

球孢白僵菌硝酸还原酶缺陷型突变体的筛选与鉴定

宋景荣^{1,2,3}, 徐文静¹, 赵 曦^{1,2}, 杜 茜¹, 杨信东², 李启云¹

(1. 吉林省农业科学院, 吉林 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118; 3. 内蒙古呼伦贝尔市农业科学研究所, 内蒙古 扎兰屯 162650)

摘要: 分别利用甲基磺酸乙酯(EMS)诱变原生质体和用氯酸盐培养基(WAC)诱变菌丝, 获得球孢白僵菌硝酸还原酶缺陷型突变体。EMS 诱变得到突变体 68 株, 其中硝酸盐还原酶活性最低的突变体相比于野生型菌株活性降低了 63.49%。WAC 方法诱变获得突变体菌株 19 株, 其中硝酸盐还原酶活性最低的突变体比野生型菌株活性降低了 59.46%。

关键词: 球孢白僵菌; 硝酸盐还原酶; 突变体; 筛选; 鉴定

中图分类号: S476.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2010)05-0003-04

白僵菌(*Beauveria*, SSP)是当前世界上研究和应用最多的昆虫病原真菌之一, 也是目前微生物农药研究的热点之一^[1]。随着昆虫病原真菌致病性分子机理研究的不断深入及昆虫病原真菌的遗传转化技术的日趋成熟, 基因工程技术已成为菌株改良最有效的途径之一, 然而高效、无毒选择标记是工程菌株改良的关键和限制性因素。以硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NR)作为选择标记, 将其转化 NR 基因突变菌株, 使突变菌株恢复野生型 NR 活性而建立选择体系, 可作为转基因菌株的专用选择标记, 具有抗生素和除草剂等其它

选择标记所没有的优点^[2]。通过化学物理诱变技术筛选球孢白僵菌硝酸盐突变体, 并进行了生理生化和分子生物学验证, 可为球孢白僵菌基因工程菌株改良提供很好的受体材料。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

野生型球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*) T3-1菌株为吉林省农业科学院植物保护研究所谭云峰副研究员赠予。大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 为吉林省农业科学院植物保护研究所生物农药研究室保存。

1.2 供试试剂

亚硝酸钠标准溶液, 0.100 mol \cdot L⁻¹ pH 7.5 的磷酸缓冲液, 1.00% 磺胺溶液, 0.02% 萘基乙烯胺, 0.100 mol \cdot L⁻¹ 硝酸钾溶液, 0.025 mol \cdot L⁻¹ pH 8.7 的磷酸缓冲液, 粗酶提取缓冲液, 2.000 mg \cdot mL⁻¹ NADH 溶液(现用现配)。

收稿日期: 2010-02-04

基金项目: 吉林省科技厅科技支撑计划重点资助项目(20080249)

第一作者简介: 宋景荣(1978-), 女, 吉林省德惠市人, 硕士, 助理研究员, 从事微生物农药研究。

通讯作者: 李启云(1974-), 男, 重庆市万县人, 博士, 研究员, 从事生物农药研究。E-mail: qyli@cjaas.com。

Effect of Different Plant Growth Retardants on Conservation in vitro Plantlets of Potato

ZHAO Hai-hong¹, BEI Li-xia², DING Jun-jie¹

(1. Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. Agronomy College of Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319)

Abstract: The potato variety of Kexin13 was used as experimental material, the medium supplemented with CCC 500 mg \cdot L⁻¹, B₉ 80 mg \cdot L⁻¹ and PP₃₃₃ 0.3 mg \cdot L⁻¹ were used as the regard proliferation medium, the effects of multiplication culture and conservation of different plant growth retardants were studied. The results showed that the medium supplemented with CCC 500 mg \cdot L⁻¹ was the best, could conserve the in vitro plantlets for more than 12 months. But had no significant effect on subculture.

