

对甜菜夜蛾高毒苏云金芽孢杆菌菌株的选育*

吴继星** 陈在佺 张志刚

(湖北省农业科学院 Bt 研究开发中心 武汉 430064)

摘要: 采用物理诱变——虫体传代模式, 选育获得一株对甜菜夜蛾高毒菌株 BtCZE 99985。通过摇瓶和 40 t 发酵罐 3 年 10 批发酵试验, 表明该菌株具有良好的发酵性能。摇瓶试验表明, 与出发菌株 93005、对照菌株 HD-1-580、GC-91 相比较, 该菌株对甜菜夜蛾的毒效分别提高 429%、655%、114%。40t 发酵罐发酵试验表明, 该菌株对甜菜夜蛾测定的 LC_{50} 平均值为 $0.076 \mu\text{L/mL}$, 比 GC-91 菌株 (平均 $0.213 \mu\text{L/mL}$) 的毒效提高 180%。

关键词: 苏云金杆菌 (Bt), 甜菜夜蛾, 高毒, 选育

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2004) 03-0025-05

Breeding of *Bacillus thuringiensis* (Bt) with High Insecticidal Activity to *Spodoptera exigua*

WU Ji-Xing CHEN Zai-Er ZHANG Zhi-Gang

(BT Research and Development Center, Hubei Academy of Agriculture Sciences, Wuhan 430064)

Abstract: By the breeding model of physics mutagenesis (^{60}Co , UV light) and re-strong in the body of insects, We obtained a Bt strain Bt99985 with high insecticidal activity. The shake flask and 40t tank fermentation tests showed that, this strain showed special activity against *Spodoptera exigua*. Comparing with original Bt strain: 93005, CK strain: HD-1-580 and GC-91, the value of potency increased respectively by 429%, 655% and 114% in shake flask test. Comparing with GC-91, the value of potency increased by 180% in 40t tank fermentation test.

Key words: *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bt), *Spodoptera exigua*, High insecticidal activity, Breeding.

目前广泛用于防治甜菜夜蛾 (*Spodoptera exigua*) 的苏云金芽孢杆菌 (Bt) 菌株对该害虫毒效较低, 防治效果不甚理想, 因此选育对甜菜夜蛾高毒的 Bt 菌株便成为学者们探讨的热点课题^[1]。郑大胜等^[2]测定 3100 株野生型 Bt 菌株对甜菜夜蛾的毒力活性, 得

* 国家九五攻关项目 (No 96-005-01-09)

** 联系人 Tel: 027-87380915, E-mail: btcdc@public.wh.cn

收稿日期: 2003-06-02, 修回日期: 2003-09-03

到高毒株 13 株, 其中 CN33 在 $5 \mu\text{L/mL}$ 浓度下校正死亡率达到 100%。牛桂兰等^[3]以甜菜夜蛾为供试昆虫, 从 406 株 Bt 菌株中筛选获得一株高效的 WY-190 菌株。我们从 1995 年开始, 采用物理诱变 (紫外线,⁶⁰Co 辐射处理和热处理) 与虫体传代相结合的方法, 交叉处理, 获得一个对甜菜夜蛾高毒的菌株 BtCZE99985。现将该菌株的选育及发酵研究报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 出发菌株: Bt93005 系作者 1993 年从木槿卷叶蛾自然死亡的幼虫体内分离获得; 对照菌株 HD-1-580 为本室保藏菌株, BtGC-91 由瑞士 Ciba-Geigy 公司提供。

1.1.2 培养基: (1) 斜面、茄氏瓶和营养体悬液摇瓶培养基为常规牛肉膏-蛋白胨培养基^[4]。(2) 摇瓶和 40t 发酵罐培养基: 豆饼粉 (东北产) 47 g, 淀粉 (石家庄) 18 g, 酵母粉 (宜昌产) 2 g, 蛋白胨 1 g, KH_2PO_4 1 g, CaCl_2 2 g, ZnCl_2 0.3 g, FeCl_2 0.5 g, MgCl_2 0.05 g, CoCl_2 0.05 g, CuCl_2 0.05 g, 添加剂 II 号 3 g, 自来水定容至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 紫外线处理 (UV): 使用功率 15 W, 波长 $253.7 \mu\text{m}$ 的紫外线灯。取在牛肉膏蛋白胨培养基上 30°C 振荡培养 8 h 的营养体悬浮液 5 mL, 置于平皿中, 距离紫外线灯 30 cm 处振荡照射 3 min, 然后结合自然分离, 挑选正常菌落, 并置于 30°C 培养。

