一株与类酵母共生菌拮抗的放线菌的筛选及其活性成分对褐飞虱的防治效果*

马 正** 林恒伊 李丑强 张永勇 俞晓平***

（浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室，中国计量大学生命科学学院，杭州 310018）

摘 要 【**目的**】为减少吡虫啉的使用，开发以褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 体内的类酵母共生菌（Yeast-like symbiontes，YLS）为靶标的杀菌剂，并与之配伍使用，以探索防治褐飞虱的一种可行策略。【**方法**】以季也蒙毕赤酵母 *Pichia guilliermondii* 为靶标菌，从土壤样品中筛选到一株对季也蒙毕赤酵母具有较强拮抗活性的放线菌，分离纯化其活性化合物并进行化合物结构解析，并通过单独或与吡虫啉配伍使用，研究其对褐飞虱的防治效果。【**结果**】经鉴定，该菌株命名为白色链霉菌 *Streptomyces albus* 2013；*S. albus* 2013 发酵液中主要的活性成分为四霉素 A（Tetramycin A）。褐飞虱取食分别用浓度为 500 mg/L 和 750 mg/L 的四霉素 A 喷施稻苗后，褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母的数量分别降低至 3.1 copies/L 和 1.2 copies/L，显著（$P<0.05$）低于对照组（4.5 copies/L）。将吡虫啉与不同浓度的四霉素 A 进行配伍使用后发现：与单独使用吡虫啉对照相比，10 mg/L 80%吡虫啉与浓度为 500 mg/L 和 750 mg/L 的四霉素 A 按 1∶1 等体积配伍，褐飞虱的死亡率均有所提高，分别为 50.3%和 59.4%。【**结论**】筛选的拮抗菌株 *S. albus* 2013 的活性成分四霉素 A 与吡虫啉配伍不仅能提高褐飞虱的防治效果，而且可降低吡虫啉的使用量。这一结果为研发新型褐飞虱生物防治策略提供了思路。

关键词 褐飞虱；白色链霉菌；四霉素 A；季也蒙毕赤酵母；吡虫啉

Screening an actinomycete antagonist against yeast-like symbiotics and the effect of its active ingredient on *Nilaparvata lugens*

MA Zheng** LIN Heng-Yi LI Chou-Qiang ZHANG Yong-Yong YU Xiao-Ping***

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract **[Objectives]** To reduce the use of imidacloprid by developing a bactericide that targets yeast-like symbiontes (YLS) in *Nilaparvata lugens* and is compatible with imidacloprid. **[Methods]** An antagonistic actinomycete was isolated from a soil sample using *Pichia guilliermondii* as the indicator strain and its active ingredient purified and analyzed. The effectiveness of the active ingredient for controlling *N. lugens*, both alone, and in combination with imidacloprid, was determined. **[Results]** The actinomycete, named *Streptomyces albus* 2013, displayed a high level of antagonistic activity against *P. guilliermondii*. The major bioactive ingredient of *S. albus* 2013 was identified as tetramycin A. Treating rice seedlings with 500 mg/L or 750 mg/L tetramycin A significantly reduced the number of *P. guilliermondii* in *N. lugens* feeding on these plants to 3.1 copies/L and 1.2 copies/L, respectively, compared to the control group which had 4.5 copies/L. The mortality rates of *N. lugens* treated with a mixture of 500 mg/L imidacloprid and 750 mg/L tetramycin A (1∶1, *v/v*), were 50.3% and 59.4% higher than that of those treated with the same concentration of imidacloprid alone. **[Conclusion]** A

*资助项目 Supported projects：浙江省自然科学基金（LY20C140006）

**第一作者 First author，E-mail：mazheng1227@cjlu.edu.cn

***通讯作者 Corresponding author，E-mail：yxp@cjlu.edu.cn

收稿日期 Received：2022-06-15；接受日期 Accepted：2022-08-19

combination of imidacloprid and tetramycin A isolated from a strain of *S. albus* 2013 not only increased mortality of *N. lugens* but also reduced imidacloprid usage. These findings provide a novel strategy for controlling *N. lugens*.

Key words　*Nilaparvata lugens*; *Streptomyces albus*; tetramycin A; *Pichia guilliermondii*; imidacloprid

褐飞虱 *Nilaparvata lugens* 是一种主要的水稻害虫，广泛分布于我国和东亚地区，它不仅能够通过刺吸汁液危害水稻，而且可以传播多种水稻病毒病，对水稻生产造成了严重威胁（Cheng *et al.*，2013；Wu *et al.*，2018；Qin *et al.*，2021）。目前对于褐飞虱的防治主要依赖喷施化学农药和种植抗性水稻品种，但由此引发了环境污染严重、褐飞虱抗药性增强、水稻抗虫性丧失和防治效果急剧下降等一系列问题（Liao *et al.*，2019；Tang *et al.*，2022）。吡虫啉作为防治褐飞虱的新烟碱类杀虫剂，杀虫效果好，但近年来随着吡虫啉的大量使用，褐飞虱对其抗药性水平逐渐提高（Sanada-Morimura *et al.*，2019；Fujii *et al.*，2020）同时也对环境造成了一定的影响。共生菌在昆虫进化过程中的扮演着重要角色，是昆虫特殊的“多功能器官”（Henry *et al.*，2015）。与一般刺吸式昆虫一样，褐飞虱体内也含有大量共生菌，主要分为共生真菌和共生细菌（申屠旭萍等，2021）。研究表明，丰富多样的共生菌与褐飞虱的生长、发育、繁殖、营养代谢和免疫等息息相关（Tang *et al.*，2010；Xue *et al.*，2014；Bao and Zhang，2019）。褐飞虱体内常见的共生菌有类酵母共生菌（Yeast-like symbiont，YLS）、杀雄菌属 *Arsenophonus*、沃尔巴克氏体 *Wolbachia* 等（申屠旭萍等，2021）。Tang 等（2021）用四环素和环丙沙星处理田间褐飞虱种群后，发现其对吡虫啉等杀虫剂敏感性显著增加，且褐飞虱体内共生细菌 *Arsenophonus* 和 *Acinetobacter* 的拷贝数均显著下降，表明褐飞虱的共生菌与褐飞虱的抗药性相关。Shentu 等（2016）通过将丰加霉素（Toyocamycin）、四烯菌素（Tetraenocin）等抗生素喷施稻苗供褐飞虱取食，发现其体内 YLS 数量显著下降，将这些抗生素与杀虫剂吡虫啉配伍使用，提高了褐飞虱的死亡率。此外，Shentu 等（2019）还以显微注射的方式将杀菌剂丙环唑注射入褐飞虱体内来探究其影响，发现丙环唑显著降低了 YLS 数量，导致褐飞虱死亡率大幅提升。以上研究结果表明：以褐飞虱共生菌为靶标，通过抑制其数量或活性是防治褐飞虱的有效策略。因此，筛选直接对褐飞虱共生菌具有抑制作用的活性化合物开发新药剂，为防治褐飞虱开辟新的路径（Acevedo *et al.*，2021）。

放线菌作为一种极为重要的微生物资源，在自然界中种类繁多、分布广泛，且具有强大的次级代谢系统，可产生大量具有生物活性的次级代谢产物，如，抗菌剂、杀虫剂、抗肿瘤药物和免疫调节剂等，在医药、农业等领域得到广泛应用（Barka *et al.*，2015；Jakubiec-Krzesniak *et al.*，2018）。因此，放线菌是生物合成天然活性化合物的重要来源，成为分离筛选天然活性化合物的首选研究对象（Genilloud，2017）。

