

# 诱变剂对苏芸金杆菌的影响

刘志成

(湖南省微生物研究所,长沙)

**摘要** 本文研究了五种诱变剂对苏芸金杆菌 HD-1 菌种的诱变效应,并获得了一些诱变菌。这些诱变菌所产生的伴孢晶体无论在大小、数量或形状比例方面都发生了一些变化。通过对家蚕 (*Bombyx mori*)、菜青虫 (*Pieris rapae*)、稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*) 的毒力试验,有的诱变菌提高了对某些昆虫的毒力。在五种诱变剂中以亚硝基胍 (MNNG) 和硫酸二乙酯 (DES) 的诱变效应最明显,获得的抗噬菌体菌株和产色素菌株都对某些害虫具有较高的杀虫活性,因此,在工业生产中有一定的价值。

**关键词** 苏芸金杆菌;诱变剂;毒力

近年来,国内外不少学者为提高苏芸金杆菌对昆虫的毒力和对噬菌体的抗性,应用物理因素或化学因素对苏芸金杆菌进行诱变育种,取得了一定成效<sup>[1-3]</sup>。我国自引进 *Bacillus thuringiensis* subsp *Kurstaki* (HD-1) 以来,虽已应用于工业生产,并较广泛地用于防治农、林、果、蔬害虫<sup>[4]</sup>,但用几种不同的理论因素处理 HD-1 菌种,并比较它们对 HD-1 菌种的伴孢晶体、芽孢以及对昆虫的毒力影响,尚未见报道。本文研究了用不同诱变剂如紫外线、硫酸二乙酯 (DES)、争光霉素、二乙撑三胺、亚硝基胍 (MNNG) 等对苏芸金杆菌 HD-1 菌种的诱变效应。

## 材料与方 法

### (一) 出发菌株

*Bacillus thuringiensis* subsp *Kurstaki* (HD-1)。

### (二) 培养基组成 (%)

斜面培养基:蛋白胨 0.8,牛肉膏 0.3,柠檬酸钠 0.5,琼脂 2.0。

摇瓶培养基:蛋白胨 2.0,牛肉膏 0.7,葡萄糖 0.3,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.03,  $KH_2PO_4$  0.03。

### (三) 诱变因素

用紫外线、硫酸二乙酯 (DES)、争光霉素、

二乙撑三胺、亚硝基胍 (MNNG) 等 5 种诱变剂分别进行单因素处理菌种。

### (四) 处理方法

按诱变育种的常规方法进行<sup>[5]</sup>。将培养好的斜面菌种,移种于摇瓶培养基中,30℃ 振荡培养至对数生长期,菌液过滤、离心后,稀释成含菌数为 1 亿/ml 的菌悬液,然后按照不同诱变因素的常规方法处理,取经处理的菌液 0.1ml 用于平板表面涂布和平板计数,各试验处理均设对照组,计算杀菌率。

### (五) 诱变菌株的筛选

上述各处理的平板 30℃ 培养 3 天后,挑取各类型的单菌落,镜检,转接斜面 and 摇瓶中培养。30℃ 振荡培养至菌体呈孢子囊形状时,将菌液置相差显微镜下,随机取样,计算 100 个以上孢子囊中的芽孢与伴孢晶体数量及其比例,同时按常规方法测定抗噬菌体性能及观察菌体的形态培养特征,最后进行毒力比较。

### (六) 纯伴孢晶体制剂的制备

菌种的伴孢晶体与芽孢分离及伴孢晶体产量收率计算采用王瑛<sup>[6]</sup>的改良方法进行,伴孢晶体制剂纯度在 95.8—99.2%,芽孢纯度 99%

肖喜凤、马小恙、鲁迎新等同志参加部分试验工作。姚欣容同志提供苏芸金杆菌噬菌体,张松柳同志协助拍照,特此致谢。

以上。 伴孢晶体形状按照 Швецова<sup>[7]</sup> 分为圆菱形(I型)、菱形(II型)、伸长菱形(III型)和不定形的四角形小菱形(IV型)等4个类型。

