

# 真菌新型激活蛋白对 Bt 制剂的增效作用

邱德文<sup>1</sup> 杨秀芬<sup>1</sup> 芮昌辉<sup>2</sup> 范贤林<sup>2</sup> 吴青君<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院生物防治研究所 北京 100081)

(<sup>2</sup> 中国农业科学院植物保护研究所 北京 100094)

(<sup>3</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所 北京 100081)

**摘 要** 激活蛋白是从交链孢属(*Alternaria*)真菌分离的新型多功能蛋白,以棉铃虫和小菜蛾幼虫为供试昆虫,用饲料染毒法、浸叶法和浸虫法测定了激活蛋白对 Bt 的增效作用。结果表明,用 Bt:激活蛋白为 1:0.03 的含毒饲料饲喂 2 龄棉铃虫幼虫,其增效指数为 2.2 倍。Bt:激活蛋白以 1:0.095 和 1:0.6 混合后分别浸叶后,饲喂棉铃虫和小菜蛾幼虫,其增效指数分别为 2.7 和 5.5 倍。单独用激活蛋白饲喂棉铃虫幼虫无致死活性,但当 Bt 与激活蛋白以 1:0.75 混合后,毒杀效果显著增强,对 Bt 的增效指数为 18.5 倍。

**关键词** 激活蛋白, Bt, 增效作用

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2004)05-0647-03

从原核细菌过敏蛋白(Harpin)中研究开发的微生物蛋白农药是目前国际上公认的抗虫防病微生物蛋白新农药<sup>[1]</sup>,Harpin 的研究和 Messenger 的成功开发开创了植物分子免疫药物的新领域并促进了微生物蛋白新农药的兴起<sup>[2,3]</sup>。作者首次从真核微生物(*Alternaria*)中分离出一类新型的激活蛋白,该蛋白具有明显的增强植物免疫力,促进农作物增产的作用,对 CMV、TMV 等病毒病的防治效果达 75% 左右(待发表),具有良好的开发前景。近年来,增效蛋白的研究已成为国际研究的热点,研究激活蛋白对鳞翅目害虫的作用,特别是对具有很高市场占有率的苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)的增效作用,将为该蛋白的开发利用展示广阔的前景。本文以棉铃虫(*Helicoverpa armigera* Hübner)和小菜蛾(*Plutella xylostella* Linnaeus)幼虫为测试昆虫,用不同生物测定方法和多种配比测定了激活蛋白对 Bt 的毒杀增效作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试药剂** 50000 IU/ $\mu$ L Bt 原粉,由武汉市 Bt 研究中心提供;3% 真菌激活蛋白粉剂由中国农业科学院生防所蛋白药物工程实验室提供。

**1.1.2 供试昆虫** 棉铃虫(*Helicoverpa armigera*),成虫采自河北棉田,在室内用人工饲料混合繁殖多代,

以 2、3 龄幼虫为供试虫<sup>[4]</sup>;小菜蛾(*Plutella xylostella*)采自北京郊区蔬菜田,在室内用甘蓝叶片饲养多代,饲养温度  $25^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ ,光照周期 16L:8D,采用 3 龄幼虫供试。

### 1.2 饲料染毒法

设激活蛋白、Bt 原粉、Bt 与激活蛋白按 1:0.03 比例混合 3 个处理。按不同处理将各药剂配成系列浓度,分别与人工饲料混合均匀,加入 24 孔试验盒中。选择体重均匀的 2 龄幼虫分别移入孔中,每孔 1 头,加保鲜膜后加盖,置于  $25^{\circ}\text{C} \pm 1.0^{\circ}\text{C}$ 、光周期 L:D = 16h:8h 的培养箱中,每次处理 72 头试虫,每次处理重复 3 次,5d 后检查昆虫死亡率。根据系列浓度的校正死亡率求毒力回归方程,计算  $LC_{50}$  和  $LC_{90}$ ,同时与 Bt 单独处理的结果进行比较计算增效指数。

增效指数 = Bt 原粉的  $LC_{50}$  值 / (Bt 原粉 + 激活蛋白)  $LC_{50}$  值

### 1.3 浸叶法

设 Bt 原粉、Bt 与激活蛋白按 1:0.095 的比例混合饲喂棉铃虫 3 龄幼虫,以 1:0.6 的比例饲喂小菜蛾 3 龄幼虫。将新鲜油菜叶圆片浸入药液 10s,取出后在纸上自然晾干,分别置于 24 孔试验盒中,每孔加入供试虫 1 头。培养条件同上,3d 后检查各处理的幼虫死亡率。

### 1.4 浸叶浸虫法

设激活蛋白、Bt 原粉、Bt 与激活蛋白按 1:0.75

基金项目 国家自然科学基金(30340088)