本研究以褐飞虱体内的 YLS——季也蒙毕赤酵母 *Pichia guilliermondii* 为靶标菌，进行拮抗放线菌的筛选，并对其活性次级代谢产物进行分离提取、结构鉴定以及活性检测，通过单独使用、与吡虫啉配伍等方式，研究其对褐飞虱的防治效果。

1　材料与方法

1.1　供试土样

为了筛选到具有拮抗活性的放线菌，选择环境破坏较少的风景区或环境可能被影响的特殊地区进行土样采集。本研究选择浙江省杭州市和广西壮族自治区不同的生态环境中采集 7 份土壤样品。采集地点信息如表 1 所示。

1.2　褐飞虱虫源和共生菌菌株

褐飞虱采自杭州周边的稻田内，带回室内置于人工气候箱中饲养，饲养条件设置为温度：（26±1）℃，相对湿度：80%±5%，光照周期：16L：8D。季也蒙毕赤酵母由本实验室离体培养

表 1 土壤样品采集地点
Table 1 The collection sites of soil sample

编号 Serial no.	采样地点 Sampling site
H1	杭州市淳安县千岛湖风景区 Thousand Islet Lake, Chun'an County, Hangzhou
H2	杭州市杭州帝景化工厂周边 Around Hangzhou Dijing Chemical Factory, Hangzhou
H3	杭州市华东医药周边 Around Huadong Medicine, Hangzhou
H4	杭州市富春江周边 Around Fuchun River, Hangzhou
H5	杭州市汇丰农药厂 Huifeng Pesticide Factory, Hangzhou
G1	广西壮族自治区崇左板利乡白头叶猴保护区 White-headed Langur Reserve, Banli Township, Chongzuo, Guangxi Zhuang Autonomous Region
G2	广西壮族自治区靖西邦亮长臂猿猴保护区 Gibbon Monkey Reserve, Jingxi Bangliang, Guangxi Zhuang Autonomous Region

获得（朱杭峰，2020）。

1.3 培养基

放线菌富集培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基（PDB）（g/L）：马铃薯浸出粉 200.0 g，葡萄糖 20.0 g；

土壤分离培养基为改良高氏一号培养基（g/L）：KNO_3 1.0 g，KH_2PO_4 0.5 g，$MgSO_4$ 0.5 g，$FeSO_4$ 0.01 g，NaCl 0.5 g，可溶性淀粉 20.0 g，琼脂 15.0 g；

酵母培养为 YPD 培养基（g/L）：酵母提取物 10.0 g，蛋白胨 20.0 g，葡萄糖 20.0 g，琼脂 20.0 g；

种子培养基（g/L）：葡萄糖 5.0 g，酵母提取物 4.0 g，胰蛋白胨 3.0 g，NaCl 0.5 g，KH_2PO_4 1.0 g，$K_2HPO_4·3H_2O$ 1.5 g，$MgSO_4·6H_2O$ 0.5 g，$FeSO_4·7H_2O$ 0.01 g；

发酵培养基（g/L）：黄豆粉 20.0 g，甘露醇 20.0 g，$K_2HPO_4·3H_2O$ 0.06 g；

ISP2 培养基（g/L）：麦芽提取物 10.0 g，酵母提取物 4.0 g，葡萄糖 4.0 g，琼脂 20.0 g；

ISP3 培养基（g/L）：燕麦粉 20.0 g，$FeSO_4·7H_2O$ 0.001 g，$MnCl_2·4H_2O$ 0.001 g，$ZnSO_4·7H_2O$ 0.001 g，琼脂 18.0 g；

PDA 培养基（g/L）：马铃薯浸出粉 200.0 g，葡萄糖 20.0 g，琼脂 20 g；

MS 培养基（g/L）：黄豆粉 20.0 g，甘露醇 20.0 g，琼脂 20.0 g；

生理生化培养基为硝酸盐还原培养基、淀粉水解培养基、纤维素还原培养基、碳源利用培养基等，此类培养基配方参照文献（Williams *et al.*，1983）。

1.4 主要仪器

5-L 发酵罐：上海保兴生物设备有限公司；高效液相色谱系统（2998 PDA 光电二极管阵列检测器）：美国 Waters；Bruck Avance AV500 核磁共振仪：德国 Bruker 公司；质谱仪：Thermo Scientific™ LCQ Fleet™（电喷雾离子源 ESI、正负离子模式）；半制备液相色谱仪：岛津 6AD 半制备液相色谱仪；Develosil ODS-HG Column (10.0 mm×250 mm, 5 μm)）：日本大曹；XAD16 N 大孔树脂柱（直径×高=6 cm× 40 cm）：美国 Amberlite 公司；全自动凝胶成像分析系统：美国 Bio-Rad 公司。

1.5 主要试剂

乙腈、甲醇（色谱级）：美国 Tedia 公司；细菌基因组提取试剂盒、真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒、SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒、SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒：上海生工生物工程有限公司；pMD18-T 连接试剂盒、*EX Taq* DNA 聚合酶、Solution I 连接酶：宝生物工程（大连）有限公司。

1.6　杀虫剂

80%吡虫啉水分散粒剂购于拜尔杭州作物科学有限公司。

1.7　拮抗放线菌的筛选

将土样置于阴凉干燥处进行风干处理一周。然后将风干的土壤样品称取 5 g 置于研钵中磨碎，然后将其放入装有 50 mL PDB 液体培养基的锥形瓶中，同时将 10 颗已灭菌的玻璃珠置于其中，摇床 180 r/min、28 ℃振荡 2 h 得到土壤悬浊液。土壤悬液按梯度稀释得到稀释液，取 200 μL 分别涂布在含有放线菌酮（1×10^{-8} g/L）的改良高氏一号固体培养基上，置于 28 ℃培养箱中培养 4-5 d，然后挑选单菌落，划线于改良高氏一号培养基上纯化培养。纯化后的放线菌用 25%（v/v）甘油刮取孢子，- 70 ℃冻存备用。

以季也蒙毕赤酵母为指示菌进行拮抗放线菌复筛，将初筛所得放线菌置于 28 ℃条件下培养 7 d，用打孔器在培养好的放线菌培养皿上打孔取直径为 6.0 mm 的菌块，将其接种在涂有 150 μL 季也蒙毕赤酵母（1×10^5 CFU/L）的 YPD 培养基上，于 28 ℃培养 1 d，明确放线菌对季也蒙毕赤酵母的拮抗活性。

1.8　拮抗放线菌生理生化特性测定

根据《放线菌的分类与鉴定》（阎逊初，1992）对所筛目标拮抗放线菌的形态特征进行鉴定，将其分别接种于 ISP2、ISP3、PDA、改良高氏一号培养基、MS 培养基及 YPD 培养基上，在 28 ℃培养 7 d 观察并记录放线菌的形态特征和生长情况。

参照《链霉菌鉴定手册》（中国科学院微生物研究所放线菌分类组，1975）测定拮抗菌株的淀粉水解、明胶液化、牛奶凝固与胨化、纤维素水解、硝酸盐还原及硫化氢等生理生化特征。采用普戈二氏固体培养基（辜柳霜等，2019）测定菌株的碳源利用情况。

1.9　拮抗放线菌 16S rDNA 扩增及系统发育树的构建

提取拮抗菌株的基因组进行 16S rDNA 序列测定，采用通用引物 27F 和 1495R（Lu *et al.*，2016）进行 PCR 扩增，以 1%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带大小，将扩增产物送杭州擎科生物科技有限公司测序。将测序所得的 16S rDNA 序列在 NCBI 上进行 BLAST 比对，然后使用软件 MEGA 6.0 采取 Neighbor-Joining 算法构建系统发育树。

