

野生大豆内生真菌及发酵液中高质量分数次生代谢产物菌株筛选

王鹤鸣¹, 李凤姿¹, 张 鸾¹, 张秀峰¹, 尹 静^{1,2*}

1. 东北林业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040

2. 东北林业大学 林木遗传育种国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

摘 要: 目的 以分离纯化的42株野生大豆内生真菌为材料, 分析内生真菌菌丝及发酵液中次生代谢产物的积累, 筛选高产次生代谢产物内生菌株。方法 采用液体发酵摇瓶培养法及紫外分光光度法对不同内生真菌菌丝及发酵液中的总三萜、黄酮、多糖、多酚与总酚的量进行检测。结果 42株野生大豆内生真菌菌丝中, 筛选获得高质量分数多糖菌株为Y2S9、WDL3和WDL2, 质量分数最高可达85.51 mg/g; 高质量分数黄酮菌株为Y1S9和Y6S8, 质量分数分别为2.99和2.24 mg/g; 高质量分数三萜菌株为Y6S8、Y2R1、Y6R2, 质量分数分别为25.55、17.89、15.96 mg/g; 而WDS7总酚量最高, 为22.65 mg/g。内生真菌发酵液中, 黄酮量较高菌株为Y1S8和SYS4, 其质量浓度分别为3.11和4.81 mg/L; 总三萜质量浓度较高的菌株为YSYL2、Y1S8、WDL3, 质量浓度分别为17.46、35.00、42.98 mg/L。结论 不同生境可能是导致次生代谢产物量差异的主要原因, 本研究筛选出高产次生代谢产物野生大豆内生真菌菌株11株, 为野生大豆内生真菌功能挖掘及新药筛选奠定了基础。

关键词: 野生大豆; 内生真菌; 次生代谢产物; 总三萜; 黄酮; 多糖

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)22-3401-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.020

Screening of strains with high content of secondary production in endophytic fungi and fermentation liquid from wild soybean

WANG He-ming¹, LI Feng-zi¹, ZHANG Luan¹, ZHANG Xiu-feng¹, YIN Jing^{1,2}

1. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

2. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Objective Using 42 endophytes separated and purified from wild soybean as materials, the accumulation of secondary metabolites in hypha and fermentation liquid of endophytic fungi was analyzed so as to screen the strains with high content of secondary production. **Methods** Liquid fermentation cultivation with shaking flask and ultraviolet spectrophotometer was utilized to detect the contents of total triterpenoids, flavonoids, polysaccharides, polyphenols, and total phenolic in different endophyte mycelia and their ferment liquids. **Results** For 42 endophytic fungi from wild soybean, strains Y2S9, WDL3, and WDL2 had high content of polysaccharide up to 85.51 mg/g, then Y1S9 and Y6S8 had higher content of the flavonoid with 2.99 and 2.24 mg/g, respectively; In addition Y6S8, Y2R1, and Y6R2 would produce more triterpenoid with 25.55, 17.89, and 16.39 mg/g; Meanwhile WDS7 had the highest content of total phenol with 22.65 mg/g. For the fermentation liquid of endophytic fungi, strains Y1S8 and SYS4 had higher contents of flavonoid with 3.111 and 4.809 mg/L; But strains YSYL2, Y1S8, and WDL3 had the higher levels of total triterpenoids up to 17.46, 35.00, and 42.98 mg/L, respectively. **Conclusion** Different habitats might be the main factor causing difference in the contents of secondary production. Eleven strains with high yield secondary metabolites selected from wild soybean would lay the foundation for mining endophytic fungi function and screening new drugs.

Key words: wild soybean; endophytic fungi; secondary metabolism; screen; total triterpenoids; flavonoids; polysaccharides

植物中直接或间接的提取是目前人们获得天然药物的主要手段, 但随着人口的增多及市场需求量的增加, 直接从植物中提取次生代谢产物已经难以满足需求, 所以发展新的高效生产这些重要的次生

收稿日期: 2015-06-07

基金项目: 东北林业大学本科国家级创新项目(201410225022); 国家基础科学人才培养基金(J1210053); 国家自然科学基金资助项目(31101171)

作者简介: 王鹤鸣(1994—), 男, 山东胶州人, 在读本科, 主要研究方向为植物次生代谢。

*通信作者 尹 静, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要研究方向为植物代谢调控。E-mail: yinjing20135@163.com

代谢产物方法迫在眉睫^[1-2]。长期寄生在某种植物上的内生真菌通常能与该宿主植物协同演化,因而该宿主植物与其内生真菌之间可能存在基因重组的现象,从而使得宿主植物上的内生真菌能产生与宿主植物相同的代谢产物^[3-4]。近来发现的天然产物中有 51%来自植物内生真菌,38%来自土壤微生物,11%来自植物和动物,显然内生真菌已成为天然产物潜在的重要资源,开发与研究内生真菌资源,并从中寻找和发现新的先导化合物已成为国内外研究的热点^[5-8]。

