

DOI:10.11937/bfyy.201624024

微波诱变结合 DES 诱变改良拮抗酵母菌

郭东起, 廖凤菊

(塔里木大学 生命科学学院, 新疆特色农产品深加工兵团重点实验室, 新疆 阿拉尔 843300)

摘 要:以拮抗酵母菌 TL-24 为试材, 采用微波结合硫酸二乙酯(DES)复合诱变方法, 研究了复合诱变对酵母菌 TL-24 的影响, 以期选育出拮抗能力强的酵母菌菌株。结果表明:复合诱变选育出的拮抗酵母菌菌株 DE5, 在适宜的培养条件下, 抑菌圈直径达到 31.5 mm, 其抑菌能力比出发菌株 TL-24 提高了 85.3%。

关键词:拮抗酵母菌;微波诱变;DES 诱变

中图分类号:Q 948.12⁺2.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)24-0096-03

目前, 利用拮抗微生物进行生物防治是果蔬采后病害控制研究的热点, 被认为是最有希望替代化学杀菌剂的方法之一, 近年来越来越受到重视, 成为一种发展趋势^[1]。拮抗酵母菌可用来防治果蔬采后病害, 酵母菌与其它生防微生物相比, 具有许多优越性, 如对营养要求低、生长快、安全性高、拮抗效果好等^[2-3]。然而, 获得的拮抗酵母菌通常都是从自然界中分离、筛选出的野生型的菌种, 虽能适应其周围环境, 具有较强的生存竞争能力, 但不能满足商业化的要求^[4], 因此, 需要对野生型菌株进行改良、选育, 将其改造成为抗菌谱广和防病效果好的多功能超级菌株势在必行, 这是解决拮抗酵母菌商品化应用的关键性问题。

微生物诱变育种方法有物理诱变和化学诱变^[5], 物理诱变有紫外、微波、激光、太空辐射、离子束诱变等^[6-7], 常用的化学诱变剂有烷化剂、碱基类似物、叠氮化物、亚硝酸等^[8]。微波是一种高频电磁波, 微波诱变具有正突变频率高、效果好, 所选育菌株遗传性状稳定的特性^[9-10], 硫酸二乙酯是常用的烷化剂诱变剂的一种。随着诱变手段的多样化, 为了提高诱变效果, 采用组合 2 种或 2 种以上诱变方法, 即复合诱变, 其具有协同效力^[11]。该试验采用微波结合 DES 的复合诱变方法, 对拮抗酵母菌 TL-24 菌株进行诱变改良, 以期获得遗传性状稳定、拮抗性能佳、可商业化应用的生防酵母菌菌株。

第一作者简介:郭东起(1975-), 男, 硕士, 副教授, 现主要从事食品安全及果蔬保鲜与加工技术等研究工作。E-mail: guodongqi10@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31160342)。

收稿日期:2016-09-23

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌种:酵母菌菌株 JK-24, 在实验室从新疆冬枣的表面分离、筛选出的拮抗酵母菌, 经生工生物工程(上海)有限公司鉴定为库德里阿兹威(氏)毕赤酵母(*Pichia kudriavzevii*);指示菌:橘青霉(*Penicillium citrinum*)是引起新疆冬枣采后贮藏过程中青腐病的主要病原菌。

供试试剂:硫酸二乙酯(AR 分析纯, 上海迈瑞尔化学技术有限公司)。

供试仪器:G70F23CN2P-BM1(S0)微波炉(格兰仕微波炉电器有限公司);LDZX-50KB 立式压力蒸汽灭菌器;HPX-9162 电热恒温培养箱;SW-G-1F 超净工作台;XB-K-25 血球计数板;CX31RTSF 系统显微镜;GL-20G-II 冷冻离心机等。

PDA 培养基:称取 200 g 马铃薯, 洗净去皮切小块, 加水煮沸 0.5 h, 纱布过滤, 取上层清液, 再加 20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂粉, 溶化后补足水至 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。YPD 培养基:葡萄糖 20 g 酵母膏 10 g 蛋白胨 20 g 蒸馏水 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 酵母菌菌悬液的制备 在无菌条件下, 用接种环从 YDP 琼脂斜面上刮下 1 环酵母菌, 接入到 YDP 液体培养基中, 28 °C 培养 3~4 d 后, 离心(10 000 r·min⁻¹, 10 min)收集菌体, 血球计数板计数, 调至试验所需浓度, 待用。

