

土壤来源苏云金芽孢杆菌的形态、 δ -内毒蛋白质及其毒力特性

李荣森 戴顺英 李小刚 赵迎春 孙春娥

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

在透射和扫描电镜下观察了土壤来源的 94 株苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的菌体、鞭毛、芽孢及伴孢晶体的形态。以快速 SDS-PAGE 法分析了全部菌株 δ -内毒素的蛋白质成分。用鳞翅目、鞘翅目及双翅目的 9 种昆虫进行了毒力试验。筛选出了数株杀鞘翅目和杀夜蛾科害虫的高效菌。发现了一些新型伴孢晶体, 其形态和蛋白质成分均未报道过。

关键词 苏云金芽孢杆菌; δ -内毒素; 鞘翅目

有关苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的伴孢晶体的形态结构^[1,2], 形态结构及 δ -内毒素蛋白质性质与毒力特性之间的相互关系^[3-5]等方面曾有较多研究。已有研究的对象大多是从昆虫体内分离到的苏云金芽孢杆菌菌株。近年来, 从我国部分地区的土壤中分离到大量苏云金芽孢杆菌菌株^[6], 它们分属于 14 个血清型及未知血清型。本文主要报道近 100 株土壤来源苏云金芽孢杆菌伴孢晶体电镜下的形态结构、 δ -内毒素蛋白质成分及毒力特性。

材料与 方法

(一) 苏云金芽孢杆菌菌株

自我国西南、西北、中南地区土壤中分离到的 94 株苏云金芽孢杆菌, 经鉴定分属于 H3—H29 血清型的 14 个血清型及无鞭毛型, 另有部分血清型未定。

(二) 电镜观察

7—8 小时菌龄的菌体供营养菌体及鞭毛观察。经洗涤离心 3—4 次的芽孢晶体混合液供孢晶形态观察。样品悬液于复膜的铜网上滴样后, 晾干, 喷涂钨铍合金, 于 JM-100C 透射电镜下观察。

为进行伴孢晶体和芽孢形态的扫描电镜观察, 将洗涤干净的芽孢、晶体悬液, 以离心法将样品沉降于铜网上, 以 2.5% 戊二醛进行前固定, 1% 锇酸进行后固定, 系列浓度酒精或丙酮脱水, 以醋酸异戊酯置换, CO₂ 临界点干燥法干燥, 喷金, 然后于分辨率为 60 Å 的 KYKY Amray 1000B 扫描电镜下观察。

(三) δ -内毒素蛋白质的电泳分析

按李荣森等^[6]以快速 SDS-PAGE 法分析全部菌株的伴孢晶体蛋白质成分。每菌株制成含孢晶混合物(湿重) 10mg/ml 的悬液, 然后每取 20 μ l 进行电泳分析。

本文于 1991 年 5 月 16 日收到。

电镜观察由本所技术室电镜组协助完成; 孙春娥同志为毒力试验主要完成者之一。

(四) 毒力试验

以全部菌株的洗净孢晶混合物对 9 种昆虫的毒效试验, 部分菌株的提纯伴孢晶体对柳蓝叶甲或斜纹夜蛾等进行了半致死剂量的测定。除小菜蛾、黄粉甲及致倦库蚊使用 3 龄幼虫外, 其余供试昆虫皆为 2 龄, 每种浓度处理用虫 25—30 头。28°—30℃ 下饲喂。供试昆虫为: 小菜蛾 (*Plutella xylostella*), 斜纹夜盗蛾 (*Prodenia litura*), 棉铃虫 (*Heliothis armigera*), 粘虫 (*Leucania separata*), 黄粉甲 (*Tenebrio molitor*), 柳蓝叶甲 (*Plagioderia versicolora*), 廿八星瓢虫(马铃薯瓢虫)(*Henosepilachna vigintioctopunctata*), 黄守瓜 (*Aulacophora femoralis*), 致倦库蚊 (*Culex fatigans*)。

