

文章编号:1001-6880(2014)1-0117-07

放线菌 Snea253 代谢产物及寡糖对南方根结线虫活性的影响

李玲玉¹, 赵迪¹, 刘晓宇², 陈井生^{1,3}, 段玉玺¹, 陈立杰^{1*}¹沈阳农业大学植物保护学院 北方线虫研究所;²沈阳农业大学理学院, 沈阳 110866; ³黑龙江农科院大庆分院, 大庆 163316

摘要:本文针对前期筛选获得的高效放线菌 Snea253 菌株代谢产物中杀线虫活性成分进行试管法和薄层层析法预试, 结果显示活性物质含糖和氨基酸。贝氏皿浸没法研究了 Snea253 代谢产物中杀线虫活性物质和已知寡糖对南方根结线虫卵孵化和二龄幼虫 J2 的影响, 结果表明:Snea253 活性物质对南方根结线虫卵孵化的相对抑制率为 84.95%, 供试寡糖中除麦芽糖和蔗糖有不显著的抑制作用外, 半乳糖、果糖和木糖显著促进了南方根结线虫卵孵化; 乳糖、葡萄糖和山梨糖均具有促进作用, 但与对照相比不显著。Snea253 活性物质对 J2 的校正死亡率为 98.21%, 与各寡糖处理和对照相比差异显著; 葡萄糖、乳糖和蔗糖处理 J2 无死亡现象, 反而利于南方根结线虫 J2 的存活。研究结果显示普通寡糖对南方根结线虫基本无毒性, 而放线菌 Snea253 代谢产物中氨基糖类物质则对线虫有毒性。

关键词:放线菌 Snea253; 南方根结线虫; 发酵产物; 杀线虫活性物质; 寡糖

中图分类号:R432.45

文献标识码:A

Toxicity of Oligosaccharide and Nematicidal-active Substance Produced by Actinomycetes Snea253 to *Meloidogyne incognita*

LI Ling-yu¹, ZHAO Di¹, LIU Xiao-yu², CHEN Jing-sheng^{1,3}, DUAN Yu-xi¹, CHEN Li-jie^{1*}¹Nematology Institute of Northern China, College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University;²College of Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;³Daqing Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, China

Abstract: Actinomycetes are important antibiotics producing microorganism. In this study, testing tube method and thin layer chromatography pretesting revealed that the nematicidal-active substance produced by *Streptomyces venezuelae* Snea253 contained carbohydrate and amino acid moieties. The effects of active substance from Snea253 and some known oligosaccharides on egg hatching and J2 of *Meloidogyne incognita* were investigated. The results showed that active substance from Snea253 had the highest relative suppression rate of 84.95% on *M. incognita* egg hatching. However, maltose and sucrose have no significant inhibitory effect; In addition, galactose, fructose and xylose significantly promoted egg hatching of *M. Incognita*. Lactose, glucose and sorbitol sugar also had a promoting effect of egg hatching of *M. Incognita*, which however was not significant compared with the control group. The corrected mortality rate of *M. incognita* juveniles J2 caused by active substance from Snea253 was 98.21%, having a significant difference from that of oligosaccharides and control groups. On the contrary, glucose, lactose and sucrose were promoters of J2's survival. Hence, it was concluded that oligosaccharides had no toxicity to root knot nemtode, however, nematicidal metabolites of Snea253 had strong activity to *M. incognita*.

Key words: Actinomycetes Snea253; *Meloidogyne incognita*; fermentation metabolites; nematicidal-active substance; oligosaccharide

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 广泛分布于世界各地, 寄主植物有 3000 余种, 黄瓜番茄等各类蔬菜、

烟草、果树和观赏植物等都是其良好寄主^[1]。根结线虫病是世界农业生产上危害最严重的一类线虫病害, 对我国的蔬菜、经济作物等种植已造成严重威胁。但是针对根结线虫病的有效化学农药如涕灭威、溴甲烷等陆续被禁用或限制使用, 因此寻找替代的高效低度低残留的有效药剂成为当今世界研究热

收稿日期:2013-03-07 接受日期:2013-06-26

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200903040-03, 2011030
18); 国家自然科学基金(31171823); 教育部优秀人才
(NCET-8688)

