

· 研究论文 ·

doi: 10.16801/j.issn.1008-7303.2023.0055

定量评价南方根结线虫趋性方法的建立及应用

魏钰洋, 谢佳*, 王帅, 丁晓帆, 杨紫薇,
白永霞, 姚友植, 孙然锋*

(海南大学 植物保护学院, 热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 为了能够定量评价南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 2 龄幼虫的趋化性, 本研究以 Pluronic F-127 胶体为载体, 建立了一种能够借助体式显微镜相机及 ImageJ 灰度值统计法对根结线虫移动轨迹进行量化检测, 从而判断根结线虫 2 龄幼虫趋性的测试方法, 并用 10 种已报道的具有趋性活性的化合物验证了方法的可靠性。另外, 采用该方法测定了 40 种化合物对南方根结线虫的趋性活性。研究表明, 10 $\mu\text{g/mL}$ 质量浓度下, 22 种测试化合物具有吸引活性、11 种化合物具有驱避活性, 其中对茴香胺和间苯三酚分别具有较强的吸引和驱避线虫活性。进一步研究表明, 对茴香胺对南方根结线虫 2 龄幼虫具有低浓度吸引和高浓度驱避的趋性活性, 而间苯三酚对该幼虫的驱避活性随浓度增高而增强。该研究为快速定量评价化合物对南方根结线虫 2 龄幼虫的趋性及发现高活性根结线虫驱避剂提供了一种可靠的方法。

关键词: 定量评价; 根结线虫; 趋性活性; 引诱剂; 驱避剂

中图分类号: S482.51 文献标志码: A

Establishment and application of quantitative evaluation method for the chemotaxis of *Meloidogyne incognita*

WEI Yuyang, XIE Jia*, WANG Shuai, DING Xiaofan, YANG Ziwei,
BAI Yongxia, YAO Youzhi, SUN Ranfeng*

(Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Agriculture and Forestry Biological Disasters Ministry of Education, School of Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: To quantitatively evaluate the chemotaxis of the second-stage juveniles (J2s) of *Meloidogyne incognita*, an experimental method using stereomicroscope camera and ImageJ grayscale statistics method to detect the chemotaxis of J2s by analyzing the movement trajectory of the root-knot nematode in Pluronic F-127 gel was established, and verified the reliability of the method with 10 reported compounds to induce chemotaxis. In addition, the method was used to determine the chemotaxis of 40 compounds against *M. incognita*. The results showed that 22 compounds had attractive activity and 11

收稿日期: 2023-03-28; 录用日期: 2023-05-30; 网络首发日期: 2023-06-25.

Received: March 28, 2023; Accepted: May 30, 2023; Published online: June 25, 2023.

URL: <https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2023.0055>

<http://www.nyxxb.cn/cn/article/doi/10.16801/j.issn.1008-7303.2023.0055>

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (321QN178, 321CXTD436, 321QN177); 海南大学科研启动基金项目 [KYQD(ZR)-21041].

Funding: Supported by the Natural Science Foundation of Hainan Province (No. 321QN178, 321CXTD436, 321QN177) and the Scientific Research Start-up Fund Project of Hainan University [No. KYQD(ZR)-21041].

第一作者 (First author): 魏钰洋, 20095132210134@hainanu.edu.cn. *通信作者 (Corresponding authors): 谢佳, jiaxie@hainanu.edu.cn; 孙然锋, srf18@hainanu.edu.cn.

The authors declare that they have no competing interests.



compounds had repellent activity at the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$, with *p*-anisidine and phloroglucinol being the most attractive and repellent to nematodes, respectively. Further studies showed that *p*-anisidine exhibited attraction activity at low concentrations and repellent activity against J2s of *M. incongnita* at high concentrations, while the repellent activity of phloroglucinol increased with higher concentrations. This study provides a reliable method for rapid and quantitative evaluation of the chemotaxis of compounds against *M. incongnita* and for the discovery of highly active root-knot nematode repellents.

Keywords: quantitative evaluation; root-knot nematode; chemotaxis activity; attractants; repellents

根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 属于植物根系内寄生线虫, 可为害大多数开花植物^[1], 主要靠口针刺伤寄主根部进行寄生, 并诱导取食位点产生巨细胞影响植物健康。根结线虫感染后, 作物可减产 40%~80%, 严重时甚至造成连作耕地内大片农作物绝收^[2], 其种群在世界各地均有广泛分布, 每年造成农作物损失超过 1000 亿美元^[3]。我国作为农业大国, 危害生产的主要根结线虫种类为南方根结线虫 *Meloidogyne incongnita*^[4]。开发绿色防控手段以减轻根结线虫危害造成的经济损失成为当前十分重要的课题。

根结线虫从卵发育成 2 龄幼虫后, 利用自身有限的能量移动至寄主植物根部并完成侵染是其生活史中最重要的一环, 这一过程离不开线虫体内化学物质感受器对线虫移动的指向作用。头感器作为线虫体内主要的化学感受器^[5], 能够指示线虫分辨植物根系分泌物。研究表明, 番茄碱、玉米素、柠檬烯等植物的特定代谢产物能够有效引导线虫定向运动, 并且具有浓度依赖效应^[6-7], 这表明线虫头感器受到特定分泌物刺激后, 会沿低浓度区域向高浓度区域移动, 最终到达植物根部进行侵染。而土壤环境中除了含有吸引线虫的物质外, 也存在能够对线虫造成负面影响、抑制其生命活动或具有驱避作用的物质, 这些物质一部分来自于土壤, 例如无机盐硝酸钾^[8], 还有一部分来自土壤中的微生物, 例如苯并噻唑、2-辛酮^[9-10]等, 也有植物被病害侵染刺激后分泌的自我防御性的活性物质, 如百里酚^[7]及二氢辣椒碱^[11]等。这些物质能够驱离根结线虫 2 龄幼虫, 表明根结线虫化学感受器能够警示其逃逸有害物质。利用其这一特性, 如果提前在作物根部附近施用具有驱避活性的物质, 则能够达到预防侵染、减轻病害的目的。因此, 通过开发影响根结线虫趋性的特异性化合物而应用于作物根部保护是一个新的

