

低能氮离子束诱变选育捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌

王 军¹, 王 瑞^{2*}, 杨晓野², 杨莲茹²

(1. 内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021; 2. 内蒙古农业大学兽医学院, 呼和浩特 010018)

摘 要: 为获取理想的生物防治捕食线虫性真菌菌株, 达到利用自然天敌有效控制家畜寄生性线虫病的目的, 作者利用低能氮离子注入诱变捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)的分生孢子, 测定分生孢子萌发后菌丝的生长速度、产孢能力及菌株对线虫幼虫的捕食率, 筛选正突变株。结果表明, 低能氮离子束具有诱变少孢节丛孢菌的潜能, 诱变后的 1 株少孢节丛孢菌的生长速度、产孢量和对线虫幼虫的捕食率呈现出了正突变效果。

关键词: 离子束; 诱变; 捕食线虫性真菌; 少孢节丛孢菌; 产孢量

中图分类号: S852.66; S852.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)07-1129-05

Study on Mutation Breeding of *Arthrobotrys oligospora* by Low Energy N⁺ Implantation

WANG Jun¹, WANG Rui^{2*}, YANG Xiao-ye², YANG Lian-ru²

(1. College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China; 2. College of Veterinary Medicine, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China)

Abstract: The objective of this study was to get effective strain of nematode-trapping fungus-*Arthrobotrys oligospora*, by which parasitic nematodes of livestock could be controlled and chemical drugs may be replaced partly or completely. First of all, the mutagenic effect of the low-energy nitrogen ion beam on the original strain - *A. oligospora* were studied, then the survival rate of strains injected by different doses of nitrogen ion were determined to select the best injection parameter: energy, dose. Later, the strains were screened out according to mycelial growth rate, sporulation, the trapping rate and resistance to the digestion of the sheep. The results showed that ion beam implantation could be an efficient way to improve the characters of nematode-trapping fungus, such as growth rate, sporulation quantity and nematode-trapping rate, and it was the first time to use ion beam in mutation breeding of nematode-trapping fungi.

Key words: ion beam; mutagenesis; nematode-trapping fungi; *Arthrobotrys oligospora*; sporulation

捕食线虫性真菌广泛存在于自然界生态系统中^[1], 目前研究最多和最系统的代表种为少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)。各种研究表明给家畜投服少孢节丛孢菌的分生孢子后, 能够有效地防治家畜的多种寄生性线虫病^[2-4]。为更有效地利

用捕食线虫性真菌对家畜寄生性线虫进行生物防治, 国内外学者对少孢节丛孢菌进行了详细的研究。内蒙古农业大学的杨晓野教授在动物寄生性线虫的生物防治方面做了大量的工作。不仅创立了少孢节丛孢菌的分离培养方法^[1], 由家畜粪便、土壤中分离

收稿日期: 2011-12-02

基金项目: 内蒙古自然科学基金项目(2009MS0411); 高校博士点专项科研基金项目(20101515120006)

作者简介: 王 军(1955-), 男, 内蒙古人, 副教授, 硕士, 主要从事草食家畜寄生性线虫生物控制研究, Tel: 0471-4992649, E-mail: nmngxwj@163.com

* 通讯作者: 王 瑞, Tel: 0471-4303726, E-mail: wr2006@163.com

获得少孢节丛孢菌菌株,还进行了少孢节丛孢菌菌网捕食线虫机制的相关研究^[5-9],为将捕食性真菌用于生物防治的实践奠定了基础^[2,6-7]。但不足的是现有捕食线虫性真菌繁殖形成孢子的速度相对较慢,5~7 d 后孢子才开始产生,大量产生则需要 3 周左右的时间;而厚垣孢子产生的时间更长,且量也很少,这在一定程度上阻碍了其商品化生产及在临床实践中的应用。而低能氮离子束注入诱变选育技术在农业和医学中应用广泛,具有突变频率高,诱变效果好的优点^[8-10]。因此,作者利用低能氮离子束注入技术,对少孢节丛孢菌进行诱变选育,获得生长繁殖快、始发产孢时间早、产孢数量多的少孢节丛孢菌菌株。以得到捕食性能更强的捕食线虫性真菌,推动捕食性真菌对家畜寄生性线虫的生物防治应用,更好的保证畜牧业可持续健康地发展。

