

文章编号: 1000-5692(2004)03-0299-04

银杏内生镰刀菌 GI024 生物学特性

蒋继宏, 陈凤美, 曹小迎, 孙 勇, 朱红梅

(徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116)

摘要: 对内生镰刀菌 *Fusarium* sp. GI024 进行了生物学特性的研究。结果表明, 内生镰刀菌 *Fusarium* sp. GI024 在 20~37 °C 下生长较好, 最适生长温度为 25 °C, 4 °C 时不能生长。该菌在 pH 值为 5.5~7.5 菌落生长较好, 最适生长 pH 值为 5.5, pH 值 4.0~7.5 产孢较多。光照对菌落生长和产孢有一定影响, 黑暗、连续日光灯照射 (24 h)、黑暗与日光灯 (14 h) 交替处理对菌落生长影响差异不显著, 2 h 紫外线照射对菌落生长和产孢无抑制作用。该菌能利用多种碳源和氮源, 糊精、麦芽糖、DL-丙氨酸和 L- α -丙氨酸有利于该菌生长和产孢。表 4 参 14

关键词: 内生镰刀菌; 生物学特性; 营养条件

中图分类号: S763.15; S432.43 **文献标识码:** A

近年来的研究表明, 生活在植物体这一特殊进化环境中的内生真菌 (endophytic fungus) 能产生与宿主相同或相似的具有生理活性的代谢产物^{1~14}。研究得较多的是一些对抗癌、抗菌等有潜在应用价值的代谢产物, 也有研究发现能产香料的内生真菌。张玲琪²从德国鸢尾 *Iris germanica* 的根状茎干片中分离到 1 株能产香的米根霉 *Rhizopus oryzae* 的内生真菌, 经鉴定此产香物质为鸢尾酮。彭彦华³进行微生物发酵直接产生烟用香料的研究, 获得了 23 株在含蓖麻油的培养基上产生花香味的菌株。国外用类地青霉和木霉等生产乳制品主香料 2-庚酮³。随着人们对天然产物兴趣的增加, 香料工业越来越注重与生物技术相结合生产天然芳香物质。生物合成香料具有生产原料的天然性和安全性等优点。利用产香微生物技术受到各国研究者和生产商的高度重视, 将产生巨大的社会效益和经济效益^{4~12}。实验从银杏 *Ginkgo biloba* 中分离筛选到一产香内生真菌镰刀菌, 对其生物学特性进行研究, 优化其培养条件, 为该银杏内生真菌的进一步鉴定提供了依据, 为它在化学工业上如化妆品、香水、食品和香精等的开发应用打下基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株 银杏内生镰刀菌 *Fusarium* sp. GI024 (以下称镰刀菌) 由江苏省药用植物生物技术重点实验室提供。

1.1.2 培养基 供试培养基马铃薯蔗糖琼脂培养基 (PSA)。

1.1.3 试剂 D-木糖、葡萄糖、D-半乳糖、糊精、麦芽糖、甜醇、 α -乳糖、蔗糖、三梨醇、甘露醇、

收稿日期: 2003-11-07; 修回日期: 2004-05-26

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金资助项目 (okjd220004)

