

ARTP 与紫外线复合诱变 选育高性能绿僵菌菌株

黄玉¹, 尼玛扎西^{2,*}, 薛正莲¹, 张国强^{1,*}

(1.安徽工程大学生物与化学工程学院,安徽芜湖 241000;

2.西藏自治区农牧科学院农业资源与环境研究所,西藏拉萨 850000)

摘要:为获得高性能的金龟子绿僵菌菌株,本研究采用常压室温等离子体(ATmospheric and room temperature plasma, ARTP)和紫外线复合诱变处理金龟子绿僵菌,通过比较产孢快慢和生长直径大小进行初筛,用抗紫外能力和毒力作为复筛指标选育菌株,并对育种获得的突变株进行耐热性和遗传稳定性试验,最终在 ARTP 40 s 和紫外 120 s 时筛选出一株产孢量高、耐紫外线、毒力强、遗传稳定的优良菌株 AU34。该菌株产孢时间比原始菌株快,产孢量为 $1.63 \pm 0.22 (10^8 \text{ cell/cm}^2)$,较原始菌株提高了 63.81%。经紫外照射 5 min 后,AU34 存活率为 3.18%,比原始菌株更耐紫外照射。并且 AU34 对小菜蛾的毒力强,校正死亡率为 85.71%,半数致死时间(Half-lethal time, LT_{50})为 6.12 d。与原始菌株相比,AU34 的耐热性也有较大提高。传代培养 6 代后,菌株 AU34 的产孢量无明显变化,具有良好的遗传稳定性。
关键词:金龟子绿僵菌,常压室温等离子体(ARTP),紫外诱变,复合诱变,筛选,遗传稳定性

Breeding of High Performance *Metarhizium anisopliae* Strain by ARTP/UV Mutagenesis

HUANG Yu¹, Nimazhaxi^{2,*}, XUE Zhenglian¹, ZHANG Guoqiang^{1,*}

(1.College of Biological and Chemical Engineering, Anhui Polytechnic University, Wuhu 241000, China;

2.Institute of Resources and Environment, Tibet Academy of
Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Lhasa 850000, China)

Abstract: After atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and ultraviolet (UV) compound mutation, a high-performance strains of *Metarhizium Anisopliae* was selected. By comparing the speed of sporulation and the size of growth diameter, selected with the ability of anti-ultraviolet and virulence as the re-screening index, and tested for heat resistance and genetic stability, a good strain AU34 with high sporulation, UV tolerance, strong virulence and stable genetic was selected at the time of ARTP 40 s and UV 120 s. The sporulation time of the strain was faster than the original strain, and the sporulation amount was $1.63 \pm 0.22 (10^8 \text{ cell/cm}^2)$, which was 63.81% higher than the original strain. After 5 min of UV irradiation, the survival rate of AU34 was 3.18%, which was more resistant to UV irradiation than the original strain. The toxicity of AU34 to *Plutella xylostella* L. was high. The adjusted mortality rate was 85.71% and LT_{50} was 6.12 days. Compared with the original strain, the heat resistance of AU34 was also improved. After subculture for 6 generations, the sporulation of strain AU34 had no obvious change and had good genetic stability.

Key words: *Metarhizium anisopliae*; atmospheric and room temperature plasma (ARTP); ultraviolet mutagenesis; compound mutation; screening; genetic stability

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)04-0060-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020060082

引文格式: 黄玉, 尼玛扎西, 薛正莲, 等. ARTP 与紫外线复合诱变选育高性能绿僵菌菌株[J]. 食品工业科技, 2021, 42(4): 60-64, 70.

HUANG Yu, Nimazhaxi, XUE Zhenglian, et al. Breeding of High Performance *Metarhizium anisopliae* Strain by ARTP/UV Mutagenesis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(4): 60-64, 70. (in Chinese with English abstract) <http://www.spgykj.com>

收稿日期: 2020-06-08 + 并列第一作者

作者简介: 黄玉(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物发酵工程, E-mail: 1553067871@qq.com.

尼玛扎西(1973-), 男, 本科, 副研究员, 研究方向: 资源与环境生物技术, E-mail: nyima313@163.com.

* 通信作者: 张国强(1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 农业与食品生物技术, E-mail: guoqiang2008@163.com.