1 材料与方法

1.1 主要仪器设备、试验菌株和线虫幼虫

离子束注入机(IBBE—device),由合肥中科院等离子体物理研究所生产。

少孢节丛孢菌菌株(*Arthrotrrys oligospora*),由内蒙古农业大学兽医学院兽医寄生虫学研究室提供。

马圆线虫幼虫,取马新鲜粪便置于搪瓷盘(20 cm×40 cm)中,在 25℃条件下分别培养 15 d,后采用改良贝尔曼氏法分离并收集第 3 期幼虫,进行纯化,在光学显微镜下检查,幼虫悬液中 95%以上幼虫活力良好。计数后将马圆线虫第 3 期幼虫悬液稀释至 300 条·mL⁻¹的浓度,备用。

试验绵羊,由内蒙古农业大学实验动物园提供。

1.2 主要培养基

按照标准方法制备 0.4 g·L⁻¹玉米粉琼脂培养基、分生孢子玉米粒培养基^[5-6,11]。

1.3 低能氮离子束诱变选育

1.3.1 菌株的准备 将少孢节丛孢菌菌株接种于 0.4 g·L⁻¹玉米粉琼脂培养基,置(25±1)℃温箱中培养。培养 3 周后,加入孢子洗脱液,用灭菌玻璃棒搅动,少量多次洗脱分生孢子,收集孢子洗脱液,并置于含玻璃珠的三角瓶内摇匀后,用灭菌纱布过滤 2 次,再于振荡器上振荡混匀,制成 10⁶~10⁷个·mL⁻¹的悬液。吸取 0.1 mL 涂布于无菌空平皿表面,于超净台内自然风干,用于后续离子束注入。

1.3.2 离子注入条件 采用 N⁺,能量 10 keV,注入靶室内真空度 10⁻³ Pa,剂量为 $n \times 2.6 \times 10^{13}$ N⁺ ions·cm⁻²氮离子束照射少孢节丛孢菌分生孢子,共选择 11 个剂量($n=0,30,50,70,90,110,130,150,170,190,210$),脉冲剂量为 2.6×10^{13} ions·(cm²·s)⁻¹。设计 2 个对照:一个为干燥对照,即空白对照(干燥后不经抽真空处理,也不经粒子束照射),另一个为真空对照(干燥后经抽真空处理,但不经粒子束照射)。所有照射剂量在靶室内放置的时间与最高照射剂量在靶室内放置的时间相同。

1.3.3 存活率测定 在选定的 11 个剂量下,进行离子注入诱变,以真空处理组作为对照组。向注入后的平皿(内有菌膜)加入 1 mL 无菌水,用涂菌棒将菌膜洗下,吸取适量菌悬液,用 10 倍稀释法稀释后涂布于 0.4 g·L⁻¹玉米粉琼脂培养基上,置(25±1)℃温箱中培养,统计存活率。

依据存活率曲线,选择 $130 \times 2.6 \times 10^{13}$ N⁺ ions·cm⁻²; $90 \times 2.6 \times 10^{13}$ N⁺ ions·cm⁻²; $170 \times 2.6 \times 10^{13}$ N⁺ ions·cm⁻²,进一步实施注入诱变。

1.3.4 诱变菌株筛选 按照选定条件进行离子束注入试验。分离离子束注入发芽的单个孢子,分别接种于 0.4 g·L⁻¹玉米粉琼脂培养基上,置于(25±1)℃温箱中培养。每天定时测定菌落大小,判定菌丝生长速度,待分生孢子产生后,观察统计菌丝产孢情况,将生长速度快,产孢子量大的少孢节丛孢菌作为正突变株。传代培养 5 代进行稳定试验,并扩增培养。

1.3.5 诱变菌株对马圆线虫幼虫捕食率的测定

将相同浓度的少孢节丛孢菌正突变株的分生孢子分别接种于 0.4 g·L⁻¹玉米粉琼脂培养基上,置于(25±1)℃温箱中培养备用。待菌丝长到培养皿的 2/3 后,向培养皿内加入有活力的马圆线虫第三期幼虫 0.5 mL(500 条·mL⁻¹),每组 3 个培养皿,作为试验组,另以未经照射的真空对照组作为对照。在倒置显微镜下,每天定时观察少孢节丛孢菌捕食器(菌环和菌网)的数量以及对线虫幼虫的致死率。开始时每隔 2 h 观察 1 次,24 h 后每天观察 1 次^[12]。

