

# 放线菌防治根结线虫的作用机制及研究进展

曹艳茹<sup>1,2#\*</sup>, 朱国兴<sup>1#</sup>, 王海龙<sup>1</sup>, 吴雅杰<sup>1</sup>, 焦钰<sup>1</sup>,  
张兴丽<sup>1</sup>, 朱若娴<sup>1</sup>

(1. 昆明学院农学与生命科学学院, 昆明 650214; 2. 昆明学院农业资源利用科技创新团队, 昆明 650214)

**摘要** 根结线虫病是全球性植物土传病害, 每年造成巨大经济损失。传统的线虫防治方法因成本高、毒性大、线虫易产生抗药性、危害生态环境等原因不符合农业生产绿色可持续发展的理念。放线菌因其能适应各种生境, 代谢产物丰富, 且能通过诱导植物产生免疫防御, 调节植物根部微生物区系, 分泌多种酶等方式来安全高效地防治根结线虫病而广受关注和研究。本文主要综述了放线菌防治根结线虫的作用机制及目前所取得的研究进展, 以期为开发、应用放线菌资源进行线虫生物防治提供帮助。

**关键词** 放线菌; 根结线虫; 生物防治; 作用机制

**中图分类号**: S 432.6 **文献标识码**: A **DOI**: 10.16688/j.zwbh.2023027

## Mechanism and research progress of actinomycetes for root-knot nematodes control

CAO Yanru<sup>1,2#\*</sup>, ZHU Guoxing<sup>1#</sup>, WANG Hailong<sup>1</sup>, WU Yajie<sup>1</sup>, JIAO Yu<sup>1</sup>,  
ZHANG Xingli<sup>1</sup>, ZHU Ruoxian<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy and Life Sciences, Kunming University, Kunming 650214, China; 2. Scientific and Technological Innovation Team for Agricultural Resource Utilization, Kunming University, Kunming 650214, China)

**Abstract** Root-knot nematode disease is a global soil borne plant disease, which causes severe economic losses every year. The traditional control methods are not in line with the concept of green sustainable development of agricultural production because of its high cost, high toxicity, nematode resistance and harm to the ecological environment. Actinomycetes attracts wide attention and research because they can adapt to various habitats, are rich in metabolites, and can safely and efficiently prevent root-knot nematode disease by secreting various enzymes, regulating the microflora of plant roots, and inducing plants to produce immune defenses. In this paper, mechanism of actinomycetes against root-knot nematode and research progress made in recent years are reviewed, with a view to providing help for the development and application of actinomycetes resources for biological control of nematode.

**Key words** actinomycete; root knot nematode; biological control; action mechanism

### 1 根结线虫的发生与危害

根结线虫 *Meloidogyne* spp. 是属于线虫动物门 Nematoda 的一类寄主广泛、种类繁多、繁殖时间短、危害程度大, 在全球范围内分布的植物寄生性线

虫<sup>[1-3]</sup>。1855年, Berkeley 首次在英国温室种植的黄瓜根系发现根结线虫<sup>[4]</sup>。此后, 在全球发现根结线虫的寄生植物高达 5 500 多种<sup>[5]</sup>, 根结线虫在茄科、十字花科、葫芦科等作物根系均能繁殖<sup>[6]</sup>, 其中受害最严重的是番茄<sup>[7]</sup>、黄瓜<sup>[8]</sup>、辣椒<sup>[9]</sup>等蔬菜作物。根结线虫种类繁多, 常见的有南方根结线虫

收稿日期: 2023-01-18 修订日期: 2023-02-09

基金项目: 云南省“万人计划”青年拔尖人才资助项目(YNWR-QNBJ-2018-011); 云南省基础研究专项(202301AT070051); 云南省教育厅科学研究基金(2021Y733, 2024Y730, 2024Y732); 国家自然科学基金(31660002); 省部共建云南生物资源保护与利用国家重点实验室开放课题(2019KF005)

\* 通信作者 E-mail: yanrucao3@aliyun.com

# 为并列第一作者

*Meloidogyne incognita*、爪哇根结线虫 *M. javanica*、北方根结线虫 *M. hapla* 和花生根结线虫 *M. arenaria* 4种,其中南方根结线虫的危害最广,能够感染几乎所有栽培植物的根系。近年来,象耳豆根结线虫 *M. enterolobii* 也成为危害农作物的重要根结线虫之一<sup>[10-12]</sup>。象耳豆根结线虫最早发现于海南儋州,因其原始寄主为象耳豆树,故而称为象耳豆根结线虫,该线虫寄主范围广泛、致病性强、能抵御 *Mi* 抗性基因<sup>[13]</sup>。

根结线虫的生命力极其顽强,在无任何寄主植物的情况下仍然可以利用土壤中的病残体生存。在 10℃ 时,根结线虫便可以在土层活动,在温度 24~30℃ 时生长繁殖更为迅速,因此是热带、亚热带和温带地区最常见的植物病原物<sup>[14-15]</sup>。根结线虫在入侵过程中,通过口针分泌激素类物质刺激寄主细胞产

生巨细胞,进而形成增生结构,该结构称为根结。线虫从植物吸收营养并显著削弱植物吸收水分和养分的能力,导致植物正常生理代谢功能失衡。与此同时,根结线虫入侵时留下的伤口为其他病原微生物的侵入提供了便利<sup>[16]</sup>。由此,根结线虫能与其他病原微生物联合引起复合病害,加重对寄生植物的危害程度<sup>[14,17]</sup>,造成寄主植物叶片萎蔫、黄枯、植株矮小甚至死亡<sup>[18]</sup>(图 1)。近年来,由于设施蔬菜种植面积的加大,复种指数增加,种植产品单一,导致根结线虫病日益加剧,严重影响农作物的产量与品质,给农作物生产带来了极大威胁<sup>[19-20]</sup>。寄生性线虫每年造成全球农业损失 3 280.4 亿美元<sup>[21]</sup>,其中在中国造成的直接经济损失就高达 500 亿元<sup>[22]</sup>。因此,迫切需要研究开发出有效防治根结线虫的生防制剂。

