蛋白表达的 SDS-PAGE 分析结果

Fig.4 SDS-PAGE analysis of crystal proteins from Bt representative isolates

M: 蛋白质分子量标准; 1 ~ 17: 分别为菌株 HBF18、P65-1、1126-1、127-2、78-3、261-1、QD147、S10A2、B8E12、Bt185、SU4、FCD11、78-2、1198-1、FTL84、QDL40、B8E11 的晶体蛋白。M: Protein marker; 1 - 17: expressed crystal proteins of HBF18, P65-1, 1126-1, 127-2, 78-3, 261-1, QD147, S10A2, B8E12, Bt185, SU4, FCD11, 78-2, 1198-1, FTL84, QDL40 and B8E11 isolates, respectively.

个基因,分别与 *Cry8Ca2* 和 *Cry8Ab1* 相似性最高,氨基酸序列一致性分别为 99% 和 79%;FCD114 菌株扩增出 2 个基因,分别与 *Cry8Ga3* 和 *Cry8Ea1* 相似性最高,氨基酸序列一致性分别为 99% 和 79%;1126-1 菌株扩增出 2 个基因,分别与 *Cry8Ga3* 和 *Cry8Ea1* 相似性最高,氨基酸序列一致性分别为 97% 和 89%。表明这 4 个菌株中分别含有第 3 或者第 4 等级的新的 *cry8* 基因。

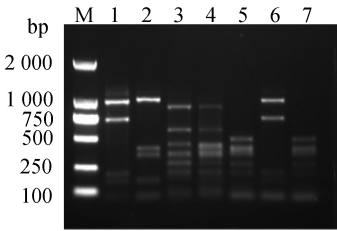


图 5 Bt 菌株 *cry8* 类基因的 PCR-RFLP 图谱分析

Fig.5 PCR-RFLP patterns of *cry8*-type genes from Bt isolates

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1 ~ 7: 分别表示菌株 HBF18、SU4、BT185、78-2、FCD114、P65-1、1126-1 的 PCR 产物经 *Hinf* I 酶切后的电泳图谱。M: DNA marker DL2000; 1 - 7: the products of HBF18, SU4, BT185, 78-2, FCD114, P65-1, and 1126-1 digested with *Hinf* I.

2.6 大黑鳃金龟甲幼虫中肠病理切片观察

大黑鳃金龟甲幼虫中肠切片病理学观察结果显示,未经 Bt 侵染的对照组幼虫中肠肠壁细胞致密、整齐,分布均匀(图 6-A、B)。用对大黑鳃金龟甲幼虫有活性的 HBF18 菌株处理的幼虫,2 d 后其中肠肠壁细胞排列疏松,细胞明显出现空洞化(图 6-C);4 d 后肠壁细胞受到严重破坏,并脱离底膜(图 6-D)。无晶体突变株 HD73⁻处理组,幼虫中肠肠壁细胞也排列整齐致密(图 6-E、F)。菌株 261(图 6-G)、1198-1(图 6-H)和 1126-1(图 6-I)侵染 2 d 后,幼虫

中肠肠壁细胞排列较整齐,但细胞明显变形,并出现少量空洞,而菌株 FCD114(图 6-J)和 QDL40-2(图 6-K)侵染 2 d 后,幼虫中肠肠壁细胞就开始排列疏松,细胞变形严重,并出现较多空洞。侵染 4 d 后,菌株 261(图 6-L)、1198-1(图 6-M)、FCD114(图 6-N)、1126-1(图 6-O)和 QDL40-2(图 6-P)均能引起幼虫中肠肠壁细胞严重变形,出现大量空洞,菌株 261(图 6-L)甚至引起肠壁细胞严重破坏,排列杂乱,无法辨认细胞形态,并脱离底膜,连同细胞内含物向肠腔内移动。而其它菌株 P65-1、127-2、78-3、QDL47-1、S10A2、B8E12、78-2、FTL84、B8E11 侵染幼虫后则未观测到明显的病变。

