紫外线诱变莱氏绿僵菌对敌敌畏的耐药性

王诗玮， 纪 琪， 朱天辉*

（四川农业大学林学院，温江 611130）

摘要 为筛选出对常用有机磷杀虫剂敌敌畏具有较强耐药性的莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi* 突变菌株，本文通过紫外线照射诱变莱氏绿僵菌，并利用敌敌畏对紫外突变菌株进行 4 次药剂理化诱变，并对突变株进行了抗性水平、遗传稳定性测定，得出敌敌畏对莱氏绿僵菌孢子的致死浓度为 1 291 mg/L，适合莱氏绿僵菌紫外线诱变的最佳照射时间为 2 min 和 2.5 min，得到 6 株能耐 1 291 mg/L 敌敌畏的突变菌株，其中突变株 Nr-UVY6 的抗性水平是出发菌株的 2.57 倍，抗药性遗传稳定性也最佳。

关键词 紫外线诱变； 莱氏绿僵菌； 敌敌畏； 药剂理化诱变； 耐药性

中图分类号： S 476.11 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2018465

Resistance of *Metarhizium rileyi* UV mutation to dichlorvos

WANG Shiwei， JI Qi， ZHU Tianhui

（*College of Forestry*，*Sichuan Agricultural University*，*Wenjiang* 611130，*China*）

Abstract In order to screen out the mutant strain of *Metarhizium rileyi* which is highly resistant to dichlorvos, a common organophosphate insecticide. The *M. rileyi* strain mutagenized by ultraviolet irradiation, and DDVP was used to domesticate the mutant strain for 4 times. The resistance level and genetic stability of the mutant were determined. The lethal concentration of dichlorvos against the spores of *M. rileyi* was 1 291 mg/L, and the optimal durations fort UV irradiation were 2 min and 2.5 min. Six mutant strains resistant to 1 291 mg/L DDVP were obtained. The resistance level of the mutant strain Nr-UVY6 was 2.57 times higher than the original strain, and the genetic stability of the drug resistance was also the best.

Key words UV mutagenesis； *Metarhizium rileyi*； dichlorvos； drug mutagenesis； drug resistance

莱氏野村菌 *Metarhizium rileyi* 现已更名为莱氏绿僵菌 *Metarhizium rileyi*，是一种重要的昆虫病原真菌。据不完全统计，其对 40 多种鳞翅目昆虫具有致病性，尤其对夜蛾科害虫具有较强的致病性。在各类昆虫病原物（包括细菌、病毒和线虫等）中，真菌是唯一能通过表皮侵入昆虫的病原微生物，其在害虫生物防控中具有重要作用[1]。通常使用的方法是以孢子悬浮液的形式喷施到农作物或者林木上或以土壤缓释的方式来感染靶标害虫。周立峰等发现莱氏绿僵菌 Nr15 菌株对斜纹夜蛾的田间侵染率超过 90%，有着巨大的应用潜力[2]。此外，它对人体和其他非靶标生物包括昆虫、寄生虫和天敌无毒，不仅具有较高的实用价值而且在环境中能自然降解，是一种高效、环保的实用生防菌。

但在实际应用中，多种杀虫剂都对莱氏绿僵菌菌丝的生长或孢子的形成具有一定的抑制作用[3]。邱思鑫等[4]对使用 20 种常用杀虫剂对莱氏绿僵菌孢子萌发和菌丝生长造成的影响进行了测定，结果表明，60%的杀虫剂对孢子萌发抑制率达 50%以上，说明大多数杀虫剂对莱氏绿僵菌孢子的形成有一定的抑制作用，其中敌敌畏的抑制率高达 88.68%。试验结果同时表明各杀虫剂对莱氏绿僵菌的菌丝生长有不同程度的抑制作用，其中有机磷类的 5 种杀虫剂抑制率均较高。综合治理可以兼具化学农药和虫生真菌双方的优点，要使微生物杀虫剂在存在杀虫剂的速效性时兼具莱氏绿僵菌的持效性，从而在控制病虫害的前提下大幅度减少化学杀虫剂的施用量，进而获取经济和环境效益的双赢，最

收稿日期： 2018－11－03 **修订日期：** 2019－02－25
基金项目： 中国博士后基金面上项目（2016M602705）
* 通信作者 E-mail：zhuth1227@126.com