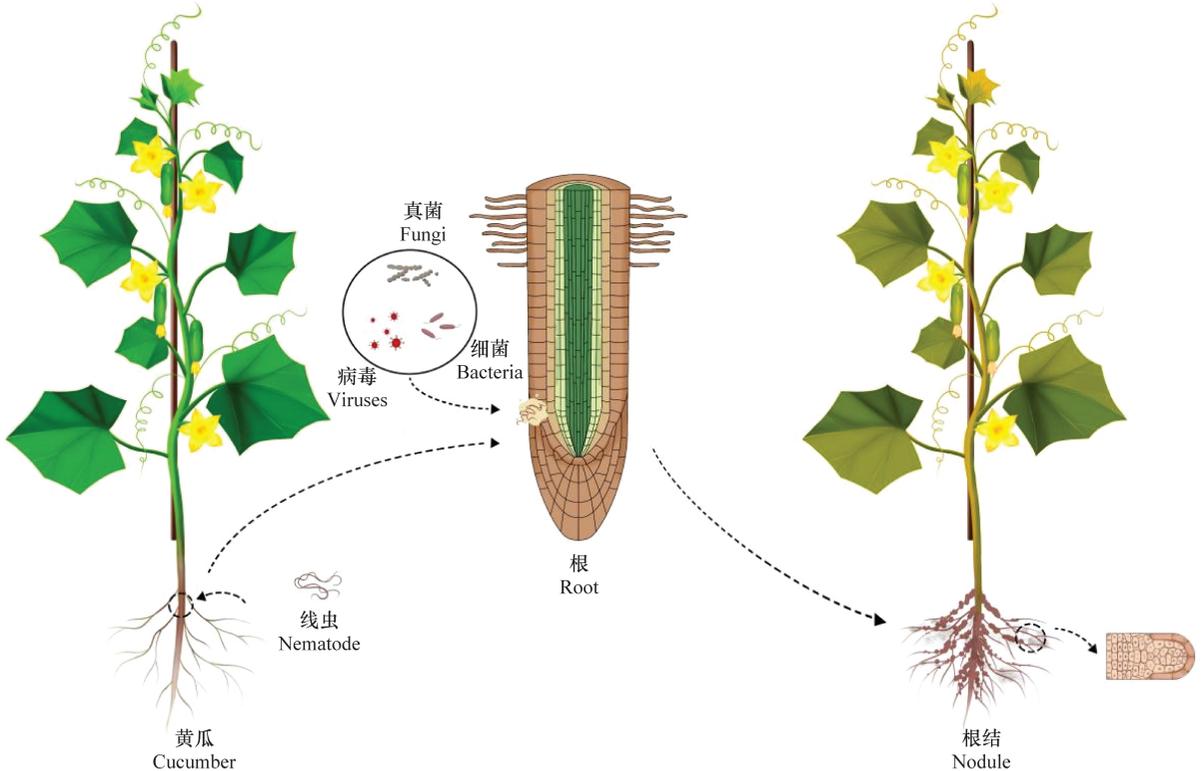


图 1 根结线虫侵染黄瓜根部形成根结的过程

Fig. 1 Process of root nodule formation in cucumber roots infected by root-knot nematode

## 2 根结线虫的防治现状

目前防治根结线虫的主要方法有农业防治、物理防治、化学防治和生物防治。农业防治主要通过轮作、深耕、客土、选用无虫地育苗等方式改善作物的生长环境,费时费力并且效果不佳<sup>[23]</sup>。物理

防治主要通过高温闷棚、熏蒸等方式消除土壤中的线虫卵,同时也消灭了部分土壤有益菌群并破坏了土壤团粒结构及生态系统<sup>[23]</sup>。化学防治是目前应用最广的线虫防治手段,主要通过溴甲烷、噻唑膦、克百威、氟吡菌酰胺、氟唑环菌胺、三氟吡啶胺等人工合成的化学杀虫剂防治。长期使用化学药

剂容易引发线虫抗性及环境污染等问题,残留药剂进入食物链对人和动物造成毒害,因而很多化学杀线虫药剂如克百威、溴甲烷等熏蒸剂已被国家明文禁止使用<sup>[24-25]</sup>。

生物防治是利用植物、微生物或其产生的代谢产物来防治根结线虫<sup>[26]</sup>。利用有杀线虫活性的生防菌来防治根结线虫,既利于解决化学防治带来的毒性残留、危害环境及动物和人体健康等问题,又能达到低毒、易降解且不易产生抗药性的防治效果,同时还能促进作物生长发育,如红灰链霉菌 *Streptomyces rubrogriseus* HDZ-9-47 作用于番茄,在减少 87.1% 线虫根结的同时,番茄产量也增加了 16.1%<sup>[27]</sup>。目前已有多种真菌、细菌和放线菌被用于防治根结线虫。近年来也有报道利用动物,如蚯蚓粪便微生物来控制根结线虫病的发生<sup>[28-30]</sup>。在根结线虫生防菌资源中放线菌因其在自然界中分布广泛、种类繁多、代谢产物丰富而被认为是生物活性天然化合物的主要来源。在大约 18 000 种已知的生物活性化合物中,有超过 10 000 种来自放线菌,尤其是放线菌中的链霉菌属 *Streptomyces* 菌株<sup>[31-32]</sup>。

### 3 放线菌防治根结线虫的作用机制

放线菌是一类具有发达菌丝,以无性孢子繁殖,能在多种生境中生活的革兰氏阳性菌<sup>[33-34]</sup>。目前的研究表明,放线菌主要通过分泌各种酶作用于线虫卵或者线虫体壁,发酵产生具有杀线虫活性的代谢产物和挥发性物质,调节植物根部微生物区系,诱导植物产生免疫防御反应等方式防治根结线虫。

#### 3.1 分泌降解线虫卵或者体壁的酶

线虫体壁中的主要成分胶原蛋白很难被一般蛋白酶水解,却能被胶原蛋白酶在螺旋区断裂<sup>[35]</sup>,从而将线虫体壁降解,因而胶原蛋白酶是生防菌防治线虫的重要作用因子之一。线虫的卵膜主要由蛋白质基质和几丁质层等组成<sup>[36]</sup>。放线菌可以通过分泌几丁质酶、胶原蛋白酶、丝氨酸、蛋白酶等直接作用于卵或者体壁,抑或进入卵内寄生抑制和杀死线虫。Yoon 等<sup>[37]</sup>发现可可链霉菌 *Streptomyces cacaoi* GY525 通过产生几丁质酶作用于线虫外壳进而抑制南方根结线虫的卵孵化;张艳杰等<sup>[38]</sup>研究发现,玫瑰黄链霉菌 *S. roseoflavus* Men-

myco-93-63 能够产生胶原蛋白酶、丝氨酸蛋白酶作用于线虫卵壳和体壁,从而具有较强的杀线虫活性。

#### 3.2 产生具有杀死或抑制线虫活性的次级代谢产物

放线菌最突出的特性就是能产生种类繁多、功能各异的活性化合物,如大环内酯类、新型大环多烯内酯类、生物碱类化合物等<sup>[39-40]</sup>。近年来筛选到的新生化药物许多是来自放线菌的次生代谢产物,包括酶抑制剂、抗寄生虫剂、免疫抑制剂和农用杀虫/杀菌剂等。

