

拮抗真菌—桃色顶孢霉生物学特性研究

孙冬梅,董雪梅,王北艳,林志伟,肖翠红

(黑龙江八一农垦大学,黑龙江 大庆 163319)

摘要:为了更好的将拮抗真菌——桃色顶孢霉应用于实践,对其生物学特性进行了研究。结果表明:以察氏为基本培养基,该菌的最佳碳源为蔗糖,最佳氮源为胰蛋白胨,最适 pH8.5,最适温度为 30℃,添加无机离子 Zn^{2+} 对菌丝生长有利。

关键词:拮抗真菌;桃色顶孢霉;生物学特性

中图分类号:S476+.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)11-0066-03

随着生活条件的改善与生态意识的加强,生物防治逐渐成为植物病害防治的研究热点。真菌次生代谢产物十分丰富,而且许多真菌代谢物对害虫和植物病原菌有抑制和杀灭作用,无疑在解决某些植物资源短缺和作为新的生物农药来源等方面具有十分重要的经济和生态效益^[1-4]。顶孢霉属(*Acronium*)被认为是一个无性型复系真菌属,含有约 117 个种,是多种生物活性物质的重要来源菌。我国目前在顶孢霉的应用上主要集中在医药和农药杀虫方面的研究^[5-7],然而在生物防治中对植物病原菌抑制作用的研究鲜见报道。黑龙江八一农垦大学在研究中获得了一株拮抗真菌桃色顶孢霉^[8-9],对其生物学特性的研究将为该菌株在生产上的进一步应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为桃色顶孢霉,保存于黑龙江八一农垦大学生命学院生物技术实验室。

1.2 方法

1.2.1 碳源对桃色顶孢霉菌丝生长的影响 以察氏培养基为基本培养基,分别称取 20 g 葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉、甘露糖和纤维素取代察氏培养基中的蔗糖,制成含不同碳源的培养基。将供试菌株用直径为 5 mm 的打孔器在同心圆环处打成菌碟并接入含不同碳源培养基的无菌培养皿中央位置,每处理重复 3 次。置于 28℃ 恒温箱中培养,培养第 3 天开始测量每组菌

丝生长直径,每隔 24 h 测量 1 次。计算 4~6 d 内该菌株的菌丝生长速率,具体计算公式为:生长速率($cm \cdot d^{-1}$) = $(D_n - D_3) / (n - 3)$ 。

1.2.2 氮源对桃色顶孢霉菌丝生长的影响 以察氏培养基为基本培养基,分别称取 3 g 尿素、硝酸钠、硫酸铵、蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨和酵母浸膏取代察氏培养基中的 $NaNO_3$,制成含不同氮源的培养基。具体处理方法同 1.2.1,计算不同氮源培养条件下该菌株的菌丝生长速率。

1.2.3 pH 对桃色顶孢霉菌丝生长的影响 以察氏培养基为基本培养基,培养基配制过程中,在加入琼脂之前,用 1 mol·L⁻¹ 盐酸及氢氧化钠溶液将培养液 pH 分别调至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、8.5 和 9.0,再加入琼脂粉,分装灭菌(121℃, 20 min),制成不同 pH 的培养基。具体处理方法同 1.2.1,计算不同 pH 条件下该菌株的菌丝生长速率。

1.2.4 培养温度对桃色顶孢霉菌丝生长的影响

配制足量的察氏培养基,分装灭菌(121℃, 20 min)后,在超净工作台内倒入培养皿内,每皿 15~20 mL,冷却后制成平板,将直径大小相同的供试菌株菌碟接在培养基中央,分别置于培养温度为 25、28、30、32 和 35℃ 的恒温箱中培养,在培养第 6 天开始测量每组菌丝生长直径,每隔 24 h 测量 1 次。计算 6~9 d 内不同温度培养条件下该菌株的菌丝生长速率。

1.2.5 无机离子对桃色顶孢霉菌丝生长的影响

以察氏培养基为基本培养基,分别添加 0.01 g $MnSO_4$ 、 $CuSO_4$ 和 $ZnSO_4$ 制成含不同无机离子的培养基,将各培养基分别制成平板,将大小相同的供试菌株菌碟接在培养基中央位置,以不添加无机离子的培养基作对照,计算 6~9 d 内不同无机离子培养条件下该菌株的菌丝生长速率。

收稿日期:2014-09-15

基金项目:黑龙江省教育厅科研资助项目(面上)(12511361);黑龙江省高校科技创新团队资助项目(2012TD)

