

Snf907 真菌代谢物对大豆胞囊线虫卵及二龄幼虫的影响^{*}

刘 霆^{1,2} 王 莉³ 段玉玺¹ 陈立杰¹ 王 雪¹

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110161; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100089; 3. 中国农业大学理学院, 北京 100083)

摘要 研究 Snf907 真菌代谢物原液及不同稀释液对大豆胞囊线虫卵孵化及二龄幼虫活性的影响。结果表明, 在原液、5×、10×、20×、50× 稀释液浓度下, 对胞囊孵化的相对抑制率分别是 88.34%、82.33%、74.32%、57.01% 和 38.62%, 均与无菌水对照差异显著; 对分散卵粒孵化的相对抑制率分别是 98.86%、92.66%、84.19%、72.32% 和 65.54%, 除了 50× 稀释液浓度外, 其他浓度均与无菌水对照差异显著; 对二龄幼虫的校正死亡率分别是 96.33%、83.18%、63.15%、47.04% 和 33.99%, 均与无菌水对照差异显著。

关键词 真菌代谢物; 大豆胞囊线虫; 胞囊; 分散卵; 二龄幼虫

中图分类号 S 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)03-0325-04

大豆胞囊线虫, *Heterodera glycines* Ichinohe (1952), (soybean cyst nematode, SCN) 是世界性分布的大豆生产中的主要病害之一。该病害在中国、美国、日本、朝鲜发生严重, 是限制这些国家大豆生产的主要因素^[1]。近年来随着我国大豆栽培面积的不断扩大, 大豆胞囊线虫的分布也越来越广^[2], 主要发生在东北三省、内蒙、山西、陕西、河南、河北、山东、安徽、江苏、湖北、天津和北京共 14 个省市自治区, 一般减产 10%~20%, 重者可达 30%~50%, 甚至颗粒无收^[3]。近 20 年来, 随着可持续农业和有机农业的发展, 人们已将该线虫防治工作的重点转向了生物防治。从真菌代谢产物中寻找对线虫有作用的药剂成为近年来一个热点。国外在真菌的杀线虫活性的研究方面取得了显著的成果, 已经从真菌中分离和鉴定出近百种具有杀线虫活性的化合物, 包括醌类、生物碱类、萜类、大环内酯类、萘类、肽类、脂肪酸类、烃类等^[4]。国内近年来在真菌代谢产物杀线虫方面的研究进展很快。向红琼(1999)进行了粗皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 对线虫的作用进行了研究, 获得了对植物寄生线虫具有较强的毒杀活性的粗提物^[5]。孙漫红(2002)报道了淡紫拟青霉

的代谢物对大豆胞囊线虫和根结线虫都有很明显的抑制作用^[6]。林茂松(2001)报道了尖镰孢菌对根结线虫卵的孵化抑制作用^[7]。孙建华(2002)报道了 Sr18 的代谢物对南方根结线虫、甘薯茎线虫、大豆胞囊线虫都具有较强的作用^[8]。张克勤等也在这方面取得了很大的成绩。本文主要是利用从土壤中分离出的真菌中筛选出对甘薯茎线虫、大豆胞囊线虫、根结线虫都有很强的杀线虫作用—活性菌株(代号 Snf907)的代谢物对大豆胞囊线虫卵孵化的影响和对大豆胞囊线虫二龄幼虫的活性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 Snf907 真菌代谢物的制备

25℃, Snf907 菌株液体发酵摇瓶培养一周后, 发酵液布氏漏斗抽滤, 取粗滤液过 0.25μm 微孔滤膜去除孢子, 制备无菌滤液, 依次稀释成 5×、10×、20×、50× 备用。

1.2 大豆胞囊线虫胞囊、卵及二龄幼虫的获得

* 收稿日期: 2006-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助课题(20372064, 30300231)

作者简介: 刘霆(1975-), 男, 博士, 主要从事生物农药的研制与开发工作。Tel: 010-51503337 E-mail: lting11@163.com.

