

物理化学诱变选育冠菌素高产菌株

吴慧玲, 李召虎

中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193

摘要 冠菌素是一种能够引起大豆叶片黄萎病的致病因子。它作为茉莉酸类物质的结构类似物在植物抵抗各种环境胁迫中起着重要作用。但是目前冠菌素产量比较低,这就限制了冠菌素生理作用的广泛研究。本试验通过紫外、亚硝基胍结合诱变选育冠菌素高产突变体,得到的突变体冠菌素产量是出发菌株的 1.8 倍,命名为 M-18。该菌株在 18℃下发酵生产冠菌素,产量大幅度提高,发酵周期明显缩短。

关键词 冠菌素;丁香假单胞菌大豆致病变种;紫外-亚硝基胍;诱变;选育

中图分类号 Q939.92

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2009)12-0034-04

Screening of High Coronatine Mutants Induced by Mutagenesis with UV and NTG

WU Huiling, LI Zhaohu

College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China

Abstract Coronatine(COR) is a phytotoxin that can induce bacterial blight in soybean (*Glycine max* L.). It is a structural and functional analogue of jasmonic acid, produced by many plant species in response to stress. COR might be employed in agriculture to elicit plant resistance against various aggressors. But the low yield of COR has limited its applications in research. In our study, COR biosynthesis is enhanced by combination of ultraviolet (UV) radiation and *N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG) mutagenesis in *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* PG4180. Wild-type *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180 is exposed to UV and NTG, to create a mutant M-18 with a high yield of COR. The yield of COR of strain M-18 is increased about 1.8-fold and reaches the maximum COR production in less than one-half of the time that the wild-type *P. syringae* pv. *glycinea* PG4180 takes. The pH of the culture medium is decreased much earlier with the mutant M-18 than the wild-type, which confirms that the fermentation period of the mutant is shorter than that of the wild strain.

Keywords coronatine; *P. syringae* pv. *Glycinea*; UV-NTG; mutagenesis; screening

0 引言

冠菌素(coronatine, COR)是一种非特异性宿主的植物毒素,它可以诱导植物组织缺绿、肥大或抑制植物根的伸长。许多丁香假单胞菌属的一些致病变种能够产生冠菌素,这些细菌是大豆十字花科及番茄的病原菌^[1-4]。冠菌素与植物生长调节物质脱落酸、茉莉酸具有类似的功能,而且活性是后两者的数千倍,可作为后两者(较为昂贵,生产上很难推广)的替代品^[5-10]。冠菌素属纯天然品,生产上应用不会对环境造成污染,是一种环境友好型生物调节剂。冠菌素可以调节植物细胞和组织防御相关的次生代谢物的积累和抗逆相关基因的表达^[7,11],因此,冠菌素有望作为一种非常有价值的工具应用于农业植物抗逆胁迫中。目前对于冠菌素的研究一直停留在实验室阶段,其原因是纯化得到冠菌素非常困难,只有个别实验室为了研究需要,纯化了少量样品。目前制约冠菌素产业化的重要因素是缺少高产的优良菌株。

冠菌素由一个来自异亮氨酸的冠烷酸 (Coronamic Acid, CMA)和一个聚酮结构的冠菌酸 (Coronafacic Acid, CFA)以酰氨键连结而成,CFA 和 CMA 的产量较低^[1,12-14]。由于化学合成冠菌素步骤繁多,成本较高,因此有必要研究冠菌素发酵高产菌株^[7,15]。

本研究利用紫外、亚硝基胍结合诱变选育冠菌素高产菌株,得到高产突变体,并对其进行致病性检测,以期在获得冠菌素高产的同时不会引起严重病害。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

丁香假单胞菌大豆致病变种 (*P. syringae* pv. *glycinea*) PG4180、冠菌素标准样品均由美国 C.L. Bender 教授惠赠。

收稿日期: 2009-03-23

基金项目: 中国高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA10A213)

作者简介: 吴慧玲,博士研究生,研究方向为植物生物调节剂,电子信箱:wuhuilin925@yahoo.com.cn;李召虎(通信作者),教授,研究方向为植物生长调节剂,电子信箱:lizhaohu@cau.edu.cn



1.2 培养条件

丁香假单胞菌生长培养基为 MG^[16], 发酵培养基为 HSC, 培养温度为 28℃^[17]; 所用抗生素卡那霉素终浓度为 10 μg/mL

1.3 制备细菌悬浮液

将出发菌株丁香假单胞菌大豆致病变种 PG4180 接种于具有卡那霉素抗性的 MG 固体培养基上, 28℃培养 48 h 左右; 挑单菌落接种于 MG 液体培养基, 在 280 r/min 条件下振荡培养至 OD 值达到 0.7 左右; 离心, 弃去上清液, 将所得菌体用磷酸缓冲液 (pH 7.0) 冲洗 4~5 遍悬浮菌体, 使浓度为 10⁶~10⁷ cfu/mL。