根结线虫防控策略。

为了能够有效地测试根结线虫对物质的趋性, 已有许多研究方法被应用并证实。例如琼脂糖法^[12]、沙土法^[13]、微流控芯片法^[14]及 Pluronic F-127 (以下简称“PF 胶”)^[15]等。其中, PF 胶是一类新型的高分子非离子表面活性剂, 为聚氧乙烯聚氧丙烯醚嵌段共聚物^[15]。质量浓度为 23% 的 PF 胶具有在 4 $^{\circ}\text{C}$ 为液体、在室温凝结为固体凝胶的可逆特性, 因易于操作且根结线虫能够在其中进行三维移动并被实时观察而在线虫行为研究领域得到广泛的应用。许多学者利用这一材料完成了根结线虫对植物寄主分泌物趋性的研究, 发现由番茄等寄主中分离出的水杨酸甲酯、鼠李糖半乳糖醛酸-I 及根部呼吸作用产生的 CO_2 等多种物质对线虫具有普遍的吸引活性^[11, 16]。PF 胶也被应用在对线虫引诱剂的合成化合物库筛选中, 如尸胺和腐胺被证实同样能够引诱根结线虫^[17]。在线虫对环境变化响应方面, 研究者利用 PF 胶测试得出大豆孢囊线虫 2 龄幼虫在 pH 值 4.98~5.46 之间能大量积聚, 且氯离子浓度在 171~256 mmol/L 区间内对大豆孢囊线虫 2 龄幼虫的吸引效果最佳^[18]。

然而, 目前 PF 胶对根结线虫的行为学研究主要集中在吸引活性物质定性筛选方面, 利用 PF 胶对根结线虫进行驱避活性定量检测的研究则仅有利用计数方法的少数报道^[11]。由于计数方法繁琐耗时, 不利于根结线虫趋性物质活性的快速大量评价, 因此建立一种快速定量评价南方根结线虫趋性的方法十分必要。在本研究中, 基于 PF 胶设计了一种可检测根结线虫对物质趋性指数 (含正负趋性) 的模型, 并建立了借助体式显微镜相机及 ImageJ 灰度值统计法对根结线虫的运动轨迹进行量化计算得到趋性指数从而判断趋性的新方法。采用已报道的对根结线虫趋性有明显作用的化合物进行模型和方法的验证, 并利用该方法对 40 种化合物

进行了趋性测试。研究结果可为快速寻找吸引和驱避根结线虫化合物提供思路, 也可为田间根结线虫生态防控、减少杀线虫剂的使用和减缓抗药性的产生奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试线虫 南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 2 龄幼虫, 采自本课题组日光温室内发病的番茄根系, 采用 Giannakou 等^[19] 的方法, 洗去病根表面的沙土后挑取新鲜的卵囊, 用质量分数为 0.5% 的次氯酸钠溶液进行表面消毒 1 min, 用无菌水冲洗 3 次, 在 50 mm 培养皿内于黑暗条件下、25 ℃ 左右孵化, 每天更换一次蒸馏水。以第 4 天起孵化 24 h 产生的 2 龄幼虫为供试线虫, 以保证线虫的活力。

1.1.2 化合物及试剂 10 种验证化合物: 硝酸钾 (1000 μg/mL)、百里酚 (50 μg/mL)、苯并噻唑 (50 μg/mL)、2-辛酮 (50 μg/mL)、二苯并呋喃 (10 μg/mL)、3-甲氧基苯甲酸 (10 μg/mL)、1,5-戊二胺 (10 μg/mL)、1,4-丁二胺 (10 μg/mL)、十三烷 (10 μg/mL) 和水杨酸甲酯 (1 μg/mL), 均购于北京伊诺凯科技有限公司。

40 种待测试化合物: 对茴香胺、4-羟基-5,6-二甲苯吡喃-2-酮、混旋樟脑磺酸、四水合酒石酸钾钠、对正丁基苯胺、苯甲酸、香芹酮、苯甲酸乙酯、2-氨基苯并咪唑、三苯基膦、1-氯-4-硝基苯、对羟基苯甲醛、4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮、苯甲腈、乙噻酚、2-溴吡啶、吡啶、3,5-二氯-4-甲基苯胺、2,6-二氯苯硼酸、1-溴辛烷、*N*-乙基苄胺、2,4-二氯苯乙酮、桂皮醛、1-辛醛、 α -紫罗兰酮、2,6-二氯苯胺、2,6-二氯-4-氨基苯酚、水杨羟肟酸、对羟基苯丙酸甲酯、1-四氢萘酮、邻氨基苯酚、碳酸丙烯酯、2-甲基间苯二酚、 β -香茅醇、2,3-二甲氧基苯酚、噻吩-2-羧酸甲酯、4-乙基苯胺、香叶醇、亚磷酸二乙酯和间苯三酚, 测试质量浓度均为 10 μg/mL, 均购于北京伊诺凯科技有限公司; PF 胶, 购于 Sigma-Aldrich; 95% 乙醇等溶剂为分析纯, 购于西陇科学股份有限公司。

