

华中农业大学

1999届博士学位论文摘要汇编

华中农业大学研究生处
中国 武汉
1999年12月

目 录

B01	核盘 EP-IPN 菌株母力衰退及生防潜能的研究	姜道宏
B02	虫草属真菌及其无性型相关真菌关系的研究	刘作易
B03	苏云金芽胞杆菌高频转化系统的建立及其性能	李林
B04	野油菜黄单胞菌野油菜致病型胞外多糖产生基因簇研究	李有志
B05	苏云金芽胞杆菌帮助蛋白对杀虫晶体蛋白表达的影响	邵宗泽
B06	苏云金芽胞杆菌对鳞翅目昆虫广谱高毒基因工程的构建	鲁松清
B07	苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因和辅助蛋白基因的克隆表	刘子铎
B08	华癭根瘤菌染色体基因和质粒基因群体遗传学比较研究	郭先武
B09	灰色链霉菌 ATCC14811 胆固醇氧化酶的分子生物学研究	周礼芹
B10	链霉菌基因组中 DNA 大片断的基因置换与克隆	白林泉
B11	基因表达水平上水稻杂种优势的分子生物基础研究	熊立仲
B12	两个 I 型聚合酶功能结构域在异源宿主的表达	陶美凤
B13	用分子标记研究水稻重要农艺性状的遗传研究	邢永忠
B14	玉米 CMS 丁线抗体基因文库的构建及 R 区结构和功能分析	张方东
B15	银杏细胞培养、共同黄酮糖苷积累及其 ELISA 技术的研究	姜玲
B16	柑橘原生质体对称和非对称融合研究	刘继红
B17	板栗空苞形成与调节的生理机制研究	周志翔
B18	柑桔遗传多样性的分子评价及起源分类研究	胡春根
B19	红富士苹果外观品质形成与调控技术的研究	孙建设
B20	不同硼带效率甘蓝型油菜硼钙相互作用机理研究	王火焰
B21	冬小麦钼营养特性及钼、氮营养关系和机理研究	胡承孝
B22	中国农户积累消费问题研究	余维祥
B23	农业产业化经营研究	高燕
B24	农户经营的市场交易成本与中介组织研究	何坪华
B25	中国房地产金融市场研究	雷泽
B26	中国农业发展机制研究	高保周
B27	我国农村城市化与土地利用研究	陈平
B28	天然生物活性成分耐缺氧作用及其作用机理研究	李晓莉
B29	海带岩藻糖胶及其生物学效应研究	李德远
B30	香菇蛋白多糖的分离纯化, 结构及其功能特性研究	杨娟
B31	稻谷吸附等温线模型与计算机模拟	文友先
B32	城市土地市场运行及其管理研究	杨钢桥
B33	果酸菌高产菌株选育及产酶条件与酶学性质研究	陈峰
B34	超高产杂交水稻选育及杂种优势和白叶枯病抗性的分子遗传	罗利军
B35	汕优 63 遗传改良的部分性状遗传学基础分析	谈移芳
B36	现代城乡网络化发展模式研究	曾菊新

核盘菌 Ep-1PN 菌株毒力衰退及生防潜能的研究

微生物学

99 届研究生 姜道宏 指导教师 周启

核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary)是一种重要的植物病原真菌,可寄生 75 科 450 多种植物,在我国常年严重为害油菜、向日葵和大豆等油料作物及多种蔬菜作物。由于该菌在病残体上形成的菌核可以在土壤中顽固存活,给防治带来了极大的困难。目前核盘菌引致的作物(包括蔬菜)菌核病仍然依赖于化学农药防治,化学农药防治在一定程度上可确保作物的产量,但也造成了严重的后果,其主要有两个方面:(1)由于长期大量使用农药,核盘菌群体中已出现了抗药性菌株;(2)农药给环境(空气、水和土壤)造成了严重的污染,特别是直接污染了食品(食用油和蔬菜等)。考虑到农业持续性发展的要求,环境问题的紧迫性及食品卫生等诸多因素,降低化学农药使用剂量和频次势在必行。利用抗病品种和生物防治是替代化学农药防治菌核病的最佳途径。但目前这两种措施均没有取得突破性进展,其主要原因是对核盘菌的认识不够。深入了解核盘菌的致病机理及病菌致病力(毒力)衰退的机理将为菌核病的防治研究提供新的思路和线索。

本文对核盘菌 Ep-1PN 菌株的弱毒特性及其相关特性的遗传特点进行了分析,并评估了 Ep-1PN 菌株及其弱毒因子防治菌核病的生防潜能,现将结果报道如下:

获得 272 株 Ep-1PN 的气生菌丝的原生质体再生菌株,并发现它们之中较高频率地出现了具有正常表型和部分正常表型的再生菌株,这表明 Ep-1PN 中的弱毒因子在不同细胞中分布是不均匀的。绝大多数 Ep-1PN 的有性后代(子囊孢子单孢分离物)的培养特性与核盘菌正常菌株的没有显著差异。因此 Ep-1PN 的毒力衰退不是由细胞核遗传物质变异所致,而是由胞质因子所致的。