结 果

(一) 营养细胞与鞭毛的形态

透射电镜观察和测定表明, 不同血清型菌株营养细胞大小有差异。平均细胞直径 1.19—1.33 μm , 其中 H5、H13 及无鞭毛型细胞直径最小, 平均 1.19—1.22 μm , 自凝型菌株细胞直径较大, 为 1.33 μm , 不同血清型细胞的长度变化更大, 在 2.50—3.37 μm (图版 I)。

除 4 株菌无鞭毛外, 其余均着生周生鞭毛(图版 I), 绝大部分菌株的鞭毛柔软, 其中有的呈螺旋状弯曲(图版 1-7、8), 极少数菌株的鞭毛较刚直(图版 1-6、8、9)。

(二) 芽孢的大小

由图版 II—IV 的电镜照片可知, 各血清型的芽孢形态基本无区别, 经测定其大小也较接近, 平均直径为 0.50—0.56 μm , 长度为 0.96—1.13 μm 。在 H3 型和未知血清型中, 可以分出大、中、小三种类型的芽孢。

(三) 伴孢晶体的形态结构

图版 II—IV 表明, 土壤来源苏云金芽孢杆菌的伴孢晶体, 双锥体类型相对较少, 而有较多的其他形态类型, 如双菱台、球形等, 全部伴孢晶体按形态可归为以下类型。

(1) 双锥体(图版 II-1—5)。(2) 镶嵌型双锥体(图版 II-6—15), 晶体中镶嵌有小双锥体、立方体、球形或长椭球形的镶嵌体。(3) 双菱台体(图版 III-1—8), 伴孢晶体由二个棱台体底面重合而成, 体积较小, 这类菌株所占比例甚高。(4) 立方体(图版 III-9、10), 依菌株不同体积或大或小。(5) 多角体(图版 III-11), 伴孢晶体呈类似多角体病毒的颗粒。(6) 球形或椭球形(图版 III-13—18、20), 依菌株不同, 球状晶体大小不同。(7) 杯状(图版 III-12), 伴孢晶体呈中空的杯状, 在少数视野中可发现杯状体旁边有球形体, 似乎是由空洞处脱出的, 此种形态的伴孢晶体国内外研究者均未报道。(8) 多形态(图版 III-19), 同一菌株产生双锥体、立方体及近球形的伴孢晶体。某些代表性菌株的伴孢晶体, 在较高倍扫描电镜下(图版 IV) 和超薄切片中(图版 V) 形态结构更为清楚。

(四) 孢晶复合物的杀虫范围及其 δ -内毒蛋白质成分的相关性

快速 SDS-PAGE 分析(图版 VI) 及毒力试验结果(表 1) 表明, 双锥体伴孢晶体中含有 130—155kD 的蛋白质, 大多数对小菜蛾低毒或无毒; 镶嵌型双锥体, 按其所含蛋白质可分为三类: (1) 含 130—140kD 和 65—68kD 蛋白质, 占总数 70% 以上, 对鳞翅目高效, (2) 仅含 130—155kD 的蛋白质, 大部对鳞翅目低效或无效, (3) 仅含 43kD 的低分子量蛋白质, 对鳞翅目无效; 双菱台晶体, 大部只含 50kD 的蛋白质, 几乎对所有供试昆虫

表 1 43 种伴孢晶体的蛋白质成分及毒力特性

Table 1 Proteins and toxicities of parasporal crystals in 43 strains of *Bacillus thuringiensis* from soils