Key words: plant growth retardants; potato; virus-free in vitro plantlets

1.3 仪器

HIMAC CR 22F 型日本日立冷冻高速离心机, SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台为苏州净化公司产品, HZQ-QX 全温振荡器购自哈东联, 紫外分光光度计为上海光谱生产, 冷冻离心机为 eppendorf 公司生产, 1% 天平为龙腾仪器公司生产, 液态氮, 恒温水浴锅, 研钵, 离心管等。

1.4 供试培养基

L-broth 培养液, 再生培养基^[3], 富集培养基^[4-5], 渗透压稳定液, 基本培养基 (BM): 30.00 g 蔗糖, 1.00 g 磷酸二氢钾, 0.50 g 七水硫酸镁, 0.50 g 氯化钾, 0.01 g 七水硫酸亚铁, 20.00 g 琼脂, 微量元素液 0.20 mL, 1 L 蒸馏水定容; 微量元素液: 5.00 g 柠檬酸, 0.50 g 七水硫酸锌, 1.00 g 六水二铵硫酸亚铁, 0.25 g 五水硫酸铜, 50.00 mg 硫酸锰, 50.00 mg 硼酸, 50.00 mg 二水钼酸钠, 95.00 mL 水; 硝酸盐培养基 (MM): 1 L BM 中加入 2.00~2.50 g 硝酸钠; 亚硝酸盐培养基 (MO₂): 1 L BM 中加入 0.5 g 亚硝酸钠; 次黄嘌呤培养基 (MH): 1 L BM 中加入 0.20 g 次黄嘌呤; Tween-80。PDA 培养基, WAC 培养基: 20.00 g 琼脂粉, 0.20 g 葡萄糖, 50.00 g 氯酸钾, 定容至 1 L。

1.5 EMS 诱变球孢白僵菌原生质体

参照徐文静^[3]的方法获得球孢白僵菌 T3-1 菌株原生质体。配制好终浓度为 1 个·μL⁻¹ 的球孢白僵菌原生质体悬液, 取 Eppendorf 管, 每管加入原生质体悬液 1 mL, 分别加入 EMS, 终浓度分别为 1.0%、1.5% 和 2.0%, 每个浓度 3 管, 28℃, 110 r·min⁻¹ 摇床培养, 处理时刻开始计时。分别于处理后 1.0、1.5 和 2.0 h 取不同 EMS 浓度处

理的 Eppendorf 管各 1 支, 无菌条件下各取 100 μL 处理悬液涂在再生培养基上, 28℃ 培养。5 d 后挑取 EMS 诱变后再生培养基上的白僵菌孢子, 用 Tween-80 溶液配制浓度为 1 个·μL⁻¹ 的孢子悬液, 取 100 μL 接种在富集培养基上, 28℃ 培养, 每处理 3 次重复。采用逐个检出法从每个富集培养基平板上挑出快速生长的白僵菌单菌落, 在 MM 培养基上划线培养, 做好标记 (浓度和时间), 28℃ 培养 7 d。从 MM 培养基上挑选纤细细菌丝, 平铺在培养基表面的单菌落, 每种条件挑取 28 个单菌落分别接种在 MM、MO₂ 和 MH 培养基上, 做好标记, 28℃ 连续培养 5 代, 注意观察和记录结果。

1.6 WAC 诱变球孢白僵菌

白僵菌 T3-1 菌株接种于 PDA 培养基上, 于 28℃ 活化 5 d, 挑取其菌丝尖端约 0.5 cm² 的菌块, 接种于 WAC 培养基, 每皿 4 块, 20 次重复, 28℃ 培养箱里培养 7 d。待 WAC 培养基上的菌块周围出现纤细细菌丝, 成膜状平铺于培养基表面时, 在此区域取 0.5 cm² 菌块接种于 MM 培养基上, 做好标记, 28℃ 培养箱里培养 7 d, 挑取纤细的菌丝分别在 MM、MO₂ 和 MH 培养基上划线培养, 继代培养 5 代, 从每次继代开始时记录 30 d 内培养结果并拍照。