* 通讯作者 Tel: 86-24-88454528; E-mail: Chenlijie0210@163.com

点。目前生产中推广使用的阿维菌素—链霉菌产生的抗生素是较为理想的防治药剂,但是阿维菌素对根结线虫卵无效。因此,寻找新的生物杀线剂,尤其是从放线菌的代谢产物中筛选高效低毒的生物杀线剂成为防治植物线虫病的重要发展方向^[2]。

放线菌中以链霉菌属(*Streptomyces*)产生的生物活性物质最多。如阿维菌素是由灰色链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)发酵产生的大环内酯类抗生素^[3]。目前已陆续发现几种对线虫有活性的放线菌代谢产物。放线菌Snea253菌株(委内瑞拉链霉菌*Streptomyces venezuelae*)是本实验室前期从土壤中分离得到的具毒杀植物线虫活性的高效菌株,其代谢物对大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)、南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)和北方根结线虫(*M. hapla*)的J2均具有较高的生物活性,并且能够抑制大豆胞囊线虫卵的孵化^[4,5]。经初步对其杀线虫活性物质进行分离纯化、结构解析,认为其可能含有氨基寡糖的糖类活性物质(待发表),因此本文重点研究其代谢产物中杀线虫活性物质及已知寡糖类物质对南方根结线虫的活性。

寡糖素(Oligosaccharins)是Alberhseim教授于1985年首次提出的概念,活性寡糖具有调控植物生长、发育、繁殖、防病和抗病等多方面的功能^[6]。各种活性寡糖可发出调节特定功能的信息,激活防御反应、诱导植物抗病性,调控植物生长,产生具有抗病害的活性物质,抑制病虫害的形成和侵染,寡糖在农业生产上显示出广阔的应用前景^[7]。鉴于本研究中Snea253菌株发酵液中活性物质可能含有寡糖类物质,因此将此活性物质与已知寡糖共同测试对南方根结线虫卵孵化和J2活性的影响,以明确寡糖类物质对植物线虫的毒力作用,为植物线虫病害生物防治研究中生物杀线剂的研制提供新的理论支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

放线菌Snea253菌株,菌株及其制备方法已获得国家发明专利授权(ZL200810010465.X)。

1.2 放线菌Snea253菌株发酵产物中活性物质的粗提取

用50 L~100 L发酵罐GUGS-50进行发酵,在28 °C下培养,初始pH为6,转速150 r/min,发酵5~7 d。将放线菌Snea253菌株发酵液浓缩10倍,

浓缩液和无水乙醇置于4 °C冰箱中预冷12 h,再将两者按1:5混合充分摇匀静置于4 °C冰箱中12 h。取出混合液除去沉淀并用RE-52AA旋转蒸发仪将乙醇蒸掉,将所得的预处理液用CoolSafe55-4冷冻干燥仪冷冻干燥成粉末。用HC-ADS-7大孔吸附树脂吸附样品中的色素,去离子水洗脱,收集液体并冷冻干燥即得粗提物,备用。

1.3 放线菌Snea253杀线虫活性物质的成分分析

1.3.1 试管法分析活性物质^[8]

取Snea253粗提物样品溶液1 mL于试管中,加入显色剂,不同化合物发生不同的显色反应,从而鉴别其中化合物成分。用α-萘酚试剂和斐林试剂检查糖及苷;茚三酮试剂和双缩脲试剂检查氨基酸、多肽和蛋白质;碘化铋钾试剂检查生物碱;三氯化铁试剂检查酚类;盐酸-镁粉试剂和醋酸铅试剂检查黄酮及甙;Borntrager试剂和醋酸镁试剂检查蒽醌及甙;碱性3,5-二硝基苯甲酸试剂和碱性苦味酸试剂检查强心苷;异羟肟酸铁试剂检查内酯、香豆素及甙;氯化钠-明胶试剂和新鲜石灰水试剂检查鞣质;泡沫试剂和氯仿-浓硫酸试剂检查皂甙;冰醋酸-硫酸试剂和氯仿-浓硫酸试剂检查甾体萜类;挥发油试剂和油脂试剂检查挥发油和油脂。

1.3.2 薄层层析法预试^[8]

将Snea253粗提物样品点样到硅胶薄层层析板上,用乙酸乙酯:甲醇:水:冰乙酸(V:V:V:V)=12:5:1:1作展层剂,在层析缸内充分展开。硅胶板干燥后,喷显色剂,各种化合物遇特异显色剂显示出特有的颜色,方法如上,从而判断化合物的类型。