第一作者简介:孙冬梅(1970-),女,黑龙江省北安市人,博士,教授,从事植物病害生物防治研究。E-mail:sdmlzw@163.com。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对桃色顶孢霉菌丝生长的影响

结果表明,该菌株在淀粉、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和甘露糖培养基中均可生长,其中以蔗糖为碳源时菌丝生长速率最高,可达 $0.34\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$,气生菌丝长势浓密,与其它 6 种碳源相比差异显

著,是一种较为理想的碳源;且同一碳源不同培养天数菌丝生长速率也存在差异,其中第 5 天和第 6 天的菌丝生长速率比较接近;桃色顶孢霉在以纤维素为碳源的培养基中菌丝生长速率为 0,说明菌株不能利用纤维素(见表 1)。

表 1 不同碳源营养条件下桃色顶孢霉菌丝生长速率

碳源 Carbon sources	生长速率/ $\text{cm}\cdot\text{d}^{-1}$ Growth rate				长势 Growth condition
	第 4 天 The fourth day	第 5 天 The fifth day	第 6 天 The sixth day	平均 Mean	
淀粉 Starch	0.13	0.16	0.17	$0.15\pm0.00\text{ b}$	++
葡萄糖 Glucose	0.30	0.18	0.22	$0.23\pm0.03\text{ c}$	++
蔗糖 Sucrose	0.41	0.33	0.27	$0.34\pm0.01\text{ d}$	+++
麦芽糖 Maltose	0.22	0.28	0.20	$0.23\pm0.01\text{ c}$	++
乳糖 Lactose	0.22	0.23	0.17	$0.22\pm0.00\text{ c}$	+
甘露糖 Mannose	0.15	0.13	0.12	$0.13\pm0.01\text{ b}$	+
纤维素 Cellulose	0	0	0	$0\pm0.00\text{ a}$	—

注:“+++”:菌丝生长浓密;“++”:菌丝生长密;“+”:菌丝生长稀疏;“—”不长菌丝。同列不同字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note:“+++” was thick grown;“++” was close grown;“+” was thin grown;“—” was no hyphae. Different lowercases mean significant difference at 0.05 level. The same below.

2.2 不同氮源对桃色顶孢霉菌丝生长的影响

由表 2 看出,该菌株利用有机氮的能力优于无机氮,且菌丝长势浓密,其中以胰蛋白胨为氮源时菌丝生长速率最高,可达 $0.39\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$,与其它氮源相比菌丝生长速率差异显著;且培养第 7 天

菌丝生长速率与第 5、第 6 天的相比较低,无机氮源中,该菌株对 NaNO_3 的利用能力强于 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,尿素为氮源时菌丝生长速率最低,仅为 $0.12\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

表 2 不同氮源条件下桃色顶孢霉菌丝生长速率

氮源 Nitrogen sources	生长速率/ $\text{cm}\cdot\text{d}^{-1}$ Growth rate				长势 Growth condition
	第 5 天 The fifth day	第 6 天 The sixth day	第 7 天 The seventh day	平均 Mean	
尿素 Urea	0.13	0.12	0.12	$0.12\pm0.01\text{ a}$	+
NaNO_3	0.16	0.15	0.17	$0.16\pm0.01\text{ a}$	++
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.15	0.15	0.07	$0.12\pm0.02\text{ a}$	+
蛋白胨 Peptone	0.25	0.25	0.27	$0.26\pm0.01\text{ b}$	+++
大豆蛋白胨 Soy peptone	0.23	0.23	0.23	$0.23\pm0.01\text{ b}$	+++
胰蛋白胨 Tryptone	0.43	0.43	0.31	$0.39\pm0.01\text{ c}$	+++
酵母浸膏 Yeast extract	0.22	0.21	0.24	$0.22\pm0.01\text{ b}$	+++

2.3 不同 pH 对桃色顶孢霉菌丝生长的影响

从表 3 看出,pH 为 8.5 时菌丝生长速率最高,达 $0.31\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$,与其它 pH 处理下的菌丝生长速率相比差异显著,且培养不同天数的菌丝生长速率亦出现差异,因而在计量中可以适当筛选培养天数。从测定结果可知,该菌株在 pH7.0~

9.0 的培养基上菌丝生长情况较好,而 $\text{pH}<7.0$ 时,菌丝生长明显受到抑制,菌丝生长速率较低,且只长基内菌丝,不长气生菌丝,最低生长速率仅为 $0.07\text{ cm}\cdot\text{d}^{-1}$,因此菌株在弱碱条件下生长优于酸性条件。