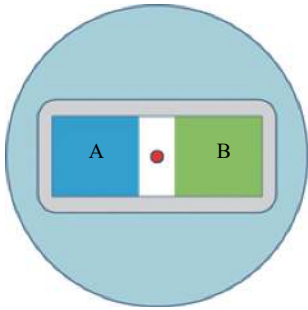
1.1.3 主要仪器设备 NIKON SMZ745T 体式显微镜及配套数码相机 (尼康光学仪器有限公司); 63 mm WR63HW LED 环形灯源 (苏州德乐达电子科技有限公司)。

1.2 PF 胶胶体制备

根据 Wang 等^[15] 的方法制备: 在 4 ℃ 条件下, 将 23 g PF 胶粉末溶于 80 mL 蒸馏水中并搅拌溶解 24 h, 得到质量浓度为 23% 的 PF 胶胶体。将溶有待测化合物的药液加入蒸馏水中, 同法用其搅拌溶解 PF 胶粉末, 制得对应浓度的含有待测化合物的 PF 胶胶体; 溶剂对照则相应地加入与药液等量的溶剂。制得的胶体均贮存于 4 ℃ 冰箱中备用。

1.3 模型设计、测试方法建立及根结线虫趋性测试

如图 1 所示, 在直径 60 mm 玻璃培养皿底内放置一个内部长 40 mm、宽 20 mm、高 5 mm 的硅胶模具, 在模具中央放置硅胶隔垫将区域隔为面积相等的两个正方形区域。左侧加入 1 mL 含有待测化合物的 PF 胶胶体作为处理侧 (图 1A), 右侧加入 1 mL 含有 95% 乙醇等对照溶剂的 PF 胶胶体作为溶剂侧 (图 1B), 室温下放置。待其凝固后, 撤去中央的硅胶隔垫, 并刮去交界处左、右各 4 mm 共 8 mm 宽的胶体, 在留出的空白区域内加入 0.5 mL 空白 PF 胶胶体作为缓冲区域。



A 为待测化合物侧, B 为溶剂侧, 中央白色部分为空白缓冲区, 红色圆圈为线虫注射区。
A represents the test compound side and B represents the solvent side, white part represents blank buffer zone, red circle represents nematode injection zone.

图 1 模型设计示意图

Fig. 1 Model design diagram

待全部胶体凝固后, 将 10 μL 约 150 条南方根结线虫 2 龄幼虫注入胶体缓冲区域的中心, 保湿并置于 25 ℃ 黑暗环境中 8 h, 待根结线虫在胶体内运动形成轨迹后对胶体平面处理侧和溶剂侧分别在固定倍数及参数下使用 NIKON SMZ745T 体式显微镜及配套数码相机拍摄图片, 并用图像处理软件 ImageJ 处理为黑白 8 位图像, 对轨迹对应的白色像素数进行处理和计算后可得出线虫轨迹在整张图片像素数中所占的百分比, 按公式 (1)

计算趋性指数 (chemotaxis index, CI)。

$$CI = \frac{2A}{A+B} \times 100\%$$

(1)

其中, A 为处理侧所占百分比, B 为溶剂侧所占百分比。规定左、右百分比各占 50% 的空白对照的趋性指数为 1.00; 当趋性指数在 1.00 ± 0.05 区间时, 判定该处理对线虫趋性没有明显影响; 高于 1.05 时判定具有吸引活性; 低于 0.95 时具有驱避活性, 即处理区域轨迹越稀疏、溶剂区域轨迹越密集, 证明该化合物的驱避效果越好, 趋性指数越低; 反之吸引效果越好, 趋性指数越高。

1.4 测试方法的验证及新化合物趋性测试和浓度梯度测试

对已报道的 10 个化合物进行检测, 测试浓度参考文献报道的测试浓度或取较低浓度, 以检验测试方法的可靠性。验证可靠后, 选取 40 种未知趋性的化合物进行测试, 并选择效果较为明显的两个化合物对茴香胺及间苯三酚进行 5、10、25、50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 共 6 个质量浓度梯度测试。每个化合物均设 5 次平行, 3 次重复试验。

2 结果与分析

2.1 模型及测试方法可靠性验证

按照图 1 的设计, 本研究顺利完成了模型设计及测试方法建立。同时, 以 PF 胶为载体对 10 种已报道在琼脂平板、沙土或 PF 胶等介质中具有趋性活性的化合物进行重复验证。验证结果(表 1) 显示: 本方法测得的趋性结果与文献报道全部一致, 从而证明了模型设计和统计方法的合理性。

