

DOI: 10.16210/j.cnki.1007-7561.2020.06.029

生物农药多杀菌素及其结构类似物的研究进展

张逍遥^{1,2}, 郭超¹, 刘艳丽², 张鑫^{1,2}, 王超¹✉

(1. 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037;
2. 北京城市学院 生物医药学部, 北京 100083)

摘要: 在日益重视环保的今天, 生物农药因其易降解、低残留、低污染、高安全性以及病虫害不易产生抗性等优点已成为世界各国农药学家研究的热点, 将引领农药开发新趋势。多杀菌素及其结构类似物作为新型绿色生物农药, 其特殊的化学结构决定了独特的作用机理, 同时具有生物农药的安全性和化学农药的速效性。在防治农林害虫、储粮害虫、卫生害虫以及牲畜寄生虫上发挥重要作用。通过比较多杀菌素及其结构类似物的理化特性, 总结其理化诱变、分子改造、产品研发与应用以及抗性研究等方面的进展, 分析生物农药推广的现状和存在问题, 提出解决思路, 并对其发展前景进行展望。

关键词: 生物农药; 多杀菌素; 丁烯基多杀菌素; 乙基多杀菌素

中图分类号: TS201.2; S482.3 文献标识码: A 文章编号: 1007-7561(2020)06-0209-09

Research Progress on the Biopesticide Spinosyns and Their Analogues

ZHANG Xiao-yao^{1,2}, GUO Chao¹, LIU Yan-li², ZHANG Xin^{1,2}, WANG Chao¹✉

(1. Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China;
2. Department of biomedicine, Beijing City University, Beijing 100083, China)

Abstract: As the environmental protection has been more and more concerned nowadays, biological pesticides have become a research focus by pesticide researches all over the world due to their advantages of easy degradation, low residue, low pollution, high safety and low generation of resistance in diseases and insect pests, and the development of biological pesticides has become a new trend in leading pesticide research and development. As a new type of green biological pesticide, spinosyns and their analogues have a unique action mechanism due to their special chemical structure. They have both the safety of biological pesticides and the rapid effect of chemical pesticides and play an important role in controlling agricultural and forestry pests, stored grain pests, sanitary pests, and livestock parasites. This study mainly compared the physicochemical properties of biopesticide spinosyns and their analogues, summarized the progress in physicochemical mutagenesis, molecular modification, product research and development and application, and resistance research, analyzed the current situation and existing problems of biological pesticides promotion, proposed solutions, and looked forward to their development prospects.

收稿日期: 2020-05-20

基金项目: “十三五”国家重点研发项目计划(2017YFC1600604); 北京城市学院2019年度实培计划项目

作者简介: 张逍遥, 女, 1996年出生, 在读硕士生, 研究方向为中药学。

通讯作者: 王超, 男, 1981年出生, 博士, 副研究员, 研究方向为微生物活性物质研发与应用。E-mail: wc@ags.ac.cn.

Key words: biopesticide; spinosad; butenyl-spinosyns; spinetoram

随着化学工业的快速发展,化学合成农药已在农业中广泛应用,但长期大量使用导致害虫抗药性不断提高,其高残留对环境造成严重污染。2019 年中共中央、国务院发文明确,5 年内淘汰现存的氯化苦、磷化铝等高毒农药。国家大力鼓励并出台政策支持“绿色、无污染、健康”的新型生物农药的研发和推广。生物农药是指利用生物产生的天然活性物质或生物活体本身制作的农药,有时也将天然活性物质的化学衍生物等称作生物农药^[1]。我国生物农药的类型主要有微生物农药、抗生素农药、植物源农药和生物化学农药等。因生物农药具有选择性强,对人畜及非靶标生物安全、环境中易降解等优点,在虫害防治领域广泛应用。据统计,我国生物农药已登记超 100 个有效成分、近 5 000 种产品,其中包括具有杀虫、杀螨及杀线虫活性的大环内酯类抗生素阿维菌素,以及兼具生物农药安全性和化学合成农药速效性的多杀菌素等。随着人们环保意识的提高及对食品安全的高度关注,生物农药占全球农药总份额比例将越来越高^[2]。

多杀菌素是 20 世纪 90 年代初由陶氏益农公司开发的一种大环内酯类杀虫抗生素,因具有较高的杀虫选择性和环境兼容性,1999 年获得美国“总统绿色化学品挑战奖”(presidential green chemistry challenge award)。作为第二代杀虫剂的乙基多杀菌素,不但对蔬菜作物的杀虫效果明显,亦能有效防止水果和坚果等作物上的虫害,尤其是对梨果类果树一种棘手的主要害虫——苹果蠹蛾有特效,并于 2008 年再次获奖。多杀菌素及其结构类似物作为一类高效安全的生物杀虫剂,在防治农林害虫、储粮害虫、卫生害虫以及牲畜寄生虫上面发挥着重要作用。相信同多杀菌素一样绿色安全的结构类似物乙基多杀菌素、丁烯基多杀菌素等,也将拥有更大的市场应用价值。本文主要比较多杀菌素及其结构类似物的理化特性,总结其理化诱变、分子改造、产品研发与应用以及抗性研究等方面的进展,分析生物农药推

