

# 抗虫内生工程菌对亚洲玉米螟的杀虫效果 及其在植株体内的动态变化

段灿星\* 张青文 徐静 熊延坤 周明

(中国农业大学 植物保护学院, 北京 100094)

**摘要** 利用3株转*Bt cryIA (c)*基因的抗虫工程菌,对亚洲玉米螟*Ostrinia furnacalis*进行离体生物测定。结果表明:在相同浓度下,工程菌对玉米螟的杀虫活性均高于*Bt*野生菌株,幼虫死亡率与浓度呈正相关,体重、体长与浓度呈负相关;工程菌RPT40、RPT50、RPT55和野生型*Bt*菌株HD-73对玉米螟的 $LC_{50}$ 值分别为71.26, 36.33, 84.71和172.36  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在以RPT50注射接种的活体生测中,处理株对玉米螟具有明显的抗性,虫体重减轻24.5%~52.3%,体长降低22.6%~64.6%。工程菌RPT50接种玉米10 d后,玉米体内菌量逐步增多,20 d后菌量迅速增加,30 d左右达到最高峰,根、茎、叶中的菌量分别达 $3.7\times 10^6$ ,  $3.0\times 10^6$ ,  $1.3\times 10^6$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ ;此后开始回落,50 d后趋于稳定;60 d后根、茎、叶中的菌量约保持在 $4.0\times 10^5$ ,  $3.5\times 10^5$ ,  $7.0\times 10^4$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 的水平。该菌在玉米根、茎中的分布量明显高于叶片。

**关键词** 工程菌; 亚洲玉米螟; 生物测定; 荧光假单胞菌

**中图分类号** S435.132; S476.11

## Endophytic Engineered Bacterial Insecticidal Activity to Asian Corn Borer and Dynamical Distribution in Corn Plant

Duan Canxing Zhang Qingwen Xu Jing Xiong Yankun Cheo Mingsang

(College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract** The insecticidal activity of three engineered bacteria strains with *Bt cryIA (c)* gene to larvae of Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, was tested *in vitro*. Results obtained demonstrated that the engineered strains of RPT40, RPT50 and RPT55 had a higher insecticidal activity to the corn borer than *Bt* HD-73, a wild *Bt* strain. Larval mortality was positively, while larval weight and length was negatively correlated to concentration of the bacteria.  $LC_{50}$  to larval corn borer for strains of RPT40, RPT50, RPT55 and HD-73 was 71.26, 36.33, 84.71 and 172.36  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  respectively. A corn plant injected with RPT50 also showed an obvious resistance to the corn borer. Weight and length of living larvae were reduced by 24.5%~52.3% and 22.6%~64.6%, respectively. The bacteria number of RPT50 increased gradually within 20 days after inoculation (DAI), and attained a peak approximately at 30 DAI, when the number of bacteria in root, stalk and leaf was  $3.7\times 10^6$ ,  $3.0\times 10^6$ ,  $1.3\times 10^6$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ , respectively. Since then, the bacterial number was decreased and tended to be stable at 50 DAI. There were approximately  $4.0\times 10^5$ ,  $3.5\times 10^5$  and  $7.0\times 10^4$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  in the root, stalk, and leaf at 60 DAI. Based on these results, it seemed clear that the distribution of RPT50 in the root and stalk was strikingly higher than that in the leaf of corn plant.

**Key words** engineered bacterium; Asian corn borer; insecticidal activity; *Pseudomonas fluorescens*

收稿日期: 2002-05-14

国家重点基础规划资助项目(G2000016209)

\* 段灿星, 助理研究员, 研究方向为植物抗虫性与IPM。北京圆明园西路2号

亚洲玉米螟(简称玉米螟)*Ostrinia furnacalis* Guenée 是影响玉米产量和品质的重要害虫,对玉米生产威胁很大。在玉米螟防治中由于长期大量施用化学农药,污染了环境,杀伤了天敌,增强了害虫的抗药性,影响了农业的可持续发展。因此,生物制剂的开发和应用越来越受重视。近年以植物内生菌为载体菌,用DNA重组技术将*Bt*毒素基因转入内生菌体内,构建抗虫内生工程菌,逐步成为生物制剂领域的热点<sup>[1]</sup>。

