

文章编号: 1001-1498(2010)01-0098-04

柏树火焰层孔菌菌丝体的液体培养

苏珏¹, 贺新生^{1*}, 郑林用²

(1. 西南科技大学生命科学与工程学院, 四川 绵阳 621010; 2. 四川农业科学院, 四川 成都 610000)

摘要: 柏树火焰层孔菌是柏树的病原菌物, 是中国和亚洲的新记录属中的新记录种。本文采用液体发酵的方法对菌丝体生长的营养条件等生物学特性进行了研究。结果表明, 柏树火焰层孔菌菌丝体生长最适碳源为淀粉, 最适氮源为麸皮, P、K、Mg 对其菌丝的生长具有促进作用, Fe、Zn 对其菌丝生长具有显著抑制作用。通过生长曲线试验得到 Logistic 方程: $y = 0.22 / (1 + 1.019 e^{-0.013x})$, 菌丝体干质量为 $0.22 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$ 。

关键词: 柏树火焰层孔菌; 液体培养; 菌丝体产量

中图分类号: S718.81 文献标识码: A

The Liquid Cultivation of the Mycelia of *Pyrofomes demidoffii*

SU Jue¹, HE Xin-sheng¹, ZHENG Lin-yong²

(1. School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan, China;
2. Sichuan Academy of Agricultural Science, Chengdu 610000, Sichuan, China)

Abstract: *Pyrofomes demidoffii* is a new recorded species of the new recorded genus in the China and Asia, and a pathogenic fungus of juniper. Adopting the liquid fermentation to study its biological characteristics such as vegetal nutrition condition of mycelia, the results indicated that the mycelia of *P. demidoffii* could be produced by liquid fermentation process. Starch and bran were the optimum carbon and nitrogen source, and P, K, Mg had the effect of acceleration to the growth of mycelia, Fe, Zn inhibited its growth. The growth curve of the logistic equation was deduced: $y = 0.22 / (1 + 1.019 e^{-0.013x})$, the weight of the dry mycelia was $0.22 \text{ g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$.

Key words: *Pyrofomes demidoffii*; liquid cultivation; mycelia yield

柏树火焰层孔菌 (*Pyrofomes demidoffii* (Lév.) Kotl. & Pouzar) 是刺柏 (*Juniperus formosana* Hayata) 上的一种病原菌, 是中国和亚洲的新记录属中的新记录种^[1-2], 分类学地位属菌物界 (Fungi), 担子菌门 (Basidiomycota), 伞菌纲 (Agaricomycetes), 多孔菌目 (Polyporales), 多孔菌科 (Polyporaceae), 火焰层孔菌属 (*Pyrofomes* Kotl. & Pouzar)^[1]。全球记载该属有 7 个种。柏树火焰层孔菌主要分布于中欧、非洲和北美, 该菌特异性地着生于刺柏属 (*Juniperus* L.) 树木, 造成树木的白色心材腐朽病, 英文病名为

white heart rot^[2-4]。

据报道^[5-6], 柏树火焰层孔菌曾使北美和欧洲地区大量的刺柏属树木感染而腐朽。典型的症状是受害树木的主干上活的部位长出病菌的子实体, 树干心材腐朽。受害木质部初变红褐色, 后出现白色斑点, 纵剖时, 呈白色花斑状腐朽。严重时使整个木材干枯。

笔者于 2006 年在四川卧龙大熊猫自然保护区采集到该菌的子实体, 分离得到了纯菌种, 经 Dai 和 He (2009) 鉴定为柏树火焰层孔菌^[2]。该菌的菌种

收稿日期: 2009-05-25

基金项目: 四川省科技厅平台建设“农业微生物菌种资源标准化整理、整合及共享服务”项目资助和“西南科技大学研究生创新基金”资助。

作者简介: 苏珏 (1985—), 女, 四川南充人, 植物学硕士点菌物学方向硕士研究生。E-mail: sujue6@163.com

* 通讯作者: 贺新生 (1965—), 男, 四川金堂人, 教授, 主要从事食用、药用蕈菌资源研究。E-mail: hexinsheng@swust.edu.cn

保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号 CGMCC NO: 1932。柏树火焰层孔菌是一种在我国新发现的林木病原菌^[7-11], 为探索该菌的生物学特性和防治方法, 本试验采用液体培养方法对柏树火焰层孔菌的菌丝体的生长特性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 供试菌种

