

杀虫防病基因工程枯草芽孢杆菌的构建

¹ 陈中义 ¹ 张 杰 ¹ 曹景萍 ¹ 丁之铨 ¹ 黄大昉* ² 陈志谊

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 100094)

²(江苏农业科学院植物保护研究所 南京 210014)

摘 要 分别以枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭质粒 pHB201 和 pRP22 为载体,通过感受态转化方法,将 Bt HD-1 杀虫蛋白基因 *cry1Ac* 导入了水稻纹枯病生防菌株枯草芽孢杆菌 B916。工程菌株质粒酶切电泳分析、Southern 印迹分析和杀虫生物活性测定结果证实了 *cry1Ac* 基因的导入及其在 B916 中的有效表达。抑菌测定证明工程菌株保持了原野生型菌株良好的抑菌活性。质粒稳定性分析表明以载体 pRP22 构建的工程菌株 Bs2249 具有良好的稳定性,而以载体 pBH201 构建的工程菌株 Bs2014 则不稳定。此外,实验还证实 Bt 基因的导入与表达对 B916 的生长没有不良影响。

关键词 苏云金芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, 穿梭载体, 杀虫蛋白基因, 基因工程

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0215-20

Bt (*Bacillus thuringiensis*) 杀虫剂具有无污染残留、对靶害虫高专一性和对非靶生物安全的优点,被广泛用于害虫生物防治。将 Bt 杀虫晶体蛋白(ICPs)基因导入植物根际、叶面和内生细菌构建的新型工程菌可有效克服 Bt 制剂持效期短、对根部和茎蛀害虫难以有效发挥作用等不足^[1-4],有的还可使工程菌株兼有固氮和增产的功能^[5-7]。张杰等^[8]将 Bt *cry1Ac* 基因导入病害生防菌荧光假单胞菌获得了兼有杀虫防病作用的工程菌,唐文华^[9]和刘伊强等^[10]将枯草芽孢杆菌与 Bt 通过细胞融合也获得了具有抑菌杀虫作用的融合子。枯草芽孢杆菌 B916 是江苏农科院植保所与国际水稻研究所合作分离的一株水稻纹枯病生防菌,1992~1996 年田间试验表明它对水稻纹枯病防效达 50%~81%,并对水稻稻瘟病和稻曲病等具有广谱抑制作用^[11,12]。本研究以枯草芽孢杆菌-大肠杆菌穿梭质粒为载体,将 *cry1Ac* 基因导入了 B916,构建成功兼有杀虫防病作用的工程菌株,同时还对工程菌株的质粒稳定性和生长速率进行了研究。

1 材料和方法

1.1 试验材料

菌株与质粒见表 1。玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)和小菜蛾(*Plutella xylostella*)标准试虫分别由中国农科院植保所玉米螟组和农药合成组提供。DNA 限制酶, DNA Nick Translation System Kit, T4DNA 连接酶购自 Promega 公司; α -³²P dCTP 购于福瑞公司;抗生素购于天象人生物公司;其它试剂均为市售商品(分析纯)。

联系作者: E-mail: dfh313@public.bta.net.cn.

收稿日期: 1998-01-13, 修回日期: 1998-11-30。

表 1 菌株与质粒
Table 1 Strains and plasmids

Plasmids or strains	Description	Construction or source
Plasmids		
pOS22	Amp ^r , pUC18 carried Bt HD-1 <i>cry1Ac</i>	Lab. stock
pRP22	Amp ^r , Cm ^r , <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle plasmid	Prof. Chen Yongfu
pHB201	Erm ^r , Cm ^r , <i>E. coli</i> - <i>B. subtilis</i> shuttle plasmid	Prof. S. Bron
pZY2014	pHB201 carried <i>cry1Ac</i> of pOS22	This work
pZY2249	pRP22 carried <i>cry1Ac</i> of pOS22	This work
<i>Bacillus subtilis</i>		
B916	Wild type	Prof. Chen Zhiyi
Bs2014	B916 contains plasmid pZY2014	This work
Bs2249	B916 contains plasmid pZY2249	This work
<i>Bacillus thuringiensis</i> HD-73		
Pathogenic fungi		
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	Wild Type	Prof. Peng Yufa
<i>Pyricularia oryzae</i> Cav.	Wild Type	Prof. Peng Yufa
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (Atk.)	Wild type	Prof. Sun Wenji
<i>Verticillium dahliae</i> Kleb	Wild Type	Prof. Shi Leiyan