表 1 验证化合物对南方根结线虫的趋性活性

Table 1 Validation of chemotaxis activity of compounds against *M. incognita*

化合物 Compound	文献报道 趋性 Reported chemotaxis	测试质量浓度 Test concentration/ ($\mu\text{g/mL}$)	趋性指数 Chemotaxis index, CI
硝酸钾 Potassium nitrate	驱避 ^[8] Repellent	1000	0.54 ± 0.06
百里酚 Thymol	驱避 ^[7] Repellent	50	0.58 ± 0.04
苯并噻唑 Benzothiazole	驱避 ^[9] Repellent	50	0.62 ± 0.04
2-辛酮 2-Octanone	驱避 ^[10] Repellent	50	0.77 ± 0.03
二苯并呋喃 Dibenzofuran	吸引 ^[9] Attractant	10	1.18 ± 0.03
3-甲氧基苯甲酸 <i>m</i> -Anisic acid	吸引 ^[13] Attractant	10	1.26 ± 0.03
水杨酸甲酯 Methyl salicylate	吸引 ^[11] Attractant	1	1.31 ± 0.05
1,5-戊二胺 1,5-Pentanediamine	吸引 ^[17] Attractant	10	1.36 ± 0.07
1,4-丁二胺 1,4-Butanediamine	吸引 ^[17] Attractant	10	1.46 ± 0.04
十三烷 Tridecane	吸引 ^[7] Attractant	10	1.53 ± 0.07

根结线虫对于具有吸引活性的化合物如水杨酸甲酯及十三烷等响应较为灵敏, 在 1 $\mu\text{g/mL}$ 或 10 $\mu\text{g/mL}$ 下均能检测出较为明显的吸引活性, 其中十三烷在 10 $\mu\text{g/mL}$ 测试质量浓度下趋性指数达到 1.53 ± 0.07 (图 2); 对于具有驱避活性的化合物, 则普遍需要 50 $\mu\text{g/mL}$ 或更高质量浓度才能较好地使根结线虫有效避开。在驱避活性测试中, 可明显观察到根结线虫在处理侧的轨迹分布较为稀疏, 证明驱避物质使线虫放弃进入处理侧转而进入溶剂侧活动 (图 3)。

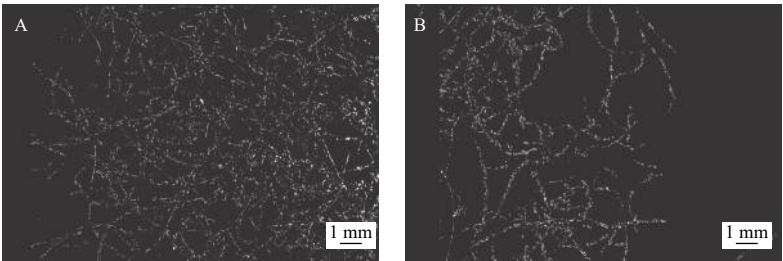


图 2 10 $\mu\text{g/mL}$ 十三烷处理侧与溶剂侧对比: A 为十三烷侧, B 为溶剂 (95% 乙醇) 侧

Fig. 2 Comparison between 10 $\mu\text{g/mL}$ tridecane and solvent treatment: A represents tridecane treatment, B represents solvent (95% ethanol) treatment

2.2 40 种化合物对根结线虫的趋性活性

根结线虫对 40 种未测定化合物的趋性指数的测定结果如表 2 所示, 其中有 22 种具有吸引活性, 11 种具有驱避活性。在测试的 40 种供试化合物

中, 对茴香胺表现出的吸引活性最强, 趋性指数为 1.53 ± 0.09 (图 4), 而间苯三酚则表现出最强的驱避活性, 趋性指数为 0.69 ± 0.06 (图 5)。

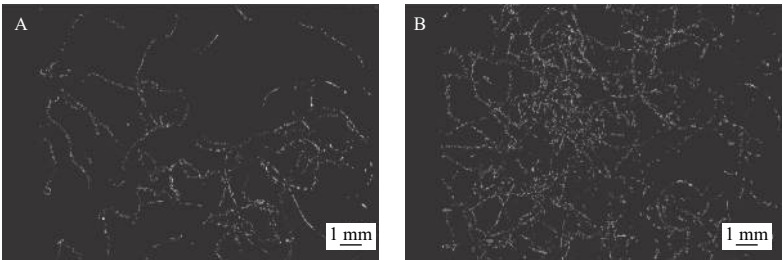


图 3 50 µg/mL 苯并噻唑处理侧与溶剂侧对比: A 为苯并噻唑侧, B 为溶剂 (95% 乙醇) 侧

Fig. 3 Comparison between 50 µg/mL benzothiazole and solvent treatment: A represents benzothiazole treatment, B represents solvent (95% ethanol) treatment