野生子实体采集于卧龙大熊猫自然保护区 2 棵有 500 年以上树龄的刺柏 (*Juniperus formosana* Hayata) 树干上, 共生长了 10 多个子实体, 采集日期为 2006 年 8 月 23 日, 组织分离得到纯菌种。拉丁学名: *Pyrofomes demidoffii* (Lév.) Kotl. & Pouzar, 中文名称: 柏树火焰层孔菌。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基 PDA 培养基。

1.2.2 种子培养基 PDA 培养基去掉琼脂, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.46 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2.3 液体发酵基础培养基 葡萄糖 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, K_2HPO_4 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 $0.46 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 方法

1.3.1 菌种活化 将保存的菌种接种到斜面培养基上, 于 25°C 下培养 8 天。

1.3.2 种子液制备 取活化菌种 1 cm^2 左右接入装有 150 mL 种子液培养基的 250 mL 输液瓶中, 于 25°C 、 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下培养 10 天。

1.3.3 摇瓶培养

1.3.3.1 C 源对菌丝体生长情况的影响 用 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的蛋白胨为 N 源, 分别用葡萄糖、蔗糖、果糖、淀粉、乳糖、木糖、甘露醇、山梨醇、纤维素钠、木质素作 C 源, 用量均为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 重复 3 次。250 mL 输液瓶装 100 mL 液体培养基, 等量接种, 置旋转式摇床 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 25°C 振荡培养 10 天(下同)。

1.3.3.2 N 源对菌丝体生长情况的影响 用 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖为 C 源, 分别用蛋白胨 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母浸膏 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硝酸钾 $3.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硝酸铵 $1.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、氯化铵 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硫酸铵 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、尿素 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、干酪素 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、麸皮 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、玉米粉 $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、米糠 $75 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作 N 源, 重复 3 次。

1.3.3.3 无机盐对菌丝体生长情况的影响 用 2 g

$\cdot \text{L}^{-1}$ 的蛋白胨为 N 源, $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖为 C 源, 分别设置硫酸镁、硫酸铁、硫酸锌、硫酸钙、硫酸钾、磷酸二氢钠 6 个处理, 用量均为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 重复 3 次。

1.3.4 生长曲线实验 用基础培养基, 装液量为 100 mL, 灭菌接种, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 25°C 振荡培养, 每 24 h 测菌体干质量, 重复 3 次。

1.4 测定与观察

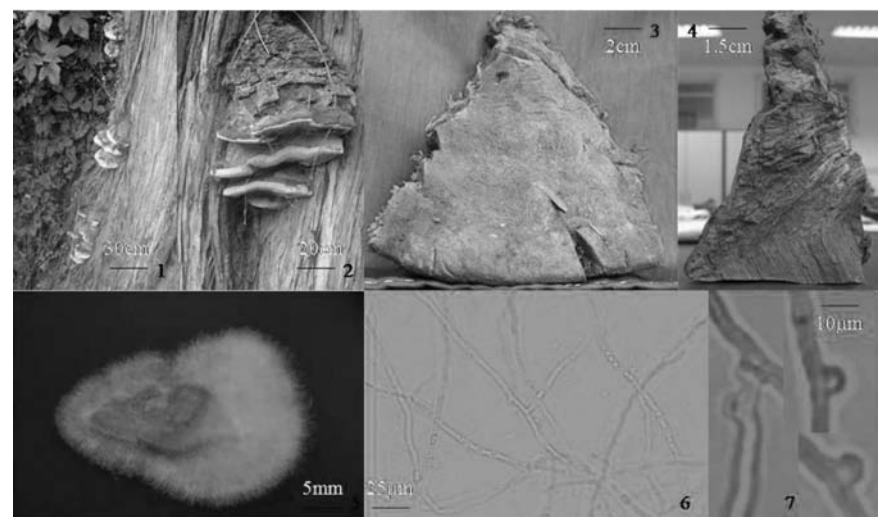
测定菌丝体干质量。收取的发酵液用双层纱布过滤得菌丝球, 用蒸馏水冲洗 2 次后于 80°C 下烘干达恒质量, 以每 100 mL 发酵液中菌丝体干质量 ($\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) 计。

