

生防链霉菌 ZM-16 的发酵产物生物活性及其微波诱变育种

曾羽澈 李应党 杨志荣 冯甦*

(四川大学 生命科学学院 四川 成都 610065)

摘要:【目的】链霉菌 ZM-16 对多种细菌有良好的抑菌作用, 其发酵产物的主要活性物质为放线菌素 D。本研究旨在进一步探讨其抗真菌活性, 并通过诱变育种的方法对菌株进行改良, 以提高活性物质的产量, 从而为其在植物病害生物防治领域的实践应用奠定基础。【方法】利用液体发酵的方法获取活性产物并对其进行粗提取; 利用抑菌圈法检测菌株发酵产物对 11 种植物病原真菌的抑制作用; 通过微波处理并利用抗生素抗性筛选的方法对菌株进行诱变育种。【结果】粗提液对 11 种植物病原真菌均具有抑菌效果, 最为明显的 3 种病菌分别是苹果炭疽病菌、油菜菌核病菌和禾谷镰刀病菌; 经微波诱变筛选到了一株耐利福平突变株, 其放线菌素 D 的产量提高了 36.75%; 传代研究表明其经过 10 代选育, 遗传稳定性较好。【结论】链霉菌 ZM-16 的发酵产物具有良好的抗植物病原真菌的活性, 经过育种后其活性产物产量也有所提高, 因此具有较高的实际应用价值。

关键词: 链霉菌 ZM-16, 放线菌素 D, 生物活性, 药敏性, 生理性质, 微波诱变

The biological activities of fermentation products of an antibiotic *Streptomyces* ZM-16 and the microwave mutation breeding of the strain

ZENG Yu-Che LI Ying-Dang YANG Zhi-Rong FENG Su*

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

Abstract: [Objective] *Streptomyces* ZM-16 has been proved to possess great anti-bacteria effect to many strains of bacteria. The main active component of the fermentation products is actinomycin D. This study aims at the investigation of the antifungal activities of the fermentation products of *Streptomyces* ZM-16 and the enhancement of the active substance yield of the strain by mutation breeding, in order to develop and improve its practical application in bio-control field of plant diseases. [Methods] Obtain the active fermentation products with liquid fermentation of the strain and conduct a crude extraction; test the antimicrobial effect of the crude extracts on 11 kinds of plant pathogenic fungi by inhibition zone method; improve the strain by microwave mutation breeding and antibiotics resistance screening. [Results] The crude extracts solution showed antimicrobial effect on all the 11 kinds of plant pathogenic fungi. Among them, it possessed greatest inhibitive effect on

基金项目: 四川省科技支撑计划项目(No. 2011SZ0008); 国家国际科技合作专项项目(No. 2011DFR31220)

*通讯作者: Tel: 86-28-66691617; ✉: fengsu_fs@163.com

收稿日期: 2013-09-22; 接受日期: 2013-11-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-09

Glomerella cingulata, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium graminearum*. After induced mutation by microwave, a rifampin resistant mutant strain was screened out, whose yield of actinomycin D was enhanced 36.75%. The study on genetic stability of passage showed that the mutant strain was stable after 10 generations. [Conclusion] The fermentation products of *Streptomyces* ZM-16 have great inhibitive effect on most plant pathogen fungi; moreover, the yield of active products was enhanced after genetic improvement. These results demonstrated that the strain has a high value of practical application.

Keywords: *Streptomyces* ZM-16, Actinomycin D, Biological activities, Susceptibility, Physiological properties, Microwave mutagenesis

生物农药因其高效、广谱、环保的特点,近年来已被广泛研究,而农用抗生素在生物农药这一领域占有主导地位。自 20 世纪 50 年代第一种农用抗生素——杀稻瘟菌素在日本被报道后^[1],便迅速得到广泛的应用。自此,农用抗生素的研发开始处于迅猛增长的阶段。我国于 20 世纪 70 年代研发出第一种农用抗生素——井冈霉素,之后便广泛应用于水稻纹枯病的防治,并取得了良好的效果^[2-3]。

