

柱层析法对菌株 snef8 有效成分的初步分离

谭可菲^{1,2}, 段玉玺², 朱晓峰², 陈井生³, 罗宝君¹, 赵秀梅¹, 王连霞¹

(1. 黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006; 2. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 3. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316)

摘要:采用硅胶柱层析的方法, 对 snef8 菌株中的杀线虫活性物质进行了初步的分离, 生物法测定各组份的杀线虫活性, 减压浓缩有活性的组份制备粗提液。结果表明: 菌液中的杀线虫活性物质主要集中于第 8~第 12 号管中, 其杀线虫活性接近于 100%。此法不但可以除去部分杂质, 提高粗提液的纯度, 还可以应用制备型硅胶柱, 大量制备富集粗提液, 将其作为生物农药应用于农业生产, 其防治根结线虫病效果较好。

关键词: snef8 真菌; 南方根结线虫; 杀线虫活性; 生物测定; 硅胶柱层析法

中图分类号: S432

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2011)04-0064-03

根结线虫是一类重要的植物寄生线虫, 可以给农业生产造成严重的损失。在蔬菜作物上发病, 常年减产 15%~20%, 严重时可达 70%, 甚至绝收^[1]。目前, 根结线虫的防治以化学防治为主, 但由于化学农药具有高毒、高残留等缺点, 因此, 生物农药的研发越来越受到人们的重视^[2-3]。

已有研究表明, 嗜松青霉菌株 snef8 菌液对南方根结线虫具有显著的毒杀作用。现利用硅胶柱对杀线虫真菌菌株 snef8 活性物质进行了初步的分离, 为进一步的分离纯化打下基础, 为新农药的开发及毒理学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

供试菌株为 snef8(沈阳农业大学北方线虫研究所保存嗜松青霉菌株); 供试线虫为南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*); 供试试剂为无水乙醇、1 mol·L⁻¹ 盐酸、甲醇, 各种试剂均为分析纯(天津市科密欧化学试剂有限公司生产); 200~300 目的硅胶(上海五四化学试剂厂生产)。主要仪器有: Milli-Q 超纯水机、层析柱(沈阳化玻仪器厂)、电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏试验设备有限公司)、BS-100A 自动部分收集器(上海市青浦户西仪器厂)和 HL-2 恒流泵(上海市青浦户西仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 菌液的制备 以优化的查氏培养基(葡萄糖 4%、氯化铵 0.25%、磷酸氢二钾 0.075%、氯化钾 0.1%、硫酸镁 0.04%、硫酸亚铁 0.001%)作为发酵培养液, 在 25℃, 通气量为 10 L·min⁻¹, 转速为 150 r·min⁻¹, 自然的 pH 条件下培养 7 d, 发酵原液先用布氏漏斗抽滤, 除去菌丝体及孢子体, 再用旋转蒸发器减压浓缩至 10 倍, 置于 4℃冰箱中预冷 12 h 后, 将其与乙醇以体积比 1:5 混合, 置于 -20℃冰箱中 24 h, 再将上清液加压蒸馏至原体积, 经 0.22 μm 醋酸纤维滤膜过滤, 除去沉淀后置于 -4℃冰箱中保存备用^[4]。

1.2.2 南方根结线虫 J2 的获得 在温室中盆栽番茄(L-402)繁殖南方根结线虫。将番茄种子播种在育苗床中, 稍显粗壮时移为盆栽。接种南方根结线虫 1 个月后, 根部会产生大量的卵囊。将根取出并洗去泥土, 用镊子挑取卵囊置于培养皿中, 用 0.5% 的次氯酸钠处理 3 min, 再用无菌水冲洗 3 次, 置于 25℃培养箱中进行孵化, 3 d 左右就会孵出大量的 J2, 吸到灭菌的三角瓶中, 置于 4℃冰箱中保存。

1.2.3 硅胶预处理 取硅胶用无离子水浸泡 6 h, 倾去细小颗粒, 布氏漏斗抽干; 用 6 mol·L⁻¹ HCl 浸泡 12 h, 去掉硅胶中酸性物质, 用无离子水洗至中性, 布氏漏斗抽干; 用无水乙醇浸泡 12 h, 去掉硅胶中脂溶性物质, 布氏漏斗抽干, 备用。用前在 120℃烘箱中活化 24 h。