3 讨论

蛴螬食性杂、生活环境多样、适应性强,是国内外公认的难以防治的地下害虫(刘树森等,2008)。由于目前对大黑鳃金龟甲幼虫有活性的菌株资源相对较少,为此,本研究以对大黑鳃金龟甲高效的 Bt 菌株为主要筛选目标,从实验室分离的 500 株 Bt 菌株中,筛选到 42 株对大黑鳃金龟甲幼虫有活性的菌株,其中校正死亡率(14 d)在 60% 以上的有 10 株。这些菌株丰富了我国对蛴螬有效的 Bt 菌株资源,为高效杀虫基因的发掘和利用提供了材料,并为新的 Bt 杀虫剂和转基因抗虫植物研发奠定了基础。

对具有应用价值的杀虫基因发掘并进行专利保护已经成为目前 Bt 资源发掘的一个重要目的。截止到 2015 年 12 月,世界上已报道的 Bt 杀虫晶体蛋白基因已达 816 个(Crickmore et al., 2015)(http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt)。从已公布的杀虫基因克隆分布来看,Bt 资源地域性差别不明显,国家间很难利用资源地域性进行竞争。因此,Bt 资源竞争的核心就是提高 Bt 资源

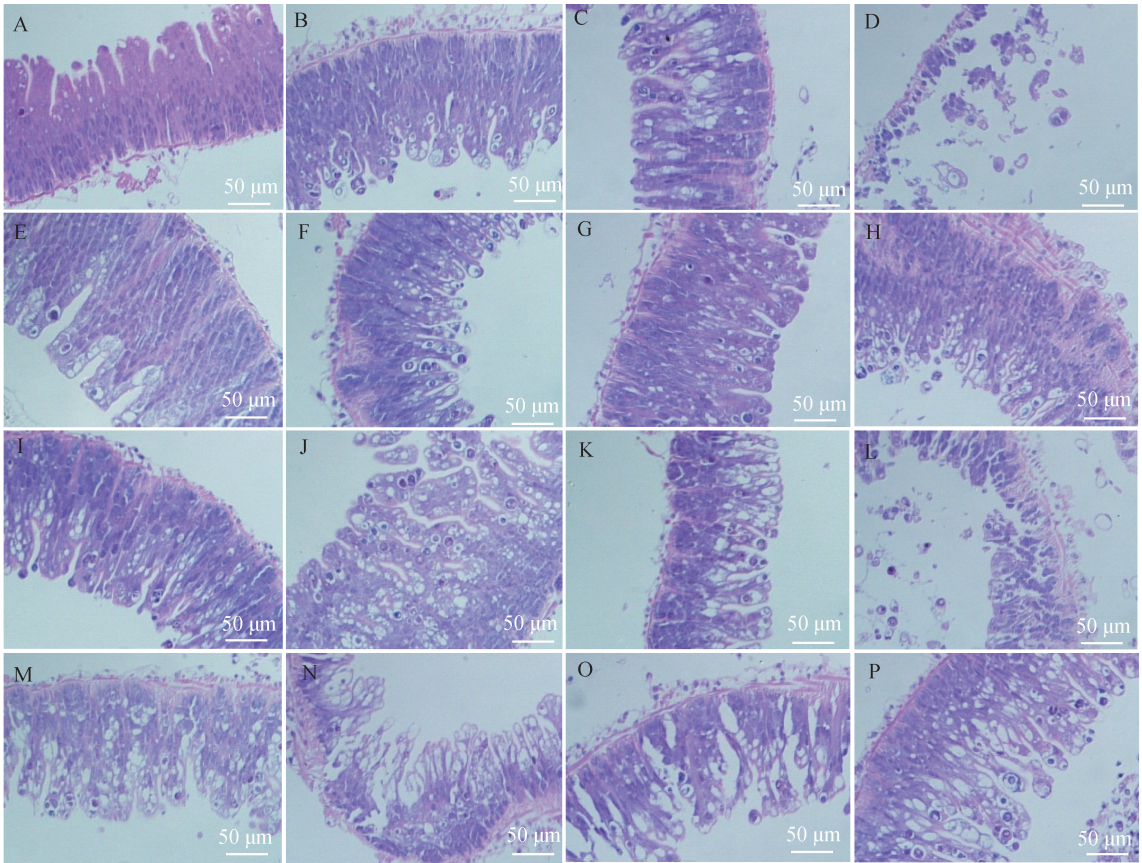


图 6 大黑鳃金龟幼虫感染 Bt 后中肠组织病理变化情况

Fig. 6 Histopathological changes in the midgut of *Holotrichia oblita* larvae after infected by Bt isolates