基金项目: 中央引导地方资金(Y20X20195400004790); 平台引进高层次人才资助项目(2018PTJB03); 安徽省高校学科拔尖人才项目(jxbjZD22)。

金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 是一种广谱的昆虫病原真菌, 具有不污染环境, 无残留, 对人畜无害等优点^[1], 被认为是一种环境友好型杀虫剂。金龟子绿僵菌通过其分生孢子粘附在昆虫体表, 然后利用氨基酸、蛋白质等营养物质萌发, 同时分泌蛋白酶、几丁质酶^[2-3]等穿透昆虫表皮, 在昆虫体内大量繁殖, 产生毒素^[4], 最后导致昆虫死亡^[5]。金龟子绿僵菌现已成功应用到田间, 正缓慢而稳定地取代传统的化学农药, 取得了较好的防治效果^[6-7]。但田间的不利环境会限制绿僵菌的感染性和有效性^[8-9]。在田间试验中, 紫外线和高温降低了孢子的存活率, 毒力大大降低, 阻碍了绿僵菌分生孢子的作用^[10-11]。

当绿僵菌在生长过程中暴露于紫外、温度等亚致死胁迫下时, 绿僵菌分生孢子对紫外线和热的耐受性会提高^[12-13]。陈瑞勤^[14]利用紫外线和亚硝酸复合诱变, 选育出孢子海藻糖含量显著提高的抗逆诱变株 M105-32。高温会抑制真菌在野外的持久性和药效, 是商业发展的限制因素^[15], 生产对胁迫温度更耐受的分生孢子可提高真菌在田间的有效性。因此, 筛选具有抗逆性的优良绿僵菌菌株具有重要的意义。

近年来, 为了获得绿僵菌优良菌株, 大部分是通过紫外诱变来获取^[16-19]。紫外诱变使 DNA 形成嘧啶二聚体, 阻碍碱基间的正常配对, 从而引起微生物的突变或死亡^[20-21]。它是研究中常用的诱变手段, 且所用到的设备简单, 操作方便, 诱变的效率高。目前尚未见利用 ARTP 诱变技术增强绿僵菌性能的报道。常压室温等离子体 (Atmospheric and room temperature plasma, ARTP), 一种新兴的诱变方式, 已经成功应用于细菌、真菌等微生物, 具有突变率高等优点^[22-24]。ARTP 诱变技术操作简便, 易得到稳定的突变菌株, 利用两种诱变方式会使得突变位点增多, 突变效果增强。ARTP 和紫外诱变相结合, 突变率大大提高。戴剑澍等^[25]通过 ARTP 和紫外复合诱变获得发酵单位比出发菌株提高 221%、埃莎霉素 I 组分含量提高 192% 的正突变株 IA-425。

本研究以金龟子绿僵菌 421 为材料, 采用 ARTP 和紫外线复合诱变处理菌株, 以小菜蛾为生测对象, 筛选出产孢量高、耐紫外、毒力强的优良诱变株。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*) 421 本实验室保藏; PDA 培养基 (g/L) 土豆 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 水 1000 mL; Tween 80 国药集团化学试剂有限公司; 小菜蛾 河南省济源白云实业有限公司。

HSP-70BE 恒温恒湿培养箱 上海力辰邦西仪器科技有限公司; ARTP-II 型诱变育种仪 北京思清源生物科技有限公司; 85-2 恒温磁力搅拌器 金坛市杰瑞尔电器有限公司; SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台 苏州净化设备有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 孢子悬液的制备 取 5 mL 0.05% 的 Tween 80

溶液打在新鲜的培养基平板上, 将孢子冲洗下来放入到含有玻璃珠的 10 mL 离心管中, 并振荡均匀, 用四层的灭菌擦镜纸过滤, 稀释后在光学显微镜下计数, 将孢子悬液的浓度调整至 10^7 个孢子/mL 左右^[26]。

1.2.2 ARTP 诱变方法 将载片灼烧 30 s, 放入灭菌平板中, 待冷却后, 取 10 μ L 10^7 个孢子/mL 孢子悬液均匀涂于载片。紫外灯灭菌 30 min 后, 开始诱变操作, 诱变时间设定为 0、10、20、30、40、50、60 s, 放电功率为 100 W, 气流量为 10 SLM。待诱变处理完毕后, 将装有载片的 EP 管振荡洗脱, 稀释相应的倍数, 取 100 μ L 涂布于平板中, 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d, 计算致死率。

$$\text{致死率}(\%) = 1 - \frac{A}{B} \times 100$$

式中: A: 处理组平板长出的菌落数; B: 对照组平板长出的菌落数。

1.2.3 紫外诱变方法 将磁力搅拌器放入超净工作台中, 用酒精清洗超净工作台和磁力搅拌器, 固定距离 30 cm, 紫外灭菌 20 min。吸取 5 mL 10^7 个孢子/mL 孢子悬液加入于已灭菌的带有转子的平板中, 打开磁力搅拌器和培养皿盖, 在黑暗条件下用 30 W 紫外灯照射 0、30、60、90、120、150、180、210、240、270、300 s。照射结束后, 关闭紫外灯。将取出的不同照射时间的菌液稀释合适的倍数, 取 100 μ L 涂布于培养基平板中, 以上操作均在红外光下操作。28 $^{\circ}$ C 避光培养 3 d, 计算致死率。