微生物这种高效的细胞反应器工厂的生物学特点使微生物发酵工程的药物很好地满足了人们对快速、高效、价廉的次生代谢产物药物的需求。在近 20 年中,已经从内生真菌中成功分离到许多抗微生物、杀虫、细胞毒性和抗癌等具有重要价值的生物活性物质^[9-12]。涉及类异戊二烯、聚酮化合物、氨基酸衍生物等合成途径代谢产物,包括萜类、类固醇、杂氧萜酮、醌、酚类、香豆素、苯骈吡喃酮、恩镰孢菌素等类别。自从 Stierle 等^[13]从短叶紫杉中分离到一株能够产生肿瘤治疗剂紫杉醇的内生真菌以来,学者们相继从其他内生真菌发酵产物中分离得到了生物碱类、黄酮类、苯丙素类、甾体类等抗肿瘤活性成分^[14-16]。最近,Wellensiek 等^[17]分离了来自沙漠植物的内生真菌,筛选获得了 4 个几乎可完全阻断 HIV-1 病毒复制的活性化合物。薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 与印度梨形孢 *Piriformospora indica* leads 的共生相互作用促进植物的地上部分生长、花的发育及改变薄荷次生产物合成^[18]。目前已分离鉴定的海洋植物红树林真菌超过 200 种,成为海洋真菌的第 2 大类群,红树林内生真菌次级代谢产物中具有抑制肿瘤细胞活性的物质主要包括生物碱、黄酮、苯骈呋喃(吡喃)酮、有机酸、萜醌、环二肽、萜类、聚酮和香豆素类等^[6,11]。

由于野生大豆原始生境复杂,种群多样性高,抗逆性强^[19-20],其内生真菌的丰富度及多样性应较其他物种更为优越。通过对野生大豆内生真菌的分离,极有可能得到一些较为原始以及次生代谢产物功能多样的内生真菌,但相关研究鲜见报道。本研究以来自黑龙江省不同区域野生大豆中分离的 42 株内生真菌为试材,对分离、纯化的内生真菌进行菌丝及发酵液中多糖、多酚、黄酮、总三萜类物质的量进行检测,以期筛选出高产有用次生代谢产物的内生菌株,为东北野生大豆内生真菌的功能菌株的挖掘和利用奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

以来自于黑龙江省周边地区野生大豆中分离、纯化的 42 株内生真菌为材料(深圳华大基因 ITS 测序鉴定),42 株菌株编号中,哈尔滨阿城区(Y1)、同江市(Y2)、饶河(Y3)、铁力市(Y4)、宁安县(Y5)、逊克县(Y6)和阿城区野生豌豆(WD)分别代表黑龙江省不同生境的野生大豆,菌株中 S、L 和 R 分别代表野生大豆茎、叶和根来源内生菌株。Z3 菌株来自普通栽培大豆黑农 48(紫花尖叶,哈尔滨阿城区)根部分离的内生真菌。

1.2 试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 萘酮、硫酸、无水乙醇、蒸馏水、盐酸、甲醇、香草醛、冰乙酸、醋酸乙酯、高氯酸、硝酸铝、亚硝酸钠、葡萄糖均为分析纯,PDA 固体培养基,PDB 液体培养基。

1.2.2 主要仪器 IKA HB10 旋转蒸发仪(德国),DZ-900A 水平双层摇床(中国常州中捷),BSA124S 分析天平(德国赛多利斯),TU-1901 型双光束紫外-可见分光光度(UV)计(北京普析通用仪器有限责任公司),SEX-2P 超净工作台(中国苏州安泰 Air TECH 公司),恒温烘箱,超声仪。

2 方法

2.1 内生真菌的发酵培养

将保存在试管斜面中的野生大豆内生真菌在超净工作台中重新接种到 PDA 平皿上活化培养,菌落活化培养 7 d 后,用直径 1 cm 打孔器在平皿上取出 3 块菌种块,接种到含 150 mL PDB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中培养,每种菌株培养 3 瓶,即 3 次重复。发酵培养置摇床上,速度 120 r/min,温度 25 °C,光照 16 h/8 h,培养周期为 10 d,10 d 后分别滤过收获菌丝和发酵液。

利用旋转蒸发仪(温度 70 °C,转速 200 r/min)将收获的每一个菌株发酵液浓缩 10 倍,装入 50 mL 离心管,4 °C 冰箱保存备用。将收获的野生大豆内生真菌菌丝放置于锡箔纸上,60 °C 烘干至恒定质量,使用分析天平称量菌丝干质量。

