



# 苏云金芽胞杆菌等离子复合体诱变提高抗鳞翅目害虫的杀虫毒力

彭金莉<sup>#</sup>, 朱梓榕<sup>#</sup>, 陈文慧, 罗斯思, 周朋吉, 全梅芳, 孙运军, 夏立秋, 丁学知<sup>\*</sup>

湖南师范大学生命科学学院, 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 微生物分子生物学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410081

彭金莉, 朱梓榕, 陈文慧, 罗斯思, 周朋吉, 全梅芳, 孙运军, 夏立秋, 丁学知. 苏云金芽胞杆菌等离子复合体诱变提高抗鳞翅目害虫的杀虫毒力. 微生物学报, 2022, 62(4): 1390–1400.

Peng Jinli, Zhu Zirong, Chen Wenhui, Luo Sisi, Zhou Pengji, Quan Meifang, Sun Yunjun, Xia Liqiu, Ding Xuezhi. Improvement of the virulence of *Bacillus thuringiensis* to lepidopteran pests by ARTP and NTG mutagenesis. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1390–1400.

**摘 要:**【目的】苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt) D18 对鳞翅目、鞘翅目等农业害虫具有杀虫毒力, 本研究拟通过复合诱变育种, 筛选出杀虫毒力更高的突变菌。【方法】经四轮室温常压等离子体(ARTP)诱变和一轮 ARTP-NTG 复合诱变后, 镜检形态观察与生物毒力测定筛选高毒力菌株, SDS-PAGE 检测 Cry 蛋白, qRT-PCR 定量 *cry* 基因的表达, 揭示突变菌株毒力提高的原因。【结果】复合诱变筛选到 2 株高毒力突变菌株 An-L5-1 和 An-L5-7, 与出发菌株 Bt D18 相比, An-L5-1 和 An-L5-7 的生长衰亡期略微提前; 芽胞形成能力增强; Cry 蛋白表达量分别提高了 80.47% 和 88.31%; 对小菜蛾和黏虫的杀虫毒力显著增强。【结论】突变菌株 An-L5-1 和 An-L5-7 杀虫活性提高主要是由于毒力基因 *cry1Aa*、*cry2Aa* 和调控基因 *sigK* 的表达显著上调。

**关键词:** 苏云金芽胞杆菌; 杀虫晶体蛋白; 室温常压等离子体; 复合诱变

**基金项目:** 国家重点研发计划(2017YFD0201201); 国家自然科学基金(31370116)

Supported by National Key Research and Development Program of China (2017YFD0201201) and by the National Natural Science Foundation of China (31370116)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

**\*Corresponding author.** Tel: +86-731-88872298; E-mail: dingxuezhi@hunnu.edu.cn

**Received:** 15 July 2021; **Revised:** 18 September 2021; **Published online:** 29 September 2021

# Improvement of the virulence of *Bacillus thuringiensis* to lepidopteran pests by ARTP and NTG mutagenesis

PENG Jinli<sup>#</sup>, ZHU Zirong<sup>#</sup>, CHEN Wenhui, LUO Sisi, ZHOU Pengji, QUAN Meifang, SUN Yunjun, XIA Liqu, DING Xuezhi<sup>\*</sup>

Hunan Provincial Key Laboratory of Microbial Molecular Biology, State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China

**Abstract:** [Objective] *Bacillus thuringiensis* (Bt) D18 is virulent to agricultural pests of *Lepidoptera* and *Coleoptera*. This study aims to improve the virulence of D18 by compound mutagenesis. [Methods] After four rounds of atmospheric and room temperature plasma (ARTP) mutagenesis and one round of ARTP-N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ARTP-NTG) mutagenesis, highly virulent mutants were screened out by microscopy and virulence bioassay. To reveal the reason for the increase of virulence, we detected the Cry proteins by SDS-PAGE and key *cry* genes by qRT-PCR. [Results] Two highly virulent mutants, An-L5-1 and An-L5-7 were screened out, compared with the wild strain D18, An-L5-1 and An-L5-7 demonstrated slightly early decline, improved ability of sporulation, 80.47% and 88.31% rise of Cry protein expression, and significantly stronger virulence to *Plutella xylostella* and *Mythimna seperata*. [Conclusion] The increase in the virulence of An-L5-1 and An-L5-7 was mainly attributed to the significantly up-regulated expression of *cry1Aa*, *cry2Aa*, and *sigK*.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*; insecticidal crystal protein; ARTP; compound mutagenesis

苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*, Bt)是一种重要的昆虫病原细菌, Bt 的杀虫活性与其菌体细胞可产生多种杀虫活性的毒素密切相关, 主要为  $\delta$ -内毒素, 即杀虫晶体蛋白(insecticidal crystal proteins, ICPs), 包括 Cry 和 Cyt 类蛋白, 其含量可以占到芽胞形成过程中菌体产生蛋白总量的 20%–30%<sup>[1–3]</sup>。Bt 制剂已发展成为在农林领域使用最广泛的微生物农药<sup>[3–4]</sup>, 具有靶向性强、环境友好等特点<sup>[5–7]</sup>。小菜蛾(*Plutella xylostella* Linnaeus)隶属于鳞翅目小菜蛾科, 为世界性迁飞害虫, 以十字花科蔬菜叶为食。其幼虫取食叶肉, 留下表皮, 在菜叶上形成一个个透明的斑, 俗称“开天窗”, 3–4 龄幼虫可将菜叶食成孔洞和缺刻, 被认为是最广泛的鳞翅目害虫<sup>[8–11]</sup>; 严重影响了蔬菜的产量和质量, 每年给全球经济造成了巨大的损失<sup>[12–14]</sup>。此外,

