

· 中药农业 ·

秦岭凹叶厚朴内生真菌研究初报[△]

耿直*

(陕西国际商贸学院 医药学院, 陕西 西安 712046)

[摘要] **目的:**通过对凹叶厚朴内生真菌的鉴定研究,进一步丰富凹叶厚朴内生真菌种群的多样性,为更加合理有效的利用药用植物资源提供依据。**方法:**本文通过微生物方法从秦岭凹叶厚朴中分离纯化内生真菌,采用显微形态观察法对分离得到的内生真菌进行初步鉴定。**结果:**对秦岭凹叶厚朴内生真菌进行分离纯化及初步鉴定,共分离得到内生真菌34株,其中四川都江堰共分离14株,优势菌群为枝孢属;陕西汉中分离20株,优势菌群为镰刀菌属。初步鉴定结果为:1纲,3目,4科,9属。其中曲霉属3株,青霉属1株,葡萄孢属2株,胶帚霉属1株,镰刀菌属16株,枝孢属5株,交链孢属1株,束丝核菌属2株,组丝核菌属3株。**结论:**凹叶厚朴内生真菌的种群存在着极其丰富的多样性特征,为合理利用凹叶厚朴药用成分及保护凹叶厚朴药用植物资源提供理论依据。

[关键词] 凹叶厚朴;内生真菌;多样性

Preliminary Study on Diversity of Endophytic Fungi in QinLing *Magnolia officinalis* subsp. *biloba*

GENG Zhi*

(Shanxi Institute of International Trade Commerce, Xi'an 712046, China)

[Abstract] **Objective:** Through the study on the endophytic fungus of the *Magnolia officinalis* subsp. *biloba*, in order to enrich the diversity of endophytic fungus of the *Magnolia officinalis* subsp. *biloba*, to promote the development of research on the medicinal plant resources. **Methods:** Isolated the endophytic fungus from Qinling *M. officinalis* subsp. *biloba* with Microbiological methods, Take the Microscopic morphology observation to identificat. **Results:** 34 strains of endophytic fungi were isolated from Qinling *M. officinalis* subsp. *biloba*, among them 14 strains were isolated from Dujiangyan of Sichuan, The Cladosporium is dominant bacterial community. 20 strains were isolated from Hanzhong of Shaanxi, the Fusarium is dominant bacterial community. The appraisal result is: 1 class 3 orders 4 families 9 genus. aspergillus is 3 strains, penicillium is 1 strain, Botrytis is 2 strains, Gliocladium is 1 strain, Fusarium is 16 strains, Cladosporium is 5 strains, Alternaria is 1 strain, Rhizoctonia is 2 strains, Phacodium is 3 strains. **Conclusion:** The endophytic fungi of *M. officinalis* subsp. *biloba* have rich population diversity, Based on available for using the Component of *M. officinalis* subsp. *biloba* and protecting the resources of *M. officinalis* subsp. *biloba*.

[Keywords] *Magnolia officinalis* subsp. *biloba*; Endophytic fungi; diversity

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.2017.1.019

凹叶厚朴为多年生禾本科植物,为木兰科木兰属植物厚朴的一个亚种^[1],是我国特产树种,主产浙江、福建、四川、湖北、湖南、江西等地,商品习称温朴,产量大^[2],是我国传统的特有珍贵中药材。凹叶厚朴其性温,味苦、辛;具有温中化痰引滞、下气的功效;用于消炎灭菌、痰饮喘满、胸腹胀满、肠梗阻等症^[3]。其主要药效成分是厚朴酚与和厚朴酚,两种化合物均具有抗肿瘤、抗菌、抗氧

化、抗神经变性、抗抑郁等多种药理活性。陕西属于凹叶厚朴的边缘产区,主要产于安康、汉中一带。

在采收树龄上,传统认为凹叶厚朴种植16年后方可采剥进行利用,然而近年来对于厚朴及凹叶厚朴药理活性的研究深入,药材需求量的不断增加,大批凹叶厚朴未到采种年龄就被提前砍伐,由于过度滥伐森林和大量剥去树皮药用,导致凹叶厚朴的分布范围迅速缩小,成年野生植株极少见,已处于

