

苏云金芽孢杆菌 Bt-3701 与巨大芽孢杆菌 Bm-107 种间原生质体融合

穆国俊* 董毓琨

(河北农业大学农学系 保定 071001)

黄冠辉

(河北省科学院微生物研究所 保定 071051)

摘要 具有杀虫活性的苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringensis* subsp. *kurstaki*) Bt-3701 与具有解磷活性的巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium* var. *phosphaticum*) Bm-107 原生质体进行了融合。Bt-3701 原生质体形成率为 99.4%，再生率为 21.4%；Bm-107 原生质体形成率为 97.5%，再生率为 23.8%。以 PEG 为助融剂进行原生质体融合，得到 22 个融合子，融合率达 6.03×10^{-3} 。融合子在双抗培养基 (DR-CNB) 上连续传代 12 次，得到 4 个稳定的融合子，生物测定表明，融合子既具有一定的杀虫活性又具有一定的解磷活性。

关键词 苏云金芽孢杆菌, 巨大芽孢杆菌, 原生质体融合, 杀虫活性, 解磷活性

原生质体技术已成为基础分子生物学研究和微生物育种的一种有效方法。芽孢杆菌属种内融合的研究已有很多报道，但对具有杀虫活性的苏云金芽孢杆菌及具有解磷活性的巨大芽孢杆菌之间的种间融合研究迄今未见报道。该试验试图通过原生质体融合技术获得既具杀虫活性又有解磷活性的融合子，为组建益于农业发展的、具有多种优良性状的新型菌株探索新的途径。

1 材料和方法

1.1 菌株

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringensis*) Bt-3701 (Str^r Rif^r)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) Bm-107 (Str^r Rif^r) 分别由河北省科学院生物研究所提供的 Bt-37 和微生物研究所提供的 Bm-01 中筛选得到。

1.2 培养基

RHAF 培养基^[1]；LB 培养基^[2]；NB 培养基^[2]；TPM 为无速效磷合成培养基；CNB 培养基为 0.5% NaCl、0.5% 酵母膏、0.5% 牛肉膏，pH7.2~7.4；HNB、HCNB 再生培养基是在 NB、CNB 中加入 0.3~0.5mol/L 蔗糖及 0.005% 牛血清蛋白 (BSA)；DR-CNB 双抗选择培养基是在 CNB 中加入链霉素 (Str) 60μg/ml 和利福霉素 (Rif) 20μg/ml。

* 现在河北省科学院微生物研究所工作。

本文于 1994 年 3 月 23 日收到。

1.3 主要溶液

SMM 缓冲液^[3]; SMK 缓冲液^[4]; CHM 高渗缓冲液由 HM^[5] 改进而成; 新生钙液为 0.54% 的 KH_2PO_4 与 29.4% 的 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 等体积混合; PEG 液是将 40g PEG 溶于 SMM 中, 定容至 100ml。

1.4 原生质体的制备与再生

Bt-3701 原生质体的制备与再生参照文献[6]。Bm-107 原生质体的制备与再生参照 Dubnau 等的方法^[7]并加以改进, 采用 CNB 液振荡培养(165r/min, 30℃)12h, 按 4% 转接量转接, 活化 4h, 用 CHM 缓冲液收集菌体, 之后在菌体悬浮液中加入 100~250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶菌酶, 30℃ 酶解 30min。以 HCNB 为再生培养基, CNB 为普通培养基, 计算原生质体形成率及再生率^[8]。

1.5 原生质体融合

采用 SMM 缓冲液将亲株原生质体分别调至 10^7 个/ml, 各取 5ml 均匀混合。离心沉淀后加 5ml 40% PEG 和 0.25ml 新生钙搅匀, 置 37℃ 水浴 3min, 离心沉淀, SMM 稀释。以 HCNB 为再生培养基, DR-CNB 双抗选择培养基筛选融合子。

1.6 融合子的生物学特性

1.6.1 遗传稳定性测定: 在 DR-CNB 上连续转接传代, 观察融合子生长情况。

1.6.2 菌体形态与菌落形态的观察: 用相差显微镜观察对数生长期的营养体形态; 油镜观察孔雀绿染色后的伴孢晶体; CNB 平板观察菌落形态。

1.6.3 解磷活性的观测: 在 TPM 平板上观测各菌株的生长势强弱、菌苔厚度、产酸能力及解磷圈大小; 用溴百里酚蓝为指示剂。

1.6.4 杀虫活性的测定: 以沾菌 (10^8 孢子/ml) 新鲜棉花嫩叶饲喂初孵棉铃虫, 以沾菌 (10^8 孢子/ml) 新鲜玉米嫩叶饲喂二龄玉米螟, 无菌叶饲喂对照虫。35℃ 饲养 2d, 计算致死率及校正致死率。

