

冠菌素生物合成的研究进展

梁 焱¹, 王 俊¹, 陈明胜², 张生杰¹, 潘 飞¹, 吕荣宾¹, 方水琴¹, 孙国霞¹, 姜 星¹, 吴福安²

(1. 江苏科技大学生物与环境工程学院, 江苏 镇江 212018;
2. 中国农科院蚕业研究所, 江苏 镇江 212018)

摘要:介绍了冠菌素生物合成的研究进展,总结了冠菌素合成研究的3个阶段。介绍了近年来发酵生产冠菌素菌株的选育及诱变,重点总结了发酵生产冠菌素过程中培养条件优化,指出了目前冠菌素的生物合成仍然存在产量低、发酵条件苛刻等不足,在新菌株的选育、分子手段的应用以及培养基优化是今后生物合成冠菌素研究的热点。

关键词:冠菌素;生物合成;发酵

中图分类号:Q815

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2011)05-0025-05

Progress in biosynthesis of coronatine

LIANG Yao¹, WANG Jun¹, CHEN Ming-sheng², ZHANG Sheng-jie¹, PAN Fei¹, LV Rong-bin¹,
FANG Shui-qin¹, SUN Guo-xia¹, JIANG Xing¹, WU Fu-an²

(1. College of Biological and Environmental Engineering, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China; 2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang 212018, China)

Abstract: The bacterial strains and fermentation conditions involved in the biosynthesis of coronatine (COR) are reviewed. Three stages about the study of synthesis coronatine are summarized. Mutation breeding of the coronatine strain by fermentation in recent years are introduced. The optimization of fermentation conditions for COR is highlighted. The problems such as low efficiency of biosynthesis, the harsh fermentation conditions, and so on, are pointed out. Research on the new strains, the related genes and enzyme and the optimization of fermentation conditions are suggested for further studies in the future.

Key words: coronatine; biosynthesis; fermentation

冠菌素 (coronatine, COR, C₁₈H₂₅NO₄) 319^[1], 包括一个含 α-氨基酸的冠烷酸 (coronamic acid)^[2] 和一个聚酮结构的冠菌酸 (coronafacic acid), 以酰胺键连结^[3]。COR 是由植物病菌分泌于细胞外的植物激素, 结构与活性与茉莉酸 (Jasmonic acid, JA, C₁₂H₁₈O₃) 和脱落酸 (Abscisic acid, ABA, C₁₅H₂₀O₄) 相近。首先, 冠菌素可以有效地提高植物的抗逆性, 提高玉米^[4]、花生^[5]、香蕉^[6] 和冬小麦^[7] 越冬时的抗旱性, 提高小麦^[8]、黄瓜^[9] 的抗寒性, 提高棉花^[10] 的耐盐性等; 第二, 促进植物次生代谢产物的积累^[11], 提高大豆类黄酮、红豆杉紫杉醇^[12] 等的产量, 对改善烟草品质、水稻田灭草等^[13] 都有潜在的应用价值; 第三, 冠菌素是多种植物细菌病的致病因素之一, 诱导西红柿叶斑病的氧化反应^[14], 使拟南芥叶片气孔张开, 利于细菌侵入^[15]; 第四, 冠菌素具有极高的生物活性, 低浓度冠菌素可浸种培育健壮水稻幼苗^[16], 促进玉米种子萌发^[17]。但 COR 目前价格昂贵, 难以大规模直接用于工农业生产, 对于

COR 的工业化发酵的研究, 拥有广阔的应用前景。

1 冠菌素的结构和合成方法

冠菌素的结构见图 1。自 COR 于 1977 年首次被发现^[1], 对于冠菌素纯品获得的研究一直是植物激素领域的热点, 可分为 3 个阶段: 第一个时期, 20 世纪 80 年代和 90 年代初, 冠菌素生物合成通路的

