

付瑞敏,韩鸿鹏,张丽琴,等. 葡萄霜霉病和白粉病拮抗菌的分离、鉴定和 He-Ne 激光诱变[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):122-125.

葡萄霜霉病和白粉病拮抗菌的分离、鉴定 和 He-Ne 激光诱变

付瑞敏^{1,2}, 韩鸿鹏¹, 张丽琴¹, 张红¹, 常慧萍¹, 邢文会¹, 杨雪¹, 刘春雷¹, 王丁¹, 陈五岭²

(1. 河南教育学院, 河南郑州 450046; 2. 西北大学, 陕西西安 710069)

摘要:从葡萄果园土壤中筛选出可有效抑制葡萄致病菌葡萄白粉病病原菌和葡萄霜霉病病原菌生长的菌株,通过表型生理学、生物化学研究,筛选出的菌株 PT4 被鉴定为枯草芽孢杆菌。为了增强 PT4 菌株的拮抗能力,对其进行 He-Ne 激光诱变,获得 6 株突变株,通过拮抗力和遗传稳定性的检测,对葡萄白粉病病原菌和葡萄霜霉病病原菌拮抗性最强的突变株 PT46 被挑选出来。根据试验结果,认为 He-Ne 激光诱变拮抗菌的方法可以应用于葡萄霜霉病和葡萄白粉病的生物防治领域。

关键词:葡萄;霜霉病;白粉病;拮抗菌;激光诱变

中图分类号: Q933 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0122-03

葡萄以其独特的风味、丰富的营养价值和保健价值,成为当今世界各国竞相发展的一种水果产业。近年来,随着人工栽培葡萄面积的不断扩大,葡萄病害的危害也在逐年加重,有的病害已经成灾,严重影响了葡萄的品质,制约着葡萄产业的发展。引起葡萄病害的主要病原菌是葡萄白粉病和葡萄霜霉病病原菌,前者主要侵染葡萄的绿色部分尤其是幼嫩组织,后者能引起葡萄严重落叶,对葡萄树木危害严重^[1-2]。

生物防治具有安全、无毒、有效、经济的优势,对建立绿色有机葡萄生产体系具有战略性意义^[3]。过去的 20 年来,植物病原菌的生物防治已经涌现出多种多样的防治策略。一些拮抗性细菌,比如农杆菌 (*Agrobacterium*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*) 被认为在作物保护中具有有益效果。拮抗性微生物的分离和筛选对于生物防治的应用具有重要作用,假单胞菌的使用已有很长历史,近年来又强调了芽孢杆菌的使用,人们对于枯草芽孢杆菌的使用表现出极大兴趣^[4-5]。

同时,拮抗菌的育种工作引起了很多科学家的关注,现代的基因工程技术和代谢工程技术都被认为是微生物育种中行之有效的办法,但是这种现代技术的应用总是遭遇到各种障碍,因此,传统的育种方法仍是获得改良菌株的有效途径。低功率的激光辐射技术引起了微生物诱变育种者的广泛关注,该技术已经被报道用于苯酚降解菌的筛选^[6];但目前尚鲜有利用低功率氦氮激光进行葡萄病害拮抗菌诱变育种的报道。本研究报道了菌株 PT4 的分离、鉴定、拮抗性能及氦氮激光辐射诱变育种效果,将为开发有益微生物用于作物保护的工

作提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

致病菌葡萄白粉病病原菌 (*Uncinula necator*) 和葡萄霜霉病病原菌 (*Plasmopara viticola*) 从陕西省微生物研究所获得,病原菌生长在 PDA 平板上,30 ℃ 保存。

1.2 器械

T3 型 He-Ne 激光发生器 (波长 632 nm, 功率 10 mW), 使用光斑为 1.5 mm, 西北大学光电厂提供。

1.3 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基 (NA 平板); 马铃薯培养基; 摇瓶种子培养基。

1.4 试验方法

1.4.1 细菌的分离 菌株分离自陕西渭南患病葡萄果园土壤。所有试验操作在无菌环境中完成。取 10 g 土壤, 晒干后研碎, 于无菌条件下加入 90 mL 无菌水中, 混合后用磁力搅拌器振荡搅拌 30 min, 连续稀释成 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的梯度浓度稀释液。将梯度稀释液在 100 ℃ 水浴加热 10 min, 而后将其涂布于 NA 平板上, 37 ℃ 平板培养 24 h, 获得单克隆。从各个单克隆平板上挑取单个菌落接种到其他新鲜平板上以检查纯度, 获得单克隆后, 于体外检查其对病原菌的拮抗性。

