

一株具有杀虫活性链霉菌的研究

李立梅^{1#}, 左彤彤^{1#}, 邹建军¹, 勾天兵¹, 刘庆珍¹, 陈越渠^{1,2*}

(1. 吉林省林业科学研究院, 长春 130033; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

摘要 通过卤虫初筛和花布灯蛾幼虫复筛, 从土壤中获得 1 株具有较高杀虫活性的链霉菌, 编号为 LKY208, 为明确该菌株的生防效果及分类地位, 采用叶片浸渍法、饲料染毒法、玻片浸渍法及常规浸虫法分别测定了其对花布灯蛾、美国白蛾、小菜蛾、菜青虫、亚洲玉米螟、二斑叶螨、马铃薯瓢虫、桃蚜 8 种农林害虫的杀虫活性; 并对该菌株发酵液的稳定性进行了初步研究, 同时通过形态学和 16S rDNA 序列分析初步确定了其分类地位。结果表明: 该菌株对 8 种试虫均有致死作用, 杀虫谱广, 其中对花布灯蛾的致死作用最强, 48 h 的校正死亡率达 72.1%, 菌株发酵液对温度耐受性强, 在 25~50℃ 杀虫活性稳定; pH 4~7 范围内菌株杀虫活性较好, 发酵液有较好的光稳定性、贮存稳定性和菌株遗传稳定性, 具有较好的开发应用价值; 经形态学和 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定菌株 LKY208 为雷格链霉菌 *Streptomyces regensis*, 此乃国内外首次报道将链霉菌应用于花布灯蛾的防治。

关键词 雷格链霉菌; 分类地位; 生防效果; 花布灯蛾

中图分类号: S763.306 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019127

Study on the insecticidal activity of a *Streptomyces* strain

LI Limei¹, ZUO Tongtong¹, ZOU Jianjun¹, GOU Tianbing¹, LIU Qingzhen¹, CHEN Yuequ^{1,2}

(1. Jilin Provincial Academy of Forestry Science, Changchun 130033, China; 2. Research Institute of Forest Ecology Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract Strain LKY208 with a good insecticidal activity was isolated from soil by using *Artemia salina* and *Camptoloma interiorata*. In order to clarify the biocontrol effect and taxonomic status of the strain LKY208, the insecticidal activity of fermented broth of LKY208 against 8 pests was determined by leaf-dipping method, feeding with poison, slide-dip method and conventional dipping method. Meanwhile, the stability of fermentation broth was also studied. The taxonomic identification was carried out by the morphology and 16S rDNA sequence. The strain LKY208 displayed broad-spectrum inhibition activity against all the 8 pests tested, including *Camptoloma interiorata*, *Hyphantria cunea*, *Plutella xylostella*, *Ostrinia furnacalis*, *Pieris rapae*, *Tetranychus urticae*, *Henosepilachna vigintioctomaculata* and *Myzus persicae*. The results showed that the insecticidal effect on *C. interiorata* was the strongest, with a relative mortality of 72.1% after 48 hours. The fermented broth showed a high resistance to temperature and a highly insecticidal activity was still observed at the temperature of 25–50℃. In the range of pH 4–7, its insecticidal activity was good, with a good photochemical stability, storage tolerance and subculture, and thus it deserved further study. On the basis of morphology and 16S rDNA sequence analysis, it was identified as *Streptomyces regensis*. This is the first report that *Streptomyces regensis* was applied for the control of *C. interiorata*.

Key words *Streptomyces regensis*; classification; biocontrol effect; *Camptoloma interiorata*

虫害是制约林业发展一个重要因素, 比如美国白蛾 *Hyphantria cunea*, 又称美国灯蛾、秋幕蛾, 属于世界性检疫害虫, 原产于北美洲, 具有传播途径广、适应性强、繁殖量大、多食性等特点^[1], 对植物的

收稿日期: 2019-03-14 修订日期: 2019-04-19

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1200400); 吉林省科技攻关计划重大招标专项(20150203015NY); 吉林省林业厅科技项目(2014-004)

* 通信作者 E-mail: fungi3@126.com

为并列第一作者

危害性极强,且一旦侵害植物极易暴发成灾,被称为“无烟的火灾”^[2]。又如花布灯蛾 *Camptoloma interiorata*,国内主要分布于东北、华北、华东、华中、华南等地区^[3]。2010 年,花布灯蛾在吉林省辉南县暴发成灾,发生面积 3 000 hm² 以上^[4]。2011 年,吉林省花布灯蛾轻度为害林区近 1.70 万 hm²,中度为害林区近 1.51 万 hm²,而 2.32 万 hm² 重度受害,发生区域扩大到吉林市、辽源市、通化地区的 10 个县(市、区)及红石林业局和辉南森经局^[5]。花布灯蛾幼虫早春取食树木的芽苞和叶片,导致树木不能正常发芽、抽叶,造成局部枝条干枯、失水,严重影响树木的生长,如果连年为害,甚至可导致幼树死亡。

目前生产上对于害虫的防治仍多采用化学防治,但大量使用化学农药易造成环境污染和破坏生态平衡。杀虫抗生素是一类由微生物产生的具有杀虫活性的次级代谢产物,具有高效、专化和对环境安全等特点。因此,利用拮抗微生物防治花布灯蛾,以菌治虫,最终达到以生物防治为主的综合防治的目的。

