

紫外诱变对绿僵菌素生产的影响

胡琼波, 任顺祥, 刘树艳

(教育部生物防治工程研究中心, 华南农业大学 资源环境学院, 广东广州 510642)

摘要: 利用金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* MaQ10 菌株作为出发菌株, 应用紫外线 (UV) 诱变其分生孢子和原生质体, 分别测定了 40 个突变株的绿僵菌素产量。结果表明, 出发菌株 MaQ10 的绿僵菌素 A 和 B (DA 和 DB) 产量分别为 (106.81 ± 9.55) 和 (29.53 ± 2.70) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 分生孢子突变株的 DA 和 DB 平均产量分别为 (45.05 ± 7.77) 和 (10.83 ± 1.05) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 原生质体突变株的 DA 和 DB 平均产量分别为 (68.97 ± 6.07) 和 (11.80 ± 1.35) $\mu\text{g}/\text{mL}$; 绿僵菌素产量最高的分生孢子突变株是 08 菌株, 其 DA 达到 (158.29 ± 3.85) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 比出发菌株增产 48.21%; 产量最高的原生质体突变株是 24 菌株, 其 DA 和 DB 产量分别达到 (146.95 ± 12.28) 和 (36.91 ± 5.37) $\mu\text{g}/\text{mL}$, 比出发菌株分别增产 37.59% 和 25.11%。分生孢子诱变的 DA 和 DB 正突变率分别为 15.00% 和 0, 负突变率分别达到 85.00% 和 97.50%; 原生质体诱变的 DA 和 DB 正突变率分别为 17.50% 和 5.00%, 负突变率分别为 70.50% 和 95.50%。原生质体诱变效果优于分生孢子诱变效果。另外, 紫外线诱变不会改变 DA 与 DB 产量的正相关性。

关键词: 紫外诱变; 绿僵菌; 绿僵菌素; 生产

中图分类号: S182; Q935

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)02-0034-04

Effects of UV Mutation on Destruxins Yields of *Metarhizium anisopliae*

HU Qiong-bo, REN Shun-xiang, LIU Shu-yan

(Engineering Research Center of Biocontrol, Ministry of Education, College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: By using the *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* strain MaQ10 as an original strain and the technics of ultraviolet ray (UV) inducing the conidia spores and protoplasts, forty mutants of spores or protoplasts were selected and subjected to investigating for the changes of the destruxins production. The original strain MaQ10 yielded 106.81 and 29.53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for destruxins A and B (DA and DB), forty spores mutants yielded DA and DB for (45.05 ± 7.77) and (10.83 ± 1.05) $\mu\text{g}/\text{mL}$, while the mutants of protoplasts got an average production of DA and DB for (68.17 ± 6.07) 和 (11.80 ± 1.35) $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. The best producer of destruxins from spores mutants was the strain 08 which produced DA (158.29 ± 3.85) $\mu\text{g}/\text{mL}$, and increased by 48.21% compared to MaQ10 strain. The best producer of destruxins from protoplast mutants was 24 strain, its yields of DA and DB were (146.95 ± 12.28) and (36.91 ± 5.37) $\mu\text{g}/\text{mL}$, which increased by 37.59% and 25.11%, respectively. Furthermore, conidia spores had the 15.00% and 0 positive mutation rate for DA and DB, the 85.00% and 97.50% of negative mutation rate for DA and DB; meanwhile protoplasts got a higher positive rate 17.50% and 5.00% for DA and DB, which had a lower negative rate 70.50% and 95.50%, respectively. It was suggested that inducing protoplasts was more effective than inducing conidia spores, and the treatment with UV could not change the positive correlation of production between DA and DB.

