

常压室温等离子体 (ARTP) 对脱落酸产生菌的诱变效应

毛玉华, 张金儿*, 周义凤 (江西新瑞丰生化股份有限公司, 江西新干 331300)

摘要 [目的] 研究 ARTP 对脱落酸产生菌的诱变效应及有效性, 以期获得高产突变菌株。[方法] 应用 ARTP 在电源功率 100 W、等离子体温度 25 ℃、气流量 10 SLM、照射距离 2 mm 的条件下, 进行不同照射时间的诱变处理, 统计致死率、正变率、变异幅度等。[结果] 在 100 s 的处理剂量下, ARTP 对脱落酸产生菌的正变率在 20% 以上, 诱变幅度在 -30.53% ~ 22.06%, 高产突变株 6-2 的 S-ABA 产量比出发菌株提高 22.06%, 且经连续 5 次传代试验, 产量无明显变化。[结论] ARTP 对脱落酸产生菌的正变率高、诱变幅度大, 所获高产突变株的稳定性好。

关键词 脱落酸; 常压室温等离子体; 诱变效应

中图分类号 S-03 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)27-0010-02

Mutagenic Effects of Atmospheric and Room Temperature Plasma (ARTP) on Abscisic Acid (ABA) Producing Strains

MAO Yu-hua, ZHANG Jin-er*, ZHOU Yi-feng (Jiangxi New Reypthon Biochemical Co. Ltd., Xingan, Jiangxi 331300)

Abstract [Objective] The aim was to study mutagenic effects of atmospheric and room temperature plasma (ARTP) on abscisic acid (ABA) producing strains to obtain mutants with high ABA production. [Method] ARTP was employed to generate the mutants under the conditions of 100 W power supply, the plasma temperature of 25 ℃, gas flow of 10 SLM, and irradiation distance of 2 mm. The spore of *Botrytis cinerea* was treated by different mutation time. The statistical analysis of the mutagenic effects was carried out in terms of lethality, positive mutation rate and amplitude of variation. [Result] The positive mutation rate was above 20% and amplitude of variation was -30.53% - 22.06% under the condition of 100 s treatment time with ARTP. The high-yield mutant 6-2 had an increase of 22.06% comparing with the original strain, and the yield did not change significantly after five consecutive passage tests. [Conclusion] The ARTP mutation method has a high positive mutation rate and better stability on ABA producing strains. The stability of high-yield mutant is good.

Key words Abscisic acid; ARTP; Mutagenic effects

脱落酸 (ABA) 是一种重要的植物激素, 参与植物胚胎发育、种子休眠、果实成熟和逆境胁迫等许多方面, 对植物生长发育起着重要调节作用^[1]。植物接受胁迫信号, 影响基因的表达, 引起植物体内 ABA 水平上升, 从而增加植物的抗逆性^[2]。通过施用外源 ABA 可提高作物抗寒、抗旱、抗盐能力, 在果树移植、种子储存、花卉园艺等领域有广阔的应用前景, 但其生产成本较高是限制其农业应用的一个重要因素。微生物发酵法生产是近年来兴起的新的脱落酸生产方法^[3], 而提高菌种的发酵产量是降低成本的关键因素之一。通过菌种诱变是提高发酵产量的方法之一, 寻求好的诱变方法是关键。

常压室温等离子体 (ARTP) 诱变方法不仅具有获得突变菌株的效率高、突变菌株的遗传稳定性好等特点, 而且操作简便、安全、诱变效果稳定且无污染。与之前的化学诱变 (如氯化锂) 和物理诱变 (如紫外) 等方法相比, ARTP 诱变方法具有显著优势。通过定量分析与测定不同诱变方式对遗传物质的损伤程度得出, ARTP 产生更加强烈的 DNA 损伤和更高的突变率。因此, ARTP 诱变方法在工业微生物育种中得到越来越广泛的应用^[4]。ARTP 作为一种新型操作简便、低成本的物理方法, 在微生物育种及医疗消毒领域具有广泛的应用潜力, 主要是利用了 ARTP 在放电时产生的各种电子流对微生物基因进行损伤从而诱导其进行诱变。其诱变机理是 ARTP 对菌株出现遗传物质损伤后, 微生物启动 SOS 修复机制, 其诱导产生 DNA 聚合酶 IV 和 V, 它们不具有 3' 核酸

