

油樟叶内生真菌的多样性研究^{*}

王涛¹, 魏淑芳¹, 魏琴¹, 侯茂¹, 崔晓龙²

(1. 宜宾学院 生物工程系, 四川 宜宾 644007; 2. 云南大学 云南省微生物研究所, 云南 昆明 650091)

摘要:采取在马铃薯培养基上加无菌油樟(*Cinnamomum longepaniculatum* N. Chao ex H. W. Li)叶汁液作为分离培养基的办法,从油樟树叶中分离到24株内生真菌,经过鉴定,其分属于子囊菌纲的双足囊菌属(*Dipodascus* Lagerh.)、拟指突孢曲霉属(*Emericellopsis* J. F. H. Beyma)和半知菌类的花核菌属(*Anthina* Fr.)、青霉属(*Penicillium* Link)、组丝核菌属(*Phacodium* Pers.)、茎叶核菌属(*Ectostroma* Fr.)、地霉(*Geotrichum* Link)、皮核菌(*Acinula* Fr.)、团丝核菌(*Papulaspora* Preuss)、发菌(*Capillaria* Pers.)、峡串孢霉(*Paepalopsis* J. G. Kühn)、小卵孢霉(*Ovularia* Sacc.)、卵形孢霉(*Oospora* Wallr.)、稀丝头孢霉(*Haplotrichum* Link)、单梗曲霉(*Briarea* Corda)等15个属,且以无孢菌居多,表现出较为丰富的类群(物种)多样性。

关键词:油樟;内生真菌;分离;鉴定;微生物多样性

中图分类号:Q 935 **文献标识码:**A **文章编号:**0258-7971(2007)03-0300-03

油樟(*Cinnamomum longepaniculatum* N. Chao ex H. W. Li)是我国特有的天然芳香油生产植物,油樟叶可经水蒸气蒸馏而生产由几十种不同沸点的化学物质组成的油樟油(粗樟油)。油樟油的精加工产品为国防、轻工、医药等方面重要的稀有原料;在香精香料工业中,也占有重要的地位^[1~3]。来自宜宾市科委的信息表明:全国65%的油樟分布在宜宾,樟油产量占全国总产量的75%;宜宾油樟与同属植物物种相比,叶含油率高,达3.8%~4.5%,比香樟树叶含油率1.5%高1~2倍,所得的粗樟油含桉叶油素为58.55%,是广东、江西等省樟油含桉叶油素23%的2.5倍。

植物内生菌是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部或细胞间隙的真菌或细菌,它们与宿主植物之间存在明显的互惠共生关系^[4]。文献显示,某些植物内生微生物在与宿主发生联系时可增强宿主的抗病性,提高植物的生产力。因此利用有益内生微生物,研究植物与内生微生物的相互作用具有重要的理论意义和应用价值^[5]。

对油樟内生真菌开展研究,为研究油樟内生菌

的多样性、分析其与环境因子的相关性,以及探讨内生菌的多样性与油樟产油量的相关性具有重要的理论意义。同时,油樟内生菌的多样性及其与环境因子的相关性研究,对指导宜宾油樟的栽培、提高宜宾樟油的产量和质量具有潜在的现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品 采集宜宾县观音镇的油樟树叶,采集时间为2006年4月19日。

1.1.2 分离样品的制备

(1) 油樟树叶的表面消毒 将50g新鲜油樟树叶用自来水清洗干净;将树叶放在75%的乙醇中浸泡5min,用无菌水清洗1次;树叶重新转入新的75%的乙醇中浸泡5min;最后再用无菌水清洗8次,每次洗液分别置于不同灭菌的三角瓶中;取最后1次无菌水洗液涂于常规PDA平板上,在恒温培养箱中28℃培养4d,观察有无菌落产生,若发现平板中无菌落生成,则证明该材料表面消毒彻底,否则,不能使用。

(2) 油樟菌悬液的制备 将表面灭菌彻底的

* 收稿日期:2006-11-20

基金项目:四川省教育厅青年基金资助项目(2006B079);国家自然科学基金资助项目(30660004,30460004,30260004);云南省科技厅基金资助项目(2005PY01-1,2006C0006M)。

