

# 大豆胞囊线虫生防菌 Snea49 代谢物对不同种类线虫的毒力

陈井生<sup>1</sup>,周园园<sup>2</sup>,朱 峰<sup>2</sup>,周长军<sup>1</sup>,孙明明<sup>3</sup>,李智媛<sup>3</sup>,段玉玺<sup>2</sup>,陈立杰<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163316; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院/北方线虫研究所,辽宁 沈阳 110866; 3. 黑龙江省农业科学院 信息中心,黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**链霉菌 Snea49 是从大豆根际中分离得到的对大豆胞囊线虫具有杀线虫活性的菌株,采用离体贝氏皿室内测定放线菌 Snea49 的发酵代谢产物对北方根结线虫、南方根结线虫、甘薯茎线虫 3 种植物寄生线虫和自由生活的小杆线虫的杀线虫活性。结果表明:处理 24 h 后,贝式小皿检测菌株 Snea49 的代谢物对北方根结线虫和南方根结线虫表现出较高的生物活性,对甘薯茎线虫毒力次之,对土壤中非靶标小杆线虫毒力最弱,即对不同种类线虫存在选择性毒力差异,而且随稀释倍数增加毒力减弱。

**关键词:**链霉菌 Snea49;代谢产物;线虫;杀线虫活性

**中图分类号:**S565. 1      **文献标识码:**A      **DOI:**10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 03. 0527

## Nematicidal Activity Analysis of Streptomyces Snea49 Metabolic Product

CHEN Jing-sheng<sup>1</sup>, ZHOU Yuan-yuan<sup>2</sup>, ZHU Feng<sup>2</sup>, ZHOU Chang-jun<sup>1</sup>, SUN Ming-ming<sup>3</sup>, LI Zhi-yuan<sup>3</sup>, DUAN Yu-xi<sup>2</sup>, CHEN Li-jie<sup>1</sup>

(1. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China; 2. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University/Plant Protection Station of Liaoning Province, Shenyang 110866, China; 3. Information Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

**Abstract:** The use of secondary metabolites of *streptomyces* is the most effective method in biological control of nematode. Strain Snea49 was isolated by diluted solution from a soil sample collected from soybean field. The toxicity of *streptomyces* Snea49 fermentation metabolic product to *Meloidogyne hapla*, *M. incognita*, *Ditylenchus destructor*, and *Caenorhabditis* sp. were tested *in vitro* in plant nematology laboratory. The result indicated the metabolic product of Snea49 had biological activity to nematodes, and significant virulence to different nematodes was detected, the more poisonous effect to nematodes was *M. hapla* and *M. incognita*, secondly was *Ditylenchus destructor*, the least was *Caenorhabditis* sp. . The toxicity became lower with dilution times increasing.

**Keywords:** *Streptomyces* Snea49; Metabolic product; Nematodes; Toxicity

大豆胞囊线虫和蔬菜根结线虫病是农作物生产中影响较大且普遍发病的重要线虫病害。大豆胞囊线虫病在我国东北三省和黄淮海地区发生严重,可致大豆减产。根结线虫广泛分布于世界各地,主要危害黄瓜、番茄等,对保护地发展构成严重威胁<sup>[1]</sup>。根结线虫寄主植物多达 3 000 多种。由于设施农业的发展,在温带和寒带不断扩大的温室等保护地农业生产使得根结线虫不断向温带和寒带蔓延。到目前为止,从我国最南部的海南省和最北部的黑龙江省都严重发病<sup>[2]</sup>。

防治植物线虫病害最安全有效的方式就是抗病育种,由于抗病育种周期长且抗病选择压力普遍存在,长期使用抗病品种会导致抗性丧失<sup>[3]</sup>。近年来,由于一些高毒化学农药被陆续限制使用,开发安全高效的杀线剂是防治大豆胞囊线虫病和蔬菜根结线虫病的工作重点<sup>[4]</sup>。植物线虫的生物防治

具有可持续治理和保持生物多样性的优势,其中利用放线菌的次生代谢产物防治植物寄生线虫病害是最有潜力的防治措施<sup>[5-6]</sup>。包括链霉菌在内的很多放线菌都是植物寄生线虫的天敌,其作用机理主要是利用次生代谢产物毒杀线虫<sup>[7-9]</sup>。

