

# 紫外诱变改良柑橘采后病害拮抗菌柠檬形克勒克酵母研究

向家云 邓伯勋\* 刘昱佳 刘慧敏 俎延喜 余 慧

(华中农业大学园艺林学学院/园艺植物生物学教育部重点实验室/国家柑橘育种中心 武汉 430070)

**摘 要:** 以柠檬形克勒克酵母(*Kloeckera apiculata*)为出发菌株,采用紫外线(UV)、UV+LiCl 等方法对其进行诱变改良。确定了处理的最佳剂量:紫外处理 15 W 30 cm 照射 20 s, UV+LiCl 处理 UV 照射 20 s 并在平板中加入 LiCl 0.3% (W/V)。选育到一株生理特性有明显改善的变异菌株 UV20-13,果实试验中,7 d 后柑橘青、绿霉病的发病率分别比出发菌株降低 25.56%和 10.00%。生长动态测定和传代试验表明,该菌株生长特性优于出发菌株,连续传代 10 代,该菌株没有出现退化、回复突变等,在遗传上是稳定的。

**关键词:** 柑橘, 采后病害, 柠檬形克勒克酵母, 诱变育种, 紫外线

## Ultraviolet Mutation Breeding Aspect of the Biological Control of Postharvest Diseases by *Kloeckera apiculata* in Citrus Fruit

XIANG Jia-Yun DENG Bo-Xun\* LIU Yu-Jia LIU Hui-Min ZU Yan-Xi YU Hui

(National Centre of Citrus Breeding, Key Laboratory of Horticulture Plant Biology of Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract:** A series of experiments were conducted to study the mutation of *Kloeckera apiculata* by many kinds of treatments such as UV and UV+LiCl. The optimal dosage disposal was determined: 15 W 30 cm under Ultraviolet irradiation for 20 s, UV+LiCl under Ultraviolet irradiation for 20 s and added LiCl 0.3% (w/v). One strain (UV20-13) which had obvious physiological characteristic was obtained. the incidence of blue and green mold of citrus was reduced by 25.56% and 10.00% *in vivo* experiment after 7 days respectively. The strain UV20-13 was tested by the experiments of subculture and dynamic growth, and the results showed that the strain UV20-13 was better than *K.apiculata* in the growth characteristics, and it did not appear retrogression, reversion mutation *ect* after subculturing 10 generations. Therefore the strain UV20-13 had genetic stability.

**Keywords:** Citrus, Postharvest diseases, *Kloeckera apiculata*, Mutation breeding, Ultraviolet radiation

本实验室从柑橘园根际土壤中分离获得一株柠檬形克勒克酵母(*Kloeckera apiculata*)34-9, 该菌对柑橘青霉病菌(*Penicillium italicum* Wehmer)、柑橘绿霉病菌(*P. digitatum* Sacc.)和葡萄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)等具有较强的拮抗作用<sup>[1]</sup>。

紫外线是一种使用最早、沿用最久、应用广泛、效果明显的物理诱变剂, 在微生物育种史上曾经发挥过及其重要的作用, 迄今仍然是微生物育种中最常用和有效诱变剂之一<sup>[2]</sup>。王关林等以发根土壤杆菌K84 为供试菌株, 对其进行紫外诱变, 筛选出高产细菌素的目的菌株WJK84-1, 通过琼脂扩散法和液体培养法测试表明, WJK84-1 菌株和其产生的P-2001 细菌素均对C58 病原菌有明显的抑制作用<sup>[3]</sup>。彭园花等以青霉M1-1 为出发菌株, 经过紫外诱变和透明圈筛选得到两株遗传性状稳定的高产木聚糖酶菌株M128 和M195<sup>[4]</sup>。34-9 为野生型菌株, 在研究应用中发现其生物量、抑菌活性还有待提高, 本研究拟通过紫外诱变对其进行遗传改良, 用离体和活体筛选相结合的方法从随机挑选的突变株中筛选高效菌株, 以期进一步提高其抑菌活性和生物量。

## 1 材料与方法

### 1.1 出发菌株

柠檬形克勒克酵母(*K.apiculata*), 由本实验室分离鉴定, 现保存于中国典型培养物保藏中心(武汉), 保藏编号, CCTCC No: M204025。