作者简介:王涛(1973-),男,四川人,讲师,主要从事植物内生菌学方面的研究。

树叶用无菌的剪刀剪成碎片,放入无菌研钵中;向研钵中加入无菌的石英砂(0.216 mm),并加入少量无菌水进行适当研磨;将研磨出的汁液用无菌的多层纱布过滤,滤液装入无菌的三角瓶中,4℃冰箱保存备用。

1.2 培养基 采用常规 PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL,自然 pH 值,121℃ 灭菌 20 min,冷却至 50℃,每 1 000 mL 加入 40 mg 的链霉素,混合均匀后倒平板。将常规 PDA 培养基分成 2 类,一类的各个平板上先分别涂布 0.5 mL 无菌油樟树叶滤液,倒置 30 min 后备用;另一类平板不涂布无菌油樟树叶滤液,这 2 种平板互为对照。

无菌油樟树叶滤液的制备:将油樟叶用自来水将表面清洗干净,剪成碎片,将碎片放入搅拌机中,加入无菌水,搅拌 2~4 min 后将其倒出。搅拌机重新加入碎叶片,将上次搅拌液重新倒进搅拌机里进行搅拌。重复 3 次。将液体用 3 层纱布过滤后用 0.2 μm 孔径细菌滤膜过滤,滤液放冰箱备用。

1.3 分离与鉴定方法

1.3.1 涂布梯度平板 将油樟叶菌悬液做成 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 的梯度;选 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 梯度悬液涂布平板,每个梯度重复 5 个平板;2 种平板涂布的梯度、菌悬液量和重复次数都相同。同时设置无菌对照平板。28℃ 培养,每 12 h 观察 1 次平板。

1.3.2 菌落的纯化和鉴定 将已长出的菌落挑入斜面培养基(常规 PDA,无抗菌素)中纯化后,参照文献[6]进行分类鉴定。同时辅以文献[7]进行鉴定。

2 结果与讨论

2.1 2 种分离 PDA 平板菌落生长情况 涂了无菌油樟树叶滤液的平板上经过 8 d 培养后,共长出 34 个菌落。而且最早在第 3 天长出;而未涂无菌油樟树叶滤液的平板中,只有 10^{-2} 有 1 个平板在接种后第 8 天长出 1 个菌落。由此可知,油樟内生菌与油樟之间存在非常密切的关系。24 株菌落形态差异较大的菌株在 2 种平板上长出菌落的时间及其平板分布状况见表 1。

2.2 真菌鉴定结果 上述 24 株菌中,除 3 株属于子囊菌纲以外,其余 21 株皆属于半知菌纲,其中又有 11 株属于无孢菌群。其种类、菌株数、培养特征和形态特征等见表 1。其中菌株 Yz21 为未涂无菌油樟树叶滤液的平板上长出的菌落。

由表 1 可以看出,宜宾油樟内生真菌体现出相当丰富的真菌类群(物种)多样性。其中菌株 Yz1 与 Yz5 同属于双足囊菌属;菌株 Yz4, Yz17, Yz20 与 Yz23 同属于青霉属;菌株 Yz6 与 Yz27 同属于组丝核菌属;菌株 Yz8 与 Yz18 同属于茎叶核菌属;菌株 Yz10, Yz16 与 Yz19 同属于皮核菌属;菌株 Yz13 与 Yz14 同属于峡串孢属。这几组菌在显微镜下的属一级分类学形态特征相同,但在平板上的菌落形态明显不同,这表明它们可能是同一个属中的不同物种,其种的鉴定有待于进一步实验确定。

2.3 对未涂布无菌油樟树叶滤液的平板上长出的菌落分析 在未涂无菌油樟树叶滤液的平板上长出的菌落(Yz21)并没有在涂有无菌油樟树叶滤液的分离平板培养基上发现相同菌落。这有 2 种可能:第 1 种可能是这株菌本身不是油樟内生真菌,而是在培养过程中由于操作不当而污染的杂菌;第 2 种可能是这株菌的生长速度比较慢,在涂有无菌油樟树叶滤液的培养基上,由于其他的菌种生长速度比这株菌快,于是对它产生了抑制作用,故而这株菌在涂有树汁原液的分离培养基上就不能长出菌落。

