

易龙,张亚,廖晓兰,等.链霉菌防治植物病害的研究进展[J].江苏农业科学,2014,42(3):91-95.

链霉菌防治植物病害的研究进展

易龙¹,张亚^{1,2},廖晓兰¹,苏品³,蒋程¹

(1.湖南农业大学生物安全科学技术学院,湖南长沙 410128;

2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室,湖南长沙 410128; 3.湖南农业科学院植物保护研究所,湖南长沙 410125)

摘要:链霉菌是一种生防菌,可用于防治多种植物病害。本文介绍了链霉菌分类、对植物病害的生防机制,重点讨论了链霉菌提高防治植物病害的途径,提出了链霉菌应用研究中存在的主要问题,并对其进行了展望。

关键词:链霉菌;生物防治;植物病害;生防机制;研究进展

中图分类号: S476.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0091-04

20世纪50年代以来,化学农药在粮食生产中起着举足轻重的作用,然而化学农药的广泛应用,造成了环境污染、农药残留、破坏生态平衡及病菌产生抗药性等问题。这促使各国政府、企业从过去单一开发化学农药,转而投入大量的人力、财力和物力开发生物农药。近年来,越来越多的生物农药商品化,开发对人类以及环境友好的、防治效果良好的、新的植物病虫害生物防治方法一直是各国科学家研究的热门领域^[1]。链霉菌(*Streptomyces*)是高等放线菌,可产生多种抗生素、植物激素等活性物质,对提高植物的抗病、抗逆性能具有重要的作用,具有开发生物农药的潜力^[2-3]。国内外对链霉菌防治植物病害鲜见综述报道,本文对国内外的链霉菌防治植物病害的相关研究进行了综述,并对其发展前景进行了展望,以期进一步发挥链霉菌的生防作用,实现其代谢活性物质的高产量、工业化及开发低毒、高活性的新型物质,使其更好地为农业服务。

1 链霉菌的分类

长期以来,链霉菌缺少统一的分类标准,直到1943年Waksman等才首次建立了链霉菌属^[4]。1962年,链霉菌数值分类方法得到应用,Kämpfer等用数值分类法测定了链霉菌属和链轮丝菌属821个菌株的329个特征^[5]。但后来发现链霉菌种的数量太大,而化学分类比数值分类更适合分析大量菌株,并有极高的可重复性。Manchester等通过全细胞蛋白SDS-PAGE图谱分析,快速、准确地对大量链霉菌菌株进行了分类^[6]。20世纪80年代,随着核酸测序技术的发展,系统发育树成为研究链霉菌分类地位最有效的方法。近年报道的链霉菌新种多是由16S rRNA序列分析确定的。Slim等基于16S rRNA基因的核苷酸序列,将TN17的放线菌确定为典型的链霉菌^[7]。目前,链霉菌分类学研究发展为多相分类,即综合考虑传统的表型分类(形态和生理生化特征)、数值分

类、化学分类和分子分类等各种信息,以确定菌株的分类地位。文才艺等通过确定形态特征、生理生化特性、细胞壁组分和16S rRNA基因序列的序列综合分析,将分离的放线菌SCY311确定为圆突起链霉菌^[8]。但我国国内与国际研究仍存在差距,不仅使发表的新种得不到国际承认,而且加大了开发以及利用链霉菌资源的难度。链霉菌是一个高度分化的菌属,不同菌种之间有很大的差异,因此研究链霉菌的分类,建立快速、准确的链霉菌鉴定方法是目前我国链霉菌研究的重要课题,也是研究链霉菌防治植物病害的前提。

2 链霉菌生防机制

关于链霉菌的生防作用机制,国内外学者进行了大量研究。链霉菌对植物病害的生防作用机制包括拮抗作用、竞争作用和诱导植物抗性作用等方面,其生防效果往往不是单方面的,而是以上几种方式作用的综合结果,不同生防机制之间往往存在着协同作用。

