

# 苏云金杆菌 B24-14 及其 $\delta$ -外毒素对植物寄生线虫的作用

茆振川<sup>1,2,3</sup> 唐文华<sup>1</sup> 王汝贤<sup>2</sup> 张力群<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100094; 2. 西北农林科技大学 植物保护学院,  
陕西 杨凌 712100; 3. 河北农林科学院 昌黎果树研究所,河北 昌黎 066600)

**摘要** 分离戈壁土壤样品,获得 1 株芽孢杆菌菌株 B24-14,经 16SrDNA 序列分析鉴定为苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。用乙醇分级沉淀和紫外扫描方法,提取 B24-14 菌株的  $\delta$ -外毒素。用细胞培养板法检测其对松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 的毒杀效果,结果表明:在 4 mg·mL<sup>-1</sup> 质量浓度下处理 8 h,线虫的杀死率可以达到 93.75%,致死中质量浓度为 574  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>;随处理时间延长和外毒素质量浓度的提高,毒杀效果也明显增强;6 种质量浓度的  $\delta$ -外毒素处理线虫,其死亡率与毒素质量浓度的自然对数呈正相关,相关系数为 0.981。温室防病试验表明,B24-14 菌株的液体菌剂可以有效地防治根结线虫 (*Meloidogyne* spp.),处理 21 d 黄瓜苗根结减退率达到了 71.6%~84.6%,经多次试验其防治效果均与对照呈显著差异。

**关键词** 苏云金杆菌;  $\delta$ -外毒素; 植物寄生性线虫

**中图分类号** S 476.15

**文章编号** 1007-4333(2004)06-0034-04

**文献标识码** A

## Action of *Bacillus thuringiensis* B24-14 and its $\delta$ -exotoxin on the parasitic nematodes of plant

Mao Zhenchuan<sup>1,2,3</sup>, Tang Wenhua<sup>1</sup>, Wang Ruxian<sup>2</sup>, Zhang Liqun<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 3. Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Changli 066600, China)

**Abstract** Bacilli isolate B24-14 was isolated from Gobi soil in Gansu province. This bacterium was identified as *Bacillus thuringiensis* based on the analysis of 16S rDNA and Bergey's Manual system.  $\delta$ -exotoxin produced by B24-14 was distilled by the technique of alcohol graded deposition. Nematodecide effectiveness of the  $\delta$ -exotoxin on *Bursaphelenchus xylophilus* was examined with the plate method. Responding to 8 hour treatment of  $\delta$ -exotoxin (4 mg/mL) on the nematode, motility of nematode reached to 93.75% and LC 50 was 574  $\mu$ g/mL. Along with increasing concentration of  $\delta$ -exotoxin and lasting the time of treatment, the nematodecide effectiveness of  $\delta$ -exotoxin raised obviously. Motility of *B. xylophilus* treated by 6 different concentrations of the  $\delta$ -exotoxin was examined. The correlation ( $r = 0.981$ ) between nematode survival and the natural logarithm of exotoxin concentration was positive. Experiments on control of root knot disease caused by *Meloidogyne* spp. were conducted in greenhouse. Reducing rate of root-knot with B-24-14 treatment compared with non-treated control reached to 71.6% - 84.6% in 5 experiments. Statistic analysis showed that the difference was significant.

**Key words** *Bacillus thuringiensis*;  $\delta$ -exotoxin; plant parasitic nematodes

苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 在微生物防治害虫方面占有极其重要的地位。苏云金杆菌  $\delta$ -外毒素又称苏云金素,具有与 ATP 相似的分子结构,耐高温、易溶于水,性质稳定,对植物无接触性毒性,不被植物吸收或代谢,可以在植物体内及叶片表

面长期稳定存在<sup>[1,2]</sup>。 $\delta$ -外毒素对昆虫、螨类、线虫,软体动物等多种害虫均具有杀伤作用<sup>[3~5]</sup>。特别是证明其对哺乳动物安全以后, $\delta$ -外毒素的研究及应用越来越受到重视<sup>[6]</sup>。已有一些国家利用此外毒素防治植物寄生性线虫<sup>[7,8]</sup>。在我国,对  $\delta$ -外毒