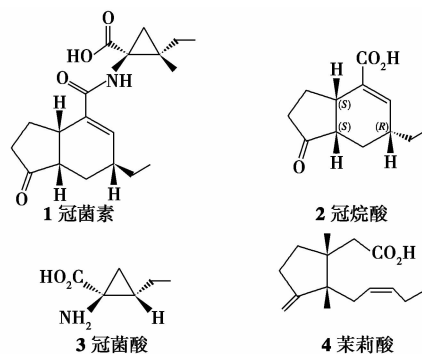


图 1 冠菌素及相关化合物的结构

收稿日期: 2010-12-20

基金项目: 江苏省高等学校大学生实践创新训练计划 2010 年立项项目 (605); 江苏科技大学 2010 年度本科创新计划项目, 江苏省“青蓝工程”, 现代农业产业技术体系建设项目 (蚕桑: nyeytx-27-gw205)

作者简介: 梁焱 (1986-), 男, 硕士生; 吴福安 (1961-), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物保护方面的研究, 通讯联系人, 0511-85616571, fuword@163.com。

阐明;第二个时期,20 世纪 90 年代末,生物合成的基因调控研究,并成功实现了化学合成冠菌素;第三个时期,21 世纪至今,新菌种的选育,与发酵液中纯品冠菌素的分离纯化。通过 30 多年的研究和探索,分别建立了化学合成和生物发酵 2 条冠菌素获得的途径。

但是,无论是纯化学合成途径,还是生物发酵手段,都还处于实验室研究阶段,仅能够满足生理生化性质的研究所需,而无法应用于工农业生产中,并且长期无法突破冠菌素的工业化瓶颈,使得对于冠菌素的生产研究陷入低谷,日本北海道大学的市原狄民^[18]曾经认为生物发酵法获得大量冠菌素是不可能的,跨入 21 世纪后,随着冠菌素分子背景的清晰,以及对其功能的不断深入研究,它蕴含的巨大经济价值,冠菌素的发酵研究再次兴起。

2 冠菌素的生物合成研究

早期的冠菌素发酵研究证明了发酵途径的可行性^[19],以及冠菌素的生长相关性^[20],相关文献报道了其生物合成受到温度的调节和影响^[21-22],但既缺少细致的育种工作,又缺少对冠菌素的产生条件的细致优化与研究。近年来这 2 方面受到了研究者的重视,并取得了一定进展。

2.1 冠菌素的检测手段

在冠菌素生物合成的研究中,需要定量研究冠菌素的合成规律,常用的检测手段包括薄层层析法、高效液相色谱法、气相色谱法^[18]和毛细管电泳法^[23]。高效液相色谱法的使用较多,检测冠菌素可以使用 C18 和 C8 的分析柱^[24],254 nm 或 208 nm 波长检测,流动相一般为含 0.05% 三氟乙酸的乙腈水溶液,流速为 1 ~ 5 mL/min,或者流动相:0.5 mL/L 磷酸的 $\varphi = 60\%$ 甲醇水溶液,也有选择 0.5 g/L 磷酸的 $\varphi = 60\%$ 甲醇水溶液;流速:1 mL/min;检测波长:254 nm;进样量:15 ~ 20 μL ;柱温:30 ~ 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

丰娟等^[25]建立了发酵液中冠菌素检测的薄层色谱法。以乙醇-乙酸-丙酮-氯仿(体积比为 0.3:0.1:3.0:15)的混合溶剂为最佳溶剂系统,硅胶 C 薄层板为层析板,香兰素-浓硫酸溶液为显色剂,3,5-二羟基甲苯(DHT)溶液为参照物,以冠菌素特有的桔黄色斑点及其与参照物的相对比值 R_m (约为 0.55)进行定性分析,运用冠菌素点样量(Y)冠菌素与参照物斑点的面积比值(X)之间的标准曲线 $Y = 3.28X - 0.30$, Y 线性范围 0.25 ~ 2.00 μg ,粗定量测定发酵液中冠菌素的含量。此方法操作简单、方便,在产冠菌素菌株的筛选和发酵样品的分析中得到很好的应用。