A ~ B: 分别为对照 ddH₂O 处理 2, 4 d; C ~ D: HBF18 处理 2, 4 d; E ~ F: HD73⁻ 处理 2, 4 d; G ~ K: 分别为经菌株 261、1198-1、1126-1、FCD114、QDL40-2 处理 2 d; L ~ P: 分别为经菌株 261、1198-1、1126-1、FCD114、QDL40-2 处理 4 d。A ~ B: 2, 4 d with ddH₂O; C ~ D: 2, 4 d with HBF18 isolate; E ~ F: 2, 4 d with HD73⁻; G ~ K: 2 d with 261, 1198-1, 1126-1, FCD114, and QDL40-2 isolates, respectively; L ~ P: 4 d with 261, 1198-1, 1126-1, FCD114 and QDL40-2 isolates, respectively.

的发掘效率。目前报道的基于 *gyrB* 基因序列扩增、鞭毛抗原基因序列扩增、回文序列扩增图谱等 Bt 多样性分析方法达不到分析菌株之间差异的要求 (Yu et al., 2002; Xu & Côté, 2008; Soufiane & Côté, 2009), Bt 质粒图谱分析难以准确定量分析 (Reyes-Ramírez & Ibarra, 2008)。鉴于此,本研究根据杀虫基因序列的特性,利用可以扩增多种杀虫基因的简并引物对菌株含有的基因片段进行扩增,进一步利用菌株间杀虫基因种类和数量的差异产生的 RFLP 图谱多样性对菌株进行比较,结果表明筛选到的 42 株对大黑鳃金龟幼虫有活性的菌株属于 14 个不同的菌株类型。该方法操作简便,有利于去除冗余菌株,节约成本与时间,有助于提高 Bt 杀虫基因的发掘效率。

本研究通过进一步的菌株鉴定和序列测定,发现 4 个菌株含有新的 *cry8* 类基因,包括 *cry8Ma*、*cry8Ca*、*cry8Ab*、*cry8Ga*、*cry8Ea* 共 5 类,推测它们属

于第 3 或者第 4 等级的新基因,有待今后进一步克隆验证。而毒力最高、中肠也能产生病理变化却检测不到任何 *cry* 基因的 261-1 菌株以及其它类似的菌株 1198-1 和 QDL40-2,可能含有其它全新的杀虫蛋白,但利用常规的 PCR 等技术尚无法鉴定。下一步将尝试利用高通量全基因组测序等新的手段,来发现和克隆这些菌株中可能含有的全新的杀虫蛋白基因。

Bt 杀虫晶体蛋白对敏感昆虫中肠引起的病理学变化主要表现为:中肠细胞的液泡增加,细胞膨胀变形,肠壁细胞出现明显的空泡化,最终细胞内含物与细胞一起脱落于肠腔中 (Endo & Nishiitsutsuji-Uwo, 1980)。宋健等 (2008) 报道,感染 Bt 后铜绿丽金龟甲和黄褐丽金龟甲 *Anomala exoleta* 幼虫中肠肠壁细胞内含物随着细胞最终脱落游离至肠腔。本研究也观察到,在感染 Bt 后供试昆虫幼虫中肠肠壁细胞排列疏松,细胞明显出现空洞化,细胞最终脱离底

模等相似的病理学变化。王志英等 (1996) 研究发现, 落叶松毛虫 *Dendrolimus superans* 幼虫经 Bt 处理后, 在发病后期还感染除中肠外的其它许多组织; 王忠华等 (2002) 也研究发现, 转 Bt 基因水稻 KMD2 的生米粉处理家蚕 *Bombyx mori* 后, 其中肠内壁的微绒毛明显稀疏而短小, 柱状细胞和杯状细胞的线粒体和粗面内质网数量也明显减少。但本研究只进行了光学切片的病理观察, 存在一定不足, 无法观测到细胞内的超微结构以及其它器官的变化, 今后将利用透射电子显微镜来进一步观察。