外切酶校正功能, 于是在 DNA 键的损伤部位即使出现不配对碱基, 复制仍能继续前进, 在此情况下允许错配可增加存活的机会。ARTP 对遗传物质造成的损伤多样性较高, 又加上 SOS 诱导修复本身为容错性修复, 因此, ARTP 多样性的损伤将可能在修复过程中包含于 DNA 链中。在微生物进行复制修复时, 其可能带来多样性的错配可能。损伤的多样性和 SOS 修复都存在较高的错配概率, 都可大大增加有利突变的出现概率^[5], 同时具有突变后稳定性较高等优点。基于以上诱变特点, 笔者对产脱落酸菌进行诱变分析, 研究了其诱变效应情况, 以期通过 ARTP 诱变筛选得到脱落酸高产菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与仪器。常压室温等离子体诱变仪 (源清天木生物科技有限公司)。脱落酸产生菌灰葡萄孢霉 (*Botrytis cinerea*) 由中国科学院成都生物研究所提供。

1.1.2 培养基。固体培养基: 马铃薯 200.0 g/L, 葡萄糖 20.0 g/L, 琼脂 15.0 ~ 20.0 g/L。种子培养基: 葡萄糖 30.0 g/L, 牛肉膏 1.0 g/L, 麦麸 10.0 g/L, 蔗糖 10.0 g/L, NH₄NO₃ 15.0 g/L, MgSO₄ 0.5 g/L, 麦芽糖 3.0 g/L。摇瓶发酵培养基: 糊精 50.0 g/L, 麦麸 10.0 g/L, 葡萄糖 4.0 g/L, 硫酸镁 0.1 g/L, 大豆蛋白粉 4.0 g/L。

1.2 方法

1.2.1 斜面菌株的培养。将冷冻管保藏的原种解冻后均匀涂布于制备好的空白斜面上, 23 ~ 28 ℃ 培养 8 d 左右, 培养好后置于冰箱备用。

1.2.2 孢子悬浮液的制备。吸取适量无菌水加入到制备好的菌株斜面, 用竹签刮下孢子, 倒入到含有玻璃珠的三角瓶中, 在旋转摇床上充分振荡成分散悬浮液。悬浮液试验用多

作者简介 毛玉华 (1976—), 女, 江西吉安人, 工程师, 从事抗生素菌种选育研究。* 通讯作者, 高级工程师, 从事菌种选育和工艺优化研究。

收稿日期 2017-07-05

层无菌擦镜纸过滤除菌丝,得到孢子悬浮液。

1.2.3 诱变载片的样品制备。在无菌条件下,将“1.2.2”制备的悬浮液用 100 μL 移液器吸取 10 μL 滴加到灭菌载片上,并涂布均匀使孢子液覆盖全部载片。

1.2.4 ARTP 诱变。ARTP 仪诱变操作前通入氦气(He)进行机器预热。该诱变装置采用 99.999% 高纯氦气(He)作为产生等离子体的出发气体,电源功率为 100 W,工作距离为 2 mm,等离子体温度为 25 $^{\circ}\text{C}$,气流量为 10 SLM。在气流量、辐射距离确定的情况下,ARTP 对样品的作用效果取决于照射时间的大小。分别设定孢子悬浮液诱变的暴露时间为 50、60、70、80、90 和 100 s 6 个不同的照射时间。在 ARTP 诱变仪下分别进行上述不同处理时间的照射,照射结束后,立即用无菌镊子取出样品载片,置于装有适量无菌水的 10 mL EP 管中,利用旋涡混合器剧烈振荡 1 min,全部洗下载片上的孢子并悬浮于无菌水中。将样品进行梯度稀释后,取 0.1 mL 涂布琼脂培养基平板,23 ~ 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 d 左右,每个不同时间和浓度各设 5 个平行。统计不同诱变时间下的致死率。在不同的诱变剂量下,细胞的致死率计算公式:

$$\text{Lethality} = (T - A) / T$$

式中, T 为样品在未经 ARTP 处理时的总菌落数; A 是样品在 ARTP 处理后存活的菌落数。

1.2.5 S-ABA 初筛-打孔浸提法。将分离的单菌落均匀涂布于装有 20 mL PDA 的直径 9 cm 的平皿上,于黑暗中倒置培养 8 d。用直径 4.5 mm 的打孔器取出 PDA 平皿上的单菌落琼脂块,用丙酮浸提过夜,蒸干丙酮及水分后,用甲醇-水溶液(6:4, V/V)定容至 10.0 mL,用 HPLC 测定 S-ABA 含量^[6]。

