

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

陈立杰, 陈井生, 董 健, 朱晓峰, 王媛媛, 段玉玺

(沈阳农业大学植物保护学院植物线虫学研究室, 辽宁 沈阳 110161)

摘 要: 抗生素是控制植物病害的重要手段之一, 而放线菌是抗生素的主要产生菌。针对已筛选到的 5 株放线菌 C25-3、H-4、H-2、C44 和 C49, 利用室内培养法对其发酵液抑制田间大豆胞囊线虫 J2 混合群体的活性作用进行了比较研究。结果表明: 发酵液 4 × 稀释浓度下, 处理 24 h 后, C25-3 对大豆胞囊线虫 J2 的毒性最高, 其校正死亡率达到 95% 左右; 其他 4 株菌的次生代谢产物也具有一定的毒杀作用, 对 J2 的校正死亡率均达到 60% 以上。5 株放线菌菌株中, C25-3、H-2 和 C44 对大豆胞囊线虫 J2 的毒性不因线虫的致病性和活性差异而改变, 而 C49 和 H-4 表现出因线虫的致病性和活性差异而改变的特性。

关键词: 放线菌; 代谢产物; 大豆胞囊线虫 J2; 毒性

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)04-0637-04

Toxicity of Secondary Metabolites of Actinomycetes on *Heterodera glycines* J2

CHEN Li-jie, CHEN Jing-sheng, DONG Jian, ZHU Xiao-feng, WANG Yuan-yuan, DUAN Yu-xi

(Plant Nematology Laboratory, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: Plant parasitic nematode could be controlled by antibiotics effectively. It is well-known that actinomycetes should be able to produce antibiotics. At present, we had screened 5 strain actinomycetes, and tested their activity on soybean cyst nematode J2 by means of separate technique and intro-culture fermentation. Effects of secondary metabolites of actinomycetes on *Heterodera glycines* J2 showed that: fermentation filtrates of strain C25-3 manifested the highest level of toxicity on J2, and the other strains also had been effective. The corrected mortality rate of J2 reached 95% by strain C25-3 at 4 diluted solution, and the other strains also reached beyond 60%. Activity of the strains C25-3, H-2 and C44 had never varied with different phenotype cyst nematodes J2 which came from Heilongjiang and Liaoning province, on the contrary, the strains C49 and H-4 displayed different level of toxicity. The phenotype cyst nematodes of Heilongjiang included race 3, race 4 and race 14, and that of Liaoning only included race 3. So we found some actinomycetes could produce broad spectrum antibiotics for different phenotype cyst nematodes and others were opposite in this research.

Key words: Actinomycetes; Metabolites; *Heterodera glycines* J2; Toxicity

大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines* Ichinohe, 1952) 病是世界性分布的大豆主要病害之一。我国大豆胞囊线虫分布广泛, 在主要大豆产区造成严重危害, 而且由于大豆各产区具有地理环境的复杂性和种植品种的多样性, 增加了该病的防治难度。随着可持续农业和有机农业的发展, 大豆胞囊线虫病的生物防治已经受到了国内外的广泛重视^[1-3]。放线菌作为抗生素的主要产生菌, 其代谢途径复杂, 产生的次生代谢产物在结构类型和生物活性等方面都呈现出与细菌和真菌不同的特点和多样性^[4-5]。很多放线菌的代谢产物如阿维菌素 (Avermectins)、南

昌霉素 (Nanchangmycin) 等都具有较高的杀线虫活性。

大豆胞囊线虫作为一种专性寄生物, 存在明显的生理分化现象, 线虫的田间群体是混合群体, 其致病型并不整齐一致^[6], 连续种植抗病品种, 由于抗病基因对线虫群体的选择作用, 田间线虫的生理小种会发生改变^[7]。有研究报道了安达盐碱地作物研究所的大豆田多年种植抗病品种后, 大豆胞囊线虫生理小种类型发生了变异。安达抗病品种连作 6 a 大豆胞囊线虫 3 号生理小种变为 14 号小种, 连种 4 a 变为 1 号小种^[8]; 连作 13 a 变为 1 号和 4 号生