收稿日期: 2004-04-26 修回日期: 2004-09-03

基金项目: 北京市高廷根生物技术有限公司资助项目

作者简介: 茆振川, 硕士研究生; 唐文华, 教授, 通讯作者, 主要从事植物病害生物防治研究, E-mail: tangwh@cau.edu.cn

Tel: 010-68918582

素的研究始于 20 世纪 70 年代,但目前,特别是在利用  $\delta$ -外毒素防治植物寄生性线虫方面尚缺乏深入研究。笔者通过对土壤样品的分离,获得 1 株芽孢杆菌 B24-14,研究了其杀线虫及防治线虫病的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 B24-14 菌株的分离与鉴定

用于分离植物寄生线虫生防菌的土壤样品取自甘肃敦煌戈壁滩地表 5~15 cm 土壤。采用梯度稀释法,使用牛肉汁蛋白胨培养基分离细菌<sup>[9]</sup>。获得的 B24-14 菌株采用 16S rDNA 片段测序法进行鉴定<sup>[10,11]</sup>。扩增引物为 16S1 (5'-GTGCCA GCMGC-CGCGG-3') 与 16SR (5'-GGYTACCTTGTTAC-GACTT-3'), PCR 扩增程序设置: 94 预变性 5 min; 94 变性 40 s, 55 退火 40 s, 72 延伸 2 min, 循环数为 35; 72 延伸 5 min。扩增 16SrDNA 片段长度为 0.9 kb<sup>[12]</sup>。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后分别连接 *EcoR* 酶切的克隆载体 pBluescript, 送上海申友生物技术公司测定该片段序列。结果用 BLAST 软件对序列进行同源性比较。

### 1.2 外毒素的提取

用产苏云金素专用培养基发酵 B24-14, 培养液成分:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.3 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g,  $\text{Na}(\text{NH}_4)\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.5 g, 葡萄糖 10 g, 酪氨酸 (Difco) 10 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 000 mL, pH 7.0。28 ℃, 160 r·min<sup>-1</sup> 条件下摇瓶培养 36 h 后, B24-14 发酵液经 121 ℃ 处理 10 min, 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心, 取上清液 50 mL 下旋转蒸发, 将 100 mL 上清液浓缩至 20 mL, 加入冷却的等体积无水乙醇, 4 ℃ 静置 24 h, 离心去沉淀; 上清液再加无水乙醇至乙醇体积分数为 60%, 4 ℃ 静置 24 h, 离心取沉淀, 并溶于 10 mL 的无离子水中; 上清液继续加无水乙醇至乙醇体积分数为 90%, 4 ℃ 静置 24 h, 离心收集沉淀, 并溶于 10 mL 的无离子水中。将所收集的沉淀水溶液过纤维素与乙醇的混合柱, 用体积分数为 80% 乙醇洗脱, 收集的无色洗液即含有效成分。然后用旋转蒸发法除去乙醇, 将固形物重新溶于无离子水进行紫外光扫描检测, 根据试验要求配制成不同含量的生物测定溶液。

### 1.3 室内杀线虫试验

供试线虫为松材萎蔫线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*), 由中国林业科学院杨宝君研究员惠赠。

用漏斗法将培养在灰葡萄孢菌上的松材线虫分离出来<sup>[13]</sup>, 以细胞培养板法检测外毒素的杀线虫活性: 称取 B24-14 菌株粗提外毒素 0.1 g, 分别用无离子水等比稀释为 4, 2, 1, 0.5, 0.25 和 0.125 mg·mL<sup>-1</sup> 溶液; 按每穴 0.5 mL 加入细胞培养板孔中, 每孔中加入约 100 条松材线虫, 在 0.75, 2, 4, 8 和 16 h 时检查线虫死亡率。每个处理做 1 孔, 重复 4 次。