放线菌是最早发现有生防作用的一类微生物,国内外相继报道放线菌中的多种链霉菌能够产生杀虫抗生素。阿维菌素是农业生产中应用最为广泛的杀虫抗生素。近几年报道的 3 000 多种新抗生素中,杀虫抗生素约占 5%,如 Takahashi 等发现的由链霉菌产生的杀虫杀螨抗生素 altemicidin^[6],我国学者欧阳谅等发现的梅岭霉素(meilingmycin)^[7],中国医学科学院医药生物技术所和日本北里研究所共同开发的杀虫抗生素戒台霉素(jietacin),但迄今未见关于防治花布灯蛾的抗生素产品的相关报道。

研制开发新型杀虫链霉素对林业可持续发展至关重要,本研究从采自吉林省不同地区的土壤中分离得到 217 株放线菌,以卤虫 *Artemia salina* 初筛和花布灯蛾复筛进行杀虫效果测定,最终获得了 1 株具有较高杀虫活性的拮抗链霉菌菌株,以期为生物防治提供新的生防因子。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤

2016 年 6 月—8 月及 2017 年 6 月—7 月,在吉林省不同地区采集土样 30 份。详见表 1。

表 1 土壤样品信息
Table1 The information of soil samples

编号 No.	采集地点 Location	采集时间/年-月 Time of collection	植被类型 Vegetation type
1	长春市净月潭实验林场	2016-08	阔叶林
2	伊通县伊丹林场	2016-07	针阔混交林
3	伊通县伊丹林场	2016-07	阔叶林
4	露水河林业局狩猎场	2016-08	红松混交林
5	露水河林业局东升林场	2016-08	红松混交林
6	露水河林业局红松种子园	2016-08	红松人工林
7	长白山保护区美人松公园	2016-08	长白松林
8	长白山保护区双目峰保护站	2016-08	落叶松天然林
9	长白山保护区白山保护站	2016-08	针阔混交林
10	长白山保护区白山保护站	2016-08	云冷杉林
11	长白山保护区白河保护站	2016-08	针阔混交林
12	长白山保护区头道保护站	2016-08	阔叶林
13	长白山保护区头西保护站	2016-08	针阔混交林
14	长白山保护区池西保护站	2016-09	针阔混交林
15	长白山保护区维东保护站	2016-09	针阔混交林
16	长白山保护区峰岭保护站	2016-07	针阔混交林
17	长白山保护区横山保护站	2016-07	云冷杉林
18	长白山保护区横山保护站	2016-07	苔原带
19	通化县三棚林场	2016-07	落叶松林
20	临江林业局桦树林场	2016-07	红松混交林
21	临江林业局闹枝林场	2016-07	针阔混交林
22	临江林业局红松种子园	2016-07	红松人工林
23	长白县十五道沟	2016-07	针阔混交林
24	敦化市雁鸣湖自然保护区	2017-06	阔叶林
25	和龙林业局广坪林场	2017-06	落叶松天然林
26	莫莫格自然保护区	2017-07	草地
27	向海自然保护区	2017-07	榆树林
28	向海自然保护区	2017-07	草地
29	双辽林业局实验林场	2017-07	杨树人工林
30	双辽林业局那木林场	2017-07	杨树人工林

1.1.2 供试菌株

链霉菌菌株 LKY208,由本实验室从 1.1.1 中的土壤样品中筛选、分离并保存。

1.1.3 供试虫源

花布灯蛾 *C. interiorata* Walker,鳞翅目灯蛾科,采自大连市金狐山;美国白蛾 *H. cunea* Drury,鳞翅目灯蛾科,采自沈阳苏家屯;小菜蛾 *Plutella xylostella* L.,鳞翅目菜蛾科,采自吉林省林科院伊通基地;亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée,鳞翅目螟蛾科,采自吉林省林科院伊通基地;菜青虫 *Pieris rapae* L.,鳞翅目粉蝶科;采自吉林省林科院伊通基地;二斑叶螨 *Tetranychus urticae* Koch,蜱螨目叶螨科;采自吉林省林科院伊通基地;马铃薯瓢虫 *Henosepilachna vigintioctomaculata* Motschulsky,鞘翅目瓢甲科;采自吉林省林科院伊通基地;桃蚜 *Myzus persicae* Sulzer,半翅目,蚜科;采自吉林

省林科院伊通基地;以上供试虫源为其各自发生期采集及养虫室继代饲养。

1.1.4 供试卤虫

卤虫 *Artemia salina*, 又称盐水丰年虫, 购自山东省滨州港友发水产有限公司。

1.1.5 供试培养基

高氏一号合成培养基和液体培养基: 可溶性淀粉 20 g, K_2HPO_4 0.5 g, KNO_3 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, NaCl 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2。高氏一号液体培养基除不含琼脂外, 其他成分同合成培养基。

发酵培养基: 花生饼粉 2.5%、可溶性淀粉 5.0%、酵母粉 0.08%、葡萄糖 0.02%、 $(NH_4)_2SO_4$ 0.08%、NaCl 0.2%、 $CaCO_3$ 0.32%, pH 7.0~7.2。

人工海水参考熊丽霞^[8] 配方: NaCl 24.48 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 4.98 g, Na_2SO_4 3.92 g, $CaCl_2 \cdot H_2O$ 2.23 g, $NaHCO_3$ 0.19 g, KCl 0.66 g, $NaBO_3$ 0.03 g, $SrCl_2 \cdot 0.02$ g, NaF 0.01 g, 1000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤样品采集

