

He-Ne 激光对球孢白僵菌生物学特性的影响

杨 革, 陈洪章, 李佐虎

(中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080)

摘 要:应用 He-Ne 激光对球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 75A 进行辐照处理. 研究了不同剂量激光辐照对菌体生长的影响, 辐照强度 0.48 mW/cm^2 、辐照 15 min 利于菌体的诱变. 两种激光辐照方式中, 生理盐水菌悬液辐照方式诱变效果较好. 经发酵产孢实验和菌体生物量测定, 发现 He-Ne 激光对球孢白僵菌具有明显的生物刺激效应和诱变作用, 并初步筛选到产孢量有较大变化的辐照变异菌株; 同时, 通过对变异菌株的细胞外、胞周间、细胞内三位区的 RNA 和 DNA 分析, 进一步证实了 He-Ne 激光对球孢白僵菌的诱变作用.

关键词: He-Ne 激光; 球孢白僵菌; 诱变作用

中图分类号: Q939.9

文献标识码: A

文章编号: 1009-606X(2003)05-0438-04

1 前言

激光辐照应用于生物技术有其独到之处. 激光是一种光子波动形式, 同时也是一种能量传递形式. 利用激光辐照的光效应以及电磁场效应直接或间接地影响生物有机体, 引起细胞遗传大分子的改变, 导致相关酶的激活或纯化, 进而引起细胞分裂和生理代谢途径的改变^[1]. 激光独有的特点在微生物诱变育种中具有重要应用价值.

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)具有较广泛的寄主范围, 能寄生很多种昆虫^[2]. 白僵菌是国内研究最多、应用最广的一种昆虫病原真菌^[3]. 在松毛虫、玉米螟的防治中, 白僵菌是一种有效的生物防治手段, 但应用效果常常受各种因子的影响, 其中菌株产孢量的多少是关键因素之一. 由于一般的白僵菌的产孢量较低, 通常需要对产生菌进行高产突变株的诱变选育. 本文应用 He-Ne 激光对球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 75A 辐照所产生的诱变效应进行了初步的研究.

2 材料与方法

2.1 菌种和培养基

菌种球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 75A 由本研究室保存.

斜面培养基(g/L): 蛋白胨 10, 牛肉膏 10, 酵母膏 3, 琼脂 20; pH 6.5.

种子培养基(g/L): 淀粉 20, 豆饼粉 10, KH_2PO_4 2, MnSO_4 0.01, FeSO_4 0.01, NaCl 10; pH 6.5.

基础发酵培养基(g/L): 同种子培养基.

2.2 激光器

He-Ne 激光器(由山东省激光偏光工程技术中心提供), 辐照强度 0.48 和 1.44 mW/cm^2

2.3 培养条件

菌种活化: 取 75A 菌种一环, 接入新鲜斜面培养基内, 27°C 培养 72 h.

孢子的制备: 取一定量的菌悬液, 用无菌水制成浓度为 12×10^3 个/ml 的悬液, 供辐照用.

收稿日期: 2002-12-17, 修回日期: 2003-05-19

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(批准号: KSCXZ-SW-301)

作者简介: 杨革(1966-), 男, 山东省郓城市人, 博士后, 生化工程专业; 陈洪章, 通讯联系人, E-mail: chenhz@yaho.com.

种子培养: 250 ml 三角瓶内装 50 ml 种子培养基, 接种活化后的斜面一环, 于温度 27°C、转速 200 r/min 条件下摇床上培养 48 h.

摇瓶培养: 按 5% 的接种量将种子液接入基础发酵培养基中, 500 ml 三角瓶装液量为 100 ml, 转速 200 r/min, 温度 27°C 下培养 72 h.

2.5 He-Ne 激光辐照

取 4 ml 制备的孢子悬液加到直径 9 cm 的培养皿内, 置磁力搅拌器上, 激光扩束光斑直径为 1 cm, 辐照距离 30 cm, 辐照时间分别为 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 min, 计算其正变率和负变率. 取辐照孢子液 2 ml 于液体培养基中, 200 r/min 摇床上培养 48 h, 停止培养, 取孢子后再辐照.

2.6 分析方法

生物量测定: 使用干重法测定 540 nm 处光密度.

