

一株产冠菌素新菌种的分离与鉴定

王园秀^{1,2}, 吴晓玉^{1,2*}, 丰娟^{1,3}, 曾晓春⁴, 饶志强^{1,2}

(江西农业大学¹ 生物科学与工程学院,⁴ 农学院, 南昌 330045)

(² 南昌市发酵应用技术重点实验室, 南昌 330045)

(³ 宜春学院生命科学与资源环境学院, 南昌 330045)

摘要:【目的】从不同样本中分离筛选性能稳定的产冠菌素菌株。【方法】根据冠菌素引起植物叶片产生弥漫性黄萎病、块茎膨大的特性,采集各种植物病叶、病枝及感病植物的土壤,采用穿刺法与系列稀释法分离筛选菌株;液相色谱测定菌株产生的冠菌素;在电子和光学显微镜下观察菌体形态;根据生理生化试验、(G + C) mol% 含量、16S rDNA 序列分析等对菌株进行鉴定;对分离提纯的发酵产物进行紫外、质谱和红外分析。【结果】菌株 BBC933 为革兰氏阴性菌,端生鞭毛,短杆状,无芽孢。在 41℃ 下不生长,细胞内有聚 β -羟基丁酸盐颗粒积累,没有精氨酸双水解酶和氧化酶,不能水解淀粉、明胶,不进行硝酸还原及反硝化作用,过氧化氢酶反应呈阳性。菌株的(G + C) mol% 含量为 67.2%,根据该菌株 16S rDNA 序列的同源性分析,构建系统发育树。【结论】菌株 BCC933 鉴定为洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholder cepacia*),具有产冠菌素性能。国内外未曾见报道洋葱伯克霍尔德氏菌产冠菌素。

关键词: 冠菌素; 伯克霍尔德菌; 鉴定; 16S rDNA

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2010) 01-0023-06

冠菌素(也称冠毒素, coronatine, 简称 COR)于 70 年代末发现,主要由细菌产生。冠菌素分子由冠面酸(coronafacic acid, 简称 CFA)和冠氨酸(coronamic acid, 简称 CMA)通过酰胺键构成^[1-2]。它既是一种能引起多种植物弥漫性黄萎病的细菌毒素^[3],也是结构新颖的强生理活性物质。冠菌素对植物的生长调节呈现多种功能,它能促进块茎的形成与膨大,抑制种子的萌发与根的生长,促进果实脱落,增强作物耐寒性等^[4-8]。因此研究者们认为冠菌素在农业上应用前景可观,可望作为植物生长生理调节剂开发成杂交水稻花时调节剂、水稻种子发芽抑制剂、果实脱落剂等^[9-11]。研究资料显示,冠菌素由一些丁香假单胞菌致病变种产生,包括丁香假单胞菌大豆致病变种

(*Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*)、丁香假单胞菌李溃疡病变种(*P. syringae* pv. *morsprunorum*)、丁香假单胞菌麦叶褐斑变种(*P. syringae* pv. *atropurpurea*)、丁香假单胞菌斑点病变种(*P. syringae* pv. *maculicola*)和丁香假单胞菌番茄叶斑病变种(*P. syringae* pv. *tomato*)^[2-6]。本文根据冠菌素对植物的致病特征,从自然环境中广泛筛选,获得稳定的产冠菌素新菌种,并对其进行形态学、生理生化特征,及 16S rDNA 序列分析等,鉴定为洋葱伯克霍尔德氏菌。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源:根据冠菌素引起植物叶片产生弥

基金项目:博士启动基金,江西省自然科学基金(2008GJN0016);国家自然科学基金(30760113)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-791-3828080; E-mail: wuxiaoyu58@yahoo.com.cn

