

杀虫遗传工程荧光假单胞菌 IPP202 部分生物学特性*

丁之铨¹ 张 杰¹ 陈中义¹ 黄大昉² 李季伦³

(¹ 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)(² 中国农业科学院生物技术研究中心 北京 100081)
(³ 中国农业大学微生物学系 北京 100094)

摘 要 对遗传工程荧光假单胞菌 IPP202 进行了质粒稳定性检测、抑菌活性测定、在棉花根部和叶面定殖能力分析、杀虫蛋白抗紫外能力检测及田间杀虫活性测定等试验。结果表明,工程菌与出发菌株 P303 相比,其抑菌、定殖等有益于植物的优良特性未发生显著变化;经过连续培养和连续稀释培养后工程菌的质粒都非常稳定;广波长紫外线照射 2 h 后,苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)由于裸露的伴孢晶体杀虫蛋白受紫外线破坏因而杀虫活性大大下降,而荧光假单胞菌工程菌的活性变化不大;IPP202 田间杀虫活性与 Bt 野生菌株接近。工程菌有望解决 Bt 本身存在的杀虫蛋白多以裸露晶体的形式存在而易受紫外线破坏的弱点,同时也发挥了 P303 菌株在多种植物上定殖能力的优点,使其具有在植物周围大量繁殖而直到杀虫作用的优势。通过进一步研究,将有望构建成更有实用价值的工程菌。

关键词:荧光假单胞菌,遗传工程,生物学特性

中图分类号:Q812 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2001)01-0003-06

很多假单胞菌(*Pseudomonas*)作为植物根际微生物具有抑制植物病原菌、帮助植物吸收营养、促进植物生长等有益作用。以荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)为受体构建农业上具有应用前景的工程菌在国外已有产业化的例子^[1]。本实验室将来自苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*,简称 Bt)的两个杀虫蛋白基因 *cry1Ac* 和 *cry2Aa* 导入抑菌活性强、在多种植物根部具有定殖能力的荧光假单胞菌 P303 菌株,构建了高效杀虫、防病工程菌株 IPP202,本文在此基础上对 IPP202 的一些生物学特性进行了深入研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒:见表 1。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and Plasmids

| Name | Characterization | Source |
|---------------------|-----------------------------------------------------------|------------------|
| P303 | Pf strain with root-colonizing and antifungal activity | Prof. Yufa Peng |
| IPP202 | <i>cry1Ac</i> ⁺ , <i>cry2Aa</i> ⁺ | This lab |
| HD73 | Bt wild type strain, <i>cry1Ac1</i> ⁺ | This lab |
| pJMS6 α -lac | Cloning vetor of <i>Pseudomonas</i> Km ^r 4.1kb | Dr. Romer(Spain) |

* 国家“863”高科技项目资助课题(101-03-01-01)

作者简介:丁之铨(1965-)男,浙江省新昌县人,中国农业科学院植物保护研究所助理研究员,博士,主要从事遗传工程微生物及环境微生物研究。

收稿日期:1999-12-03,修回日期:2000-04-06

1.1.2 棉花品种 :中 12、BD134 由中国农业科学院植物保护研究所孙文姬老师提供。

1.1.3 Bt-化学农药混配制剂 新疆农业科学院微生物研究所研制 ,中试产品。

1.1.4 培养基 :LB 液体培养基 ,LB 固体培养基 ,参考 Maniatis 等^[2] ;D6 培养基 :蔗糖 30g ,甘油 1.0mL ,蛋白胨 5g ,酵母粉 5g (NH_4)₂SO₄ 3.0g , NaNO₃ 1.0g , MgSO₄ · 7H₂O 2.0g , K₂HPO₄ 1.0g , NaCl 7.5g , CaCO₃ 2.0g ,用水定容至 1000mL ,pH7.2。

1.1.5 抗生素 :卡那霉素(Km)50mg/mL ,水溶液保存 ,使用浓度 50 μ g/mL ;利福平(Rif) 20mg/mL ,乙醇溶液保存 ,使用浓度 100 μ g/mL。