表 2 测试化合物对南方根结线虫的趋性活性

Table 2 Chemotaxis activity of test compounds against *M. incognita*

化合物 Compound (10 µg/mL)	趋性指数 CI	化合物 Compound (10 µg/mL)	趋性指数 CI
对茴香胺 <i>p</i> -Anisidine	1.53 ± 0.09	<i>N</i> -乙基苄胺 <i>N</i> -Ethylbenzylamine	1.06 ± 0.06
4-羟基-5,6-二甲基吡喃-2-酮	1.45 ± 0.11	2,4-二氯苯乙酮 1-(2,4-dichlorophenyl)ethanone	1.06 ± 0.05
4-Hydroxy-5,6-dimethylpyran-2-one		桂皮醛 Cinnamaldehyde	1.05 ± 0.08
混旋樟脑磺酸 <i>DL</i> -Camphor sulfonic acid	1.45 ± 0.08	1-辛醛 Octyl aldehyde	1.03 ± 0.04
四水合酒石酸钾钠 Potassium sodium tartrate tetrahydrate	1.44 ± 0.11	α -紫罗兰酮 α -Ionone	1.01 ± 0.03
对正丁基苯胺 4- <i>n</i> -Butylaniline	1.41 ± 0.13	2,6-二氯苯胺 2,6-Dichloroaniline	0.99 ± 0.04
苯甲酸 Benzoic acid	1.39 ± 0.10	2,6-二氯-4-氨基苯酚 4-Amino-2,6-dichlorophenol	0.99 ± 0.03
香芹酮 (-)-Carvone	1.30 ± 0.13	水杨羟肟酸 Salicylhydroxamic acid	0.97 ± 0.03
苯甲酸乙酯 Ethyl benzoate	1.30 ± 0.10	对羟基苯丙酸甲酯 Methyl 3-(4-hydroxyphenyl)propionate	0.96 ± 0.11
2-氨基苯并咪唑 2-Aminobenzimidazole	1.29 ± 0.08	1-四氢萘酮 1-Tetralone	0.93 ± 0.12
三苯基膦 Triphenylphosphine	1.27 ± 0.12	邻氨基苯酚 2-Aminophenol	0.93 ± 0.06
1-氯-4-硝基苯 4-Nitrochlorobenzene	1.26 ± 0.09	碳酸丙烯酯 Propylene carbonate	0.93 ± 0.02
对羟基苯甲醛 4-Hydroxybenzaldehyde	1.24 ± 0.05	2-甲基间苯二酚 2-Methylresorcin	0.92 ± 0.05
4-羟基-6-甲基-2-吡喃酮 4-Hydroxy-6-methyl-2-pyrone	1.23 ± 0.08	β -香茅醇 (-)- β -Citronellol	0.91 ± 0.04
苯甲腈 Benzonitrile	1.17 ± 0.08	2,3-二甲氧基苯酚 2,3-Dimethoxyphenol	0.90 ± 0.05
乙噻酚 Ethirimol	1.17 ± 0.04	噻吩-2-羧酸甲酯 Thiophenate methyl	0.82 ± 0.09
2-溴吡啶 2-Bromopyridine	1.16 ± 0.07	4-乙基苯胺 4-Ethylaniline	0.82 ± 0.06
吡啶 Pyridine	1.09 ± 0.10	香叶醇 Geraniol	0.82 ± 0.04
3,5-二氯-4-甲基苯胺 3,5-Dichloro-4-methylaniline	1.08 ± 0.03	亚磷酸二乙酯 Diphenyl ethylhexyl phosphite	0.81 ± 0.05
2,6-二氯苯硼酸 (2,6-Dichlorophenyl)boronicacid	1.07 ± 0.04	间苯三酚 Phloroglucinol	0.69 ± 0.06
1-溴辛烷 1-Bromooctane	1.06 ± 0.09		

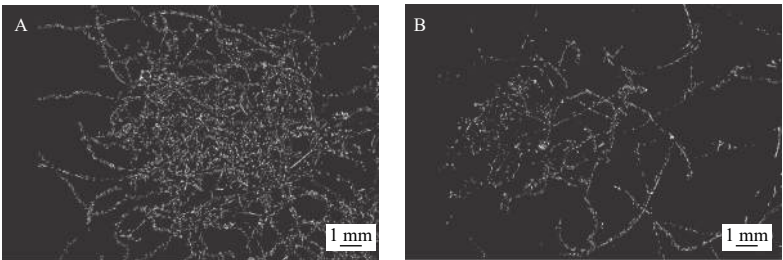


图 4 10 µg/mL 对茴香胺处理侧与溶剂侧对比: A 为对茴香胺侧, B 为溶剂 (95% 乙醇) 侧

Fig. 4 Comparison between 10 µg/mL *p*-anisidine and solvent treatment: A represents *p*-anisidine treatment, B represents solvent (95% ethanol) treatment

2.3 梯度浓度的对茴香胺及间苯三酚对根结线虫的趋性活性

采用设计方法检测南方根结线虫对对茴香胺、间苯三酚的梯度浓度响应。结果显示, 对茴

香胺在 5 µg/mL 及 10 µg/mL 时可较明显地吸引线虫, 且随化合物质量浓度的提高吸引活性增强; 而当其质量浓度提升至 25 µg/mL 及以上时则出现驱避活性, 表明这种物质在低浓度下吸引线虫,

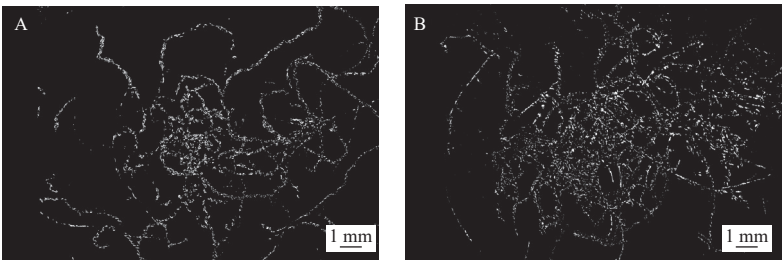


图 5 10 $\mu\text{g/mL}$ 间苯三酚处理侧与溶剂侧对比: A 为间苯三酚侧, B 为溶剂 (95% 乙醇) 侧

Fig. 5 Comparison between 10 $\mu\text{g/mL}$ phloroglucinol and solvent treatment: A represents phloroglucinol treatment, B represents solvent (95% ethanol) treatment

而浓度过高时反而对线虫的生理活动造成负面影响。而间苯三酚在 5 $\mu\text{g/mL}$ 时即表现出驱避活性, 且驱避活性随着其质量浓度的提高逐渐加强, 表明间苯三酚对于根结线虫负趋性的影响具

