

抗稻瘟病菌株—诺卡氏菌 A11 的诱变育种

叶亚军, 张 敏*, 汤志良

(四川农业大学植物保护系, 雅安 625014)

摘要 从四川农业大学农场土壤中分离得到的诺卡氏菌(*Nocardia* sp.), 其代谢产物对稻瘟病菌有强烈的抑制作用。以此菌株为出发菌株, 进行紫外线(UV)、硫酸二乙酯(DES)、微波(MV)诱变, 诱变处理后获得的突变株中以 UV 处理 120 s 时正变率最高, 其摇瓶复筛试验中, 该变异株代谢产物拮抗活性比出发株提高 43.4%。MV 处理在 20 s 剂量下提高了 32.8%; DES 处理在浓度为 0.2% 时提高了 24.8%。经连续传代 8 次, 拮抗活性稳定。

关键词 稻瘟病; 诱变; 诺卡氏菌

中图分类号 S 511.035

Breeding of *Nocardia* sp. A11, a strain resistant to rice blast by induced mutation

Ye Yajun, Zhang Min, Tang Zhiliang

(Department of Plant Protection, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract A strain named A11 was isolated from the soil in farm fields in Sichuan Agricultural University. It was identified as *Nocardia* sp. through colony analysis and biochemical determination. It produced an antibiotic substance that could obviously inhibit *Pyricularia Grisea*. With A11 as a starting strain, some high-yield mutant strains were obtained after UV irradiation, DES treatment and microwave irradiation. With UV irradiation for 120 s, the best forward-mutant strain was obtained. Through fermentation, the antibiotic activity of the mutant strain that was irradiated by UV for 120 s increased by 43.4% compared with that of the starting strain. And the antibiotic activity of the mutant strain irradiated by MV for 20s increased by 32.8% compared with that of the starting strain. Meanwhile, the antibiotic activity of the mutant strain treated with 0.2% DES increased by 32.8% compared with that of the starting strain. Their antibiotic activity was stable through 8 generations.

Key words rice blast; mutation; *Nocardia* sp.

水稻稻瘟病是世界性真菌病害^[1], 全球 80 余个国家均有发生, 也是我国南北稻区危害最严重的水稻病害之一, 流行年份可造成损失达 40% ~ 50%^[2]。在防治稻瘟病的研究中, 利用抗病育种取得了较好的防治效果^[3], 但也存在抗性丧失的问题。农药防治上, 目前生产上使用的主要杀菌剂不仅容

易使病原菌产生抗药性, 而且颈瘟防治中农药残留严重。开发应用微生物源农药防治稻瘟病符合无公害防治的大势所趋^[4], 市场上也相继出现了春雷霉素^[5], 庆丰霉素, 农抗 120 等微生物源农药, 效果较好。从土壤中分离的诺卡氏菌 A11 其代谢产物对稻瘟病有较好的抑制作用, 本研究采用紫外线

收稿日期: 2006-06-05

基金项目: 四川省教育厅资助项目(2002A013)

* 通讯作者 E-mail: zhangm@sicau.edu.cn

(UV)、硫酸二乙酯(DES)^[6-7]、微波^[8](MV)等3种方法对该生防菌株进行诱变改良,以期获得高产菌株,为进一步开发应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

(1)诺卡氏菌 A11 由本试验室分离保存;稻瘟菌(*Pyricularia grisea*)由四川省农业科学院植物保护研究所提供。

(2)活化(再生)培养基采用高氏一号培养基;发酵培养基配方为:可溶性淀粉 50 g,黄豆饼粉 20 g, KH_2PO_4 1 g, NaCl 2 g, CaCO_3 5 g, 水 1 000 mL, pH7.2~7.4;拮抗培养基采用 PDA 培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 单孢子悬浮液的制备^[9]

取培养到对数生长期的诺卡氏菌 A11 孢子平板,加入少量无菌水,用无菌接种铲刮洗下孢子,然后移入含玻璃珠和装有 30 mL 无菌水的三角瓶摇床振荡 30 min,将孢子打散,滤纸无菌过滤,即得单孢子悬浮液,用无菌水稀释至孢子悬浮液浓度为 1×10^7 个/mL。