### 1.2 培养基

1.2.1 基础培养基: 20%豆芽汁培养基: 称取黄豆芽200 g, 加水煮沸30 min 后, 用双层纱布过滤并加水至1 L, 加琼脂20 g, 葡萄糖50 g, 自然pH 值。用于平板和斜面培养。

1.2.2 种子培养基: NYDB 培养基: 营养肉汤8 g, 酵母膏5 g, 葡萄糖10 g, 水定容至1 L, 自然pH 值。

1.2.3 发酵培养基: YPD 培养基: 酵母膏10 g, 蛋白胨20 g, 葡萄糖20 g, 水定容至1 L, pH5~5.5。

### 1.3 方法

1.3.1 菌悬液的制备: 在活化的34-9 菌种斜面上用接种环取两环接种于盛有50 mL 种子培养基的三角瓶中, 28℃培养24 h 后, 取1 mL 种子液转入发酵培养基中(50 mL/250 mL), 28℃, 200 r/min 振荡培养至对数生长期。发酵液4000 r/min 离心15 min, 弃上清, 沉淀用无菌水洗涤2 次, 再转入盛有无菌玻璃珠的三角瓶内振荡10 min, 使其充分分散, 无菌脱脂棉

或滤纸过滤, 调整浓度至 $10^6$  CFU/mL。

1.3.2 紫外诱变: 取菌悬液10 mL 于90 mm 无菌培养皿中, 置于磁力搅拌器上, 照射10 min, 对皿进行表面消毒(提前开紫外灯30 min, 使光波稳定), 再15 W 30 cm 分别照射5 s、10 s、20 s、30 s、40 s。取1 mL 各处理液10 倍梯度稀释, 取最后3 个浓度梯度涂平板, 28℃避光培养48 h。每处理3 个重复, 未处理菌悬液为对照。各步操作在红光或避光下进行。

1.3.3 紫外线和光照复活交替处理: 菌悬液经紫外处理后于100 W 的白炽灯下光照复活2 h, 再增加紫外照射剂量, 如此交替2 次。取1 mL 处理液稀释涂平板, 28℃培养48 h。

1.3.4 UV+LiCl: 菌悬液经紫外处理后分别涂布于含0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% LiCl(W/V)的平板, 28℃避光培养48 h。每处理3 个重复, 以未加LiCl 为对照。

1.3.5 初筛: 诱变后随机挑取生长速度快, 形态不同的单菌落70 个, 转接斜面4℃保存。活化诱变菌株并调配成 $10^8$  CFU/mL 的菌悬液, 取200  $\mu$ L 涂平板, 28℃培养48 h, 用内径为5 mm 的打孔器打孔, 制备酵母琼脂块。出发菌株为对照。

柑橘青、绿霉病菌病原菌, 28℃培养7~14 d 后, 配成 $10^5$  spores/mL 的孢子悬浮液。

将60 mL 培养基熔化, 冷至50~55℃时, 混入6 mL 病原孢子悬浮液, 摇匀, 迅速倒入无菌的玻璃方盘, 待冷却凝固后, 用接种针挑取酵母琼脂块, 菌面朝上置于方盘培养基上, 每方盘7 个诱变菌株、1 个对照, 每菌2 个重复, 28℃倒置培养48 h, 根据抑菌圈大小筛出高效突变株, 并转接斜面4℃保存。

1.3.6 摇瓶复筛: 将初筛出的菌株, 按1.3.1 的方法振荡培养48 h, 离心收集菌体并制备菌悬液, 然后按1.3.5 的方法进行复筛, 每处理3 个重复。根据抑菌圈大小筛出高效突变株, 并转接斜面4℃保存。

1.3.7 活体(*in vivo*)复筛: 将摇瓶筛选出的突变株制备成 $10^8$  cfu/mL 的菌悬液, 病原菌制备成 $10^5$  spores/mL 的孢子悬浮液。

