

苏芸金芽孢杆菌孢子囊超微结构的研究*

戴莲韵 王学聘

(中国林业科学研究院林业研究所)

摘 要

用电子显微镜观察了分属于苏芸金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 23个 H-血清型的30个亚种和3株新分离菌株孢子囊超薄切片的超微结构。结果表明苏芸金杆菌30个亚种的芽孢和伴孢晶体在孢子囊中形成的部位、形状及数量有所不同。大部分亚种的伴孢晶体位于孢子囊的一端,以单个晶体存在于孢外膜之外,只有幕虫亚种 (*Subsp. finitimus*) 的伴孢晶体位于孢外膜之内。在孢子囊中晶体的形状分别为菱形、方形、圆形、不规则形。其数量大多数为一个。从不同森林土壤中分离到的87052、85020、85040三株菌,其中87052菌株伴孢晶体为圆形,与已知圆形伴孢晶体的亚种形态特征相似,其它两株菌在形态特征上与已知30个亚种在孢子囊的超微结构上有着一定的差异。

关键词 苏芸金芽孢杆菌; 孢子囊; 芽孢; 伴孢晶体; 孢外膜

苏芸金芽孢杆菌每个菌体是否产生蛋白质晶体(伴孢晶体),是区分它与之极相似的蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 的主要特征,其伴孢晶体的产生及形状结构也是致死昆虫的主要因子之一。前人^[1-3]和我们的研究¹⁾指出:不同形状的晶体对昆虫的毒性表现出一定差异。因此研究该类细菌晶体的形成及其形状、结构有着十分重要的意义。随着超薄切片技术的广泛应用,苏芸金杆菌超微结构的电子显微镜观察也同样得到了微生物学家的研究^[4]。我们对从我国森林土壤中苏芸金杆菌生态分布的研究中(报告待发表),分离到三株产生伴孢晶体的苏芸金芽孢杆菌87052、85020、85040菌株,在对其孢子囊的光学显微镜观察和超薄切片的电子显微镜观察中发现85020、85040菌株与已发表的30个亚种^[5-7,9,10]在晶体形状和数量组成上有所不同,为了在超微结构的水平上对所有的苏芸金杆菌伴孢晶体在孢子囊中的形成及形态特征进行比较研究,并对新发现的菌株进行正确的分类、鉴定,我们对至1986年止已发表的属于23个 H-血清型的苏芸金芽孢杆菌的30个亚种和新分离的三株菌,进行了孢子囊的超薄切片在电子显微镜下超微结构的比较研究,现将结果报道如下。

本文于1988年2月22日收到。

·电镜照片由本院分析中心电镜组协助完成,Barjac 博士(法国巴斯德研究院)、王瑛、任改新先生提供标准菌株,张锡津、贾风友同志提供土壤样品,一并致谢。

1) 《林业科学》待发表。

一、材料和方法

(一) 菌株及来源

30个亚种的标准菌株及3株新分离菌株的名称及来源见表1。

(二) 孢子囊的制备

将待观察的33个菌株移接于含有0.5%牛肉膏、1%蛋白胨、1.5—1.8%琼脂粉、pH7.0—7.5的斜面培养基上，在30℃±1℃培养至孢子囊形成阶段(在光学显微镜下观察)。