1.4 诱变处理

1.4.1 紫外线(UV)诱变

一切操作均在红光下或避光进行。紫外灯的功率为 15 W, 照射距离为 30 cm。将 3 mL 菌液和磁力搅拌棒放入直径为 9 cm 的无菌培养皿中, 搅拌照射时间为 10 s。

1.4.2 亚硝基胍(NTG)诱变

在通风橱内用少量丙酮将亚硝基胍助溶后, 加磷酸缓冲溶液(pH 7.0), 其比例为 9:1(缓冲溶液 9 mL, NTG 丙酮溶液 1 mL), NTG 母液浓度 1 mg/mL, 保存于棕色瓶中。将悬浮菌液和 NTG 溶液反应。该反应进行正交处理, 处理时间分别为 5, 10, 20, 30 min, NTG 处理最终浓度分别为 0.1, 0.05, 0.01 mg/mL, 共设有 9 个处理。

1.4.3 终止反应

用 2 mL 柠檬酸缓冲液(pH 5.6)稀释反应液终止反应后, 洗涤 2~3 次, 离心, 沉淀, 用等体积液体 MG 培养基重新悬浮, 涂布到 MG 固体培养基上。每个处理稀释 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁵, 10⁻⁷ 共 5 个梯度, 每个梯度作 2 个重复涂平板, 在 28℃条件下培养 5~10 d, 将长出的单菌落转接到新的 MG 固体培养基上, 再在 28℃条件下培养 24~36 h。挑选 2 000 个单菌落进行初筛。

1.5 筛选方法

1.5.1 平板划线预筛

从分离平板挑取生长快且形态明显变异的菌落划线接种于基础培养基平板上, 培养 48 h, 转接于小瓶发酵初筛。

1.5.2 小瓶发酵初筛

预筛所得菌株接种于试管, 在 3 mL 种子培养基上培养 24 h, 转接于装有发酵培养基的 250 mL 三角瓶培养, 在 18℃、280 r/min 条件下振荡培养 7 d, 重复接种 3 瓶。微量提取冠菌素, 用色谱淋洗剂甲醇溶解, 采用高效液相色谱法^[17]测定冠菌素含量。

1.5.3 大瓶复发酵复筛

用初筛出的高产菌株在种子培养基上培养, 28℃、280 r/min 条件下培养 48 h, 得到种子液。将种子液按 2%接种量转接于发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 18℃、280 r/min 条件下培养 7 d。重复接种 3 瓶, 大量提取冠菌素。

1.6 冠菌素样品的提取及测定

冠菌素的提取采用微量提取法^[17]。取 0.7 mL 发酵液于离心管中, 14 000 g 离心 3 min 后取上清液 0.5 mL 到新的离心管中。

然后加入 25 μL 9 mol/L 的 HCl 和 0.5 mL 的乙酸乙酯, 振荡 10 s 后, 静置 2 min, 再取 0.4 mL 乙酸乙酯相到新的离心管中。重复上述步骤 2~3 次后, 在 55℃下水浴吹干或者自然风干后, 溶解于 250 μL 色谱级甲醇中, 置于-20℃冰箱备用。

冠菌素含量的测定采用 HPLC 法^[2]。高效液相色谱流动相由 0.05%的三氟乙酸(pH 2.9)和乙腈按 1:9 的比例配制成。待测样品在检测波长 208 nm, 速度 2 mL/min, 进样量 25 μL, 每个样品在保留 10 min 的条件下进行。根据冠菌素纯品保留时间确定提取液中是否含有冠菌素, 并通过与冠菌素标准品峰面积比较确定冠菌素的含量。

1.7 可溶性蛋白质检测

通过 15%的 SDS-PASG 分析突变体和野生型的蛋白质分布。将原菌种和突变体接种于 MG 和 HSC 的培养液中(用装量为 200 mL 的三角瓶装 100 mL 培养液) 分别在 18℃和 28℃下培养, 将 OD 值达到 0.4 的发酵液以 12 000 r/min 离心 20 min, 将沉淀物用 25 mmol/L 的 Tris 缓冲液洗涤 2 遍, 然后悬浮于 2 mL 的蛋白提取液(pH 6.8, 0.06 mmol/L Tris, 10%甘油, 2% SDS, 5%巯基乙醇 1 和 0.001%溴酚蓝), 上样量为 20 μL^[18]。