2.1 拮抗

拮抗作用是微生物界的普遍现象。链霉菌能利用拮抗作用抑制其他植物病原微生物,即通过链霉菌次生代谢产物以及新的生物活性达到防治植物病害的目的^[9-10]。申屠旭萍等报道了丰加霉素对水稻纹枯病菌、葡萄炭疽病菌和番茄灰霉病菌等7种植物病原真菌有很好的拮抗作用^[11]。Harikrishnan等从土壤中分离的链霉菌VSMGT1014乙酸乙酯提取物有明显抑制真菌菌丝生长、孢子和菌核萌发的作用^[12]。Oskay研究了链霉KEH23菌株,发现其对人类致病细菌有抗菌活性,如金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌,且该菌可作为植物和人类的病原体生物防治剂^[13]。Jayakumar等认为,阿维链霉菌发酵液对根结线虫、南方根结线虫和肾形线虫有拮抗作用^[14-15]。链霉菌可在代谢过程中产生抗生素和酶类等活性物质,来拮抗病原菌的生长、繁殖和侵染。

2.1.1 抗生素 链霉菌可通过产生抗生素来发挥拮抗作用。据统计,链霉菌产生的抗生素约为微生物产生的抗生素总量的90%^[16]。作为生物农药的一个重要分支,农用抗生素因具有高效、无残留、易分解、与环境相容等优点而日益受到重视。细黄链霉菌(*S. microflavus*)产生的大环二酯类抗病毒抗生素Fattviracins,对多种有包膜的DNA和RNA病毒有活性^[17]。对链霉菌抗生素的研究很多,其他不再一一列举(表1)。

收稿日期:2013-07-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31070397);湖南省教育厅一般项目(编号:12C0184);湖南省大学生科技创新项目(编号:SCX1209)。
作者简介:易龙(1990—),男,主要从事有害生物生物防治研究。

E-mail:longyi1227@yahoo.com.cn.

通信作者:张亚,博士,讲师。E-mail:zhangya230@126.com.

表 1 链霉菌产生的常用农用抗生素

抗生素名称	抗生素类型	产生菌代表
井冈霉素 ^[18]	氨基糖苷类	<i>S. hygroscopicus</i>
大观霉素 ^[19]	氨基糖苷类	<i>S. lividans</i>
嘌呤霉素 ^[20]	氨基糖苷类	<i>S. alboniger</i> ATCC 12461
春雷霉素 ^[21]	氨基糖苷类	<i>S. kasugaensis</i> M338 - M1
武夷霉素 ^[22]	氨基糖苷类	<i>S. ahysgroscopicus</i> var. <i>wuyiensis</i>
瑞拉霉素 ^[23]	氨基糖苷类	<i>S. venezuelae</i> var. <i>qinlingensis</i>
丰加霉素 ^[24]	核苷类	<i>S. rimosus</i>
灭瘟素 ^[25]	核苷类	<i>S. griseus</i>
尼可霉素 ^[26]	两性水溶性核苷类	<i>S. ansochromogenes</i> 7100
农抗 120 ^[27]	嘧啶核苷类	<i>S. hygrospinosus</i> var. <i>beijingensis</i>
多氧霉素 ^[28]	肽啶核苷类	<i>S. cacaoi</i> var. <i>asoeinsisasoensis</i>
土霉素 ^[29]	四环素类	<i>S. rimosus</i>
抗生素 8510 ^[30]	氨基环醇类	<i>S. rutgersensis</i>
阿扎霉素 B ^[31]	十六环大环内酯类	<i>S. hygroscopicus</i> NND - 52
巴弗洛霉素 K ^[32]	大环内酯类	<i>S. flavotricini</i> Y12 - 26
纳他霉素 ^[33]	多烯炔内酯类	<i>S. lydicus</i>
红霉素 ^[34]	酮内酯类	<i>S. erythreus</i>
腐霉素 ^[35]	聚醚类	<i>S. hygroscopicus</i>

2.1.2 酶类 链霉菌通过产生各种酶类抑制、降解、水解其他病原体,也是表现在防治植物病害上的一种途径。万平平等筛选出产生 β -1,3-葡聚糖酶的链霉菌,证明该酶对小麦纹枯病菌抑制作用很强,盆栽防病试验表明,小麦的种子通过酶液处理后,防病效果为 64.28%^[36]。Morita 等提纯了作用于细胞壁肽聚糖的溶菌酶,该溶菌酶可以破坏细胞壁使微生物裂解死亡,而且对人和动植物没有明显毒性,安全可靠^[37]。链霉菌 WYEC108 分泌的几丁质酶,可通过催化几丁质的水解破坏植物病原真菌细胞壁的主要成分,从而具有抑制植物病害发展的作用^[38-39]。Singh 等从链霉菌 A6 纯化得到抗真菌丝氨酸蛋白酶^[40]。Bielen 等研究了天蓝色链霉菌产生可作为生物催化剂的酯酶^[41]。