1.4 已知寡糖的选择

所选用寡糖均为分析纯,分别为D(+)半乳糖、D-果糖、D(+)木糖、L-山梨糖、D(+)麦芽糖、D(+)葡萄糖、乳糖和蔗糖。所用寡糖溶液的浓度与Snea253活性物质的浓度相同,均为5 mg/mL。

1.5 南方根结线虫卵囊和二龄幼虫的获得

在温室中用盆栽番茄繁殖南方根结线虫(番茄品种为L402)。第一代卵囊成熟后,将番茄根系取出,用水轻轻冲洗,小心挑取卵囊。卵囊在0.5%次氯酸钠中消毒3 min,无菌水反复冲洗3次,将消毒的部分卵囊置于自制孵化池中备用。

另一部分卵囊放在自制的孵化池中,孵化池放在少量无菌水的灭菌培养皿里,25 °C恒温箱中培养,每隔24 h收集一次新孵化的南方根结线虫J2,置于灭菌的培养皿中制成J2线虫悬液备用。

1.6 活性物质及寡糖溶液对南方根结线虫卵囊中卵孵化的影响

取新鲜饱满大小均一的消毒卵囊,每2个消毒卵囊放入一个消毒孵化池中,再将孵化池放入盛有测试溶液的灭菌培养皿中,测试溶液包括5 mg/mL的Snea253发酵液粗提取后的活性物质和5 mg/mL各类寡糖溶液各1 mL,以无菌水处理作为对照,为尽可能的减少皿中液体的蒸发,培养皿用封口膜密封,每个处理重复3次。将放有卵囊的培养皿置于25 ℃恒温箱中,7 d后计数线虫孵化总数,计算孵化相对抑制率。

$$\text{相对抑制率}(\%) = \frac{\text{对照孵化线虫数} - \text{处理孵化线虫数}}{\text{对照孵化线虫数}} \times 100$$

1.7 活性物质及寡糖溶液对南方根结线虫J2的影响

在经过高温灭菌的贝氏小皿中放入活泼的南方根结线虫J2,各加入1 mL的活性物质和寡糖溶液,以无菌水作为空白对照,每个处理重复3次。各处理的贝氏小皿放入25 ℃恒温培养箱中,24 h后计数线虫的死亡率,计算线虫校正死亡率,采用毛针碰触和NaOCl刺激法来判断线虫的死活。

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

$$\text{校正死亡率}(\%) = \frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100$$

表1 放线菌 Snea253 代谢产物中活性物质化学成分试管法分析结果

Table 1 Snea253 metabolites identified by test tube method

序号 Number	预试项目 Pre-test item	试验内容 Experimental content	试验现象 Experimental phenomenon	结果 Result
1	糖(Sugar)	α-萘酚试验(Alpha-naphthol test)	紫红色环(Purple ring)	+++
		斐林试验(Fehling test)	砖红色沉淀(Brick-red precipitate)	+++
2	氨基酸、多肽和蛋白质 (Amino acid, peptide and protein)	茚三酮试验(Ninhydrin test)	蓝色(Blue)	+++
		双缩脲试验(Biuret test)	无变化(No change)	-
3	生物碱(Alkaloid)	改良碘化铋钾试验 (Modified bismuth potassium iodide test)	无变化(No change)	-
4	酚类(Phenols)	三氯化铁试验(Ferric chloride test)	无变化(No change)	-
5	黄酮及其甙 (Flavonoids and its glycoside)	盐酸-镁粉试验 (Hydrochloric acid - Mg powder test)	无变化(No change)	-