放线菌菌株 Snea49 是从辽宁省沈阳市连作大豆根际土壤分离筛选获得的具有开发潜力的生防菌株,经鉴定为环状链霉菌(*Streptomyces anulanus*),对大豆胞囊线虫具有较高的毒力<sup>[9]</sup>。本研究着重报道其代谢产物对除大豆胞囊线虫之外的蔬菜根结线虫(北方根结线虫、南方根结线虫)和甘薯茎线虫以及土壤中腐生的小杆线虫 4 种不同种类线虫的杀线虫活性,旨在为进一步开发应用菌株防治大豆胞囊线虫及其多种线虫病害的广谱性杀线虫剂奠定理论基础。

收稿日期:2014-11-28  
基金项目:黑龙江省农业创新工程重点项目(2012ZD006)。  
第一作者简介:陈井生(1982-),男,博士,助理研究员,主要从事大豆抗线虫育种和线虫病害控制研究。E-mail: jingsheng6673182@163. com。  
通讯作者:陈立杰(1971-),女,教授,博导,主要从事植物病理学和植物线虫学研究。E-mail: chenlijie0210@163. com。

1 材料与方法

1.1 供试线虫培养

1.1.1 根结线虫 2 龄幼虫 南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*):采自受南方根结线虫侵染严重的番茄,将番茄根系取出带回实验室,自来水冲洗后取下卵囊,放在 1% 的次氯酸钠中消毒 3 min,然后用无菌水反复冲洗 3 次,置于 25℃ 恒温培养,3 d 后陆续收集新孵化的南方根结线虫 2 龄幼虫,4℃ 冰箱中备用。

1.1.2 北方根结线虫 北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*) 在温室中盆栽番茄繁殖。将番茄种子播种在育苗床中,待番茄苗长到 20 cm 左右,稍显粗壮时移为盆栽。接种北方根结线虫,一个月后,根部会产生大量卵囊。将根取出并洗去泥土,用镊子挑取卵囊置于培养皿中,用 1% 的次氯酸钠处理 3 min,再用无菌水冲洗 3 次,置于 25℃ 培养箱中进行孵化。3 d 后每天收集 J2,4℃ 保存备用。

1.1.3 甘薯茎线虫 甘薯茎线虫(*Ditylenchus destructor*)采自受茎线虫侵染严重的甘薯。将发病薯块放在盛有少量无菌水的培养皿里,室温条件下,24 h 后采用贝曼漏斗法分离并收集活的茎线虫。

1.1.4 小杆线虫 小杆线虫(*Caenorhabditis* sp.) 由沈阳农业大学北方线虫研究所提供,接种 NA 培养基上培养,7 d 后在贝曼漏斗中收集分离获得大量小杆线虫,置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 供试菌株发酵液的制备

1.2.1 菌株活化培养 在无菌环境下,将保存的菌种接入高氏 1 号培养基。将平板上长出的放线菌单菌落用灭菌的移植钩转入新的培养基平板进行继代培养 2~3 代,直到菌株纯化为止,如有杂菌及时转出。分离获得的菌株 Snea49 经纯化后,4℃ 斜面保存。

1.2.2 摇瓶培养 取经活化的菌株 Snea49,用 Tween-80 和无菌水制备成  $10^9$  cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液。以培养基 2% 的比例接种 100 mL 液体发酵 PD 培养基的三角瓶中,28℃ 150 r·min<sup>-1</sup> 摇瓶培养 7 d。

1.2.3 发酵液的获取 将发酵液  $10\,000$  r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min,即为所要菌种的发酵滤液。用无菌水将发酵液依次稀释 1(原液),5,10,15,20 倍共 5 个浓度梯度,4℃ 保存备用。

1.3 待测菌株杀线虫活性的测定

在经灭菌的 24 孔细胞培养板中加入不同稀释浓度的菌株 Snea49 发酵液 200 μL,然后分别向处理和对照中各加入 100 条新孵化的供试线虫进行毒力测定。放入 25℃ 培养箱中,24 h 后于倒置显微镜检

查并记录线虫活虫数和死虫数。24 h 观察线虫的死亡情况,虫体僵直不动,体壁无折光性,NaOH 刺激后仍不具有活动性判断为死虫。计算死亡率和校正死亡率,以无菌水作对照。处理和对照各 3 次重复。