Ep-1PN 的弱毒特性可以通过菌丝融合向正常菌株(营养体亲和性菌株)转移,使正常菌株表现出 Ep-1PN 的弱毒特性及其相关特性,表明在 Ep-1PN 中存在传染性胞质弱毒因子。

在 Ep-1PN 中可以分离到 3 条 dsRNA 片段,大小分别约是 7.4kb、6.4kb 和 1.0kb,而在正常菌株 Ep-1PNA183 中没有检测到任何 dsRNA。Ep-1PNA183 被 Ep-1PN 感染后,表现出 Ep-1PN 的特性,同时也可以自其中分离到 3 条类似于 Ep-1PN 的 dsRNA 片段,表明 Ep-1PN 中的 dsRNA 与弱毒特性紧密相关。其中 7.4kb 的 dsRNA 可能与弱毒特性没有直接的关系,而 6.4kb 和 1.0kb dsRNA 对寄主均有不同程度的影响,后者可能就是弱毒因子。

Ep-1PN 的单菌核分离物可不同程度地恢复生长和致病作用,来自 Ep-1PN 同一

菌核的分离物中也有类似现象,这表明核盘菌有可能借助其休眠体——菌核摆脱弱毒因子的影响。

在 Ep-1PN 中分离到 2 株能够抵御弱毒因子(dsRNA)作用的突变株,即 SSB9 和 SA12^M,它们与 Ep-1PN 有很大的差异,并可在其中检测到 1 条 7.4kb 的 dsRNA。

Ep-1PN 的弱毒特性及其弱毒因子(dsRNA)可以在土壤中或油菜叶面向正常的营养体亲和性菌株(Ep-1PNA183)中转移,使其发生毒力衰退,保护植株免遭毒力株的为害。而且 Ep-1PN 菌丝片段可以在油菜叶面上有效定殖 7d 以上。但 Ep-1PN 不能诱导寄主植物产生抗病作用,也不能通过营养竞争或位点竞争控制非亲和性毒力株的为害。

采用双亲灭活法,对 Ep-1PN 和它的营养体非亲和性菌株 Let-27 的原生质体进行了融合,获得 4 株具有弱毒特性而且能够传染 Let-27 的目标融合子,并可在被目标融合子传染后的 Let-27 中检测到 dsRNA。这表明 Ep-1PN 中的弱毒因子(dsRNA)可以在异源细胞核质中表达和发挥作用;原生质体融合介导可以克服营养体非亲和性的限制作用,拓宽 Ep-1PN 及其弱毒因子(dsRNA)的应用领域。

关键词 核盘菌,生物防治,弱毒性,真菌病毒,dsRNA,Ep-1PN

虫草属真菌及其无性型相关真菌 关系的研究

微生物学

99 年届博士生 刘作易 指导教师 喻子牛教授

虫草属真菌及其无性型相关真菌具有医药、昆虫生防等重要作用。针对我国报道的虫草种类不到世界也报道种的四分之一，虫草属内及其无性型所在属存在分类混乱，有的种有性型和无性型的关系不明确等问题，采用了随机片段长度多态性 (RAPD)，核糖体 DNA (rDNA) 的内转录间区 (ITS) 的限制性片段长度多态性 (RFLP) 及 rDNA 的 ITS 序列分析等分子手段研究上述真菌系统学及其相互间关系，利用诱发微循环产孢，扫描电子显微镜观察，子囊孢子分离等方法来阐述生理发育过程及其形态结构。对 100 多号标本或菌株进行了研究，取得了如下主要结果：

1. 在物种资源上，先后调查了西南地区包括贵州的梵净山和茂兰喀斯特保护区，云南白马雪山，人支雪山，西双版纳热带雨林，峨眉山，西岭雪山等 10 多个不同的生态区域或自然保护区，采集了虫生真菌标本，作了分离研究，发现了虫草新种 3 种：茂兰虫草 (*Cordyceps maolanensis* sp. Nov.)；贵州虫草 (*C. guizhouensis* sp. nov.)；拟布里班克虫草 (*C. brittlebanksoides* sp. Nov.)；4 种虫生有丝分离孢子真菌新种：蜻蜓拟青霉 (*Paecilomyces odonatae* sp. Nov.)；双梭隔梭孢 (*Septofusidium bifusisporum* sp. Nov.)；香棒弯颈霉 (*Tolypocladium barnesii* sp. Nov.)；蝉白僵菌 (*Beauveria sobolifera* sp. Nov.)；通过子囊孢子微循环产孢，子囊孢子发育形态学观察，rDNA 的 ITS 碱基序列分析，模式标本比较观察等生理，形态学和分子生物学综合手段的研究，确定了具有重要经济意义冬虫夏草的无性型是中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*)。采用上述措施初步确定新近报道的尼泊尔虫草 (*C. nepalensis*) 和多枝虫草 (*C. multiaxialis*) 是冬虫夏草的同物异名。根据研究结果对甘肃虫草 (*C. gansuensis*) 和阔孢虫草 (*C. crassospora*) 提出置疑，这两种也可能是冬虫夏草的同物异名。
2. 其他虫草无性型确证：用 ITS 碱基序列分析，子囊孢子分离和组织分离观察培养特征确证了拟布里班克虫草的无性型是大孢绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae* var. *Majus*)，这是首次报道大孢绿僵菌是虫草的无性型。大蝉虫草 (*C. sobolifera*) 已报