有效的措施就是对莱氏绿僵菌进行诱变。

采用人工诱变和基因工程手段可以获得抗药性生防菌株，但目前基因工程改造生防菌的技术还不是很成熟，操作技术难度较大，只有少数种类获得成功[5]。物理诱变中的紫外线诱变因其作用时间长、效果好、突变随机性强，可在短时间内获得大量突变体等优势，在诱变育种工作中得到大量运用[6-7]。由于复合诱变效果优于单因子诱变，因此，本试验主要采用紫外线诱变和含敌敌畏培养基理化诱变相结合的方法，以不同浓度敌敌畏对突变株及继代培养菌株的生长影响来对突变株的抗药性水平进行初步评价。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 出发菌株

莱氏绿僵菌出发菌株由四川农业大学森林保护学科实验室提供。

1.1.2 试剂

蛋白胨，杭州微生物试剂有限公司；无水葡萄糖，西陇科学股份有限公司；琼脂，上海伊卡生物技术有限公司；吐温-80，成都市科龙化工试剂厂；77.5%敌敌畏乳油，漯河科瑞达生物科技有限公司；无水乙醇，成都市科隆化学品有限公司；甘油，四川西陇化工有限公司；酵母浸粉，北京奥博星生物技术有限责任公司。

1.1.3 培养基

PDA 培养基[8]、PPDA 培养基[9]、SMAY 培养基[9]，均为自然 pH。

1.2 试验方法

1.2.1 原始菌株扩繁

将莱氏绿僵菌原始菌株转接到 PPDA 斜面培养基上进行扩繁，在温度 27℃、相对湿度 95%、光照条件 L//D=12 h//12 h 的恒温光照培养箱中培养 7～15 d，于冰箱 4℃保存备用。

1.2.2 制备孢子悬浮液

将试管保存的莱氏绿僵菌菌株接种在 PDA 培养基上，收集孢子，用无菌的 0.05%(*V*/*V*)吐温-80 水溶液反复冲洗孢子，倒入无菌三角瓶，经 27℃恒温磁力搅拌器搅拌 60 min 使孢子分散活化，用脱脂棉或者无菌滤纸过滤掉菌丝和杂质，得到较纯的孢子悬浮液，再稀释成约 10^2～10^3 个/mL 孢子悬浮液。

1.2.3 敌敌畏对莱氏绿僵菌孢子致死浓度的测定

将 77.5%的敌敌畏乳油稀释 10 倍后再稀释 1 600、1 200、800、600、400 倍(稀释后浓度为 484、646、968、1 291、1 937 mg/L)分别加入到培养基中，并制成不同浓度的含药平板，每个浓度设 3 个重复。吸取 0.1 mL 莱氏绿僵菌孢子悬浮液均匀涂布于含药平板上，以不加敌敌畏的 PDA 平板为对照，置于 27℃恒温培养箱中，培养 3～5 d 后逐日观察菌落生长情况。在前一个较低浓度平板上长出菌落而在后一个较高浓度平板上未长出菌落，后一浓度即为敌敌畏对莱氏绿僵菌出发菌株孢子的致死浓度。

1.2.4 紫外线诱变最佳照射时间的确定

吸取 0.1 mL 孢子悬浮液均匀涂布于 PDA 平板上，然后打开皿盖置于已预热 30 min 的 16 W 暗箱三用紫外分析仪内进行紫外线照射，照射距离为 16 cm，波长 254 nm。诱变时间从 0.5～20 min 分次分梯度设置，以不经紫外线照射的孢子悬浮液涂布培养平板为对照，所有处理均设 3 个重复。试验操作全程避光。48 h 后视生长情况逐日统计菌落数并计算紫外诱变后的致死率，并以致死率在 70%～80%确定最佳的紫外线照射时间。致死率按下式计算：

$$致死率=\frac{未经诱变处理组菌落数-诱变处理组菌落数}{未经诱变处理组菌落数}\times 100\%。$$

1.2.5 紫外线多次重复诱变

以试验所得的最佳紫外线照射时间为诱变时间进行多次循环诱变，每次以前一次诱变后产生的菌落直径大于出发菌株且产孢快、孢子丰富、无污染的突变株为材料做成孢子悬浮液，同样涂抹于平板上进行紫外线照射得到下一代突变株，如此重复，直到突变株的菌落直径与上一代突变株相比无明显增加时即结束诱变。对最终诱变所得的突变株进行编号、保存。