1.10　活性成分的分离提取与鉴定

1.10.1　目标菌株的发酵　将目标拮抗菌株的孢子液（1×10^5 CFU/L）以 2%（v/v）的接种量接种于种子培养基中，28 ℃、180 r/min、摇瓶培养 48 h，然后将此培养液按 4%（v/v）的接种量接种到 5-L 发酵罐的发酵培养基中进行发酵，发酵 96 h。

1.10.2　发酵液预处理　对多次发酵收集的 10 L 菌液进行预处理，5 000 r/min 离心 15 min 分离菌株上清液和菌丝体。一方面将发酵上清液过大孔树脂柱进行动态吸附，首先用 5 L 水洗脱，弃去水液，再用 5 L 100% 纯甲醇洗脱。40 ℃水浴，减压回收甲醇洗脱液，得发酵上清液提取物（5.3 g）；另一方面菌丝体则用 3 L 100% 纯甲醇超声提取 3 次，40 ℃水浴，真空减压回收甲醇，得菌丝体提取物（10.2 g）。液相分析两者所含主成分相似，则进行合并处理。将合并的粗提取物（15.7 g）于 40 ℃水浴真空浓缩至蒸干，然后经水混悬之后，继续上样于大孔树脂柱，先用 3 L 水洗脱，水液弃去之后，再分别用不同梯度（20%、40%、60%、80%和 100%）的甲醇各 2 L 洗脱，每 500 mL 为一流份，减压回收溶剂，共收集 20 个流份。然后根据 HPLC 分析结果合并各主成分相似的馏分，得到 8 个收集物（I-Ⅷ）。

以季也蒙毕赤酵母为活性跟踪指示菌，检测各部位的活性。发现部位Ⅷ（0.5 g）具有拮抗活性。然后用半制备液相色谱流动相：乙腈-水（35∶65），流速 5 mL/min，柱温 30 ℃）进行纯化，收集 23 min 时出现的主峰，得到一个活性化合物（15 mg），用此方法分离得到的活性物质纯度在 99%左右，4 ℃保存，备用。

1.10.3 活性成分的结构鉴定 本实验分离所得的活性单体化合物主要以核磁共振及质谱为主，以紫外吸收光谱（根据活性成分的出峰时间从 HPLC 图谱中获得）为辅助对单体化合物进行结构鉴定。称取纯度高的化合物 5 mg，加入 500 μL DMSO-d6 溶解，转入核磁小管，使用软件 MestReNova 14 进行核磁分析。

1.11 实时荧光定量 PCR 对褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母数量的测定

1.11.1 标准质粒的构建 利用真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒提取季也蒙毕赤酵母基因组 DNA，并以此为模板，以 305F 和 305R 为引物（侯云，2013）扩增目标片段，将扩增得到的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上，质粒浓度的测定参考 Whelan 等（2003）。

将标准质粒进行 10 倍梯度稀释，每个标准品稀释 6 个梯度，以稀释倍数的对数值为横坐标，循环阈值（Cycle threshold，C_t）为纵坐标，获得标准质粒的标准曲线。以季也蒙毕赤酵母基因组作为模板，扩增体系如下：SYBR Green mix 12.5 μL，模板 2 μL，引物各 0.5 μL，加 ddH_2O 补齐至 25 μL。反应程序为：94 ℃预变性 1 min，94 ℃变性 10 s，61 ℃退火 30 s，40 个循环。

1.11.2 实时荧光定量 PCR 测定褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母的数量 采用不同浓度的活性成分喷施稻苗供褐飞虱成虫取食，观察其致死率并利用实时荧光定量 PCR 技术分析季也蒙毕赤酵母在褐飞虱成虫体内的拷贝数，从而确定其在褐飞虱成虫体内的数量变化。实验在 18 mm×180 mm 玻璃试管中进行，每个试管放入 3 株处理过的稻苗，并放入 15 头褐飞虱成虫，用纱布封口，置于人工气候箱饲养。以喷洒清水为对照，每组 3 个生物学重复。

1.12 吡虫啉与活性成分的配伍使用对褐飞虱的影响

将吡虫啉与不同浓度的活性成分进行配伍，然后喷施稻苗供褐飞虱成虫取食，统计褐飞虱的死亡率，以相应浓度 80%吡虫啉为阳性对照，清水为阴性对照，具体实验方法同 1.11.2。计算吡虫啉、活性成分及混合配剂的 LC_{50}、置信区间、毒力回归方程及共毒系数。

$$毒力指数（TI）=\frac{标准药剂的LC_{50}}{供试药剂的LC_{50}}\times 100，$$

$$混合药剂的毒力指数(ATI)=\frac{标准药剂的LC_{50}}{混合药剂的LC_{50}}\times 100，$$

混剂理论毒力指数（*TTI*）=*TI*（a）×a 在混剂中所占比例+*TI*（b）×b 在混剂中所占比例；a：代表一种药剂，b：代表另一种药剂；

$$共毒系数（CTC）=\frac{混剂实际毒力指数ATI}{混剂理论毒力指数TTI}\times 100。$$

1.13 数据处理

褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母数量统计采用 Graphpad Prism 8 软件，死亡率数据统计采用 Microsoft Excel 2021 与 DPS v7.05 软件，不同组间采用单因素方差分析（One-way ANOVA），以 LSD 法进行多重比较分析差异显著性，$P<0.05$ 表示有显著差异，$P<0.01$ 表示具有极显著差异。所有数据均用平均数 ± 标准差表示。

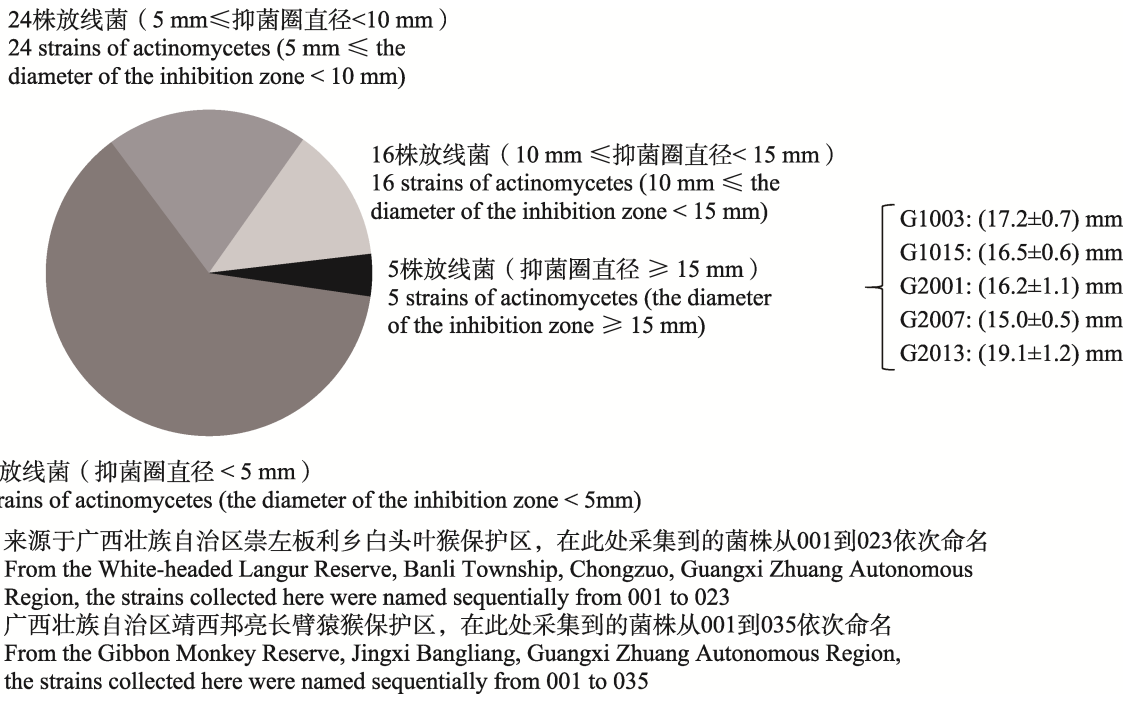
2 结果与分析

2.1 放线菌的分离与纯化及活性检测

从浙江省和广西壮族自治区不同的生态环境中采集的 7 份土壤样品中，共分离到 120 株放线菌。以季也蒙毕赤酵母为指示菌，进行拮抗菌株的复筛，发现一株来源于广西壮族自治区的 G2013 菌株对季也蒙毕赤酵母有较强的拮抗活性，其抑菌圈大小为（19.1±1.2）mm（图 1）。

