

# YAG 激光对番茄早疫病拮抗菌 WB7 的诱变效应

张军<sup>1</sup>, 陈立<sup>1</sup>, 胡青平<sup>1,2</sup>, 陈五岭<sup>1\*</sup>

(1. 西北大学生命科学学院, 陕西西安 710069; 2. 山西师范大学生命科学学院, 山西临汾 041004)

**摘要** [目的] 探明 YAG 激光对枯草芽孢杆菌 WB7 诱变作用。[方法] 采用 YAG 激光(波长 1 060 nm, 功率 7 W)照射 1 株对番茄早疫病菌有拮抗作用的枯草芽孢杆菌 WB7, 综合各辐照时间组里菌株致死率和正变率的大小以及拮抗能力提高程度, 分析不同辐照时间对 WB7 生长以及诱变的影响效果。采用连续传代培养, 测定正变株拮抗能力的遗传稳定性。[结果] 利用 YAG 激光辐照枯草芽孢杆菌对 WB7 有显著的诱变效应, 不同辐照时间的诱变率有显著性变化, 辐照 1.5 min 诱变作用最强, 且正变率最大; 筛选的最佳突变株 WB7-L1.5<sup>'5</sup> 高抗番茄早疫病菌, 经过 7 代传代试验证明其可稳定遗传。[结论] 该研究建立了 YAG 激光诱变枯草芽孢杆菌 WB7 的试验体系, 对番茄早疫病的生物防治具有广阔的应用前景。

**关键词** YAG 激光; 枯草芽孢杆菌; 番茄早疫病菌; 拮抗; 诱变

中图分类号 Q933 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)36-16028-03

**Mutagenic Effect of YAG Laser on Antagonistic Bacteria WB7 against *Alternaria solani***

ZHANG Jun et al (College of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069)

**Abstract** [Objective] The research aimed to study the mutagenesis effect of YAG laser on *Bacillus subtilis* WB7. [Method] Using YAG laser ( $\lambda = 1\ 060$  nm,  $P = 7$  W) to irradiate *B. subtilis* WB7 which had an antagonistic ability on *Alternaria solani*, the effects of the different irradiation time on growth and mutation were analyzed according to the comprehensive results of the lethality rate, the positive mutation rate, the improved level of antagonistic activity in each irradiating group. The heredity stability of antagonistic ability of the positive mutation strain was determined through succession cultivation. [Result] Using YAG laser to irradiate *B. subtilis* had distinct mutagenic effect on WB7 and the mutation rate under different irradiation time showed an obvious change. 1.5 min irradiation had strong mutagenic effect with maximum positive mutation rate. The best screened mutation strain WB7-L1.5<sup>'5</sup> had a high resistance on *A. solani* and its antagonistic ability was proved stable in heredity through the succession cultivation tests for 7 generations. [Conclusion] The research established a experimental system for using YAG laser to irradiate *B. subtilis* WB7, which had wide application foreground on biological control of *A. solani*.

**Key word** YAG laser; *Bacillus subtilis*; *Alternaria solani*; Antagonism; Mutagenesis

番茄早疫病(Tomato Early Bight)在各地普遍发生, 该病除直接危害茎、叶、果外, 还可抑制番茄生长和果实形成, 造成巨大的经济损失。当前国际上仍以化学防治作为控制番茄早疫病的主要途径, 但长期使用化学药剂易造成药害和污染, 安全、绿色的生物防治方法已成为该研究领域的热点<sup>[1-2]</sup>。激光作为一种新型诱变方式, 能够直接损伤或切割 DNA, 引起染色体结构或数量上的变化, 然后通过细胞分裂将这些变化遗传给后代; 也可使其能量在染色体及 DNA 分子周围聚集, 引起分子的剧烈运动或变化, 从而使 DNA 分子发生突变, 这就为微生物的诱变育种提供了有利的条件<sup>[3-6]</sup>。该试验出发菌株 WB7 是经原位筛选所得到的对番茄早疫病菌具有较强拮抗作用的一株枯草芽孢杆菌。笔者主要研究了 Nd:YAG 激光(以下简称 YAG 激光)对 WB7 的诱变效应, 并选育针对番茄早疫病菌拮抗能力显著提高的新拮抗菌株, 旨在为番茄早疫病的防治提供科学基础。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种。**枯草芽孢杆菌 WB7(*Bacillus subtilis* WB7)从渭北番茄园土壤中分离得到。

