

果实生防酵母菌株的紫外诱变选育

刘晓媛, 郭红莲, 杨 振, 胡 明

(天津科技大学 食品工程与生物技术学院 天津 300384)

摘 要:以实验室选育的汉逊氏酵母菌为初发菌株,采用紫外诱变方式对防治桃软腐病的生防酵母菌株进行选育,通过对正突变株的离体初筛与活体复筛,获得了一株对油桃软腐病抑制效果最佳的突变株 XY-331。比出发菌株的离体抑菌圈直径增加 0.97 倍,对桃软腐病的活体发病率降低 42.1%。

关键词:紫外诱变;生防酵母;选育

中图分类号:S 482.2⁺92 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)03-0084-02

近年来,以拮抗菌控制果蔬采后病害是生物防治采后病害的重要方向^[1-3]。在研究中,发现一株汉逊氏酵母菌对桃软腐病有一定的防治效果,在此基础上,该研究对汉逊氏酵母进行紫外诱变改良,以期获得拮抗效果更好、性状更优良的生防酵母菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种 汉逊氏酵母菌 331-4 为该研究室保存的生防菌种,桃软腐病菌-黑根霉菌为该室分离保存。

1.1.2 培养基及试剂 YEPD 培养基(g/L):蛋白胨 20,酵母膏 10,葡萄糖 20,琼脂 20, pH 6.0; YEPD 液体培养基(g/L):蛋白胨 20,酵母膏 10,葡萄糖 20, NaCl 6, pH 6.0; PDA 培养基(g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 17; 无菌生理盐水:0.9 g NaCl 溶于 100 mL 蒸馏水中;以上培养基及试剂在使用前均需经 121℃、0.1 MPa 下灭菌 20 min。

1.2 试验方法

1.2.1 UV-诱变的选育 挑取出发酵母菌 331-4 接于 50 mL YEPD 液体培养基中,28℃恒温水浴振荡培养,经 4 000 r/min 离心 10 min,去上清,用等体积的无菌生理盐水悬浮后,再 4 000 r/min 离心 10 min,去上清,制成无菌的孢子悬浮液,各取 5 mL 加入 5 板灭菌平皿中,于 50 W 紫外灯,垂直距离 40 cm,分别照射 0.1、2、3、4 min,暗处放置 20 min 后,每照射处理稀释为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 涂平板,28℃培养箱中培养 48 h 后,计数平板

菌落存活数,以未诱变的孢子悬液为基数,确定致死率,以致死率为 90%的条件下确定最佳诱变时间。

1.2.2 新拮抗菌 *in vitro* 初筛 挑取诱变时间梯度下的单菌落,采用抑菌圈法^[4],观察并记录待测突变株对黑根霉菌的抑菌圈直径大小,将抑制作用较佳的突变株筛出。

1.2.3 *in vivo* 复筛 将初筛获得的突变株同出发菌株 331-4 在 YEPD 平板上 28℃培养 48 h 后,用无菌水制备浓度为 1×10^7 cfu/mL 菌悬液。将油桃用 75%酒精浸泡 1 min 之后用自来水洗净,晾干,用消毒刀片在果实腰部划 3 mm×3 mm 见方的伤口,分别接种 30 μ L 拮抗菌悬液。1 h 后,再接种 2×10^6 cfu/mL 黑根霉菌孢子悬浮液,晾干后将果实装入塑料筐内,外套一塑料袋以保持 95%左右的相对湿度,于室温下贮存,4 d 后测定果实发病率和病斑直径。每处理 10 个果实,重复 2 次。结果用 SPSS 软件进行统计分析。

1.2.4 遗传稳定性试验 参考龙建友^[5]等的方法,筛出的突变株用基本培养基接种作传代试验,传代间隔为 1 d,传代 10 次后,利用抑菌圈法,测定突变株每代的抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 紫外诱变下的存活率

表 1 中在与对照组的比较中, 10^{-4} 、 10^{-5} 的孢子悬液,照射 3.4 min 对该菌株产生了明显的致死作用。在孢子悬液浓度为 10^{-4} 下作用 4 min 时,致死率已达 90%以上,此后菌体再稀释时均不适宜做筛选菌株,所以确定 4 min 为致死时间。进一步对 331-4 菌株诱变选育,采用 4 min 作为紫外线诱变的时间。

2.2 诱变菌株的筛选结果

2.2.1 初筛 选定 4 min 为诱变时间,在稀释至 10^{-4} 时,共获得 14 株突变菌株。对这 14 株菌作离体抑菌试验,以无菌水为阴性对照,以出发菌株为空白对照,结果

