

菌核菌生长和产生草酸的营养和环境条件研究

刘胜毅 周必文 余琦 王超英

(中国农业科学院油料作物研究所, 湖北武昌 430062)

摘要 本研究探讨了培养基种类、酸碱度、温度对菌核菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 菌丝生长 (MG) 和草酸累积 (OA) 的影响及 MG 和 OA 之间的动态变化过程。正交试验中, 碳源为: 琥珀酸钠-葡萄糖、蔗糖-马铃薯汁液和蔗糖的三种培养基中, OA 量依次递减且差异显著。MG 和 OA 成负相关关系。培养基的 pH 值是影响 OA 的一个主要因子, 本试验中 pH6 最适合菌丝产草酸, 而 pH5 最适合菌丝生长。23℃ 下 OA 和 MG 大于 26℃ 下 OA 和 MG。OA 和 MG 的动态变化过程试验表明, 不同培养基的草酸累积速率和最终量差异显著。本文认为碳源种类或草酸前体物是影响 OA 的主要因子。

关键词 菌核菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*); 菌丝生长; 草酸累积; 营养和环境因子

植物病原菌核菌 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary] 的代谢物草酸参与致病已被许多试验所证实, 并且研究表明草酸的作用可能是多方面的^[1-3]。但是该菌产生草酸的营养代谢机理和环境条件却不很清楚。目前已知有许多菌都产生草酸, 对 *Sclerotium rolfsii* (白绢小菌核菌) 和 *Cristulariella pyramidalis* 的研究表明, 在不同的 pH 值中草酸累积 (OA) 和菌丝生长 (MG) 正相关, 草酸累积有一个适合的 pH 值^[4,5]。但在菌核菌中这些结果如何还不清楚。同一培养基中, OA 和 MG 的时间曲线呈正相关^[4,5], 并且 MG/OA 在各种碳源培养基上是定值^[5], 但菌核菌在不同碳源培养基上的关系如何还未见报道。试验已表明菌核菌的代谢物草酸液可代替病原菌菌体接种而用于抗性筛选, 但试验也表明用病菌代谢物处理植株后幼苗萎蔫除主要受草酸作用外还可能有未知因子的作用^[6]。本研究的目的是了解菌核菌在培养条件下生长和产生草酸的营养和环境条件, 寻找单位时间内产生最多草酸的适合条件。

材料和方法

(一) 材料

1. 供试菌核菌: 菌核菌来自中国农科院油料作物研究所试验田, 用 PDA 培养基在 23℃ 下培养菌丝, 菌丝纯化后备用。

2. 培养基: 四种培养基为 (每 100ml 含量): A₁: 20g 马铃薯, 20g 蔗糖。A₂: 20g 马铃薯, 20g 蔗糖, 2.5g KH₂PO₄, 1.25g MgSO₄·7H₂O。A₃: 10g KNO₃, 5g KH₂PO₄, 2.5g MgSO₄·7H₂O, 0.02g FeCl₃, 50g 蔗糖。A₄: 343.8mg MgSO₄·7H₂O, 149mg KCl, 1.00g NH₄NO₃, 680mg KH₂PO₄, 11.3mg ZnSO₄·7H₂O, 13.9mg MnSO₄·H₂O, 4.0mg FeCl₃, 4.2mg CuSO₄·5H₂O, 0.5g 酵母粉, 14.6g 葡萄糖, 15.1g (CH₂COONa)₂·6H₂O。

(二) 试验方法

1. 正交试验法: 采用正交试验设计表 L₁₆ (4³×2⁶) 安排四个因子。这四个因子为: 培养基 (A₁₋₄), 培养基的 pH 值 (B₁₋₄), 培养时间 (C₁₋₄), 培养温度 (D₁₋₂)。在正交表中选择没有交互作用重叠的 4 列, 把 A、B、C、D 四个因子各水平分别安排在这 4 列中, 从而形成如表 1 的 16 个处理组合。4 种 pH 值为 B₁ 为 pH3, B₂ 为 pH5, B₃ 为 pH6, B₄ 为 pH8。先将 200ml 的三角瓶装 100ml 液体培养基, 在 121℃ 下高压消毒 13 分钟, 冷却后接种 2 块直径 0.7cm 的菌丝琼脂块, 然后置 23℃ (D₁) 或 26℃ (D₂) 下恒温振荡培养。培养物分别在接种后 4、7、10、15 天取样测定。试验重复三次。

