

EPA 高产菌的繁殖体诱导条件初探*

董宏平 袁 生

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

摘要: 研究了诱导介质、处理时间及温度等因素对高产 EPA、AA 等多不饱和脂肪酸的菌株——轮梗霉 (*Diasporangium* sp.) 产游动孢子能力的影响。结果表明: 胡萝卜片介质上、25℃诱导 6d, 可得到最大数量的孢子, 同一条件下游动孢子量则在第 8d 达到最高。进一步探讨孢子的萌发条件发现: 25℃、营养琼脂上孢子的萌发率最高。

关键词: EPA, AA, 轮梗霉, 游动孢子

中图分类号: Q 939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2001) 06-0015-04

STUDY ON INDUCATION CONDITIONS FOR THE PROPAGULUM OF THE EPA AND AA-PRODUCING FUNGUS *DIASPORANGIUM* SP.

DONG Hong-Ping YUAN Sheng

(Faculty of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract: It was investigated that the effect of various inducing mediums, times and temperatures on the number of the zoospores from *Diasporangium* sp. producing polyunsaturated fatty acid of Eicosapentaenoic acid (EPA) and Arachidonic acid (AA). The results showed that the zoospores were detected in various liquid mediums after 1 day, They were globose and about 23.9 μm in diameter. And maximum number of spores was obtained 6 days after translocation of mycelium to carrot patches at 25℃. But the number of the zoospores was the most 8 days at the same condition. The highest germination rate of the fungus was obtained in the vegetative agar.

Key words: EPA, AA, *Diasporangium* sp., Zoospore

本实验室自淡水中分离到的一株能高产二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA)、二十碳四烯酸 (Arachidonic acid, AA) 等多不饱和脂肪酸的菌株——轮梗霉 (*Diasporangium* sp.)^[1], 是一种水生的低等真菌, 研究发现该菌株在传种接代过程中, 形态特征不太稳定, 而且经菌丝连续传代数次以后, EPA、AA 产量亦有所下降。真菌的孢子一般是单核的, 利用孢子传代, 可有效地防止菌种衰退^[2], 同时孢子也是真菌进行诱变育种的基本单位^[3]。目前国内外对轮梗霉的研究几乎还没有涉足, 相关资料也极为贫乏, 本文就此作初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 轮梗霉系本实验室分离纯化并保藏。

1.1.2 诱导介质: DS 溶液—— K_2HPO_4 、 KH_2PO_4 、 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 、 CaCl_2 、 MgCl_2 各 50mmol/L; 胡萝卜片及相应的培养液—— $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 各 150mg, KCl 60 μg , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 400mg, 去离子水 1000mL; 马铃薯片, 其所用培养液同上述胡萝卜片中的溶液。

* 江苏省青年基金重点资助项目 (No. BG96025)

收稿日期: 2000-09-14, 修回日期: 2000-11-09

1.1.3 培养基:无机盐琼脂培养基^[5]、营养琼脂培养基以及马铃薯培养基(PDA)、1/2 PDA、1/3PDA、1/4PDA、1/5PDA等。

1.2 方法

1.2.1 诱导条件:于不同诱导介质和温度下诱导不同的时间,所选择的诱导介质见1.1.2温度为4℃、室温(10℃左右)、25℃;时间为1d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d。

1.2.2 诱导方法^[4]:将培养5d的菌丝体切成1cm²左右的小方块,无菌水清洗后,置于不同植物组织上(植物组织放在其相应的培养液中)或直接放在10mL DS溶液中,不同温度下诱导并进行光照,每天更换培养液1~2次,以无菌水作空白对照。血球计数板计溶液中的孢子数,每种组合重复3次,每次重复计数1次。

1.2.3 孢子的萌发:将获得的孢悬液稀释成10⁴个/mL,涂布于不同营养的培养基上,低温(4℃)预处理2~4h或直接放在25℃培养1~2d,计菌落数。

2 结果与分析

2.1 孢子形态与大小

将菌丝体连同培养基切成小块转移到不同诱导介质中,以1d为计时单位开始观察计数。1d后显微镜下即可见许多形态大小比较均一、球形的、壁比较厚的游动的或静止的孢子,其孢子直径约为 2.39×10^{-3} cm。

2.2 诱导条件对孢子产生的影响

由诱导介质与温度及时间等组成的不同处理系统,诱导菌丝产生的孢子分别见以下各图。

图1显示了4℃时各介质中产生游动孢子的情况。从图中可见不同介质均能诱导产生一定数量的游动孢子,而且均是在第2d数量达到最大,其中以胡萝卜片诱导的效率最高。2d后急剧下降,游动孢子日趋减少。在此温度下,孢子(游动孢子+静止孢子)的产生情况基本同游动孢子:第2d产量达到顶峰,降幅最大出现在第3d。大体而言,胡萝卜片是该菌株较理想的生孢培养基,PDA虽是其良好的生长培养基,但似不利于孢子的产生。DS溶液诱导产孢效果与无菌水几乎没有差别,因此在以后的实验中,我们就没有另外无菌水的空白对照。