1.2 方法

1.2.1 连续培养法 待测菌株接种在有 Km 抗生素选择压的 LB 液体培养基中 28℃ 振荡培养过夜 ,以 1% 的接种量转接至不含抗生素的 LB 液体培养基中 28℃ 连续振荡培养 ,分别于 24、36、48、60、72、84 和 120 h 取样 ,按菌浓度稀释 10⁷~10⁹ 倍 ,并分别取 100 μ L 稀释液涂布于不含抗生素的 LB 平板上 28℃ 培养 30~40h ,待长出单菌落后 ,任意挑取 100~200 个单菌落转移至含抗生素的平板上 28℃ 培养 30~40 h ,统计含抗生素的平板上的菌落数 ,计算抗性菌落百分数。

1.2.2 连续稀释培养 活化、转接同 1.2.1 节 ,每间隔 7.5 h 此时细胞处于对数生长期 , OD₆₆₀ = 0.75~0.85)取样 ,并再转接至不含抗生素的新鲜 LB 液体培养基中 ,按菌浓度适当稀释 ,涂布、转接、计算方法同 1.2.1 节。如此转接稀释 7 次 ,以观察在细胞不断分裂繁殖的情况下质粒的稳定性。

1.2.3 工程菌对小麦全蚀病菌的抑菌活性测定 参考文献 [3]。

1.2.4 喷施法分析工程菌在棉花根部、叶面的定殖能力 :采用直径 7cm 高 10cm 的纸制营养钵 ,分别装入自然土和无菌土 ,每钵中播 5~6 粒中 12 种子 ,每处理 6 个营养钵。待棉苗苗龄达约 40d 左右 ,取待测菌培养液(约 10⁹cfu/mL)用自来水稀释 10 倍 ,用微型喷雾器均匀喷施于叶表 ,10d 后再喷施一次。第二次喷施后 10d 从每一处理剪取 6 片健壮叶片(每一营养钵一片) ,用剪子剪取一部分 ,测量叶面积 ,在 10mL 无菌水中漂洗 30s ,再转到 10mL 无菌水中 ,漂洗 10min ,分别取第一次和第二次漂洗后的水经无菌水稀释 10³、10⁴ 倍并各涂布于含 Km 和 Rif 及不含抗生素的 LB 平板上。上述叶子继续在无菌水中浸泡 10h(不振荡) ,再取出在 10mL 无菌水中振荡漂洗 5min ,取 100 μ L 漂洗液涂布于含 Km 和 Rif 的 LB 平板上 30℃ 培养 40 h 左右 ,统计平板上菌落数。从每个菌株处理得到的抗性平板中随机挑取 5 个假单胞菌菌落培养 ,提取质粒、酶切鉴定。

1.2.5 浸种法分析工程菌在棉花根部的定殖能力 :从棉花地采自然土 ,分别用无菌土和自然土制做营养钵 ,每一种工程菌处理的种子均播在两种营养钵里。55℃ 温水浸种 1h ,再于室温下浸种 8h ,保湿过夜 ,再以菌液(约 10⁹cfu/mL)室温下浸种 1 h 后播种。出苗后约 30d ,将营养钵内土壤用清水小心冲净 ,取 2~3 棵苗的须根称重 ,用无菌水将表面稍稍漂洗 ,再转至 5mL LB 液体培养基中振荡漂洗 10 min ,取第二次漂洗后的菌悬液 10 μ L 涂布于含 Km 和 Rif 的 LB 平板上 ,对照则涂于有抗生素和无抗生素选择压两种 LB 平板上 30℃ 培养 40h 左右 ,计平板上假单胞菌菌落数。从中挑取抗性菌落培养 ,提取质粒鉴定 ,方法同 1.2.4 节。

1.2.6 工程菌杀虫蛋白抗紫外线性能测定 HP202 用 D6 培养基培养 ,HD73 用 1/2

LB 培养基振荡培养至晶体释放。将培养好的菌液 3mL 滴加在一个培养皿底部并使均匀散开,自然风干或用吹风机吹干,在广波长紫外灯(无菌室灭菌用灯)下 15cm 处连续照射 2 h,然后再以 3mL 相应培养基将菌体悬浮,对棉铃虫初孵幼虫作室内杀虫活性测定。假单胞菌和 Bt 分别以出发菌株 P303 和清水为对照,调查幼虫死亡率并计算校正死亡率。