1.2.2 紫外线(UV)诱变

取 10 mL A11 单孢子菌悬液于带磁力棒的 $d=90$ mm 的培养皿中,磁力搅拌下进行紫外线(功率 15 W,照射距离 30 cm)照射。诱变时间设为:20、40、60、80、100、120、140、160、200 s,CK(不照 UV)。

1.2.3 硫酸二乙酯(DES)诱变

取 2 mL 单孢子菌悬液加入灭菌小三角瓶内,再加入 8 mL pH7.0 磷酸缓冲液,分别加入 5、10、20、30、40、50 μL DES,形成 DES 含量为 0.05%、0.10%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 的 6 个诱变梯度,以不加 DES 为空白对照。28 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 摇床振荡 30 min,然后向小三角瓶内加入 1 mL 2% 硫代硫酸钠终止诱变反应。

1.2.4 微波(MV)诱变

取 10 mL A11 单孢子菌悬液注入 $d=90$ mm 的培养皿中,选用的微波炉功率为 700 W,脉冲频率为 2 450 Hz,将微波炉调至中火,按不同的处理时间,对孢子悬液进行辐射处理。处理时间 10、20、30、40、50、60、80、100 s,另设 CK(分别为不照 MV)。

1.2.5 诱变后初筛

经过上述 3 种方法诱变后,每种处理稀释为孢子含量 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 个/mL 3 个浓度梯度,分别吸取 0.3 mL 单孢菌悬液涂布于再生培养基平板上,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内倒置培养 3~4 d,选取直径

较对照大的菌落与稻瘟病菌作对峙培养,4~5 d 后测量抑菌带的大小,并与出发株 A11 比较筛选。

1.2.6 复筛

选取初筛过程中抑菌作用较出发株 A11 强的菌株接种于发酵培养基(250 mL 三角瓶 100 mL 培养基)中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 摇床振荡培养 6 d,发酵结束后用纸碟法^[10]进行复筛。

1.2.7 遗传稳定性试验

将复筛获得的正突变菌株接种于再生培养基上,分别连续传代 8 次,摇瓶发酵后分别做拮抗稻瘟病试验,以第一代菌株抑菌率为 100% 效价计,计算各代的抑菌率并转化为相对效价,进行比较。

2 结果与分析

2.1 3 种处理的诱变效应和初筛结果

从 3 种诱变处理后的诱变效应的趋势可以看出,诱变剂量(浓度)的大小与诱变菌株的致死率是成正相关的(图 1、图 2、图 3)。经验数据表明,诱变剂量(浓度)在致死率达到 50% 左右时,适合选育强壮的菌株;而当诱变剂量达到 95% 以上的致死率时,易获得变异高产菌株。