道了两百多年，其无性型争论不休，本研究通过 ITS 碱基序列分析，电镜扫描观察，确定它的无性型是蝉白僵菌；用微循环产孢途径证明了双梭孢虫草的无性型是双梭隔梭孢。

3. 临界点干燥处理结合扫描电镜技术清晰地揭示了布氏虫草无性型—布氏白僵菌，古尼虫草无性型—古尼拟青霉，布里特班克虫草无性型—大孢绿僵菌，大蝉虫草无性型—大蝉白僵菌，茧虫草无性型—茧草玛利亚霉，香棒虫草分离菌株—香棒弯颈霉，蜻蜓虫草分离菌株—蜻蜓拟青霉，峨眉虫草分离株—一种轮枝霉，罗伯茨虫草分离菌株—粉红粘帚霉等的超微结构特征。

4. 利用 rDNA ITS 碱基序列分析对虫草有性型和无性型关系进行了研究，结果表明：布氏虫草无性型—布氏白僵菌，古尼虫草无性型—古尼拟青霉（霍克斯虫草—霍克斯拟青霉），布里特班克虫草无性型—大孢绿僵菌，大蝉虫草无性型—大蝉白僵菌，茧虫草无性型—茧草玛利亚霉，蛹虫草—蛹草拟青霉，冬虫夏草—中国被毛孢等有性型和无性型对应关系，从分子生物学水平证明是正确的，本实验中的其他对应关系即沫蝉虫草，峨眉虫草和罗伯茨虫草所对应的培养物在分子水平上差异较大，还有待进一步研究。

5. 利用 rDNA ITS 碱基序列分析对虫草属系统发育关系进行了研究，发现：A. 从总体上讲，分子系统比较符合常规的分类系统，把子囊壳埋生和子囊壳非埋生或半埋生的两类分开，说明埋生是一很重要的特征，半埋生和非埋生的系统发育上是比较接近的特征。B. 在埋生类群中，子囊壳斜埋生的种即属于新虫草亚属的沫蝉虫草和双头虫草，以及虫草亚属的下垂虫草都被归到一个类群之中，从 DNA 水平也充分说明形态学上的一致性。C. 在子囊壳非埋生的类群中，除了大团囊虫草和 *C. cantheraloides* 的子囊壳为埋生型外，其他均为非埋生型的。在各小类群中可见：无论来自中国或英国的下垂虫草和均无差异；冬虫夏草，尼泊尔虫草和多枝虫草几乎无差异地归在一起；来自四川和皇家植物园保存的大蝉虫草，尽管它们的序列不完全相同但被归为一类，该种具有很大的相似性；其他种相互间从分子水平差异较大。

6. ITS RFLP 分析结果表明：双孢绿僵菌和柱孢绿僵菌应是一个种，代氏虫草的无性型—代氏绿僵菌和贵州绿僵菌也应该是一个种。古尼拟青霉和霍克斯虫草的无性型—霍克斯拟青霉是一个种。它们具有几乎完全相同的限制性片段谱带。绿僵菌属 RFLP、虫草无性型 RFLP 和拟青霉属 RFLP 都能明显地把不同的种相互区别开来。

7. 基因组 DNA 随机片段扩增分析 (RAPD)，这一方法是对整体 DNA 进行分析，是很灵敏，即使在同一种不同的菌株之间，有时都有很大差异。本研究中对绿僵菌属，虫草的无性型，拟青霉属，拟青霉种内不同菌株，虫草有性型与无性型等均作了 RAPD 分析，对种间的区别不如 RFLP 和 ITS 碱基序列分析容易，但对种内不同菌株间的区别效果好。

关键词：虫草，无性型，分子生物学，SEM，绿僵菌，拟青霉，RAPD，RFLP，ITS

苏云金芽胞杆菌高频转化系统的 建立及其性能

微生物学

95 级博士研究生 李 林 指导教师 李阜棣 喻子牛

本研究通过筛选苏云金芽胞杆菌受体菌和对受体菌电脉冲转化条件的研究，建立了一种苏云金芽胞杆菌的高频转化系统，并对该系统表达几类常用苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因的性能、受体菌的形态学、生理生化 and 遗传学特性等方面进行了研究。

分别用溴化乙锭诱变处理、逐级升温培养以及用 SDS 作为质粒消除剂处理等三种处理方法对苏云金芽胞杆菌无晶体 (Cry⁻) 突变株和无质粒突变株进行了筛选研究。用限量培养基和 42℃ 培养 9 株苏云金芽胞杆菌野生菌株，结果筛选到 9 株 Cry⁻ 突变株；继续升温至 44℃ 来培养其中的三个 Cry⁻ 突变株，结果得到内生质粒被进一步消除的突变株。然后进一步升温至 46℃ 来培养突变株 BMB170，并用 SDS 处理，最终筛选到 1 株无内生质粒的突变株，即 BMB171。对出发菌株 YBT-1463 和其无质粒突变株 BMB171 的部分形态、生理生化 and 遗传学特性进行的比较研究的结果表明，突变株 BMB171 不形成伴胞晶体，但在个体形态与菌落特征、对红霉素等 10 种抗生素的敏感性、对葡萄糖等 19 种碳源和谷氨酸等 12 种氮源的利用能力及生长性能与出发菌株 YBT-1463 无明显差异。用 pHT3101 等 5 种供体质粒电转化 BMB171 的效率比电转化 YBT-1463 的效率显著提高，而转化导入的 3 种外源质粒在 BMB171 中的稳定性也明显高于出发菌株 YBT-1463。

