

林贵兵,高娜,徐萍霞,等. 栀子内生真菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学,2014,42(2):298-300.

栀子内生真菌的分离与鉴定

林贵兵,高娜,徐萍霞,刘勇,葛菲

(江西中医药大学,江西南昌 330004)

摘要:分离纯化栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis.)新鲜果实中的内生真菌,用插片法观察菌种的菌丝、孢子囊以及孢子等特征,探讨栀子内生真菌群落多样性。结果表明,从栀子果实中分离获得了 42 株内生真菌,初步鉴定为 1 目 1 科 9 属,交链孢霉属(*Alternaria* spp.) 1 株,占 2.38%;青霉属(*Penicillium* spp.) 3 株,占 7.14%;曲霉属(*Aspergillus* spp.) 3 株,占 7.14%;轮枝霉属(*Verticillium* spp.) 3 株,占 7.14%;瓶梗青霉属(*Paecilomyces* spp.) 2 株,占 4.76%;穗霉属(*Spicaria* spp.) 2 株,占 4.76%;头孢霉属(*Cephalosporium* spp.) 1 株,占 2.38%;粘帚霉属(*Gliocladium* spp.) 1 株,占 2.38%;双曲孢霉属(*Nakataea* spp.) 26 株,占 61.9%。其中双曲孢霉属为优势菌群。

关键词:栀子;内生真菌;分离;鉴定

中图分类号: S567.1⁺90.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)02-0298-03

栀子为茜草科栀子属植物栀子(*Gardenia jasminoides* Ellis.)干燥成熟的果实,是一种常见的中药,也是江西省道地药材之一,具有泻火除烦、清热利湿、凉血消毒等功效,外敷可治扭伤瘀肿,主要用于治疗黄疸型传染性肝炎、胆囊炎等症。栀子主要生于海拔 1 000 m 以下的低坡红壤土地,不耐寒^[1]。目前关于栀子的研究主要集中在地理环境、气候条件、采收期不同对栀子药材品质的影响方面^[2-6],栀子内生菌群对其品质的影响研究还未见报道。可以采用组织学方法,严格进行

表面消毒的植物组织块分离方法,以及植物组织直接扩增微生物 DNA 方法来证明内生菌的内生性^[7]。内生菌群可以通过产生生长素、增进宿主植物营养元素吸收来促进宿主生长,增强宿主抗旱、抗高温、抗虫害等抗逆性,部分内生真菌能够促进药用植物次生代谢产物的合成,产生与宿主相同或相似的药用活性成分^[8]。本研究分离纯化栀子新鲜果实中的内生真菌,用插片法观察菌种的菌丝、孢子囊以及孢子等特征,探讨栀子内生真菌群落的多样性。

收稿日期:2013-07-18

基金项目:江西省教育厅科技计划(编号:GJJ12537);江西中医药大学博士启动基金;江西中医药大学重点学科青年教师扶持项目。

作者简介:林贵兵(1981—),男,四川自贡人,博士,讲师,主要从事中药资源研究。E-mail:linguibing897@gmail.com。

3 结论

研究了沁水盆地柿庄南煤层产区产出水对土壤盐碱性的影响。通过 SAR 值和 pH 值区域分布等势图可以看出排水口周边土壤 SAR 值和 pH 值有明显的增加趋势,排水口附近 SAR 值超过 8.0 mmol^{1/2}/L^{1/2},pH 值在 8.8 以上。个别区域土壤钠质化严重,SAR 值达 15.3 mmol^{1/2}/L^{1/2},pH 值接近 10。单口产水井影响分析表明,产出水横向影响范围在排水口周围 4 m 左右的地区,纵向影响深度为 30 cm。总体看来,受产出水影响区域不大,集中于排水口周边地区;但如果产水井在农田中,应配合适当的土壤修复措施,以防止土壤钠质化严重。

参考文献:

- [1] Yang Z, Wu T, Li X H. Experimental studies and estimates of the explosion limit of some environment ally friendly refrigerants[J]. Combustion Science and Technology, 2005, 35(3): 613-626.
- [2] 唐晓东,孟英峰. 变压吸附技术在煤层气开发中的应用探讨[J]. 中国煤层气, 1996(1): 46-49.
- [3] 黄盛初,刘文革,赵国泉. 中国煤层气开发利用现状及发展趋势

1 材料与方法

1.1 材料

2012 年 10 月采自江西中医药大学神农园药用植物栀子的新鲜果实,经刘勇副教授鉴定为茜草科栀子属植物栀子。

[J]. 中国煤炭, 2009, 35(1): 5-10.

