

# 羊蹄内生真菌的分离鉴定及其多样性分析

曾庆桂 颜日明 朱笃\*, 温增春

(江西师范大学生命科学学院, 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 江西南昌 330022)

**摘要** [目的] 为从羊蹄中寻找具有药用价值的内生真菌奠定基础。[方法] 利用PDA培养基进行羊蹄内生真菌的分离、纯化和初步鉴定, 并对其多样性进行分析。[结果] 从羊蹄中共分离到45株内生真菌, 其中根部21株, 占46.67%。从茎部和叶部分别分离到14株和10株。这说明羊蹄根部的内生真菌资源比茎部和叶部更为丰富。羊蹄根部的内生真菌比茎中和叶中生长得快。形态学鉴定结果表明分离菌株中共有青霉属8株, 木霉属4株, 镰孢霉属3株, 拟茎点霉属、黑霉属和曲霉属各1株, 无孢类群27株(占整个内生真菌类群的60%)。[结论] 青霉属、木霉属和镰孢霉属为羊蹄内生真菌的优势种属, 而无孢类群为其绝对优势类群。

**关键词** 羊蹄; 内生真菌; 分离鉴定; 多样性

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)09-03706-03

## Isolation and Identification of the Endophytic Fungi in *Radix runcis Japonici* and Its Diversity Analysis

ZENG Qing-gui et al (College of Life Science of Jiangxi Normal University/ Jiangxi Provincial Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources, Nanchang, Jiangxi 330022)

**Abstract** [Objective] The research aimed to lay the foundation for seeking the endophytic fungi in *Radix runcis Japonici* with the medicinal value. [Method] PDA medium was used to isolate, purify and identify preliminarily the endophytic fungi in *R. runcis* and analyze its diversity. [Result] 45 strains of endophytic fungi were isolated from *R. runcis*, 21 strains of which were in the root, occupying 46.67%. 14 and 10 strains were isolated from the stem and the leaves resp. This indicated that the endophytic fungi resources in the root of *R. runcis* were more abundant than that in the stem and leaves. The endophytic fungi in the root of *R. runcis* grew faster than that in the stem and leaves. The results of morphological identification showed that there were 8 strains of *Pericillium*, 4 strains of *Tichoderma*, 3 strains of *Fusarium*, 1 strain of *Phanerochaete*, black mold and *Aspergillus* and 27 strains of *Mycelia sterilia* (occupying 60% of the whole endophytic fungi). [Conclusion] *Pericillium*, *Tichoderma* and *Fusarium* were the dominant species of the endophytic fungi in *R. runcis* and *Mycelia sterilia* was its absolutely dominant group.

**Key words** *Radix runcis Japonici*; Endophytic fungi; Isolation and identification; Diversity

植物内生真菌几乎存在于所有目前已经研究过的各种陆生及水生植物中, 分布广泛、种类繁多, 研究潜力相当大<sup>[1-3]</sup>。国内外掀起对药用植物和濒危植物内生真菌的研究热潮<sup>[4]</sup>, 药用植物内生真菌已成为发现新天然活性物质的重要资源<sup>[5]</sup>。

羊蹄是酸模属药用植物土大黄中的一种, 以根或根茎入药。羊蹄根的酊剂在试管内对多种致病真菌都有抑制作用, 对红色毛发癣菌(*Trichophyton rubrum*)、趾间发癣菌(*T. interdigitale*) 在浓度50 μg/ml 时即有抑制作用。因此, 临床上用羊蹄根内服或外用治疗一些真菌感染的皮肤病, 常能收到良好效果<sup>[6]</sup>。但是, 草药的使用受到季节气候, 地理环境等因素的影响, 从而在一定程度上限制了草药的使用。因此从羊蹄中寻找能够产生与羊蹄相同或相似药用活性成分的内生真菌有着重要的意义。笔者主要对江西南昌羊蹄内生真菌的多样性进行了初步分析, 以期从羊蹄中寻找有药用价值的内生真菌奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试草药。**羊蹄(*Rumex japonicus* Hutt) 全植株采自江西南昌江西师范大学校园。

