

紫外线诱导提高重寄生放线菌 PR和 F46活性的研究^{*}

杨洪俊^{1,2},宗兆锋[✉],郭小芳¹

(1. 西北农林科技大学植保学院,陕西杨陵 712100; 2. 廊坊市林业局,河北廊坊 065000)

摘 要: 利用紫外线照射诱导两种重寄生放线菌 PR和 F46,并对诱导产生的诱变菌株的特性进行了初步研究。结果发现,诱变菌株菌落的基内菌丝的颜色与出发菌落的明显不同。在适合度上,诱变菌株的菌丝生长量有所下降,而在产孢能力、重寄生能力方面则高于出发菌株。诱变菌株对常用化学杀菌剂的抗药性测定结果显示,诱变菌株与一些常用化学杀菌剂是可以混合使用的。

关键词: 重寄生放线菌; 紫外线照射; 诱变菌株; 生物学特性

中图分类号: Q939.13.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-1389(2005)03-0022-04

Study on the Mutations Induced by Ultraviolet Radiation Affecting Hyperparasites Strain F46 and PR

YANG Hong-jun^{1,2}, ZONG Zhao-feng[✉] and GUO Xiao-fang¹

(1. College of Plant Protection, Northwest A& F University, Yangling Shaanxi 712100, China;

2. Langfang Forestry Department, Langfang Hebei 065000, China)

Abstract The biological properties of mutants of hyperparasites strain PR and F46 by ultraviolet radiation were studied. Results showed that the color of substrate mycelia of mutants was always white or colorless. Mutants reduced growth and sporulation and had better inhibiting effects to target pathogens. The mutants could be a candidate of some fungicides, because of their good combinations with fungicides.

Key words Hyperparasites; Ultraviolet radiation; Induced strain; Biological characteristics

PR和 F46是由西北农林科技大学植保学院实验室在病害发生严重,且农药使用量较少的温室中的特定植物上分离的两株重寄生菌,对许多植物病原真菌有较强的重寄生能力,尤其是对一些低等的植物病原真菌,它们的作用效果非常明显^[1],笔者已对这2个菌株做了一些研究^[1,2,3]。为进一步提高它们的生防活性,通过紫外诱变获得了抗真菌的活性稳定且高于出发菌株的诱变菌株,并对它们的生物学特性进行了研究探讨。

1 材料与方法

1.1 菌株

重寄生放线菌 PR F46及灰葡萄孢 (*Botry-*

tis. cinerea)、梨状毛霉 (*Mucor. piriformis*)、苹果炭疽菌 (*Colletotrichum. gloesporioides*)、大豆腐霉菌 (*Pythium. aphanidermatum*) 等靶标病原菌均由西北农林科技大学植保学院提供。

1.2 菌株 PR和 F46的紫外诱导

将出发菌株 PR和 F46的孢子悬浮液用无菌水调整至 10^6 孢子/mL,在紫外灯 (40W)下 40cm处照射,取不同照射时间的孢子悬浮液各 200 μ L分别涂于 PDA平板上,以未照射的作为对照,所有操作在红光下进行^[4,5]。随即置于 28 $^{\circ}$ C条件下暗培养,3 d后记录存活菌落的数目和菌落生长情况。从致死率在 95% 以上的处理中挑取出现较

^{*} 收稿日期: 2004-12-28 修回日期: 2005-03-01

基金项目: 教育部“春晖计划”启动项目。

作者简介: 杨洪俊 (1978-),男,山西洪洞人,在读硕士。

^{*} 通讯作者: 宗兆锋,教授,主要从事植物病害生物防治研究。

早,生长速率较快,形态不同的单菌落,纯化后保存^[6]。

1.3 诱变菌株与出发菌株形态上的比较

将诱变菌株和出发菌株分别涂到高氏一号、克氏一号、察氏、马铃薯浸汁、葡萄糖天门冬素、葡萄糖酵母等培养基上,在 28℃条件下培养 7 d后,观察培养特征。

1.4 诱变菌株与出发菌株产孢能力和菌丝生长量的比较

分别将诱变菌株和出发菌株的孢子悬浮液(10⁶孢子/mL)接于 30 mL SNB培养液中,在 28℃下振荡培养,7 d后进行显微计数,计算每毫升孢子悬浮液中的孢子数目^[7]。每个处理重复 3 次。

