

四种植物提取物对大豆胞囊线虫毒杀作用

刘淑霞¹, 潘冬梅^{1,2}, 魏国江¹, 李振伟¹, 马志军¹, 杜春玉³, 潘静¹

(1. 黑龙江省科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 大庆应用技术研究院, 黑龙江 大庆 163316; 3. 大庆市绿色农产品监测中心, 黑龙江 大庆 163319)

摘要:为探索经济、高效、环保的防治大豆胞囊线虫病的方法,以轮作过程中对大豆胞囊线虫毒杀效果明显的亚麻、大麻、蓖麻、万寿菊 4 种植物为试材,研究其根水提取物和根、叶乙醇提取物对大豆胞囊线虫卵孵化和线虫室内毒杀活性。结果表明:亚麻根提取物具有促进大豆胞囊线虫卵孵化的作用,对大豆胞囊线虫二龄幼虫毒性随着提取物浓度的增大而增强,亚麻根水提取物干粉:水比例为 1:1 和亚麻根乙醇提取物浓度为 1.00% 和 2.00% 时可以全部杀死大豆胞囊线虫。

关键词: 亚麻; 大麻; 蓖麻; 万寿菊; 提取物; 大豆胞囊线虫; 毒杀作用

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)11-0046-03

大豆胞囊线虫病是世界大豆生产上流行性、毁灭性病害之一。目前在中国、美国、加拿大和巴西等大豆主产国广泛发生,每年造成全世界大豆减产 11%^[1]。我国黑龙江、吉林、辽宁、河南和内蒙古等地区发生较重,其中大豆主产区——东北地区的盐碱地、白浆土和沙壤土地为重病区,一般减产 20%~30%,严重的达 70%~80%,并且每年出现许多大面积绝产地块^[2]。大豆胞囊线虫病防治主要采用化学药剂防治,但杀线虫化学药剂毒性大,残留和污染比较严重,加上抗病品种缺乏,轮作等防治措施难以实现,给防治工作带来很大的困难^[3-4]。该试验选用对防治大豆胞囊线虫病效果明显的前茬作物亚麻、大麻、蓖麻和万寿菊为试材,分别研究各试材水提取物和乙醇提取物对大豆胞囊线虫卵孵化和对二龄线虫室内毒杀作用,以期筛选出防治大豆胞囊线虫的植物物质,为使用天然植物源农药防治大豆胞囊线虫病提供基本数据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试大豆品种为黑农 37 由黑龙江省农业科学院大庆分院提供;供试亚麻品种为双亚 10 号,由黑龙江省科学院大庆分院提供;大麻、蓖麻和万寿菊购于大庆市萨尔图区种子商店。供试线虫采集自黑龙江省农业科学院(安达)国家抗线大豆研究中心的大豆胞囊线虫病圃内大豆根际表层土(0~30 cm)。采用美国一套鉴别寄主,通过室内盆栽试

验鉴定为大豆胞囊线虫 3 号生理小种。

1.2 方 法

1.2.1 胞囊的分离 将采集到的病土通过漂浮法直接分离胞囊,Olympus 解剖镜下选取饱满、颜色鲜亮、大小整齐一致的完整胞囊,蒸馏水冲洗 5 遍后置于 4℃ 冰箱中备用。

1.2.2 卵和线虫悬浮液的制备 (1)卵悬浮液的制备:在已装满消毒细沙的塑料盆内,播种大豆胞囊线虫感性品种,在豆苗约 10 cm 高时,接入饱满胞囊。每 7 d 浇灌 1 次 Hoagland's 培养液,待 35 d 后将豆苗全根拔出。在放大镜下,从根表挑取黄白色胞囊,在 0.05% NaClO 溶液中消毒 3 min,用无菌水反复冲洗数次后,将无菌的胞囊置入组织研磨器中挤碎,利用 200 目和 500 目套筛分离卵,并制备成卵悬浮液,卵悬浮液浓度为 200 粒·mL⁻¹。(2)线虫二龄幼虫悬浮液的制备:将分离到的胞囊在 0.05% NaClO 溶液中消毒 3 min,用无菌水冲洗数次后,将无菌的胞囊放入 6 cm 的培养皿中,在 0.5 mmol·L⁻¹ ZnSO₄ 溶液中 25℃ 孵化,5 d 后开始收集二龄幼虫,制备二龄幼虫悬浮液,用于试验^[5]。

