

## No051 内生真菌次生代谢产物量与培养时间的关系研究

陈珣, 杨镇, 肖军, 丑静, 龚娜, 王娜, 王红, 肇莹, 杨涛\*

(辽宁省农业科学院微生物工程中心, 辽宁沈阳 110161)

**摘要** [目的]研究 No051 内生真菌次生代谢产物量与培养时间的关系。[方法]以从辽宁省西北地区根系土壤中分离得到的 No051 内生真菌为材料, 对其进行液体培养, 分别在培养 5、9、13、17、21 和 25 d 后进行次生代谢产物干物质量的测定, 同时进行高效液相色谱分析。[结果]液体培养 9 d 为次生代谢产物产生的高峰期; 高效液相色谱分析表明该时期产生的次生代谢产物中包含的活性物质较多。[结论]该研究为 No051 内生真菌次生代谢产物的进一步研究提供了理论依据。

**关键词** 内生真菌; 次生代谢产物; 培养时间; 高效液相色谱

中图分类号 S182 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)17-07423-02

## Study on Relationship between the Amount of Metabolites of No051 Endophytic Fungi and Incubation Time

CHEN Xun et al (Research Center of Microbial Engineering, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** [Objective] The paper was to study the relationship between the amount of metabolites of No051 endophytic fungi and incubation time. [Method] The No051 endophytic fungi isolated from root-zone soil in northwest area of Liaoning province was used as materials, and it was cultured in liquid. The dry matter weight of secondary metabolites was measured after 5, 9, 13, 17, 21 and 25 days, respectively, and high performance liquid chromatography (HPLC) analysis was carried out. [Result] The production of secondary metabolites reached the peak in 9 days-cultivation. The HPLC analysis showed that higher content of active substances in the secondary metabolites in 9 days as well. [Conclusion] The study provided a theoretical basis for the further study of secondary metabolites of No051 endophytic fungi.

**Key words** Endophytic fungi; Secondary metabolite; Incubation time; High performance liquid chromatography

植物内生菌是一个多样性十分丰富的微生物类群, 分布于没有外在感染症状的健康植物组织内。随着研究领域的不断拓宽和研究方法的不断深入, 越来越多的植物内生菌被分离出来<sup>[1]</sup>。植物内生真菌产生的次级代谢产物种类丰富、结构新颖、作用机制多样。在农业方面, 植物内生菌产生的次级代谢产物不仅可抗植物病害, 同时也有促进植物生长等作用<sup>[2]</sup>。文中通过研究内生真菌 No051 次级代谢产物量与培养时间的关系, 旨在为 No051 次级代谢产物的进一步研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 供试材料。**内生真菌 No051, 由实验室从辽宁西北地区采集的根系土壤中分离并保存。

**1.1.2 供试培养基。**PA 培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 水 1 000 ml, pH 自然。

## 1.2 方法

**1.2.1 内生真菌的分离纯化。**参照马晓颖等<sup>[3]</sup>方法进行内生真菌的分离纯化。

**1.2.2 内生真菌代谢产物的制备与干物质测量。**将活化的内生真菌菌种 No051 接种于装有 100 ml PA 培养基的三角瓶中, 置于 28 ℃、200 r/min 的摇床培养, 5、9、13、17、21、25 d 时分别取出, 抽提菌丝体代谢物, 向菌丝体代谢物中加入等体积的 20% 乙醇, 浸提 24 h, 过滤, 滤液保存。将各滤液吸取

1 ml, 风干后测量干物质量。

**1.2.3 内生真菌代谢产物的高效液相色谱分析。**色谱柱: Agilent TC-C<sub>18</sub> 250 mm × 4.6 mm × 5 μm; 流动相为甲醇: 水 = 10%: 90%; 紫外检测器: 检测波长为 254 nm; 柱温: 25 ℃; 进样量: 10 μl; 流速: 1 ml/min。