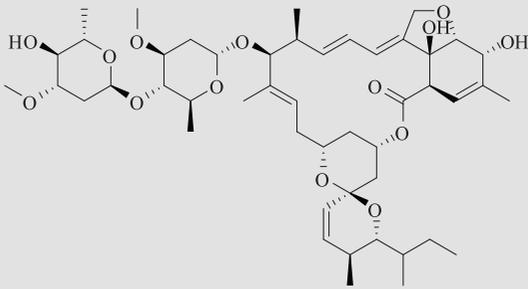
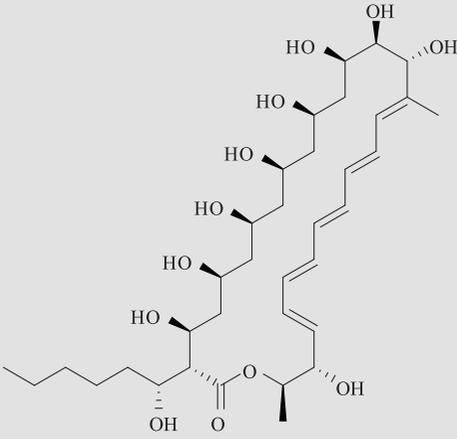
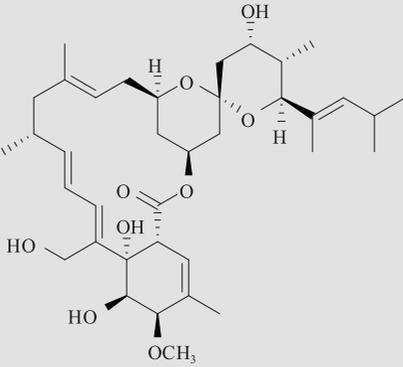
Mrozik 等<sup>[41]</sup>从阿维链霉菌 *Streptomyces avermitilis* 发酵液中发现的大环内酯类抗生素阿维菌素通过干扰线虫神经生理活动,抑制神经传导系统导致线虫出现麻痹症状,不活动、不取食,2~4 d 即死亡。由于阿维菌素对根结线虫具有极高的活性,同时其被土壤吸附不会移动,易被微生物分解,在环境中无累积作用,因此一经发现就在杀虫剂市场占据重要地位。孙敏等<sup>[42]</sup>发酵白刺链霉菌 *S. albospinus* CT205 并分离获得杀线虫活性物质环己酰亚胺,其作为蛋白抑制剂可以有效抑制真核生物蛋白质的合成,从而杀死根结线虫。谭卓等<sup>[43]</sup>从委内瑞拉链霉菌 *S. venezuelae* Snea253 中纯化得到了邻苯二甲酸二丁酯,推断该物质通过使虫体发生渗漏,抑制 2 龄幼虫的呼吸作用来杀死根结线虫。占宝林等<sup>[44]</sup>从金色链霉菌 *S. aureus* DA09202 发酵液中分离得到杀线虫活性化合物 4',7-二羟基异黄酮,该化合物可以强烈地抑制细胞膜上的 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase 活性,从而杀死线虫。曾庆飞<sup>[45]</sup>从白浅灰链霉菌 *S. albo-griseolus* HA10002 发酵液中分离出活性物质诺卡胺素、6'-甲基制霉色基素和 3-[1-(6,8-二羟-1,5,6-三甲基辛基)-7-羟基-1,6,6,8a-四甲基-8-(吡喃戊糖氧基)-1,4,4a,5,6,7,8,8a-八氢萘烯-2-基]-丙酸,对根结线虫的防治效果均能达到 90% 以上,且发酵液室温存放 6 个月后抗线虫活性几乎保持不变。其中 6'-甲基制霉色基素和 3-[1-(6,8-二羟-1,5,6-三甲基辛基)-7-羟基-1,6,6,8a-四甲基-8-(吡喃戊糖氧基)-1,4,4a,5,6,7,8,8a-八氢萘烯-2-基]-丙酸为首次报道的新化合物。刘亮山等<sup>[46]</sup>发现链霉菌 *Streptomyces* sp. JH108 发酵滤液稀释 10 倍后处理南方根结线虫,24 h 后校正死亡率达 95.4%,同时发现该菌还会影响线虫对寄主植物根的亲和力,从而有效

地防治根结线虫病害。Park 等<sup>[47]</sup>从黑链霉菌 *S. nigrescens* KA-1 中分离纯化的杀线虫化合物曲古抑菌素 C 和脱氢曲古抑菌素 A, 以 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度作用 48 h 时, 对根结线虫的杀灭活性为 46% ~ 59%。表 1 是通过文献查阅总结的具有杀根结线虫活性的化合物结构, 从中可以看出, 目前从放线菌门发现的杀线虫活性物质主要有大环内酯类、放线菌

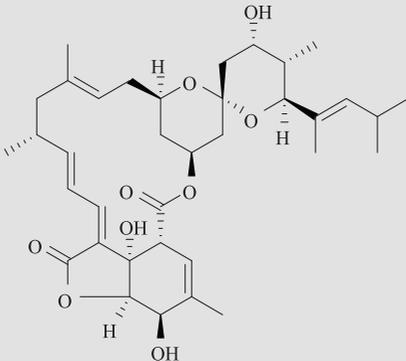
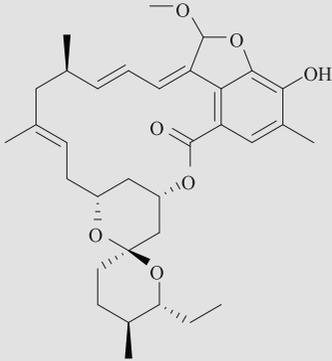
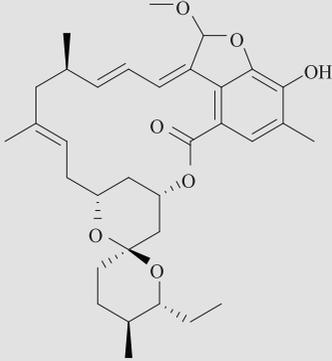
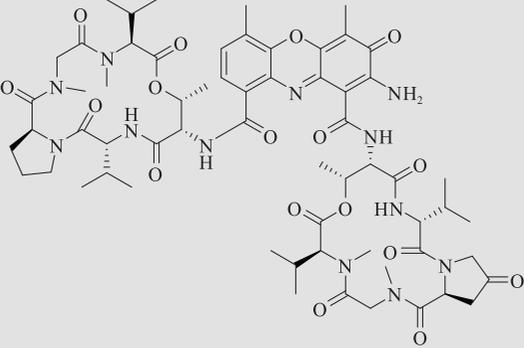
素类、环肽类、黄酮类、苯甲酸类、脂肪酸类、萜烯类、氮杂环类、含磷类、内酯类、酰胺类、苯丙酸类、吡咯类、呋喃类化合物等共 14 类化合物, 主要来源于放线菌中的链霉菌科 Streptomycetaceae 链霉菌属 *Streptomyces* 菌株。此外, 小单孢菌属 *Micromonospora*、农霉菌属 *Agromyces* 等稀有放线菌也是杀线虫活性物质的重要来源。

表 1 杀线虫活性化合物的结构

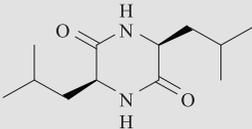
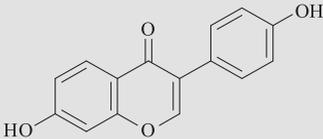
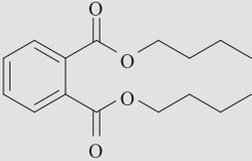
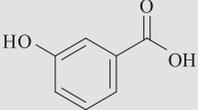
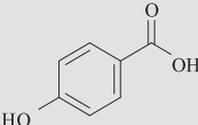
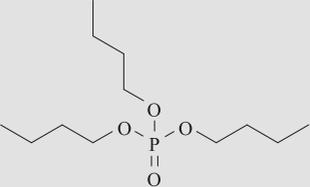
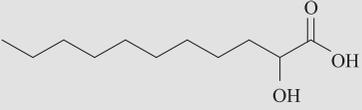
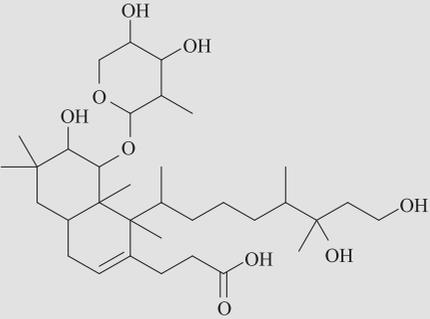
Table 1 Structure of nematocidal compounds