通讯作者: 段玉玺, 博士研究生导师, Tel: 024-88454528 E-mail: duanyx@mail.syau.edu.cn

采用改良淘洗—过筛法从大豆胞囊线虫病严重地块采取的土样中分离胞囊:把土样加入适量水搅拌均匀,静置3min后,上层悬液过40目和60目套筛,重复3次。倾去上层40目筛子上的残余物,用高压喷头把60目筛子上泥土冲净,剩余物用缓慢水流收集在一干净的塑料烧杯中。烧杯中的残余物分次倒入垫有双层擦镜纸的贝曼漏斗中,过滤后的残余物连同擦镜纸一并移入干净的9cm培养皿中,在体视解剖镜下用自制的挑针和毛刷挑出新鲜饱满成熟的胞囊。挑取成熟且饱满的大豆胞囊线虫胞囊,放入组织研磨器中加水研磨至破壁,倒出混合液,过200目筛网,在500目筛收集卵,35%蔗糖溶液中离心,2500r·min⁻¹,5min,500目筛上收集大豆胞囊线虫卵,加水制备卵悬液。用上述方法收集大豆胞囊线虫的卵,在0.5%NaOCl溶液中消毒1min,反复冲洗后在25℃、0.4mmol·L⁻¹ZnCl₂溶液中孵化2龄幼虫。

1.3 Snf907 真菌代谢物对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

取新鲜饱满的胞囊,无菌水浸泡过夜,0.5%NaOCl表面消毒5min,无菌水冲洗3次。放入自制的孵化池。每个孵化池放10个胞囊,孵化池为双层套管,在双层套管间夹入擦镜纸。将孵化池置于灭菌的培养皿中,向培养皿内加入菌液克原液及其稀释液10mL,以10mL无菌水作为对照,3次重复,25℃下孵化⁹。9d后观察计数孵化出的J₂数量。

1.4 Snf907 真菌代谢物对大豆胞囊线虫卵孵化的影响

在每个孵化池内加入0.2mL(约含200.2±8.0粒/池)卵悬浮液,其余处理均同胞囊的孵化。

1.5 Snf907 真菌代谢物对大豆胞囊线虫二龄幼虫活性的影响

在经灭菌的24孔细胞培养板中加入不同浓度的菌液各1mL,以加1mL无菌水作为对照,然后分别向处理和对照中各加入新孵化的大豆胞囊线虫二龄幼虫100条/孔。处理和对照各3次重复。放入25℃培养箱中,24h后记录线虫死亡率,计算校正死亡率⁹,所得数据经SPSS软件处理。线虫死活判断采用NaOH刺激法¹⁰。

1.6 计算方法

孵化抑制率(%)=

$$\frac{\text{对照孵化线虫数} - \text{处理孵化线虫数}}{\text{对照孵化线虫数}} \times 100$$

$$\text{线虫死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{供试线虫数}} \times 100$$

校正死亡率(%)=

$$\frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 Snf907 真菌代谢物对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

试验结果表明,Snf907菌液对大豆胞囊线虫胞囊的孵化具有较强的抑制作用,不同倍数的稀释液对胞囊孵化的抑制作用不同(表1)。Snf907菌液稀释50×液,对大豆胞囊线虫胞囊孵化的抑制率仅为38.63%。其20×液以上对胞囊的孵化抑制率均在50%以上。

表1 Snf907 真菌代谢物对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

Table 1 Effect of Snf907 fungal metabolites on cyst hatching of soybean cyst nematode

稀释倍数 Dilution times	孵化出的线虫数(条) The number of hatched juvenile				相对抑制率 (%) Relative suppression rate
	I	II	III	平均 Average	
原液	24	17	23	21.33c	88.34
5×	32	36	29	32.33c	82.33
10×	44	48	49	47.00c	74.32
20×	86	81	69	78.67b	57.01
50×	114	110	113	112.33b	38.62
无菌水	188	177	184	183.00a	—

注:文中三个表中的数字后字母均为新复极差测验结果,不同小写字母表示差异显著(P≤0.05),字母相同者为差异不显著,以下均同。

2.2 Snf907 真菌代谢物对大豆胞囊线虫卵孵化的影响

试验结果表明,Snf907菌液对大豆胞囊线虫卵孵化具有很强的抑制作用,同浓度菌液对分散卵孵

表2 Snf907 真菌代谢物对大豆胞囊线虫分散卵孵化的影响

Table 2 Effect of Snf907 fungal metabolites on individual eggs hatching of soybean cyst nematode

