

杨 洋,胡永红,杨文革,等. 多抗菌素发酵培养基响应面优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):154-158.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.047

多抗菌素发酵培养基响应面优化

杨 洋,胡永红,杨文革,曹 峥,张 棋

(南京工业大学材料化学工程国家重点实验室,江苏南京 211816)

摘要:以多抗菌素生产菌 *Streptomyces aureochromogenes* NJYHWG66382 为试验菌株,在单因素试验的基础上进行 Plackett-Burman 试验和中心组合试验设计,采用响应面法建立发酵培养基的优化模型,得到最优产多抗菌素的培养基:蔗糖 17.42 g/L,酵母膏 18.72 g/L, KH_2PO_4 0.69 g/L, FeSO_4 0.2 g/L, CaCO_3 0.3 g/L。经试验验证,在此条件下,多抗菌素的效价可达 2 300 $\mu\text{g/mL}$,比优化前提高了 40%。

关键词:多抗菌素;培养基优化;响应面法;条件;效价

中图分类号: S482.2⁺8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0154-04

目前,植物病害在全球范围内每年造成高达数千亿美元的损失,而其中又以真菌病害最为严重。多抗菌素 (polyoxins) 也被称为多效霉素,多抗霉素,多氧霉素,是一种抗真菌核苷类抗生素。多抗菌素能够抑制真菌细胞壁几丁质的合成,被广泛应用于治疗水稻纹枯病、梨黑斑病和番茄灰霉病等植物真菌病害,是一种有效防治植物真菌病害的生物农药^[1-2]。多抗菌素作为一种广谱性抗生素,具有良好的内吸性和高度的靶标生物选择性,已成为国内外杀菌、除虫的一线药物之一^[3-4]。然而,在多抗菌素发酵生产过程中,多抗菌素效价低、生产成本高、发酵周期长等问题限制了其推广应用^[5-7]。因此,对多抗菌素发酵培养基优化及条件初探具有重大意义。本研究以多抗菌素生产菌 *Streptomyces aureochromogenes* NJYHWG66382 为试验菌株,应用响应面法系统考察了影响多抗菌素效价的培养基成分,得到最佳培养基配方,从而提高多抗菌素的产量。

1 材料与方法

1.1 菌种

多抗菌素产生菌 *Streptomyces aureochromogenes* NJYHWG66382,由课题组保藏。

1.2 培养基

斜面培养基:马铃薯 200 g/L,蔗糖:20 g/L,琼脂 15 ~ 20 g/L,自然 pH 值;种子培养基:蔗糖 10 g/L,酵母膏 10 g/L, KH_2PO_4 0.2 g/L, FeSO_4 0.2 g/L, CaCO_3 0.3 g/L, pH 值 6.0;发酵培养基蔗糖 20 g/L,酵母膏 20 g/L, KH_2PO_4 0.2 g/L, FeSO_4 0.2 g/L, CaCO_3 0.3 g/L, pH 值 6.0。

1.3 主要试剂和仪器

试验主要试剂:蔗糖、葡萄糖、甘油、可溶性淀粉、蛋白胨、酵母膏、琼脂粉(国药集团化学试剂有限公司), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 NaNO_3 、 CuSO_4 、 CaCO_3 (广东汕头市西陇化工厂)。

试验仪器设备:电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂)、灭菌锅(华粤行仪器有限公司)、医用净化工作台(苏州净化设备厂)、鼓风电热恒温干燥箱(上海实验仪器厂有限公司)、基础分析型纯水机(青岛富勒姆科技有限公司)。

1.4 试验方法

1.4.1 多抗菌素含量的测定 用管碟法测量发酵液中多抗菌素的含量。使用水稻纹枯菌为指示菌种,配制不同浓度的多抗菌素标品,牛津杯装液量为 200 μL ,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 48 h。根据不同浓度标品和抑菌圈的大小,绘制标准曲线。

1.4.2 单因素试验设计 分别对氮源、碳源、无机盐进行优化,配制发酵培养基,28 $^{\circ}\text{C}$ 发酵培养 5 d,测定每种因素对多抗菌素含量的影响,选择最佳培养基成分。