广的现状和存在问题,提出解决思路,并对其发展前景进行展望。

1 多杀菌素及其结构类似物的特性比较

1.1 理化特性

如表 1 所示^[3-9],多杀菌素是大环内酯类的天然发酵代谢产物,spinosad A (约占 85%~90%)和 spinosad D (约占 10%~15%)是其活性成分。于 2007 年底推出的乙基多杀菌素产品得益于人工神经网络(ANN)^[10],它是美国陶氏益农公司在多杀菌素的基础上研制的杀虫剂,其原药有效成分为乙基多杀菌素 J (75.5%)和乙基多杀菌素 L (20.7%)的混合物。在 1999 年发现的须糖多孢菌代谢产物——丁烯基多杀菌素,因其与多杀菌素的区别在 C21 位由丁烯基取代了乙基^[11],这一结构上的相似性使得二者的理化性质和作用机理相近。主要作用于烟碱型乙酰胆碱受体(nicotinic acetylcholine receptor, nAChR)和 γ -氨基丁酸受体(γ -amino-hutyric acid receptor, GABA),通过刺激害虫的神经系统而引起兴奋,导致非功能性的肌肉收缩、颤抖、衰竭和麻痹等,最终致其死亡。

1.2 杀虫谱

乙基多杀菌素能有效解决多杀菌素防治果树害虫效果不明显的问题,如对水果、坚果、蔬菜上的梨小食心虫、卷叶蛾、甜瓜蓟马^[12]、苹果蠹蛾等均有良好的防治效果。丁烯基多杀菌素和多杀菌素两者均具有杀虫、杀螨、杀虱活性,但丁烯基多杀菌素比多杀菌素具有更宽的杀虫谱,能有效的控制膜翅目、鳞翅目、缨翅目、双翅目、鞘翅目等害虫,对鳞翅目、缨翅目具有较强的选择性杀虫活性,对于多杀菌素难控制的对农作物危害极大的烟青虫、苹果蠹蛾、马铃薯甲虫等却能有效防治,其有望成为新一代多杀菌素类高效杀虫剂。

1.3 生物合成基因

多杀菌素的全基因组测序已于 2011 年完成,

表 1 多杀菌素及其结构类似物的理化特性

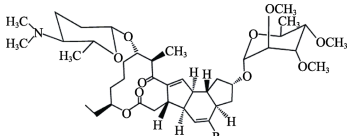
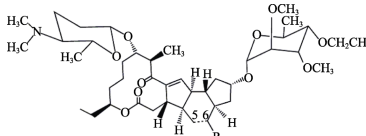
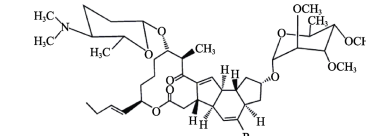
	多杀菌素 (spinosad)		乙基多杀菌素 (spinetoram)		丁烯基多杀菌素 (butenyl-spinosyns)	
	多杀菌素 A	多杀菌素 D	乙基多杀菌素 J	乙基多杀菌素 L	丁烯基多杀菌素 A	丁烯基多杀菌素 D
来源	刺糖多孢菌 (<i>Saccharopolyspora spinosa</i>) 的胞内次级代谢产物		研究人员在明确多杀菌素生物合成的中间体和途径后,应用人工神经网络对其生物活性进行定量-构效关系分析,将多杀菌素 5,6-双键的氢化与鼠李糖-3'-O-乙基化进行组合获得的		须糖多孢菌 (<i>Saccharopolyspora pogona</i>) NRRL30141 的次级代谢产物	
结构式	 <p>R=H 为多杀菌素 A, 分子式 C₄₁H₆₅NO₁₆; 相对分子量 731.98; R=CH₃ 为多杀菌素 D, 分子式 C₄₂H₆₇NO₁₆; 相对分子量为 746.00</p>		 <p>C5=C6, R=H 为乙基多杀菌素 J 分子式 C₄₂H₆₉NO₁₀, 相对分子量 748.02; C5=C6, R=CH₃ 为乙基多杀菌素 L 分子式 C₄₃H₆₉NO₁₀, 相对分子量 760.03</p>		 <p>R=H 为丁烯基多杀菌素 A, 分子式 C₄₃H₆₇NO₁₀; 相对分子量 757.99; R=CH₃ 为丁烯基多杀菌素 D, 分子式 C₄₄H₆₉NO₁₀; 相对分子量为 771.90</p>	
性状	略带泥土气味的浅灰色或白色的晶状固体		带有霉味的灰白色固体		泥土气味的浅灰色或白色的粉状晶体	
熔点/°C	84~99.5	161.5~170	143.4	70.8	143.4	
密度/(g/cm ³) (20 °C)	0.512		1.495	1.181	1.181	
蒸气压/Pa	2.4×10 ⁻⁸ (20 °C)	1.6×10 ⁻⁸ (20 °C)	5.3×10 ⁻⁵ (20 °C)	2.1×10 ⁻⁵ (20 °C)	1.30×10 ⁻¹⁴ (25 °C)	1.10×10 ⁻¹⁴ (25 °C)
稳定性	土壤中光降解的半衰期为 8~10 d; 叶面光降解的半衰期为 1~1.6 d; 水中光降解的半衰期不到 1 d; 水中 pH 5.0~7.0 范围内稳定		光降解是主要降解途径,半衰期为 0.3 d~0.5 d; 有氧土壤中半衰期分别为 13 d 和 21 d (25 °C); 在水中 pH 5.0 和 pH 7.0 时稳定		光降解和微生物降解为主要降解途径。其最终降解为不会对环境 and 地下水有害的 C、H、O、N 等成分	
杀虫机制	作用于昆虫神经系统的烟碱型乙酰胆碱受体和 γ-氨基丁酸受体,对昆虫进行快速触杀和摄食毒性					
	溶解度 (mg/L)					
pH 5.0	290	29	423	1.63	184	17.5
有机溶剂	甲醇: 190 000 己烷: 4 480 丙酮: 168 000	甲醇: 2 500 己烷: 743 丙酮: 10 100	甲醇、丙酮、乙酸乙酯、1,2-二氯乙烷、二甲苯>250 000, n-辛醇 132 000, 庚烷 61 000		甲醇: 150 000	甲醇: 2 100