番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)为该试验的目标植物病原真菌, 为西北大学生命科学学院 302 实验室保藏菌种。

**1.1.2 激光器。**YAG 激光器(华中科技大学, ZSM1 型, 波长 1 060 nm, 输出功率 0~70 W)。

**1.1.3 培养基。**

(1) 摇瓶种子培养基牛肉膏 5.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、葡萄糖 5.0 g/L、NaCl 5.0 g/L、MnCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g/L、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.15 g/L, pH 值 7.0。

(2) 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基。牛肉膏 3.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、NaCl 5.0 g/L、琼脂 20.0 g/L, pH 值 7.0。

(3) 马铃薯培养基(PDA)。马铃薯 200.0 g/L、蔗糖 20.0 g/L、琼脂 20.0 g/L, pH 值自然。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌悬液制备。**无菌条件下, 将 WB7 培养液以 1% 接种量转接到新鲜的摇瓶种子培养液中, 30℃ 振荡培养 12 h, 取 10 ml 离心(4 000 r/min) 15 min, 弃去上清液; 将菌体沉淀用无菌生理盐水洗涤, 制成浓度为 10<sup>8</sup> CFU/ml 菌悬液; 磁力搅拌 15 min, 制成匀菌悬液。

**1.2.2 YAG 激光诱变 WB7 菌体。**各取 0.3 ml 搅匀的菌悬液于 5 个无菌小试管(直径 1.0 cm, 壁厚 0.1 cm)中进行 YAG 激光辐照, 将该 5 管样品分别辐照 0、0.5、1.0、1.5、2.0 min, 取其中不经辐照的菌悬液作为对照样。辐照时, 保持激光发射源点与样品受照面的间距为 10 cm, 功率密度约为 36 mW/cm<sup>2</sup>, 黑暗条件下进行辐照。辐照后, 对各时间组样品依次作梯度稀释(10<sup>-1</sup>~10<sup>-8</sup>), 于 10<sup>-6</sup>~10<sup>-8</sup> 稀释度下, 各取吹吸均匀的 0.1 ml 菌液涂布于无菌固体牛肉膏蛋白胨培养基上, 每个稀释度各作 3 个平行样, 于 30℃ 下培养 24 h, 最后进行平板计数, 计算致死率:

$$\text{致死率} = \frac{\text{对照生长菌落数} - \text{各辐照时间生长菌落数}}{\text{对照生长菌落数}} \times 100\%$$

**1.2.3 初筛。**将已活化的番茄早疫病菌接于无菌固体 PDA 培养基中央, 30℃ 下培养 50 h, 使菌落直径达到约 15 mm, 随后从上述不同辐照时间组样品培养基上随机挑取 50 个单菌

基金项目 山西省自然科学基金(20031096)资助。

作者简介 张军(1983-), 男, 山东牟平人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物菌种筛选与发酵。\* 通讯作者, E-mail: wuling\_chen@sohu.com。

收稿日期 2008-10-23

落,按相同间隔接种于中央着生有番茄早疫病病菌菌落的PDA培养基上,保证每个平板上均接有对照菌株,并各自作好标记,继续培养30 h后观察抑菌圈大小。以未照射的原始菌株抑菌圈直径大小 1 为对照,突变株抑菌圈直径大小为 2。若  $2 > 1$ ,则初步视其为正突变,反之为负突变。