2 结果

2.1 Bt-3701 原生质体的形成与再生

采取单纯用甘氨酸处理的方法制备原生质体^[9]。培养基、菌龄、甘氨酸浓度、缓冲液后处理等对原生质体的形成与再生有显著影响。采用 RHAf 培养基, 将对数早中期的菌体转接振荡培养 2h 后, 加入 3% 的甘氨酸和 0.3mol/L 蔗糖, 继续振荡培养 5h, 离心沉淀用 HM 洗涤和悬浮, 置 42℃ 水浴 30min。在上述条件下, 原生质体形成率可高达 99.4%, 再生率可达 21.4%, 原生质体直径 1.23~2.99 μm , 平均 2.11 μm 。

2.2 Bm-107 原生质体的形成及再生

2.2.1 培养基对原生质体形成及再生的影响: 不同培养基对菌体生长及原生质体再生影响较大, 对原生质体的形成影响甚微。结果表明(表 1), CNB 宜于 Bm-107 原生质体的制备。

2.2.2 活化培养及酶浓度对原生质体形成和再生的影响: Bm-107 菌株的原生质体形成率与活化培养时间呈负相关, 与酶浓度呈正相关, 而再生率与之相反。用 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶菌酶于 30℃ 处理已活化 4h 的菌体 30min 较理想, 原生质体直径 1.32~2.81 μm , 平均

表 1 培养基对菌体生长、原生质体形成及再生的影响*

Table 1 The effect of culture medium on bacterial growth, protoplast formation and regeneration

培养基 Culture medium	PHM	RHAF	CNB	LB
菌数 (CFU/ml) Bacterial number	4.3×10^5	8.9×10^7	5.4×10^8	7.6×10^7
原生质体形成率 Protoplast formation (%)	99.45	98.64	99.34	97.92
原生质体再生率 Protoplast regeneration (%)	0.29	10.77	21.35	8.25

* 活化培养 4h; 酶浓度 100 μ g/ml; 30 $^{\circ}$ C 酶解 40min。
Transfer inoculation 4h; Lysozyme treatment 100 μ g/ml; 30 $^{\circ}$ C, 40min.

1.76 μ m。

2.3 原生质体融合

以抗药性为遗传标记,采用间接选择法,用灭菌牙签从 HCNB 再生平板上随机挑取 3650 个菌落点种于 DR-CNB 选择平板,结果有 22 个菌落良好生长,视为融合子,融合率达 6.03×10^{-3} 。图 1 显示两个原生质体之间发生融合的现象。

2.4 融合子生物学特性

2.4.1 遗传稳定性:融合子在 DR-CNB 双抗平板上连续转接传代,随着传代次数的增加,能在 DR-CNB 上生长的融合子数目逐渐减少,传代 12 次后,有 4 个融合子 (F-9, F-17, F-21, F-22) 仍良好生长,说明此 4 个融合子的遗传性很稳定。本试验重点对 F-9 和 F-21 进行了生物学测定。

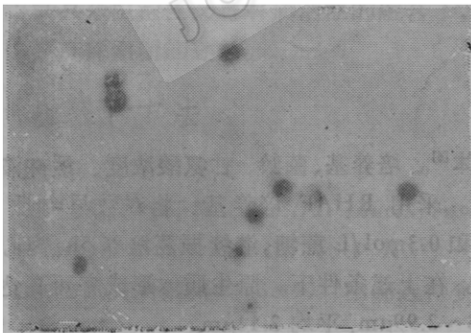
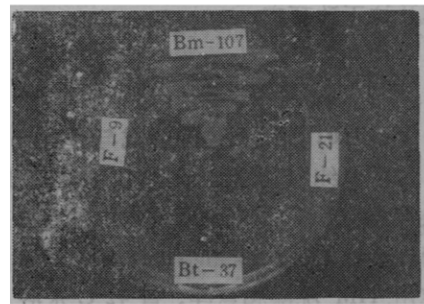


图 1 原生质体融合的相差显微镜照片 (3500 \times)
Fig. 1 Phase contrast microscope photo of protoplast fusion (3500 \times)



TPM (30 $^{\circ}$ C, 4d)

图 2 融合子和亲株在 TPM 平板上生长情况的比较
Fig. 2 Comparison of the growth states of fusants and parental strains on TPM plate

2.4.2 菌落、菌体及伴孢晶体的形态观察:融合子 F-9 及 F-21 的营养体、菌落形态介于双亲之间,但趋近 Bt-3701。融合子可形成菱形伴孢晶体, F-9 的伴孢晶体略小于亲株 Bt-3701, F-21 的伴孢晶体则较 Bt-3701 小得多。

