

拮抗酵母菌 0732-1 的鉴定及其 ITS-5.8S rDNA 序列分析

王晓东¹, 李国庆², 张莉¹, 葛米红³

(1. 石河子大学 农学院 新疆 石河子 832003; 2. 华中农业大学 植物科技学院 湖北 武汉 430070; 3. 武汉市农科所 湖北 武汉 430065)

摘 要: 从石河子地区西瓜叶片上分离获得 1 株对哈密瓜细菌性果斑病菌-燕麦嗜酸菌属西瓜亚种(*Acidovorax avena* subsp. *citrulli*) 有显著拮抗作用的酵母菌 0732-1, 对该菌株形态学观察、培养性状观察、生理生化测定, 以及结合 ITS-5.8S rDNA 序列同源性分析。结果表明: 酵母菌 0732-1 为异常毕赤酵母(*Pichia anomala* Kurtzman), 首次证明了 *P. anomala* 对哈密瓜细菌性果斑病菌具有生防作用。

关键词: 细菌性果斑病; 酵母菌; ITS-5.8S rDNA; 种类鉴定

中图分类号: Q 939.92 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)01-0146-04

酵母菌是一类蕴含巨大应用价值的微生物类群。自 20 世纪 50 年代以来, 酵母菌在植物病害防治领域中以其自身表现出特殊的生防潜质^[1-3], 得到了深入的研究和广泛应用, 成为国内外研究的热点。迄今为止, 已筛选出和用于防治苹果、梨、草莓、桃、柑橘、葡萄、桃、樱桃、油桃、猕猴桃等果实的采后真菌病害的酵母菌有 20 多种^[4-7]。用于控制柑橘类和仁果类果实的采后腐烂的 2 种酵母菌已经制成微生物抗菌剂投放市场, 如美国的“Aspire”(Candida Oleophila strain-182)、“BiosaveTM 100”和“BiosaveTM 110”(Pseudomonas syringae)^[8]。但利用酵母菌防治细菌性病害未见报道。

2006~2007 年, 通过从外界环境中大量分离酵母菌, 经室内平板筛选、盆栽活体筛选和田间生防效果的评估测定^[9], 成功获得了 1 株对哈密瓜细菌性果斑病有很好生防潜质的酵母菌 0732-1。为进一步深入了解该酵母菌, 现对其进行形态学鉴定及 ITS 序列分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试培养基 糖发酵基础培养基、同化碳源基础培养基、同化乙醇基础培养基、同化氮源基础培养基、产生淀粉类化合物培养基、产酯培养基、高渗透压培养基

制备方法参考文献[10-11]进行。PDA、LB 培养基和 PSB、LB 培养液配制方法参照植病研究法^[12]。胡萝卜培养基: 将新鲜的胡萝卜洗净, 切成柱形块(2 cm × 2 cm × 3 cm), 装入 150 mL 三角瓶。YEPB 培养液: 1% 酵母汁, 5% 甘油, 葡萄糖 20.0 g, 蛋白胨 10.0 g, 用蒸馏水配制。以上培养基均在 1 × 10⁵ Pa 灭菌 25 min 后, 备用。

1.1.2 供试菌株 酵母菌 0732-1 从新疆石河子西瓜叶片上分离获得。哈密瓜细菌性果斑病菌 XJ05-1 由石河子大学农学院植病教研室提供。分别将活化后的酵母菌 0732-1 和 XJ05-1 分别接种在 YEPB 和 KB 培养液中, 振荡培养(28℃, 160 r/min)36 h 后, 备用。

1.2 酵母菌 0732-1 的鉴定

酵母菌培养性状、菌体、假菌丝和掷孢子诱导及形态等重要分类学指标的观察参照 Barnett 记载的方法进行^[10]。测量菌体的长与宽数量为 100 个培养 48 h 的酵母菌个体。子囊孢子诱导及形态观察采用将新鲜酵母菌 0732-1 接种到胡萝卜培养基上, 20℃下培养 15 d 后, 用接种环从胡萝卜上挑取少许酵母菌体制成水浸玻片, 置于 OLYMPUS 光学显微镜 100 倍油镜下观察子囊和子囊孢子形态、子囊孢子数目、排列形式和大小等。对于生理生化指标的鉴定, 具体方法参考文献[10-11]。