第一作者简介:刘晓媛(1983-),女,硕士,研究方向为食品加工与保鲜。E-mail: liuxiaoyuan141@163.com。

通讯作者:郭红莲(1971-)女,博士,副教授,现从事农产品采后病害方向研究工作。E-mail: guohonglian@tust.edu.cn。

基金项目:国家“十一五”支撑计划资助项目(2006BAD22B02)。

收稿日期:2008-10-28

见表2, 菌1、3、4、12的抑菌直径均比出发菌株331-4大, 其中突变菌1比出发菌株的离体抑菌圈直径大0.97倍, 将这4株菌用于复筛。

稀释倍数	培养基上的菌落数				对照
	1 min	2 min	3 min	4 min	
10 ⁻²	多	多	150以上	100左右	多
10 ⁻³	多	150~120	66	27	多
10 ⁻⁴	146	94	18	14	150左右
10 ⁻⁵	100~150	30	3	无	150左右

表2 紫外诱变菌株对黑根霉菌的抑制效果			
供试菌株	抑菌直径/mm	供试菌株	抑菌直径/mm
CK	—	7	—
331-4	30.5	8	24.6
1	60.2	9	25.2
2	26.3	10	—
3	32.5	11	31.3
4	31	12	35.4
5	25.7	13	19.8
6	17.2	14	—

2.2.2 复筛 试验结果(见表3)表明, 各诱变菌株与出发菌株相比, 发病第4天时菌株4-1在活体的抑菌病斑直径缩小0.076倍, 发病率降低42.1%, 与出发菌株331-4存在极显著差异($p=0.01$)。因此将菌株1筛出, 正式编号为XY-331。

表3 活体复筛试验结果					
供试菌株	1	3	4	12	331-4
病斑直径	24.3 **	25.8	25.1	24.9	26.3
发病率/%	55 **	75	69	67	77.8

注: **表示差异显著性达0.01水平。

2.3 遗传稳定性试验

在传代试验结果表明, 连续10次传代中, 酵母XY-1拮抗性能比较稳定, 抑菌能力没有明显的变化, 见图1, 可作为油桃软腐病的新生防菌株作进一步研究。

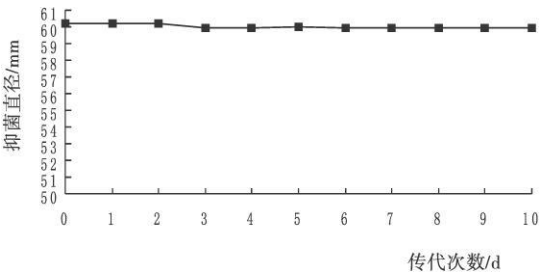


图1 酵母331-1传代10次对黑根霉的抑制效果

3 讨论

紫外诱变试验中, 将处于对数生长期的菌体作为试验菌, 并稀释10⁻²至10⁻⁵, 再均匀涂布平板, 可获得单一的纯菌落。经过“in vitro”初筛和“in vivo”复筛, 菌株XY-331对油桃软腐病抑制效果相对最佳。试验结果表明, 相对于出发菌331-4, 突变株XY-1的离体抑菌圈直径比对照大0.97倍, 活体发病率降低了41.1%, 生物活性存在极显著差异; 且连续传代后, 抑菌能力基本维持不变, 遗传稳定, 可作为油桃软腐病的新生防菌株, 为进一步田间应用提供可选菌株。

参考文献

[1] 范青, 季也蒙假丝酵母对采后桃果实软腐病的抑制效果[J]. 植物学报 2000 42(10): 1033-1038.

[2] De Meyer G, Bigirimana J, Elad Y, et al. Induced systemic resistance in *Trichoderma harzianum* T39 biocontrol of *Botrytis cinerea*[J]. Eur J Plant Pathol. 1998, 104: 279-286.

[3] Smilanek J L, Dennis A R. Control of green mold of lemons with *Pseudomonas* species[J]. Plant Dis. 1992, 76: 481-485.

[4] 张学军, 缪卫国, 朱桂宁, 等. 农作物重要病原菌拮抗菌的筛选[J]. 生物防治通报. 1993, 9(3): 126-129.

[5] 龙建友, 吴文君. 农用抗生素 No. 24 菌株诱变选育研究[J]. 西北农业学报 2005 14(1): 98-101.

The Study of Selection and Breeding of Bio-control Strain with UV Mutation

LIU Xiao-yuan, GUO Hong-lian, YANG Zhen, HU Ming

(Food Engineering and Biotechnology College, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: UV-mutagenesis method was treated to antagonistic yeast of *Debaryomyces hansenii* for controlling of nectarine rot. Among 14 strains of positive mutant, the best one XY-331 was obtained from primary and further screening, which was more large in vitro inhibitive circle and the incidence rate decrease 42.1% in vivo test than the comparison.

Key words: UV-mutagenesis; Antagonistic yeast; Selection and breeding