化合物结构类型 Type of compound structure	来源 Source	结构式 Structural formula	名称 Name
大环内酯类 Macrolides	阿维链霉菌 <sup>[41]</sup> <i>Streptomyces avermitilis</i>		阿维菌素 Avermectin
	白浅灰链霉菌 <sup>[45]</sup> <i>S. albogriseolus</i>		6'-甲基制霉色基素 6'-methyl-fungichromin
	细黄链霉菌 <sup>[48]</sup> <i>S. microflavus</i>		尼莫克汀同系物 1 Nemadectin congeners 1

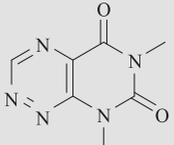
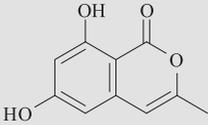
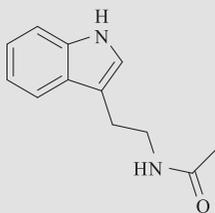
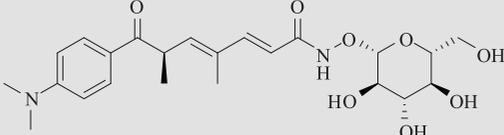
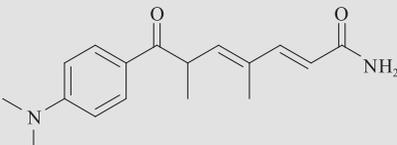
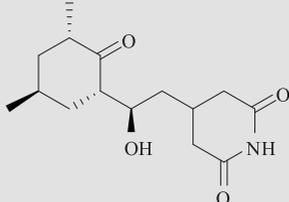
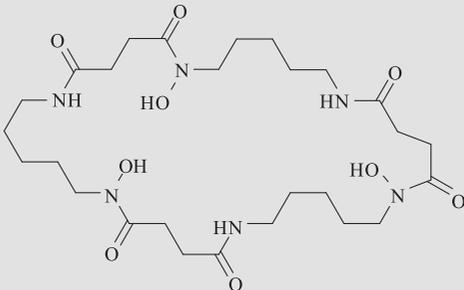
续表 1 Table 1(Continued)

化合物结构类型 Type of compound structure	来源 Source	结构式 Structural formula	名称 Name
大环内酯类 Macrolides	细黄链霉菌 <sup>[48]</sup> <i>S. microflavus</i>		尼莫克汀同系物 2 Nemadectin congeners 2
	冰城链霉菌 <sup>[49]</sup> <i>S. bingchengensis</i>		27-甲氧基米霉素-α31 27-methoxymilbemycin-α31
	冰城链霉菌 <sup>[49]</sup> <i>S. bingchengensis</i>		27-氧代米尔贝霉素-α31 27-oxomilbemycin-α31
放线菌素类 Actinomycin	抗生素链霉菌 <sup>[51]</sup> <i>S. antibioticus</i>		放线菌素 V Actinomycin V

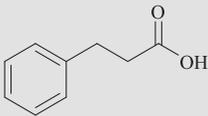
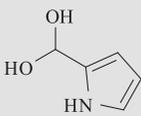
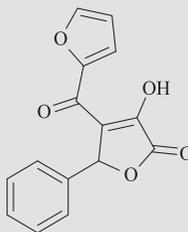
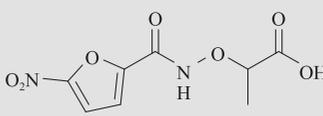
续表 1 Table 1(Continued)

化合物结构类型 Type of compound structure	来源 Source	结构式 Structural formula	名称 Name
环肽类 Cyclic peptides	委彻氏链霉菌 <sup>[52]</sup> <i>S. rochei</i>		环(亮氨酸-亮氨酸)二肽 Cyclo (Leu-Leu)
黄酮类 Flavonoid	金色链霉菌 <sup>[44]</sup> <i>S. aureus</i>		4',7-二羟基异黄酮 4',7-dihydroxyisoflavone
苯甲酸类 Benzoic acid	委内瑞拉链霉菌 <sup>[53]</sup> <i>S. venezuelae</i>		邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate
	小单孢菌 <sup>[54]</sup> <i>Micromonospora</i> sp.		3-羟基苯甲酸 3-hydroxybenzoic acid
	小单孢菌 <sup>[54]</sup> <i>Micromonospora</i> sp.		4-羟基苯甲酸 4-hydroxybenzoic acid
含磷类 Phosphorus	委彻氏链霉菌 <sup>[52]</sup> <i>S. rochei</i>		磷酸三丁酯 Tributyl phosphate
脂肪酸类 Fatty acid	阿利农霉菌 <sup>[55]</sup> <i>Agromyces allii</i>		2-羟基十一酸 2-hydroxyundecanoic acid
萜烯类 Naphthene	白浅灰链霉菌 <sup>[45]</sup> <i>S. albogriseolus</i>		3-[1-(6,8-二羟-1,5,6-三甲 基辛基)-7-羟基-1,6,6,8a- 四甲基-8-(吡喃戊糖氧基)- 1,4,4a,5,6,7,8,8a-八氢 萜烯-2-基]-丙酸 3-[1-(6,8-dihydroxy-1,5,6- trimethyloctyl)-7-hydroxy-1, 6,6,8a-tetramethyl-8-(pyr- anopentosyl)-1,4,4a,5,6, 7,8a-octahydropaten-2-yl]- propionic acid

续表 1 Table 1(Continued)

化合物结构类型 Type of compound structure	来源 Source	结构式 Structural formula	名称 Name
氮杂环类 Nitrogen	链霉菌 <sup>[56]</sup> <i>Streptomyces</i> sp.		6,8-二甲基嘧(5,4- <i>e</i> )-1,2,4-三嗪-5,7(6H,8H)-二酮 6,8-dimethylpyrimido(5,4- <i>e</i> )-1,2,4-triazine-5,7(6H,8H)-dione
内酯类 Benzolactone	链霉菌 <sup>[56]</sup> <i>Streptomyces</i> sp.		6,8-二羟基-3-甲基异香豆素 6,8-dihydroxy-3-methylisocoumarin
酰胺类 Acylamide	小单孢菌 <sup>[54]</sup> <i>Micromonospora</i> sp.		乙酰酪胺 N-acetyltryptamine
	黑链霉菌 <sup>[47]</sup> <i>Streptomyces nigrescens</i>		曲古抑菌素 C Trichostatin C
	黑链霉菌 <sup>[47]</sup> <i>S. nigrescens</i>		脱羟基曲古抑菌素 A Dehydroxytrichostatin A
	白刺链霉菌 <sup>[42, 50]</sup> <i>S. albospinus</i>		环己酰亚胺 Cycloheximide
	白浅灰链霉菌 <sup>[45]</sup> <i>S. albogriseolus</i>		诺卡胺素 Nocardamine