1.2.2 复合诱变 微波诱变:取 1.5 mL 稀释浓度(10⁵ 个细胞·mL⁻¹)酵母菌菌悬液加入到 2 mL EP 管中, 将 EP 管置于加满冰水混合物小烧杯中。选用最大功率 700 W, 额定微波频率 2 450 MHz 的微波炉, 按不同时间(10、20、30、40、50、60 s)对其进行辐射处理, 每隔 20 s

取出,更换加满冰水混合物的小烧杯^[12]。诱变完成后,避光 4 ℃ 冷藏 12 h 后,用移液枪吸取 1 mL 菌悬液置于 YPD 琼脂平板上,用涂布棒将酵母菌菌悬液涂匀,每处理重复 3 次。28 ℃ 培养 3~4 d 后,进行菌落计数,计数致死率。硫酸二乙酯(DES)诱变:选取经微波诱变选育出拮抗效果好的突变株为出发菌株,制成稀释 10^5 个细胞 \cdot mL⁻¹ 的酵母菌菌悬液。取 32 mL pH 7.0 磷酸缓冲液、8 mL 孢子悬浮液、0.4 mL DES 原液充分混合(DES 的浓度为 1%, 体积比),30 ℃ 恒温分别振荡处理 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60 min 后,分别于 1 mL 处理液中加入 0.5 mL 25% Na₂S₂O₂ 溶液终止反应,适当稀释后,涂布于 YPD 琼脂平板上,每处理重复 3 次^[13]。28 ℃ 培养 3~4 d 后,进行菌落计数,并计算致死率。致死率(%)=(对照菌落数-处理菌落数)/对照菌落数 \times 100。

1.2.3 突变株的筛选 将诱变筛选的酵母菌菌株连续传代 5 次,然后接入到 YPD 液体培养基,28 ℃ 培养 28 h 后,制成菌悬液,浓度为 10^8 个细胞 \cdot mL⁻¹。利用牛津杯法离体筛选突变菌株,从培养 7 d 的病原菌 PDA 平板上用消毒过的打孔器(直径为 5 mm)取带病原菌的 PDA 培养基,将其移至 PDAY 平板中央,在 PDAY 平板上对称放置 4 个牛津杯,用移液枪吸取 100 μ L 酵母菌菌悬液加入牛津杯中,其中十字交叉为同一种酵母菌,28 ℃ 培养 5~7 d,测定抑菌圈直径的大小,试验重复 3 次。抑菌圈大于出发菌株的诱变菌株为正突变株。将每一轮诱变筛选到的拮抗效果好的突变株,作为下一轮诱变处理的出发菌株。

2 结果与分析

2.1 微波诱变

从图 1 可以看出,随着微波辐照时间的延长,酵母菌 TL-24 菌株的致死率逐渐增大,由辐照 10 s 时的 40.1% 增加到辐照 60 s 时的 98.9%,而正突变率由 10 s 的 15.2% 逐渐增加至 40 s 的 56.7% 最高值后,其正突变率又快速下降。随着微波照射处理时间的增加,酵母菌菌株的突变优良可能性就越大,但是菌株的致死率也在

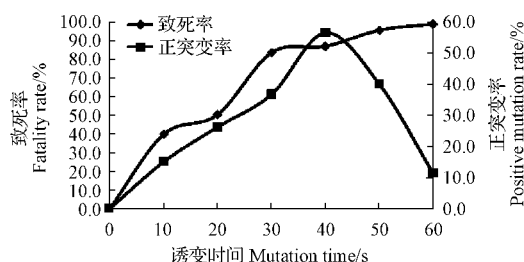


图1 不同微波辐照时间的致死率和正突变率

Fig.1 Fatality rate and positive mutation rate of different microwave irradiation times

不断增加,突变的优良菌株也有可能因此致死,不利于筛选,为了得到理想的正突变型菌株,往往采用致死率较低的微波辐照处理。该试验中,在 40 s 时,酵母菌菌株的致死率为 87.1%,且 TL-24 菌株的正突变率在此最高为 56.7%,因此,确定 40 s 为酵母菌 TL-24 菌株的最佳微波诱变时间。