对用电脉冲法转化苏云金芽胞杆菌受体菌 BMB171 优化条件的研究表明, 采用 SG 溶液作电脉冲缓冲液, 用 10.0 kV/cm 的脉冲场强和 1 次电脉冲(4.6ms), 以及采用对数前期(OD_{550} 约 0.2~0.3)收获的受体菌, 可以达到最高转化频率。转化频率随质粒 pHT3101 浓度的增加, 在 54.69 pg/mL 至 3.50 μ g/mL 范围内呈线性增加, 随后达到饱和。

通过将苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因 *cryIAa1*、*cryIAC10* 和 *cryICA* 转移至不同质粒载体上, 分别构建了重组质粒 pBMB121L、pBMB9821L 和 pBMB986L, 并分别导入无质粒突变株 BMB171, 筛选得到携带相应重组菌株。

研究了苏云金芽胞杆菌 Cry 突变株和无质粒突变株 BMB171 的转化性能和表达性能。用 pHT3101 等 4 种外源质粒转化含不同内生质粒数的 Cry 突变株的结果表明, 受体菌内生质粒数越少, 转化频率越高。几种重组质粒的转化突变株 BMB171 转化频率的大小与质粒大小及复制子类型有关。用 pHT3101、pBMB3305、pBMB1736、pBMB671、pBTL-1 和 pHV1249 等 6 种外源质粒电转化无质粒突变株 BMB171 的转化频率, 分别是 Bt-4Q7、Bt-4D10 和 Bti.IPS.78/11 等 3 种常用受体菌相应最高转化频率的 2~3500 倍。无质粒突变株 BMB171 表达 *cryIAC* 基因的表达量高于 Bt-4Q7, 略低于 Bt-4D10 和 Bti.IPS.78/11, 而表达 *cryICA* 和 *cry3Aa* 的表达量高于这 3 种对照受体菌。对小菜蛾 3 龄幼虫和甜菜夜蛾初孵幼虫的毒力测定结果表明, BMB171 表达 *cryIAC* 基因的杀虫毒力高于 Bt-4Q7 和 Bt-4D10, 略低于 Bti.IPS.78/11; 而 BMB171 表达 *cryICA* 基因的毒力高于这 3 种受体菌。

对转座子 mini-Tn10 在苏云金芽胞杆菌野生菌株 YBT-1463 及其无质粒突变株 BMB171 中的转座作用进行了初步研究。结果表明, 携带 mini-Tn10 的转座载体 pHV1249 能在菌株 YBT-1463 中复制, 且对其内生质粒无明显影响, 但很不稳定; 转座子 mini-Tn10 可以 1.2×10^{-5} 的频率在 YBT-1463 中转座, 但在 BMB171 中未观察到转座效应。

野油菜黄单胞菌野油菜致病型胞外多糖产生有关的一基因簇的鉴定和分析

微生物分子遗传

98 届博士研究生 李有志 指导教师 马庆生 教授

野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; 简称 Xcc) 是十字花科作物的重要致病菌, 该菌产生的胞外多糖 (Extracellular Polysaccharides; EPS) 商业名称为黄原胶 (xanthan gum)。EPS 不仅被认为是致病因子之一 (Goplin and Cook 1990), 而且在工业、食品、医药等领域有广泛的用途, 商业价值很高 (Sutherland 1993)。过去的研究工作主要集中于 EPS 的生理学及其生物合成途径 (Sutherland 1993), 并已克隆到许多与 EPS 合成相关的基因簇, 并完成部分基因的测序分析 (Coplin and Cook 1990)。然而由于 Xcc 的 EPS 是一种十分复杂的多聚杂多糖, 其重复单位是由 2 份葡萄糖 (Glu)、一份葡萄糖酸 (GlcA) 2 份甘露糖 (Man) 组成的戊糖, 因此生物合成过程的许多细节仍然不十分清楚。

本研究构建了 Xcc 8004 菌株染色体基因组 9.4kb HindIII DNA 片段的 6 种 DNA 限制性内切酶 (BamHI, EcoRV, KpnI, HindIII, SacI 及 SalI) 酶切图谱。通过转座子 Tn5gusA5 饱和式插入诱变该 DNA 片段, 分离得到 15 个在该片段上不同位置的转座子独立插入。通过标记置换将转座子引入到野生型菌株 8004 染色体相对应位置后得到 12 个只在某一位置突变的标记置换突变株。根据培养基平板检测及液体发酵测定, 这 12 个突变株是胞外酶产量未受影响, 液体培养生长能力与 8004 相似, EPS 产量减少的突变体 (EPS⁻)。在这 12 个突变体中 Tn5gusA5 是插在 9.4kb HindIII DNA 片段三个连续的 EcoRI 片段。上述结果充分表明 9.4kb HindIII DNA 片段上存在一个与 EPS 生物合成相关的基因簇。