Key words: UV induce; *Metarhizium*; destruxins; production

绿僵菌素 (destruxin) 是一类环缩肽类真菌毒素, 主要由金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* 及座壳孢 *Aschersonia* sp. 等虫生真菌产生^[1-2]。绿僵菌素是绿僵菌对寄主昆虫的重要致病因子^[3], 对鳞翅目、半

翅目、鞘翅目、双翅目、同翅目、等翅目等 20 多种昆虫有较强的毒杀和拒食活性^[1,4],并且能够提高苏云金杆菌(Bt)^[5]和拟青霉菌 *Paecilomyces javanicus*^[6]的杀虫能力,这是因为绿僵菌素具有抑制昆虫血细胞免疫的功能^[7-9]。此外,绿僵菌素的抗病毒、抗癌活性和其他药用价值也有研究报道^[10-11]。在筛选了 80 株国内不同来源的绿僵菌菌株,获得了绿僵菌素高产菌株——金龟子绿僵菌金龟子变种 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* 菌株 MaQ10 的基础上^[12],本研究以该菌株为出发菌株,应用紫外线诱变技术处理分生孢子和原生质体,以期选育出绿僵菌素增产幅度较大的突变株,为进一步开发利用绿僵菌素提供材料。

1 材料与方法

1.1 分生孢子的紫外诱变

1.1.1 孢子悬浮液制备 供试菌株 MaQ10 为笔者分离的金龟子绿僵菌 *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* 菌株^[12]。从斜面菌种上挑取分生孢子,接入已经灭菌的 $\varphi = 0.05\%$ 的吐温-80 溶液中,充分搅匀使孢子分散,用血球计数板测量孢子浓度,并调整到 10^6 mL^{-1} , 26°C 下培养 18 h(孢子即将萌发),备用。

1.1.2 紫外线处理 在超净工作台(SW-CJ-2F型,苏州净化设备有限公司)的紫外灯下进行,灯管功率 28 W,先开机预热 0.5 h 以上。将孢子悬浮液分装于直径 75 mm 的培养皿中,每皿 5 mL 左右,打开皿盖,照射距离 30 cm,照射时间 10 min。然后暗操作以避免光修复作用,将紫外光照射后的孢子悬浮液稀释 1 000 倍,再取 0.1 mL 稀释液均匀涂布于直径 90 mm 的 PDA 平板上, 26°C 下暗培养 4 d,将单菌落移至 PDA 平板继续培养,并根据菌落生长速度与产孢量,目测淘汰弱势菌株,保留 40 个生长快、产孢好的诱变株。

1.2 原生质体的紫外诱变

1.2.1 原生质体的分离 参照时连根^[13]的方法。

1.2.2 紫外线处理 诱变条件同 1.1.2,将 10^7 mL^{-1} 的原生质体悬浮液分装于培养皿中,照射时间 30 s,然后将原生质体悬浮液稀释到 10^3 mL^{-1} ,以便再生。

1.2.3 原生质体再生 接种 0.2 mL 原生质体悬浮液均匀涂布于直径 90 mm 的再生培养基(Czappek-Dox 培养基 1 000 mL,再加 KCl 至 0.65 mol/L)^[13] 平板上, 26°C 暗培养 7 d 后,将单菌落转移至 PDA 培养基上继续培养,并根据菌落生长速度与产孢量,目测淘汰弱势菌株,保留 40 个生长快、产孢好的突变株。

1.3 绿僵菌素产量测定

供试菌株为出发菌株及目测筛选后保留的分生孢子和原生质体突变菌株,经种子培养和摇瓶发酵培养后,采用高效液相色谱(HPLC)法测定绿僵菌素产量,参照 HU 等^[12]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 分生孢子突变株的绿僵菌素产量

HPLC 过程中,绿僵菌素 A(DA)的出峰时间为 6.690 min,绿僵菌素 B(DB)约 11.221 min(图 1)。40 个分生孢子突变株的 DA 与 DB 平均产量分别为 (45.05 ± 7.77) 和 $(10.83 \pm 1.05) \mu\text{g/mL}$ (表 1),而出发菌株 MaQ10 的 DA 与 DB 产量分别为 (106.81 ± 9.55) 和 $(29.53 \pm 2.70) \mu\text{g/mL}$;产量最高的是 08 菌株,其 DA 达到 $(158.29 \pm 3.85) \mu\text{g/mL}$,比出发菌株 MaQ10 增产 48.21%。DA 和 DB 的正突变株数分别为 6 和 0 株,正突变率分别为 15.00% 和 0,但是 DA 和 DB 的负突变株数分别达到 34 和 39 株,负突变率分别达到 85.00% 和 97.50%(表 2)。