(七) 毒力测定

经初筛挑选的各类型菌株,用芽孢、伴孢晶体混合制剂,以及纯伴孢晶体制剂分别对由湖南省蚕种场供试的家蚕 (*Bombyx mori*)、长沙市国营综合农场供试的菜青虫 (*Pieris rapae*)、长沙南托乡植保站供试的稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*) 进行毒力比较。

实验结果

(一) 诱变因素对苏芸金杆菌的致死作用

各种诱变因素对 *Bacillus thuringiensis* ssp. *Kurstaki* 均有明显的致死作用。用 2537 Å、20W 紫外线,在灯距 27cm 下,进行 1、3、5、7、9 分钟照射处理的菌体死亡率分别为 31.7、84.2、90.1、95.2 和 98.9%。用硫酸二乙酯(5% V/V),在 30℃ 下处理 30、45、60、75、90、120 分钟,菌体死亡率分别为 34.8、70.1、92.3、95.9、99.2 和 99.8%。分别用争光霉素 150、300、450、600 和 750γ/ml, 30℃ 处理 1 小时,菌体死亡率为 75.1、80.9、91.3、92.4 和 97.2%。应用二乙撑三胺 1ml 与 1ml 菌悬液, 30℃ 处理 5、15、30、45 和 60 分钟,菌体死亡率分别为 41.7、60.8、79.4、97.2 和 99.7%。用 100μg/ml 的亚硝基胍, 30℃ 处理 10、20、30、40、50 和 60 分钟,菌体死亡率分别为 57.2、63.7、67.4、74.6、84.1 和 91.3%。上述结果均表明,诱变剂的浓度以及处理时间与苏芸金杆菌菌体死亡率呈正相关。

(二) 诱变因素对 HD-1 芽孢与伴孢晶体的影响

各种诱变因素处理苏芸金杆菌后,由于菌落形态除只有两株是产色素诱变菌外,其它菌落在形态上没有发生显著变异。因此,我们根据菌落大小挑取大菌落(4 mm 以上)、小菌落(1 mm 以下)和中菌落(1—4 mm)各 50 个移接斜面,并通过摇瓶 30℃ 振荡培养后,取菌液用平板计数法测定芽孢数,并以此作为初筛指标,统计出在挑取的诱变菌中芽孢数比出发菌增加的百分率,诱变菌的芽孢数比出发菌增加的菌株,其芽孢数平均增加百分率为 5.6—22.3%(见表 1)。

在相差显微镜下观察芽孢与伴孢晶体的数量比例时,可以看到经过诱变的菌种,有的孢子囊中有 2 个或 2 个以上的(多的达 5 个)伴孢晶体,伴孢晶体数量明显地比出发菌株高。在用 MNNG 处理 HD-1 后,挑取的诱变菌中,伴孢晶体数量增加的类型占 69.7%,数量没有增加的类型占 30.1%,丧失伴孢晶体的类型只有 0.2%。

(三) 诱变菌的芽孢、伴孢晶体重量、大小、形态比较

用上述诱变剂处理 HD-1 后,分别从诱变菌中挑取芽孢数高或抗噬菌体或产色素的菌株进行伴孢晶体重量、大小、形态的比较。测定结果,诱变菌的伴孢晶体数量增加,但伴孢晶体变小,形状比例也发生了变化。诱变菌的伴孢晶体与芽孢比例一般为 1.34—1.54:1,而出发菌株为 1.06:1;出发菌株的 III 型和 IV 型的伴孢晶体只占 5.5%,而诱变菌除紫外线处理的 57

表 1 诱变因素对 HD-1 芽孢数量的影响

诱变剂及处理方法	菌体死亡率 (%)	诱变菌的芽孢数	
		比出发菌增加的菌株百分率 (%)	平均增加百分率 (%)
紫外线照射 7 分钟	95.0	55.0	11.4
DES(5%V/V)30℃, 1 小时	91.8	32.9	5.6
争光霉素 600V/ml, 30℃, 1 小时	90.4	50.3	15.8
二乙撑三胺(1:IV/V), 30℃, 1 小时	98.1	37.5	8.6
MNNG(100μg/ml), 30℃, 1 小时	92.7	57.1	22.3