小菜蛾具有很强的繁殖能力和环境适应性, 且极易产生抗药性, 成为危害蔬菜的头号害虫<sup>[14–15]</sup>。因此, 提高 Bt 对小菜蛾幼虫的毒力是实现十字花科植物绿色防治效果的重要手段。

ARTP 诱变育种技术具有放电均匀稳定、活性颗粒浓度高、操作简便、诱变迅速、环境友好、对操作者无辐射、操作可控性强等特点, 可与常规诱变方法联合使用<sup>[16–18]</sup>。它成功地应用于细菌、真菌和微藻等多种微生物的诱变育种<sup>[19–20]</sup>, 提高了相关菌株的性能<sup>[21–23]</sup>。此外, 亚硝基胍(NTG)被认为是一种传统的化学诱变剂, 在诱变育种中起到了重要的作用<sup>[24–25]</sup>。本研究利用等离子体和亚硝基胍对 Bt 菌株 D18 进行复合诱变, 筛选出对鳞翅目、鞘翅目等害虫有较高杀虫毒力的突变株, 为农作物鳞翅目害虫的生物防治提供优良的候选菌株。

# 1 材料与amp;方法

## 1.1 材料

### 1.1.1 菌株、引物和细菌培养条件

本研究所用菌株和引物见表 1。Bt 的 LB 培养基(10 g/L 胰蛋白胨, 5 g/L 酵母粉, 10 g/L NaCl)和发酵培养基(18 g/L 葡萄糖, 14.5 g/L 胰蛋白胨, 2.5 g/L  $K_2HPO_4$ , 0.02 g/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.02 g/L  $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.25 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 30 °C 培养。

### 1.1.2 试剂

0.9%生理盐水; 0.5 mol/L NaCl; 5%丙酮; NTG。

### 1.1.3 仪器

ARTP (常压室温等离子体)诱变育种仪 (ARTP-IIS), 无锡源清天木生物科技有限公司; 正置光学显微镜 AXIO Abserver A1, 德国蔡司 Zeiss 公司; 蛋白胶扫描仪 Microtek Bio-5000, 中晶科技; SpectraMax® M5 酶标仪, 美国 Molecular Devices。

## 1.2 ARTP 诱变

ARTP 诱变在 ARTP 生物诱变系统进行。氮的输入量为 99.99%时, 工作射频功率输入为 100 W, 处理距离为 2.0 mm, 气体流量为 8.0 SLM。取 10 μL 原始菌液( $OD_{600}=0.6-0.8$ )于灭菌后的不锈钢板上进行 ARTP 处理。将不锈钢板转

表 1 菌株和引物

Table 1 Strains and primers

Strains/primers	Relative description	Sources
Strains		
<i>B.thuringiensis</i> D18	The wild strain used as starting strain	Lab store
AR-L1-3	One round of ARTP mutation from D18	This work
AR-L2-6	One round of ARTP mutation from AR-L1-3	This work
AR-L3-2	One round of ARTP mutation from AR-L2-6	This work
AR-L4-3	One round of ARTP mutation from AR-L3-2	This work
AN-L5-1	One round of ARTP and NTG compound mutation from AR-L4-3	This work
AN-L5-7	One round of ARTP and NTG compound mutation from AR-L4-3	This work
qRT-PCR primers		
	Sequences (5'→3')	
16S-qF	CTTGACATCCTCTGAAAACCCTA	This work
16S-qR	GACTTAACCCAACATCTCACGAC	This work
<i>cryI</i> Ac-qF	ATATTCCTTGTCGCTAACGCA	This work
<i>cryI</i> Ac-qR	TGTACAAGAAATGCGTCCCAT	This work
<i>cry2</i> Aa-qF	CCCTTGCTCGTGTAATGCA	This work
<i>cry2</i> Aa-qR	AGGAACAGGGTTTGTAGTAGGG	This work
<i>spoII</i> GA-qF	TGTAACCTTTATGGTTGGCGG	This work
<i>spoII</i> GA-qR	TTGGATCACCCTAAGAAATTGAC	This work
<i>spoII</i> HD-qF	CCAGAAATTAATCCAGAGCTCG	This work
<i>spoII</i> HD-qR	GTTGCTTCTCCCCCTCTTAAAT	This work
<i>spoIV</i> A-qF	GCGTTGTTTGGCAGTTTAGTCA	This work
<i>spoIV</i> A-qR	CTGTTTGCTTAACCATACGCAGT	This work
<i>sigK</i> -qF	AGTTAATGGAGCAAGGTGATGC	This work
<i>sigK</i> -qR	CTGCATCTTCTCCTGTGTTCTCA	This work
<i>cwl</i> C-F	AAGTTAAAGATGCCGTGGCG	This work
<i>cwl</i> C-R	CAGCATGGGAATTGCTATTCC	This work

