

· 研究简报 ·

## 西农 No. 24 菌株发酵产物对反枝苋的除草活性初步研究

龙建友\*, 姬志勤, 师宝君, 田小卫, 吴文君

(西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** 西农 No. 24 菌株是从陕西秦岭山区采集的 200 份土壤中分离得到的一株放线菌, 经初步鉴定为链霉菌属 (*Streptomyces*)。采用微量小杯法, 通过发酵、洗脱和高效液相色谱 (HPLC) 分离, 测定西农 No. 24 菌株发酵液对反枝苋 *Amaranthus retroflexus* L. 的除草活性。结果表明, 该菌株的发酵产物对反枝苋有较强的抑制生长作用。其发酵液对反枝苋种子萌发抑制率为 26.7%, 主根生长抑制率为 80.6%, 主茎生长抑制率为 66.5%; 离子交换液对反枝苋的种子萌发抑制率为 42.9%, 主根生长抑制率为 93.1%, 主茎生长抑制率为 86.2%。经 HPLC 分离后得到 8 个馏份, 其中馏份 4 的除草活性最强, 对反枝苋的种子萌发抑制率为 86.36%, 主根生长抑制率为 95.84%, 主茎生长抑制率为 93.76%。

**关键词:** 西农 No. 24 菌株; 链霉菌; 发酵; 除草活性

**中图分类号:** S154 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2004)01-0089-04

## Studies on Herbicidal Activity of Fermentation Products of Xi Nong No. 24 Strain against *Amaranthus retroflexus* L.

LONG Jian-you\*, JI Zhi-qin, SHI Bao-jun, TIAN Xiao-wei, WU Wen-jun

(Institute of Pesticide of NWSUAF, Yangling 712100, China)

**Abstract:** The strain of Xi Nong No. 24 was separated from the soil collected in Qinling, Shaanxi province. It was identified to be streptomyces, taking as object, by means of micro-pannikin, herbicidal activity had been measured on *Amaranthus retroflexus* L. by fermenting, eluting and Pre-HPLC. The results of biological test showed that the fermentation products of No. 24 had an intensive herbicidal activity against *Amaranthus retroflexus* L., and had an inhibition of 80.6% to taproot, an inhibition of 66.5% to caulis and an inhibition of 26.7% to bourgeon. Exchange liquor had an inhibition of 93.1% to taproot, an inhibition of 86.2% to caulis and an inhibition of 42.9% to bourgeon. Eight fractions were isolated from the fermentation products of No. 24 strain by Pre-HPLC. The fraction No. 4 had the most intensive herbicidal activity. The inhibiting rate of No. 4 was 95.8%, 93.76% and 86.36% against the taproot, caulis and the bourgeon of *Amaranthus retroflexus* L. respectively.

**Key words:** *Streptomyces* spp. Xi Nong No. 24; streptomyces; fermentation; herbicidal activity

反枝苋 *Amaranthus retroflexus* L. 可以危害多种作物, 世界范围内由反枝苋危害造成的损失每年达几千万美元<sup>[1,2]</sup>。近年来我国科学家正在研究利用

微生物代谢产物防除杂草。“鲁保一号”菟丝子盘长孢状刺盘孢 *C. gloeosporoides* f. sp. *Cuscutae* 的代谢物防治大豆田菟丝子是我国利用微生物防除杂

收稿日期: 2003-10-30; 修回日期: 2003-12-04

作者简介: 龙建友(1977-), 男, 湖南衡阳人, 博士研究生, 主要从事农药毒理学和农用抗生素方面的研究

\* 联系电话: 029-87092191; E-mail: longgaoxiaoning@126.com

草的先例<sup>[3,4]</sup>。西农No. 24菌株是作者首次在秦岭山区分离得到的,发现其代谢产物对反枝苋具有较好活性。关于放线菌代谢产物活性的研究大多是关于杀虫和杀菌活性的报道,而有关其除草活性的报道相对较少,只有少数农用抗生素如双丙氨膦、赤霉素和比洛尼素等具有除草活性的报道<sup>[5,6]</sup>。为此作者进行了西农No. 24菌株发酵代谢产物对反枝苋的除草活性测定研究,其结果简报如下。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