选择无病虫害、无自然伤口、成熟度和大小一致, 未经任何处理的柑橘果实(温州蜜柑, 采果于华中农业大学柑橘园), 2% NaClO 溶液浸泡2 min, 无菌水冲洗后晾干。在果实腰部刺一5 mm 深、3 mm 宽的伤口(不伤及果肉)。先接种20  $\mu$ L  $10^8$  cfu/mL 的酵母悬浮液, 4 h 后, 再分别用相同体积的青、绿霉病菌孢子悬浮液挑战接种, 于恒温恒湿培养箱(95%

相对湿度, 25℃)中培养, 7 d后统计病果数, 计算果实的发病率。以出发菌株和只接病原菌为对照。每处理 30 个果, 3 个重复。实验重复 3 次。

**1.3.8 突变株生长特性测定:** 将活体筛选出的菌株按 1.3.1 的方法培养, 每 2 h 取出发酵液用无菌水稀释 10 倍, 以未接种的发酵培养基作空白, 用 722S 型分光光度计测定发酵液在 600 nm 处的光密度(*OD*值), 比色杯光程 1 cm, 测 36 h。以出发菌株为对照, 每处理 3 个重复。

**1.3.9 突变株遗传稳定性测定:** 将活体筛选出的菌株在斜面上连续传代 10 次, 选取第 2、4、6、8、10 代培养物按前述方法测定对柑橘青、绿霉菌的抑菌活性。第 0 代菌株为对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌悬液制备

对数生长期的菌体细胞生长速率大, 酶系丰富, DNA合成旺盛, 与这些基本生理功能相关的基因表达活跃, 此时进行紫外处理, 对其基因结构造成突变的机率大, 突变率高<sup>[3]</sup>。34-9 菌株在 YPD 中 8 h 进入对数生长期, 14 h 后达到稳定期, 因此, 选择 12~14 h 的菌体细胞作为制备菌悬液的材料<sup>[5]</sup>。

### 2.2 诱变剂量的确定

统计各处理致死率, 结果见图 1 和图 2。由图可知, 致死率随处理剂量的增加而增加。由于诱变剂都有杀菌和诱变双重效应。近年来的研究认为, 致死率在 70%~80% 的诱变剂量, 诱变效果好<sup>[6]</sup>, 因

此, 本实验拟定各处理的剂量为: 紫外诱变照射时间为 20 s, 紫外 + 光复活诱变首次 UV 照射时间为 20 s, 光复活后 UV 照射时间为 40 s<sup>[7]</sup>, UV+LiCl 复合处理时 UV 照射时间为 20 s, 平板培养基中加入 0.3% 的 LiCl。

### 2.3 初筛

将菌悬液进行紫外、紫外线 + 光照复活交替、UV+LiCl 处理后, 共初筛出 41 个突变菌株, 进入下一步的摇瓶复筛。

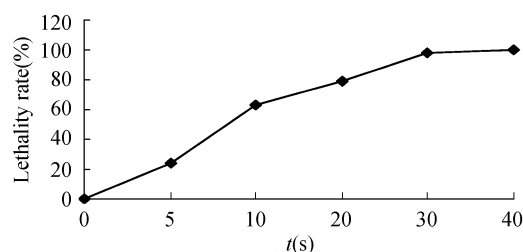


图 1 UV 处理剂量与致死率

Fig. 1 Lethality rate of spores treated with UV

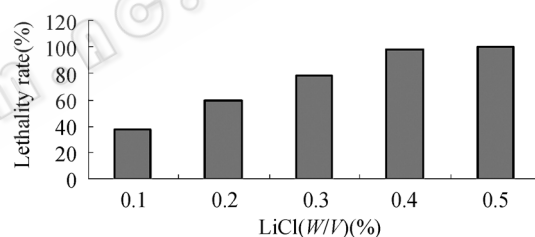


图 2 UV+LiCl 处理剂量与致死率

Fig. 2 Lethality rate of spores treated with UV+LiCl

表 1 紫外、紫外线和光照复活交替、UV+LiCl 处理摇瓶复筛结果

Table 1 The prescreening results of different treatments by UV、UV+Photoreactivation and UV+LiCl