将诱变菌株和出发菌株的孢子悬浮液(10⁶孢子/mL)分别接于 100 mL SNB培养液中,在 28℃下振荡培养 7d,用干燥的滤纸过滤后在烘箱中烘干,称重并计算菌丝干重,每处理 3次重复。

1.5 诱变菌株与出发菌株重寄生能力的比较

分别在 PDA平板上的 3个孔中注入 20 μ L 诱变菌株的孢子悬浮液(10⁷孢子/mL)、出发菌株的孢子悬浮液(10⁷孢子/mL)及无菌水。28℃培养 2d后,再在 PDA平板上分别涂 100 μ L靶标病原菌的孢子悬浮液(10⁵孢子/mL)。25℃下培养 15 d,观察靶标病原菌是否被重寄生,用十字交叉法测量诱变菌株与出发菌的重寄生圈的大小^[12]。

表 1 紫外线照射后 PR和 F46孢子的致死率
Table 1 Lethality rate on spores of strain PR and F46 treated with UV

项目 Item	PR					F46				
照射时间 /min Irradiating time	0	3	5	7	9	0	1	2	3	4
致死率 % Lethality rate	0	59.40	83.84	97.98	98.99	0	51.85	86.47	96.15	98.73

2.2 诱变菌株与出发菌株形态上的比较

PR和 PR72、F46和 F4637在各种培养基上

表 2 诱变菌株与出发菌株菌落颜色的比较
Table 2 Color of colony of strain PR, F46 and their mutants

培养基 Medium	PR的基内菌丝 Substrate mycelium of strain PR	PR72的基内菌丝 Substrate mycelium of strain PR72	F46的基内菌丝 Substrate mycelium of strain F46	F4637的基内菌丝 Substrate mycelium of strain F4637
高氏一号 Gause's Synthetic Agar	丁香棕 Brown	白色 White	淡黄褐色 Flavotestaceous	白色 White
克氏一号 Kleyn's Synthetic Agar	灰黑 Carbon black	白色 White	白色 White	白色 White
察氏培养基 Czapek's Agar	赭石 Ochre	白色 White	黄灰色 Gray	白色 White
马铃薯浸汁 Potato extract	银灰色 Silver gray	白色 White	淡粉色 Rose pink	白色 White
葡萄糖酵母 Glucose Yeast Extract Agar	无色 Achromaticity	无色 Achromaticity	无色 Achromaticity	无色 Achromaticity
葡萄糖天门冬素琼脂 Glucose Asparagine	白色 White	白色 White	淡黄褐色 Flavotestaceous	白色 White

2.3 诱变菌株与出发菌株产孢能力和菌丝生长量的比较

每处理重复 3次。

1.6 出发菌株和诱变菌株对化学杀菌剂的抗性

选用几种常用的不同类型的化学杀菌剂,在离体条件下采用生长速率法,测定出发菌株和诱变菌株对化学杀菌剂的抗性^[8]。杀菌剂用无菌水稀释,加到 PDA培养基中制成 PDA药板,制成 10、20和 30g/mL3个浓度。将诱变菌株和出发菌株的菌饼置于平板中央。28℃培养 7 d后,用十字交叉法测量重寄生菌的菌落直径,每处理重复 3次。用以下公式计算杀菌剂对重寄生菌生长的影响。

抑菌率 % = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100

2 结果与分析

2.1 菌株 PR和 F46的紫外诱导

经不同时间处理,PR和 F46孢子的致死率都随照射时间的延长而逐渐增加;死亡率变化幅度也随着时间的延长而变小并渐进趋向 100%(表 1)。通过统计生长菌落的数目,计算致死率。PR处理 7 min后,致死率为 97.98%;F46处理 3 min后,致死率为 96.15%。PR在 7 min、F46在 3 min处理时,诱变菌株的菌落生长旺盛,且形态不同。从中选出生长较快且形态不同的菌株,分别命名为 PR72和 F4637,对它们进行研究。