作者简介 邱德文(1959-)男,湖南人,研究员,博导;中国农业科学院一级岗位人才;从事蛋白药物研究与开发。Tel/Fax 86-10-62139620;

E-mail: qdewenqiu@hotmail.com

收稿日期 2004-02-17,修回日期 2004-05-25

比例混合 3 个处理。分别将油菜叶圆片和幼虫在相同浓度的药液中浸 10s ,待叶片晾干和虫体多余药液吸去后 移入 24 孔盒中 ,每孔 1 叶 1 头。每次处理 72 头试虫 ,每处理重复 3 次 ,以水为空白对照。培养条件同上 ,72h 后检查各处理的幼虫死亡率。

## 2 结果和分析

### 2.1 饲料染毒法测定激活蛋白对 Bt 的增效作用

Bt 与激活蛋白的比例为 1:0.03 ,用饲料染毒法处理 2 龄棉铃虫 120h 后 ,测定的  $LC_{50}$  值与 Bt 单独使用比较 ,增效指数为 2.1 倍(表 1) ,说明激活蛋白粉剂对 Bt 有很好的增效作用。同时 ,用此方法测定激活蛋白粉剂本身的生物活性 ,在 15.6、31.25、62.5、125、250、500 和 1000 $\mu\text{g/mL}$  7 个浓度中 ,5d 后棉铃虫的死亡率在 8.8% ~ 18.8% 之间 ,与对照死亡率

8.3% 没有显著差异 ,说明激活蛋白粉剂对棉铃虫无致死活性。

### 2.2 浸叶法测定激活蛋白对 Bt 的增效作用

Bt 与激活蛋白以 1:0.095 混合进行浸叶处理 ,饲喂 3 龄棉铃虫幼虫 ,激活蛋白对 Bt 的增效指数可达 2.7 倍(表 2)。

### 2.3 浸叶浸虫法测定激活蛋白对 Bt 的增效作用

Bt 与激活蛋白比例为 1:0.75 对 Bt 的增效指数高达 18.5 倍 ,进一步说明了这种新型激活蛋白不仅对 Bt 的增效作用显著 ,而且 随加入比例的增加 ,对 Bt 的增效作用增强(表 3)。

### 2.4 浸叶法测定激活蛋白对 Bt 的增效作用

用浸叶法对 3 龄小菜蛾幼虫的测定结果表明 ,激活蛋白对 Bt 具有显著的增效作用 ,其增效指数高达 5.5 倍(表 4)。

表 1 饲料染毒法测定激活蛋白对 Bt 的增效作用(120h)

Table 1 Enhancement of activator protein on Bt in *H. armigera* with feeding artificial diet (120h)

Treatment	$y = a + bx$	$LC_{50}$ (95% limits) ( $\mu\text{g/mL}$ )	$LC_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Synergistic fold
Bt: Activator protein = 1:0.03	$3.76 + 1.59x$	6.01(4.49 ~ 8.05)	38.67	2.1
Bt powder	$2.99 + 1.82x$	12.63(9.92 ~ 16.08)	64.25	1.0

表 2 浸叶法测定激活蛋白对 Bt 的增效作用(72h)

Table 2 Enhancement of activator protein on Bt in *H. armigera* with dipping cabbage leaf (72h)

Treatment	$y = a + bx$	$LC_{50}$ (95% limits) ( $\mu\text{g/mL}$ )	$LC_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Synergistic fold
Bt: Activator protein = 1:0.095	$2.54 + 0.92x$	484.71(223.70 ~ 1050.25)	12176.41	2.7
Bt powder	$1.75 + 1.04x$	1328.19(592.759 ~ 2976.0893)	22667.61	1.0

表 3 浸叶浸虫法测定激活蛋白对 Bt 的增效作用(72h)

Table 3 Enhancement of activator protein on Bt in *H. armigera* with insect dipping (72 h)

Treatment	$y = a + bx$	$LC_{50}$ (95% limits) ( $\mu\text{g/mL}$ )	$LC_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Synergistic fold
Bt: Activator protein = 1:0.75	$4.51 + 0.81x$	4.08(0.66 ~ 25.23)	158.14	18.5
Bt powder	$3.85 + 0.61x$	75.50(20.51 ~ 277.92)	9326.63	1.0
Activator protein		> 11000		

表 4 浸叶法测定激活蛋白对 Bt 的增效作用(72h)

Table 4 Enhancement of activator protein on Bt in *P. xylostella* with dipping cabbage leaf (72h)

Treatment	$y = a + bx$	$LC_{50}$ (95% limits) ( $\mu\text{g/mL}$ )	$LC_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Synergistic fold
Bt: Activator protein = 1:0.6	$3.29 + 2.39x$	5.20(3.57 ~ 7.57)	17.93	5.5
Bt powder	$2.86 + 1.47x$	28.67(10.29 ~ 79.87)	215.21	1.0