正变率=不同时间辐照组  $2 > 1$  的菌落数/相对应辐照组挑取菌落总数  $\times 100\%$

**1.2.4 辐照时间对 WB7 生长及拮抗能力的影响分析。**综合各辐照时间组里菌株致死率和正变率的大小以及拮抗能力提高程度,分析不同辐照时间对 WB7 生长以及诱变的影响效果。

**1.2.5 诱变结果验证。**对初步认为发生正变的共15株菌株进行抑菌圈大小测定后,为了验证所测结果的显著度,以50株对照菌株中的最大抑菌圈直径为参照,运用t值检验方法,对拮抗结果进行分析。

**1.2.6 正变菌株拮抗稳定性试验。**采用连续传代培养,测定正变株拮抗能力的遗传稳定性。把拮抗效果有最显著提高的菌株进行传代培养,培养7代,并对每次传代的拮抗结果进行记录,将所有数据用SPSS软件进行分析。

表1 辐照时间对致死作用的影响

Table 1 The effects of irradiation time on the lethal action

辐照时间 min	长出总菌落数 个	致死率 %
Irradiation time	Total colony number	Lethal rate
0	662	0
0.5	538	18.7
1.0	308	53.5
1.5	158	76.1
2.0	93	85.9

表2 正变菌株抑菌圈直径与出发菌株的t值检验结果

Table 2 t test results of the antibacterial circle diameter of positive mutation strains and original strains

菌株	平均值 mm	偏离值 mm	t 检验结果
Strain	Mean	Deviation value	t test results
L1.0 <sub>1</sub>	14.233 3	0.251 66	3.653 *
L1.0 <sub>2</sub>	14.266 7	0.208 17	2.186 *
L1.0 <sub>3</sub>	14.333 3	0.208 17	2.404 *
L1.0 <sub>4</sub>	14.300 0	0.435 89	2.253 *
L1.5 <sub>1</sub>	15.166 7	0.351 19	5.085 **
L1.5 <sub>2</sub>	14.866 7	0.208 17	7.032 **
L1.5 <sub>3</sub>	14.733 3	0.152 75	7.183 **
L1.5 <sub>4</sub>	14.900 0	0.173 21	4.269 **
L1.5 <sub>5</sub>	15.533 3	0.404 15	6.244 **
L1.5 <sub>6</sub>	14.733 3	0.776 75	3.476 **
L1.5 <sub>7</sub>	15.466 7	0.305 51	6.081 **
L2.0 <sub>1</sub>	14.300 0	0.264 58	3.896 *
L2.0 <sub>2</sub>	14.200 0	0.264 58	3.340 *
L2.0 <sub>3</sub>	14.333 3	0.288 68	2.392 *
L2.0 <sub>4</sub>	14.266 7	0.351 19	2.164 *

注:对照抑菌圈直径为13.60 mm; \* 表示在0.05水平存在差异; \*\* 表示在0.01水平存在差异。L1.0<sub>1</sub>表示1 min时间组内首株被筛出的正变株,其他依次类推。下同。

Note: The antibacterial circle diameter of control is 13.60 mm; \* means difference at 0.05 level and \*\* means difference at 0.01 level. L1.0<sub>1</sub> stands for the first positive mutation strain screened from one-minute group and the others can be analogized accordingly. The same as below.

## 2 结果与分析

### 2.1 激光辐射对 WB7 的致死作用 YAG 激光可诱发细菌

DNA分子损伤,从而引起细胞遗传物质改变及代谢活动变化。一方面这为诱变育种提供了有利的条件;另一方面,其也会造成部分菌体死亡。因而,致死率在生物理化诱变中是极为重要的指标,常被用作判断最佳诱变条件的依据之一。由表1可知,低剂量辐照对WB7的致死作用有限。随着辐照剂量的进一步加大,激光对菌体的致死作用逐渐显现,细菌的存活数量大幅减少,表明高剂量的激光辐照对WB7有较强的致死作用。