和 A₄ 两种培养基。每三角瓶 50ml 培养基, pH 均为 5.8, 在 121℃ 下高压消毒 13 分钟。冷却后接种一块直径 0.7cm 菌丝琼脂块, 然后置 23℃ 下恒温振荡培养。试验重复四次。

3. 草酸和菌丝测定: 培养后的菌丝用滤纸收集, 烘至恒重后称重, 用无菌丝琼脂块校正至净重。草酸按文献〔7〕方法, 先用 CaCl₂ 沉淀, 然后离心纯化, 最后用高锰酸钾法滴定以测定其量。

表1 正交试验设计 L₁₆ (4³×2⁶) 处理组合

组合号	因 素			
	A	B	C	D
1	1	1	1	1
2	1	2	2	1
3	1	3	3	2
4	1	4	4	2
5	2	1	2	2
6	2	2	1	2
7	2	3	4	1
8	2	4	3	1
9	3	1	3	1
10	3	2	4	1
11	3	3	1	2
12	3	4	2	2
13	4	1	4	2
14	4	2	3	2
15	4	3	2	1
16	4	4	1	1

“*”表中 A、B、C、D 因素下的 1、2、3、4 为各因素水平序号

结果和讨论

(一) 培养基种类对菌丝生长和草酸累积的影响

菌丝在不同的培养基中产生草酸的能力显著不同(表2)。以 A₄ 培养基产生草酸最多, A₃ 产生最少。培养基对菌丝生长也有显著的影响, 但与上述相反, A₄ 培养基中菌丝生长最差, A₃ 中生长量则最大。这种菌丝生长和草酸累积量的负相关关系可以解释为: 在适合的培养基上, 可利用的碳源量和菌丝生长量成正比例关系, 但

草酸的累积量不仅和碳源的数量有关而且和草酸的前体物(指代谢中相对较易转化成草酸的物质)数量有关。

(二) 培养基的酸碱度对 MG 和 OA 的影响

开始培养时的培养基 pH 值不同, MG 和 OA 显著不同。在 pH5 和 pH6 两种培养基中 MG 和 OA 显著大于 pH3 和 pH8 两种培养基中 MG 和 OA (表2)。但在这四种 pH 值中, 最适合 MG 的是 pH5, 而最适合 OA 的却是 pH6。上面谈到 A₄ 培养基中 OA 最大, 但当 pH 值调到 8 或 3 时, 同样 OA 量很少。因此, pH 值是影响 OA 和 MG 的一个主要因子。

在这四种培养基中, 最终 pH 值和草酸含量并不相一致。这可能是培养基的酸碱缓冲力不同所致。

(三) 温度对 MG 和 OA 的影响

23℃ 下的 OA 大于 26℃ 下的 OA, 但差异不显著。23℃ 下的 MG 显著大于 26℃ 下的 MG。我们以前结果表明, 在 PDA 上 23℃ 下培养该菌菌丝较好^{〔10〕}, 而国外研究者用 26℃ 结果较好^{〔4〕}。本结果亦表明在液体培养中 23℃ 优于 26℃。

(四) 影响 OA 和 MG 的主要因子及因子的优化组合

以因子水平的均值 (y_{ij} , 其中 i 为因子序号, j 为因子水平序号) 与总平均值的离差 ($y_{ij} - \bar{y}$) 作为因子的水平效应, 而以各因子的最大水平效应值和总平均值的和 $\Sigma (\bar{y} + (y_{ij} - \bar{y})_{max})$ 作为工程平均, 其对应的组合为优化组合, 工程平均即为优化组合的理论值。以每一因子的水平效应平方和 $\Sigma (y_{ij} - \bar{y})^2$ 来衡量因子的贡献大小。结果见表2。对 OA, 供试因子的优化组合为 A₄B₃D₁, 工程平均为 4.07m mol/L; 对 MG, 优化组合为 A₃B₂D₁, 工程平均为 346.8mg/瓶。在这三个因子中, 开始培养时的培养基 pH 值是影响 OA 和 MG 的主要因子。这些分析和以上结果是一致的。