2.2 竞争

目前研究的生防菌多数具有与病原菌的竞争作用,这也是生防微生物发挥作用的主要机制之一。竞争作用包括营养竞争和空间竞争。空间竞争是生防菌对植物表面空间或内部空间尤其是病原菌侵入位点的争夺,生防菌预先定殖在植物表面阻止病原菌的直接侵入。链霉菌可以通过快速生长和繁殖而夺取养分和水分、占有空间、消耗氧气等,以致削弱和排除同一生存环境中的某些病原物。链霉菌对生存空间和营养资源的竞争作用特别强,可以利用这一特点来排斥病原菌。

2.3 诱导植物抗性作用

在关注生防菌与致病菌之间相互作用的同时,也不能忽略其对寄主植株的作用,很多微生物可以诱导寄主植物产生防御反应,使得局部或系统获得抗性。张穗发现,吸水链霉菌可使水稻叶片中的过氧化物酶和苯丙氨酸解氨酶的活性增强,诱导植株产生抗性防卫反应,具有激发水稻抗性防卫反应表达的特性^[42]。链霉菌组成型表达载体 pIB139 携带的红霉

素强启动子与目的基因的优化及生物合成,可以直接与植物相互作用,诱导植物抗性,与抗生素协同抗病^[43]。

3 提高链霉菌防治植物病害效果的途径

由于链霉菌防治植物病害时存在防治效果难以稳定、持久等缺点,寻找提高链霉菌防治植物病害效果的途径显得十分重要。提高链霉菌防治植物病害效果的途径有诱变育种、固定化技术和改良发酵工艺等,其目标是为了提高目标产物的产量和纯度,减少副产物,改变生物合成途径,以获得高产的新产品。人们经常通过种内融合或者紫外诱变等方式提高链霉菌分泌抗生素的能力,以提高其抑菌能力^[44-45]。

3.1 诱变育种

人工诱变能提高突变频率和扩大变异谱,具有速度快、方法简便等优点,是当前菌种选育的一种方法。我国在利用太空辐射诱变对尼可霉素产生菌圈状链霉菌的影响时发现,其主要生物活性组分 X 和 Z 的含量均有所提高^[46]。车洪杰采用紫外线诱变和氯化锂加紫外线复合诱变的方法对普特拉链霉菌 F-1 进行诱变改良,增强了其防病效果,降低了抗真菌物质分离纯化的难度^[47]。张茜茜等对吸水链霉菌井冈变种进行了⁶⁰Co γ 射线、亚硝酸-紫外和紫外复合诱变,经过逐级诱变筛选出一株高产菌株 F-101,该菌株的代谢产物井冈霉素 A 组分含量比原菌株高 33.5%^[48]。

3.2 固定化技术

固定化微生物技术于 20 世纪 80 年代兴起,是一种具有良好发展前景的新型生物技术,有利于提高生物反应器内微生物细胞浓度和纯度、保持高效菌种、二次污染小等。朱祥瑞等用蚕丝为载体材料通过吸附和交联方法制备成固定化链霉菌,其活性比游离链霉菌高,适应范围广^[49]。用微生物固定化细胞方法生产生物工程产品早已有报道,从海底泥分离的灰棕褐链霉菌(p-33)产生 α 、 β -不饱和 γ -内酯类抗生素,将其固定在硅藻土中进行发酵,其抗菌活性提高 2 倍,抗生素产量提高 2.6 倍。朱启忠等研究了链霉菌 Strz-2 木聚糖酶被固定化后的酶活性变化情况,结果发现固定化酶优于原酶^[50]。Ibrahim 将海藻酸钙固定化细胞作为生物催化剂,结果表明固定化细胞的链霉菌对抗微生物病原体更有效^[51]。