1.8 统计学方法

实验结果用 SAS 8.0 软件统计分析差异显著性, $P \leq 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 NTG 最佳诱变条件的确定

利用 NTG 处理菌液时间分别为 5、10、20、30 min, 不同剂量的 NTG, 使其作用的最终浓度分别为 0.01、0.05、0.1 mg/mL, 设计正交试验, 所得致死率如表 1 所示。

表 1 不同 NTG 处理剂量、时间下的细菌致死率(%) Table 1 The lethality rate of different time and concentration treated by NTG			
时间/min	浓度/(mg·mL ⁻¹)		
	0.01	0.05	0.1
5	15.21	18.33	37.69
10	28.56	32.16	57.35
20	41.38	47.18	79.17
30	60.96	62.54	89.13

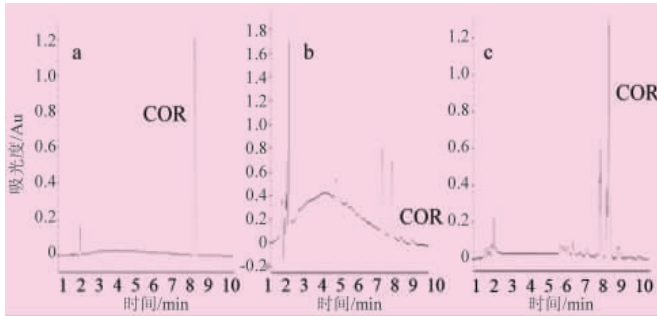
结果表明, 浓度为 0.1 mg/mL, 处理 20 min 时的致死率是 79.17%, 可作为诱变处理的最佳作用条件。

2.2 高效液相测定冠菌素产量

将利用上述提取方法得到的冠菌素粗提物进行高效液相色谱法检测。检测冠菌素标准样品表明, 冠菌素停滞时间在 7.6 min 左右; 从冠菌素粗提物提取 COR, 在 7.6 min 时也有比较明显的波峰出现, 证明得到的粗提物即为冠菌素, 命名为 M-18(图 1)。

2.3 突变株 M-18 的冠菌素产量及稳定性分析

诱变处理后得到的高产突变菌株 M-18, 经多次继代后,



(a) 标准样品 (b) 野生型 PG 4180 (c) 突变体 M-18COR
(a) STD (b) wild-type PG 4180 (c) COR of M-18

图 1 高效液相色谱检测冠菌素产量

Fig. 1 HPLC chromatogram of standard

高产性能比较稳定,重复多次,产量可达 80 mg/L,其产量变异系数为 0.038,经方差分析,其产量与对照相比,差异显著,是目前报道最高产量(40 mg/L)的 2 倍^[17](图 2)。

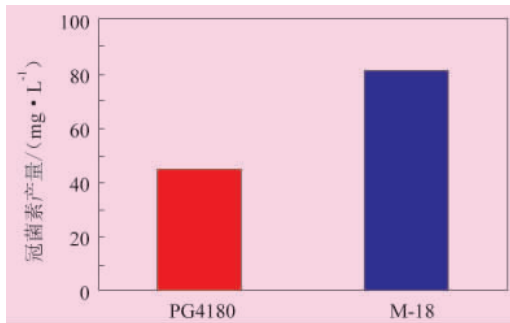


图 2 突变株 M-18 及出发菌株 PG4180 冠菌素产量

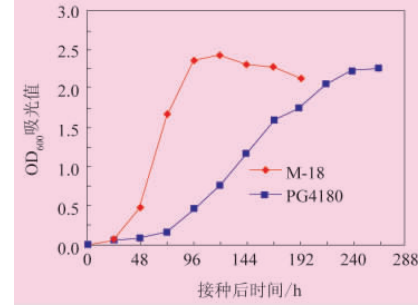
Fig. 2 Coronatine yield of mutant strain M-18 and original strain PG4180

2.4 突变株 M-18 与出发菌株 PG4180 细胞生长和 pH 值变化

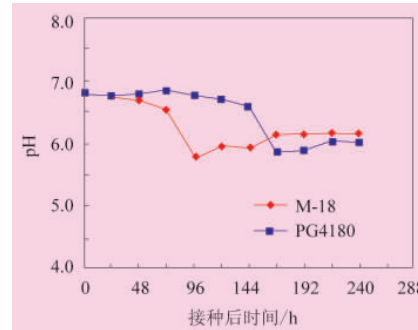
突变株 M-18 在接种后第 4 天,其 OD₆₀₀ 值达到最大,而且冠菌素产量也达到最大,而出发菌株在接种后大约 7 d 左右 OD₆₀₀ 值、冠菌素产量才达到最大。发酵工艺研究表明,冠菌素提取的最适时间为 pH 值下降到一定值回升后的第 1 天,此时冠菌素产量最大,M-18 的生长周期较出发菌株明显缩短,而且该突变株 pH 值的变化周期也较出发菌株明显提前,所以该突变体在节约能源方面具有重要意义(图 3)。