收稿日期: 2008-02-29

基金项目: 霍英东青年教师基金资助项目 (101033); 国家自然科学基金资助项目 (30671399); 辽宁省优秀人才支持计划资助项目。

作者简介: 陈立杰 (1971-), 女, 副教授, 博士, 现从事植物病理学和线虫学的教学和科研工作。E-mail: chenlj@syau.edu.cn。

理小种^[9],该试验地的胞囊线虫是含有不同生理小种类型的混合群体。针对生防菌而言,成功的生防菌应对病原物的生理小种不具有专化性,因此,研究放线菌的代谢物对大豆田间混合胞囊线虫群体的作用具有重要的意义。现分别测试了几株生防放线菌对大豆胞囊线虫单一小种和混合小种 J2 的毒杀活性,以期筛选获得高效稳定、并对不同生理小种的胞囊线虫混合群体都具有高毒力的生防放线菌菌株,为生产上大豆胞囊线虫的生物防治提供新的微生物来源。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

采用的菌株 C25-3 分离自吉林省辽源市,H-4 和 H-2 分离自黑龙江省哈尔滨市延寿县,C44 和 C49 分离自辽宁省沈阳市。

1.2 大豆胞囊线虫单一致病型胞囊的分离和 J2 的孵化

1.2.1 大豆胞囊线虫 3 号生理小种新鲜胞囊和 J2 的获得 将感病品种辽 11 种植在沈阳农业大学北方线虫研究所线虫繁殖圃,一代胞囊成熟后挖出整个根系,体视镜下挑取根上的新鲜胞囊,选取新鲜饱满成熟的胞囊和卵囊在 0.5% NaOCl 溶液中消毒 3 min,无菌水冲洗 3 遍,在 25℃ 于无菌水中孵化 J2。每天及时收集新孵化出的 J2。

1.2.2 大豆胞囊线虫 3 号生理小种越冬胞囊和 J2 的获得 春季种植大豆前从本单位线虫繁殖圃采集土样,采用改良淘洗-过筛法分离胞囊,在体视镜下用自制的玻璃挑针挑出饱满成熟的褐色胞囊。胞囊在 0.5% NaOCl 溶液中消毒 3 min,无菌水反复冲洗 3 次后,在 25℃、0.5 mmol·L⁻¹ ZnSO₄·5H₂O 溶液中孵化 J2。及时更换处理液并收集新孵化出的 J2。

1.3 田间混合群体的大豆胞囊线虫胞囊和 J2 的获得

从黑龙江省农业科学院大庆分院安达盐碱地作物研究所大豆育种基地随机五点取样,采用改良淘洗-过筛法从土壤中分离胞囊,该实验地由于连种抗病品种产生选择压力,已使大豆胞囊线虫 3 号生理小种分化成 1 号、4 号和 14 号。在田间属于混合群体形式存在。胞囊孵化方法同 1.2.2。

1.4 放线菌菌株代谢物对靶标线虫的作用

取制备好 10⁹ cfu·mL⁻¹ 的菌悬液放到马铃薯培养液中振荡培养 7 d,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上

清液稀释 4×,放入 4℃ 冰箱中备用。在 0.6 mL 发酵滤液中加入新孵化的 J2,24 h 后观察线虫的死亡情况,重复 3 次。以无菌水作为对照。

1.5 计算方法

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%

2 结果与分析

2.1 放线菌菌株代谢物对 3 号生理小种新鲜胞囊孵化 J2 的影响

28℃ 条件下振荡培养 7d 得到的发酵液经离心后,在 4× 稀释浓度下,24 h 对大豆胞囊线虫 3 号生理小种新鲜胞囊孵化的 J2 均有一定的致死作用。结果表明,C25-3 处理的 J2 校正死亡率达到 95.23%,活性最高,与其他菌株相比差异均显著。H-2、C49 和 H-4 对 J2 校正死亡率相近,均达到 70% 以上,C44 对二龄幼虫的校正死亡率为 62.80%,活性最低,但均与对照相比达极显著差异水平(表 1)。