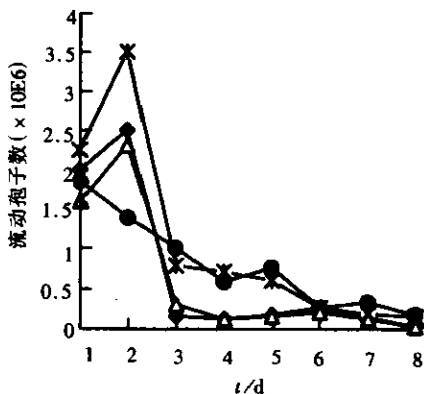


图1 4℃下游动孢子的产生情况

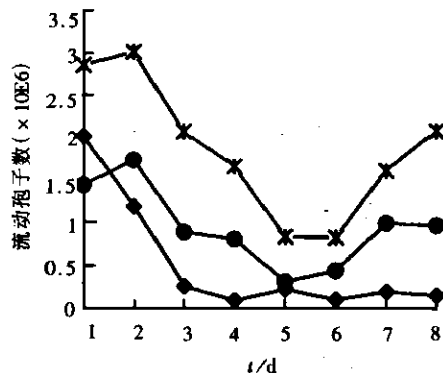


图2 RT下游动孢子的产生情况

◆ DS溶液, ★ 胡萝卜片, ● 马铃薯片, △ 无菌水 ◆ DS溶液, ★ 胡萝卜片, ● 马铃薯片

图 2 表明了在室温 (RT) 下, 游动孢子的变化情况。其变化过程虽较为复杂, 但整体上 (主指前 2d) 各介质产生游动孢子的数量不及 4℃ 时的产生量。不过, 同样也是以胡萝卜片诱导产生的孢子数量最多。2d 后, 若不提供任何营养基质, 游动孢子的产量将随时间的延长而不断的减少 (见 DS 溶液的变化曲线), 这比较容易理解。但在有营养供给的时候, 孢子在持续下降一段时间之后, 会再次回升。对此我们推测这可能是轮梗霉对不良环境的一种适应性表现: 该菌的适宜生长温度为 25℃ ~ 28℃, 实验伊始, 将其从 25℃ 的生长环境突然转移到约 10℃ 的室温下, 环境的不利变化, 会迫使它调整本来的生活习性: 处于营养生长阶段的菌丝停止生长或转入繁殖阶段, 已进入繁殖阶段的菌丝立即产生孢子, 以便度过这一非常时期。适者生存, 对环境的适应性又是生物体得以生存的基本条件, 因此若是长期处于这种环境中, 菌体本身也会逐渐适应当前环境, 而且若有营养供给, 亦能够缓慢生长。至此, 对于上述游动孢子的变化状态基本上就可以这样来解释: 在诱导的前 1~2d, 以部分转移的老龄菌丝产生孢子为主, 故溶液中能检测到相当数量的游动孢子; 之后则是以菌丝和少数孢子萌发形成的新生菌丝进行缓慢的营养生长为主, 在这一时间段, 溶液中的孢子数很少; 菌丝生长到一定阶段, 又开始分化形成繁殖体。因此在经历一个低谷之后, 游动孢子的数量重呈现上升趋势。诱导液中孢子总量的变化趋势与游动孢子类似, 后期也存在一回升阶段。

图 3 表示该菌株在其最佳生长温度范围内, 不同介质中产生孢子的情况。在此温度下, 各诱导液中孢子呈现完全不同的变化趋势。DS 介质因缺乏菌体所需的营养, 故产孢能力很差, 整体上呈下降趋势; 马铃薯块诱生孢子呈持续上升状态, 在第 6d 达到最大; 胡萝卜片诱导产生的孢子, 在 4d 以后才迅速增加, 同样在第 6d 达到高峰。

对这一现象我们解释为: 在适宜的环境下, 生物体能够正常完成其生活史即菌丝营养生长→分化产生孢子→孢子萌发, 形成菌丝体, 如此反复。上述被转移的菌丝中, 一部分进入了分化年龄的菌丝, 在遇到水环境之后, 便开始分化形成繁殖体。而另一部分菌丝以及后来由孢子萌发产生的新生菌丝继续在生长, 且随着其菌龄的增加, 也在不断分化形成无性孢子, 因此产生的孢子基本呈持续上升状态。实验后期, 由于营养基质逐渐消耗完毕, 受营养条件限制, 菌丝生长速度减慢甚至停止, 分化产生的孢子亦逐渐减少。

