

滇重楼寄生菌的研究*

王世林 周立刚 李 英

蔡妙英

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

(中国科学院微生物研究所 北京 100081)

提 要 从滇重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)地下茎中分离和鉴定出两种细菌——蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)和产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*),以及三种真菌——黑团孢霉(*Periconia* sp.)、白色厚顶孢霉(*Pachnocybe albida*)和重楼索霉(*Hormomyces paridiphilus*)。对蜡状芽孢杆菌、产碱假单胞菌和重楼索霉进行了液体培养并测定了胞外多糖含量,结果表明重楼索霉可分泌大量胞外多糖,这可能是导致滇重楼地下茎胶质化和多糖含量增加的原因。

关键词 滇重楼,寄生菌,液体培养,胞外多糖

分类号 Q939.1 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)02-0160-63

滇重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*)地下茎是中药重楼的主要药用种。^[1]

此药系野生,因年用量过大,加之生长缓慢,致使资源日趋枯竭,为能永续利用,实现人工栽培商品化,已势在必行。在粉质和胶质滇重楼研究中,发现因微生物寄生,地下茎质地发生胶质化,所含糖类的数量、种类和组成均发生了显著差异^[2]。探讨该药材的生长及其品质与寄生物之间的关系,可为发展人工大量栽培和保证其药效提供有益的参考。本文报道胶质滇重楼寄生菌的分离、鉴定和优势菌株液体培养的结果。

1 材料和方法

1.1 样品来源

滇重楼采自昆明植物研究所植物园。

1.2 寄生物体的分离培养

滇重楼为多年生草本植物,地下茎深埋于地下,因此在分离寄生菌之前,必需对地下茎进行严格的表面消毒。在无菌条件下,先用升汞溶液浸泡地下茎,再用酒精灯火焰灼烧表面,削去外皮,取其内质部切成小块,用 PDA 培养基进行真菌分离,用 KB 培养基进行细菌分离。经多次分离纯化,镜检确认后,再行鉴定。

1.3 鉴定方法

主要根据文献^[3,4,5]的方法进行

1.4 液体培养

滇重楼主要分布于云贵高原冷凉的山区,为喜荫多年生植物。为了接近其生活习性,液体培养采用低温(20℃~22℃)长时间(15d),摇床培养。真菌接种于查氏培养液^[6]

*国家自然科学基金资助项目(No. 39570030)

收稿日期:1997-10-28,修回日期:1998-05-25

中,细菌接种于 YEB 液体培养基^[7]中,每 1000ml 的三角瓶中装培养基 200ml。菌液经离心(9 000r/min)分离出菌体和培养液,菌体经冰冻干燥,称重,上清液减压浓缩至小体积。用乙醇沉淀胞外多糖,脱水、干燥后称重。

2 结果和讨论

2.1 真菌鉴定

在真菌的分离纯化过程中,首先在滇重楼地下茎的薄壁组织中分离出黑团孢霉(*Periconia* sp.)^[2]。分离出的第二种真菌形态特征为:菌丝组合多成束状、为 2~3 层,分生孢子柱呈台生型、直立、白色或乳白色,高 400 μ m、粗 40~80 μ m,分生孢子透明、光滑、大小为 15~25 μ m \times 11~15 μ m,与文献[4]报道基本一致,将其鉴定为白色厚顶孢霉(*Pachnocybe albida*)。该菌记录寄生于黄杨属(*Buxus*)、白蜡树属(*Fraxinus*)或栎属(*Quercus*)等植物的腐木桩上,原记录于欧洲。在滇重楼地下茎中发现,尚属首次。

在分离纯化中,还得到一株生长迅速的优势菌,经鉴定,为索霉属一新种,定名为重楼索霉(*Hormomyces paridiphilus* M. Zang et S. L. Wang)^[8]。

2.2 细菌鉴定

从滇重楼地下茎的薄壁组织中分离出细菌两株 No. 1 和 No. 2。

No. 1:革兰氏阳性,杆状,大小为 1.0~1.1 μ m \times 2.8~4.0 μ m。胞内产中生芽孢。孢囊不膨大。胞内在幼培养物时有聚- β -羟基丁酸颗粒。菌落圆形,蜡状,不透明,大小为 5mm 以上。能产乙酰甲基甲醇(V-P 阳性)。产淀粉酶和卵磷脂酶,不产苯丙氨酸脱氨酶。能在 7%(ρ)NaCl 和 pH5.7 中生长,能在厌氧培养基中生长,营兼性厌氧生活。能抗溶菌酶(0.001%)。能分解酪氨酸。对葡萄糖和甘露醇产酸,而对阿拉伯糖和木糖不产酸,该菌被鉴定为蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)。

No. 2:革兰氏阴性,杆状,具极生鞭毛。胞内无聚- β -羟基丁酸颗粒。菌落呈圆形,大小为 1~2mm,光滑,半透明到透明,色略黄。接触酶阳性,氧化酶迟缓阳性。葡萄糖 O/F 测定为氧化型,葡萄糖不产酸而产碱,硝酸盐不能还原到亚硝酸盐,葡萄糖和果糖都不能作为唯一的碳源,经鉴定,该菌为产碱假单胞菌(*Pseudomonas alcaligenes*)。

滇重楼为多年生草本植物,每年秋后地上茎和须根枯萎,地下茎逐年膨大并生新芽和新的须根。次年长成新的地上茎,生长多年后地下茎形成多层倒塔状物(即药用部位),故名重楼(图 1-A)。老须根枯萎脱落,使地下茎出现许多易为微生物侵染的小孔(图 1-B)。