### 2.2 辐照对菌株拮抗性的影响

**2.2.1 初筛结果。**由图1可知,在2 min内随着辐照时间的延长,负变菌株的数量会不断增加,呈现先缓和后加剧的趋势。而正变菌株的数量则从0.5 min开始逐渐增加,到1.5 min时达到最大,随后数量开始减少,呈倒“V”型曲线。

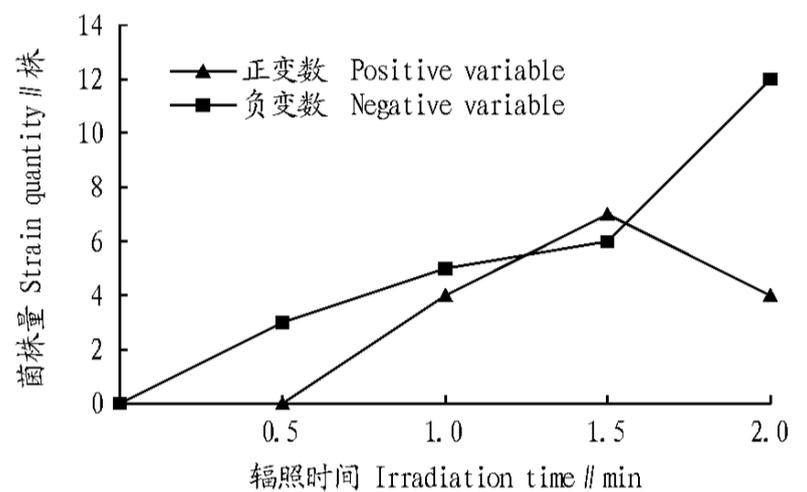


图1 拮抗试验初筛结果

Fig.1 The preliminary screening results of antagonistic test

**2.2.2 诱变试验验证结果。**由表2可知,初筛所得的15株变异株都可确认为发生了正向突变,而辐照1.5 min所得7株正变株的拮抗效果均达极显著水平。

**2.2.3 最佳辐照时间分析。**通过观察正变率、致死率与时间的关系和两者间相互关系(图2)以及正变菌株拮抗能力提高的效果(表3),来判断最佳的辐照时间。

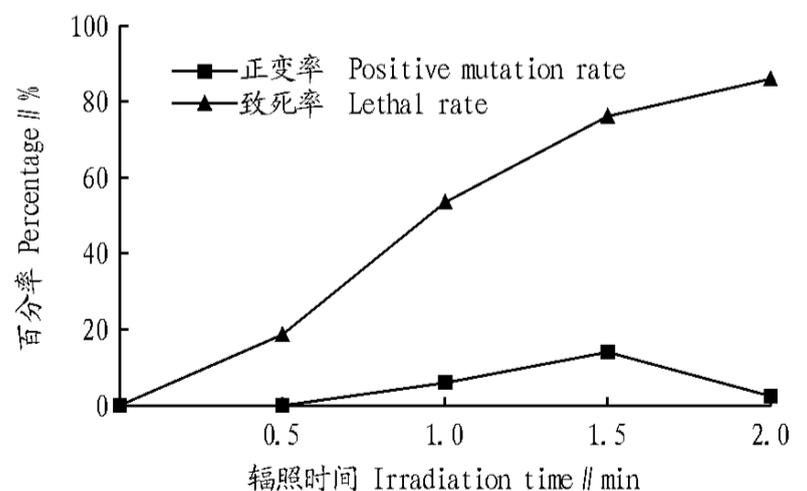


图2 不同辐照时间下的菌株正变率和致死率

Fig.2 The positive mutation rate and lethal rate of strains at different irradiation time

由图2可知,在2 min内致死率会随着辐照时间的延长而不断增大。而正变率则呈现先升后降的趋势,正变率与时间在0.5~1.5 min的过程内存在正相关关系,在1.5 min时正变率最大,达到了14.0%。由表3可知,辐照了1.5 min的正变菌株拮抗能力均明显强于辐照了1.0 min和2.0 min的菌株,拮抗能力最大。可见,激光辐照1.5 min对于提高WB7的拮抗能力有最佳的诱变效应。

表3 正变菌株拮抗能力提高效果

Table 3 The improved effect of antagonistic capability of positive mutation strains