选择好适当地点后, 用小铲除掉表层土, 取 5~10 cm 深处的土壤约 30~50 g, 装入灭菌的纸袋中, 编号, 并注明采集地点和采集日期等信息, 用于链霉菌的分离。

1.2.2 链霉菌的分离与纯化

采用平板稀释分离法分离和纯化链霉菌^[9]。为减少杂菌、尤其是细菌的污染, 先将称好的 10 g 土壤 120℃ 烘烤 1 h, 然后加入 100 mL 无菌水中, 振荡 30 min 后, 吸取 1 mL 混悬液, 用无菌水梯度稀释, 依次从 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释管内分别吸取 0.1 mL 混悬液滴到高氏一号平板上, 均匀涂布, 然后将培养皿倒置于 28℃ 恒温箱内培养 3~10 d, 每天观察并挑选菌落形态各不相同的菌株及时转接到高氏一号斜面上培养, 采用稀释分离法重新纯化 3~5 次后, 编号并保存至 4℃ 冰箱中备用。

1.2.3 摇瓶发酵初筛杀虫活性菌株

发酵液的制备: 将 1.2.2 中分离纯化的链霉菌转接至高氏一号平板培养基上, 28℃ 下培养 7 d 后, 使用 7 mm 打孔器打菌饼接种至装有 40 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶内 (每瓶 15 个菌饼), 28℃, 150 r/min, 振荡培养 5 d, 发酵液以 6 000 r/min, 离心 20 min, 取上清液过细菌滤器去除菌体

备用。

杀虫活性的测定: 采用卤虫初筛^[10]。测定时, 将卤虫卵置于人工海水中, 28℃ 活化 24 h。在 96 孔细胞培养板中分别加入 0.1 mL 卤虫液 (约 20~30 头卤虫) 和 0.1 mL 待测菌株的发酵液, 以高氏一号液体培养基为对照, 28℃ 培养 24 h 后, 双目解剖镜观察并统计卤虫死亡率和校正死亡率。

$$\text{死亡率} = \frac{\text{死亡虫数}}{\text{供试虫数}} \times 100\%;$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\%。$$

1.2.4 摇瓶发酵复筛杀虫活性菌株

杀虫活性测定: 以花布灯蛾幼虫为试虫。采用叶片浸渍法^[11], 取新鲜蒙古栎叶片用菌株发酵液浸湿, 置于灭菌的培养皿中, 晾干后接入 2~3 龄花布灯蛾幼虫, 每皿 20 头, 3 次重复, 另设浸渍高氏一号液体培养基为空白对照, 阿维菌素 1 000 倍液为阳性对照, 分别置于人工气候培养箱 (25℃ ± 1℃, RH70%~80%, 光周期 L//D=16 h//8 h) 中饲养, 48 h 后统计试虫生存情况, 计算死亡率和校正死亡率。

1.2.5 链霉菌 LKY208 发酵液杀虫谱的测定

LKY208 为 1.2.4 小节筛选获得的活性最高的菌株。花布灯蛾、美国白蛾、小菜蛾、菜青虫、桃蚜的杀虫活性测定采用叶片浸渍法 (方法同 1.2.4)。

玉米螟的杀虫活性测定采用饲料染毒法^[12]。均匀切取一定大小的饲料 (约为幼虫的一日食量), 将菌株发酵液拌入高压灭菌后的人工饲料中 (100 μL/g), 饲喂 2 龄玉米螟幼虫。每处理 20 头幼虫, 重复 3 次。以人工饲料拌高氏一号液体培养基为对照。48 h 后在双目解剖镜下统计试虫生存情况, 计算死亡率和校正死亡率。

二斑叶螨的杀虫活性测定采用玻片浸渍法^[13]。粘贴时注意不要粘住螨的足和口器, 确保其肢体可以活动。每玻片粘 25 头, 3 次重复。将粘有二斑叶螨的载玻片置于人工气候培养箱中 (条件同上) 饲养 4 h 后, 用双目镜观察并剔除死亡或不活泼个体, 然后把粘有二斑叶螨的载玻片一端浸入发酵液中, 用滤纸吸干螨体及周围多余的液体, 重新置于人工气候培养箱中饲养。另以粘螨玻片浸渍高氏一号液体培养基为对照。48 h 后, 在双目解剖镜下统计试虫生存情况, 计算死亡率和校正死亡率。

马铃薯瓢虫的杀虫活性测定采用常规浸虫法^[14]。将供试昆虫放入浸虫器中,于菌株发酵液中浸 30 s,取出后放入养虫瓶中,培养方法同上。每处理成虫 20 头,重复 3 次,以试虫浸渍高氏一号液体培养基为对照,饲养条件同上。48 h 后在双目解剖镜下检查试虫生存情况,计算死亡率和校正死亡率。

1.2.6 发酵液热稳定性测定

取等量菌株发酵液分别于 30、40、50、60、70、80、90℃ 和 100℃ 下处理 1 h 后取出,自然冷却后,对 2~3 龄花布灯蛾幼虫进行杀虫活性检测,以未处理的发酵液(25℃)为对照。