利用三亲本接合方法, 将含有 9.4 kb HindIII DNA 的重组质粒 pMT46BP 及载体 pIJ3200 分别导入 8004 菌株, 形成 8004/pMT46BP 及 8004/pIJ3200。在含 4%(w/v) 葡萄糖的 200ml NYGB (盛于 500ml 三角瓶中) 28℃, 摇床 (200rpm) 培养发酵, 离心 (25000×g) 30 分钟除去菌体, 在上清液中加入 2% (w/v) KCl 使其终浓度为 1% 及 2 倍体积的无水乙醇, 充分混匀后离心 (25000×g) 30 分钟沉淀 EPS, 42℃ 烘干称重。结果表明 EPS 产量 (mg/ml): 培养 36 小时, 8004/pMT46BP、8004/pIJ3200 (对照 1) 及 8004 (对照 2) 几乎一致; 48—100 小时, 8004/pMT46BP 明显高于对照 1 及对照 2; 144 小时, 8004/pMT46BP 产量最高, 比对照 1 和 2 高出 2.8 倍。这说明, 9.4kb DNA 片段有极显著的后增产作用。增产原因很可能

是增加了受体菌 8004 中与 EPS 合成相关基因的拷贝数, 而且似乎只有经过一个“适应”期后, 该片段上的基因才能“完全、充分”表达, 所以发酵培养后期增产效果更为明显。

根据 Entrez nucleotide Query 数据中搜寻, 与 *Xcc* 的 EPS 生物合成后期过程相关的基因是存在于 16075bp DNA 上的 13 个 *gum* 基因 (*gumA—M*) (索取号 XCU22511)。并且相应基因产物蛋白已被鉴定 (Vanderslice et al. 1989)。我们对 9.4kb HindIII DNA 中的 1.88kb EcoRI—DNA 片段进行了测序分析, 结果表明, 这一 EcoRI DNA 片段与 *Xcc gum* 基因有 98% 的一致性。有两个真实的 ORFs: 642bp 的 ORF2 及不完整的 288bp 的 ORF1。ORF2 推断性编码产物是 213 个氨基酸组成的多肽, 在氨基酸水平与 *Xcc gumB* 基因的 GmB 蛋白有 100% 一致性。ORF1 推断性编码产物是 75 个氨基酸组成的多肽, 在氨基酸水平上, 与 *Xcc gumA* 基因的 GmA 蛋白 100% 一致性。迄今为止, 对于 *gumA* 及 *gumB* 基因及其产物蛋白在 EPS 生物合成中的具体作用仍未有一个准确地解释。*gumB* 基因可能与糖苷聚合或 EPS 的输出相关。*gumA* 基因是一种作用范围较广的调控基因, 编码的蛋白常被称之为整合寄生因子 α (IHF α), 在大肠杆菌中是由 *hmlA* 基因编码。

胞外多糖 EPS 不仅是 G⁻细菌抵御不良环境的屏障而且也是致病因子之一。长期以来, 对 *Xcc* 致病性机理研究总是与它所产生的 EPS 联系在一起。*Xcc* 是一种十字花科植物的维管束病害, *Xcc* EPS 特点之一是粘度较高, 能够延缓水份和养分运输或者堵塞植物维管束系统, 这是 *Xcc* 重要致病机理之一 (Daniels and Leach 1993)。1986 年 Barrere et al. 指出 *Xcc* 的 EPS 缺失突变体仍然具有致病性。1988 年, Ramirez et al. 研究 *Xcc* 在甘蓝上的毒性与 EPS 产量间的关系后, 提出 EPS 最终产量与致病性强度有正相关关系。1989 年, Daniels et al. 报道指出 EPS 在 *Xcc* 对萝卜幼苗的致病过程中没有作用。1997 年, Chou et al. 研究证实, *Xcc gumB* 基因突变体在甘蓝上仍然致病, 只是毒性降低。这也是首次明确地提出某一具体的 EPS 生物合成相关基因对 *Xcc* 致病性的影响。正因为如此, 对于 EPS 的致病作用的认识曾莫衷一时, 现在许多的研究结果似乎都支持这样一个观点: “EPS 对 *Xcc* 的致病性有影响”, 至于影响程度的大小和方面, 仍然未达成共识 (Coplin et al. 1999)。本研究中所构建的 EPS 突变体中有 6 种突变体的菌落在 NYGA 平板上表现为平铺、干燥、无光泽。在 9 个系列梯度接种浓度 ($OD_{600}=0.01-1.2$)、剪叶接种条件下, 4 种 EPS 突变体不能致病, 2 种突变体的致病性明显减弱, 致病叶时 (株) 率均低于对照 8004。相对于不致病的 4 种 EPS 突变体, 2 种仍具致病性 EPS 的 EPS 产量相对较高, 这似乎预示着 EPS 产量与致病性有一定的相关性; 结果也表明, 在一定范围内, 接种浓度与致病叶 (株) 率是正相关关系。在接种浓度 $OD_{600}=0.7$ 时喷雾接种结果表明: 剪叶接种时不致病的 4 种 EPS 在喷雾接种条件下也不致病, 它们丧失了气孔入侵能力。在剪叶接种时致病的 2 种突变体喷雾接种也能致病, 它们丧失了气孔入侵能力。但致病性明显地低于对照 8004。上述结果表明, EPS 产量对 *Xcc* 致病性有重要的影响。本研究首次证实 *gumB* 基因的 EPS 突变体失去了气孔入侵能力并提供了 *Xcc* 气孔入侵的电镜观察证据。