参 考 文 献 (References)

- Bi Y, Zhang YR, Shu CL, Crickmore N, Wang QL, Du LX, Song FP, Zhang J. 2015. Genomic sequencing identifies novel *Bacillus thuringiensis* Vip₁/Vip₂ binary and Cry8 toxins that have high toxicity to Scarabaeoidea larvae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2): 753–760
- Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7): 423–431
- Chen JM, Yu XP, Chen LZ, Lü ZX, Zheng XS, Xu HX, Zhang JF. 2004. Occurrence, damage of the soil-dwelling pests and its management strategy in China. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 16(6): 389–394 (in Chinese) [陈建明, 俞晓平, 陈列忠, 吕仲贤, 郑许松, 徐红星, 张珏锋. 2004. 我国地下害虫的发生为害和治理策略. *浙江农业学报*, 16(6): 389–394]
- Donovan WP, Donovan JC, Slaney AC. 2000. *Bacillus thuringiensis* cryET33 and cryET34 compositions and uses therefore; US 6063756. 2000–05–16
- Endo Y, Nishiitsutsuji-Uwo J. 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: histopathological changes in the silkworm midgut. *Journal of Invertebrate Pathology*, 36(1): 90–103
- Feng SL, Wang RY, Fan XH, Hu MJ. 2000. A new *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to larvae of the Scarabaeidae family. *Chinese Journal of Biological Control*, 16(2): 74–77 (in Chinese) [冯书亮, 王容燕, 范秀华, 胡明峻. 2000. 一株对金龟子类幼虫具有杀虫活性的苏云金杆菌新分离株. *中国生物防治*, 16(2): 74–77]
- Ibrahim MA, Griko N, Junker M, Bulla LA. 2010. *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1): 31–50
- Kurt A, Özkan M, Sezen KI, Demirbağ Z, Özcengiz G. 2005. Cry3Aa1: a new Cry3Aa delta-endotoxin from a local isolate of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, 27(15): 1117–1121
- Liu SS, Li KB, Yin J, Cao YZ. 2008. Review of the researches on biological control of grubs. *Chinese Journal of Biological Control*, 24(2): 168–173 (in Chinese) [刘树森, 李克斌, 尹姣, 曹雅忠. 2008. 蛴螬生物防治研究进展. *中国生物防治*, 24(2): 168–173]
- Mao JY, Shu CL, Li KB, Liu CQ, Lin Y, Song FP, Zhang J. 2011. Screening and identification of *cry* gene from *Bacillus thuringiensis* strains toxic to the larvae of cockchafer. *Chinese Journal of Biological Control*, 27(2): 176–181 (in Chinese) [茅洁瑜, 束长龙, 李克斌, 刘春琴, 林毅, 宋福平, 张杰. 2011. 对蛴螬有活性的苏云金芽胞杆菌菌株的筛选与基因鉴定. *中国生物防治学报*, 27(2): 176–181]
- Reyes-Ramírez A, Ibarra JE. 2008. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1): 125–129
- Sambrook J, Russell DW. Huang PT translated. 2002. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd edition). Beijing: Science Press (in Chinese) [萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 黄培堂译. 2002. 分子克隆实验指南 (第3版). 北京: 科学出版社]
- Schnepf E, Crickmore N, van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3): 775–806
- Shu CL. 2013. *Bacillus thuringiensis* resource diversity analysis and insecticidal gene discovery. Ph. D Thesis. Harbin: Northeast Agriculture University (in Chinese) [束长龙. 2013. 苏云金芽胞杆菌资源多样性分析与杀虫基因发掘. 博士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学]
- Shu CL, Liu DM, Zhou ZS, Cai JL, Peng Q, Gao JG, Song FP, Zhang J. 2013. An improved PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for the identification of *cryI*-type genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21): 6706–6711
- Shu CL, Liu R, Wang R, Zhang J, Feng S, Huang D, Song F. 2007. Improving toxicity of *Bacillus thuringiensis* strain contains the *cry8Ca* gene specific to *Anomala corpulenta* larvae. *Current Microbiology*, 55(6): 492–496
- Shu CL, Yan G, Wang R, Zhang J, Feng S, Huang D, Song F. 2009a. Characterization of a novel *cry8* gene specific to Melolonthidae pests: *Holotrichia oblita* and *Holotrichia parallela*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(4): 701–707
- Shu CL, Yu H, Wang R, Fen S, Su X, Huang D, Zhang J, Song F. 2009b. Characterization of two novel *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* strain BT185. *Current Microbiology*, 58(4): 389–392
- Song J, Wang RY, Du LX, Cao WP, Zhang HJ, Wang JY, Feng SL, Zhang J, Song FP. 2008. Symptoms of *Anomala corpulenta* and *A. exoleta* (Coleoptera: Rutelidae) larvae infected by Bt HBF-1 strain and histopathological changes in their midguts. *Acta Entomologica Sinica*, 51(10): 1083–1088 (in Chinese) [宋健, 王容燕, 杜立新, 曹伟平, 张海剑, 王金耀, 冯书亮, 张杰, 宋福平. 2008. 铜绿丽金龟和黄褐丽金龟幼虫感