移到 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL LB 液体培养基, 振荡 2 min, 使细胞重新悬浮。稀释后在 LB 琼脂平板上涂布, 30 °C 培养 12 h, 计算琼脂平板上菌落的 ARTP 致死率, 以死亡率在 60%–90% 的处理为最佳时间。挑取最佳处理时间的单克隆, 斜面重新培养 48 h, 显微镜观察芽胞和伴胞晶体数量, 初步筛选突变株进行生物毒力测定。最后将筛选出的高杀虫毒力菌株在 LB 液体培养基中培养, -80 °C 保存。

### 1.3 NTG 诱变

经过 4 轮 ARTP 诱变, 筛选出对小菜蛾杀虫活性最高的菌株作为 NTG 诱变菌的原始菌株。在 LB 液体中培养至指数期( $OD_{600}$  为 0.6–0.8), 收集 1 mL 菌液, 悬于 5 mL PBS 中, 加入 NTG 使终浓度为 500  $\mu$ g/mL。暗箱孵育 1 h, 用预冷 PBS 洗涤 4 次, 停止反应。

### 1.4 杀虫活性的生物测定

将野生菌 D18 和诱变菌在发酵培养 48 h 后的菌液加入 20 mL 人工饲料中, 搅拌均匀后分别倒入到 24 孔板中, 每个样品重复 3 次。每孔加入一条 3–4 龄的小菜蛾, 在 25 °C 的培养箱中饲养, 观察统计 48 h 幼虫死亡数。选择死亡率最高的代表性菌株作为下一轮 ARTP 诱变的起始菌株。

### 1.5 生长曲线测定及活芽胞计数

分别在 LB 液体培养基中过夜活化原始菌和 2 株高杀虫毒力诱变菌 AN-L5-1、AN-L5-7, 以 1% 的比例转接到装有 30 mL 发酵培养基的三角瓶中, 每组设置 3 个平行, 30 °C 振荡培养。测定时间 0–60 h, 每隔 6 h 取一定体积的发酵培养物, 使用分光光度计测其  $OD_{600}$ 。利用 OriginPro 9 软件, 以培养时间为横坐标、培养物  $OD_{600}$  值为纵坐标绘制生长曲线。

对原始菌 Bt D18 及 2 株高杀虫毒力诱变菌 AN-L5-1、AN-L5-7 进行划线, 挑取单克隆于

LB 液体培养过夜, 按 1% 接种量转接至发酵培养基中, 30 °C 培养至后期芽胞完全释放, 菌体裂解。测定原始菌、2 株诱变菌  $OD_{600}$  处的吸光值, 然后将其稀释至终浓度  $OD_{600}$  为 1.0, 分别取原始菌、2 株诱变菌菌液 1 mL 在 80 °C 热处理 20 分钟, 进行梯度稀释至  $10^{-7}$ , 取 100  $\mu$ L 菌液涂布 LB 固体平板, 将平板置于 30 °C 倒置过夜培养。对平板上单菌落进行计数。

### 1.6 芽胞和伴胞晶体混合物的提取

以 1% 接种量转接已活化好的菌株到 30 mL 发酵培养基中, 振荡培养 48 h, 对菌液进行镜检, 确定其芽胞和伴胞晶体释放情况。各取 10 mL 菌株发酵液于 15 mL 离心管, 9 000 $\times$ g 离心 10 min, 收集沉淀用 NaCl (0.5 mol/L) 洗涤 2 次, 弃去白色泡沫, 悬浮于适量的生理盐水中; 4 °C 超声, 每间隔 3 s 超声 3 s, 共处理 6 min, 并重复 2 次, 每次间隔 2–3 min。离心收集沉淀, 用生理盐水洗涤 2 次, 再用 5% 丙酮和超纯水各洗涤 2 次, 沉淀即为芽胞和伴胞晶体混合物, 分装此混合物于 EP 管中, -80 °C 保存备用。

### 1.7 qRT-PCR

菌株发酵 20 h, 取 1 mL 发酵菌液于 1.5 mL 离心管中, 8 000 $\times$ g 离心 2 min, 收集菌体。加入 2 mL TRIzol 试剂 (Invitgen) 研磨菌体, 提取 RNA。用 RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) 将 RNA 逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 16S rRNA 基因为内参, 进行 qRT-PCR。所有用于 qRT-PCR 分析的引物和 16S rRNA 基因序列见表 1。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱变时间的确定

以 Bt D18 为 ARTP 诱变的第一轮出发菌株, 分别处理 0、15、30、60、120、240 s, 得到致死率曲线。Bt D18 的死亡率随着 ARTP 处



理时间的增加而升高, 菌体的致死率与处理时间呈剂量效应关系。当诱变时间为 30 s 时, 致死率明显提升, 为 65.2%; 诱变时间为 60 s 时, 致死率为 89.8%; 诱变时间为 120 s 时, 致死率为 96.9%; 诱变时间为 240 s 时, 致死率接近 100%。有研究者认为菌体致死率为 60%–90% 有利于产生正突变菌株<sup>[16]</sup>, 本研究 ARTP 诱变过程最佳的处理时间是 30–60 s, 考虑到合理化获取突变库容量, 选取 40–55 s 的处理时间进行后续 ARTP 诱变。