通过鉴定,这株菌是属于半知菌类,丛梗孢目,丛梗孢科,头孢霉族,稀丝头孢霉属。丛梗孢目的菌种包括多种腐生菌和寄生菌,与人类的经济关系极为密切^[6],由此可以推断这株菌有可能也是宜宾油樟的内生真菌,也就是说它没有在涂有无菌油樟树叶滤液的培养基上长出菌落是属于第 2 种可能。同时这也说明仅用一种培养基,一种培养方法很难分离出所有内生真菌,亦即油樟内生真菌的未培养微生物(as - yet uncultured microorganism)的研究,需要设计合适的培养基和培养条件。

关于宜宾油樟茎、根内生真菌的分离鉴定正在进行研究,待报道。

表 1 内生真菌鉴定结果

Tab. 1 Identification of endophytic fungi

菌株	所在平板	长出菌落 时间/d	内生真菌分类地位*
Yz1	10 ⁻⁴ - 1	10	子囊菌纲, 酵母目, 酱霉科, 双足囊菌属 (<i>Dipodascus</i> Lagerh)
Yz2	10 ⁻⁴ - 1	7	子囊菌纲, 曲霉目, 曲霉科, 拟指突孢曲霉属 (<i>Emericellopsis</i> J. F. H. Beyma)
Yz3	10 ⁻³ - 3	7	半知菌类, 无孢菌群, 花核菌属 (<i>Anthina</i> Fr.)
Yz4	10 ⁻² - 4	7	半知菌类, 丛梗孢目, 丛梗孢科, 曲霉族, 青霉属 (<i>Penicillium</i> Link)
Yz5	10 ⁻² - 1	6	子囊菌纲, 酵母目, 酱霉科, 双足囊菌属 (<i>Dipodascus</i> Lagerh.)
Yz6	10 ⁻⁴ - 2	6	半知菌类, 无孢菌群, 组丝核菌属 (<i>Phacodium</i> Pers.)
Yz8	10 ⁻² - 3	7	半知菌类, 无孢菌群, 茎叶核菌属 (<i>Ectostroma</i> Fr.)
Yz9	10 ⁻² - 4	8	半知菌类, 卵形孢霉族, 地霉属 (<i>Geotrichum</i> Link)
Yz10	10 ⁻³ - 2	4	半知菌类, 无孢菌群, 皮核菌属 (<i>Acinula</i> Fr.)
Yz11	10 ⁻² - 3	7	半知菌类, 无孢菌群, 团丝核菌属 (<i>Papulaspora</i> Preuss)
Yz12	10 ⁻³ - 3	5	半知菌类, 无孢菌群, 发菌属 (<i>Capillaria</i> Pers)
Yz13	10 ⁻² - 3	8	半知菌类, 卵形孢霉族, 峡串孢霉属 (<i>Paepalopsis</i> J. G. Kühn)
Yz14	10 ⁻³ - 2	6	半知菌类, 卵形孢霉族, 峡串孢霉属 (<i>Paepalopsis</i> J. G. Kühn)
Yz16	10 ⁻² - 3	8	半知菌类, 无孢菌群, 皮核菌属 (<i>Acinula</i> Fr.)
Yz17	10 ⁻³ - 4	3	半知菌类, 丛梗孢目, 曲霉族, 青霉属 (<i>Penicillium</i> Link)
Yz18	10 ⁻³ - 1	8	半知菌类, 无孢菌群, 茎叶核菌属 (<i>Ectostroma</i> Fr.)
Yz19	10 ⁻² - 2	3	半知菌类, 无孢菌群, 皮核菌属 (<i>Acinula</i> Fr.)
Yz20	10 ⁻³ - 4	8	半知菌类, 丛梗孢目, 曲霉族, 青霉属 (<i>Penicillium</i> Link)
Yz22	10 ⁻³ - 2	9	半知菌类, 葡萄孢族, 小卵孢霉属 (<i>Ovularia</i> Sacc.)
Yz23	10 ⁻² - 4	3	半知菌类, 丛梗孢目, 曲霉族青霉属 (<i>Penicillium</i> Link)
Yz25	10 ⁻³ - 3	5	半知菌类, 卵形孢霉族, 卵形孢霉属 (<i>Oospora</i> Wallr.)
Yz21	10 ⁻²	8	半知菌类, 头孢霉族, 稀丝头孢霉属 (<i>Haplotrichum</i> Link)
Yz27	10 ⁻² - 3	7	半知菌类, 无孢菌群, 组丝核菌属 (<i>Phacodium</i> Pers.)
Yz28	10 ⁻² - 4	6	半知菌类, 丛梗孢目, 丛梗孢科, 曲霉族, 单梗曲霉属 (<i>Briarea</i> Corda)