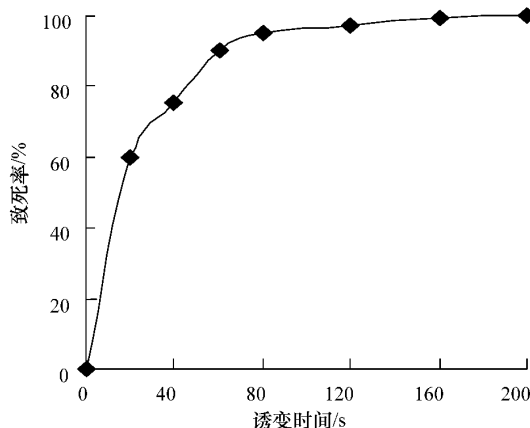


图 1 UV 诱变处理对诺卡氏菌 A11 的致死效应

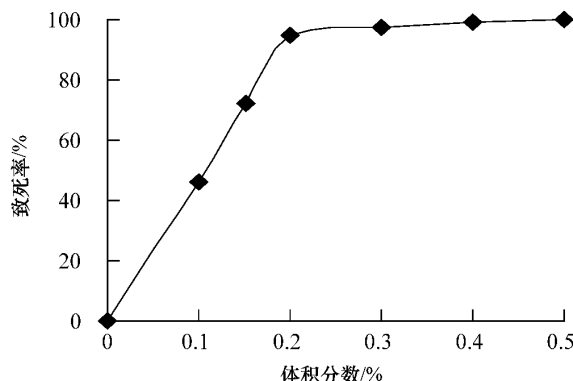


图 2 DES 诱变处理对诺卡氏菌 A11 的致死效应

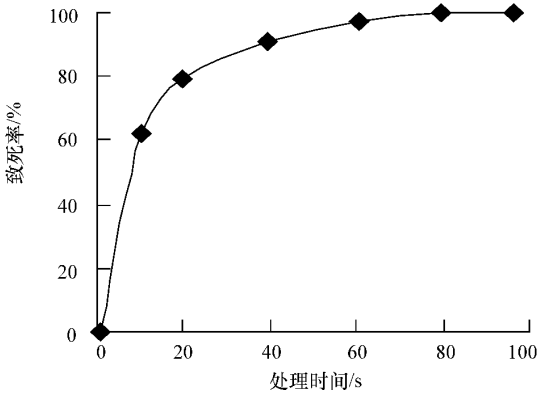


图3 MV诱变处理对诺卡氏菌 A11 的致死效应

从图1可以看出,在紫外灯功率和照射距离保持不变时,照射时间越长,菌株致死率越高。UV照射时间在20 s时,菌株致死率为60%,40 s时致死率为75%;而当UV照射时间达到80 s时,菌株致死率达到了95.4%,在200 s的剂量下,菌株的致死率已经接近100%了。因此,在紫外线致死剂量在95%以上的菌株中,80~200 s列为筛选范围,按1.2.5法进行初筛,结果见表1。

表1 诺卡氏菌 A11 经 UV 诱变处理初筛结果¹⁾

处理时间/s	正变株数量/株	负变株数量/株	不变株数量/株	变异率/%
80	8	10	84	17.65
120	12	1	43	23.21
160	4	2	16	27.27
200	0	1	4	20.00

1) 正变株为抑菌带大于出发株抑菌带的菌株;负变株为抑菌带小于出发株抑菌带的菌株;不变株为抑菌带等于出发株抑菌带的菌株。

硫酸二乙酯(DES)的诱变效应根据图2可以看出,在诱变时间不变的情况下,DES体积分数越大,菌株致死率越高。当DES体积分数达到0.2%以后,致死率明显增加到95%以上,而当DES浓度达到0.5%,致死率达到100%。因而筛选菌株的DES体积分数以0.2%~0.4%为宜,结果见表2。

表2 诺卡氏菌 A11 经 DES 诱变处理初筛结果¹⁾

体积分数/%	正变株数量/株	负变株数量/株	不变株数量/株	变异率/%
0.2	5	7	96	11.11
0.3	0	7	40	14.89
0.4	1	2	15	16.67

1) 正变株为抑菌带大于出发株抑菌带的菌株;负变株为抑菌带小于出发株抑菌带的菌株;不变株为抑菌带等于出发株抑菌带的菌株。

微波(MV)诱变效应见图3,经MV处理10 s时,菌株致死率为62%;MV处理20 s时,菌株的致死率已经在90%以上了;MV处理60 s时,菌株的致死率达到了97.7%。可以看出微波的最佳诱变

剂量在20~60 s之间乃至更长一点的时间。试验在20、60 s和100 s发现了正突变株,见表3。

表3 诺卡氏菌 A11 经 MV 诱变处理初筛结果¹⁾

处理时间/s	正变株数量/株	负变株数量/株	不变株数量/株	变异率/%
20	12	52	356	15.23
60	7	6	33	28.26
100	2	0	7	22.22

1) 正变株为抑菌带大于出发株抑菌带的菌株;负变株为抑菌带小于出发株抑菌带的菌株;不变株为抑菌带等于出发株抑菌带的菌株。

从表1、表2、表3看出,随着诱变剂剂量(浓度)的增加,变异率也随之增加,这一点同致死率也是相同的;值得注意的是,有些在致死率接近100%时,变异率略有下降的趋势(UV和MV)。正变率和负变率没有和诱变剂量成固定的关系。通过对3种诱变剂的SSR分析,UV诱变的平均变异率最高,为22.7%,MV次之,DES诱变变异率最低。5%显著水平下,UV诱变和MV诱变的变异率明显高于DES诱变的变异率;1%极显著水平下,3种诱变的变异率无明显差异。正变株在UV剂量为120 s时和MV处理20 s时发现最多,为12株;其次为UV处理80 s出现8株正变株,MV处理60 s出现7株正变株;DES处理出现的正变株较少。