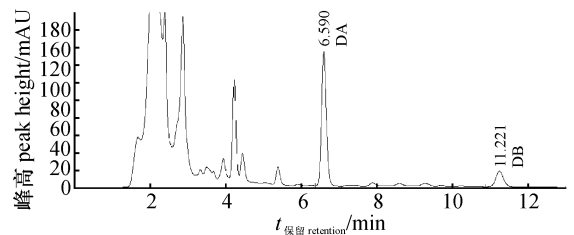


图 1 分生孢子突变株发酵液的 HPLC 图谱

Fig. 1 Profile of HPLC of cultural broth from mutant of conidia

2.2 原生质体突变株的绿僵菌素产量

40 株原生质体的 DA 平均产量为 $(68.97 \pm 6.07) \mu\text{g/mL}$ (表 1),DB 的平均产量为 $(11.80 \pm 1.35) \mu\text{g/mL}$;产量最高的是 24 菌株,其 DA 和 DB 产量分别达到 (146.95 ± 12.28) 和 $(36.91 \pm 5.37) \mu\text{g/mL}$,比出发菌株分别增产 37.59% 和 25.11%。DA 和 DB 的正突变株数分别为 7 和 2 株,正突变率分别为 17.50% 和 5.00%,DA 和 DB 的负突变株数分别达到 30 和 38 株,负突变率分别为 70.50% 和 95.50%(表 2)。可见,与分生孢子诱变相比,原生质体诱变的正突变率更高,而负突变率更低。

2.3 DA 与 DB 产量的相关性

2 类突变株的 DA 和 DB 产量具有显著的正相关性($P < 0.05$)(图 2)。分生孢子突变株的相关系数为 0.649 4,原生质体突变株的相关系数为 0.620 9,2 个相关系数的 T 测验表明其差异不显著($P > 0.05$),说明 2 种诱变方法并未改变 DA 与 DB 产量的相关作用。