冠菌素作为细菌的次级代谢产物,含量往往很低,因此需要较为精确地分析检测体系,高效液相色谱利用常见的 C8 和 C18 色谱柱即可得到理想的检测效果,因此成为现在应用最广泛的检测手段,薄层色谱法可以在某些定量分析中得到应用,也具有一定价值。

2.2 冠菌素产生菌的选育

冠菌素产生菌株的经典菌株为 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* PG4180,早期的研究说明了经典菌株不能满足工业生产的需求。因此新菌株的选育成为后期发酵研究的基础,但大部分产冠菌素菌株为植物病原菌,获得相对困难,因此对于经典菌株的诱变选育成为研究热点,近年来也不断有新的冠菌素产生菌株的报道。

2.2.1 菌株的诱变育种

目前诱变剂主要有紫外线(UV)、硫酸二乙酯、*N*-甲基-*N'*-硝基-*N*-亚硝基胍(NTG)和亚硝基甲基胍(NMU)等。紫外诱变是传统且常用的育种手段,被广泛应用于诱变获得具有耐高温积累冠菌素菌种的研究中,亚硝基胍则具有极强的诱变效果,经常与紫外诱变结合使用。

张国栋^[18]利用紫外诱变获得新菌株 104 号菌株,产量提高 43.1%,又进一步利用 *N*-甲基-*N*-

(上接第 24 页)

- [26] Kobayashi M, Miyoshi K. WO_3 - TiO_2 monolithic catalysts for high temperature SCR of NO by NH_3 : Influence of preparation method on structural and physico-chemical properties, activity and durability[J]. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2007, 72(3/4): 253 - 261.
- [27] Xiong Jun, Chen J X, Zhang J Y. Liquid-phase hydrogenation of *o*-chloronitrobenzene over supported nickel catalysts[J]. *Catalysis Communications*, 2007, 8(3): 345 - 350.
- [28] Corma A, Serna P, García H, *et al.* Gold catalysts open a new gener-

al chemoselective route to synthesize oximes by hydrogenation of α , β -unsaturated nitrocompounds with H_2 [J]. *Journal of American Chemical Society*, 2007, 129(20): 6358 - 6359.

- [29] 王继元, 顾越峰, 陈韶辉, 等. 载体焙烧温度对 Pd/ TiO_2 催化剂上对羧基苯甲醛加氢性能的影响[J]. *石油学报(石油加工)*, 2009, 25(3): 327 - 331.
- [30] Escobar J, Toledo J A, Torres-García E, *et al.* Highly active sulfided CoMo catalyst on nano-structured TiO_2 [J]. *Catalysis Today*, 2005, 106(1/2/3/4): 222 - 226. ■

硝基-N-亚硝基胍诱变后得到 212 号菌株,产量在第一次的基础之上又提高了 14.3%;李召虎等^[26]等利用亚甲基胍,诱变丁香假单胞菌大豆致病变种(*P. syringae* pv. *Glycinea*),获得了于 18℃ 下产量达到 84.7~112 mg/L 的新菌株;吴慧玲等^[27]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。

紫外诱变与亚甲基胍诱变相结合得到了很好结果,然而也暴露出了不确定性、工作量巨大的问题,这是传统诱变育种的共同问题,因此人们利用更加科学的方法诱变育种。焦睿^[28]利用了 Tn5 转座子对冠菌素产生菌株丁香假单胞菌大豆致病变种(*P. syringae* pv. *glycinea*) PG4180 进行诱变;Bender 等^[29]向 *hrcC* 基因中加入抗卡那霉素基因,获得 APV1 菌种,它可以适应大规模生产冠菌素的温度(26℃)要求,并且菌种没有致病性;吴晓玉等^[30]分别以菌株对萘代谢的温度敏感性及对红霉素抗性为筛选标志,依次采用亚硝基胍、5-溴尿嘧啶、紫外线、吡啶橙与紫外线混合等诱变方式,经系列推理选育,获得产冠菌素能力为 100 μg/mL 的突变菌株,比野生菌株产量提高了 7.3 倍。以上方法在传统诱变的基础之上建立了新的育种思路,获得了许多产冠菌素能力更加具备工业潜力的菌株。

