

高产细菌素菌株 WJ K84-1 的诱变筛选及其对植物病原菌抑菌机理的研究

王关林¹ 姜 丹² 方宏筠¹ 李洪艳¹ 李 霞¹

(¹ 辽宁师范大学生命科学学院 大连 116029)

(² 天津理工学院 环境科学与安全工程学院 天津 300191)

摘 要 :以发根土壤杆菌 K84 为供试菌株 ,对其进行紫外诱变 ,采用定向竞争选择技术 ,筛选出高产细菌素的目的菌株 WJK84-1 ,并对根癌农杆菌的抑菌作用及其抑菌机理进行了研究。通过琼脂扩散法和液体培养法测试表明 ,WJK84-1 菌株和其产生的 P-2001 细菌素均对 C58 病原菌有明显的抑制作用。蛋白电泳谱带分析示出 ,细菌素对 C58 病原菌的作用是抑制蛋白合成 ,使其蛋白总量表达水平呈下降趋势 ,尤其是大分子量蛋白含量下降显著 ,有的蛋白谱带(R1、R4)缺失 ,且随细菌素浓度的增加 ,抑制作用更加强烈。扫描电镜观察 ,细菌素作用后的菌体不同部位出现缢痕 ,直至缢缩成颗粒状残体而死亡。透射电镜观察进一步证明 ,C58 菌细胞膜被裂解 ,细胞结构被破坏而致死。樱桃接瘤实验表明 ,WJK84-1 菌株和其产生细菌素均可抑制根瘤发生 ,抑瘤率达到 83.4% 左右。

关键词 :K84 根癌农杆菌 ,细菌素 ,诱变筛选 ,抑菌机理 ,冠瘿瘤

中图分类号 :Q93 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2004)01-0023-06

植物冠瘿病(Crown gall disease)是由土壤根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)所致 ,病菌从根部伤口侵入植物细胞后 ,在植物的根、茎部均能产生肿瘤^[1]。根癌病是一种世界性植物细菌病害 ,寄主相当广泛 ,而且由于其致病机制特殊 ,即病菌将带有致瘤基因的 T-DNA 片段整合进入植物细胞核基因组 ,致使被侵染的植物细胞分裂失调 ,细胞无控制地增殖形成肿瘤^[2] ,目前还没有很好的化学治疗药物。其造成损失很大 ,甚至果树毁园。

鉴于化学农药对环境的污染和生态平衡的破坏 ,因此植物根癌病的生物防治更得到重视。最早的成功例子是用非致病的发根土壤杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)K84 菌株防治致病的根癌土壤杆菌^[3,4]。K84 菌能分泌细菌素(Agrocin) ,具有抑制 C58 根癌病菌的作用。细菌素是细菌代谢过程中合成 ,并分泌到环境中的一类对同种的或亲缘关系较近的种有抑(杀)菌作用的蛋白或多肽类物质^[5]。但现有的 K84 菌合成细菌素水平低 ,杀菌作用较弱 ,其抑菌机理也尚未完全阐明。为此 ,本实验旨在通

过定向竞争选择诱变技术 ,获得高产细菌素的 K84 突变菌 ,提高其杀菌效力 ,并研制新的生物农药。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌种 :拮抗菌株(生防菌):*Agrobacterium rhizogenes* K84 ,购自中国农业大学 ;指示菌株 :土壤根癌农杆菌 C58(*Agrobacterium tumefaciens*) ,购自中国科学院微生物研究所菌种贮藏中心。

1.1.2 培养基和抗生素 :产素培养基^[6] ;其它培养基^[7]有 BPY 培养基、LB 培养基、YEB 培养基。筛选抗生素、氨噻胍头孢霉素(Cefotaxime ,Cef)购置于 Sigma 公司。

1.2 紫外诱变和筛选方法

1.2.1 诱变处理 :发酵培养 18~24h 的 K84 菌 ,调整菌个数为 10^6 个/mL ,放入灭菌的培养皿中 ,将平皿置于磁力振荡器上 ,放在紫外灯下(30w ,照射距离 20cm)进行照射诱变。照射时间分别为 1min、3min、5min、7min ,分别取样液 1 mL 待用。为观察不

基金项目 国家自然科学基金国际合作项目(30310103130)

作者简介 王关林(1943-) ,男 ,浙江人 ,博士 ,教授 ,博士生导师 ,从事基因工程、细胞工程研究。Tel :86-411-4258779 ;E-mail :guanlinwang@163.com