观察菌丝球形态和数量, 显微镜检查、剔除污染。

2 结果与分析

2.1 子实体及菌落特征

如图 1 所示, 柏树火焰层孔菌子实体群生、单生、迭生于活的柏树树干表面, 多年生。单个菌盖 $10 \sim 20 \times 20 \sim 30 \times 10 \sim 20 \text{ cm}$, 半圆形或椭圆形, 表面黑褐色, 边缘黄色或黄褐色、黄白色, 有同心圆环带, 表面不均匀。菌肉黄褐色, 木质, $3 \sim 5$ 层, 横切面三角形, 厚度为 $5 \sim 10 \text{ cm}$ 。菌管多层, 长度 $10 \sim 15 \text{ cm}$, 黄褐色, 下表面黄色, 光滑无突起。菌孔密生, 椭圆形, $2 \sim 4 \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$ 。孢子印黄色。孢子近圆形、方椭圆形, 光滑, 黄色, 中有 1 液泡, $6.5 \sim 8.5 \times 4.5 \sim 5.5 \mu\text{m}$ 。菌丝体系统二型, 有锁状联合, 生殖菌丝直径 $2.5 \mu\text{m}$, 联络菌丝 $1.0 \sim 1.5 \mu\text{m}$ 。



1, 2. 寄生在柏树上的子实体; 3. 子实体下表面; 4. 子实体横切面;
5. 菌落; 6. 菌丝; 7. 锁状联合

图 1 柏树火焰层孔菌子实体和菌丝体形态

柏树火焰层孔菌菌丝体在 PDA 培养基上生长十分缓慢, 生长速度为 $2 \sim 3 \text{ mm} \cdot \text{d}^{-1}$, 在松针蛋白胨葡萄糖酵母粉培养基上生长速度为 $3 \sim 4 \text{ mm} \cdot$

d^{-1} 。菌丝初期黄白色,致密,后分泌黄褐色色素,培养基颜色变深,菌落圆形,边缘不整齐,气生菌丝不发达,菌丝体贴在培养基表面生长。

2.2 C源对菌丝体生长情况的影响

试验结果如表 1,方差分析得到 $F=12.6440$, $P=0.0001$,差异极显著,表明菌丝体在不同 C 源条件下培养,菌丝产量有显著变化。菌丝体在淀粉中长势最好,其次分别是葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露醇、木糖、木质素、山梨醇、乳糖,最差的是纤维素钠。

表 1 不同 C 源对菌丝体生长情况的影响

菌丝	葡萄糖	蔗糖	果糖	淀粉	乳糖	木糖	甘露醇	山梨醇	纤维素钠	木质素
菌丝体产量/(g·100 mL ⁻¹)	0.21	0.17	0.19	0.31	0.11	0.15	0.16	0.13	0.10	0.15
菌丝球直径/mm	6	4	5	9	3	6	5	5	4	4
菌丝球密度/(个·瓶 ⁻¹)	20	23	12	30	33	8	25	10	11	20

表 2 不同 N 源对菌丝体生长情况的影响

菌丝	蛋白胨	酵母膏	硝酸钾	硝酸铵	硫酸铵	氯化铵	干酪素	玉米粉	麸皮	米糠	尿素
菌丝体产量/(g·100 mL ⁻¹)	0.21	0.14	0.16	0.19	0.20	0.13	0.29	0.20	0.47	0.43	0.40
菌丝球直径/mm	6	5	8	6	6	5	4	8	12	12	10
菌丝球密度/(个·瓶 ⁻¹)	20	6	5	7	10	6	49	15	13	15	11

2.4 无机盐对菌丝体生长情况的影响

结果如表 3,方差分析得到, $F=94.00$, $P=0.0001$,差异极显著,表明菌丝体在不同无机盐条

2.3 N源对菌丝体生长情况的影响

结果如表 2,方差分析得到 $F=20.75$, $P=0.0001$,差异极显著,表明菌丝体在不同 N 源条件下培养,菌丝产量有显著变化。柏树火焰层孔菌在各种氮源中均能生长,在麸皮中长势最好,其次分别是米糠、尿素、干酪素、蛋白胨、玉米粉、硫酸铵、硝酸铵、硝酸钾和酵母膏。在天然培养基中的生长普遍比非天然培养基好。菌丝球的直径在麸皮和米糠中最大,菌丝球的个数在干酪素中最多。

件下培养,菌丝产量有显著变化。 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 对柏树火焰层孔菌的生长具有抑制作用。P、K、Mg 元素对菌丝体的生长均有较好的促进作用。

表 3 不同无机盐对菌丝体生长情况的影响

无机盐种类	硫酸镁	硫酸铁	硫酸钙	硫酸锌	硫酸钾	磷酸二氢钠
菌丝体产量/(g·100 mL ⁻¹)	0.17	0	0.12	0	0.18	0.25
菌丝球直径/mm	4	0	6	0	5	5
菌丝球密度/(个·瓶 ⁻¹)	16	0	4	0	8	20