正变菌株 Positive mutation strains	抑菌圈直径 mm Antibacterial circle diameter	抑菌圈直径提高率 % Improvement rate of antibacterial circle diameter	正变菌株 Positive mutation strains	抑菌圈直径 mm Antibacterial circle diameter	抑菌圈直径提高率 % Improvement rate of antibacterial circle diameter
L1.0 <sub>1</sub>	14.233 3	4.66	L1.5 <sub>5</sub>	15.533 3	14.22
L1.0 <sub>2</sub>	14.266 7	4.90	L1.5 <sub>6</sub>	14.733 3	8.33
L1.0 <sub>3</sub>	14.333 3	5.40	L1.5 <sub>7</sub>	15.466 7	13.72
L1.0 <sub>4</sub>	14.300 0	5.15	L2.0 <sub>1</sub>	14.300 0	5.15
L1.5 <sub>1</sub>	15.166 7	11.52	L2.0 <sub>2</sub>	14.200 0	4.41
L1.5 <sub>2</sub>	14.866 7	8.82	L2.0 <sub>3</sub>	14.333 3	5.40
L1.5 <sub>3</sub>	14.733 3	8.33	L2.0 <sub>4</sub>	14.266 7	4.90
L1.5 <sub>4</sub>	14.900 0	9.56			

**2.3 L1.5<sub>5</sub> 拮抗能力稳定性考察结果** 由表4可知,经传代7次后,从第1代正变株开始一直到所传第7代,其拮抗效果均无显著性差异,由此证明该正变菌株的拮抗能力可以进行稳定的遗传。

表4 L1.5<sub>5</sub> 遗传稳定性检验结果Table 4 The results of L1.5<sub>5</sub> genetic stability test

培养代数 Generation	抑菌圈直径 平均值 mm Mean of positive mutation strains	抑菌圈直径偏 离值 mm Deviation value of positive mutation strains	t 检验结果 t test results
1	15.366 7	0.315 01	0.212
2	15.240 0	0.260 58	- 0.470
3	15.236 7	0.257 75	- 0.493
4	15.363 3	0.165 03	0.299
5	15.396 7	0.205 02	0.485
6	15.270 0	0.315 12	- 0.261
7	15.366 7	0.100 17	0.393

注:对照株抑菌圈直径为15.33 mm。

Nte: The antibacterial circle diameter of control strains was 15.33 mm.

### 3 结论

YAG 激光诱变是一种新型高效的诱变育种手段,其具有靶点小、能量密度高、方向性好、见效快等特点,但在微生物育种领域仍鲜有应用<sup>[7-8]</sup>。笔者在这方面作了一些积极的探索。从试验结果来看,YAG 激光对枯草芽孢杆菌 WB7 针对番茄早疫病菌的拮抗能力有明显的诱变作用。辐照1.0 min 时,正变菌株出现;当激光作用1.5 min 时,正变率最大,且此时所得的全部正变菌株的拮抗能力与对照相比均有极显著的提高;随后,正变菌株的数量开始减少,拮抗能力也出