西农No. 24菌株(*Streptomyces* spp., XiNong No. 24)自陕西秦岭山区土样中分离得到。

### 1.2 供试杂草

反枝苋 *Amaranthus retroflexus* L.。

### 1.3 西农No. 24菌株的分离

准确称取10g土样放入装有90mL无菌水与小玻璃珠的250mL三角瓶中,即成浓度为0.1mg/L的土样稀释液。另用1mL无菌吸管吸取上述土样稀释液1mL移入装有9mL无菌水的试管中,吹吸3次,让菌液混合均匀即成浓度为0.01mg/L的稀释液,采取逐步稀释法获得质量分数为 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 和 $1 \times 10^{-5}$ 三个稀释浓度。将无菌平皿编上 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $1 \times 10^{-5}$ 代码,每一代码设置3个重复。用1mL无菌吸管按无菌操作要求吸取 $1 \times 10^{-5}$ 稀释液1mL放入编号为 $1 \times 10^{-5}$ 的平皿中,同法依次吸取 $1 \times 10^{-4}$ 和 $1 \times 10^{-3}$ 稀释液各1mL分别放入编号为 $1 \times 10^{-4}$ 和 $1 \times 10^{-3}$ 平皿中。然后在9个平皿中分别倒入已融化并冷却至45~50℃的放线菌专用培养基中,轻轻转动平板,使菌液与培养基混合均匀,冷凝后倒置于28~30℃温箱中培养<sup>[7,8]</sup>。

### 1.4 培养基配方

1.4.1 固体培养基 可溶性淀粉20g, KNO<sub>3</sub> 1g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01g, 琼脂20g, 蒸馏水1L, pH值7.2~7.4,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌30min 备用。

1.4.2 液体培养基 黄豆饼粉培养基和小米培养基: 将黄豆饼粉或小米放入水中煮沸15min后,加入葡萄糖、氯化钠和碳酸钙,用8层纱布过滤,最后加水定容分装。

### 1.5 培养方法

采用摇瓶培养法。在250mL三角瓶中装入100mL液体培养基,再接入西农No. 24菌株孢子悬

浮液,接种量10% (体积分数), 150 r/min, 30 振荡培养5d。

### 1.6 发酵液的处理

西农No. 24菌株经过发酵后,弃去菌丝体,进行硅胶柱层析,分别用甲醇和蒸馏水洗脱,再用阳离子交换树脂脱盐。处理样品分别标记为西农No. 24菌株发酵原液; 发酵液浓缩并经硅胶吸附后的甲醇洗脱液; 发酵液浓缩并经硅胶吸附后的水洗脱液; 为的阳离子树脂交换液。

### 1.7 除草活性成分分离方法

将16L西农No. 24菌株发酵液用8层纱布过滤后,弃去菌丝体和滤渣,在通风橱中浓缩至一定体积,用200~300目硅胶拌匀,然后吹干装柱。以甲醇和蒸馏水(体积分别为1L和1.5L)淋柱,流速为8mL/min,将收集的馏份用阳离子交换树脂进行交换以达到脱盐目的。最后用高效液相色谱制备。

### 1.8 除草活性测定方法

将西农No. 24菌株发酵原液、发酵液浓缩经硅胶吸附后的甲醇洗脱液、发酵液浓缩经硅胶吸附后的水洗脱液、水洗脱后的阳离子树脂交换液和经HPLC制备后的8个馏份各10mL分别混合到热的100mL质量分数为1%的水琼脂培养基中。待培养基冷却后,将浸泡2h的反枝苋种子种到培养基中,每个处理重复5次,用清水作对照。于人工气候箱中培养( $T=28^\circ\text{C}$ ,  $\text{RH}=95\%$ , 光照L/D=12h/12h)3d,然后检查发芽率,测定根长、芽长。按下式计算其生长抑制率<sup>[9]</sup>。

$$\text{生长抑制率}(\%) = \frac{\text{对照生长量} - \text{处理生长量}}{\text{对照生长量}} \times 100$$

$$\text{抑制萌发率}(\%) = \frac{\text{对照萌发数} - \text{处理萌发数}}{\text{对照萌发数}} \times 100$$

## 2 结果与分析

西农No. 24菌株发酵液不同处理对反枝苋的除草活性结果见表1。

经统计分析,3次洗脱对反枝苋种子萌发的抑制作用无显著性差异,水洗脱液和离子交换液对反枝苋根、茎的抑制作用与西农No. 24菌株发酵原液有显著差异性,而甲醇洗脱液对反枝苋的抑制作用与西农No. 24菌株发酵原液无明显差异性。西农No. 24菌株发酵液对反枝苋根的抑制率为80.6%,对茎的抑制率为66.5%;经水洗脱再稀释10倍情况下抑制率分别达到了90.7%和85%,经离子交换

Table 1 Herbicidal activity of fermentation of XiNong No. 24 against *Amaranthus retroflexus* L.