稀释倍数 Dilution times	孵化出的线虫数(条) The number of hatched juvenile				相对抑制率 (%) Relative suppression rate
	I	II	III	平均 Average	
原液	1	1	0	0.67b	98.86
5×	3	4	6	4.33b	92.66
10×	8	9	11	9.33ab	84.19
20×	14	16	19	16.33ab	72.32
50×	17	20	24	20.33a	65.54
无菌水	53	60	64	59.00a	—

化的抑制要强于对胞囊孵化的抑制(表 2)。原因可能是胞囊外面具有一层较厚的褐色角质层, 具有较强的抗逆作用。

2.3 Snf907 真菌代谢物对大豆胞囊线虫二龄幼虫活性的影响

Snf907 菌液原液及不同稀释倍数对大豆胞囊线虫二龄幼虫都具有一定的抑杀作用。数据经 SPSS 软件方差分析, 除了 10× 和 20× 浓度之间差异不显著, 其他各浓度之间差异均显著(表 3)。

表 3 Snf907 真菌代谢物不同稀释倍数对大豆胞囊线虫二龄幼虫活性的影响

Table 3 Effects of Snf907 fungal metabolites at the different concentration on juveniles of *H. glycines*

稀释倍数 Dilution times	二龄幼虫死亡率(%) Mortality of juvenile				校正死亡率(%) The corrected mortality
	I	II	III	平均 Average	
原液	96.89	96.74	96.02	96.55a	96.33
5×	86.14	81.96	84.53	84.21b	83.18
10×	61.11	68.42	66.67	65.40c	63.15
20×	50.00	45.83	55.00	50.28c	47.04
50×	38.10	36.84	39.13	38.02d	33.99
无菌水	6.15	6.07	6.11	6.11e	—

3 结论与讨论

本试验中, Snf907 菌液对大豆胞囊线虫胞囊和分散卵粒孵化均表现了较强的抑制作用, 但其原液及其不同的稀释倍数对两者的抑制作用不同。从总体上看, Snf907 菌液原液及其稀释液大豆胞囊线虫胞囊孵化的抑制作用大于分散卵粒的抑制作用, 这与胞囊结构的抗逆性有关。Snf907 菌液原液及 5× 稀释液对大豆胞囊线虫二龄幼虫均具有较强的抑杀作用, 其原液对二龄幼虫的校正死亡率高达 96.33%, 表明 Snf907 菌液在胞囊孵化为二龄幼虫时, 对二龄幼虫的侵入具有控制作用, 从而具有较好的防治效果。

大豆胞囊线虫胞囊可以在土壤中越冬并存活数年, 是下一年大豆胞囊线虫发生的病源。本文从对大豆胞囊线虫胞囊的孵化和对二龄幼虫的活性进行测定, 旨在寻找对大豆胞囊线虫具有防治效果的新的资源。真菌种类不同, 其代谢物中的杀线虫物质、杀线虫活性也不同, 对线虫的作用机制也不同,

Anke 等从寡孢节丛孢 (*Arthrobotrys oligosporon*) 发酵液中得到一个毒杀线虫 *Caenorhabditis elegans* 的化合物亚油酸^[1]; Mayer 等和 Sterner 从奥尔类脐菇分离到一环十二缩肽物质, 它是所发现的真菌杀线虫活性代谢物中最有开发利用价值的化合物。其对南方根结线虫的 ED₅₀ 为 0.75 mg · mL⁻¹, 比商业杀线剂阿维菌素活性更高^[12]; 球孢白 (*Beauveria bassiana*) 是一种重要的昆虫病原真菌, 其产生的白僵菌素 (beauvericin) 对南方根结线虫 (*M. incognita*) 有微弱活性 (Mayer et al, 1995), 而本试验所分离得到的菌株却对根结线虫、大豆胞囊线虫均具有较强的活性, 但其对线虫的作用机理、活性物质类型、剂型以及对人畜及植物的安全性、持久性和针对性等问题有待进一步深入的研究。