**1.1.2 培养基。**

**1.1.2.1 固体分离培养基(PDA)。**取新鲜马铃薯200 g, 切块煮30 min, 过滤取清液加20 g 葡萄糖和20 g 琼脂, 蒸馏水定容至1 000 ml, pH 自然, 121 °C 高压灭菌20 min。

**1.1.2.2 斜面培养基。**PDA 培养基, 用以保存菌种。

**1.1.3 主要仪器和药品。**隔水式电热恒温培养箱(GSM350-BS) 购自上海新苗医疗器械制造有限公司, 不锈钢手提式灭菌锅(DSX-280A) 购自上海申实医疗器械厂, 电子天平(JY10001, 上海精密科学仪器有限公司), 数码鼓风干燥箱(101A-3E) 购自上海实验仪器有限公司, 电炉(220V, AC, 100kW) 购自天津市·泰斯特仪器有限公司。葡萄糖购自上海实验试剂有限公司, 琼脂购自天津永大化学试剂开发中心。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 内生真菌的分离。**采样, 按常规无菌操作。取健康、新鲜的羊蹄, 用自来水冲洗干净, 75% 乙醇漂洗5 min, 无菌水冲洗3~4次, 再用0.1% 氯化汞溶液冲洗3 min, 最后用无菌水冲洗4~5次。剪去边缘, 再将茎、叶片和不定根剪成长3 cm, 宽2 cm 的小块, 并且分别种植到PDA 培养基上, 28 °C 恒温箱中倒置培养2~7 d, 期间每天观察菌落生长状况。同时设立对照, 即将上述表面灭菌处理材料不做切割处理, 置于同样条件下培养, 或将最后一次无菌水洗涤液涂布于PDA 平板上, 以检查表面消毒是否彻底, 辨别分离到的细菌是否为内生真菌<sup>[7]</sup>。

**1.2.2 内生真菌的纯化。**取切口处新长出的菌, 无菌操作, 接种到新鲜的PDA 培养基上, 并于28 °C 恒温培养箱培养。待菌落出现后, 根据菌落形态、颜色的差异以及长出时间的不同, 分别挑取各平板上菌落边缘的菌接种于新的PDA 培养基进行分离培养。培养数日后, 观察菌落的形态及菌落边缘的整齐情况、湿润程度等, 并做相应纪录。挑取单菌落, 重复纯化3次以上, 对菌株进行编号, 然后转至PDA 斜面培养基上, 于28 °C 恒温培养箱培养2~5 d, 最后放入4 °C 冰箱中保存备用。

**1.2.3 内生真菌的鉴定。**在最后一次纯化操作中, 取单菌落接于PDA 培养基中央。恒温培养后, 菌落呈同心圆状生

基金项目 江西师范大学成长基金项目。

作者简介 曾庆桂(1977-), 女, 江西赣州人, 硕士, 讲师, 从事微生物教学与科研工作。\* 通讯作者。

收稿日期 2007-07-19

长。生长3 d 之后,在菌落、边缘用接种针切下半菌落半培养基的小块,接到载玻片(一种菌接2份于同一载玻片),压片,恒温培养(培养皿装一湿润的滤纸片,以保持一定的水分)<sup>[8]</sup>。待盖玻片边缘长出菌丝后,显微镜下镜检观察。内生真菌的鉴定参考魏景超《真菌鉴定手册》<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 内生真菌的分离纯化结果** 植物羊蹄中经分离纯化得到内生真菌45株,其中根部21株,占46.67%;茎部14株,占31.11%;叶部10株,占22.22%。可见,根部的内生真菌资源要比茎部和叶部丰富。经过表面消毒之后,在未做切割处理的羊蹄材料上没有真菌的生长。这说明45株真菌均来自于羊蹄的内部,即为羊蹄的内生真菌。

**2.2 内生真菌的鉴定结果** 通过菌落形态观察,发现45株内生真菌生长情况有较大差异。根部的内生真菌普遍生长较快,茎和叶中内生真菌生长相对较慢。有些内生真菌生长3 d 还不到平板的1/3,而有些已快长满整个平板(表1)。

通过菌丝形态观察,发现其中无孢类群的内生真菌较丰富,共有27株,占整个内生真菌类群的60%。其中,根部有无孢类群14株,占66.7%;茎部有无孢菌群7株,占50%;叶部有无孢类群6株,占60%。其余内生真菌形态各异。由表2可知,羊蹄内生真菌中青霉属8株,木霉属4株,镰孢霉属3