1.4.2 体外筛选拮抗性细菌 首先, 用抑菌圈法进行初筛。分别以葡萄霜霉病病原菌和葡萄白粉病病原菌为指示菌, 采用抑菌圈法检测各菌株的拮抗性能, 稀释倒平板法制备病原菌平板, 将待测菌点接于平板上, 28 ℃ 恒温条件下培养 48 h 后观察抑菌情况, 测量抑菌圈直径。每组试验重复 3 次, 根据抑菌圈直径大小选取抑菌活性较为明显的菌株, 保存备用。然后, 为了检测细菌发酵液的拮抗能力, 采用牛津杯法进行复筛。将拮抗细菌接种到牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 37 ℃、150 r/min 摇瓶培养 3 d, 10 000 r/min 离心 20 min, 弃沉淀, 将上清液经 0.25 μm 的微孔滤膜除菌, 制成无菌的发酵液置于 4 ℃ 保存。以病原菌为指示菌, 测定拮抗菌发酵液的拮抗能

收稿日期: 2013-05-13

基金项目: 河南省科技攻关重点项目 (编号 122102310171); 陕西省重大科技创新项目 (编号 2009ZKC04-16); 河南教育学院青年科研项目 (编号 20100103)。

作者简介: 付瑞敏 (1981—), 女, 河南郑州人, 博士研究生, 讲师, 从事农业及食品微生物研究。E-mail: angelaminmin@163.com。

通信作者: 陈五岭, 教授, 博士生导师, 从事农业、环境及食品微生物研究。E-mail: wuling.chen@263.net。

力。将 100 μL 10^9 CFU/mL 的病原菌涂布于平板,在平板中放置 1 个牛津小杯,然后将制备好的无菌发酵液 200 μL 移入牛津杯中,以无菌水作为对照。所有的平板均置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 24 h,记录牛津杯周围出现的抑菌圈大小,并根据记录结果衡量拮抗性。以上涉及到的试验均重复 3 次。

1.4.3 形态学和生理生化鉴定 参照微生物学试验、《伯杰细菌鉴定手册》和《常见细菌系统鉴定手册》,进行了革兰氏染色、芽孢染色和细菌大小测定。利用光学显微镜对其形态学和微观特征进行目视观察,按照规定程序进行革兰氏染色,利用孔雀绿芽孢染色进行芽孢形成鉴定。将菌落划线接种于平板上培养 24 h,观察记录菌落形态特征、菌落质地、菌落边缘、光学特性、菌落的颜色和是否分泌可溶性色素等。参照微生物试验标准进行过氧化氢酶反应、糖或醇类发酵试验、VP 试验、淀粉水解试验、柠檬酸盐利用试验、酪素水解试验、硝酸盐还原试验、耐盐性试验、在 pH 值 5.7 的 NA 培养基中生长试验、纤维素分解试验、硫化氢产生试验和吡啶产生试验等生理生化指标鉴定。以上试验均进行 3 次重复。

1.4.4 16S rDNA 序列分析 细菌总 DNA 提取、16S rDNA 片段回收、E. coli 质粒的提取均利用相应的试剂盒进行操作(天跟生化有限公司提供)。参照前人的方法^[7],对 16S rDNA 序列进行了扩增和序列分析。设计了 1 对通用引物,上游引物为 27F: 5' - AGAGTTGTCATGGCTC - 3', 下游引物为 1492R: 5' - TACGGYTACCTGTTACGACTT - 3'(上海生工生物工程有限公司合成)。通过 PCR 合成核苷酸样本的 1500 bp 的 16S rDNA。PCR 条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经纯化后将目的片段提交上海生工生物工程有限公司进行测序。利用 MAGE 3.1 的 NJ 法与 GenBank 中相近物种的 16S rDNA 构建系统发育树,发育树的聚类稳定性进行 1000 次自导检验^[8]。