突变株选育: 将辐照孢子悬液用生理盐水稀释成 10^{-1} ~ 10^{-7} 浓度, 取 0.2 ml 涂皿, 每个稀释度涂 3 个平皿. 27°C 培养 20 h 后, 挑出生长速度快、形态大、产孢量高的单菌落进行纯培养.

突变菌株正变态率的计算: 正变态率=正突变态菌落数/总菌落数 \times 100%.

产孢量测定: 用血球计数板测定.

高产突变株的确定: 应用无效假说统计法^[4]筛选遗传性状稳定的高产菌株.

遗传稳定性实验: 将所选突变株在斜面培养基中 24 h 转接 1 次, 共转接 15 代, 测定其生物量、产孢量.

细胞外 RNA 及 DNA 测定: 紫外吸收法^[5]. 胞周间物质测定参照 Akaki 法^[6]. 胞内物质测定参照 Tagawa 法^[7].

3 结果与分析

3.1 激光辐照强度的影响

菌体在 He-Ne 激光的作用下, 机体产生辐照活化效应, 既表现为形态结构上的改变, 又表现在代谢生理方面的变化. 经过辐照诱变之后出现少量形态或色素有变异的菌落, 称为正变态菌株, 它们一般多与正常型接近, 菌落特征严重变异(如菌落的含水状态、外观状态、透明度、颜色、边缘、生长速度、气味等)的往往为低产负变态菌株. 孢子悬液用生理盐水稀释 10^{-4} 倍. 表 1 表明激光辐照强度和时间影响球孢白僵菌的正变态率, 辐照强度低的正变态率普遍比辐照强度高时高. 辐照 15 min, 功率密度 0.48 mW/cm^2 是较适宜的辐照诱变条件. 固定激光辐照条件, 进行以下实验.

表 1 激光辐照时间和强度对菌株 75A 微生物诱变效应的影响
Table 1 Effects of He-Ne laser irradiation time and intensity on 75A strain

Irradiation time (min)	Positive mutant rate (%)	
	0.48 mW/cm^2	1.44 mW/cm^2
5	63.5 \pm 1.4	51.4 \pm 1.5
10	64.6 \pm 1.5	55.7 \pm 1.1
15	72.8 \pm 1.2	63.7 \pm 1.5
20	58.4 \pm 1.4	53.1 \pm 1.4
25	40.6 \pm 1.6	32.8 \pm 1.3
30	37.2 \pm 1.3	33.6 \pm 1.4
35	21.6 \pm 1.3	11.1 \pm 1.6
40	12.8 \pm 1.2	11.1 \pm 1.4

3.2 激光辐照方式的影响

激光辐照方式有两种, 方式 A 是对用生理盐水制成的孢子悬液进行辐照, 方式 B 是对用液体

培养基制成的孢子悬液进行辐照. 方式 A 得到的菌体正变态率较高(76.3%)而方式 B 的较低(54.8%), 这可能是由于方式 B 中含有丰富的营养成份, 使激光的光效应及电磁场效应受到了直接或间接的影响.

3.3 He-Ne 激光辐照诱变结果和突变株的遗传稳定性实验

固定以上实验所得到的最优激光辐照模式为: 辐照时间 15 min, 功率密度 0.48 mW/cm^2 , 辐照孢子悬液用生理盐水制成. 以每次诱变所得生长速度最快、产孢量最高的菌株培养 48 h 后, 作为下次诱变的出发菌株, 进行反复激光辐照诱变, 6 代之后最终获得 3 株变异株 75A-1, 75A-2, 75A-3, 其发酵特性与原始菌株 75A 的对比见表 2. 结果表明, 3 株变异株的生物量、产孢量都有明显提高. 应用无效假说统计法, 最终确定只有 75A-3 与原始菌株 75A 产孢量的差异是由两菌株之间产孢能力不同所引起的, 其它两突变株与原始菌株的差异可能是由于机误所造成的, 不宜选作新菌株使用. 75A-3 经转化, 发酵检测结果表明生物量、产孢量均很稳定, 证明 75A-3 变异菌株的遗传性状稳定.