1.2.4 硅胶柱层析初步分离 取 40 cm × 1.6 cm 的普通层析柱, 先用无离子水冲洗干净,

收稿日期: 2011-01-13

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划资助项目(2006BAD08A08)

第一作者简介: 谭可菲(1984-), 女, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 硕士, 研究实习员, 从事植物保护研究。E-mail: tkfhj@163.com

再用洗脱液甲醇:水(90:10)淋洗,保证无水后,将处理好的硅胶与洗脱液混合均匀,进行湿法灌柱。用洗脱液平衡后,上样量为浓缩 10× 的菌液 2 mL,用洗脱液进行淋洗,洗脱速度为 1 mL·min⁻¹,分管收集,每管 5 mL,共收集 70 管。反复过柱 5 次,合并相同编号试管,分别进行生物检测。

1.2.5 不同浓度菌液杀线虫活性的测定 将 1 倍菌液分别配制成 100%(发酵液原液),90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%不同的浓度,各取 0.5 mL 菌液加入贝氏小皿后,直接加入线虫 50 头左右,置于 25℃ 保湿温箱中,24 h 后镜检测定线虫死亡率,以无菌水为对照,每处理 3 次重复。

1.2.6 第一轮柱层析菌液杀线虫活性的测定 经柱层析分离出 70 份样品,有选择的取出一部分进行生物测定。第一轮试验抽取 1、5、10、15、20、30、40、50、60、70 号试管样品,各取 0.5 mL 菌液加入贝氏小皿中,同时加入线虫 50 头左右,置于 25℃ 保温箱中,24 h 后镜检测定线虫死亡率,以无菌水为对照,每处理 3 次重复。此试验是对柱层析分离后的活性组份进行的初步筛选,为进一步明确活性物质所在区域奠定基础。

1.2.7 第二轮柱层析菌液杀线虫活性的测定 根据第一轮生物测定结果,分析活性物质所在区域,取该区域内的所用流份分别进行第二轮菌液的生物测定,分析活性物质集中位置,多次重复大量收集并合并活性组份,减压浓缩即为粗提液。

取活性区域的菌液 0.5 mL 加入贝氏小皿后,直接加入线虫 50 头左右,置于 25℃ 保温箱中,24 h 后镜检测定线虫死亡率,以无菌水为对照,每处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 浓缩物的杀线虫活性测定

由表 1 可知,随着发酵液浓度的降低,其杀虫活性随之下降。当菌液浓度为 100%(发酵液原液)时,其活性最高,致死率可达到 90%以上;当菌液浓度为 20%时,即稀释 5 倍液时,致死率为 48.12%,接近致死中浓度;随着菌液浓度的无限降低,杀线虫活性逐渐降低。表明菌液活性的强弱与其浓度关系密切,其杀线虫活性随着菌液的浓度降低而下降。

表 1 不同浓度菌液杀线虫活性测定 %

发酵液 浓度/%	二龄幼虫死亡率			校正 死亡率
	I	II	III	
100	94.55	94.44	93.22	94.07
90	92.45	87.27	87.72	89.15
80	83.64	85.19	81.03	83.29
70	79.66	78.69	78.95	79.10
60	75.47	74.58	76.36	75.47
50	70.25	71.33	69.52	70.37
40	64.15	67.31	62.75	64.73
30	62.00	59.65	63.79	61.81
20	47.27	45.10	52.00	48.12
10	16.95	13.21	12.73	14.29
5	6.78	4.92	3.39	5.03

2.2 第一轮过柱分离液杀线虫活性测定

第一轮活性试验采取 20 号以前逢 5、10 取样的方法,30 号以后逢 10 取样的方法进行生物活性检测(见表 2)。

表 2 第一轮生物试验测定线虫死亡率 %

试管编号	二龄幼虫死亡率			校正 死亡率
	I	II	III	
1	61.11	63.16	62.26	62.18
5	66.04	67.27	69.49	67.60
10	100.00	100.00	100.00	100.00 ⁺
15	61.02	58.49	59.32	59.61
20	42.59	44.07	39.29	41.98
30	0	0	0	0
40	0	0	0	0
50	0	0	0	0
60	0	0	0	0
70	0	0	0	0