荧光假单胞菌是植物根围常见的有益细菌,许多菌株有防病增产作用<sup>[2]</sup>。将*Bt*毒素基因转入荧光假单胞菌中<sup>[3,4]</sup>,产生的杀虫晶体蛋白对烟草天蛾、玉米螟、小菜蛾等的幼虫具有显著的毒杀作用。本研究室从1990年开始对植物内生工程菌的研究做了大量工作,构建了棉花<sup>[5,6]</sup>、水稻<sup>[7]</sup>、玉米<sup>[8]</sup>等内生抗虫工程菌;以转座子mini-Tn5为介导,将*Bt cryIA (c)*基因整合到了荧光假单胞菌P303-1的染色体上,构建的工程菌RPT40、RPT50、RPT55等通过酶切分析、PCR扩增、Southern杂交、SDS-PAGE电泳鉴定、ELISA检测后,证实上述重组菌株中均含有*Bt cryIA (c)*基因并能产生约133 kD的原毒素,但对于其在离体和活体条件下对靶标生物的毒力尚未详细报道。为了加速工程菌的应用进程,笔者现对玉米螟的生物测定结果进行报道。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试虫源:玉米螟2龄幼虫、玉米螟卵块,由中国农科院植保所提供。

供试菌株:工程菌株RPT40、RPT50、RPT55<sup>[9]</sup>和*Bt*野生菌株HD-73,由本室提供。

### 1.2 生物测定方法

发酵液的培养和孢晶制剂的制备参照冯书亮等<sup>[10,11]</sup>的方法。

1.2.1 室内离体杀虫效果测定 用盐酸调整发酵液为pH 7.0左右,5 000 g离心10 min,收集菌体沉淀,悬浮在0.1~0.05体积的5%乳糖溶液中,振荡30 min,加入4倍体积丙酮,摇动20 min,离心去上清,再用少量丙酮悬浮,振荡20 min,离心沉淀,重复3次,将所得沉淀(孢晶制剂)风干,用PBS缓冲液(NaCl 0.85%、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.6%、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3%、吐温0.001%)按梯度稀释到指定浓度,拌入玉米螟的人工饲料中<sup>[8,10,13]</sup>,使孢晶制剂的浓度分别为500, 250, 125, 62.5和31.25 μg·g<sup>-1</sup>,以未转入毒素基因的P303-1和PBS(空白处理)为对照,对玉米螟2龄幼虫进行毒力测定,每个浓度处理试虫30头,27℃下饲养,光暗比为16/8 h,48 h后统计死亡虫数,连续观察到第7天,并测存活幼虫的体长和体重。

1.2.2 活体杀虫效果测定 以上述杀虫效果较好的菌株RPT50做进一步研究,将玉米感虫品种郑518种植在温室中4周后,用5种浓度(5.0, 5.0×10<sup>-1</sup>, 5.0×10<sup>-2</sup>, 5.0×10<sup>-3</sup>, 5.0×10<sup>-4</sup> μg·mL<sup>-1</sup>)的RPT50菌剂注射接种幼茎,各浓度接种20株,对照用PBS注射。接种2周后,约在玉米心叶中期将黑头期玉米螟卵块接于心叶丛中,每株接卵2块(约60粒),4周后调查玉米螟为害食叶级别,按国际通用的玉米抗螟性9级分标准进行抗性评价<sup>[12]</sup>。

### 1.3 抗虫工程菌在玉米植株体内动态变化研究

以工程菌RPT50(浓度5.0×10<sup>-2</sup> μg·mL<sup>-1</sup>)处理的玉米株为研究对象,在注射接种10, 20, 30, 40, 50, 60 d后取植株的根、茎、叶(心叶或顶叶)进行分离,方法参照文献[13]。取1 g鲜组织,冲洗后置于70%的酒精中浸2 min,再用0.5%的次氯酸钠溶液(含0.05% TritonX-100)处理3~10 min,无菌水冲洗3次,吸干,置于灭菌的研钵中,加9 mL无菌水研磨,取上清