1.3 ITS-5.8S rDNA 序列分析

1.3.1 基因组 DNA 的提取 采用 Francisco 的方法进行酵母菌总 DNA 的提取^[13]。

1.3.2 5.8S rDNA 的扩增 使用酵母菌 5.8S rDNA 的通用互补引物进行扩增^[13], 引物 ITS1 和引物 ITS4 的序列分别为 5'-TCCG TAGGTG AACCTGCGG-3' 和 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。反应体系: 取 DNA

第一作者简介: 王晓东(1975-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事植物病害生物防治研究工作。E-mail: wxd_agr@shzu.edu.cn.

通讯作者: 李国庆(1963-), 男, 湖北武汉人, 博士, 教授, 现主要从事植物病害生物防治研究工作。E-mail: guoqingli@mail.hzau.edu.cn.

基金项目: 石河子大学高层次人才科研启动资助项目(RCXZ200906)。

收稿日期: 2010-11-05

模板 1 μL , 10 \times PCR 缓冲液 5 μL , 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , dNTP (各 10 mmol/L) 1 μL , *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL)0.5 μL , 总反应体积为 50 μL 。循环参数: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 10 min。取扩增产物 5 μL , 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙啶染色, 检测 PCR 反应的产物, 以 Mark DL 2000 作为分子量的对照, 电泳结束后在凝胶成像仪上观察分析, 并将其扫描记录。

1.3.3 PCR 产物的克隆与 5.8S rDNA 序列测定及同源性分析 用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 电泳验证。连接到 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经蓝白斑筛选, 获得阳性克隆。委托北京赛诺生物工程技术服务有限公司进行 5.8S rDNA 双向序列测定。测得的基因序列结果通过 BLAST 程序与 GenBank 核酸数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行对比分析。然后采用 Clustalx 及 MEGA 4.0 软件进行同源性分析, 构建系统发育树, 确定该菌株的分类地位。

2 结果与分析

2.1 酵母菌 0732-1 形态特征

酵母菌 0732-1 在 PDA 平板上培养 2 d 后形成的菌落呈椭圆形或卵圆形, 乳白色, 表面隆起, 边缘整齐, 直径 0.6~1.1 cm, 表面光滑, 无光泽, 质地粘稠(图 1-A), 闻其有芳香味。易形成发达的树枝状分枝的假菌丝(图 1-B)。在 YEPB 培养液中培养的菌体细胞呈卵圆形, (5~7) $\mu\text{m} \times$ (3~5) μm (长 \times 宽), 细胞为多出芽殖(图 1-C)。未见有掷孢子产生。能在胡萝卜培养基上形成的圆形子囊, 内含礼帽形子囊孢子(图 1-D), 大小为 (3.5~4.2) $\mu\text{m} \times$ (1.2~1.8) μm 。这些形态特征与文献[10]上所描述的 *Pichia anomala* 特征相似。