表2 不同的培养基、酸碱度和温度对菌丝生长、草酸累积和最终 pH 值的影响

因子	草酸产量(m Mol/L.)			菌丝生长量(mg/瓶)			最终 pH	
	水平	均值 $y_{ij}^{(1)}$	因子水平效应 $(y_{ij}-\bar{y})$	水平	均值 y_{ij}	因子水平效应 $(y_{ij}-\bar{y})$	水平	均值 y_{ij}
培养基	A ₄	2.73a ⁽³⁾	0.84	A ₃	204.9 A ⁽³⁾	93.5	A ₄	5.0 a
	A ₂	2.21 ab	0.32	A ₂	83.0 B	-28.4	A ₃	4.8 ab
	A ₁	1.46 b	-0.43	A ₁	82.2 B	-29.2	A ₂	4.5 b
	A ₃	1.15 b	-0.74	A ₄	75.4 B	-36.0	A ₁	3.5 c
	Q ⁽²⁾		1.54	Q		11697.5		
酸碱度	B ₃	3.00 A	1.11	B ₂	216.1 A	104.7	B ₄	5.8 a
	B ₂	2.77 A	0.88	B ₃	106.2 B	-5.2	B ₃	4.6 b
	B ₄	1.08 B	-0.81	B ₁	83.3 B	-28.1	B ₂	4.2 c
	B ₁	0.70 B	-1.19	B ₄	39.9 B	-71.5	B ₁	3.1 d
	Q		4.08	Q		16891.0		
温度	D ₁	2.12 a	0.23	D ₁	148.8 A	37.2	D ₁	4.7 a
	D ₂	1.65 a	-0.24	D ₂	74.1 B	-37.3	D ₂	4.4 a
	Q		0.11	Q		2775.1		
总平均(\bar{y})	1.89			111.4			4.5	
优化组合	A ₄ B ₃ D ₁			A ₃ B ₂ D ₁				
工程均值	4.07			346.8				

注：(1) 培养基和酸碱度的水平均值为12个瓶的平均值，而温度的水平均值为24个瓶的平均值。(2) $Q = \sum (y_{ij} - \bar{y})^2$ (“i”表示因子，“j”表示因子的水平)代表因子对菌丝生长和草酸累积的贡献大小。(3) 数据后标有相同字母的为新复极差测验差异不显著。小写字母为5%显著水平，大写字母为1%显著水平

(五) MG 和 OA 的动态变化过程

在正交试验中，随着培养时间的延长，MG 和 OA 量都逐渐增加，pH 值下降。由于 MG 和 OA 与培养前的 pH 值存在相互作用，故在正交试验中不宜比较各培养基中 MG 和 OA 的动态变化过程(图1)。图1中看到从接种后第5天到第17天草酸累积率最大，这时菌丝生长也最快，到17天后草酸累积接近停止，菌丝生长缓慢。随着菌丝生长速度达到最快阶段，草酸累积率也随之达到最高，pH 值下降最快。到培养后期 pH 值反而稍有上升。本研究中草酸达到最大累积率的时间和早期报道⁽⁴⁾的不同，这可能与使用的菌源和单位体积内接种量不同有关。值得注意的是，在两种培养基中，菌丝最大生长量接近，但草酸累积量和累积率相差很大，A₁培养基中，OA 小于6m mol/L，而 A₄培养基中接近24m mol/L。这就是说 OA 和 MG 的时间曲线关系

在不同的培养基中是不同的，即菌丝生长和产生草酸所需的营养和酸碱条件是不同的。早期的研究表明 pH 值下降和有机酸累积率最大时，三羧酸循环酶的活性也最高⁽⁸⁾。比较这些结果，作者认为草酸最大累积率和三羧酸循环酶的最大活性期是同步的。