2.2 检测方法

2.2.1 内生真菌多糖的测定 菌丝中多糖样品制备及检测参考朱伟^[21]方法,略有改动,具体如下:准确称取内生真菌菌丝干样 0.200 g,于 10 mL 试管中加入 5 mL 蒸馏水,沸水浴加热 30 min,回收上清液后,再加 5 mL 蒸馏水沸水浴加热 30 min,2 次上

清液滤过回收至 25 mL 量瓶中,用蒸馏水定容备用。取 0.5 mL 样品液加入 2 mL 蒸馏水与 6.5 mL 硫酸-萘酚溶液(1.0 g 萘酚溶于 500 mL 浓硫酸),涡旋混匀后立即于沸水中加热 5 min,冷却后,利用分光光度计检测 625 nm 下的吸光度(A)值,依据线性回归方程 $Y=260.08X-4.5448$, $R^2=0.9985$ (式中 X 为 A 值, Y 为样品质量分数)计算内生真菌菌丝中多糖的量。

2.2.2 菌丝中总黄酮样品制备及检测 参考李佳等^[22]方法,略有改动,具体如下:精确称取 0.200 g 样品于 25 mL 的量瓶中,加入 10 mL 50%乙醇,密封好后超声提取 90 min,滤过并定容至 25 mL,备用。精密移取待检测样品 4 mL 置于 25 mL 量瓶中,加 5%亚硝酸钠溶液 1 mL,摇匀静置 6 min,再加入 10%硝酸铝溶液 1 mL,摇匀静置 6 min,加 4%氢氧化钠 10 mL,并用 50%乙醇定容至刻度,摇匀静置 15 min,同时以试剂为空白对照,于 550 nm 下检测 A 值。黄酮量计算依据线性回归方程 $Y=0.0875X+0.0002$, $R^2=0.9997$ (式中 X 为 A 值, Y 为样品质量浓度)。

2.2.3 发酵液中总黄酮的测定 精密量取 5 mL 浓缩后的发酵液,加入 5 mL 无水乙醇定容至 10 mL,密封好后超声提取 90 min,备用。精密移取 4 mL 定容后溶液,按照“2.2.2”项步骤操作,以检测发酵液中黄酮量。

2.2.4 菌丝中总三萜样品制备及检测 参考李春晓等^[23]方法。

2.2.5 发酵液中总三萜的测定^[23] 从浓缩后的发酵液中取 1 mL,置于 10 mL 的离心管中,70 °C 水浴蒸干,加入 200 μ L 的 5%香草醛-冰乙酸和 800 μ L 高氯酸,70 °C 水浴 15 min,取出后迅速放入冰中冷却,醋酸乙酯定容至 5 mL 后,利用分光光度计检测 551 nm 下的 A 值。根据回归方程计算总三萜量。

2.2.6 菌丝中多酚样品制备及检测: 参考周曼等^[24]方法,略有改动,具体如下:精确称取 0.200 g 菌丝样品置于 50 mL 三角瓶中,加入 7 mL 60%乙醇后,置于超声仪中 40 Hz 超声提取 45 min,将上清液转移至另一 50 mL 三角瓶中,向剩余固体样品中再加入 7 mL 60%乙醇,重复超声提取 45 min,此过程共重复 3 次,回收 3 次所得滤液合并,在 70 °C 下水浴将乙醇蒸干后,用蒸馏水定容至 15 mL。取 5 mL 定容后的样品液,加 3 mL 4%香草醛-甲醇,再加入 1.5 mL 浓盐酸,最后用甲醇

定容至 10 mL。用分光光度计检测 500 nm 下的 A 值。多酚量计算依据线性回归方程 $Y=86.95X-0.6792$, $R^2=0.998$ (式中 X 为 A 值, Y 为样品质量分数)。

2.2.7 发酵液中多酚量测定 精密移取浓缩后的发酵液 4 mL,加入 6 mL 无水乙醇后,超声 40 Hz 提取 45 min,再在 70 °C 下水浴将乙醇蒸干,然后用蒸馏水定容至 15 mL。精密称取 5 mL 定容后的样液,按照“2.2.6”项方法检测发酵液中多酚的量。

2.2.8 内生真菌中总酚量的测定 菌丝总酚量测定参考汪铁山等^[25]方法。

3 结果与分析

3.1 不同野生大豆内生真菌生长量差异分析

分析显示,野生大豆内生真菌菌株 Y2R14 *Fusarium oxysporum* species complex、Y5R4 *Fusarium* 和 Y5R11 *Fusarium oxysporum* species 的菌丝生长量较低,培养 10 d 后,菌丝干质量分别为 0.23、0.21、0.27 g。菌株 Y6S8、Y2S9 和 Y1S9 3 菌株生长量最高,质量分别为 5.46、4.65、4.49 g(表 1)。表明野生大豆中不同内生真菌的生长速率差异显著,且 3 株生长量最低的菌株均分离自野生大豆 Y2 株及 Y5 株的根部,Y2R14、Y5R4 和 Y5R11 菌株,生长速率分别为 0.03、0.02、0.03 g/d。3 株生长量最高的菌株全部分离自野生大豆 Y1 株、Y2 株以及 Y6 株的茎部,其生长速率分别为 0.56、0.47、0.45 g/d。说明定殖在不同部位的内生真菌在生长速率上存在较明显的差异。