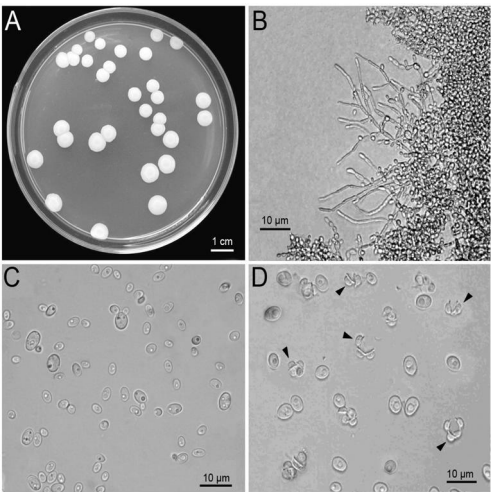


图1 酵母菌 0732-1 形态特征

注 A: 菌落形态(PDA/28 $^{\circ}\text{C}$ /2 d 后); B: 假菌丝形态; C: 菌体及其芽殖; D: 子囊孢子形态。

2.2 酵母菌 0732-1 生理生化特征

由表 1 可知, 在半厌氧条件下, 酵母菌 0732-1 可发酵 D-葡萄糖、D-半乳糖、麦芽糖和蔗糖, 但不能发酵乳糖。在有氧环境下, 可以同化 D-葡萄糖、D-半乳糖、麦芽糖、蔗糖、D-木糖、淀粉、D-甘露糖、L-阿拉伯糖、甘露醇、甘油、乙醇和山梨醇, 不能同化甲醇、乳糖和肌醇。对氮源同化测定, 酵母菌 0732-1 可以同化 L-赖氨酸盐酸盐、硝酸钾和硫酸铵, 但不能同化肌酸。另外, 该菌能在 42 $^{\circ}\text{C}$ 生长, 能够产生芳香类物质, 耐高渗透压。

表 1 酵母菌 0732-1 生理生化特征

测试项目	0732-1	测试项目	0732-1
糖发酵		Mannitol	+
D-Glucose	+	Glycerol	+
D-Galactose	+	Ethanol	+
Maltose	+	Methanol	-
Sucrose	+	Sorbitol	+
Lactose	-	氮源	
同化作用		L-Lysine	+
碳源		Creatine	-
D-Glucose	+	KNO ₃	+
D-Galactose	+	(NH ₄) ₂ SO ₄	+
Maltose	+	其它测试项目	
Sucrose	+	Starch production	-
Lactose	-	Grew at 42 $^{\circ}\text{C}$	+
D-Xylose	+	in 50% D-Glucose	+
Starch	+	in 60% D-Glucose	+
D-Mannose	+	Acids production (PDB)	+
Inositol	-	Ester production	+
L-Arabinose	+		

注: “+”: 阳性反应; “-”: 阴性反应; “+/-”: 阳性或阴性。

2.3 ITS-5.8S rDNA 序列分析

扩增后获得酵母菌 0732-1 的 ITS-5.8S rDNA 片段大小为 617 bp(图 2), 没有侧翼区的 ITS 序列(ITS1+5.8S rDNA+ITS2)组成只有 529 个碱基对。所获序列已提交 GenBank, 登录号为 EU380207。将测得的序列与 GenBank 数据库中已注册的 ITS-5.8S rDNA 序列用 BLAST 程序进行比对分析。酵母菌 0732-1 的 ITS-5.8S rDNA 与 *Pichia anomala* 的相似性高达 99%, 二者可以视为同一种。将 GenBank 中与酵母菌 0732-1 相似性较高的 5 个属的酵母菌株, 利用 DNAMAN5.0 和 Mega 4.0 软件构建系统进化树。由图 3 可知, 酵母菌 0732-1 与 *Pichia anomala* 处于同一分支, 说明它们亲缘关系较近, 支持率达 92%。

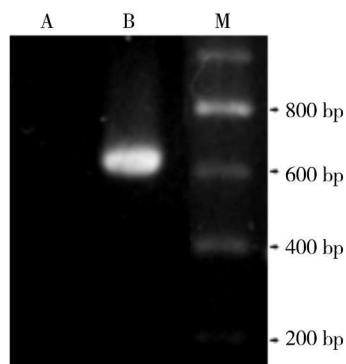


图2 重组质粒的PCR鉴定

注: A: 清水空白; B: IT-5.8S rDNA 片段的 PCR 产物; M: DNA Marker.