2.2.2 新型菌株的发现

除传统的产冠菌素菌株的诱变选育以外,李昌灵等^[31]发现了产冠菌素新菌株洋葱假单胞菌 *Pseudomonas cepacia* Y57,在最优培养条件下,产量可达 128 mg/L;吴晓玉等^[32]报道了一种伯克霍尔德菌能够发酵生产冠菌素;笔者所在实验室从桑疫病植株中分离获得一株具有产冠菌素活性的桑丁香假单胞菌,新型菌株的发现为突破温度限制与工业化限制提供了希望。

经过了 COR 发酵研究的新阶段之后,通过对菌种的诱变与筛选,使得 COR 产量大幅提升,但是低温限制依然存在,大规模的发醇生产无法实现,而且如此低的含量使得 COR 的后期分离纯化成本也将成为限制其工业化生产的重要因素。综上所述,仍然需要寻找更加适宜工业化生产的耐高温菌种,并且建立新型快速的分离纯化手段。

2.3 冠菌素发酵条件的优化

冠菌素是细菌(如丁香假单胞菌等)的次级代谢产物,是与菌体生长直接相关的,传统菌株产冠菌素活性一直存在低温限制,因此,产冠菌素的发酵条件需要在菌体生长与冠菌素积累两方面平衡,温度

作为菌体生长与产冠菌素活性的双重影响因子起着至关重要的作用。

2.3.1 碳源的选择

碳源是影响菌体生长的关键因素,其浓度会影响菌种液中冠菌素的积累。Palmer 等^[24]在对 *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* PG4180 的液体培养条件的影响因素研究中认为,最优组分中葡萄糖质量浓度应该为 10 g/L;张国栋^[18]进行的冠菌素发酵研究中,最优葡萄糖质量浓度为 15 g/L;焦睿^[28]和李昌灵等^[31]则都提出最优葡萄糖质量浓度 20 g/L 的结论。

从现有报道可知,冠菌素发酵碳源的选择集中在葡萄糖上(个别使用萘碳源进行菌种筛选),仅仅是因为菌种和其他因素的差异,导致最优浓度的不同,说明了现阶段的冠菌素发酵研究还处于实验室研究阶段,而且由于冠菌素的巨大的商业回报,研究者忽略了多样性碳源的选择。笔者所在实验室在前期研究的基础上,正在尝试其他碳源(如农作物的秸秆处理物)以降低生产成本,在大规模发酵生产时应当极有意义。

2.3.2 氮源的选择

冠菌素发酵过程中氮源的选择不仅影响菌体生长,而且直接影响菌液 pH 的变化,因此对于冠菌素的积累极其重要。目前报道的常见氮源有氯化铵^[18,24,28,31,33]、蛋白胍^[31]、黄豆饼粉^[32]、牛肉膏^[30,32]、玉米浆^[32]等。其中氯化铵的质量浓度均为 1 g/L,其他有机氮源的使用并没有显示出一定的规律性,可见人们对于无机氮源的认识是一致的,并且均满足各自菌种的产冠菌素需要及保证最大的积累量。无机氮源在发酵的早期无疑是更易于同化利用的,然而在菌体的代谢酶系形成后,过于单一简单的无机氮源并不利于菌体的生长,另外无机氮源会引起发酵液 pH 的变化,影响冠菌素的积累,因此笔者所在实验室在优化发酵条件的基础之上,继续优化了无机氮源和有机氮源的比例,希望能进一步提高发酵液中冠菌素的含量。

2.3.3 温度的影响

产冠菌素活性受到温度的调控与限制,PG4180 的最适产冠菌素温度为 18℃,于 28℃ 下活性基本消失^[34]。李召虎等^[26]在 18℃ 条件下发酵产量达到 84.7~112 mg/L。并且在最近的报道中,于 26℃^[18]和 28℃ 下,发酵获得冠菌素的产量得到了一定的提高。焦睿^[28]筛选获得的 PG4180 突变株 MFB141 在 28℃ 下产量达到 37.7 mg/L。