3.3 发酵工艺

发酵可以使链霉菌富集,从而获取大量防治植物病害的活性物质。为了让链霉菌更好发挥生防作用,优化链霉菌的发酵工艺显得十分有意义。邱立友等将链霉菌 A048 采用几丁质和纤维素双因子诱导二步发酵,产生的几丁质酶活性比只加几丁质诱导的高 4 倍^[52]。骆健美等用最陡爬坡路径、中心旋转组合设计及响应面分析方法得到褐黄孢链霉菌纳他霉素发酵条件较佳的试验点,与原始培养条件相比,纳他霉素产量提高了 2 倍^[53]。Adinarayana 等优化了生产新霉素的弗氏链霉菌半固态发酵,新霉素含量可达 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[54]。刘薇等进行了串珠霉与链霉菌 2 株菌株混合协同互助发酵产纤维素酶,使得纤维素酶比优化前提高了 1.11 ~ 5.57 倍^[55]。

3.4 核糖体工程

核糖体工程是通过核糖体和 RNA 聚合酶进行修饰和改造,激活细胞自身潜能,可引入特定的抗生素抗性突变,筛选出高效抗性突变株,提高次级代谢产物产量,可用于链霉菌

生物合成潜能的提高及其他性状的改良。Ochi 提出了核糖体工程育种技术的概念^[56]。Shima 等发现,向变铅青链霉菌核糖体中引入某些点突变,会显著提高放线菌紫红素的产生量^[57]。李晓玲等应用核糖体工程技术对白浅灰链霉菌进行改造,丰富了白浅灰链霉菌次生代谢产物的结构多样性,探索了天然产物资源有限的问题^[58]。

3.5 基因工程

随着现代生物技术发展,以基因工程为核心的菌种改良方法有望发展成为定向改良现有微生物杀菌剂性能和降低生物农药生产成本的主导技术。通过基因工程可以激活抗生素的沉默基因获得新的抗生素,改良抗生素的生产菌等。张桂敏等将透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)克隆到含链霉菌 ΦC31 噬菌体整合酶, *attP* 基因的诱导型表达载体 pJ8600 上, pHZ1276 通过接合转移导入变铅青链霉菌, *vgb* 基因在该菌中表达出有活性的 VHB 蛋白,从一定程度上解决了链霉菌发酵中的溶氧问题,提高了抗生素产量^[59]。日本学者 Hotta 等通过将灰色链霉菌和天神岛链霉菌种间基因组重排,筛选到一种完全不同于亲株的非氨基糖苷类抗生素吡啶唑霉素^[60]。Zhang 等运用基因工程快速提高弗氏链霉菌合成泰乐菌素的能力^[61]。廖国建等通过增加相关关键酶基因(*sanU*、*sanV*、*sanG*)的拷贝数成功提高尼可霉素的产量^[62]。Mazodier 等于 1989 年通过接合转移的方法把质粒 DNA 从大肠杆菌转移到变铅青链霉菌中,实现了质粒在大肠杆菌和链霉菌之间的跨属转移^[63]。

4 存在的问题及展望

链霉菌在生物防治 and 环境保护领域具有重大应用前景,是许多病原微生物的生防因子,也是目前研究应用广泛的生防菌。随着链霉菌研究的不断扩展和深入,相信会有更多链霉菌被筛选,进而丰富我国的链霉菌种群及其系统分类学研究。筛选优良菌株或利用基因工程技术和原生质体融合技术,为构建高产、高效链霉菌的生防菌株防治植物病害等提供有力的保障。尽管链霉菌在生物防治中取得了一定的成就,但从整体上看还存在一些问题。例如,病原体对抗生素的耐药性增强,使得新抗生素的数量呈直线下降趋势发展^[64];大多数生防链霉菌筛选都是在试验的条件下进行的,没有进行田间试验,而在田间自然条件下生防菌株的生防能力也会有所变化,防效不稳;链霉菌中许多的功能物质、定殖规律和作用机理不明确,影响其发挥作用,而链霉菌能否成功定殖在植物叶表面和根部形成优势种群,是其大规模商品化应用于农业上的一个关键因子^[65-66]。有研究表明,环境中的温度、湿度、天气等都会影响链霉菌在植物表面和土壤中的定殖、繁殖和扩展情况。