1.2.6 抗敌敌畏突变株的筛选

将经过紫外诱变后得到的突变株产生的孢子制成孢子悬浮液。以 77.5%敌敌畏乳油有效成分浓度 968 mg/L 作为初始药剂理化诱变浓度进行紫外线诱变加药剂理化诱变，吸取 0.1 mL 孢子悬浮液涂布于含敌敌畏 968 mg/L 的培养基平板上，16 W 紫外灯下诱变 2.5 min，每处理重复 3 次，避光培养 5～7 d，期间逐日观察记载菌落生长情况。凡是在

平板上长出菌落的，即为抗敌敌畏 968 mg/L 的突变菌株。挑取菌落直径大、孢子丰富、产孢快的单菌落继续进行紫外线诱变和更高浓度的含药培养基理化诱变，通过多次理化诱变，逐步提高药剂浓度直到在含敌敌畏 3 875 mg/L 的培养基上长出菌株。选择菌落直径大、产孢快、孢子丰富的单菌落保存。

1.2.7　突变株对敌敌畏的抗性水平测定

采用菌丝生长抑制率法[10-11]测定莱氏绿僵菌突变株对敌敌畏的抗性水平。将原出发菌株和突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 培养 10 d 后，移接到含敌敌畏 1 600、1 200、800、600、400、300、200 倍稀释液（浓度分别为 484、646、968、1 291、1 937、2 583、3 875 mg/L）的 PDA 平板中央，以不加敌敌畏为对照，每个处理设 3 个重复，置于温度 27℃、相对湿度在 95%、光照条件 L//D=12 h//12 h 的恒温光照培养箱中培养，每个处理重复 3 次。10 d 后，待莱氏绿僵菌生长稳定后，用十字交叉法测量各处理的菌落直径，并计算出各菌株的抑制率值、EC_{50} 以及抗性水平。

抑制率=（对照菌落数－处理菌落数）/对照菌落数×100%；

抗性水平：抗性比=突变株 EC_{50}/出发菌株 EC_{50}。

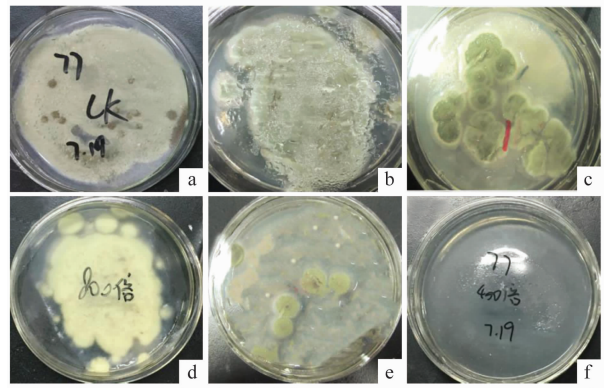
1.2.8　突变菌株的遗传稳定性测定

将经紫外线诱变和含药培养基理化诱变后获得的高抗性突变株制成孢子悬浮液，分别接种于含敌敌畏浓度为突变菌株最高耐药浓度的含药培养基和空白培养基上，27℃恒温培养，连续转接 7 代，每隔 8 d 转接 1 次。观察菌株在含药培养基上的生长状况，并用十字交叉法测量菌落直径，每个处理重复 3 次，计算敌敌畏对各代突变株的生长抑制率并绘制各突变株相对应的遗传稳定性图表。

2　结果与分析

2.1　敌敌畏对莱氏绿僵菌孢子的致死浓度

对照组接种 2 d 后即有菌落产生，随后绿色分生孢子很快布满平板并覆盖了菌丝；在敌敌畏浓度为 484、646 mg/L 的含药平板上第 3 天开始有菌落产生，随后绿色分生孢子逐渐产生；在浓度为 968、1 291 mg/L的含药平板上第 5 天才见有菌落长出，7 d后才见产孢，和前几组处理相比，这两种浓度处理下的菌落更小、孢子更少，且在含敌敌畏1 291 mg/L处理中分生孢子产量锐减，到第 10 天也只有几个小菌落，而在敌敌畏浓度 1 937 mg/L 的含药平板上第 10 天也未见有菌落产生，由此表明，浓度 1 291 mg/L 为敌敌畏对莱氏绿僵菌出发菌株孢子的致死浓度，并以此为抗药性致死突变标志。



a: 空白对照; b~f: 敌敌畏浓度依次为484、646、968、1 291、1 937 mg/L
a: CK; b-f: Dichlorvos concentration at 484, 646, 968, 1 291 and 1 937 mg/L

