

对玉米螟具有生物活性的海洋放线菌筛选与鉴定

刘志航, 袁忠林, 罗 兰

(青岛农业大学农学与植物保护学院/山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘 要: 通过平板稀释法对来自青岛不同地区的海洋样品进行分离, 共得到 18 株海洋放线菌。采用浸虫法测定海洋放线菌发酵液对玉米螟 2 龄幼虫的室内毒力, 筛选得到 2 株活性较高的菌株 YC3 和 SLR3, 其 48 h 发酵液对玉米螟 2 龄幼虫的校正死亡率分别为 86.21% 和 81.04%。根据形态特征、培养特征及生理生化性状将活性菌株鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*)。

关键词: 玉米; 放线菌; 发酵液; 玉米螟

中国分类号: S435.131

文献标识码: A

Screening and Identification of Marine Actinomycetes with Bioactive for Asian Corn Borer(*Ostrinia furnacalis* G.)

LIU Zhi-hang, YUAN Zhong-lin, LUO Lan

(College of Agronomy and Plant Protection of Qingdao Agricultural University/

Key Lab of Integrated Crop Pest Management of Shandong Province, Qingdao 266109, China)

Abstract: Eighteen strain marine actinomycetes were isolated from sea samples of Qingdao different regions by using dilution-plate method. Toxicities of fermentation broth from these marine actinomycetes were assayed against 2 instar larvae of Asian corn borer by insect immersion bioassay method, and two strains had insecticidal activities for *Ostrinia furnacalis* G. The corrected mortality rates were 86.21% and 81.04% respectively in 48 h after treatment with supernatant from fermentation broth of YC3 and SLR3. The morphological and cultural characteristics, physiological and biochemical properties showed two strains were *Streptomyces*.

Key words: Maize; Actinomycetes; Fermentation broth; *Ostrinia furnacalis* G.

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Guenée) 俗名钻心虫, 属鳞翅目螟蛾科, 是我国玉米生产上的重要害虫之一, 严重影响玉米产量和质量。一般年份可造成减产 10%, 严重时减产 30% 以上, 玉米螟除危害玉米外, 还危害棉花等^[1,2]。目前对于玉米螟的防治技术包括抗螟育种、化学防治、生物防治、物理防治、农业

防治等^[3~5]。化学防治作为一种主要措施, 在玉米螟的防治中一直发挥重要的作用^[6,7], 因其防治效果好、作用快等优点成为防治玉米螟的主要手段, 但是大量不科学地使用化学农药出现了农药残留、环境污染以及人畜中毒等问题, 所以研究开发、筛选高效、低毒、低残留的农药新品种尤为重要。

海洋放线菌由于其独特生存环境, 易于产生结构新颖的活性物质, 拥有巨大的研究价值和潜能, 因此成为发现新药的热点和重点^[8~10]。从海洋放线菌分离出一些新活性物质, 主要有大环内酯、小环内酯、生物碱、醌类和酰胺类等抗生素类, 这些活性物质在医药方面具有潜在的应用价值。农用海洋放线菌的研究远不及医药方面, 徐守健等人采用浸虫法测定海洋微生物发酵液对小菜蛾 2~3 龄幼虫的杀虫活性, 筛选出 7 株具有活性的海洋微生物^[11]。胡志钰运用卤虫生物检测发现有 7 株杀线虫活性达 90% 以上海洋放线菌^[12]。因此, 从放线菌中筛选杀

收稿日期: 2014-6-12

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划(201210435002)、“十二五”农村领域国家科技计划课题(BAD19B04-09)、山东省高等学校青年骨干教师国内访问学者项目、山东省“泰山学者”建设工程专项、青岛农业大学第六届大学生创新教育立项经费

作者简介: 刘志航(1990-), 男, 山东日照人, 主要从事生物农药研究。罗 兰为本文通讯作者。

E-mail: luolanchinese@163.com

致谢青岛农业大学实验中心胡春辉老师在电镜观察中给予帮助。

虫活性物质,对于开发新型杀虫剂具有积极意义。本文从青岛不同海域采集样品,分离纯化海洋放线菌,筛选出对玉米螟具有生物活性的海洋放线菌,通过形态观察与生理生化测定,对菌株进行分类鉴定,为更好地开发青岛周边及其他周边海域的海洋微生物资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 海洋样品收集与培养基

分别从青岛五四广场、奥帆中心、第一海水浴场、青岛栈桥、石老人景点的附近海域采集海水、海沙和海洋漂浮物等。放线菌分离采用海水高氏培养基,放线菌培养采用改良的海水高氏一号培养基,发酵所用培养液为黄豆粉发酵培养基^[13]。