## 2.2 诱变菌株初筛

经过 5 轮诱变, 包括前 4 次的 ARTP 递推式诱变及最后一次的 ARTP-NTG 复合诱变, 分离挑取 956 个单克隆, 斜面培养 48 h, 利用相差显微镜观察菌株的表型(图 1, 表 2)。结果显示, 共有 5 种表型的诱变菌株在菌体裂解程度、芽胞形态和伴胞晶体等表型变化较为明显。选取菌体裂解程度高、芽胞与伴胞晶体明显的诱变表型菌株作为生物测定的优势菌株; 淘汰生长速度慢、菌体裂解少、无晶体的表型菌株。

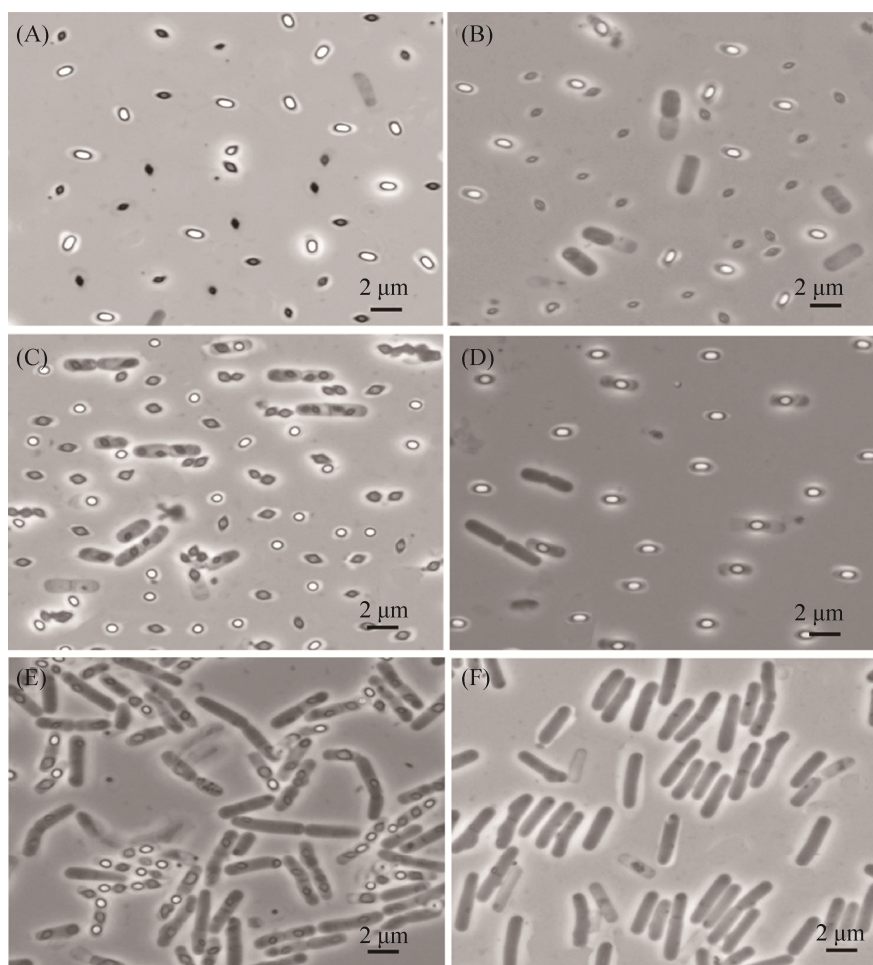


图 1 野生菌 D18 和突变菌培养 48 h 相差显微镜表型观察

Figure 1 Phase contrast microscope observation of D18 and mutant strains cultured for 48 h. A: D18; B: mutagenic I; C: mutagenic II; D: mutagenic III; E: mutagenic IV; F: mutagenic V.

表 2 诱变菌株的主要表型

Table 2 Main types of mutagenic strains

Strains	Proportion of lysis strains/%	Shapes of spores	Shapes of crystal proteins	Main changes of mutants
Bt D18	98	Oval	Diamond	None
Mutagenic I	96	Oval	Diamond	None
Mutagenic II	93	Round	Diamond	Larger crystal proteins
Mutagenic III	98	Oval	None	No crystal proteins
Mutagenic IV	20	Oval	Diamond	Lysis delayed
Mutagenic V	0	None	None	Poor growth

统计 5 轮诱变镜检优势菌株比例(表 3)发现, ARTP 迭代诱变中, 第二轮 ARTP 优势菌株比例最高, 随后比例逐渐降低直到 10%左右。当作用条件调整为 ARTP/NTG 复合诱变时, 优势菌株比例又得到明显提高。从 956 株突变株中共选取了 197 株进行下一轮摇瓶发酵。

### 2.3 诱变菌株复筛

斜面培养菌株镜检根据芽胞与伴胞晶体形态变化和菌体裂解程度缩小了筛选的范围, 检测杀虫活性变化进行生物测定。每轮初筛后的菌株培养发酵至 48 h, 以 5  $\mu$ L/mL 的发酵液浓度进行生物测定。与每一轮的出发菌株相比,

选择小菜蛾死亡率提高的为正突变株, 统计每一轮诱变的正突变率(表 4)。结果表明, 与优势菌株比例变化相似, 前两轮 ARTP 的正突变率较高, 达到 30%以上, 说明等离子体诱变效率较好。但是随着第三轮、第四轮 ARTP 诱变, 发现正突变率逐渐降低。因此在第五轮采用 ARTP/NTG 复合诱变以增加诱变作用位点, 正突变率得到有效提升。