2.2 拮抗放线菌 G2013 的鉴定

2.2.1 培养特征观察 将放线菌 G2013 在不同培养基上培养，结果发现在改良高氏一号、YPD、MS、PDA、ISP2 和 ISP3 培养基上放线菌 G2013 生长状态良好、产孢能力强，并且在所有培养基上均没有观察到可溶性色素的产生（图 2）。



G1：来源于广西壮族自治区崇左板利乡白头叶猴保护区，在此处采集到的菌株从001到023依次命名
From the White-headed Langur Reserve, Banli Township, Chongzuo, Guangxi Zhuang Autonomous Region, the strains collected here were named sequentially from 001 to 023

G2：广西壮族自治区靖西邦亮长臂猿猴保护区，在此处采集到的菌株从001到035依次命名
From the Gibbon Monkey Reserve, Jingxi Bangliang, Guangxi Zhuang Autonomous Region, the strains collected here were named sequentially from 001 to 035

图 1　对季也蒙毕赤酵母拮抗的放线菌的筛选

Fig. 1　Screening of actinomycete antagonisticagainst *Pichia guilliermondii*

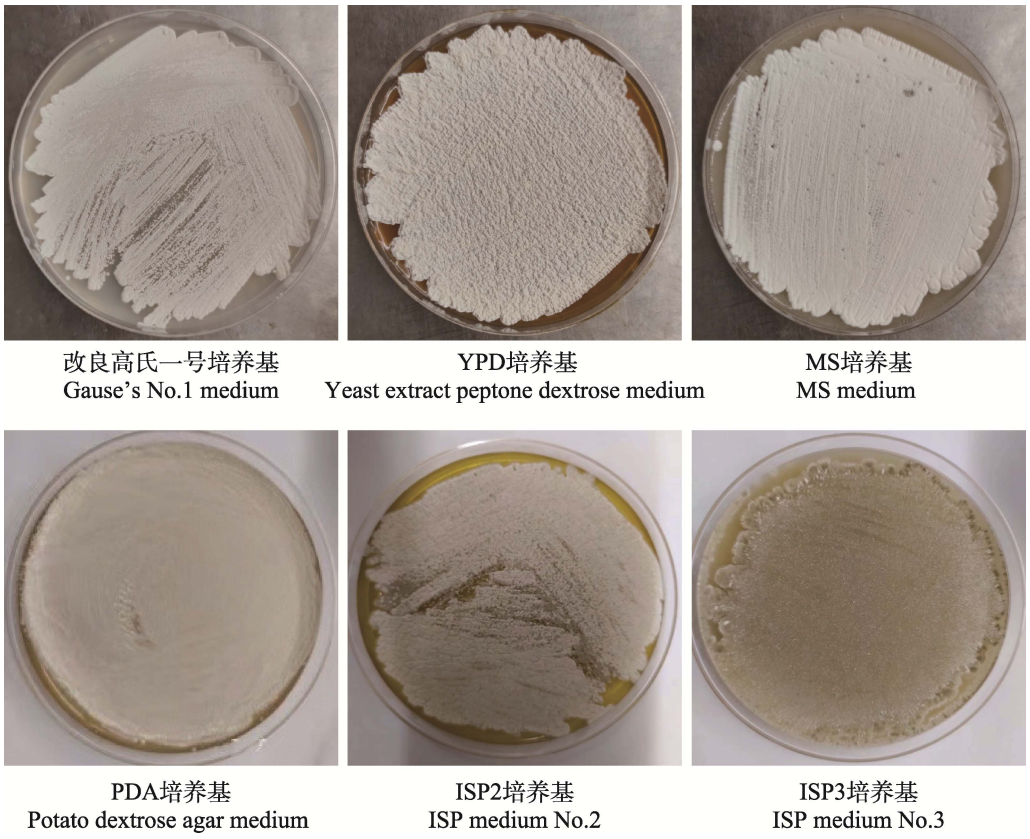


图 2　菌株 G2013 在不同培养基上生长情况

Fig. 2　Growth of strain G2013 on different media

2.2.2 生理生化特征 G2013 菌株的生理生化特性如表 2 所示，该菌株可以使明胶液化，不能将淀粉水解，对牛奶具有凝固作用并可以使其胨化，在纤维素上能够生长，具备将硝酸盐还原的能力，不能产硫化氢；菌株 G2013 能够利用 D-葡萄糖、D-果糖、D-木糖和 D-甘露醇，不能利用蔗糖、L-阿拉伯糖、鼠李糖和肌醇。

根据上述的培养特征观察及生理生化实验结果，参照《链霉菌鉴定手册》，表明该菌株具有链霉菌的生理生化特征。

2.2.3 系统发育学鉴定 菌株 G2013 的 16S rDNA 基因片段 PCR 扩增条带测得为 1 486 bp（图 3：A），序列上传至 NCBI（GenBank: No. OM995888）。将 GenBank 数据库中与菌株 G2013 同源性较高的放线菌进行比对分析，构建系统发育树（图 3：B）。从系统发育树可以看出，本次筛选得到拮抗菌株 G2013 与菌株 *Streptomyces albus* strain VSA37 归为一类。

经过生理生化特征观察以及 16S rDNA 序列分析，拮抗菌株 G2013 符合白色链霉菌 *Streptomyces albus* 的特征，因此，命名为 *Streptomyces albus* 2013，将其保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏编号为：CCTCC NO: M 2013269。

表 2 菌株 G2013 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical properties of strain G2013

项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results
D-葡萄糖 D-glucose	+	明胶化 Gelatin liquefaction	+
D-果糖 D-fructose	+	淀粉水解 Amylolysis	–
蔗糖 Sucrose	–	纤维素水解 Cellulase	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	–	牛奶凝固 Milk coagulation	+
D-木糖 D-xylose	+	硝酸盐还原 Nitrate reductase	+
鼠李糖 L-rhamnose	–	牛奶胨化 Milk peptonization	+
D-甘露醇 D-mannitol	+	硫化氢 Hydrogen sulfide	–
肌醇 Inositol	–		

+表示反应为阳性或能够利用；–表示反应为阴性或不能利用。

+ indicates that the reaction is positive or can be used; – indicates that the reaction is negative or cannot be used.

