

球形芽孢杆菌TS-1与苏云金芽孢杆菌 H4 细胞融合的研究

王岳五 陈月华 陈 宁* 任改新
郭淑华 焦瑞身**

(南开大学生物系, 天津)

Bacillus sphaericus TS-1与 *Bacillus thuringiensis* H4是两种重要的昆虫病原菌, 前者对淡色库蚊的毒性与国外的1593-4和 T-M-1菌株相当^[1], 后者对粘虫、玉米螟等有高毒力。其制剂国外已有商品化生产。它们的毒性均来自于菌体所特有的毒蛋白, 而这些蛋白是由染色体或质粒DNA所编码^[2, 3]。

我们通过原生质体融合技术, 使芽孢杆菌属的两株不同种进行融合, 而获得既杀双翅目又杀鳞翅目幼虫的杂种菌株。目前已有报道在苏云金杆菌种内得到稳定的既杀鳞翅目又杀双翅目幼虫的融合重组菌株^[4]。但是, 种间融合的情况尚未见国内外有报道。

实验可为扩大生物防治范围提供新效杂种菌株, 并为进一步研究基因与毒蛋白之间的关系, 毒蛋白基因定位提供了有意义的依据。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

球形芽孢杆菌天津一号 (*Bacillus sphaericus*) TS-1 (Str^r)

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) H4 (Amp^r)

(均为南开大学生物系任改新同志提供)

(二) 培养基

1. NB培养基(保藏菌种用)(%) : 牛肉膏0.5, 蛋白胨1.0, 琼脂2.0, pH7.2—7.4。

2. 液体培养基(%) : 牛肉膏0.5, 蛋白

胨1.0, 酵母膏0.3, NaCl 0.5, pH7.2—7.4。

3. 高渗NB培养基(L) : NB培养基中加蔗糖0.5mol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, 顺丁烯二酸20 mmol/L, pH7.2—7.4。

4. 选择培养基: NB培养基中加入链霉素200μg/ml, 氨基青霉素160μg/ml。

(三) 溶液

1. EDTA溶液(L) : 0.1mol/L乙二胺四乙酸二钠, pH8.0。

2. SMM缓冲液: 蔗糖0.5mol/L, MgCl₂ 20 mmol/L, 顺丁烯二酸 20 mmol/L, pH6.5。

3. SMMD溶液: SMM缓冲液加DNA酶5μg/ml。

4. PEG溶液: 40%聚乙二醇(分子量6000)溶于SMMD溶液中。

(四) 原生质体的制备

将两菌株的新鲜斜面分别接入液体培养基中, 28℃过夜, 再以1%接种量接入新鲜液体培养基中, 振荡培养到对数期 (OD₆₀₀ = 0.6), 收集菌体, 再分别于4000rpm离心15min, 用SMM缓冲液洗涤两次, 悬于SMM溶液中, 42℃预热, 再加入溶菌酶。溶菌酶浓度以每毫升(约10⁸—10⁹细胞) 2—3mg为宜。混匀后, 立即加入预热的EDTA溶液0.5ml, 置42℃水浴45min, 随时镜检观察原生质体形成情况, 最后2000rpm离心除去溶菌酶, 将沉淀悬于SMMD溶液中,

本文于1987年9月17日收到。

* 天津轻工业学院食品工程系研究生。

** 中国科学院上海植物生理研究所。

制成原生质体悬浮液。

(五) 原生质体再生及再生率计算

将获得的原生质体, 经如下两个步骤加以处理:

1. 用无菌水作适当稀释, 涂布在NB培养基平板上, 28℃培养24h后, 计数菌落, 为未形成原生质体的菌落(此数为B)。

2. 用SMM溶液作适当稀释, 涂布在高渗NB培养基平板上, 28℃培养48h后, 计数菌落, 为形成的原生质体与未形成原生质体的菌数的总和(此数为C)。

设: A为溶菌酶处理前的菌体数

$$\text{则: 形成率} = \frac{A-B}{A}, \quad \text{再生率} = \frac{C-B}{A-B}$$

(六) 原生质体融合

将两亲本原生质体各取0.5ml, 按1:1比例混合, 2000rpm离心10min, 沉淀物中加入0.1ml SMM溶液并予以轻轻摇匀, 再加入0.9ml含40% PEG的SMM溶液, 42℃保温5min, 显微镜下, 清晰可见2或3个细胞融合在一起的情况。