收稿日期 2003-03-14 ,修回日期 2003-09-02

同菌体生长时期对突变的影响,根据正常菌体 K84 的生长曲线中各生长时期所对应时间,分别于 3h、8h、10h、18h 即菌体生长的延迟期、对数期、稳定期、衰亡期取样,进行辐射诱变,照射时间相同,观察菌体突变率的变化。

1.2.2 抗生素(Cef)抗性标记筛选:将紫外诱变处理得到的 K84 菌液,各取 100 μ L,涂布于含不同 Cef 浓度(100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、1000 mg/L)的 YEB 培养基上,于 28℃暗培养,将得到的有抗性的单菌落再进行初筛。

1.2.3 抗土壤根癌农杆菌 C58 定向竞争筛选:①用平板打孔法初筛抗 C58 的突变菌。②对 C58 强抑菌作用突变菌的筛选:将初选的抗性菌株与指示菌 C58 在液体培养基中进行不同体积比的混合培养,使二者竞争生长,之后再用含有 Cef 抗生素的培养基进行抗性筛选。获得在竞争中具有对 C58 强抑制作用,并带有抗 Cef 的突变菌。③高产细菌素菌株的筛选:从②得到的菌落,用同体积的产素培养基发酵培养相同时间,再次用平板打孔法检测其上清液中抑菌物质的抑菌效果,最后选定一株抑菌活性较高的作为细菌素高产菌株,定名为 WJK84-1。④用 SDS-PAGE 比较突变菌 WJK84-1 与原始菌 K84 胞内表达蛋白的差异,以验证 WJK84-1 确实是源自 K84 的突变菌株。

1.3 细菌素的粗提和理化性质检测

将在产素培养基中,28℃培养 30h 的 WJK84-1 的发酵液进行离心(4000r/min,30min),得上清,放入 65℃水浴锅中进行浓缩,待浓缩到原有体积的 1/20 左右,进行透析,再经无菌滤膜过滤,最后经冷冻干燥,得细菌素粗品,定名为 P-2001。通过 D20mm 的透析袋透析、EB 染色、对蛋白酶、温度及酸碱度的敏感性试验以及有机溶剂的处理,初步分析 P-2001 的理化性质。

1.4 P-2001 抑菌活性检测

1.4.1 P-2001 对 C58 根癌农杆菌的平板抑菌敏感性检测:采用两倍稀释法^[8],将 P-2001 配成不同浓度 0.5g/mL、0.25g/mL、0.125g/mL、0.0625g/mL,加到含指示菌 C58($10^3 \sim 10^5$ cfu/mL)的检测平板的孔中,28℃过夜培养,以肉眼能观察到抑菌圈的 P-2001 浓度,即为 P-2001 的最低抑菌浓度(MIC)。

1.4.2 P-2001 和 WJK84-1 菌的接瘤试验:将过夜培养的 C58,按 1:50 的比例,接种于 BPY 液体培养

基中,放入 28℃培养箱中(160r/min),待 OD_{500} 大约 0.3 左右将菌取出,进行樱桃试管苗茎段接瘤实验。将培养好的 C58 菌株分为 3 份:一份作为对照组;一份等体积加入 3 种浓度 0.5g/mL、0.25g/mL、0.125g/mL 的 P-2001;一份加入等体积的 WJK84-1 菌。将预培养一天且带有伤口的试管苗樱桃茎段,分别在上述 3 种不同的菌液中侵染 30s,之后平放于无激素的 MS 培养基中,共培养 3d 后,转移到含 500mg/L Cef 抗生素的无激素 MS 培养基中继续培养。同时以 C58 单独接种、WJK84-1 单独接种作对照,2 周后观察,统计抑瘤率。

1.5 P-2001 抑菌机理分析

1.5.1 指示菌 C58 生长曲线绘制及 P-2001 抑菌时期测试:将 C58 培养到对数生长期,分成加药组和对照组。此时加药组加入 P-2001,根据 MIC 确定指示菌加药组的 P-2001 的加入剂量为 0.25 g/mL。之后与对照组同步继续培养,用分光光度计检测 P-2001 作用后指示菌 C58 生长曲线的变化。