表 2 诱变剂对 HD-1 的伴孢晶体大小、形状及产量(重量)的影响

菌株	伴孢晶体大小 ( $\mu\text{m}$ )	伴孢晶体形状百分率 (%)				伴孢晶体与 芽孢比例	伴孢晶体制剂产量 (重量)收率(%)
		I	II	III	IV		
出发菌株 HD-1	0.946—2.67 × 0.86—2.58	58.9	35.6	3.45	2.05	1.06:1	31.85
诱变菌 57 (紫外线处理)	0.935—2.58 × 0.86—2.46	56.2	40.29	2.14	1.37	1.51:1	31.51
诱变菌 5 (DES 处理)	0.824—1.742 × 0.774—2.68	53.8	26.7	10.58	8.92	1.42:1	29.4
诱变菌 197 (争光霉素处理)	0.782—2.22 × 0.78—2.44	61.4	29.62	5.56	3.42	1.54:1	32.42
诱变菌 34 (二乙撑三胺处理)	0.922—2.58 × 0.86—2.48	55.2	36.1	5.28	3.42	1.34:1	29.74
诱变菌 241 (MNNG 处理)	0.774—1.118 × 0.86—1.892	56.6	9.3	21.6	12.5	1.48:1	30.9
诱变菌 475 (MNNG 处理)	0.688—2.75 × 0.774—2.58	65.1	20.7	3.5	10.7	1.53:1	30.6

菌株 III 型和 IV 型的伴孢晶体只占 3.51% 以外,其它的诱变菌株 III 型和 IV 型的伴孢晶体高达 8.7—34.1%。伴孢晶体数量的增加也不一定会增加菌体产生伴孢晶体的重量,结果见表 2。此外,诱变菌芽孢也稍变大,营养细胞和孢子囊大小也稍有不同。

#### (四) 诱变剂对 HD-1 菌种特性的影响

用诱变剂处理 HD-1 菌株后,我们得到了一些诱变菌。其中用 MNNG 处理的得到了 475 和 526 两株产棕褐色水溶性色素的诱变菌及 241 和 1114 两株抗噬菌体的诱变菌。475 菌株能在许多种培养基上产生稳定的水溶性色素(图 1)。241 和 1114 菌对  $D_I$  型噬菌体(效价  $51 \times 10^{10}$  PFU/ml)和  $D_{II}$  型噬菌体(效价  $43 \times 10^{10}$  PFU/ml)有抗性。用 DES 处理 HD-1 后,也得到了 5 号诱变菌,该菌对  $D_I$  和  $D_{II}$  型噬菌体均有抗性。其它的诱变剂处理 HD-1 后,在我们实验中没有得到形态、色素和抗噬菌体的变异菌株。

在对上述 6 个诱变菌进行的生理生化试验

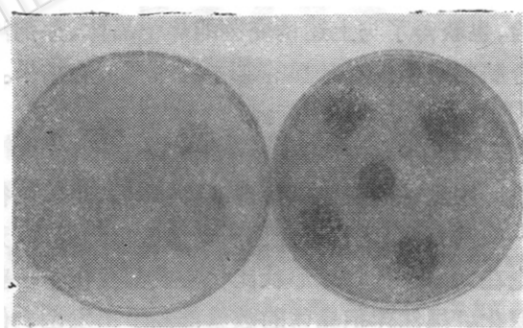


图 1 30℃ 培养 5 天的平板菌落

(左: HD-1, 不产色素; 右: 诱变菌 475, 产色素)

中,除了只有 475 菌产色素,57 菌对七叶灵的利用稍弱和 475、241 对水杨苷利用稍弱外,对蔗糖、甘露糖、卵磷脂酶、VP 试验、明胶液化、水解淀粉、菌膜形成、尿酶试验等结果均与出发菌株相同,说明它们在生化特性上没有发生根本的改变。