图 1　莱氏绿僵菌在含不同浓度敌敌畏的含药平板上的生长情况

Fig. 1　Growth of *Metarhizium rileyi* on drug-containing plates with different concentrations of dichlorvos

2.2　紫外线诱变

2.2.1　紫外线照射时间的确定

由表 1 可知，莱氏绿僵菌孢子经紫外线照射 10 min 时死亡率已达 92.47%，紫外线照射 15 min 和 20 min 后，莱氏绿僵菌的死亡率均为 95.21%，说明 15 min 以后的照射最多影响长势，对存活尚无明显影响。当紫外线波长、功率、照射距离等条件一定时，致死率随照射时间（即紫外线照射剂量）的增加而增加，且在 0～5 min 这一时间段内的死亡率增加最快，照射 5 min 时莱氏绿僵菌的死亡率已接近 90%。由于 5～20 min 照射的致死率均不在 70%～80%之间，故重新进行第 2 次紫外线诱变，结果见表 2。

表 1　第 1 次紫外线诱变后莱氏绿僵菌的死亡率

Table 1　Mortality rates of *Metarhizium rileyi* after the first ultraviolet mutagenesis

照射时间/min Irradiation time	菌落数量/个 Number of colonies	致死率/% Mortality rate
0	146	0.00
5	20	86.30
10	11	92.47
15	7	95.21
20	7	95.21

表 2 同样显示随着紫外线照射时间的增加，莱氏绿僵菌的死亡率也增加，当照射 0.5 min 时，死亡率仅

63.01%，而照射 3 min 时，致死率已达 82.88%。经计算，在 0～0.5 min 这一时间段内，莱氏绿僵菌的死亡率增加最快，0.5 min 之后死亡率上升趋势较平稳，到 3 min 时死亡率已超过 80%。根据要求需要选择致死率在 70%～80%之间的，故 2 min 和 2.5 min 均为适合莱氏绿僵菌的紫外照射时间。为统一标准，后续试验均采用紫外线照射 2.5 min 进行诱变。

表 2　第 2 次紫外线诱变莱氏绿僵菌的死亡率

Table 2　Mortality rates of *Metarhizium rileyi* after the second ultraviolet mutagenesis

照射时间/min Irradiation time	菌落/个 Number of colonies	致死率/% Mortality rate
0.0	146	0.00
0.5	54	63.01
1.0	51	65.07
1.5	48	67.12
2.0	38	73.97
2.5	33	77.40
3.0	25	82.88

2.2.2　多次重复诱变

经测定，出发菌株的菌落直径平均为 11.50 mm，经过第 1 次 2.5 min 紫外线照射后，挑选出了 28 个产孢快、孢子丰富、平均菌落直径为 15.25 mm 的正突变株做成孢子悬浮液进行第 2 次紫外线诱变；经过第 2 次紫外线诱变后又筛选出了产孢较快、孢子丰富、平均菌落直径为 18.75 mm 的 6 个单菌落，将这 6 个单菌落制成孢子悬浮液进行第 2 次紫外线诱变后，长出来的单菌落中没有同时满足直径大于 18.75 mm，且产孢快、孢子丰富这两个筛选条件的，说明从表观看诱变效果已无明显增加。因此，将第 2 次诱变后获得的 6 株突变株分别编号为 Nr-UVY1、Nr-UVY2、Nr-UVY3、Nr-UVY4、Nr-UVY5、Nr-UVY6。

2.3　抗敌敌畏突变株的筛选

分别将紫外诱变突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY2、Nr-UVY3、Nr-UVY4、Nr-UVY5、Nr-UVY6 配制成 10^7 个/mL 浓度的孢子悬浮液，在不同浓度敌敌畏含药平板上进行第 1 次药剂理化诱变，理化诱变结果如表 3。

表 3　各紫外突变株第 1 次敌敌畏药剂理化诱变结果[1)]

Table 3　The first pesticide acclimation results of different UV mutants

含药平板中敌敌畏浓度/mg·L^{-1} Concentration of dichlorvos in the medium	诱变结果 Result of mutation					
	Nr-UVY1	Nr-UVY2	Nr-UVY3	Nr-UVY4	Nr-UVY5	Nr-UVY6
968	+	+	+	+	+	+
1 291	+	−	+	+	−	+
1 937	−	−	−	−	−	−
2 583	−	−	−	−	−	−
3 875	−	−	−	−	−	−

1) 表中“+”代表菌株能生长，“−”代表菌株不能生长。下同。
+, the strains can grow; −, the strains cannot grow. The same below.

