

杀虫微生物

(第一卷)

《杀虫微生物》编委会编
中国微生物学会农业专业委员会编

北京农业大学出版社

杀虫微生物

(第一卷)

《杀虫微生物》编委会编
中国微生物学会农业专业委员会编

中国微生物学会

28日在苏州举行

地反映出我国杀虫

菌，以及应用于防治

菌，不仅会有助于我国杀虫微生物研究工作的深入发展，而且，通过今后

的推广应用，也会取得更高的生态效益和经济效益。有鉴于此，编委会

选录其中反映国内外研究进展的综述1篇和著有成果的课题论文(或简报)

58篇，汇编成《杀虫微生物(第一卷)》，由北京农业大学出版社出版发

行，作为学术交流资料，供同行参阅。

北京农业大学出版社

一九八七年·北京

责任编辑：石 真 熊家国

杀虫微生物 （第一卷）

《杀虫微生物》编辑委员会编

北京农业大学出版社出版发行

北京市海淀区圆明园西路

华中农业大学印刷厂印刷

*

1987年5月第一版 开本：787×1092 1/16

1987年5月第一次印刷 印张：11 14/16

印数：0001—1500 字数：267千字

统一书号：13446·14

定价：2.80元

前言

樊庆笙谨识

1987年3月

中国微生物学会第二次全国杀虫微生物学术讨论会于1986年5月25—28日在江苏常州举行。会上提出的综述报告和课题论文共138篇,比较全面地反映出我国杀虫微生物及其代谢产物的杀虫机理、杀虫效率的研究成果,以及应用于防治害虫的技术方法。可以预期,这些研究成果的讨论交流,不仅会有助于我国杀虫微生物研究工作的深入发展;而且,通过今后的生产应用,也将会取得更高的生态效益和经济效益。有鉴如此,编委会选录其中反应国内外研究进展的综述11篇和著有成果的课题论文(或简报)58篇,汇编成《杀虫微生物(第一卷)》,由北京农业大学出版社出版发行,作为学术交流资料,供同好争鸣。

樊庆笙谨识
1987年3月

编者的话

《杀虫微生物》是一部反映国内外杀虫微生物学研究最新动态和最新研究成果，交流杀虫微生物的生产和应用经验的论文集。它包括杀虫细菌、虫生真菌、昆虫病毒、杀虫素等方面的综述、研究报告和简报。可供从事农业、林业和卫生害虫微生物防治的科技人员参考，并可为有关管理干部，农、林、医学院校师生提供科技信息。

本书的内容取材于1985年5月25—28日在常州召开的中国微生物学会第二次全国杀虫微生物学术讨论会交流的综述报告、研究论文中的一部分。为了避免论文的重复，加之本卷篇幅有限，大会交流的文章未能一一收入，敬请参加会议的代表及作者谅解。

用《杀虫微生物（第一卷）》的书名编辑出版，意在今后将有不定期续卷相继与读者见面。这是一次新的尝试。由于编者水平所限，不当与错误之处在所难免，敬请广大读者批评指正，以便在今后的续卷中得以改进和提高。

在本书的编辑出版中，得到中国农业科学院分子生物学研究室、江西农业大学农学系、华中农业大学土化系、华中农业大学学报编辑部、中国科学院武汉病毒研究所、贵州农学院植保系、中国农业科学院生物防治研究室、武汉大学病毒系及资源应用技术研究所、湖南省微生物研究所、新疆农业科学院微生物研究所的大力支持，谨致衷心的感谢。

编者

1987年3月

编委会成员

- | | | |
|-----|-----------------|----|
| 范云六 | 中国农业科学院分子生物学研究室 | 北京 |
| 欧阳亮 | 江西农业大学农学系 | 南昌 |
| 喻子牛 | 华中农业大学土化系 | 武汉 |
| 张用梅 | 中国科学院武汉病毒研究所 | 武汉 |
| 梁宗琦 | 贵州农学院植保系 | 贵阳 |
| 吴正铠 | 中国农业科学院生物防治研究室 | 北京 |
| 罗绍彬 | 中国科学院武汉病毒研究所 | 武汉 |
| 谢天恩 | 中国科学院武汉病毒研究所 | 武汉 |
| 梁东瑞 | 武汉大学病毒研究所 | 武汉 |
| 刘岱岳 | 武汉大学资源应用技术研究所 | 武汉 |

产 品 介 绍

青虫菌六号液剂

武汉市工业微生物研究所生产的《青虫菌六号液剂》(深圳农业科学研究中心监制),是我国苏云金杆菌的一个新商品剂型,荣获1986年农牧渔业部科学技术进步二等奖。用于防治农、林、牧、果、茶、菜、花卉等的鳞翅目害虫幼虫有显著效果,对人、畜、天敌昆虫、蜜蜂均安全。

微生物杀虫剂——苏云金杆菌

本粉剂对菜青虫、稻苞虫、松毛虫等农林害虫有良好的杀灭作用。具有选择性强,不伤害天敌,害虫不产生抗药性,不污染环境等优点,适用于无公害蔬菜的生产。该产品已出口东南亚一些国家。由林业部洛阳微生物制品厂生产。