菌株 Strain	青霉菌 <i>P. italicum</i>		绿霉菌 <i>P. digitatum</i>	
	抑菌圈直径(mm) Inhibition diameter(mm)	相对提高率(%) Correspondingly enhance rate(%)	抑菌圈直径(mm) Inhibition diameter(mm)	相对提高率(%) Correspondingly enhance rate(%)
UV20-13	16.81b*	18.21	15.31bc	17.68
UV20-54	16.95b	19.20	14.55bcd	11.84
UV20-60	16.21bc	13.99	14.30bcd	9.92
UV20-67	15.59bcd	9.63	15.35b	17.99
UV20-13-1	19.36a	36.15	20.21a	55.34
UV20-13-9	15.17cd	6.68	13.37cd	2.77
UV20-13-22	15.86bc	11.53	14.54bcd	11.76
UV+LiCl-25	15.27cd	7.38	14.66bcd	12.68
34-9	14.22d	0	13.01d	0

\*同列相同字母表示邓肯多重检验差异不显著( $P < 0.05$ )

\*The same letter in a column means no significant difference at  $P < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

2.4 摇瓶复筛

将初筛出的 41 个突变菌株，反复摇瓶复筛，共筛选出 8 个突变菌株，其结果见表 1。由表 1 中可以看出：8 个突变菌株的抑菌效果相对出发菌株 34-9 都有明显提高，经 SAS 分析，UV20-13-1、UV20-54、UV20-13 菌株相对提高率与其他突变株差异显著，拮抗柑橘青霉病的抑菌圈直径相对提高率达 36.15%、19.20%、18.21%，拮抗柑橘绿霉病的抑菌圈直径相对提高率达 55.34%、11.84%、17.68%。

2.5 活体(in vivo)复筛

将摇瓶复筛出的 8 个突变菌株，果实表面挑战

接种培养 7 d 后,各处理发病率如表 2。由表 2 可知 UV20-13 菌株处理后发病率较低,青霉病仅为 13.33%，绿霉病仅为 16.67%，相对出发菌株 34-9 发病率分别降低 25.56%和 10.00%，且显著低于其他各处理。

2.6 UV20-13 菌株生长特性

由图 3 可以看出：诱变菌株 UV20-13 的生长趋势与出发菌株 34 - 9 基本一致，但 UV20-13 延迟期比 34-9 略短，而对数生长期比 34-9 略长，由此可见，UV20-13 的生长特性优于 34-9。

表 2 不同菌株对柑橘青、绿霉病的拮抗效果				
Table 2 The antagonism of different stains against blue and green mold of citrus				
菌株 Strain	青霉病 Blue mold		绿霉病 Green mold	
	病果数/处理果数 Decay fruit number /treated number	发病率(%) Infection rate(%)	病果数/处理果数 Decay fruit number /treated number	发病率(%) Infection rate(%)
UV20-13	12/90	13.33g <sup>*</sup>	15/90	16.67g
UV20-54	24/90	26.67f	18/90	20.00gf
UV20-60	25/90	27.78ef	24/90	26.67ef
UV20-67	30/90	33.33de	47/90	52.59c
UV20-13-1	81/90	90.00b	84/90	92.96a
UV20-13-9	33/90	36.67d	36/90	40.00d
UV20-13-22	66/90	73.33c	64/90	71.11b
UV+LiCl-25	32/90	35.56d	30/90	33.33de
34-9	35/90	38.89d	24/90	26.67ef
CK(只接病菌)	90/90	100.00a	90/90	100.00a

\*同列相同字母表示邓肯多重检验差异不显著(P < 0.05)  
\*The same letter in a column means no significant difference at P < 0.05 by Duncan’s multiple range test.

表 3 UV20-13 菌株遗传稳定性实验					
Table 3 The inherited stability of UV20-13					
遗传代数 Inherited generation number	F <sub>2</sub>	F <sub>4</sub>	F <sub>6</sub>	F <sub>8</sub>	F <sub>10</sub>
青霉病抑菌圈直径(mm) Blue mold inhibition Diameter(mm)	16.02a <sup>*</sup>	15.97a	16.11a	15.88a	16.18a
绿霉病抑菌圈直径(mm) Green mold inhibition diameter(mm)	15.05a	15.18a	15.14a	15.12a	15.02a

\*同行相同字母表示邓肯多重检验差异不显著(P < 0.05)  
\*The same letter in a row means no significant difference at P < 0.05 by Duncan’s multiple range test.