作者简介:王园秀(1979-)女,讲师,主要从事微生物资源开发利用

收稿日期:2009-06-22;修回日期:2009-09-23

散性黄萎病、块茎膨大的特性,采集各种蔬菜、果树的病叶、病枝及植物发病的土壤。

1.1.2 培养基:斜面培养基^[12]、发酵培养基^[13]。

1.1.3 冠菌素纯品:日本北海道大学有机化学实验室馈赠,纯度 99.5%。

1.1.4 主要试剂与仪器:葡萄糖酸盐氧化的试剂(斐林试剂)、甲基红试验(M. R 试验)试剂、乙酰甲基甲醇(V. P)试验试剂、淀粉水解试验用试剂、硝酸盐还原试验试剂、PHB 积累试剂;PCR 扩增试剂及扩增引物购自上海生工生物工程技术服务有限公司,JEOL JEM1200EX 透射电镜,Waters 1525 系列液相色谱仪购自美国沃特斯公司,Tpersonal Combi PCR 购自德国 Biometra 公司,ZHWY-211213 双层恒温培养摇床购自上海天呈科技有限公司。

1.2 菌株的分离纯化

采集的样品以平板划线法和系列稀释法分离菌株,培养获得单菌落;再将单菌落进一步划线纯化、显微镜观察;取纯化单菌落斜面培养后,检测分析。

1.3 菌株的培养条件

斜面培养:32℃,3 d;摇瓶培养:32℃培养 36 h,再 18℃降温培养 36 h。

1.4 菌株冠菌素产量的测定

菌株发酵产物冠菌素的提取及检测参考文献[13]。液相检测色谱条件:色谱柱 Symmetry C18 柱(Waters,4.6 × 150 mm,5 μm);流动相用含 0.05% 磷酸的 60% 甲醇溶液;检测波长为 230 nm,流速 1.0 mL/min,柱温 35℃。

1.5 发酵产物的鉴定

1.5.1 发酵产物的分离提取:首先采用文献[13]样品制备方法进行发酵产物的初步纯化,再利用硅胶柱层析法,以三氯甲烷-乙醇(体积比 3:1)和三氯甲烷-乙酸乙酯-丙酮(体积比 2:4:1)为流动相,对冠菌素发酵液进行多次的层析纯化。

1.5.2 发酵产物的鉴定:用紫外、质谱、红外鉴定产物结构。

1.6 菌株的鉴定

1.6.1 形态特征:光学显微镜与透射电子显微镜下观察菌体形态与运动特性;采用革兰氏染色;32℃培养 48 h 观察菌落形态。

1.6.2 生理生化特征:参考文献[14]对菌株进行生理生化鉴定。包括葡萄糖的氧化发酵、葡萄糖酸盐的氧化、甲基红试验(M. R 试验)、乙酰甲基甲醇(V. P)试验、淀粉水解、果聚糖(Levan)的形成、硝酸盐还原、硫化氢产生、甘油形成二羟基丙酮、精氨酸

双水解酶、碳源利用(pH6.5)。

1.6.3 基因组 DNA 的(G + C)mol% 含量测定:基因组 DNA 的提取参考文献[15]所述方法进行,DNA 的 G + C 含量测定采用熔解温度(T_m)法,参照菌株为 *E. coli* K₁₂。参考文献[14]。

采用 0.1SSC G + C mol% 计算公式:(G + C)mol% = 2.44(T_m - 69.3)

1.6.4 16S rDNA 序列分析:采用细菌通用引物,即 Forward Primer:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', Reverse primer:5'-TACGGCTACCTGTTCAGACTT-3',参考文献[16]。

以菌株 BCC933 的基因组为模板进行 PCR 扩增。反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 5 min,50 - 55℃ 1 min,72℃ 1.5 min,循环 30 次;72℃ 5 min。用 TaKaRa 公司回收试剂盒回收 PCR 扩增产物,送上海生工生物技术有限公司测序。菌株序列与 GenBank 数据库序列进行相似性分析,并用 MEGA 4.0 软件包中 Neighbor-joining 法构建系统进化树。

2 结果

2.1 菌株分离及形态学特征

平板划线法和系列稀释法分离菌株,培养得到单菌落,将单菌落进一步划线纯化,取单菌落斜面培养,保存。将之摇瓶发酵,乙酸乙酯萃取发酵液,HPLC 测定冠菌素含量,从中选取高产冠菌素菌株。经初筛、复筛,最后获得产冠菌素性能稳定的野生菌株 BCC933。