抗生素生产的主要来源是放线菌。据报道,目前约 2/3 的抗生素是由放线菌,尤其是其中的链霉菌属所产生的^[4],因而在放线菌中寻找并分离新型农用抗生素是极具潜力的。利用链霉菌发酵生产抗生素并用于生物防治领域,国内外已有诸多报道。国内方面,龙建友等从秦岭山区中分离得到一株链霉菌,其发酵液对十余种常见的农作物病原真菌具有良好的杀菌活性,并已申请专利^[5-6];宋兆桃等从植物根际土壤中分离筛选到一株抗油茶炭疽病菌的拮抗链霉菌 F10,对田间防治油茶炭疽病具有指导意义^[7]。国外方面,研究发现分离自链霉菌的变构霉素、变构菌素对油菜菌核病有很强的抑制作用,而 Ezomycin S 则被发现对灰霉病菌有良好的杀菌活性^[8]。放线菌 ZM-16 是本实验室之前从河南中牟的土壤中分离得到的,其对姜瘟的病害菌青枯假单胞菌具有明显的抑制作用,经 16S rRNA 鉴定该菌株为链霉菌属的抗生链霉菌(*Streptomyces antibioticus*),其对常见的革兰氏阴性致病菌,如肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)、大肠杆菌 O157 (*Escherichia coli* O157),以及常见的革兰氏阳性致

病菌,如白色链球菌(*Streptococcus albus*)、卡拉双球菌(*Diplococcus cata*)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)等均具有明显的抑制作用^[9]。前期工作研究显示,该菌株的发酵产物分离纯化后经鉴定其活性物质为放线菌素 D (Actinomycin D)。为了进一步地探讨该菌发酵产物的抑菌活性,本研究对其主要活性物质进行了定量分析,并探讨了其对农业上常见的几种植物病害性真菌的抑制活性。另外,为了提高活性物质的产量,通过微波诱变的方式对该菌株进行了育种研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试放线菌:链霉菌 ZM-16,来自本实验室菌种保藏库。

1.1.2 供试真菌:禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*, ACCC36249)、玉米小斑病菌(*Helminthosporium maydis*, LICC80166)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*, ACCC36169)、苹果炭疽病菌(*Glomerella cingulate*, ACCC36199)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*, ACCC36199)、马铃薯早疫病菌(*Alternaria solani* Sorauer, ACCC36023)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata* Keissler, ACCC36171)、玉米大斑病菌(*Helminthosporium turcicum*, LICC30167)、拟盘多毛孢菌(*Pestalotiopsis eriobotrifolia*, ACCC36414)、玉米纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*, ATCC44662)和灰霉(*Botrytis cinerea*, CCAM041257),前 2 株来自

本实验室菌种保藏库,后 9 株由四川省农业科学院提供,保藏方式均为 PDA 斜面冻藏。

1.1.3 培养基: (1) 高氏一号培养基^[10]。(2) PDA 培养基^[10]。(3) 链霉菌 ZM-16 种子培养基(g/L)^[9]: 蛋白胨 5.00, 葡萄糖 5.00, 牛肉膏 1.00, K₂HPO₄ 0.10, NaCl 0.50, MgSO₄·7H₂O 0.24, pH 7.0–7.2。(4) 链霉菌 ZM-16 发酵培养基(g/L)^[9]: 蔗糖 80.0, 大豆粉 50.0, NaNO₃ 10.0, NaCl 2.0, CaCO₃ 4.0, K₂HPO₄ 0.8, pH 7.0。

1.1.4 放线菌素 D 标准品: 5 mg (HPLC 98%, 美国 MP 公司)。

1.1.5 杀菌剂与抗生素: 多菌灵(25%), 四川国光; 硫酸链霉素, 美国 Amresco; 利福平, 美国 Sigma。

1.1.6 其他试剂: 丙酮、Tween 80 等, 均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 链霉菌 ZM-16 的发酵^[9]: (1) 斜面活化: 将保藏的菌株 ZM-16 接种于高氏一号斜面培养基上, 置于恒温培养箱中 28 °C 培养 3–5 d。(2) 扩大培养: 用无菌接种环小心刮取一环培养好的菌种接于种子培养基中, 于 28 °C、180 r/min 振荡培养 48 h 制成种子液。(3) 发酵: 以 10% (体积比) 的接种量将种子液接入发酵培养基中, 于 30 °C、200 r/min 振荡培养 6 d^[9], 可得发酵液。