1.2.7 发酵液 pH 稳定性测定

取等量菌株发酵液用 1 mol/L HCl 和 1 mol/L NaOH 分别调整 pH 为 1、2、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13 和 14,静置 24 h 后调回 pH 7,对 2~3 龄花布灯蛾幼虫进行杀虫活性检测,以未处理的发酵液为对照。

1.2.8 发酵液光照稳定性测定

取等量菌株发酵液分别置于日光下照射 1、2、3、4、5 h 后,对 2~3 龄花布灯蛾幼虫进行杀虫活性检测,以未处理的发酵液为对照。

1.2.9 发酵液耐贮性测定

取等量菌株发酵液分别在 4℃、50℃、-20℃ 的恒温条件下贮存 15 d 后,将发酵液恢复至原体积,对 2~3 龄花布灯蛾幼虫进行杀虫活性检测,以未处理的发酵液(25℃)为对照。

1.2.10 菌株遗传稳定性测定

将链霉菌 LKY208 转接至高氏一号斜面培养基上,记为 F₁ 代,28℃ 条件下培养 5~6 d 后,再转接斜面,记为 F₂ 代,依次继代转接直至 F₆ 代。取上述分别培养 7 d 的 F₁、F₂、F₃、F₄、F₅、F₆ 代斜面培养体,按上述的发酵方法进行发酵,检测各代菌株发酵液对 2~3 龄花布灯蛾幼虫的杀虫活性。

1.2.11 菌株鉴定

将菌种接种至高氏 1 号琼脂平板上,将灭菌盖玻片以 45° 斜插在培养基中,28℃ 培养 5~7 d 后,取出盖玻片,在光学显微镜下直接观察;同时,选择菌丝生长疏密适中,但气生菌丝和孢子丝发育良好的部分,真空喷镀制片后,用扫描电镜观察孢子链和孢子形态及表面结构,处理方法参考杨瑞等^[15]的方法。

参照树脂型™ 基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA,上下游引物(F: 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3'/R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')由宝生物(大连)工程有限公司合成。50 μL PCR 反应体系:PCR Mixture 25 μL、模板 2 μL、上下引物各 1 μL、ddH₂O 21 μL。PCR 反应条件:94℃ 变性 5 min;94℃ 变性 1 min,56℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min,35 次循环;72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存,以无菌水的 PCR 产物为阴性对照,以已知 16S rDNA 的菌株 PCR 产物为阳性对照。按上样量 2 μL 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳。回收产物送至宝生物(大连)工程有限公司进行双向测序,序列经 BioEdit 7.0.1 等软件分析和手工校正后,用 NCBI 的 BLAST 程序将测出的序列与在 GenBank 中下载的已知相似模式菌种的序列进行同源性比较分析,并用 MEGA 6.0 软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)进行序列比对并绘制系统发育树图。

1.3 数据统计

采用 SPSS 17.0 进行数据统计,Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 链霉菌的分离与纯化

从采集的 30 份土壤样品中共分离得到 217 株链霉菌菌株,将上述菌株在高氏一号斜面培养基中培养,4℃ 保存,作为原始菌株备用。

2.2 摇瓶发酵初筛结果

将分离得到的 217 株链霉菌菌株进行摇瓶发酵。以卤虫为靶标进行杀虫活性测定,获得 12 株对卤虫致死率达 50% 以上的菌株,其中编号 LKY208 号菌株效果最好,校正死亡率达 94.2%,LKY23 杀虫活性次之,校正死亡率可达 90%(表 2)。

2.3 摇瓶发酵复筛结果

将初筛获得的 5 株对卤虫具有较高活性的链霉菌菌株进行摇瓶发酵培养,以花布灯蛾幼虫为靶标进行杀虫活性测定,48 h 后观察统计,结果见表 3。菌株 LKY208 对花布灯蛾幼虫的杀虫活性最高,校正死亡率达 73.5%,与其他供试菌株差异显著,与供试的生物药剂阿维菌素差异不显著,菌株 LKY23 对花布灯蛾幼虫亦有较好的杀虫活性,校正死亡率为 65.0%,与阿维菌素差异显著。

表 2 杀虫活性链霉菌菌株的初筛结果¹⁾

Table 2 Results of preliminary screening of *Streptomyces* strains with insecticidal activity

菌株 Strain	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	菌株 Strain	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality
LKY02	55.5±2.32	53.3±2.22	LKY112	66.4±1.81	64.7±1.66
LKY07	80.5±1.85	79.5±1.78	LKY115	72.2±2.34	70.8±2.32
LKY18	79.0±1.72	78.0±1.68	LKY147	87.5±3.12	86.9±3.06
LKY23	90.5±3.25	90.0±3.78	LKY152	60.3±2.18	58.3±2.22
LKY58	85.8±3.21	85.1±3.53	LKY169	66.9±2.67	65.2±2.53
LKY104	77.5±4.50	76.4±3.98	LKY208	94.5±3.52	94.2±3.57
CK	4.7±0.08	—	—	—	—

1) 表中数据为平均值±标准差。
Data in the table are mean±SD.