1.4.5 He - Ne 激光照射诱变拮抗性菌株 PT4

1.4.5.1 诱变菌种活化 取培养 30 h 的 PT4 菌种斜面,分别用 5 mL 的无菌生理盐水清洗菌苔,并倒入含玻璃珠的锥形瓶,在回旋振荡器上振荡 30 min,采用光电比浊计数法调节 $D_{600\text{nm}}$ 值为 0.986,使菌悬液浓度为 10^8 CFU/mL。

1.4.5.2 He - Ne 激光照射 无菌条件下,取 2 mL PT4 菌悬液分别置于无菌试管中,调节 He - Ne 激光(波长为 632 nm,扩束光斑直径为 2.5 mm)的输出功率为 9 mW,照射距离 25 cm,分别照射 5、10、15、20、25 min,原菌悬液作为对照,每个照射时间设 3 次重复,试验重复 3 次。

1.4.5.3 诱变菌培养 用无菌吸管吸取 1 mL 照射的菌悬液,移入预先装有 9 mL 无菌水的试管中,制成 10^{-1} 的稀释度,振荡使菌悬液充分混匀,再用同样的方法分别稀释到 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} ,各取 0.2 mL 悬液涂布平板,每个稀释度 3 个平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 20 h,观察菌落形态,细菌个数计数,未照射的原菌液作为阴性对照。

1.4.5.4 存活率和正变率的计算 将长出的菌落接至病原菌平板上,采用抑菌圈法进行拮抗性检测,并计算存活率和正变率。存活率 = 诱变后的活菌数/诱变前的活菌数 $\times 100\%$; 正变率 = 正突变的菌株数/诱变后的活菌数 $\times 100\%$ 。

1.4.6 PT4 突变株筛选 在正突变株中挑选出长得又快又

好且菌落形态变化明显的突变株,以葡萄白粉病病原菌和葡萄霜霉病病原菌作为指示菌,采用抑菌圈法检测各正变株的拮抗能力;以病原菌为指示菌,牛津杯法测定拮抗细菌发酵液拮抗能力的大小。

1.4.7 PT4 突变株遗传稳定性试验 将挑选出的拮抗效果显著的突变株活化并转接至 NA 培养基上培养 1 d,作为第 1 代,然后按照相同的方法培养至第 50 代,通过菌株拮抗能力的变化情况,确定该突变株拮抗能力的遗传稳定性。

2 结果与分析

2.1 微生物的分离和拮抗菌的筛选

从葡萄果园土壤中分离获得的 6 株菌都是细菌。以葡萄霜霉病病原菌和葡萄白粉病病原菌为靶标,采用抑菌圈法对 6 株菌进行初筛并测量形成的抑菌圈大小,结果如表 1 所示。结果表明:6 株菌针对 2 种病原菌的拮抗效果表现出了明显的差异,PT4 和 PT3 对 2 种病原菌有比较明显的拮抗效果,而另 4 株菌的拮抗效果则表现出明显的不均衡性,如 PT1 对葡萄白粉病病原菌表现出较强的抑制作用,而对葡萄霜霉病病原菌的拮抗效果较弱。

表 1 6 株菌株细胞的拮抗效应

拮抗菌	抑菌圈直径(mm)	
	白粉病菌	霜霉病菌
PT1	3.6 \pm 0.13	1.3 \pm 0.32
PT2	2.6 \pm 0.31	2.3 \pm 0.58
PT3	4.2 \pm 0.31	4.0 \pm 0.11
PT4	4.4 \pm 0.00	4.2 \pm 0.00
PT5	1.7 \pm 0.23	1.6 \pm 0.23
PT6	2.3 \pm 0.25	2.0 \pm 0.08

将 6 株菌制成无菌发酵液,以葡萄白粉病病原菌和葡萄霜霉病病原菌为靶标,采用牛津杯法进行复筛,着重验证初筛中抑菌效果较为明显的 PT3 和 PT4 的拮抗能力(表 2)。表 2 中结果表明,6 株菌株发酵滤液对于 2 种病原菌的拮抗能力相比活细菌而言均有不同程度的下降,但是 PT4 的拮抗效果仍是最强的,其发酵滤液抑菌圈直径与初筛相比只是略有下降,说明其胞外分泌的抑菌物质足够多,拮抗性能较为稳定,因此选取拮抗性能最强的 PT4 菌株进行后续研究。