表1 分生孢子和原生质体突变株的绿僵菌素产量

Tab.1 Production of destruxins from mutants of conidia and protoplast

| 菌株 strains | μg · mL ⁻¹ | | | |
|---------------------|-----------------------|---------------|-----------------|---------------|
| | 分生孢子 conidia | | 原生质体 protoplast | |
| | DA | DB | DA | DB |
| 01 | 72.92 ± 10.11 | 14.24 ± 3.28 | 117.62 ± 32.27 | 0.86 ± 1.48 |
| 02 | 86.73 ± 14.46 | 12.53 ± 2.66 | 80.07 ± 6.86 | 14.76 ± 1.94 |
| 03 | 129.03 ± 18.36 | 13.01 ± 5.68 | 116.06 ± 37.34 | 14.94 ± 5.75 |
| 04 | 41.83 ± 9.83 | 9.94 ± 5.09 | 121.23 ± 19.44 | 19.24 ± 5.54 |
| 05 | 84.22 ± 7.24 | 12.92 ± 6.86 | 137.23 ± 23.66 | 25.22 ± 10.12 |
| 06 | 131.67 ± 7.36 | 22.06 ± 2.72 | 68.58 ± 0.69 | 10.63 ± 1.67 |
| 07 | 77.12 ± 16.10 | 16.01 ± 4.63 | 17.22 ± 3.79 | 2.49 ± 1.16 |
| 08 | 158.29 ± 3.85 | 28.60 ± 7.04 | 102.19 ± 31.49 | 14.00 ± 1.65 |
| 09 | 94.58 ± 9.47 | 14.82 ± 1.80 | 72.54 ± 5.64 | 10.09 ± 2.56 |
| 10 | 145.79 ± 10.65 | 19.73 ± 9.08 | 103.61 ± 22.45 | 14.15 ± 1.13 |
| 11 | 0.00 ± 0.00 | 5.08 ± 8.80 | 58.99 ± 9.20 | 6.54 ± 0.93 |
| 12 | 82.45 ± 6.40 | 10.46 ± 0.73 | 129.17 ± 23.03 | 11.48 ± 1.33 |
| 13 | 142.06 ± 9.67 | 14.19 ± 3.84 | 17.08 ± 3.81 | 1.73 ± 1.41 |
| 14 | 51.02 ± 7.78 | 15.20 ± 6.44 | 53.54 ± 7.48 | 5.61 ± 2.24 |
| 15 | 26.60 ± 21.19 | 9.94 ± 8.25 | 1.50 ± 1.65 | 1.39 ± 1.33 |
| 16 | 18.45 ± 2.52 | 12.71 ± 0.78 | 68.87 ± 3.00 | 9.75 ± 0.88 |
| 17 | 123.20 ± 16.25 | 9.42 ± 0.26 | 29.18 ± 2.54 | 11.46 ± 1.12 |
| 18 | 55.38 ± 3.43 | 14.63 ± 4.74 | 37.91 ± 7.50 | 8.38 ± 0.89 |
| 19 | 14.26 ± 7.77 | 5.52 ± 2.10 | 57.76 ± 3.55 | 10.39 ± 1.12 |
| 20 | 2.01 ± 1.83 | 3.09 ± 5.35 | 56.23 ± 1.87 | 9.10 ± 2.22 |
| 21 | 9.45 ± 5.66 | 1.33 ± 1.63 | 79.81 ± 2.01 | 16.25 ± 1.50 |
| 22 | 7.05 ± 5.57 | 2.11 ± 2.78 | 67.66 ± 2.22 | 12.35 ± 1.34 |
| 23 | 7.41 ± 1.18 | 1.86 ± 2.95 | 3.83 ± 3.35 | 2.13 ± 1.91 |
| 24 | 1.72 ± 2.98 | 3.05 ± 5.29 | 146.95 ± 12.28 | 36.91 ± 5.37 |
| 25 | 12.85 ± 3.95 | 8.23 ± 5.86 | 36.12 ± 2.18 | 12.68 ± 2.55 |
| 26 | 7.04 ± 2.44 | 4.21 ± 7.14 | 62.09 ± 1.14 | 37.25 ± 2.06 |
| 27 | 1.77 ± 3.06 | 9.67 ± 7.60 | 124.02 ± 31.53 | 16.46 ± 2.77 |
| 28 | 24.70 ± 6.85 | 11.09 ± 7.25 | 4.99 ± 3.26 | 3.05 ± 1.93 |
| 29 | 3.10 ± 2.85 | 4.50 ± 7.60 | 69.16 ± 8.83 | 8.15 ± 1.54 |
| 30 | 3.32 ± 3.16 | 17.73 ± 4.81 | 121.22 ± 18.77 | 23.63 ± 6.75 |
| 31 | 3.04 ± 5.27 | 4.52 ± 7.83 | 83.40 ± 6.81 | 14.75 ± 0.53 |
| 32 | 7.06 ± 6.47 | 26.00 ± 8.54 | 56.93 ± 4.34 | 8.63 ± 1.43 |
| 33 | 16.81 ± 6.13 | 9.79 ± 7.97 | 90.31 ± 27.20 | 11.66 ± 2.02 |
| 34 | 2.53 ± 3.80 | 3.04 ± 5.27 | 58.08 ± 4.03 | 11.09 ± 2.72 |
| 35 | 26.84 ± 8.56 | 10.08 ± 4.61 | 55.53 ± 4.71 | 13.04 ± 3.66 |
| 36 | 80.82 ± 10.48 | 21.85 ± 10.41 | 23.88 ± 23.16 | 2.33 ± 2.02 |
| 37 | 21.85 ± 1.49 | 6.39 ± 3.82 | 70.78 ± 50.77 | 4.44 ± 1.93 |
| 38 | 3.75 ± 4.80 | 5.57 ± 7.10 | 57.90 ± 40.89 | 9.39 ± 5.90 |
| 39 | 11.38 ± 1.89 | 7.65 ± 5.30 | 72.29 ± 26.10 | 23.98 ± 13.34 |
| 40 | 11.83 ± 4.74 | 10.59 ± 7.11 | 27.39 ± 23.76 | 1.81 ± 1.20 |
| \bar{X} | 45.05 ± 7.77 | 10.83 ± 1.05 | 68.97 ± 6.07 | 11.80 ± 1.35 |
| MaQ10 ¹⁾ | 106.81 ± 9.55 | 29.53 ± 2.70 | 106.81 ± 9.55 | 29.53 ± 2.70 |