1.2.4 ARTP 结合紫外复合诱变 孢子悬液经 ARTP 处理 40 s 后直接进行紫外诱变, 稀释并涂布于平板, 重复 3 次, 28 $^{\circ}$ C 避光培养, 计算致死率。

1.2.5 初筛方法 将复合处理后的诱变株培养 3 d 后, 观察不同时间的平板的生长情况, 计数平板上的菌落, 对诱变株进行初筛, 将平板上长出来的菌落和原始菌株一起点种于新的 PDA 培养基上, 于第 6 d 时测量并记录菌落生长直径。比较初始菌株和诱变株, 筛选诱变后能产孢、菌落生长速度快、生长直径大的诱变株。

1.2.6 复筛方法

1.2.6.1 抗紫外线能力筛选 将初筛得到的菌株在紫外灯下照射 5 min, 选择萌发率高的、抗紫外能力较强的菌株。

1.2.6.2 毒力筛选 把原始菌株和通过 1.2.6.1 得到的诱变株一起进行小菜蛾的毒力试验, 选择对小菜蛾毒力强的菌株。用浸泡法将供试 10^7 个孢子/mL 的绿僵菌孢子悬液接种于小菜蛾 2 龄幼虫, 筛选具高侵染能力的绿僵菌菌株。幼虫死亡后, 将虫尸进行保湿培养, 5 d 后, 检查这些虫体是否长出菌丝及分生孢子, 以确认它们是否死于绿僵菌感染^[27]。每组处理 20 头, 重复 3 组, 采用 0.05% Tween80 溶液作为对照, 每天观察小菜蛾的症状并记录, 统计小菜蛾的死亡数, 并计算出校正致死率, 同时通过每天的致死率做相关性分析, 求出 LT_{50} 和毒力回归方程, 用 SPSS 软件做数据统计分析。

校正致死率 (%) = (处理组死亡率 - 对照组死

亡率)/(1-对照组死亡率) × 100

1.2.7 突变菌株耐热性试验 取 10^7 个孢子/mL 浓度的孢子悬液 1 mL 于 10 mL EP 管中,将其置于水浴锅中,分别在 35、40、45、50、55、60 °C 温度下处理 0.5 h,处理完毕后,将其稀释涂布于 PDA 平板中,重复 3 次,培养 3 d 后,测定萌发率。

$$\text{萌发率}(\%) = \frac{A}{B} \times 100$$

式中:A:处理组平板长出的菌落数;B:对照组平板长出的菌落数。

1.2.8 突变菌株稳定性试验 将获得的诱变优良菌株在 PDA 平板上连续传代点种,用 4 mm 的打孔器挖取菌块,测定菌株连续 6 代的产孢量,检测其遗传稳定性。

1.3 数据处理

所有数据均处理三次,采用 IBM SPSS Statistics 25 进行数据分析,通过 Origin 2018 作图。

2 结果与分析

2.1 初筛选育

2.1.1 ARTP 诱变选育 以金龟子绿僵菌 421 孢子悬液为出发菌株,探索 ARTP 最佳诱变时间。从图 1 看,金龟子绿僵菌对 ARTP 很敏感,在 60 s 时致死率已接近 100%。当照射时间为 40 s 时,致死率为 80.06%。为获得生长快、产量高的优良菌株,一般把 80%~90% 的致死率选定为诱变时间^[28],因此本研究诱变处理时间选定 40 s。

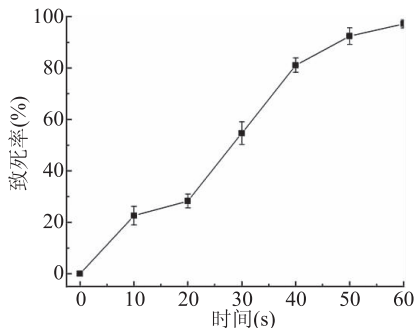


图1 ARTP 诱变致死曲线

Fig.1 ARTP mutagenic lethal curve

2.1.2 紫外诱变 将孢子悬液在 30 W 紫外灯下照射处理不同时间后,发现随着时间延长致死率逐渐升高,结果见图 2,照射 300 s 时,致死率达到 100%,因此,将紫外诱变的时间范围确定在 0~300 s 内。