Sample	Diluted times	Inhibition (%) $\pm$ SE		
		Seed bourgeon	Tap root development	Caulis development
Fermentation liquor		26.7 a $\pm$ 0.1	80.6 a $\pm$ 0.3	66.5 a $\pm$ 0.1
Eluted carbino1	10	21.4 a $\pm$ 0.1	91.3 b $\pm$ 0.3	72.2 a $\pm$ 0.1
	50	7.10 a $\pm$ 0.2	72.2 a $\pm$ 0.2	41.6 a $\pm$ 0.1
Eluted distilled water	10	28.6 a $\pm$ 0.1	90.7 b $\pm$ 0.3	85.0 b $\pm$ 0.3
	50	21.4 a $\pm$ 0.1	89.9 b $\pm$ 0.2	81.5 b $\pm$ 0.3
Exchange liquor		42.9 a $\pm$ 0.1	93.1 b $\pm$ 0.2	86.2 b $\pm$ 0.2

后抑制率分别达到了 93.1% 和 86.2%。而离子交换液对反枝苋的抑制作用与水洗脱液无显著性差异。因此, 选用水洗脱和离子交换都可除去西农 No. 24

菌株发酵液中的杂质, 从而进一步提高其除草活性。用 C<sub>18</sub> 柱对交换后的样品进行切割, 收集得到 8 个馏份, 结果见图 1。其除草活性数据见表 2。

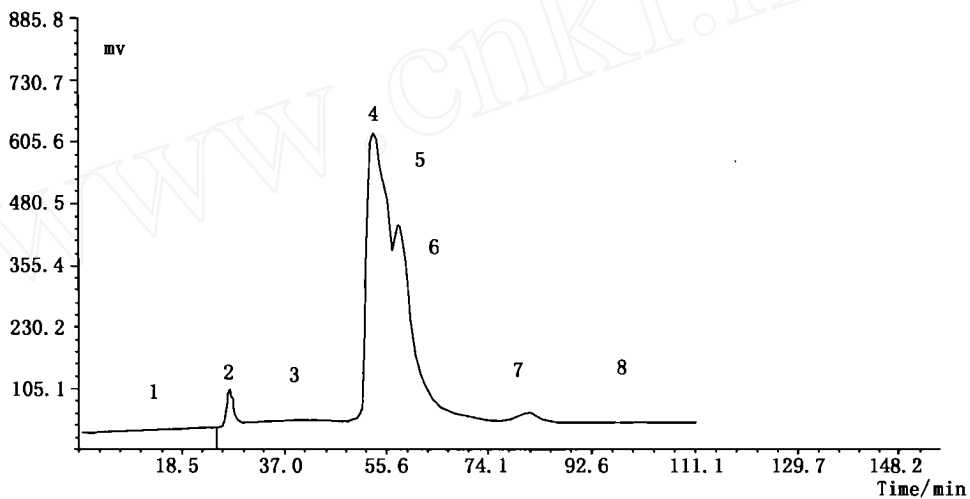


Fig 1 HPLC spectrum of herbicidal activity of fermentation products of XiNong No. 24 strain

Table 2 Herbicidal activity of eight fractions to *Amaranthus retroflexus* L.