## 2 结果与分析

**2.1 内生真菌代谢产物的干物质测量** 由图 1 可知, 内生真菌 No051 液体培养 9 d 时产生的次生代谢产物量最高, 9 d 后各时期产生的次生代谢产物呈逐渐下降的趋势。这说明内生真菌 No051 液体培养 9 d 时是产生次级代谢产物的高峰时期。

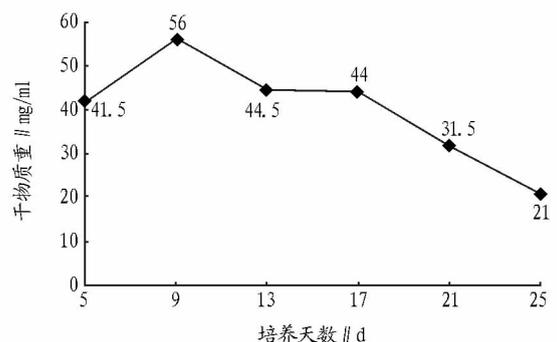


图 1 内生真菌 No051 产生次级代谢产物的干物质重

**2.2 内生真菌代谢产物的高效液相色谱分析** 图 2、3、4、5、6、7 是内生真菌 No051 液体培养 5、9、13、17、21、25 d 6 个时期产生次级代谢产物的高效液相色谱图。由各图可知, 液体培养 9 d 时, 产生次级代谢产物的高效液相色谱图中产生的吸收峰较多, 而每个吸收峰代表一种活性物质, 也就说明液体培养 9 d 时产生的次级代谢产物中包含的活性物质较多, 这与“2.1”中干物质质量的测量结果相一致。

**基金项目** 辽宁省科技攻关项目(2011215005); “百千万人才工程”入选项目择优资助项目(2012921065)。

**作者简介** 陈珣(1979-), 女, 辽宁沈阳人, 助理研究员, 硕士, 从事微生物方面的研究, E-mail: chenxun\_82\_ren@126.com。\*通讯作者, 研究员, 从事微生物方面的研究, E-mail: smkzx@sina.com。