1.7 硝酸还原酶活性测定

1.7.1 标准曲线制作 取 7 支洁净烘干的 15 mL 刻度管按表 1 顺序加入试剂, 配成 0~2.0 μg 的系列亚硝态氮标准溶液。摇匀后在 25℃ 下保温 30 min, 然后在 540 nm 下比色测定。以亚硝态氮为横作标 (x), 吸光度值为纵坐标 (y) 建立回归方程。

表 1 标准曲线制作的数据

试 剂	管 号					
	1	2	3	4	5	6
亚硝酸钠标准/mL	0.0	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0
蒸馏水/mL	2.0	1.8	1.6	1.2	0.8	0.4
1% 磺胺/mL	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
0.02% 萘基乙烯/mL	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
OD 值	0.020	0.076	0.136	0.260	0.350	0.444

1.7.2 测定方法 酶的提取: 称取 0.50 g 突变体或者野生型菌丝放置研钵中, 液态氮研磨, 吸 4 mL 提取缓冲液, 匀浆, 转移于离心管中 4℃,

4 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 上清液即是粗酶提取液; 酶的反应: 取粗酶液 0.40 mL 于 10 mL 试管中, 加 1.20 mL 0.1 mol·L⁻¹ 硝酸钾磷酸缓冲液

和 0.40 mL NADH 溶液,混匀,在 25℃ 水浴中保温 30 min,对照不加 NADH 溶液,而以 0.40 mL 0.1 mol · L⁻¹ pH 7.5 的磷酸缓冲液代替;终止反应和比色测定:保温结束后立即加入 1 mL 磺胺溶液终止酶反应,再加 1 mL 萘基乙烯胺溶液,显色 15 min 后于 4 000 r · min⁻¹ 离心 5 min,取上清液在 540 nm 下比色测定吸光度。根据回归方程计算出反应液中所产生的亚硝态氮总量。其计算公式为:

单位鲜重样品中硝酸还原酶活性/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} = X \times V_1 / (W \times T \times V_2)$

式中 X:反应液酶催化产生的亚硝态氮总量(μg); V_1 :提取酶时加入的缓冲液体(mL); V_2 :酶反应时加入的粗酶液体积(mL);W:样品鲜重(g);T:反应时间(h)。

2 结果与分析

2.1 诱变结果

2.1.1 EMS 诱变结果 重复培养 5 代以后得到比较稳定的突变体菌株 68 株(见表 2)。表现为连续 5 代培养后仍不产生气生菌丝或者菌落很薄,在 MO₂ 和 MH 培养基上表现出菌丝浓密,正常生长(见图 1A)。

表 2 EMS 诱导突变体的稳定性检验

EMS 处理梯度/ μL	突变体数/株	稳定突变株数/株
10-1.0	5	2
10-1.5	8	6
10-2.0	6	4
15-1.0	13	6
15-1.5	11	5
15-2.0	10	8
20-1.0	14	12
20-1.5	16	14
20-2.0	12	11
合计	96	68

2.1.2 WAC 诱变结果 获得不利用硝酸盐突变体菌株 35 株,继代培养 5 代后得到稳定的突变体菌株 19 株。同样表现为连续 5 代培养后仍不产生气生菌丝或者菌落很薄,在 MO₂ 和 MH 培养基上表现出菌丝浓密,正常生长(见图 1B)。

图 1A 和 B 中的培养基从左到右依次顺序为硝酸盐培养基(MM)、亚硝酸盐培养基(MO₂)和次黄嘌呤培养基(MH);上排为野生型白僵菌在 3 种培养基上生长的情况,下排为诱变后的突变体