1.2 质粒提取、DNA 酶切、片段回收、连接及遗传转化

枯草芽孢杆菌遗传转化和质粒提取采用标准方法^[13];大肠杆菌质粒提取、DNA 酶切、片段回收、连接及遗传转化采用常规方法^[14]。

1.3 Southern blot

cry1Ac 和 λ_{DNA} 放射性探针制备按 Promega 公司试剂盒说明进行, Southern 杂交采用 David 方法^[15]。

1.4 工程菌株质粒稳定性分析及其与 B916 生长速率比较

工程菌株质粒稳定性分析参考 Bron 方法^[13], 并通过测定工程菌株与 B916 的生长速率, 比较分析 BtICPs 基因的导入和表达对 B916 的影响。

1.5 工程菌株抑菌生物活性检测

接病原真菌于 PDA 平板中央培养至菌落直径约 2cm, 在平板边缘分别接入直径约 8mm 的 B916 和工程菌株菌片继续培养 3~6d, 测抑菌带大小。

1.6 工程菌株杀虫生物活性检测

工程菌株及其对照接种 LB 液, 培养 3~4d, 以菌液:水:人工干饲料为 1:9:10 的比例配置饲料接入玉米螟试虫后, 28℃ 培养 6d 调查结果;以菌液浸泡甘蓝叶片约 10s, 自然晾干后接入小菜蛾试虫, 25~26℃ 培养, 48h 和 96h 调查结果;以无菌水为对照。按公式计算:校正死亡率=(处理平均死亡率-对照平均死亡率)/对照平均存活率×100%。

2 试验结果

2.1 工程菌株的构建与分子检测

质粒 pOS22 经 *Hind*Ⅲ 和 *Bam*H I 完全消化后的一个 3.0kb 片段包含了 *cry1Ac* 基因启动子和 2.8kb 编码区。将此片段分别克隆在 2 个穿梭载体相应的多克隆位点,获得了携带 *cry1Ac* 基因片段的两个重组穿梭质粒,以 pHB201 和 pRP22 为载体的重组质粒分别命名为 pZY2014 和 pZY2249。

以重组质粒 pZY2014 和 pZY2249 分别转化 B916 感受态细胞,转化频率约 10^2 转化子/ μ g DNA。各随机选取 4 个转化子,质粒检测表明它们均含有与相应重组质粒大小相同的质粒。分别任选一个转化子质粒,酶切电泳分析和 Southern blot(图 1)证实 *cry1Ac* 基因已成功导入 B916 菌株。含有重组质粒 pZY2014 和 pZY2249 的两种转化子相应命名为工程菌株 Bs2014 和 Bs2249。

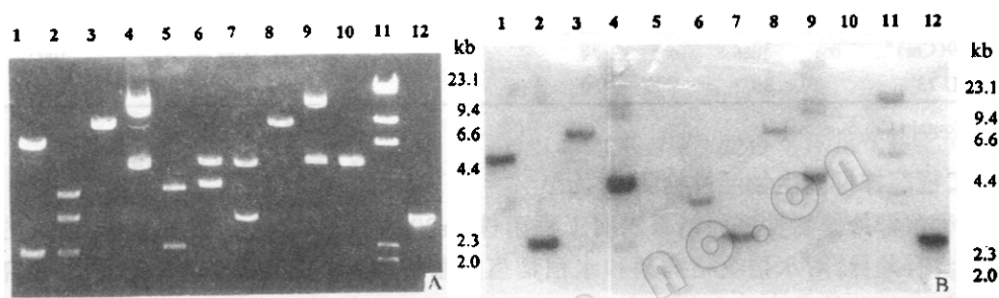


图 1 工程菌株质粒限制酶切电泳分析(A)和 Southern blot(B)