从目前的研究可以看出影响菌丝产生草酸的因素是复杂的。以往的研究认为培养基对酸碱的缓冲能力是影响 OA 的一个重要因子^(4,9)，但在生物体内它可能不是主要因子，而草酸前体物多少可能是影响 OA 的一个主要因子。在培养条件下，A₄培养基中琥珀酸钠很容易被菌丝体代谢成草酸，因此 OA 最多，而 A₃培养基中的碳源仅有蔗糖，因此 OA 最少。这里认为蔗糖不易代谢生成草酸。事实上蔗糖分解代谢有多种途径，并且这些途径中都要经过一系列的中间产物才到草酸。

参 考 文 献

1. Lumsden RD: *Phytopathology*, **69**: 890-896, 1979.
2. Tu JC: *Physiological plant pathology*, **26**: 111-117, 1975.
3. Hancock JG: *Plant physiology*, **49**: 358-364, 1972.
4. Maxwell DP et al.: *Phytopathology*, **60**: 1395-1398, 1970.
5. Kurian P et al.: *Phytopathology*, **69**: 712-714, 1979.
6. 周必文等: *中国油料*, **4**: 14-17, 1993.
7. Bateman DF et al.: *Phytopathology*, **55**: 204-211, 1965.
8. Wang SC et al: *Arch. Mikrobiol.*, **80**: 219-233, 1971.
9. Vega RR et al: *Mycologia*, **62**: 332-338, 1970.
10. 中国农业科学院油料作物研究所: *油菜菌核病*, 第100页, 农业出版社, 北京, 1979.

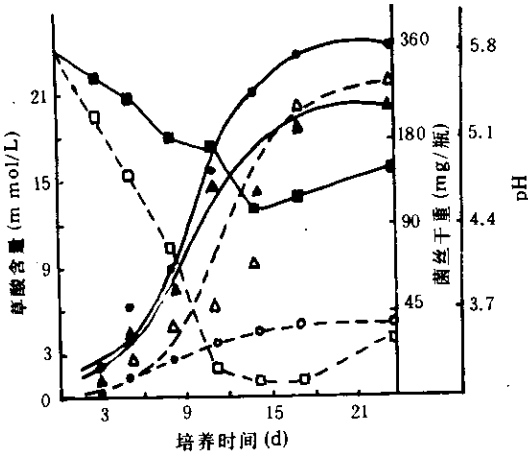


图1 两种培养基中菌丝生长和草酸累积的动态变化过程
 在A₁培养基中:---△---为菌丝生长线,---○---为草酸累积线,
 ---□---为pH变化线;在A₄培养基中:—▲—为菌丝生长线
 —●—为草酸累积线, —■—为pH变化线

(1991-08-24收稿)

NUTRITIONAL AND ENVIRONMENTAL FACTORS AFFECTING GROWTH OF *SCLEROTINIA SCLEROTIORUM* AND OXALIC ACID ACCUMULATION IN CULTURE

Liu Shengyi Zhou Biwen Yu Ji Wang Chaoying

(Institute of Oil Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062)

The effects of various media, pH, temperature and time course on mycelial growth (MG) of and oxalic acid accumulation (OA) by *Sclerotinia sclerotiorum* in the culture were studied. It was shown in an orthogonal experiment design ($L_{16}4^3 \times 2^6$) that OA were significantly different ($p < 0.05$) when glucose succinate, sucrose potato juice and sucrose were used as carbon source in the media. The medium containing glucose succinate was most effective for OA. However, MG was negative correlation with OA across different media. The initial pH values of media were a primary factor in regulating OA. Optimum pH for OA was 6, but optimum pH for MG was 5. OA and MG at 23°C were more than those at 26°C. In a separate study by using both the medium containing glucose succinate and the medium containing sucrose it was found the rate of OA and final amount of OA were significantly different ($p < 0.05$) between the two media. These results suggested that amount of precursor of oxalic acid (carbon source easily metabolized to oxalic acid is called as precursor of oxalic acid) was a main factor affecting OA.

Key words *Sclerotinia sclerotiorum*; Oxalic acid accumulation; Mycelial growth; Nutritional and Environmental Factors