(七) 融合体的检出

将融合处理后的菌液涂布在高渗NB培养基平板上, 28℃培养60h, 用影印法将长出的菌落移植在含Sm和Ap的双抗选择培养基平板上, 48h后, 再次影印或用牙签点种在双抗平板上, 使融合株充分分离, 在第二次的双抗平板上长出的菌落, 可初步认为是融合株。我们通过多次融合实验, 共初步筛选出融合株186株。

(八) 融合体的毒性测定

用上述方法筛选出的融合株只能说明获得一个新的抗性基因, 而是否同时也获得对方的毒蛋白基因, 还需进一步通过生物测定来筛选。

1. 杀蚊试验: 以3龄至4龄的淡色库蚊幼虫为毒杀物, 所用实验菌均为培养48h的新鲜斜面, 用无菌水洗下菌苔。库蚊幼虫毒杀测定以每杯20头为准, 置于装有20ml无菌水的小烧杯中, 加入0.2ml浓度为 10^8 — 10^9 细胞/ml的菌悬液。

2. 杀虫试验: 将上述菌悬液1ml注入烧杯中, 将新鲜的玉米叶(长5cm左右)浸入菌悬液后, 立在烧杯中, 然后用脱脂棉球将余下的菌悬液吸干, 放入2龄至3龄的粘虫10头, 保温保湿培

养。

测试玉米螟时, 将1ml菌液与约5g重的饲料拌匀, 干燥几小时后, 放入10头2龄至3龄玉米螟, 同上述条件保温保湿培养。

以上全部生测均在24、48至120h观察虫体死亡现象, 并计数测定毒杀率。

以双抗平板上筛出的186株, 几乎无不杀虫或杀蚊, 但分别表现为既杀虫又杀蚊的仅有6株, 它们的毒效不仅有差异, 而且有的对玉米螟敏感, 有的对粘虫敏感。

结果与讨论

(一) 原生质体的形成及再生率

通过镜检可知, 随着加入溶菌酶浓度的不同和处理时间的延续, 原生质体形成数量逐渐增多(表1), 经多次重复本实验, TS-1和H₄均以加入2mg/ml溶菌酶, 处理40min为最佳, 其再生率可达37.6%和39.7%。若加大酶量, 原生质体形成率增高, 但再生率急剧下降(表1)。

表1 不同溶菌酶浓度对原生质体形成与再生的影响

菌株	溶菌酶(mg/ml)	原生质体(%)	再生(%)
TS-1	2	91.2	37.6
	3	93.4	27.6
	4	96.7	7.0
	5	97.7	3.0
H ₄	2	87.5	39.7
	3	93.3	31.2
	4	96.1	17.1
	5	98.0	7.0

(二) 原生质体融合及融合子的检出

当TS-1与H₄原生质体混合后, 在聚乙二醇促融下, 于相差显微镜下可看到原生质体的凝聚现象, 在扫描电镜下清晰地观察到融合的原生质体(图1), 融合频率为 7×10^{-6} , 当把出发菌株TS-1、H₄分别涂在双抗平板上, 均不长出菌落, 说明发生抗性突变的频率小于融合频率。

将融合的原生质体涂布在高渗NB培养基上, 待菌落长出后再连续两次影印在含Sm和Ap



图 1 TS-1和H4 的原生质体融合

的选择平板上,目的是让核不融合株充分分离,使稳定的融合体得以保存。28℃培养48h后长出较小菌落,即为两亲株原生质体融合后的再生菌,如F-2, F-3, F-15, F-31等。

(三) 融合体与亲本的形态比较

据表2可知,融合体的个体形态近于亲本

表 2 两亲本和融合体的形态比较

菌 株	个体形态	菌落形态
亲 株 TS-1	1. 营养体呈杆状 (2.60—5×0.95 μm) 常呈两个以上短排列 2. 孢子囊鼓锤状 3. 芽孢位于一端、多为圆形	圆形,扁平,表面光滑湿润,粘稠,半透明,边缘呈细丝状,大小为0.4—0.9cm 悬浮时易于打散
亲 株 H4	1. 培养体呈杆状 (2—4×0.9—1.1 μm), 两端钝圆 2. 孢子囊不明显膨大 3. 芽孢多位于中部,椭圆形	圆形,干燥扁平,表面不很光滑,有皱折,不透明,边缘不规则,大小为0.6—1.1cm 悬浮时不易打散
F-2 F-15 F-45 F-31 F-72	近于TS-1	圆形,扁平,菌苔较厚,表面光滑湿润,粘稠,稍透明,边缘整齐,大小为0.4—0.6cm 悬浮时易于打散