一方面,温度是制约冠菌素大规模发酵的关键因素,总体显现出中温高活性(18℃)、高温失活性(>28℃)的特征,另一方面,冠菌素产生是生长相关型的,而菌体本身的生长温度则需要较之冠菌素积累更高的温度,于是在发酵生产中,为了获得最合适的发酵温度,需要综合考虑菌体生长与产冠菌素活性两方面。于是李昌灵等^[31]提出了变温培养发酵产生冠菌素的方法,首先 32℃ 下培养 1 d,降温至 18℃ 发酵 2 d,冠菌素的产量提高了 30% 左右。这种方法兼顾了菌体生长和冠菌素积累,但是在实际生产中,变温控制的实现较为困难,而且 32℃ 与 18℃ 跨度较大,仍然需要很长时间 18℃ 培养,因此需要进一步明晰温度对冠菌素产生的影响,因为冠菌素发酵温度不断地提高,似乎暗示了温度限制不是不可逾越的。笔者所在课题组通过从桑疫病株上筛选获得的新型产冠菌素菌株,于 32℃ 发酵条件下,HPLC 检测到产冠菌素活性,显现出了突破性进步,不过产量不高,仍需进一步选育与研究。

2.3.4 其他因素的影响

发酵液 pH 是发酵产冠菌素时要考虑到的,发酵液初始 pH 为 6.5 ~ 7.8^[24],最常见的优化 pH 为 6.8^[28]。冠菌素作为细菌分泌于胞外的次生代谢产物,在不同 pH 下显示不同的溶解性,在酸性条件下不溶于水,而易溶于甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯中,碱性条件下形成钠盐和钾盐易溶于水。因此发酵液的 pH 极大地影响冠菌素的积累,并且对菌体的生长也作用明显。

在摇瓶发酵培养中,摇瓶装量和转速对冠菌素积累的影响是明显的,较少的装量以及较高的转速能明显提高发酵液的冠菌素浓度。Palmer 等^[24]优化选择 280 r/min 发酵生产。产冠菌素的同时也正处于菌体生长的旺季,对于溶氧的较高需求也暗示了产冠菌素过程的较高耗能,提供大量的氧气给菌体成为实施工业化生产冠菌素的又一个难题,很多较高产量的优化发酵条件在大规模扩大实施时无法达到原有产量。

目前的发酵条件优化依然存在以下问题:①碳氮源选择较为单一;②低温发酵限制的约束;③工业化高通量溶氧无法实现。

2.4 冠菌素的分离纯化技术

发酵生产得到的菌液中,冠菌素含量很低,需要便捷高效快速的分离纯化工艺,以降低工业化生产成本。大孔吸附树脂是最常见的天然产物分离提取手段,而且易于工业化放大,成为实验室分离提取冠

菌素研究的热点。

COR 作为小分子弱极性物质,吴晓玉等^[35]选择孔径较小的弱极性与非极性 3 种类型树脂 1400、HZ841 和 HZ803 进行实验,选择 1400 树脂进行初步的分离纯化。周静等^[36]筛选出 HZ-818 树脂,并对发酵液中冠菌素进行静态、动态吸附性实验,实现最佳吸附率为 93.14%,回收率可达 86.62%。

COR 的分离纯化研究是冠菌素生产研究的下游技术,是建立在传统菌种筛选的基础之上的,并且结合了现代的工业微生物产物分离技术,尤其是大孔吸附树脂的应用。

3 今后的研究方向

由于冠菌素的功能与生理研究的需要,以及冠菌素越来越广阔的工业与农业应用前景,冠菌素的生产研究也因此显得更为重要。通过对冠菌素生物合成通路的阐明,首先建立了化学合成冠菌素的工艺,实现了冠菌素生产研究的第一次重大突破,但由于不能满足大规模生产与应用的需要,人们开始进行培养条件的摸索和优化,并在一定程度上提高了冠菌素的发酵产量;在此基础上,从自然界重新筛选优势菌种,应用一般的诱变手段获得了部分耐高温的产冠菌素菌种,实现了冠菌素生产研究的第二次重大突破;在结合了相关分子生物学对于调节产冠菌素的基因研究之后,定点插入一定基因后的新型诱变,使新菌种的获得更加具有方向性,实现了冠菌素生产研究的第三次重大突破。