- [4] 孙茂远. 煤层气资源开发利用的若干问题[J]. 中国煤炭, 2005, 31(3): 5-8, 27.
- [5] Chaudhari K S. Saturated hydraulic conductivity, dispersion, swelling and exchangeable sodium percentage of different textured soils as influenced by water quality[J]. Community of Soil Science and Plant Analysis, 2001, 32(15/16): 2439-2455.
- [6] 宋岩,张新民. 煤层气成藏机制及经济开采理论基础[M]. 北京:科学出版社, 2005.
- [7] 李向东,冯启言,宋均轲,等. 电絮凝处理煤层气产出水[J]. 环境工程学报, 2012, 6(3): 744-748.
- [8] 梁雄兵,程胜高,宋立军. 煤层气勘探开发中的水污染分析及防治对策[J]. 环境科学与技术, 2006, 29(1): 50-51.
- [9] 丰庆泰. 沁水盆地柿庄南区块煤层气藏地质特征[J]. 山西大同大学学报:自然科学版, 2012, 28(3): 72-74, 78.
- [10] 傅雪海,秦勇,韦重韬. 煤层气地质学[M]. 徐州:中国矿业大学出版社, 2007: 110.
- [11] 江绍静,余华贵,刘春燕. 高矿化度体系碳酸钙结垢动力学研究[J]. 应用化工, 2011, 40(9): 1623-1628.
- [12] Oosterbaan J R. Paper discussing alkaline-sodic and acid-sulfate soils[R]. 2003.

江西省南昌市属中亚热带湿润季风气候,气候湿润温和,日照充足,年均气温 17.0 ~ 17.7 °C,年均降水量 1 600 ~ 1 700 mm,年均相对湿度为 78.5%。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离 采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)与混合抗生素(80 万单位青霉素钠与硫酸庆大霉素注射液 4 万单位混合溶解)培养分离茄子果实的内生真菌。将新鲜健康的茄子果实用自来水冲洗干净,再用无菌水洗 2 ~ 3 次,用 0.1% 次氯酸钠溶液浸泡 1 min,再用 75% 乙醇处理 5 min,对果实表面进行消毒,再用无菌水冲洗 4 ~ 5 次。削去外皮,取少量果肉置于培养基中,28 °C 下恒温培养 7 ~ 10 d。待组织块周围长出白色菌丝后,用接种针挑起,纯化菌种。

1.2.2 内生真菌鉴定 将菌种置于 PDA 培养基中,采用插片法在 28 °C 下恒温培养 7 ~ 10 d,观察其产孢结构、分生孢子梗着生情况、孢子形态与颜色,参考《真菌鉴定手册》^[9] 鉴定内生真菌。

2 结果与分析

2.1 内生真菌种群

2.1.1 交链孢霉属(*Alternaria* spp.) 菌落生长迅速,初期为黑色,随后有灰白色棉絮状菌生长,背面灰黑色。营养菌丝有分隔。分生孢子梗暗色,通常较短,单生或分枝简单,直或略弯曲,有隔。分生孢子暗色,横隔 1 ~ 6 个,纵隔 0 ~ 5 个,倒棍棒形、椭圆形或卵形,顶端常延长为喙状,经常向顶着生成链(图 1)。

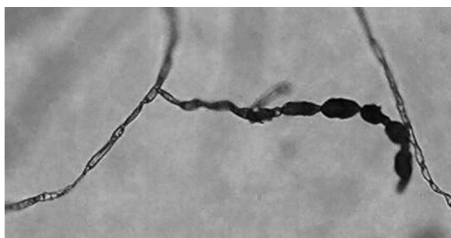


图1 交链孢霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

2.1.2 青霉属(*Penicillium* spp.) 菌落灰色或灰白色,绒毛状、蛛网状或棉絮状,背面黑色,菌丝有隔。分生孢子梗从菌丝中垂直生出,无足细胞,暗色,有横隔膜,菌丝单个发生或成束。分生孢子串生,孢子光滑,单胞,褐色,球形或卵圆形(图 2)。



图2 青霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

2.1.3 曲霉属(*Aspergillus* spp.) 菌落为褐色或黄色颗粒状,背面黄色或棕色。菌丝无色、淡色或表面凝集有色物质,有隔膜。分生孢子梗从壁厚而膨大的菌丝细胞(足细胞)中垂直生出,大多数无隔膜,光滑或粗糙,上部较粗大,顶端膨大成