**收稿日期** 2013-05-22

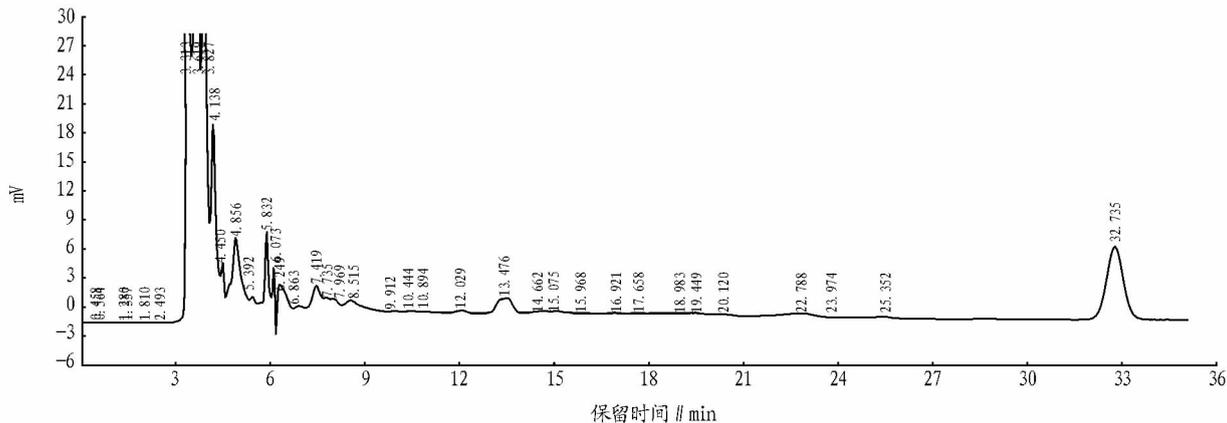


图2 内生真菌 No051 液体培养 5 d 产生次级代谢产物的高效液相色谱图谱

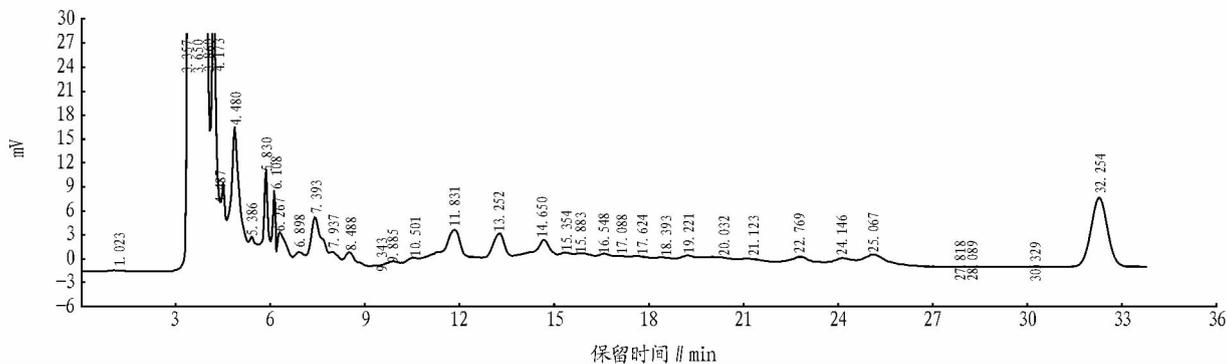


图3 内生真菌 No051 液体培养 9 d 产生次级代谢产物的高效液相色谱图谱

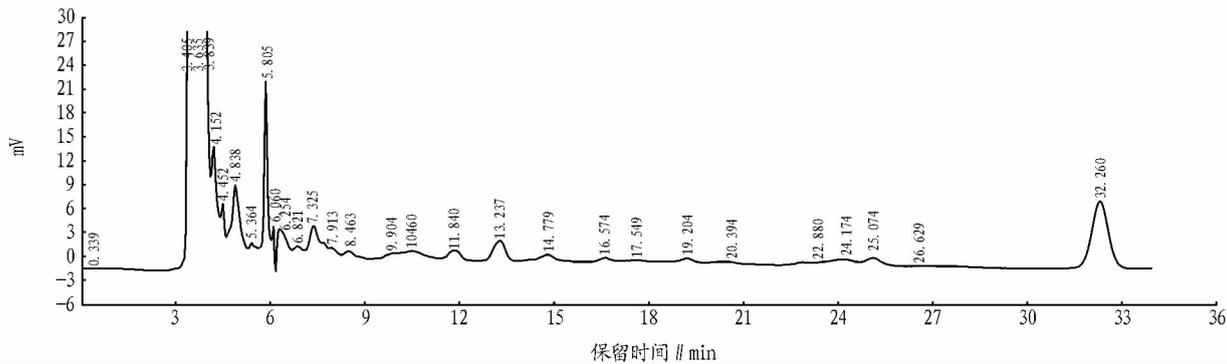


图4 内生真菌 No051 液体培养 13 d 产生次级代谢产物的高效液相色谱图谱

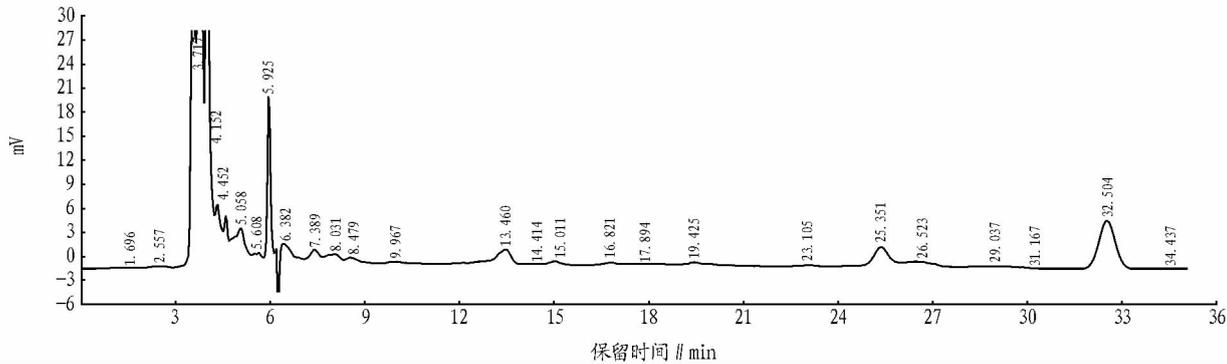


图5 内生真菌 No051 液体培养 17 d 产生次级代谢产物的高效液相色谱图谱

直播粳稻生产上不建议使用多效唑浸种。

### 参考文献

- [1] 陈晓琳,高焕章,王朝晖.多效唑水溶液浸种对绿荆籽苗发育特性的影响[J].长江大学学报:自然科学版,农学卷,2007(3):29-30.
- [2] 张昌杰,尤爱琴.多效唑在农作物生产上使用方法[J].上海农业科技,2005(4):138-139.
- [3] 阿加拉铁,薛大伟,李仕贵,等.植物激素与水稻产量的关系[J].中国稻米,2006(5):1-3.
- [4] 吕双庆,李生秀.多效唑对旱地小麦一些生理、生育特性及产量的影响[J].植物营养与肥料学报,2005,11(1):92-98.

- [5] 张红梅,曹长尧.植物源调节剂对水稻的影响[J].安徽农业科学,2008,36(7):2684-3686.
- [6] 李春喜,赵广才,代西梅,等.小麦分蘖变化动态与内源激素关系的研究[J].作物学报,2000,26(6):963-968.
- [7] 樊继伟,秦德荣,方兆伟,等.多效唑对不同类型水稻秧苗素质及其产量的影响[J].农业科技通讯,2009(5):37-38.
- [8] 陈善坤,曾晓春,张恩和,等.PP333和823307对水稻秧苗控长促蘖培育壮秧效应和增产效果及其与植物激素的关系[J].植物学通报,1995,12(S1):95-101.

(上接第7424页)