gus 基因现已作为标记或报告基因广泛地应用于转基因植物研究 (Curtis et

al. 1997)。主要是因为包括十字花科在内的许多已被检测过的植物体中无 GLS 活性; *gus* 基因表达后产生 B-葡萄糖苷酶遇到 X-Gluc 发生肉眼可见的蓝色生色反应, 因此十分便于检测特定的目标菌。迄今, 还没有关于 *gus* 基因在 *Xcc* 致病性研究中的应用报道。采用高接种浓度 ($OD_{600} > 10^{10}$) 剪叶接种, 对本研究构建的 2 种能表达 *gus* 基因的 EPS 突变体和含有能表达 *gus* 基因的重组质粒的 8004 对照菌株在萝卜上的侵染路线也做了探索性研究 (相关资料及图片在本论文中出示)。研究结果初步表明: EPS 突变体与 8004 的侵染路线及速度几乎基本一致。接种 24 小时, 菌体从剪叶接种处沿主脉向叶的侧脉及叶柄基部扩展; 48 小时后, 菌体主要分布于整个叶柄并接近叶柄基部; 72 小时, 大部分菌体已由接种处转移至叶柄基部与之相连的茎内, 并沿维束上、下“分流”转移; 96 小时菌体已遍布全茎并向连体的未接种叶扩展; 120 小时, 菌体进入顶部新叶及花器组织。124-216 小时, 菌体开始进入茎根交界处并逐渐抵达根部并最终抵到根尖、根毛顶端。以上结果说明 *Xcc* 是一种局部侵染系统性维管束致病菌。Swings et al. (1993) 在其著作中指出 *Xcc* 可以由根部入侵, 但未指出由叶部侵入的菌体是否可以进入花器及根组织。本研究结果表明由于叶子局部入侵的 *Xcc* 的扩展, 寄主萝卜很可能无花或败育, 或者此种侵染最终导致种子带菌, 进入根部的菌体有可能进入根围土中。尽管这是一个尚需进一步证实而有趣的研究课题, 但至少提示我们在预防该菌时, 应注意清除大田中的植株残根、土壤消毒、实行轮作倒茬等措施。

苏云金芽胞杆菌帮助蛋白对杀虫晶体蛋白表达影响的研究

微生物学

99 届毕业生 邵宗泽 导师 喻子牛 教授

本文研究了以色列亚种的 20kDa 帮助蛋白对库斯塔克亚种 *cryIAc* 杀虫晶体蛋白基因表达及伴胞晶体形成的影响及其作用机制, 构建了携带 20kDa 帮助蛋白基因的位点专一性重组质粒, 并在此基础上构建出了三株杀虫晶体蛋白高效表达的苏云金芽胞杆菌工程菌。

1. 20kDa 帮助蛋白对 CryIAc 大量表达及伴胞晶体形成的影响

本实验主要研究了有 20kDa 帮助蛋白对 CryIAc 表达和伴胞晶体形成的影响。发现 CryIAc 蛋白从开始合成到晶体形成的整个芽胞形成期内均可被胞内蛋白酶降解, 20kDa 帮助蛋白能够防止 CryIAc 初生肽的合成过程中的降解但不能阻止合成后的 130kDa 原毒素的降解。在 20kDa 帮助蛋白存在的情况下 CryIAc 的表达量是不含 20kDa 蛋白对照菌的 3.5 倍, 形成的双金字塔形伴胞晶体长为 $1.85\mu\text{m}$ 、宽 $0.85\mu\text{m}$, 体积为不含 20kDa 帮助蛋白对照菌晶体的 3 倍, 对初孵棉铃虫幼虫的毒力提高了 1.5 倍。此外还发现, 含有 20kDa 帮助蛋白的转化子的芽胞形成期延长、芽胞脱落滞后。这些结果表明, 20kDa 帮助蛋白对 CryIAc 初生肽起着分子伴侣的作用, 可能通过帮助初生肽的正确折叠或屏蔽其蛋白酶切点而避免了被胞内蛋白酶的降解, 提高了 CryIAc 的表达量并促进了伴胞晶体的形成。关于胞内蛋白酶对杀虫晶体蛋白降解的定量分析及 20kDa 帮助蛋白对 CryIAc 表达和伴胞晶体形成影响的研究, 国内外尚无报道。