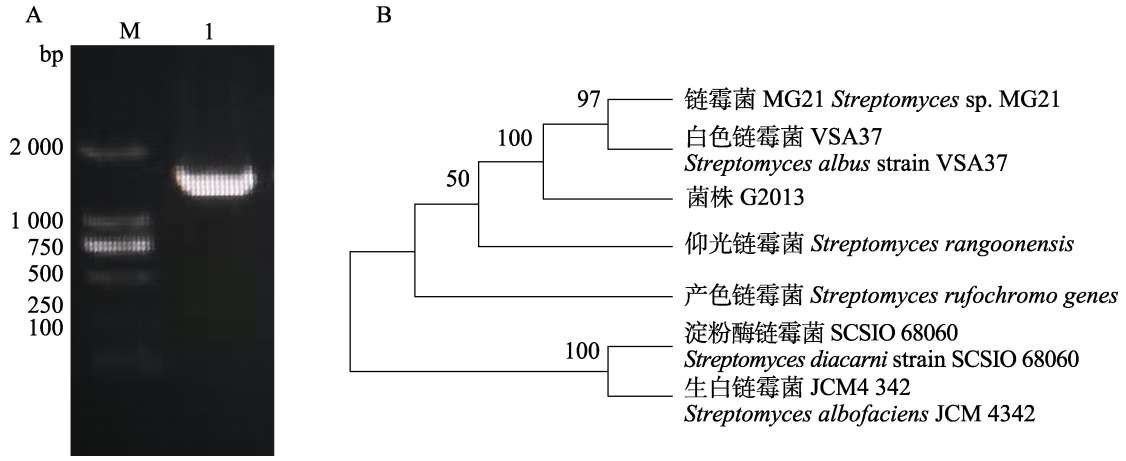


图 3 菌株 G2013 的 16S rDNA 鉴定及其系统发育树

Fig. 3 The identification of strain G2013 and its phylogenetic tree

A. 16S rDNA 扩增；B. G2013 菌株基于 16S rDNA 基因序列的系统发育树。

泳道 M: DL2000 marker；泳道 1：G2013 扩增。

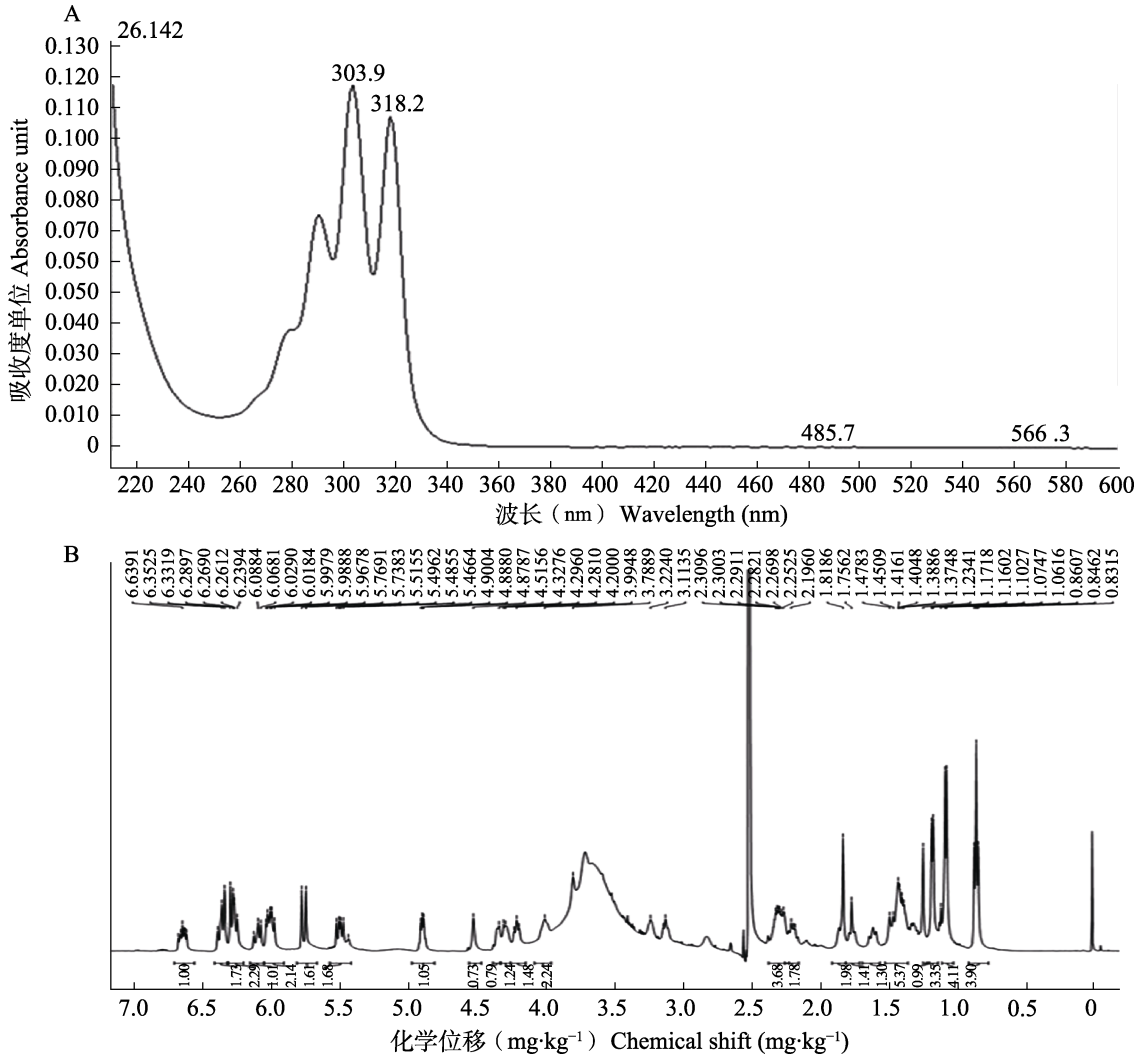
A. The amplification product of 16S rDNA of G2013 strain; B. Phylogenetic tree of G2013 strain based on 16S rDNA gene sequences. Lane M: DL 2000 markers; Lane 1: Amplicons of 16S rDNA of G2013 strain.

2.3　活性成分的结构鉴定

S. albus 2013 的发酵液中分离纯化的活性化合物为类白色粉末，易溶于甲醇、甘油、二甲基亚砜和吡啶，微溶于乙醚、氯仿和水。UV 吸收光谱显示其在 303.9 nm 和 318.2 nm 波长下紫外吸收最为明显，并且从图 4 中可观察到 303.9 nm 波长下该化合物显示最大紫外吸收峰，符合多烯类化合物呈现的紫外吸收特征（图 4：A）；根据质谱显示该化合物：*m/z*：695.78 $[M+H]^+$、1 390.9 $[2M+H]^+$、694.00$[M-H]^-$、1 388.93$[2M-H]^-$的准分子离子峰，可推测该化合物的分子量可能为 695；氢谱中，低场区有多个烯氢信号，高场区有 3 个甲基信号（图 4：B）；碳谱中低场区 123-146 mg · kg^{-1} 有 10 个烯碳信号，65-74 mg · kg^{-1} 为多个与氧相连的饱和碳信号（图 4：C），推测可能含有一个糖和数个连氧碳；DEPT 谱中 28-47 mg·kg^{-1} 含有多个亚甲基信号，高场区的 18.0、13.8 和 12.4 应为 3 个甲基碳信号（图 4：D），结合分子量和这些信号特征，与文献（张楠等，2011）数据对比，可确定该化合物为四霉素 A（Tetramycin A）（图 4：E）。

2.4　标准质粒的构建

按照 1.7.1 方法构建标准质粒并做标准曲线，构建的标准曲线的回归系数 R^2 = 0.999，扩增效率 *E* 在相应温度下在 95%-105%之间，属于理想范围（图 5：A）。熔解曲线为单一峰（图 5：B），表明引物特异性良好，可以准确地反映目标产物的扩增。这为实时荧光定量 PCR 定量分析褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母的数量奠定了基础。