2.2 复筛结果

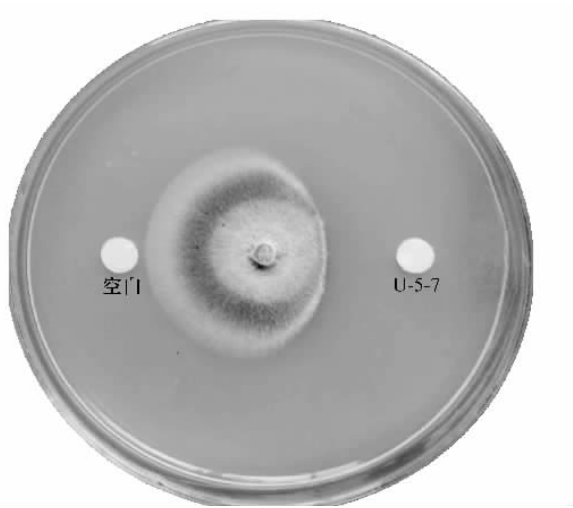
按1.2.6法作复筛,经过反复筛选后,UV处理筛选出5株菌株,DES处理筛选出3株菌株,MV处理筛选出3株菌株(表4)。

表4 3种诱变处理的复筛结果

处理	菌株号	抑菌带直径/mm				相对提高率/%	差异显著性(SSR)	
		1	2	3	4		0.05	0.01
UV	U-4-8	14.6	14.8	14.4	14.2	16.0	e	D
	U-5-2	15.4	15.8	15.6	15.5	24.6	d	C
	U-5-7	18.1	17.6	18.2	17.8	43.4	a	A
	U-5-11	16.2	15.8	15.8	16.0	27.6	c	C
	U-6-9	13.9	14.0	13.6	13.2	9.4	f	E
DES	D-3-1	15.7	15.5	15.4	15.8	24.8	d	C
	D-3-7	13.6	13.8	14.2	14.0	11.2	f	E
	D-3-13	14.0	14.2	14.6	14.2	15.6	e	D
MV	M-2-9	16.8	16.6	16.6	16.4	32.8	b	B
	M-6-6	16.2	16.8	16.4	16.5	31.8	b	B
	M-6-12	14.8	14.4	14.8	14.6	17.2	e	D
CK ¹⁾	—	12.5	12.5	12.5	12.5	0	g	F

1) CK 为出发株。

经过UV诱变的出现了一个正突变最高的菌株U-5-7(图4),为UV处理120 s时的一个突变株,经SSR分析,显著高于出发株,提高率达到了43.4%。经MV诱变的菌株提高率仅次于UV处理120 s的突变株,分别达到了32.8%和31.8%。相比之下,DES诱变的菌株也有所提高,但没有UV和MV显著。



左为清水对照

图4 诺卡氏菌 A11 正变株 U-5-7 复筛拮抗带图

综合以上比较,诱变结果是紫外线诱变(UV)>微波诱变(MV)>硫酸二乙酯诱变(DES)。

2.3 遗传稳定性试验结果

经复筛筛选到的正突变株中,选取相对提高率较高的高产菌株:U-5-7、M-2-9、M-6-6、U-5-11、D-3-1 分别接种于高氏一号培养基上,连续传代 8 次,分别测定相对效价(表 5)。结果表明:代间相对效价差异不明显,证明遗传性状稳定。