1.4.3 响应面试验设计

1.4.3.1 Plackett-Burman(PB)设计试验 采用 PB 试验从多个单因素中筛选出对多抗菌素发酵影响最显著的几个因素,使用 Design Expert 软件设计试验方案,包括 11 个变量,使用 Design Expert 软件设计试验方案,包括 11 个变量($n=11$),其中 8 个主要因素(蔗糖、麦芽糖、肌醇、蛋白胨、酵母膏、 FeSO_4 、 KH_2PO_4 、 CaCO_3)和 3 个虚拟变量(表 1),11 个变量分别用 A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K 来代表,每个变量有高(+)和低(-)2 个水平,设置高(+)水平是低(-)水平的 1.5 倍,共进行 12 组试验(表 2)。

1.4.3.2 最陡爬坡试验 在 PB 试验中得到了影响较为显著的 3 个因素,并且根据 PB 设计得出的一次项拟合方程中相应变量的系数,从而确定变化梯度和爬坡方向。若变量系数为负,则该变量水平以梯度递减的方向进行爬坡试验。若变量系数为正,则该变量水平以梯度递增的方向进行爬坡试验,这样就能够经济、快速地逼近最佳区域。将最陡爬坡试验中得到的多抗菌素发酵产量最高点作为中心组合设计的中心点来设计试验方案。

收稿日期:2014-09-05

基金项目:国家高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20133221110010)。

作者简介:杨洋(1990—),男,江苏宿迁人,硕士研究生,主要从事发酵工程和生物分离技术研究。Tel:(025)58139928, E-mail: yangyangnjtech@163.com。

通信作者:胡永红,博士,教授,主要从事生物发酵分离研究工作。Tel:(025)58139209, E-mail: yonghonghu11@126.com。

表 1 Plackett – Burman 试验因素及水平

| 序号 | 变量 | 水平 (g/L) | |
|-------|-------------------------------------|----------|----------|
| | | 低水平 (-1) | 高水平 (+1) |
| A | 蔗糖添加量 | 5.0 | 7.5 |
| B | 麦芽糖添加量 | 4.0 | 6.0 |
| C | 肌醇添加量 | 3.0 | 4.5 |
| D | 蛋白胨添加量 | 6.0 | 9.0 |
| E | 酵母膏添加量 | 8.0 | 12.0 |
| F | FeSO ₄ 添加量 | 0.2 | 0.3 |
| G | CaCO ₃ 添加量 | 0.8 | 1.2 |
| H | KH ₂ PO ₄ 添加量 | 0.2 | 0.3 |
| I、J、K | 虚拟变量 | | |

1.4.3.3 响应面分析法 经过最陡爬坡试验,逼近多抗菌素最大化生产区域,根据中心组合设计 (central composite design) 原理,对经过 PB 和爬坡试验的变量进行 5 水平试验 ($-\alpha$ 、 -1 、 0 、 $+1$ 、 $+\alpha$),共 20 组,使用 Design – Expert 软件对试验结果进行分析,研究多抗菌素的最优发酵培养基配方。

2 结果与分析

2.1 多抗菌素含量的测定

配制不同浓度的多抗菌素标样,使用管碟法 (牛津杯法) 测定不同浓度多抗菌素标准品的抑菌圈大小,以抑菌圈直径 (mm) 为横坐标、多抗菌素浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 为纵坐标绘制标准曲线,见图 1。多抗菌素浓度在 200 ~ 2 400 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性拟合度良好,其回归方程为 $y = 138.23x - 2\,058.46$, x 代表抑菌圈直径, y 代表多抗菌素浓度。相关系数 $r = 0.998$,说明该方程具有良好的相关性,可以用于多抗菌素含量的测定。

2.2 单因素试验结果

2.2.1 氮源对多抗菌素发酵的影响 氮源在合成菌体蛋白质、核酸、酶及各种初级和次级代谢产物等含氮物质的过程中发挥着重要的作用,同时在发酵生产中氮源还起着调节菌体的生长及生物量的作用。由图 2 可知,有机氮源比无机氮源对多抗菌素发酵的促进作用更为显著,在添加有机氮源的培养基中,菌体生长良好,产物正常生成;而在添加无机氮源的发 酵培养基中,菌体生长较稀疏,并且无法产生多抗菌素,这可能是因为该链霉菌无法利用无机氮源来生产多抗菌素。在有机氮源中,酵母膏效果最好,蛋白胨次之。