表 2 多杀菌素及其结构类似物杀虫谱

类别	俗名	学名	多杀菌素	乙基多杀菌素	丁烯基多杀菌素
鳞翅目	亚热带黏虫	<i>Spodoptera eridania</i>	+	+	+
	甜菜夜蛾	<i>Spodoptera exigua</i>	+	+	+
	粉纹夜蛾	<i>Trichoplusia ni</i>	+	+	+
	棉铃虫	<i>Heliothis armigera</i>	+	+	+
	家蝇	<i>Musca domestica</i>	+	+	+
鞘翅目	烟青虫	<i>Heliothis assulta</i>	-	+	+
	苹果小卷叶蛾	<i>Cydia pomonella</i>	-	+	+
	马铃薯甲虫	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	-	+	+
半翅目	苹果蠹蛾	<i>Laspeyresia pomonella</i>	-	+	+
	棉蚜	<i>Aphis gossypii</i>	+	-	-
	梨小食心虫	<i>Grapholitha molesta</i>	-	+	+

注: “+”表示有杀虫活性;“-”表示无杀虫活性。

多杀菌素的生物合成途径已基本阐明,生物合成基因簇已被克隆和测序,大部分基因的功能已确定^[10-11]。多杀菌素的生物合成共涉及 23 个基因,除 NDP-鼠李糖合成酶基因外,大部分成簇排列在长约 74 kb 的基因簇中^[13],并以 *spn* 命名。它的生物合成共涉及四个部分:以丙酸开始的共 5 个基因 (*spnA-E*) 参与聚酮链合成,4 个基因 (*spnF-M*) 参与的大环内酯核分子内的交联反应,鼠李糖糖基的转移和甲基化过程共 4 个基因 (*spnG-I*) 参与以及 6 个基因 (*spnN-S*) 参与福乐胺糖糖基的合成和连接。在明确生物合成涉及到的基因后,可以通过改变鼠李糖和福乐胺糖,合成多杀菌素新衍生物方法来获得新的化合物,提高杀虫活性和拓宽杀虫谱。

为了开发更高效、更广谱的多杀菌素衍生物,研究人员在明确了多杀菌素生物合成的中间体和途径后,应用人工神经网络对其生物活性进行定量-构效关系分析 (quantitative structure-activity relationship, QSAR) 时发现,多杀菌素中鼠李糖-3'-O-乙基化进行改造可以明显提高其生物活性,因此将多杀菌素 5,6-双键的氢化与鼠李糖-3'-O-乙基化进行组合,成功研发出主要成分为 3'-O-乙基-5,6-二氢多杀菌素 J 的乙基多杀菌素^[14],最终通过半合成修饰获得的乙基多杀菌素,其是由质量比为 3:1 的 3'-O-乙基-5,6-二氢多杀菌素 J 与 3'-O-乙基多杀菌素 L 组成的混合物。这一系列的结构修饰使得乙基多杀菌素不仅保留了多杀菌素的杀虫活性和对环境及哺乳动物安全友好的特点,更拥有了广阔的杀虫谱,并再一次获得了 2008 年的“总统绿色化学品挑战奖”。

为探求丁烯基多杀菌素的合成途径,以刺糖多孢菌基因作为探针,发现了相关的合成基因长约 110 kb,共 23 个基因,与编码多杀菌素的基因序列高度相似。聚酮合成酶基因是由 *busA-E* 共 5 个头尾相连的基因构成的基因簇,负责合成大环内酯结构;*busJ*、*busF*、*busL*、*busM* 共 4 个基因,负责将大环内酯修饰为糖苷配基;鼠李糖由 *gtt*、*gdh*、*epi*、*kre*、*busG* 这 5 个基因编码合成并添加,*busH*、*busI*、*busK* 这 3 个基因使鼠李糖甲基化,*busN-S* 是福乐胺糖合成的相关基因^[11,15-16]。在丁

烯基多杀菌素基因簇的两侧还克隆到了 9 个多杀菌素基因簇所没有的基因,它们可能与一些特异的丁烯基多杀菌素的形成有关^[4]。

1.4 产生菌的生物学特性

1.4.1 刺糖多孢菌的菌种特性

多杀菌素的产生菌,刺糖多孢菌是好氧型革兰氏阳性放线菌,其菌株在大多数培养基上都会产生良好的气生菌丝,菌丝在液体培养基中呈现碎片状。电镜下的刺糖多孢菌表面被针状刺,外形为独特的串珠状。它能有效利用碳源(葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、D-赤藻糖醇、甘油、甘露醇等)产酸和氮源(脲化牛奶、牛肉膏、棉籽蛋白等),同时在发酵培养过程中添加菌体所需的无机盐等元素可供其快速生长,对溶菌酶敏感。最佳的培养和产孢温度为 24~33 °C,当温度在 28~30 °C 时适合代谢产物的合成,此外溶氧量也会对发酵过程产生极大影响^[17]。值得注意的是,因为有些菌株经冷冻干燥后会慢慢失去产孢能力,所以通常以砂土管真空保存。