2.1.3 双诱变条件复合诱变 由图 3 知,将经 ARTP 处理 40 s 后的孢子悬液再进行紫外照射处理,发现在紫外处理 120、150、180 s 时,致死率分别为 70.38%、94.81%、97.97%,考虑到本研究是结合 ARTP 和紫外复合诱变,为保证后续有足够的菌株,因此将 120 s 作为诱变时间。

2.1.4 诱变株生长情况 在经过 ARTP 和紫外复合诱变后,将诱变后长出的菌落和出发菌株点种到新的 PDA 平板上,通过比较出发菌株和诱变菌株的生长直径(d)大小及产孢快慢,共筛得了 28 株生长直径比原始菌株大的诱变菌株,编号 AU3~AU101,结果见表 1。

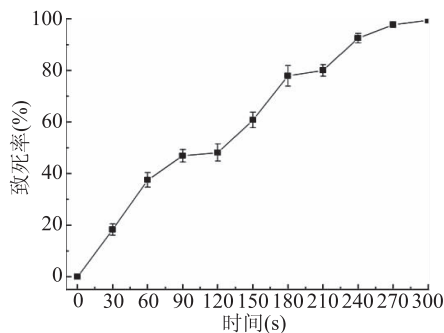


图2 紫外诱变致死曲线

Fig.2 Ultraviolet mutagenic lethal curve

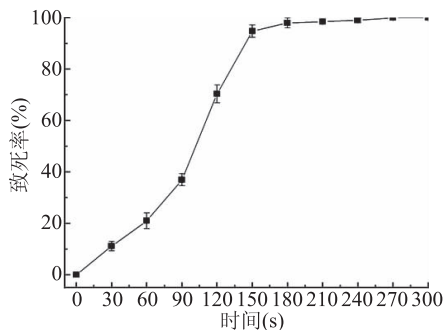


图3 ARTP 后紫外诱变致死曲线

Fig.3 Lethal curve of ultraviolet mutagenesis after ARTP

28 株诱变菌株中有 5 株诱变株 AU6、AU23、AU34、AU43 和 AU48 产孢较快,其中 AU34 产孢特征见图 4A,这 5 株诱变株在 48 h 后开始产孢,而原始菌株则是在 60 h 后开始产孢。其余诱变菌株产孢表现与初始菌株一致,但菌落大小较初始菌株大,其中 AU34 结果如图 4B。

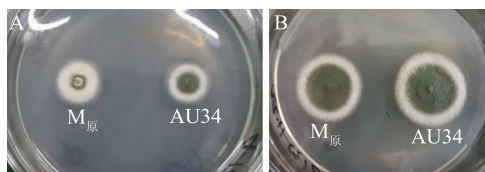


图4 原始菌株 $M_{原}$ 与诱变株 AU34 的产孢快慢和生长直径大小比较

Fig.4 Comparison of sporulation speed and growth diameter between the original strain and the mutant strain
注:A:3 d 后产孢快慢;B:6 d 后生长直径大小。

2.2 复筛结果

2.2.1 抗紫外线能力复筛 将初筛得到的 28 株诱变菌株在紫外灯下照射 5 min 后,发现 28 株诱变菌株中 AU3、AU34 两株菌株比原始菌株更抗紫外线照射(见表 2),菌株 AU3、AU34 在照射 5 min 后的存活率分别为 2.36%、3.18%,较原始菌株高,其中菌株 AU34 的存活率更高,耐紫外线能力更强。因此,选用菌株 AU3、AU34 进行下一步的毒力筛选。

2.2.2 毒力筛选 将原始菌株、AU3、AU34 的孢子悬液作用于小菜蛾,每天定时观察小菜蛾的死亡数,做数据统计分析。结果见表 3。可以看出原始菌株、菌株 AU3、菌株 AU34 处理的供试小菜蛾校正致死率分别是 80.36%、82.14%、85.71%,其中菌株 AU34 对小

表1 原始菌株与诱变株生长直径大小比较

Table 1 Comparison of the growth diameter of the original strain and the mutant strain