续表 1 Table 1 (Continued)

化合物结构类型 Type of compound structure	来源 Source	结构式 Structural formula	名称 Name
苯丙酸类 Phenylpropanoic acid	小单孢菌 <sup>[54]</sup> <i>Micromonospora</i> sp.		3-苯基丙酸 3-phenylpropanoic acid
吡咯类 Pyrrole	阿利农霉菌 <sup>[55]</sup> <i>Agromyces allii</i>		(1H-吡咯-2-基)甲二醇 (1H-pyrrol-2-yl) methanediol
呋喃类 Furanes	阿利农霉菌 <sup>[55]</sup> <i>A. allii</i>		4-(呋喃-2-羰基)-3-羟基-5-苯基呋喃-2(5H)-酮 4-(furan-2-carbonyl)-3-hydroxy-5-phenylfuran-2(5H)-one
	阿利农霉菌 <sup>[55]</sup> <i>A. allii</i>		2-((5-硝基呋喃-2-甲酰胺基)氧基)丙酸 2-((5-nitrofuran-2-carboxamido)oxy)propanoic acid

### 3.3 产生杀死或抑制线虫活性的挥发性物质

在根结线虫的生物防治中,大多数化合物是从放线菌发酵的次级代谢产物中获得,但还有一部分从其产生的挥发性物质中获得。金涵等<sup>[50]</sup>利用白刺链霉菌 *S. albospinus* CT205 产生的烯炔类、醇类复合挥发性有机物作用于根结线虫,对根结线虫  $J_2$  的毒杀作用 24 h 达到了 91.21% 以上,同时对卵孵化的抑制率达到 80%。乔茜<sup>[57]</sup>将白黄链霉菌 *S. alboflavus* TD-1 产生的挥发性物质如萜烯类、芳香烃类、醛类、醇类、酚类、醚类等作用于线虫,48 h 后,对  $J_2$  期线虫致死率超过 70%。挥发性有机化合物(VOCs)广泛存在于植物和微生物中,VOCs 通过影响线虫神经系统、肠道或者引起氧化应激反应导致 DNA、蛋白质和脂质损伤来杀死线虫,在根结线虫的生物防治中具有重要作用,也是具有被开发成商品化杀虫剂的潜在物质<sup>[58-59]</sup>。

### 3.4 调节植物根部微生物区系

植物根际微生物区系被认为是最复杂的生态系统,既包含促进植物生长的有益微生物,也包含抑制植物生长的有害微生物。同时根部微生物区系并非静态,而是动态变化的。植物根系微生物区系会随着外部条件的改变而改变,通过在植物根际接种或施加放线菌剂,改变植物根系拮抗菌的数量,从而减

少或抑制病原物的发生<sup>[60-61]</sup>。生防放线菌通过改变根区土壤微生态系统引发植物、微生物和线虫之间的复杂相互作用,导致植物对根结线虫敏感性下降<sup>[62]</sup>。

Nimnoi 等<sup>[63]</sup>将链霉菌 *Streptomyces* spp. KPS-E004 菌株与 KPS-A032 菌株复配后接种于辣椒根部提高了根际土壤微生物的丰富度,与接种单株 KPS-E004 相比,对根结线虫的防治效率提高了 104.99%,在防治根结线虫的同时还促进了辣椒的生长,提高了产量。马媛媛<sup>[64]</sup>将密旋链霉菌 *S. pactum* 和娄彻氏链霉菌 *S. rochei* 1:1 复配后接种到番茄根部使得根结线虫病情指数下降 37%,根区土壤可培养微生物总数中细菌和放线菌分别减少了 18% 和 10%,真菌增加了 20%,同时植物促生菌和杀线虫菌的数量增加,而植物致病菌数量减少。张翠绵等<sup>[65]</sup>将链霉菌 *Streptomyces* sp. S506 纯菌剂添加增效剂后应用于黄瓜育苗,黄瓜育苗成苗根际可培养微生物的总量增加 67.8%,同时 S506 对线虫的校正击倒率维持在 50%~60% 之间。活性放线菌通过改变植物根部微生物区系改变了微生物群落结构,减少了致病菌,增加了拮抗线虫的潜在有益菌群,进而降低了植物的线虫感染率。

### 3.5 诱导植物产生免疫防御反应

植物自身具有抵抗外来病原物的防御能力。一旦病原菌侵袭植物,便能激发相应的分子机制和效应因子诱导植物免疫相关蛋白,比如与防御有关酶的过表达,引发过敏性反应等<sup>[66]</sup>来抵御病原菌的侵染。而生防放线菌作用于植物之后可以激发植物组织内的一些抗病基因表达,从而激活某些免疫途径,对线虫的侵染、发育产生抑制作用。WRKY 是植物中一类重要的转录因子(transcription factors, TFs),广泛参与植物对生物、非生物和激素胁迫的响应。乔丹娜<sup>[67]</sup>在黄瓜根际施用玫瑰黄链霉菌 *S. roseoflavus* Men-myc-93-63 水剂后,提高了黄瓜组织中 6 个与抗线虫相关的 WRKY 基因的表达,从而提高了黄瓜的抗病能力,增强了黄瓜抵抗根结线虫侵染的能力。马媛媛<sup>[64]</sup>用密旋链霉菌和娄彻氏链霉菌复配的混合菌剂拌土,使番茄组织内的防御酶 PPO 活性提高了 33%,番茄的根结数降低了 66.7%。Sharma 等<sup>[68]</sup>研究表明,*S. hydrogenans* 菌株 DH-16 产生的代谢物通过增强番茄体内非酶抗氧化剂、酶抗氧化剂增加光合物质(总酚、花青素和类黄酮等酚类化合物)含量来减轻南方根结线虫危害。激发植物体内免疫防御反应是生防放线菌抑制根结线虫的侵染、降低病情指数的重要作用方式。

## 4 放线菌防治根结线虫的研究进展

在根结线虫的生物防治中,放线菌占据着举足轻重的地位。1975 年日本北里研究所(Kitasato Institute)从阿维链霉菌次级代谢产物中分离出的十六元大环内酯化合物阿维菌素,具有杀线虫活性<sup>[69-71]</sup>。研究表明 0.5  $\mu\text{g}/\text{L}$  的浓度在 12 h 时就能高效杀死根结线虫,在储存数月后,仍能保持原有杀线虫效力<sup>[72]</sup>。目前阿维菌素已被广泛用作蔬菜、水果和粮食作物的杀线虫剂、杀螨剂和杀虫剂。黄瓜、棉花等作物的种子经过阿维菌素处理后,在生长发育过程中,被线虫侵染的几率降低了 20%~80%<sup>[73-74]</sup>。

自阿维菌素问世以来,学者们掀起了深入挖掘杀线虫活性放线菌的狂潮。Meidani 等<sup>[75]</sup>从希腊不同植物根际分离到 461 株链霉菌,其中 *Streptomyces monomycini* ATHUBA 220、*S. colombiensis* ATHUBA 438、*S. colombiensis* ATHUBA 431 和 *S. youssoufiensis* ATHUBA 546 对南方根结线虫、爪哇根结线虫有活性;Mishra 等<sup>[76]</sup>从农田、盆栽植

