

# 杀螟杆菌菌种的分离、诱变与复壮方法

湖南省长沙农校微生物农药试验组

在杀螟杆菌的生产和应用中，菌种对产品质量和杀虫效果有很大的影响。所以，菌种工作必须引起我们高度的重视。

为了得到杀虫效率高的菌株，一是要由自然界分离毒力高的新菌种；二是通过人工诱变提高已有菌株的毒力；三是经常进行菌种的复壮。现将我们采用的分离、诱变及复壮方法介绍如下：

## 菌种的分离

1. 分离操作的步骤：一般将采集的三化螟幼虫尸体，用75%酒精浸2—3秒钟，接着用0.1%升汞水浸2—3分钟，进行表面消毒，然后用无菌水洗3次。如虫尸还较新鲜，可将虫尸放入无菌皿中，用无菌剪刀剪断胸足，体液流出象一滴小水珠，就用接种环挑取少量脓液，在含1%蛋白胨、1%牛肉膏、0.5% NaCl和2%琼脂培养基上划线（或用细玻璃棒蘸菌液均匀涂抹），连续划3个平皿。通常在第3个皿的培养基上，可以形成单株菌落。如虫死较久（尽可能用新鲜虫尸，以避免噬菌体），可从虫体背面剪开，挑取体液用无菌水稀释 $10^{-4}$ 倍。也可较粗放地将虫尸放在无菌水中压烂稀释至 $10^{-8}$ 倍，将后面3次稀释的菌液，分别各吸1毫升于消毒好的皿内，设2个重复，共9皿，再倒入50℃左右的同样培养基摇匀。在28—30℃下培养1—2天后，从菌落形态看，挑选好的转入斜面试管，并编号。每个被选的菌落同时接3支斜面，再培养2天后开始镜检，留下伴孢晶体大、数量多而整齐、生长发育也较快的菌株，较差的淘汰，将留下的较好的菌株再扩大培养，进一步作杀虫效力比较测定。

2. 分离效果：从分离后在培养基上长出的菌落看，表现有两种类型：一种表面粗糙有皱纹，无光泽，边缘呈锯齿状；另一种表面较平滑，有光泽，边缘较平整。在杀虫效力测定中，前者高于后者。实践证明在同一地点，同一时间乃至同一种三化螟寄主上，也有杀虫效力不同的杀螟杆菌菌株。如能广泛发动群众收集螟虫病死虫尸，大量进行分离培养和测定，是可筛选出更好的菌株的。

## 诱变育种

毛主席教导我们：“对于任何一个具体的事物说来，对立的统一是有条件的、暂时的、过渡的，因而是相

对的，对立的斗争则是绝对的。”生物的遗传和变异是一对矛盾，是对立的统一。生物的遗传性是有条件的，相对的。在一定条件下，生物的遗传性发生动摇，而产生某些性状的变化或变异。外界条件越强烈，发生变异的可能性越大，变异也越深刻。微生物也一样，在外因影响下，通过内因起作用，产生变异的性状，通过其遗传性表现于下一代个体可形成性状不一的菌株。现代分子遗传学阐明，存在于细胞内的主要遗传物质脱氧核糖核酸分子中碱基的任何改变，都可以引起突变。有些药物对某特定碱基较易引起改变；某种射线容易使某些位点引起突变。为了改良原有杀螟杆菌菌种的性能，提高产量和质量，增强杀虫效力，可采用化学和物理因素处理菌种，进行人工诱变。我们试用了下面两种方法：