表 2 原始菌株与变异株摇瓶实验结果比较

Table 2 Comparison between original strain and mutant strain on flask culture results

Strain	Biomass (g/L)	Sporulation (cell/ml)
75A	11.3 ± 0.8	$3.17 \times 10^8 \pm 98$
75A-1	18.5 ± 1.1	$4.87 \times 10^8 \pm 123$
75A-2	15.7 ± 0.8	$5.09 \times 10^8 \pm 109$
75A-3	17.4 ± 0.7	$5.22 \times 10^8 \pm 115$

3.4 辐照突变株与原始菌株的细胞外、胞周间、细胞内三位区的 RNA 和 DNA 分析

表 3 表明, 辐照突变株 75A-3 与原始菌株 75A 的细胞外、胞周间、细胞内三位区的 RNA 和 DNA 含量有明显差异. 突变株 75A-3 的三位区都有 RNA, 以胞周间浓度最高, DNA 只在细胞内检出. 原始菌株 75A 的三位区都有 RNA, 但浓度各不相同, DNA 只存在于细胞内, 其它位区均未检出. 从上述的 He-Ne 激光辐照菌与未经 He-Ne 激光辐照的对照菌相比三位区大分子分析中可以看出, He-Ne 激光确实对球孢白僵菌有诱变作用, 这就为工业上利用 He-Ne 激光对球孢白僵菌进行诱变育种提供了有力的实验依据.

表 3 细胞外、胞周间、细胞内三位区的 RNA 和 DNA 的浓度

Table 3 Concentration of RNA and DNA in extracellular, periplasmic and intracellular space

Strain	Site	RNA ($\mu\text{g/ml}$)	DNA ($\mu\text{g/ml}$)
Mutant 75A-3	Extracellular	10.0 ± 1.6	0
	Periplasmic	87.3 ± 2.5	0
	Intracellular	13.6 ± 1.8	28.7 ± 2.3
<i>B. bassiana</i> 75A	Extracellular	49.0 ± 2.1	0
	Periplasmic	56.8 ± 2.4	0
	Intracellular	53.4 ± 1.8	35.2 ± 2.1

参考文献:

- [1] 向洋. 激光生物学 [M]. 长沙: 湖南科技出版社, 1995. 31-79.
- [2] Ferron P. Biological Control of Insect Pests by Entomogenous Fungi [J]. Ann. Rev. Entomol., 1978, 23: 409-442.
- [3] 蒲蛰龙. 害虫生物防治的原理和方法 [M]. 北京: 科学出版社, 1984. 126-213.
- [4] 施巧琴, 吴淞刚. 工业微生物学 [M]. 福州: 福建科技出版社, 1991. 174-316.
- [5] 北京大学生化教研室. 生物化学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1988. 133-138.
- [6] Akaki M, Kirsche B, Voigt K-D, et al. Studies on Biological Macromolecules of Periplasmic Space [J]. Agric. Biol. Chem., 1978, 42(12): 2391-2393.
- [7] Tagawa M, Kirk T, Schultz E, et al. Testing Methods for Biological Macromolecules [J]. Agric. Biol. Chem., 1978, 42(6): 1157-1163.

Effects of He-Ne Laser Irradiation on the Mutagenesis of *Beauveria bassiana*

YANG Ge, CHEN Hong-zhang, LI Zuo-hu

(State Key Lab. Biochem. Eng., Inst. Proc. Eng., Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The influences of He-Ne irradiation on the mutation and growth of *Beauveria bassiana* 75A strain was investigated. The optimum He-Ne laser irradiation dosage was 0.48 mW/cm² for 15 min. Among the two ways of He-Ne laser irradiation, irradiation on bacteria suspension in physiological salt water appeared more effective in activation. Based on the analysis of the sporulation fermentation and biomass, it was found that He-Ne laser could give rise to a markedly biological stimulating effect and certain mutagenesis effect. Several strains that produced sporulation abnormally were screened. By the contrast of RNA and DNA contents from the extracell, intracell and periplasmic between mutant and original strains, further evidence that the He-Ne laser beam causes mutagenesis of *Beauveria bassiana* is concluded .

Key words: He-Ne laser; *Beauveria bassiana*; mutagenesis