作者简介: 蒋继宏 (1964-), 男, 安徽滁州人, 副教授, 博士, 从事微生物学等研究。E-mail: jhjiang@xznz.edu.cn

L-谷氨酸、硝酸钠、DL-丙氨酸、L-赖氨酸、DL-甲硫氨酸、L- α -丙氨酸、硫酸铵、草酸铵、硝酸铵等为市售品。

1.2 方法

1.2.1 镰刀菌生长的产孢条件 ①温度。在 PSA 平板上移入直径 5 mm 的小菌饼至皿中央(下同),在 4, 20, 25, 37 °C 下培养, 每一处理重复 3 次, 培养 120 h 后测量菌落直径。将培养 120 h 的菌落加入 5 g \cdot L⁻¹ Tween-80 制成孢子悬浮液, 在血球计数板上检查分生孢子数。②pH 值。PSA 培养基用 0.1 mol \cdot L⁻¹ 盐酸和 0.1 mmol \cdot L⁻¹ 氢氧化钠调节 pH 值为 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5 等 12 个梯度。用上法接种后, 于 25 °C 下培养, 每一处理重复 3 次。培养 120 h 后检测产孢量及菌落生长情况。③光照。将已接种的 PSA 平板在 25 °C 下培养 22 h 后作如下光照处理: 完全黑暗, 连续日光灯照射(日光灯 6 W, 灯皿距 25 cm, 24 h), 黑暗与日光灯(14 h)交替, 紫外灯(20 W, 灯皿距 50 cm, 2 h)照射后分别置于黑暗和连续日光灯照射等 5 种处理。每一次处理重复 3 次。在 25 °C 下培养 96 h 后产孢量及菌落生长情况。

1.2.2 镰刀菌对碳源、氮源的利用 ①碳源试验。在基础培养基上分别以等量的 D-木糖、葡萄糖、D-半乳糖、糊精、麦芽糖、甜醇、 α -乳糖、蔗糖、三梨醇和甘露醇等 9 种碳源取代蔗糖, 每处理重复 3 次。在 25 °C 下培养 120 h 后检测产孢量及菌落生长情况。②氮源试验。在基础培养基上分别用等量的 L-谷氨酸、硝酸钠、DL-丙氨酸、L-赖氨酸、DL-甲硫氨酸、L- α -丙氨酸、硫酸铵、草酸铵和硝酸铵等 8 种氮源置换 L-胱氨酸, 每一处理重复 3 次。在 25 °C 下培养 120 h 后检测产孢量及菌落生长情况。

2 结果

2.1 温度对镰刀菌生长和产孢条件的影响

表 1 表明, 镰刀菌在 4 °C 时不生长, 37 °C 仍生长, 但菌落直径小。最适温度是 25 °C, 菌丝生长茁壮, 与其余处理相比差异显著; 产孢量以 25 °C 最多, 每视野为 25.50 个, 其次为 37 °C 每视野 22.00 个, 20 °C 时为 7.43 个。

表 1 温度对内生镰刀菌 GI024 生长产孢的影响

Table 1 Effects of temperature on growth and sporulation of *Fusarium* sp. GI024

温度/°C	菌落直径/mm	显著性	菌丝体生长	每视野孢子数/个	显著性
4	0	a	++++	0	a
20	37.8	b	++++	7.43	ab
25	46.6	a	++++	25.50	b
37	34.5	a	++++	22.00	ab

说明: 表中字母相同者为差异不显著 ($P < 0.05$), 下同

2.2 pH 值对镰刀菌生长和产孢条件的影响

镰刀菌能适应较宽的 pH 值范围。pH 值为 4.0~9.5 条件下能生长和产孢。pH 值 5.5~7.5 (pH 值 7.0 除外) 生长较好, 各处理间无显著差异, pH 低于 5.0 和高于 8.0 时生长缓慢, 最适 pH 值为 5.5。产孢量以 pH 值为 4.0~7.5 较多, 每视野孢子为 12.00~48.78 个。

2.3 光照对镰刀菌生长和产孢条件的影响

表 2 表明, 镰刀菌在连续日光灯(24 h)照射, 黑暗与日光灯(14 h)交替和完全黑暗处理下, 菌落生长有一定差异, 完全黑暗处理菌落直径最小。连续日光灯照射产孢最

表 2 光照对镰刀菌生长和产孢的影响

Table 2 Effects of light on growth and sporulation of *Fusarium* sp. GI024 at 25 °C

光照处理	菌落直径/mm	显著性	菌丝体生长	每视野孢子数/个	显著性
连续日光灯照射	43.8	b	++++	41.08	a
黑暗与日光灯交替	43.2	b	++++	30.33	ab
完全黑暗	42.2	c	++++	12.78	b
2 h 紫外灯后黑暗	45.6	a	++++	30.33	ab
2 h 紫外灯后日光灯	45.5	a	++++	22.67	ab