注:“+”表示分离液对线虫的毒性较强。下同。

由于受所选洗脱液的类别、流速、柱长和柱温等多方面因素的影响,试验结果表明,活性组份存在于 30 号分离液以前,其中第 10 号管分离液的杀线虫作用可达 100%,表明活性物质主要集中在第 10 号管附近。第 30 号管以后活性物质存在量极其微少,其杀线虫作用不明显,趋近于 0。因此,30 号管分离液后的组份活性忽略不计,达到分离杂质,部分除杂的效果。

2.3 第二轮过柱分离液杀线虫活性测定

经第一轮试验结果表明,活性物质主要存在于前 30 号管分离组份中,并集中于第 10 号管附近,故第二轮试验采用第 5~第 15 号管进行逐管生物检测,分析活性物质主要存在的位置(见表 3)。

表 3 第二轮生物试验测定线虫死亡率 %

试管编号	二龄幼虫死亡率			校正死亡率
	I	II	III	
5	66.04	67.27	69.49	67.60
6	62.50	63.79	62.71	63.00
7	85.71	87.04	82.69	85.15
8	100.00	100.00	100.00	100.00 ⁺
9	100.00	100.00	100.00	100.00 ⁺
10	100.00	100.00	100.00	100.00 ⁺
11	100.00	100.00	100.00	100.00 ⁺
12	98.18	96.61	100.00	98.26 ⁺
13	77.97	76.79	78.18	77.64
14	73.21	76.27	75.00	74.83
15	61.02	58.49	59.32	59.61

由表 3 可知,菌液中的杀线虫活性物质主要集中在第 8~第 12 号管中,其杀线虫活性接近于 100%;其它分离液中也有部分杀线虫活性,但是随着距离中心第 10 号管的位置偏移距离增加,其杀线虫活性降低。

按照第二轮生物测定分析结果,利用制备柱扩大模式,大规模生产,集中收集活性物质存在于第 8~第 12 号管分离液,将其合并浓缩即得粗提液。

3 结论与讨论

该试验主要应用生物化学的分离手段对真菌

代谢物中的活性物质进行粗分离,结果表明,菌液中的杀线虫活性物质主要集中在第 8~第 12 号管中,其杀线虫活性接近于 100%,利用硅胶柱层析进行活性物质的初步分离,不但可以除去部分杂质,同时还可以利用生物测定法分析活性物质集中位置,制备粗提液。

目前关于该菌杀线虫活性物质的研究,国内外还尚未有所报道,该方面的研究工作具有良好的发展前景,今后还要进一步应用有效的生化分离手段,对其进行深入的探讨和分析,尽可能从该菌物中分离获得高纯度杀线虫活性物质并确定其结构及性质,为化学农药的仿合成、商品化加工以及田间大范围的应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] 张克勤. 植物寄生线虫生物防治[M]. 北京:中国科学技术出版社,2004.
- [2] 高仁恒,刘杏中,裘维藩. 根结线虫的生物防治简介[J]. 贵州农学院学报,1996,15(2):51-55.
- [3] 齐淑华,曹勘程,袁会珠,等. 爱福丁防治番茄根结线虫病[J]. 植物保护,2000,26(5):46-47.
- [4] 谭可菲. 嗜松青霉(*Penicillium pinophilum*)杀线虫活性物质质量控制技术研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2009.

Primary Separation of the Activity Substances of snef 8 against *Meloidogyne incognita* by Chromatography

TAN Ke-fei^{1,2}, DUAN Yu-xi², ZHU Xiao-feng², CHEN Jing-sheng³

LUO Bao-jun¹, ZHAO Xiu-mei¹, WANG Lian-xia¹

(1. Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar; Heilongjiang 161006; 2. Plant Protection College of Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161; 3. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing, Heilongjiang 163316)

Abstract: The preliminary separation of the activity substances from the Fermentation against *Meloidogyne incognita* was investigated by using silica gel column chromatography. The activity against *Meloidogyne incognita* of each component was tested by vivo measurement. The crude extracts was prepared by decompressed and concentrated the activity component. The result showed that the activity substances against *Meloidogyne incognita* was in the bottles from No. 8 to No. 12. The methods could not only remove some impurities, improve the purity of the crude extracts, but also enrich lots of crude extracts by using the preparative silica gel column chromatography. This crude extracts could be used in agricultural production directly and the control effects was better.

Key words: snef8 fungus; *Meloidogyne* spp.; nematocidal activity; bio-assay; silica-chromatography