表 3 链霉菌杀虫活性的复筛结果¹⁾

Table 3 Results of re-screening of *Streptomyces* strains with insecticidal activity

菌株 Strain	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality
LKY208	(75.2±3.23)a	(73.5±3.32)a
LKY23	(67.3±1.89)b	(65.0±1.83)b
LKY147	(51.5±1.75)c	(48.1±1.85)c
LKY58	(46.7±2.32)c	(43.0±2.12)c
LKY07	(48.3±2.51)c	(44.7±2.21)c
阿维菌素 abamectin	(80.3±3.51)a	(78.9±3.21)a
CK	(6.5±0.06)d	—

1) 表中数据为平均值±标准差。同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差方法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。
Data in the table are mean±SD. Lowercase letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ by Duncan's new multiple range test. The same below.

2.4 链霉菌 LKY208 发酵液杀虫活性的测定

分别测定了菌株 LKY208 发酵液对 8 种农林害虫的杀虫活性,研究表明(表 4),菌株 LKY208 发酵液对鳞翅目花布灯蛾幼虫的杀虫活性最高,48 h 的校正死亡率可达 72.1%,对鳞翅目小菜蛾幼虫和美国白蛾幼虫的杀虫活性仅次于花布灯蛾幼虫,校正死亡率分别为 69.5%和 66.6%,与其他试虫差异显著,同时对鳞翅目菜青虫和玉米螟 48 h 的校正死亡率分别为 36.9%和 32.8%;对二斑叶螨亦具有较好的杀虫活性,48 h 的校正死亡率达 44.8%;但对半翅目害虫桃蚜和鞘翅目害虫马铃薯瓢虫致死作用不明显。

表 4 链霉菌菌株 LKY208 发酵液杀虫活性

Table 4 Insecticidal activity of the fermentation broth of *Streptomyces* strain LKY208

供试虫源 Insect source tested	虫态 Instar	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality
花布灯蛾 <i>Camptoloma interiorata</i>	2 龄幼虫	(76.7±2.50)a	(72.1±2.32)a
美国白蛾 <i>Hyphantria cunea</i>	2 龄幼虫	(69.8±3.27)a	(66.6±3.29)a
小菜蛾 <i>Plutella xylostella</i>	3 龄幼虫	(75.2±3.21)a	(69.5±2.81)a
菜青虫 <i>Pieris rapae</i>	2 龄幼虫	(38.9±2.17)c	(36.9±2.07)c
玉米螟 <i>Ostrinia furnacalis</i>	2 龄幼虫	(35.3±0.56)d	(32.8±2.75)d
桃蚜 <i>Myzus persicae</i>	成虫	(20.0±0.00)e	(20.0±0.00)e
马铃薯瓢虫 <i>Henosepilachna vigintioctomaculata</i>	成虫	(10.0±0.58)f	(6.9±0.37)f
二斑叶螨 <i>Tetranychus urticae</i>	雌成螨	(48.0±3.24)b	(44.8±3.93)b

2.5 链霉菌 LKY208 发酵液稳定性测定

2.5.1 热稳定性测定

经不同温度处理后,菌株 LKY208 发酵液的杀虫活性略有变化。温度低于 50℃时,发酵液对花布灯蛾幼虫的杀虫活性较好,保持了很好的稳定性,但当温度高于 50℃时,杀虫效果有所下降(图 1),但即使温度达到 100℃,LKY208 发酵液仍然具有杀虫活性。

2.5.2 pH 稳定性测定

分别测定 pH 1~14 处理后菌株 LKY208 的发酵液活性的变化。当 pH 7 时发酵液的杀虫活性最高,在 pH 小于 7 时,发酵液杀虫活性略有降低,但当 pH 超过 9 时,菌株发酵液的杀虫活性明显降低(图 2),因此菌株发酵液在偏酸和中性条件下活性稳定,且活性明显高于经碱性条件处理的发酵液。

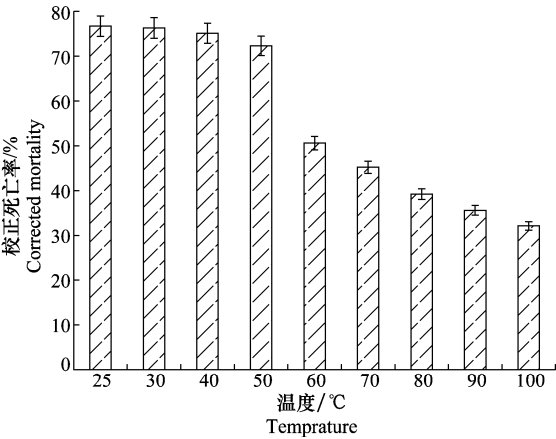


图 1 温度对链霉菌菌株 LKY208 发酵液杀虫活性的影响
Fig. 1 Effects of temperature on the insecticidal activity of the fermentation broth of *Streptomyces* strain LKY208

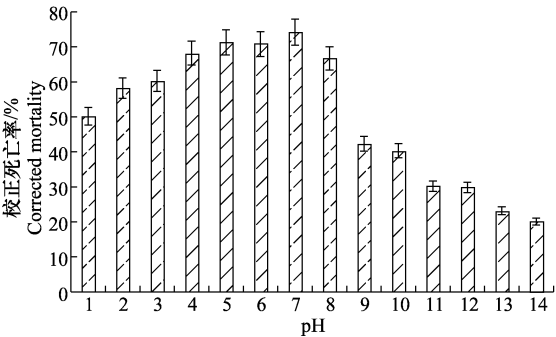


图 2 pH 对链霉菌菌株 LKY208 发酵液杀虫活性的影响
Fig. 2 Effects of pH on the insecticidal activity of the fermentation broth of *Streptomyces* strain LKY208