液稀释。将稀释液接入直径 9 cm 的单抗 LB (基本成分: NaCl 10 g·L<sup>-1</sup>, 酵母提取物 5 g·L<sup>-1</sup>, 胰蛋白胨 10 g·L<sup>-1</sup>, pH 7.5, 利福平 100 μg·L<sup>-1</sup>) 与双抗 LB (NaCl 10 g·L<sup>-1</sup>, 酵母提取物 5 g·L<sup>-1</sup>, 胰蛋白胨 10 g·L<sup>-1</sup>, pH 7.5, 利福平 100 μg·L<sup>-1</sup>, 四环素 10 μg·L<sup>-1</sup>) 平板上, 每皿 0.1 mL, 均匀涂布, 每个处理接 3 皿, 重复 3 次; 28 ℃ 暗培养 24 h, 统计菌落数。

## 2 结果与分析

### 2.1 室内离体杀虫效果测定

用工程菌 RPT40、RPT50、RPT55 和野生菌 HD-73 感染的饲料饲养玉米螟 2 龄幼虫, 第 7 天幼虫死亡率分别为 80.0%、90.0%、76.7% 和 70.0%, 死亡率与浓度呈正相关, 体重、体长与浓度呈负相关; 对照 P303-1 和空白 (PBS) 处理的玉米螟死亡率分别为 16.7% 和 13.3% (图 1), 且发育良好。RPT40、RPT50、RPT55 和 HD-73 的 LC<sub>50</sub> 值分别为 71.26、36.33、84.71 和 172.36 μg·g<sup>-1</sup>, 各菌株的毒力回归方程和相关系数 (表 1) 均表明工程菌对玉米螟幼虫具有显著的杀虫活性。

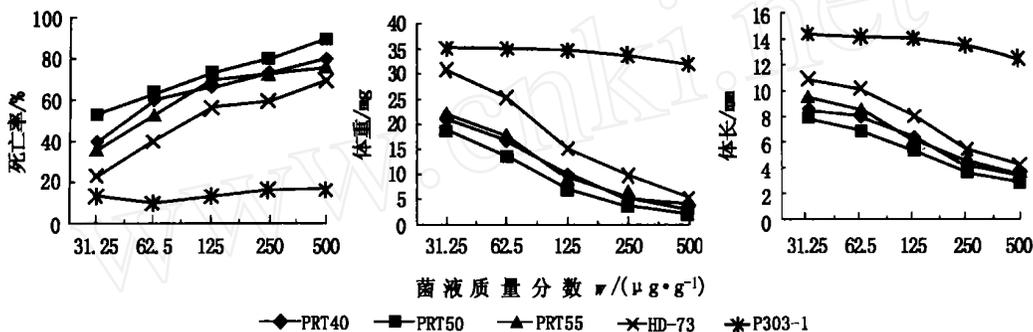


图 1 工程菌与对照菌株的浓度对玉米螟的杀虫效果的影响

表 1 离体生测中各菌株 LC<sub>50</sub> 值

菌株	相关系数 (r)	回归方程式 (Y=)	LC <sub>50</sub> / (μg·g <sup>-1</sup> )
RPT40	0.991 2	3.243 8 + 0.947 8X	71.26 ± 6.96
RPT50	0.993 6	3.435 4 + 1.002 8X	36.33 ± 3.98
RPT55	0.990 6	3.071 0 + 1.000 6X	84.71 ± 7.63
HD-73	0.980 2	2.520 1 + 1.108 9X	172.36 ± 16.98

从各菌株对玉米螟幼虫毒杀作用的统计分析结果 (表 2) 可以看出, 抗虫工程菌 RPT50 对玉米螟幼虫的毒杀作用极显著地高于 RPT40 和 RPT55; RPT40 和 RPT55 的杀虫活性极显著地高于野生菌株 HD-73; HD-73 的杀虫活性极显著地高于 P303-1; 而 RPT40 和 RPT55 之间则无显著差异; 各菌株的不同浓度之间的杀虫活性均有极显著差异。