物和公园草坪土壤样本中筛选出的 11 株链霉菌和 3 株小单孢菌均具有杀线虫活性,其中灰色链霉菌 *S. griseus* 04020 在 2 h 内杀线虫活性达到了 50%;陈井生等<sup>[77]</sup>从大豆根际土壤中获得的小链霉菌 *S. parvus* H-2 代谢物稀释 5 倍后处理南方根结线虫 2 龄幼虫,24 h 后致死率达 74.35%,对卵囊孵化的抑制率高达 78.46%;田阳等<sup>[78]</sup>把从海洋中筛选出的海洋放线菌 M1D14 发酵液稀释 16 倍后作用于南方根结线虫,致死率高达 100%;Park 等<sup>[79]</sup>研究表明,米氏链霉菌 *S. misionensis* KRA-24 和 *S. yatensis* KRA-28 的培养液分别显示出约 75%和 85%的杀线虫活性;阿尔新等<sup>[80]</sup>从新疆高盐土样和罗布泊地区土样分离得到 123 株放线菌,有 14 株放线菌具有杀线虫活性,其中链霉菌 *Streptomyces* sp. L075 的次级代谢产物对秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 的致死率在 70%~80%。随着科研工作者的努力,越来越多的杀线虫活性放线菌资源被发现,为杀线虫的生物防治研究提供了有力保障。

目前在实际生产中,为了提高杀线虫活性放线菌的防治效果,往往将其与其他防治方法相结合。王波等<sup>[81]</sup>将放线菌 LH117 的发酵上清液与淡紫拟青霉 *Purpureocillium lilacinum* LP1 孢子液按 1:1 比例复配施于田间,对番茄根部南方根结线虫根结形成和卵块形成的抑制率分别高达 68.7%和 58.4%,相比单菌株防治效果显著提高。Jin 等<sup>[82]</sup>先对土壤进行熏蒸,再将红灰链霉菌 *S. rubrogri-seus* HDZ-9-47 孢子液注入种植孔,使番茄根部南方根结线虫形成的根结指数减少 87.1%,虫口密度降低 91.0%,番茄产量提高 16.1%,优于单独使用 HDZ-9-47 或土壤熏蒸。Zhao 等<sup>[83]</sup>用阿维菌素(Abm)与 EHL 基纳米颗粒结合(EHL 基纳米颗粒含有纤维素和果胶酶),研究负载阿维菌素的 EHL 基纳米颗粒(Abm@L-CL)对根结线虫的防治效果,结果显示,Abm@L-CL 对南方根结线虫的致死活性是 Abm 的 1.7 倍。与其他防治方法连用可以提高放线菌的杀线虫效果,是未来生防菌剂的研发方向之一。

## 5 总结与展望

随着经济的发展以及人类生活质量的提高,人们对生态健康及粮食安全越来越重视,因此高毒、高残留的化学杀虫剂正在逐渐淡出大众视野,无毒的生物源杀虫剂是未来的发展趋势<sup>[84]</sup>。通过大量文

献查阅总结发现,放线菌可以通过分泌多种酶作用于线虫外壳、产生具有多种活性成分的次级代谢产物、调节植物根部微生物区系、诱导植物产生免疫防御等方式来安全高效地防治根结线虫。为了加快放线菌的大规模商业化生产和应用,我们应当加强以下几方面的研究:1)为了适应盐碱地、荒漠地等多样化的土壤环境,应扩大筛选放线菌的分离源,以增强杀线虫放线菌菌剂的广谱适应能力;2)运用宏基因组学、转录组学、代谢组学、蛋白组学等组学技术及其他生物技术研究植物-微生物-线虫互作机制;3)将放线菌与其他菌株、其他防治方法联合使用,构建复合菌剂和联防机制,综合提高对根结线虫的防治效果;4)对靶向基因进行编辑,构建高效合成活性产物的工程菌株,降低生产成本,实现大规模推广。

集约化农业种植模式使根结线虫病害频发,严重制约我国农业发展。“十四五”规划提出加快农业绿色发展的步伐,生物防治研究得到大力发展。随着杀线虫活性放线菌资源的不断丰富及杀线虫机理的解析,影响放线菌田间功效发挥的因素有望被逐一克服,促进放线菌剂的开发和应用,真正实现活性放线菌从实验室走向田间,从而推动我国农作物根结线虫病害的生物防治进程。

## 参考文献

- CAO Xiaomei, ZHANG Ruiping, MENG Shuai, et al. Biocontrol potential of *Agromyces allii* 130935 and its metabolites against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J/OL]. *Rhizosphere*, 2021, 19: 100378. DOI: 10.1016/j.rhisph.2021.100378.
- TIAN Xueliang, ZHAO Xiaoman, ZHAO Songyu, et al. The biocontrol functions of *Bacillus velezensis* strain Bv-25 against *Meloidogyne incognita* [J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 843041. DOI: 10.3389/fmicb.2022.843041.
- AFFOKPON A, COYNE D L, HTAY C C, et al. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(3): 600–608.
- BERKELEY M J. *Vibrio* forming cysts on the roots of cucumbers [J]. *Cardener's Chronicle*, 1855, 7(36): 220–221.
- JAOUANNET M, PERFUS-BARBOECH L, DELEURY E, et al. A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei [J]. *New Phytologist*, 2012, 194(4): 924–931.
- 毛佳, 吴险平, 王宏宝, 等. 南方根结线虫与土壤理化性质对不同外源物的响应[J]. *浙江农业科学*, 2022, 63(3): 569–572.
- EL-SAPPAH A H, ISLAM M M, EL-AWADY H H, et al. Tomato natural resistance genes in controlling the root-knot nematode [J/OL]. *Genes*, 2019, 10(11): 925. DOI: 10.3390/genes10110925.
- GÓMEZ-GONZÁLEZ G, MÁRQUEZ-ZEQUERA I, CRUZ-LACHICA I, et al. First report of *Meloidogyne enterolobii* parasitizing cucumber in Sinaloa, Mexico [J]. *Plant Disease*, 2020, 104(4): 1260.
- MOOSAVI M R. Damage of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* to bell pepper, *Capsicum annuum* [J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2015, 122(5): 244–249.
- 罗梅, 陈欣瑜, 张新新, 等. 广东省甘薯根结线虫的鉴定[J]. *中国农学通报*, 2021, 37(21): 140–144.
- 刘昊, 龙海, 鄢小宁, 等. 海南省番石榴根结线虫病病原的种类鉴定及其寄主范围的测试[J]. *南京农业大学学报*, 2005, 28(4): 55–59.
- 张礼萌, 姜秉政, 苗悦, 等. 一年生辣椒对象耳豆根结线虫的抗性生理机制分析[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(23): 7923–7931.
- 张怀军, 赵志祥, 陈绵才. 象耳豆根结线虫对7个品种番茄生长的影响[J]. *华南农业大学学报*, 2015, 36(4): 87–90.
- 李明远. 蔬菜根结线虫病的发生、识别、传播和防治[J]. *中国蔬菜*, 2017(11): 85–88.
- 徐红兵. 蔬菜上根结线虫种群检测、毒性分化及防治研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- MOSLEHI S, POURMEHR S, SHIRZAD A, et al. Potential of some endophytic bacteria in biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J/OL]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2021, 31(1): 50. DOI: 10.1186/s41938-021-00396-4.
- 王霞, 梁小平, 李碧霞. 黄瓜根结线虫病的鉴别与防治研究[J]. *蔬菜*, 2020(6): 50–52.
- 陈启明. 温室黄瓜根结线虫病及其防治[J]. *现代农业*, 2020(9): 68.
- 李天予. 邯郸市设施蔬菜根结线虫发生现状、种类鉴定及毒性变异研究[D]. 邯郸: 河北工程大学, 2020.
- DU Jianfeng, GAO Qixiong, JI Chao, et al. *Bacillus licheniformis* JF-22 to control *Meloidogyne incognita* and its effect on tomato rhizosphere microbial community [J/OL]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 863341. DOI: 10.3389/fmicb.2022.863341.
- ABD-ELGAWAD M M M. Understanding molecular plant-nematode interactions to develop alternative approaches for nematode control [J/OL]. *Plants*, 2022, 11(16): 2141. DOI: 10.3390/plants11162141.
- 高丙利. 植物线虫综合治理概论[M]. 北京: 中国农业科学技术出版, 2021.
- 巩相景. 蔬菜根结线虫病的防治现状及生物酶防治效果探析[J]. *现代农业科技*, 2020(11): 135–137.
- 韩冰洁, 张立君, 张建君. 作物根结线虫病防治研究进展[J]. *长江蔬菜*, 2021(22): 44–48.
- 王家哲, 李英梅, 张锋, 等. 根结线虫防治药剂及抗性研究