76582——淀粉酶

本制剂是固内酶制剂使用最广泛的一个品种,用于啤酒、酒精、饴糖、乳酸、棉纺、印染等行业。由林业部洛阳微生物制品厂生产。

高效细菌灭蚊幼剂

球形芽孢杆菌 BS₁ 对伊蚊、库蚊等幼虫有高效与持效的优点。扬州生物实验厂生产。

苏云金杆菌杀虫素

1. 苏云金杆菌以色列变种 BT.H 14 制品,杀灭伊蚊、库蚊等幼虫有速效,杀蚋有高效。

2. 苏云金杀虫素“青虫灵”,防治蔬菜的青虫、小菜蛾有特效,并可防治刺蛾等果树害虫。

3. 苏云金杀虫素“螟蛾灵”,防治玉米螟、豆荚螟、稻纵卷叶螟等有效。

产品有粉剂、液剂、乳剂,质量采用国际统一标准。由扬州生物实验厂生产。

目 录

前言

编者的话

苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因的分子遗传学.....	(2)
昆虫病原真菌在害虫防治上的应用.....	(12)
昆虫病毒防治害虫研究进展.....	(19)
杀虫细菌研究的新进展.....	(29)
我国病原真菌的研究及其在生物防治中的应用.....	(41)
球形芽孢杆菌的研究进展.....	(48)
白僵菌的研究和应用.....	(55)
苏云金杆菌的晶体蛋白质及芽孢衣中的类晶体蛋白质成分.....	(65)
苜蓿丫纹夜蛾核型多角体病毒的培养、提取、定量和毒力测定.....	(72)
茶树害虫病毒资源的开发利用.....	(76)
苏云金杆菌的开发与利用.....	(81)
苏云金杆菌的溶原性.....	(88)
球形芽孢杆菌有毒株的酯酶图型.....	(91)
热刺激 (HS) 对苏云金杆菌蛋白质合成的影响.....	(95)
两株高毒力球形芽孢杆菌的分离.....	(98)
灭蚊细菌制剂的生物测定 I、确定生物效价的依据.....	(102)
苏云金杆菌菌株间的质粒转移 (初报).....	(110)
速灭杀丁对苏云金杆菌武汉变种 (140) 生长发育及其毒力的影响.....	(113)
感染芽孢杆菌187菌株的致乏库蚊幼虫组织细胞病理研究.....	(117)
肉色拟青霉的分离培养及其防治稻褐飞虱的效果.....	(121)
有味耳霉的分离培养和鉴定.....	(126)
一株与异小杆线虫共生的细菌.....	(129)
杨尺蠖核型多角体病毒血清学特性研究.....	(132)
华山松大小蠹痘病毒的初步研究.....	(140)
菜粉蝶浓核病毒在我国的分布及其活性的研究.....	(143)
球形芽孢杆菌TS—1 丙酮粉对七种蚊虫的毒力测定.....	(147)
黄地老虎颗粒体病毒的田间应用试验.....	(151)
苏云金杆菌以色列亚种抗噬菌体菌株的筛选及生产性能.....	(153)

研究通报

南昌霉素的提取、纯化和鉴别 (155)	通过原生质体融合产生的苏云金杆菌新菌株 (156)
蚊虫病原细菌芽孢杆菌的分离鉴定 (156)	高效蚊虫病原细菌——球形芽孢杆菌TS—1 杀
虫毒素的研究 (156)	缓死芽孢杆菌的一个新变种 (157)
苏云金杆菌与杀灭菊酯对棉虫	种群消长的影响 (158)
球形芽孢杆菌 BS—10的毒效和急性安全性 试验(159)	BS—10菌

粉对几种动物的安全性(160) 蚜虫虫霉的调查和鉴定(160) 热刺激(HS)对苏云金杆菌生活周期和毒力的影响(161) 绿僵菌高致病性菌株的筛选(162) 苏云金杆菌防治稻纵卷叶螟及其致病组织病理观察(163) 不同培养基对187菌的生长发育及毒力的影响(163) 苏云金杆菌MSO7A防治松毛虫的效果(164) 苏云金杆菌对红铃虫的毒力筛选(164) 荔枝上的索线虫(164) 新胜茶场应用油桐尺蠖核型多角体病毒的情况及效益(165) 苏云金杆菌187菌的发酵(165) 枣尺蠖核型多角体病毒致病力研究(166) 杀虫抗生素7180和5472的纯化及其理化性质研究(167) 飞虱虫疫霉的生活史(167) 球形芽孢杆菌伴孢体的显微观察(168) 粘质沙雷氏菌防治水稻害虫的效果(168) 新发现一株八点灰灯蛾核型多角体病毒(169) 茶蚕颗粒体病毒寄主范围试验研究(169) 杀虫素32号与乐果混用防治棉蚜试验(170) 微生物杀虫剂防治蔬菜害虫试验(170) 茶尺蠖核型多角体病毒EoNPV(170) 小菜蛾颗粒体病毒在家蚕细胞系中的复制(171) 三株产晶体芽孢杆菌的分类鉴定及其对蚊幼虫的致病性(172) 应用孔性载体生产白僵菌的初步探讨(172) 苏云金杆菌伴孢晶体的大小和形态结构(172) 苏云金杆菌伴孢晶体血清学的相关性(173) 无鞭毛和不能进行鞭毛抗原凝集反应的苏云金杆菌的初步鉴定(173) 苏云金杆菌MSO7A防治美国白蛾的试验(174) 球形芽孢杆菌10号菌株的几种发酵液对致乏库蚊的毒力(174) 84—1杀虫素的研究(175) 球形芽孢杆菌135—10防治蚊幼虫的野外试验(176) 球形芽孢杆菌10号菌株的生物学特性(177) 球形芽孢杆菌杀虫活性及其影响因素的研究(177) 球形芽孢杆菌1503菌株产生高杀蚊活性的培养基(178) 苏云金杆菌187菌株的 β -外毒素测定(178)