的生长状况不同,特别是基内菌丝的颜色,诱变菌株与出发菌株明显不同(表 2)。

从产孢量看,诱变菌株明显比出发菌株高,而在菌丝的生长量上,则诱变菌株低于出发菌株(表3)。放线菌的孢子是微生物农药制剂的主要成分,在植物病害生物防治中具有重要作用。在相同时间内,诱变菌株的产孢量几乎是出发菌株的2.5倍(表3)。所以,诱变菌株在微生物农药制剂方面有较大的优势。

表 3 诱变菌株和出发菌株产孢量及菌丝生长量的比较

Table 3 Spore production and dry weight of mycelia of strain PR, F46 and their mutants		
菌株编号 Strain	产孢量 /($10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$) Production of spore	菌丝干重 /mg Dry weight of mycelia
PR	1.4	468.5
PR72	3.05	431.5
F46	0.9	522.0
F4637	1.95	489.3

2.4 诱变菌株与出发菌株重寄生能力的比较

在离体条件下,比较诱变菌株与出发菌株对4种靶标病原菌的重寄生活性。结果表明,无论诱变菌株,还是出发菌株,不同重寄生菌对不同的靶标病原菌的作用效果是不同的,且对同一种靶标病原菌,诱变菌株的重寄生圈大于出发菌株的重

寄生圈。统计结果表明,诱变菌株对病原菌的寄生能力高于出发菌株(表4)。

表 4 PR和 PR72 F46和 F4637对致病菌的重寄生作用

Table 4 Hyperparasitic effect of strain PR, F46 and their mutants on target pathogens mm				
菌株编号 Strain	灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	梨状毛霉 <i>M. piriformis</i>	苹果炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	大豆腐霉菌 <i>P. aphani-dermatum</i>
PR	6.5 ^a b	5.7b	6.6b	5.0b
PR72	7.1 _a	6.3 _a	7.0 _a	5.3 _b
F46	6.5b	6.2b	5.0b	6.0b
F4637	7.0 _a	6.5 _b	5.8 _a	6.5 _a

注: * 表示重寄生圈的直径。表中为3个处理的平均值,每栏中不同小写字母表示在5%水平的差异。

Note * Indicate the hyperparasitic zone. Values are means of three replicates, the small letters indicate the difference in 5% lev el.

2.5 诱变菌株对常用杀菌剂的抗性

试验结果表明,不同类型的杀菌剂对两种诱变菌株具有不同的作用效果。25%甲霜灵、40%五氯硝基苯、50%腐霉利、18%三唑酮在3种浓度下对PR72没有抑制作用,所以,它们可以混和使用(表5)。70%甲基托布津、40%五氯硝基苯、50%多菌灵、50%腐霉利、18%三唑酮在3种浓度下对F4637没有抑制作用,它们也可以使用(表5)。

表 5 常用化学农药对 PR和 PR72 F46和 F4637的影响

Table 5 Tolerance of strain PR, F46 and their mutants to fungicides		Inhibiting effect of strain PR and F46 and their mutants of fungicides			
供试药剂 Fungicides	药剂浓度 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Concentration	抑菌率 /%			
		PR	PR72	F46	F4637
70% 代森锰锌 70% mancozeb	10	S	49.93	S	S
	20	S	68.42	S	S
	30	S	80.31	S	S
70% 甲基托布津 70% mildothane	10	55.90	S	0	0
	20	63.35	S	0	0
	30	93.16	S	0	0
25% 甲霜灵 25% matalaxyl	10	0	0	S	S
	20	0	0	S	S
	30	0	0	S	S
40% 五氯硝基苯 40% quinto zene	10	0	0	0	0
	20	0	0	0	0
	30	0	0	0	0
75% 百菌清 75% chlo m thalonil	10	9.86	12.92	32.14	25.00
	20	11.11	15.79	35.71	31.25
	30	13.57	19.76	44.64	34.72
50% 多菌灵 50% carbendazim	10	S	S	0	0
	20	S	S	0	0
	30	S	S	0	0
50% 腐霉利 50% procymidone	10	0	0	0	0
	20	0	0	0	0
	30	0	0	0	0
18% 三唑酮 18% Tradinfon	10	0	0	0	0
	20	0	0	0	0
	30	0	0	0	0

注: * 表示重寄生菌不能生长 Note * Indicate the hyperparasite cann t grow in the medium.