捕食率(X)=(捕食致死虫体+捕食未致死虫体)/(捕食致死虫体+捕食未致死虫体+未捕食虫体)×100%。

2 结 果

2.1 氮离子束注入对菌株存活率的影响

在实验条件下,用低能量氮离子束($n \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+ \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$, $n=0, 30, 50, 70, 90, 110, 130, 150, 170, 190, 210$)注入少孢节丛孢菌分生孢子,观察氮离子注入对菌株存活率的影响。结果统计如图 1 所示,经氮离子注入诱变的少孢节丛孢菌分生孢子,存活率具有随注入剂量的增大先减小,到达一定剂量时又增大,然后再减小,再增大的趋势,其中在 $90 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+ \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量下,分生孢子的存活率为最大,在 $130 \times 2.6 \times 10^{13}$ 和 $170 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ N}^+ \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的剂量下,孢子存活率依次降低。

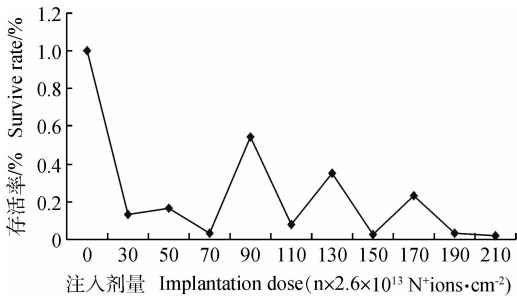


图 1 氮离子注入剂量与孢子存活率的关系曲线
Fig. 1 Surviving curve of strain after N^+ beam implanting

表 1 离子束照射对少孢节丛孢菌菌丝生长率的影响

Table 1 The effects of ion beam irradiation on mycelial growth rate of <i>Arthrobotrys oligospora</i>					$\text{mm} \cdot \text{d}^{-1}$
组别	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	平均
Group	The 1st day	The 2nd day	The 3rd day	The 4th day	\bar{x}
$90 \times 2.6 \times 10^{13}$ 组	1.12	7.15	21.45	19.75	12.37 ^A
$130 \times 2.6 \times 10^{13}$ 组	2.42	3.78	16.28	21.55	11.01 ^B
$170 \times 2.6 \times 10^{13}$ 组	1.97	4.25	11.53	18.07	8.96 ^C
真空对照组	1.24	6.62	17.88	11.03	9.19 ^B

具有相同字母者间差异不显著($P>0.05$),具有不同字母者间差异显著($P<0.05$)
The different capital letters mean significant difference($P<0.05$); The same letter means no difference ($P>0.05$)

2.4 离子束照射对少孢节丛孢菌捕食率的影响

由表 2 数据可以看出,随试验时间的增加,3 个照射组和真空对照组的捕食率逐渐变大;在观察末期,计数所得对马圆线虫第 3 期幼虫的捕食率在 82%~94%,其中以 $130 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 照射组的捕食率最高,为 94%,与对照组相比,两者差

2.2 离子束照射对少孢节丛孢菌菌丝生长率的影响

由表 1 可以看出,在试验的 4 d 当中,菌丝的生长率多随生长时间逐渐变大,但 3 天后,经 $90 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量照射组和真空对照组的生长速率减缓。其中生长最快的组别为经 $90 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量的离子束照射组,平均生长率为 $12.37 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$,明显快于真空对照组的 $9.19 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$;经 $130 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量照射组的生长率也快于对照组的 $9.19 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$,但两者差异不显著($P>0.05$)。在 3 个照射剂量中,只有 $170 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 剂量照射组的生长率较对照组低,仅为 $8.96 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$,且两者差异显著($0.01<P<0.05$)。

2.3 离子束照射对少孢节丛孢菌分生孢子产生的影响

经离子束照射对少孢节丛孢菌产生分生孢子的影响试验发现,照射剂量为 $90 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的试验组产孢数与真空对照试验组相似(见图 2、3),照射剂量为 $130 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的试验组产孢数与真空对照试验组比稍少,而照射剂量为 $170 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 的试验组产孢数量最少。

异显著($0.01<P<0.05$);其余 2 个照射组均较对照组低,分别为 82% 和 89%,而 $90 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 照射组的捕食率最低,仅为 82%,与对照组相比,两者差异显著($0.01<P<0.05$),剩余试验组与对照组相比,无明显差异($P>0.05$)。

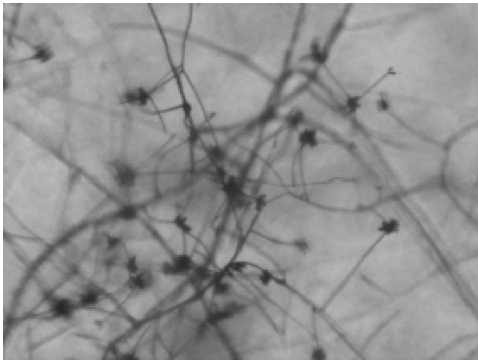


图 2 $90 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions \cdot cm⁻² 照射组菌丝产孢情况(200 \times)
Fig. 2 Sporulation of mycelium irradiated by ion beam of $90 \times 2.6 \times 10^{13}$ ions \cdot cm⁻² (200 \times)