[△] [基金项目] 陕西省教育厅2014年科学研究计划(专项项目),编号:14JK2010

* [通信作者] 耿直,讲师,研究方向:生物工程及植物生物技术研究;E-mail: gengzyx1226@163.com

濒危状况。

据不完全统计,除了分离出产生紫杉醇内生真菌的药用植物外,至少有130多种的药用植物被研究过内生真菌^[4]。通过相关查阅与调查,秦岭地区凹叶厚朴内生真菌研究报道较少。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 采自陕西省汉中市洋县华阳古镇金丝猴沟和四川省都江堰的凹叶厚朴根、茎,置于无菌袋中,4℃冰箱保存。经我院雷国莲教授鉴定为木兰科木兰属凹叶厚朴 *Magnolia officinalis* subsp. *biloba* (Rehd. et Wils.) Cheng et Law。

1.1.2 培养基 CPDA 培养基;查氏培养基

1.1.3 主要仪器 人工气候箱(LRH-250-G-S,广东省医疗器械厂);双层恒温培养振荡器(ZHWY-2102C,上海智城分析仪器制造有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌分离与纯化 取新鲜健康的凹叶厚朴的根、茎,根、茎截成5cm小段,刮去外表皮直至露出韧皮部即可,流动水冲洗24h,将冲洗好的材料移入超净工作台,无菌水冲洗3次,75%乙醇消毒10~30s,而后用0.1%升汞漂洗(5~10min),无菌水冲洗3次。手术刀剥下根皮,枝

皮,使用手术剪剪成0.5cm×0.5cm的小块,接入已倒好的马铃薯培养基。置于28℃培养箱中培养3~7d。

取切口处新长出的菌丝及时转接至新鲜PDA培养基上培养。待菌落出现后,根据长出时间的不同、菌落形态以及颜色的差异,分别挑取各平板上的菌落边缘的菌丝接于新的平板上进行分离培养,如此反复纯化多次后即可得到一个纯菌株,置入4℃冰箱中保存。

1.2.2 内生真菌形态观察 制片检查:纯培养物接种于CA培养基,28℃下倒置培养,待刚长出菌丝时,将无菌的盖玻片斜插入平板内(插片法)^[5],继续培养至菌丝爬满盖玻片,将玻片取出,在显微镜下观察其特征。参考真菌鉴定手册对其分类地位进行初步鉴定^[6]。

2 结果及分析

2.1 结果

从凹叶厚朴中共分离出34株内生真菌,其中从陕西洋县中分离得到20株内生真菌,从四川都江堰中分离得出14株内生真菌。结果见表1和表2,在厚朴内生真菌中,从数量上看,以镰刀菌属 *Fusarium* 为优势种群,包含菌株占总菌株数的47%。