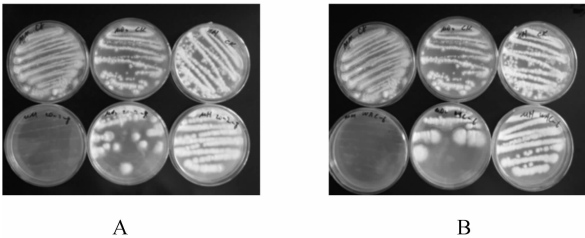


图 1 野生型与突变体菌株利用氮源的情况
A:EMS 诱变;B:WAC 诱变

在 3 种培养基上的生长情况。

2.2 硝酸盐还原酶活性测定结果

以亚硝酸钠作为亚硝态氮材料绘制硝酸还原酶标准曲线(见图 2),该曲线相关系数大于 0.99,线性关系良好,可以用来进行球孢白僵菌硝酸还原酶缺陷型突变体硝酸还原酶活性的测定。

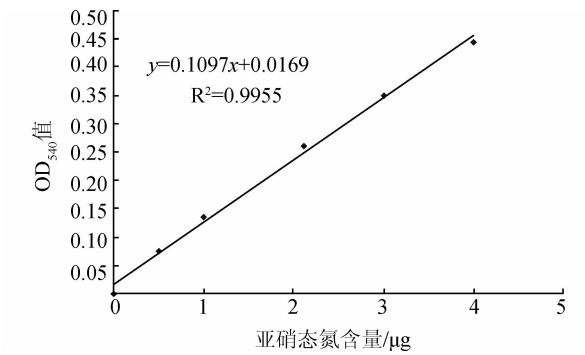


图 2 硝酸还原酶活性测定标准曲线
选择了 9 株 EMS 诱变突变体及 1 株 WAC 诱变突变体,以野生型菌株 T3-1 为对照,进行硝酸还原酶活性测定(见图 3)。从图 3 中可以看出,野生型白僵菌的硝酸盐还原酶活性最高,为 381.08 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。不同 EMS 浓度和不同处

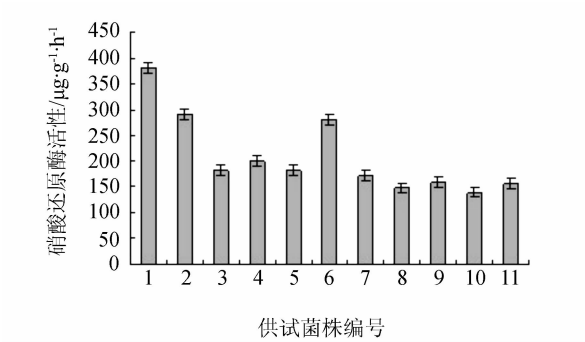


图 3 野生型和突变体菌株硝酸盐还原酶活性
1 为野生型菌株,2~10 为 EMS 诱导突变体,其中 10 为 20-2-17 突变体,11 为 WAC 诱导突变体 WAC-9

理时间获得突变体菌株的 NR 活性比野生型降低,其中 20-2-17 菌株的硝酸盐还原酶活性最低,为 $139.13 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,与野生型相比降低了 63.49%。WAC 诱变突变体菌株 NR 活性与野生型相比显著降低,其中 WAC-9 硝酸还原酶活性最低,为 $154.47 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,与野生型相比降低了 59.46%。

3 讨论

随着转基因技术在微生物育种研究中的广泛利用,常用的除草剂和抗生物类筛选标记基因破坏生态环境也越来越受到人们的重视。但检测外源基因是否在受体中表达,尤其是是否获得稳定表达,必须确立合适的选择标记。因此,营养缺陷型选择标记基因的研究日益受到重视。硝酸还原酶可以作为良好的营养缺陷型筛选标记基因,用诱变后的菌株作为受体通过转化使其恢复野生型表现型,从而作为筛选标记是除草剂和抗生物类筛选标记所没有的优点。