参 考 文 献

- Kim D G. Biological control of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, with a soil-borne fungus [D]. University of Arkansas, Fayetteville, 1989, 108.
- 刘杏忠. 中国食线虫真菌的分类学及生态学研究 [D]. 北京: 北京农业大学, 1991.
- 陈庆恩, 白金铠著. 中国大豆病虫图志 [M]. 吉林: 吉林科学技术出版社, 1987, 64.
- 董锦艳. 真菌杀线虫代谢物的研究进展 [J]. 菌物系统, 2001, 20(2): 286—296.
- 向红琼, 冯志新. 粗皮侧耳生物学特性及其与杀线虫毒力的关系 [J]. 植物病理学报, 2000, 30(3): 271—278.
- 孙漫红, 刘杏忠, 晋治波. 淡紫拟青霉对大豆胞囊线虫卵及 2 龄幼虫的影响 [J]. 植物保护学报, 2002, 29(1): 136—141.
- 林茂松, 张治宇. 尖镰孢菌非致病菌株对南方根结线虫数量的控制 [J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(1): 40—42.
- 孙建华, 宇克莉, 陈宏, 等. Sr18 真菌代谢物防治番茄根结线虫病研究 [J]. 华北农学报, 2002, 17(1): 119—123.
- 韩熏莱. 中国农药百科全书(农药卷) [M]. 北京: 农业出版社, 1993, 377.
- Chen, S Y, Dickison D W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 2000, 32(1): 117—121.
- Anderson M G, Jarman T B, Rickards R W. Structures and absolute configurations of antibiotics of the oligosporon group from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* [J]. Antibiot 1995, 48: 391—398.
- Mayer A, Anke H, Sterner O. Omphalotin, a new cyclic peptide with potent nematocidal activity from *Omphalotus olearius*. I. Fermentation and Biological activity [J]. Nat Prod Lett, 1997, 10: 25—32.

**EFFECTS OF Snf907 FUNGAL METABOLITES ON EGG
HATCHING AND JUVENILE MORTALITY OF *HETERODERA GLYCINES***

Liu Ting^{1,2} Wang Li³ Duan Yuxi¹ Chen Lijie¹ Wang Xue¹

(1. *Plant Protection College of Shenyang Agricultural University Shenyang 110161;*

2. Institute of Plant and Environmental protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Science Beijing 100089; 3. *College of Science of China Agricultural University Beijing 100083*)

Abstract The effect of Snf907 fungal metabolites at the original, 5×、10×、20× and 50× diluted solution on cysts and individual eggs hatching and juvenile of *Heterodera glycines* were investigated. The hatching rate of cysts were suppressed by 88.34%、82.33%、74.32%、57.01% and 38.62% and the corrected mortality rate of juveniles were 96.33%、83.18%、63.15%、47.04% and 33.99%, respectively. The difference between these treatments and water control were significant. The hatching rate of individual eggs were suppressed by 98.86%、92.66%、84.19%、72.32% and 65.54%, respectively, the difference between these treatments except for 50× diluted solution and water control being significant.

Key words Fungal metabolites; *Heterodera glycines*; Cyst; Individual eggs; Juvenile

(上接第 313 页)

**ADVANCES ON THE STUDY OF AGROBACTERIUM-MEDIATED
TRANSFORMATION OF SOYBEAN**

Zhang Yinxia^{1,2} Song Xiaohua¹ Li Yinhui² Qiu Lijuan²

(1. *College of Agronomy, Ningxia University, Ningxia 750021;*

2. Institute of Crop Germplasm Resources, CAAS, Beijing 10081)

Abstract This paper introduced the receptor system used for Soybean transgenic technology and their advantages and limitations, factors influencing agrobacterium-mediated soybean transformation, research and production results of transgenic soybean. Cotyledonary node via Agrobacterium-mediated was thought to be the efficient systems of genetic transformation. Three problems existed in genetic transformation of soybean. So optimization of the transformation system would develop a high-efficiency soybean transformation system.

Key words Agrobacterium-mediated method; Soybean; Transgene; Advances