2. 位点专一性重组质粒的构建

本实验利用苏云金芽胞杆菌转座子 Tn4430 的位点专一性重组系统, 通过体外重组获得了携带 *cryIAc10* 和 20kDa 蛋白基因的位点专一性重组质粒 pBMB1808 和仅含 20kDa 帮助蛋白基因的位点专一性重组质粒 pBMB1820, 两质粒均为大肠杆菌/苏云金芽胞杆菌穿梭质粒。其共同特点是目的基因 (*cryIAc10*、*p20*) 和 Bt 复制子位于顺式排列的两个 250bps 的解离位点之间, 而红霉素、氨苄青霉素抗生素抗性基因、整合酶基因 *tnpI* 和大肠杆菌复制子等非 Bt 基因则位于两解离位点之外。在 TnpI 的介导下, 通过位点专一性重组就可以在 Bt 中丢失质粒中所有非 Bt 基因。这将为进一步利用 20kDa 蛋白基因构建

高效安全的工程菌打下基础。关于位点专一性重组质粒的构建，国内尚无公开报道。

3. 杀虫晶体蛋白高效表达工程菌的构建

本实验通过电转化法将携带有 20kDa 帮助蛋白和 *cryIac10* 基因的位点专一性重组质粒 pBMB1808 导入到对棉铃虫、小菜蛾等鳞翅目害虫高毒力的三种天然菌株中。所获得的三种转化子的 130kDa 的杀虫晶体蛋白的表达量均为各受体菌的两倍以上。受体菌晶体平均长 1.8 μm 、宽 0.8 μm ，而转化子的伴胞晶体的平均长 2.4 μm 、宽 1.1 μm ，平均体积为其受体菌对照的 2-3 倍，部分转化子晶体长 4 μm 、宽 1.4 μm ，其体积是受体菌晶体平均值的 6 倍。而转化子芽胞由长椭圆形变为小圆球形，位于芽胞囊的一角。进一步分析发现，受体菌在芽胞分化开始约 4 小时后 130kDa 毒素蛋白达到最大，随后浓度直线下降，到芽胞完全形成时有 1/3 的晶体蛋白被降解。而转化子的 130kDa 蛋白在整个芽胞形成期内呈持续的积累状态，到发酵结束时表达量为受体菌的 2 倍。但是，转化子的伴胞晶体对初孵棉铃虫幼虫的毒力不但没有提高，反而严重下降。这可能是伴胞晶体在昆虫体内溶解困难所致。此外，还发现供体质粒的 DNA 在少部分受体菌中的修饰作用，及其由此引起的位点专一性重组能力的丧失。本实验将帮助蛋白基因置于解离载体中用于天然菌株的改造，并获得了杀虫晶体蛋白的超量表达和巨大伴胞晶体的形成，前人尚无报道。

关键词： 苏云金芽胞杆菌 帮助蛋白 杀虫晶体蛋白 *cryIac* 高效表达
位点专一性重组 工程菌 棉铃虫

苏云金芽胞杆菌广谱高毒基因工程菌的构建

微生物学

研究生 鲁松清 导师 喻子牛教授

本论文主要是围绕构建苏云金芽胞杆菌对鳞翅目昆虫特别是针对甜菜夜蛾的高效广谱基因工程菌而开展的研究工作。研究结果总结如下:

1 菌株对甜菜夜蛾的毒力与基因类型的关系

PCR 扩增检测了九个苏云金芽胞杆菌菌株所含杀虫晶体蛋白(Insecticidal Crystal Protein, ICP) 基因, 根据扩增结果将它们分为 5 种基因类型。高毒力菌株属于基因类型 1 和 2。基因类型 1 含 *cryIAa* 和 *cryIAc*, 基因类型 2 含 *cryIAa*。这一结果为基因工程菌的构建提供了理论依据。国内尚未见基因类型与毒力关系的相关报道。

2 依赖芽胞形成 ICP 的 *cryIC* 启动子 (P_{IC}) 对野生菌株特性的影响

将带 P_{IC} 及 *cryIC* 的质粒 pBMBLC 分别转入野生菌株 YBT-1535、YBT-1520 和 YBT-833。结果菌株 YBT-1535 的转化子对甜菜夜蛾的毒力有非常显著的提高(8 倍以上), 对棉铃虫和小菜蛾的毒力影响不大, 转化子的综合毒力高于 YBT-1535。菌株 YBT-1520 的转化子不论是对棉铃虫还是对小菜蛾的毒力均有不同程度的下降, 对甜菜夜蛾的毒力也无大的变化。质粒 pBMBLC 电脉冲转入菌株 YBT-833, 得到了几个 ICP 基因背景不同的转化子, 它们的综合毒力较出发菌 YBT-833 都没能得到提高。综合这三个菌株的实验结果, 虽然菌株 YBT-1535 转化子的综合毒力有所提高, 但那是建立在 YBT-1535 较低毒力水平之上的, 转化子的毒效离实际应用相差甚远, 工程菌构建的基本思路可能需作大的改变。将 ICP 基因转入野生菌株国内尚无人报道。