诱变方法分为物理因子诱变方法和化学因子诱变方法。其中化学因子诱变方法的优点为可操作性强,简单易行,特异性较强,诱变能被定位到 DNA 上的某些碱基,并且后代较易稳定遗传,一般到 F_3 代就可稳定。在微生物诱变育种上常用的化学诱变剂主要是甲基磺酸乙酯(EMS)、LiCl、 NaHSO_3 、亚硝基胍(NTG)、盐酸羟胺、5-脲嘧啶(5-BU)、乙烯亚胺(EI)、亚硝酸(NA)和 8-甲氧基补骨脂素(8-Mop)等。该试验所采用的化学诱变剂为 EMS,是一种化学诱变致畸的烷化剂,已被用作很多领域的诱变^[6-8]。WAC 主要成分为氯酸钾,是一种高毒药品,具有致畸的作用,余霞等^[9]曾用 WAC 培养基诱变过新月弯孢菌,获得

的抗氯酸盐突变体。

该研究得到的 WAC 诱变方法获得硝酸还原酶突变体以及 $20 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ EMS 处理球孢白僵菌原生质体获得的突变体的稳定性从 1 代到 5 代都比较稳定,稳定率达到了 90%以上。2 种方法都能获得稳定和硝酸还原酶活性显著降低的突变体菌株,硝酸还原酶活性比野生型硝酸还原酶活性显著降低,是获得不利用硝酸盐突变体一种简便方法,为以后研究其它真菌的诱变提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 林海萍,韩正敏,毛胜,等. 球孢白僵菌研究现状及提高其杀虫效果展望[J]. 浙江林学院学报,2006,23(5):575-580.
- [2] Singh H N, Sonie K C. Isolation and characterization of chlorate resistant mutants of the blue green alga *Nostoc muscorum*[J]. *Mutat. Res.*, 1977,43:205-212.
- [3] 徐文静,马德良,李启云,等. 球孢白僵菌原生质体获得和再生恢复培养[J]. 吉林农业大学学报,2006,28(2):148-151.
- [4] Funkhauser E A. Synthesis of nitrate reductase in *Chlorella*. II. Evidence for synthesis in ammonia-grown cells[J]. *Plant Physiol*, 1981,65:944-948.
- [5] Herdman M, Delaney S F. Mutation of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* (*Synechococcus* PCC6301): Improved conditions for the isolation of auxotrophs[J]. *Microbiol*, 1980,124:177-184.
- [6] 方卫国,杨星勇,裴炎,等. 真菌核酸的一种快速提取方法[J]. 应用与环境生物学报,2002,8(3):305-307.
- [7] 罗静,周厚成,王永清,等. EMS 离体诱变及抗草莓灰霉病愈伤组织的筛选[J]. 核农学报,2009,23(1):90-94.
- [8] 姚秋燕,王国芬,徐智斌,等. EMS 诱导小麦条锈菌毒性突变的研究[J]. 西北农林科技大学学报,2006,34(6):121-123.
- [9] 余霞,龚国淑,鲁学蓉,等. 新月弯孢菌 nit 突变体的诱导与鉴定[J]. 四川农业大学学报,2006,24(1):62-64.

Screening and Identification of Nitrate Reductase-deficient Mutants of *Beauveria bassiana*

SONG Jing-rong^{1,2,3}, XU Wen-jing¹, ZHAO Xi^{1,2}, DU Qian¹, YANG Xin-dong², LI Qi-yun¹

(1. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling, Jilin 136100; 2. Agronomy College of Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 3. Inner Mongolia Hulunbeir Institute of Agricultural Science, Zhalantun, Inner Mongolia 162650)

Abstract: 68 and 19 nitrate reductase-deficient mutants of *Beauveria bassiana* were obtained, from protoplasts treated with ethane methane sulphonate (EMS) and hypha treated with water agar chlorate (WAC), respectively. The lowest nitrate reductase activity of the mutants induced by the two ways, reduced 63.49% and 59.46%, respectively, compared with wild type strain.

Key words: *Beauveria bassiana*; nitrate reductase; mutant; screening; identification