3.2 不同野生大豆内生真菌多糖量差异分析

内生真菌菌丝多糖测定结果表明(表 1),菌株 SYS1、Y5L12、Y5R10 3 株内生真菌菌丝中多糖质量分数较低,分别为 0.91、0.33、1.80 mg/g。菌株 Y2S9、WDL3、WDL2、Y2S10 的菌丝多糖量较高,其多糖量分别达到了 85.51、41.70、37.23、32.92 mg/g,其中菌株 Y2S9 多糖量显著高于其他菌株。

3.3 不同野生大豆内生真菌总黄酮差异分析

内生真菌菌丝总黄酮量分析显示(表 1),菌株 Y4R6 和 Y4R7 内生真菌菌丝中总黄酮质量分数较低,分别为 0.09、0.10 mg/g。而总黄酮质量分数较高的野生大豆内生真菌有 Y1S9、Y6S8、WDS7,质量分数分别为 2.99、2.24、1.99 mg/g。真菌发酵液中总黄酮量测定结果表明(表 2),菌株 Y5S8、Y6S8 2 株内生真菌菌丝中总黄酮量较低,其量分别

表 1 野生大豆内生真菌菌丝质量及其次生代谢产物质量分数

Table 1 Contents of secondary metabolism of endophytic fungi from wild soybean

菌株	生长量/g	质量分数/(mg·g ⁻¹)					菌株	生长量/g	质量分数/(mg·g ⁻¹)				
		多糖	总黄酮	总三萜	多酚	总酚			多糖	总黄酮	总三萜	多酚	总酚
BYSS3	0.55	28.90	0.89	1.34	3.85	5.90	Y2S10	2.00	32.92**	0.50	9.48	2.02	5.48
SYS1	1.09	0.91	0.78	2.33	2.44	2.99	Y2S9	4.65**	85.52**	0.29	14.96	0.50	0.53
SYS4	0.74	16.13	1.96	6.19	4.34	4.67	Y4R1	1.02	10.38	0.39	1.25	0.26	1.89
WDL2	2.18	37.23**	1.22	4.39	1.97	3.34	Y4R6	2.72	20.04	0.09	2.10	0.73	2.94
WDL3	3.36	41.70**	0.71	14.39	0.70	1.09	Y4R7	2.00	16.19	0.10	1.91	0.63	1.22
WDR5	1.07	16.32	0.75	0.56	2.91	4.38	Y4S1	0.51	20.81	0.27	0.64	3.06	5.00
WDS3	1.68	16.73	0.87	2.60	1.40	3.48	Y5L2	0.89	5.26	0.62	1.23	0.31	3.21
WDS7	1.69	10.56	1.99**	1.11	2.96	22.65**	Y5L10	2.41	13.98	0.44	2.32	0.55	2.15
WDS8	1.01	5.02	1.21	1.83	10.83**	4.50	Y5L11	2.94	25.63	1.32	1.54	1.94	6.52
Y1R3	0.63	4.51	1.93	2.66	1.95	3.36	Y5L12	1.13	0.33	0.52	3.69	1.36	2.21
Y1S5	1.83	19.25	1.15	0.93	3.79	12.23**	Y5R10	1.32	1.80	0.52	2.34	1.76	7.53
Y1S6	0.55	2.98	0.54	6.79	4.30	7.97	Y5R11	0.27	18.11	1.28	8.68	5.76	5.68
Y1S8	2.76	11.36	0.76	3.28	2.11	4.68	Y5R14	2.66	2.81	0.89	1.48	1.97	9.72**
Y1S9	4.49**	8.96	2.99**	4.12	2.20	4.86	Y5R15	3.13	16.02	0.86	0.95	1.93	4.92
Y2L5	2.11	11.86	0.37	14.64	1.55	2.07	Y5R4	0.21	16.15	1.56	11.53	0.96	1.33
Y2L6	2.67	10.07	0.40	15.63	1.45	6.71	Y6R2	2.98	16.19	0.79	15.96**	1.83	2.21
Y2R1	1.32	8.41	0.27	17.89**	2.47	3.31	Y6S8	5.46**	17.50	2.24**	25.55**	0.53	0.59
Y2R12	1.75	4.51	0.46	1.94	0.78	2.19	YSYL3	3.03	21.13	0.04	1.96	1.05	2.39
Y2R13	1.72	16.90	0.12	2.27	1.81	1.37	YSYS1	3.85	31.62	0.48	5.06	1.38	5.06
Y2R14	0.23	15.96	1.15	15.73	1.02	4.17	YSYS7	2.95	5.74	0.73	1.35	1.37	1.44
Y2R15	1.86	15.02	0.31	1.95	1.76	1.92	YSYS8	2.39	29.32	0.24	1.49	1.01	5.97
Y2R5	4.09	18.29	1.40	6.66	5.47**	5.47	Z3	2.53	5.54	0.62	3.56	0.24	1.24
Y2R6	1.83	18.01	0.22	3.83	0.48	2.35							