Fig.1 Analysis of plasmids from engineered strains by restriction digestion (A) and southern hybridization (B)
1. Bs2249/*Hind*Ⅲ; 2. Bs2249/*Bam*H I + *Hind*Ⅲ; 3. Bs2249/*Bam*H I; 4. Bs2249; 5. pRP22; 6. Bs2014/*Hind*Ⅲ;
7. Bs2014/*Bam*H I + *Hind*Ⅲ; 8. Bs2014/*Bam*H I; 9. Bs2014; 10. pHB201; 11. λ DNA-*Hind*Ⅲ; 12. *cry1Ac*

2.2 工程菌株杀虫生物活性检测

玉米螟试虫取食工程菌株处理的人工饲料后第二天即停止进食,随后陆续死亡,而阴性对照的试虫正常取食,生长良好。6d 后 Bs2014 和 Bs2249 在非选择压条件和选择压条件培养物杀虫生测校正死亡率分别为 40.0%、91.4% 和 82.9%、88.6%(表 2)。

表 2 工程菌株对玉米螟初孵幼虫的杀虫活性(6d)

Table 2 Insecticidal activity of engineered strains against *Ostrinia furnacalis* instar larvae(6 days)

Treatment	No. of tested larvae	Killed larvae	Mortality/%	Modified mortality/%
CK	36	1	2.8	-
B916	36	2	5.6	2.9
Bs2014	36	15	41.6	40.0
Bs2014(Cm) #	36	33	91.7	91.4
Bs2249	36	30	83.3	82.9
Bs2249(Cm) #	36	32	88.9	88.6
HD-73	36	36	100	100

: Contain Cm 5 μ g/mL.

小菜蛾试虫取食工程菌株处理的甘蓝叶片后当天停止进食,24h 后开始死亡。96h

后 Bs2014 在非选择压条件和选择压条件下培养物校正死亡率分别为 55.2% 和 100%；而 Bs2249 则均为 100%，其杀虫效果基本上与 HD-73 菌株相当(表 3)。

表 3 工程菌株对小菜蛾二龄幼虫的杀虫活性

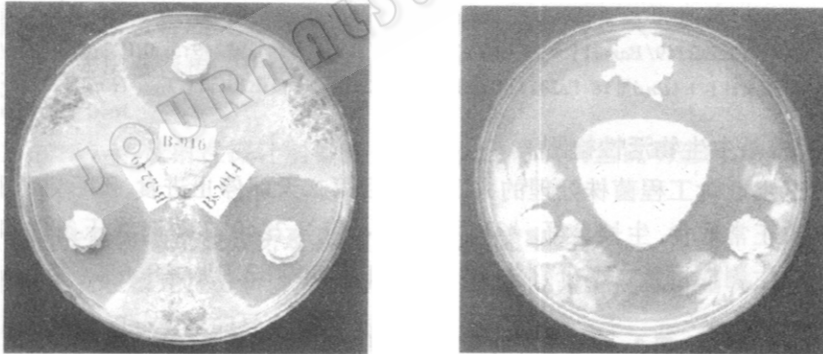
Table 3 Insecticidal activity of engineered strains against *Plutella xylostella* 2nd instar larvae

Treatment	No. of tested Larvae	48 h		96 h	
		Killed larvae	Killed larvae	Mortality/%	Modified mortality/%
CK	30	1	1	3.3	—
B916	30	2	2	6.6	3.4
Bs2014	30	13	17	56.7	55.2
Bs2014(Cm) [#]	30	30	—	100	100
Bs2249	30	30	—	100	100
Bs2249(Cm) [#]	30	30	—	100	100
HD-73	30	30	—	100	100

: Contain Cm 5 μ g/mL.

2.3 工程菌株抑菌生物活性检测

工程菌株抑菌活性试验结果表明工程菌株 Bs2014 和 Bs2249 与出发菌株 B916 的抑菌活性没有差异,对水稻纹枯病菌和水稻稻瘟病菌抑菌带在 12mm 左右(图 2)。研究还发现它们对棉花枯萎病菌和黄萎病菌也有很强的抑菌作用,抑菌带分别为 9mm 和 12mm (图略),表明 B916 具广谱抑菌活性,有可能应用于其它作物病虫害生物防治。



Activities against *Rhizoctonia solani* KÜh

Activities against *Pyricularia oryzae* Cav.