表 2 6 株菌株发酵液的拮抗效应

拮抗菌	抑菌圈直径(mm)	
	白粉病菌	霜霉病菌
PT1	3.0 \pm 0.18	1.1 \pm 0.02
PT2	2.1 \pm 0.16	2.0 \pm 0.07
PT3	2.5 \pm 0.15	2.2 \pm 0.24
PT4	4.2 \pm 0.21	3.0 \pm 0.00
PT5	1.5 \pm 0.25	1.4 \pm 0.25
PT6	1.8 \pm 0.25	1.9 \pm 0.00

2.2 拮抗菌 PT4 表型特征

对拮抗菌 PT4 进行了个体形态和群体形态的观察,结果显示:幼龄培养物形态为杆状,革兰氏染色阳性,产芽孢,芽孢呈椭圆形,芽孢囊膨大,细菌大小 1.1 μm \times 0.9 μm ,菌落干燥带褶,不透明、有不规则扩散边缘。由这些形态特征可初步判定:PT4 可能属于芽孢杆菌属。

2.3 拮抗菌 PT4 的生物化学特征

由拮抗菌 PT4 的生理生化指标测定结果可看出,PT4 属严格好氧菌,能在肉汤培养基中生长,pH 值 5.7,2%、5%、7%、10% 抗氯化钠,可发酵多种糖类化合物包括葡萄糖(只产酸)和甘露醇,但是不能产生吡啶和硫化氢。以下反应均是阳性:淀粉和酪蛋白水解、明胶液化、VP 试验(pH 值 7.82)、柠檬酸盐利用、产过氧化氢酶和氧化酶。其生理生化特征均和枯草芽孢杆菌标准株相同,根据形态及生理生化特征可基本确定拮抗菌 PT4 属于芽孢杆菌属。

2.4 PT4 的 16S rDNA 系统发育研究

扩增出的 PCR 产物经测序分析得到 1 491 bp 碱基序列(图 1)。通过与 NCBI 基因库中相近物种的 16S rDNA 序列进行 BLAST 序列相似性分析,结果显示该菌与与枯草芽孢杆

菌 CT5 有 100% 的同源性。采用 N-J 法构建系统发育树,根据系统进化特征(图 2),可确定拮抗菌 PT4 属于枯草芽孢杆菌。

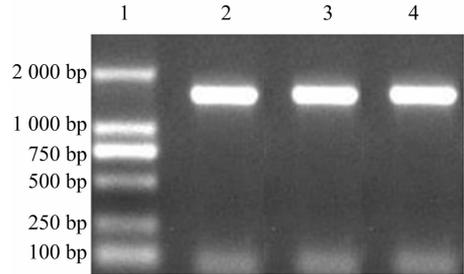


图1 菌株PT4 16S rDNA的PCR扩增结果

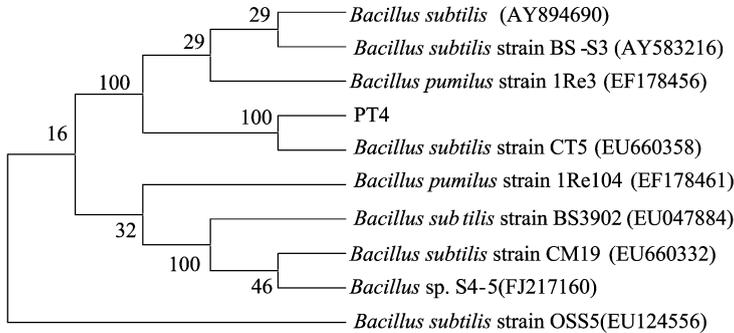


图2 基于16S rDNA的菌株PT4系统进化树

2.5 PT4 突变株的筛选

用激光对拮抗菌株 PT4 照射不同时间,处理结果见表 3。

表 3 不同激光处理时间对拮抗菌株 PT4 的影响

照射时间(min)	存活率(%)	正变率(%)
5	59.5	10.1
10	42.0	19.6
15	28.6	23.0
20	15.0	18.1
25	8.8	15.4

由表 3 可以看出,随着照射时间的增加,PT4 菌株的死亡率逐渐增大,正变率也随之增大;但增大到一定的程度后,正变率出现下降趋势,可见并非致死率越高,其正变率就越高,综合考虑以 15 min 照射时间为最佳。