菌株	直径(cm)	菌株	直径(cm)	菌株	直径(cm)	菌株	直径(cm)
M _原	2.403 ± 0.012	M _原	2.586 ± 0.043	M _原	2.619 ± 0.004	M _原	3.085 ± 0.016
AU3	2.539 ± 0.027 **	AU19	2.638 ± 0.119	AU43	2.686 ± 0.014 **	AU64	3.164 ± 0.005 **
M _原	2.836 ± 0.061	M _原	3.011 ± 0.007	M _原	2.950 ± 0.023	M _原	3.037 ± 0.019
AU6	2.885 ± 0.043 *	AU23	3.048 ± 0.018 *	AU48	3.105 ± 0.012 **	AU69	3.220 ± 0.091 *
M _原	3.074 ± 0.013	M _原	2.373 ± 0.084	M _原	2.95 ± 0.053	M _原	2.502 ± 0.017
AU9	3.083 ± 0.008	AU26	2.384 ± 0.006	AU52	3.102 ± 0.104	AU75	2.678 ± 0.011 **
M _原	2.728 ± 0.039	M _原	3.079 ± 0.033	M _原	2.984 ± 0.049	M _原	2.950 ± 0.063
AU10	2.761 ± 0.011	AU28	3.162 ± 0.054	AU54	2.991 ± 0.101	AU82	3.003 ± 0.006
M _原	2.826 ± 0.016	M _原	2.651 ± 0.028	M _原	2.909 ± 0.012	M _原	2.655 ± 0.025
AU13	2.932 ± 0.017 **	AU32	2.731 ± 0.022 *	AU56	3.003 ± 0.010 **	AU93	2.823 ± 0.026 **
M _原	3.022 ± 0.003	M _原	2.972 ± 0.018	M _原	2.847 ± 0.35	M _原	2.852 ± 0.019
AU15	3.067 ± 0.015 **	AU34	3.022 ± 0.028 *	AU61	2.904 ± 0.017	AU95	2.915 ± 0.013 *
M _原	2.747 ± 0.037	M _原	3.026 ± 0.013	M _原	2.843 ± 0.052	M _原	2.731 ± 0.119
AU18	2.803 ± 0.010	AU38	3.114 ± 0.013 **	AU65	2.869 ± 0.043	AU101	2.815 ± 0.027

注: * 原始菌株 M_原 与诱变株差异显著 (P < 0.05), ** 原始菌株 M_原 与诱变株差异极显著 (P < 0.01); 表 2 同。

表2 不同菌株在紫外 5 min 下的存活率 (%)

Table 2 Survival rate of different strains under UV 5 min (%)

菌株	存活率	菌株	存活率	菌株	存活率
M _原	0.4 ± 0.0620	AU26	0.35 ± 0.087 *	AU61	0
AU3	2.36 ± 0.079 *	AU28	0.26 ± 0.108 *	AU65	0.33 ± 0.044 *
AU6	0.12 ± 0.026 *	AU32	0.13 ± 0.061 *	AU64	0.05 ± 0.036 *
AU9	0.29 ± 0.101 *	AU34	3.18 ± 0.111 *	AU69	0.28 ± 0.132 *
AU10	0.36 ± 0.061 *	AU38	0	AU75	0
AU13	0	AU43	0.16 ± 0.035 *	AU82	0.01 ± 0.017 *
AU15	0.31 ± 0.035 *	AU48	0.37 ± 0.030 *	AU93	0.22 ± 0.066 *
AU18	0.14 ± 0.036 *	AU52	0.25 ± 0.066 *	AU95	0.16 ± 0.096 *
AU19	0.11 ± 0.056 *	AU54	0.29 ± 0.020 *	AU101	0.34 ± 0.075 *

表3 金龟子绿僵菌对小菜蛾的毒力

Table 3 Toxicity of *Metarhizium anisopliae* to *Plutella xylostella*

菌株	浓度(个孢子/mL)	校正致死率 (%)	回归方程	可决系数	半数致死时间(d)
M _原	1 × 10 ⁷	80.36	y = 12.122x - 32.692	0.973	6.53
AU3	1 × 10 ⁷	82.14	y = 12.463x - 32.817	0.980	6.36
AU34	1 × 10 ⁷	85.71	y = 12.875x - 32.675	0.984	6.12

小菜蛾的校正致死率较高,从半数致死时间看,菌株 AU34 所用的 LT₅₀ 最短,为 6.12 d。因此,菌株 AU34 对小菜蛾的毒力最好。

2.3 菌株耐热性测定

耐热性是衡量昆虫病原真菌在野外环境中持久性的指标之一^[29]。陶星虎^[30]通过高温热激来筛选出耐高温的蝗绿僵菌突变体,得到三株 M₂₋₁、M₂₋₂ 和 M₂₋₇ 较耐热的菌株,其中 M₂₋₇ 耐热性最好,并对其进行了抗紫外能力等性能测定,与野生型 WT 的差异不显著。本研究在对原始菌株和诱变株 AU34 进行耐热性试验后,发现萌发率随温度升高而逐渐下降,高温限制了绿僵菌菌丝的生长,在 55 °C 时原始菌株和诱变株的菌落形态较小且生长速率慢,两株菌株在 60 °C 时均无法生长。由图 5 可以看出突变株 AU34