- 进展[J]. 陕西农业科学, 2021, 67(12): 74-77.
- [26] 王建宇. 根结线虫生防菌高地芽孢杆菌 AMCC1040 的筛选及杀线虫作用机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- [27] JIN Na, XUE Hui, LI Wenjing, et al. Field evaluation of *Streptomyces rubrogriseus* HDZ-9-47 for biocontrol of *Meloidogyne incognita* on tomato [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(6): 1347-1357.
- [28] ZUHAIR R, MOUSTAFA Y T A, MUSTAFA N S A, et al. Efficacy of amended vermicompost for bio-control of root knot nematode (RKN) *Meloidogyne incognita* infesting tomato in Egypt [J/OL]. Environmental Technology & Innovation, 2022, 27: 102397. DOI: 10.1016/j.eti.2022.102397.
- [29] 刘大伟, 韩文昊, 张艳菊, 等. 蚯蚓粪及浸提液对番茄根结线虫的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(5): 686-691.
- [30] ROSTAMI M, KAREGAR A, HAMZEHZARGHANI H. Biocontrol potential of the *Vorticella* sp. isolated from vermicompost against *Meloidogyne javanica* [J/OL]. Current Microbiology, 2022, 79(11): 333. DOI: 10.1007/s00284-022-03030-0.
- [31] 张超群, 戴建荣. 放线菌的研究现状与展望[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(1): 110-113.
- [32] CHANG T L, HUANG T W, WANG Y X, et al. An actinobacterial isolate, *Streptomyces* sp. YX44, produces broad-spectrum antibiotics that strongly inhibit *Staphylococcus aureus* [J/OL]. Microorganisms, 2021, 9(3): 630. DOI: 10.3390/microorganisms9030630.
- [33] PRUDENCE S M M, ADDINGTON E, CASTAÑO-ESPRIU L, et al. Advances in actinomycete research; an ActinoBase review of 2019 [J]. Microbiology, 2020, 166(8): 683-694.
- [34] ALAM K, MAZUMDER A, SIKDAR S, et al. *Streptomyces*: The biofactory of secondary metabolites [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 968053. DOI: 10.3389/fmicb.2022.968053.
- [35] MILLER P M, SANDS D C. Effects of hydrolytic enzymes on plant-parasitic nematodes [J]. Journal of Nematology, 1997, 9(3): 192-197.
- [36] ASATUROVA A M, BUGAEVA L N, HOMYAK A I, et al. *Bacillus velezensis* strains for protecting cucumber plants from root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in a greenhouse [J/OL]. Plants, 2022, 11(3): 275. DOI: 10.3390/plants11030275.
- [37] YOON G, LEE Y S, LEE S, et al. Effects on *Meloidogyne incognita* of chitinase, glucanase and a secondary metabolite from *Streptomyces cacaoi* GY525 [J]. Nematology, 2012, 14(2): 175-184.
- [38] 张艳杰, 魏学军, 寇宏达, 等. 玫瑰黄链霉菌 Men-myc-93-63 抗南方根结线虫相关酶活性及其防效[J]. 西北农业学报, 2013, 22(4): 184-190.
- [39] 尚坤, 阎瑾逸, 高君梅, 等. 放线菌来源活性天然产物发现研究进展[J]. 微生物学杂志, 2023, 43(4): 101-108.
- [40] MAST Y, STEGMANN E. Actinomycetes: The antibiotics producers [J/OL]. Antibiotics, 2019, 8(3): 105. DOI: 10.3390/antibiotics8030105.
- [41] MROZIK H, ESKOLA P, LINN B O, et al. Discovery of novel avermectins with unprecedented insecticidal activity [J]. Experientia, 1989, 45(3): 315-316.
- [42] 孙敏, 王小姣, 丁宇涵, 等. 白刺链霉菌 *Streptomyces albospinus* CT205 次生代谢产生活性物质的分离纯化及结构鉴定[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(7): 793-798.
- [43] 谭卓, 朱峰, 朱晓峰, 等. 委内瑞拉链霉菌 Snea253 杀线虫活性化合物的分离纯化与结构鉴定[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(11): 81-84.
- [44] 占宝林, 曾庆飞, 吴晓鹏, 等. 杀线虫放线菌 DA09202 的鉴定及其活性物质的解析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(9): 1283-1286.
- [45] 曾庆飞. 根结线虫拮抗放线菌的筛选及菌株 HA10002 和 DA09202 活性物质的研究[D]. 海口: 海南大学, 2011.
- [46] 刘亮山, 林茂松, 鄢小宁, 等. 生防链霉菌 JH108-2 的发酵培养基优化[J]. 植物病理学报, 2006, 36(3): 259-266.
- [47] PARK E J, JANG H J, PARK J Y, et al. Efficacy evaluation of *Streptomyces nigrescens* KA-1 against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J/OL]. Biological Control, 2023, 179: 105150. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2023.105150.
- [48] YANG Lingyu, WANG Jidong, ZHANG Ji, et al. New nematode congeners with acaricidal and nematocidal activity from *Streptomyces microflavus* neau3 Y-3 [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013, 23(20): 5710-5713.
- [49] LI Jiansong, ZHANG Hui, ZHANG Shaoyong, et al. New macrocyclic lactones with acaricidal and nematocidal activities from a genetically engineered strain *Streptomyces bingchenggensis* BCJ60 [J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2017, 19(4): 339-346.
- [50] 金涵, 李梦雅, 姚感, 等. 白刺链霉菌 CT205 对南方根结线虫的毒杀作用及盆栽防效[J]. 南京农业大学学报, 2023, 46(1): 63-70.
- [51] SHARMA M, JASROTIA S, OHRI P, et al. Nematicidal potential of *Streptomyces antibioticus* strain M7 against *Meloidogyne incognita* [J/OL]. AMB Express, 2019, 9(1): 168. DOI: 10.1186/s13568-019-0894-2.
- [52] 杨树. 娄彻氏链霉菌 ZZ-9 菌株杀线作用及其活性成分分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.
- [53] 谭卓. 链霉菌 Snea253 代谢物中脂溶性活性物质的结构解析及杀线虫机理研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- [54] RAN Yuan, ZHANG Yu, WANG Xin, et al. Nematicidal metabolites from the actinomycete *Micromonospora* sp. WH06 [J/OL]. Microorganisms, 2022, 10(11): 2274. DOI: 10.3390/microorganisms10112274.
- [55] 孟帅. 地衣和珍稀动物粪便放线菌杀线虫菌株筛选及其活性代谢产物研究[D]. 昆明: 云南大学, 2018.
- [56] RUANPANUN P, LAATSCH H, TANGCHITSOMKID N, et al. Nematicidal activity of fervenulin isolated from a nematocidal actinomycete, *Streptomyces* sp. CMU-MH021, on