		醋酸铅沉淀试验 (Lead acetate precipitation test)	无变化(No change)	-
6	蒽醌及其甙 (Anthraquinone and its glycoside)	Borntrager 试验(Borntrager test)	无变化(No change)	-
		醋酸镁试验(Magnesium acetate test)	无变化(No change)	-
7	强心甙(Cardiac glycoside)	碱性 3,5-二硝基苯甲酸试验 (Alkaline 3,5 - dimethyl benzoic acid test)	无变化(No change)	-
		碱性苦味酸试验(Alkaline picric acid test)	无变化(No change)	-
8	内酯、香豆素及其甙 (Lactone, coumarin and its glycoside)	异羟肟酸铁试验 (Hydroxamic acid iron test)	无变化(No change)	-
9	鞣质(Tannin)	氯化钠-明胶试验 (Sodium chloride - gelatin test)	无变化(No change)	-
		新鲜石灰水试验(Fresh lime water test)	无变化(No change)	-
10	皂甙(saponin)	泡沫试验(Foam test)	无变化(No change)	-
		氯仿-硫酸试验 (Chloroform-sulfuric acid test)	无变化(No change)	-
11	甾体、萜类 (Steroids and terpenoids)	冰醋酸-浓硫酸试验 (Glacial acetic acid - concentrated sulfuric acid test)	无变化(No change)	-
		氯仿-硫酸试验 (Chloroform - sulfuric acid test)	无变化(No change)	-
12	挥发油、油脂类 (Volatile and grease)	挥发油试验(Volatile oil test)	无变化(No change)	-
		油脂试验(Grease Test)	无变化(No change)	-

表 2 放线菌 Snea253 代谢产物中活性物质化学成分薄层层析法分析结果

Table 2 Snea253 metabolites by identified thin layer chromatography

序号 Number	预试项目 Pre-test project	试验内容 Experimental content	试验现象 Experimental phenomenon	结果 Result
1	糖(Sugar)	苯胺-二苯胺试剂 (Aniline - diphenylamine reagent)	蓝色斑点(Blue spots)	+++
		苯胺-邻苯二甲酸试剂 (Aniline-phthalate reagent)	棕色斑点(Brown spots)	+++
		α -萘酚试剂 (Alpha-naphthol reagent)	蓝色斑点(Blue spots)	+++
2	氨基酸(Amino acids)	茚三酮显色剂(Ninhydrin reagent)	粉红色斑点(Pink spots)	+++
3	生物碱(Alkaloid)	改良碘化铋钾试剂 (Modified bismuth potassium iodide reagent)	无变化(No change)	-
4	酚类(Phenols)	三氯化铁试剂(Ferric chloride reagent)	无变化(No change)	-
5	黄酮及其甙 (Flavonoids and its glycoside)	1% 三氯化铝试剂 (1% aluminum chloride reagent)	无变化(No change)	-
		3% 三氯化铁乙醇试剂 (3% ferric chloride ethanol reagent)	无变化(No change)	-
6	蒽醌及其甙 (Anthraquinone and its glycoside)	氨气熏蒸(Ammonia fumigation)	无变化(No change)	-
		5% 氢氧化钾试剂 (5% potassium hydroxide)	无变化(No change)	-

7	强心甙 (Cardiac glycoside)	2% 3,5-二甲基苯甲酸乙醇和 4% 氢氧化钠乙醇试剂 (2% 3,5-Dimethyl benzoic acid ethanol and 4% Sodium hydroxide ethanol reagent)	无变化 (No change)	-
8	内酯、香豆素 (Lactone and coumarin)	异羟肟酸铁试剂 (Hydroxamic acid iron reagent reagent)	无变化 (No change)	-
		荧光试验 (Fluorescence test)	无变化 (No change)	-
9	甾体、萜类 (Steroids and terpenoids)	5% 磷钼酸乙醇试剂 (5% phosphomolybdic acid ethanol reagent)	无变化 (No change)	-
10	挥发油、油脂类 (Volatile and grease)	滤纸油迹 (filter paper Oil) 5% 香草醛浓硫酸试剂 (5% Vanilla aldehyde sulfuric acid reagent)	无变化 (No change)	-
11	有机酸 (Organic acid)	pH 试验 (pH test) 0.05% 溴酚蓝乙醇试剂 (0.05% bromophenol blue ethanol reagent)	无变化 (No change)	-

2.2 Snea253 代谢产物中活性物质与寡糖对南方根结线虫卵囊中卵孵化和 J2 的影响

试验选择已知寡糖类物质 8 种,比较与 Snea253 代谢产物中氨基寡糖对南方根结线虫的卵和 J2 的毒性,研究结果显示,Snea253 代谢产物中的活性物质对南方根结线虫的毒性最高,而其他寡糖类物质对根结线虫毒性很低,甚至可以促进线虫的卵孵化和 J2 存活。