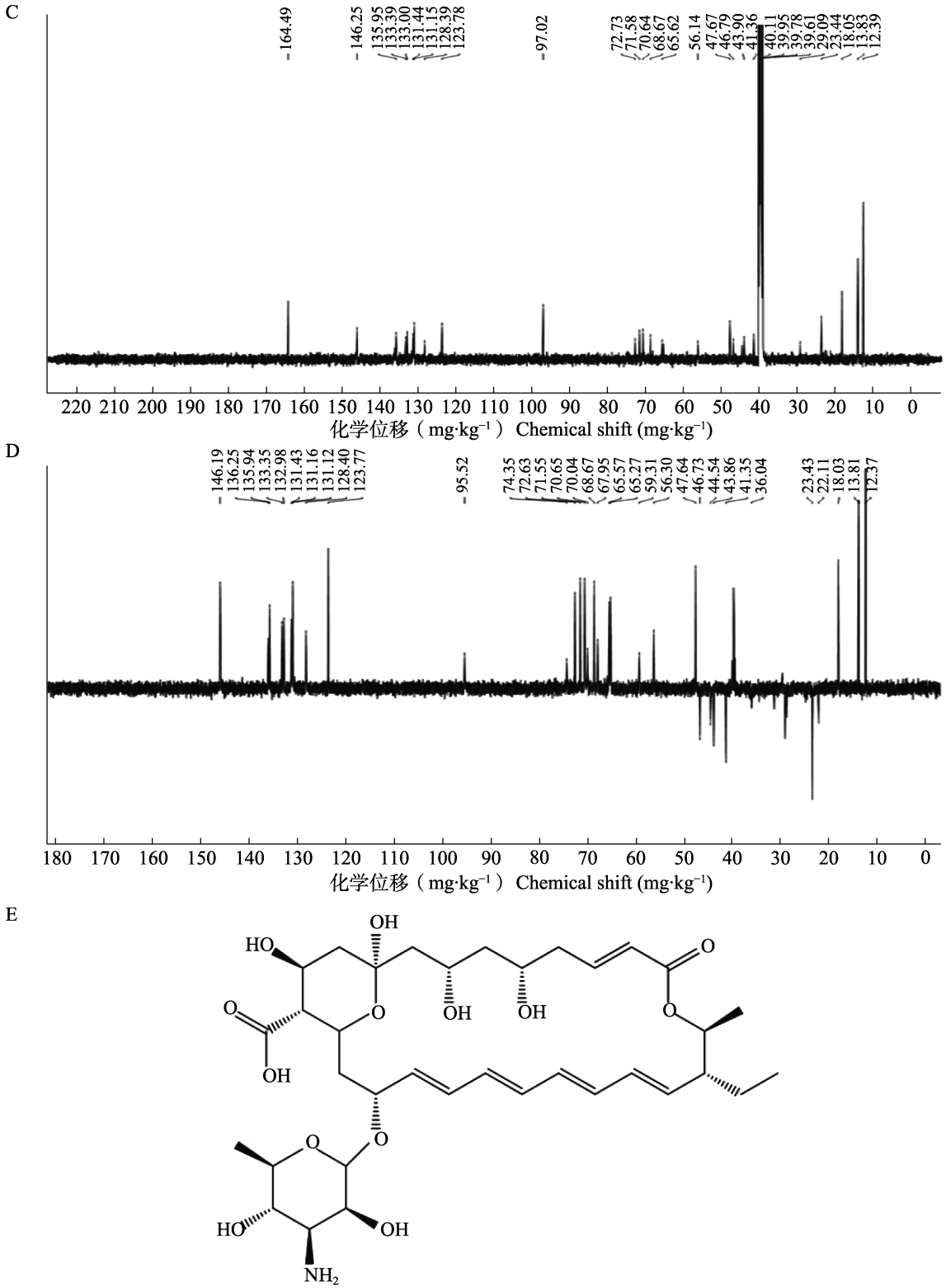


图 4　化合物的结构鉴定

Fig. 4　The structural identification of compound

A. 紫外吸收光谱；B. ^{1}H NMR (500 MHz)谱图；C. ^{13}C NMR (125 MHz)谱图；D. DEPT (125 MHz)谱图；E. 四霉素 A。

A. UV spectrum; B. ^{1}H NMR spectrum (500 MHz); C. ^{13}C NMR spectrum (125 MHz); D. DEPT NMR spectrum (125 MHz); E. Tetramycin A.

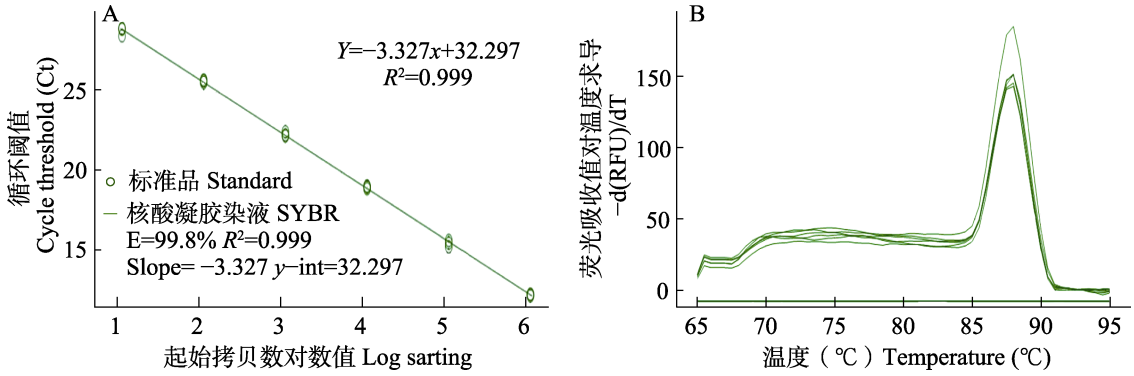


图 5　质粒标准曲线的构建

Fig. 5　The construction of plasmid standard curve

A. 质粒标准曲线；B. 荧光引物扩增熔解曲线。

A. The standard curve of plasmid; B. Amplification melting curve of fluorescent primer.

2.5　四霉素 A 对成虫褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母的影响

喷洒不同浓度四霉素 A 后褐飞虱体内的季也蒙毕赤酵母的实时荧光定量 PCR 测定结果如图 6 所示，根据原始拷贝数分析可知：250 mg/L 四霉素 A 处理过的褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母的数量没有显著性变化（$P > 0.05$）；500 mg/L 四霉素 A 处理过的褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母的数量（3.1 copies/L）显著低于（$P<0.05$）清水组（4.5 copies/L），提高四霉素 A 至 750 mg/L 时，季也蒙毕赤酵母拷贝数降至 1.2 copies/L。这表明喷洒一定浓度的四霉素 A 可以抑制褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母的生长。

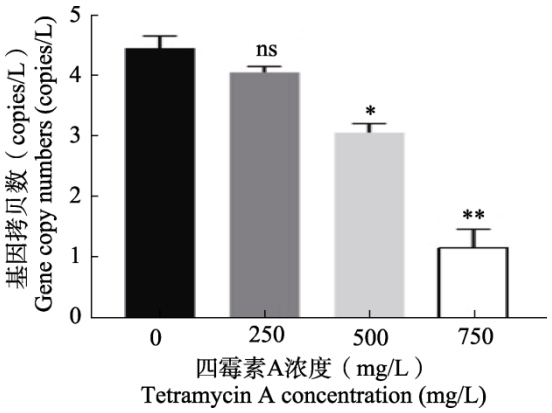


图 6　不同浓度四霉素 A 对褐飞虱体内季也蒙毕赤酵母数量的影响

Fig. 6　Effects of different concentrations of tetramycin A on the number of *Pichia guilliermondii* in *Nilaparvata lugens*

ns 表示无显著性差异；*表示具有显著性差异（$P<0.05$）；**表示具有极显著差异（$P<0.01$）。

ns indicates no significant difference; * indicates significant differences ($P<0.05$); ** indicates extremely significant differences ($P<0.01$).