2.5.3 光照稳定性测定

菌株 LKY208 的发酵液经不同光照时间处理后,其对花布灯蛾的杀虫活性变化较小(图 3),说明菌株 LKY208 发酵液中的杀虫活性物质对光照稳定,不易分解。

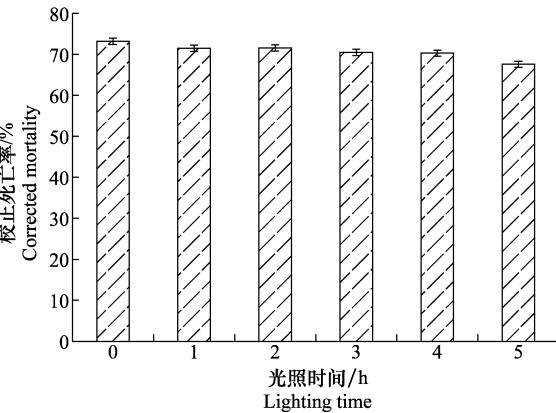


图 3 光照对链霉菌菌株 LKY208 发酵液杀虫活性的影响
Fig. 3 Effects of light on the insecticidal activity of the fermentation broth of *Streptomyces* strain LKY208

2.5.4 耐贮性测定

菌株 LKY208 的发酵液在 50℃、4℃、-20℃保存 15 d 后,对花布灯蛾的杀虫活性与对照相比活性变化不大。发酵液具有可贮藏性,可以长期保存,以 4℃低温贮藏效果最好(图 4)。

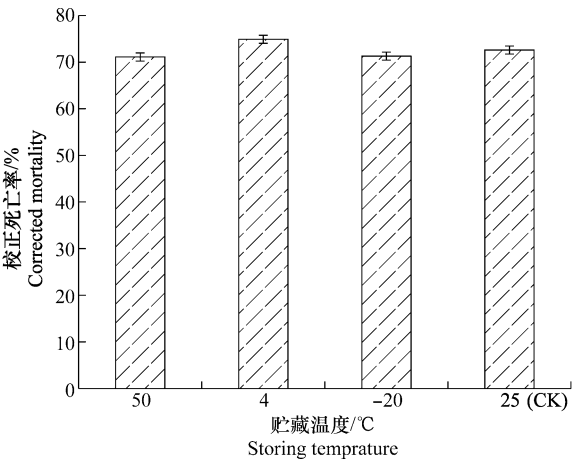


图 4 不同温度下贮藏 15 d 后链霉菌菌株 LKY208 发酵液的杀虫活性

Fig. 4 Insecticidal activity of the fermentation broth of *Streptomyces* strain LKY208 after stored at different temperature for 15 days

2.5.5 遗传稳定性测定

试验结果表明(图 5),链霉菌 LKY208 继代培养后发酵液对花布灯蛾的杀虫活性与原始菌株相比,表现了极强的遗传稳定性。

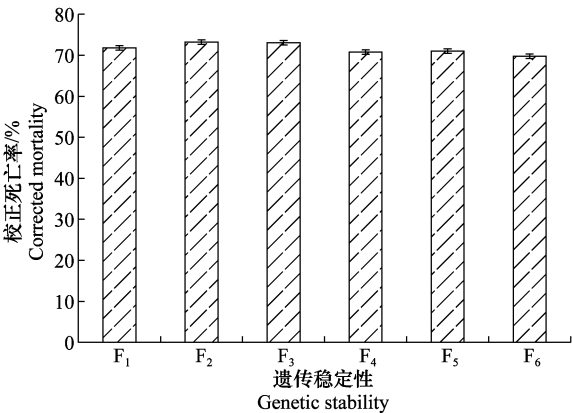


图 5 继代培养对链霉菌菌株 LKY208 发酵液杀虫活性的影响

Fig. 5 Effects of subculture on the insecticidal activity of the fermentation broth of *Streptomyces* strain LKY208

2.6 菌株鉴定

2.6.1 菌株 LKY208 形态学鉴定

菌株 LKY208 在高氏一号培养基上生长茂盛,

气生菌丝丰茂,28℃培养 1~2 d 时,菌落光滑、无孢子生成,第 3 天开始可见气生菌丝呈黄绿色、淡黄绿色、淡黄色,4 d 后基质颜色逐渐变为黄色,7 d 时气生菌丝逐渐变成褐绿色。在显微镜下观察,基内菌丝无横膜,不断裂;电镜观察结果表明孢子丝短,偶见短而松散螺旋状(图 6a),孢子椭圆形、柱形,表面光滑或不规则褶皱(6b),根据形态特征初步分析菌株 LKY208 为链霉菌属。

2.6.2 菌株 LKY208 的 16S rRNA 鉴定

对菌株 LKY208 的 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增、纯化、测序后,测得其序列长度为 1 388 bp。与 GenBank 数据库的 16S rDNA 序列相比,与雷格链霉菌 *Streptomyces regensis* 的同源性最高,相似值均在 99% 以上。选择与菌株 LKY208

同源性较高的 10 个菌株,建立系统发育树,结果表明,菌株 LKY208 与 *Streptomyces regensis* strain NBRC(GenBank:NR 112402.1)等 4 个菌株,聚在一个分支,亲缘关系最近,因此初步鉴定菌株 LKY208 为雷格链霉菌(MH 473142)(图 7)。

