

放线菌 Snea49 的种类鉴定及对胞囊线虫的活性评价

陈井生^{1,2}, 陈立杰¹, 刘大伟¹, 朱晓峰¹, 王媛媛¹, 段玉玺¹

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆, 163316)

摘 要:采用稀释分离法从辽宁沈阳市土壤中分离到 1 株放线菌 Snea49。对 Snea49 进行了形态学特征、培养特征、生理生化特征及 16S rDNA 分析, 初步鉴定为环状链霉菌 (*Streptomyces anulatus*)。利用离体测试法, 研究了 Snea49 菌株代谢物不同倍数稀释液对大豆胞囊线虫的抑制作用。结果表明: 10 倍稀释液浓度下, 该菌株对胞囊孵化的相对抑制率达 82.60%, 与无菌水对照差异显著。处理 24 h 后, 在 1 倍稀释液浓度下, 该菌株对 2 龄幼虫的校正死亡率是 89.66%, 各稀释浓度均与无菌水对照差异显著, 该菌株有较高的杀线活性。

关键词:放线菌; 大豆胞囊线虫; 16S rDNA; 2 龄幼虫

中图分类号:S154.38

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2010)04-0663-03

Identification of the Strain Snea49 and Evaluation for Nematicidal Activity Against Soybean Cyst Nematode

CHEN Jing-sheng^{1,2}, CHEN Li-jie¹, LIU Da-wei¹, ZHU Xiao-feng¹, WANG Yuan-yuan¹, DUAN Yu-xi¹

(1. Plant Nematology Laboratory, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning; 2. Daqing Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, Heilongjiang, China)

Abstract: Strain Snea49, was isolated by diluted solution from a soil sample collected in Liaoning province. The results based on characteristics of morphological, physiology and biochemistry and 16S rDNA sequence analysis of strain Snea49 showed that it was *Streptomyces anulatus*. Fermentation filtrates of *Streptomyces anulatus* at different concentrations were evaluated for nematicidal activity against soybean cyst nematode in the laboratory, bioassays included egg hatching and mortality of second stage juvenile. The hatching rate of cysts were suppressed by 82.60% at 10 × diluted solution. The corrected mortality rates of juveniles were 89.66% when J2 were treated with the strain at 1 × dilution for 24 hours. The difference between these treatments and water control were significant. Fermentation filtrates of the strains were effective in inhibiting *H. glycines* hatch and killing J2.

Key words: Actinomycetes; *Heterodera glycines*; 16S rDNA; second stage juvenile (J2)

大豆胞囊线虫病 *Heterodera glycines* Ichinohe 是世界性分布的大豆主要病害之一, 对中国和世界大豆都造成较大损失, 尤其我国东北的大豆主产区已成为该病害的重灾区^[1-2]。利用抗病品种和轮作是控制该病害的有效措施, 近年来, 人们越来越重视有害生物的综合治理, 包括有效的生物防治措施。放线菌是人类发现新型抗生素的重要资源, 目前广泛应用的抗生素约 70% 是由各种放线菌所产生。某些种类的放线菌还能产生各种酶制剂 (蛋白酶、淀粉酶、和纤维素酶等)、维生素和有机酸等。相关研究表明放线菌的代谢产物如阿维菌素 (*Avermectin*)、南昌霉素 (*Nanchangmycin*) 都具有较高的杀线虫活性^[3-4]。现以放线菌 Snea49 为材料, 测定其对大豆胞囊线虫的生物活性, 以期获得具有开发价值

的微生物资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 线虫与供试菌株 大豆胞囊线虫采自沈阳农业大学北方线虫学研究所试验地, 由该室繁殖保存; Snea49 分离自辽宁省沈阳市的土壤中。

1.1.2 培养基 高氏合成一号培养基 (GA), 酵母精麦芽糖琼脂培养基 (ISP2)、燕麦粉琼脂培养基 (ISP3)、无机盐淀粉琼脂培养基 (ISP4)、甘油天门冬素培养基 (ISP5)、淀粉琼脂培养基、明胶培养基等。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株形态特征观察 采用埋片法观察菌株

收稿日期: 2010-01-12

基金项目: 教育部新世纪优秀人才支持计划资助项目 (NCET-08-0866); 辽宁省优秀人才支持计划资助项目 (RC-05-18)。

第一作者简介: 陈井生 (1982-), 男, 硕士, 研究实习员, 研究方向为大豆胞囊线虫抗性育种和生物防治。E-mail: chenjingsheng1982@hotmail.com。

通讯作者: 陈立杰, 教授, 博士生导师。E-mail: chenlj@syaue.edu.cn。

形态特征。在鉴定培养基平板上 28℃ 培养。观察记录菌落形态特征、基内菌丝体、气生菌丝体和孢子丝的形态、颜色,是否有断裂或者横隔等特征,以及是否产生可溶性色素等。