伴孢晶体形态 类型 Form of crystals	菌 株 Strain	菌株血清型 Serotype of strain	晶体蛋白质 Protein (MW)	毒力(死亡率%) Toxicity (mortality %)									
				鳞翅目 Lepidoptera				鞘翅目 Coleoptera				双翅目 Dip- tera	
				小 Px	斜 Pl	槐 Ha	粘 Ls	柳 Pv	黄 Tm	守 Af	瓢 Hv	库蚊 Cf	
双锥体 Bipyramid	KA5-01	H5	140,130	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KA32-01	H5	140,130	+++	+	+	+	-	-	-	++	-	-
	SEy13-02	H5	140,130	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KZ12-02	无鞭毛 Nf	140,130	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	KZ16-02	无鞭毛 Nf	140,130	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KS40-02	H7	140,130	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SEb07-03	H7	135,130	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	KZ31-01	H13	148,135	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	YG48-03	H13	148,135	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	YK49-03	自凝 Aa	148,135	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SCg04-02	自凝 Aa	148,135	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H2-03	未知 Nw	43,37	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	HD-1(CK)	H3ab	135,130,68	++++	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-
镶嵌型双锥体 Mosaic- bipyramid	SH11-05	H3	135,130,68	++++	+	+	+	++	+	-	-	-	-
	SCb11-01	H3	135,130,68	++++	+	++++	++++	-	-	-	-	-	-
	YD41-01	H3	135,130,68	++++	+	++++	++++	-	-	-	-	-	-
	YG41-02	H3	135,130,68	++++	++	++++	++++	-	-	-	-	-	-
	YP45-01	H3	135,130,68	++++	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-
	SPy14-01	无鞭毛 Nf	140,130,65	++++	+	++++	++++	-	-	-	-	-	-
	SPy18-01	H5	135,130	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	Sph04-06	H7	140,130	++++	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
	SPh11-05	H21	43	+	-	-	-	++	-	-	-	-	-
	YD37-01	H8	155-135,90-36	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	YGd19-05	H8	155-135,90-36	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	HD-1(CK)	H3ab	135,130,68	++++	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-
双菱台 Bifrustum- pyramid	SPh08-02	未知 Nw	50	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SPh09-02	未知 Nw	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SPh18-01	未知 Nw	50	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SPh15-06	未知 Nw	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SPt08-03	H4	50	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	YGd22-03	未知 Nw	110,36	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	YGd22-05	未知 Nw	110,36	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	YGg01-02	未知 Nw	50	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H3-03	未知 Nw	50	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
立方体 Cube	Y M-03	H8	74,68	-	-	-	-	++++	-	++	-	-	-
	SH22-01	H4	135,130	+++	++	+	+	-	+	?	-	-	-
多角体 Polyhedron	SPh04-04	H22	35	-	-	-	-	++++	+	+	-	-	-

续表 1

伴孢晶体形态 类型 Form of crystals	菌 株 Strain	菌株血清型 Serotype of strain	晶体蛋白质 Protein (MW)	毒力(死亡率%) Toxicity (mortality %)							
				鳞翅目 Lepidoptera				鞘翅目 Coleoptera			
				小 Px	斜 Pl	棉 Ha	粘 Ls	柳 Pv	黄 Tm	守 Af	瓢 Hv
杯状 Cup-like	YK20-05	H22	140,135	-	++	-	-	-	-	-	-
球形、菌球 Sphere or spheroid	SPb16-01	H3	140,135,68,54	-	-	-	-	++	-	++	-
	KZ9-01	H5	140,130,65	+	+	-	-	?	-	-	+
	YK14-01	未知 Nw	145,135,62,54	+	+	?	?	+++	-	-	-
	YP40-05	未知 Nw	150-135,55-28	+	+	-	-	?	-	-	-
	KK10-01	H24	150-135,55-28	+	-	-	-	-	-	-	-
	YK22-01	H3	30,28	+++	-	-	-	-	-	-	+++
多形态 Multi-shape	YH-8A	H7	140,135	++++	++++	++	++	-	-	-	-

注 Note: 死亡率 mortality, (-) 0—20%, (+) 20—60%, (++) 60—80%, (+++) 80—90%, (+++++) 90%; Px——小菜蛾 *Plutella xylostella*, Pl——斜纹夜蛾 *Prodenia litura*, Ha——棉铃虫 *Heliothis armigera*, Ls——粘虫 *Leucania separata*, Pv——柳蓝叶甲 *Plagiodera versicolora*, Tm——黄粉虫 *Tenebrio molitor*, Af——黄守瓜 *Aulacophora femoralis*, Hv——廿八星瓢虫 *Henosepilachna vigintioctopunctata*, Cf——致乏库蚊 *Culex fatigans*.