1.2.7 工程菌的田间杀虫活性试验 试验棉田位于新疆维吾尔自治区托克逊县夏乡五大队,为头年受棉铃虫危害的重灾区,于第二代棉铃虫卵高峰期喷施药剂,工程菌采用 1×和 10×两个稀释浓度,喷药前调查基数,喷药后分别于 36、60、84、108 和 132 h 调查虫口减退率,计算防治效果。以当地使用的 Bt-化学农药混配制剂 100×稀释液为对照药剂,清水为阴性对照。

2 结果

2.1 工程菌中重组质粒稳定性检测

抗性菌落百分数统计结果见表 2 和表 3。从连续培养法和连续稀释培养的结果看,含重组质粒和空质粒载体的菌株抗性都非常稳定,抗性菌落百分数为 99%~100%。

表 2 连续培养法各重组质粒的稳定性

Table 2 Stability of recombinant plasmids in continuous culture

| Strain | Percentage of colonies with antibiotic resistance/% | | | | | | |
|------------------|-----------------------------------------------------|------|------|------|------|------|-------|
| | 24 h | 36 h | 48 h | 60 h | 72 h | 84 h | 120 h |
| IPP202 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| P303(pJMS6α-lac) | 100 | 99 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

表 3 连续稀释培养法各重组质粒的稳定性

Table 3 Stability of recombinant plasmids in successive diluting culture

| Strain | Percentage of colonies displaying antibiotics resistance/% | | | | | | |
|------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 1 st dilution | 2 nd dilution | 3 rd dilution | 4 th dilution | 5 th dilution | 6 th dilution | 7 th dilution |
| IPP202 | 100 | 100 | 100 | 100 | 99 | 100 | 100 |
| P303(pJMS6α-lac) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

2.2 工程菌对植物病原真菌的抑菌活性

工程菌对小麦全蚀病菌的抑菌圈直径见表 4。IPP202 较出发菌株 P303 的抑菌活性无显著变化。

表 4 工程菌对小麦全蚀病菌的抑菌活性

Table 4 Inhibition effects of engineered Pf to Ggt

| Strain | Diameter of inhibition zone/cm | | | |
|----------------|--------------------------------|----------|----------|---------|
| | Repeat 1 | Repeat 2 | Repeat 3 | Average |
| No inoculation | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DH5α | 0 | 0 | 0 | 0 |
| P303 | 1.7 | 1.8 | 1.8 | 1.8 |
| IPP202 | 2.0 | 1.9 | 1.9 | 1.9 |

2.3 工程菌在棉花叶面的定殖

分离过程中发现了如下现象:叶片经过无菌水漂洗 10 min 后,所培养出的几乎都为芽

孢杆菌(*Bacillus*)菌落 ,由于其生长速度快 ,极少出现其它菌落 ,再浸泡 10h 后将叶片转移至 10mL 无菌水中 ,涂于含抗生素的平板(每处理重复 3 个) ,才长出假单胞菌及其它一些革蓝氏阴性菌的菌落。表 5 列出了此时长出的假单胞菌菌落计数。可以看出 ,IPP202 较出发菌株 P303 在棉叶上的定殖活性无显著变化。任取 5 个菌落提质粒经 *Bam*HI 酶切鉴定正确。

表 5 从棉花叶面分离的工程菌数量

Table 5 Colonization of engineered Pf on cotton leaves

| Sample for spray | Area of leaves /cm ² | No. of Rif ^r and Km ^r Pf/per plate | No. of Rif ^r Pf/per plate | No. of Pf/cm ² leave |
|--------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|--------------------------------------|
| IPP202 ,Sterile soil | 21.06 | 14.0 | NT | 66.48 ^a |
| IPP202 ,Natural soil | 21.84 | 16.7 | NT | 76.47 ^a |
| P303 ,Sterile soil | 21.87 | NT | 22.3 | 101.97 ^b |
| P303 ,Natural soil | 25.20 | NT | 31.7 | 125.79 ^c |
| H ₂ O ,Sterial soil | 24.36 | 1.0 | 1.66 | 4.11 ^a ,6.81 ^b |
| H ₂ O ,Natural soil | 20.06 | 2.0 | 2.0 | 9.97 ^a ,9.97 ^b |

