

文章编号 :1003-8701 (2006)01-0050-03

球孢白僵菌最适培养基筛选和遗传转化筛选标记的研究

徐文静¹, 马德良^{1,2}, 刘娜¹, 谭云峰¹, 李启云¹, 董英山¹

(1. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学农学系, 长春 130118)

摘要:研究了球孢白僵菌在 4 种培养基上的生长速度,发现球孢白僵菌在 L-broth 培养基上生长最快,在 PDA 培养基上产孢最快。进一步研究包括除草剂和潮霉素 B 等 10 种抗生素在 L-broth 培养基上对球孢白僵菌菌丝体和原生质体的生长抑制作用。球孢白僵菌菌丝体在 150 mg/L 除草剂的培养基上生长被完全抑制,球孢白僵菌的原生质体在 25 mg/L 除草剂的培养基上生长被完全抑制,潮霉素 B 和其他抗生素没有明显的抑制作用。结果表明,外源基因转化球孢白僵菌原生质体时,可以以抗除草剂基因为转化筛选标记。

关键词:球孢白僵菌;生长曲线;抗生素;除草剂

中图分类号:S482.39

文献标识码:A

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana* Vuillemin)属半知菌纲,丛梗孢目,丛梗孢科,白僵菌属,是最常见的昆虫病原真菌之一,广泛应用于害虫的生物防治。在我国南方,已应用球孢白僵菌大面积防治林区松毛虫,并且在东北地区防治玉米螟取得了显著效果。由于球孢白僵菌的作用方式是感染害虫,在害虫体内寄生,消耗害虫的营养,其作用时间长、防效不稳定。目前,利用基因工程技术,可以把外源抗虫基因转入球孢白僵菌,使其表达,增加球孢白僵菌的致病能力,缩短其作用时间,增强防效。以此为目的研究了球孢白僵菌的最适生长培养基,并且在最适培养基上对不同抑制剂进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

球孢白僵菌由吉林省农业科学院环境与资源中心提供。

4 种培养基:①L-broth 培养基为 1%蛋白胨、0.5%NaCl、0.3%酵母浸出物、2%蔗糖、2%琼脂;②PDA 培养基为马铃薯 200 g,去皮切碎煮沸 30 min,取出过滤液加入 15 g 葡萄糖、20 g 琼脂粉定容至 1 L,pH 值自然;③花生培养基为花生饼 3%(取煮出液过滤)、蛋白胨 0.2%、磷酸二氢钾 0.02%、硫酸镁 0.02%、蔗糖 3%、琼脂 2%~2.5%,pH 值自然;④盐培养基为硝酸钠 0.2%、磷酸二氢钾 0.02%、硫酸镁 0.02%、硫酸亚铁 0.001%、淀粉 1%、蔗糖 2%、琼脂 2%,pH 值自然。

1.2 实验方法

取等量的菌悬液(菌种活化后,培养 24 h 的菌悬液)0.1 mL,在不同培养基的培养皿上涂平板,27℃培养,2~8 d 内观察,测量菌落直径,记录菌落变色时间和变色程度,统计结果。

用接种环接取适量孢子于 50 mL 不同培养基中,在摇床中(170 rpm 27℃)培养 20~30 h,取 0.1 mL 培养液接种到 50 mL 培养基中摇床培养 20 h,再取 0.1 mL 培养液接种到含少量玻璃珠的 200 mL 培养基中摇床培养,分别在 16、24、28、32、36、40、44、50 和 60 h 各取 1 mL,721 分光光度计测 OD₆₀₀,以无菌培养基为空白对照,做生长曲线。

收稿日期:2005-11-17

基金项目:吉林省农科院生物技术中心内部资助项目

作者简介:徐文静(1977-),女,辽宁省营口人,助理研究员,在读硕士,研究方向为生物农药。

用卡那霉素、氨基青霉素、四环素、利福平霉素、硫酸链霉素、先锋霉素、羧苄青霉素、壮观霉素、潮霉素 B 和除草剂分别配制浓度为 25、50、100、150、200、300、400 和 800 $\mu\text{g/mL}$ 的 L-broth 培养基若干皿。取等量的孢子悬液 0.1mL 在不同梯度的抗生素和不含抗生素的培养皿上涂板, 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2~10 d 内观察并统计结果。