Nf——无鞭毛 nonflagellum, Aa——自凝 auto-agglutinate, Nw——未知 unknown.

表 2 几个菌株的 δ -内毒素对三种昆虫的毒力Table 2 Toxicities of δ -endotoxins of some strains in three species of insect

试虫 Insect	虫龄 Instar	伴孢晶体 Crystal	δ -内毒素的毒力 (LC ₅₀) 48h, 28℃ Toxicity of δ -endotoxin	
			μg 蛋白质/ml μg protein/ml	μg 蛋白质/g 饲料 μg protein/g diet
斜纹夜盗蛾 <i>P. litura</i>	2	YH-8A	16.25	
		YG41-02	26.19	
		YG48-06	25.10	
		YK49-04	38.54	
		HD-1(CK)	46 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 死亡<50% mortality<50%	
柳蓝叶甲 <i>P. versicolora</i>	2	YM-03	150	
		SPb04-04	540	
		YK14-01	800	
		HD-1(CK)	无毒 nontoxic	
棉铃虫 <i>H. armigera</i>	2	SCb11-1		50.14
		YD41-01		54.50
		YG41-02		48.24
		YP41-01		60.25
		HD-1(CK)		63.58

无效;立方体、多角体及球形伴孢晶体中均有对鞘翅目有高效的类型,其蛋白质成分各不相同;对斜纹夜蛾有高效的仅一种,伴孢晶体是多形态的,对其他供试夜蛾科害虫也有效。总之大部菌株对鳞翅目昆虫无效或毒效很低,与日本研究者的结果类似^[8]。

(五) 提纯伴孢晶体的毒力

10个菌株的提纯伴孢晶体对3种昆虫的毒力测定结果(表2)表明,YH-8A δ -内毒素对斜纹夜盗蛾、YM-03 δ -内毒素对柳蓝叶甲有高毒效,YG41-02、SCb11-01等对棉铃虫有高毒效。

(六) 杀鞘翅目苏云金芽孢杆菌菌株筛选的昆虫模型

在早先的研究中^[6]我们曾利用黄粉甲、廿八星瓢虫、黄守瓜及豆象等鞘翅目昆虫筛选有效菌株,均因敏感性低或不便于人工饲养而不很适合于在我国作为筛选杀鞘翅目苏云金芽孢杆菌的昆虫模型。通过反复试验,选定了柳蓝叶甲作为筛选昆虫模型,柳蓝叶甲一龄幼虫过于敏感,三龄幼虫敏感性又较低,二龄幼虫较为合适,可以用二龄幼虫较准确地测出半致死剂量(表2)。

讨 论

本研究结果表明,土壤来源的苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素,大部(约70%)对鳞翅目昆虫无毒或毒效极低,少数(约5%)对鞘翅目有程度不等的毒效,对双翅目有效的种类仅3%,此外还有约20%的 δ -内毒素对三个目的供试昆虫均无毒效。这说明,尽管土壤中的苏云金芽孢杆菌资源丰富,但要获得高效菌株并不容易。本研究结果还证明,对鳞翅目高效的主要是镶嵌型的双锥体晶体,含130kD和65—68kD的蛋白质。而双菱台和非镶嵌型的双锥体伴孢晶体,绝大部分对鳞翅目低毒或无毒。对鞘翅目有效的菌株,其伴孢晶体形态和蛋白质成分均表现有某些特异性。这些结果对从土壤中筛选高效或特异杀虫的苏云金芽孢杆菌有一定指导作用。值得提出的是,本文提到的一部分伴孢晶体对供试的9种昆虫均无毒,这也许并不等于对其他种昆虫也无毒,这一类伴孢晶体在应用上和 δ -内毒素蛋白质的结构与功能关系的研究上可能有一定价值。已报道的杀鞘翅目的 δ -内毒素蛋白质,分子量不小于70kD^[8,9]。本研究所获得三种杀鞘翅目 δ -内毒素中,有一种仅含35kD的蛋白质,说明其极可能由一种新的基因所编码。