今后研究可以包括以下方面:(1)采用现代发酵工程和代谢工程技术研究微生物定向发酵调控工艺。建立优化的发酵、增殖生产工艺技术,提高有效活性物质的生产率。(2)用抗病机制有交叉的生防菌复配协同抗病。许多学者的研究表明,使用几种拮抗菌的混合物可以获得良好的病害防治效果^[67-68],多菌复配可以拓宽链霉菌使用范围,防治多种病原菌;可以增强其有效性,减少使用频率,可结合不同微生物的防治优势,提高生防效果。(3)通过对链霉菌的遗传改良包括提高抗菌物质的表达增强竞争能力和诱导抗性等,增强其

抗菌活性,扩大抑菌谱,增强在植物寄主上的定殖能力,从而提高防病能力。随着现代生物技术的运用,链霉菌的研究及开发应用将会出现新的发展,对农业的可持续发展具有重要意义,同时有较强的市场竞争力和良好经济效益,能产生巨大的社会、经济和生态效益,将会有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Cook R J, Bruckart W L, Coulson J R, et al. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation[J]. *Biological Control*, 1996, 7(3): 333 - 351.
- [2] Pawel B, Chian K, Paul S L. Not a peripheral issue: secretion in plant - microbe interactions[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13: 378 - 387.
- [3] Kim Y C, Leveau J, McSpadden G B B, et al. The multifactorial basis for plant health promotion by plant - associated bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1548 - 1555.
- [4] Waksman S A, Henrici A T. The nomenclature and classification of the actinomycetes[J]. *Journal of Bacteriology*, 1943, 46(4): 337 - 341.
- [5] Kämpfer P, Kroppenstedt R M, Dott W. A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests[J]. *Journal of General Microbiol*, 1991, 137(8): 1831 - 1891.
- [6] Manchester L, Pot B, Kersters K, et al. Classification of *Streptomyces* and *Streptoverticillium* species by numerical analysis of electrophoretic protein patterns[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 1990, 13(4): 333 - 337.
- [7] Slim S, Florence M, Lilia F B F, et al. Taxonomy and antimicrobial activities of a new *Streptomyces* sp. TN17 isolated in the soil from an oasis in Tunis[J]. *Archives of Biological Sciences*, 2011, 63(4): 1047 - 1056.
- [8] 文才艺, 郑东光, 陈建光, 等. 一株生防圆突起链霉菌的分类鉴定[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(5): 687 - 693.
- [9] Augustine S K, Bhavsar S P, Kapadnis B P. A non - polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23[J]. *Journal of Biosciences*, 2005, 30(2): 201 - 211.
- [10] El - Tarabily K A. Rhizosphere - competent isolates of streptomycete and non - streptomycete actinomycetes capable of producing cell - wall - degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping - off disease of cucumber[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2006, 84(2): 211 - 222.
- [11] 申屠旭萍, 于冰, 边亚琳, 等. 拮抗链霉菌 B28 的分类鉴定及其生防作用研究[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(1): 105 - 109.
- [12] Harikrishnan H, Shanmugaiah V. *Streptomyces* sp. VSMGT1014 - mediated antifungal activity against fungal plant pathogens[M]//Sabu A, Augustine A. *Prospects in bioscience: addressing the issues*. Berlin: Springer, 2013: 335 - 341.
- [13] Oskay M. Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 8(13): 3007 - 3017.
- [14] Jayakumar J. Bio - efficacy of *Streptomyces avermitilis* culture filtrates against root knot nematode, *Meloidogyne incognita* and reniform nematodes, *Rotylenchulus reniformis* [J]. *Karnataka Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 22(3): 567 - 571.
- [15] Jayakumar J, Rajendran G, Ramakrishnan S. Management of reniform