### 1.4 温室防治根结线虫病试验

自北京马连洼采集根结线虫病病土, 以黄瓜品种中农 12 号为寄主植物, 进行 B24-14 的防治线虫病温室试验。试验设空白和生防菌 *Pseudomonas* sp. 418# 菌株处理 2 组对照, 菌株 418# 为白俄罗斯防治根结线虫病的商品化细菌菌株, 由山东省科学院生物所杨和同研究员惠赠。B24-14 菌株液体菌剂的制备: 纯化的 B24-14 菌株在 28 ℃, 160 r·min<sup>-1</sup> 的条件下摇瓶培养 36 h 备用。供试黄瓜种子用体积分数为 5% 的次氯酸钠消毒 4 min, 无菌水冲洗 3 次, 40 ℃ 热水温汤浸种 30 min, 28 ℃ 温箱中进行催芽处理 24 h。种子露白时, 用供试菌株的发酵液浸泡种子 5 min, 种入线虫土中, 7 d 时用相应的菌剂灌根处理, 每株 3 mL, 处理 24 d 时检测植株根结数, 计算根结减退率。每处理 10 钵, 每钵 1 苗。试验重复 5 次。根结减退率计算公式:

$$\text{根结减退率} = \frac{\text{对照根结数} - \text{处理根结数}}{\text{对照根结数}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 B24-14 菌株的分离与鉴定

从土壤中分离出的 B24-14 菌株在牛肉汁蛋白胨培养基上形成乳白色圆形菌落边缘较整齐, 表面呈现毛玻璃状, 呈革兰氏阳性。

将 PCR 扩增的 16S rDNA 0.9 kb 片段克隆到质粒 pBluescript 中, 经测序后将 B24-14 的 16S rDNA 片段碱基序列与基因库 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 的记录对比, 发现 B24-14 16S rDNA 序列与蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)、炭疽芽孢杆菌 (*B. anthracis*) 符合率分别为 99.8%, 99.8% 和 99.6%。通过伴孢晶体染色, 在 B24-14 的细胞中可见伴孢晶体, 菌落中更有大量菱形伴孢晶体<sup>[14]</sup>。根据“伯杰细菌鉴定手册”, 结合 16S rDNA 序列鉴定, B24-14 鉴定为苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)。

### 2.2 外毒素粗提物的杀线虫作用

将外毒素粗提物溶于无离子水, 进行紫外线扫

描,体积分数为90%的乙醇提取的外毒素在257 nm处有一吸收峰,且只出现单一峰(图1),结合提取过程中采用的外毒素沉淀方法(核酸提取方法),说明所提取的物质为核苷类物质,而且此核苷类物质来自苏云金杆菌代谢物,具有热稳定性,可以判断提取物为苏云金杆菌的外毒素。

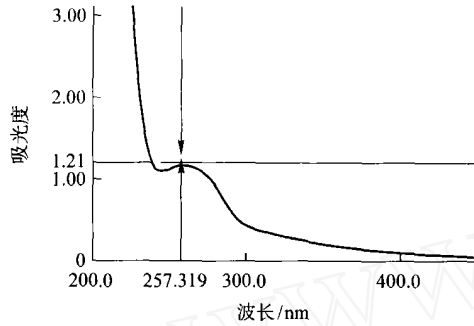


图1 外毒素的紫外吸收峰

Fig. 1 Absorbed ultraviolet curve of exotoxin

B24-14 菌株的 -外毒素处理线虫,在2 h时,CK及1,0.5,0.25和0.125 mg·mL<sup>-1</sup>各处理溶液对线虫都没有影响,线虫均呈现活泼的“S”形摇摆,每秒约1~2次;而在4 mg·mL<sup>-1</sup>溶液处理中,线虫明显的倦怠,身体僵硬,只有头部缓慢地摆动,部分线虫卷曲不动或呈“C”、“6”形,“S”形僵硬或是偶尔伸展一下,但此时线虫虫体仍然透明;2 mg·mL<sup>-1</sup>溶液处理中,线虫只有少数呈现出倦怠现象,多数线虫仍然较为活泼的摆动。以上各处理到8 h时,在 -外毒素处理组中,随着质量浓度的增高,线虫出现不同程度的倦怠;死亡线虫虫体僵硬不动,伸直或略有弯曲,虫体灰暗没有光泽,而且放入清水中不能复活。线虫死亡率调查结果见表1。

表1 不同质量浓度外毒素对线虫的影响

Table 1 Effects of different concentrations of exotoxin solution on the mortality of nematodes