BCC933 菌株为短杆状,0.5 - 0.7 μm × 1.8 - 2.4 μm,无芽孢,运动,端生鞭毛,革兰氏染色阴性(图 1-A)。菌株 32℃ 下平板培养,其菌落呈圆形、光滑湿润,中心突起状,边缘整齐,为浅黄色(图 1-B)。

2.2 生理生化特征

对菌株 BCC933 进行生理生化性状测定试验。

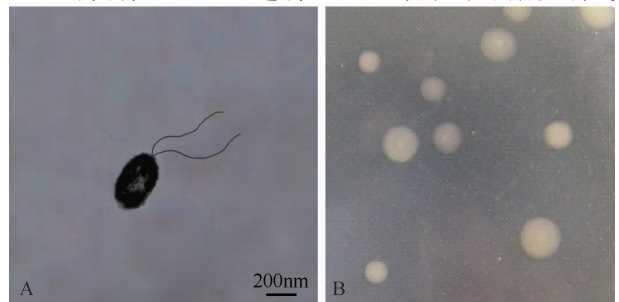


图 1 菌株 BCC933 的形态和菌落

Fig. 1 The strain BCC933 morphology and colony. A: Under transmission electron microscope (25000 ×); B: Colony photograph.

结果显示(表1),该菌株在41℃下不生长,,在金氏培养基中产荧光,细胞内有聚β-羟基丁酸盐颗粒积累,没有精氨酸双水解酶和氧化酶,不能水解淀粉、明胶,不进行硝酸还原及反硝化作用,过氧化氢酶反应呈阳性。

表1 菌株 BCC 933 生理生化试验结果

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain BCC933

Characteristics	Strain	<i>B. cepacia</i>	<i>B.</i>
	BCC933	1.1834*	<i>cepacia</i> **[14]
Fluorescent pigment on KB	+	+	+
Catalase	+	+	+
Methyl red	-	-	-
Voges-Proskauer	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-
Denitrification	-	-	-
H ₂ S production	-	+	+
PHB accumulation	+	+	+
Oxidase	-	-	V
Arginine dihydrolase	-	-	-
Hydrolysis of gelatine	-	-	V
Hydrolysis of starch	-	-	-
Growth at 41℃	-	-	-
DNA G + C mol%	67.2	66.5	67.6
Utilization of Carbon-substrates			
Rhamnose	-	+	V
Maltose	-	-	-
Citrate	+	+	+
Mucate	-	-	+
Malonate	+	+	+
Glutarate	+	+	+
Adipate	+	+	+
Azelate	+	+	+
Suberate	+	+	+
D-tartrate	-	-	-
Glycolate	+	+	V
Aconitate	+	+	+
Fructonate	+	+	+
Citraconate	+	+	+
Mesaconate	-	-	-
Phycite	-	-	-
2,3-butanediol	+	+	+
Benzoate	+	+	+
D-alanine	+	+	+
L-valine	-	-	V
Leucine	+	+	+
DL-α-propionaline	-	-	-
Anthranilic acid	+	+	+
Neovaricanine	+	+	+
Benzylamine	-	+	V
Acetamide	-	-	V
Nicotinic acid amide	+	+	V

+ positive, - negative, V variable reaction, * The strain was obtained from China general microbiological culture collection center, **Data from reference[12].