(三) 超薄切片的制备

培养至孢子囊阶段的培养物经3%戊二醛洗于无菌的小试管中，并固定2小时以上，然

表1 菌种名称及来源一览

编 号	亚 种 名 称 (<i>B. T. subsp.</i>)	血 清 型	来 源
1	苏 兰 金 亚 种 (<i>thurinSiensis</i>)	H1	Barjac赠送
2	幕 虫 亚 种 (<i>finitimus</i>)	H2	"
3	阿 来 亚 种 (<i>alesti</i>)	H3a	"
4	库 尔 斯 塔 克 亚 种 (<i>kurstaki</i>)	H3a3b	"
5	猝 倒 亚 种 (<i>sotto</i>)	H4a4b	"
6	松 蠹 亚 种 (<i>dendrolimus</i>)	H4a4b	"
7	肯 尼 亚 亚 种 (<i>kenyae</i>)	H4a4c	"
8	蜡 螟 亚 种 (<i>Galleriae</i>)	H5a5b	"
9	加 拿 大 亚 种 (<i>canadensis</i>)	H5a5c	"
10	杀 虫 亚 种 (<i>entomocidus</i>)	H6	"
11	亚 毒 亚 种 (<i>subtoxicus</i>)	H6	"
12	占 泽 亚 种 (<i>aizawai</i>)	H7	"
13	莫 里 逊 亚 种 (<i>morrisoni</i>)	H8a8b	"
14	玉 米 螟 亚 种 (<i>ostrinae</i>)	H8a8c	任改新提供
15	多 窝 亚 种 (<i>tolworthi</i>)	H9	Barjac赠送
16	达 姆 斯 特 亚 种 (<i>darmstadiensis</i>)	H10	"
17	托 马 诺 夫 亚 种 (<i>toumanoffii</i>)	H11a11b	"
18	九 州 亚 种 (<i>kyushuensis</i>)	H11a11c	任改新提供
19	汤 普 逊 亚 种 (<i>thompsoni</i>)	H12	Barjac赠送
20	巴 基 斯 坦 亚 种 (<i>pakistani</i>)	H13	"
21	以 色 列 亚 种 (<i>israelensis</i>)	H14	"
22	达 可 达 亚 种 (<i>dakota</i>)	H15	任改新提供
23	印 弟 安 亚 种 (<i>indiana</i>)	H16	"
24	东 北 亚 种 (<i>tohokuensis</i>)	H17	"
25	熊 本 亚 种 (<i>kumamotoensis</i>)	H18	"
26	励 木 亚 种 (<i>tochiGionsis</i>)	H19	"
27	云 南 亚 种 (<i>yunnanensis</i>)	H20	王 瑛 提 供
28	可 玛 利 亚 种 (<i>colmeri</i>)	H21	任改新提供
29	山 东 亚 种 (<i>shandonSiensis</i>)	H22	王 瑛 提 供
30	日 本 亚 种 (<i>japonensis</i>)	H23	"
31	8 7 0 5 2		由四川森林土壤分离
32	8 5 0 2 0		由北京郊区森林土壤分离
33	8 5 0 4 0		"

后用缓冲液浸洗三次,再用1%OsO₄固定2小时,用双蒸水浸洗,经上述双固定后,以丙酮脱水到100%,用丙酮:树脂(Epon 812)=1:1浸透12小时,将培养物取出,置于胶囊中,经60℃聚合48小时,进行切片,以醋酸双氧铀染色,电子显微镜观察,照像。

二、结 果

(一) 孢子囊中芽孢与伴孢晶体的位置

图版 I—III 中 1—30 的电镜照片表明: 30 个亚种的标准菌株其伴孢晶体均位于孢子囊的一端,而芽孢位于另一端,幕虫亚种伴孢晶体位于孢外膜内,当孢子囊壁溶解时晶体和孢子不分开,其它 29 个亚种的晶体均位于孢外膜之外,当孢子壁溶解时晶体和芽孢分别释放于培养基中。

(二) 孢子囊中伴孢晶体的形状

从图版 I—III 中可见伴孢晶体在孢子囊中的形状分别为菱形、方形、圆形及不规则形等,其中以菱形最多。

(三) 伴孢晶体在孢子囊中的数量

图版 I—IV 中 1—33 可见,伴孢晶体大多以一个存在于孢子囊中,从我国不同森林土壤中分离的三株菌中的 87052 菌株伴孢晶体为圆形,位于一端; 85020 菌株孢子囊中的晶体由数个小晶体组成(见图版 IV—32 A 32 B 中 C); 85040 菌株中有的孢子囊中只形成 1 到数个晶体而无芽孢形成(见图版 IV—33 A 33 B 中 SP₁, SP₂, SP₃),有的孢子囊中晶体和芽孢同时存在(见图版 IV—33 B 中 SP₄)。

三、讨 论

1. 从供试的分属于苏芸金杆菌 23 个 H-血清型的 30 个亚种的超薄切片的电子显微镜观察结果看出,除了 5 号猝倒亚种(Subsp. *sotto*)未表现出孢子囊的超薄切片细微结构外,其余 29 个亚种均获得了孢子囊的超微结构图谱。尽管我们的超薄切片技术还不够完美,但以苏芸金杆菌 30 个亚种的标准菌株为样品,进行系统的超微结构的形态学比较研究,还是第一次尝试。