野生菌 D18 为诱变的出发菌株。每轮筛选得到的杀虫毒力最高的菌株, 作为下一轮诱变的出发菌株。每轮筛选得到的杀虫毒力最高的菌株的生物毒力测定结果如图 2。

表 3 五轮镜检优势菌株比例

Table 3 Proportion of dominant strains in five rounds of microscopy

Rounds	Methods	Amounts of selected strains	Amounts of positive strains	Proportion/%
First	ARTP	230	48	20.87
Second	ARTP	169	41	24.26
Third	ARTP	210	38	18.10
Fourth	ARTP	168	20	11.90
Fifth	ARTP, NTG	179	50	27.93

表 4 五轮诱变复筛正突变率统计

Table 4 Statistics of positive mutation rates in five rounds of mutagenesis

Rounds	Methods	Amounts of tested strains	Amounts of positive strains	Proportion/%
First	ARTP	48	15	31.25
Second	ARTP	41	14	34.15
Third	ARTP	38	11	28.95
Fourth	ARTP	20	4	20.00
Fifth	ARTP, NTG	50	19	38.00

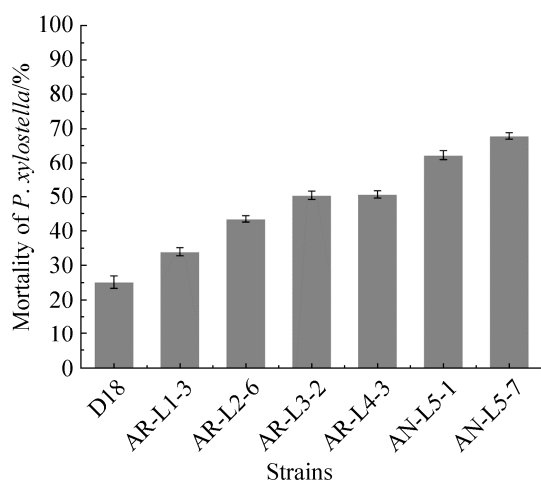


图 2 每轮筛选得到的杀虫毒力最高的菌株对小菜蛾处理 48 h 的致死率

Figure 2 48 h virulence bioassay of the every round of mutagenized strains (the highest virulence) against *Plutella xylostella*. Error bars are calculated from three independent determinations of 24-well plate in each sample.

对比分析每轮诱变典型菌株的杀虫毒力变化(表 5), 随着诱变次数的递推, 菌株的杀虫毒力越来越高。对每轮诱变典型菌株与前一轮菌株对小菜蛾的校正死亡率进行比较分析, 发现第四轮代表菌株 AR-L4-3 对小菜蛾的校正死亡率与第三轮代表菌株 AR-L3-2 差异不明显, 其他代表菌株与前一轮相比均具有显著差异。进一步分析逐轮校正死亡率提高幅度, 与正突变率变化相似, 校正死亡率的提高幅度在第三轮、第四轮逐渐降低, 当调整为复合诱变的处理方法后, 提高幅度又得到较明显升高。最终得到的高毒力菌株 AN-L5-1 对小菜蛾的校正死亡率相比于出发菌株 D18 提高了 159%, AN-L5-7 对小菜蛾的校正死亡率相比于出发菌株 D18 提高了 170%。

表 5 五轮 ARTP 诱变典型菌株对小菜蛾处理 48 h 的致死率

Table 5 Mortality of five rounds of ARTP mutagenesis against *Plutella xylostella* at 48 h

Rounds	Strains	Lethality/%	Adjusted lethality/%	Remarkable analysis	Improvement/%
Original	D18	26.39	24.26	None	None
First	AR-L1-3	34.72	32.86	*	35.45
Second	AR-L2-6	44.44	42.86	*	30.43
Third	AR-L3-2	50.00	48.57	*	13.32
Fourth	AR-L4-3	52.78	51.43	ns	5.80
Fifth	AN-L5-1	63.89	62.86	*	22.23
	AN-L5-7	66.67	65.71	*	27.77

Two-tailed *T* test, ns:  $P > 0.05$ , \*:  $P < 0.05$ .

## 2.4 生长曲线及芽胞形成能力比较

测定了原始菌株 Bt D18 和 2 株高杀虫毒力突变菌株 AN-L5-1 与 AN-L5-7 在 60 h 内的生长曲线, 结果显示 3 株菌的生物量无明显差异, 但 2 株诱变菌的衰亡期略微提前(图 3)。对 3 株菌进行了活芽胞计数, 发现 2 株诱变菌的芽胞形成能力显著增强(图 4)。

## 2.5 $LC_{50}$ 生物毒力测定

复筛是以一个发酵菌液浓度进行的, 需要

对以上 2 株诱变高杀虫毒力菌株从  $LC_{50}$  及晶体蛋白产量进行测定验证。对比野生菌 D18 及诱变菌株 AN-L5-1、AN-L5-7 的  $LC_{50}$  (表 6), 结果发现野生菌的毒力  $LC_{50}$  值为  $9.998 \mu\text{L/mL}$ , AN-L5-1 的毒力  $LC_{50}$  值为  $3.858 \mu\text{L/mL}$ , 相比野生菌降低约 61.41%。AN-L5-7 的杀虫毒力  $LC_{50}$  值为  $3.419 \mu\text{L/mL}$ , 相比野生菌降低约 65.80%。结果说明 2 株诱变菌株的杀虫毒力明显提高。