1.5.2 菌体蛋白 SDS-PAGE:SDS-PAGE 采用 Leammli 系统^[8]:10%分离胶、4%浓缩胶。将处于对数生长期的菌株分为对照组和加药组。根据菌体的生长曲线,分别于相同时间 1h、2h、4h、8h、24h 取 5mL 样液,取 4h 和 24h 两组作为对照组。将对照组和加药组的菌株稀释成 OD_{500} 值相同,离心收集菌体,悬于 50 μ L 无菌水中,按体积比 1:4 加入 200 μ L 样品缓冲液,于沸水浴中煮沸 4min,离心收集上清菌体胞内可溶性蛋白,进行电泳。采用凝胶成像系统的 Gel-Pro Analyzer (Version 3.1) 蛋白分析软件,定量分析指示菌胞内可溶性蛋白含量的变化。

1.5.3 扫描及透射电镜观察:菌体制备同 1.5.2,设定药物作用时间分别为 4h、24h,每次各取 1.5mL 样液,按扫描电镜及透射电镜生物样品制备法^[9]制样,在电镜下观察菌体外观形态及超微结构。

2 结果和分析

2.1 WJK84-1 突变菌株的诱变筛选

2.1.1 不同紫外照射时间及抗生素浓度对 K84 的诱变效应:取经紫外线不同照射时间处理的样液各 0.1 mL,涂布于含不同抗生素(Cef)浓度的 YEB 培养基上,计存活菌落数(表 1)。结果显示,随照射时间的延长、抗生素浓度的提高,突变菌落数呈下降的趋势。当抗生素浓度达 1000 mg/L,无突变菌落长出。

表 1 不同抗生素浓度和不同紫外线照射时间
对 K84 突变菌落数的影响

| Table 1 Effects of Cef antibiotic concentration and UV radiation time on mutant amount of K84 | | | | | |
|--|--------------------|-----|-----|-----|------|
| Radiation time /min | Cefotaxime(mg/L) | | | | |
| | 200 | 300 | 400 | 500 | 1000 |
| 1 | 14 | 3 | 3 | 1 | 0 |
| 3 | 8 | 3 | 6 | 1 | 0 |
| 5 | 5 | 1 | 0 | 2 | 0 |
| 7 | 4 | 2 | 1 | 2 | 0 |

2.1.2 不同菌体生长时期对诱变率的影响：分别取不同生长时期菌体样液 0.1mL 涂布于含500mg/L Cef 的培养基上进行筛选。以未诱变处理的相同数量级的菌株为对照。结果表明，菌体生长的对数期的诱变率最高，为 12%。其次是延迟期，稳定期突变率较低，而衰亡期基本接近于零。

2.1.3 抗 Cef 的突变菌株的获得：从 2.1.1 和 2.1.2 所得单菌落中，随机挑取了 38 个菌株，进行平板抑菌试验，检测发酵上清液中细菌素的抑菌活性情况。其中正突变率达 52.6%，细菌素平均提高率 20% 以上的菌株有 31.6%，最大提高率达 100%。根据平板抑菌实验结果，选出 8 株抑菌活性较高的同时带有 Cef 抗性的突变株，作为竞争共培养选择的出发菌株。

2.1.4 抗 Cef 的高产细菌素菌株 WJK84-1 的获得：在上述 8 株不同突变菌基础上，采用竞争选择法，分别按 WJK84-1:C58 为 1:1、1:5、1:10 的 3 个等级比例，与 C58 进行混合培养，而后再次在抗生素培养基上筛选，将得到的菌落进行发酵培养，在同步培养条件下，比较其上清液中抑菌物质的抑菌效果，最后选定 3 株抑菌活性较高的作为细菌素高产菌株，其中 1 号抑菌活性最好，定名为 WJK84-1，此突变菌细菌素提高率达 150%。从 SDS-PAGE 图谱可见，突变菌 WJK84-1 与原始菌 K84 胞内蛋白在大分子量蛋白条带上存在明显差异。

2.2 WJK84-1 菌株细菌素粗提物 P-2001 的理化性质和 MIC

2.2.1 细菌素 P-2001 理化性质初探：对细菌素 P-2001 的粗提物初步进行了理化性质分析，结果表明，该物质进行透析后，抑菌活性物质主要存在于周围透析液中，可见是一类分子量很小的小分子物质，其具体的化学结构还有待于进一步研究；经 EB 染色，在紫外灯下有荧光现象；100℃作用 30 min 仍然

保持抑菌活性，说明 P-2001 对热稳定，该物质在酸性条件下的稳定性高于碱性条件下，且醇溶性较好；对胃蛋白酶敏感，随酶浓度的提高，抑菌活性降低，3mg/mL 酶浓度下仍有部分抑菌活性。