2.3 G + C 含量测定

由热扫描曲线得到菌株 BCC933 的 T_m 值为

96.8,由公式计算得 DNA 中的“G + C mol%”值为 67.2 mol%,符合 *Burkholderia* 属的“G + C mol%”值特征。

2.4 16S rDNA 序列分析及系统发育学分析

以菌株 BCC933 基因组 DNA 为模版,采用细菌通用引物进行 PCR 扩增,得到 1.45 kb 的 PCR 产物。菌株 BCC933 的 16S rDNA 序列 GenBank 登录号(accession number)GQ149776。与 GenBank 数据库中序列进行相似性分析,BCC933 菌株与 *Burkholderia cepacia* ATCC 53795 和 *Pseudomonas* sp. SMCC B0333 核苷酸序列同源性达 99%。采取 MEGA4.0 软件包中 Neighbor-joining 法构建系统发育树,结果显示菌株 BCC933 与上述 2 个菌株聚为一簇(图 2),说明它们与菌株 BCC933 的亲缘关系最近。根据 2.2 中生理生化特性描述(表 1):菌株 BCC933 能积累 PHB,可产生荧光,精氨酸双水解酶缺乏,利用 2,3-丁二醇、乙醇酸盐等。这些特性均不同于假单胞菌类,而与洋葱伯克霍尔德菌特性描述相一致^[17],且其各项生理生化检测指标和参照菌株 *Burkholderia cepacia* 1.1834 相似。综上所述,确定菌株 BCC933 为洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)。

2.5 菌株 BCC933 发酵产物的鉴定

通过采用乙酸乙酯萃取、减压蒸馏得到发酵产物的粗品,再将之进行多次硅胶柱层析分离,获得精制产物,图 3 为其液相色谱图。将纯化后的发酵产物进行如下系列检测。

紫外与可见光谱显示(图 4),发酵产品在 190-300 nm 波长范围内进行紫外吸收光谱扫描,其中在 208 nm 处出现吸收最高峰,与文献[1]中的报道相一致。

高分辨质谱 HR-ESI(图 5)证实,分子式为: $C_{18}H_{25}NO_4$, (+ K) 计算值为 358.1457,实验值 358.1421,确定产物的分子量为 319,与冠菌素分子量相同。

傅立叶红外光谱表明(图 6),产物具有与冠菌素相一致的特征吸收峰 IR(涂层): 3295.6 cm^{-1} (COOH), 2924.2 cm^{-1} (CH₃), 2853.6 cm^{-1} (CH₂), 1719.6 cm^{-1} (C=O), 1665.9 cm^{-1} (C=C), 1455.7 cm^{-1} (N-C=O)[4 Ichihara]

综上所述,可以确定菌株 BCC933 发酵所得产物为冠菌素。

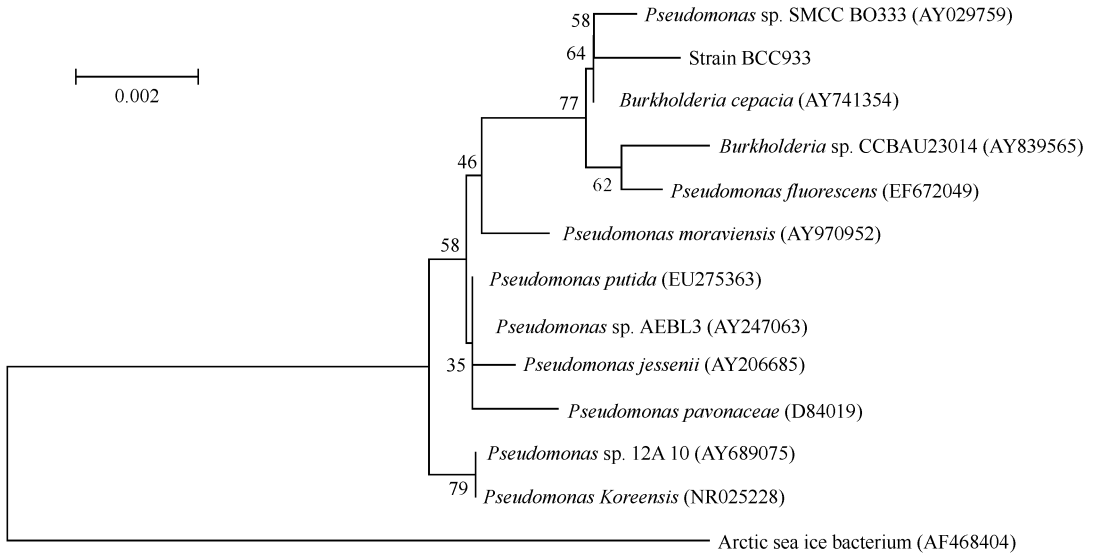


图2 基于菌株 BCC933 的 16S rRNA 基因同源性的系统发育树

Fig.2 The phylogenetic position of strain BCC933. The sequences used in the analysis were obtained from the GenBank Database (accession numbers are given parentheses). The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on 1000 resample data sets. The scale bar corresponds to 0.002 substitutions per nucleotide position.