1. 用硫酸二乙酯处理：将培养24小时的杀螟杆菌斜面（如用液体振荡培养约8—9小时即可），用接种环挑取一环菌落于10毫升无菌水中，再稀释10倍，在第二管菌液中吸取1毫升，加入到89毫升的中性磷酸缓冲液中（内面预放有玻璃珠），振荡10分钟后，再加入1个克分子量的硫酸二乙酯10毫升，继续振荡处理30、60、90分钟，然后各取1毫升加入到20毫升蛋白胨、牛肉膏培养液中，经间歇振荡，培养24小时，最后取0.1毫升到培养皿中，加蛋白胨、牛肉膏、琼脂培养基进行分离培养（或用平板涂抹），并设有未经处理的作对照。处理的结果引起变异较大，菌体有变成畸形的，性状有变差的，但也有变好的。我们从硫酸二乙酯处理90分钟的菌体群中，经分离培养选出了“72930”菌株。此菌株与未处理的对照株已看出下列的变异（见下页表）。

2. 紫外线处理：也是将培养24小时的斜面，用无菌水稀释成约每毫升含10万个菌的浓度，吸取0.2毫升菌液涂抹于培养皿内的培养基平板上，用15瓦紫外线灯，波长2537 Å，距离30厘米（30瓦的60厘米），揭开皿盖照射。照射时间是在紫外线灯预热20分钟后，分别照射1、2.5、5、7.5、10、15、20分钟。留一皿不照射作为对照。照射后菌的存活率要求在0.1—1%以内。根据我们初步试验以处理10分钟左右较好。操作要在红光下进行，处理后要继续在黑暗环境下存放24小时（可用黑布盖着培养），以免发生光复活作用。在培养2天后，从中挑选生长快、菌落大而厚的，

## 菌种复壮

表 “72930”菌株与未处理菌株的形态对照比较

项 目	对 照	“72930”
菌 落	平滑,边缘缺刻浅	中间有突起,稍外较平下,外部又较高,边缘缺刻较深
菌 苔	表面较平滑,有时有小颗粒,无埂状纹,有光泽	表面粗糙,菌体群堆集成颗粒或成埂状,好似绉纹
孢 子 囊	大小为 $2.5-4 \times 1-1.3$ 微米,晶体与芽孢占有的部分相近	大小为 $3-4.5 \times 1.2-1.5$ 微米,晶体占有的部分大于芽孢
芽 孢	椭圆形,大小为 $1.2-1.9 \times 1-1.5$ 微米	长椭圆形,膜较厚,大小为 $1.3-2 \times 0.9-1.4$ 微米
晶 体	菱形为主,一般大小为 $1.2-2 \times 0.9-1.5$ 微米	芝麻形为主,一般大小为 $1.5-3.5 \times 1.2-1.7$ 微米
药效试测 (0.2亿/毫升)	24小时菜青虫死亡 92.85%	24小时菜青虫死亡 100%

再镜检芽孢及伴孢晶体的产生量和大小,选出好的菌株,进一步作杀虫效力测定。

杀螟杆菌在人工培养 10 代以后,一般有退化现象。尤其用营养体反复繁殖,其退化更快。其表现是:晶体小,甚至看不见晶体;菌苔也薄,更有出现单个菌落不联成片的;杀虫效力降低。为使菌种复壮,我们将杀螟杆菌接种于螟虫,实行活体培养,并结合进行定向选育。首先,从田间采集较大的螟虫幼虫,最好选用龄期一致的作接种用。然后,将菌液喷于盆栽不亩上,再放上螟虫,每天检查一次螟虫致病死亡情况。为了便于检查,有时我们也将一节稻茎在菌液里浸一下,取出放到养虫皿中,再放螟虫,让其钻入,每天检查两次,选最早染病死亡的虫体进行分离培养,采取边复壮,边挑选的方法,挑选长势好,菌苔厚,晶体粗而齐,杀螟虫效力高的菌株。具体作法基本上与自然病死螟虫体分离筛选相同,连续复壮选育 5 次以上,一般即可收到显著的成效。我们这样先后复壮选出“705”、“72930”两个菌株,都比未经复壮选育前的杀虫效力有所提高。另外,也可在菌液接种螟虫致病死亡后,即将虫尸放在水中压烂制成菌液,再连续接种螟虫活体培养 4 次以上,最后一次需分离纯化。这个方法的缺点是不便结合复壮不断挑选菌株,如仅从复壮角度来说,是可以更快达到目的的。