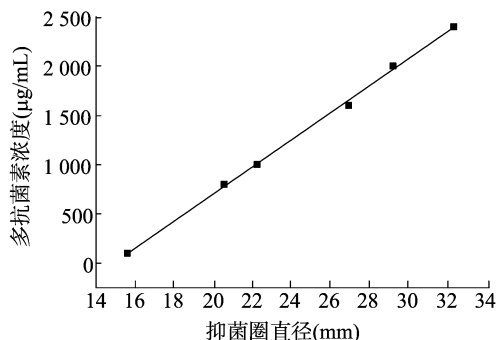


图 1 多抗菌素标准曲线

2.2.2 碳源对多抗菌素发酵的影响 碳源是构成菌体的基本骨架,是菌体生长的能量来源,是各种代谢产物的重要来源,通过影响菌体的呼吸、能量、生长及相关代谢最终影响抗

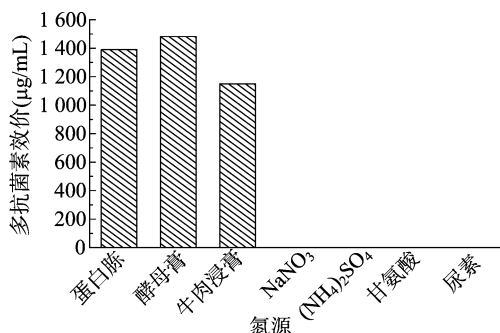


图 2 氮源对多抗菌素发酵的影响

生素等次级代谢产物的产量。由图 3 可知,在供试的 8 种碳源中蔗糖、麦芽糖和肌醇对多抗菌素发酵效果较为理想,其中蔗糖效果最好。其他 5 种碳源对多抗菌素生成的效果相对较差,该链霉菌对其他 5 种碳源利用率不高。

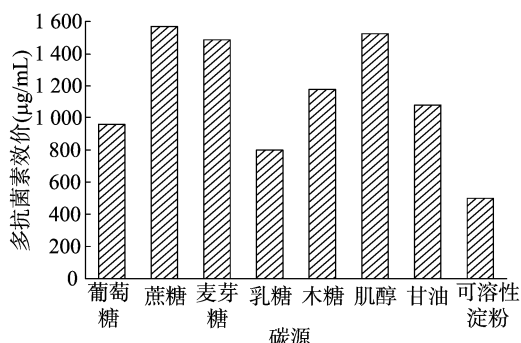


图 3 碳源对多抗菌素发酵的影响

2.2.3 无机盐对多抗菌素发酵的影响 在微生物生命活动中,无机盐构成菌体组成成分,作为酶的组成部分,酶的激活剂或是抑制剂,调节培养基渗透压、pH 值及氧化还原电位等。由图 4 可知,添加 KH₂PO₄ 多抗菌素发酵效果最好,FeSO₄ 和 CaCO₃ 次之。因此在下个阶段的 PB 设计中,将 KH₂PO₄、FeSO₄ 和 CaCO₃ 作为考察因素,其用量分别为 0.2、0.5、1 g/L。

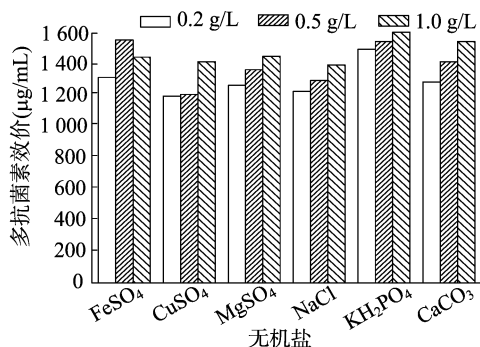


图 4 无机盐对多抗菌素发酵的影响

2.3 响应面试验设计

2.3.1 Plackett – Burman (PB) 试验 对多抗菌素发酵影响较大的 8 个主要因素,再加 3 个虚拟变量 (表 1)。每个变量有高 (+)、低 (-) 2 水平,共计 12 次试验结果见表 2。使用 Design – Expert 软件对表 2 进行分析,结果见表 3。由表 3 可知,上述 8 个因素对发酵生产多抗菌素的显著性由大到小的顺序为蔗糖、酵母膏、KH₂PO₄、麦芽糖、蛋白胨、肌醇、CaCO₃、FeSO₄,其中蔗糖为极显著因素。该模型 $R^2 = 0.975\,9$,表示该