线虫死亡率(%) = (死亡线虫数/供试线虫数) × 100

校正死亡率(%) = (处理线虫死亡率 - 对照线虫死亡率)/(1 - 对照线虫死亡率) × 100

1.4 数据分析

采用 Excel 2003 进行数据处理分析。

2 结果与分析

2.1 供试菌株对根结线虫 J2 的杀线虫活性影响

以蔬菜根结线虫为靶标线虫,发酵液处理 24 h 后对南方根结线虫和北方根结线虫均有一定的抑制作用,对两种根结线虫防效没有明显差异。其中 1 倍液对南方根结线虫和北方根结线虫的毒力分别为 92.50% 和 91.56%。随着稀释倍数的增加,对两种线虫的毒力作用逐渐减弱(表 1)。放线菌菌株 Snea49 代谢产物对根结线虫具有较强的毒杀效果,虫体死亡后虫体僵直。线虫起初表现为虫体扭曲、颤抖、痉挛,接着线虫游动缓慢,显著明显抑制根结线虫运动频率,最后线虫反应迟钝,摆动减慢,首尾同侧展开,标志着线虫死亡。

2.2 供试菌株对甘薯茎线虫和小杆线虫活性的杀线虫活性影响

试验结果表明:发酵液稀释 1 倍液处理甘薯茎线虫 24 h 后,其校正死亡率达到 81.36%,而发酵液稀释 5 倍的杀线虫活性下降 69.31%,发酵液稀释 20 倍的校正死亡率仅为 12.54%,但与对照相比差异达到显著水平(表 2)。

小杆线虫为土壤腐生线虫,一般对植物不造成直接危害,是非靶标线虫;基于环境安全性和不破坏土壤生物多样性角度考虑,用作靶标对发酵液进行筛选有重要意义。发酵液稀释 5 倍以上浓度对小杆线虫的毒力为 10.87%,而在稀释 20 倍浓度对小杆线虫没有活性(表 2)。

总体来看,Snea49 发酵液对两种根结线虫具有较高的杀线虫活性,其次是甘薯茎线虫,对小杆线虫的毒力作用最小,说明该菌株有一定研究潜力。Snea49 菌株发酵液不耐稀释,不能直接利用发酵液进行工厂化生产,因此应继续深入研究其杀线虫的活性物质分离纯化和结构解析,明确杀线虫活性物质的先导化合物,进一步进行生物合成研究。

表 1 Sne49 代谢产物对根结线虫的杀线虫活性

Table 1 Nematicidal activity of Sne49 against *M. hapla* and *M. incognita*

发酵液稀释倍数 Dilution factor	南方根结线虫 <i>M. incognita</i>		北方根结线虫 <i>M. hapla</i>	
	平均死亡率	校正死亡率	平均死亡率	校正死亡率
	Mortality rate/ %	Corrected mortality rate/ %	Mortality rate/ %	Corrected mortality rate/ %
1	92. 50 a	92. 50	91. 67 a	91. 56
5	75. 83 b	75. 83	78. 42 b	78. 15
10	48. 50 c	48. 50	51. 00 c	50. 38
15	21. 67 d	21. 67	32. 60 d	31. 75
20	14. 26 d	14. 26	17. 36 e	16. 31
无菌水 Sterile water	0. 00	—	1. 25	—

数字后小写字母表示 Duncan’s 新复极差测验差异显著( $P<0.05$ )。下同。

Values followed by different lowercase letters in the same column are significantly different ( $P<0.05$ ) according to Duncan’s New Multiple Range Test. The same below.

表 2 Sne49 代谢产物对甘薯茎线虫和小杆线虫的杀线虫活性

Table 2 Nematicidal activity of Sne49 against *Ditylenchus destruct* and *Caenarhabditis* sp.

发酵液稀释倍数 Dilution factor	甘薯茎线虫 <i>Ditylenchus destructo</i>		小杆线虫 <i>Caenarhabditis</i> sp.	
	平均死亡率	校正死亡率	平均死亡率	校正死亡率
	Mortality rate/ %	Corrected mortality rate/ %	Mortality rate/ %	Corrected mortality rate/ %
1	81. 83 a	81. 36	14. 82 a	14. 82
5	70. 08 b	69. 31	10. 87 b	10. 87
10	45. 39 c	43. 99	7. 15 c	7. 15
15	31. 42 d	29. 66	2. 00 d	2. 00
20	12. 54 e	10. 30	0. 00e	0
无菌水 Sterile water	2. 50 f	—	0. 00e	—