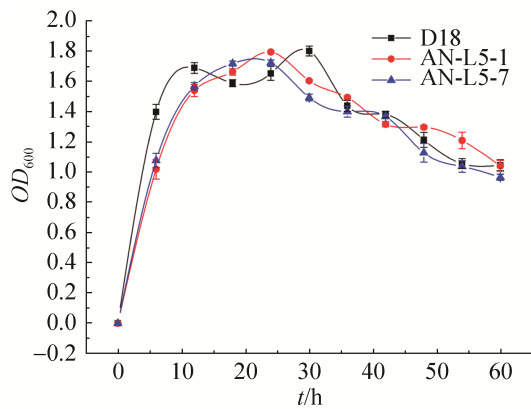


图 3 原始菌株 Bt D18 与突变菌株 AN-L5-1 和 AN-L5-7 60 h 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of wild strain Bt D18 and mutated strains AN-L5-1 and AN-L5-7 in the fermented broth for 60 h. Error bars are calculated from three independent determinations in each sample.

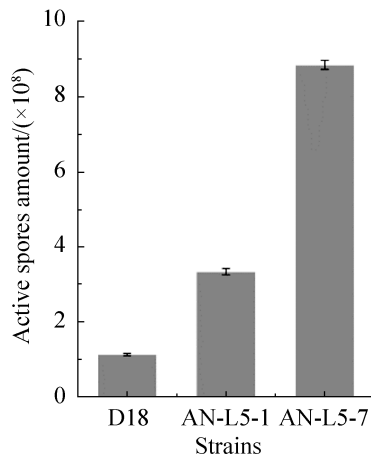


图 4 Bt D18、AN-L5-1 和 AN-L5-7 发酵 60 h 后的活芽胞计数

Figure 4 The active spores amount of Bt D18, AN-L5-1 and AN-L5-7 fermented 60 h. Error bars are calculated from three independent determinations of spores amount in each sample.

## 2.6 晶体蛋白 SDS-PAGE 分析

提取野生菌 D18 和诱变高毒力菌株 AN-L5-1、AN-L5-7 的晶体蛋白进行 SDS-PAGE (图 5)。Gel-Pro 灰度软件分析显示, AN-L5-1 (泳道 2) 的晶体蛋白含量是 D18 (泳道 1) 的 1.80 倍,

晶体蛋白含量提高了约 80.47%; AN-L5-7 (泳道 3) 晶体蛋白含量是 D18 的 1.88 倍, 晶体蛋白含量提高了约 88.31%。两菌株的晶体蛋白含量明显提高, 与杀虫毒力  $LC_{50}$  变化趋势相一致。

## 2.7 qRT-PCR 分析关键功能基因

生物毒力测定和 SDS-PAGE 结果表明, 突变株的 Cry 蛋白产量和毒力都得到了提高, 因此我们进行了相关基因的 qRT-PCR, 以进一步验证这些结果。与野生菌株相比, 突变株 AN-L5-1 和 AN-L5-7 的 *cryIAC* 相对表达量分别增加了 1.7 倍和 16.7 倍, 而 *cry2Aa* 的相对表达量分别增加了 5.7 倍和 3.7 倍。此外, 与芽胞形成相关的 *spoIIIGA*、*spoIIID* 基因, 与细胞裂解相关的 *cwlC* 基因以及 *sigK* 基因的相对表达量也增加(图 6)。

表 6 野生菌 D18 与诱变高毒力菌株对小菜蛾的杀虫毒力  $LC_{50}$

Table 6  $LC_{50}$  analysis of the toxicity of wild strain D18 and highly virulent mutant strains against *Plutella xylostella*

Strains	$LC_{50}/(\mu\text{L}/\text{mL})$	95% confidence interval
D18	9.998	7.790–14.503
AN-L5-1	3.858	3.258–4.589
AN-L5-7	3.419	2.914–4.048

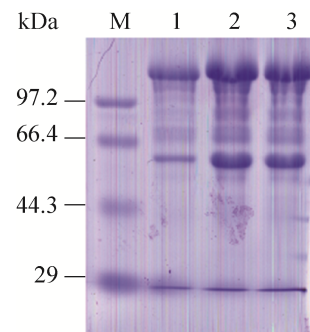


图 5 野生菌与诱变菌株晶体蛋白 SDS-PAGE

Figure 5 Crystal protein SDS-PAGE of wild strain and highly virulent strains. M: protein marker; lane 1: wild strain D18; lane 2: mutant strain AN-L5-1; lane 3: mutant strain AN-L5-7.