3 讨论

紫外线照射是改良微生物,获得优良、高产菌株最简便常用的方法。用紫外线诱导微生物变异的研究报道很多^[4,5],在放线菌领域中,主要是利用紫外线诱导产生抗生素的放线菌,以提高产生抗生素的量。而本试验是用紫外线诱导提高重寄生菌的寄生能力。

放线菌在大田中是否有应用前景,除其本身对病原菌的作用效果的好坏外,对环境的适应能力也是另一制约条件。本试验主要是通过紫外线诱导产生抗病原菌活性稳定于出发菌株的诱变菌株,并对它们的产孢能力、菌丝生长量、对靶标病原菌的重寄生能力及抗药性等特性进行研究,结果发现,尽管诱变菌株比出发菌株产孢量大,但其菌丝生长量却低于出发菌株。因此,放线菌菌丝生长与孢子繁殖在遗传上的协调机制,有待于进一步研究。另外,由于放线菌的作用效果和它的形态之间相关性不大,所以,在其形态差异的基础之上,又从产孢能力、菌丝生长、对靶标病原真菌的重寄生能力及其对化学杀菌剂的抗性等方面进行了研究。结果表明,诱变菌株的菌丝生长量下降,抗药性也存在着一些差异。关于诱变的重寄生放

线菌的其它特性,有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 乔红萍,宗兆锋.重寄生菌 F46和 PR对苹果采后病害 3 种致病菌的控制作用[J].中国生物防治,2002,19(1):76~79.

[2] 乔红萍,宗兆锋.重寄生放线菌 F46和 PR对灰葡萄孢的抑制作用[J].西北农林科技大学学报,2004,32(11):23~26.

[3] 宗兆锋,乔红萍,何杞真.2种重寄生菌的分离和对靶标菌的抑制作用[J].西北农业学报,2002,11(4):1~4.

[4] 杨丽.庆大霉素产生菌的紫外线诱变育种及发酵条件研究[J].青岛化工学院学报,1999,20(1):48~51.

[5] 付艳平,王明祖,姜道宏.淡紫拟青霉 36-1菌株 3种诱变育种方法的比较[J].华中农业大学学报,1998,17(1):20~23.

[6] 宗兆锋,王汝贤,杨之为,等.紫外线对非致病菌尖孢镰刀菌的诱变作用[J].西北农业大学学报,1996,24(2):99~101.

[7] 丁中,刘峰,慕立义,等.紫外线诱导哈茨木霉产生腐霉利抗性菌株的研究[J].中国生物防治,2002,18(2):75~78.

[8] 宗兆锋,钮绪燕.菌药结合防治土传病害[J].陕西农业科学,1995,(1):36~38.

《西北农业学报》编辑委员会 The Editorial Board of Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica			
顾问 (Advisers to the editorial board):			
山 仑 (Shan L)	卢良恕 (Lu L-S)	许 鹏 (Xu P)	何 康 (He K)
张宝文 (Zhang B-W)	李振岐 (Li Z-Q)	陈宗兴 (Chen Z-X)	沈其益 (Shen Q-Y)
员小苏 (Yun X-S)	吴尚贤 (Wu S-X)	路 明 (Lu M)	
主任 (Chairman): 吴普特 (Wu P-T)			
副主任 (Vice Chairman):			
毛学荣 (Mao X-R)	王新华 (Wang X-H)	冯应新 (Feng Y-X)	许 兴 (Xu X)
刘青元 (Liu Q-Y)	孙 浩 (Sun H)	李寿山 (Li S-S)	
编委 (Members of editorial board):			
马玉寿 (Ma Y-S)	尹飞虎 (Yi F-H)	毛学荣 (Mao X-R)	王新华 (Wang X-H)
冯应新 (Feng Y-X)	叶 凯 (Ye K)	许 兴 (Xu X)	刘青元 (Liu Q-Y)
祁周约 (Qi Z-Y)	孙 浩 (Sun H)	吴普特 (Wu P-T)	张富国 (Zhang F-G)
李自祥 (Li Z-X)	李寿山 (Li S-S)	陈炳东 (Chen B-D)	宋继学 (Song J-X)
杜德志 (Du D-Z)	易 华 (Yi H)	高世铭 (Gao S-M)	戴 健 (Dai J)