(86)	 印 度 的 金 云 金 杆 菌 (2H) 意 陈 燕
(86)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 高 树 西
(101)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(101)	 (苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(111)	 印 度 的 金 云 金 杆 菌 (2H) 意 陈 燕
(111)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 高 树 西
(121)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(121)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(131)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(131)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(141)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(141)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(151)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(151)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(161)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(161)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(171)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(171)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(181)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(181)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用

(821)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(821)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(831)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(831)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(841)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(841)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(851)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(851)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(861)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(861)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(871)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(871)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(881)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(881)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(891)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(891)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用
(901)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 宝 国 德 生 的 研 究 陈 燕 天
(901)	 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用 苏 云 金 杆 菌 的 生 产 和 应 用

中只一部分为活性的毒性物质。至于BTB的晶体蛋白，不需要经过溶解或蛋白酶水解，本身具有毒性。BTB系双链自动虫，BTB其它各种毒株的自动虫，BTB的生理、化学性质、毒性等，均不同于BTB的其它毒株。在遗传学上，BTB与其它BTB类毒素，是产生不同类型的 δ -内毒素基因。

苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因

分子生物学

苏云金

综述

THE MOLECULAR BIOLOGY OF DELTA-ENDOTOXIN GENE OF

BACILLUS THURINGIENSIS

3. 不同的 δ -内毒素蛋白

Fan Yun-Lin

(Laboratory of Molecular Biology, Chinese Academy of

Agricultural Sciences, Beijing)

苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因

已经鉴定出100多种昆虫病原菌，它们分别为芽孢杆菌科 (Bacillaceae)、微球菌科 (Micrococaceae)、乳杆菌科 (Lactobacillaceae) 及假单胞菌科 (Pseudomonadaceae)。其中用于生物防治的苏云金芽孢杆菌 (Bacillus thuringiensis) 及其变种 (Bac. thuringiensis var. israelensis, Bac. thuringiensis var. finlayiana, Bac. thuringiensis var. kurstaki, Bac. thuringiensis var. tenebrionis, Bac. thuringiensis var. thuringiensis) 是最重要的昆虫病原菌。苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素基因 (delta-endotoxin gene) 位于染色体上，编码一种具有毒性的蛋白质。该蛋白在昆虫肠道中形成可溶性的毒素复合物，导致昆虫死亡。苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素基因的研究工作大有进展。目前已知， δ -内毒素基因由三个外显子和两个内含子组成。其编码的蛋白质由130-140个氨基酸组成。苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素基因的研究工作大有进展。目前已知， δ -内毒素基因由三个外显子和两个内含子组成。其编码的蛋白质由130-140个氨基酸组成。苏云金芽孢杆菌的 δ -内毒素基因的研究工作大有进展。目前已知， δ -内毒素基因由三个外显子和两个内含子组成。其编码的蛋白质由130-140个氨基酸组成。

苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因的分子遗传学

范云六

(中国农业科学院分子生物学研究室)

THE MOLECULAR BIOLOGY OF DELTA-ENDOTOXIN GENE OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

Fan Yun-Liu

(Laboratory of Molecular Biology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

已经鉴定出100多种昆虫病原菌,它们分别为芽孢杆菌科(Bacillaceae)、微球菌科(Micrococcaceae)、乳杆菌科(Lactobacillaceae)及假单胞菌科(Pseudomonadaceae)等^[1]。其中用于生物防治的五种芽孢杆菌已广泛地进行了研究,这五种芽孢杆菌是球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)、苏云金芽孢杆菌(*Bac. thuringiensis*)、苏云金芽孢杆菌以色列变种(*Bac. thuringiensis* var. *israelensis*)、缓病芽孢杆菌(*Bac. lentimorbus*)和日本甲虫芽孢杆菌(*Bac. popilliae*)。范云六等首次报道了*Bac. laterosporus*有杀蚊幼虫作用^[2]。在上述芽孢杆菌中,苏云金芽孢杆菌已注册工业化生产;应用于防治农业害虫和人类某些重要疾病的媒介昆虫。