1.2.2 ⁶⁰Co 辐射处理: 取在牛肉膏-蛋白胨培养基上 30°C 培养 4 d 的试管斜面置于 $7 \times 10^4 \text{ rad}$ 剂量下处理, 将辐射处理菌苔刮下, 以生理盐水稀释, 进行平板分离, 30°C 培养 30 h 后进行斜面初筛。

1.2.3 高温处理 (HT): 将培养 3 d 的斜面制成孢子悬浮溶液, 置于 $90^\circ\text{C} \sim 100^\circ\text{C}$ 水浴处理 30 min, 冷却至室温后吸入 0.5 mL 悬浮液放入灭菌砂土管, 粗环将菌苔与砂粒搅匀, 细环分离单孢子。分离菌株作为进一步筛选的材料。

1.2.4 虫体传代 (IT): 虫体传代虫种选用斜纹夜蛾。方法是: 从野外荷叶上采回卵块, 室内孵化, 饲养至 3~4 龄后用镊子轻轻夹住幼虫前胸部, 浸入预先制备好的 1 亿芽孢/mL 菌悬浮液中 5 s, 取出迅速置于吸水纸上, 吸干虫体表面的菌液, 然后每套培养皿内放入 5 头幼虫, 加入新鲜饲料, 30°C 恒温饲养, 取 24 h 死亡幼虫体液进行菌株分离, 接入斜面后进行斜面初筛。

1.2.5 斜面初筛和摇瓶复筛: (1) 斜面初筛: 将诱变处理和虫体传代后分离的单菌落分别随机挑取不同类型菌落移种到斜面上, 30°C 培养 24 h 后观察斜面菌苔的丰满度及噬菌斑状况, 同时涂片镜检检查晶体率。(2) 摇瓶复筛: 取 500 mL 三角瓶, 培养基装量 27 mL, 分别接种后置于 $30^\circ\text{C} \sim 32^\circ\text{C}$, 230 r/min 振荡培养 28~35 h, 终止培养后取发酵液检测生物效价和晶体蛋白含量。

1.2.6 发酵生物效价测定: 棉铃虫试验采用室内人工饲养的棉铃虫初孵幼虫, 标准品为 CS3 ab-1991 (生物效价为 15,000 IU/mg), 将标准品和样品按 5 个稀释度进行梯度稀释, 混入人工饲料中。将孵化不超过 10 h 且未取食的初孵棉铃虫幼虫抖入直径 20 cm 的玻璃缸, 选取爬上玻璃缸口的活跃幼虫为供试虫, 移入盛有感染饲料的 24 孔组织培养板中, 加盖, 叠加置于 30°C 恒温箱中培养。72 h 后调查死、活虫数, 计算校正死亡率 and 毒力回归方程, 求出致死中浓度 (LC_{50}) 值、斜率、相关系数, 最后根据供试样品

和标准品的 LC_{50} 及标准品的毒力效价计算出样品效价。甜菜夜蛾试验采用室内人工饲养的甜菜夜蛾初孵幼虫，初孵幼虫个体差异小，且敏感度适中。各样品同上进行梯度稀释，用微量取样器移取稀释液涂布在预备的人工饲料表面，涂布量为 0.2 mL/cm^2 ，室温下静置 2~3 h 待表面无水后接虫，每杯 50 头，恒温 25°C 培养 48 h 后检查结果，计算方法与棉铃虫试验相同。

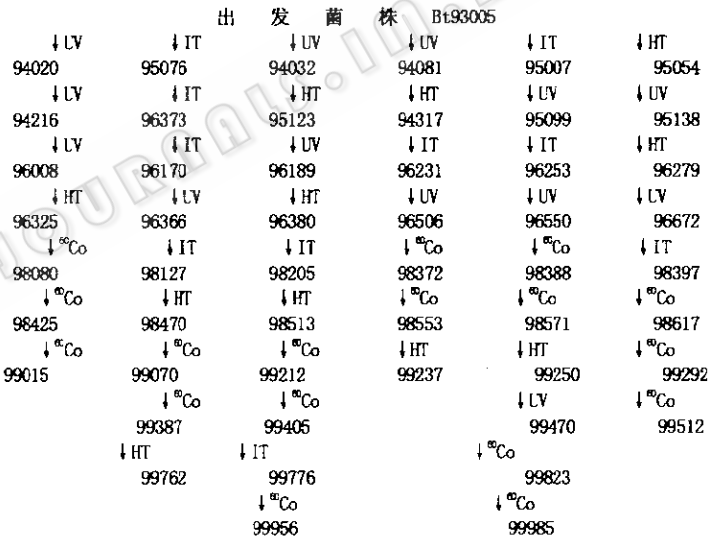
1.2.7 晶体蛋白含量测定：将各稀释液样品采用超声波处理 30 min 后，加入适量的碱解液，使其中的伴孢晶体蛋白完全溶解。然后加入含有 β -巯基乙醇的样品缓冲液，沸水浴后 $1,000\text{ r/min}$ 离心，取上清液电泳。根据凝胶上蛋白量与其紫外吸收量成正比的关系，利用 Image-ID 软件，通过扫描凝胶即可计算出样品中晶体蛋白含量。