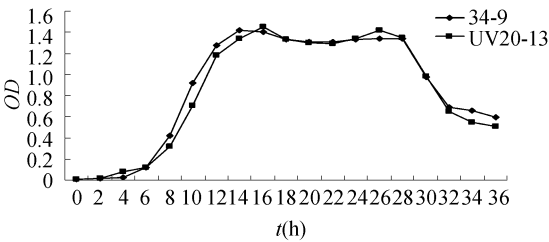


图 3 UV20-13 的生长动态  
Fig. 3 The growth dynamics of UV20-13

2.7 UV20-13 菌株遗传稳定性

UV20-13 菌株在斜面上连续转接 10 代，选取其中 5 代测定抑菌活性，实验结果见表 3。由表 3 可以看出，UV20-13 各代菌株的抑菌活性无显著差异，表明该突变株遗传性稳定。

### 3 讨论

(1) 本研究采用紫外及其复合诱变对 34-9 进行改良, 通过离体和活体筛选相结合的方法, 最终获得一株生理特性有明显改善且稳定性良好的突变株 UV20-13, 果实试验中柑橘青、绿霉病的发病率分别比出发菌株降低 25.56% 和 10.00%。但能否降低果蔬其它病害的发生率, 还有待于进一步的研究。

(2) 本研究中出发菌株抑菌机理不明, 因此诱变处理后随机挑取突变子, 需尽可能扩大选择范围, 从大量菌落中才有可能筛选到抑菌活性增强的菌株, 需消耗大量的人力和物力<sup>[8]</sup>。若探明其抑菌机制, 再选择相应的检测手段, 有针对性的进行筛选, 将缩小工作量, 提高筛选效率。

(3) 本研究将离体与活体相结合的技术用于诱变育种中, 但试验中发现部分菌株离体和活体筛选结果不完全一致。例如, 筛选过程中 UV20-13-1 在离体上产生明显的抑菌圈, 但活体试验却对柑橘青、绿霉病失去了抑制能力, 发病率分别高达 90.00% 和 92.96%, 可能是突变后发生回复突变<sup>[9]</sup>, 也可能是离体和活体营养条件不同造成的。因此, 在生防菌的诱变筛选中不仅要两者相结合, 更应注重活体筛选。

### 参考文献

- [1] Long Chao-An, Wu Zheng, Deng Bo-Xun. Biological control of *Penicillium italicum* of Citrus and *Botrytis cinerea* of Grape by Strain 34-9 of *kloeckera apiculata*. *Eur Food Res Technol*, 2005, **221**: 197-201.
- [2] 施巧琴, 吴松刚. 工业微生物育种学. 北京: 科学出版社, 2003, pp.71-74.
- [3] 王关林, 姜 丹, 方宏筠, 等. 高产细菌素菌株 WJK84-1 的诱变筛选及其对植物病原菌抑菌机理的研究. *微生物学报*, 2004, **44**(1): 23-27.
- [4] 彭园花, 卢红梅, 曾祥钦. 高产木聚糖酶菌株的诱变筛选及其产酶性质. *酿酒科技*, 2006, **148**(10): 34-36.
- [5] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2005, pp.174-175.
- [6] 陶金莉, 沈亚领, 魏东芝, 等. 产灵菌红素沙雷氏菌的诱变育种. *微生物学通报*, 2004, **31**(2): 45-48.
- [7] 陈声明, 张立钦. 微生物学研究技术. 北京: 科学出版社, 2006, pp.101-103.
- [8] 王瑞霞, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 枯草芽孢杆菌 B-903 菌株的诱变选育. *微生物学通报*, 2005, **32**(5): 10-13.
- [9] 诸葛健. 工业微生物育种学. 北京: 化学工业出版社, 2006, pp. 22-23.

### 稿件规范化与标准化

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学各分支学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 最好包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势。即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。