1.4.2 须糖多孢菌的菌种特性

丁烯基多杀菌素的产生菌由于对糖多孢菌属 (*saccharopolyspora*) 的特殊噬菌体敏感,且其孢子在电镜下呈现毛刺等形态学特征而被命名为须糖多孢菌。该菌为好氧型菌,在 24~33 °C 可适宜生长。在 ISP2 和 ISP5 培养基上产生气生菌丝和亮白色的多毛刺孢子,菌丝体在液体培养基中易断裂。须糖多孢菌与刺糖多孢菌一样都能利用海藻糖、D-赤藻糖醇、果糖、葡萄糖、甘油、甘露醇等碳源产酸,不同的是对于乳糖、麦芽糖、松三糖、蜜二糖、棉子糖、水杨苷核糖醇、D-半乳糖、糊精等无法产酸^[3]。

2 多杀菌素及其结构类似物的研究进展

2.1 高产菌株的诱变选育

对多杀菌素及其结构类似物在分子结构、理化性质、杀虫机理等有一定了解的基础上,其高产菌株的产量决定了它的工业化前景。筛选高产菌株的常规诱变技术包括:紫外 (UV) 诱变,亚硝基胍 (NTG) 诱变,⁶⁰Co- γ ^[18]诱变、离子束诱变、常压室温等离子体 (ARTP) 诱变、复合诱变

选育等。此外,微生物的抗生素抗性突变可赋予突变株新生次级代谢产物的代谢生产能力,并以 96 孔板发酵培养结合生物检测进行高通量筛选能大幅提高筛选效率^[19]。

常用的诱变剂亚硝基胍(NTG)是具有一定毒性的烷化剂,陈园^[19]以 NTG 对刺糖多孢菌进行诱变,最终在诱变剂量 2 mg/mL、处理时间 50 min 时获得产量提高 43.96%的多杀菌素高产株。当采用诸多组合的复合诱变时可以有效提高突变株的次级代谢产物产量,如通过 UV、NTG 结合链霉素、安普霉素、鼠李糖抗性因子诱变选育的高产株产量提高了 45.71%^[20];MPMS 结合链霉素、庆大霉素、利福平、氯霉素四种抗生素抗性筛选多杀菌素高产菌株产量提高 28.68%^[21]。但是诱变选育的高产菌株的遗传存在不稳定性,特别是多杀菌素高产性状易丢失,所以采取属间原生质体融合等引入外源基因的方法可有效改善基因稳定性的问题^[22]且有研究使多杀菌素产量提高了 331%^[23]。

陈爽^[24]为提高丁烯基多杀菌素产量,对须糖多孢菌以 5 mg/mL 的 NTG 诱变 50 min 筛选出 1 株遗传稳定且产量提高 86.7%的菌株。对须糖多孢菌进行不同浓度的链霉素筛选研究,结果显示 4×MIC 浓度的突变株菌丝体粗壮、分支增多,有利于丁烯基多杀菌素的积累,产量提高 1.79 倍^[25]。邬洋^[26]开展的 10×MIC 浓度的巴龙霉素抗性筛选研究中,抗性突变株的产量是原始菌株的 2.2 倍。为获得更高产的工程菌株,研究者进行 10×MIC 浓度的链霉素-庆大霉素双重抗性选育,该突变株的产物峰面积是起始菌株的 3.89 倍^[27]。

2.2 基因工程改造高产突变株

与传统的理化诱变技术不同的是,基因工程改造方法在提高菌种代谢产物产量方面具有更加准确的方向性和目的性。通过调节生物合成途径中的相关基因,可以显著提高生物合成产量,并且通过抑制次要组分的合成,也可提高主要有效成分的产量。

迄今为止,在刺糖多孢菌中引入生物合成簇和鼠李糖合成的相关基因,是大多数以基因工程为手段来提高多杀菌素产量的主要方法。如引入

过度表达的 *fadE* 和 *fadD1* 增强了刺糖多孢菌的脂肪酸降解速率,其多杀菌素在含油培养基中有显著提高^[28]。多杀菌素 J 和 L 与 A 和 D 结构上的差异为鼠李糖残基上 3'-O 位点上的甲基。前人研究证实其生物合成基因簇中 *spnI*、*spnK*、*spnH* 分别参与多杀菌素鼠李糖残基上不同位点的甲基化修饰。因此,党福军^[29]建立了刺糖多孢菌的基因敲除技术(即去除 *spnK* 编码保守区域序列),在工业菌株中构建了 *spnK* 失活的突变株,可以大量产生多杀菌素 J 和 L。

研究者们为围绕提高丁烯基多杀菌素产量,根据前期基因组测序表明须糖多孢菌含有 *fcl* 基因和 *padR* 基因,开展了敲除 *padR* 的研究,使得菌体转运蛋白表达水平上调,促进提产 27.3%^[30]。而敲除 *fcl* 虽影响了菌丝体的生长发育,但促进了其生物合成和杀虫活性,相较野生型菌株产量提高了 130%^[31]。使多核苷酸磷酸化酶过度表达也可促进了菌株的生物量,丁烯基多杀菌素产量提高了 1.92 倍^[32]。

2.3 高产菌株的发酵优化

通过优化发酵培养基,改善发酵环境,可以缩短发酵时间,延长代谢产物合成期,提高发酵产量。对于发酵条件优化最好的方式就是采用以表格化直观的数理统计法对发酵过程建立相关的数学模型,通过适时调节发酵参数,实现对发酵过程的优化控制。目前常借助的统计学方法包括:单因素实验法、响应面分析法、人工神经网络建模法等,通过统计学方法筛选最佳培养基配方,是提高代谢产物产量最直接、简单、高效的方法。