1.2.8 发酵试验：40 t 罐按 25 t 投料，加消泡剂 41 kg，消毒灭菌，待罐温降至 33°C 时接种孢子悬浮液（ 80°C 处理 25 min），培养温度 $30^{\circ}\text{C} \sim 32^{\circ}\text{C}$ ，罐压 $0.3 \sim 0.5\text{ kg/cm}^2$ 搅拌常开，转速 160 r/min ，芽孢晶体脱落 40% 时终止培养，测定生物效价和晶体蛋白含量值。

2 结果与分析

2.1 高毒菌株选育系谱

以 Bt93005 为出发菌株，采用物理诱变和虫体传代相结合的方法交替处理，选育系谱如图 1。



注：UV 紫外线处理，⁶⁰Co 辐射处理，HT 高温处理，IT 虫体传代

图 1 甜菜夜蛾高毒菌株选育的程序

2.2 摇瓶试验

见表 1。将出发菌株，筛选菌株和对照菌株分别接经热处理的孢子悬浮液（1 亿芽孢/ mL）0.2 mL，每个菌株接种 3 瓶。终止培养后进行发酵水平的检测。结果表明，诱变选育菌株对棉铃虫的毒力表现不一，与出发菌株相比，除 99015 外其余菌株均有大幅提高，提高幅度为 51.2%~97.4%，其中 99985 菌株最高，为 97.4%；对甜菜夜蛾的毒效提高更为显著，与出发菌株的毒效相比提高 118%~429%。表 1 还显示，尽管这些

菌株蛋白晶体含量与 GC-91 菌株相当,但对两种昆虫毒力差异极大。总体表现为对棉铃虫低毒,而对甜菜夜蛾高毒。

表 1 各菌株摇瓶发酵试验结果

测定项目	菌 株								
	99015	99237	99512	99762	99956	99985	HD-1-580	GC-91	93005
发酵周期 (h) 32.0	31.5	31.0	31.5	32.0	31.5	31.0	34.0	32.5	
同步率 (%)	96	97	96	95	96	98	95	98	94
晶体含量 (%)	0.43	0.39	0.47	0.42	0.40	0.45	0.21	0.41	0.39
与 93005 比较 (± %)	10.3	0	20.5	7.7	2.6	15.4			
与 HD-1-580 比较 (± %)	104.8	85.7	123.8	100.0	90.5	114.3			
与 GC-91 比较 (± %)	4.9	4.9	14.6	2.4	-2.4	9.8			
棉铃虫生测效价 (IU/μL)	1098	2063	1660	1887	2013	2167	1830	4370	1098
与 93005 比较 (± %)	0	87.9	51.2	71.9	83.3	97.4			
与 HD-1-580 比较 (± %)	-40.0	12.7	-9.3	3.1	10.0	18.4			
与 GC-91 比较 (± %)	-74.9	-52.8	-62.0	-56.8	-53.9	-50.4			
甜菜夜蛾生测相对毒力*	231	285	370	285	218	529	70	247	100
与 93005 比较 (± %)	131	185	270	185	118	429			
与 HD-1-580 比较 (± %)	230.0	307.1	428.6	307.1	211.4	655.7			
与 GC-91 比较 (± %)	-6.5	15.4	49.8	15.4	-11.7	114.2			

* 相对毒力,以 B93005 毒力为基数 100,根据其它样品 LC₅₀与 B93005 的 LC₅₀计算出相对毒力

2.3 大罐发酵

从 2000 年开始,我们选用对甜菜夜蛾高毒的菌株 BtCZE99985 在 40 t 大罐进行了连续 3 年多批发酵试验,发酵水平测试结果见表 2。表 2 结果显示,与对照菌株 GC-91 相比,发酵周期,晶体含量水平基本相当,其对棉铃虫和甜菜夜蛾的毒力呈明显反差。其对棉铃虫的毒力为 2,004 IU/μL,仅为 GC-91 菌株 (4,476 IU/μL) 的 44.8%。该菌株发酵液、旋风、塔底对甜菜夜蛾测定的 LC₅₀ 值分别为 0.076 μL/mL、0.010 mg /mL、0.013 mg /mL,与 GC-91 菌株 (LC₅₀值分别为 0.213 μL/mL、0.026 mg /mL、0.035 mg /mL) 的毒效比值分别达到 2.8、2.6、2.7 倍。