表 5 遗传稳定性试验结果¹⁾

菌株号	相对效价/%							
	第1代	第2代	第3代	第4代	第5代	第6代	第7代	第8代
U-5-7	100	99.6	99.2	98.9	98.9	98.6	98.8	98.4
M-2-9	100	99.8	98.8	98.6	98.5	98.2	98.2	98.0
M-6-6	100	99.7	99.5	99.0	98.6	98.6	98.3	98.2
U-5-11	100	99.5	99.4	98.4	98.0	97.8	97.6	97.6
D-3-1	100	99.2	98.9	98.2	98.0	97.6	97.6	96.8

1) 以第 1 代菌株的相对效价为 100% 计算。

3 讨论

诱变育种具有重要的实践意义。当前发酵工业和其他微生物生产部门所使用的高产菌株,几乎都是通过诱变育种而明显提高其生产性能。诱变育种除能提高代谢产物的产量外,还可以达到改进产品质量、扩大品种和简化生产工艺等目的。

诱变育种主要分物理诱变和化学诱变两种。本试验采用的紫外线(UV)诱变和微波(MV)诱变为物理诱变,而硫酸二乙酯(DES)则属于化学诱变。紫外线(UV)诱变的生物学效应主要是由于 UV 能引起 DNA 结构变化造成的,其中胸腺嘧啶二聚体的形成又是紫外线改变 DNA 结构的主要途径。硫

酸二乙酯(DES)属于烷基硫酸盐一类的烷基化合物,它的作用机制主要是使 DNA 的磷酸及碱基部分发生烷化作用而引起的 DNA 复制发生错误。微波(MV)是一种电磁波,起作用于生物体有热效应和非热效应两种不同的方式,但作为电磁波其交变电场对微生物细胞内 DNA 的洛仑兹力作用,引起 DNA 分子的点突变可能是主要的作用方式。本试验诱变的菌株是否也发生了类似上述的遗传变异,其分子生物学上的证据,还需进一步的研究。

本试验进行的 3 种诱变方式,除大小外,出发株菌落的形状、颜色、光泽度并没有太大的改变,说明 3 种诱变方式所引起的菌株变异中形态突变并不是主要的;而代谢产物对稻瘟病菌的拮抗作用明显增强,说明其代谢产物有了明显的提高,可以说,该试验诱变所得变异菌株主要是产量突变型的高产菌株。

通过遗传稳定性的试验,证明突变的高产菌株是稳定遗传的,说明本试验得到的高产菌株为基因型菌株,而不是表型改变地菌株。本试验的 3 种诱变方式,都不同程度地提高了拮抗活性,其中紫外线(UV)诱变诱变效果最好,但如果用紫外线(UV)诱变结合微波(MV)诱变或者硫酸二乙酯(DES)等化学诱变来做复合诱变,是否会得到更好的诱变结果,还需做进一步的研究。

参考文献

- [1] 曾千春,叶华智,朱 祯,等. 稻瘟病分子生物学研究进展[J]. 生物技术通报,2000(3):1.
- [2] 孙国昌,杜新法,陶荣祥,等. 水稻稻瘟病防治策略和 21 世纪研究展望[J]. 植物病理学报,1998,28(4):289-292.
- [3] 程式华,庄杰云,曹立勇,等. 超级杂交稻分子育种研究[J]. 中国水稻科学,2004,18(5):377-383.
- [4] 游春平,肖爱萍,李湘明,等. 稻瘟病菌拮抗微生物的筛选及鉴定[J]. 江西农业大学学报,2001,23(4):521.
- [5] 任金平,郭晓莉,王继春,等. 防治稻瘟病化学农药与生物农药协调应用技术研究[J]. 吉林农业科学,2004,29(2):23-24.
- [6] 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):20-22.
- [7] 黄 晶,刘 峰,刘 勇. 硫酸二乙酯和紫外线对金霉素链霉菌的诱变育种[J]. 中国抗生素杂志,2002,27(3):138-140.
- [8] 贾红华,周 华,韦 萍. 微波诱变育种研究及应用进展[J]. 工业微生物,2003,33(2):46-50.
- [9] KIESER T, BIBB M J, BUTTNER M J, et al. Practical *Streptomyces* genetics[M]. England: The John Innes Foundation. 2000: 99-106.
- [10] 方中达. 植病研究方法(第 3 版)[M]. 北京:中国农业出版社,1996.