表 1 放线菌菌株代谢物对 SCN3 号小种新鲜胞囊孵化 J2 的作用

Table 1 The effect of different strains on J2 of new cyst of SCN Race 3

菌株 Strains	死亡率 Mortality of juvenile/%			平均死亡率 Average/%	校正死亡率 The corrected ratio/%
	I	II	III		
C25-3	100.00	93.33	92.86	95.40aA	95.23
H-4	77.78	69.23	72.73	73.25bcBC	72.30
H-2	86.36	80.00	71.43	79.26bB	78.53
C44	55.56	70.00	66.67	64.07cC	62.80
C49	81.25	71.43	78.57	77.08bBC	76.27
CK	5.00	5.26	0.00	3.42dD	-

数字后字母为 Duncan's 新复极差测验结果,不同大小写英文字母分别表示在 P<0.01 和 P<0.05 水平上差异显著。下同。

The letters in table were the results of Duncan's test. Capital and small letter indicated P<0.01 and P<0.05 separately. The same as below.

2.2 放线菌菌株代谢物对 3 号小种越冬胞囊孵化 J2 的影响

结果表明,C25-3 对大豆胞囊线虫越冬胞囊孵化的 J2 有较高的毒杀作用,发酵液稀释 4× 处理 24 h 后,J2 校正死亡率达到 94.84%,与其他几株相比差异均极显著。C49、C44、H-4 和 H-2 对处理的 J2 校正死亡率差异不显著,均在 70% 左右。5 株菌与对照相比均达极显著差异水平(表 2)。

表2 放线菌菌株代谢物对 SCN 3 号小种
越冬胞囊孵化 J2 的作用

Table 2 The effect of different strains on J2 of old cyst of SCN Race 3					
菌株 Strains	死亡率			平均死亡率 Average/%	校正死亡率 The corrected ratio/%
	Mortality of juvenile/%				
	I	II	III		
C25-3	100.00	91.67	92.86	94.84aA	94.84
H-4	79.17	60.00	70.00	69.72bB	69.72
H-2	64.29	86.67	62.50	71.15bB	71.15
C44	55.56	75.00	77.78	69.45bB	69.45
C49	70.00	72.73	70.00	70.91bB	70.91
CK	0.00	0.00	0.00	0.00cC	—

2.3 放线菌菌株代谢物对田间混合群体的大豆胞囊线虫 J2 的影响

5 株菌对田间混合群体的大豆胞囊线虫 J2 均有不同程度的抑制作用,与对照相比达极显著差异水平。其中 C25-3 处理后 J2 的校正死亡率达 96.59%,与其他几株相比差异均极显著。H-4 和 H-2 对 J2 的活性次之,校正死亡率分别为 87.29% 和 73.97%。C44 为中等水平,校正死亡率达到 64.05%。C49 对田间混合群体 J2 的活性与其他 4 株菌比较相对最低,校正死亡率仅为 53.13%;但是对胞囊线虫 3 号小种 J2 却有相对较高的活性,对新鲜胞囊线虫 J2 和越冬胞囊线虫 J2 的校正死亡率均在 70% 以上,说明 C49 代谢物对 3 号小种 J2 具有一定的专化性,从而导致对不同生理小种 J2 活性存在差异(表 3)。

表3 放线菌菌株代谢物对 SCN 不同致病型 J2 的作用
Table 3 The effect of different strains on J2 of different
pathogenic phenotypes of SCN