通过微波诱变 40 s 筛选出拮抗效果好的酵母菌菌株,命名为 MW1、MW2、MW3、MW4、MW5。由图 2 可知,通过牛津杯法测定,其抑菌圈直径分别为 18.5、21.0、21.5、22.0、23.0 mm,比原始菌株 TL-24(17.0 mm)分别提高 8.8%、23.5%、26.5%、29.4%、35.3%。

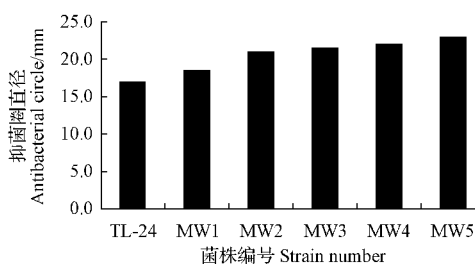


图2 微波诱变菌株与原始菌株抑菌圈直径的比较

Fig.2 Comparison of the MW mutant strain and original strain on antibacterial circle diameter

2.2 硫酸二乙酯(DES)诱变

由图 3 可知,在 1% DES 浓度下,随着处理时间的延长,酵母菌菌株 MW5 致死率增加,处理 50 s 时,致死率超过 90%;而正突变率由 15.5% 逐渐增加至 40 s 的 62.5% 最高值后,其正突变率又逐渐下降。菌株的致死率过高,突变的优良菌株有可能因此致死,不利于筛选,为了筛选到合适的正突变株,采用致死率为 50.0%~85.0% 的 DES 处理,在 40 s 时,酵母菌菌株的致死率为 84.5%,且菌株的正突变率在此最高为 62.5%,因此,确定 40 s 为酵母菌菌株 MW5 的最佳 DES 处理时间。

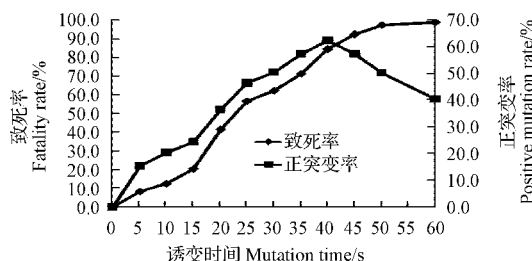


图3 不同硫酸二乙酯处理时间的致死率和正突变率

Fig.3 Fatality rate and positive mutation rate of different DES treatment times

通过 DES 处理 40 s 筛选出拮抗效果好的酵母菌菌株,命名为 DE1、DE2、DE3、DE4、DE5。如图 4 所示,通过牛津杯法测定,其抑菌圈直径分别为 26.0、26.5、27.5、29.0、31.5 mm,相较于出发菌株 MW5(23.0 mm)分别

提高 13.0%、15.2%、19.6%、26.1%、37.0%。诱变酵母菌株 DE5 的抑菌能力比原始菌株 TL-24 提高了 85.3%。

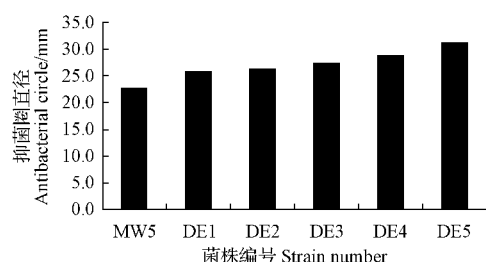


图4 DES 诱变菌株与出发菌株抑菌圈直径的比较

Fig. 4 Comparison of the DES mutant strain and original strain on antibacterial circle diameter