表 2 BtCZR99985 菌株在 40t 发酵罐发酵水平测试结果*

日 期	罐 批	发酵周期 (h)	发酵液			旋风			塔底		
			效价 (IU/μL)	LC ₅₀ (μL/mL)	晶体含量 (%)	效价 (IU/mg)	LC ₅₀ (mg/mL)	晶体含量 (%)	效价 (IU/mg)	LC ₅₀ (mg/mL)	晶体含量 (%)
2000.11.1	00-231	30.5			0.44			0.97			0.71
2001.2.21	01-040	33.5	1098	0.080	0.58		0.01	1.21		0.013	1.13
2001.4.10	01-088	31.5			0.45		0.92				0.70
2001.4.27	01-105	37.5			0.29			0.70			0.58

续表 2

日 期	罐 批	发酵周期 (h)	发酵液			旋 风			塔 底		
			效价 (IU/ μ L)	LC ₅₀ (μ L/mL)	晶体含量 (%)	效价 (IU/mg)	LC ₅₀ (mg/mL)	晶体含量 (%)	效价 (IU/mg)	LC ₅₀ (mg/mL)	晶体含量 (%)
2001.5.14	01-122	30.5		0.090	0.43		0.009	0.76		0.014	0.66
2001.6.8	01-147	33.5			0.48			0.77		0.013	0.70
2001.7.16	01-185	32.0		0.059	0.35		0.011	0.75			0.64
2002.1.28	02-026	31.5	2063		0.45	29178		1.09	24767		0.96
2002.7.3	02-164	31.0	2765		0.41	26538		0.74	23000		0.72
2003.2.17	03-027	31.0	2089		0.43	37586		0.65	31818		0.62
以上 10 罐平均		32.5	2004	0.076	0.43	31101	0.01	0.86	26528	0.013	0.64
GC-91 菌株 10 罐平均		33.8	4476	0.213	0.44	52675	0.026	0.85	40366	0.035	0.62

* 表 2 中效价为棉铃虫初孵幼虫的生测结果, LC₅₀ 为对甜菜夜蛾初孵幼虫的生测结果

3 讨论

苏云金芽孢杆菌制剂的生产与大面积应用, 至今已有 40 多年历史, 但真正能够应用于害虫防治的菌株种类仅 10 多种。究其原因, 主要是迄今发现和使用的菌种有限, 毒力不高, 杀虫谱较窄。例如 HD-1, 7216 等我国广泛使用的菌株对甜菜夜蛾, 斜纹夜蛾等夜蛾科害虫毒力较低。因此, 构建或筛选对某些重要害虫具有高毒力的特异性菌株便成为我们研究的重要课题。根据这个目标, 作者从国家“八五”以来便从两个方面进行了研究。一是广泛从全国各地收集的样品(土壤, 昆虫, 水体等)中进行分离筛选; 二是以现有菌株为出发菌株, 采用物理诱变与虫体传代的方法进行选育, 并获得成功。

许多研究人员习惯采用物理和化学诱变剂交替进行的方式选育高毒力、抗噬菌体菌株, 我们则将物理诱变与虫体传代的方式交替进行, 并获得一株对甜菜夜蛾高毒的菌株 BtCZE99985。通过摇瓶和 40 t 大罐发酵试验表明该菌株具有良好的发酵性能, 特别对甜菜夜蛾的毒力明显高于出发菌株 93005 与对照菌株 HD-1-580、GC-91。由此可见, 微生物理化等传统诱变技术仍然不失为高效菌株选育的有效方法。

参 考 文 献

[1] 王津红, 吴卫辉, 陈月华, 等. 微生物学通报, 2001, 28 (3): 50~55.
[2] 郑大胜, 黄军艳, 闫建平, 等. 中国病毒学, 2000, 15 (杀虫微生物专集): 98~101.
[3] 牛桂兰, 闫建平, 郑大胜, 等. 中国生物防治, 2001, 18 (4): 166~170.
[4] 吴继星, 陈在恒, 谢天健, 等. 生物防治通报, 1994, 10 (3): 110~113.