- 染 Bt HBF-1 菌株后的病症及中肠组织病理变化. 昆虫学报, 51(10): 1083 – 1088]
- Soufiane B, Côté JC. 2009. Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on 16S rRNA, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. Antonie van Leeuwenhoek, 95(1): 33 – 45
- Wang ZH, Shu QR, Cui HR, Xu MK, Xie XB, Xia YW. 2002. The effect of Bt transgenic rice flour on the development of silk-worm larvae and the sub-micro-structure of its midgut. Scientia Agricultura Sinica, 35(6): 714 – 718 (in Chinese) [王忠华, 舒庆尧, 崔海瑞, 徐孟奎, 谢小波, 夏英武. 2002. Bt 转基因水稻米粉对家蚕生长发育及中肠亚显微结构的影响. 中国农业科学, 35(6): 714 – 718]
- Wang ZY, Yue SK, Jia CS, Zhang YL, Wang YS. 1996. Histopathology of *Dendrolimus superans* infected by *Bacillus thuringiensis*. Journal of Northeast Forestry University, 24(4): 22 – 25 (in Chinese) [王志英, 岳书奎, 贾春生, 张玉楼, 王延生. 1996. 苏云金杆菌感染落叶松毛虫的组织病理. 东北林业大学学报, 24(4): 22 – 25]
- Wei HJ, Zhang ZL, Wang YC. 1989. Chinese soil pests. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press (in Chinese) [魏鸿钧, 张治良, 王荫长. 1989. 中国地下害虫. 上海: 上海科学技术出版社]
- Xu D, Côté JC. 2008. Sequence diversity of *Bacillus thuringiensis* flagellin (H antigen) protein at the intra-H serotype level. Applied and Environmental Microbiology, 74(17): 5524 – 5532
- Yokoyama T, Tanaka M, Hasegawa M. 2004. Novel *cry* gene from *Paenibacillus lentimorbus* strain Semadara inhibits ingestion and promotes insecticidal activity in *Anomala cuprea* larvae. Journal of Invertebrate Pathology, 85(1): 25 – 32
- Yu H, Zhang J, Huang DF, Gao JG, Song FP. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* strain Bt185 toxic to the Asian cockchafer; *Holotrichia parallela*. Current Microbiology, 53(1): 13 – 17
- Yu JX, Tan L, Liu YS, Pang Y. 2002. Phylogenetic analysis of *Bacillus thuringiensis* based on PCR amplified fragment polymorphisms of flagellin genes. Current Microbiology, 45(2): 139 – 143
- Zhang Y, Zheng GL, Tan JX, Li CY, Cheng LY. 2013. Cloning and characterization of a novel *cry8Ab1* gene from *Bacillus thuringiensis* strain B-JJX with specific toxicity to scarabaeid (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. Microbiological Research, 168(8): 512 – 517

(责任编辑:李美娟)