通过使用抑菌圈法,6 株形态较大、生长较快、且拮抗性高于亲本 PT4 的突变株被挑选出来,分别编号为 PT41、PT42、PT43、PT46、PT47、PT49。使用对峙生长法检测它们对葡萄霜霉病原菌和葡萄白粉病病原菌的拮抗能力,综合分析拮抗活性后,选择 PT46 用作后续研究。

2.6 PT46 突变株发酵液的拮抗性

采用牛津杯法检测 PT46 发酵液的拮抗性,结果显示,与亲本 PT4 相比,突变株 PT46 发酵液抗葡萄霜霉病原菌的能力有了显著提升。

2.7 PT4 正拮抗突变株的遗传稳定性

把拮抗效果显著提高的突变株 PT46 传代培养 50 代,每代的菌株分别做对峙拮抗试验,结果表明各代拮抗效果基本一致,且菌落数量变化也不大,说明突变株 PT46 的拮抗能力

的遗传稳定性良好。

3 讨论

本研究在葡萄果园土壤中分离出抗葡萄病害霜霉病和白粉病病原菌的 6 株菌株,经过初筛和复筛,得到了对葡萄白粉病和葡萄霜霉病原菌抗性最强的菌株 PT4,经鉴定,确定 PT4 菌株是枯草芽孢杆菌。

为增强该生物防治菌株的拮抗能力,对所选菌株 PT4 进行激光诱变育种,经过 He-Ne 激光照射后,不仅菌落形态发生了变化,而且菌落数量减少,说明激光照射对于 PT4 菌株有致死和致突变的效应。将传代 50 次的拮抗效果比较分析,发现突变株 PT46 的拮抗能力具有良好的稳定性,有进一步研究的价值。

分离筛选的亲本菌株 PT4 抵抗葡萄霜霉病原菌的能力较弱,抵抗葡萄白粉病原菌的能力较强,但是经过诱变后,抵抗葡萄霜霉病原菌的能力也显著增强,而且菌体发酵液的拮抗活性也比诱变前有了显著提高。推测可能是诱变过程中某个代谢过程的调控酶的基因发生了突变,从而使得抗生素产量提高,具体原因还需要进一步的试验进行论证。

参考文献:

[1] Condit R, Hubbell S P. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes[J]. Genome, 1991, 34(1):66-71.

[2] Dai G H, Andary C, Cosson-Mondolot L, et al. Polyphenols and resistance of grapevine to downy mildew [J]. Acta Horticulturae, 1994(381):763-766.

金 硕,迟小明,袁子涵,等. 双孢菇生产中高效安全杀虫剂的筛选[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):125-126.

双孢菇生产中高效安全杀虫剂的筛选

金 硕^{1,2}, 迟小明², 袁子涵², 纪 娇², 白 冰², 王升厚^{1,2}

(1. 沈阳师范大学特种菌业研究所, 辽宁沈阳 110034; 2. 沈阳师范大学化学与生命科学学院, 辽宁沈阳 110034)

摘要:采用平板加药法和杀虫剂杀灭果蝇试验,研究敌敌畏乳油、高效氯氰菊酯乳油及印楝素乳油对双孢菇菌丝生长的影响和对果蝇的杀灭效果。结果表明:敌敌畏乳油对果蝇的杀灭作用强,但同时菌丝的生长有较强的抑制作用和致畸作用;高效氯氰菊酯乳油对菌丝生长抑制作用稍弱,对果蝇的杀灭效果一般;印楝素乳油对菌丝生长的抑制作用较小,且对果蝇的杀灭效果明显,可作为高效安全杀虫剂在食用菌栽培中使用。