从表 3 可以看出，6 株紫外突变株经过第 1 次药剂理化诱变后在敌敌畏浓度为 968 mg/L 的含药培养基均能生长；在出发菌株的致死浓度 1 291 mg/L的含药培养基上，除了 Nr-UVY2、Nr-UVY5 两株不能生长，其余 4 株突变株均能生长；在浓度大于 1 291 mg/L 的平板上，6 株突变株均无法生长。

选择能在含 1 291 mg/L 敌敌畏的含药培养基上生长的突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY3、Nr-UVY4、Nr-UVY6，挑取菌落直径大、产孢快的单菌落做成孢子悬浮液，在含药平板上继续进行第 2 次药剂诱变，结果如表 4。

表 4　4 株突变株第 2 次药剂诱变结果

Table 4　The results of the second pesticide domestication of 4 mutant strains

含药平板中敌敌畏浓度/mg·L^{-1} Concentration of dichlorvos in the medium	诱变结果 Result of mutation			
	Nr-UVY1	Nr-UVY3	Nr-UVY4	Nr-UVY6
1 291	+	+	+	+
1 937	+	−	+	+
2 583	−	−	−	+
3 875	−	−	−	−
5 166	−	−	−	−

从表 4 可以看出,4 株突变株在敌敌畏致死浓度 1 291 mg/L 的含药培养基上都可以生长且正常产孢;在含药浓度为 1 937 mg/L 的平板上除了 Nr-UVY3 不能生长,原来在此浓度下不能生长的突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY4、Nr-UVY6 均可以生长且产孢,突变株 Nr-UVY6 同样长势最好、产孢较快;在更高浓度的 2 583 mg/L 含药平板上只有 Nr-UVY6 能生长但产孢较少、菌落直径小;而在浓度大于 2 583 mg/L 的所有含药平板上均未见菌落出现。因此,选择能在 1 937 mg/L 的含药平板上生长的 Nr-UVY1、Nr-UVY4、Nr-UVY6 继续进行第 3 次药剂理化诱变,同样挑取菌落直径大、产孢快的单菌落做成孢子悬浮液,在含药平板上进行理化诱变,理化诱变结果见表 5。

表 5　3 株突变株第 3 次药剂诱变结果

Table 5　The results of the third pesticide domestication of three mutant strains

含药平板中敌敌畏浓度/mg·L^{-1} Concentration of dichlorvos in the medium	诱变结果 Result of mutation		
	Nr-UVY1	Nr-UVY4	Nr-UVY6
1 937	+	+	+
2 583	+	−	+
3 875	+	−	+
5 166	−	−	−
7 750	−	−	−

从表 5 可以看出,3 株突变株在含敌敌畏浓度 1 937 mg/L的平板上均能够生长,而在含敌敌畏 2 583 mg/L的培养基上,突变株 Nr-UVY6 仍然能够生长;原来不能在此浓度下生长的突变株 Nr-UVY1 也可以生长且正常产孢,但长势不如突变株 Nr-UVY6;在含敌敌畏 3 875 mg/L 的培养基上,原来经过第 2 次理化诱变后不能在此浓度下生长的突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 现在可以生长,而 Nr-UVY4 依然不能生长;在浓度大于 3 875 mg/L 的含药平板上均未见菌落生长。因此选择能在含药浓度为 3 875 mg/L 的平板上生长的突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 进行第 4 次药剂诱变,结果如表 6。

表 6　突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 第 4 次药剂诱变结果

Table 6　The results of the fourth pesticide domestication of mutant strains Nr-UVY1 and Nr-UVY6

含药平板中敌敌畏浓度/mg·L^{-1} Concentration of dichlorvos in the medium	诱变结果 Result of mutation	
	Nr-UVY1	Nr-UVY6
3 875	+	+
5 166	−	−
7 750	−	−

表 6 显示,突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 经过第 4 次理化诱变后,与第 3 次的结果一样,依然不能在含敌敌畏 5 166 和 7 750 mg/L 的平板上生长,说明诱变效果已无明显正突变,因此 3 875 mg/L 即为所有突变株对敌敌畏的最高耐药浓度,Nr-UVY1、Nr-UVY6 即为筛选到的抗药性突变株。