1.2 供试试虫

亚洲玉米螟(*O. furnacalis*)来自山东省农业科学院植物保护所。以人工饲料进行连续饲养,饲养温度为26℃~28℃,光照为16:8(L:D),相对湿度为(75±5)%^[14~16]。人工饲养2~3代后,挑选体长一致和健康的2龄幼虫进行杀虫活性测定。

1.3 放线菌分离与待测样品的制备

放线菌的分离:采用稀释涂布平皿法进行放线菌的分离,分别取海洋样品用灭菌的海水配成10⁻¹、10⁻²和10⁻³稀释液,于摇床中200 r/min,30 min。取出静置30 min,分别取0.5 mL上清液在海水高氏平板上涂布,28℃培养5~7 d观察菌落的生长状况,挑出疑似放线菌的菌落接于改良的海水高氏一号平板上,反复划线纯化、冷藏保存。

待测样品的制备:将纯化的放线菌接种到海水高氏一号培养基上,28℃培养5 d,然后用直径4 mm打孔器打取菌块接种于装有50 mL液体培养液的250 mL锥形瓶中,3块/瓶。28℃,160 r/min发酵5 d。发酵液经10 000 r/min,15 min离心,取上清液,5℃保储备用。

1.4 杀虫活性的测定方法

1.4.1 初筛

采用浸虫法进行生物测定^[17],将大小基本一致的玉米螟2龄幼虫浸入待测液中5~10 s,用滤纸吸取多余的药液后转移到含有人工饲料培养皿中正常饲养,每组处理玉米螟15头,重复4次,以空白发酵液和清水作对照,48 h后调查死亡结果,虫体活动迟缓或完全死亡的个体视为死亡个体,空白对照的试虫死亡率控制20%以内^[18]。死亡率及校正死亡率的计算公式如下:

$$\text{死亡率}=\text{死亡虫数}/\text{供试总虫数}\times 100\%;$$

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

1.4.2 复筛

对复筛中校正死亡率达50%以上的菌株发酵上清液分别稀释2、4、8、16和32倍,观察其杀虫活性情况,重复6次,供试虫数为90头,方法同1.4.1。

1.5 菌株的初步鉴定

形态观察:利用插片法对具有活性的2菌株进行形态观察^[19,20],将灭菌盖玻片以45度斜插在待观察菌培养基中,28℃培养5~7 d后,取出盖玻片,在显微镜下直接观察;同时,选择菌丝生长疏密适中、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。培养和生理生化试验采用常规鉴定方法进行^[21]。

2 结果与分析

2.1 海洋放线菌的分离

2013年5~9月从青岛附近海域5个点共采集海洋样品15份,包括海水、海藻和海沙等。采用平板稀释法进行分离纯化,共获得18株菌落形态有差异的海洋放线菌,其中,五四广场附近海域7株、青岛奥帆中心2株、第一海水浴场4株、青岛栈桥2株、石老人3株(表1)。

表1 青岛海域放线菌分离
Table 1 The separation results of actinomycetes from Qingdao coasts

采集地点 Place	分离放线菌 Actinomycetes	菌株编号 Strain code
五四广场附近海域	3	GC1~GC3
	4	WS1~WS4
青岛奥帆中心附近海域	2	AF1~AF2
青岛第一海水浴场	4	YC1~YC4
青岛栈桥海域	2	ZQ1~ZQ2
石老人附近海域	3	SLR1~SLR3

2.2 杀虫活性菌株的筛选

采用浸虫法测定18株海洋放线菌的发酵上清液对玉米螟2龄幼虫的杀虫活性,获得2株具有较强杀虫活性的菌株,其校正死亡率在80%以上(表2)。通过杀虫活性复筛,发现菌株YC3和SLR3的发酵上清液杀虫活性较好,YC3发酵上清液稀释16倍后,48 h校正死亡率为51.72%;SLR3发酵上清液稀释8倍后,48 h校正死亡率为55.17%(表3)。

表2 海洋放线菌发酵液杀虫活性测定

Table 2 Insecticidal activity of fermentation liquid of marine actinomycetes

菌株编号	试虫数(个)	死亡数(个)	死亡率(%)	校正死亡率(%)	活性排序
Strain code	Test insect number	Mortality	Mortality rate	Corrected mortality rate	Sort
ZQ2	60	26	43.33	41.38	5
YC1	60	24	40.00	37.93	6
ZQ1	60	29	48.33	46.55	3
YC4	60	18	30.00	27.59	11
YC3	60	52	86.67	86.21	1
SLR2	60	14	23.33	20.69	14
SLR3	60	49	81.67	81.04	2
SLR1	60	22	36.67	34.48	9
YC5	60	24	40.00	37.93	6
YC2	60	20	33.33	31.03	10
WS1	60	16	26.67	24.14	13
WS2	60	10	16.67	13.79	18
WS3	60	12	20.00	17.24	16
WS4	60	24	40.00	37.93	6
AF1	60	14	23.33	20.69	14
GC1	60	18	30.00	27.59	11
GC2	60	12	20.00	17.24	16
GC3	60	27	45.00	43.10	4
CK	60	2	3.33	--	--