- nematode, rotylechulus reniformis on okra through *Streptomyces avermitilis* [J]. *Indian Journal of Nematology*, 2005, 35(1): 59–62.
- [16] 汤晖, 张利平. 阿维链霉菌 *aveD* 基因的定点突变[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2011, 12(10): 1424–1426.
- [17] Fattiviracins U M. Antiviral antibiotics produced by an actinomycete [J]. *日本放线菌学会志*, 2004, 18(2): 57–66.
- [18] Iwasa T, Yamamoto H, Shibata M. Studies on validamycins, new antibiotics. I. *Streptomyces hygroscopicus* var. *limoneus* nov. var., validamycin-producing organism [J]. *Journal of Antibiotics*, 1970, 23(6): 595–602.
- [19] Hopwood D A, Kieser T, Wright H M, et al. Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66 [J]. *Journal of General Microbiology*, 1983, 129(7): 2257–2269.
- [20] Sankaran L, Pogell B M. Biosynthesis of puromycin in *Streptomyces alboniger*: regulation and properties of O-demethylpuromycin O-methyltransferase [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1975, 8(6): 721–732.
- [21] Ikeno S, Aoki D, Hamada M, et al. DNA sequencing and transcriptional analysis of the kasugamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces kasugaensis* M338–M1 [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2006, 59(1): 18–28.
- [22] 冯超, 张克诚, 袁会珠, 等. 武夷菌素可溶性粉剂的研究[J]. *中国生物防治*, 2008, 24(3): 248–252.
- [23] 安德荣, 慕小倩. 瑞拉菌素产生菌的鉴定[J]. *微生物学杂志*, 2002, 22(2): 5–6.
- [24] Uematsu T, Suhadolnik R J. Nucleoside antibiotics. VI. Biosynthesis of the pyrrolopyrimidine nucleoside antibiotic toyocamycin by *Streptomyces rimosus* [J]. *Biochemistry*, 1970, 9(5): 1260–1266.
- [25] Fukunagak, Misato T, Ishii I, et al. Blastocidin, a new anti-phytopathogenic fungal substance. Part I [J]. *Bull Agric Chem Soc Jpn*, 1955, 19(3): 181–188.
- [26] 周中仲, 孙殿春, 郑慧哲, 等. 尼可霉素的研究进展[J]. *中国医药情报*, 2001, 7(6): 52–54.
- [27] Kong J, Zhang G F, Shen X C, et al. Some important aspect of the application technique for agricultural antibiotic 120 [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1993, 9(8): 133–137.
- [28] Isono K, Nagatsu J, Kawashima Y, et al. Studies on polyoxins, antifungal antibiotics. Part I. Isolation and characterization of polyxins A and B [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1965, 29(9): 848–854.
- [29] Alikhanian S I, Mindlin S Z. Recombinations in streptomycetes rimosus [J]. *Nature*, 1957, 180(30): 1208–1209.
- [30] 黄维真, 苏国城, 刘添才, 等. 新抗生素 8510 的研究[J]. *中国抗生素杂志*, 1988, 13(4): 277–280, 261.
- [31] 王世梅, 黄为一, 崔凤元. 阿扎霉素 B 产生菌吸水链霉菌 NND-52 的诱变筛选[J]. *微生物学通报*, 2001, 28(1): 64–67.
- [32] Zhang D J, Wei G, Wang Y, et al. Bafilomycin K, a new antifungal macrolide from *Streptomyces flavotricini* Y12–26 [J]. *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(5): 391–393.
- [33] Lu C G, Liu W C, Qiu J Y, et al. Identification of an antifungal metabolite produced by a potential biocontrol actinomycetes strain A01 [J]. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2008, 39(4): 701–707.