有浓度依赖性 (图 6; 表 3)。当间苯三酚质量浓度提升至 50、100 和 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 线虫的趋性活性变化趋于平缓, 进一步提升浓度趋性指数无明显变化; 所测浓度下未发现线虫有明显死亡现象。

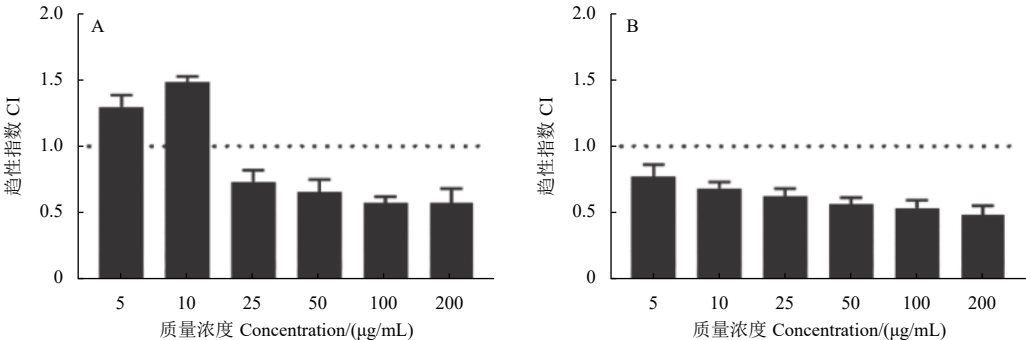


图 6 梯度浓度的对茴香胺 (A) 和间苯三酚 (B) 对南方根结线虫的趋性活性

Fig. 6 Chemotaxis activity of *p*-anisidine (A) and phloroglucinol (B) with gradient concentration against *M. incognita*

表 3 对茴香胺和间苯三酚的浓度梯度对南方根结线虫的趋性活性相关性分析

Table 3 Correlation analysis of concentration chemotaxis activity of *p*-anisidine and phloroglucinol against *M. incognita*

供试药剂 Test compound	回归方程 ($y =$) Regression equation	相关系数 Correlation coefficient, r
对茴香胺 <i>p</i> -Anisidine	$-0.5873\log x + 1.775$	0.7742
间苯三酚 Phloroglucinol	$-0.1786\log x + 0.8698$	0.9797

3 讨论与结论

3.1 测试方法的建立、验证及测试情况

本研究建立并验证了一种基于 PF 胶中南方线虫运动轨迹的图像分析法得出趋性指数的量化测试途径, 为进一步优化新介质对根结线虫趋性的研究提供了新方法。对已报道的 10 种具有趋性活性的化合物进行了验证及重复, 证实了该方法在量化根结线虫趋性时的可靠性, 并对 40 种未检测的化合物进行了趋性检测, 其中有 22 种具有吸引

活性, 11 种具有驱避活性, 对茴香胺对线虫具有最强的吸引活性, 趋性指数为 1.53, 而间苯三酚具有最强的驱避活性, 趋性指数达 0.69。

3.2 吸引活性物质机制分析

在 22 种吸引活性物质中, 对线虫趋性指数达 1.30 的苯甲酸乙酯同样能够明显吸引果蝇^[20]。这与 Jones 等^[21] 的结论相佐证, 即线虫与昆虫含有一些保守的嗅觉结合蛋白基因。然而本研究中也有一些物质的趋性活性并非在昆虫和线虫中具有一致性, 如对线虫具有吸引活性的苯甲酸对拟谷盗并没有趋性活性^[22]。而天然存在于留兰香中的香芹酮^[23] 虽然能够吸引线虫, 但文献报道其对淡色库蚊却具有良好的驱避和熏杀活性^[24]。造成这种差异的原因可能是由线虫和昆虫的部分嗅觉结合蛋白在进化过程中发生了基因分化, 产生了物种特异性。

3.3 驱避活性物质机制分析

在 11 种具有驱避活性的化合物中, 间苯三酚等 4 种酚类物质的处理侧线虫轨迹较为稀疏, 这

与已有文献报道的酚类物质对线虫有拮抗作用具有相似之处^[7, 25-26], 即酚类在低浓度下可以通过刺激线虫对其造成负面影响从而使其移动出现迟滞以达到驱避的目的。值得一提的是, 间苯三酚的杀线虫活性此前曾有报道, 如闫磊等及刘计权发现, 间苯三酚对马铃薯腐烂茎线虫、南方根结线虫的 LC₅₀ 值分别为 251.64 μg/mL 和 840 μg/mL^[27-28]。在本文中, 南方根结线虫在低于 200 μg/mL 的间苯三酚环境下未出现明显死亡现象, 但其驱避活性呈现浓度依赖性, 表明间苯三酚在低浓度下能够驱避根结线虫, 而在高浓度下可以灭杀根结线虫, 具有多种抗根结线虫活性。另外, 我们发现许多酯类物质也表现出了明显的驱避活性。酯类物质对线虫活性的影响也多有报道, 如异硫氰酸苄酯及磷酸三甲苯酯等, 这些酯类物质不仅影响线虫的运动及趋向, 同时还对线虫的生殖及卵囊的孵化具有较好的抑制活性, 而作为芸薹属植物次生代谢产物的异硫氰酸酯类化合物用作土壤熏蒸剂也能够有效控制根结线虫的数量及活性^[29-30]。