表3 菌种发酵液稀释后活性测定

Table 3 Insecticidal activity of fermentation liquid of strains

菌株编号	稀释倍数	试虫数(个)	死亡数(个)	死亡率(%)	校正死亡率(%)
Strain code	Dilution multiple	Test insect number	Mortality	Mortality rate	Corrected mortality rate
YC3	2	90	75	83.33	82.76
	4	90	69	76.67	75.86
	8	90	57	63.33	62.07
	16	90	48	53.33	51.72
	32	90	33	36.67	34.48
SLR3	2	90	69	76.67	75.86
	4	90	63	70.00	68.97
	8	90	51	56.67	55.17
	16	90	39	43.33	41.38
	32	90	21	23.33	20.69
CK	--	90	3	3.33	--

2.3 活性菌株的初步鉴定

2.3.1 形态和培养特征

菌株 YC3 在海水高氏一号培养基上生长良好,在培养基上最初菌落为白色,逐渐变为粉红色、凸起,营养菌丝能够在培养基内产生红色的基内色素;在察氏培养基上,菌落为白色、平坦,周围绒毛状;在马铃薯琼脂培养基上,菌落初为白色,后期为红色或粉红色,菌落凸起,有褶皱,上有白色绒毛状物;在葡

萄糖酵母膏培养基上,菌落为红褐色,中间凸起,有褶皱,周围放射状。电镜下菌株 YC3 的菌丝产生链状孢子,孢子表面粗糙(图 1)。

菌株 SLR3 在海水高氏一号培养基上,初期菌落为灰白色,有褶皱、凸起,后期产生的基内色素为红褐色,边缘放射状,周围波纹状;在察氏培养基上,菌落前期白色,后期黄白色,菌落较平坦,上有白色绒毛状物;在马铃薯琼脂培养基上,菌落淡黄色或黄

色、凸起,周围放射状;在葡萄糖酵母膏培养基上,菌落黄色或淡黄色,菌落平坦,上有黄色粉状物。电镜下SLR3菌丝产生链状孢子,孢子表面粗糙,有皱褶(图2)。

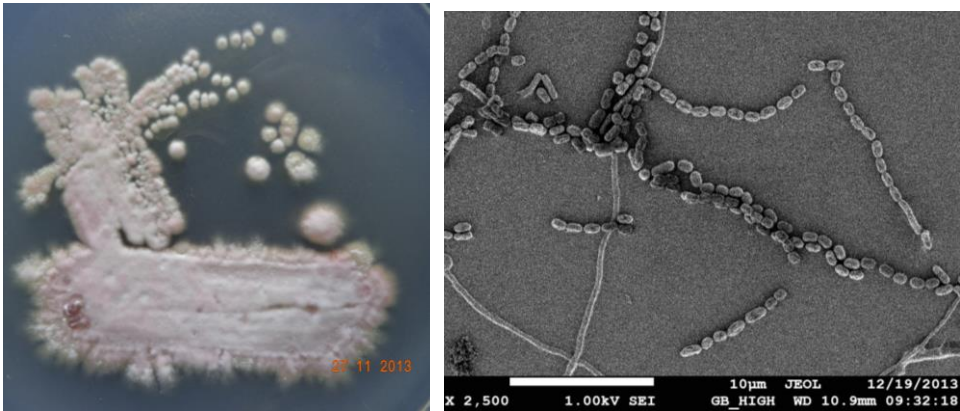


图1 YC3的菌落形态图与电镜扫描图
Fig.1 Colony morphology and scanning electron micrograph of strain YC3