2.4.3 解磷活性的观测: (1) TPM 培养基上的生长情况:在 TPM 培养基上生长势的

强弱,可在一定程度上反映菌株解磷活性的高低,图 2 显示亲株和两个融合子生长情况的差异。(2) 产酸能力的比较: 解磷巨大芽孢杆菌的产酸能力与其解磷活性呈显著正相关^[10]。本实验以溴百里酚蓝为指示剂进行产酸能力的定性比较。在 Bm-107 菌苔周围有较大的变黄区域,说明产酸能力较强;融合子 F-9 及 F-21 菌苔周围均有较小的变黄区域,说明具有一定的产酸能力,但 F-21 强于 F-9; Bt-3701 菌苔周围不变色,说明不产酸。(3) 解磷圈的观测: 采用溴百里酚蓝为指示剂,测得融合子可形成解磷圈。F-9 和 F-21 解磷圈直径分别为 1.5cm 和 1.6cm,明显小于 Bm-107($d = 2.4\text{cm}$), Bt-3701 不形成解磷圈。

2.4.4 杀虫活性的测定: Bt-3701 对二龄玉米螟和初孵棉铃虫均有较高的杀虫活性,Bm-107 无杀虫活性。融合子 F-9 的杀虫活性接近 Bt-3701, F-21 对二龄玉米螟无杀虫活性,对初孵棉铃虫有一定的杀虫活性,但明显低于 Bt-3701。两个融合子的杀虫活性的差异,与其晶体、产酸能力、解磷活性同亲株相比所发生变化的大小相吻合。

3 讨论

遗传性稳定的融合子 F-9 和 F-21,营养体和菌落形态较近似 Bt-3701,均可形成菱形的伴孢晶体。F-9 的伴孢晶体明显大于 F-21,其杀虫活性亦大于 F-21。F-9 及 F-21 均可在 TPM 上生长,并产酸及形成解磷圈,说明融合子具有一定的解磷能力。综上所述,融合子 F-9 和 F-21 表达双亲特性,但在生物学特性上,F-9 较近于 Bt-3701,而 F-21 较近于 Bm-107。

致谢 本试验得到河北省科学院微生物研究所张增艳女士的热情帮助;北京大学生物系李玲君先生及河北农业大学农学系罗耀武教授对试验工作提出宝贵意见,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Isabelle T C, Kenneth D G, Lawrence P. *J Bacteriol*, 1987, 169(12): 5423~5428.
- [2] 王岳五,陈月华,陈宁. 生物工程学报,1988,4(3): 230~233.
- [3] 张美庆,丁安林. 农业科技资料,1978,6: 43~49.
- [4] 陈乃用,印小明. 微生物学报,1986,26(2): 134~142.
- [5] Katalin F. *J Bacteriol*, 1975, 121(1): 390~391.
- [6] 张增艳,穆国俊. 微生物学研究与应用,1992,17: 34~36.
- [7] Dubnau D, Avidoff-albelson R D. *J Mol Biol*, 1971, 56:209~221.
- [8] 刘志成,张淑芝. 微生物学杂志,1989,9(2): 52~57.
- [9] Gaber M H, Horchkiss R D. *J Bacteriol*, 1979, 137: 1346~1353.
- [10] 黄德羽. 农业科技资料,1979,9: 20~25.

INTERSPECIFIC PROTOPLAST FUSION BETWEEN *BACILLUS THURINGENSIS* Bt-3701 AND *BACILLUS MEGATERIUM* Bm-107

Mu Guojun Dong Yukun

(Department of Agronomy, Hebei Agriculture University, Baoding 071001)

Huang Guanhui

(Institute of Microbiology, Hebei Academy of Sciences, Baoding 071051)

Abstract The results of the interspecific protoplast fusion between *B. thuringensis* sub. *kurstaki* Bt-3701 which has pesticide ability, and *B. megaterium* var. *phosphaticum* Bm-107 which has decomposing phosphate activity, were reported. High frequency of protoplast formation and regeneration was obtained with 4h activated Bm-107 treated by 100 μ g/ml lysozyme, and with 2h activated Bt-3701 treated by 3% glycin and mild temperature. Using 40% PEG and 5% nascent Ca²⁺ to treat the parental protoplast mixture for 3min at 37 $^{\circ}$ C, 4 stable fusants were obtained. Biological tests show that they have both pesticide ability and decomposing phosphate activity, but which are weaker than that of parental strains.

Key words *Bacillus thuringensis* sub. *kurstaki*, *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*, Protoplast fusion, Pesticide ability, Decomposing phosphate activity