菌株 Strains	死亡率			平均死亡率 Average/%	校正死亡率 The corrected ratio/%
	Mortality of juvenile/%				
	I	II	III		
C25-3	100.00	90.00	100.00	96.67aA	96.59
H-4	72.73	100.00	90.00	87.58aAB	87.29
H-2	80.00	80.00	63.64	74.55bBC	73.97
C44	70.00	54.55	70.00	64.85bcCD	64.05
C49	75.00	63.64	72.73	54.17cD	53.13
CK	0.00	0.00	6.67	2.22dE	—

3 结论与讨论

研究结果显示,筛选出的 5 株放线菌菌株中,C25-3 对所有供试的不同致病型 J2 的活性最高,另外,C25-3、H-2 和 C44 对大豆胞囊线虫 J2 的毒性不因线虫的致病型和活性差异而改变,而 C49 和 H-4 表现出因线虫的致病性和活性差异而改变的特性。

目前,人们正在探索如何筛选高效、稳定的线虫生防放线菌的方法。Skantar 根据胞囊孵化时间的快慢将大豆胞囊线虫的胞囊分为 TN17 和 TN18 两种类型,室内研究了格兰德霉素(Geldanamycin)对 TN17 和 TN18 孵化的二龄幼虫活性的影响,结果表明:格兰德霉素对来源不同的胞囊孵化的二龄幼虫活性有一定的差异^[10]。

考虑到胞囊线虫会因越冬或生理分化所导致的 J2 活性不一致,因此选择了黑龙江省安达市常年抗线育种基地中胞囊的混合群体(含有 3 号、4 号和 14 号小种^[8-9])为研究对象,研究了不同放线菌次生代谢产物对胞囊混合群体孵化出的 J2 毒杀活性所表现出差异,说明不同生防菌对不同毒力和活性的 J2 作用机制不同,这可能是由于大豆胞囊线虫的生理分化或地理差异而导致 J2 的抗性存在差异;还有可能是放线菌的次生代谢产物复杂,往往含有多个有效组分,导致对不同来源胞囊孵化的 J2 活性存在差异。其他相关研究也显示,不同生防菌次生代谢物质对不同种类线虫的毒性明显不同^[11-12]。

生防放线菌是一种很有潜力的生物防治资源,对于活性菌株的次生代谢产物中活性物质的分离纯化以及安全性评价还有待进一步研究。生防放线菌除产生抗生素之外,还可能同时具有多种生防机制,必须全面分析和利用,才能达到最佳的防治效果,从而控制有害生物的为害。

参考文献

[1] 陈立杰,段玉玺,王媛媛,等.不同细菌菌株对大豆根腐病菌及胞囊线虫病的影响[J].沈阳农业大学学报,2006,37(6):831-834. (Chen L J,Duan Y X,Wang Y Y,et al. Bio-effect of different bacterial strains on soybean root rot pathogens and *Heterodera glycines*[J]. Journal of Shenyang Agricultural of University,2006,37(6):831-834.)

[2] 陈立杰,段玉玺,范圣长,等.大豆胞囊线虫病的生防因子研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(增):190-194. (Chen L J,Duan Y X,Fan S C,et al. Advances in antagonists of soybean cyst nematode[J]. Journal of Northwest Agriculture and Forest of University,2005,33 (Appl.):190-194.)

[3] 段玉玺.大豆胞囊线虫病及其防治[M].北京:金盾出版社,2006:44-51. (Duan Y X. Soybean cyst nematodes disease and control[M]. Beijing:Jindun Press,2000:44-51.)