表2 2种诱变方法的效果比较¹⁾

Tab.2 The different effectiveness between the mutantations of conidia and protoplasts

| 突变株 mutant | 株 | | | |
|-----------------|-----------------------|----------|-----------------------|------------|
| | 正突变 positive mutation | | 负突变 negative mutation | |
| | DA | DB | DA | DB |
| 分生孢子 conidia | 6(15.00%) | 0(0) | 34(85.00%) | 39(97.50%) |
| 原生质体 protoplast | 7(17.50%) | 2(5.00%) | 30(70.50%) | 38(95.50%) |

1)产量比出发菌株增加10%以上的菌株为正突变株,减少10%以上的菌株为负突变株;括号内为百分比率。

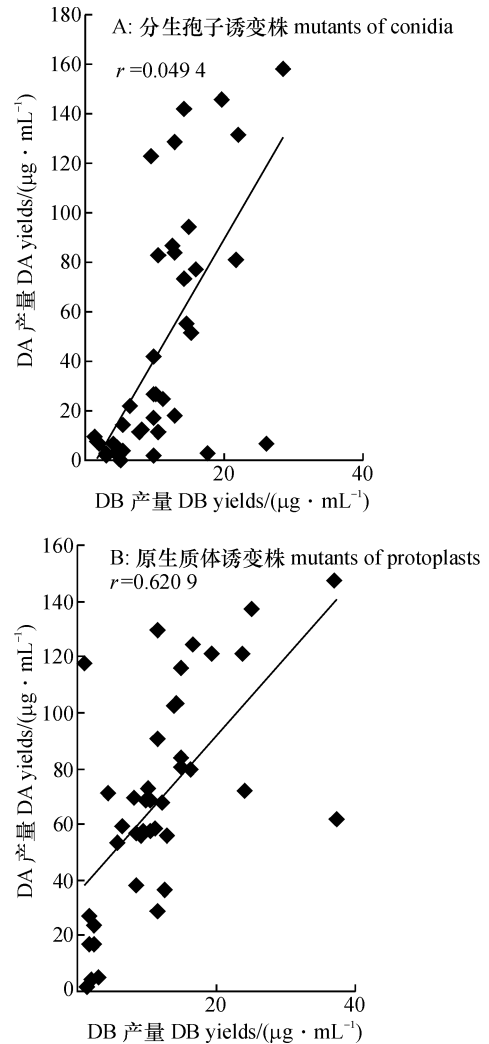


图2 分生孢子突变株与原生质体突变株的绿僵菌素A与B产量的相关性

Fig.2 The correlations between DA and DB production of mutants of conidia and protoplasts

3 讨论与结论

研究表明,诱变原生质体比诱变分生孢子效果更好,因为原生质体诱变株的平均产量更高,正突变率更高,而负突变率更低.分析其原因,笔者认为,原生质体失去了细胞壁的保护,对紫外线更加敏感,因而更容易形成突变体;并且,由于在准性生殖

1)出发菌株

过程中,菌丝或芽管间相互融合形成了异核体^[14],从而由菌丝细胞生成的原生质体中往往含有2个甚至多个细胞核,因而增加了绿僵菌素相关基因的突变概率,进而加速绿僵菌素的合成和转化过程。

在天然菌株中,存在DA与DB产量的正相关性^[12],本试验进一步证实这种相关性也存在于突变菌株中,并且2种诱变方法都没有改变这种相关性,说明DA与DB在菌体内部的生化代谢中是密切联系的。事实上,在相应酶的作用下它们可以相互转化^[1]。这种相关性对于毒素测定与菌株筛选具有指导作用,因为DA产量高的菌株意味着DB产量也是高的,这样,测定了一种毒素的产量,基本上可以推测另一种毒素的产量,节省了大量的时间。