3 非依赖芽胞形成 ICP 的 *cry3A* 启动子(P_{3A})对野生菌株特性的影响

带 P_{3A} 和 *cryIC* 基因的重组质粒 pBMB827 转入 YBT-1520, 转化子对所测昆虫的毒力下降非常明显, 芽胞和晶体也很难脱落。此外, PCR 扩增发现转化子比出发菌 YBT-1520 多了 *cryIAb* 的特异带, SDS-PAGE 电泳证实 CryIAb 的存在。至于为何质粒 pBMB827 的转入导致隐性 *cryIAb* 的表现及表达则不清楚。国内尚未有人报道 P_{3A} 对野生菌株特性影响的相关研究。

4 高毒力工程菌株 YBT-833-2-1 的遗传改造及其特性

对 YBT-833-2 进行无抗性压力选择, 得到一株高毒力工程菌株 YBT-833-2-1。YBT-833-2-1 比其原始出发菌株 YBT-833 少了一条带 *cryIAb* 的质粒。生物测定结果表明, 它对小菜蛾的毒力比 YBT-833 有明显提高($P>0.95$); 对棉铃虫和甜菜夜蛾的毒力比 YBT-833 有大幅上升。与生产菌株 YBT-1520 比较, 除对棉铃虫的毒力存在差距外, 对小菜蛾和甜菜夜蛾的毒力都明显提高 ($P>0.95$)。工程菌株 YBT-833-2-1 的综合毒力明显高于菌株 YBT-833 和 YBT-1520, 它具有极高的商业开发价值。通过消除 *cryIAb* 提高菌株毒力在国内外均未见相关报道。

5 影响菌株毒力的因素

体外将 Cry2 和 CryIAb 分别与菌株 YBT-833, YBT-833-2-1 的胞晶混合物混合测定, 结合 HD-1 与 HD-1-80-21, HD-133 与 HD-133-5 的生测结果, 发现 CryIAb 与其它 ICP 不存在拮抗作用。工程菌株 YBT-833-2-1 毒力远高于 YBT-833 的原因是: a. *cryIAb* 的丢失导致其它 ICP 量的增加(包括 Cry2); b. Cry2 对其它 ICP 的增效作用。本文结果国内外均未见相关报道。

关键词 苏云金芽胞杆菌 工程菌 启动子 协同作用 生物活性

苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白和 辅助蛋白基因的克隆表达

微生物学

98届博士研究生 刘子铎

指导教师 喻子牛 教授

鉴于苏云金芽胞杆菌杀虫剂在农林害虫防治中占有重要地位,国外相继研制出了不同的高效工程菌杀虫剂。然而,我国目前仍处于使用天然菌株进行发酵生产的落后状况。因此,本研究围绕进一步提高苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白产量和杀虫活性,构建工程菌这一主题,进行了以下两个方面的基础研究。

一、苏云金芽胞杆菌杀虫晶体蛋白基因在不同受体菌中的表达

1.将cryI基因高保守区的cryIA(a)EcoR-F片段插入带有T7 RNA聚合酶启动子的质粒pSELECT-1,获得了能在体外转录的RNA探针载体pBPL-1。用该载体制备的RNA探针具有特异性强,背景清楚,省时省力等优点,已成功地用于苏云金芽胞杆菌的分子生物学研究和特异菌株的筛选。

2.利用cryIA(a)EcoR-F片段RNA探针和cryI混合特异引物对本室筛选的苏云金芽胞杆菌菌株YBT803和YBT-791的质粒进行了基因杂交定位和基因型的PCR分析。并将携带有cryIA(b)和cryII基因的38MDa质粒分别电转化到不同血清型苏云金芽胞杆菌无晶体突变株4D10(H_{3ab})和Bti.IPS·78/11(H_{1a})中,证明了相同基因型在不同血清型受体中有不同的杀虫活性。建立了一个利用电转化技术构建遗传改良工程菌的新模式。

3.将含有cryI基因的苏云金芽胞杆菌YBT-803质粒的7.9kb和4.4kb的片段与穿梭载体pX161重组,转化大肠杆菌TG1,获得了克隆株EL-1和EL-2。PCR分析表明7.9kb片段含有cryIA(b)基因,4.4kb片段兼有cryIA(b)和cryIA(a)基因型的特征谱带。对4.4kb片段进行了部分序列分析,获得了基因上游650bp序列的精确酶谱。SDS-PAGE分析表明,EL-1和EL-2均可表达130kDa蛋白质。这一结果表明克隆的两个片段含有完整的结构基因,可直接用于构建基因重组工程菌和进一步的分子生物学研究。同时,将重组质粒pBL-1、pBL-2分别转化苏云金芽胞杆菌无晶体突变株Bti.IPS·78/11和4D10,获克隆株BL-1、BL-2和BL-3。通过SDS-PAGE分析和生物测定,证明了不同载体对表达产物稳定性及杀虫活性有直接影响。

4.为研究杀虫晶体蛋白基因在荧光假单胞菌中的表达特性,利用多寄主质粒pSUP106探索了不同CaCl₂浓度和细胞不同生长时期对转化频率的影响,建立了一个简便易行的转化方法,奠定了异源基因在荧光假单胞菌中克隆与表达研究的基础。