1.2.2 菌株的生理生化特征 参照徐丽华等^[5]的放线菌系统学进行生理生化特征的鉴定,包括淀粉水解、H₂S 产生、碳源利用、纤维素分解等。

1.2.3 16S rDNA 序列分析 采用酶解法^[5]提取菌株总 DNA 和 PCR 扩增 16S rDNA 基因,引物为通用保守引物 27f 和 1492r。测序由上海生工生物工程有限公司完成。

反应条件:94℃ 变性 5 min;94℃ 变性 1 min,56℃ 复性 1 min,72℃ 延伸 2 min,30 次循环;72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存。

PCR 产物采用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。扩增后的 PCR 产物经上海生工生物工程有限公司纯化并测序。利用 BLAST 搜索软件将菌株的 16S rDNA 序列结果与 GenBank 数据库中相关放线菌菌株的 16S rDNA 序列进行比对,明确菌株的分类地位。

1.2.4 放线菌发酵液的制备 将平板上生长良好的菌落加入适量的 0.05% 的 Tween-80 于 2 mL 离心管内,用血球计数板配制成 109 cfu·mL⁻¹ 的菌悬液。取制备好的菌悬液 2 mL 接种于 50 mL 马铃薯培养液于 100 mL 三角瓶中,180 r·min⁻¹,28℃ 条件下振荡培养 7 d,5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,上清液用高压灭菌的细菌过滤器过滤,用无菌水将发酵液依次稀释 1、5、10、15、20 × 等 5 个浓度梯度,放入 4℃ 冰箱中备用。

1.2.5 大豆胞囊线虫胞囊和 2 龄幼虫的获得 采用改良淘洗-过筛法从采取的土样中分离胞囊,在体视镜下用自制的玻璃挑针挑出新鲜饱满成熟的胞囊。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 ZnSO₄·7H₂O 溶液中孵化 2 龄幼虫。每天及时更换处理液并收集新孵化出的 2 龄线虫。

1.2.6 代谢物对大豆胞囊线虫胞囊孵化和 2 龄幼虫活力的影响 取新鲜饱满的胞囊,无菌水浸泡过夜,0.5% NaOCl 表面消毒 5 min,无菌水冲洗 3 次,放入自制的孵化池。将 10 个胞囊放入自制的孵化池内。将孵化池置于灭菌的 24 孔细胞培养板中,向其加入无菌水作为对照,3 次重复,25℃ 下孵化。9 d 后观察计数孵化出的 2 龄幼虫的数量。

在经灭菌的贝氏小皿中加入菌株发酵液 200 μL,以加无菌水作为对照,然后向贝氏小皿中加入新孵化的大豆胞囊线虫 2 龄幼虫。处理和对照各 3 次重复。放入 25℃ 培养箱中,24 h 后记录线虫死亡率,计算校正死亡率,线虫死活判断采用 NaOH 刺激法。

2 结果与分析

2.1 菌株形态和生理生化特征

Snea49 菌株基丝细长,不断裂,气丝发达,形成同心环。基丝为各种色调,并以黄色为主,气丝为白色,少为灰色和暗灰色,无可溶性色素;能利用半乳糖、D-果糖、麦芽糖、肌醇、D-木糖、山梨醇,不能利用甘露糖、蔗糖。革兰氏阳性,明胶液化,淀粉水解,纤维素上不生长,不产生硫化氢。菌株初步鉴定为链霉菌属白孢类群。

2.2 16S rDNA 序列分析

菌株的 16S rDNA 基因的扩增 PCR 产物经上海生工公司进行测序,结果拼接后得到菌株 Snea49 的 16S rDNA 碱基序列,片段全长为 1 442 bp。与 GenBank 数据库中相关放线菌菌株的 16S rDNA 序列相比,菌株与已知放线菌的环状链霉菌 *Streptomyces anulatus* 16S rDNA 同源性最高,达到 99.64%。

综合菌株 Snea49 的形态特征、生理生化特性以及 16S rDNA 的基因序列结果表明,菌株的分类地位属于环状链霉菌。

表 1 放线菌 Snea49 代谢物对大豆胞囊线虫胞囊孵化和 2 龄幼虫活性的影响
Table 1 Bioactivity effect of fermentation filtrates of Snea49 to *Heterodera glycines*

稀释倍数 Dilution times	孵化出的线虫数 Hatched J2/No.	相对抑制率 Relative suppression rate/%	死亡率 Mortality rate of J2/%	校正死亡率 Corrected mortality rate/%
1	8.00d	95.95	90.00a	89.66
5	10.33d	94.77	71.67b	70.67
10	34.33c	82.60	43.67c	41.73
15	48.00c	75.68	31.33cd	28.97
20	75.33b	61.82	24.00d	21.38
CK	197.33a	-	3.33e	-

表中数据为 3 次重复结果,数字后标记为 Duncan's 新复极差测验结果,字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Values are means of three replicates. Values followed by the same letter in a column do not differ significantly at $P < 0.05$ according to Duncan's New Multiple Range Test.