多。2 h 紫外线处理对菌落生长和产孢无抑制作用。

2.4 不同碳源、氮源对镰刀菌生长和产孢的影响

2.4.1 碳源的影响 镰刀菌除对甘露醇利用较差外, 对其余的供试碳源都能较好利用, 其中以糊精为最好, 差异显著, 甘露醇菌落直径最小。D-半乳糖的产孢量最大, 而 α -乳糖产孢量最少(表 3)。

2.4.2 氮源的影响 在 10 种供试氮源中, 镰刀菌都能生长。对 DL-甲硫氨酸利用较差, 菌落直径最小, 菌丝生长较稀, 不茁壮, 而且几乎不产孢。在其余供试氮源中, 以硝酸钠菌落直径最大, 菌丝生长旺盛, 与其他相比差异显著; DL-丙氨酸和 L- α -丙氨酸产孢量最大, 彼此无显著差异。供试无机氮源和大部分的供试有机氮源相比较, 菌丝生长较稀, 不茁壮, 而且产孢量较少(表 4)。

3 讨论

镰刀菌在 20~37℃ 下均能生长, 最适温度为 25℃。温度过低, 该菌的生长及产孢缓慢甚至受到抑制, 而温度过高对该菌也产生影响。在本实验提供的温度范围外的条件下, 其生长情况有待于进一步补充。

镰刀菌对 pH 值的适应范围很宽, pH 值 5.5~7.5 生长较好, pH 值 5.5 最适, pH 值 4.5~6.0 产孢量较多。但 pH 值太高或者太低对该菌的生长和产孢都有一定的抑制作用。

光照对镰刀菌生长有一定影响, 黑暗、连续日光灯照射(24 h)和黑暗与日光灯(14 h)交替对菌落生长影响差异不显著。但本实验中 2 h 紫外线照射对菌的生长无抑制影响, 可能与时间和辐射量有关, 有待于进一步研究。

镰刀菌可以利用多种碳源和氮源生长并产孢, 营养来源广泛。有利于该菌生长和产孢的碳源是糊精、麦芽糖等; D-半乳糖产孢量最大, 葡萄糖、 α -乳糖产孢量最少。在所有供试氮源中对 DL-甲硫氨酸利用较差, 几乎不产孢; 产孢量以 DL-丙氨酸、L- α -丙氨酸产孢量最大, 彼此无显著差异。供试无机氮源与大部分有机氮源相比较, 菌丝生长较差, 而且产孢量较少。由于供试无机氮源种类较少, 此现象是否具有普遍性还要更深入研究。不同碳源、氮源的影响有所差别, 因此在培养时要有选择。

本实验对从银杏中筛选到一产香内生真菌的研究将有助于森林资源合理广泛的利用。

参考文献:

- [1] 周成, 邵华. 植物内生真菌研究的应用潜力分析[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 14(2): 69-73.
- [2] 张玲琪. 发酵产萜烯酮真菌的分离及产香特性的初步研究[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 49-54.
- [3] 彭彦华. 微生物法产生烟用香料研究[D]. 昆明: 云南大学, 2001.
- [4] 许平. 产香微生物技术研究[D]. 济南: 山东大学, 2002.
- [5] 赖传雅, 赖传碧, 曾凡家, 等. 茶扦插苗根腐性苗枯病菌腐皮镰孢生物学特性研究[J]. 植物病理学报, 2002, 32(1): 79-83.
- [6] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148-152.
- [7] 王辉, 杨志荣. 蛭孢菌的生长和产孢研究[J]. 菌物系统, 2000, 15(2): 134-138.
- [8] 张玲琪, 孙晓鹏, 娄家凤. 对鸢尾新鲜根状茎发酵生香的微生物研究[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1997, 19(4): 362-365.