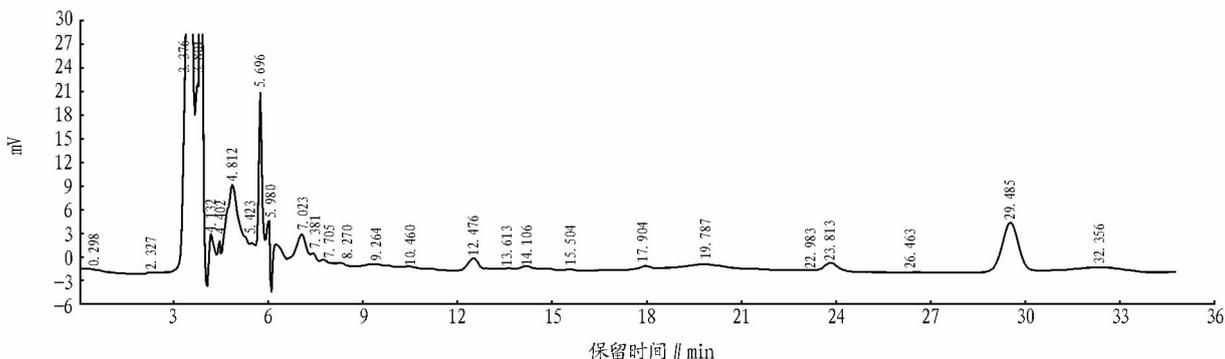


图6 内生真菌 No051 液体培养 21 d 产生次级代谢产物的高效液相色谱图谱

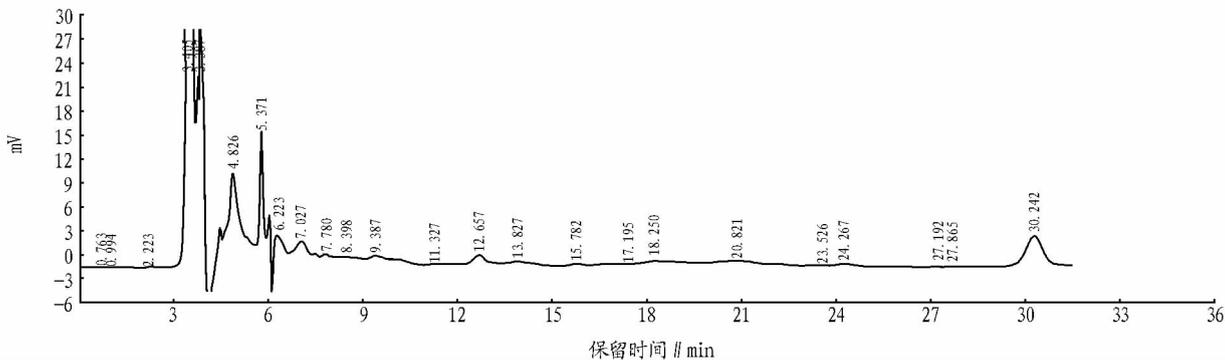


图7 内生真菌 No051 液体培养 25 d 产生次级代谢产物的高效液相色谱图谱

### 3 结论与讨论

众所周知,微生物因其种类繁多,次级代谢产物也多样化。内生真菌作为主要的微生物物种,其代谢产物也具有多样性<sup>[4-5]</sup>。

该试验研究了内生真菌 No051 次级代谢产物量与培养时间的关系,结果发现内生真菌 No051 的次级代谢产物量并不是依时间从无到有,从少到多,直至保持稳定量的线性关系,而是在一定时间范围内随时间增加而出现上下波动,但其重要的规律是次级代谢产物在培养 9 d 形成高峰产量后迅速消解,提取量急剧下降,其原因目前还不清楚,也许是随菌丝体一同消解而分解。

由于试验条件的原因,该研究只做了 6 个时期的次级代谢产物研究,只得到了一个粗略的时间范畴。从结果中可发现内生真菌 No051 液体培养 9 d 是次级代谢产物产生的高峰期,9 d 前后具体产生次级代谢产物高峰的时间,应作为下一步的研究内容。

高效液相色谱是分离纯化次级代谢产物的技术手段,该试验中高效液相色谱分析表明内生真菌 No051 液体培养 9 d 时产生的次生代谢产物中包含的活性物质较多,但具体哪种活性物质具有较高的活性还有待于进一步的研究。利用高效液相色谱可分离、纯化得到具有活性的单成分,这将为进一步研究内生真菌 No051 次级代谢产物奠定基础。

### 参考文献

- [1] 张鑫,孟国庆,刘新利.内生真菌的分离方法及其次级代谢产物研究[J].山东轻工业学院学报,2011,25(2):23-26.
- [2] 史长东.植物内生菌活性代谢产物的研究进展[J].现代园艺,2011(21):13.
- [3] 马晓颖,高颖,贾东贝,等.1株 *Alternaria* sp. 真菌菌丝提取物对玉米种子发芽促进作用的研究[J].微生物学杂志,2010,31(3):39-42.
- [4] 刘蕴哲,何劲,张杰,等.植物内生真菌及其活性代谢产物研究进展[J].菌物研究,2005,3(4):30-36.
- [5] ZHOU Y, YANG T X, YANG P, et al. Antagonistic Endophytic Bacteria Isolated from Different Growth Stages of Cotton for the Control of Cotton Verticillium wilt[J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(4): 778-783.