研究者们为了提高多杀菌素的产量,对碳源、氮源、前体、培养温度及溶氧量等进行优化,取得一定进展:研究人员尝试添加油脂类^[33]、氨基酸类和有机酸类成分来满足刺糖多孢菌的生长需求^[34],使得产生菌在原有发酵水平上有了较大幅度提高。采用人工神经网络结合粒子群算法优化产多杀菌素的发酵培养基,和利用响应曲面及其等高线对提取效果各种关键因素进行探讨,达到提产目的,并获得最优提取条件^[35-36]。

碳源对须糖多孢菌生长及次生代谢产物的生物合成起着至关重要的作用,研究者们为提高丁

烯基多杀菌素产量,常通过优化碳源、氮源等以达到该目的。陈爽^[24]对经 NTG 诱变和高通量筛选后的高产菌株进行单因素实验和正交实验来优化发酵培养基配比,最终获得的最佳配方使菌株的丁烯基多杀菌素产量比优化前提高 52.1%。通过对 11 种常见碳源进行代谢途径分析后得到以 5 g/L 的甘露糖作为碳源添加时,显著提高了丁烯基多杀菌素的产量 1.78 倍^[37]。

2.4 产品应用情况

2.4.1 大田虫害的防治

1994 年陶氏益农公司将率先向美国环保总局 (EPA) 上报并得到优先登记注册的多杀菌素产品 “Naturalyte” 和 “Tracer” 推入市场,其分别用于果树、蔬菜和防治催杀棉花田和烟草中鳞翅目类害虫^[38-39]。目前该产品已成功在 80 多个国家登记注册,可用于防治超过 200 种害虫。在我国上市的多杀菌素产品有用于棉花类的 “催杀” (spinosad 48%) 悬浮剂和用于果蔬类的 “菜喜” (spinosad 2.5%) 悬浮剂。

2007 年新西兰获批的商品 Delegate (spinetoram 25%) 陆续上市,常被用于坚果、水果、蔬菜类作物。其水分散粒剂也被用于防治苹果树害虫。随后,以商品名为 Delegate WG (spinetoram 25%) 和 Radiant SC (spinetoram 120 g/L) 获得加拿大政府和美国政府的审核批准用于防治瓜果蔬菜、谷物类作物的害虫。

多杀菌素与乙基多杀菌素对害虫均具有胃毒和触杀作用,杀虫活性高,主要用于防治田间鳞翅目害虫 (小菜蛾、甜菜夜蛾) 及缨翅目害虫 (蓟马)、双翅目害虫等。如其均可以防治田间的多食性害虫草地贪夜蛾,杀虫防效与保叶效果为 100%^[38-40]。若与虫生真菌联合使用,可以达到协同增效的目的^[41]。以玉米粉为基质制成的多杀菌素颗粒剂可延长农作物的货架期^[42]。

2011 年在中国与全球同步上市的艾绿士悬浮剂 (spinetoram 60 g/L),其主要成分是乙基多杀菌素,已在国内登记用于茄子防治蓟马、甘蓝防治甜菜夜蛾与小菜蛾、水稻防治稻纵卷叶螟等^[43]。它对菜田中的小菜蛾以及蔬菜蓟马具有很好的速效性和持效性,在施药的第一天就达到较好防治

水平,且第七天防效仍在 90% 以上^[44-45]。

2.4.2 储粮虫害的防治

由于储粮害虫为害引起的粮食损失是威胁我国粮食安全的重要因素,特别多发于储藏设施落后的农村。害虫的爆发不仅会造成粮食损失,它们的排泄物、尸体还会使粮食发霉变质,甚至产生对人体有害的物质。单一的长期大量使用化学农药熏蒸剂使害虫产生了严重的抗药性,已经无法有效的防治害虫,因此我国储粮防治迫切需要新型的无公害防治技术。

2003 年多杀菌素在肯尼亚被第一次注册登记为储粮保护剂,随后 2005 年在美国注册成为储粮杀虫剂,可以在多种粮食和种子上应用。大量研究显示 1 mg/kg 多杀菌素对玉米、绿豆、小麦等粮库中玉米象、谷蠹等常见的储粮害虫有显著的防治效果,即使是炎热高温的夏季,也可保证储粮无虫害^[46]。若使用多杀菌素熏蒸或复配剂还可延长粮食保质期和增强杀虫活性^[47-48]。可在农户储粮、大型粮仓或者简易粮仓中推广使用。

乙基多杀菌素多使用于田间,在储粮害虫防治上的应用较少。对于小麦中锈赤扁谷盗^[49],烟叶中烟草粉螟^[50],粮仓中谷蠹、书虱等均能有效防治,且控制效果同多杀菌素基本一致。因此在储粮有害生物防治领域具有很大的研究开发潜力。

2.4.3 生活与卫生害虫的防治

海港周边的城市经常受到蚊虫的吸血肆虐,更重要的是它们的传播会带来疟疾、流行性乙型脑炎等流行病的发生。综合治理策略是蚊虫控制的基本原则,化学防治虽然快速高效,但长期大量不合理的使用,导致蚊虫产生抗性^[51],引发防治效果差、施药量增大、环境污染等问题。而多杀菌素的缓释粒剂 Natular G30 对致倦库蚊的防治效果较好,且对水生生物安全^[52],作为一种环境友好型杀虫剂,值得在我国推广使用。

头虱是一种寄生性昆虫,主要存在于人们的毛发内,以吸食人血为食,感染在美国儿童及成年人十分普遍。2011 年美国 FDA 批准的 Natroba (0.9% 多杀菌素混悬液制剂),是用于治疗 4 岁以上儿童及成年人头虱感染的外用制剂^[53]。在经 14 天的用药治疗后治愈率 (即完全无头虱个体的比