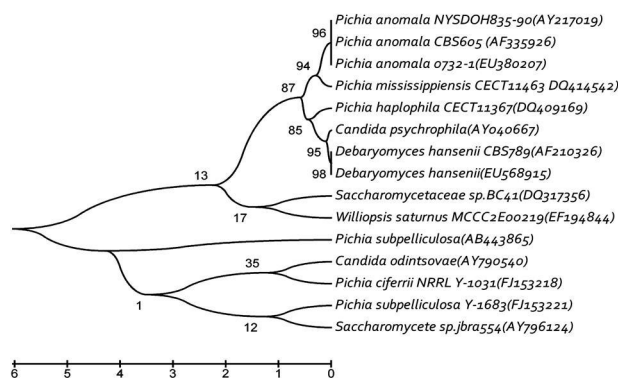


图3 酵母菌 0732-1 系统发育进化树

注: 括号内代码指 GenBank 登录号

3 结论

酵母菌的分类鉴定通常以形态特征和生理生化特性、生态学特性等表型性状作为分类的主要依据^[15]。但这些表型性状反映的遗传信息很有限。很多表型特征易受多种外界因素的影响而发生变化改变^[16-17], 具有很大的不确定性, 很难给出一个可信的酵母菌分类、鉴定标准。随着分子生物学技术的发展, ITS-5.8S rDNA 序列被广泛用于酵母菌的系统进化研究, 并已成为确立酵母菌新分类单位的必要数据。根据酵母菌 0732-1 的形态观察、生理生化特性, 以及 ITS-5.8S rDNA 序列分析的结果, 参照文献^[10, 18-19], 将酵母菌 0732-1 鉴定为真菌门、子囊菌亚门、半子囊菌纲、内孢霉目、酵母科、毕赤酵母属(*Pichia*)、*Pichia anomala* (Hansen) Kurtzman。

据现有资料表明, *Pichia anomala* 在国外植物真菌病害生防中已有大量研究和利用^[6, 20], 但在国内未见有报道。通过对拮抗酵母菌 0732-1 的鉴定, 首次证明了 *P. anomala* 具有防治哈密瓜细菌性果斑病作用, 拓宽了其生防范围。但对于 *P. anomala* 拮抗细菌性病害机制

是否与防治真菌病害的机理一致, 有待进一步确证。

参考文献

- [1] WANG X, CHI L Z, LI Y J. Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab[J]. Curr Microbiol, 2007, 55: 396-401.
- [2] izgü F, Altı nbay D, Acun T. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo-1, 3-glucanase activity[J]. Enzyme Microbial Technol, 2006, 39: 669-676.
- [3] CHAN Z, TIAN S. Interaction of antagonistic yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action[J]. Post Biol Technol, 2005, 36: 215-223.
- [4] 龙超安. 酵母菌的分离、筛选以及对柑橘保鲜的机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.
- [5] Karabulut O A, Baykal N. Biological Control of Postharvest Diseases of Peaches and Nectarines by Yeast[J]. Phytopathology, 2003, 151: 130-134.
- [6] Lassois L, Lapeyre de Bellaire L, Jijakli H. Biological control of crown rot of bananas with *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O[J]. Biol Control, 2008, 45: 410-418.
- [7] ZHANG H Y, ZHENG X D, YU T. Biological control of postharvest diseases of peach with *Cryptococcus laurentii*[J]. Food Control, 2007, 18: 287-291.
- [8] Janisiewicz W J, Jeffers S N. Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mold and gray mold of apple in cold storage[J]. Crop Protect, 1997, 16: 629-633.
- [9] WANG X, LI G, JIANG D, et al. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrullifolii*) of hami melon[J]. Biol Control, 2009, 50(2): 164-171.
- [10] Barnett J A, Payne R W, Yarrow D. Yeasts: characteristics and identification (Third edition)[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.
- [11] 中国科学院微生物研究所编写组. 常见与常用真菌[M]. 北京: 科学出版社, 1978.
- [12] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 北京农业出版社, 1998.
- [13] las Heras-Vazquez F J, Mingorance-Cazorla L M, Clemente-Jimenez J M, et al. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers[J]. FEMS Yeast Res, 2003, 3: 3-9.
- [14] Deák T, Beuchat L R. Handbook of Food Spoilage Yeasts[M]. Boca Raton F L: CRC Press, 1996.
- [15] Scheda R, Yarrow D. The instability of physiological properties used as criteria in the taxonomy of yeasts. Arch Mikrobiol[J], 1966, 55: 209-225.
- [16] Price C W, Fuson G B, Phaff H J. Genome comparison in yeast systematics, delimitation of species within the genera *Schwanniomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* and *Pichia*[J]. Microbiol Rev, 1978, 42: 161-193.
- [17] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
- [18] Yarrow D, Kurtzman C P, Fell J W. The Yeasts: a Taxonomic Study, 4th edn[M]. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1998: 77-100.
- [19] Friel D, Vandenbol M, Jijakli M H. Genetic characterization of the yeast *Pichia anomala* (strain K), an antagonist of postharvest diseases of apple[J]. J Appl Microbiol, 2005, 98: 783-788.
- [20] Fredlund E, Druvefors U, Lingsten K J, et al. Physiological characteristics of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121[J]. FEMS Yeast Res, 2002, 2: 395-402.