** 表示菌丝中次生产物质量分数或产量较高的内生菌, 下同

** indicates strains of endophytic fungi with highest yield or highest mass fraction of per secondary metabolism products which were expressed in the mycelium liquid, same as below

为 0.32、0.36 mg/L。发酵液中总黄酮量较高的 3 株为 Y6R2、Y1S8、SYS4, 分别为 3.06、3.11、4.81 mg/L。

3.4 不同野生大豆内生真菌总三萜量差异分析

野生大豆内生真菌菌丝总三萜测定结果表明, WDR5、Y4S1、Y1S5 3 株内生真菌菌丝中总三萜量较低, 分别为 0.56、0.64、0.93 mg/g。菌丝中总三萜量较高的野生大豆内生真菌有 Y6S8、Y2R1、Y6R2, 菌丝中总三萜量分别为 25.55、17.89、15.96 mg/g (表 1)。分析显示, 野生大豆内生真菌菌丝中总三萜量最高的菌株比总三萜量最低的菌株平均高 19.233 mg/g, 约高 28.2 倍。

野生大豆内生真菌发酵液中总三萜量测定结果表明, Y2R12、Y5S8、WDR5 3 株内生真菌发酵液中总三萜量较低, 分别为 0.26、0.37、0.40 mg/L。YSYL2、Y1S8、WDL3 3 株菌发酵液中总三萜量最高, 分别为 17.46、35.00、42.98 mg/L。内生真菌发酵液中总三萜量最高的菌株 WDL3 是最低的菌株 Y2R12 的 15.78 倍 (表 2)。

3.5 不同野生大豆内生真菌多酚量差异分析

野生大豆内生真菌菌丝多酚测定结果表明, 菌株 Y5L2、Y4R1 和 Z3 3 株内生真菌菌丝中多酚量较低, 分别为 0.31、0.26、0.24 mg/g。菌丝中多酚量较高的内生真菌有 WDS8、Y2R5, 多酚量分别为 10.83 和 5.47 mg/g。多酚量较高的菌株 WDS8 是 Z3 的 44.9 倍 (表 1)。

通过测定野生大豆内生真菌发酵液中多酚量发现, 菌株 Y6S8、Y5S8、Y2R1 中多酚量较低, 分别为 0.11、0.65、0.72 mg/L。野生大豆内生真菌发酵液中多酚质量浓度最高的 3 株为 WDR5、Y2S9、BYSS3, 分别为 7.07、5.11、4.98 mg/L, WDR5 发酵液中多酚是 Y6S8 的 64.23 倍 (表 2)。

3.6 不同野生大豆内生真菌总酚量差异分析

野生大豆内生真菌菌丝总酚测定结果表明 (表 1), 菌株 Y6S8、Y4R7、Z3 3 株内生真菌菌丝中总酚质量分数较低, 分别为 0.59、1.22、1.24 mg/g。菌丝中总酚质量分数较高的野生大豆内生真菌有 WDS7、Y1S5、YSR14, 其菌丝中总酚质量分数分

表 2 野生大豆内生真菌发酵液中次生代谢产物量

Table 2 Contents of secondary metabolism in fermentation liquid of endophytic fungi from wild soybean

菌株	质量浓度/(mg·L ⁻¹)			菌株	质量浓度/(mg·L ⁻¹)		
	多酚	总三萜	总黄酮		多酚	总三萜	总黄酮
BYSS3	4.98**	2.65	2.43	Y2S10	4.27	0.70	1.14
SYS1	2.47	1.01	1.21	Y2S9	5.11**	1.28	2.82
SYS4	3.72	0.75	4.81**	Y4R1	2.19	—	1.21
WDL2	2.34	0.63	0.67	Y4R6	1.00	—	1.13
WDL3	—	42.98**	3.04	Y4R7	0.93	3.55	1.09
WDR5	7.07**	0.40	2.35	Y4S1	1.96	—	—
WDS3	3.11	—	1.61	Y5L11	1.22	2.79	2.26
WDS7	2.48	1.49	2.43	Y5L12	1.01	—	1.40
WDS9	1.18	11.37	2.05	Y5R10	1.81	3.01	0.42
Y1L2	1.01	2.94	1.53	Y5R11	1.95	—	1.14
Y1R3	0.73	0.59	0.54	Y5R14	2.35	0.76	1.08
Y1S5	1.06	—	0.55	Y5R15	2.20	0.76	1.04
Y1S6	1.66	1.08	0.87	Y5R4	2.21	4.80	1.17
Y1S8	—	35.00**	3.11**	Y5S6	—	—	0.74
Y1S9	2.80	3.70	1.63	Y5S8	0.65	0.37	0.32
Y2L5	1.54	3.45	1.00	Y6R1	1.71	14.44	0.68
Y2L6	1.98	—	—	Y6R2	2.06	—	3.06**
Y2R1	0.72	14.51	0.92	Y6S8	0.11	15.26	0.36
Y2R12	1.83	0.26	1.91	YSYL2	1.56	17.46**	1.33
Y2R13	2.70	2.23	1.25	YSYL3	1.48	1.18	0.77
Y2R14	0.88	3.03	1.04	YSYS1	1.28	4.72	0.83
Y2R15	2.38	2.76	1.72	YSYS7	1.87	9.58	0.96
Y2R5	2.19	4.84	0.69	Z3	2.95	1.01	0.45
Y2R6	2.64	2.89	0.98				