2.2.2 最低抑菌浓度(MIC)：以 C58 为指示菌，将 1g /mL 的 P-2001，用二倍稀释法^[8]，进行抑菌活性测定，重复操作 3 次，确定 MIC 为 0.0625g/mL。

2.3 WJK84-1 菌和 P-2001 对樱桃根瘤的防治作用

接瘤实验对照组表明，致病菌 C58 的致瘤率为 97.3%，WJK84-1 菌株无致瘤作用。当 C58 菌液中分别加入 WJK84-1 菌株和 P-2001 后接种的樱桃的抑瘤率，统计结果如下：P-2001 的抑瘤效果最好，高达 83.4%，其次是突变菌株 WJK84-1 为 72.2%，突变供试原始菌株 K84 为 53.5 % 的抑瘤率。可见，突变菌株 WJK84-1 的抑瘤作用经突变后有明显提高。

2.4 P-2001 抑菌机理的分析结果

2.4.1 P-2001 对指示菌 C58 生长曲线的影响：从生长曲线(图 1)可知：对照组正常生长，出现菌体数量明显增长的对数生长期，之后是正常生长的稳定期和衰亡期，而加药组只出现了一个短暂的不显著生长的对数期，随后细菌数呈明显的下降趋势，很快就进入衰亡期。随 P-2001 作用时间的延长，菌体的生长一直处于较低的水平。该对比生长曲线表明，P-2001 主要抑制了 C58 对数生长期细胞的分裂。

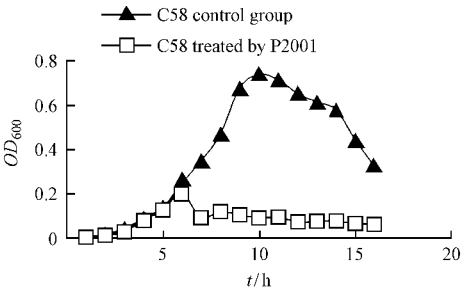


图 1 P-2002 对 C58 菌生长曲线的影响

Fig.1 Effect of P-2001on the growth curve of C58

2.4.2 P-2001 作用后指示菌 C58 的 SDS-PAGE 蛋白谱带变化：比较正常 C58 菌和 P-2001 作用后 C58 菌的菌体蛋白电泳谱带，结果表明：P-2001 作用后的 C58 菌的大分子量的蛋白带与正常 C58 菌相比，明显变浅，差异显著。图 2 示出，大分子量蛋白 R1、R4 在 P-2001 作用 24h 后均缺失，而蛋白 R7、R9 在 P-2001 作用 4h、8h 后变浅，随 P-2001 作用时间的延长，在作用 24h 后缺失。经 Gel-Pro Analyzer 蛋白分析软件定量分析的结果表明(表 2)，P-2001 作用后

的 C58 菌体内总蛋白的表达量呈明显下降趋势。正常 C58 培养 24h 后总蛋白的 OD_{500} 值为 710.43 ,而 P-2001 作用 24h 后 C58 菌总蛋白的 OD_{500} 降为 360.40 ,下降了近 1 倍。其中大分子量蛋白含量减少尤为明显 ,许多大分子量蛋白的表达量达不到软件检测的剂量。

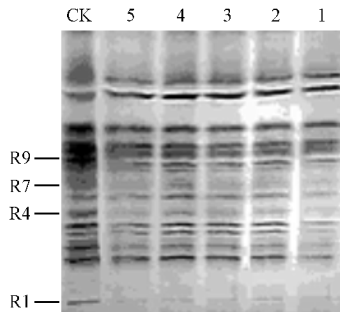


图 2 P-2001 不同作用时间 C58 菌体内蛋白的变化

Fig.2 The difference of soluble protein of C58 treated by P-2001 for different time
1. 24h ; 2. 8h ; 3. 4h ; 4. 2h ; 5. 1h.