模型可以解释 97.59% 的发酵产多抗菌素水平的变化。P 值小于 0.05 表示该因素为显著因素,从 8 个因素中选出对多抗菌素发酵生产影响显著的因素(蔗糖、酵母膏、KH₂PO₄)进行下一步试验优化。

表 2 Plackett – Burman 试验设计

| 序号 | 变量 | | | | | | | | | | | 效价 (μg/mL) |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------|
| | A | B | C | D | E | F | G | H | I | J | K | |
| 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | 1 353 |
| 2 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | 926 |
| 3 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 202 |
| 4 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 376 |
| 5 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 579.6 |
| 6 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | 1 417 |
| 7 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 672 |
| 8 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 691 |
| 9 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | -1 | 1 001 |
| 10 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 777 |
| 11 | -1 | 1 | -1 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | 1 408 |
| 12 | 1 | 1 | -1 | 1 | 1 | 1 | -1 | -1 | -1 | 1 | -1 | 1 595 |

表 3 Plackett – Burman 试验结果方差分析

| 方差来源 | F 值 | P 值 | 重要性排序 |
|---------------------------------|-----------|---------|-------|
| 蔗糖 | 74.282 96 | 0.003 3 | 1 |
| 麦芽糖 | 0.832 92 | 0.428 7 | 4 |
| 肌醇 | 0.531 38 | 0.518 8 | 6 |
| 蛋白胨 | 0.706 15 | 0.462 4 | 5 |
| 酵母膏 | 27.352 6 | 0.013 6 | 2 |
| FeSO ₄ | 0.206 25 | 0.680 6 | 8 |
| CaCO ₃ | 0.328 05 | 0.606 9 | 7 |
| KH ₂ PO ₄ | 17.339 07 | 0.025 2 | 3 |

2.3.2 最陡爬坡试验 根据 PB 试验设计结果,蔗糖、酵母膏、KH₂PO₄ 的模型方程系数为正值,其浓度水平应增加,根据 3 个因素的效应值大小设计它们的变化方向及步长进行最陡爬坡试验,试验设计结果见表 4。由表 4 可知,选择第 5 组试验方案时,即蔗糖 20 g/L、酵母膏 20 g/L、KH₂PO₄ 0.7 g/L,对应的多抗菌素发酵液效价达到最高值,以此值为中心值进行响应面试验,这样响应面方程更能充分地逼近真实值。

表 4 最陡爬坡试验设计

| 试验编号 | 蔗糖添加量 (g/L) | 酵母膏添加量 (g/L) | KH ₂ PO ₄ 添加量(g/L) | 效价 (μg/mL) |
|------|----------------|-----------------|---|---------------|
| 1 | 8 | 12 | 0.3 | 1 360 |
| 2 | 11 | 14 | 0.4 | 1 590 |
| 3 | 14 | 16 | 0.5 | 1 784 |
| 4 | 17 | 18 | 0.6 | 1 896 |
| 5 | 20 | 20 | 0.7 | 1 940 |
| 6 | 23 | 22 | 0.8 | 1 780 |
| 7 | 26 | 24 | 0.9 | 1 442 |
| 8 | 29 | 26 | 1.0 | 1 278 |

2.3.3 响应面分析法 经过 Plackett – Burman 试验和爬坡试验,确定蔗糖、酵母膏、KH₂PO₄ 的水平,利用 Design – Expert 软件设计响应面试验(表 5)。根据表 6 结果,使用 Design – Expert 软件进行拟合,得到三元二次回归方程 $y = 2\,021.98 - 160.49x_1 - 55.76x_2 - 77.29x_3 + 66.50x_1x_2 -$