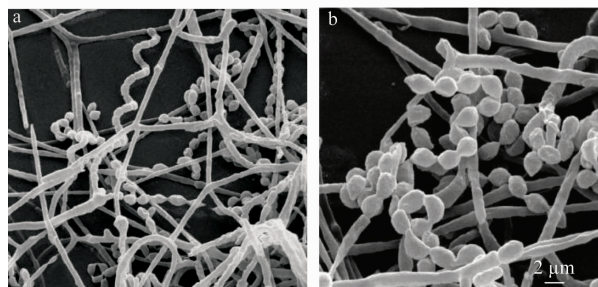


图 6 菌株 LKY208 的孢子链和孢子电镜照片

Fig. 6 The spore chains and spores of strain LKY208

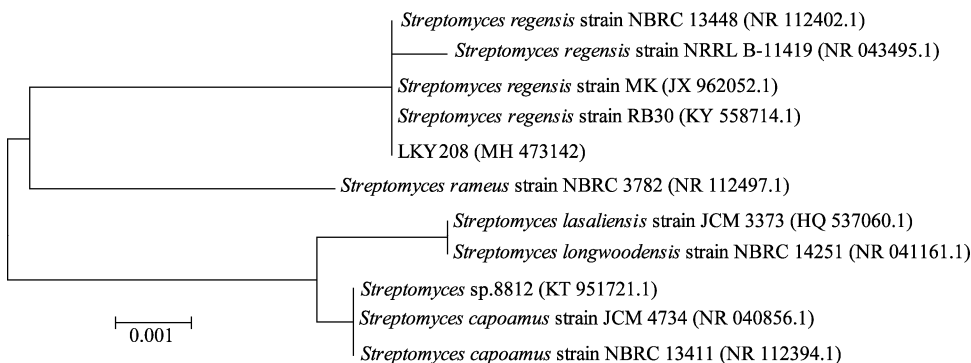


图 7 菌株 LKY208 及相关菌株的系统发育树

Fig. 7 The phylogenetic tree of strain LKY208

3 结论与讨论

随着害虫生物防治研究的不断发展,微生物源农药的研制已成为国内外研究的热点之一。放线菌在自然界中分布广泛,代谢产物种类丰富,是产生抗生素活性物质最多的一类微生物,而链霉菌属又是放线菌中产生抗生素最多的一个属。因此,从链霉菌中筛出的可产生高效杀虫活性物质的菌株具有非常好的开发应用前景。

传统杀虫抗生素的筛选都是以目标昆虫为靶标,耗费人力及物力。利用小型活体动物进行早期初筛,继而用目标昆虫进行复筛是目前被广泛认可的筛选策略^[16]。因此本研究选定卤虫为初筛研究对象,减少前期的工作,节约了时间和成本。

本试验利用稀释分离法从采集到的各类土壤样品中共分离到 217 株链霉菌,以卤虫为初筛指示生物,获得 12 株对卤虫致死率达 50% 以上的链霉菌

菌株,其中 LKY208 的杀虫活性,高达 94.2%;以花布灯蛾为靶标,以初筛较好的 5 株拮抗菌株为试材进行复筛,结果发现编号为 LKY208 的菌株对花布灯蛾的杀虫效果明显,48 h 的校正死亡率可达 73.5%,具有很好的研究和开发前景。

利用室内生物测定方法测定了链霉菌 LKY208 菌株发酵液对多种昆虫的杀虫效果。结果表明:菌株 LKY208 发酵液对花布灯蛾的杀虫活性最高,48 h 的校正死亡率可达 72.1%,对鳞翅目小菜蛾幼虫和美国白蛾幼虫的杀虫活性仅次于花布灯蛾幼虫,校正死亡率分别为 69.5% 和 66.6%,对二斑叶螨也具有较好的杀虫活性,48 h 的校正死亡率达 44.8%;但对桃蚜和马铃薯瓢虫的杀虫作用不明显,这可能是由于微生物的次生代谢产物对昆虫的毒杀作用具有较高的选择性,一般一类次生代谢产物可能仅对某些种类的昆虫有作用。

对菌株 LKY208 发酵液进行的稳定性试验结果

表明:发酵液在 50℃ 以下、pH 为偏酸性和中性条件下杀虫活性比较稳定;具有良好的光照稳定性、耐贮藏性;且菌株遗传性稳定。因此,菌株 LKY208 具有很好的开发研究价值及应用前景。

利用 16S rRNA 基因对菌株 LKY208 进行了分类鉴定,将菌株 LKY208 初步定名为链霉菌属雷格链霉菌 *Streptomyces regensis*。

参考文献

[1] 徐明,刘冬梅,徐福元,等. Bt 与灭幼脲混剂对美国白蛾第 2,3 代幼虫的联合毒力及预防效果[J]. 林业科学,2013,49(12): 171-174.

[2] 魏建荣,杨忠岐,苏智. 利用生命表评价白蛾周氏啮小蜂对美国白蛾的控制作用[J]. 昆虫学报,2003,46(3):318-324.

[3] 萧刚柔. 中国森林昆虫[M]. 北京:中国林业出版社,1992:1039.

[4] 房立新,陈连正,张联合,等. 花布灯蛾生物学特性及综合防治技术[J]. 吉林林业科技,2012,41(4):53-54.