比原始菌株更耐热,耐热能力有较大提高。

2.4 菌株遗传稳定性测定

通过测量生长 6 d 的产孢量,原始菌株的产孢量为 0.995 ± 0.316 (10⁸ cell/cm²),菌株 AU34 的产孢量为 1.63 ± 0.22 (10⁸ cell/cm²),比原始菌株提高了 63.81%。对菌株 AU34 进行遗传稳定性试验,结果见表 4,通过连续 6 代产孢量检测,菌株 AU34 具有良好的遗传稳定性。

3 结论

本研究通过 ARTP 和紫外复合诱变,成功筛选到一株生长饱满、产孢快、抗紫外线能力强、耐高温、毒力强的优良菌株 AU34,产孢量为 1.63 ± 0.22 (10⁸ cell/cm²),比原始菌株提高了 63.81%,在检测传代 6 次的产孢量后,该诱变菌株具有良好的遗传稳定性。其中在

表4 菌株 AU34 的遗传稳定性
Table 4 Genetic stability of strain AU34

传代次数(代)	1	2	3	4	5	6
产孢量(10^8 cell/cm ²)	1.63 ± 0.22	1.51 ± 0.17	1.67 ± 0.28	1.47 ± 0.20	1.43 ± 0.44	1.55 ± 0.26

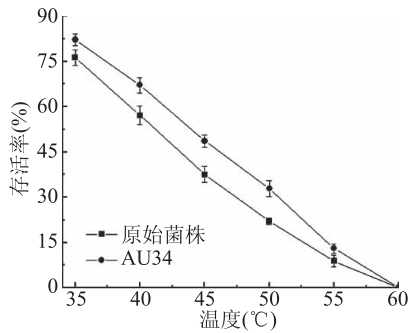


图5 原始菌株与 AU34 的耐热性比较

Fig.5 Comparison of heat tolerance between original strain and AU34

测定耐热性时发现突变菌株 AU34 较原始菌株的耐高温能力极大提高,表明 ARTP-紫外复合诱变对提高绿僵菌的性能是有效的。而且利用双诱变条件获得的绿僵菌菌株产孢时间提前、孢子产量提高、毒力增强,提高了其作为微生物杀虫剂的应用潜力,表明经 ARTP-紫外复合诱变可以成功选育出绿僵菌优良菌株,有利于提高现有杀虫剂的使用效果,为筛选优良绿僵菌菌株提供了新的途径。

参考文献

- [1] 陈名君,章西,侯因嵩,等.安徽大别山区绿僵菌属物种多样性[J].中国生物防治学报,2018,34(2):274-279.
- [2] Leão M P C, Tiago P V, Andreote F D, et al. Differential expression of the pr1A gene in *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium acridum* across different culture conditions and during pathogenesis[J].Genetics and Molecular Biology,2015,38(1):86-92.
- [3] Javar S, Mohamed R, Sajap A S, et al. Expression of pathogenesis-related genes in *Metarhizium anisopliae* when infecting *Spodoptera exigua* [J]. Biological Control, 2015, 85: 30-36.
- [4] Shakeel M, Xu X X, Xu J, et al. Identification of immunity-related genes in *Pluella xylostella* in response to fungal peptide destruxin A: RNA-Seq and DGE analysis[J].Scientific Reports, 2017,7(1):10966.
- [5] 刘颖,殷从松.金龟子绿僵菌致病的分子机理研究进展[J].贵州农业科学,2010,38(10):96-100.
- [6] Tang J F, Liu X Y, Ding Y C, et al. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* for rice planthopper control and its synergy with selected insecticides[J].Crop Protection,2019,121:132-138.
- [7] Mweke A, Akutse K S, Ulrichs C, et al. Efficacy of aqueous and oil formulations of a specific *Metarhizium anisopliae* isolate against *Aphis craccivora* Koch, 1854 (Hemiptera: Aphididae) under field conditions [J]. Journal of Applied Entomology, 2019, 143(10):1182-1192.
- [8] Brunner-Mendoza C, Reyes-Montes M D R, Moonjely S,

et al. A review on the genus *Metarhizium* as an entomopathogenic microbial biocontrol agent with emphasis on its use and utility in Mexico[J]. Biocontrol Science and Technology, 2019, 29(1): 83-102.