率) 达 86%，它的上市为治疗头虱提供了一种新的选择。

2.5 多杀菌素类药剂的抗性研究

自多杀菌素上市以来，陶氏益农公司就建议农民不要重复使用该杀虫剂，并且鼓励与其他产品轮换使用来避免多杀菌素产生抗性。虽然多杀菌素类化合物的作用机制独特，一些独具生物学特性和危害习性的害虫还是表现出明显的抗药性。如北京地区西花蓟马田间种群对多杀菌素的抗性倍数达到 80~150 倍，对乙基多杀菌素抗性倍数高达 7 730 倍^[54]。该田间监测表明靶标害虫对多杀菌素类杀虫剂的抗性有着不容忽视的影响，了解抗性发展规律对以后的抗性治理有着重要的意义。

对于抗性机理，有观点提出代谢解毒酶或许在抗性中起作用，并研究了羧酸酯酶、谷胱甘肽硫转移酶和多功能氧化酶这 3 种解毒酶的活性，但在西花蓟马对多杀菌素的抗药性中认为并非如此^[55]。还有研究发现，烟碱型乙酰胆碱受体 $\alpha 6$ 亚基跨膜区的三个氨基酸缺失导致小菜蛾对多杀菌素产生高水平抗性^[56]。并且杀虫靶标位点的不敏感性，也是导致害虫对杀虫剂产生抗性的一个重要的生化机制。

害虫抗药性是防治过程中必须要面对的一个重要关卡，在尚未找到行之有效的治理方法之前，采用合理用药与加强田间害虫抗性的监测可以延缓抗性发展，寻求新型杀虫剂并联合更多措施来防治害虫侵害刻不容缓。

3 前景展望

3.1 生物农药推广的现状和存在问题

近年来，我国生物农药产业的开发与应用得到了国家和政府的大力支持，通过国家科技支撑计划、公益性行业科研专项、重点研发计划项目等进行资助来推动生物农药资源的研发^[1]。可尽管如此，生物农药的普及和应用步伐仍十分滞缓，与欧美发达国家相比存在不小的差距。除了生物农药政策制度不健全外，其产品本身也存在着生物农药制品种类少、研发成本高、防治谱窄等制

约因素。作为科研人员，我们不仅要尽快解决提取培育成本高的问题，更重要的是大力开发新的活性化合物和衍生物，这是当前和今后发展的热点领域。

3.2 解决思路

3.2.1 复配剂的研发

生物农药的研发为绿色有机农业提供了安全生产的技术支撑，不仅增加了农业产量，也提高了农作物的质量，减轻了水土污染等环境压力。但是，生物农药的应用技术和使用面积仍是亟待解决的问题。对于大多数生物农药存在的对靶标生物明显选择性，甚至是专一性，可以通过研究将新型生物源杀虫剂与传统杀虫剂按一定比例组合复配，发挥各自优势，而从减缓害虫抗药性和延长药剂的使用寿命。已有研究将多杀菌素与毒死蜱 7:5 复配后表现出明显的增效作用^[57]，与吡虫啉以 1:20 浓度比组成的混剂也可用于韭菜迟眼蕈蚊幼虫的防治^[58]。


3.2.2 新活性化合物和衍生物的开发

丰富种类，开发新的活性化合物和衍生物(如丁烯基多杀菌素)，也可以解决当前防治杀虫谱窄，产品种类少的方法。为了筛选多杀菌素类似物，郭超^[59]等从采集到的 162 份土壤样品，分离获得了 15 000 余株放线菌建立放线菌库，利用高通量发酵平台及蚊子幼虫生物测定的方法筛选具有杀虫活性的微生物，获得一株产丁烯基多杀菌素的须糖多孢菌，并进行了 16s RNA 鉴定、全基因组序列测定、理化诱变等研究工作。但须糖多孢菌生长慢、生物量低、发酵过程调控难，丁烯基多杀菌素产量仍然较低，达不到工业化生产要求。目前国际上无丁烯基多杀菌素相关产品注册登记的报道，作为继第一代多杀菌素、第二代乙基多杀菌素之后的第三代生物农药，丁烯基多杀菌素在延缓害虫抗药性、扩大杀虫谱等方面将展现其潜力。

随着人类环保和生态意识的增强，以及现代生物技术的飞速发展，新型生物农药的性能和品质会不断提高，高效低毒、特异性强的新生物农药品种的发展前景会更加美好。

参考文献:

- [1] 邱德文. 生物农药研究进展与未来展望[J]. 植物保护, 2013, 39(5): 81-89.
- [2] 徐敏强. 生物农药多杀菌素生产菌株的选育及发酵工艺优化研究[D]. 苏州科技大学, 2018.
- [3] 寿佳丽, 裘娟萍. 新型生物农药-丁烯基多杀菌素[J]. 农药, 2011, 50(4): 239-243+272.
- [4] 佚名. 乙基多杀菌素[J]. 农药科学与管理, 2010, 31(7): 58.
- [5] 杜静, 刘重喜, 王相晶, 等. 新穎绿色杀虫剂—spinetoram[J]. 世界农药, 2010, 32(4): 55-58.
- [6] 陈园. 多杀菌素高产菌株的诱变选育及快速筛选方法的研究[D]. 华南理工大学, 2013.
- [7] 王超, 郭超, 郭伟群, 等. 一种从须糖多孢菌发酵液中提取丁烯基多杀菌素的工艺[P]. 中国专利: CN110776536A, 2020-02-11.
- [8] 史雪岩. 多杀菌素类杀虫剂的环境降解及抗性机制研究进展[J]. 农药学报, 2018, 20(5): 557-567.
- [9] 华乃震. 绿色环保生物杀虫剂多杀霉素和乙基多杀菌素的述评[J]. 农药, 2015, 54(1): 1-5+13.
- [10] THOMAS C S, GARY D C, JAMES E D, et al. Neural network-based QSAR and insecticide discovery: spinetoram[J]. Journal of computer-aided molecular, 2008, 22(6-7): 393-401.
- [11] HUANG K X, XIA L, ZHANG Y, et al. Recent advances in the biochemistry of spinosyns[J]. Springer-Verlag, 2009, 82(1): 12-23.
- [12] 吴声敢, 柳新菊, 安雪花, 等. 8 种杀虫剂对甜瓜蓟马的防治效果[J]. 浙江农业科学, 2019, 60(11): 1980-1982.
- [13] 向双云, 周珍辉, 马建民, 等. 新型生物农药—多杀菌素[J]. 现代生物医学进展, 2008, (9): 1750-1752.
- [14] UTE G, THOMAS C S. Natural product derived insecticides: discovery and development of spinetoram[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2016, 43(2-3): 185-193.
- [15] WALDRON C, MADDURI K, CRAWFORD K, et al. A cluster of genes for the biosynthesis of spinosyns, novel macrolide insect control agents produced by *Saccharopolyspora spinosa*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2000, 78(3-4): 385-390.
- [16] HAHN D R, GUSTAFSON G, WALDRON C, et al. Butenyl-spinosyns, a natural example of genetic engineering of antibiotic biosynthetic genes[J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2006, 33(2): 94-104.
- [17] 兰周. 多杀菌素生物合成基因簇的克隆及异源表达载体的构建[D]. 福建农林大学, 2012.
- [18] 郭伟群, 邹球龙, 陈园, 等. 多杀菌素高产菌株的诱变选育及代谢曲线初步研究[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39(4): 245-248.
- [19] 陈园, 熊轶, 郭伟群, 等. 多杀菌素产生菌的高通量诱变选育[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(5): 339-343+347.
- [20] 扶教龙, 徐敏强, 张松, 等. 多杀菌素产生菌复合诱变选育及发酵培养基优化[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(7): 824-830.
- [21] 王海霞, 陈园, 王超, 等. MPMS 诱变结合抗生素抗性选育多杀菌素高产菌株[J]. 粮油食品科技, 2017, 25(3): 82-86.
- [22] 郭伟群. 多杀菌素高产菌株的选育及发酵过程多参数、多尺度优化[D]. 中国农业大学, 2016.
- [23] 易卓, 夏立秋, 丁学知, 等. 通过两种糖多孢菌属菌株原生质体融合提高多杀菌素产量研究[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(10): 1148-1155.
- [24] 陈爽, 赵晨, 黎琪, 等. 丁烯基多杀菌素高产菌株的诱变选育及培养基优化[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 108-111.
- [25] 罗林根, 杨燕, 魏慧, 等. 须糖多孢菌 *Saccharopolyspora pogona* 的核糖体工程改造对丁烯基多杀菌素合成的影响[J]. 生物工程学报, 2016, 32(2): 259-263.
- [26] 邹洋, 徐妙, 罗林根, 等. 丁烯基多杀菌素高产菌株的巴龙霉素抗性筛选[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(1): 106-114.
- [27] 张鹏. 杀虫微生物菌株的多重抗性筛选[D]. 湖南师范大学, 2011.
- [28] 黄颖. 基于组学分析构建多杀菌素高产基因工程菌及其代谢调控研究[D]. 中国农业大学, 2018.
- [29] 党福军, 王继栋, 覃重军, 等. 遗传改造刺糖多孢菌菌株生产多杀菌素 J 和 L[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(1): 52-58.
- [30] 何思颖, 柏丹, 夏伦, 等. *PadR* 对须糖多孢菌丁烯基多杀菌素生物合成及转运相关蛋白表达的影响[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2019, 42(5): 44-51.
- [31] 彭胜男, 何昊城, 苑爽芹, 等. *fct* 基因对须糖多孢菌丁烯基多杀菌素生物合成及生长发育的影响[J]. 生物工程学报, 2019, 35(9): 1662-1675.
- [32] LI L, RANG J, HE H, et al. Impact on strain growth and butenyl-spinosyn biosynthesis by overexpression of polynucleotide phosphorylase gene in *Saccharopolyspora pogona*[J]. Springer Berlin Heidelberg, 2018, 102(18): 8011-8012.
- [33] 马坤, 裘娟萍, 赵春田. 植物油对刺糖多孢菌生长及其合成多杀菌素能力的影响[J]. 农药学报, 2015, 17(3): 257-266.
- [34] 伍小颖. 多杀菌素高产菌株育种及培养基优化[D]. 湖南农业大学, 2017.
- [35] 王子宝, 赵春田, 裘娟萍. 人工神经网络结合粒子群算法优化产多杀菌素发酵培养基[J]. 农药, 2012, 51(11): 805-808.
- [36] 秦为辉, 李丽, 张晓琳, 等. 响应曲面分析方法优化发酵液中多杀菌素的提取工艺[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23(2): 314-319.
- [37] 何思颖, 柏丹, 夏伦, 等. 不同碳源对须糖多孢菌生长发育及丁烯基多杀菌素生物合成的影响[J]. 激光生物学报, 2019, 28(2): 136-143.
- [38] MONTEZANO D G, SPECHT A, SOSA-GÓMEZ D R, et al. Host plants of spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) in the Americas[J]. Entomological Society of Southern Africa, 2018, 26(2): 286-300.
- [39] 王国荣, 李斌, 黄福旦, 等. 4 种杀虫剂对玉米上草地贪夜蛾的室内外活性[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(12): 70-72.
- [40] 姜玉英, 刘杰, 朱晓明. 草地贪夜蛾侵入我国的发生动态和未来趋势分析[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(2): 33-35.
- [41] RIVERO-BORJA M, GUZMÁN-FRANCO A W, RODRÍGUEZ-LEYVA E, et al. Interaction of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* with chlorpyrifos ethyl and spinosad in *Spodoptera frugiperda* larvae[J]. Pest management science, 2018, 74(9): 2047-2052.