2.4　突变株对敌敌畏的抗性水平

由表 7 可知,未经诱变的出发菌株的 EC_{50} 最小,为 851 mg/L,与 2 株突变株的 EC_{50} 在 0.05 水平上有显著差异,但突变株 Nr-UVY1 和 Nr-UVY6 之间无显著性差异。经过诱变处理的两株突变株对敌敌畏的抗性水平不同。突变株 Nr-UVY1 对敌敌畏的抗药性稍弱,抗性比为 2.22,其 EC_{50} 为 1 888 mg/L;而突变株 Nr-UVY6 对敌敌畏的抗药性较强,抗性比为 2.57,EC_{50} 为 2 184 mg/L。突变株 Nr-UVY6 的抗性水平高于突变株 Nr-UVY1,并且 2 个突变株的抗性水平都高于出发菌株,说明经过紫外线诱变加药剂理化诱变后莱氏绿僵菌对敌敌畏的抗药性明显提高。

表 7　两株突变株对敌敌畏的抗性水平[1)]

Table 7　Resistance levels of two mutants to dichlorvos

菌株 Strain	回归方程 Regression equation	相关系数(r) Correlation coefficient	EC_{50}/mg·L^{-1} Median effect concentration	95%置信区间/mg·L^{-1} 95% Confidence interval	抗性水平 Resistance level
Nr-UVY1	$y=0.56x+0.72$	0.826 0	1 888 a	1 292～2 760	2.22
Nr-UVY6	$y=0.56x+0.62$	0.817 9	2 184 a	1 417～3 369	2.57
CK	$y=3.46x-18.32$	0.882 5	851 b	620～1 169	1.00

1) 采用 Duncan 氏多重分析法比较,同列数据后不同字母表示在 0.05 水平差异显著($P<0.05$,$N=3$)。
Different letters in the same column indicate significant difference at the 0.05 level by using Duncan's multi-analysis method ($P<0.05$, $N=3$).

2.5　突变株的遗传稳定性

从表 8 可以看出,突变株 Nr-UVY1 和 Nr-UVY6 经过连续转接 7 代后,敌敌畏对 2 株突变株的生长抑制率差异不大,说明经过紫外线诱变加药剂理化

诱变后得到的突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 对敌敌畏的抗药性遗传基本稳定。随着转接代数的增加，可以看出敌敌畏对突变株 Nr-UVY1 的生长抑制率缓慢增加，增加幅度明显大于突变株 Nr-UVY6，说明突变株 Nr-UVY6 的遗传稳定性更好。因此，无论从对敌敌畏的抗性水平还是遗传稳定性来看，突变株 Nr-UVY6 均优于 Nr-UVY1。

表 8　敌敌畏对 2 株突变株转接后的生长抑制率

Table 8　Growth inhibition rates of two mutant strains after transfer

突变株 Mutant	生长抑制率/% Growth inhibition rate						
	第 1 代 1st generation	第 2 代 2nd generation	第 3 代 3rd generation	第 4 代 4th generation	第 5 代 5th generation	第 6 代 6th generation	第 7 代 7th generation
Nr-UVY1	62.4	62.0	62.9	66.0	68.2	68.8	69.0
Nr-UVY6	59.6	60.7	60.1	61.2	61.7	62.7	62.9

3　讨论

试验通过莱氏绿僵菌出发菌株在含不同浓度敌敌畏平板上的生长情况对比得出敌敌畏对莱氏绿僵菌孢子的致死浓度为 1 291 mg/L，这与邱思鑫等[4]得出的 80%敌敌畏乳油 1 000 倍稀释液对莱氏绿僵菌孢子萌发的抑制率达 88.68%的结果有一定出入，分析原因可能有两个：一是不同地域、不同寄主的莱氏绿僵菌由于生物学性状不同造成对杀虫剂的耐受性不同。龙亚飞等[12]曾对来自河南、山东、安徽的莱氏绿僵菌菌株对农用多抗霉素的敏感性进行过测定，结果表明来自安徽和山东的莱氏绿僵菌菌株对农用多抗霉素比较敏感，而来自河南的莱氏绿僵菌菌株则对农用多抗霉素具有较强的抗药性。邱思鑫所用试验菌株分离自福州郊区蔬菜地斜纹夜蛾，而本试验所用菌株分离自大邑县杜仲种植基地自然感染莱氏绿僵菌而死的杜仲梦尼夜蛾，因此，不同地域的莱氏绿僵菌对同一农药的敏感性不尽相同。二是化学农药的长期使用已经使得一些生防菌对化学农药产生了一定的抗药性，实际上长期的农药选择压力也是提高菌株耐药性的一种方法，但是因为其周期较长而不被使用。而敌敌畏等有机磷杀虫剂在以往的长期使用中，对人类、动植物以及生态环境带来了诸多负面影响。因此有必要通过诱变手段提高莱氏绿僵菌的耐药性，为莱氏绿僵菌在田间的推广使用打下基础。