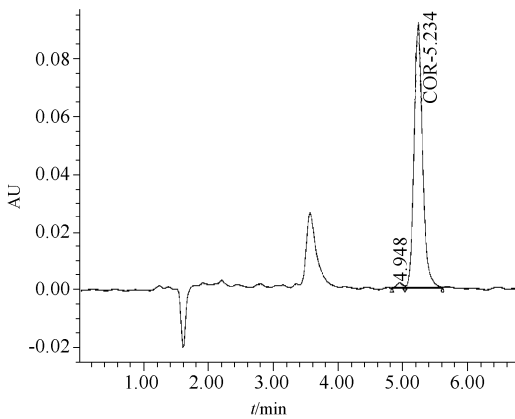


图3 发酵液分离纯化后的代谢产物液相图谱

Fig.3 HPLC chromatograph of metabolite by separating and purifying fermentation broth.

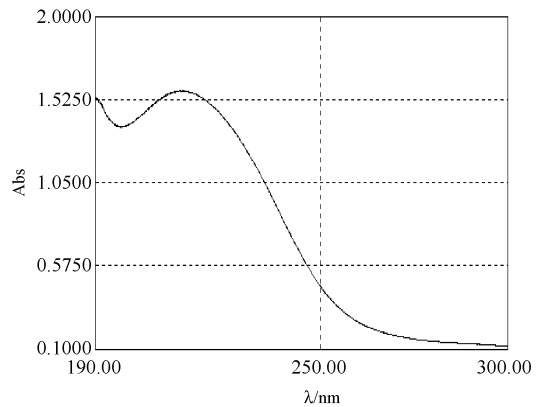


图4 发酵产物的紫外吸收光谱图

Fig.4 UV-absorbing spectrum of fermentation product.

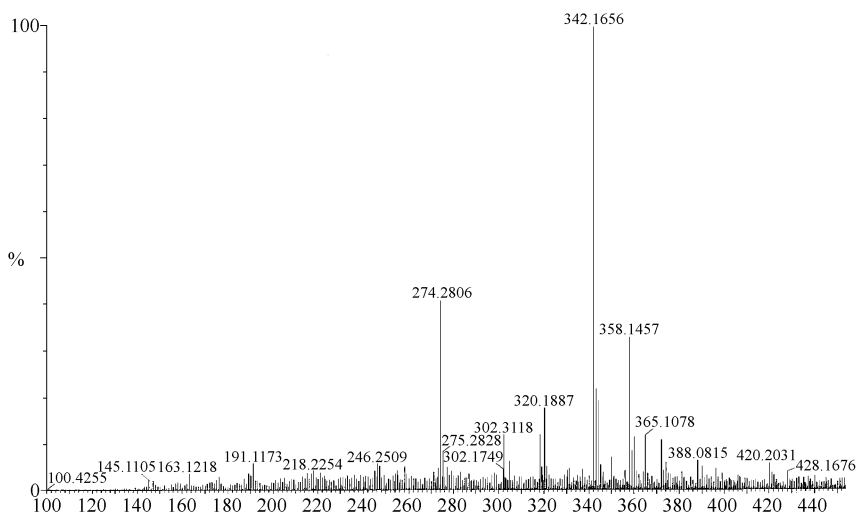


图5 发酵产物的质谱图

Fig.5 Mass spectrum of fermentation product.