[9] Rangel D E N, Finlay R D, Hallsworth J E, et al. Fungal strategies for dealing with environment- and agriculture- induced stresses[J].Fungal Biology,2018,122(6):602-612.

[10] Nascimento é, da Silva S H, Marques E d o s R, et al. Quantification of cyclobutane pyrimidine dimers induced by UVB radiation in conidia of the fungi *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Metarhizium acridum* and *Metarhizium robertsii* [J]. Photochemistry and Photobiology,2010,86(6):1259-1266.

[11] Wang L, Chen X, Wu G, et al. Improved ϵ -poly-l-lysine production of *Streptomyces* sp. FEEL-1 by atmospheric and room temperature plasma mutagenesis and streptomycin resistance screening[J].Annals of Microbiology,2015,65(4):2009-2017.

[12] Braga G U L, Rangel D E N, Fernandes E K K, et al. Molecular and physiological effects of environmental UV radiation on fungal conidia[J].Current Genetics,2015,61(3):405-425.

[13] 练涛. 虫生真菌优良菌株筛选及对油茶象甲的防治研究[D].江西:南昌大学,2018.

[14] 陈瑞勤. 紫外线-亚硝酸复合诱变选育高抗逆性绿僵菌的初步研究[J].河北省科学院学报,2008(2):53-56.

[15] Onsongo S K, Gichimu B M, Akutse K S, et al. Performance of three isolates of *Metarhizium anisopliae* and their virulence against *Zeugodacus cucurbitae* under different temperature regimes, with global extrapolation of their efficiency [J]. Insects, 2019,10(9):1-13.

[16] 赵晶. 绿僵菌紫外诱变及高毒力菌株的筛选[D].广东:华南农业大学,2016.

[17] 马丽娟. 优良绿僵菌菌株的筛选及应用性研究[D].河北:河北农业大学,2012.

[18] 杨恩兰. 烟田害虫高毒力绿僵菌和混剂筛选及防治效果研究[D].广东:华南农业大学,2016.

[19] 韦云. 两株绿僵菌紫外线诱变株的生物学特性研究[D].广东:华南农业大学,2016.

[20] 苏筱雨,王婧,任晓婧,等. 美国白蛾高毒力白僵菌菌株的紫外线诱变选育[J].林业科学,2016,52(7):165-169.

[21] 牛春华,高岩,李玉秋,等. 紫外诱变选育高产蛋白酶枯草芽孢杆菌[J].中国酿造,2011(12):67-69.

[22] 李小坤,王旺,林影,等. 常压室温等离子体 (ARTP) 诱变选育高核酸酿酒酵母[J].现代食品科技,2018,34(12):137-144,238.

[23] 刘文静,程晗,陈崇艺,等. 产 β -葡萄糖苷酶菌株的筛选及产酶条件优化[J].食品与发酵工业,2019,45(23):43-49.

[24] 许鹏飞,郭金玲,吕育财,等. 常压室温等离子体诱变选育高产油脂皮状丝孢酵母的研究[J].中国油脂,2019,44(3):

(下转第70页)