2. 从我国不同森林土壤中分离的三株菌中 87052 菌株伴孢晶体在孢子囊中的位置、形状与新近发表的日本亚种(Subsp. *japonensis*)极为相似^[10]; 85040 菌株伴孢晶体的数量和孢子囊中的特性与报道的励木亚种(Subsp. *tochigionsis*)和云南亚种(Subsp. *yunnanensis*)有近似之处^[2,8,9]; 85020 菌株孢子囊的超微结构与已知 30 个亚种表现出明显的差异。上述菌株在孢子囊超薄切片的超微结构上所表现出的异同与其所属分类地位之间的关系,将作进一步研究。

3. 苏芸金杆菌伴孢晶体,在孢子囊中的位置、形状、大小与结构尽管与研究中菌体不同位置的超薄切片以及观察的不同侧面有着一定的关系,但晶体的形成、结构与编码中质粒和染色体的关系,以及它们与对昆虫毒力之间的关系,是目前微生物形态学家、遗传学家与分类学家们十分感兴趣的研究课题。

参 考 文 献

- [1] 李荣森等, 1981, 几种苏芸金杆菌的毒力及形态结构, 微生物学报, 21(3): 311—317.
- [2] 陈涛, 1986, 苏芸金杆菌伴孢晶体大小和形态结构, 电子显微学报, 5(4): 20—30.
- [3] 冯维熊, 1986, 苏芸金杆菌五个菌株的晶体蛋白研究, 微生物学通报, 11(2): 55.
- [4] Burges, H. D. et al., 1971, 广东农林学院林学系等译, 1977, 昆虫和螨类的微生物防治, 科学出版社, 156—167.
- [5] De Barjac H., 1981, In "Microbial control of pests and plant diseases 1970—1980" ed by H. O. Burges, Academic press, London, 35—43.
- [6] Delucca, A. J. et al., 1984, New serovar of *Bacillus thuringiensis* Serovar colmeri (Serovar 21) J. Invert. Path., 43, 437—438.
- [7] 王瑛等, 1986, 苏芸金杆菌的一个新血清型, 微生物学报, 26(1): 1—6.
- [8] Ohba, M. et al., 1986, Crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *gunnanensis* are produced only in asporogenous cells, J. Invert. Path., 48(2):254—256.
- [9] Ohba, M. et al., 1981, A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* isolated in Japan: *Bacillus thuringiensis* subsp. *tohokuensis* (serotype 17), J. Invert. Path., 38(2):184—190.
- [10] Ohba, M. et al., 1986, *Bacillus thuringiensis* subsp. *japonensis* (Flagellar Serotype 23), A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* with a novel Flagellar Antigen, J. Invert. Path., 48(1):129—130.