1.2.6 高产诱变株的稳定性试验。在打孔浸提前,将打孔的菌落各转接斜面 2 支,对通过菌落打孔浸提法初筛选出的高产单菌落进行稳定性分析。从各个剂量中选出 1 株高产菌株进行连续 5 次传代。各传代斜面接种于种子培养基中,以 20% 的移种量移至 250 mL 发酵摇瓶中,23 ~ 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 d 后采用 HPLC 测定摇瓶液中的 ABA 浓度。

1.2.7 产物检测法——HPLC 法。流动相:甲醇:水:乙酸按 60:40:0.5 体积比例混合均匀,用 0.45 μm 过滤器抽滤。分析条件:检测流速为 0.8 mL/min,紫外检测波长为 260 nm,常温,进样量为 20 μL 。

1.2.8 诱变正变率及变异幅度的统计。涂布的琼脂培养基平板经过 23 ~ 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 8 d 左右,对各平板的菌落进行打孔浸提测菌落的 ABA,每个诱变平板打孔 3 个菌落,对照平皿打孔 2 个菌落作为对照,通过对比诱变平皿菌落 ABA 和对照平皿 ABA 数据计算其正变率。各个诱变剂量所测数据以对照数据为中心,计算其正负变异幅度的大小。

2 结果与分析

2.1 多层无菌擦镜纸过滤去除孢子悬液中菌丝的效果 采用 1、2、3、4 层不同层数的擦镜纸过滤后的孢子悬浮液进行血球计数板计数,其孢子纯度和孢子数量统计结果见表 1。由表 1 可知,擦镜纸层数越多,孢子悬液纯度越高,但孢子也

有部分被过滤掉,用 3 层擦镜纸过滤较合适。

表 1 不同层数的擦镜纸过滤除菌丝效果统计

Table 1 Effect of filtration to remove the mycelium with different layers of the mirror paper

擦镜纸层数 Layers of mirror papers // 层	孢子纯度 Purity of spores	孢子数量 Number of spores 个/mL
1	++	1×10^7
2	+	1×10^6
3	-	1×10^6
4	-	1×10^5

注: + 表示孢子纯度不好,有菌丝, + 越多菌丝含量越高; - 表示没有菌丝,孢子纯度很好

Note: + indicated the spores had bad purity and hyphae, and the more the symbol was, the high the hyphae content was; - indicated the spores had high purity, without hyphae

2.2 ARTP 诱变致死率 由图 1 可知,在一定剂量内,随着照射时间的延长,致死率增加。

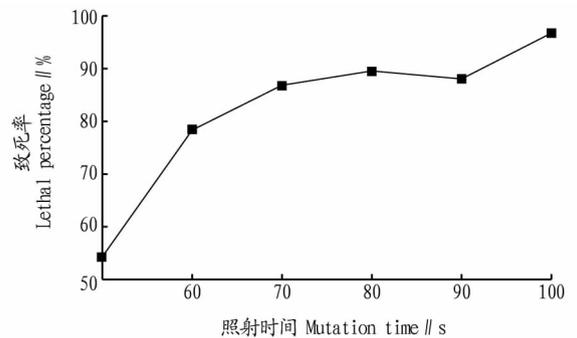


图 1 ARTP 不同处理时间的致死率曲线

Fig. 1 Lethal percentages of *Botrytis cinerea* treated by different mutation time

2.3 ARTP 诱变正变率和诱变幅度 由表 2 可知,在 100 s 的照射剂量下,正变率为 20.00%,变异幅度在 -30.53% ~ 22.06%。

表 2 ARTP 诱变的正变率和变异幅度统计

Table 2 The positive mutation rate and mutagenic effects of ARTP

剂量 Dosage // s	正变率 Positive mutation rate	变异幅度 Variation range
50	87.50	-11.20 ~ 6.44
60	66.07	-6.68 ~ 13.79
70	63.00	-5.85 ~ 15.02
80	50.00	-20.48 ~ 8.68
90	28.60	-19.96 ~ 10.06
100	20.00	-30.53 ~ 22.06