表 3 碳源对菌生长和产孢的影响

Table 3 Effects of carbon sources on the growth and sporulation of *Fusarium* sp. GI024 at 25 °C

碳源	菌落直径/mm	显著性	菌丝体生长	每视野孢子数/个	显著性
糊精	29.0	a	++	23.13	ab
α -乳糖	28.1	b	++	15.25	d
麦芽糖	27.8	b	+++	20.42	abc
三梨醇	26.5	c	+++	16.83	cd
葡萄糖	26.3	c	++++	15.58	d
蔗糖	26.1	c	++++	19.25	bcd
D-半乳糖	26.0	c	+++	25.75	a
D-(+)木糖	24.9	d	++++	23.25	ab
甜醇	24.8	d	+++	22.33	abc
甘露醇	23.6	d	+++	20.50	abcd

说明: ++++ 示菌落生长好; +++ 示居中; ++ 示菌落生长差, 下同

表 4 氮源对菌生长和产孢的影响

Table 4 Effects of nitrogen sources on the growth and sporulation of *Fusarium* sp. GI024 at 25 °C

氮源	菌落直径/mm	显著性	菌丝体生长	每视野孢子数/个	显著性
硝酸钠	31.8	a	++	6.07	bcd
DL-丙氨酸	28.8	b	++++	24.50	a
L-赖氨酸	27.7	bc	+++	9.25	e
L-谷氨酸	27.2	bcd	++++	19.42	bc
L- α -丙氨酸	27.1	cbd	+++	20.00	ab
L-胱氨酸	25.7	cd	+++	11.00	de
硝酸铵	25.7	cd	+++	14.33	cde
硫酸铵	25.1	de	+++	15.92	bcd
草酸铵	23.3	ef	++	9.25	e
DL-甲硫氨酸	21.6	f	++	1.50	f

- [9] 罗毅, 刘锋. 镰刀菌培养物中代谢产物的鉴定与定量分析[J]. 质谱学报, 1994, 16(4): 54-58.
- [10] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane producing by *Taxomyces andreanae* an endophytic fungus of pacific yew [J]. *Science* 1993, 260(9): 214-216.
- [11] Herd S, Christensen M J, Saunders K, et al. Quantitative assessment of in planta distribution of metabolic activity and gene expression of an endophytic fungus [J]. *Microbiology*, 1997, 143: 267-270.
- [12] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究进展[J]. 植物学报, 2001, 43(1): 881-892.
- [13] Merritt S, David E, Wilford H, et al. An endophytic *Gliocladium* sp. of *Eurythia cordifolia* producing selective volatile antimicrobial compounds [J]. *Plant Sci*, 2003, 165(4): 913-922.
- [14] Gutierrez-Zamora M L, Martine-Romero E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.) [J]. *J Biotechnol*, 2001, 91(3): 117-126.

Biological characteristics of endophytic fungus *Fusarium* sp. GI024 from *Ginkgo biloba*

JIANG Ji-hong, CHEN Feng-mei, CAO Xiao-ying, SUN Yong, ZHU Hong-mei

(Xuzhou Normal University, Key Laboratory of Biotechnology for Medicine Plant of Jiangsu Province, Xuzhou 221116 Jiangsu, China)

Abstract: *Fusarium* sp. GI024 could grow at temperature between 20—37 °C, with the optimal growth at 25 °C, while it could not grow at 4 °C. The fungus could fit a wide pH value range. Conidia germinated well between pH 5.5—7.5, with the optimal growth at pH 5.5 and between pH 4.0—7.5 was the best range for sporulation. Treatments of darkness or with daylight lamp or darkness with alternative daylight lamp did not show significant effects on the mycelium growth of the fungus. The treatment of ultraviolet light had no significant reduction on mycelium growth. When cultured in artificial media, the fungus could utilize monosaccharids as well as alcohols as carbon sources and many kinds of inorganic and organic nitrogen. The proper nitrogen for the growth and sporulation were dextrine, maltose, DL-alanine and L- α -alanine. [Ch, 4 tab. 14 ref.]

Key words: *Fusarium* sp.; biological characteristics; nutrition conditions

更 正

本刊2004年第21卷第2期《杉木积成材浸渍纸贴面工艺的初步研究》一文中的“基本密度”应为“密度”。特向作者、读者致歉。

浙江林学院学报编辑部