2 结果与分析

2.1 涂平板观察法筛选结果

表 1 菌落直径和变色状态统计结果

培养基种类	菌落直径平均值(mm)和菌落数量						菌落变色状态				
	48 h		72 h		96 h		96 h	120 h	144 h	168 h	191 h
	大小	数量	大小	数量	大小	数量					
PDA	3.21 \pm 0.25	29	6.87 \pm 0.21	30	9.44 \pm 0.40	30	白色	淡黄	乳黄	乳黄	乳黄
花生培养基	3.92 \pm 0.31	29	6.07 \pm 0.32	29	8.12 \pm 0.43	29	白色	淡黄	乳黄	乳黄	乳黄
L-broth	5.12 \pm 0.23	33	11.03 \pm 0.27	33	15.28 \pm 0.20	33	白色	白色	淡黄	淡黄	乳黄
盐培养基	1.13 \pm 0.21	27	3.47 \pm 0.18	27	5.81 \pm 0.12	27	白色	淡黄	淡黄	乳黄	乳黄

从表 1 可见, 在 2~4 d 观察球孢白僵菌的菌落数量和直径, 发现培养基上的菌落直径由大到小依次为 L-broth 培养基>PDA 培养基>花生培养基>盐培养基。在 4~8 d 观察平板孢子的变色程度, 发现 PDA 和花生培养基上孢子变色最快、最重, 但 PDA 培养基的菌落直径大于花生培养基, 产孢子的数量比花生培养基多, L-broth 培养基孢子变色最慢, 证明 PDA 培养基产孢率最高, 适合生产球孢白僵菌的孢子; 而 L-broth 培养基适合球孢白僵菌的营养生长, 可以用来生产菌丝体。

2.2 生长曲线法筛选结果

从图 1 可见, 球孢白僵菌菌丝培养的最适培养基为 L-broth 培养基, 菌丝在不同培养基上的生长速度依次为 L-broth 培养基>花生培养基>PDA 培养基>盐培养基, 但是在菌种达到平台期时 PDA 培养基中的菌丝含量高于花生培养基, 此结论与涂平板观察法结果基本一致。图 1 花生培养基和 PDA 培养基的生长曲线在平台期附近有交叉, 花生培养基已经达到平台期, PDA 培养基还没有达到平台期, 说明花生培养基营养比较高, 利于培养早期的菌丝生长, 而 PDA 培养基营养丰富, 利于产生更多的菌丝, 但生长时间略长。

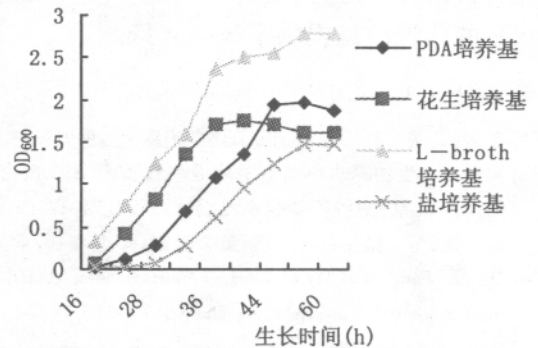


图 1 球孢白僵菌菌丝在不同培养基中的生长曲线

2.3 抗生素选择结果

表 2 抗生素筛选(培养 4d 生长状态)结果

抗生素浓度 ($\mu\text{g/mL}$)		抗生素种类										
		Kan	Amp	Str	Rif	Chl	Ce	Cb	Spec	Hyg	Tet	PPT
无抗生素	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
25	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
50	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
100	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
150	A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-
	B	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-

注: A 为孢子萌发时的状态; B 为原生质体萌发的状态; Kan, Kanamycin, 卡那霉素; Amp, Ampicillin, 氨基青霉素; Str, Streptomycin Sulfate, 硫酸链霉素; Rif, Rifampicin, 利福平霉素; Chl, Chloramphenicol, 氯霉素; Ce, Cephalothin I, 先锋霉素 I; Cb, Carbenicillin Na₂, 羧苄青霉素; Spec, Spectinomycin, 壮观霉素; Hyg, Hygromycin B, 潮霉素 B; Tet, Tetracyclin, 四环素; PPT 为除草剂; “-” 代表完全抑制; “+++” 代表生长正常; “++” 代表生长有明显抑制; “+” 代表生长大部分被抑制。