别为 22.65、12.23、19.72 mg/g。可见分离的内生真菌菌丝中总酚物质量差异显著。

3.7 野生大豆内生真菌菌丝次生代谢产物总产量分析

野生大豆内生真菌菌丝中以菌株 Y2S9、WDL3、YSYS1 的多糖产量最高, 菌丝多糖总产量分别达 398.02、140.14、121.60 mg; 菌株 Y1S9、Y6S8 菌丝中的黄酮总产量较高, 分别达 13.41、12.22 mg; 菌株 Y6S8、Y2S9、WDL3 的总三萜产量较高, 分别达 139.40、69.67、48.36 mg; 菌株 Y2R5、Y1S9、Y1S5 的多酚总产量较高, 分别为 9.61、9.89、6.93 mg; 菌株 WDS7、Y5R14、Y2R5、Y1S5 的总酚总产量较高, 分别为 38.29、25.83、22.36、22.36 mg, 共计筛选出 11 株野生大豆高产次生代谢产物菌株 (表 3)。

4 讨论

来源于植物内生真菌的天然活性化合物是农业、医药和食品行业中的重要新资源, 有广阔的应用前景^[1-3,5-8]。目前, 许多有价值的抗菌、杀虫、细胞毒性和抗癌活性的化合物已成功地从内生真菌中

发现^[9-18,26-28]。在长期的协同进化中, 内生菌与寄主植物之间形成了友好的关系。一些内生菌能够产生与源于宿主植物相同或相似的生物活性化合物。如紫杉醇、足叶草毒素、喜树碱、长春花碱、金丝桃素、薯蓣皂苷都在宿主植物内生真菌中被分离和检测^[9-17,27-35]。

野生大豆起源于中国, 是栽培大豆的原始祖先种, 隶属于 *Glycine* Willd. 属 *Moench* 亚属^[19-20]。在自然生境中, 野生大豆的遗传多样性及功能多样性不受人工选择的影响。同时, 由于原有野生大豆生境复杂, 其内生真菌的丰富度及多样性要明显优于其他物种。通过对野生大豆内生真菌的分离, 极有可能得到一些较为原始以及次生代谢产物功能多样的内生真菌。本研究前期对 6 个不同类型野生大豆和 6 个栽培大豆内生真菌进行分离, 共分离内生真菌菌株 302 株, 其中来自野生大豆菌株 215 株。本研究中以前期分离鉴定的 42 株野生大豆内生真菌为研究材料, 对内生真菌的生长量及菌丝、发酵液中多糖、总三萜、总黄酮、总酚物质量的测定, 结

表 3 野生大豆内生真菌菌丝次生代谢产物总产量

Table 3 Total yields of secondary metabolism of endophytic fungi from wild soybean