- Meloidogyne incognita* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(6): 1373–1380.
- [57] 乔茜. 链霉菌 TD-1 挥发性物质的生物活性研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2013.
- [58] DENG Xiaotong, WANG Xin, LI Guohong. Nematicidal effects of volatile organic compounds from microorganisms and plants on plant-parasitic nematodes [J/OL]. Microorganisms, 2022, 10(6): 1201. DOI: 10.3390/microorganisms10061201.
- [59] TERRAA W C, CAMPOSA V P, MARTINSB S J, et al. Volatile organic molecules from *Fusarium oxysporum* strain 21 with nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* [J]. Crop Protection, 2018, 106: 125–131.
- [60] RAAIJMAKERS J M, PAULITZ T C, STEINBERG C, et al. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms [J]. Plant and Soil, 2009, 321: 341–361.
- [61] 周文杰, 吕德国, 秦嗣军. 植物与根际微生物相互作用关系研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(3): 253–260.
- [62] MA Yuanyuan, LI Yulong, LAI Hangxian, et al. Effects of two strains of *Streptomyces* on root-zone microbes and nematodes for biocontrol of root-knot nematode disease in tomato [J]. Applied Soil Ecology, 2017, 112: 34–41.
- [63] NIMNOI P, RUANPANUN P. Suppression of root-knot nematode and plant growth promotion of chili (*Capsicum flutescens* L.) using co-inoculation of *Streptomyces* spp. [J/OL]. Biological Control, 2020, 145: 104244. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2020.104244.
- [64] 马媛媛. 抗线虫放线菌筛选及其对番茄生长与根际微生态系统的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [65] 张翠绵, 李洪涛, 李晓芝, 等. 链霉菌 S506 对设施黄瓜根际生态和生产性状的影响[J]. 中国农业科技导报, 2010, 12(5): 98–102.
- [66] 王诗宇, 王志兴, 张丽丽, 等. 植物防御反应的研究进展[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(19): 39–45.
- [67] 乔丹娜. 玫瑰黄链霉菌诱导黄瓜抗线相关 WRKY 基因的表达分析及其药效试验[D]. 保定: 河北农业大学, 2016.
- [68] SHARMA N, MANHAS R K, OHRI P. *Streptomyces hydrogenans* strain DH-16 alleviates negative impact of *Meloidogyne incognita* stress by modifying physio-biochemical attributes in *Solanum lycopersicum* plants [J/OL]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 15214. DOI: 10.1038/s41598-022-19636-0.
- [69] BURG R W, MILLER B M, BAKER E E, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents; Producing organism and fermentation [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1979, 15(3): 361–367.
- [70] MILLER T W, CHAIET L, COLE D J, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents; Isolation and chromatographic properties [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1979, 15(3): 368–371.
- [71] EGERTON J R, OSTLIND D A, BLAIR L S, et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents; Efficacy of the B1a component [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1979, 15(3): 372–378.
- [72] WEBER T, CHARUSANTI P, MUSIOL-KROLL E M, et al. Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes [J]. Trends in Biotechnology, 2015, 33(1): 15–26.
- [73] ZASADA I A, WALTERS T W, PINKERTON J N. Post-plant nematicides for the control of root lesion nematode in red raspberry [J]. American Society of Horticultural Science, 2010, 20(5): 856–862.
- [74] BESSI R, INOMOTO M M, SUJIMOTO F R. Seed treatment affects *Meloidogyne incognita* penetration, colonization and reproduction on cotton [J]. Crop Protection, 2010, 40(6): 1428–1430.
- [75] MEIDANI C, SAVVIDIS A, LAMPROPOULOU E, et al. The nematicidal potential of bioactive *Streptomyces* strains isolated from Greek rhizosphere soils tested on *Arabidopsis* plants of varying susceptibility to *Meloidogyne* spp. [J/OL]. Plants, 2020, 9(6): 699. DOI: 10.3390/plants9060699.
- [76] MISHRA S K, KELLER J E, MILLER J R, et al. Insecticidal and nematicidal properties of microbial metabolites [J]. Journal of Industrial Microbiology, 1987, 2: 267–276.
- [77] 陈井生, 朱峰, 鲁旭鹏, 等. 南方根结线虫拮抗放线菌的分离、鉴定与杀线虫活性分析[J]. 中国蔬菜, 2015(4): 41–45.
- [78] 田阳, 李平, 张莉, 等. 海洋放线菌 MID14 代谢产物对几种重要植物寄生线虫的抑制作用[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 96–100.
- [79] PARK E J, JANG H J, PARK C S, et al. Evaluation of nematicidal activity of *Streptomyces yatusis* KRA-28 against *Meloidogyne incognita* [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2020, 30(5): 700–707.
- [80] 阿尔新, 旭格拉, 张金辉. 新疆高盐极端环境可培养放线菌的种群及其生物活性初步研究[J]. 环球中医药, 2013, 6(S1): 11–13.
- [81] 王波, 李红梅, 王碧, 等. 淡紫拟青霉与放线菌代谢物复配对南方根结线虫的防治[J]. 南京农业大学学报, 2009, 32(1): 55–60.
- [82] JIN Na, LU Xiuliang, WANG Xueyan, et al. The effect of combined application of *Streptomyces rubrogriseus* HDZ-9-47 with soil biofumigation on soil microbial and nematode communities [J/OL]. Scientific Reports, 2019, 9(1): 16886. DOI: 10.1038/s41598-019-52941-9.
- [83] ZHAO Ning, ZHU Li, LIU Meichen, et al. Enzyme-responsive lignin nanocarriers for triggered delivery of abamectin to control plant root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023, 71(8): 3790–3799.
- [84] 仕影, 陈景三, 于稳欠, 等. 农药对人体健康及生态环境的影响[J]. 安徽农业科学, 2022, 50(6): 53–59.