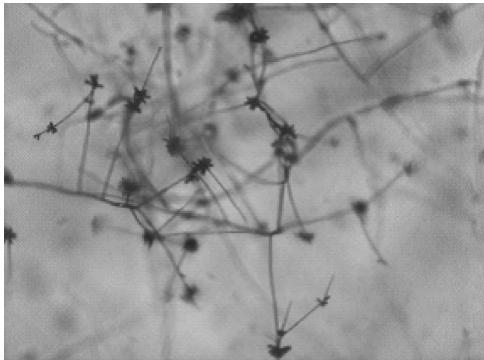


图 3 真空对照组菌丝产孢情况(200 \times)
Fig. 3 Sporulation of mycelium of vacuum control (200 \times)

表 2 离子束照射对少孢节丛孢菌菌丝捕食率的影响

Table 2 The effects of ion beam irradiation on trapping rate of <i>Arthrobotrys oligospora</i>						%
组别 Group	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	
$90 \times 2.6 \times 10^{13}$ 组	63	73	74	75	82 ^A	
$130 \times 2.6 \times 10^{13}$ 组	69	81	87	92	94 ^B	
$170 \times 2.6 \times 10^{13}$ 组	46	55	85	86	89 ^C	
真空对照组	67	76	80	85	90 ^C	

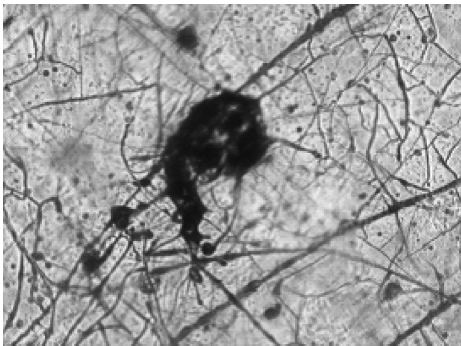


图 4 被少孢节丛孢菌捕食的马圆线虫(100 \times)
Fig. 4 Larvae of *Strongylus* trapped by *Arthrobotrys oligospora* (100 \times)

3 讨 论

在控制家畜寄生性线虫病方面,利用线虫的天敌——捕食线虫性真菌进行生物防治是非常富有潜力的。但现有天然菌株生长捕食性能方面的不足,限制了捕食性真菌进一步的开发和应用。因此,本试验拟利用离子注入诱变这一新的育种方法,选育捕食线虫性真菌,以期获得生长速度快、产孢量大、

捕食率高的菌株,为寄生虫生物防治提供理想的菌株材料。

在使用试验中所选定的 11 个照射剂量进行的存活率试验中,菌株的存活率随照射剂量的增加在一定范围内先下降,后上升,然后又下降,呈波浪状变化,总体看是随剂量的增加而呈下降趋势。可能是由于低剂量时,离子只对细胞表面进行损伤和作用,其存活量较大,因此其突变率不高;较大剂量下的离子注入是能量恒定离子持续不断地连续作用,尽管先注入的离子可能触及不到细胞的遗传物质 DNA,但它能为后续注入的离子打通通道,使后续注入的离子能穿透细胞壁、细胞膜和细胞质,作用到细胞内部的遗传物质 DNA,从而致使存活量急剧下降^[13-17]。菌株死亡率越大,说明菌株受到的损伤越大,DAN 链断裂的程度就越大。但当剂量累积到一定值时,细胞某种修复机制被激活,使得存活量有所回升;在菌株修复期间,突变的机率就越大,因此筛选到突变菌株的机会也就越大。当剂量继续增加时,细胞损伤将无法修复,因此总的趋势是存活率下降^[18-21]。

少孢节丛孢菌分生孢子经离子束照射后,由经

照射后的分生孢子萌发产生的菌丝生长率明显不同。低剂量的照射可促进分生孢子的萌发,与其他试验组和对照组相比,萌发所需时间较短,而且孢子萌发后的菌丝生长率明显快于对照组;但随着照射剂量的增加,菌丝的平均生长率降低;而高剂量的照射对菌丝的生长有一定的抑制作用。