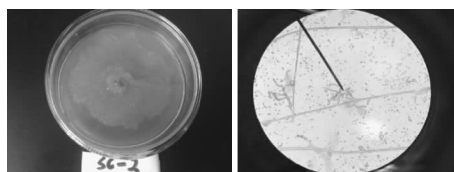
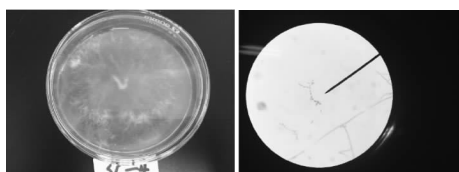
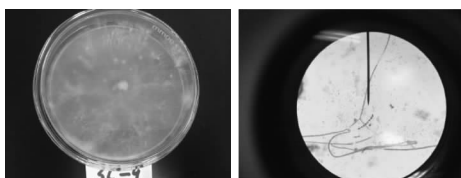
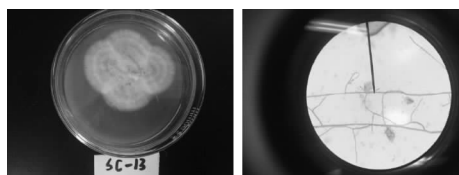
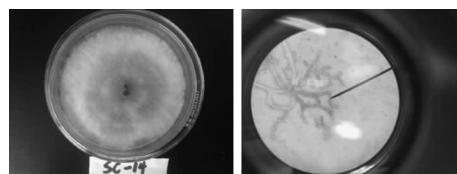
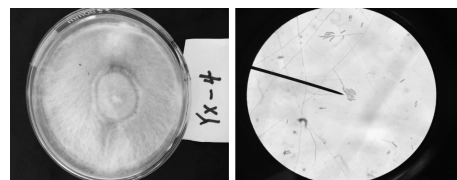
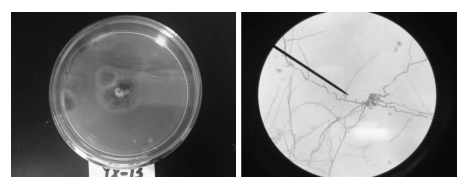
表1 凹叶厚朴内生真菌的种群组成

纲	目	科	属	总计	分离频率(%)		
半知菌纲	丛梗科目	丛梗孢科	曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	3	9		
			青霉属(<i>Penicillium</i>)	1	3		
			葡萄孢属(<i>Botrytis cinerea</i>)	2	6		
			胶帚霉属(<i>Gliocladium</i>)	1	3		
		瘤座孢科	镰刀菌属(<i>Fusarium</i>)	16	47		
			枝孢属(<i>cladosporium</i>)	5	14		
			交链孢属(<i>Alternaria</i>)	1	3		
			球科孢目	半壳孢科	束丝核菌属(<i>Ozonium</i>)	2	6
				无孢目	无孢科	组丝核菌属(<i>Phacodium</i>)	3
			总计				34

表2 不同采集地点凹叶厚朴内生真菌的数量及种类分布情况

采样地点	属	数量/株	合计
四川都江堰	交链孢属	1	14
	曲霉属	2	
	镰刀菌属	1	
	葡萄孢属	1	
	胶帚属	1	
	组丝核菌属	2	
	枝孢属	5	
	束丝核菌属	1	
	青霉属	1	
陕西汉中洋县	镰刀菌属	16	20
	青霉属	1	
	曲霉属	1	
	组丝核菌属	1	
	葡萄孢属	1	

部分属种代表性菌落形态及显微形态特征见图1-7。

图1 SC-2束丝核菌属 *Ozonium* sp.图2 SC-4枝孢属 *Cladosporium* sp.图3 SC-9交链孢属 *Alternaria* sp.图4 SC-13胶帚霉属 *Gliocladium* sp.图5 SC-14组丝核菌属 *Phacodidium* sp.图6 YX-4镰刀菌属 *Fusarium* sp.图7 YX-13葡萄孢属 *Botrytis cinerea* sp.

2.2 结果分析

厚朴酚与和厚朴酚是从厚朴及凹叶厚朴中提取出来的天然产物，具有抗氧化、调节肠功能和抗胃溃疡、中枢抑制、肌肉松弛、降压和抗聚集、提高免疫、抗过敏、抗菌、抗病毒、抗癌等多种药理活性，现今临床药用厚朴酚主要来源于从濒危植物厚朴及凹叶厚朴组织中提取，但已严重破坏自然资源，不利于厚朴资源保护。然而根据植物内生真菌共生的内生真菌的理论，植物内生真菌可能产生与宿主植物相同或相似，具有生物活性的次级代谢产物，为获得厚朴酚这一天然产物开辟了一条新途径。但由于产量较低，仍不能满足工业化生产需求。筛选高产内生真菌菌株，进行菌种改良及工程菌株的构建是解决目前内生真菌发酵生产厚朴酚主要途径。