依据文献[6]的分类地位, 与文献[7]的类群归属不尽相同(未列出)

参考文献:

- [1] 罗中杰, 李唯一, 魏琴. 宜宾油樟的现状 & 未来[J]. 四川师范大学学报: 自然科学版, 2001, 24(3): 317 - 319.
- [2] 陶光复, 丁靖坤, 孙汉董. 湖北油樟叶精油的化学成分[J]. 武汉植物学研究, 2002, 20(2): 75-77.
- [3] 王坚, 罗永明, 刘贤旺. 樟科樟属植物樟的化学成分与组织培养研究[J]. 江西中医学院学报, 2004, 16(2): 69-70.
- [4] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91.
- [5] 罗永兰, 张志远, 冉国华. 柑橘内生真菌的生态研究[J]. 湖南农业大学学报, 2005, 31(5): 539-542.
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [7] KIRK P M, CANNON P F, DAVID J C, et al. Ainsworth and bisby's dictionary of the fungi[M]. 9th ed. Egham: CAB International, 2001.

- [12] GLAZER A N. Phycobilisomes: structure and dynamics. *Ann Rev[J]. Microbiol*, 1982, 36:173-198.
- [13] 张成武, 吴洁. 蓝藻细胞外多糖的研究概况[J]. *中国海洋药物*, 1997, 3:20-26.
- [14] WOODALL A A, BRITTON G, JACKSON M J. Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1336:575-586.

The effects of exogenous AHLs on the growth and metabolism of blue-green algae

ZHOU Li-juan, CHEN Xiao-lan, WANG Bo, CHEN Shan-na

(School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The effect of AHLs on growth and metabolism of *Microcystis aeruginosa* FACHB905, *Synechocystis* sp. FACHB898 were studied. The results showed that AHLs had very strong inhibiting effects on the growth of two kinds of algae. In the range of concentration of AHLs from 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ to 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the biomass and content of intra-cellular phycocyanin of two kinds of algae were slightly inhibited, but the content of soluble polysaccharose and Car/Chla increased dramatically. As the increase concentration of AHLs, the content of superoxide of *Microcystis aeruginosa* increased greatly, but the content of superoxide of *Synechocystis* sp. decreased, which indicated the difference of the adaptability between two kinds of algae.

Key words: blue-green algae; inhibition of growth; AHLs; physiologic metabolism

* * * * *

(上接第 302 页)

Diversity of endophytic fungi from leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* N. Chao ex H. W. Li in Yibin, Sichuan, China

WANG Tao¹, WEI Shu-fang¹, WEI Qin¹, HOU Mao¹, CUI Xiao-long²

(1. Department of Biotechnology, Yibin University, Yibin 644007, China;

2. Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: The PDA medium added 0.2 μm filter-sterilized leaf-succus of *Cinnamomum longepaniculatum* N. Chao ex H. W. Li was used as isolation medium, and twenty four pure endophytic fungal strains were isolated from surface-sterilized leaves of *Cinnamomum longepaniculatum* N. Chao ex H. W. Li in Yibin, Sichuan Province, China. These strains were classified into 15 genera: *Dipodascus*, *Emericellopsis*, *Anthina*, *Penicillium*, *Phacodium*, *Ectostroma*, *Geotrichum*, *Acinula*, *Papulaspora*, *Capillaria*, *Paepalopsis*, *Ovularia*, *Oospora*, *Haplotrichum*, and *Briarea*, which showed higher diversity of endophytic fungi in leaves.

Key words: *Cinnamomum longepaniculatum*; endophytic fungi; isolation; identification; microbial diversity