STUDIES ON THE ULTRAMICRO STRUCTURE OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SPORANGIUM

Dai Lianyun Wang Xuepin

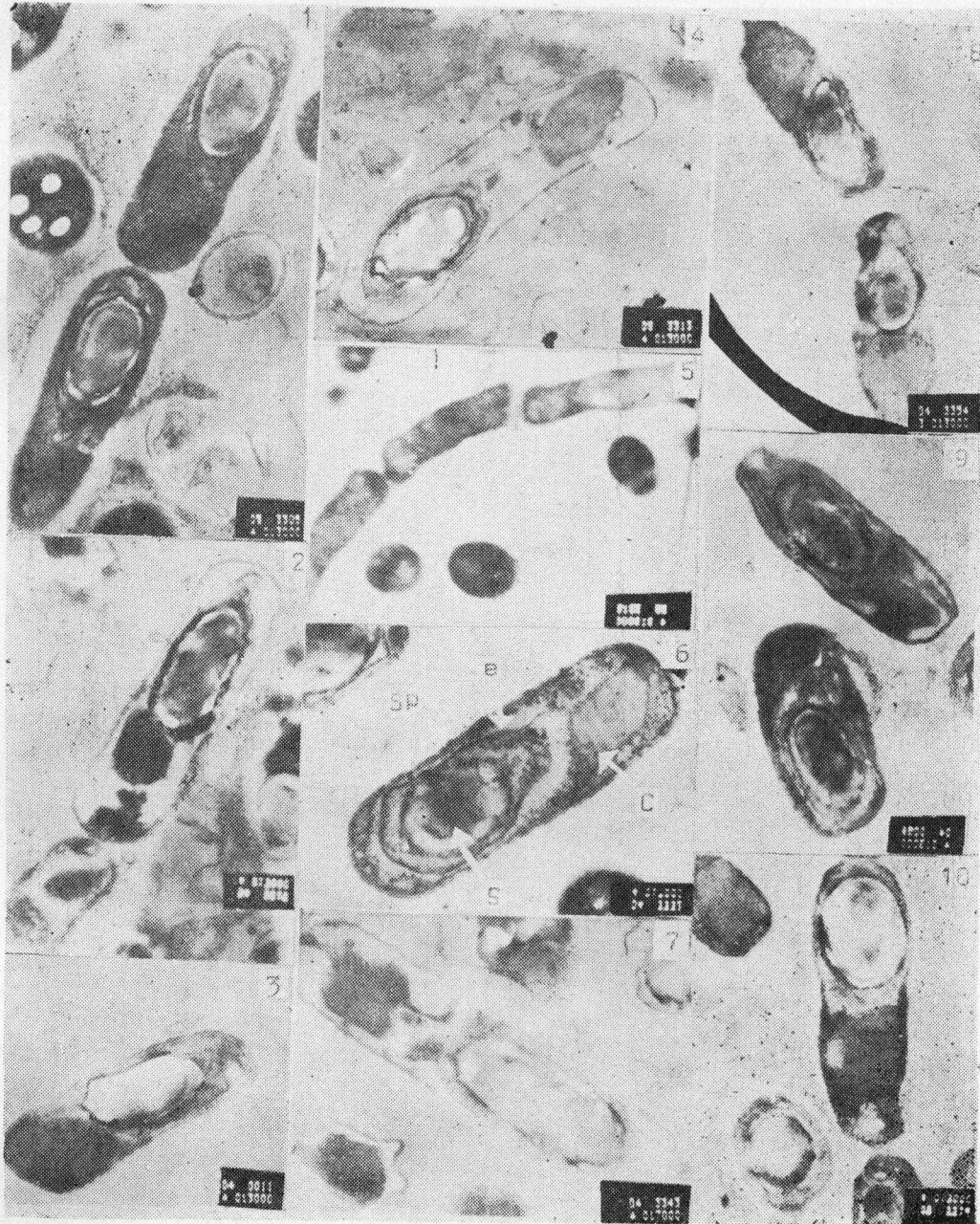
(The Research Institute of Forestry CAF)

Abstract

The thin-sections of ultramicro structure of *Bacillus thuringiensis* belonging to 30 subspecies of 23 H-serotypes and 3 strains isolated from the soil were examined by electron microscopy. The result showed that the forming position, the form and the quantity of spore and crystal of the 30 subspecies in sporangium vary from each other. In most of the species, the spore is located on one side of the sporangium and outside of exosporium. The crystal of *Bacillus thuringiensis* subspecies *finitimus* is located inside of exosporium. The form of crystal in the sporangium of various subspecies varies greatly, which is usually dipyramidal, spheroidal, cuboidal or irregular in shape and most of them were single one.