3.4 浓度梯度测试及浓度依赖效应分析

从趋性活性结果来看, 具有吸引活性的已报道物质在较低浓度, 如水杨酸甲酯在 1 μg/mL 条件下即可吸引根结线虫, 表明根结线虫幼虫在侵染阶段能够灵敏地感知到植物根部分泌的信号分子, 从而快速完成定位和侵染过程。对茴香胺的浓度测试表明, 低浓度下吸引根结线虫的物质在提高浓度后反而会驱避, 表明线虫对引诱其运动的物质也有耐受界限。超出浓度界限后也会令其逃逸, 导致引诱效果降低甚至变为驱避效果, 这与其他一些物质对线虫的趋性表征结果一致^[31]。此外发现, 具有驱避活性的验证化合物普遍需要 50 μg/mL 或更高质量浓度才能较好的驱离线虫, 这可能是由于验证化合物在低浓度下未能对根结线虫的活力或行为造成足够影响, 幼虫为了利用自身有限的能量尽快到达植物根部并完成侵染过程, 会忍耐化合物造成的不利影响并继续向原方向运动。而间苯三酚在 10 μg/mL 下对根结线虫的驱避活性优于已报道的化合物 2-辛酮在 50 μg/mL 下的驱避活性, 表明其具有开发为高效根结线虫驱避剂的潜能。在间苯三酚的浓度梯度测试中, 根结线虫在物质浓度较低的情况下趋性具有浓度依赖性, 即随着间苯三酚质量浓度提升驱避效果逐渐提高; 但随着浓度进一步提升, 100 μg/mL 的

趋性指数 (0.53) 和 200 μg/mL 的趋性指数 (0.48) 差别并不明显, 可能是由于胶体内浓度到达一定阈值后, 超出了线虫的感知水平, 继续提高浓度无法对线虫造成更有效的驱离作用。

3.5 结论

本研究设计了一种检测根结线虫 2 龄幼虫趋性的测试模型, 并建立了将根结线虫在胶体中运动留下的轨迹量化为趋性指数, 从而判断根结线虫趋性的全新方法。通过 10 种已报道物质的趋性检测验证了方法的可靠性, 并对 40 种未测试化合物的趋性进行测试, 筛选出吸引活性最强的对茴香胺和驱避活性最强的间苯三酚, 研究了根结线虫对这两种化合物不同浓度的趋性关系, 为下一步筛选发现活性更优的根结线虫驱避活性化合物提供了新方法, 为未来杀线虫农药的减施增效与抗药性的预防提供了新思路。本研究结果仅为室内根结线虫趋性化合物筛选, 所测试结果需进一步经过土壤及田间环境重复验证, 最终确认化合物对根结线虫的趋性影响及实际防治效果。

参考文献 (References):

[1] TRUDGILL D L, BLOK V C. Apomictic, polyphagous root-knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2001, 39(1): 53-77.

[2] AKINSANYA A K, AFOLAMI S O, KULAKOW P, et al. The root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, profoundly affects the production of popular biofortified cassava cultivars[J]. *Nematology*, 2020, 22(6): 667-676.

[3] KANTOR M, HANDOO Z, KANTOR C, et al. Top ten most important U. S.-regulated and emerging plant-parasitic nematodes[J]. *Horticulturae*, 2022, 8(3): 208.

[4] 刘晨, 李英梅, 陈志杰. 南方根结线虫耐寒性研究进展[J]. *陕西农业科学*, 2016, 62(7): 98-100.

LIU C, LI Y M, CHEN Z J. Research progress on cold tolerance of *Meloidogyne incognita*[J]. *Shaanxi Agric Sci*, 2016, 62(7): 98-100.

[5] 郑雅楠, 杨忠岐, 王小艺, 等. 植物寄生线虫的化学趋性[J]. *生态学杂志*, 2014, 33(3): 837-842.

ZHENG Y N, YANG Z Q, WANG X Y, et al. Chemotaxis of plant parasitic nematodes: a review[J]. *Chin J Ecol*, 2014, 33(3): 837-842.

[6] KIRWA H K, MURUNGI L K, BECK J J, et al. Elicitation of differential responses in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* to tomato root exudate cytokinin, flavonoids, and alkaloids[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(43): 11291-11300.

[7] KIHIIKA R, MURUNGI L K, COYNE D, et al. Parasitic nematode *Meloidogyne incognita* interactions with different *Capsicum annum* cultivars reveal the chemical constituents modulating root herbivory[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2903.

[8] CASTRO C E, BELSER N O, MCKINNEY H E, et al. Strong repellency of the root knot nematode, *Meloidogyne incognita* by