2.4 高产突变菌株的稳定性 由表 3 可知,6 株高产突变株经连续 5 次传代,其产酸能力无明显变化,性能稳定。

3 结论与讨论

ARTP 诱变育种的原理是其发出的等离子体流作用于丝状真菌等微生物,它作为一种新型的诱变方式,能够对微生物的遗传物质产生强烈的畸变作用,使得微生物的基因序列

(下转第 16 页)

线正相关关系比较而言,蔬菜砷和土壤有效砷的正相关关系更加显著,说明用土壤有效砷来评价土壤砷对蔬菜的生物有效性要比用土壤全砷更合理。

蔬菜砷转移系数与土壤全砷含量主要呈负指数相关关系的趋势,而且蔬菜砷转移系数减小的速度伴随土壤全砷含量的提高而趋于变缓。蔬菜砷转移系数与土壤有效砷含量之间的相关关系不明显,说明土壤有效砷含量的高低不会影响到蔬菜对砷的转移系数。

参考文献

- [1] 崔瑞平. 环境砷污染及其危害[J]. 遵义医学院学报, 1994, 17(3): 255 - 256.
- [2] 王连方, 颜世铭. 环境砷与地方性砷中毒[J]. 广东微量元素科学, 1997, 4(6): 7 - 12.
- [3] 宋波, 伏凤艳, 张学洪, 等. 桂林市菜地土壤和蔬菜砷含量调查与健康风险评估[J]. 环境科学学报, 2014, 34(3): 728 - 735.
- [4] 涂杰峰, 刘兰英, 伍云卿, 等. 福州市主栽蔬菜品种对砷的积累及健康风险[J]. 环境工程学报, 2016, 10(11): 6761 - 6767.
- [5] 吴倩鑫, 杨联安, 于世锋, 等. 蔬菜地土壤重金属含量空间插值精度分析[J]. 中国农学通报, 2016, 32(23): 81 - 86.
- [6] MATHIEU N K, 曾希柏, 李莲芳, 等. 几种叶类蔬菜对砷吸收及累积特性的比较研究[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(3): 485 - 490.
- [7] 苏年华, 张金彪, 王玉. 福建省土壤重金属污染及其评价[J]. 福建农业大学学报(自然科学版), 1994, 23(4): 434 - 439.
- [8] 夏家淇. 土壤砷的环境基础研究[J]. 农村生态环境, 1993(4): 1 - 4.
- [9] 蔡保松, 陈同斌, 廖晓勇, 等. 土壤砷污染对蔬菜砷含量及食用安全性

的影响[J]. 生态学报, 2004, 24(4): 712 - 717.

- [10] SCHMIDT A C, MATTUSCH J, REISSER W, et al. Uptake and accumulation behaviour of angiosperms irrigated with solutions of different arsenic species[J]. Chemosphere, 2004, 56(3): 305 - 313.
- [11] 杜丽娟, 米艳华, 陈璐, 等. 药用植物三七对土壤中砷的吸收转运及形态转化[J]. 生态与农村环境学报, 2016, 32(6): 997 - 1002.
- [12] 唐尚坚. 水生植物吸收水中重金属的研究[J]. 渝州大学学报(自然科学版), 1993(4): 7 - 12.
- [13] TU S, MA L Q. Interactive effects of pH, arsenic and phosphorus on uptake of As and P and growth of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. under hydroponic conditions[J]. Environmental and experimental botany, 2003, 50(3): 243 - 251.
- [14] 张素芹, 杨居荣. 农作物对铅镉砷的吸收与运输: 伤流及根系外渗分析[J]. 农业环境科学学报, 1992, 11(4): 171 - 175.
- [15] 武淑华, 韩爱民, 蔡继, 等. 蔬菜中重金属含量与土壤质量的关系[J]. 长江蔬菜, 2002, 14(S1): 41 - 43.
- [16] 胡勤海, 叶兆杰, 陈广照, 等. GaAs₃和Ga³⁺和As(V)对蔬菜种子萌发生理影响研究[J]. 农业环境保护, 1996, 15(2): 53 - 57.
- [17] 陈玉成, 赵中金, 孙彭寿, 等. 重庆市土壤-蔬菜系统中重金属的分布特征及其化学调控研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(1): 44 - 47.
- [18] 蔡立梅, 黄兰椿, 周永章, 等. 东莞市农业土壤和蔬菜砷含量及其健康风险分析[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(1): 197 - 200.
- [19] 夏立江, 华路, 韦东普. 部分地区蔬菜中的砷含量[J]. 土壤, 1996(2): 105 - 109.
- [20] 黄雅琴, 杨在中. 蔬菜对重金属的吸收累积特点[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1995, 26(5): 608 - 615.
- [21] 凌乃规. 蔬菜品种重金属元素含量差异性分析[J]. 广西农业科学, 2000(1): 13 - 15.