$16.00x_1x_3 + 7.75x_2x_3 - 170.21x_1^2 - 177.28x_2^2 - 237.91x_3^2$,其中:y 为多抗菌素效价, x_1 、 x_2 、 x_3 分别为蔗糖、酵母膏、KH₂PO₄ 浓度。

表 5 中心组合设计试验因素与水平

| 编码水平 | 因素(g/L) | | |
|-------|---------|--------|-------------------------------------|
| | 蔗糖添加量 | 酵母膏添加量 | KH ₂ PO ₄ 添加量 |
| -1.68 | 11.59 | 11.59 | 0.53 |
| -1 | 15 | 15 | 0.6 |
| 0 | 20 | 20 | 0.7 |
| +1 | 25 | 25 | 0.8 |
| +1.68 | 28.41 | 28.41 | 0.87 |

表 6 响应面分析及试验结果

| 试验编号 | 蔗糖添加量 | 酵母膏添加量 | KH ₂ PO ₄ 添加量 | 效价 (μg/mL) |
|------|-------|--------|--|---------------|
| 1 | 1 | 1 | -1 | 1 336 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 1 244 |
| 3 | 0 | 0 | -1.68 | 1 316 |
| 4 | 0 | 1.68 | 0 | 2 078 |
| 5 | 0 | 0 | 0 | 1 986 |
| 6 | -1.68 | 0 | 0 | 2 004 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 1 060 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 1 526 |
| 9 | -1 | -1 | 1 | 1 288 |
| 10 | 1 | 1 | 1 | 1 998 |
| 11 | -1 | -1 | -1 | 1 896 |
| 12 | 1.68 | 0 | 0 | 1 365 |
| 13 | -1 | 1 | -1 | 1 757 |
| 14 | 1 | -1 | -1 | 2 022 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 1 639 |
| 16 | 0 | -1.68 | 0 | 1 598 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 1 251 |
| 18 | 0 | 0 | 1.68 | 2 018 |
| 19 | 1 | -1 | 1 | 1 435 |
| 20 | -1 | 1 | 1 | 1 628 |

根据表 6 的结果,运用 Design – Expert 软件对其进行方差分析和模型的显著性分析,结果见表 7。由表 7 可知,该模型的 $P < 0.000\,1$,表明该模型极显著。通过 R^2 来判断该模型的拟合度, $R^2 = 0.950\,4$,即表明该模型可以解释 95.04% 试验所得多抗菌素效价的变化,进一步说明了回归方程的拟合程度较好。

2.4 响应面优化结果的分析

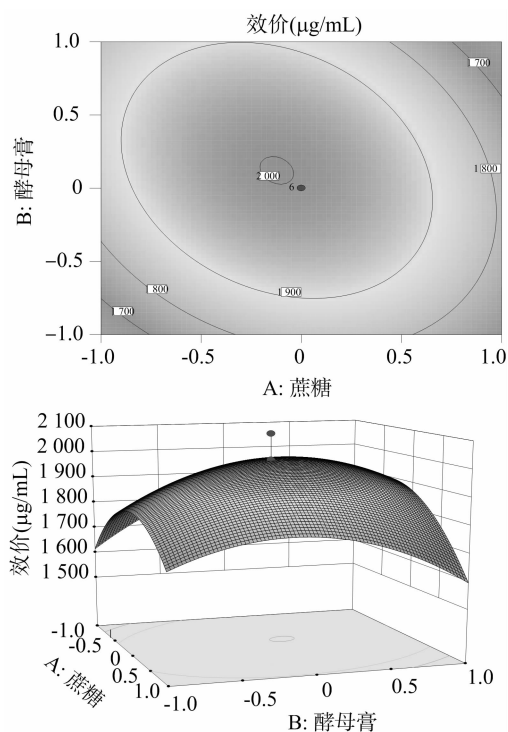
由二元回归方程所得到的响应面图与相应的等高线图见图 5 至图 7。各因素交互作用对响应值多抗菌素产量的影响由图可以直观地反应出来^[8-10]