2.6　四霉素 A 与吡虫啉配伍使用对褐飞虱的影响

吡虫啉与四霉素 A 配伍使用对褐飞虱的影响如表 3 所示：500 mg/L 和 750 mg/L 四霉素 A 处理的褐飞虱死亡率分别为 23.2%和 30.3%，与对照组的死亡率 10.0%相比，有显著性差异（$P<0.05$）。当 10 mg/L 80%吡虫啉与 500 mg/L 四霉素 A 以体积比 1∶1 配伍（终浓度为 5 mg/L 80%吡虫啉 + 250 mg/L 四霉素 A）喷施稻苗供褐飞虱取食后，褐飞虱的死亡率为 50.3%，比 5 mg/L 80%吡虫啉处理的死亡率（40.1%）提高了 10.2%，表明四霉素 A 与杀虫剂吡虫啉配伍使用对褐飞虱的防治效果有所提升。当 10 mg/L 80%吡虫啉与 750 mg/L 四霉素 A 以体积比 1∶1 配伍（终浓度为 5 mg/L 80%吡虫啉，375 mg/L 四霉素 A），褐飞虱的死亡率为 59.4%，与 10 mg/L 80%吡虫啉的死亡率 60.1%无显著性差异（$P>0.05$），表明 750 mg/L 四霉素 A 与吡虫啉配伍使用，可以用来代替部分吡虫啉的使用从而减少其用量。同时，研究发现 10 mg/L 80%吡虫啉分别与 500 mg/L 和 750 mg/L 四霉素 A 等体积配伍后，共毒系数均大于 120（表 4），说明两者混合均具有协同增效作用，同时验证了吡虫啉与四霉素 A 配伍的可行性。

表 3 杀虫剂吡虫啉与四霉素 A 配伍对褐飞虱的影响

Table 3 Effects of combined utilization of different concentrations of tetramycin A and imidacloprid on *Nilaparvata lugens*

农药处理 Pesticide treatments	死亡率（%） Mortality rate (%)
5 mg/L 80%吡虫啉 5 mg/L 80% imidacloprid	40.1±3.7aA
10 mg/L 80%吡虫啉 10 mg/L 80% imidacloprid	60.1±3.7bB
500 mg/L 四霉素 A 500 mg/L tetramycin A	23.2±4.0cC
750 mg/L 四霉素 A 750 mg/L tetramycin A	30.3±2.3aC
10 mg/L 80%吡虫啉+500 mg/L 四霉素 A（1：1 混配） 10 mg/L 80% imidacloprid mixed with 500 mg/L (1：1, v/v) tetramycin A	50.3±2.9dB
10 mg/L 80%吡虫啉+750 mg/L 四霉素 A（1：1 混配） 10 mg/L 80% imidacloprid mixed with 750 mg/L (1：1, v/v) tetramycin A	59.4±3.1bB
对照组 Control group	10.0±2.6dD

数据为平均值±标准差，数据后标有不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$，LSD 检验），数据后标有不同大写字母表示差异极显著（$P<0.01$，LSD 检验）。

Data are mean±SE, and followed by the different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$, LSD test), while followed by the different capital letters indicate extremely significant differences ($P<0.01$, LSD test).

表 4 吡虫啉与四霉素 A 对褐飞虱的联合毒力

Table 4 Combined virulence of imidacloprid and tetramycin A against *Nilaparvata lugens*

处理 Treatments	回归方程 Regressione quation	相关系数 Coefficient correlation (r)	LC_{50} (mg/L)	95%置信区间 95% confidence interval	共毒系数 *CTC*
80%吡虫啉 80% imidacloprid	$y=1.65x+3.4$	0.927 4	8.71	7.375-9.964	—
四霉素 A Tetramycin A	$y=2.50\times10^{-3}x+3.64$	1.291 2	1 483	1.420×10^{3}-1.530×10^{3}	—
10 mg/L 80%吡虫啉+500 mg/L 四霉素 A（1：1 等体积混配） 10 mg/L 80% imidacloprid mixed with 500 mg/L (1：1, v/v) tetramycin A	$y=1.67x+3.64$	0.920 3	6.31	5.124-7.648	274
10 mg/L 80%吡虫啉+750 mg/L 四霉素 A（1：1 混配） 10 mg/L 80% imidacloprid mixed with 700 mg/L (1：1, v/v) tetramycin A	$y=1.72x+3.81$	0.909 1	4.86	3.756-6.214	356

3 讨论

褐飞虱对水稻危害极大，吡虫啉等杀虫剂的大量使用，使褐飞虱逐渐产生了抗药性，防治效果减弱。因此，如何配伍和开发新剂型，以减少吡虫啉的使用，成为迫切需要解决的问题。由于褐飞虱体内 YLS 与其生长代谢及其致害性密切相关，通过 YLS 为靶标实现褐飞虱的防治成为了一种研究思路。围绕“抑菌防虫”这一思路，前人（Shentu *et al.*，2016，2019）也曾尝试通过体外注射抗生素、不同抗生素与杀虫剂混配等方式研究对褐飞虱的防治效果。但如何直接以某特定 YLS 为靶标，通过体外实验针对性的筛选对 YLS 有拮抗作用的活性化合物，并应用于褐飞虱的防治相关研究目前仍未见报道。本课题组前期通过多种分离培养策略，成功分离到了来自褐飞虱的 YLS——*P. guilliermondii* 季也蒙毕赤酵母，这为以此菌株为靶标开发配伍新剂型，提供新的

防治策略创造了条件。

由于放线菌具有合成生物活性化合物的巨大潜力，因此，本研究通过对季也蒙毕赤酵母具有拮抗活性的放线菌株的筛选，获得了具有较好拮抗活性的 *S. albus* 2013，并明确其主要的活性成分为四霉素 A。四霉素 A 是一种多烯大环内酯类抗生素，对真菌具有较强的拮抗作用，主要用于防治植物真菌病害，主要见于对水果病害等的防治（He *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022），如防治果树腐烂病、辣椒疫霉菌和斑点落叶病等的四霉素水剂（Ma *et al.*, 2017; He *et al.*, 2020）。本研究发现用喷洒四霉素 A 后的水稻苗喂食褐飞虱可有效降低其共生菌——季也蒙毕赤酵母的数量，并可与杀虫剂配伍使用，提高杀虫剂的防效，为利用害虫共生菌拮抗剂开辟害虫防治新途径提供了新的依据。

本文主要研究了四霉素 A 对一种 YLS 菌株——季也蒙毕赤酵母的影响，并没有测试对其他 YLS 菌株，尤其是优势菌株 *Noda* 菌的影响；筛选到的活性成分——四霉素 A 是一个已知化合物，今后可继续分离新型化合物或采用四霉素 A 同类化合物与吡虫啉或其他杀虫剂配伍的褐飞虱防治效果。

参考文献 (References)

Acevedo TS, Fricker GP, Garcia JR, Alcaide T, Berasategui A, Stoy KS, Gerardo NM, 2021. The importance of environmentally acquired bacterial symbionts for the squash bug (*Anasa tristis*), a significant agricultural pest. *Frontiers in Microbiology*, 12: 719112.

Actinomycete Classification Group, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, 1975. Handbook of *Streptomyces* Identification. Beijing: Science Press. 15–16. [中国科学院微生物研究所放线菌分类组, 1975. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社. 15–16.]

Bao YY, Zhang CX, 2019. Recent advances in molecular biology research of a rice pest, the brown planthopper. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(4): 716–728.

Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Meier-Kolthoff JP, Klenk HP, Clément C, Ouhdouch Y, van Wezel GP, 2015. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1): 1–43.

Cheng X, Zhu L, He G, 2013. Towards understanding of molecular interactions between rice and the brown planthopper. *Molecular Plant*, 6(3): 621–634.