参 考 文 献

- [1] Norris, J. R.: Microbial Control of Insects and Mites, pp.229—246. Ed. by Burges, H. D. and N. W. Hussey, Academic Press, London, New York, 1971.
- [2] 李荣森等:微生物学报,23(4): 343—346,1983。
- [3] 李荣森等:微生物学报,29(6): 397—404,1989。
- [4] Nickerson, K. W.: *Biotechnology and Bioengineering*, 22(7): 1303—1333, 1980.
- [5] Faust, R. M. et al.: *J. Seric. Sci. Jpn.*, 51:316—324, 1982.
- [6] 李荣森等:微生物学报,30(5): 380—388,1990。
- [7] Kikuta, H. et al.: Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control, Proceedings and Abstracts, p. 258, Adelaide, Australia, 1990.
- [8] Krieg, V. A. et al.: *Z. Angew. Ent.*, 96: 500—508, 1983.
- [9] Herrstadt, C.: *Bio/Technology*, 4: 305—308, 1986.

MORPHOLOGY AND δ -ENDOTOXIN PROTEINS OF *BACILLUS THURINGIENSIS* FROM SOILS AND THEIR TOXICITIES TO INSECTS

Li Rongsen Dai Shunying Li Xiaogang

Zhao Yingchun Sun Chune

(Wuhan Institute of Virology, Academia Sinica, Wuhan 430071)

94 strains of *Bacillus thuringiensis* were isolated from soils in southwest and northwest of China. The morphology of cells, spores and parasporal crystals of these strains was investigated under transmission and scanning electro-microscope. Proteins of δ -endotoxins from all strains were analysed by rapid SDS-PAGE. 9 species of insects in *Lepidoptera*, *Coleoptera* and *Diptera* were tested for assay of δ -endotoxins. Some kinds of parasporal crystals were quite different in form and in composition of protein from those reported before. Most of strains were nontoxic to all of 9 species used in bio-assay. Some strains were very effective in species of *Coleoptera* or *Noctuidae*.

Key words *Bacillus thuringiensis*; δ -Endotoxin; *Coleoptera*

图 版 说 明

Explanation of plates

图 版 I

电子显微镜下土壤来源苏云金芽孢杆菌的营养细胞与鞭毛的形态。1. KA5-01; 2. SPh04-06; 3. SPh15-06; 4. YP40-05; 5. H3-03; 6. YG47-02; 7. SCb06-02; 8. KA10-04; 9. SPh04-04; 10. SEy13-02; 11. KZ12-02。

图 版 II

扫描电镜下苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的形态。双锥体: 1. KA5-01; 2. KZ16-02; 3. KS40-02; 4. SEb07-03; 5. SEy13-02; 镶嵌型双锥体: 6. SCb11-01; 7. SCg04-02; 8. SPh04-06; 9. SPh11-05; 10. SPy18-01; 11. SH11-05; 12. YD41-01; 13. YG41-02; 14. YD37-01; 15. H2-03。

图 版 III

扫描电镜下苏云金芽孢杆菌伴孢晶体的形态。双菱台: 1. H3-03; 2. SPh08-02; 3. SPh09-02; 4. SPh18-01; 5. SPh15-06; 6. SPt08-03; 7. YGg01-02; 8. YGd22-03; 立方体: 9. YM-03; 10. SH22-01; 多角形: 11. SPh04-04; 杯状: 12. YK20-05; 球形及椭圆形: 13. SPh16-01; 14. YK22-01; 15. KZ9-01; 16. KZ12-02; 17. YK14-01; 18. YP40-05; 20. KK10-01; 多形态 19. YH-8A (透射电镜投影)。

图 版 IV

高倍扫描电镜下几种伴孢晶体的形态。1. SPh04-06; 2. SPh11-05; 3. YD41-01; 4. YK20-05; 5. YK20-05 (芽孢囊); 6. H3-03; 7. SPt08-03; 8. YM-03。