1.2.2 发酵产物预处理及活性物质粗提物制备: (1) 将发酵液 12 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 收集上清液。(2) 向菌丝体沉淀中加入适量丙酮, 置于超声波清洗机中 40 °C 超声处理 15 min 后, 于 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 收集上清液。(3) 重复步骤(2) 3 次, 直到菌丝体没有颜色。(4) 收集所有上清液, 静置 3–5 h, 使蛋白质完全沉淀。过滤后于旋转蒸发器中 60 °C 浓缩, 直到黏稠状时, 转于真空冷冻干燥机中过夜处理, 第 2 天可得膏状物的粗提品。(5) 准确称取定量的膏状物粗提品, 配成不同浓度的溶液并过 0.22 μm 滤器, 于–20 °C 保存备用。

1.2.3 粗提液中放线菌素 D 的定量分析: 利用紫外分光光度计, 采用中国药典的比色法来进行^[11]。

(1) 放线菌素 D 标准曲线的绘制。精确称取定量的放线菌素 D 标准品, 分别配制成浓度为 200、100、50、20 和 10 mg/L 的标准品液, 先以蒸馏水的空白对照作全波段(200–700 nm)扫描, 再以 10 mg/L 的标品液作全波段(200–700 nm)扫描, 于 441.6 nm 处出现吸收峰。以蒸馏水为空白对照, 调零后, 分别测量上述浓度标品液在 441.6 nm 的吸光度(OD 值), 每个浓度重复 3 次, 记录各浓度的 OD 值, 利用 Excel 软件, 以 OD 值为横坐标, 浓度为纵坐标, 作出放线菌素 D 的标准曲线, 并得相关线性方程。

(2) 粗提液中放线菌素 D 的定量分析。取 10 g/L 和 20 g/L 的样品液, 测量 441.6 nm 的 OD 值, 重复 3 次, 并记录。

1.2.4 发酵产物粗提液的抗真菌活性研究: 对 11 种植物病原菌的抑菌谱进行测定^[12]。(1) 将供试的 11 种病原菌接种于 PDA 斜面上, 28 °C 培养 5 d, 以无菌生理盐水冲刷斜面并经 8 层无菌纱布过滤得病原菌的孢子或菌悬液, 待用。(2) 取病原菌悬液 100 μL 于冷却至 50 °C 的 PDA 培养基中, 用灭菌玻璃棒搅拌均匀再倒平板, 制成含有各真菌指示菌平板。(3) 抑菌实验分 4 个组: 蒸馏水空白对照、20 g/L 粗提液组、58 mg/L 放线菌素 D 组、多菌灵 1 000 倍液(有效成分浓度 250 mg/L)组。取各真菌的指示菌平板, 用灭菌的 5 mm 打孔器于平板中央打孔, 在孔内加入 50 μL 的 20 g/L 粗提液, 以蒸馏水为空白对照, 以 58 mg/L 放线菌素 D 溶液及多菌灵 1 000 倍液为阳性对照, 每组设 3 个重复, 4 °C 放置 8–12 h, 28 °C 培养 2–3 d^[13], 观察抑菌圈大小并测量。所得数据的统计学处理则利用 Excel 软件进行方差分析及显著性检验。

1.2.5 微波诱变育种: 与传统的紫外线诱变相比, 微波诱变育种操作方便, 整个过程不易被杂菌污染, 对设备要求不高, 辐射损伤小, 诱变效果较好, 并且不会受光修复作用的影响而导致诱变失败, 因

此已成为一种新的诱变育种技术而得到广泛的研究^[14-15]。微波从本质上来讲是一种电磁辐射,但辐射能较低,其对生物产生的辐射效应包括热效应和非热效应两种^[16],两种效应的结合能够使得生物体发生一系列的生理生化反应,从而使得诱变频率提高,较易获得正变株。