(上接第 11 页)

和代谢网络发生较大的差异,进而使微生物发生稳定遗传的突变^[7]。该研究针对脱落酸产生菌用 ARTP 对 6 个不同剂量诱变孢子悬浮液进行了初步的探索,并未对脱落酸产生菌原生质体进行诱变处理,后续研究需用原生质体进行诱变处理,对比诱变效果。

表 3 6 株突变株遗传稳定性

Table 3 The abscisic acid production stability of six mutation strains

菌株名称 Strain name	F ₁	F ₂	F ₃	F ₄	F ₅
1-12	100	89.3	99.6	101.8	102.1
2-8	100	98.3	100.3	100.7	101.4
3-5	100	100.8	98.7	99.6	101.9
4-1	100	102.0	101.5	93.7	102.0
5-10	100	92.6	102.1	99.9	100.2
6-2	100	100.9	98.4	100.3	99.5

注:ABA 数据以 F₁ 的效价为 100%。其中,6-2 菌株的 S-ABA 产量比出发菌株提高 22.06%

Note: The statistics of ABA was carried out by taking the title of F₁ as 100%, among them the S-ABA's yield of strain 6-2 was improved by 22.06% comparing with starting strain

菌种的生产能力是发酵高产的前提^[8],ARTP 诱变脱落酸产生菌能有效提高其生产能力,其随着诱变剂量的增加,

虽然正变率呈下降趋势,但诱变幅度增大,菌株的稳定性好。通过提高菌种生产水平能大幅降低生产成本,达到提高经济效益的目的。

参考文献

- [1] LI S, ASSMANN S M, ALBERT R. Predicting essential components of signal transduction networks: A dynamic model of guard cell abscisic acid signaling[J]. PLoS Biology, 2006, 4(10): 1 - 17.
- [2] FREY A, GODIN B, BONNET M, et al. Maternal synthesis of abscisic acid controls seed development and yield in *Nicotiana glauca* [J]. Planta, 2004, 218(6): 958 - 964.
- [3] 施天穹, 彭辉, 季荣钰, 等. 微生物发酵法产脱落酸的研究进展[J]. 化工进展, 2016, 35(7): 2140 - 2144.
- [4] LI X Y, LIU R J, LI J, et al. Enhanced arachidonic acid production from *Mortierella alpina* combining atmospheric and room temperature plasma (ARTP) and diethyl sulfate treatments[J]. Bioresource technology, 2015, 177(1): 134 - 140.
- [5] WANG Q, FENG L R, WEI L, et al. Mutation breeding of lycopene-producing strain *Blakeslea trispora* by a novel atmospheric and room temperature plasma (ARTP) [J]. Applied biochemistry and biotechnology, 2014, 174(1): 452 - 460.
- [6] 谭红, 周金燕. 脱落酸研究与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2014.
- [7] 黎亮, 王泽建, 郭美锦, 等. 头孢菌素 C 产生菌的诱变育种及培养基优化[J]. 中国生物工程杂志, 2014, 34(8): 61 - 66.
- [8] ZHANG X, ZHANG C, ZHOU Q Q, et al. Quantitative evaluation of DNA damage and mutation rate by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) and conventional mutagenesis[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2015, 99(13): 5639 - 5646.