对大量的滇重楼地下茎进行观察和比较,发现感染微生物较多的胶质重楼地下茎个头大、量重,而感染轻的粉质重楼地下茎个头小、量轻。因此,有必要对重楼、真菌和细菌三者相互关系进行深入的研究,为将来人工大量栽培、提高产量和质量创造条件。

2.3 液体培养

研究发现,因微生物寄生而使滇重楼地下茎多糖含量显著增加,并发生胶质化^[2],提示微生物的寄生能提高地下茎多糖的含量。为了找出到底是哪些菌在起主要作用,进行了蜡状芽孢杆菌、产碱假单胞菌和重楼索霉这三种优势菌的液体培养,并对菌体重量和胞外多糖产率进行了比较(表 1)。

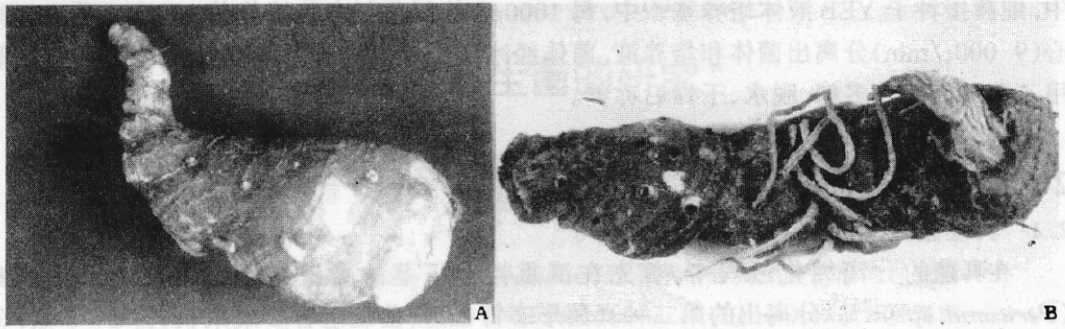


图1 滇重楼地下茎

Fig.1 Hypogeous stems of *P. polyphylla* var. *yunnanensis*

A. 呈倒塔状的地下茎 The hypogeous stem in shape of upside down pagoda;

B. 地下茎表面出现的小孔 Many small holes on the surface of the hypogeous stem.

表1 蜡状芽孢杆菌、产碱假单胞菌、重楼索霉的液体培养

Table 1 Submerged culture of *B. cereus*, *P. alcaligenes* and *H. paridiphilus*

寄 生 菌	菌体干重	胞外多糖产率
Parasites	Dry weight of parasites/(g/L)	Yield of extracellular polysaccharide/(g/L)
<i>B. cereus</i>	1.43	1.20
<i>P. alcaligenes</i>	2.35	0.33
<i>H. paridiphilus</i>	8.64	3.94

结果表明,在培养时间和温度均相同的条件下,重楼索霉不仅生长快,分泌的胞外多糖也多。提示胶质重楼地下茎多糖含量显著增加,主要与该真菌有关。

滇重楼不仅在云南民间广泛用于消炎祛肿,还大量用于成药配方中。无论吞服或煎煮用药,其所含微生物菌体及其代谢产物均可能食入人体,发挥生理作用。细菌菌体、脂多糖(内毒素)、荚膜多糖和胞外多糖等作为免疫调节因子,已受到药物研究者的重视。进一步研究滇重楼中各物种及其产物的生物活性,将有助于从更深层次认识滇重楼的药效学和生物多样性的关系。

致谢 臧穆研究员帮助鉴定真菌,李恒研究员鉴定滇重楼植物样品,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会,中华人民共和国药典.北京:人民出版社,1990.231.
- [2] 王世林,赵永灵,李晓玉等.云南植物研究,1996,18(3):345~348.
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组,一般细菌常用鉴定方法.北京:科学出版社,1978.
- [4] Martin B E, Ellis J P. Microfungi on Land Plants. London & Sydney: Croom Helm, 1985. 69.
- [5] Holt J G, Krieg N R, Peter H A. Bergey's of Manual of Determinative Bacteriology. 9ed. Baltimore; williams & Wilkins Company, 1994.
- [6] 范秀容,沈 萍.微生物学实验.北京:高等教育出版社,1986.130.
- [7] Hoogkass P J J, Klapnijk P, Nuti M P *et al.* *J Gen Microbiol*, 1977, 98:477~484.
- [8] 臧 穆,王世林.云南植物研究.1997,19(3):324.

**STUDIES ON THE PARASITES OF
PARIS POLYPHYLLA VAR. *YUNNANENSIS***

Wang Shilin Zhou Ligang Li Ying

(*Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204*)

Cai Miaoying

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract Two bacteria and three fungi were isolated from the hypogean stems of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*. The bacteria were identified as *Bacillus cereus* and *Pseudomonas alcaligenes*, and the fungi were identified as *Periconia* sp., *Pachnocybe albida* and *Hormomyces paridiphilus*. The results on liquid culture of *B. cereus*, *P. alcaligenes* and *H. paridiphilus* indicated that the colloidization and polysaccharide content increasing in hypogean stems of *P. polyphylla* var. *yunnanensis* were due to the extracellular polysaccharide secretion of the parasitical fungus *H. paridiphilus*.

Key words *Paris polyphylla* var. *yunnanensis*, Parasite, Submerged culture, Extracellular polysaccharide

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No.39570030)