- [42] PATRICIA T G, FERNANDO T M, RICARDO G F, et al. Increased efficacy and extended shelf life of spinosad formulated in phagostimulant granules against *Spodoptera frugiperda*[J]. *Pest management science*, 2018, 74(1): 100-110.
- [43] 王燕波, 水清. 陶氏益农新药乙基多杀菌素上市[J]. *农药市场信息*, 2011, (8): 36-37.
- [44] 谷莉莉, 仇学平, 陈永明, 等. 几种生物农药对设施小白菜小菜蛾的防控效果[J]. *中国植保导刊*, 2019, 39(12): 76-78.
- [45] 周海燕, 谷健. 艾绿士对蔬菜蓟马的防治效果研究[J]. *农业科技与装备*, 2019, (5): 19-20.
- [46] 祝星星. 多杀菌素防治储粮害虫应用技术研究[D]. 武汉轻工大学, 2014.
- [47] 张从宇, 王国万, 汪正雄, 等. 多杀菌素在实仓中的应用试验[J]. *粮油仓储科技通讯*, 2015, 31(1): 37-38+46.
- [48] 王晶磊, 肖雅斌, 高洪涛, 等. 多杀菌素及其多杀菌素复配剂实仓防虫效果初探[J]. *粮食与食品工业*, 2014, 21(5): 81-84+91.
- [49] 吴树会, 邓树华, 周剑宇. 生物药剂乙基多杀菌素对锈赤扁谷盗成虫的毒杀作用[J]. *粮食科技与经济*, 2012, 37(4): 27-29.
- [50] 杨国浩, 叶明亮, 郑东胜, 等. 利用乙基多杀菌素防治初烤烟仓库中的烟草粉螟[J]. *烟草科技*, 2017, 50(10): 30-34.
- [51] 孟凤霞, 靳建超, 陈云, 等. 我国淡色库蚊/致倦库蚊对常用化学杀虫剂的抗药性[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2011, 22(6): 517-520+528.
- [52] 张晓越, 孟凤霞, 刘起勇, 等. 多杀菌素 Natular G30 对海南省不同生境致倦库蚊的控制效果比较研究[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2014, 25(2): 105-108+112.
- [53] 夏训明. 美国 FDA 批准 Natroba 用于治疗头虱感染[J]. *广东药学院学报*, 2011, 27(1): 73.
- [54] 万岩然, 何秉青, 苑广迪, 等. 北京和云南地区西花蓟马对多杀菌素类药剂产生抗药性[J]. *应用昆虫学报*, 2016, 53(2): 396-402.
- [55] 侯文杰, 李飞, 吴青君, 等. 西花蓟马对多杀菌素的抗性生化机制研究[J]. *应用昆虫学报*, 2013, 50(4): 1042-1048.
- [56] WANG J, WANG X, LANSDELL S J, et al. A three amino acid deletion in the transmembrane domain of the nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 6$ subunit confers high-level resistance to spinosad in *Plutella xylostella*[J]. *Elsevier Ltd*, 2016, 71:29-36.
- [57] 沈登荣, 何超, 赵远艳, 等. 多杀菌素与 4 种杀虫剂复配对西花蓟马的联合毒力[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(23): 91-93.
- [58] 王险, 王志超, 史雪岩. 吡虫啉与多杀菌素混配剂对韭菜迟眼蕈蚊幼虫的室内毒力测定[J]. *农药科学与管理*, 2017, 38(12): 39-46.
- [59] 郭超, 赵晨, 黎琪, 等. 产丁烯基多杀菌素菌株的筛选及鉴定[J]. *粮油食品科技*, 2019, 27(2): 55-60. 

· 公益宣传 ·

2021 年《粮食与饲料工业》征订启事

《粮食与饲料工业》创刊于 1972 年, 是一份由中粮工程科技股份有限公司主管, 国粮武汉科学研究设计院有限公司主办, 涵盖粮食、饲料、轻工、食品、化工、商检、农垦、军需等行业, 以及相关科研、设计、工程、教学、加工、仓储、检测等部门的技术类刊物。是国家期刊奖“百种重点期刊”、全国优秀农业期刊技术类一等奖期刊、湖北省优秀期刊、《中国核心期刊(遴选)数据库》收录期刊、中国科技核心期刊、RCCSE 中国核心学术期刊(A)、英国《食品科技文摘》(FSTA)固定收录源刊。

《粮食与饲料工业》为双月刊, 大 16 开本, 正文 64 页, 出刊时间为逢双月 15 日, 全年共 6 期, 定价: 60 元/年。欢迎粮食与饲料行业从事科技管理、科学研究、工程设计、生产管理等人员及相关院校师生订阅。

地址: 湖北省武汉市洪山区卓刀泉南路 3 号 邮编: 430079

电话: 027-50657638

电子邮箱: lsyslgy@126.com

网址: <http://www.lsyslgy.com>

国内统一连续出版物号: CN 42-1176/TS

国际标准连续出版物号: ISSN 1003-6202

邮发代号: 38-151 外发代号: M4246