## 3 讨论

1978 年科学家发现在 *Pseudomonas* 属和 *Erwinia* 属含有一种蛋白能够对植物产生过敏反应( Hyper-

sensitive Response , HR ) ,这种蛋白能诱导植物产生持久的系统抗性( System resistance ) ,刺激植物生长<sup>[15]</sup> ,美国 Eden 生物公司已将该转基因工程菌生产的蛋白质开发成生物农药 Messenger ,在取得了良

好的经济效益的同时,生态效益更是无可估量<sup>[2]</sup>。近年来,国内通过遗传工程技术开展 arpin 蛋白基因的研究和应用,取得了一定的研究进展<sup>[6,7]</sup>,为新型生物农药的开发奠定了一定的技术基础。真菌激活蛋白是作者首次从真菌中分离提取了新型的抗虫防病蛋白,具有中国自主知识产权,其分子量、氨基酸及基因序列均有别于细菌蛋白质(Hapin),其制剂能诱导植物对灰霉病、青枯病、烟草花叶病毒病等植物病害的抗性,促进农作物种子萌发和生长,提高作物产量,同时还兼有抗蚜虫和果蔬的保鲜作用,具有更高的科研价值和广阔的开发前景。

本文采用饲料染毒法、浸叶法、浸叶浸虫法 3 种生物测定方法,用重要的农业害虫棉铃虫和小菜蛾幼虫为测试害虫,测定了新型激活蛋白对 Bt 具有明显的增效作用。初步研究结果表明,这种新型激活蛋白对 Bt 具有很好的增效作用,而且随激活蛋白加入比例的增加,对 Bt 的增效作用越趋明显,这一结果在国内外均属首次报道,通过更加系统的增效作用机理的研究,有可能开发出 Bt 的新型增效剂,促

进以 Bt 为代表的生物农药的发展。

## 参 考 文 献

- [1] Qiu D, Clayton K. Messenger enhances plant biomass accumulation. *EDEN Bioscience Technique Review*, 2002, **4**: 1-2.
- [2] Qiu D, Clayton K, Wei Z. Effects of messenger on disease resistance and plant growth in strawberry and cucumber. *Phytopathology*, 2002, **92**(6): S67.
- [3] 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质(中国)2002. 专利公开号: CN1344727A.
- [4] 范贤林, 茹李军, 魏 岑. 一种新型棉铃虫试验盒的设计与应用. *植物保护*, 1998, **24**(4): 41-42.
- [5] Wei Z, Laby R J, Zumoff C H, et al. Harpin elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992, **257**: 85-88.
- [6] 李汝刚, 范云六. 表达 Harpin 蛋白的转基因马铃薯降低晚疫病斑生长期. *中国科学(C 辑)*, 1999, **29**(1): 56-61.
- [7] 李汝刚, 时光春, 范云六, 等. Harpin 蛋白基因的克隆及序列分析. *植物病理学报*, 1998, **28**(3): 281-286.
- [8] Greenberg J T. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, **48**: 525-545.

## Enhancement of A New Activator Protein to *Bacillus thuringiensis*

QIU De-Wen<sup>1\*</sup> YANG Xiu-Fen<sup>1</sup> RUI Chang-Hui<sup>2</sup> FAN Xian-Lin<sup>2</sup> WU Qing-Jun<sup>3</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Biological Control, Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS), Beijing 100081, China)

(<sup>2</sup> Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China)

(<sup>3</sup> Institute of Vegetables and Flowers, CAAS, Beijing 100081, China)

**Abstract**: A novel activator protein was isolated from *Alternaria*. Experiment showed that it could enhance the activity of Bt (*Bacillus thuringiensis*) significantly. The Synergia was 2.2 fold for *Helicoverpa armigera* while 2<sup>nd</sup> instar larvae were fed with artificial medium containing the mixture of Bt and activator at a rate of 1:0.03 (W/W). The Synergia was 2.7 fold for 3<sup>rd</sup> larvae of *H. armigera* and was 5.5 fold for 3<sup>rd</sup> larvae of *Plutella xylostella*, while both insect larvae fed with plant leave pre-soaked in the solution of Bt and activator protein at the ratios of 1:0.095 or 1:0.6, respectively. Test showed that activator protein alone was no insecticidal activity to the larvae of *H. armigera* by insect dipping method, however, 18.5-fold activity enhancement could be obtained while Bt mixed with activator protein at a rate of 1:0.75.

**Key words**: Activator protein, *Bacillus thuringiensis*, Enhancement

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation(30340088)

\* Corresponding author. Tel/Fax 86-10-62139620, E-mail: dlewenqiu@hotmail.com

Received date: 02-17-2004