

淡紫拟青霉菌 IPC 菌株诱变育种方法比较

The comparison of different methods of induced mutation of *Paecilomyces lilacinus* IPC

张延新¹ 刘开启^{2*} 夏振远³ 李天飞⁴

(1. 山东农业大学植物保护学院, 泰安 271018; 2. 仲恺农业技术学院植物保护系, 广州 510225; 3. 云南烟草科学研究院生物技术重点实验室, 昆明 650106; 4. 玉溪红塔集团, 玉溪 653100)

ZHANG Yan-xin¹ LIU Kai-qi^{2*} XIA Zhen-yuan³ LI Tian-fei⁴

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China; 2. Department of Plant Protection, Zhongkai Agrotechnical College, Guangzhou 510225, China; 3. Key Lab of Biotechnology of Yunnan Academy of Tobacco Sciences, Kunming 650106, China; 4. Yuxi Hongta Group, Yuxi 653100, China)

淡紫拟青霉菌 *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson 是一种重要的根结线虫卵寄生菌, 同时是多种昆虫及其他植物寄生线虫的重要天敌, 具有极高的应用价值。Jatala 等^[1]发现该菌对南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 的卵寄生率高达 60% ~ 70%。作者采用紫外线等方法对淡紫拟青霉菌 IPC 菌株进行了诱变选育, 以便进一步提高其防效及应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

出发菌株: 淡紫拟青霉 IPC 菌株由云南烟草科学研究院生物技术重点实验室提供。

培养基: 马铃薯葡萄糖培养基 (PDA), 用于菌株的保存和固体培养; 马铃薯葡萄糖液体培养基 (PD) 用于液体摇瓶发酵; 几丁质分离培养基 (胶体几丁质 2.5g, K₂HPO₄ 0.7g, KH₂PO₄ 0.3g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01g, 琼脂 20g, pH7.0), 用于初筛突变菌株。

1.2 方法

诱变: 参照白毓谦^[2]和施巧琴等^[3]方法, 对出发菌株孢子悬浮液分别采用紫外线照射和硫酸二乙酯、氮芥和亚硝酸处理进行诱变。

初筛: 经诱变处理后的孢子悬浮液稀释 10⁴ ~ 10⁶ 倍, 涂到几丁质培养基平板上 (每皿加 0.2mL 孢子液), 28℃ 恒温培养 4 天, 计算致死率, 筛选透明

圈和菌落直径较大的菌株进行复筛。致死率 (%) = [(对照平均萌发菌落数 - 处理平均萌发菌落数) / 对照平均萌发菌落数] × 100。

复筛: 用灭菌水配制 1 万粒/mL 的南方根结线虫卵粒悬浮液, 在直径 6cm 的小培养皿中加入 0.5mL 该卵悬浮液、50μL 孢子液、4.5mL 灭菌水。以未加孢子液为对照。每个突变菌株各重复 3 次, 即各 3 皿。26℃ 培养 4 天。镜检, 每皿随机计数 50 粒卵, 统计被寄生的卵数, 计算各菌株的卵寄生率和提高率。卵寄生率 (%) = (该菌株 3 次重复试验中被寄生卵数的平均值 / 50) × 100。提高率 (%) = {[突变菌株的卵寄生率 (%) - 对照菌株 IPC 的卵寄生率 (%)] / 对照菌株 IPC 的卵寄生率 (%) } × 100。根据各处理测定的卵寄生率提高的突变菌株数, 计算正突变率。正突变率 (%) = (正突变菌株数 / 测定菌株数) × 100。

2 结果与分析

经初筛后共挑取菌株 130 个, 进行 2 次复筛测定, 其中提高率大于 5% 的为正突变菌株, 每个处理选出 5 个较好的正突变菌株, 结果见表 1。结果表明, 亚硝酸处理各个处理剂量均能筛选到较多的正变菌株, 正突变率最高达 88.9%, 紫外线照射处理获得菌株的卵寄生提高率平均值最高, 并且在高处理剂量下可以获得卵寄生率提高较大的突变株, 其中 UV-307 菌株的提高率达 24.28%。硫酸二乙酯