图 5 表明,在 KH₂PO₄ 一定的情况下,蔗糖和酵母膏的交互作用显著,随着蔗糖和酵母膏含量的增加,多抗菌素效价不断提高,后期呈现小幅下降。

由图 6 可知,在酵母膏一定的情况下,随着蔗糖和 KH₂PO₄ 含量的增加,多抗菌素效价不断提高,后期呈现下降趋势。在一定程度上,提高培养基中蔗糖和 KH₂PO₄ 的含量有利于提高多抗菌素效价,但蔗糖浓度过高会影响细胞通透性,抑制菌体生长,不利于多抗菌素产量的增加。

表 7 回归方程方差分析结果

| 方差来源 | 平方和 | 自由度 | 均方 | F 值 | P 值 |
|----------------------------------|---------------------|-----|---------------------|-------|----------|
| 模型 | 1.931×10^6 | 9 | 2.146×10^5 | 21.28 | <0.000 1 |
| x_1 : 蔗糖 | 3.518×10^5 | 1 | 3.518×10^5 | 34.87 | 0.000 1 |
| x_2 : 酵母膏 | 42 465.43 | 1 | 42 465.43 | 4.21 | 0.067 3 |
| x_3 : KH_2PO_4 | 81 588.81 | 1 | 81 588.81 | 8.09 | 0.017 4 |
| $x_1 x_2$ | 35 377.55 | 1 | 35 377.55 | 3.51 | 0.090 6 |
| $x_1 x_3$ | 2 047.89 | 1 | 2 047.89 | 0.20 | 0.661 9 |
| $x_2 x_3$ | 480.55 | 1 | 480.55 | 0.048 | 0.831 6 |
| x_1^2 | 4.175×10^5 | 1 | 4.175×10^5 | 41.39 | <0.000 1 |
| x_2^2 | 4.529×10^5 | 1 | 4.529×10^5 | 44.90 | <0.000 1 |
| x_3^2 | 8.157×10^5 | 1 | 8.157×10^5 | 80.87 | <0.000 1 |
| 残差 | 1.00×10^5 | 10 | 10 086.58 | | |
| 拟合度 | 95 630.46 | 5 | 19 126.09 | 18.27 | 0.003 2 |
| 误差 | 5 235.333 | 5 | 1 047.07 | | |
| 总和 | 2.032×10^6 | 19 | | | |

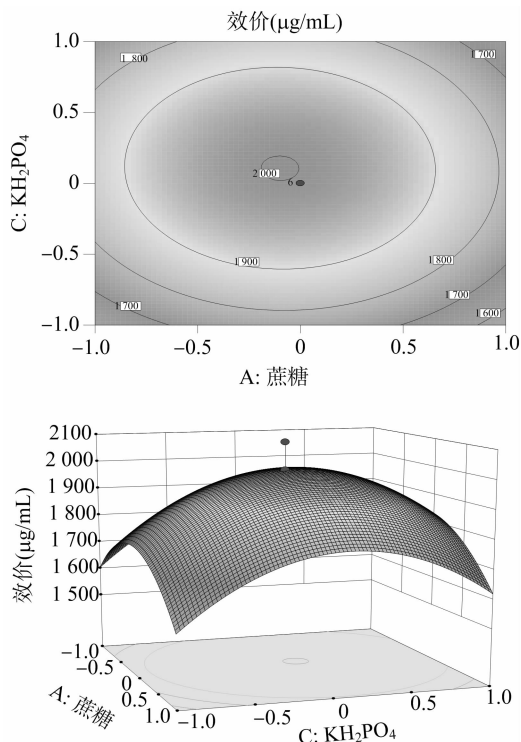
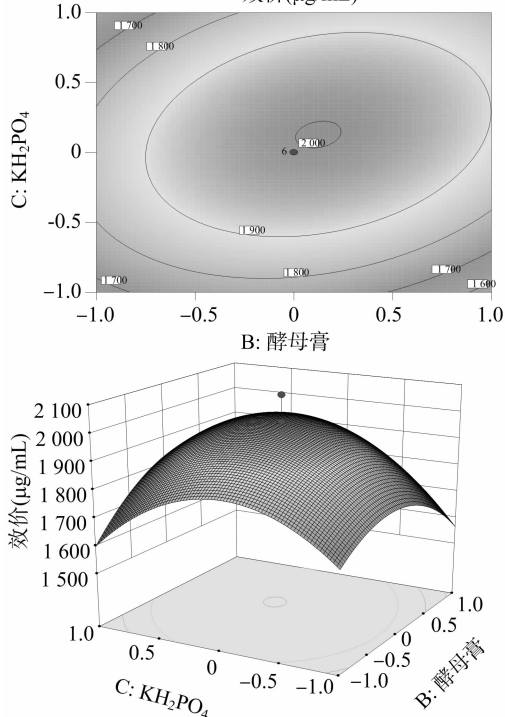
图5 $y=f(\text{蔗糖、酵母膏})$ 等高线与响应曲面