2.5 生长曲线实验

结果如图 2,菌丝体生长动态关系符合 Logistic 方程,柏树火焰层孔菌的生长曲线方程: $y=0.22/(1+1.019e^{-0.013x})$ 。式中, y 为菌丝体质量(g·100 mL⁻¹); x 为生长天数。从图中可看出,柏树火焰层孔菌液体发酵培养大致经历 4 个阶段。前 4 天菌丝生长速率缓慢,基本处于代谢调控状态;第 4—10 天,菌丝生长速度大大增加,处于对数生长期;第 11—14 天,菌丝的合成代谢和分解代谢基本相等,菌丝的产量处于稳定期;第 15 天后,菌丝产量开始减少,进入衰老期。因此,菌丝在第 11—14 天停止发酵最经济。

3 小结与讨论

结果表明,柏树火焰层孔菌可以通过液体发酵

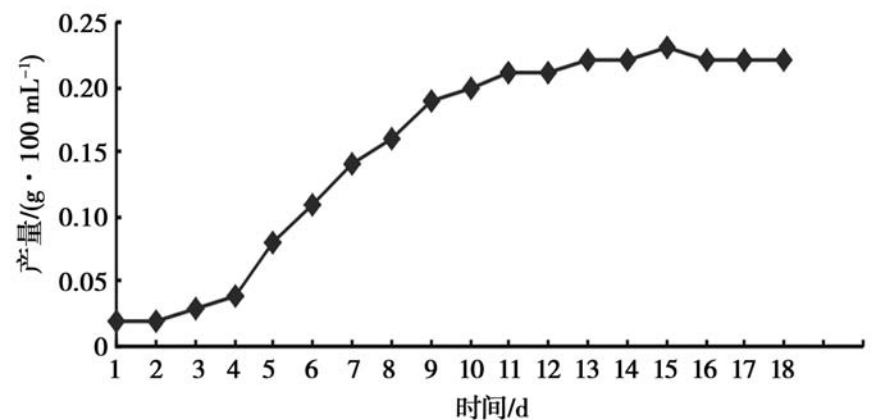


图 2 柏树火焰层孔菌菌丝生长曲线图

的方式获得菌丝。淀粉是长势最好的 C 源,麸皮是最廉价高产的 N 源, P、K、Mg 对其菌丝体的生长均有较好的促进作用, Fe、Zn 对其菌丝生长具有显著抑制作用。柏树火焰层孔菌的生长曲线方程为: $y=0.22/(1+1.019e^{-0.013x})$, 发酵终点是 11—14 天,菌丝产量为 0.22 g·100 mL⁻¹。为进一步探讨柏树

火焰层孔菌的生物学特性, 还需对转速、温度、pH 值、装瓶体积、接种量等培养条件进行研究。试验结果表明, Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 及重金属离子等对该菌菌丝体生长具有显著的抑制作用, 对该菌的防治可以选择含 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 及重金属离子的农药, 配制成液体对感病部位进行处理, 以杀灭子实体和菌丝体, 具体的防治效果还在进行研究。

参考文献:

- [1] Kirk P M, Cannon P F, Minter D W, et al. Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi [M]. 10th ed. London: CABI Bioscience, CAB International, 2008
- [2] Dai Y C, He X S. *Pyrofores demidoffii* newly reported to cause a white trunk rot of juniper (*Juniperus formosana*) in China [J]. Plant Pathology, 2009, 58: 796
- [3] Dai Y C, Cui B K. Pathogenic wood-decaying fungi in China [J]. Forest Pathology, 2007, 37: 105 - 120
- [4] Rywarden L, Gilbertson R L. European polypores 2 [J]. Synopsis Fungorum, 1994, 7: 394 - 743
- [5] Schapf R F. Diseases of pacific coast conifers, Albany, OR, USA [R]. U. S. Forest Service, Pacific Southwest Research Station, 1993
- [6] Zakaullah. Decay in the Ziarat juniper forests of Baluchistan [J]. Pakistan Journal of Forestry, 1978, 28: 28 - 34
- [7] 戴玉成. 中国林木病原腐朽菌图志 [M]. 北京: 科学出版社, 2005
- [8] 余长军, 黄明远, 戴玉成. 中国木腐菌两种新记录种 [J]. 林业科学研究, 2006, 19(4): 484 - 487
- [9] 崔宝凯, 孙向前, 陈建新, 等. 浙江天目山两种新的阔叶树心材腐朽病 [J]. 林业科学研究, 2007, 20(1): 97 - 100
- [10] 戴玉成, 范少辉, 魏玉莲, 等. 中国东北杨树上的木腐菌 [J]. 林业科学研究, 2003, 16(1): 13 - 18
- [11] 徐梅卿, 何平勋. 中国木本植物病原总汇 [M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2008