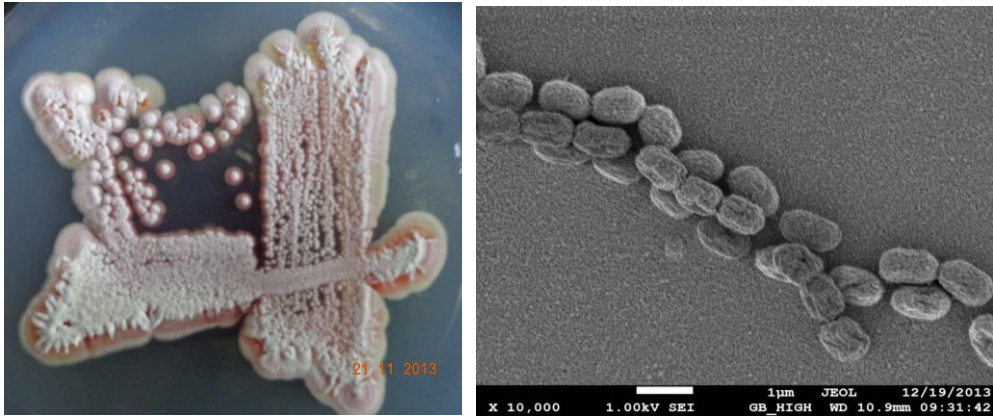


图2 SLR3的菌落形态图与电镜扫描图
Fig.2 Colony morphology and scanning electron micrograph of strain SLR3

2.3.2 生理生化特征

由表3可知,菌株YC3能水解淀粉,能产生过氧化氢酶,能产生硫化氢,不能使明胶液化,不产生纤维素酶;菌株SLR3能水解淀粉,能产生过氧化氢酶,不能使明胶液化,不产生纤维素酶,不产生硫化氢。

依据上述试验得到的2菌株的形态特征、培养特征和生理生化测定结果,参照放线菌鉴定的相关文献^[19~21],菌株YC3和SLR3应归为链霉菌属(*Streptomyces*)。

表4 菌株的生理生化测定
Table 4 Determination of physiological and biochemical of 2 strains

菌株编号 Strain code	淀粉水解酶 Starch hydrolysis	明胶液化 Gelatin liquefaction	纤维素酶 Cellulase	过氧化氢酶 Katalase	硫化氢产生 Hydrogen sulfide produced
YC3	+	-	-	+	+
SLR3	+	-	-	+	-

3 结论与讨论

随着化学农药问题的出现,生物农药特别是微生物农药越来越受到重视。海洋放线菌是新药开发

和天然活性产物的重要来源。本文以玉米螟2龄幼虫为靶标害虫,采用浸虫法对海洋放线菌发酵液的杀虫活性进行生物测定,从而得到对玉米螟具有生物活性的菌株YC3和SLR3,并且通过形态观察与生

理生化特征的测定,初步鉴定将菌株YC3和SLR3归类于链霉菌属(*Streptomyces*)。

对于放线菌杀虫活性的测定方法有多种,主要有卤虫测定法、浸渍叶碟饲喂法、触杀法和利用双层琼脂扩散等方法,在细胞培养板或者其他实验设备上培养或者直接作用于害虫的卵,来测定发酵液的杀虫杀卵活性。本试验由于供试虫体为玉米螟2龄幼虫,个体比较大,实验操作较方便,结果易检查,因此采用浸虫法,把处理后的玉米螟2龄幼虫放置在条件适宜的培养箱内,48 h后观察其死亡情况,该试验操作简单,切近实际,结果直观且明显,在实际上更加具有操作性和经济节约。