由图 7 可知,在蔗糖一定的情况下,酵母膏和 KH_2PO_4 交互作用较显著,随着酵母膏和 KH_2PO_4 含量的增加,多抗菌素效价不断提高,但酵母膏对多抗菌素效价的影响大于 KH_2PO_4 对产量的影响。

为了能够求出培养基的最佳配方,对回归方程中各个变量求一阶偏导数,解得: $x_1 = 17.42$, $x_2 = 18.72$, $x_3 = 0.69$,此时多抗菌素效价为 2 076 $\mu\text{g/mL}$ 。并进行试验验证,在最适发酵条件下,重复 3 次试验,多抗菌素效价实测值 2 300 $\mu\text{g/mL}$,与预测值基本符合,说明响应面法对多抗菌素发酵培养基优化具有较强可靠性。因此,我们得到最佳培养基配方是:蔗糖 17.42 g/L,酵母膏 18.72 g/L, KH_2PO_4 0.69 g/L。

3 结论

在单因素试验的基础上,经 Plackett - Burman 试验确定

图6 $y=f(\text{蔗糖、}\text{KH}_2\text{PO}_4)$ 等高线与响应曲面图7 $y=f(\text{酵母膏、}\text{KH}_2\text{PO}_4)$ 等高线与响应曲面

了蔗糖,酵母膏, KH_2PO_4 为主要影响因素,在此基础上,进行最陡爬坡试验,确定最佳响应面区域,然后采用中心组合试验设计和 Design Expert 软件分析计算,得到这 3 种因素的添加量:蔗糖 17.42 g/L,酵母膏 18.72 g/L, KH_2PO_4 0.69 g/L。经过验证在此发酵条件下多抗菌素效价达 2 300 $\mu\text{g/mL}$ 。然而,此研究仅限于摇瓶发酵,很多因素(如溶氧,通气量等)难

苏媛,刘雪静,尹宝重,等. 利用枯萎病菌毒素筛选草莓枯萎病抗性突变体[J]. 江苏农业科学,2015,43(10):158-161.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.048

利用枯萎病菌毒素筛选草莓枯萎病抗性突变体

苏媛^{1,2}, 刘雪静³, 尹宝重^{1,2}, 甄文超^{1,2}

(1. 河北农业大学植物保护学院,河北保定 071001;2. 河北省农作物病虫害生物防治工程中心,河北保定 071001;
3. 中国科学院唐山高新技术研究与转化中心,河北唐山 063000)

摘要:以丰香、童子一号、全明星、森格那、达赛莱克特 5 个品种草莓组培苗为试材,以草莓枯萎病菌毒素作为选择压力,筛选草莓抗枯萎病突变体,对突变体再生植株与野生型植株的生长、分化进行鉴定。结果表明,草莓枯萎病菌毒素对植株和茎尖生长点均有较强的毒害作用,经粗毒素处理的植株可产生与枯萎病相似的症状。在毒素含量为 10% 的条件下继代培养 3 次后,丰香品种的存活率上升最显著;于毒素含量为 15% 的培养基继代培养 3 次后,森格那、全明星品种的存活率上升最显著。在 15% 毒素浓度下,继代 3 次培养的草莓抗性不定芽存活率均不同程度低于 10% 毒素浓度,其中下降幅度最小的是全明星品种,仅为 7.6%。在含有毒素的培养基上培养,AS-1、TZ-1 抗性不定芽分化最为稳定,分别比同品种的野生型不定芽高 49.61%、50.38%;可见,在含有毒素的培养基上继代培养可提高不定芽对毒素的抗性。抗病性鉴定结果表明,突变体再生植株对枯萎病菌的抗性高于野生型再生植株。选用 OPP-18 特异性引物对 TZ-1 与童子一号品种进行 RAPD 分析,电泳结果显示,在 750~1 000 bp 之间存在特异性条带;选用 OPO-05 引物对其进行筛选,扩增出清晰可辨的 3 条非特异性条带,表明所获得的抗性植株与野生型植株在基因水平上发生了改变,可被认定为突变体。