此外,在初筛方面,传统的筛选方法工作量特别大。有研究报道,利用抗药性突变可筛选出抗生素高产菌株^[17-18]。在一项针对放线菌素 D 产生菌 *S. sindenensis* 的研究中^[18], Praveen 等利用链霉素和利福平的复合抗性突变来筛选 UV 处理后的存活体,最终筛选到了一株 Rif^r 和 Str^r 复合突变体,其放线菌素 D 产量提高到了 400 mg/L。本实验拟采取抗生素抗性的筛选方法进行初筛工作。

(1) 孢子悬浮液制备:将 ZM-16 接种于斜面上 28 °C 培养 3 d,以含有 0.2% Tween 80 的生理盐水冲刷斜面,并转入含有无菌玻璃珠的灭菌三角瓶中,于摇床上 12 000 r/min 振荡 2 h,使孢子充分分散;经 8 层纱布过滤后得孢子悬浮液,并将孢子浓度控制在 10⁶ 个/mL。

(2) 微波处理^[15]:准确吸取 2 mL 孢子悬液于 EP 管中,再将 EP 管置于冰浴烧杯中,于微波炉中以 700 W、2 450 MHz 分别处理 10、20、30、40、50、60 s。

(3) 初筛:向冷却至 50 °C 的高氏一号固体培养基中分别加入适量的链霉素和利福平溶液,并用无菌的玻璃棒小心搅匀,配制成含有 50 mg/L 的链霉素或利福平的培养基,再倒平板。待凝固后,取 0.2 mL 微波处理后的孢子悬液于平板表面,并用无菌的玻璃刮铲涂布均匀,28 °C 培养 5 d。待菌落长成后,挑选形态较大、边缘整齐的菌落进行下一步的摇瓶复筛工作。

(4) 复筛:将初筛得到的 Rif^r 和 Str^r 耐药菌株与原菌株对比,做摇瓶发酵实验。发酵完成后将发酵液离心并收集上清液,以蒸馏水为空白对照,测定其在波长 446.1 nm 处的 OD 值,并与原菌株进

行对照。

(5) 遗传稳定性检验:选取产量较高的几株菌,传代 10 次后,与传代前的菌株对比效价。

2 结果与分析

2.1 发酵产物预处理及粗提品制备

发酵产物预处理过程中,旋蒸浓缩后得到的是棕红色黏稠状液体,经冷冻干燥后,即可得粗提品。粗提品外观为棕红色的膏状物,20 g/L 粗提液 pH 为 8.35。

2.2 粗提液中放线菌素 D 的定量分析

2.2.1 放线菌素 D 标准曲线的绘制:结果如图 1 所示,线性方程为 $y=106.210 0x+0.572 7$,相关系数 $R^2=0.999 9$,线性关系良好。

2.2.2 粗提液中放线菌素 D 的含量测定:结果见表 1。将对应的 OD 值代入方程中即可得放线菌素 D 的含量。

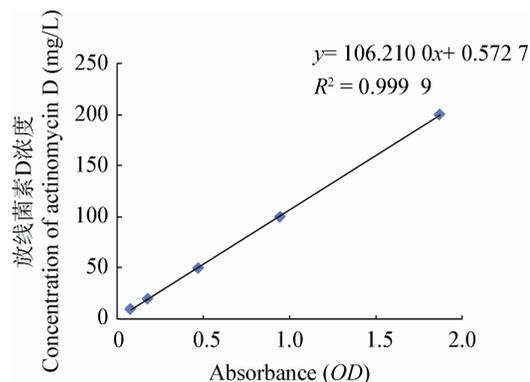


图 1 放线菌素 D 标准曲线

Figure 1 Standard curve of actinomycin D

表 1 粗提液中放线菌素 D 的浓度
Table 1 Concentration of actinomycin D in cruel extracts solution

粗提液浓度 Concentration of cruel extracts solution (g/L)	OD _{446.1}	放线菌素 D 浓度 Concentration of actinomycin D (mg/L)
20	0.534 4	57.359 6
10	0.258 3	28.006 7