本文介绍苏云金芽孢杆菌杀虫毒素基因及其克隆、表达调控的研究进展。并对基因工程或其它生物技术应用细菌杀虫剂的潜力进行了讨论。

一、 δ -内毒素的生化特性

苏云金芽孢杆菌在细胞形成芽孢时产生伴孢晶体毒素—— δ -内毒素。一般占细胞干重的20—30%。首先在苏云金芽孢杆菌的H-3ab血清型中发现这种晶体毒素蛋白质^[3]。以后,在其它如H-1, H-2, H-4, H-6, H-7及H-14等多种血清型菌中相继发现^[4-5]。其分子量为130 000道尔顿。1981年Yamamoto^[6]等研究*kurstaki* HD-1晶体报道了第二个毒性多肽p₂, 分子量为65 000道尔顿。在var. *thuringiensis berliner* 1715及H-5菌株中发现有两个晶体蛋白。在BTI中有三个晶体蛋白^[5,7],它们的分子量分别为27 000, 65 000及130 000道尔顿。在BT的不同变种中除有130 000道尔顿的晶体毒素蛋白外,可能还有其它的晶体蛋白,然而130 000道尔顿的晶体毒素蛋白的主要组成是以双聚体的形式存在。

δ -内毒素作为晶体亚单位存在时是无毒的,溶解或经蛋白酶水解后才成为毒性肽(toxic peptide)。毒性肽的分子量约为晶体蛋白的一半,即65 000道尔顿。由此可推想,毒素基因

中仅一部分为活性的毒性肽编码。至于BTI的晶体蛋白，不需要经过溶解或蛋白酶水解，本身具有毒性。BTI杀双翅目幼虫，BT其它变种杀鳞翅目幼虫。BTI的生化、血清学反应、晶体物理型等均不同于BT的其它变种，在遗传学上也不同源。因此，BTI与其它BT实质上是产生两类不同的 δ -内毒素。表1列出 δ -内毒素的一些基本特性。

表1 *Bac. thuringiensis* δ -内毒素的特性

性 质	描 述
1. 多肽	在大部分血清型中分子量约为130 000Md， 在H-14型中分子量为27 000，65 000及130 000Md
2. 单基因产物	假 说
3. 不同的 δ -内毒素蛋白质	a. 不同的鞭毛抗原作用谱。 b. 不同的晶体血清型。 c. 同一鞭毛血清型具有差别
4. δ -内毒素中只一小部分为活性毒性肽	a. 胰酶消化释放出毒性肽； b. 活性区域是在蛋白质的N-末端区

二、 δ -内毒素基因的定位

对于大部分BT来说， δ -内毒素基因定位于染色体以外的复制子——质粒上。早期的观察提供了这样的线索：因为在培养BT时，培养物中经常以高频率出现无晶体的细胞（cry⁻），而这种cry⁻细胞不能回复为cry⁺。但早期的工作没有注意到cry⁻的出现是由于spo⁻突变还是cry⁻spo⁺。因为晶体的产生与芽孢的形成是，既相关又各自独立的事件。

1976年，Zakharyan^[8]等第一次报道了质粒对于BT晶体蛋白质的生物合成可能起重要作用。但是 δ -内毒素基因位于质粒上的确切证据是来自以后的几方面重要工作：第一，检测大质粒方法的出现。早期研究BT时，常用SDS—NaCl方法^[9]来分离质粒DNA。由于方法学上的局限，不易检测到大于100Md的质粒。自从Eckhardt^[10]报道了检测大质粒的简易快速方法，BT质粒的研究工作大有进展。目前已知道，BT菌除含小质粒外还含大质粒。质粒分子量可由1.4到180Md。不同BT菌株含有质粒数目不等。有的菌株高达11—12个质粒， δ -内毒素基因定位于大质粒上；第二，1982年Gonzalez等^[11]发现BT中有类似接合转移的质粒转移系统，该系统的发现对于BT菌中毒素晶体基因定位于质粒上提供了直接的证据；第三， δ -毒素基因的分子克隆；第四，利用 δ -毒素基因克隆为分子探针来定位不同BT菌的 δ -内毒素基因。关于第二点及第三点将在下面较详细介绍，此处着重谈第四点。

H. R. Whiteley等^[12]（1982）和Kronstad等（1983）^[13]利用一个732 bp的*E. coli*的 δ -毒素基因片段为分子探针，对代表14个变种的22个菌株进行分子杂交。结果列于表2。

从表2可看出，除israelensis, wuhanensis及dokota变种外，其余的变种均能杂交。杂交的部位是质粒，说明 δ -内毒素基因在质粒上。其中有些菌株，例如HD-1、HD-244，有一个

表2 用含 δ -毒素基因的732 bp的克隆对不同BT变种分子杂交^[13]