### 2.2 活体杀虫效果测定

将 5 种不同浓度的工程菌 RPT50 菌剂注射入玉米茎秆后, 处理株表现出了从高抗到中抗等不同程度的抗螟性, 而对照株均表现为感虫型。同时 RPT50 能抑制玉米螟的生长发育, 处理株上玉米螟的体长和体重明显的低于对照株, 与对照相比, 虫体重减轻 24.5% ~ 52.3%, 体长降低 22.6% ~ 64.6% (表 3)。

表2 离体生测中各菌株对玉米螟杀虫活性的Duncan's新复极差测验的多重比较

菌株	A 因素(菌株) SSR 检验			B 因素(浓度)SSR 检验			
	幼虫平均死亡率/%	显著性 ( $P=0.05$ )	显著性 ( $P=0.01$ )	质量分数/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	幼虫平均死亡率/%	显著性 ( $P=0.05$ )	显著性 ( $P=0.01$ )
RPT50	71.980 0±7.023 7	a	A	500	70.016 7±6.876 9	a	A
RPT40	64.000 0±6.630 2	b	B	250	63.333 3±6.275 1	b	B
RPT55	62.000 0±6.187 9	b	B	125	58.333 3±5.820 3	c	C
HD-73	50.000 0±5.623 7	c	C	62.5	47.766 7±4.936 5	d	D
P303-1	14.000 0±1.738 6	d	D	31.25	36.650 0±4.057 6	e	E

表3 RPT50 菌剂处理的玉米植株对玉米螟的抗性指标

 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 

指标	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$					
	5.0	$5.0\times 10^{-1}$	$5.0\times 10^{-2}$	$5.0\times 10^{-3}$	$5.0\times 10^{-4}$	CK
被害级数	1	1	3	5	6	8
抗性等级	高抗	高抗	抗	中抗	中抗	感虫
虫重减轻率/%	52.3	42.5	35.6	31.8	24.5	0
体长降低率/%	64.6	53.8	43.6	30.7	22.6	0

注: 虫体重减轻率和体长降低率是指处理株上玉米螟体重、体长的平均值相对于对照株上的减轻或降低率。

### 2.3 工程菌在玉米植株体内的动态变化

抗虫工程菌 RPT50 注射接种后, 最初 20 d 内, 工程菌在玉米植株体内的菌量增加较为缓慢; 20 d 后菌量迅速增长, 约 30 d 左右达到高峰, 此时玉米根、茎、叶中的菌量分别达  $3.7\times 10^6$ ,  $3.0\times 10^6$ ,  $1.3\times 10^6$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 。此后菌量即开始回落, 50 d 后趋于稳定, 60 d 后根、茎、叶中的菌量约保持在  $4.0\times 10^5$ ,  $3.5\times 10^5$ ,  $7.0\times 10^4$   $\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$  的水平(图 2)。由此可见, 工程菌 RPT50 注射接种玉米后, 在根、茎中的分布明显多于叶中, 说明该菌在玉米根、茎中定植力比在叶中强; 同时可看出, 控制玉米螟危害的较好时期应为注射菌剂后的 20~40 d 之间。

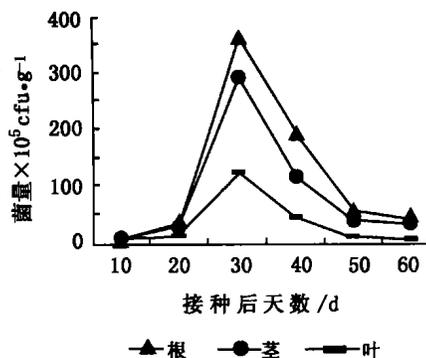


图2 工程菌 RPT50 在玉米各组织内的动态变化曲线

### 3 讨论

1) 抗虫工程菌的离体生测表明其对玉米螟具有显著的毒杀力, 其毒力均高于野生菌株 *Bt* HD-73, 而工程菌的杀虫活性还可通过基因工程手段加以提高(如构建更好的表达载体, 转入 2 个或多个不同的毒素基因等)。

2) 在注射接种的活体生测中, 表明工程菌 RPT50 能在玉米体内定植繁衍, 对玉米螟的危害具有明显的抑制作用, 显示了利用该菌在生产上防治玉米螟的可能性和注射接种方法的有效性。另外, 浸种和喷雾处理也是常用的接种方式, 但效果有待进一步检验。