#### (五) 诱变菌的毒力测定

用诱变菌的芽孢、伴孢晶体混合制剂及纯伴孢晶体制剂分别对家蚕、菜青虫、稻纵卷叶螟

表3 诱变菌的伴孢晶体、芽孢混合制剂对3种昆虫的毒力比较

菌株	菜青虫		稻纵卷叶螟		蚜 蚕	
	LC <sub>50</sub> (mg/ml)	毒力指数*	LC <sub>50</sub> (mg/ml)	毒力指数	LC <sub>50</sub> (mg/ml)	毒力指数
出发菌 HD-1	0.25	1000	1.35	1000	4.02	1000
诱变菌 57	0.22	1136	1.33	1015	3.98	1010
诱变菌 5	0.26	962	1.44	938	4.22	953
诱变菌 197	0.24	1042	1.58	854	3.88	1036
诱变菌 34	0.29	862	1.26	1071	5.96	675
诱变菌 241	0.23	1087	1.62	833	2.12	1896
诱变菌 475	0.28	893	1.98	682	8.84	455

\* 某制剂毒力指数=HD-1 LC<sub>50</sub>×1000/某制剂的 LC<sub>50</sub>

的毒力比较试验说明,诱变菌对昆虫的毒力发生了一些变化。57 菌株对供试的 3 种昆虫毒力有所提高,241、34 和 197 诱变菌一方面对某些昆虫的毒力有所提高,而对某些昆虫的毒力又有所降低。475 和 5 诱变菌一方面对稻纵卷叶螟和菜青虫仍有较高的毒力,但低于出发菌株,另一方面 475 菌株明显地降低了对有益昆虫(家蚕)的影响。结果见表 3。用诱变菌的纯伴孢晶体制剂对稻纵卷叶螟的毒力比较试验,也获得了与上述诱变菌的伴孢晶体、芽孢混合制剂对稻纵卷叶螟的毒力基本相似的结果。

## 讨 论

用供试的诱变剂处理 HD-1 后,可以获得一些诱变菌。这些诱变菌所产生的伴孢晶体,无论在大小、数量或形状比例方面都发生了一些变化。虽然伴孢晶体的数量都高于出发菌,但是并没有增加伴孢晶体的产量(重量),通过毒力比较试验,有的诱变菌提高了对某些昆虫的毒力,而有的诱变菌则降低了对某些昆虫的毒力,说明伴孢晶体对昆虫的毒力差异,不仅与伴孢晶体数量、质量、大小和形状有关,而且与昆虫敏感性有关。应用苏芸金杆菌防治害虫时,针对目标昆虫选用不同菌剂,将会得到更好的防治效果。

通过对 5 种诱变剂处理 HD-1 菌种的比较。用 MNNG 处理的得到了两株抗噬菌体菌

株和两株产色素菌株,诱变效应最明显。用 DES 处理的得到了一株抗噬菌体菌株。这些菌株对某些害虫具有较高的杀虫活性,同时它们又具有抗噬菌体或产色素的特性标志,因此在工业生产中有一定意义。但要大幅度地提高菌种对昆虫的致病力,还需考虑以多种途径进行研究。

诱变育种初筛时,我们是以芽孢数作为指标,因此诱变菌的芽孢数比出发菌高,但对昆虫毒力测定的结果并不呈正相关,说明苏芸金杆菌的芽孢数与它对昆虫的杀虫活性没有重要关系<sup>[2]</sup>。因此苏芸金杆菌的选育以防治对象害虫进行毒力测定是最理想的方法,但目前生测标准化问题未得到解决之前,在诱变育种中,综合考虑诱变菌的菌落形态、生长速度、芽孢数量、伴孢晶体在光学显微镜下的形态、大小、数量以及产量(重量)等,仍具有一定的参考价值。

## 参 考 文 献

- [1] 幸兴球等:昆虫学报,22(2):206—209,1979。
- [2] Мысловагая, М. П. и А. Н. Майсунян: Генетика, 12(4):79—82, 1976。
- [3] Junko, Nishiisnji-uwo et al.: J. Invert. Path., 25:355—361, 1975。
- [4] 湖南省微生物研究所杀虫菌试验组:微生物学通报,4(4):5—8,1977。
- [5] 微生物诱变育种编写组:微生物诱变育种,23—61,科学出版社,北京,1973。
- [6] 王瑛等:微生物学报,20(3):285—287,1980。
- [7] Швецова, О. И.: Журн. Общей Биол., 23(5):381—390, 1962。
- [8] 中国科学院动物研究所苏芸金杆菌研究组:微生物学报,18(4):352,1978。