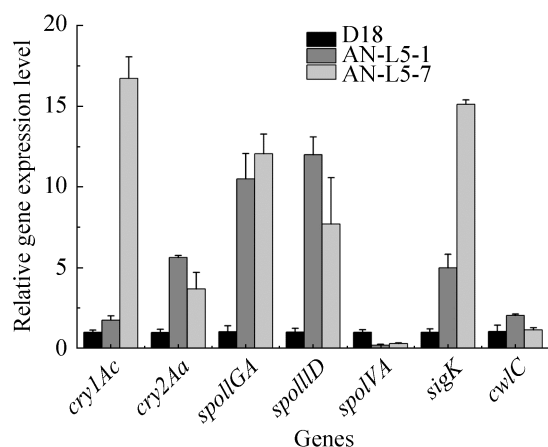


图6 *cry1Ac*、*cry2Aa*、*spoII GA*、*spoIIID*、*spoI VA*、*sigK*、*cwlC* 的 qRT-PCR 验证

Figure 6 Real-time qRT-PCR analysis of selected genes. Error bars are calculated from four independent determinations of mRNA abundance in each sample.

## 2.8 菌株遗传稳定性分析

诱变育种获得的突变株可能会发生回复突变，因此对于高产菌株进行传代实验验证非常关键。在试管斜面培养后分别将高毒力杀虫菌株 AN-L5-1、AN-L5-7 连续传代培养 5 代，进行显微镜镜检、摇瓶发酵、检测发酵液的杀虫毒力  $LC_{50}$ 。AN-L5-1、AN-L5-7 菌株传代至第 5 代的晶体、芽胞形状无变化，杀虫毒力无明显差异，表现出较好的遗传稳定性，具有成为工业生产应用菌株的潜力。

## 3 讨论与结论

等离子体射流包含处于激发态的高浓度化学活性颗粒，该颗粒可以破坏细胞中核苷碱基的化学键和肽键，并改变细胞的代谢活性和遗传特性<sup>[26]</sup>。但是，单一诱变始终得不到令人满意的结果<sup>[19]</sup>。因此，为了提高 Bt D18 对小菜蛾的杀虫毒力，应用了四轮 ARTP 递归诱变与一轮 ARTP-NTG 诱变相结合，并从 956 个突变体中选择了 197 个菌株进行了生物毒力测定。

平均的逐轮矫正后的小菜蛾死亡率显著提高，这表明诱变具有一定的累积作用。

经过传代培养稳定检测后，最终获得了 2 株具有稳定遗传特性的阳性突变菌株 AN-L5-1 和 AN-L5-7。qRT-PCR 显示 *cry1Ac* 的相对表达水平分别增加了 1.7 倍和 16.7 倍，*cry2Aa* 分别增加了 5.7 倍和 3.7 倍，显示生物毒力测定和 SDS-PAGE 结果相一致；*cry1Ac* 和 *cry2Aa* 的表达水平提高是增强杀虫毒力的关键因子。此外，与芽胞形成相关的 *spoII GA* 和 *spoIIID* 基因，与细胞裂解相关的 *cwlC* 基因以及 *sigK* 基因的相对表达量也增加，这与生长曲线以及活芽胞计数测定的实验结果也是相符合的。有文献报道，Cry1、Cry11A 以及 Cyt1A 蛋白的活性依赖于 sigma 因子 K 的 RNA 聚合酶<sup>[27]</sup>，而 sigmaK 本身也参与了芽胞皮层的组装<sup>[28]</sup>。*cwlC* 基因编码细胞壁水解酶，在 Bt 母细胞的裂解中扮演着重要的角色，*cwlC* 的表达依赖于 sigma 因子 K (*sigK*)，有研究报道，*cwlC* 缺失突变体中 Bt 母细胞不裂解但不影响芽胞和晶体蛋白的形成，也不影响其杀虫蛋白的杀虫活性<sup>[29-30]</sup>。

在诱变育种过程中，为了快速消除诱变处理后的低毒力菌株，采用相差显微镜选择细胞裂解程度高，芽胞和晶体明显的菌株作为毒力的主要菌株。经过四轮 ARTP 诱变，优势菌株的比例逐渐降低。与此变化类似，第四轮 ARTP 诱变菌株的阳性突变率和小菜蛾的校正死亡率的增加在生物测定重新筛选中呈显著的下降趋势。这可能是由于长期使用单一诱变剂引起的“疲劳效应”，它会导致缺陷，例如细菌活力降低和产品含量降低<sup>[31]</sup>。在实际生产中，为了解决上述现象，采用复合诱变的方法来进一步提高菌株的诱变效果和杀虫毒力<sup>[32]</sup>。本研究采用 ARTP-NTG 复合诱变方法对菌株进行第五轮处理，恢复了小菜蛾的校正死亡率，具有良好的诱变协同作用。