基金项目: 云南省“十五”攻关项目 (2001NG08); 国家烟草专卖局科技项目 (110200101010)

作者简介: 张延新, 硕士研究生, 主要从事植物病虫害生物防治方面的研究

* 通讯作者 Author for correspondence (email: kqliu@sdau.edu.cn)

收稿日期: 2004-04-24

表 1 不同诱变处理的复筛结果

Table 1 Results of the further screening of the mutated isolates

诱变处理方法 Mutational methods	处理剂量 Treatment dose	致死率(%) Fatality rate	正突变率(%) Effective mutation rate	二次复筛 Further reselection		
				菌株号 Isolates	卵寄生率(%) Rate of parasitic eggs	提高率(%) Raise rate
紫外线照射 UV	1min	90.0	10.0	UV-307	90.6	24.28
	2min	95.6	30.0	UV-309	84.0	15.23
	3min	99.8	55.6	UV-205	82.6	13.31
				UV-207	82.6	13.31
				UV-308	79.4	8.92
硫酸二乙酯处理 (C ₂ H ₅) ₂ SO ₄	40min	40.3	40.0	SD-103	81.4	11.66
	50min	76.0	77.8	SD-308	80.0	9.24
	60min	92.0	44.4	SD-205	76.6	5.08
				SD-208	76.6	5.08
				SD-210	76.0	4.25
氮芥处理 (CH ₂ CH ₂ Cl) ₃ N	30s	84.3	0.0	DJ-210	80.0	9.74
	60s	97.4	55.6	DJ-305	79.4	8.92
	90s	97.8	30.0	DJ-302	78.6	7.82
				DJ-206	77.4	6.17
				DJ-207	78.6	7.82
亚硝酸处理 HNO ₂	50s	74.2	77.8	HN-404	84.6	16.05
	100s	83.3	88.9	HN-407	84.0	15.23
	150s	88.8	55.6	HN-402	84.0	15.23
	200s	95.3	50.0	HN-203	82.0	12.48
	250s	97.4	66.7	HN-307	81.4	11.66
原始菌株 CK					72.9	0.00

处理和氮芥处理无效果较突出的菌株,不能达到诱变育种的目的。最后获得的 UV-307、UV-309、HN-404、HN-407、HN-402 菌株卵寄生提高率大于 15%,卵寄生效果较好。在倒置显微镜下直接观察结果表明,该菌可以寄生根结线虫卵和部分低龄幼虫,室内测定卵寄生率达 60%~90%;被寄生卵内通常充满菌丝,内含物全部被破坏,无幼虫形成。

在倒置显微镜下直接观察。结果表明,该菌可以寄生根结线虫卵和部分低龄幼虫,室内测定卵寄生率达 60%~90%;被寄生卵内通常充满菌丝,内含物全部被破坏,无幼虫形成。

3 讨论

4 种诱变方法均能使 IPC 菌株的孢子产生较强的变异,但综合各结果分析,选育高卵寄生率的菌株以紫外线照射处理最好,并且在高致死率的处理剂量(3min)下可获得优良菌株。经各诱变处理最终

选育出了 5 个正突变菌株,其中 UV-307 的卵寄生率达到 90.6%,室内试验效果良好,为该菌株的开发利用提供了重要条件。

淡紫拟青霉 IPC 菌株可以产生几丁质酶,作用于根结线虫卵壳,是该菌寄生卵的主要作用物质之一。所以本研究首次采用淡紫拟青霉菌的几丁质酶产量和酶活力作为筛选标准,以几丁质作为唯一碳源的几丁质分离培养基进行初筛,减少了工作量,节省了选育时间。选育出的优良突变菌株的定植能力、生长速度、稳定性等还有待于进一步研究。

参 考 文 献(References)

1 Jatala P. Biological control of plant-parasitic nematodes. Annual Review of Phytopathology, 1986,24:453-489
2 白毓谦. 微生物实验技术. 济南:山东大学出版社,1986,327-399
3 施巧琴,武松刚. 工业微生物育种学. 北京:科学出版社,2003