D(+)半乳糖、D-果糖和 D(+)木糖对南方根结线虫卵孵化具有显著的促进作用;其次是乳糖、D(+)葡萄糖和 L-山梨糖有一定的促进作用,但与对

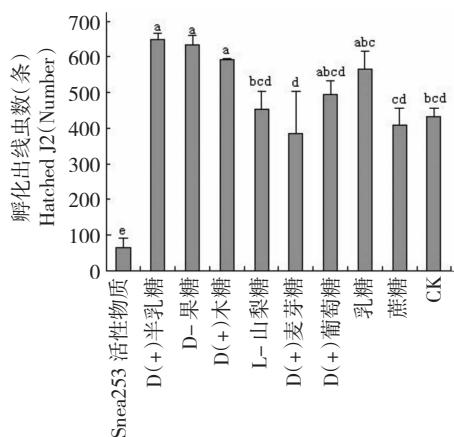


图 1 Snea253 活性物质和寡糖对南方根结线虫卵孵化的影响

Fig. 1 Effect of Snea253 active substance and oligosaccharides on egg hatching of *M. incognita*.

注:图中数据为 3 次重复结果;图中字母为 Duncan's 新复极差测验结果,不同小写英文字母表示差异显著 ($P < 0.05$);下同。

Notes: Data were means of three replicates; different letters indicated significantly different ($P < 0.05$) according to Duncan's multiple range test; Same as below.

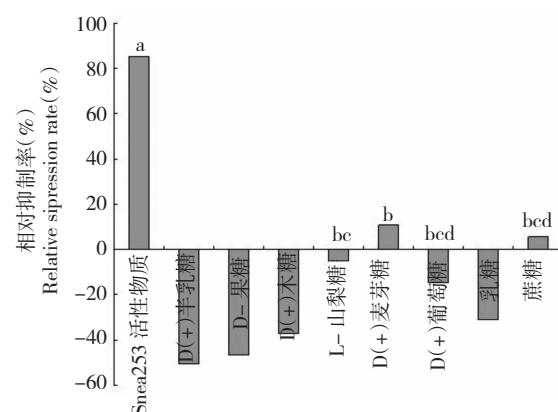


图 2 Snea253 活性物质和寡糖对南方根结线虫卵孵化的相对抑制率

Fig. 2 Relative suppression rate of egg hatching of *M. incognita* by Snea253 active substance and oligosacharides

照相比不显著;蔗糖和麦芽糖略有抑制,但也不显著;而 Snea253 活性物质则能够显著抑制南方根结线虫的卵孵化(图 1)。而且 Snea253 对卵囊中卵孵化的相对抑制率最高,达到 84.95%;麦芽糖和蔗糖相对抑制率不显著,但是半乳糖、果糖和木糖正相反,显著促进了南方根结线虫的卵孵化,乳糖、山梨糖和葡萄糖也有一定促进作用,但与对照相比不显著(图 2)。

对南方根结线虫 J2 的致死率试验中,Snea253 活性物质对 J2 的校正死亡率最高为 98.21%,与寡糖和对照处理差异极其显著,寡糖中除 D(+)半乳糖的致死率为 4.176% 相比对较显著外,其他寡糖对 J2 致死效果均不显著,而且葡萄糖、乳糖和蔗糖溶液中的线虫没有死亡现象,与无菌水对照相比,反

而有促进 J2 更活跃生存的作用(图 3)。

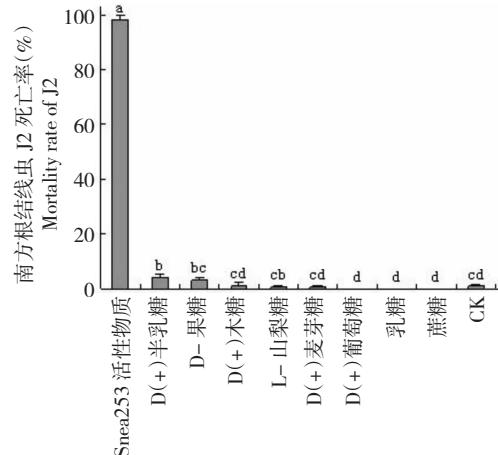


图 3 Snea253 活性物质和寡糖对南方根结线虫 J2 的致死率

Fig. 3 Mortality of *M. incognita* J2 by Snea253 active substance and oligosaccharide