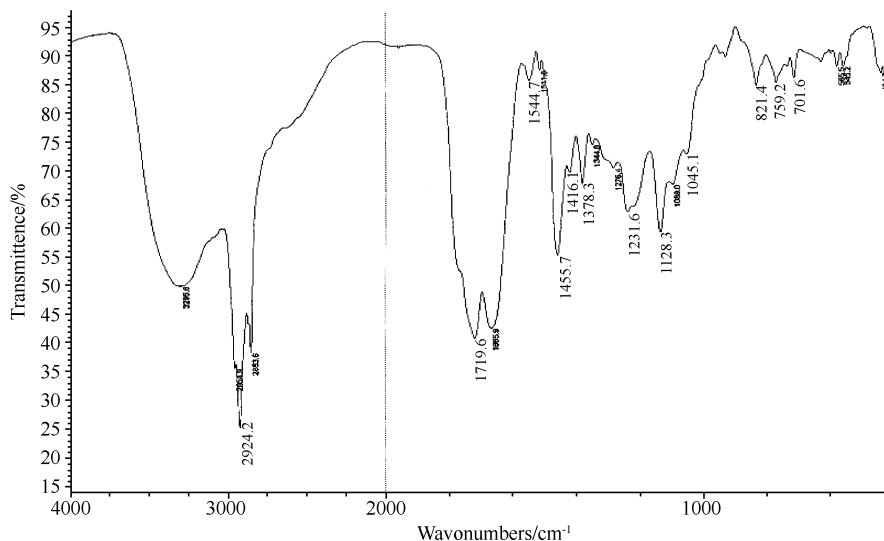


图 6 发酵产物的红外光谱图

Fig. 6 Infrared spectrum of fermentation product.

3 讨论

冠菌素是 20 世纪 70 年代末发现的、由细菌产生的一种既能引起植物弥散性黄萎病的毒素, 又具有生理活性的生物活性物质。研究显示, 其在结构和功能上与具有胁迫作用的植物内源激素茉莉酸甲酯 (MeJA) 显著相似, 具有模拟高等植物十八碳途径信号分子的功能, 且作用性能远高于后者, 在农业上具有广泛的应用前景^[4]。

依据目前的研究资料显示, 已分离筛选出的冠菌素产生菌均为假单胞菌类。伯克霍尔德菌属于 1992 年由 Yabuuchi 等提出, 从假单胞菌属中分离出来, 将其中的 7 个种转入到伯克霍尔德菌属下。随着细菌分类学研究的不断深入与新属新种的快速呈现, “伯杰氏系统细菌学手册”于 2001 年再版, 对原核生物的归群和分类系统重新编排, 将所有原核生物的种分为 31 个部分。伯克霍尔德菌属和假单胞菌属均归在细菌域变形杆菌门, 但属于不同的纲, 前者分在 β -变形菌纲伯克霍尔德菌目伯克霍尔德菌科中, 而后者划分在 γ -变形杆菌纲假单胞菌目假单胞菌科^[17]。本文根据冠菌素对植物的作用特性, 有针对性地采集样本进行分离筛选细菌菌株。通过发酵产物检测、生理生化特性测定以及 16S rDNA 序列分析等, 确定菌株 BCC933 为产冠菌素新菌种——洋葱伯克霍尔德菌 (*Burkholderia cepacia*), 此为国内外首次报道。有关此菌株的产冠菌素的遗传学特性及发酵工艺研究正在进行中。

参考文献

- [1] Ichihara A, Shiraishi K, Sato H, et al. The structure of coronatine. *Journal of the American Chemical Society*, 1977, 99:636-637.
- [2] Cuppels DA, Ainsworth T. Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronatine. *Applied and Environment Microbiology*, 1995, 61(10):3530-3536.
- [3] Gnanamaickam SS, Starratt AN, Ward EW. Coronatine production *in vitro* and *in vivo* and its relation to symptom development in bacterial blight of soybean. *Canadian Journal of Botany*, 1982, 60:645-650.
- [4] Weiler EW, Kutchan TM, Gorba T, et al. The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Letters*, 1994, 345 (1):9-13.
- [5] Vignutelli A, Wasternack C, Apel K., et al. Systemic and local induction of an *Arabidopsis thionin* gene by wounding and pathogens. *The Plant Journal*, 1998, 14 (3):285-295.
- [6] Koda Y, Takahashi K, Kikuta Y, et al. Similarities of the biological activities of coronatine and coronafacic acid to those of jasmonic acid. *Phytochemistry*, 1996, 41:93-96.
- [7] 汪宝卿, 李召虎, 翟志席, 等. 冠菌素及其生理功能. *植物生理学通讯 (Plant Physiology Communications)*, 2006, 42(3):503-510.
- [8] 齐付国, 李建民, 段留生, 等. 冠菌素和茉莉酸甲酯诱导小麦幼苗低温抗性的研究. *西北植物学报 Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2006, 26(9):1776-1780.