1.2.3 不同植物根水提取物对大豆胞囊线虫卵孵化及线虫室内毒杀活性测定 将采集的亚麻、蓖麻、大麻、万寿菊、大豆的根烘干分别粉碎成干粉,准确称取各供试样品干粉 90 g,分别分为 3 份,装入 500 mL 棕色广口瓶内,加入 10 倍体积的蒸馏水,放置振荡培养箱内 30℃,170 r·min⁻¹ 振荡浸提 24 h,放入布氏漏斗中抽滤,残渣再加溶剂浸泡,连续浸提 3 次,合并滤液,在旋转蒸发器内 40℃ 减压浓缩,每种植物根水提取物浓缩至 1:1 和 1:3(干粉:水=1:1;干粉:水=1:3)两个浓度,分别装入磨口棕色广口瓶中密封,置于 4℃ 冰箱中备用。

在直径为 6 cm 的培养皿中,每皿先加入按照 1.2.2 方法制备好的卵悬浮液 1 mL(每皿 200 个卵),

收稿日期:2013-07-02

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C201125)

第一作者简介:刘淑霞(1982-),女,河南省平顶山市人,硕士,助理研究员,从事植物保护研究。Email:liushuxiashiyuan@163.com。

通讯作者:潘冬梅(1963-),女,黑龙江省双城市人,高级农艺师,从事作物栽培研究。Email:dongmeipan@sohu.com。

再分别加入 5 mL 1:1 和 1:3 (干粉:水=1:1; 干粉:水=1:3) 浓度的亚麻、蓖麻、大麻、万寿菊、大豆根水提取物和无菌水, 以大豆根水提取物和无菌水为对照, 共 11 个处理, 3 次重复, 置于 25℃ 培养箱中, 黑暗条件下孵化。每 48 h 观察 1 次孵化出的二龄幼虫数量并记录, 计算大豆胞囊线虫卵孵化率。

在直径为 6 cm 的培养皿中, 每皿先加入按照 1.2.2 方法制备好的二龄幼虫悬浮液 1 mL (每皿约 50 条线虫), 再分别加入 5 mL 1:1 和 1:3 (干粉:水=1:1; 干粉:水=1:3) 浓度的亚麻、蓖麻、大麻、万寿菊、大豆根水提取物和无菌水, 以大豆根水提取物和无菌水为对照, 共 11 个处理, 3 次重复, 置于 25℃ 培养箱中, 黑暗的条件下培养。处理后 24、72 和 120 h 分别检查各处理的线虫死亡与存活情况, 计算线虫死亡率和线虫校正死亡率。

1.2.4 不同植物乙醇提取物对大豆胞囊线虫卵孵化及线虫室内毒杀活性测定 将采集的亚麻根、蓖麻根(叶)、大麻根(叶)、万寿菊根烘干粉碎成干粉, 准确称取各供试样品干粉 100 g, 分为 3 份, 装入 500 mL 棕色广口瓶内, 加入 10 倍体积 99% 乙醇, 放置振荡培养箱内 30℃, 170 r·min⁻¹ 振荡浸提 24 h, 在布氏漏斗中抽滤, 残渣再加溶剂浸泡, 连续浸提 3 次, 合并滤液, 在旋转蒸发器内 40℃ 减压浓缩至稠膏状, 将膏状物分别装入磨口棕色广口瓶密封, 置于 4℃ 冰箱中备用。

在直径为 6 cm 的培养皿中, 每皿先加入按照 1.2.2 方法制备好的卵悬浮液 1 mL (每皿 200 个卵), 再分别加入 5 mL 0.1%、1%、2% 3 个浓度的亚麻根、大麻根、蓖麻根等乙醇提取物(提取物溶剂为 5% 乙醇水溶液), 以 5% 乙醇水溶液为对照, 共 19 个处理, 3 次重复, 置于 25℃ 培养箱中黑暗条件下进行孵化。每 48 h 观察 1 次孵化出的二龄幼虫数量并记录, 计算大豆胞囊线虫卵孵化率。

在直径为 6 cm 的培养皿中, 每皿先加入按照

表 1 不同植物根水提取物对大豆胞囊线虫卵孵化和二龄幼虫毒杀活性的影响

Table 1 The effect of water extract on soybean cyst nematode and juveniles 2 with root of different plants