本试验以经过紫外线诱变后致死率在 70%～80%之间为标准，得出了适合莱氏绿僵菌紫外线诱变的最佳照射时间为 2 min 和 2.5 min；经过两次紫外线照射后筛选出了 6 株产孢较快，孢子丰富，平均菌落直径为 18.75 mm 的突变株，分别编号为 Nr-UVY1、Nr-UVY2、Nr-UVY3、Nr-UVY4、Nr-UVY5、Nr-UVY6。

由于紫外线照射时其波长主要集中在 255 nm 附近，这与多数细菌的 DNA 吸收光谱相一致[13]，所以紫外线在使真菌发生诱变的同时还对细菌具有较强的致死作用，大大减少了真菌培养过程中被细菌污染的概率，是一种理想的诱变方式。但由于紫外线作用位点的随机性，诱变带来的效果也是随机的，可能发生正突变，也可能发生负突变。比如王兴民等[14]对玫烟色棒束孢进行紫外线诱变后，结果显示经过不同时间的紫外线照射后，玫烟色棒束孢 sp.1 菌株的菌落生长和产孢量存在一定差异，有些处理的菌落直径和产孢量大于出发菌株，有些则小于出发菌株。彭燕[15]对放线菌 BM10、许天委[16]对金龟子绿僵菌 MA4 进行紫外线诱变的结果显示处理后的菌落直径和产孢量也存在不同差异，需要对莱氏绿僵菌出发菌株进行进一步的药剂诱变以得到稳定的抗药性突变株。

现已有许多学者采用紫外线加药剂诱变的方式提高了出发菌株对农药的耐药性[17-18]。本试验经过 2 次紫外线诱变加 4 次药剂理化诱变后，筛选得到了能在含敌敌畏浓度为 3 875 mg/L 的平板上生长的突变株 Nr-UVY1 和 Nr-UVY6。突变株 Nr-UVY1、Nr-UVY6 的抗性水平分别是出发菌株的 2.22 倍、2.57 倍，说明莱氏绿僵菌经过紫外线加药剂理化诱变后对敌敌畏的耐药性有所提高。但与拮抗性木霉[19]经紫外线诱变加药剂诱变后耐药性提高 100 多倍、哈茨木霉[20]经诱变后耐药性提高 300 多倍、金龟子绿僵菌[16]经诱变后耐药性提高 120 倍的结果相比较，莱氏绿僵菌诱变后耐药性提高的效果远不如上述几种生防菌。分析原因可能有以下两个：第一是诱变时间较短。本试验统一采用 2.5 min 作为诱变

时间，而哈茨木霉、拮抗木霉均经过 80 min 的诱变。试验发现致死和变异作用并非同一过程的平行效应[21]，即高剂量的诱变虽然会增加菌株的变异几率，但其弊端是造成的损伤大且负突变比例较高，不利于目标菌株的分离筛选；而低剂量的诱变则相反，它造成的损伤较小且正突变比例较高，有利于目标菌株的分离筛选，但其弊端就是突变几率降低，因此诱变效果随之较低；第二则可能是莱氏绿僵菌自身基因稳定性所决定。有研究表明[22]，金龟子绿僵菌经诱变后产生的不同抗药性可能是由于编码 β-微管蛋白的相应基因发生了突变，在不同位点的突变表现了不同的抗药水平，因此对莱氏绿僵菌发生突变的位点进行更深入的研究将有助于解释为何莱氏绿僵菌经过紫外线诱变加药剂诱变后其抗药性提高幅度不如上述几种生防菌。

突变株 Nr-UVY1 和 Nr-UVY6 经过连续转接 7 代后，对敌敌畏的抗药性遗传均基本稳定，说明莱氏绿僵菌在经过紫外线诱变加药剂诱变后产生抗药性的相关基因位点比较稳定，对相关基因位点的研究、相关基因的克隆将有助于阐释莱氏绿僵菌抗药遗传稳定性的分子机制，为莱氏绿僵菌在农林生产中的长期应用奠定理论基础。

参考文献

[1] 王利军，谭万忠，罗华东，等. 虫生真菌及其在害虫生物控制中的应用现状与展望[J]. 河南农业科学，2010，4(6)：119－125.