根据图 1 和表 1 中的信息,可算出粗提品中放线菌素 D 的含量约为 0.286 8%,即 1 000 mg 的粗提品中约含有 2.868 mg 的放线菌素 D。

2.3 发酵产物粗提液的抗真菌活性

20 g/L 粗提液中放线菌素 D 的含量约为 57.96 mg/L,因此配制放线菌素 D 标准品液并稀释到 58 mg/L 进行对照实验。11 种植物病原菌的抑菌效果如表 2 所示。

结果显示,粗提液对苹果炭疽病菌的抑菌效果

最好,抑菌圈达到了 29.3 mm,其次是油菜菌核病菌,抑菌圈为 27.8 mm,再次是造成小麦、玉米赤霉病的禾谷镰刀菌,抑菌圈为 26.5 mm。效果最弱的是马铃薯早疫病菌,抑菌圈仅为 18.3 mm。另外,分析阳性对照可发现,58 mg/L 放线菌素 D 溶液对 11 株菌的抑菌效果要稍低于粗提液,两种处理的实验结果经统计学 *t* 检验,结果表明粗提液处理组与放线菌素 D 标品处理组之间存在显著性的差异 ($P < 0.1$),这说明粗提品中可能还含有其他的抑菌

表 2 11 种植物病原菌的抑菌效果

Table 2 Antimicrobial effect against 11 plant pathogenic fungi

植物病原菌 Plant pathogenic fungi	20 g/L 粗提液 20 g/L Cruel extracts solution (mm)	58 mg/L 放线菌素 D 溶液 58 mg/L Actinomycin D solution (mm)	250 mg/L 多菌灵液 250 mg/L Carbendazim solution (mm)	CK (mm)
玉米纹枯病菌 <i>R. solani</i>	19.50±0.36	18.20±0.25	23.20±0.22	0
禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	26.50±0.28	24.20±0.14	29.70±0.30	0
玉米小斑病菌 <i>H. maydis</i>	20.60±0.25	18.90±0.24	19.30±0.17	0
串珠镰刀菌 <i>F. moniliforme</i>	24.50±0.19	23.40±0.27	30.60±0.34	0
油菜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	27.80±0.46	26.30±0.12	24.80±0.18	0
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i> Keissler	19.60±0.29	18.10±0.33	17.30±0.11	0
马铃薯早疫病菌 <i>A. solani</i> Sorauer	18.30±0.27	17.10±0.23	23.90±0.25	0
苹果炭疽病菌 <i>G. cingulate</i>	29.30±0.16	27.80±0.41	26.50±0.28	0
玉米大斑病菌 <i>H. turcicum</i>	22.30±0.11	21.60±0.26	20.70±0.32	0
拟殷多毛孢菌 <i>P. eriobotrifolia</i>	21.90±0.23	20.60±0.19	20.00±0.21	0
灰霉 <i>B. cinerea</i>	23.20±0.35	21.70±0.31	24.60±0.16	0

注:表内数字为 3 次处理的平均值,±号后面数字为偏差值。同行数据中,第一列与第二列差异性显著($P < 0.1$),第一列与第三列差异性极显著($P < 0.01$)。

Note: The data is the average of the three treatments, with variance following “±”. For the data of the same row, there is significant difference between the first and the second column ($P < 0.1$), and extreme significant difference between the first and the third column ($P < 0.01$).

物质。据文献报道^[19],放线菌素 D 首次由 Wasman 于 1940 年从 *Streptomyces antibioticus* 中分离得到,当时作者纯化得到了两种放线菌素,分别命名为放线菌素 A(之后命名为放线菌素 D)和放线菌素 B,前者为深红色物质,具有强烈的抑菌性;而后者则是无色的,有较强的杀菌性。总量上放线菌素 A 含量约 80%。之后, Brockmann 等^[20]发现,从各种链霉菌属中分离到的放线菌素实际上是多种放线菌素的混合物。因此可以推测,粗提品中实际上还可能存在其他的放线菌素,不过含量不高,放线菌素 D 仍占主导^[21],这就解释了 58 mg/L 放线菌素 D 溶液的阳性对照组抑菌效果稍低的原因。至于具体还存在哪些抑菌物质,还有待进一步的探讨。