[5] 贾中鸣,张晓军,张健. 花布灯蛾生物学特性及综合防治技术[J]. 吉林农业,2013(6):64.

[6] TAKAHASHI A, KURASAWA S, IKEDA D, et al. Altemicidin, a new acaricidal and antitumor substance. I. Taxonomy, fermentation, isolation and physico-chemical and biological properties [J]. The Journal of Antibiotics, 1989, 42(11):

1556-1561.

[7] 欧阳谅,涂国全,高勇生,等. 南昌链霉菌新种及其产生的两种杀虫抗生素[J]. 江西农业大学学报. 1984,15(8):148-153.

[8] 熊丽霞. 海洋微生物杀虫活性物质的分离筛选与海洋杀虫链霉菌 L173 的研究[D]. 北京:中国科学院生态环境研究中心,2004.

[9] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,2007: 243-250.

[10] 胡志钰,刘三震,黄浩,等. 海洋放线菌杀虫抗生素的一种快速筛选模型[J]. 海洋通报,2000,19(4):36-41.

[11] 左一鸣,王开运,姜兴印. 4 种抗生素类杀虫剂对小菜蛾不同龄期幼虫的毒力和杀卵作用[J]. 农药,2004,43(1):26-27.

[12] 徐树兰,李辉,陈其津. 甜菜夜蛾核型多角体病毒的致病力测定与群养对病毒产量的影响[J]. 长江蔬菜,2010(18):10-12.

[13] FAO. Revised method for spider mites and their egg (e. g. *Tetranychus* spp. and *Panonychus ulmi* Koch) [J]. FAO Plant Production and Protection, 1980,21(4):49-54.

[14] 刘济宁. 海洋微生物 050101 菌株的杀虫活性筛选及其基因重组研究[D]. 海口:华南热带农业大学,2004.

[15] 杨瑞,王岐,张露,等. 放线菌扫描电镜样品制备方法比较研究[J]. 电子显微学报,2014. 33(1):84-89.

[16] 潘云娣,杨文鸽. 产杀虫活性物质海洋放线菌的筛选和初步鉴定[J]. 海洋通报,2006,5(4):92-95.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 200 页)

[25] LEPS J, SMILAUER P. Multivariate analysis of ecological data using CANOCO [M]. Cambridge: Cambridge University Press,2003.

[26] FERENC S, ANDRÁS H, DÓRA N, et al. Metacommunities of spiders in grassland habitat fragments of an agricultural landscape [J]. Basic and Applied Ecology, 2018, 31: 92-103.

[27] MIYASHITA T, SHINKAI A, CHIDA T. The effects of forest fragmentation on web spider communities in urban areas [J]. Biological Conservation, 1998, 86(3):357-364.

[28] BRAAKER S, OBRIST MK, GHAZOU J, et al. Habitat connectivity and local conditions shape taxonomic and functional diversity of arthropods on green roofs [J]. Journal of Animal Ecology, 2017, 86(3):521-531.

[29] 周子扬. 不同类型稻田非作物生境的节肢动物多样性[D]. 南京:南京农业大学,2001.

[30] HARVEY J A, ODE P J, MALCICKA M, et al. Short-term seasonal habitat facilitation mediated by an insect herbivore [J]. Basic and Applied Ecology, 2016, 17(5):447-454.

[31] 刘冰. 不同景观结构下华北农田主要天敌的种群数量以及控害功能[D]. 扬州:扬州大学,2016.

[32] DIEHL E, MADER V L, WOLTERS V, et al. Management intensity and vegetation complexity affect web-building spiders and their prey [J]. Oecologia, 2013, 173(2):579-589.

[33] 黄顶成,尤民生,侯有明,等. 化学除草剂对农田生物群落的

影响[J]. 生态学报,2005,25(6):1451-1458.

[34] LEFEBVRE M, FRANCK P, OLIVARES J, et al. Spider predation on rosy apple aphid in conventional, organic and insecticide-free orchards and its impact on aphid populations [J]. Biological Control, 2017, 104:57-65.

[35] ZAKKAK S, CHATZAKI M, KARAMALIS N, et al. Spiders in the context of agricultural land abandonment in Greek Mountains: species responses, community structure and the need to preserve traditional agricultural landscapes [J]. Journal of Insect Conservation, 2014,18(4):599-611.

[36] 黄德超,梁广文. 不同耕种稻田稻株上部节肢动物群落种间协变[J]. 广东农业科学,2010,37(1):9-11.

[37] 陈银方. 浙西南茶园蜘蛛消长动态和影响关键因子研究[J]. 蛛形学报,2016,25(1):56-60.

[38] 蒋杰贤,万年峰,季香云,等. 桃园生草对桃树节肢动物群落多样性与稳定性的影响[J]. 应用生态学报,2011,22(9):2303-2308.

[39] 王凯学,张清泉,陈丽丽,等. 生态稻田及常规稻田节肢动物群落结构特征的比较研究[J]. 植物保护,2013,39(3):31-35.

[40] 冉隆珣,玉香甩,毛加梅,等. 勐海茶区不同类型茶园节肢动物群落组成及多样性研究[J]. 湖南农业科学,2012,9(13):88-91.

[41] 黎秀娣,冯平万,黎健龙,等. 茶树上游猎型蜘蛛功能团对景观低碳管理模式反应[J]. 生态环境学报,2014,23(1):64-72.

(责任编辑:田 喆)