株,拟茎点霉属、黑霉属和曲霉属各1株。

表1 恒温培养3 d 后部分羊蹄内生真菌的生长情况

Table 1 The growth situation of some endophytic fungi from *Runex japonicus* Hutt after cultured with stationary temperature for 30d

菌号 Strain number	菌落直 径 cm Colony diameter	菌落颜色 Colony color	边缘形状 Edge	产色素 Pigment
TG6	7.6	紫色Purple	整齐Regular	无No
TG7	7.1	黄色Yellow	整齐Regular	无No
TG10	6.6	紫色Purple	整齐Regular	无No
TG17	7.8	青绿色Turquoise	整齐Regular	无No
TG18	7.2	青绿Turquoise	整齐Regular	无No
TG19	7.3	紫黑色Purple black	整齐Regular	无No
TG21	2.8	白色White	整齐Regular	无No
T2	2.6	黄色Yellow	稍不平整Slightly irregular	无No
T3	3.8	黑色Black	稍不平整Slightly irregular	无No
T5	3.3	黑色Black	整齐Regular	无No
T6	6.8	黄褐色Stuff color	整齐Regular	无No
TJ11	4.1	红紫色Magenta	整齐Regular	红色Red
TJ12	4.2	红色Red	整齐Regular	无No
TJ14	7.6	暗黄色Dark yellow	整齐Regular	无No
TY1	2.5	黄色Yellow	整齐Regular	无No
TY2	2.7	红色Red	整齐Regular	红色Red
TY4	6.7	褐色Brown	整齐Regular	无No
TY6	7.1	褐色Brown	不平整Irregular	无No

注:平板直径为9 cm,所有菌落均呈不透明状态。

Note: The diameter of plate is 9 cm, all the colonies assumed opaque.

表2 部分羊蹄内生真菌孢子形态鉴定

Table 2 The morphological identification on some endophytic fungi from *Runex japonicus* Hutt

菌号 Strain number	菌丝形态 Mycelial morphology	孢子形态 Spore morphology	鉴定结果 Identification result
TG6	菌丝透明,无隔,发达 Transparent, without septum, developed	卵形 Oval	青霉属 Penicillium
TG7	菌丝透明,无隔,菌丝发达,分支较少 Transparent, without septum, developed, and less offshoots	镰刀状 Sickle shaped	镰孢霉属 Fusarium
TG10	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	卵形 Oval	木霉属 Trichoderma
TG17	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	卵形 Oval	木霉属 Trichoderma
TG18	菌丝透明,无隔,菌丝不发达,分支较少 Transparent, without septum, underdevelopment, and less offshoots	分生孢子有卵形和丝状2种 Conidiophores contain oval and filamentous	拟茎点霉属 Phanerochaete
TG19	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	镰刀状 Sickle shaped	镰孢霉属 Fusarium
TG21	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	卵形 Oval	青霉属 Penicillium
T2	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	分生孢子膨大,黑色 Conidiophores expanded, black	黑孢菌属 Nigrospora
T3	菌丝透明,无隔,分支较多 Transparent, without septum, and more offshoots	卵形 Oval	青霉属 Penicillium
T5	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	卵形 Oval	青霉属 Penicillium
T6	菌丝透明,有隔 Transparent, with septum	卵形 Oval	青霉属 Penicillium
TJ11	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	卵形 Oval	青霉属 Penicillium
TJ12	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	卵形 Oval	曲霉属 Aspergillus
TJ14	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	卵形 Oval	木霉属 Trichoderma
TY1	菌丝有隔,透明 Transparent, with septum	卵形 Oval	木霉属 Trichoderma
TY2	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	卵形 Oval	青霉属 Penicillium
TY4	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	卵形 Oval	青霉属 Penicillium
TY6	菌丝透明,无隔 Transparent, without septum	镰刀状 Sickle shaped	镰孢菌属 Fusarium