3 讨论与结论

微生物突变机制复杂,单一诱变往往难以筛选到目的菌种,复合诱变较单一诱变不仅效果好,而且能大幅度减轻工作量^[14]。复合诱变是 2 种或多种诱变剂的先后使用或同一种诱变剂的重复作用或 2 种或多种诱变剂的同时使用,该试验采用了微波辐照及 DES 诱变先后使用,对拮抗酵母菌 TL-24 进行了诱变。结果表明,对拮抗酵母菌菌株 TL-24 进行复合诱变,以提高其拮抗效果是可行的,这与赵丰丽等^[15]、胡向东等^[11]、向家云^[8]、武峥等^[16]的研究结果相一致。该试验中微波诱变条件为最大功率 700 W,额定微波频率 2 450 MHz 的微波炉,冰水浴,辐照时间 40 s;DES 条件为 1% DES 浓度下,处理时间 40 s。通过复合诱变筛选得到具有良好遗传稳定性的酵母菌株 UV5,其抑菌能力比出发菌株 TL-24 提高了 85.3%。该试验的方法易行、设备简单,在微生物菌种选育中有较大的推广价值。

参考文献

- [1] 林晓敏,谭晓荣.拮抗酵母菌防治果蔬采后病害的研究[J].北方园艺,2015(1):182-186.
- [2] 周雅涵,罗杨,曾凯芳.拮抗酵母菌对果蔬采后病害生防增效途径及机理研究进展[J].食品科学,2011,32(17):362-365.
- [3] SPADARO D, GULLINO M L. State of the art and future Prospects of the biological control of Postharvest fruit diseases[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(2): 185-194.
- [4] MARI M, NERI F, BERTOLINI P. New approaches for Postharvest disease control in Europe[M]. Springer Netherlands, 2009: 119-135.
- [5] 李鸿梅,苗琇岩,魏明,等.紫外与亚硝基胍复合诱变选育高产多糖果耳阿太菌[J].食品工业科技,2014,35(20):244-247,262.
- [6] 蒋汶,张庆庆,汤文晶,等.紫外-等离子体复合诱变红曲霉产胞外多糖[J].食品与发酵工业,2016,42(1):64-69.
- [7] 王卫国,张仟伟,赵永亮,等.酿酒酵母的选育及其应用研究进展[J].河南工业大学学报(自然科学版),2015,36(6):104-112.
- [8] 向家云.柑橘采后病害拮抗菌柠檬形克勒克酵母 34-9 诱变改良研究[D].武汉:华中农业大学,2008.
- [9] 李永泉,翁醒华,贺筱蓉,等.微波诱变结合化学诱变选育酸性蛋白酶高产菌[J].微生物学报,1999(4):181-184.
- [10] 王丽婷.微波诱变白腐菌高产漆酶及降解秸秆木质素的研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2012.
- [11] 胡向东,潘玲燕,章祺,等.复合诱变选育高产虾青素的红法夫酵母菌株[J].食品与发酵工业,2014,40(10):58-62,68.
- [12] 刘宝.角蛋白酶降解菌的紫外线和硫酸二乙酯复合诱变[D].南京:南京农业大学,2012.
- [13] 兰时乐,李立恒,王晶,等.微波诱变结合化学诱变选育纤维素酶高产菌的研究[J].微生物学杂志,2007,27(1):22-25.
- [14] 周元元.法夫酵母摇瓶发酵条件优化和高产虾青素菌株诱变选育[D].扬州:扬州大学,2006.
- [15] 赵丰丽,黄翠,陈睿.复合诱变对酵母产脂的影响及检测方法的研究[J].中国油脂,2007,32(7):34-37.
- [16] 武峥,黄健,陈元平,等.指状青霉酵母拮抗菌 Y1-3 紫外线诱变选育[J].中国农学通报,2013,29(21):144-148.

Breeding of Antagonistic Yeast by Microwave and DES Composite Mutagenesis

GUO Dongqi, LIAO Fengju

(College of Life Science, Tarim University/Xinjiang Production and Construction Group Key Laboratory of Agricultural Products Processing in Xinjiang, Alar, Xinjiang 843300)

Abstract: Antagonistic yeast strain TL-24 was used as test material, the effect of compound mutation on the yeast TL-24 was studied by microwave combined with DES mutagenesis, in order to screen yeast strains with strong antagonistic ability. The results showed that the antagonistic yeast strain DE5 was bred. Under suitable conditions, its inhibition zone was 31.5 mm, the antibacterial ability of the yeast strain DE5 was increased by 85.3% compared with that of the starting strain TL-24.

Keywords: antagonistic yeast; microwave mutagenesis; DES mutagenesis