250 mg/L 的多菌灵浓度是其指导使用的最低浓度。将粗提品与多菌灵的抑菌效果相比,虽然整体抑菌圈略小于多菌灵,但考虑到有效成分浓度的原因,两者的有效成分浓度相差了近 5 倍,因而其抑菌活性相对来说还是比较好的。而对于苹果炭疽病菌,其抑菌效果甚至明显高于多菌灵。

粗提液对 11 种植物病原菌都具有抑菌作用,提示链霉菌 ZM-16 的发酵产物有望成为新一代的广谱杀菌剂,且其有望成为苹果炭疽病、油菜菌核病、小麦及玉米赤霉病的特效杀菌剂。放线菌素 D 目前在临床上广泛应用于妊娠期绒膜癌、小儿肾母细胞瘤、恶性淋巴瘤、神经母细胞瘤、横纹肌肉瘤

及睾丸癌等的治疗,目前还未见将其应用到生物防治领域的任何有关报道,这是本研究的新颖独到之处。

2.4 微波诱变育种

(1) 初筛:经平板初筛,共筛选到了 28 株菌落较大、生长良好的耐药株,其中耐利福平 10 株,耐链霉素 18 株。将此 28 株突变株一一编号后保存。

(2) 复筛:经摇瓶实验,从 28 株耐药菌株中共筛到了 3 株放线菌素 D 产量得到较大提升的菌株,结果如表 3 所示。

结果显示,3 株抗性突变株的发酵上清液在 446.1 nm 处的 OD 值与原菌株(ZM-16)相比都有所提升,且差异性显著($P < 0.1$)。而 ZM-16-5 的 Rif^r 菌株提升最多,约 40%。将此 3 株菌保存后进行传代实验。

(3) 传代实验:3 株正变株的传代实验如表 4 所示。

结果显示,菌株 ZM-16-5 的遗传稳定性相较于其他两株菌株更好,其传代 10 次之后,效价仍保持在 94.1%。将 ZM-16-5 菌株经发酵后按照 1.2.1–1.2.3 所述的方法进行活性产物粗提取、放线菌素 D 定量分析后发现,20 g/L 的粗提物溶液中放线菌素 D 的含量为 36.752 8 mg/L,相对于原菌株产量提高了 36.75%,产量得到了较大的提升,因此将该菌株保存入库。

表 3 抗性突变株的筛选
Table 3 Screening of the resistant mutants

菌株编号 Strain number	抗性 Resistance	微波处理时间 Time of microwave treatment (s)	发酵液 $OD_{446.1}$ $OD_{446.1}$ of the fermented solution
ZM-16-5	Rif ^r	30	0.144 0±0.012 8
ZM-16-17	Str ^r	30	0.132 9±0.021 9
ZM-16-23	Str ^r	40	0.140 6±0.011 5
ZM-16	—	—	0.102 8±0.023 5

表 4 传代稳定性
Table 4 Passage stability

传代次数 Passage	效价 Titer (%)		
	ZM-16-5	ZM-16-17	ZM-16-23
0	100	100	100
1	98.2±1.2	99.6±1.1	98.9±1.4
2	99.7±0.8	97.5±0.9	98.3±0.7
3	97.4±0.5	98.2±0.9	96.3±0.9
4	96.5±0.8	95.2±1.3	94.1±1.2
5	96.8±1.3	93.1±0.8	93.9±0.9
6	95.2±1.0	92.3±0.7	92.6±1.0
7	95.1±0.9	92.6±1.1	91.4±0.5
8	95.3±0.4	91.8±0.6	91.5±0.7
9	94.4±0.6	91.5±1.5	90.6±0.8
10	94.1±0.6	90.2±1.2	89.8±0.7

注：表内数字为 3 次处理的平均值，±号后面数字为偏差值。同行数据中，第一列与第二列差异性显著($P < 0.1$)，第一列与第三列差异性也显著($P < 0.1$)。

Note: The data is the average of the three treatments, with variance following “±”. For the data of the same row, there is significant difference between the first and the second column ($P < 0.1$), and also significant difference between the first and the third column ($P < 0.1$).