3 结论与讨论

很多放线菌菌株是防治植物线虫病害的潜在优良生防菌株,具有潜在的开发应用价值。本试验中菌株 Sne49 的代谢物对两种生产上常见的蔬菜根结线虫表现出较高的生物活性,对甘薯茎线虫线虫毒力较弱,对非靶标土壤中小杆线虫毒力最弱,即对不同种类线虫存在选择性毒力差异,Snea49 是新的防治植物寄生线虫的微生物菌种资源,且防效稳定,在植物寄生线虫的生物防治方面表现出巨大潜力。

生物防治是具有重要影响的和极具发展潜力的有害生物控制策略和技术,生物防治植物线虫病害为国内外研究和应用的热点之一,也是植物线虫病害可持续控制的有效途径。生物防治方法因其对环境友好,能够真正实现可持续发展,逐渐成为解决包括植物寄生线虫在内的土传病害的重要措施,但是因为生防菌在土壤中难以定殖或定殖后缺乏有效载体,导致外源的生防菌株很难成为优势种群,影响生防效果的稳定性。

土壤是放线菌主要的栖居场所,尤其是含水量

低、有机物丰富、呈中性或微碱性的土壤中数量最多,很多抗生素都是从土壤中分离获得的<sup>[11]</sup>。链霉菌通过自身复杂次生代谢积累丰富的天然活性物质,进而产生多种抗生素<sup>[12-13]</sup>。链霉菌次生代谢产物的生物合成受到严格和复杂的调控,链霉菌抗生素的形成是由基因簇控制的。通过基因敲除和位于高拷贝质粒上增强表达等手段确定了某些抗生素合成途径受专一性调控。此外,链霉菌中的群感效应和双因子系统,在抗生素等次生代谢产物合成中起重要的调控作用。从链霉菌中筛选新型杀线虫活性物质开发生物杀线剂是当今研究的重点,生物农药在植物病害的可持续控制和绿色农业中将会发挥越来越重要的作用<sup>[9]</sup>。

参考文献

[1] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000: 285-288. ( Liu W Z. Plant pathogen nematology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000;285-288. )

[2] 段玉玺. 大豆胞囊线虫病及其防治[J]. 北京:金盾出版社, 2006;44-51. ( Duan Y X. Soybean cyst nematode disease and control[M]. Beijing:Jindun Press, 2006;44-51. )

( 下转第 544 页 )

H. Plant wax and its response to environmental conditions and over-view[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(2): 565-574. )

[5] Xu S J, Jiang P A, Wang Z W, et al. Crystal structures and chemical composition of leaf surface wax depositions on the desert moss *syntrichia caninervis* [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2009, 37(6): 723-730.

[6] Gonzalez A, Ayerbe L. Effect of terminal water stress on leaf epicuticular wax load, residual transpiration and grain yield in barley [J]. *Euphytica*, 2010, 172(3): 341-349.

[7] 顾俊, 王飞, 张鹏, 等. 植物叶表皮蜡质的生物学功能[J]. *江苏农业学报*, 2007, 23(2): 144-148. ( Gu J, Wang F, Zhang P, et al. Biological function of epicuticular wax[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2007, 23(2): 144-148. )

[8] 李灵之, 马杰, 向建华, 等. 植物角质层内外蜡质的差异及其与抗逆性的关系[J]. *植物生理学报*, 2011, 47(7): 680-684. ( Li L Z, Ma J, Xiang J H, et al. Composition differences of epicuticular and intracuticular wax layers and the relationship between cuticle and plant stress tolerance [J]. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(7): 680-684. )

[9] 姬生栋, 王育水, 贾振杰, 等. 不同产量水平小麦叶片表面超微结构初探[J]. *河南农业科学*, 2003(9): 4-7. ( Ji S D, Wang Y S, Jia Z J, et al. Structure preliminary study on blade surface ultramicroscopic of spring wheat with different yield level [J]. *Henan Agricultural Sciences*, 2003(9): 4-7. )

[10] 吴杏春, 林文雄, 黄忠良. UV2B 辐射增强对两种不同抗性水稻叶片光合生理及超显微结构的影响[J]. *生态学报*, 2007, 27(2): 554-563. ( Wu X C, Lin W X, Huang Z L. Influence of enhanced ultraviolet 2B radiation on photosynthetic physiologies and ultrastructure of leaves in two different resistivity rice cultivars [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(2): 554-563. )

[11] 邵云, 姜丽娜, 李万昌, 等. 砷、铅胁迫对小麦幼苗毒害效应及叶片下表皮扫描电镜观察[J]. *西北农业学报*, 2009, 18(1): 133-138. ( Shao Y, Jiang L N, Li W C, et al. Toxic effects of as and Pb to wheat seedling and scanning electron-microscopic observation on nether epidermis of leaves[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009, 18(1): 133-138. )