表 2 Gel-Pro Analyzer 软件定量分析 C58 菌体内蛋白含量 OD 值表化

| Table 2 Changes of the content of the protein in the C58 effected by P-2001 for different time analysed by Gel-Pro Analyzer | | | | | | |
|---|--|--------|--------|--------|--------|--------|
| Protein lanes | OD ₅₀₀ of different lanes theated by different time | | | | | |
| | CK | 24h | 8h | 4h | 2h | 1h |
| R1 | 15.466 | — | — | — | — | — |
| R2 | 32.265 | 18.562 | 27.088 | 28.045 | 34.287 | 36.166 |
| R3 | 24.977 | 16.258 | 19.965 | 20.364 | 21.684 | 15.642 |
| R4 | 7.2468 | — | — | — | — | — |
| R6 | 22.567 | 17.567 | 19.689 | 18.326 | 18.247 | 16.294 |
| R7 | 16.256 | — | 8.2354 | 9.1468 | 10.394 | 11.312 |
| R8 | 13.469 | 11.777 | 15.149 | 16.443 | 17.149 | 13.347 |
| R9 | 14.067 | — | 14.836 | 12.358 | 16.185 | 15.953 |
| R10 | 32.835 | 23.641 | 23.994 | 24.582 | 25.502 | 29.581 |
| R11 | 44.172 | 27.178 | 24.358 | 26.877 | 25.369 | 35.579 |
| R12 | 38.605 | 34.974 | 42.202 | 41.934 | 41.457 | 39.359 |
| R13 | 24.977 | 16.258 | 19.965 | 21.877 | 19.548 | 16.679 |
| R14 | 3.4892 | — | 1.8694 | 1.6324 | 1.9765 | 2.0134 |
| Sum | 710.43 | 360.40 | 412.36 | 433.25 | 466.78 | 578.34 |

The 35 lanes of protein were detected by Gel-Pro Analyzer only 14 lanes were given in table.

2.4.3 细菌素 P-2001 作用后 C58 菌体形态及超微结构的改变 :在扫描电镜下观察 P-2001 作用后的 C58 菌 ,其形态与对照组有明显的改变。对照组菌

体表面平滑、饱满、两端钝圆、规则的短杆状 ,折光性好。而加药组 ,不同作用时间其形态变化不同。经 P-2001 作用 4h 后 ,菌体变形 ,个体变小 ,大部分菌体表面出现缢痕 ,直至缢缩或断裂。不同菌体出现缢痕的部位不同 ,有的出现在端部 ,有的在菌体的中间部位。P-2001 作用 8h 后 ,大部分菌体缢缩或断裂成颗粒状残体 ,菌体形态变得多样且不规则(图 3-A , B)。

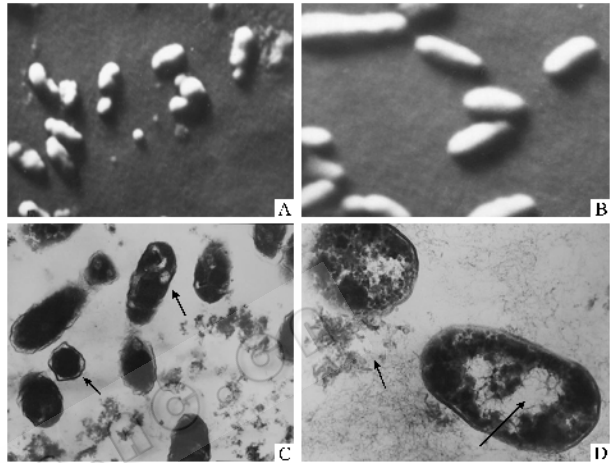


图 3 扫描和透射电镜下的 C58 菌的形态结构

Fig.3 Morphology and structure of C58 under scanning electron microscope and transmission electron microscope

A :Normal C58(10000 ×);B :Shapes of C58 after exposure to P-2001 for 24 hours(10000 ×);C :Spores of C58 after exposure to P-2001 for 4 hours(20000 ×);D :Spores of C58 after exposure to P-2001 for 8 hours(40000 ×).

经过透射电镜观察 ,对照组 C58 菌体体积较大 ,细胞壁和细胞膜完整 ,胞壁和胞膜结合紧密 ,细胞质均质化。P-2001 作用 4h 后的菌体 ,胞壁和胞膜间的空隙增宽 ,出现质壁分离现象 ,细胞质固缩、凝集成块 ,出现空腔(图 3-C ,箭头) 。P-2001 作用 8h 后 ,细胞受损严重 ,可见胞壁和胞膜破裂 ,于破裂处有胞浆内容物泄出 ,不规则散布在细胞周围。随药物作用时间的延长 ,镜下破损细胞的比例逐渐增大。(图 3-D ,箭头)