3) 注射接种后, 工程菌在玉米根、茎、叶中的分布量有一定的差异, 这是由于荧光假单胞菌本身是一种根际内生菌, 根部的微环境可能更有利于该菌的生长繁殖, 因而在根中的分布量多于茎和叶, 茎、叶中的菌量不一致可能也是由于植株内部微环境不一样所致。

工程菌在玉米体植株体内的动态变化表现为先增加后降低, 原因是该菌能定植于植物体

内,随着植株的生长而不断繁殖扩增,同时工程菌还受植物本身遗传调控的影响,抗虫基因容易丢失,从而出现分化,且分化率逐步增大<sup>[14]</sup>,丢失了抗性基因的内生菌在抗性培养基上无法存活,因此,从抗性培养基上长出的工程菌的菌量表现出先增加后降低的动态变化。

在以上工程菌的动态分布研究中,只测定了其在玉米根、茎、叶中菌量变化情况,对于幼嫩雄穗(1代)、花丝、幼嫩籽粒(2代)等几个亚洲玉米螟喜食部位尚未进行试验,因此今后的工作重点是对工程菌在这些部位的动态分布进行的研究,以便进一步确定该菌的抗螟情况。

## 参 考 文 献

- 1 Lampel J S, Canter G L, Dimock M B, et al Integrative cloning expression and stability of the *cry IA (c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* Appl Environ Microbiol, 1994, 60(2): 501~ 508
- 2 彭于发, 陈善铭 荧光假单胞菌 Tn5 诱变株防治小麦全蚀病的初步研究 植物病理学报, 1990, 38(1): 1~ 5
- 3 Obukowicz M G, Frederick J P, Kuniko Kusano-Kretzmeier, et al Integration of the  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root colonizing strains of *Pseudomonas* using Tn5 Gene, 1986, 45: 327~ 337
- 4 张光焰, 张杰, 彭于发, 等 用电激转化法构建杀虫防病荧光假单胞菌 中国农业科学, 1995, 28(4): 8~ 13
- 5 赵同海, 蔡青年, 罗科, 等 棉花内生抗虫细菌的研究 见: 邱式邦主编 中国植物保护研究进展, 北京: 中国科学技术出版社, 1996 684
- 6 段灿星, 张青文, 徐静 杀虫荧光假单胞工程菌对棉铃虫的离体及活体生物测定 中国生物防治, 2002, 18(2): 67~ 70
- 7 刘云霞, 张青文, 周明, 等 Bt 杀虫基因向水稻内生细菌的转化研究 农业生物技术学报, 1997, 5(2): 188~ 193
- 8 徐静, 张青文, 田海月, 等 玉米内生杀虫工程菌对玉米螟的离体及活体生物测定 昆虫学报, 1998, 41(增刊): 126~ 131
- 9 段灿星, 徐静, 张青文, 等 杀虫荧光假单胞工程菌的构建及其杀虫效果的研究 昆虫学报, 2002, 45(4): 419~ 424
- 10 书亮, 付韵琴, 范秀华, 等 几株高效苏云金杆菌菌株对玉米螟、棉铃虫、粘虫和黄地老虎的毒力测定 中国生物防治, 1995, 11(1): 22~ 25
- 11 钟连胜, 谢天健, 吴继星, 等 棉铃虫作供试虫的苏云金杆菌制剂毒力生物测定研究 生物防治通报, 1990, 6(增刊): 1~ 5
- 12 Dolinka B, Chiang H C, Hadzistevic D. Report of the International Project on *Ostrinia furnacalis*, Phase I Results 1969 and 1970 Agri Res Inst Hungarian Acad Sci, Martonvasar, 1973
- 13 Reeser P W, Kostaka S J. Population dynamics of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* (CXC) and a CXC/*Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Bt) recombinant in corn (*Zea mays*). (A bstr). Annu Meet Phytopathol Soc Abstr, 1988, 223
- 14 徐静, 寻广新, 张青文, 等 抗虫工程菌在棉株内的动态变化和抗虫基因分化率研究 农业生物技术学报, 2001, 9(4): 378~ 382