[12] 高臣, 刘俊渤, 常海波, 等. 硅对水稻叶片光合特性和超微结构的影响[J]. *吉林农业大学学报*, 2011, 33(1): 1-4. ( Gao C, Liu J B, Chang H B, et al. Effects of silicon on rice leaf photosynthesis and ultrastructure[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2011, 33(1): 1-4. )

[13] Kwan Su Kim, Si Hyung Park, Dong Kwan Kim, et al. Influence of water deficit on leaf cuticular waxes of soybean (*Glycine Max* [L.] Merr.) [J]. *International Journal of Plant Sciences*, 2007, 168(3): 307-316.

[14] 周小云, 陈信波, 徐向丽, 等. 稻叶表皮蜡质提取方法及含量的比较[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2007, 33(3): 273-276. ( Zhou X Y, Chen X B, Xu X L, et al. On comparison of extraction methods of epicuticular wax and content of rice leaves [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2007, 33(3): 273-276. )

[15] 王学东, 崔琳, 向文胜. 植物叶片表面蜡质除去方法的研究[J]. *东北农业大学学报*, 1999, 30(4): 412-414. ( Wang X D, Cui L, Xiang W S, Studies method for the remdval plants leaves surface waxiness[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 1999, 30(4): 412-414. )

[16] 杨艳青. 苹果果实表皮蜡质结构观察与组分分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013. ( Yang Y Q. The structure observation and component analysis of apple fruit epicuticular wax [D]. Yangling: Northwest Agricultural and Forestry University, 2013. )

(上接第 529 页)

[3] 陈立杰, 陈井生, 魏峰, 等. 放线菌及其代谢物对植物线虫的生物防治研究进展 [C]. *中国线虫学研究(第二卷)*, 2008(2): 270-275. ( Chen L J, Chen J S, Wei F, et al. Review of the actinomycetes and metabolites against plant nematodes [C]. *Nematology Research in China*, 2008(2): 270-275. )

[4] Dicklow M B, Acosta N, Zuckerman B M. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 1993, 19(2): 159-173.

[5] Chubachi K, Furukawa M, Fukuda S, et al. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumbers caused by *Meloidogyne incognita* [J]. *Biocontrol Science*, 2002, 7(1): 25-29.

[6] Zeng Q, Huang H, Zhu J, et al. A new nematocidal compound produced by *Streptomyces albogriseolus* HA10002 [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(5): 1107-1111.

[7] 陈立杰, 陈井生, 段玉玺, 等. 防治大豆胞囊线虫生防放线菌的初步筛选研究[J]. *植物保护*, 2008, 34(3): 116-119. ( Chen L J, Chen J S, Duan Y X, et al. Screening of actinomycetes against soybean cyst nematode [J]. *Plant Protection*, 2008, 34(3): 116-119. )

[8] 陈立杰, 陈井生, 董健, 等. 放线菌次生代谢产物对不同来源大豆胞囊线虫 J2 毒性的研究[J]. *大豆科学*, 2008, 27(4): 637-640. ( Chen L J, Chen J S, Dong J, et al. Toxicity of second-ary metabolites of actinomycetes on heterodera glycines J2 [J]. *Soybean Sicece*, 2008, 27(4): 637-640. )

[9] 陈立杰, 陈井生, 郑雅楠, 等. 大豆胞囊线虫生防放线菌 Snea253 的鉴定及对线虫的抑制作用[J]. *中国生物防治*, 2009, 25(1): 66-69. ( Chen L J, Chen J S, Zheng Y N, et al. Identification of the strain Snea253 and effects of metabolites of actinomycetes on mortality of soybean cyst nematode [J]. *China Biological Control*, 2009, 25(1): 66-69. )

[10] 陈井生, 陈立杰, 刘大伟, 等. 放线菌 Snea49 的种类鉴定及对胞囊线虫的活性评价大豆科学, 2010, 29(4): 663-665. ( Chen J S, Chen L J, Liu D W, et al. Identification of the strain Snea49 and evaluation for nematocidal activity against soybean cyst nematode [J]. *Soybean Science*, 2010, 29(4): 663-665. )

[11] Samac D A, Kinkel L L. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp [J]. *Plant and Soil*, 2001, 235(1): 35-44.

[12] 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.

[13] János Bérdy. Bioactive microbial metabolites [J]. *Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1-26.