菌株	总产量/mg				
	多糖	总黄酮	总三萜	多酚	总酚
BYSS3	15.94	0.49	0.74	2.12	3.25
SYS1	0.99	0.85	2.55	2.66	3.27
SYS4	11.94	1.452	4.59	3.22	3.46
WDL2	81.06	2.66	9.57	4.30	7.28
WDL3	140.14**	2.40	48.36**	2.37	3.65
WDR5	17.48	0.80	0.60	3.12	4.70
WDS3	28.05	1.46	4.36	2.35	5.83
WDS7	17.86	3.35	1.88	5.01	38.29**
Y1R3	2.86	3.12	1.69	1.24	2.13
Y1S5	35.20	2.10	1.70	6.93**	22.36**
Y1S6	1.64	0.30	3.72	2.35	4.37
Y1S8	31.40	2.10	9.08	5.85	12.93
Y1S9	40.21	13.41**	18.49	9.89**	21.80
Y2L5	25.06	0.78	30.93	3.28	4.37
Y2L6	26.89	1.07	41.71	3.87	17.91
Y2R1	11.10	0.36	23.62	3.26	4.37
Y2R12	7.91	0.81	3.40	1.37	3.84
Y2R13	29.00	0.20	3.89	3.10	2.36
Y2R14	3.62	0.26	3.57	2.01	3.21
Y2R15	27.88	0.57	3.61	3.27	3.57
Y2R5	74.82	5.74	27.26	9.61**	22.36**
Y2R6	33.00	0.40	7.01	0.87	4.30
Y2S10	65.83	1.01	18.96	4.03	10.96
Y2S9	398.02**	1.34	69.66**	2.34	2.48
Y4R6	54.42	0.23	5.71	1.99	7.98
Y4R7	32.42	0.20	3.82	1.27	2.44
Y4S1	10.67	0.14	0.33	1.57	2.56
Y5L10	33.69	1.07	5.58	1.32	5.17
Y5L11	75.37	3.89**	4.53	5.70	19.17
Y5L12	0.37	0.59	4.18	1.54	2.51
Y5R10	2.38	0.69	3.08	2.33	9.93
Y5R11	4.92	0.89	2.36	1.56	4.26
Y5R14	7.48	2.36	3.26	5.24	25.83**
Y5R15	50.18	2.68	2.99	6.03	15.40
Y5R4	3.32	0.32	2.37	2.36	3.56
Y6R2	48.29	2.37	47.60	5.47	6.59
Y6S8	95.50	12.22**	139.40**	2.89	3.19
YSYL3	64.12	0.12	5.96	3.19	7.26
YSYS1	121.60**	1.86	19.48	5.30	19.47
YSYS7	16.92	2.15	3.97	4.04	4.24
YSYS8	70.16	0.58	3.57	2.42	14.27
Z3	14.00	1.58	9.00	0.79	3.14

果表明,菌株 Y2S9、WDL3、WDL2、Y1S9、Y6S8、Y2R1、Y6R2、WDS7、SYS4、YSYL2、Y1S8,共 11 株内生真菌中次生代谢产物产量较高。其中菌株 Y6S8 黄酮量与总三萜量均较高,分别为 2.24 和 25.55 mg/g。菌株 WDS7 的黄酮量与总酚量较高,分别为 1.98 和 22.65 mg/g。而发酵液中,黄酮量最高的为 SYS4,为 4.81 mg/L; Y1S8 和 WDL3 菌株发酵液中总三萜量较高,总三萜量分别为 35.00 mg/L 和 42.96 mg/L。上述结果表明,来源黑龙江省不同生境的野生大豆内生真菌次生产物组成差异显著,次生代谢产物量高的菌株均来自野生大豆,而本研究中来自栽培大豆分离的内生真菌 Z3 虽能合成次生产物,但量不高。分析可能是不同野生大豆均采自黑龙江省不同市县的林区、公路旁、池塘边及田地边,生长环境较恶劣,抗逆性较强,其内生真菌数量及次生产物量也相对丰富,如本研究中次生产物较丰富的 Y6S8 来自黑龙江省逊克县林区野生大豆根部分离菌株,生长地为第 5 积温带,活动积温在 2 000~2 100 °C,无霜期短,仅 85~115 天。而来自栽培大豆品种内生真菌 Z3,生长在栽培条件良好的阿城区实验地,为第 1 积温带,年活动积温在 2 800 °C 以上,土质相对肥沃,水分也较充足,长势良好。分析不同野生大豆及栽培大豆生长环境的差异是导致其内生真菌中次生产物量变化较大的主要原因。该研究结果筛选出的 11 株高产次生产物内生真菌菌株,为野生大豆内生真菌的功能挖掘以及后续抗逆菌株筛选研究奠定基础,同时这些内生真菌也是新药活性物质的重要来源,是寻找药用植物替代物的重要资源。