本次实验材料分别采自四川都江堰和陕西汉中，共分离到34株内生真菌，经鉴定为1纲、3目、4科、9属。凹叶厚朴内生真菌的种群组成可以看出凹叶厚朴内生真菌在种类上存在着极其丰富的多样性特征。在凹叶厚朴内生真菌中，从数量上可以看出，以镰刀菌属为优势菌群，包含菌株占总菌株数的47%。

从四川都江堰和陕西汉中采集的凹叶厚朴植株中均分离到了一定数量、类群不同的内生真菌，表明内生真菌在凹叶厚朴中广泛存在。不同采集地点的凹叶厚朴中内生真菌的优势菌群不同。采集于四

川都江堰的凹叶厚朴优势菌体为枝孢属,采集于陕西汉中的优势菌体为镰刀菌属。采集于四川都江堰的凹叶厚朴植株中的内生真菌在种类上相对于采自陕西汉中显得丰富,认为这与采集地的具体环境、凹叶厚朴的树龄,以及材料采集时间有关。

在有关厚朴的研究报道中也可发现,不同采集地点的厚朴所含内生真菌的优势菌体不同,采集于峨眉山唐山的优势菌体为青霉属,采集于都江堰市虹口乡的优势菌体为曲霉属。采集于峨眉山的厚朴植株中的内生真菌在种类上较之采自都江堰者显得丰富,镰孢属为两个不同来源厚朴的共有菌群^[7]。

药用植物中蕴藏着丰富的内生真菌,内生真菌在植物中的分布受组织与年龄结构的影响。本次实验发现,内生真菌在凹叶厚朴根中分布最多,共21株,茎次之,共13株。根中所含内生真菌主要是常见的土壤和根部或由根部传导的真菌,由于凹叶厚朴根处于土壤中,并通过土壤吸收植物所需养分,内生真菌利用植物的营养成分来生长繁殖,所以根中内生真菌含量最高;而凹叶厚朴茎将根部吸收的营养传输到植物各部分,且茎长期暴露与环境之中,所以茎中内生真菌含量低于根部内生真菌的含量。

本实验通过对凹叶厚朴内生真菌的分离及初步

鉴定,对凹叶厚朴所含内生真菌进行了初步研究,为丰富凹叶厚朴内生真菌种群的多样性提供实验依据,同时为利用内生真菌研究凹叶厚朴药用成分提供初步基础,为更加合理有效的利用药用植物资源提供实验依据。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:235.
- [2] 张贵君. 现代中药材商品通鉴[M]. 北京:中国中医药出版社,2001:1234.
- [3] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:人民卫生出版社,1995:218.
- [4] 姜威,全文藻,张月琴,等. 东北红豆杉内生真菌代谢产物的化学研究[J]. 中国抗生素杂志,1998,23(4):263-266.
- [5] 刘士旺. 真菌形态的几种观察方法[J]. 生物学通报,1998,33(10):45.
- [6] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [7] 鹿蕾,严铸云,郭晓恒,等. 厚朴内生真菌的研究(I):菌种分离及其鉴定[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):2013-2014.

(收稿日期 2016-04-07)

(上接第87页)

- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:360.
- [4] 曾洋,张爱军,文筱. 干蟾皮的研究进展[J]. 中国医药科学,2011,1(15):29-31.
- [5] 王宏洁,杨立新,高波,等. 高效液相色谱法测定不同种蟾皮中蟾蜍噻啉的含量[J]. 中国中医药信息杂志,2012,19(11):44-45.
- [6] 乔淑芬. 中华大蟾蜍生活习性及其人工养殖场地选择[J]. 通化师范学院学报,2008,29(4):39-41.
- [7] 李军德,赵群,康彦. 密度与饲料对中华蟾蜍蝌蚪生长发育的影响[J]. 中国中药杂志,2016,41(6):1001-1007.
- [8] 李文健,王智,张健华,等. 棘腹蛙(*Rana boulengeri* Günther)[J]. 常德师范学院学报(自然科学版),2001,13(4):76-78.

(收稿日期 2016-02-15)