3 讨论

农业生产中所用的寡糖是一类对生物具有某种或某类特定功效作用的低聚糖类,即为功能性寡糖,如壳寡糖、甘露寡糖、胡萝卜寡糖等种类^[9]。根据活性物质和已知寡糖对南方根结线虫的作用,可推断活性物质并不是简单的寡糖而是功能性寡糖。Hirano 等研究显示功能性寡糖可以作为抗菌剂直接杀死病原微生物^[10],Ayers 等发现寡糖也可以激发植物自身防卫反应以达到防治植物病害目的^[11]。壳寡糖对小麦纹枯病、黄瓜灰霉病、辣椒白粉病等真菌病害和某些病毒病害及细菌病害都有明显的防治效果^[7]。也有研究发现壳聚糖处理可以诱导黄瓜对根结线虫的抗病性^[12],因此,功能性寡糖对线虫病害的防治研究将具有深远意义。

关于微生物代谢产物中含氨基寡糖类物质对植物线虫的活性研究报道很少。本研究证明委内瑞拉链霉菌 Snea253 产生的含氨基酸的寡糖类物质对植物线虫有活性。委内瑞拉链霉菌是研发较早的医用抗生素来源菌之一。Uchida 从委内瑞拉链霉菌 Tü 1102 中分离出核酸霉素(Rinamycin),它能抑制真菌、酵母菌、革兰氏阳性和一些阴性细菌^[13]。委内瑞拉链霉菌还能产生大环内酯类抗生素如酒霉素(Methymycin)、新酒霉素(Neomethymycin)和苦霉素(Picromycin)^[14]。但未见其抗生素对植物线虫有活性的报道,因此需进一步进行系统的研究,以明确其杀线虫活性物质的结构与功能,为植物线虫病害的

防治提供新的生防资源。

4 结论

本文经过薄层层析法和试管法测试了放线菌 Snea253 发酵液中活性物质,显色反应包含有氨基酸和糖类物质。根据之后对活性物质的分离纯化及核磁、质谱结果,可以初步判定为寡糖类物质(待发表)。利用活性跟踪测试,Snea253 活性物质对南方根结线虫卵囊中卵孵化具有很强的抑制作用,对 J2 也有强烈的毒杀作用,24 h 校正死亡率即可达到 98.21%,显著高于各寡糖处理和空白对照。不同寡糖对南方根结线虫的作用不同,相比 Snea253 代谢产物的高活性而言,已知寡糖的作用非常微弱,有的甚至起到促进南方根结线虫卵孵化和 J2 存活的作用。如半乳糖、果糖和木糖显著促进了南方根结线虫的卵孵化,而葡萄糖、乳糖和蔗糖还有促进 J2 存活的作用,推测可能这些已知寡糖为线虫卵孵化和 J2 存活提供了营养物质。

致谢:感谢沈阳农业大学植物保护学院于志国教授对本论文提供的建设性意见。

参考文献

- 1 Duan YX(段玉玺). Plant Nematology(植物线虫学). Beijing: Science Press, 2011. 135.
- 2 Chubachi K, Furukawa M, Fukuda S, et al. Suppressive effects of antinematodal *Streptomyces* spp. on root-knot nematodes of cucumbers caused by *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Sci*, 2002, 7:25-29.
- 3 Mrozik H, Eskola P, Linn BO, et al. Discovery of novel avermectins with unprecedented insecticidal activity. *Experientia*, 1989, 45:315-316.
- 4 Chen LJ(陈立杰), Chen JS(陈井生), Zheng YN(郑雅楠), et al. Identification of actinomycetes strain Snea253 and its activity against Soybean Cyst Nematode. *Chin J Biol Control*(中国生物防治), 2009, 25:66-69.
- 5 Chen JS(陈井生), Chen LJ(陈立杰), Duan YX(段玉玺), et al. The nematicidal spectrum of actinomycetes Snea253 metabolic product. *Acta Agric Shanghai*(上海农业学报), 2010, 26(3):80-82.
- 6 Alberhseim P, Darvill AG. Oligosaccharins. *Sci Am*, 1985, 253:58-64.
- 7 Zhang SZ(张树政). Glycobiology and Glycoengineering(糖生物工程). Beijing: Chemical Industry Press, 2012. 191-196.

(下转第 93 页)