[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] Deborah A S,Linda L K. Suppression of the root-lesion (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by Streptomyces pp

- [J]. Journal of Plant and Soil, 2001, 235: 35-44.
- [6] Riggs R D, Schmitt D P. Complete characterization of the scheme for *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 1988, 20 (3): 392-395.
- [7] 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: Agriculture Press, 2000: 285-288.)
- [8] 于佰双, 王家军, 崔丽伟, 等. 连种抗线大豆品种 (系) 对大豆胞囊线虫的选择作用 [J]. 黑龙江农业科学, 1999 (3): 4-6. (Yu B S, Wang J J, Cui L W, et al. Effects of continuous planting of resistant soybean cultivars on races of soybean cyst nematode [J]. Heilongjiang Agricultural sciences, 1999 (3): 4-6.)
- [9] 田中艳, 高国金, 周长军, 等. 大豆胞囊线虫生理小种变异的研究 [J]. 大豆科学, 2007, 26 (2): 290-292. (Tian Z Y, Gao G J, Zhou C J, et al. Study of the variation of soybean cyst nematode [J]. Soybean Science, 2007, 26 (2): 290-292.)
- [10] Andrea M S, Keli A, Susan F M, et al. Effects of geldanamycin on hatching and juvenile motility in *Caenorhabditis elegans* and *Heterodera glycines* [J]. Journal of Chemical Ecology, 2005, 1 (10): 2481-2491.
- [11] 王媛媛, 段玉玺, 王旭, 等. 生防细菌 J352 对不同种类线虫的毒力差异研究 [J]. 农药, 2007, 46 (3): 202-203. (Wang Y Y, Duan Y X, Wang X, et al. Toxicological difference of bio-control bacteria J352 against different species of nematode [J]. Pesticide, 2007, 46 (3): 202-203.)
- [12] 陈立杰, 张国栋, 段玉玺, 等. 沈阳地区大型真菌对不同种类线虫的毒力 [J]. 农药, 2008, 47 (3): 221-224. (Chen L J, Zhang G D, Duan Y X, et al. Nematicidal activity to different nematodes of basidiomycetes from Shenyang [J]. Pesticide, 2008, 47 (3): 221-224.)

第五届中国大豆加工利用大会将在印度博帕尔召开

国际大豆加工利用大会 (The International Soybean Processing and Utilization Conference, ISPUC) 是大豆加工利用研究重要的国际交流平台, 在大豆研究上具有重要的地位和广泛的影响, 该大会已经举办了四届, 分别是:

ISPUC-I Gonzhuling & Beijing, China June 26- July 2, 1991

ISPUC- II Bangkok, Thailand January 8-13, 1996

ISPUC- III Tsukuba, Japan October 15-20, 2000

ISPUC- IV Foz do Iguassu, Brazil February 29- March 5, 2004

第五届中国大豆加工利用大会 (ISPUC- V 2008) 将于 12 月 10-14 日在印度博帕尔举行, 由印度农业工程中央研究所和大豆加工利用中心承办, 大会委员会成员为:

Dr Karl Weingartner, USA: Chairman

Dr G S Chouhan, India: Vice- Chairman

Dr Akinori Noguchi, Japan: Secretary

Dr. Vidyadhar Kawalkar, India: Member

Dr Li Lite, China: Member

Dr Somsak Srisombun, Thailand: Member

Dr Jean Dayde, France: Member

Dr Cornelius Muthuri, Kenya: Member

Dr Jose Marcos Mandarino, Brazil: Member

大会主要议题为:

1 Production for Processing and Utilization (Varietal variability of soybean for specific end uses)

2 Quality Control (Post harvest management of soybean for processing)

3 Nutrition and Physiological Functionality (Role of soybean as nutritional, therapeutic and functional food)

4 Traditional Foods (Technology for soy based traditional oriental foods)

5 Modern Processing for Value Added Diversified Soy Food Products (Processing soybean using chemical, physical, and biological methods)

6 Oil and Soy-meal (New processing technologies for soy-oil and soy-meal)

7 Innovative/ New Industrial Uses (Industrial uses of soybean and by-products)

8 Strategies for Dissemination of Technology (Policy to enhance soybean utilization and marketing strategy)

大会论文接收截止日期:

摘要接收: 2008. 8. 30 以前

采用通知时间: 2008. 09. 15

全文接收时间: 2008. 10. 15

详细信息参见: http://www.ciae.nic.in/ispuc_v_2008_first_circular.pdf