参考文献

- [1] 易晓华. 植物内生真菌次生代谢产物研究进展 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 255-260.
- [2] Hyde K. A case for re-inventory of Australia's plant pathogens. *Persoonia: Molecular phylogeny and evolution of fungi* [J]. *Presoonia*, 2010, 15(25): 50-60.
- [3] Souvik K, Christian H, Michael S. Chemical ecology of endophytic fungi: Origins of secondary metabolites, [J] *Chem Biol*, 2012, 19(7): 792-798.
- [4] 袁志林, 章初龙, 林福呈. 植物与内生真菌互作的生理与分子机制研究进展 [J]. 生态学报, 2008, 28(9): 4430-4439.
- [5] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展 [J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401.
- [6] 李春艳, 郭顺星, 王春兰. 抑制肿瘤细胞活性的红树林植物内生真菌代谢产物研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 17(2): 702-705.
- [7] 邓慧颖, 邢建广, 罗都强. 海莲内生真菌 *Pestalotiopsis clavispora* 代谢产物研究 [J]. 菌物学报, 2011, 5(2): 263-267.
- [8] 仲兆金, 刘 浚. 茯苓有效成分三萜的研究进展 [J]. 中成药, 2001, 23(1): 60-64.
- [9] 郭俊柯, 曼地亚红豆杉中产紫杉醇内生真菌的分离鉴定 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [10] 陈贤兴, 陈析丰, 南旭阳, 等. 喜树果内生真菌的分离与鉴定 [J]. 河南大学学报, 2003, 21(4): 431-433.
- [11] 李艳玲, 王德才, 史仁玖, 等. 泰山黄精内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究 [J]. 中草药, 2013, 44(11): 1490-1494.
- [12] Rukachaisirikul V, Sommart U, Phongpaichit S, et al. Metabolites from the endophytic fungus *Phomopsis sp* [J]. *PSU-D15 Phytochem*, 2008, 69(3): 783-787.
- [13] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxone production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew [J]. *Science*, 1993, 260(5150): 214-216.
- [14] Amal H A, Abdessamad D, Julia K, et al. Fungal endophytes from higher plants: a prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products [J]. *Fungal Diver*, 2010, 41: 1-16.
- [15] Zhao Z Z, Wang Q S, Wang K M, et al. Study of the antifungal activity of *Bacillus valli smortis* ZZ185 *in vitro* and identification of its antifungal components [J]. *Bioresour Technol*, 2010, 101(1): 292-293.
- [16] Zhao J, Shan T, Mou Y, et al. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi [J] *Mini-Rev Med Chem*, 2011, 11: 159-168.
- [17] Wellensiek B P, Rajesh R, Bashyal B P, et al. Inhibition of HIV-1 replication by secondary metabolites from endophytic fungi of desert plants [J]. *Open Virol J*, 2013, 7(1): 72-80.
- [18] Aparajita D, Shwet K, Najam A S, et al. The root endophyte fungus *Piriformospora indica* leads to early flowering, higher biomass and altered secondary metabolites of the medicinal plant, *Coleus forskohlii* [J]. *Plant Sign Behav*, 2012, 7(1): 1-10.
- [19] 董英山. 中国野生大豆研究进展 [J]. 吉林农业大学学报, 2008, 30(4): 394-400.
- [20] 胡小梅, 张必弦, 朱延明, 等. 野生大豆资源的研究与利用 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(22): 13311-13313.
- [21] 朱 伟. 蒽酮-硫酸比色法测定香菇多糖含量 [J]. 北方药学, 2011, 8(8): 11-16.
- [22] 李 佳, 李国庆, 苏力坦·阿巴白克力. 超声波法提取

- 短毛柃柳总黄酮 [J]. 生物技术, 2008, 18(5): 38-42.
- [23] 李春晓, 尹 静, 詹亚光, 等. 水分、氮肥及 MeJA 处理对白桦三萜积累特性的影响 [J]. 西北植物学报, 2012, 32(1): 155-161.
- [24] 周 曼, 曹维仪, 王玉荣. 葡萄籽中多酚类物质提取工艺的研究 [J]. 中医药信息, 2009, 29(1): 53-56.
- [25] 汪铁山, 张生潭, 陈莉婧, 等. 半枝莲总多酚含量测定与超声提取工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 31(11): 1808-1812.
- [26] 战 妍, 王鹤鸣, 肖佳雷, 等. 林木组织内生真菌研究及应用进展 [J]. 安徽农业科学, 2014, 42(29): 10066-10069.
- [27] 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.
- [28] Abdessamad D, Amal H A, Peter P. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi [J]. *Fungal Diver*, 2011, 49(1): 1-12.
- [29] 胡淑媛, 罗都强, 陈 川. 一种来源于植物内生真菌次级代谢产物的抗肿瘤活性研究 [J]. 中国卫生产业, 2013, 10(7): 15-17.
- [30] 张德武. 番荔枝内生真菌 *Periconia* sp. F-31 中新颖结构化学成分研究 [D]. 北京: 北京协和医院, 2013.
- [31] 杨显志, 张玲琪, 郭 波, 等. 一株产长春新碱内生真菌的初步研究 [J]. 中草药, 2004, 35(1): 79-81.
- [32] 张庆波, 陈玉婵, 李浩华, 等. 南方红豆杉内生真菌的分离鉴定及其细胞毒活性研究 [J]. 生物技术通报, 2013, 1(1): 172-177.
- [33] 谭 燕, 贾 茹, 陶金华, 等. 内生真菌诱导子调控药用植物活性成分的生物合成 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 2004-2008.
- [34] 王 卓, 于慧美, 刘 鼎, 等. 人参内生真菌的分离及其抗肿瘤活性研究 [J]. 中国现代中药, 2013, 11(9): 748-751.
- [35] 李 丽. 核桃内生真菌的分离、鉴定及其代谢产物抑菌活性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.