球形、椭圆形、半圆形或棍棒形的孢囊,从孢囊的表面以放射状生出小梗或仅在孢囊顶部产生小梗,小梗单层或在顶部再分枝成 2 个或多个小梗。分生孢子串生于小梗顶端,呈辐射状排列或丛集成柱形,着色、形状、大小、纹饰变化很大(图 3)。



图3 曲霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

2.1.4 轮枝霉属(*Verticillium* spp.) 菌落生长早期呈灰色,绒毛状,周围有褐色颗粒物长出,后期有白色棉絮状菌长出,背面接种处黑色,周围浅黄色。或菌落生长早期呈灰色,后渐暗,棉絮状,背面黑色。分生孢子梗细长,轮生分枝。分生孢子为梗孢子,卵圆形或椭圆形,褐色,单胞,单生或顶生成小的潮湿簇,成向基的链(图 4)。

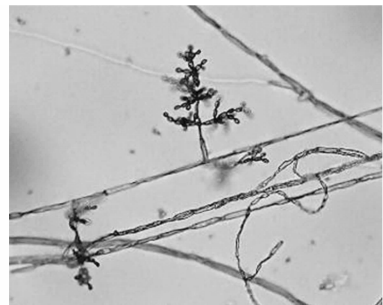


图4 轮枝霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

2.1.5 瓶梗青霉属(*Paecilomyces* spp.) 菌落生长早期呈灰绿色,凝聚灰绿色粉状物质,后有灰白色棉絮状菌长出。或菌落暗灰色,棉絮状,背面黑色,菌丝有隔。分生孢子梗从菌丝中垂直生出,无足细胞,暗色,有横隔膜,菌丝单个发生或成束。分生孢子串生,孢子光滑,单胞,褐色,球形或卵圆形,成向基的链,有 2 种形态(图 5)。

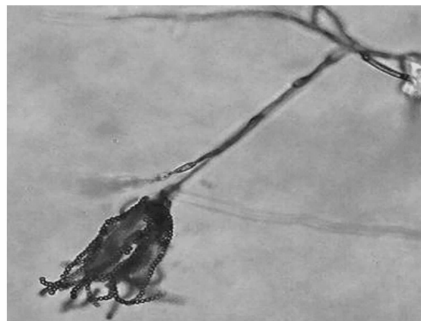


图5 瓶梗青霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

2.1.6 穗霉属(*Spicaria* spp.) 菌落生长早期呈青灰色,粉状,后期有白色棉絮状菌生长,背面黄色,菌丝有隔。分生孢子梗分枝多,顶部生轮辐射状排列且松散的小梗。分生孢子串生,暗色(图 6)。

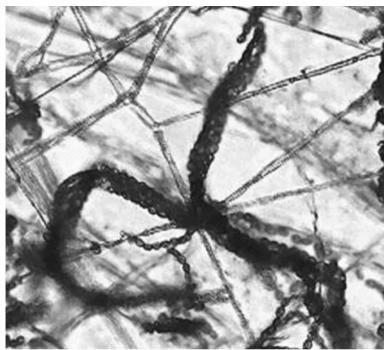


图6 穗霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

2.1.7 头孢霉属(*Cephalosporium* spp.) 菌落生长早期呈橙黄色,黏稠状,背面也是橙黄色,菌丝有隔。分生孢子梗从菌丝中生出,直立,短小,顶端生球形、长椭圆形或卵形的分生孢子。分生孢子相继断脱,由分泌的胶状物黏着成小球形,无色,单细胞(图7)。

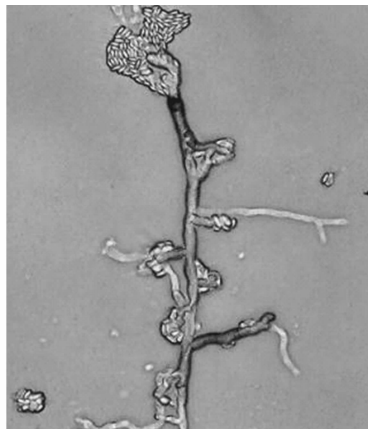


图7 头孢霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

2.1.8 粘帚霉属(*Gliocladium* spp.) 菌落生长早期呈灰色,绒毛状,背面黑色,菌丝有隔。分生孢子梗从菌丝中垂直生出,无足细胞,暗色,有横隔膜,菌丝单个发生或成束,分生孢子串生,孢子光滑,褐色,球形或卵圆形,该属形态与青霉属相似,但分生孢子结集于子实体所分泌的黏液中(图8)。