确定紫外线的辐射剂量是诱变育种成功的关键,多数结果指出,随着紫外线剂量的增加,早期可以提高突变率,当达到最高水平后,再增加辐射剂量,突变率不会相应提高,甚至会降低。因此,一般可根据致死率来确定诱变剂量,并且以高致死率(大于90%)作为参考剂量^[15-16]。然而,现在也倾向于采用致死率在70%~75%^[17],有时甚至30%~70%,以期获得较高的良性突变率。本试验也是以高致死率作为辐射剂量的,但是负突变率偏高而正突变率偏低,是否可以通过降低紫外线剂量来提高正突变率,还有待进一步研究。

08和24菌株表现出显著的增产效果,具有进一步研究价值。然而,突变株通常较不稳定,因此,今后要进一步研究这2个突变株的绿僵菌素生产稳定性及生物学特性。

参考文献:

- [1] PEDRAS M S C, ZAHARIA L I, WARD D E. The destruxins: Synthesis, biosynthesis, biotransformation, and biological activity [J]. *Phytochemistry*, 2002, 59: 579-596.
- [2] VAZQUEZ M J, ALBARRAN M L, ESPADA A, et al. A new destruxin as inhibitor of vacuolar-type H⁺-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Chem Biodivers*, 2005(2): 126-130.
- [3] WANG C S, SKROBEK A, BUTT T M. Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* [J]. *J Invertebr Pathol*, 2004, 85: 168-174.
- [4] 胡琼波,任顺祥. 绿僵菌素的研究进展[J]. *中国生物防治*, 2004, 20(4): 234-242.
- [5] BROUSSEUA C, CHARPENTIER G, BELLONCIK S. Effects of *Bacillus thuringiensis* and destruxins (*Metarhizium anisopliae* mycotoxins) combinations on spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae) [J]. *J Invertebr Pathol*, 1998, 72, 262-268.
- [6] HU Q B, REN S X, AN X C, et al. Insecticidal activity influence of destruxin on the pathogenicity of *Paecilomyces javanicus* against *Spodoptera litura* [J]. *J Appl Entomol*, 2007, 131(4): 262-268.
- [7] VEY A, MATHA V, DUMAS C. Effects of the peptide mycotoxin destruxin E on insect haemocytes and on dynamics and efficiency of the multicellular immune reaction [J]. *J Invertebr Pathol*, 2002, 80, 177-187.
- [8] VILCINSKAS A, MATHA V, GOTZ P. Effects of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its secondary metabolites on morphology and cytoskeleton of plasmotocytes isolated from the greater wax moth *Galleria mellonella* [J]. *J Insect Physiol*, 1997, 43: 1149-1159.
- [9] VILCINSKAS A, MATHA V, GOTZ P. Inhibition of phagocytic activity of plasmotocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites [J]. *J Insect Physiol*, 1997, 43, 475-483.
- [10] CHEN H C, CHOU C K, SUN C M, et al. Suppressive effects of destruxin B on hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells [J]. *Antivir Res*, 1997, 34(3): 137-144.
- [11] NAKAGAWA H, TAKAMI M, UDAGAWA N, et al. Destruxins, cyclodepsipeptides, block the formation of actin rings and prominent clear zones and ruffled borders in osteoclasts [J]. *Bone*, 2003, 33: 443-455.
- [12] HU Q B, REN S X, WU J H, et al. Investigation of destruxin A and B from 80 *Metarhizium* strains in China, and the optimization of cultural conditions for the strain MaQ10 [J]. *Toxicon*, 2006, 48: 491-498.
- [13] 时连根. 绿僵菌大孢种的原生质体及其染色体组型研究[J]. *农业生物技术学报*, 2000, 8(3): 271-274.
- [14] AL-AIDROOS K. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* [J]. *Can Gent Cytol*, 1980, 22: 309-314.
- [15] 张永军, 斐炎, 方卫国, 等. 耐低水活度高毒力虫生真菌菌株选育[J]. *菌物系统*, 2001, 20(1): 73-78.
- [16] 邹晓, 刘爱英. 紫外诱变蝉拟青霉对白粉虱致病力的研究[J]. *菌物研究*, 2004, 2(4): 35-39.
- [17] 杨新美. 中国菌物学的传承与发展[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 1-295.

【责任编辑 周志红】