放线菌的筛选是微生物农药研究的前提和基础。本研究仅从海洋中筛选的放线菌YC3和SLR3菌株发酵上清液杀虫(玉米螟)活性进行测定,其活性成分及作用机理等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 仵均祥主编. 农业昆虫学(北方本)[M]. 北京:中国农业出版社.
- [2] 周大荣,何康来. 玉米螟综合防治技术[M]. 北京:金盾出版社, 1995.
- [3] 王振营,鲁新,何康来,等. 我国研究亚洲玉米螟历史、现状与展望[J]. 沈阳农业大学学报, 2000, 31(5): 402-412.
Wang Z Y, Lu X, He K L, et al. Review of history, present situation and prospect of the Asian maize borer research in China[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2000, 31(5): 402-412. (in Chinese)
- [4] 李丽娟,鲁新,周淑香,等. 玉米种植密度对玉米螟发生及赤眼蜂寄生的影响[J]. 玉米科学, 2013, (6): 127-130.
Li L J, Lu X, Zhou S X, et al. Effects of maize planting density on occurrence of Asian corn borer and *Trichogramma* parasitism[J]. Journal of Maize Sciences, 2013, (6): 127-130. (in Chinese)
- [5] 张海燕,王丽艳,程晓娟,等. 黑龙江不同积温带玉米品种抗螟性分析[J]. 玉米科学, 2013, (4): 24-126, 131.
Zhang H Y, Wang L Y, Cheng X J, et al. Maize resistance to corn borer in different temperature zones of Heilongjiang province[J]. Journal of Maize Sciences, 2013, (4): 124-126, 131. (in Chinese)
- [6] 罗兰,于毅,袁忠林,等. 玉米螟杀虫剂的室内筛选[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(31): 12326-12327, 12341.
Luo L, Yu Y, Yuan Z L, et al. Screening insecticide to control Asian corn borer(*Ostrinia furnacalis* G.)[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(31): 12326-12327, 12341. (in Chinese)
- [7] 鲁新,刘宏伟,丁岩,等. 吉林省玉米螟的化性类型与其主要特性的关系[J]. 玉米科学, 2010, 18(5): 118-121.
Lu X, Liu H W, Ding Y, et al. The relationship between voltinism types and main characters of Asian corn borer in Jilin province[J]. Journal of Maize Sciences, 2010, 18(5): 118-121. (in Chinese)
- [8] 宗志友,魏刚,斯聪聪,等. 海洋放线菌活性代谢产物的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(7): 3808-3810.
Zong Z Y, Wei G, Si C C, et al. Research progress of active metabolite of marine actinomycetes[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(7): 3808-3810. (in Chinese)
- [9] 王淑霞,朱天骄,卢圳域,等. 海洋新放线菌及其次级代谢产物研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2007, 32(9): 513-519.
Wang S X, Zhu T J, Lu Z Y, et al. Recent progress in the discovery of new marine-derived actinomycetes and their secondary metabolites[J]. Chinese Journal of Antibiotic, 2007, 32(9): 513-519. (in Chinese)
- [10] 许兰兰,黄曦,黄蔗识,等. 来源于海洋真菌的农用抗生素的研究进展[J]. 农药, 2009, 48(10): 703-707.
Xu L L, Huang X, Huang S S, et al. The research process in farm antibiotics from marine fungus[J]. Agrochemicals, 2009, 48(10): 703-707. (in Chinese)
- [11] 徐守健,张久明,田黎,等. 海洋微生物杀虫活性筛选方法比较[J]. 华东昆虫学报, 2006, 15(1): 70-74.
Xu S J, Zhang J M, Tian L, et al. Comparison on the screening methods of insecticidal activity for marine micro-organisms[J]. Entomological Journal of East China 2006, 15(1): 70-74. (in Chinese)
- [12] 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.
Hu Z Y, Liu S Z, Huang H, et al. A rapid screening assay for insecticidal antibiotic produced by marine actinomycetes[J]. Marine Science Bulletin, 2000, 19(4): 36-41. (in Chinese)
- [13] 潘云娣,杨文鸽,候温甫,等. 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, 25(4): 92-96.
Pan Y D, Yang W G, Hou W P, et al. Screening and identifying of marine actinomycetes producing substance with insecticidal activity[J]. Marine Science Bulletin, 2006, 25(4): 92-96. (in Chinese)
- [14] 宋彦英,周大荣,何康来. 亚洲玉米螟无琼脂半人工饲料的研究与应用[J]. 植物保护学报, 1999, 26(4): 324-328.
Song Y Y, Zhou D R, He K L. Studies on mass rearing of Asian corn borer: Development of a satisfactory non-agar semi-artificial diet and its use[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 1999, 26(4): 324-328. (in Chinese)
- [15] 乔利,李怡萍,成卫宁. 亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* (Gueenee)人工饲养技术研究进展[J]. 陕西农业科学, 2007(4): 11-13.
Qiao L, Li Y P, Cheng W N. Aspect on the artificial rearing techniques in *Ostrinia furnacalis*[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences[J]. 2007(4): 11-13. (in Chinese)
- [16] 乔利,潘兹亮,卢兆成,等. 单头饲养与群体饲养对亚洲玉米螟生长发育与繁殖的影响[J]. 西北农业学报, 2011, 20(10): 204-206.
Qiao L, Pan Z L, Lu Z C, et al. Growth Development and Reproduction of the *Ostrinia furnacalis*(Guenee) under Single Raising and Group Raising[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2011, 20(10): 204-206. (in Chinese)
- [17] NY/T 1154.6-2006, 农药室内生物测定试验准则(杀虫剂第6部分): 活性试验浸虫法[S]. 2006-07-10.
- [18] 孙家隆,慕卫. 农药学实验技术与指导[M]. 北京:化学工业出版社, 2009.
- [19] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京:科学出版社, 1992.
- [20] 徐丽华,李文均,刘志恒,等. 放线菌系统学-原理、方法及实践[M]. 北京:科学出版社, 2007.
- [21] 阮继生,黄英编著. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京:科学出版社, 2011.

(责任编辑:姜媛媛)