通过形态鉴定和孢子形态鉴定(图1),只能将能产生孢子的真菌初步鉴定到属,对于无孢类群的鉴定还有待于进行真菌18 SrDNAITS 序列鉴定。

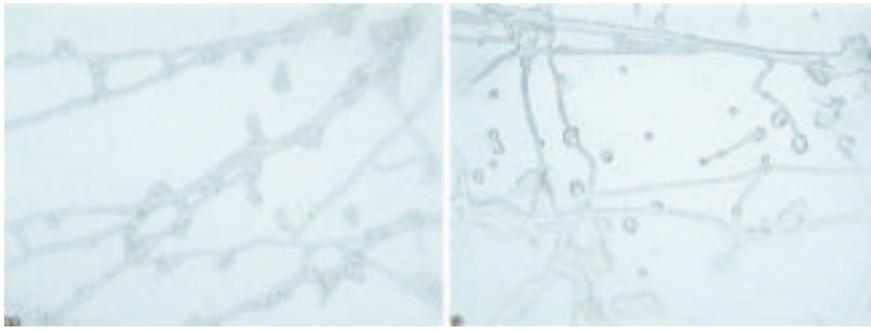


图1 部分羊蹄内生真菌的孢子形态

Fig.1 The spore morphology of some endophytic fungi

### 3 小结与讨论

研究表明,在植物羊蹄体内形成一种相对稳定的真菌菌群,其中青霉属8株、木霉属4株、镰孢霉属3株。这些真菌为羊蹄的优势种属,而无孢类群为羊蹄内生真菌的绝对优势类群。另外,在羊蹄不同部位内生真菌的数量也不尽相同。这些真菌存在于羊蹄体内,能与植物相互协调生活,形成共生关系:一是植物为内生真菌提供光合产物和矿物质;二是内生真菌的代谢物能刺激植物的生长发育。事实证明,内生真菌能够参与植物活性成分的合成,或者对植物次生代谢产物进行转化<sup>[10]</sup>。羊蹄不同部位内生真菌的分离结果表明,

(上接第3670页)

出率为0<sup>[10]</sup>,而该次检测碱检出率为15.56%,明显呈上升趋势,掺碱可以中和牛乳的酸度,以掩盖其酸败变质,这些问题在全国普遍存在。向鲜牛奶中添加植脂乳化油蛋白粉、掺杂、掺水、掺假现象时常发生。

#### 2.2 原因分析

**2.2.1 缺乏完善的管理体制。**我国乳制品“最新”的法规是1986年制定的。现实情况是中国奶业近几年发展速度非常快,之前的标准已难以适应新的行业要求,政府监管力度跟不上乳品行业的发展。

**2.2.2 生产方式落后。**目前,我国奶牛的饲养主要以小规模、分散型的农户饲养为主,一般户养奶牛3~5头,多的20头左右,生产规模小,必然导致成本偏高,应该扩大规模,向产销一体化发展。

**2.2.3 原料奶来源不好控制。**我国国民水平较低,而大多原料奶是从奶农那里收购,部分奶农素质较低,而掺假能短时间获得较高效益。

### 3 建议措施

**3.1 实施牛奶产量配额制度,加大市场调控力度** 采取牛奶由专门的乳品厂收购。政府制定牛奶价格与质量标准,并监督执行,监管部门可根据季节、市场等情况的变化,确定或调整牛奶的价格标准或浮动办法,使奶牛养殖户与乳品加工者安心生产,达到养殖户努力提高牛奶质量、增加经济收入,加工者努力提高产品质量、增加效益的目的。

**3.2 建立牛奶质量定点检测控制中心** 要有一个专门的鲜奶检测机构负责对所有鲜奶进行检测,检测控制中心根据检测结果,对所送检奶样实行按质论价,对不符合要求的鲜奶坚决拒收,并定期对奶牛场的牛奶生产、饲养方案提出指导性建议,养

羊蹄的根部有比较丰富的内生真菌资源。而羊蹄正好是根茎入药的植物。羊蹄根部丰富的内生真菌资源与其药用价值是否有一定的内在联系仍需要进一步研究。对于羊蹄内生真菌无孢菌群分类的进一步分子鉴定,需要通过PCR扩增无孢菌群核糖体ITS基因区段进行鉴定。同时,大量无孢菌群的存在与羊蹄的抗真菌活性之间是否具有联系,也需进一步分析。