- [9] 周燮,曾晓春. 一种用于水稻杂种生产的花时调控方法. 中国专利:98111652. 4. 1998,11,5.
- [10] 吴晓玉,曾晓春,李昌灵,等. 冠毒素在抑制种子萌发中的应用及其简易的冠毒素生物检测方法的预处理方法. 中国专利:200710079843. 5. 2007,2,16.
- [11] Burns K J, Bender C. Coronatine as an abscission agent. US Patent:6511939. 2003,1,28.
- [12] 方中达. 植病研究方法. 第三版. 北京:中国农业出版社,1998.
- [13] Palmer DA, Bender CL. Effects of environmental and nutritional factors on production of the polyketide phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Applied and Environment Microbiology*, 1993, 59 (5):1619-1626.
- [14] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社,2001.
- [15] Osborn F, Blinder R, Justin RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖,王海林,译. 第一版. 北京:科学出版社,2001.
- [16] 莫照兰,茅云翔,陈师勇,等. 一株牙鲈皮肤溃烂症病原菌的鉴定. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2002,42(3):263-269.
- [17] Garrity MG, Brenner JD, Krieg RN, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second edition, Volume two: The proteobacteria Part C, The Alpha-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. New York: Springer,2005.

Isolation and identification of a coronatine producing strain

Yuanxiu Wang^{1,2}, Xiaoyu Wu^{1,2*}, Juan Feng^{1,3}, Xiaochun Zeng⁴, Zhiqiang Rao^{1,2}

(¹College of Bioscience and Bioengineering of Jiangxi Agricultural University, ⁴College of Agronomy of Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

(²Nanchang Key Laboratory of Fermentation application technology, Nanchang 330045, China)

(³College of life science and Resources Environment of Yichun University, Nanchang 330045, China)

Abstract: [**Objective**] We screened and isolated coronatine-producing strains from various samples. [**Methods**] The strains were isolated and selected from samples by the methods of streak plate and serial dilution. The samples were sick leaves/branches and soil in which plants got sick according to the symptoms of leaf blight disease and tuber enlargement. Coronatine production was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The strain was characterized by the physiological and biochemical analysis, the determination of (G + C) mol% contents and 16S rDNA sequencing. The molecule structure of the fermentation product was identified based on the data of ultraviolet spectrum, infrared spectrum and mass spectrum. [**Results**] Strain BCC933 was gram-negative, polar flagella, short rod and non-spore-forming bacterium and accumulated poly- β -hydroxybutyrate (PHB). It produced catalase, but not arginine dihydrolase nor oxidase, couldn't grow at temperature 41°C. It hadn't the abilities to hydrolyze starch and gelatine. No nitrate reduction and denitrification activity was detected. The (G + C) mol% content was 67.2%. We analyzed 16S rDNA nucleotide sequence, and ascertained the phylogenetic position of the strain. [**Conclusion**] Strain BCC933 with coronatine biosynthesis ability was identified as *Burkholderia cepacia*, which hasn't been reported up to date.

Keywords: Coronatine; Burkholderia; identification; 16S rDNA

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Start-up Foundation for Doctor of Jiangxi Agricultural University, the Natural Science Foundation of Jiangxi Province (2008GJN0016) and the National Natural Science Foundation (30760113)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-791-3828080; E-mail: wuxiaoyu58@yahoo.com.cn

Received: 22 June 2009 / Revised: 23 September 2009