Fujii T, Sanada-Morimura S, Oe T, Ide M, van Thanh D, van Chien H, van Tuong P, Loc PM, Cuong LQ, Liu ZW, Zhu ZR, Li JH, Wu G, Huang SH, Estoy GF Jr, Sonoda S, Matsumura M, 2020. Long-term field insecticide susceptibility data and laboratory experiments reveal evidence for cross resistance to other neonicotinoids in the imidacloprid-resistant brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, 76(2): 480–486.

Genilloud O, 2017. Actinomycetes: Still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports*, 34(10): 1203–1232.

Gu LS, Zhang YF, Zhang K, Li XY, Liu ZQ, 2019. Identification and antifungal activity of a biocontrol actinomycete strain SD-29 against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiology China*, 46(4): 770–779. [辜柳霜, 张月凤, 张凯, 李晓宇, 柳志强, 2019. 胶孢炭疽菌生防放线菌 SD-29 的鉴定及抗菌活性评价. 微生物学通报, 46(4): 770–779.]

He L, Li X, Gao Y, Li B, Mu W, Liu F, 2019. Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* spp. from different hosts in Shandong, China. *Plant Disease*, 103(1): 34–43.

He Y, Ding Y, Wu Q, Chen M, Zhao S, Zhang J, Wei X, Zhang Y, Bai J, Mo S, 2020. Identification of the potential biological preservative tetramycin a-producing strain and enhancing its production. *Frontiers in Microbiology*, 10: 2925.

Henry LM, Maiden MC, Ferrari J, Godfray HC, 2015. Insect life history and the evolution of bacterial mutualism. *Ecology Letters*, 18(6): 516–525.

Hou Y, 2013. Diversity of yeast-like symbiotes (YLS) in brown planthopper and its variation in different nymph periods and on different resistant rice. Master dissertation. Hangzhou: China Jiliang University. [侯云, 2013. 褐飞虱体内类酵母共生菌的多样性及其在不同虫龄和不同抗性水稻上的变化规律. 硕士学位论文. 杭州: 中国计量大学.]

Jakubiec-Krzesniak K, Rajnisz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J, 2018. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish Journal of Microbiology*, 67(3): 259–272.

Liao X, Mao KK, Ali E, Jin RH, Li Z, Li WH, Li JH, Wan H, 2019. Inheritance and fitness costs of sulfoxaflor resistance in *Nilaparvata lugens* (Stål). *Pest Management Science*, 75(11): 2981–2988.

Lu D, Ma Z, Xu X, Yu X, 2016. Isolation and identification of biocontrol agent *Streptomyces rimosus* M527 against *Fusarium*

oxysporum f. sp. *cucumerinum*. *Journal of Basic Microbiology*, 56(8): 929–933.

Ma D, Zhu J, He L, Cui K, Mu W, Liu F, 2018. Baseline sensitivity and control efficacy of tetramycin against *Phytophthora capsici* isolates in China. *Plant Disease*, 102(5): 863–868.

Qin Y, Xu P, Jin R, Li Z, Ma K, Wan H, Li J, 2021. Resistance of *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae) to triflumezopyrim: Inheritance and fitness costs. *Pest Management Science*, 77(12): 5566–5575.

Sanada-Morimura S, Fujii T, Chien HV, Cuong LQ, Estoy GF Jr, Matsumura M, 2019. Selection for imidacloprid resistance and mode of inheritance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest Management Science*, 75(8): 2271–2277.

Shentu XP, Li DT, Xu JF, She L, Yu XP, 2016. Effects of fungicides on the yeast-like symbiotes and their host, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 128: 16–21.

Shentu XP, Wang X, Xiao Y, Yu X, 2019. Effects of fungicide propiconazole on the yeast-like symbiotes in brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens* Stål) and its role in controlling BPH infestation. *Frontiers in Physiology*, 10: 89.

Shentu XP, Shi JT, Song Y, Yu XP, 2021. Research advances in the diversity of symbionts in the brown planthopper，*Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Acta Entomologica Sinica*，64(8): 998–1008. [申屠旭萍, 史嘉腾, 宋阳, 俞晓平, 2021. 褐飞虱体内共生菌多样性研究进展. 昆虫学报, 64(8): 998–1008.]

Tang B, Xu KK, Liu YK, Zhou ZS, Karthi S, Yang H, Li C, 2022. A review of physiological resistance to insecticide stress in *Nilaparvata lugens*. *3 Biotech*, 12(3): 84.

Tang M, Lv L, Jing S, Zhu L, He G, 2010. Bacterial symbionts of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(6): 1740–1745.

Tang T, Zhang YH, Cai TW, Deng XQ, Liu CY, Li JM, He S, Li JH, Wan H, 2021. Antibiotics increased host insecticide susceptibility via collapsed bacterial symbionts reducing detoxification metabolism in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Journal of Pest Science*, 94(3): 757–767.

Wang Q, Zhang C, Long Y, Wu X, Su Y, Lei Y, Ai Q, 2021. Bioactivity and control efficacy of the novel antibiotic tetramycin against various kiwifruit diseases. *Antibiotics* (*Basel*), 10(3): 289.

Whelan JA, Russell NB, Whelan MA, 2003. A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*, 278(1/2): 261–269.

Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EM, Sneath PH, Sackin MJ, 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology*, 129(6): 1743–1813.

Wu SF, Zeng B, Zheng C, Mu XC, Zhang Y, Hu J, Zhang S, Gao CF, Shen JL, 2018. The evolution of insecticide resistance in the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stål) of China in the period 2012-2016. *Scientific Reports*, 8(1): 4586.

Xue J, Zhou X, Zhang CX, Yu LL, Fan HW, Wang Z, Xu HJ, Xi Y, Zhu ZR, Zhou WW, Pan PL, Li BL, Colbourne JK, Noda H, Suetsugu Y, Kobayashi T, Zheng Y, Liu S, Zhang R, Liu Y, Luo YD, Fang DM, Chen Y, Zhan DL, Lv XD, Cai Y, Wang ZB, Huang HJ, Cheng RL, Zhang XC, Lou YH, Yu B, Zhuo JC, Ye YX, Zhang WQ, Shen ZC, Yang HM, Wang J, Wang J, Bao YY, Cheng JA, 2014. Genomes of the rice pest brown planthopper and its endosymbionts reveal complex complementary contributions for host adaptation. *Genome Biology*, 15(12): 521.

Yan XC, 1992. Classification and Identification of Actinomycetes. Beijing: Science Press. 413–414. [阎逊初, 1992. 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社. 413–414.]

Zhang C, Li H, Wu X, Su Y, Long Y, 2022. Co-application of tetramycin and chitosan in controlling leaf spot disease of kiwifruit and enhancing its resistance, photosynthesis, quality and amino acids. *Biomolecules*, 12(4): 500.

Zhang N, Zhang CP, Song Z, Guo H, Zhang BF, QIU NQ, Liu XL, 2011. Isolation, purification and structural identification of antifungal active substances produced by *Streptomyces hygroscopicus* BS-112. *Acta Microbiologica Sinica*, 51(2): 224–232. [张楠, 孙长坡, 宋振, 国辉, 张本峰, 仇念全, 刘训理, 2011. 吸水链霉菌 BS-112 产生的抗真菌活性物质的分离纯化与结构鉴别. 微生物学报, 51(2): 224–232.]

Zhu HF, 2020. Differential immune responses of brown planthopper against its symbiotic and pathogenic fungi and functional analysis of an immunoregulator *Nlserpin4*. Master dissertation. Hangzhou: China Jiliang University. [朱杭峰, 2020. 褐飞虱对共生真菌和病原真菌差异性免疫响应特征及免疫调控因子 *Nlserpin4* 的功能分析. 硕士学位论文. 杭州: 中国计量大学.]