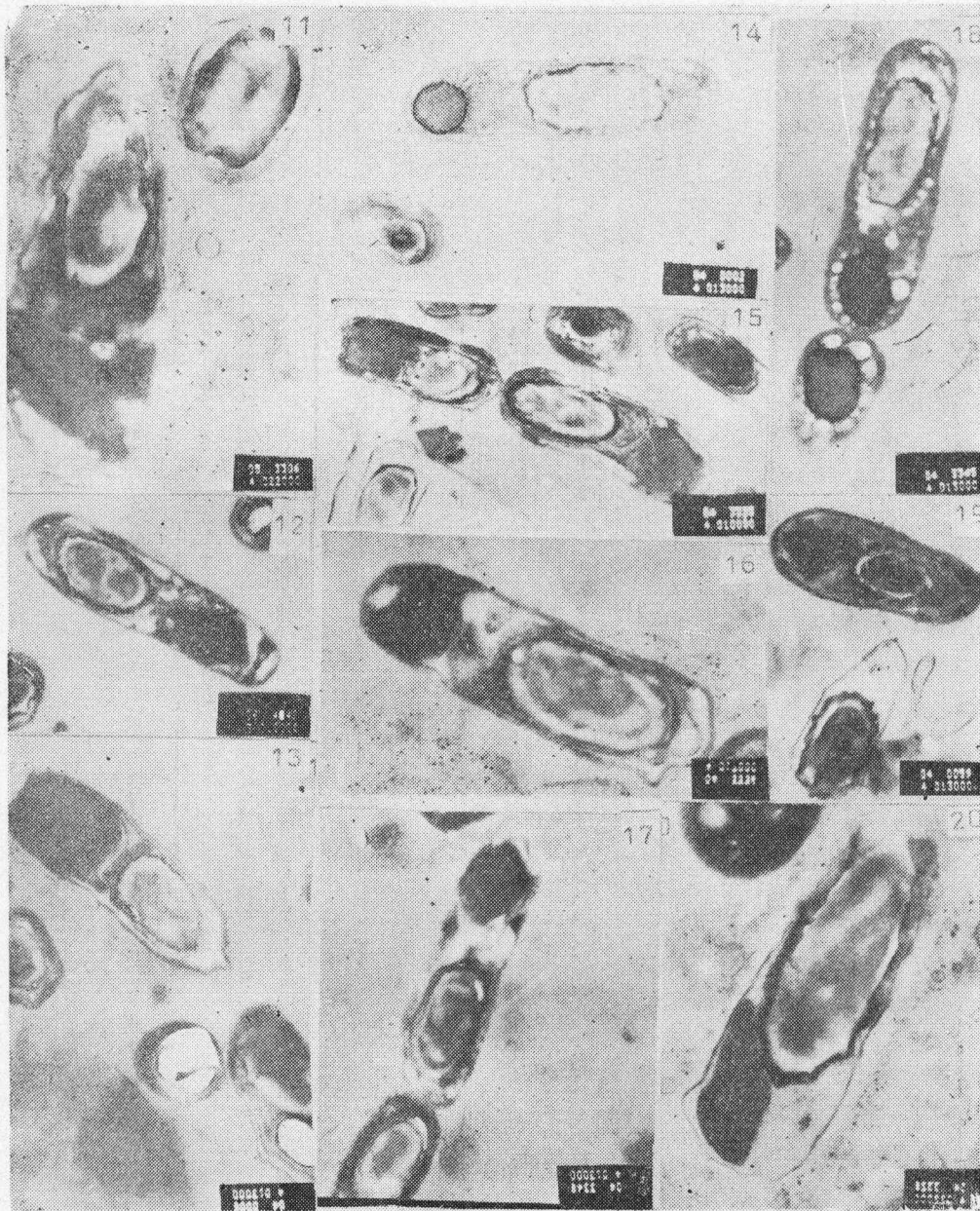
In the 3 strains isolated from soil, 87052 strain is similar to H23 (Subsp. *japonensis*), 85020 and 85040 strains were different from the 30 subspecies.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; sporangium; spore; parasporal crystal; exosporium