2.5 特异蛋白分析

通过 15% 的 SDS-PAGE 分析突变株 M-18 和野生型 PG4180 的蛋白分布,发现突变株 M-18 在种子培养基和发酵培养基上培养时都有一条分子量大约为 35 kDa 的蛋白特异带,而且无论在种子培养基还是在发酵培养基中,突变株的一些非特异蛋白带的表达都明显增强。I. P. Budde 等^[19]推测,冠菌素在 18℃ 时产量最大是由于一些与冠菌素合成有关的蛋白酶类在 18℃ 下稳定性最强且表达增强,故该突变体对于冠菌素的合成机制及其作用特性的研究将会起到重要作用(图 4)。



(a) OD₆₀₀



(b) pH

图 3 突变株 M-18 与出发菌株 PG4180 OD₆₀₀ 值和 pH 值变化

Fig. 3 Cell growth and media pH of M-18 and PG4180

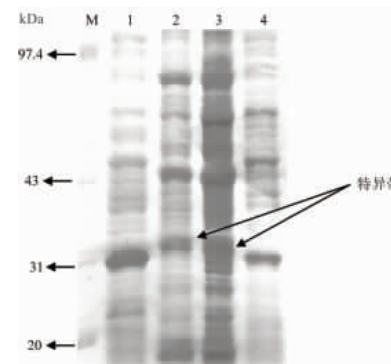


图 4 突变株 M-18 和野生型 PG4180 可溶性蛋白分析

Fig. 4 Soluble protein assay of mutant M-18 and wild type PG4180

注: M—标准蛋白质;泳道 1—18℃ 下培养的 PG4180;泳道 2—28℃ 下培养的 M-18;泳道 3—18℃ 下培养的 M-18;泳道 4—28℃ 下培养的 PG4180

Notes: M: Marker; Lane 1: PG4180 grown at 18℃; Lane 2: M-18 grown at 28℃; Lane 3: mutant M-18 grown at 18℃; Lane 4: PG4180 grown at 28℃

3 讨论

微生物菌株诱变的方法有很多,包括物理、化学方法,以及随着微生物学、生化遗传学的发展,出现了转化、转导、原生质体融合、代谢调控和基因工程等较为定向的育种方法。由于冠菌素的具体合成机制尚不清楚,因此还不可能采用定向诱变等方式来进行诱变,只能根据经典的微生物育种方法



来选育冠菌素的工业生产菌株。物理诱变主要包括紫外线、电磁辐射和中子、X 射线、 γ 射线、中子以及 β 射线等等。化学诱变剂主要指某些亚硝酸盐、烷化剂、碱基类似物、抗生素等化学药物。其中,紫外线是一种最常用的物理诱变因素,它的主要作用是使 DNA 双链之间或同一条链上 2 个相邻的胸腺嘧啶形成二聚体,阻碍双链的分开、复制和碱基的正常配对,从而引起突变^[20]。NTG 是一种有效的化学诱变剂,在碱性时 NTG 能形成重氮甲烷,烷化 DNA 而使基因突变,诱发突变的频率比自发突变的频率高很多^[21-22]。而复合处理可扩大突变的位点范围,增大获得正突变株的可能性^[23-24]。

4 结论

1) 通过筛选最佳紫外照射时间和 NTG 处理时间以及浓度,最终筛选得到丁香假单胞菌大豆致病变种 PG4180 最佳时间与浓度的组合,得到的突变株 M-18 经多次传代后高产性能比较稳定,不仅在形态、颜色上与出发菌株有明显差异,而且生长周期较出发菌株有明显缩短,对于工业化生产冠菌素起着重要的作用。

2) 本研究结果显示,该突变的 COR 产量达到 80 mg/L,是出发菌株的 1.8 倍左右,且多次重复实验显示,该突变体的高产性能稳定;生长曲线测定显示,该突变体的生长周期较野生型明显缩短。从节能方面来说,该突变体的得到具有重要意义。

3) 特异蛋白分析显示,突变体中有分子量大约 35 kDa 的蛋白特异带,这说明该突变体确实发生了未知的基因变异,并且引起蛋白表达的特异。

参考文献 (References)