变种	菌株	质粒杂交	
•kurstaki	HD 1	+	100-150及44Md质粒
kurstaki	HD-3	+	
kurstaki	HD-1 "Dipel"	+	
•kurstaki	HD-120	+	100Md及40-60Md质粒
•kurstaki	HD-290	+	
•kurstaki	HD-252	+	
kurstaki	HD-244	+	100 (~ 150) Md及50Md质粒
alesti	HD-4	+	同上
galleriae	HD-8	+	
israelensis	HD-567	-	
thuringiensis	HD-2	+	55Md质粒
sotto		+	
darmstadiensis		+	
indiana	HD-516	-	
morisoni		+	两个质粒
Wuhanensis	HD-525	-	
tolworthi		+	40-60Md及100 (~ 150) Md质粒
dakota	HD-511	-	
•etoumanoffi		+	
thuringiensis-F		+	55Md质粒
beliner	1715	+	
israelensis		-	

以上的质粒与 δ -内毒素基因的732 bp的分子克隆杂交为阳性。这表明，毒素基因的多拷贝。毒素蛋白质是单基因的产物。也有工作表明BT菌株中有多种毒素基因 (Multiple toxin genes)，Yamamoto^[6, 14-15]等报道HD-1的第二个毒素蛋白质 P₂，不论在杀虫谱、肽谱、分子量及等电点等方面均不同于 P₁毒素蛋白质。HD-1中110Md及40Md的两个质粒为 P₁、P₂毒素蛋白基因编码。在HD-263中也发现有 P₁及 P₂，现已阐明44Md质粒至少是为 P₁蛋白基因编码，而115Md质粒上编码 P₁及 P₂基因^[16]。

表3 列出不同BT菌株的 δ -内毒素基因定位于特定的质粒上。根据截至目前为止的报道，晶体蛋白基因完全定位在染色体上的菌有 var. *dendrolimus*^[17]及 var. *wuhanensis*^[13]。而在 *berliner* 1715^[17]及 *subtoxicus*^[17]菌中，晶体蛋白基因有两个拷贝：一个位于质粒上，另一个位于染色体上。

表3 不同BT菌株中与δ-内毒素产生有关的质粒

变 种	菌株	血清型	质粒数	含毒素基因质粒 (MW)
thuringiensis	HD-2	1	10	75×10 ⁶
thuringiensis	"F"	1	—	8×10 ⁶ 50×10 ⁶
thuringiensis	HD-120	1	—	50×10 ⁶ 40×10 ⁶ 100×10 ⁶
thuringiensis	HD-290	1	—	45×10 ⁶ 52×10 ⁶ 100×10 ⁶
thuringiensis	berliner 1715	1	—	40×10 ⁶
kurstaki	HD-1	3ab	12	110×10 ⁶ 44×10 ⁶
kurstaki	HD-1 "Dipel"	3ab	12	150×10 ⁶
kurstaki	HD-73	3ab	6	50×10 ⁶
kurstaki	HD-244	3ab	—	50×10 ⁶ 100×10 ⁶
kurstaki	HD-252	3ab	—	100×10 ⁶
kurstaki	HD-263	3ab	11	115×10 ⁶
alesti	HD-4	3a	10	105×10 ⁶
sotto		4ab	3	40×10 ⁶
galleriae	HD-8	5ab	4	130×10 ⁶
ostrinae	HD-536	8ac	4	68×10 ⁶
morisoni		8ab	—	150×10 ⁶
tolworthi		9	—	45×10 ⁶
darmstadiensis		10	—	50×10 ⁶
thompsoni	HD-542	12	4	100×10 ⁶
israelensis	HD-567	14	9	75×10 ⁶
israelensis	HD-500	14	9	75×10 ⁶

三、BT菌株质粒的接合转移

1982年, Gonzalez和Carlton^[1]第一次发现BT菌株的质粒接合转移系统。给体BT为cry⁺ str⁻, 受体除BT的不同菌株外, 还用了 *Bac. cereus*。BT受体菌分下列两种情况: (1) 消除了晶体毒素质粒的BT菌株, 如Cry⁻ HD-73、HD-2等; (2) 没有消除晶体毒素质粒的BT菌株, 但这些菌株的晶体蛋白质与给体菌的晶体蛋白质属不同的血清型(所有受体均为Str⁺)。他们将给体与受体混合培养后, 涂布在含链霉素的培养基中, 对质粒未加任何选择压。通过培养长出菌落后, 用相差显微镜观察晶体的存在; 用血清学方法检查晶体的免疫学

特性;用电泳检测质粒DNA图谱。结果表明:(1)80%以上的 *Bac. cereus* 得到了BT给体形成晶体的遗传特性。经电泳检测发现这些接合转移子得到了从给体转移来的毒素质粒。(2)给体HD-73将50Md的质粒,HD-263将44Md的质粒,HD-2将75Md的质粒分别转移至 cry^- HD-73及 cry^- HD-2受体菌中。转移频率高达10-20%。由于得到了给体的毒素质粒,接合转移子得到了产生晶体的能力,由 cry^- 变成 cry^+ 。所产生的晶体在免疫学及形态学上与给体中的晶体完全相同。(3)受体菌为BT cry^+ 的情况时,例如用 cry^+ HD-2为受体菌,与HD-73或HD-263给体混合培养后,接合转移子中除含有HD-2的毒素质粒(75Md)外,还有来自HD-73的50Md或来自HD-263的44Md的大质粒。受体中原有的毒素质粒与转移来的毒素质粒两者相容,并得到表达,产生了 *thuringiensis* 及 *kurstaki* 型的晶体。