TS-1, 而菌落形态则介于二亲本之间。

(四) 融合体致毒性测定

表 3 双亲与融合体对蚊虫的致毒比较 (24h)

菌 株	TS-1	H4	F-2	F-3	F-15	F-31	F-45	F-72	对照
致死率 (%)	100	0	100	100	100	100	100	100	0

表 4 双亲与融合体对粘虫和玉米螟的致毒比较 (%)

时 间 (h)	菌 株	TS-1		H4		F-2		F-3		F-15		F-31		F-45		F-72		对照	
		幼 虫	A*	B*	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A
24		0	0	90	50	50	17	60	0	60	0	30	17	20	0	20	17	0	0
48		0	0	90	63	60	33	70	0	80	0	50	50	30	17	30	17	0	0
72			0		90		50		10		20		68		34		34		0
96			0		90		50		33		35		90		68		34		0
120			0		90		50		33		35		90		68		34		0

A*: 粘虫 B*: 玉米螟

由表3、4结果可见, TS-1对库蚊幼虫有相当强的毒力,但对粘虫无毒性。而苏云金杆菌H4对蚊虫无毒性,却对粘虫、玉米螟有很强的致死性。经测定的6株融合体均表现出很强的杀虫

毒性,但对粘虫、玉米螟却有着不同的毒杀作用。F-15对粘虫有较强的毒性,而F-31对玉米螟的毒性比其他融合株要高。空白对照组均无一死亡。

上述实验结果表明, TS-1与H4经溶菌酶脱壁制备成原生质体后, 用化学促融剂聚乙二醇促融, 可使二亲株的原生质体发生融合, 当给予再生条件时, 可获得具有双亲遗传性状的新生菌种。

杀虫试验表明融合株的杀虫能力不同, 推测是否与毒蛋白的表达量有关。

融合实验的结果很像一个亲本的DNA转移到另一亲本中去的转化作用的结果, 由于在整个实验过程中加入了DNA酶, 从而排除了转化的可能性。

本实验融合频率较低, 可能同再生频率低有关, 有待于进一步探讨, 并进一步提高双效菌株的毒杀能力。

参 考 文 献

- [1] 任改新等: 昆虫学报, 25:349—350, 1982.
- [2] John, L. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 195:23—28, 1984.
- [3] Kronstad, J. W. et al.: *J. Bacteriol.*, 154 (1):419—428, Apr. 1983.
- [4] 王宪、范云六: 生物工程学报, 3 (1):29—37, 1987.
- [5] 汤懋斌等: 遗传学报, 8 (1):8—13, 1981.
- [6] 江行娟等: 遗传学报, 8 (1):1—7, 1981.
- [7] Chang, S. & Cohen, S. N.: *Mol. gen. Genet.*, 168 (1):111—115, 1979.
- [8] Schaeffer, P. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73 (6):2151—2155, 1976.
- [9] Fodor, K. & Alfoldi: *ibid.*, 73:2147—2150, 1976.

HYBRID STRAINS FOR KILLING MOSQUITOES AND LEPIDOPTERA PRODUCED BY PROTOPLAST FUSION BETWEEN *BACILLUS SPHAERICUS* AND *BACILLUS THURINGIENSIS*

Wang Yuewu Chen Yuehua Chen Ning* Ren Gaixin
Guo Shuhua Jao Ruishen**
(Department of Biology, Nankai University, Tianjin, China)

With PEG induced protoplast fusion, interspecific fusion was carried out by *B. sphaericus* TS-1 which has streptomycin resistance and high toxicity to *Culex mosquitoes* and *B. thuringiensis* H4 that has ampicillin resistance and toxic to *Mythimna separata*. The 6 fusants were selected out of 186 fusants. After transferring on the medium for 10 times, they keep the genetic characteristics of two parents, showing their genetic stability.

The efficiencies of the 6 fusants to kill laval of mosquitoes are 100%, and laval of lepidoptera vary from 30% to 90%, respectively.

Key words

Bacillus sphaericus, *Bacillus thuringiensis*, protoplast fusion

* Tianjin College of Light Industry.

**Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia Sinica.