Fraction number	Inhibition (%) $\pm$ SE		
	Seed bourgeon	Tap root development	Caulis development
1	9.09 a $\pm$ 0.14	72.99 b $\pm$ 0.24	76.13 b $\pm$ 0.23
2	4.54 a $\pm$ 0.17	57.13 a $\pm$ 0.13	46.96 a $\pm$ 0.13
3	4.54 a $\pm$ 0.18	67.77 b $\pm$ 0.29	77.72 b $\pm$ 0.26
4	86.4 c $\pm$ 0.22	95.84 c $\pm$ 0.32	93.76 c $\pm$ 0.37
5	75.5 b $\pm$ 0.21	75.68 b $\pm$ 0.26	50.08 a $\pm$ 0.13
6	4.54 a $\pm$ 0.13	56.40 a $\pm$ 0.14	39.61 a $\pm$ 0.18
7	4.54 a $\pm$ 0.17	53.56 a $\pm$ 0.16	53.65 a $\pm$ 0.13
8	9.09 a $\pm$ 0.15	67.55 b $\pm$ 0.27	76.37 b $\pm$ 0.27

经统计分析, 馏份 4 对反枝苋的抑制率与其他 7 个有显著性差异; 5 对反枝苋种子萌发的抑制作用与 1、2、3、6、7、8 这 6 个也存在显著性差异。4 对反枝苋种子萌发的抑制率为 86.4%, 主根生长抑制率为 95.84%, 主茎生长抑制率为 93.76%; 5 对反枝苋种子萌发的抑制率为 75.5%, 主根生长抑制率为 75.68%, 主茎生长抑制率为 50.08%; 4 和 5 之间也具有明显的差异性。这说明 4 是主要的除草活性部分, 5 也有一定的除草活性。因此, 用 HPLC 来分离西农 No. 24 菌株发酵液是可行的。

### 3 小结与讨论

本研究测定了西农 No. 24 菌株对反枝苋的除草活性, 此菌株的发酵液对反枝苋有强烈的抑制生长作用, 其对主根生长抑制率为 80.6%, 对主茎生长抑制率为 66.5%, 对反枝苋的种子萌发抑制率为 26.7%。经过高效液相色谱分离后得到 8 个馏份, 其中馏份 4 对反枝苋的平均抑制率最高。

目前对西农 No. 24 菌株的直接利用还存在许多问题, 其中之一是此菌株发酵产生的次生代谢产物的产量很低。本研究中西农 No. 24 菌株的发酵液中分离得到的除草活性物质也不到 5 mg/L, 无法直接进行工业化发酵生产。因此, 如何大幅度提高放线菌发酵产物中活性物质的产量是今后急需解决而且比较容易解决的问题。本研究的目的是从中发现活性先导化合物。作者从放线菌中分离得到具有除草活性的菌株即西农 No. 24 菌株, 目前其发酵产物中活性成分尚未完全分离, 结构亦不清楚, 故对

西农 No. 24 菌株的利用有待进一步研究。

### 参考文献:

- [1] LIU Huan-lu (刘焕禄), LIU Yi-xue (刘亦学), LIU Xiao-lin (刘晓林). 微生物除草剂研究概况与建议[J]. *J Tianjin A g r i College* (天津农学院学报), 2000, 7(4): 36-39.
- [2] Bernan V S, Greenstein M, Maiese W M. Marine micro-organisms as source of new natural products[J]. *Adv Appl M icrobiol*, 1997, 43: 57.
- [3] GU Jue-fen (顾觉奋). Antibiotics (抗生素) [M]. Shanghai(上海): Science and Technology Press(科学技术出版社), 2001. 92-95.
- [4] YU Qing (余卿). 新抗生素的筛选[J]. *Journal of M icrobiology* (微生物学杂志), 1987, 7(2): 75-82.
- [5] YAO De-ming (姚德明), JI You-hai (纪有海), GE Ying-hua (葛英华). 新农用抗菌素的筛选[J]. *Journal of M icrobiology* (微生物学杂志), 1997, 17(3): 41-43.
- [6] ZHAO Lei(赵蕾), YANG He-tong(杨合同). 一种农用拮抗链霉素的初步研究[J]. *Chin J Biological Control* (中国生物防治), 1998, 14(1): 18-20.
- [7] WU Wen-jun(吴文君), LIU Hui-xia(刘惠霞). 对农药的几点看法[J]. *Pesticides* (农药), 1998, 37(9): 1-5.
- [8] QIAN Cun-rou(钱存柔), HUANG Yi-xiu(黄仪秀). Experimental Tutorial of M icrobiology (微生物学实验教程) [M]. Beijing(北京): Peking University Press(北京大学出版社), 2000. 24-25.
- [9] FANG Zhong-da(方中达). Research Method of Plant Pathogen (植病研究方法) [M]. Beijing(北京): China Agriculture Press(中国农业出版社), 1998.