参考文献

- [1] Zhao J, Li J R, Wang J L, et al. Applying different methods to evaluate the freshness of large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) fillets during chilled storage [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(45): 11387-11394.
- [2] 励建荣. 海水鱼类腐败机制及其保鲜技术研究进展[J]. 中国食品学报, 2018, 18(5): 1-12.
- [3] Li T T, Li J R, Hu W Z, et al. Shelf-life extension of crucian carp (*Carassius auratus*) using natural preservatives during chilled storage [J]. Food Chemistry, 2012, 135(1): 140-145.
- [4] 王倩, 孙晓红, 蓝蔚青, 等. 保鲜冰在水产品保藏中的应用研究进展[J]. 食品与机械, 2016, 32(3): 226-230.
- [5] 杨帆, 王金庆, 张楠, 等. 水产品腐败机理及控制方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(5): 282-285.
- [6] Bai A J, Rai V R. Bacterial quorum sensing and food industry [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2011, 10(3): 183-193.
- [7] Dusane D H, Zinjarde S S, Venugopalan V P, et al. Quorum sensing: Implications on rhamnolipid biosurfactant production [J]. Biotechnology & Genetic Engineering Reviews, 2010, 27: 159-184.
- [8] 刘静雪, 李凤林, 曾英男, 等. 连翘提取物对铜绿假单胞菌群体感应系统的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019(3): 118-121, 182.
- [9] Hmel L R. Quorum sensing in marine microbial environments [J]. Annual Review of Marine Science, 2017, 9: 257-281.
- [10] Solano C, Echeverez M, Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing [J]. Current Opinion in Microbiology, 2014, 18: 96-104.
- [11] Abisado R G, Benomar S, Klaus J R, et al. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions [J]. MBio, 2018, 9(3): e02331-e02317.
- [12] Rasmussen T B, Givskov M. Quorum sensing inhibitors: A bargain of effects [J]. Microbiology, 2006, 152(4): 895-904.
- [13] Ting D, Tingting L, Jianrong L. Identification of natural product compounds as quorum sensing inhibitors in *Pseudomonas fluorescens* P07 through virtual screening [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2018, 26(14): 4088-4099.
- [14] 孙晓佳, 李婷婷, 赫彬彬, 等. 富马酸钠对荧光假单胞菌群体感应现象及其腐败活性的抑制作用[J]. 食品科学, 2019, 40(11): 7-13.
- [15] 黄靖. 群体感应抑制剂筛选及冬凌草甲素对铜绿假单胞菌 QSI 活性研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2018.
- [16] Diao W R, Zhang L L, Feng S S, et al. Chemical composition, antibacterial activity, and mechanism of action of the essential oil from *Amomum kravanh* [J]. Journal of Food Protection, 2014, 77(10): 1740-1746.
- [17] Ponnuswamy V. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye [J]. Journal of Biochemical Technology, 2013, 4(3): 628-630.
- [18] Zhang J M, Rui X, Wang L, et al. Polyphenolic extract from *Rosa rugosa* tea inhibits bacterial quorum sensing and biofilm formation [J]. Food Control, 2014, 42: 125-131.
- [19] Rode T M, Langsrud S, Holck A, et al. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions [J]. International Journal of Food Microbiology, 2007, 116(3): 372-383.
- [20] Lambropoulou K A, Drosinos E H, Nychas G J. The effect of glucose supplementation on the spoilage microflora and chemical composition of minced beef stored aerobically or under a modified atmosphere at 4 °C [J]. International Journal of Food Microbiology, 1996, 30(3): 281-291.
- [21] Myszka K, Schmidt M T, Majcher M, et al. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds [J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 114: 252-259.
- [22] 梅永超, 李婷婷, 刘楠, 等. 绿薄荷精油对温和气单胞菌群体感应现象及其腐败特性的抑制作用[J]. 食品科学, 2018, 39(15): 17-23.
- [23] 赵龙华, 杨维青. 细菌群集运动与生物被膜和耐药性的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(17): 1986-1988.
- [24] Swiecicki J M, Sliusarenko O, Weibel D B. From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions [J]. Integrative Biology, 2013, 5(12): 1490.
- [25] Servant A, Qiu F M, Mazza M, et al. Controlled *in vivo* swimming of a swarm of bacteria-like microbotic flagella [J]. Advanced Materials, 2015, 27(19): 2981-2988.
- [26] O' May C, Tufenkji N. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(9): 3061-3067.
- [27] Zhang Y, Kong J, Xie Y F, et al. Essential oil components inhibit biofilm formation in *Erwinia carotovora* and *Pseudomonas fluorescens* via anti-quorum sensing activity [J]. LWT, 2018, 92: 133-139.
- [28] 肖梦圆, 武瑞赞, 谭春明, 等. 群体感应系统及抑制剂对细菌生物被膜调控的研究进展[J/OL]. 食品科学 [2020-04-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20200330.1440.062.html>.
- [28] 李豪, 白光剑, 吴静, 等. 紫外-常压室温等离子体复合诱变高产纤维素酶真菌[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(15): 81-86.
- [29] 刘银民, 程雨蒙, 李红梅, 等. 不同温度下绿僵菌对东亚飞蝗 3 龄蝗蛹的致病力影响[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(4): 642-647
- [30] 陶星虎. 蝗绿僵菌耐热突变菌株筛选[D]. 重庆: 重庆大学, 2014.

(上接第 64 页)

123-127.

[25] 戴剑澍, 张晓婷, 卢智黎, 等. 新型常压室温等离子体-紫外复合诱变选育埃莎霉素 I 高产菌株[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(2): 182-188.

[26] 洪明生. 昆虫病原真菌对植物叶表和寄主肠道微生物群落的作用研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2017.

[27] 杨帆, 刘春来, 王爽, 等. 一株平沙绿僵菌的鉴定及生防应用潜力评价[J]. 植物保护, 2018, 44(5): 199-205.