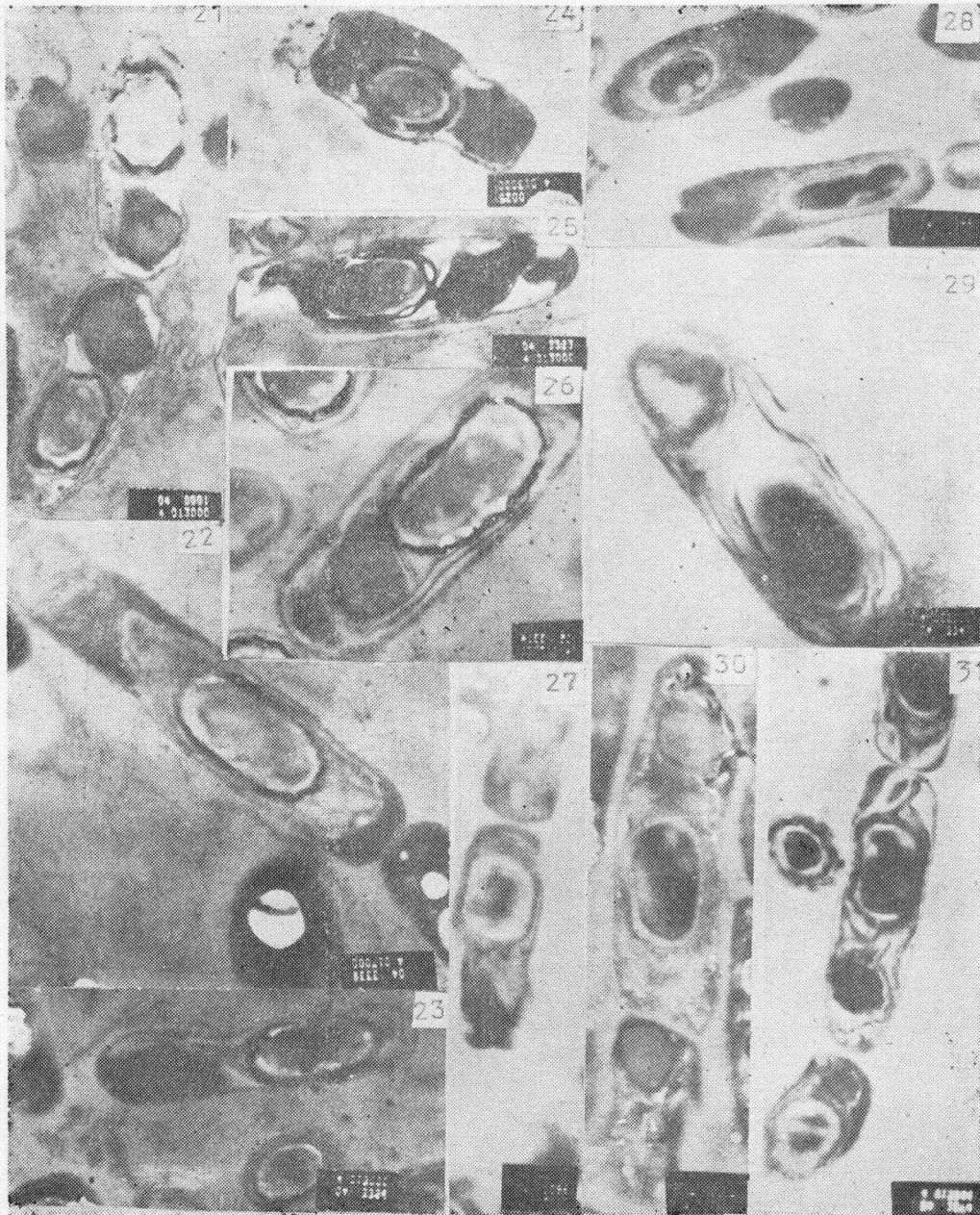


S — 孢子 C — 晶体 SP — 孢子囊 e — 孢外膜

- | | |
|---|---|
| 1. 苏芸金亚种 (<i>Subsp. thuringiensis</i>) 13000× | 2. 幕虫亚种 (<i>Subsp. finitimus</i>) 13000× |
| 3. 阿来亚种 (<i>Subsp. alesti</i>) 13000× | 4. 库尔斯塔克亚种 (<i>Subsp. kurstaki</i>) 13000× |
| 5. 猝倒亚种 (<i>Subsp. sotto</i>) 10000× | 6. 松蠹亚种 (<i>Subsp. dendrolimus</i>) 17000× |
| 7. 肯尼亚亚种 (<i>Subsp. kenya</i>) 17000× | 8. 蜡螟亚种 (<i>Subsp. galleriae</i>) 13000× |
| 9. 加拿大亚种 (<i>Subsp. canadensis</i>) 13000× | 10. 杀虫亚种 (<i>Subsp. entomocidus</i>) 13000× |