2.3 发酵液对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

不同浓度发酵液处理 24 h 对胞囊线虫孵化的影响不同。结果表明,Snea49 代谢物对大豆胞囊线虫胞囊孵化具有强烈的抑制作用,其 20 倍液对胞囊的孵化抑制作用达 61.82%,5 倍液对胞囊的孵化抑制作用达 94.77% 以上,1 倍液对胞囊的孵化抑制作用高达 95% 以上,各处理均与无菌水对照差异显著(表 1)。

2.4 发酵液对大豆胞囊线虫 2 龄幼虫活性的影响

Snea49 代谢物对大豆胞囊线虫具有良好的杀线虫活性,其 5 倍液处理 24 h 后,线虫的死亡率达 70.67%。其 1 倍液处理 24 h 后,线虫的死亡率高达 89.66%。随着稀释倍数的增加,该菌株代谢物杀线虫效果也逐渐降低,稀释 20 倍液时对线虫仍具有活性,校正死亡率为 21.38%,与对照比差异达显著水平(表 1)。

3 结论与讨论

通过对东北地区放线菌的筛选,获得几株对线虫具有较高活性的放线菌,其中菌株 Snea49 是从辽宁省沈阳市土壤中分离获得的一株放线菌,其对大豆胞囊线虫的活性仅次于 Snea253。Snea253 对大豆胞囊线虫具有较高毒力,发酵原液处理 24 h 后对胞囊线虫 J2 校正死亡率为 92.13%,经鉴定为委内瑞拉链霉菌^[6]。结果表明,Snea49 代谢物对大豆胞囊线虫胞囊孵化和 2 龄幼虫活性均表现了较强的抑制作用。不同稀释倍数的发酵液对大豆胞囊线虫 2 龄幼虫均具有较强的抑杀作用,其 1 倍液对 2 龄幼虫的校正死亡率高达 89.66%;不同的稀释倍数对胞囊线虫 2 龄幼虫的抑制作用不同,且呈梯级差异。

大豆胞囊线虫繁殖率很高,每个胞囊有 200 ~ 400 个卵,具有不同的虫态,土壤中自由活动的幼虫和雄虫,根内固定寄生的雌虫,胞囊内的卵可以在土壤中休眠越冬并存活数年,这些特征使大豆胞囊线虫难以防治。选育抗病品种和轮作是防治大豆胞囊线虫经济有效的措施,但是由于抗源单一,抗病基因对胞囊线虫群体的选择作用,导致抗性品种抗性极易丧失。此外,在我国大豆主产区,考虑到经济效益,通过轮作来控制大豆胞囊线虫病难以实施^[7]。因此,研究工作的重点转向了生物防治,抗生素作为传统杀虫剂已得到广泛的应用,杀线剂的研制工作越来越受到人们的重视。

迄今,微生物产生的抗生素等生物活性物质主

要来自放线菌的链霉菌属^[8],早期应用于农作物病害防治的链霉素均是链霉菌的代谢产物,长期以来在放线菌及其代谢物对胞囊线虫的生物防治方面开展了许多研究,试图从放线菌的代谢物中寻找到的生物活性物质,用来防治大豆胞囊线虫在生产上的危害^[9-10]。

该文首次报道了环状链霉菌具有杀线虫活力,菌株 Snea49 的获得与研究为其应用到大豆胞囊线虫病害防治提供了新的线索,菌株代谢产物中活性物质的分离纯化以及毒杀机理有待深入研究。

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,2000:285-299. (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 [M]. 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)
- [3] Dicklow M B, Acosta N, Zuckerman B M. A novel species for controlling plant-parasitic nematodes [J]. Journal of Chemical Ecology, 1993, 19(2):159-173.
- [4] 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), 2008:270-275. (Chen L J, Chen J S, Duan Y X, et al. Review of the Actinomycetes and metabolites against plant nematodes [C]. Research on Nematology in China, 2008:270-275.)
- [5] 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. (Xu L H, Li W J, Liu Z H, et al. Actinomycetes system principles, methods and practice [M]. Beijing: Science Press, 2007.)
- [6] 陈立杰, 陈井生, 郑雅楠, 等. 放线菌 Snea253 的鉴定及对胞囊线虫的抑制作用 [J]. 中国生物防治, 2009(1):66-69. (Chen L J, Chen J S, Zheng Y N, et al. Identification of the strain Snea253 and its activity against soybean cyst nematode [J]. China Biological Control, 2009(1):66-69.)
- [7] Duan Y X, Zheng Y N, Chen L J, et al. Effects of abiotic environmental factors on soybean cyst nematode [J]. Agriculture Sciences in China, 2009, 8(3):317-325.
- [8] János Bérty. Bioactive Microbial Metabolites [J]. Journal of Antibiotics, 2005, 58(1):1-26.
- [9] 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.)
- [10] 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 secondary metabolites of actinomycetes on heterodera glycines J2 [J]. Soybean Science, 2008, 27(4):637-640.)