Gonzalez等的工作不仅有力地证明了在HD-2、HD-73及HD-263菌株中的转移质粒上带有晶体合成的结构基因,而且还为探讨 *Bac. cereus* 的分类学地位提供了重要的遗传学论证。

四、转座子 (transposon) 和“插入序列” (Insertion Sequence)

1984年,Kronstad及Whiteley发现^[26],在HD-73的 δ -内毒素基因的两侧有IR 2150及IR1750两个反向重复DNA序列。这两个重复序列已分别克隆pBR322及pUC18上。有趣的是,用这两个重复序列的克隆作探针,对包括HD-73在内的15个BT菌株进行Southern blot杂交,发现:(1)在HD-73菌的众多质粒中,只有50Md的毒素质粒能与IR2150及IR1750杂交;(2)IR2150及IR1750杂交HD-73的染色体DNA,有多个杂交带,说明在HD-73的染色体上有IR2150及IR1750的多个拷贝。(3)IR2150及IR1750还能与其它14个BT的质粒杂交,它杂交的质粒与用 δ -内毒素基因片段作探针时所杂交的质粒完全相同,说明 δ -内毒素基因与IR2150及IR1750有密切的关系。

IR2150及IR1750的分子量分别为2150bp及1750bp。根据它们的大小以及在质粒和染色体上的分布情况,Kronstad等认为它们很可能是插入序列。Lereclus等^[27]在研究var. *berliner* 1715的Th序列(下面介绍)与晶体蛋白基因的关系时,也报道了类似反向重复序列,命名为IR 1及IR 2。1985年Mahillon等^[28]对IR 1核苷酸序列进行了分析,发现IR 1具有插入序列所有的特性,因此,确定了IR 1为插入序列,命名为IS 230。IS 230是芽孢杆菌中第一个被报道的插入序列。

由于插入序列的存在,导致了不同BT菌株DNA的重排,例如质粒间重组、缺失、整合至染色体中等。

最近Lereclus^[25,27,29]等报导了 *Streptococcus faecalis* JH2-2 中的pAM β 1质粒(17 Md)以高频率转移至 Cry^- 的BT, var. *sotto*, var. *israelensis*及var. *kurstaki* HD-1中去。有趣的是,以 *kurstaki* KT₀ (pAM β 1)为给体、以HD-1为受体时,发现有一个接合转移子的“pAM β 1”质粒比给体的pAM β 1大3Md (“pAM β 1”定名为pAM β 1T)。这是由于给体 *kurstaki* 的一个6 Md片段取代了pAM β 1上3Md片段的结果。用pAM β 1T作探针时,能与给体 *kurstaki* KT₀ 中的54Md的质粒杂交,而对照用的pAM β 1探针,却不与给体 *kurstaki* KT₀ 菌中的任何质粒杂交,说明pAM β 1上3Md插入物(称为Th序列)是来自KT₀ 菌株中的54Md质粒。此外,pAM β 1T还与其它BT菌株中的一个或多个质粒杂交,例如,与 *berliner* 1715的9.0Md、20Md及40Md的质粒,与var. *sotto*的35Md质粒,与var. *aizawai* 7-21的45Md及10Md的质粒呈杂交阳性。说明,Th序列广泛地存在于不同血清型的BT中。

当时,根据3Md插入物在不同BT质粒上的分布以及它从BT质粒上跳到pAM β 1等事实,

推测它可能是一个类似转座子的DNA序列^[27]。

继后, Lereclus^[30]等通过转座实验进一步证明了Th序列是一个转座子, 命名为Tn 4430。在他们设计的转座实验中, 将APH-Ⅲ基因插入至Tn 4430上作为选择标记, 便于转座的检测。根据他们的观察, Tn 4430以 10^{-6} 世代的频率转座至*E. coli*的pBR322上。由于pBR 322的核苷酸序列是已知的, Tn 4430转座在pBR322上后, 便可直接检测出它的末端反向重复序列的核苷酸顺序, 以及在pBR322上插入位点的顺序。结果表明: (1) 在pBR322的插入位点上有5 bp的直接重复序列: 5'-AGCAA-3', (2) 在Tn 4430的两端有方向相反的38个相同bp。进一步将38bp与来自*E. coli*的Tn3及Tn1721的末端重复序列加以比较, 发现: Tn4430的38bp中有25个bp与Tn3相同, 有30个bp与Tn1721的相同(图1)。说明来自革兰氏阳性菌的Tn4430与革兰氏阴性菌Tn3家族的转座子非常接近。看来, Tn4430与Tn3族可能由同一祖先进化而来。

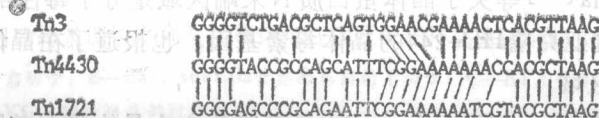


图1 Tn4430, Tn3及Tn1721中38bp的反向重复序列的比较 (引自文献[30])