关键词:枯萎病菌毒素;草莓;枯萎病;抗性不定芽;筛选;RAPD 分析

中图分类号:S436.68⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)10-0158-04

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)属于蔷薇科草莓属,在果树生产中占有重要地位。目前,中国草莓栽培面积、产量分别约为 13.5 万 hm²、200 万 t,均居世界首位。中国草莓产区广泛采用设施栽培,并由于耕地数量的限制,使连作面积不断上升。连作草莓生长发育不良、土传根部病害均日趋严重,被称为连作障碍^[1-2]。草莓枯萎病是一种由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. *fragariae*)侵染引起的真菌病害,对草

莓的生长和产量造成很大影响,而连作障碍会显著增加草莓枯萎病的发生。调查发现,未经土壤消毒处理地块的草莓第 2 年连作枯萎病发病率达 90%,减产超过 20%;第 3 年连作发病率达 100%,减产超过 40%^[3]。目前,对草莓连作障碍的防治大多采用种植前的土壤消毒,常用化学药剂有溴甲烷、氯化苦、棉隆、威百亩等。化学药剂效果明显,但均存在不同程度的毒性大、污染环境、操作技术严格等问题。

植物病原菌毒素是植物病原菌产生的对寄主植物具有毒性的代谢产物,是导致植物病害发生的主要原因之一^[4-5]。离体条件下筛选植物抗病突变体,是结合植物组织培养技术,应用病菌毒素或类似毒素的化学物质在细胞水平上选择抗病突变体,是高等植物抗病育种的一种尝试^[6]。刘海瑞等研究了香蕉抗枯萎病突变体,以香蕉枯萎病菌产生的致病毒素为选择压力,在短期内离体诱变和筛选抗香蕉枯萎病的突变体,

收稿日期:201-03-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31140064);河北农业大学青年科学基金(编号:QN201333)。

作者简介:苏媛(1988—),女,河北张家口人,硕士研究生,主要从事植物生态病理学研究。E-mail:15933521328@163.com。

通信作者:甄文超,教授,博士生导师,主要从事植物生态病理学研究。E-mail:wenchao@hebau.edu.cn。

以有效控制,下一步可以上罐分批发酵,进一步优化验证影响多抗菌素发酵的条件。

参考文献:

- [1] 胡永红,曹 峥,杨文革,等. 多效霉素研究进展[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):1-4.
- [2] 吴家全,李军民. 多抗霉素研究现状与市场前景[J]. 农药科学与管理,2010,31(11):21-23.
- [3] Sun L, Chen W Q, Deng Z X, et al. Microbiological assay for quantitative determination of polyoxin B[J]. Process Biochemistry, 2009, 44(3):361-364.
- [4] 李忠福,陈亚敏. 多氧霉素发酵条件的研究[J]. 中小企业管理

与科技,2009(10):223.

- [5] 于福利,宋喜峰,姜军侠,等. 多抗霉素 B 的高效液相色谱分析方法[J]. 农药,2008(3):188-189.
- [6] 夏湛恩,俞晓平,吕仲贤,等. 新多抗菌素及制备方法和所产生的农作物病害防治药物:中国,200410032099[P]. 2005-01-12.
- [7] 王宏平. 植物保护与持续农业[J]. 湖北植保,2000(2):37-38.
- [8] 吴军林. 防治植物病害的农用抗生素研究及应用[J]. 新农药,2003(4):27-31.
- [9] 李 超,吴雪晴,郑 艳. 乳糖酸产生菌的发酵培养基优化[J]. 食品工业科技,2014,35(3):187-191,356.
- [10] 杨其义,赵祥颖,刘建军. 响应面法优化木糖醇发酵培养基[J]. 齐鲁工业大学学报,2013,27(2):34-38.