从离子束照射后少孢节丛孢菌菌丝产孢情况来看,随着照射剂量的升高,产孢量逐渐降低。由捕食率数据可见照射剂量对捕食率也有一定的影响,其中以 $130 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 照射组的捕食率最高,为 94%;其他 2 个试验组和对照组则较低,以 $90 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 照射组的捕食率最低,为 82%。综合以上几项指标,以 $130 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 照射组为最佳,生长率与对照组无明显差别,而捕食率明显高于对照组,其余 2 个剂量组或者生长速度快,但捕食率明显下降,或者捕食率增加,生长速度下降。

离子注入法作为新的生物突变技术具有极大的发展空间,今后还需进一步对离子束诱变捕食线虫性真菌进行深入研究。

4 结 论

离子束照射对少孢节丛孢菌分生孢子的萌发、菌丝生长速度、产孢能力和捕食率均有一定的影响,且这种影响是非定向的。对少孢节丛孢菌的诱变效果以 $130 \times 2.6 \times 10^{13} \text{ ions} \cdot \text{cm}^{-2}$ 照射组最佳,生长率与对照组无明显差别,而捕食率明显高于对照组。

参考文献:

- [1] 杨晓野,杨莲茹,刘珍莲,等. 捕食线虫性真菌的分离培养及分布规律[J]. 中国兽医学报,2003,23(4):344-347.
- [2] 杨晓野,杨莲茹,刘珍莲,等. 捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌体外杀寄生性线虫幼虫的研究[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(3):334-337.
- [3] 王 军. 防治家畜寄生性线虫病的新措施[J]. 当代畜禽养殖业,2010,(1):21-22.
- [4] 杨晓野,吴彩艳,杨莲茹,等. 口服少孢节丛孢菌孢子对家畜粪便中线虫幼虫的杀灭研究[J]. 畜牧兽医学报,2005,36(9):927-930.
- [5] 王 瑞. 捕食线虫性真菌的杀虫作用及生化分子机制的初步研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.
- [6] 杨晓野,杨莲茹,刘珍莲,等. 捕食线虫性真菌——少孢节丛孢菌体外杀寄生性线虫幼虫的研究[J]. 畜牧兽医学报,2004,35(3):334-338.
- [7] 杨晓野,杨莲茹,刘珍莲,等. 捕食线虫性真菌杀动物寄生性线虫研究[C]//中国畜牧兽医学会 2003 年学会年会论文集. 北京:中国畜牧兽医学会,2003.
- [8] 张斯日古楞. 低能氮离子束诱变筛选盐霉素产生菌的技术研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2009.
- [9] 柳伟力. 低能离子束诱变选育黄霉素产生菌的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2009.
- [10] 刘丽华. 低能 N^+ 诱变选育金霉素链霉菌及其发酵特性的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2008.
- [11] 邓长胜,王 瑞,杨晓野,等. 氨基酸对少孢节丛孢菌(*Arthrobotrys oligospora*)捕食器产生的影响[J]. 畜牧兽医学报,2009,40(4):561-565.
- [12] 王 军,王 瑞,杨晓野,等. 少孢节丛孢菌捕食器表面聚合物在捕食线虫过程中的作用研究[J]. 畜牧兽医学报,2010,41(7):859-865.
- [13] YU Z L, DENG J G, HE J J. Mutation breeding by ion implantation[J]. *Nucl Inst Meth Phys Res*, 1991, 59:705-708.
- [14] YU Z L. Ions beam application ingenetic modification [J]. *Ieee T Plasma Sci*, 2000,28:128-132.
- [15] WU Y J, ZHANG Y, WU J D, et al. Study on the variation of the distant crossing rice by ion beam implantation [J]. *Plasma Sci Technol*, 2005,7(2):85-88.
- [16] 英国农业、渔业和粮食部. 兽医寄生虫学实验室技术手册[M]. 刘钟灵,译. 武汉:华中农学院,1982:9-13.
- [17] FROHLICH H. What are non-thermal electric biological effects [J]. *Bioelectromagnetics*, 1982, 13:45-46.
- [18] SONG D J, YU X Y, YU Z L. Study on the direct and indirect action of N^+ ion implantation on *D. radiodurans* and *E. coli* [J]. *High Tech Lett*, 1999,1:47-50.
- [19] 宋道军,余 汛,姚建铭,等. 低能离子束对微生物细胞的刻蚀与损伤研究[J]. 生物化学与生物物理学报(英文版),1998,30(6):570-574.
- [20] 余增亮,邵春林,杨剑波. 离子刻蚀生物样品的初步研究[J]. 安徽农业大学学报,1994,21(3):260-264.
- [21] XIANG D, LI J, YAO J M. The breeding of *Streptomyces spectabilis* 1043 by ion beam implantation [J]. *Acta Laser Biol Sin*, 2002,11(4):276-279.

(编辑 白永平)