关键词:双孢菇;杀虫剂;抑制率;筛选

中图分类号: S646.1⁺4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0125-02

近年来,随着食用菌产业的迅速发展,生产中病虫害的问题也日益凸显出来。特别是危害性大、发生普遍的菇蚊和菇蝇类害虫,咬食子实体和菌丝,使菌丝枯萎、衰退,尤其危害菇蕾和幼菇的正常生长,严重时可造成子实体绝收,对食用菌的产量及品质会造成严重的影响^[1-3]。食用菌的抗药性远不如植物,在使用常规杀虫剂时,常导致食用菌菌丝体特别是子实体生长异常、畸变甚至死亡^[4-5]。此外,随着食用菌产品出口对药物残留检测标准的提高以及人们对食品质量与安全的关注,食用菌栽培中对农药的使用越来越引起关注^[6]。因此,在虫害发生初期,选择高效、低毒、低残留的杀虫剂,已成为食用菌领域的一个极为热门的研发课题。为此,我们选择了敌敌畏乳油、高效氯氰菊酯乳油及印楝素乳油为供试药物,研究其对双孢菇菌丝生长的影响以及对果蝇的杀灭效果,旨在选择一种对双孢菇菇蝇杀灭效果好、且农药残留又符合要求的高效安全杀虫剂。

1 材料与方

1.1 供试材料

杀虫剂:80%敌敌畏乳油(山东大成农药公司)、4.5%高

效氯氰菊酯乳油(河北桃园农药公司)、0.3%印楝素乳油(成都绿金生物科学有限公司);菌种:双孢菇,引于沈阳师范大学特种菌业研究所菌种资源库;果蝇:引于沈阳师范大学遗传实验室。

1.2 试验方法

1.2.1 含杀虫剂培养基的配制 采用平板加药法,初筛依据供试杀虫剂商品含量浓度,以培养基最终含纯药量0.01%、0.03%、0.05%、0.07%、0.09%为浓度标准^[7-8]。100 mL加富PDA培养基经灭菌后,当温度下降到50~60℃时,分别倒入表1中的3种杀虫剂不同浓度的对应药量,摇匀后平均倒入4个培养皿中,做好标记。试验中所配制的3种杀虫剂的不同浓度药液见表1。

表1 配制含有不同浓度杀虫剂培养基所需加药量

药剂	原浓度 (%)	100 mL培养基所需加药量(mL)				
		0.01%	0.03%	0.05%	0.07%	0.09%
敌敌畏乳油	80	0.012	0.037	0.062	0.087	0.112
高效氯氰菊酯乳油	4.5	0.222	0.671	1.123	1.580	2.040
印楝素乳油	0.3	3.333	10.000	16.667	23.333	30.000

1.2.2 菌落及菌丝生长状态观察 在培养基上进行菌种源接种,20℃恒温培养数日后,自菌落边缘用直径为0.9 cm的打孔器连同培养基打孔,接种在平板中央并做好标记,20℃恒温培养。接种后7 d,测定菌落直径和观察菌丝体长势,结果取平均值,以不加药为对照。待菌落大小长至整个培养基的50%左右时,在菌落的边缘用盖玻片进行插片。插片时,盖玻片与菌落的边缘保持一点距离,待菌丝爬上盖玻片后,把盖玻片取出,进行显微观察。总生长量(cm) = 第7天

收稿日期:2013-01-06

基金项目:辽宁省沈阳市科技计划(编号:F11-124-3-00);沈阳师范大学校级项目(编号:201210166117)。

作者简介:金 硕(1988—),女,辽宁沈阳人,硕士研究生,研究方向为循环农业。E-mail:jinshuo2011@126.com。

通信作者:王升厚,教授,硕士生导师,研究方向为农业废弃物资源转化与再生利用。E-mail:wshhwq2009@163.com。

[3]刘会宁,李 华. 欧亚种葡萄对白粉病与霜霉病的抗性研究[J]. 东北农业大学学报,2004,35(3):302-308.

[4]Shoda M. Bacterial control of plant disease[J]. Biosci Bioeng,2000,89(6):515-521.

[5]Pamela G M. An effective biofungicide with novel modes of action [J]. Pesticide Outlook,2002,13(5):193-194.

[6]Yu G, Jia X, Wen J, et al. Strain improvement of *Streptomyces roseosporus* for daptomycin production by rational screening of He-Ne laser and NTG induced mutants and kinetic modeling[J]. Applied Bio-

chemistry and Biotechnology,2011,163(6):729-743.

[7]Fani R,Bandi C,Bazzicalupo M, et al. Phylogeny of the genus *Azospirillum* based on 16S rDNA sequence [J]. FEMS Microbiology Letters,1995,129(2/3):195-200.

[8]Han J, Sun L, Dong X, et al. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens [J]. Systematic and Applied Microbiology,2005,28(1):66-76.