Tn4430是芽孢菌属中被发现的第一个转座子。它的发现不仅对BT的遗传学研究有重要意义, 而且提示在革兰氏阳性菌和阴性菌间转座因子进行交换的可能性。芽孢杆菌转座子及插入序列的研究是一个值得重视的问题。

五、 δ -内毒素基因的分子克隆

对 δ -内毒素基因进行分子克隆, 有利于研究不同菌株毒素蛋白之间以及基因之间的结构差异, 同时, 通过了解毒素蛋白的活性位点及毒素基因的结构, 可更合理地设计对毒素基因的体外遗传操作 (*in vitro genetic manipulation*), 以创建高效广谱的新杀虫剂。因此, 毒素基因的分子克隆具有重要的理论和实践意义。

1981年, Schnepf和Whiteley^[18]第一次报导了BT的 δ -内毒素基因的分子克隆。用pBR322为载体, *E. coli* HB101为受体, 分子克隆了*kurstaki* HD-1 Dipel中质粒上编码的 δ -内毒素基因片段。重组子pES1具有低水平的表达, 可杀死烟草的鳞翅目幼虫。

Held等(1982)^[19]也用HD-1 Dipel菌株进行 δ -内毒素基因的分子克隆。用建立基因文库的方法, 将菌的全部DNA(质粒和染色体DNA)克隆在Charon 4A载体上。通过放射免疫法选出强阳性克隆。并证明了其抽提物可杀死*Manduca sexta*。然后, 亚克隆(Subcloning)至一个穿梭质粒pHV33上, 得到重组质粒pSM36, 它在*E. coli*及*Bac. subtilis*中均能表达 δ -内毒素。为了回答克隆的 δ -内毒素基因片段的来源, 他以pSM36为探针, 对染色体和质粒DNA进行分子杂交, 结果表明: pSM36既能与45kb质粒上的4.5kb Pvu II片段杂交, 也能与染色体DNA的5.6kb及0.9kb的Pvu II杂交。根据这个结果, Held等认为HD-1的 δ -内毒素基因位于质粒上, 也位于染色体上。

1983年, Kronstad^[13]的工作表明, δ -内毒素蛋白基因与HD-1 Dipel染色体无同源性, 进一步证明了HD-1 Dipel的 δ -内毒素蛋白基因定位于质粒上。看来, Held等的结果可能是由于晶体蛋白基因与芽孢外壳蛋白基因有同源性引起的。

1982年,Klier等^[17]克隆了*Bt. berliuer* 1715的晶体蛋白基因。根据他们的结果,在该菌中晶体蛋白基因有两个拷贝,一个拷贝位于42Md的大质粒上;另一个在染色体上。1985年他们又报道了var. *aizawa* 7-29的晶体蛋白基因在*E. coli*中的克隆和表达^[20]。此外,var. *israelensis*, *sotto*, *subtoxicus*和*dondrolimus*等菌的晶体蛋白基因也均已经分子克隆^[20-21]。

通过 δ -内毒素基因的分子克隆,可以分析 δ -内毒素基因及其调控序列。1983年Wong等^[22]利用Tn5诱变等方法,确定了 δ -内毒素基因由四个EcoRI片段及三个Pvu II片段组成,并分析了1525个核苷酸序列和晶体毒素蛋白的部分氨基酸序列。通过基因核苷酸序列和晶体毒素蛋白氨基酸的比较,鉴别出了晶体毒素蛋白的结构基因和包括转录起始位点在内的调控部位。Schnepf和Whiteley^[18]用基因缺失和融合方法,分析了HD-1 Dipel晶体蛋白质基因的3'和5'末端的毒性部位。发现:(1)3'末端缺失至第645个密码子时还能保持毒性肽活性;但如缺失至第603密码子时,就产生无毒性的多肽。(2)晶体蛋白基因的5'末端编码毒性肽。这与Chestukhina^[24]等关于晶体蛋白质N末端区域是分子毒性部位的报道结果相符。Mc Linden等^[42]通过亚克隆HD-244的晶体毒素基因,也报道了在晶体蛋白基因中为毒性肽编码的核苷酸序列区域。

最近,Lereclus^[25]等比较了在*E. coli*中已克隆的六个晶体蛋白基因的限制性图谱,发现有两类晶体蛋白基因。

这两类图谱主要的区别是在一个Pvu II的切点和一个EcoRI的切点上。在第I类晶体蛋白的基因的图谱中,有2kb的Pvu II的片段;而在第II类的图谱中,就被代换为8kb的Pvu II片段。另一个小的区别是,在第I类晶体蛋白质基因图谱中两个Hind III切点之间的距离是1.2 kb;而第II类中是1.3kb。HD-1的晶体蛋白基因属于第I类。尽管这两类晶体蛋白基因的限制性图谱不同,但在它们之间相应于晶体蛋白质的N末端的图谱是相同的,只是3'末端有明显的区别。