- [34] 华承伟, 于江傲, 谢凤珍. 红色链霉菌发酵产红霉素培养基的响应面优化[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(6): 109–112, 117.
- [35] Selvameenal L, Radhakrishnan M, Balagurunathan R. Antibiotic pigment from desert soil actinomycetes; biological activity, purification and chemical screening [J]. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 71(5): 499–504.
- [36] 万平平, 丁爱云, 李安娜, 等. 产 β -1,3-葡聚糖酶链霉菌菌株的筛选及其酶特性研究[J]. *烟台师范学院学报: 自然科学版*, 2004, 20(1): 58–61, 78.
- [37] Morita T, Hara S, Matsushima Y. Purification and characterization of lysozyme produced by *Streptomyces erythraeus* [J]. *Journal of Biochemistry*, 1978, 83(3): 893–903.
- [38] Yuan W M, Crawford D L. Characterization of *Streptomyces lydicus* WYEC108 as a potential biocontrol agent against fungal root and seed rots [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(8): 3119–3128.
- [39] Mahadevan B, Crawford D L. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20(7): 489–493.
- [40] Singh A K, Chhatpar H S. Purification, characterization and thermodynamics of antifungal protease from *Streptomyces* sp. A6 [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2011, 51(4): 424–432.
- [41] Bielen A, Cetkovic H, Long P F, et al. The SGNH-hydrolase of *Streptomyces coelicolor* has (aryl) esterase and a true lipase activity [J]. *Biochimie*, 2009, 91(3): 390–400.
- [42] 张穗. 井冈霉素诱导水稻防御纹枯病反应机理的研究[J]. *植物病理学报*, 2002, 32(1): 95–96.
- [43] Laureti L, Song L, Huang S, et al. Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambifaciens* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(15): 6258–6263.
- [44] Wang X J, Wang X C, Xiang W S. Improvement of milbemycin producing *Streptomyces bingchenggensis* by rational screening of ultraviolet and chemically induced mutants [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(6): 1051–1056.
- [45] Chen Z, Wen J, Song Y, et al. Enhancement and selective production of avermectin B by recombinants of *Streptomyces avermitilis* via intraspecific protoplast fusion [J]. *中国科学通报: 英文版*, 2007, 52(5): 616–622.
- [46] 骆爱群, 高春宵, 宋幼新, 等. NIKKO 霉素产生菌的空间生物学效应研究[J]. *航天医学与医学工程*, 1998, 11(6): 411–414.
- [47] 车洪杰. 普特拉链霉菌 F-1 的诱变改良及突变菌株防病潜力评估[D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [48] 张茜茜, 朱永强, 刘华梅, 等. 井冈霉素高产菌株的复合诱变筛选[J]. *湖北农业科学*, 2009, 48(3): 612–614.
- [49] 朱祥瑞, 徐俊良. 家蚕丝素固定化链霉菌的制备方法及其一般性质[J]. *农业生物技术学报*, 2003, 11(1): 105–106.
- [50] 朱启忠, 韩晓弟, 赵洪, 等. 链霉菌 Strz-2 胞外木聚糖酶的纯化和固定化研究[J]. *生物技术*, 2004, 14(6): 48–50.
- [51] Ibrahim M M. Investigation on some *Streptomyces* species produce antibiotic with immobilized cells by using calcium alginate [J]. *Journal of Applied Sciences Research*, 2012, 8(3): 1466–1476.
- [52] 邱立友, 王明道, 戚元成, 等. 链霉菌 A048 产几丁质酶最佳发酵工艺研究[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(2): 58–62.
- [53] 骆健美, 金志华, 岑沛霖. 褐黄孢链霉菌纳他霉素发酵条件优化[J]. *高校化学工程学报*, 2006, 20(1): 68–73.
- [54] Adinarayana K, Ellaiah P, Srinivasulu B, et al. Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38(11): 1565–1572.