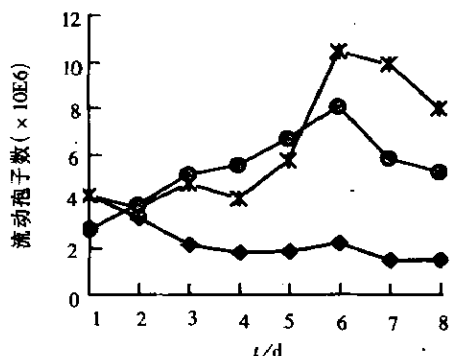


图 3 25℃下孢子的产生情况

◆ DS 溶液, ★ 胡萝卜片, ● 马铃薯片

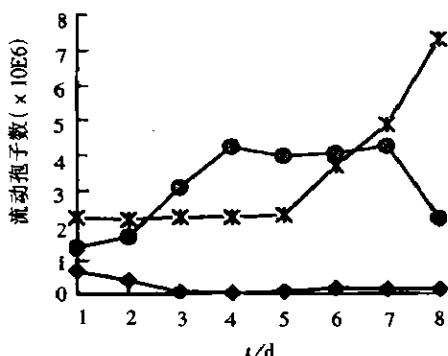


图 4 25℃下游动孢子的产生情况

◆ DS 溶液, ★ 胡萝卜片, ● 马铃薯片

图4说明游动孢子的产生情况表现出与孢子总数不同步的变化趋势(DS介质除外)DS介质诱导产游动孢子情况基本同孢子数,产生的量极少且始终呈下降状态。可见,在不提供任何营养的时候,25℃极不利于菌丝分化产生孢子。在马铃薯片的介质中,游动孢子的变化趋势是:持续上升→稳定不变→快速下降。胡萝卜片的介质上,则产生了与前者几乎完全相反的现象:实验前半周期游动孢子数量一直处于平稳状态,5d后才迅速上升。个中原因不清,有待我们进一步探讨。

2.3 培养基质对孢子萌发的影响

将获得的孢子稀释后涂布于不同营养的基质上,25℃培养,观察孢子萌发、生长、产生菌落的情况。12h后显微镜下即可见由孢子萌发产生的单根菌丝,1d后即发现在营养琼脂上出现了许多由单根菌丝滋生而来的稀薄的菌落;在不同营养的PDA上,孢子萌发生长情况基本一致,但不及营养琼脂培养基;在无机盐基质中的长势最弱。不同营养基质上,孢子萌发产生的菌落数见表1。

表1 营养基质对孢子萌发的影响

营养基质	营养琼脂	无机盐培养基	PDA	1/2PDA	1/3PDA	1/4PDA	1/5PDA
菌落数(个/mL)	3.25×10^4	0.65×10^4	1.7×10^4	1.5×10^4	1.15×10^4	1.8×10^4	1.45×10^4

注:以上结果是以35℃在胡萝卜基上诱导7d的孢子,稀释、涂布培养基,3次重复的平均值

3 讨论

轮梗霉是一种自水中分离到的低等真菌,属霜霉目腐霉科^[6]。经实验室长期驯化培养后,发现许多性状表现不稳定且开始衰退。如菌丝体长势不如从前,甚至有自溶现象,EPA的产量亦有所下降等。为尽量避免因菌丝接种而出现的不纯和衰退,试想用无性孢子进行菌种保藏。水生低等真菌产生孢子需要水环境,轮梗霉分化产生的孢囊梗不象腐霉科的其他成员,孢子囊垂直孢囊梗而生^[1],游动孢子在孢子囊内形成或释放原生质体在水中形成,也可直接以芽管萌发^[6]。由于对该菌的许多特性缺乏了解,因此本实验从诱导介质、温度和时间等不同角度对该菌的产孢能力进行了初步探讨。从实验结果看,诱导伊始(主指前2d),相同条件下,低温(4℃)似更有利于刺激无性孢子的产生,但随着时间的延长,尤其到了中后期,明显以25℃为最佳产孢温度,这可能主要与此温度适于菌体生长有关。因为随着时间的推移,被转移的老龄菌丝会逐渐死亡,此时诱导介质中若没有新一轮的菌丝来即时补充或新生的菌丝生长缓慢,那将势必影响后来的孢子数量,所以在进行长时间的诱导时,低温环境产生的孢子普遍极少,10℃的室温下因菌丝长势较慢,故产生的孢子数亦不及25℃的环境。实验中还发现诱导液中存在许多颜色很淡、静止的、形态大小不一的、球形的物质,推测这类物质可能是一些自菌体中分泌的脂肪微粒。

参考文献

- [1] 刘吉华,袁生,戴传超. 菌物系统, 2000, 19(3): 407~409.
- [2] 周德庆. 微生物学教程. 北京: 高等教育出版社, 1994, 272.
- [3] 章名春. 工业微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1984, 108.
- [4] 陈天寿. 微生物培养基的制造与应用. 北京: 中国农业出版社, 1995, 500~501.
- [5] 宾坦德, 沈崇尧. 菌物系统, 1997, 16(2): 157~162.
- [6] 余永年. 中国真菌志(第六卷). 北京: 科学出版社, 1998, 34, 54.