如果能够将菌种改造的手段明确地建立在分子层面上,使得产冠菌素活性能够在高温下适应广泛的营养条件,就可以进行大规模发酵生产,结合现代化的发酵液纯化处理技术,可以说就可以实现冠菌素生产研究的真正突破,将分子生物学、微生物代谢工程学和生物化工综合利用,兼顾菌株发酵一体化,变温积累的阶段性,发酵与分离的整体性,整个冠菌素产业的前路艰辛。

冠菌素的工业化应用可以为建立绿色农业、生态农业提供新一代农药,可以提高如紫杉醇等高附加值产物的产量,实现 COR 作为植物调节剂产品的大规模开发利用。

参考文献

- [1] Ichihara A, Shiraiishi K, Sakamura S. Partial synthesis and stereochemistry of coronatine[J]. Tetrahedron Letters, 1977, (3): 269 - 272.

- [2] Mitchell R E, Young S A, Bender C L. Coronamic acid, an intermediate in coronatine biosynthesis by *Pseudomonas syringae* [J]. *Phytochemistry*, 1994, 35 (2) : 343 - 348.
- [3] Ichihara A, Shiraiishi K, Sato H, *et al.* The structure of coronatine [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1977, 99 (2) : 636 - 637.
- [4] 汪宝卿, 李召虎, 段留生, 等. 干旱胁迫下外源冠菌素对玉米幼苗生长和内源激素含量的影响 [J]. *作物杂志*, 2008, (5) : 35 - 38.
- [5] 秦欣, 孙世玲, 王铭伦, 等. 干旱胁迫下冠菌素对花生幼苗叶片渗透调节物质及膜脂过氧化的影响 [J]. *花生学报*, 2009, (1) : 18 - 21.
- [6] 繆维言, 冯斗, 黄昌艳, 等. 冠菌素对香蕉幼苗的耐旱性影响效应 [J]. *中国南方果树*, 2009, (2) : 20 - 21.
- [7] Li X, Shen X, Li J, *et al.* Coronatine alleviates water deficiency stress on winter wheat seedlings [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52 (7) : 616 - 625.
- [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 [J]. *西北植物学报*, 2006, (9) : 1776 - 1780.
- [9] 王蕾, 王倩, 李召虎, 等. 植物生长物质冠菌素提高黄瓜幼苗耐冷性的效应 [J]. *中国农业大学学报*, 2006, (6) : 45 - 48.
- [10] 谢志霞, 李召虎, 田晓莉, 等. 冠菌素提高棉花耐盐性的抗氧化酶机理 [A]. 见: 中国棉花学会 2006 年年会暨第七次代表大会论文汇编 [C]. 保定, 2006.
- [11] Gyoso T, Hara Y. Manufacture of plant secondary metabolites using coronatines; CN, 10033190 [P]. 1998 - 02 - 10.
- [12] Yukimune Y, Hara Y, Tan H, *et al.* A method of producing a taxane-type diterpene; CN, 727492 [P]. 1996 - 08 - 21.
- [13] 汪宝卿, 李召虎, 翟志席, 等. 冠菌素及其生理功能 [J]. *植物生理学通讯*, 2006, (3) : 503 - 510.
- [14] Ishiga Y, Uppalapati S R, Ishiga T, *et al.* Involvement of coronatine-inducible reactive oxygen species in bacterial speck disease of tomato [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, 4 (3) : 237 - 239.
- [15] Melotto M, Underwood W, Koczan J, *et al.* Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion [J]. *Cell (Cambridge, MA, U. S.)*, 2006, 126 (5) : 969 - 980.
- [16] 艾林, 李召虎, 李建民, 等. 冠菌素对早稻和水稻幼苗形态及生理指标的影响 [J]. *中国农学通报*, 2008, (2) : 324 - 328.
- [17] 汪宝卿, 李召虎, 段留生, 等. 冠菌素和茉莉酸甲酯对玉米种子萌发和幼苗生长的影响 [J]. *现代农业科技*, 2008, (12) : 163 - 164.
- [18] 张国栋. 冠菌素的发酵研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2003.