#### 参考文献

- [1] 魏百琪,孙晓如.羊蹄和土大黄的化学成份比较[J].中草药,1996(7):392-393.
- [2] IIUJ Y,IIUC H,ZOU WX,et al.Letosphaeric acid,a natabdite with a new ophytidingus in *Atenisia annua*[J].Hlv ChemActa,2003,86:657-660.
- [3] 郭良栋.内生真菌研究进展[J].菌物系统,2001,20(1):148-152.
- [4] 陈毅坚,张硕,王艳,等.云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)内生真菌中产紫杉醇真菌的筛选[J].生物技术,2003,13(2):10-11.
- [5] 谷苏,邵华,蒋晓华,等.药用植物内生真菌多样性及其活性成分的潜在应用价值[J].中国药理学杂志,2001,36(1):14-15.
- [6] 沈世林,张俊英,李永升.大黄属(*Rheum*)和酸模属(*Rumex*)的药用和开发[J].甘肃中医,1998,11(3):39-41.
- [7] 曹理想,田新莉,周世宁.香蕉内生真菌、内生放线菌的类群分析[J].中山大学学报,2003,42(2):70-73.
- [8] 田新莉,曹理想,杨国武,等.水稻内生放线菌类群及其对宿主病原菌的抗性研究[J].微生物学报,2004,44(5):641-646.
- [9] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:科学技术出版社,1979.
- [10] 李能章,彭远义.植物内生菌研究进展[J].生物技术,2004,14(2):69-71.

殖户可根据检测结果,适时合理地调整饲养方案,改善管理,提高生产质量,增加经济效益。

**3.3 提高奶农素质** 进一步加强生鲜奶质量安全知识的宣传和技术培训,通过宣传培训,提高奶农的整体素质,增强安全生产的责任感和紧迫感。向奶农提供奶牛用药种类、用药量及用药方式等方面的技术指导,严格把握奶牛用药的安全停药期,实现生鲜乳的安全生产。加强管理,健全完善监管体制。充分发挥奶农协会的监管作用,加强对奶农的管理,建立生鲜奶生产纪录档案,对出售掺杂、掺假奶的农户实行经济处罚。加大投入,引进掺杂、掺假奶的快速检测设备。在各生鲜奶收购点配置掺杂、掺假速测仪或速测卡片,提高检测速度,逐步做到在收购时对每户奶农生产的生鲜奶逐一检测,严格控制掺杂、掺假奶进入市场。

#### 参考文献

- [1] 牛奶的营养价值[EB/OL].(2006-08-09)[2007-12-08].<http://news.sohu.com/20050111/r223885894.shtml>.
- [2] FRANKENFELD CL,PATTERSON R E,HORNER N K,et al.Validation of a soyfood-frequency questionnaire and evaluation of correlates of plasma isoflavone concentrations in post-menopausal women[J].Am J Clin Nutr,2003,77(3):674-680.
- [3] 王叔淳.食品卫生检验技术[M].北京:化学工业出版社,1988:359-366.
- [4] 沈海梅.酒泉市1999~2000年鲜牛乳卫生检验结果分析[J].中国卫生检验杂志,2001,11(5):608.
- [5] 徐瑞萍,吕华.海阳市城区市售牛乳的质量调查[J].职业与健康,2003,19(3):48.
- [6] 葛华.西宁地区牛奶中抗生素残留及细菌总数调查[J].青海医药杂志,1996,26(1):46-47.
- [7] 常建军,文海,邓生栋,等.西宁市市售鲜牛乳中抗生素残留调查报告[J].畜禽业,2000(12):51.
- [8] 宁鹏.鲜牛乳中抗生素残留调查[J].畜禽业,2004(3):53-54.
- [9] 抗生素的残留问题[EB/OL].(2006-03-09)[2007-12-08].<http://business.sohu.com/91/97/article202309791.shtml>.
- [10] 李太平,马双青,常建军,等.西宁市市场市售鲜牛奶的掺假调查[J].中国奶牛,2003(4):54.