图 2 工程菌株和 B916 抑菌活性检测

Fig. 2 Antifungal activities of engineered strains and B916

2.4 工程菌株质粒稳定性分析

质粒稳定性结果表明以穿梭载体 pRP22 构建的工程菌株 Bs2249 具有良好分离稳定性,连续培养 25h 稳定性高于 95.5%,连续培养 50h 稳定性高于 72%,连续稀释培养 50h (>150 代)质粒丢失频率小于 10^{-3} /代;而 pHB201 构建的工程菌株则容易丢失质粒(图 3),工程菌株质粒分离稳定性与杀虫生物活性结果一致。此外,分别对工程菌株连续稀释培养 50h 的 6 个随机抗性菌落进行了质粒及其限制性酶切电泳分析,结果证明它们与相应的重组质粒之间没有差异,没有缺失或重排现象,具有结构稳定性(图片略)。

2.5 工程菌株与 B916 生长速率比较

本研究对工程菌株 Bs2249 和出发菌株 B916 生长速率进行了比较,结果表明 Bt 基因的导入与表达对菌株生长没有明显不良影响(图 4)。

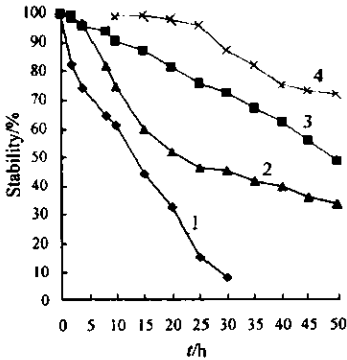


图 3 工程菌株稳定性

Fig.3 Stability of engineered strains

1. Bs2014 cultivated with continual dilution
2. Bs2249 cultivated with continual dilution
3. Bs2014 cultivated Successfully
4. Bs2249 cultivated Successfully

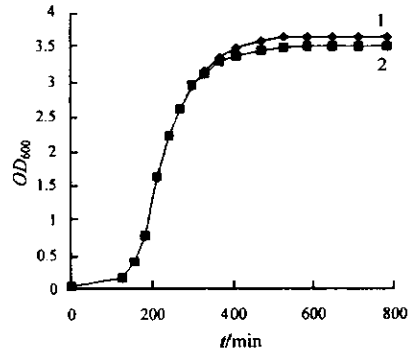


图 4 工程菌株 Bs2249 与 B916 生长速率

Fig.4 Growth rate of engineered

- Strain Bs2249 and B916
1. Bs2249; 2. B916

3 结论和讨论

通过基因工程手段将 Bt 杀虫蛋白基因 *cry1Ac* 导入了水稻纹枯病生防菌株枯草芽孢杆菌 B916, 新构建的工程菌株既保持了出发菌株原有的良好抑菌活性, 又表现了对玉米螟和小菜蛾的毒杀作用。外源 Bt 基因的导入与表达对 B916 的生长没有明显的不良影响。兼有杀虫防病作用的基因工程枯草芽孢杆菌的构建显示了生物技术在生防细菌遗传改良中的应用潜力, 为进一步研究和开发新型微生物农药创造了条件。

工程菌株的质粒稳定性是判断其有无应用价值的重要因素。本研究所选用的两个载体均为枯草芽孢杆菌内源质粒衍生物^[16,17]。试验结果显示以 pHB201 为载体构建的工程菌株 Bs2014 不稳定, 而以 pRP22 为载体构建的工程菌株 Bs2249 则具有良好的稳定性。虽然 Bs2249 连续培养 25h 以后质粒开始丢失, 但它在选择压和非选择压条件下连续培养 3~4d 培养物的杀虫活性没有明显差异。这可能是质粒丢失发生在产孢后期而 *cry1Ac* 基因表达在产孢前期的缘故。因此, 通过操纵基因表达和控制发酵工艺可望进一步提高工程菌株杀虫蛋白基因的稳定表达, 或者通过整合载体将 Bt ICPs 基因导入 B916 染色体以获得稳定的基因工程菌株。此外, 本研究发现工程菌株对水稻二化螟幼虫的毒力较对玉米螟和小菜蛾低得多(数据从略), 这与田颖川等^[18]报道一致, 其原因可能是因为二化螟对 Bt HD-1*cry1Ac* 基因产物不敏感。

参 考 文 献

- [1] R. S. Borr, M. G. Murty, R. Shenbagarathai et al. *Appl. Environ Microbiol.*, 1994, 60(1): 214~222.