NT :Not detected ; a :Rif^r and Km^r colonies of Pf , b :Rif colonies of Pf

2.4 工程菌在棉花根部的定殖

表 6 为从棉花须根分离到的荧光假单胞菌数 ,可见 IPP202 较出发菌株 P303 在棉花根部的定殖活性也无显著变化。任取 5 个菌落提取质粒 ,酶切鉴定正确。

表 6 从棉花须根分离的工程菌数量

Table 6 Colonization of engineered Pf on cotton root

| Sample for seed soaking | weight of fibre /mg | No. of Rif ^r and Km ^r Pf/per plate | No. of Rif ^r Pf/per plate | No. of Pf/g fibre |
|--------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------------------|
| IPP202 ,Sterile soil | 58 | 56.3 | NT | 4.85×10 ^{5a} |
| IPP202 ,Natural soil | 52 | 41 | NT | 3.94×10 ^{5a} |
| P303 ,Sterile soil | 51 | 18 | 18.7 | 1.76×10 ^{5b} |
| P303 ,Natural soil | 48 | 27 | 27 | 2.81×10 ^{5b} |
| H ₂ O ,Sterial soil | 36 | 0 | 2 | 0 ^b ,2.78×10 ^{4b} |
| H ₂ O ,Natural soil | 14 | 1.3 | 3.3 | 4.64×10 ^{4a} , 1.18×10 ^{5b} , |

NT :Not detected ; a :Rif^r and Km^r colonies of Pf , b :Rif colonies of Pf

2.5 工程菌中杀虫蛋白的抗紫外线能力

从表 7 数据看出 ,经广波长紫外线照射 2 h 后 ,HD-73 的杀虫活性显著下降(随稀释倍数增大 ,下降程度也更大)而工程菌 IPP202 的活性未受到影响。

表 7 紫外对对 Bt 及工程菌中杀虫蛋白活性的影响

Table 7 Influence of UV to insecticidal protein in Bt and Engineered Pf

| Treatment | Decrease rate of larvae mortality after 2h of UV treatment/% | | |
|-----------|--------------------------------------------------------------|------------|-------------|
| HD73A | 1× diluent | 9× diluent | 27× diluent |
| | 13.64 | 63.66 | 88.07 |
| IPP202A | 2× diluent | 2× diluent | 4× diluent |
| | - 9.10 | 0 | 0 |

2.6 工程菌的田间杀虫效果

表 8 列出了工程菌及对照药剂的田间杀虫效果。可以看出 ,IPP202 原液与 Bt-化学农药混配制剂的应用浓度效果相当 ,防治效果分别为 65.5 %和 65.7 %。

表 8 工程菌的田间杀虫效果

Table 8 Insecticidal activity of engineered Pf in field

| Treatment | Population decrease rate after 132h of pesticide application/% | Corrected population decrease rate after 132h of pesticide application/% |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| H ₂ O | 49.6 | — |
| Bt-chemical mixed formulation ,100 × | 82.7 | 65.7 |
| IPP202 ,1 × | 82.6 | 65.5 |
| IPP202 ,10 × | 76.4 | 54.5 |

4 讨论

van der Bij 等研究发现 ,IncP ,IncQ 和 IncW 以及未知不亲和群等四类质粒导入植物根际荧光假单胞菌后 ,在环境中质粒的稳定性以未知不亲和群 pVS1 最强 ,其次是 IncW 的质粒 ,再次是 IncQ ,最不稳定的是 IncP 群的质粒^[4]。由于本文所用的 pJMS6α-lac 复制子来源于与 IncP、IncQ 和 IncW 的质粒都能亲和的 pPS10^[5] ,所以它不属于在环境中不稳定的三个不亲和群 ,因而以它构建的工程菌株有可能在植物根际能稳定存在。从应用角度看 ,这一点对工程菌株在环境中长时间发挥作用是相当有利的。但在环境中稳定性的具体数据尚需进一步试验证实。