[2] 周立峰，于士军，刘元兵，等. 莱氏野村菌对夜蛾科害虫防治潜力的室内评测[J]. 中国生物防治学报，2012，28(1)：47－52.

[3] 于海勇. 斜纹夜蛾幼虫表皮对莱氏野村菌侵染的防御功能研究[D]. 重庆：重庆大学，2011.

[4] 邱思鑫，关雄. 杀虫剂对莱氏野村菌孢子萌发和菌丝生长的影响[J]. 中国病毒学，2000，15：176－179.

[5] 扈新萍. 蜡蚧轮枝菌抗药性诱变效应研究[D]. 北京：中国农业科学院，2006.

[6] 丁中，刘峰，慕立义. 紫外光诱导哈茨木霉产生腐霉利抗性菌株的研究[J]. 中国生物防治，2002，18(2)：75－78.

[7] 张丽荣，康萍芝，杜玉宁，等. 紫外线诱变拮抗木霉产生对百菌清抗药性菌株的研究[J]. 安徽农业科学，2010，38(31)：17533－17535.

[8] 杨勇，张凤英，陈岑. PDA 培养基改良配方的研究[J]. 酿酒科技，2012，4：29－31.

[9] 李树一，雷仲仁，李传仁. 培养基和温度对 2 株治蝗绿僵菌生长和毒力的影响[J]. 长江大学学报(自科版)农学卷，2007，4(1)：4－7.

[10] 陈红，李平，郑爱萍，等. 广谱抗病虫几丁质酶产生菌 X2－23 的筛选与鉴定[J]. 植物病理学报，2003，33(4)：368－372.

[11] KLUGE M, ULLRICH R, SCHEIBNER K, et al. Stereoselective benzylic hydroxylation of alkylbenzenes and epoxidation of styrene derivatives catalyzed by the peroxygenase of *Agrocybe aegerita* [J]. Cheminform, 2012, 14(2): 440－446.

[12] 龙亚飞，王啸，邱树毅，等. 农用多抗霉素对不同地域莱氏野村菌的抑制效果[J]. 江苏农业科学，2015，43(1)：144－146.

[13] 微生物诱变育种编写组. 微生物诱变育种[M]. 北京：北京科学出版社，1973.

[14] 王兴民，罗莹，龙秀珍，等. 紫外线诱变对玫烟色棒束孢生物学特性的影响[J]. 南方农业学报，2015，46(7)：1213－1217.

[15] 彭燕. 放线菌 BM10 菌株的生物学初步研究及诱变选育[D]. 儋州：华南热带农业大学，2007.

[16] 许天委. 金龟子绿僵菌 MA4 的紫外诱变及其固体发酵研究[D]. 儋州：华南热带农业大学，2007.

[17] 张舒亚，李红霞，王建新，等. 稻梨孢抗嘧菌酯突变体 B9-R2 的部分生物学性状[J]. 南京农业大学学报，2005，28(1)：39－43.

[18] 崔霞，梁燕，李翠，等. 化学诱变及其在蔬菜育种中的应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2013，41(3)：205－212.

[19] 田连生. 抗药性木霉菌株的选育及其与多菌灵的协同作用[J]. 核农学报，2008，22(1)：32－35.

[20] 田连生. 紫外光诱导哈茨木霉产生对多菌灵抗药性的菌株[J]. 农业环境科学学报，2007，26(1)：318－321.

[21] 李霞. 根癌病生防菌株诱变筛选及其对致病菌抑菌作用的研究[D]. 大连：辽宁师范大学，2006.

[22] GEORGOPOULOS S G. The genetics of fungicide resistance [M]//LYR H. Modern selective fungicides properties, applications and mechanisms of action. New York: Longman Scientific & Technical, 1987: 53－63.

(责任编辑：田　喆)