质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )	死亡率/%	校正死亡率/%
CK	2.35	
0.125	12.85	10.50
0.25	21.22	18.87
0.50	51.95	49.60
1.00	74.15	71.80
2.00	91.48	89.13
4.00	96.10	93.75

将表1中的死亡率及质量浓度进行曲线拟合。死亡率(y)与质量浓度(x)之间的关系拟合曲线呈现为假双曲线(图2),拟合方程为  $y = 0.2677 \ln(x) +$

0.6488。y与ln(x)成直线关系,相关系数为0.981。通过计算,外毒素的LC<sub>50</sub>为0.574 mg·mL<sup>-1</sup>。当质量浓度高于2 mg·mL<sup>-1</sup>或低于0.25 mg·mL<sup>-1</sup>时线虫的死亡率变化很小。通过试验可以看出苏云金杆菌B24-14产生的外毒素可以有效地杀死松材线虫,死亡率与浓度的自然对数成正相关,随着时间的延长杀虫效果提高。

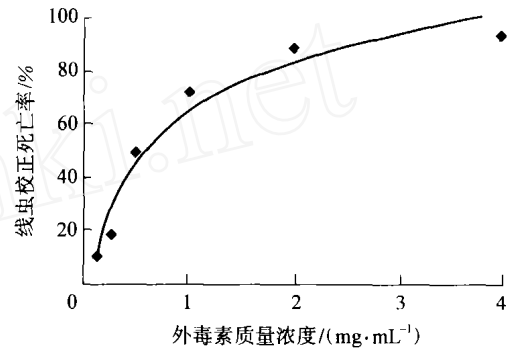


图2 外毒素质量浓度与线虫校正死亡率的拟合曲线

Fig. 2 Simulated curve between the proofed mortality and concentration of exotoxin

### 2.3 B24-14 菌株温室防治根结线虫的效果

B24-14 菌剂处理黄瓜根际土壤21 d时,将黄瓜的根际土壤用水轻轻冲洗掉,检查根结数量及植株的生长情况。在对照中根结数量较多,根结较大,根色发黄,根系不发达。菌剂处理中根系发达,根色洁白,根结少且小。记录各处理黄瓜苗的根结数量,并采用SAS软件进行方差分析,结果见表2。

表2 B24-14 菌株防治根结线虫病的效果

Table 2 The effect of controlling root knot disease by strain B24-14

试验重复	处理菌株	每株根结数 (n=10)	根结减退率/%
1	CK	6.5 A	
	418 <sup>#</sup>	2.7 B	59.32
	B24-14	1.4 B	77.97
2	CK	10.1 A	
	418 <sup>#</sup>	4.5 B	55.49
	B24-14	3.0 B	70.33
3	CK	25.1 A	
	418 <sup>#</sup>	12.0 B	52.21
	B24-14	7.1 C	71.63
4	CK	4.3 A	
	418 <sup>#</sup>	1.2 B	71.85
	B24-14	0.7 B	84.60

注:B24-14 菌剂含量为(1~2)×10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>,418<sup>#</sup> 菌剂含量为(1~4)×10<sup>9</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>;同一重复试验中,字母相同者表示处理间在0.01水平上无差异。

由分析结果可以看出,在第 4 次试验中 B24-14 菌剂和第 418<sup>#</sup> 菌株处理的黄瓜根结数量与对照相比极显著减少。B24-14 菌株与 418<sup>#</sup> 菌株处理相比较,在第 3 次试验中表现差异为不明显,但 B24-14 菌株防治效果有高于 418<sup>#</sup> 菌株的趋势,在第 1 次试验中 B24-14 菌株与 418<sup>#</sup> 菌株处理存在明显差异, B24-14 菌剂处理的根结数量极显著地少于 418<sup>#</sup> 菌株。4 次试验中 B24-14 的防治效果分别为 77.97%, 70.33%, 71.63% 和 84.60%, 而 418<sup>#</sup> 菌株防治效果相应为 59.32%, 55.49%, 52.21% 和 71.85%。根据分析结果可以看出,在温室盆栽试验中, B24-14 菌株可以有效地防治根结线虫。