从表 2 可以看出, 除草剂浓度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 时, 球孢白僵菌菌丝萌发几乎完全正常, 而球孢白僵菌

原生质体萌发几乎完全被抑制(但有时也有极少生长,与原生质体纯度有关),其它抗生素无明显影响;除草剂浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,球孢白僵菌菌丝萌发有明显抑制现象,而球孢白僵菌原生质体萌发则在该浓度及其以上浓度时被完全抑制,其它抗生素无明显影响;除草剂浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,球孢白僵菌菌丝萌发大部分被抑制,其它抗生素无明显影响;除草剂浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 及其以上时,球孢白僵菌菌丝萌发被完全抑制,其它抗生素无明显影响,与球孢白僵菌孢子萌发时的抑制剂浓度相近。潮霉素 B 对球孢白僵菌菌丝体和原生质体的菌落数目和生长速度都略有影响,但是要明显抑制生长时的剂量为 800 $\mu\text{g/mL}$ 以上,与 600 $\mu\text{g/mL}$ 的遗传转化选择剂量基本一致。而其它抗生素对生长的抑制就更弱,即使在高达 800 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下几乎没有抑制。

抗除草剂基因和抗潮霉素 B 基因都是遗传转化常用的筛选标记,通过实验可以确定球孢白僵菌的遗传转化,可以用抗除草剂基因作选择标记,这个结果与多种除草剂能够抑制球孢白僵菌的菌丝生长和孢子萌发相一致。

3 结 论

球孢白僵菌菌丝生产最适培养基为 L-broth 液体培养基,在培养 16~48 h 为对数生长期,之后逐渐达到平台期。抗生素选择实验表明,球孢白僵菌原生质体萌发可以被 25 mg/L 除草剂在 L-broth 固体培养基上完全抑制,而菌丝体萌发可以被 150 mg/L 除草剂在 L-broth 固体培养基上完全抑制。

结果表明,可以 L-broth 液体培养基为球孢白僵菌菌丝体生长介质,以平板除草剂浓度 30 mg/L 为球孢白僵菌原生质体途径遗传转化的筛选标记,以平板除草剂浓度 150 mg/L 为球孢白僵菌遗传转化后代的选择压力,这为今后进一步开展球孢白僵菌遗传转化工作奠定了基础,也为球孢白僵菌分子水平的菌种改良提供了技术支持。

参考文献:

- [1] 李运帷,等. 利用昆虫病原真菌防治森林害虫的展望,中国虫生真菌研究与应用(第 1 卷)[M]. 北京:学术期刊出版社,1998,10-14.
- [2] 冯明光. 生物杀虫剂与新的农业科技革命[A]. 植物保护 21 世纪展望暨第三届全国青年植物保护科技工作者学术研讨会论文集[C]. 北京:中国科学技术出版社,1999,21-24.
- [3] 赵 斌,等. 微生物学实验(第 2 版)[M]. 北京:科学出版社,1998,82-92.
- [4] Weiguo Fang, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Beauveria bassiana using an herbicide resistance gene as a selection marker, Journal of invertebrate pathology, 2004,85, 18-24.
- [5] Maria, et al. Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of entomopathogenic fungus Beauveria bassiana, Journal of microbiological methods, 2004, 58, 197-202.
- [6] 侯爱菊,等. 转基因植物中筛选标记的利用及消除[J]. 遗传, 2003, 25(4): 466-470.
- [7] Gardner W A. Sensitivity of Beauveria bassiana to selected herbicide[J]. Econ.Entomol, 1985,78: 1275-1279.

Studies on the Optimum Medium and Genetic Transformation Selection Marker of Beauveria bassiana

XU Wen-jing, MA De-liang, LIU Na, et al.

(Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: The growth rate of Beauveria bassiana on four medium was investigated. The results showed that the mycelium of *B. bassiana* grown fast in the L-broth medium, and the spores grown fast in the PDA medium. The growth of the protoplast and spores of *B. bassiana* were fully inhabited in the L-broth medium that containing 25 mg/L and 150 mg/L herbicide respectively, while homomycin B and other antibiotics used in this experiment had no effect on the growth of *B. bassiana*. The results indicated that herbicide resistant gene should be used as a selection marker gene in protoplast genetic transformation of *B. bassiana*.

Key words: Beauveria bassiana; Growth curve; Antibiotic; Herbicide