P303 菌株在植物根部的定殖能力张玉勋等已有过研究(未发表) ,本文在温室试验中采用更接近自然的非限生(non-gnotobiotic)系统对 P303 以及部分工程菌株做了在棉花叶面的定殖能力研究。结果表明工程菌株和出发菌株 P303 一样 ,在棉花叶面有较强定殖能力 ,在经过长时间用水浸泡之后 ,叶面上仍有相当数量的工程菌存在 ,而此时已无其它明显的优势细菌。试验结果反映出工程菌与野生 P303 菌株比较 ,在植物叶面的定殖能力未受显著影响。另外 ,由于叶片经短时间漂洗后得到的菌落多为芽孢菌 ,说明植物另一类重要生防微生物芽孢菌与植物的结合力显然不如假单胞菌。与出发菌株 P303 相比 ,工程菌在棉苗根部的定殖能力也未受到显著影响。另外 ,由于在 Bt 制剂中杀虫蛋白多以裸露的伴孢晶体形式存在 ,应用后容易受紫外线照射而丧失活力。而将 cry 基因导入其它不形成芽孢的微生物后表达的杀虫蛋白则不会以裸露的形式出现 ,从而延长杀虫蛋白的持效期。本文结果表明 ,紫外线照射后 ,Bt 的杀虫活性大大下降而荧光假单胞菌工程菌的活性变化不大 ,这一结果证明了杀虫蛋白在工程菌中得到了保护。

多年研究结果表明 ,新疆地区由于强紫外线对裸露的杀虫蛋白的破坏作用 ,单纯 Bt 制剂在田间对棉铃虫的防治效果一般仅为 40 %~60 %左右 ,转 Bt cry 基因的工程荧光假单胞菌 IPP202 对植物有益的特性较出发菌株没有根本变化 ,仍然是优良的植物根际促生细菌(Plant growth promoting thizobacteria) ,而室内和田间杀虫活性均与 Bt 野生菌株相当。工程菌中杀虫蛋白抗紫外的室内试验表明其有望克服 Bt 本身存在的弱点 ,同时工

工程菌又能发挥其在植物上的定殖能力,在植物周围大量繁殖而起到杀虫作用。通过对工程菌的进一步遗传改良,并研究其发酵、剂型等,将有望构建成集合防病、杀虫、促生作用等优良性状的、更有实用价值的工程菌。

参 考 文 献

[1] Gilroy T E. European Patent Application , 331470 A2 ,1992.
[2] Maniatis T , Frisch E F , Sambrook J. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press , 1989.
[3] 陈中义 张 杰 曹景萍 等 . 生物工程学报 ,1999 ,15(2) 215~220.
[4] Van der Bij A J , de Weger L , Tucker W T , et al . Appl Environ Microbiol , 1996 ,62(3) :1076~1080.
[5] Nieto C E , Tresguerres F , Sanchez N , et al . Gene , 1990 ,87 :145~149.

SOME BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF GENETICALLY
ENGINEERED INSECTICIDAL *PSEUDOMONAS*
FLUORESCENS *

Ding Zhiquan¹ Zhang Jie¹ Chen Zhongyi¹ Huang Dafang² Li Jilun³

(¹State Key Lab for Biology of Plant Diseases and Insect Pests , Institute of Plant Proection , CAAS , Beijing 100094)

(²Research Center for Biotechnology , CAAS ,Beijing 100081 ,China)

(³Department of Microbiology ,China Agricultural University ,Beijing 100094 ,China)

Abstract : Plasmid stability , Antifungal activity , plant-colonizing ability , UV resistance and insecticidal activity in field were analysed for the engineered *Pseudomonas fluorescens*(Pf) strain IPP202. The results indicated that the recombinant plasmid in IPP202 was very stable after successive diluting culturing and after continuous culturing , There was no significant change in the properties beneficial to plants , such as antifungal activity and plant-colonizing ability as compared with the original strain P303. IPP202 was much more resistant to UV than Bt strain HD73. The control effect in field against cotton boll worm in field was close to that of a locally used Bt-chemical mixture in normal applied concentration. All the data indicated that the engineered Pf strain was a one with prosperous future after further study.

Key words : *Pseudomonas fluorescens* , Genetic engineering , Biological properties

重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。

《微生物学报》编辑部