表 3 不同 pH 条件下桃色顶孢霉菌丝生长速率

Table 3 The colony diameter of *Acremonium persicinum* in different pH

pH	生长速率/cm·d ⁻¹ Growth rate				长势 Growth condition
	第 6 天 The sixth day	第 7 天 The seventh day	第 8 天 The eighth day	平均 Mean	
4.0	0.15	0.16	0.17	0.16±0.01 bc	—
5.0	0.12	0.12	0.11	0.12±0.01 b	—
6.0	0.06	0.06	0.09	0.07±0.01 a	—
7.0	0.20	0.18	0.20	0.19±0.01 c	+
8.0	0.26	0.27	0.28	0.27±0.01 de	++
8.5	0.27	0.31	0.33	0.31±0.01 e	+++
9.0	0.20	0.22	0.26	0.23±0.00 d	++

2.4 不同培养温度对桃色顶孢霉菌丝生长的影响

该菌株在室温条件即昼夜温度变化的条件下生长速率最低。在 25~32℃ 生长状态良好,而且在此温度范围内,随着温度升高菌丝生长速率表现为先增高后降低的趋势,在恒温 28℃ 和 30℃ 的

条件下生长速率较高,可达 0.30 cm·d⁻¹ 左右,与其它温度处理下的菌丝生长速率相比差异显著;且不同培养天数的菌丝生长速率也不完全相同。该菌株对温度的适应范围不广,当温度达到 35℃ 时,菌丝生长速率为零,表明高温可以抑制该菌株的生长(见表 4)。

表 4 不同培养温度条件下的桃色顶孢霉菌丝生长速率

Table 4 The colony growth rate of *Acremonium persicinum* in different temperature

温度/℃ Temperature	生长速率/cm·d ⁻¹ Growth rate					长势 Growth condition
	第 6 天 The sixth day	第 7 天 The seventh day	第 8 天 The eighth day	第 9 天 The ninth day	平均 Mean	
室温 Room temperature	0.05	0.18	0.15	0.10	0.12±0.01 b	—
25	0.27	0.23	0.23	0.25	0.24±0.01 c	—
28	0.30	0.35	0.20	0.35	0.30±0.01 d	—
30	0.35	0.18	0.25	0.38	0.29±0.01 d	+
32	0.20	0.23	0.15	0.38	0.24±0.01 c	++
35	0	0	0	0	0 aA	+++

2.5 无机离子对桃色顶孢霉菌丝生长的影响

由表 5 可知,与空白对照相比,添加 Mn²⁺ 对该菌株的生长速率有一定的抑制作用,添加 Cu²⁺ 和 Zn²⁺ 均能促进菌株的生长,其中 Zn²⁺ 对菌丝生长的促进作用较明显,生长速率最高可达

0.43 cm·d⁻¹; Cu²⁺ 在培养 7 d 时,菌丝生长速率较快,培养 8~9 d 时,菌丝生长速率比较接近。Cu²⁺ 与 Zn²⁺ 菌丝生长速率差异不显著,但显著高于 Mn²⁺ 和对照。

表 5 不同无机离子条件下桃色顶孢霉菌的菌丝生长速率

Table 5 The colony growth rate of *Acremonium persicinum* with different inorganic ions

无机离子 Inorganic ions	生长速率/cm·d ⁻¹ Growth rate					长势 Growth condition
	第 6 天 The sixth day	第 7 天 The seventh day	第 8 天 The eighth day	第 9 天 The ninth day	平均 Mean	
Mn ²⁺	0.22	0.20	0.28	0.32	0.26±0.01 a	++
Cu ²⁺	0.23	0.30	0.38	0.37	0.34±0.02 b	++
Zn ²⁺	0.38	0.28	0.38	0.43	0.36±0.02 b	++
CK	0.25	0.20	0.38	0.22	0.26±0.01 a	+

3 结论

通过对桃色顶孢霉菌的培养条件进行研究,发现培养基的最佳碳源为蔗糖,最佳氮源为胰蛋白胨,最适 pH 8.5,最适温度为 30℃,添加无机离子 Zn²⁺ 对菌丝生长有利。但大多文献均报道,真菌

生长最适合的 pH 为偏酸环境,研究表明桃色顶孢霉菌培养过程中应注意 pH 的影响;此外,有机氮源对该菌的生长也极为有利,为了更好地应用该菌株,这些都是需要特别关注的问题。