3 讨论

3.1 定向竞争选择诱变筛选方法的分析

紫外线诱发碱基突变 ,遗传性能比较稳定^[10]。80 年代以来 ,抗生素定向育种技术已经广泛应用于高产突变菌株的筛选过程中 ,虽然存在一定的随机性 ,但仍是目前常用的行之有效的育种手段^[11]。本研究在常规紫外诱变基础上 ,结合 Cef 抗生素筛选 ,

使目的菌株带上抗性基因,形成标记。并模拟自然选择规律,设计突变菌与指示菌 C58 混合培养,给二者提供了一个生存竞争的环境。在筛选的过程中逐渐增加 C58 菌浓度,提高竞争压,最后用抗生素选择培养基,成功筛选出既抗 Cef,又强烈抑制 C58 根癌农杆菌的突变菌株 WJK84-1。此方法快速、目的性强,筛选工作量小且要求设备低。提高了诱变筛选的变异性、选择性、定向性和稳定性,从而提高了诱变效率。

诱变处理的供试菌株最好是处于对数生长期,此生长时期菌体细胞生长速率最大,酶系丰富,DNA 合成旺盛,与这些基本生理功能相关的基因表达活跃,都处于转录或转译状态。此时进行紫外照射,对其基因结构造成突变的机率大,突变率高。菌体生长的延迟期虽然生长速率很低,但合成代谢活跃,且对外界不良条件的反应敏感。对处于延迟期的菌株进行诱变处理,也较易得到突变菌落。

3.2 突变菌株 WJK84-1 抑菌机理分析

从 WJK84-1 菌株发酵液中分离出了细菌素 P-2001 表现很强的对 C58 抑菌活性,并且随 P-2001 浓度的提高而增强。这说明 WJK84-1 菌的抑菌作用主要通过产生 P-2001 而表现抑菌活性。Anne^[12]认为细菌素杀菌机制有多种方式,即影响蛋白质的合成、DNA 的稳定性及细胞膜的完整性。

本研究的蛋白电泳结果表明,随 P-2001 作用时间的延长,指示菌 C58 的某些大分子量蛋白表达量降低,甚至缺失。从 P-2001 作用后指示菌 C58 生长曲线的变化图可知:C58 菌经 P-2001 处理后,没有出现正常生长的对数生长期。而对数期是细胞分裂的主要时期,也是 DNA 合成期。因此这些缺失或合成减少的蛋白可能与 DNA 合成调控有关。结合电泳结果和生长曲线的变化,分析 P-2001 的抑菌作用机理可能是影响了 C58 调控 DNA 合成相关基因的表达,从而阻碍了这些蛋白和酶的合成,使病原菌 C58 的 DNA 合成受抑制,影响了菌体细胞分裂所必需的某些蛋白质。1996 年吴健胜^[13]等人报道了土壤杆菌素 84(Agrocin84)可特异结合在农杆菌壁膜间隙中的蛋白质上,从而进入农杆菌体内,干扰细胞的主动吸收,干扰 ATP 酶的作用,抑制 DNA 的合成。Das^[14]等人的结论也是:Agrocin84 主要作用是抑制 DNA 的合成。本研究的实验结果分析与上述等人的报道基本一致,并进一步推断出是一些与 DNA 合成相关的

蛋白和酶的基因被抑制。与此同时,通过扫描电镜观察经 P-2001 作用后指示菌 C58 的微观形态的变化,利用透射电镜观察进一步分析 P-2001 抑菌机理。结果表明,P-2001 作用后引起 C58 菌体细胞质凝聚,固缩出现空腔,最后细胞膜和细胞壁破裂而死亡。结合蛋白和酶的变化推测:P-2001 渗透进入胞内,除抑制菌体某些 DNA 合成外,还可能抑制了某些与菌体的正常生长相关的蛋白和酶的基因表达,最后使菌体解体,以至死亡。