植物 Plants	浓度/干粉:水 Concentration	孵化率/% Hatchability	24 h		72 h		120 h	
			死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality
亚麻 Flax	1:3	32.02	66.17	63.58	73.17	70.83	76.07	73.93 B
万寿菊 Marigold	1:1	51.94	69.52	67.19	91.47	90.73	100.00	100.00 A
大麻 Hemp	1:3	10.34	49.15	45.26	59.17	55.62	71.79	69.27 B
蓖麻 Castor	1:1	18.93	51.89	48.21	78.56	96.70	80.95	79.25 B
大豆 Soybean	1:3	19.70	39.45	34.82	49.68	45.30	48.28	43.66 D
水 Water	1:1	14.08	39.89	35.30	57.00	53.26	55.26	51.26 C
	1:3	18.72	29.11	23.69	45.20	40.43	48.39	43.78 D
	1:1	15.05	35.25	30.30	51.35	47.12	55.00	50.98 C
	1:3	51.66	18.11	11.85	19.88	12.91	20.16	13.03 E
	1:1	60.40	17.90	11.63	18.00	10.87	18.32	11.02 E

注:表中数据为 3 次重复的平均值, 采用 Duncan 氏新复极差法(DMRT)进行差异显著性分析, 同列数据后不同字母表示在 1% 水平上差异显著。下同。

Note: Datas were presented as mean value with DMRT, different letters in the same column are significantly different at 0.01 level. The same below.

1.2.2 方法制备好的二龄幼虫悬浮液 1 mL (每皿约 50 条线虫), 再分别加入 5 mL 0.1%、1%、2% 的亚麻根、大麻根、蓖麻根等乙醇提取物(提取物溶剂为 5% 乙醇水溶液), 共 19 个处理, 3 次重复, 5% 乙醇水溶液为对照, 置于 25℃ 培养箱内, 黑暗的条件下培养。处理后 24、72 和 120 h 分别检查各处理的线虫死亡与存活情况, 计算线虫死亡率和线虫校正死亡率。

1.2.5 数据统计与分析 线虫死亡数(%) = 死亡线虫数/供试线虫数 × 100; 线虫校正死亡率(%) = (处理组线虫死亡率 - 对照组线虫死亡率) / (1 - 对照组线虫死亡率) × 100。

2 结果与分析

2.1 不同植物水提取物对大豆胞囊线虫卵孵化和线虫室内毒杀活性的影响

从表 1 可以看出, 万寿菊、大麻和蓖麻根的水提取物(干粉:水=1:1)抑制大豆胞囊线虫卵孵化比无菌水对大豆胞囊线虫卵孵化率低 28.07、32.92 和 31.95 个百分点; 比大豆根水提取物对大豆胞囊线虫卵孵化率低 41.47、46.32 和 45.35 个百分点; 亚麻根水提取物(干粉:水=1:1)对大豆胞囊线虫卵的孵化具有较强的诱导作用, 比无菌水对大豆胞囊线虫卵孵化率高 4.94 个百分点, 比大豆黑农 37 根水提取物低 8.46 个百分点; 大麻根、蓖麻根、万寿菊根和亚麻根的水提取物(干粉:水=1:3)对大豆胞囊线虫卵孵化影响表现出与提取物(干粉:水=1:1)相同的规律。

从表 1 还可看出, 万寿菊、大麻、蓖麻和亚麻水提取物对大豆胞囊线虫的二龄幼虫均有毒杀作用, 120 h 校正死亡率为 43.66%~100.00%。亚麻根水提取物对大豆胞囊线虫毒杀效果最好, 达到 100.00%, 极显著高于对照大豆黑农 37 和无菌水及其它处理。

2.2 不同植物乙醇提取物对大豆胞囊线虫卵孵化和二龄幼虫毒杀活性的影响

从表 2 可以看出,大麻根、蓖麻根、大麻叶和亚麻根的乙醇提取物可以促进大豆胞囊线虫卵孵化,线虫孵化率高于对照 5% 乙醇水溶液 13.25~

37.92 个百分点。其中,1.00% 浓度大麻根乙醇提取物中线虫卵孵化率高于对照 37.92 个百分点,排第一位,2.00% 浓度蓖麻根乙醇提取物中线虫卵孵化率高于对照 33.44 个百分点,排第二位。万寿菊根乙醇提取物对线虫卵孵化率与对照相近。

表 2 不同植物乙醇提取物对大豆胞囊线虫卵孵化和二龄幼虫毒杀活性的影响

Table 2 The effect of alcohol extract on soybean cyst nematode and juveniles 2 with different plants