3 讨论

链霉菌 ZM-16 的发酵产物活性物质为放线菌素 D，本研究对活性物质进行了粗提取，以便于用到农业生产实践当中。经体外毒力研究发现活性物质对多种植物病害菌具有良好的抑制作用，且其物理和化学性质相对稳定^[9]，因此有望成为新一代广谱、高效的农用杀菌剂。由于其对苹果炭疽病和小麦、玉米赤霉病病原菌有突出的抑制作用，因而可作为该两种植物病害的特效药物。与传统的化学农药多菌灵相比，低浓度的有效成分即可对各种病害菌产生作用，提示其有望成为新一代的广谱高效杀菌剂。

为了改良菌株，本研究利用新型的微波诱变方法对菌株进行了诱变育种，结果成功地筛选到了一株遗传稳定性较好，且产量得到较大提升的耐利福平突变株，有望成为生产备用菌株。

本研究仅对 11 种植物病原真菌进行了抑菌活性的探究，且均为体外实验，对其他的植物病害有无活性、体内抑菌效果如何，还有待深入的研究。此外，还可通过诱导复合抗药性突变来进一步地提高菌株的放线菌素 D 产量。

参 考 文 献

- [1] 沈寅初. 国内外农用抗生素研究和发展概况[J]. 抗生素, 1996, 6(2): 57-64.
- [2] 朱昌雄, 蒋细良, 姬军红, 等. 我国生物农药产业化现状、发展前景和展望[A]//中国青年农业科学学术年报[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 212-216.
- [3] 朱昌雄. 我国微生物农药存在的问题及解决对策[A]//微生物农药及其产业化[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 21-26.
- [4] Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002[J]. Journal of Natural Products, 2003, 66: 1022-1037.
- [5] 龙建友, 胡兆农, 刘京宏, 等. 秦岭山区链霉菌发酵产

- 物杀菌活性的测定[J]. 中国生物防治, 2005, 21(3): 187-191.
- [6] 龙建友. 秦岭链霉菌开发利用的前期基础研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学博士学位论文, 2006.
- [7] 宋兆桃, 周国英. 油茶炭疽病拮抗放线菌的筛选及其抑菌谱研究[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(2): 75-78.
- [8] Tereshin IM. Polyene Antibiotics: Present and Future[M]. Tokyo: University of Tokyo Press, 1976.
- [9] 雷娟. 青枯假单胞菌拮抗菌株 ZM-16 的分离、鉴定、发酵及次级代谢产物的初步研究[D]. 成都: 四川大学硕士学位论文, 2010.
- [10] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [11] 中华人民共和国药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 1995: 413.
- [12] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [13] 李毅. 根际链霉菌对棉花黄萎病的防病作用初步研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2005.
- [14] 贾红华, 周华, 韦平. 微波诱变育种研究及应用进展[J]. 工业微生物, 2003, 33(2): 46-50.
- [15] 李永泉. 微波诱变选育木聚糖酶高产菌[J]. 微波学报, 2001, 17(1): 50-53.
- [16] Rosaspina S, Salvatorelli G, Anzanel D, et al. Effect of microwave radiation on *Candida albicans*[J]. Microbios, 1993, 78(314): 55-59.
- [17] Haifeng H, Kozo O. Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by inducing combined resistant mutations[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1885-1892.
- [18] Praveen V, Tripathi CKM, Bihari V, et al. Production of actinomycin-D by the mutant of a new isolate of *Streptomyces sindenensis*[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2008, 39(4): 689-692.
- [19] Waksman SA, Woodruff HB. Bacteriostatic and bactericidal substances produced by a soil actinomycetes[J]. Experimental Biology and Medicine, 1940, 45(2): 609-614.
- [20] Brockmann H, Grubhofer N, Kass W, et al. Über das Actinomycin C (Antibiotica aus Actinomyceten, V. Mitteil)[J]. Chemische Berichte, 1951, 84(3): 260-284.
- [21] Brockmann H. Structural differences of the actinomycins and their derivatives[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1960, 89(2): 323-335.