

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

梔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:分离纯化梔子(*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,探讨梔子内生真菌群落多样性。结果表明,从梔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:梔子;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

梔子为茜草科梔子属植物梔子(*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。梔子主要生于海拔1 000 m以下的低坡红壤土地,不耐寒^[1]。目前关于梔子的研究主要集中在地理环境、气候条件、采收期不同对梔子药材品质的影响方面^[2-6],梔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]。本研究分离纯化梔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,探讨梔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。

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梔子的新鲜果实,经刘勇副教授鉴定为茜草科梔子属植物梔子。

[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.

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

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1min,再用75%乙醇处理5min,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7~10d。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7~10d,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)。

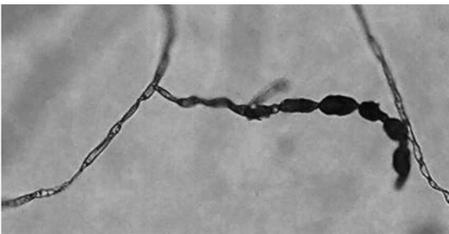


图1 交链孢霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

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,呈放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)。

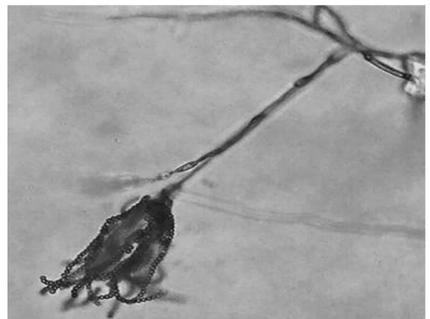


图5 瓶梗青霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

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,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)。

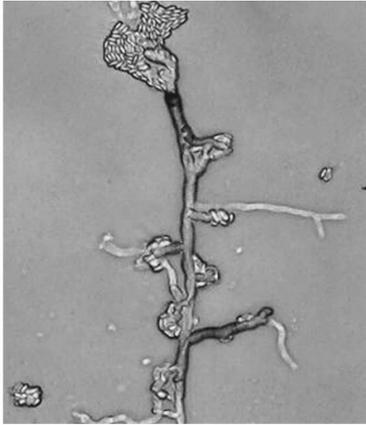


图7 头孢霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

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)。

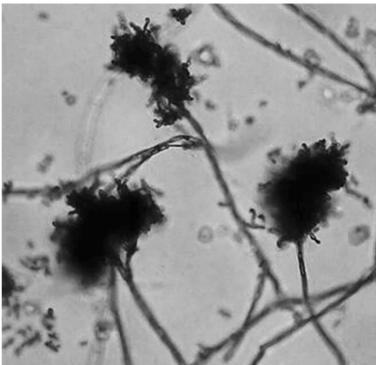


图8 粘帚霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

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)。

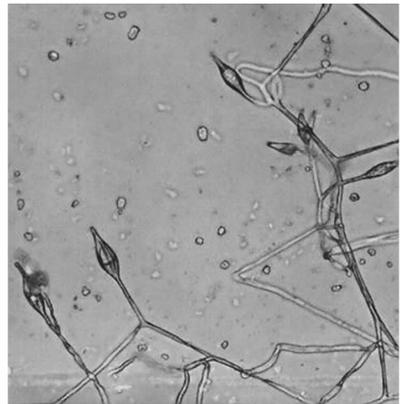


图9 双曲孢霉属菌种的分生孢子梗、分生孢子

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]. 中草药,2007,38(4):339-341.
 [3] 段启,庄文修,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.