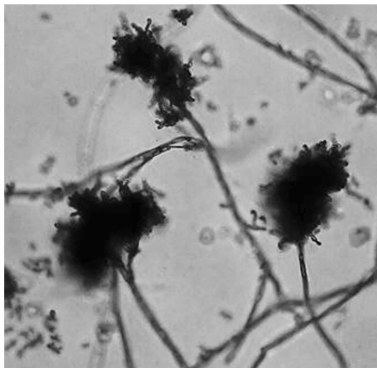


图8 粘帚霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

2.1.9 双曲孢霉属(*Nakataea* spp.) 菌落生长早期呈白色,棉絮状,生长局限,后期分泌无色透明油状物,背面黄色,菌丝无隔。分生孢子梗单生或丛生,榄褐色,有隔膜,单生或偶尔在顶部分枝,细长。分生孢子生于顶端,梭形,向一方或作“S”形弯曲,两端细胞小而尖,无色或淡色,中部细胞暗褐

色(图9)。

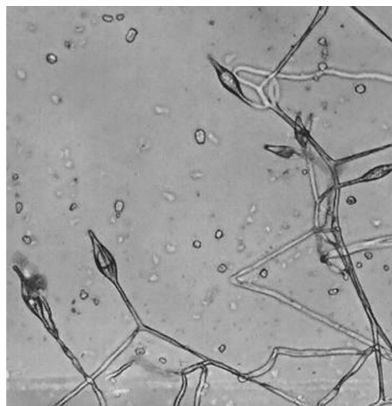


图9 双曲孢霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

2.2 内生真菌种群统计分析

本研究共分离出 42 株菌,初步鉴定为 1 目 1 科 9 属,交链孢霉属 1 株,占 2.38%;青霉属 3 株,占 7.14%;曲霉属 3 株,占 7.14%;轮枝霉属 3 株,占 7.14%;瓶梗青霉属 2 株,占 4.76%;穗霉属 2 株,占 4.76%;头孢霉属 1 株,占 2.38%;粘帚霉属 1 株,占 2.38%;双曲孢霉属 26 株,占 61.9%。其中双曲孢霉属 *Nakataea* spp. 为优势菌群。

3 结论与讨论

本研究用 PDA 培养基分离栀子新鲜果实内生真菌,得到内生真菌种群,共分离出 42 株菌,其中双曲孢霉属为优势菌群,反映了栀子中内生真菌生物多样性。但本方法具有一定的局限性,目前许多学者用植物提取液加入培养基中分离内生真菌群落。内生真菌种群受植物种类、不同生长发育阶段、生态环境等因素的作用,对药用植物特别是药材的品质形成具有重要影响,与植物的生长发育、抗逆性、化学组分有密切关系^[10]。

参考文献:

- [1] 罗光明,陈 岩,张晓云,等. 不同品种及产地栀子水溶性成分指纹图谱研究[J]. 中成药,2008,30(4):475-479.
- [2] 奉延旗,李 磊,刘 冰. GAP 基地与普通产地栀子中栀子苷的含量比较[J]. 中南药学,2007,5(4):339-341.
- [3] 段 启,庄义修,陈华师. HPLC 法测定不同产地栀子中栀子苷含量[J]. 亚太传统医药,2009,5(6):20-21.
- [4] 韩建萍,陈士林,张文生,等. 不同产地栀子药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2007,9(4):56-60.
- [5] 唐 灿,李云鹏,张彦燕,等. 不同采收期对江西栀子熊果酸含量的影响[J]. 时珍国医国药,2008,19(8):1927-1928.
- [6] 赵 静,游国钧,李 辉. 不同采收时期栀子中栀子苷的含量测定[J]. 中医药导报,2007,13(7):102,127.
- [7] 胡 凤,程玉鹏,王振月,等. 药用植物内生真菌研究现状及其应用前景[J]. 生物技术通讯,2008,19(5):781-783.
- [8] 华永丽,欧阳少林,陈美兰,等. 药用植物内生真菌研究进展[J]. 世界科学技术:中医药现代化,2008,10(4):105-111.
- [9] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [10] 江 曙,钱大玮,段金殿,等. 植物内生菌与地道药材的相关性研究[J]. 中草药,2008,39(8):1268-1272.