- [19] Bagdache M, Bublitz F, Fritsche W, *et al.* Manufacture of coronatine, coronamic acid, coronafacic acid and derivs. with *Pseudomonas syringae* [P]. DE, 299591, 1992 - 04 - 30.
- [20] Nueske J, Bublitz F. In vitro coronatine production by several *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* isolates [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1993, 33 (4) : 241 - 246.
- [21] Bender C, Palmer D, Penaloza-Vazquez A, *et al.* Biosynthesis of coronatine, a thermoregulated phytotoxin produced by the phytopathogen *Pseudomonas syringae* [J]. *Archives of Microbiology*, 1996, 166 (2) : 71 - 75.
- [22] Budde I P, Rohde B H, Bender C L, *et al.* Growth phase and temperature influence promoter activity, transcript abundance, and protein stability during biosynthesis of the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine [J]. *The Journal of Bacteriology*, 1998, 180 (6) : 1360 - 1367.
- [23] Sreedharan A, Penaloza-Vazquez A, Escobar M C, *et al.* Simple and rapid capillary zone electrophoresis method for the detection of coronamic acid, a precursor to the *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57 (22) : 10518 - 10523.
- [24] 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]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (5) : 1619 - 1626.
- [25] 丰娟, 况志明, 王园秀, 等. 建立发酵液中冠毒素检测的薄层色谱法 [J]. *药物分析杂志*, 2008, 28 (3) : 451 - 455.
- [26] 李召虎, 章家长, 段留生, 等. 一种用于生产冠菌素的基因工程菌及其构建方法; CN, 1900269 [P]. 2005.
- [27] 吴慧玲, 李召虎. 物理化学诱变选育冠菌素高产菌株 [J]. *科技导报*. 2009 (12) : 34 - 37.
- [28] 焦睿. 新型植物调节物质冠菌素耐高温生产菌株的选育及生产工艺 [D]. 中国农业大学, 2006.
- [29] Bender C L, Penaloza-Vazquez A. Optimization of coronatine production in a genetically improved strain of *Pseudomonas syringae*; US, 7579164B2 [P]. 2007 - 04 - 25.
- [30] 吴晓玉, 储炬, 王园秀. 冠毒素高产菌株的半推理选育 [J]. *江西农业大学学报*, 2008, 30 (5) : 888 - 893.
- [31] 李昌灵, 吴晓玉, 王园秀, 等. 一株产冠毒素新菌株发酵条件的初步研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2006, 28 (4) : 592 - 597.
- [32] 吴晓玉, 曾晓春, 王园秀, 等. 一种伯克霍尔德菌生产冠毒素的方法及其发酵培养基; CN, 200710079842. 0 [P]. 2007.
- [33] 吴慧玲, 焦睿, 章家长, 等. Tn5 转座诱变选育冠菌素耐高温生产菌株及其发酵条件研究 [J]. *中国农业科技导报*, 2009 (1) : 62 - 67.
- [34] Rhode B H, Pohlack B, Ullrich M S. Occurrence of thermoregulation of genes involved in coronatine biosynthesis among various *Pseudomonas syringae* strains [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 1998, 38 (1) : 41 - 50.
- [35] 吴晓玉, 丰娟, 周静, 等. 树脂法提取冠毒素的研究 [J]. *江西农业大学学报*, 2007, 29 (4) : 660 - 664.
- [36] 周静, 李仕祥, 郭成志, 等. 大孔吸附树脂对冠毒素的吸附工艺研究 [J]. *西北农业学报*, 2008, 17 (5) : 132 - 138. ■