- [2] L. Kim(Eds). *Advanced Engineered Pesticides*, 1993, New York: Marcel Dekker Inc.
- [3] M. Obukowicz, F. J. Perlak, G. Kusano-kretzmer *et al.* *J. Bacteriol.*, 1986, **168**:982~989.
- [4] J. Lampel, L. Gayle, B. Michael *et al.* *Appl. Environ Microbiol.*, 1994, **60**(2):501~508.
- [5] C. Nambiar. *Appl Environ Microbiol.*, 1990, **56**:2866~2869.
- [6] V. Udayasuriyan, A. Nakamura, H. Masaki *et al.* *World J. Microbiol Biotechnol.*, 1995, **11**:163~167.
- [7] 孙良武, 梁平彦, 田颖川等. 生物工程学报, 1994, **10**(1):1~6.
- [8] 张杰, 彭于发, 黄大防等. 中国农业科学, 1993, **26**(3):89.
- [9] 唐文华, 顾培萃. 全国生物防治学术讨论会论文摘要集, 1995, p330.
- [10] 刘伊强, 王雅平, 陈章良等. 遗传学报, 1993, **20**(6):524~530.
- [11] Chen Zhiyi, Lu Fan, Chen Yulin *et al.* In "Advances in Biological Control of Plant Diseases, Proceeding of International Workshop on Biological Control of Plant Diseases", Tang Wenhua, Eds., China Agricultural University Press, 1996, p1~5.
- [12] 陈志谊, 中国生物防治, 1997, **13**(2):75~78.
- [13] C. Harwood, S. Cutting. *Molecular Biological Methods for Bacillus*, 1990, John Wiley & Sons Ltd. Inc. UK.
- [14] J. Sambrook, F. Fritsch, T. M. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- [15] F. M. Ausubel. *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Protocols in Molecular Biology*, Third Eds., 1995, John Wiley & Sons, Inc..
- [16] S. Bron, W. Meijer, S. Holsappel *et al.* *Microbiol.*, 1991, **142**:875~883.
- [17] K. Devine, S. Hogan, D. Higfgins *et al.* *J. Bacteriol.*, 1989, **171**:1166~1172.
- [18] 田颖川, 秦晓峰, 许丙寅等. 生物工程学报, 1991, **7**(1):1~10.

Construction of Genetically Engineered Strains of *Bacillus subtilis* Against Insect Pests and Plant Pathogens

Chen Zhongyi¹ Zhang Jie¹ Cao Jingping¹ Ding Zhiquan¹ Huang Dafang¹ Chen Zhiyi²

¹(Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences,

State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100094)

²(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014)

Abstract Insecticidal crystal protein gene *cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* HD-1 was respectively cloned into two *Bacillus subtilis*-*Escherichia coli* shuttle plasmid vectors pHB201 and pRP22. The hybrid plasmids were transformed into *Bacillus subtilis* B916, a biocontrol bacterium against Rice Sheath Blight. Restriction analysis, southern hybridization and insecticidal activity bioassay respectively verified the existence of *cry1Ac* gene and the efficient expression of Bt toxin protein in the transformants. No difference in antifungal activities between the engineered strains and B916 was observed. The result of plasmids stability analysis indicated that the engineered strain constructed using pRPP22 as vector was stable, but Bs2014 constructed using pHB201 as vectors was unstable. It was also showed that expression of Bt *cry1Ac* had no negative effect on growth of B916.

Key words *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, shuttle plasmid, insecticidal crystal protein gene, genetic engineering