## 参考文献

- [1] Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(4): 547–559.
- [2] Darsi S, Divya Prakash G, Udayasuriyan V. Cloning and characterization of truncated *cry1Ab* gene from a new indigenous isolate of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(9): 1311–1315.
- [3] Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(3): 775–806.
- [4] Okinaka RT, Keim P. The phylogeny of *Bacillus cereus sensu lato*. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(1): tbs0012–2012.
- [5] Bravo A, Likitvivatanavong S, Gill SS, Soberón M. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 41(7): 423–431.
- [6] Bravo A, Gómez I, Conde J, Muñoz-Garay C, Sánchez J, Miranda R, Zhuang M, Gill SS, Soberón M. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1667(1): 38–46.
- [7] Hofmann C, Lüthy P, Hütter R, Pliska V. Binding of the delta endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *European Journal of Biochemistry*, 1988, 173(1): 85–91.
- [8] Campbell GA, Mutharasan R. Method of measuring *Bacillus anthracis* spores in the presence of copious amounts of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(3): 1145–1152.
- [9] Pigott CR, Ellar DJ. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, 71(2): 255–281.
- [10] Daniell H. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnology Journal*, 2006, 1(10): 1071–1079.
- [11] Tabashnik BE, Huang FN, Ghimire MN, Leonard BR, Siegfried BD, Rangasamy M, Yang YJ, Wu YD, Gahan LJ, Heckel DG, Bravo A, Soberón M. Efficacy of genetically modified Bt toxins against insects with different genetic mechanisms of resistance. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(12): 1128–1131.
- [12] James C. Global status of commercialized biotech/GM crops: 2011. *ht tp. Bried*, 2011, 43: 8–9.
- [13] Talekar NS, Shelton AM. Biology, ecology, and management of the diamondback moth. *Annual Review of Entomology*, 1993, 38(1): 275–301.
- [14] Furlong MJ, Wright DJ, Dosdall LM. Diamondback moth ecology and management: problems, progress, and prospects. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58: 517–541.
- [15] Zalucki MP, Shabbir A, Silva R, Adamson D, Liu SS, Furlong MJ. Estimating the economic cost of one of the world's major insect pests, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae): just how long is a piece of string? *Journal of Economic Entomology*, 2012, 105(4): 1115–1129.
- [16] Zhang X, Zhang XF, Li HP, Wang LY, Zhang C, Xing XH, Bao CY. Atmospheric and room temperature plasma (ARTP) as a new powerful mutagenesis tool. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(12): 5387–5396.
- [17] Ottenheim C, Nawrath M, Wu JC. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): the latest development. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5(1): 1–14.
- [18] Zhang X, Zhang C, Zhou QQ, Zhang XF, Wang LY, Chang HB, Li HP, Oda Y, Xing XH. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(13): 5639–5646.
- [19] Yang MM, An YF, Zabel HM, Guo Q, Yun JH, Zhang GY, Awad FN, Sun WJ, Qi XH. Random mutagenesis of *Clostridium butyricum* strain and optimization of biosynthesis process for enhanced production of 1,3-propanediol. *Bioresource Technology*, 2019, 284: 188–196.
- [20] Gu CK, Wang GY, Mai S, Wu PF, Wu JR, Wang GH, Liu HJ, Zhang JN. ARTP mutation and genome shuffling of ABE fermentation symbiotic system for improvement of butanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(5): 2189–2199.
- [21] Ma YF, Shen W, Chen XZ, Liu L, Zhou ZM, Xu F, Yang HQ. Significantly enhancing recombinant alkaline amylase production in *Bacillus subtilis* by integration of a novel mutagenesis-screening strategy with systems-level fermentation optimization. *Journal of Biological Engineering*, 2016, 10: 13.

- [22] Zhao B, Li YF, Li CL, Yang HL, Wang W. Enhancement of *Schizochytrium* DHA synthesis by plasma mutagenesis aided with malonic acid and zeocin screening. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(5): 2351–2361.
- [23] Xu F, Jin HJ, Li HM, Tao L, Wang JP, Lv J, Chen SF. Genome shuffling of *Trichoderma viride* for enhanced cellulase production. *Annals of Microbiology*, 2012, 62(2): 509–515.
- [24] Delić V, Hopwood DA, Friend EJ. Mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) in *Streptomyces coelicolor*. *Mutation Research*, 1970, 9(2): 167–182.
- [25] Siripong P. Enhanced cellulose production by ultraviolet (UV) irradiation and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) mutagenesis of an *Acetobacter* species isolate. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(6): 1433–1442.
- [26] Liu KY, Fang H, Cui FJ, Nyabako BA, Tao TL, Zan XY, Chen HY, Sun WJ. ARTP mutation and adaptive laboratory evolution improve probiotic performance of *Bacillus coagulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(14): 6363–6373.
- [27] Wanapaisan P, Chumsakul O, Panbangred W. Enhanced Cry1Da production in *Bacillus thuringiensis* by driving expression from the  $\sigma$ E-dependent Btl promoter. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 115(3): 859–871.
- [28] Yang H, Wang PS, Peng Q, Rong R, Liu CX, Lereclus D, Zhang J, Song FP, Huang DF. Weak transcription of the *cry1Ac* gene in nonsporulating *Bacillus thuringiensis* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(18): 6466–6474.
- [29] Chen XM, Gao TT, Peng Q, Zhang J, Chai YR, Song FP. Novel cell wall hydrolase CwIC from *Bacillus thuringiensis* is essential for mother cell lysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(7): e02640–17.
- [30] Serrano M, Côté L, Opdyke J, Moran CP, Henriques AO. Expression of *spoIIIJ* in the prespore is sufficient for activation of *Sigma G* and for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(13): 3905–3917.
- [31] Li Ge, Zeng HC. Application of mutation in the breeding of antibiotic-producing microorganisms. *Anhui Agricultural Science*, 2007, 35(4): 970–971.
- [32] Tan Mu, Zhao Genhai, Liu Hui, et al. Compound mutagenesis and fermentation optimization of *Flavobacterium* producing vitamin K2. *Journal of Radiation Research and Radiation Technology*, 2015, 33(4): 40401–040401.

(本文责编 张晓丽)