现下降。试验证明最佳正变株 L1.5<sub>5</sub> 的优良性状可以得到稳定遗传,这表明其在番茄早疫病的生物防治领域具有广阔的应用前景。

### 参考文献

- [1] EDEN MA. Biological control of *Berytis cinerea* stem infection of greenhouse tomatoes[J]. *Plant Pathology*, 1996, 45: 276-284.
- [2] CLARA PLIEGO, FRANCISCO MANUEL CAZORLA, MARA NGELES GONZ LEZ S NCHEZ, et al. Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizer [J]. *Research in Microbiology*, 2007, 158(5): 463-470.
- [3] 陈云琳, 刘晓娟, 闻建平. 激光诱变微生物技术的研究进展[J]. *生物物理学报*, 2003, 19(4): 353-358.
- [4] 向洋. 激光诱变及生物学作用机制研究[J]. *光电子激光*, 1994, 5(4): 87-90.
- [5] DOBSON J, WILSON M. Sensitization of oral bacteria in biofilms to killing by light from a low power laser [J]. *Archives of Oral Biology*, 1992, 37(11): 883-887.
- [6] TIINA KURA, OLGA TIPHOVA, RINAT ESENAIEV, et al. Two different mechanisms of low intensity laser photobiological effects on *Escherichia coli* [J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1994, 24(3): 155-161.
- [7] 王明兹, 陈必链, 庄惠如, 等. 倍频 Nd:YAG 激光对紫球藻生长与胞外多糖产量的影响[J]. *激光生物学*, 2002, 11(1): 6-9.
- [8] 周蓬蓬, 余龙江, 李为, 等. YAG 激光照射对高山被孢霉花生四烯酸产量的影响[J]. *激光生物学*, 2002, 11(5): 372-376.
- [9] 章文贤, 蒋咏梅, 施巧琴, 等. YAG 激光诱变选育产低温脂肪酶罗伦隐球酵母及产酶条件优化[J]. *福建轻纺*, 2007(11): 1-6.
- [10] REN WB, ZHAO L, WANG M, et al. Preliminary study on the mutagenic effects of space flight on alfalfa seeds [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(4): 51-55.
- [11] 黄鹭强, 刘峰, 谢必峰, 等. 紫外线复合 Nd:YAG 激光对 *Bacillus sp.* 产脂肪酶的诱变[J]. *福建教育学院学报*, 2007, 8(7): 126-128.
- [12] REN WB, ZHAO L, WANG M, et al. Effect of space flight factors on plant biomass developed from alfalfa seeds carried by the satellite [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(5): 78-80, 98.
- [13] COMPTON J E, BOONER D, MOIZKING, et al. Soil carbon and nitrogen in a pine oak sand plain in central Massachusetts: Role of vegetation and land use history [J]. *Oecologia*, 1998, 116: 536-542.
- [14] 郭旭东, 傅伯杰, 陈利顶, 等. 低山丘陵区土地利用方式对土壤质量的影响——以河北省遵化市为例[J]. *地理学报*, 2001, 56(4): 417-455.
- [15] FOLLETT R F. Soil management concepts and carbon sequestration in cropland soils [J]. *Soil Tillage Res*, 2001, 61: 77-92.
- [16] 张伟, 陈洪松, 王克林, 等. 喀斯特峰丛洼地土壤养分空间分异特征及影响因子分析[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(9): 1828-1835.
- [17] 卢红梅, 王世杰. 花江小流域石漠化过程中的土壤有机碳氮的变化[J]. *地球与环境*, 2006, 34(4): 41-46.
- [18] QINY R, HUX H, ZENG Z L, et al. Comparative study on phosphorus contents of soil in karst rocky desertification area during ecological restoration process in Guangxi Province [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2008, 9(3): 141-144.
- [19] 龙健, 邓启琼, 江新荣, 等. 贵州喀斯特石漠化地区土地利用方式对土壤质量恢复能力的影响[J]. *生态学报*, 2005, 25(12): 3188-3195.

(上接第16027页)

- [6] 李阳兵, 谢德体, 魏朝富. 岩溶生态系统土壤及表生植被某些特性变异与石漠化的相关性[J]. *土壤学报*, 2004, 41(2): 196-202.
- [7] 刘玉, 李林立, 赵柯, 等. 岩溶山地石漠化地区不同土地利用方式下的土壤物理性状分析[J]. *水土保持学报*, 2004, 18(5): 142-145.
- [8] 蒋勇军, 袁道先, 章程, 等. 典型岩溶农业区土地利用变化对土壤性质的影响——以云南小江流域为例[J]. *地理学报*, 2005, 60(5): 751-760.
- [9] 黄昌勇. *土壤学* M. 北京: 中国农业出版社, 2000: 164-165.
- [10] 李海鹰, 姜小三, 廖启林, 等. 土壤阳离子交换量分布规律的研究——以江苏省溧水县为例[J]. *土壤*, 2007, 39(3): 443-447.
- [11] 张琪, 方海兰, 黄懿珍, 等. 土壤阳离子交换量在上海城市土壤质量评价中的应用[J]. *土壤*, 2005, 37(6): 679-682.
- [12] 刘世全, 蒲玉琳, 张世熔, 等. 西藏土壤阳离子交换量的空间变化和影响因素研究[J]. *水土保持学报*, 2004, 18(5): 1-5.
- [13] COMPTON J E, BOONER D, MOIZKING, et al. Soil carbon and nitrogen in a pine oak sand plain in central Massachusetts: Role of vegetation and land use