王东方,王庆忠,谷 鹏,等. 石榴叶提取物的抑菌杀虫活性[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):95-96.

石榴叶提取物的抑菌杀虫活性

王东方,王庆忠,谷 鹏,柏显首

(山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室/潍坊学院,山东潍坊 261061)

摘要:以 75% 乙醇为溶剂,采用索氏提取法提取石榴 (*Punica granatum* L.) 叶的有效成分,并对该提取物的抑菌作用进行了测定。结果表明,石榴叶提取物对白色葡萄球菌抑菌活性明显,对黑腹果蝇成虫有明显的毒害作用,且毒性效果与浓度呈正相关。石榴叶提取物对槐蚜防治效果明显,当石榴叶提取物浓度为 60 mg/mL 时,24 h 后槐蚜校正死亡率达 96.72%。石榴叶提取物具有广谱抑菌杀虫活性。

关键词:石榴叶;提取物;生物活性

中图分类号:S482.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)03-0095-02

石榴叶是石榴科植物石榴 (*Punica granatum* L.) 的叶,具有收敛止泻、解毒杀虫等功效。石榴叶中含有 20 多种化合物,其中鞣质能凝固微生物的原生质及多种酶,因而对各种细菌、真菌有抑制作用^[1]。石榴皮对淋球菌有明显的抑制作用^[2]。关于石榴叶提取物的抑菌杀虫活性目前尚未见报道。笔者采用 75% 乙醇提取石榴叶的有效成分,并对其生物活性进行研究,旨在为开发利用石榴资源提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

石榴叶与槐蚜采自潍坊学院校园内。大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、白色葡萄球菌 (*Staphylococcus albus*) 取自潍坊学院生物与农业工程学院微生物学实验室。

1.2 仪 器

仪器:800A 型中药粉碎机(山东省青州市精诚医药装备制造有限公司),re-5299 旋转蒸发仪、SHZ-III A 型循环水真空泵(上海一凯仪器设备有限公司),CJ-1680 型超净工作台等。乙醇(上海凌峰化学试剂有限公司)、二甲基亚砜(DMSO)(国药集团化学试剂有限公司)等。

1.3 方 法

1.3.1 石榴叶提取物的制备 清洗并晾干石榴叶,将石榴叶置于烘箱中 65 ℃ 烘干,用中药粉碎机粉碎 15~30 s。称取

收稿日期:2013-07-10

基金项目:山东省星火计划(编号:2012XH06031);山东省潍坊市科技发展计划(编号:2011022,20111023);潍坊学院科技发展计划(编号:2012x07)。

作者简介:王东方(1970—),男,山东潍坊人,硕士,讲师,主要从事微生物生理生化、生物制药研究。Tel:(0536)8785288,E-mail:wangdf@wfu.edu.cn。

[55]刘 薇,徐尔尼,徐颖宣,等. 串珠霉与链霉菌混合发酵产纤维素酶条件的研究[J]. 中国酿造,2008,14(14):26-29.

[56]Ochi K. From microbial differentiation to ribosome engineering[J]. Bioscience Biotechnology Biochemistry,2007,71(6):1373-1386.

[57]Shima J,Hesketh A,Okamoto S,et al. Induction of actinorhodin production by rpsL(encoding ribosomal protein S12) mutations that confer streptomycin resistance in *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Journal of Bacteriology,1996,178(24):7276-7284.

[58]李晓玲,游中元,徐 俊,等. 红树林来源白浅灰链霉菌中生物碱类次级代谢产物研究及核糖体工程优化[J]. 台湾海峡,2012,31(1):143-149.

[59]张桂敏,周秀芬,邓子新,等. 将透明颤菌血红蛋白基因(*ngb*)转移到链霉菌染色体整合载体的构建[J]. 华中农业大学学报,2004,23(6):602-605.

[60]Hotta K,Yamashita F,Okami Y,et al. New antibiotic-producing streptomycetes,selected by antibiotic resistance as a marker. II. Features of a new antibiotic-producing clone obtained after fusion treatment[J]. The Journal of Antibiotics,1985,38(1):64-69.

[61]Zhang Y X,Perry K,Vinci V A,et al. Genome shuffling leads to rapid phenotypic improvement in bacteria[J]. Nature,2002,415(6872):644-646.

[62]廖国建,李金娥,田宇清,等. 增加尼可霉素生物合成基因簇拷贝数对尼可霉素产量的影响[C]//中国遗传学会第八次代表大会暨学术讨论会论文摘要汇编:2004—2008. 重庆:中国遗传学会,2008.

[63]Mazodier P,Petter R,Thompson C. Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species[J]. Journal of Bacteriology,1989,171(6):3583-3585.

[64]Mahajan G B,Balachandran L. Antibacterial agents from actinomycetes;a review[J]. Frontiers in Bioscience,2012,4:240-253.

[65]Benizri E,Baudoin E,Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biocontrol Science and Technology,2001,11(5):557-574.

[66]Bloemberg G V,Lugtenberg B J. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria[J]. Current Opinion in Plant Biology,2001,4(4):343-350.

[67]Fukui R,Fukui H,Alvarez A M. Comparisons of single versus multiple bacterial species on biological control of anthurium blight[J]. Phytopathology,1999,89(5):366-373.

[68]Guetsky R,Shtienberg D,Elad Y,et al. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control[J]. Phytopathology,2001,91(7):621-627.