新铁炮百合离体培养的生理生化变化初探

陈丽静¹, 孙春玉¹, 马慧¹, 陶承光², 阮燕晔³, 李天来¹, 王玉坤¹

(1. 沈阳农业大学, 辽宁省生物技术重点实验室 设施园艺省部共建教育部重点实验室 辽宁 沈阳 110866;

2. 辽宁省农业科学院 辽宁 沈阳 110161; 3. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所 北京 100081)

摘要:以离体培养不同时间的新铁炮百合新品种“沈香一号”鳞茎为材料,在MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L和MS无激素培养基条件下,测定并分析激素对新铁炮百合生理生化特性的影响。结果表明:激素处理的新铁炮再生苗中可溶性蛋白和非可溶性蛋白含量的变化趋势较大,适宜的激素处理能促进可溶性糖和淀粉含量的相互转变,明显增加新铁炮百合组织中过氧化物歧化酶(SOD)含量和降低丙二醛(MDA)含量;在不定芽形成过程中,激素处理可以增强百合分化和脱分化过程中的蛋白和糖代谢,还会提高组织抗逆性。

关键词:新铁炮百合;鳞茎;激素;生理生化特性

中图分类号:S 682.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)01-0149-04

新铁炮百合(*Lilium longiflorum* Thunb)是用麝香百合和台湾百合杂交育成的杂种铁炮百合,是百合切花中的优良品种,其花大瓣厚,花形特别,花朵不同于铁炮

百合向前开放,而是朝天怒放,尤其适宜用作切花。又因其各种优良性状,倍受人们的喜爱。新铁炮百合市场潜力大,近几年来全国各地有较大面积的栽培。随着百合需求量的增加,百合的种植面积不断扩大,对百合种球的需求量也将大幅度的上升。百合种球的繁殖方式主要为有性繁殖和无性繁殖。有性繁殖主要通过种子繁殖,虽能获得大量无病健康的幼苗,但是在其形成过程中常常授粉不亲和及胚发育早期死亡,导致结实率十分低,收获的种子数量很少。无性繁殖方式主要有小鳞茎分株繁殖方式、单鳞片扦插,且这2种繁殖方式会造成病毒的积累,导致百合的品质下降,单鳞片扦插还存在鳞片易腐烂的问题,所以,依靠这2种方法生产远不能满足市场对高质量百合种球的需求^[12]。

第一作者简介:陈丽静(1971-),女,山东海阳人,博士,副教授,研究方向为植物基因工程与细胞工程。E-mail: chenlijing1997@126.com。

通讯作者:阮燕晔(1971-),男,在读博士,副教授,现从事植物基因工程研究工作。E-mail: yanyeruan@yahoo.com.cn。

基金项目:国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2006AA100109);中国博士后科学基金资助项目(20100471471);辽宁省教育厅资助项目(L2010495)。

收稿日期:2010-11-10

Identification and ITS-5.8S rDNA Sequence Analysis of the Antagonistic Yeast Strain 0732-1 for Against *Acidovorax avena* subsp. *citrulli*

WANG Xiao-dong¹, LI Guo-qing², ZHANG Li¹, GE Mi-hong³

(1. Department of Plant Pathology of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003; 2. Department of Plant Pathology of

Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070; 3. Wuhan Institute of Agricultural Science, Wuhan, Hubei 430065)

Abstract: Yeast strain 0732-1, isolated from watermelon leaf samples of Tianshan reservation region, showed inhibitory activity when its filtrate was drop onto the KBA medium plate surface spreading evenly *A. avena* subsp. *citrulli*. Based on its morphological, cultural characteristics, general physiological and biochemical properties and analysis of the DNA sequence of the internal transcribed spacer of ribosomal DNA (The genbank accession numbe EU380207), the yeast strain 0732-1 was identified as *Pichia anomala* Kurtzman. To our knowledge, this is the first report of *P. anomala* with potential for biocontrol of bacterial fruit blotch of hami melon caused by *A. avena* subsp. *citrulli*.

Key words: bacterial fruit blotch; yeast; ITS-5.8S rDNA; identification