最近Sabourin等^[40]在完成HD-244菌的整个晶体蛋白基因在内的3770bp片段的序列分析后,比较了HD-244、HD-73和HD-1Dipel的晶体蛋白基因中100个限制性酶的切点,结果表明:在基因的第一个1/3区域,HD-244(或HD-75)有14个限制性切点与HD-1 Dipel的不同;在第二个1/3区域中,有45个切点不同;在最后的1/3区域中,有11个切点不同。

以上报道为遗传操作 δ -内毒素基因提供了科学基础。

六、 δ -内毒素基因的遗传调控
Wong等^[22]对*kurstaki* HD-1 Dipel的部分毒素结构基因以及结构基因的上游序列进行了分析。最近又报道^[23]了晶体蛋白基因的全部序列(4222bp),包括启动子、编码区以及晶体蛋白基因的终止区(Terminator)。

δ -内毒素蛋白质结构基因的上游序列有下面一些特征:(1)在ATG起始密码子前面有一个9-11bp的强的核糖核蛋白体结合位点;(2)在RNA起始转录位点上游的-10及-35区有自己的特点,-10区与spoVC及spoVG启动子的相应区有50-70%的同源性,而-35区与spoVC及spoVG的却没有同源性。我们知道,在芽孢杆菌中,基因的表达乃由专导性的Sigma因子负责RNA聚合酶与特异性的启动子结合,因此,在生活周期的不同阶段中表达的基因不同,spoVC及spoVG乃参与芽孢形成的两个基因,由 δ^{37} 负责转录,而营养期的基因由 δ^{55} 负责转录。 δ -内毒素基因的启动子中不论-10或-35区均不与 δ^{55} 识别的启动子相应区同源,与*E. coli*的启动子也没有同源性。

δ -内毒素基因克隆在 *E. coli* 后, 可在 *E. coli* 中表达, 而它的转录调控区域与 *E. coli* 的启动子无同源性, 那么, *E. coli* 中的 RNA 聚合酶为何识别 δ -内毒素基因片段上的启动子, 尚待研究。

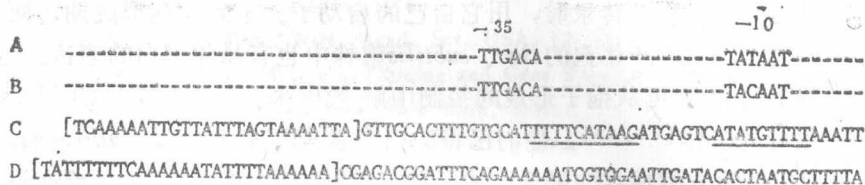


图2 δ -内毒素基因的转录调控序列与枯草芽孢杆菌及大肠杆菌基因的转录调控序列

δ -内毒素的合成究竟如何受基因的调控,有待进一步研究。Minnich等^[31]报道了一有趣事实,在一株HD-1失去了110Md质粒后, δ -内毒素蛋白质的合成变为温度敏感:在25℃时合成,30℃不合成。他们认为110Md质粒丢失后有利于29Md质粒发挥温度敏感的调控功能。为了证实这一点,将29Md及其小质粒转移至*Bac. cereus*菌株,发现*Bac. cereus*也只在25℃时合成毒素,30℃时不合成。此外,他们还作了下列实验,将HD-73的50Md质粒转移至*Bac. cereus*中,观察到:50Md质粒上编码的 δ -内毒素蛋白基因不论在25℃或30℃均可表达,但是如果将HD-73的50Md质粒转移至带有HD-1的29Md质粒的*Bac. cereus*中,情况就不同了:HD-1及HD-73的毒素基因只在25℃时表达,30℃时就不表达了。这些结果表明:HD-1中的29Md质粒使 δ -内毒素基因的表达受温度调节,而且,温度敏感的基因以Trans作用方式调控 δ -内毒素的合成。

苏云金芽孢杆菌 δ -内毒素基因及其分子遗传学研究的进展,为遗传操纵 δ -内毒素基因奠定了良好的基础。近年来, δ -内毒素基因的遗传操纵在生物技术中是一个非常活跃的组成部分。目前,它已由细菌杀虫剂的范畴跨进植物基因工程领域,进展迅速。

我们实验室已建立 *kurstaki* HD-1 基因文库^[32], 并得到克隆, 第一次报道了^[33-34]通过 *kurstaki* HD-1 与 var. *israelensis* 的原生质体融合, 得到既杀鳞翅目又杀双翅目幼虫的稳定融合子, 融合子产生双亲所特有的晶体蛋白, 融合子的质粒 DNA 图谱与亲本之一 var. *israelensis* 的相似^[35], 用 HD-1 的 δ -内毒素基因片段的克隆为探针进行杂交, 融合子呈杂交阳性。因此, 融合子中含有 HD-1 的 δ -内毒素基因, 尽管 DNA 图谱类似 var. *israelensis*。除了原生质融合途径外, 通过基因工程建构高效、多价的杀虫菌, 显然是重要的途径。目前, 对杀鳞翅目幼虫的 BT 研究较深入, 对杀其它害虫 (如鞘翅目) 的 BT, 还处在寻找菌株的阶段。因此, 通过基因工程建构多价的 BT 杀虫剂还有待今后工作的进展。