植物 Plants	浓度/% Concentration	孵化率/% Hatchability	24 h		72 h		120 h	
			死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality	死亡率/% Mortality	校正死亡率/% Corrected mortality
亚麻根 Flax root	0.10	48.16	71.00	68.48	75.00	71.59	92.00	90.91 A
	1.00	49.78	75.00	72.82	76.00	72.73	100.00	100.00 A
	2.00	53.48	78.00	76.09	80.00	77.27	100.00	100.00 A
大麻叶 Hemp leaf	0.10	52.57	44.00	39.13	81.00	78.41	92.00	90.91 A
	1.00	51.14	78.00	76.09	84.00	81.82	94.00	93.18 A
	2.00	49.26	81.00	79.35	92.00	90.91	98.00	97.97 A
蓖麻叶 Castor leaf	0.10	36.92	59.00	55.43	67.00	62.50	74.00	70.45 B
	1.00	38.54	68.00	65.22	80.00	77.27	81.00	78.41 B
	2.00	40.10	80.00	78.26	90.00	88.63	92.00	90.91 B
大麻根 Hemp root	0.10	63.79	35.00	29.34	68.00	63.64	76.00	72.73 B
	1.00	72.83	84.00	86.21	85.00	82.95	86.00	84.09 B
	2.00	67.29	59.00	55.43	75.00	71.59	82.00	79.55 B
蓖麻根 Castor root	0.10	53.73	51.00	46.74	66.00	54.67	70.00	65.91 B
	1.00	66.67	52.00	47.83	70.00	61.36	71.00	67.04 B
	2.00	68.35	60.00	56.52	70.00	65.91	75.00	71.59 B
万寿菊根 Marigold root	0.10	34.67	46.00	41.30	53.00	46.59	59.00	53.41 C
	1.00	39.67	47.00	42.39	51.00	44.32	61.00	55.68 C
	2.00	35.12	45.00	40.22	50.00	43.18	60.00	54.55 C
5% 乙醇 5% Ethanol	—	34.91	8.00	—	12.00	—	12.00	—

从表 2 中还可以看出,亚麻等 4 种植物根或叶的乙醇提取物对大豆胞囊线虫的二龄幼虫均具有一定的毒杀效果,120 h 校正死亡率在 53.41%~100.00%。1.00%、2.00% 亚麻根乙醇提取物处理 120 h,对大豆胞囊线虫的二龄幼虫毒杀效果最好,校正死亡率均为 100.00%;2.00% 大麻叶乙醇提取物对大豆胞囊线虫的二龄幼虫毒杀效果次之,校正死亡率为 97.97%;1.00% 大麻叶乙醇提取物对大豆胞囊线虫的二龄幼虫毒杀效果排第三,校正死亡率为 93.18%。

另外 0.10% 亚麻根、0.10% 大麻叶、2.00% 蓖麻叶校正死亡率为 90.90%,毒杀效果排第四,校正死亡率为 90.91。方差分析表明,亚麻根、大麻叶、2.00% 蓖麻叶乙醇提取物对大豆胞囊线虫的二龄幼虫毒杀效果极显著高于对照和 0.10%、1.00% 蓖麻叶,大麻根、蓖麻根、万寿菊根提取物。

3 结论与讨论

研究表明,亚麻、蓖麻、万寿菊、大麻 4 种植物水提取物和乙醇提取物对大豆胞囊线虫卵孵化均有不同的影响,亚麻水提取物对大豆胞囊线虫

的孵化有一定的促进作用,而大麻和蓖麻却有一定的抑制作用;大麻根、蓖麻根、大麻叶和亚麻根的乙醇提取物对大豆胞囊线虫卵孵化有一定的促进作用。亚麻、蓖麻、万寿菊、大麻 4 种植物水提取物和乙醇提取物对大豆胞囊线虫二龄幼虫均有毒性,其中亚麻根水和乙醇提取物对大豆胞囊线虫二龄幼虫毒杀效果最好,且随着提取物药液浓度的增大对大豆胞囊线虫二龄幼虫毒性增强,亚麻根水提取物(干粉:水=1:1)和亚麻根乙醇提取物(浓度为 1.00% 和 2.00%),可以完全杀死大豆胞囊线虫。

大豆胞囊线虫病是一种土传病害,胞囊在土壤中存活能达 9 a 之久^[6],胞囊不孵化其在田间的危害就一直存在,通过该研究可以看出,亚麻在试验过程中对大豆胞囊线虫的孵化具有一定的诱导和促进作用,并能毒杀孵化出的线虫,这在降低土壤中胞囊数量和防治大豆胞囊线虫病方面意义重大,在植物源农药研究方面具有很好的价值。另外,亚麻根乙醇提取物的化学成分已经过分析鉴定,至于此提取物中是单一成分还是复合成分对大豆胞囊线虫起到毒杀作用还待深入研究。