- specific inorganic ions[J]. *J Chem Ecol*, 1990, 16(4): 1199-1205.
- [9] WANG P Y, SUN Y, YANG L L, et al. Chemotactic responses of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* to *Streptomyces plicatus* [J/OL]. *FEMS Microbiol Lett*, 2019, 366(19): fnz234. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz234>
- [10] ZHAI Y L, SHAO Z Z, CAI M M, et al. Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from Antarctic soil against *Meloidogyne incognita*[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 253.
- [11] KUANG M S, LIU T T, WU H B, et al. Constituents leached by tomato seeds regulate the behavior of root-knot nematodes and their antifungal effects against seed-borne fungi[J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(34): 9061-9069.
- [12] SPIEGEL Y, BURROWS P M, BAR-EGAL M. A Chemo attractant in onion root exudates recognized by *Ditylenchus dipsaci* in laboratory bioassay[J]. *Phytopathology*®, 2003, 93(1): 127-132.
- [13] OKA Y. Aromatic compounds that attract *Meloidogyne* species second-stage juveniles in soil[J]. *Pest Manag Sci*, 2021, 77(10): 4288-4297.
- [14] BEEMAN A Q, NJUS Z L, PANDEY S, et al. Chip technologies for screening chemical and biological agents against plant-parasitic nematodes[J]. *Phytopathology*®, 2016, 106(12): 1563-1571.
- [15] WANG C L, LOWER S, WILLIAMSON V M. Application of Pluronic gel to the study of root-knot nematode behaviour[J]. *Nematology*, 2009, 11(3): 453-464.
- [16] TSAI A Y L, IWAMOTO Y, TSUMURAYA Y, et al. Root-knot nematode chemotaxis is positively regulated by l-galactose sidechains of mucilage carbohydrate rhamnogalacturonan-I[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(27): eabh4182.
- [17] OOTA M, TSAI A Y L, AOKI D, et al. Identification of naturally occurring polyamines as root-knot nematode attractants[J]. *Mol Plant*, 2020, 13(4): 658-665.
- [18] HUA C, LI C J, JIANG Y, et al. Response of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) and root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) to gradients of pH and inorganic salts[J]. *Plant Soil*, 2020, 455: 305-318.
- [19] GIANNAKOU I O, KARPOUZAS D G, ANASTASIADES I, et al. Factors affecting the efficacy of non-fumigant nematicides for controlling root-knot nematodes[J]. *Pest Manag Sci*, 2005, 61(10): 961-972.
- [20] ROBACKER D C, WARFIELD W C, FLATH R A. A four-component attractant for the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae), from host fruit[J]. *J Chem Ecol*, 1992, 18(7): 1239-1254.
- [21] JONES J, PERRY R, JOHNSTON M. Investigations of the secretions of nematode sense organs using molecular biological techniques[C]. 21st International Nematology Symposium, 1992.
- [22] TITOV O, BRYGADYRENKO V. Influence of synthetic flavorings on the migration activity of *Tribolium confusum* and *Sitophilus granarius*[J]. *Ekológia Bratislava*, 2021, 40(2): 163-177.
- [23] 万红才, 罗洪莲, 刘晓艳, 等. 留兰香不同提取物中香芹酮、柠檬烯的含量及其抑菌活性研究[J]. *中南药学*, 2021, 19(10): 2043-2047.
- WAN H C, LUO H L, LIU X Y, et al. Content of carvone and limonene and their antibacterial activity of *Mentha spicata* L. extract[J]. *Central South Pharmacy*, 2021, 19(10): 2043-2047.
- [24] 付磊磊, 李双阳, 何军, 等. 香芹酮和薄荷醇手性异构体对淡色库蚊熏蒸及驱避活性[J]. *昆虫学报*, 2016, 59(7): 732-738.
- FU L L, LI S Y, HE J, et al. Fumigation and repellent activities of the optical isomers of carvone and menthol against *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae)[J]. *Acta Entomol Sin*, 2016, 59(7): 732-738.
- [25] CHITWOOD D J. Phytochemical based strategies for nematode control[J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2002, 40: 221-249.
- [26] 曹雪, 李辉, 修光利. 环境浓度下壬基酚对秀丽隐杆线虫时间依赖性的毒性兴奋效应[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(2): 187-194.
- CAO X, LI H, XIU G L. Time-dependent hormetic effects of nonylphenol on *Caenorhabditis elegans* under environmental concentrations[J]. *Asian J Ecotoxicol*, 2019, 14(2): 187-194.
- [27] 闫磊, 肖婷, 牛洪涛, 等. 15种植物源化合物对马铃薯茎线虫的活性比较[J]. *植物保护*, 2008, 34(1): 85-89.
- YAN L, XIAO T, NIU H T, et al. Comparison of the toxicity of 15 phytochemicals to *Ditylenchus destructor*[J]. *Plant Prot*, 2008, 34(1): 85-89.
- [28] 刘计权. 绵马贯众对南方根结线虫的抑制作用研究[D]. 太原: 山西大学, 2014.
- LIU J Q. Study on inhibitory effect of *Dryopteris crassirhizoma* against *Meloidogyne incognita*[D]. Taiyuan: Shanxi University, 2014.
- [29] 莫爱素, 丘卓秋, 吴海燕. 异硫氰酸苯酯作用下大豆胞囊线虫的运动及孵化[J]. *中国油料作物学报*, 2016, 38(6): 831-837.
- MO A S, QIU Z Q, WU H Y. Behavioral response of *Heterodera glycines* locomotor and egg-hatching to benzyl isothiocyanate[J]. *Chin J Oil Crop Sci*, 2016, 38(6): 831-837.
- [30] 唐洁琳, 张红丹, 周沁宇, 等. 磷酸三甲苯酯对秀丽隐杆线虫的生殖毒性及机制[J]. *环境与职业医学*, 2022, 39(5): 532-538.
- TANG J L, ZHANG H D, ZHOU Q Y, et al. Reproductive toxicity and associated mechanism of tricresyl phosphate on *Caenorhabditis elegans*[J]. *Environ Occupat Med*, 2022, 39(5): 532-538.
- [31] 左元梅, 董林林, 李晓林, 等. 十三酸在防治南方根结线虫方面的应用: CN102524254B[P/OL]. 2014-08-13. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/detail.aspx?FileName=CN102524254B&DbName=SCPD2014>
- ZUO Y M, DONG L L, LI X L, et al. Application of tridecanoic acid in the control of *Meloidogyne incognita*: CN102524254B[P/OL]. 2014-08-13.

(责任编辑: 金淑惠)