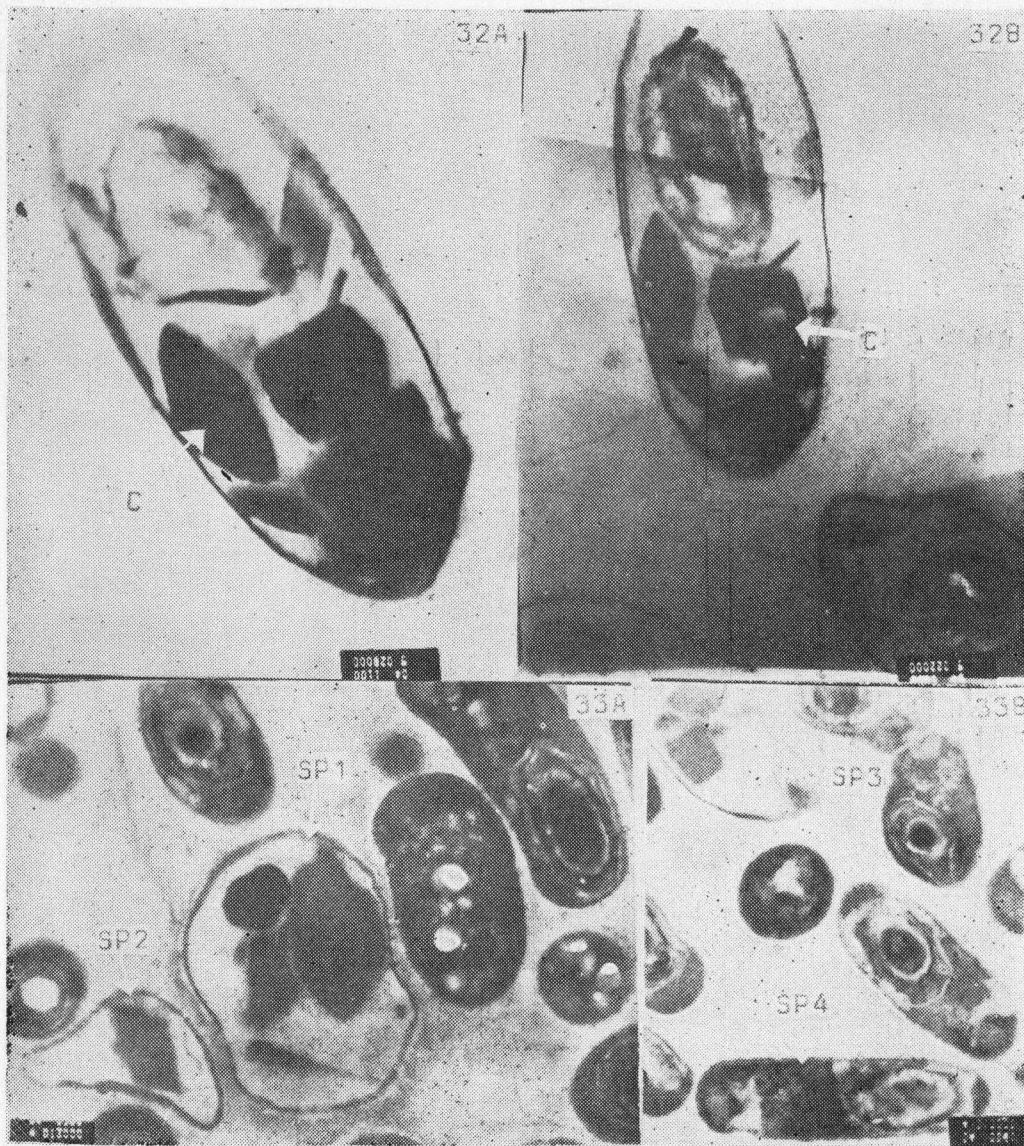


- | | |
|--|---|
| 11. 亚毒亚种 (Subsp. <i>subtoxicus</i>) 22000× | 12. 占泽亚种 (Subsp. <i>aizawai</i>) 10000× |
| 13. 莫里逊亚种 (Subsp. <i>morrisoni</i>) 13000× | 14. 玉米螟亚种 (Subsp. <i>ostriniae</i>) 13000× |
| 15. 多窝亚种 (Subsp. <i>tolworthi</i>) 10000× | 16. 达姆斯特亚种 (Subsp. <i>darmstadiensis</i>) 17000× |
| 17. 托马诺夫亚种 (Subsp. <i>toumanoffii</i>) 13000× | 18. 九州亚种 (Subsp. <i>kyushuensis</i>) 13000× |
| 19. 汤普逊亚种 (Subsp. <i>thompsoni</i>) 13000× | 20. 巴基斯坦亚种 (Subsp. <i>pakistani</i>) 22000× |



21. 以色列亚种 (Subsp. *israelensis*) 13000×
23. 印第安亚种 (Subsp. *indiana*) 13000×
25. 熊本亚种 (Subsp. *kumamotoensis*) 13000×
27. 云南亚种 (Subsp. *yunnanensis*) 13000×
29. 山东亚种 (Subsp. *shandongiensis*) 22000×
31. 87052 13000×

22. 达可达亚种 (Subsp. *dakota*) 17000×
24. 东北亚种 (Subsp. *tohokuensis*) 13000×
26. 栃木亚种 (Subsp. *tochigiensis*) 17000×
28. 可玛利亚亚种 (Subsp. *colmeri*) 13000×
30. 日本亚种 (Subsp. *japonensis*) 17000×



32. 85020 32A 28000× 32B 22000×
33. 85040 33A 13000× 33B 10000×