参 考 文 献

- [1] 马德钦,张洪胜,梁卫东.应用土壤杆菌防治植物冠瘿病.微生物学报,1995,22(4):238-242.
- [2] 王慧敏,隋新华.樱桃根癌土壤杆菌及其对土壤杆菌素 84 敏感性的研究.微生物学报,1998,38(5):381-385.
- [3] Kerr A. Biological control of crown gall through production of agrocin84. *Plant Disease*, 1980, 64(1):25-30.
- [4] 李增智.菌物在害虫、植病和杂草治理中的现状和未来.中国生物防治,1999,15(1):35-40.
- [5] Klaenhammer T R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 1988, 70:337-349.
- [6] Stonier T. Function on medium of bacteriocins. *J Bacteriol*, 1960, 79:899-898.
- [7] 范秀容,李广武,沈萍,等.微生物学实验指导.北京:高等教育出版社,1996:260-268.
- [8] 马绪荣,苏德模.药品微生物检验手册.北京:科学出版社,2001:210-215.
- [9] 李文镇.图解扫描电子显微镜技术.北京:科学出版社,1984:1-50.
- [10] 陆文清,李得发,潘宝海,等.饲用酶制剂高产菌种的诱变筛选.饲料研究,2001,3(6):9.
- [11] 李树彬,杨劲松,刘阳,等.抗真菌抗生素高产菌株的推理选育及其发酵调控研究.中山大学学报(自然科学版),2001,40(4):13-16.
- [12] Anne K V. Synthesis of antibiotically active pare of agrocin84. *Plant Disease*, 1983, 67(5):417-475.
- [13] 吴健胜,王金生.植物病原细菌的细菌素.微生物学通报,1996,23(2):4-9.
- [14] Das P K, Basu M M, Chatterjee G C. Study on the mode of action of agrocin 84. *J Antibiot*, 1978, 31:490-492.

Study on Mutation Breeding of High Bacteriocin-producing Strain WJK84-1 and Antimicrobial Mechanism Against Crown Gall Disease of Plant

WANG Guan-Lin^{1*} JIANG Dan² FANG Hong-Jun¹ LI Hong-Yan¹ LI Xia¹

(¹ College of Life Science ,Liaoning Normal University ,Dalian 116029 ,China)

(² School of Environmental Science and Safety Engineering , Tianjin University of Technology , Tianjin 300191 , China)

Abstract :Based on the means of mutations with UV , a high bacteriocin-producing mutant WJK84-1 was successfully obtained when the original strain K84 treated by the method of competitive selection. Antimicrobial activities and the antimicrobial mechanism against crown gall disease were tested. Through the method of agar diffusion assay and culture in liquid medium , the result showed that the strain of WJK84-1 and its secondary metabolites P-2001 all had strong inhibition to the strain of C58. SDS-PAGE demonstrated that the content of total protein in C58 decreased , especially the protein of large molecule , some of them (R1、R4) even disappeared. The inhibition increased along with the increased concentration of the bacteriocin. Observation under scanning electron microscope and transmission electron microscope revealed that the structure of C58 was destroyed by bacteriocin , and changed its shapes , at last , constricted into little particles and died. The experiment of antitumor in cherry indicated that the strain of WJK84-1 and its product bacteriocin all had higher antitumor effect on the crown gall disease in cherry , the inhibitory rate achieved about 83.4 percent.

Key words :*Agrobacterium radiobacter*84 , Bacteriocin , Mutation screening , Antimicrobial mechanism , Crown gall tumor

Foundation item : National Natural Science Foundation (30310103130)

* Corresponding author. Tel : 86-411-4258779 ; E-mail : guanlinwang@163.com

Received date 03-14-2003

《微生物学报》真诚欢迎刊登广告

《微生物学报》(双月刊)创刊于1953年,由中国微生物学会和中国科学院微生物研究所主办,是我国微生物学领域唯一的综合性学报级期刊和国家自然科学基金核心期刊,被国内外多家重要的文摘刊物和数据库收录。曾多次被评为优秀科技期刊。

本刊历史悠久,发行量大,内容涵盖面广,主要报道我国普通微生物学、工业、农业、医学和兽医微生物学、病毒学、免疫学以及生物工程等方面的研究成果和科研进展。一直受到国内外科研工作者、高等院校师生和相关企业界的欢迎。

本刊可以为您定期发布与微生物学相关的试剂、药品、仪器、设备及生物技术等方面的产品信息,可为您开拓在微生物学领域新的发展空间。本刊科学严谨,信守协议,由中国科学院科学出版社广告部代理广告业务(广告经营许可证:京东工商广字第0034号)编辑部备有最新的期刊简介和报价单,欢迎与我们联系。

通讯地址 北京海淀中关村 中国科学院微生物研究所内

《微生物学报》编辑部

邮政编码 100080

电 话 (010) 62630422 62554303

传 真 (010) 62554303

电子信箱 actamicro@sun.im.ac.cn

联 系 人 王晋芳 王 敏