### 3 结论与讨论

1) 从甘肃戈壁滩土壤样品分离获得的芽孢杆菌菌株 B24-14 的 16SrDNA 序列与基因库中已有记录对比,其与苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*) 的同源性为 99.8%, 结合芽孢及伴孢晶体染色观察,确定菌株 B24-14 为苏云金杆菌 (*B. thuringiensis*)。

2) B24-14 菌株的  $\delta$ -外毒素 ( $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 在 8 h 时对线虫的杀死率可达 93.75%, 致死中质量浓度为  $574 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 并随处理时间延长、外毒素质量浓度提高, 毒杀效果明显增强。线虫死亡率与  $\delta$ -外毒素浓度的自然对数呈正相关, 相关系数达到 0.981。

3) 在温室中通过种子及灌根处理, B24-14 菌株可有效地防治根结线虫病 (*Meloidogyne* spp.)。用菌剂处理 21 d, 黄瓜根结减退率达 71.6% ~ 84.6%, 经多次试验, 其防治效果均与对照呈显著差异。

B24-14 菌株的鉴定中, 16S rDNA 分类方法具有简便快速准确等特点, 但是在 16S rDNA 片段的基因库的对比中, 相似率达到 99.8% 的有 3 个菌种, 分别为 *B. cereus*, *B. thuringiensis* 和 *B. anthracis*, 为近缘种, 所以要进一步确定 B24-14 的分类地位仍然要与传统的分类方法结合才能最终确定 B24-14 菌株是否为 *B. thuringiensis*。

*B. thuringiensis* 产生的外毒素的类型很多, 目前根据其外毒素的作用对象不同, 已经报道的外毒素可以分为 4 类:  $\delta$ -Exotoxin,  $\epsilon$ -Exotoxin, M-Exotoxin 及蚁因子。虽然已经明确了外毒素基因的编码, 但是其分子结构至今仍不明确, 人们只是以外毒素中共同的分子结构即模式结构作为研究对象; 所

以同一苏云金杆菌产生的外毒素的种类及其具体活性结构、防治线虫机制以及大田防治植物寄生性线虫的效果仍有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 喻子牛. 苏云金杆菌[M]. 北京: 科学出版社, 1990. 6
- [2] Burgerjon A, Barjac H D. Another serotype of *Bacillus thuringiensis* which produces thermostable toxin[J]. J Invert Pathol, 1967, 6: 381
- [3] Hall I M, Hunter D K, Arakawa K Y. The effect of the  $\delta$ -exotoxin fraction of *Bacillus thuringiensis* on the citrus red mite[J]. J Invert Pathol, 1971, 18:359 ~ 362
- [4] Krieg A, Langenbruch G A. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. Microbial Control of Pest and Diseases 1970-1980 [M]. London: Academic Press, 1981. 837 ~ 896
- [5] Krieg A, Huger A M, Schnetter W, et al. *Bacillus thuringiensis* var. *san Diego* strain M-7 is identical to *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* strain BI256-82, which was previously isolated in Germany and is pathogenic to beetles[J]. J Appl Entomology, 1987, 104: 417 ~ 424
- [6] Bradfish G A. Nematocidal *Bacillus thuringiensis* toxins: opportunities in an animal health and plant protection [J]. Mycogen San Diego, 1992, CA92121:8 ~ 36
- [7] Travis R G, Maureen O. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety[J]. Biocontrol Biosecurity Agre-search New Zealand, 2002, 11:45 ~ 46
- [8] Davidas P, Cibulsky R J, Rehber L. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* exotoxin from nematode control [J]. J Nematologica, 1988, 34:249 ~ 301
- [9] 方中达. 植病研究法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998. 406
- [10] 焦振泉, 刘秀梅. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S-23-SrDNA 间区[J]. 微生物学通报. 2001, 028 (001): 84 ~ 89
- [11] Nishiyama M, Watanabe Y, Marumoto T. Bacterial 16S rDNA sequences in immature volcanic ash soil on Volcanoes Mt. Sakurajima and Mt. Fugen in Japan determined by PCR amplification[J]. J Soil Sci Plant Nutr, 1998, 44(4):711 ~ 715
- [12] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 646
- [13] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000. 415 ~ 416
- [14] Buchanan R E. 细菌鉴定手册[M]. 第 8 版. 北京: 北京科学出版社, 1984