- [1] Bender C L, Alarcon-Chaidez F, Gross D C. *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases [J]. *Microbio Molecul Biol Rev*, 1999, 63: 266-292.
- [2] Mitchell R E, Hale C N, Shanks J C. Production of different pathogenic symptoms and different toxins by strains of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* not distinguishable by gel-immunodiffusion assay[J]. *Physiol Plant Pathol*, 1983, 23: 315-322.
- [3] Wiebe W L, Campbell R N. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and comparison with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*[J]. *Plant Dis*, 1993, 77: 414-419.
- [4] Mitchell R E. COR production by some phytopathogenic *Pseudomonads* [J]. *Physiol Plant Pathol*, 1982, 20: 83-89.
- [5] Bender C L, Palmer D A, Penaloza-Vazquez A, et al. Biosynthesis of coronatine, a thermoregulated phytotoxin produced by the phytopathogen *Pseudomonas syringae*[J]. *Arch Microbiol*, 1996, 166: 71-75.
- [6] Weiler E W, Kutchan T M, Gorba T, et al. The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants[J]. *FEBS Lett*, 1994, 345: 9-13.
- [7] Göde S, Axel M, Ian T, et al. Coronalon: A powerful tool in plant stress physiology[J]. *FEBS Lett*, 2004, 563: 17-22.

- [8] Fliegmann J, Schüler G, Boland W, et al. The role of octadecanoids and functional mimics in soybean defence response[J]. *Biol Chem*, 2003, 384: 437-446.
- [9] Krumm T, Bandemer K, Boland W. Induction of volatile biosynthesis in the lima bean (*Phaseolus lunatus*) by leucine- and isoleucine conjugates of 1-oxo- and 1-hydroxyindan-4-carboxylic acid: Evidence for amino acid conjugates of jasmonic acid as intermediates in the octadecanoid signaling pathway[J]. *FEBS Lett*, 1995, 377: 523-529.
- [10] Mittal S, Davis K R. Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* [J]. *Mol Plant Microbe*, 1995, 8: 165-171.
- [11] Lauchli R, Boland W. Indanoyl amino acid conjugates: Tunable elicitors of plant secondary metabolism[J]. *Chem Rec*, 2003, 3: 12-21.
- [12] Ichihara A, Shiraishi K, Sato H, et al. The structure of coronatine [J]. *J Am Chem Soc*, 1977: 99, 636-637.
- [13] Parry R J, Mhaskar S V, Lin M T, et al. Investigations of the biosynthesis of the phytotoxin coronatine[J]. *Can J Chem*, 1994, 72: 86-99.
- [14] Mitchell R E. Coronatine biosynthesis: Incorporation of L-[U-¹⁴C] isoleucine and L-[U-¹⁴C] threonine into the 1-amido-1-carboxy-2-ethylcyclopropyl moiety[J]. *Phytochemistry*, 1985, 24: 247-249.
- [15] Ishihara A, Toshima H. Coronatine: chemistry and biological activities [C]//Cutler H, Cutler S. Biologically active natural products: Agrochemicals. Washington, DC: CRC Press, 1999, 93-105.
- [16] Keane P J, Kerr A, New P B. Crown gall of stone fruit. II. Identification and nomenclature of *Agrobacterium* isolates [J]. *Aust J Biol Sci*, 1970, 23: 585-595.
- [17] Palmer D A, Bender C L. Effects of environmental and nutritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*[J]. *Microbiol*, 1993, 5: 1619-1626.
- [18] Mishra M, Goel R. Development of a cold resistant mutant of plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* and its functional characterization[J]. *J Biotechnol*, 1999, 75: 71-75.
- [19] Budde I P, Rohde B H, Bender C, et al. Growth phase and temperature influence promoter activity, transcript abundance and protein stability during biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180: 1360-1367.
- [20] Gulati H K, Chadha B S, Saini H S. Production, purification and characterization of thermostable phytase from thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* TL-7 [J]. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 2007, 54: 121-138.
- [21] Adelberg E A, Mandel M, Chen G C C. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1965, 18: 788-795.
- [22] Cerda-Olmedo E, Hanawalt P C. Diazomethane as the active agent in nitrosoguanidine mutagenesis and lethality [J]. *Mol Gen Genet*, 1968, 101: 191-202.
- [23] Rubinder K, Chadha B S, Singh N, et al. Amylase hyperproduction by deregulated mutants of the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*[J]. *J Indust Microbiol Biotechnol*, 2002, 29: 70-74.
- [24] Purohit J S, Dutta J R, Nanda R K, et al. Strain improvement for tannase production from co-culture of *Aspergillus foetidus* and *Rhizopus oryzae*[J]. *Bioresource Technol*, 2006, 6: 795-801.

(责任编辑 吴晓丽)