

营养和环境条件对日本曲霉化感作用的影响

曾任森, 骆世明, 石木标

(华南农业大学 热带亚热带生态研究所, 广东 广州 510642)

摘要: 在不同培养基、营养水平、温度、pH 条件下测定日本曲霉对高等植物化感作用强度, 结果表明: 日本曲霉在查氏和马丁氏等人工合成培养基上培养的发酵产物无化感作用, 而在马铃薯复合培养基、玉米和燕麦培养基等含有天然植物营养的培养基上培养的发酵产物均能产生化感作用, 抑制植物幼苗生长。当植物附近的营养增加时, 日本曲霉化感作用显著增强。温度是影响日本曲霉化感作用的一个重要条件, 在 20~25℃ 的条件下, 日本曲霉的化感作用最强, 30℃ 时, 该菌生长最快, 但对植物的化感作用大大减弱。15℃ 时, 该菌生长非常缓慢, 但比 30℃ 条件下产生的化感作用要强。可见, 日本曲霉的化感作用很大程度上取决于营养和环境条件。

关键词: 日本曲霉; 化感作用; 营养条件; 环境条件

中图分类号: Q948.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)01-0042-05

日本曲霉(*Aspergillus japonicus* Saito)是一种常见的土壤真菌, 也存在于禾谷类植物的种子表面^[1]。研究表明, 日本曲霉对高等植物具有化感作用^[2], 产生的主要化感物质黑麦酮酸 F 在 0.075 mmol/L 浓度下对油菜和三叶鬼针草幼苗根生长的抑制分别为 92.9% 和 77.5%, 产生的草酸和柠檬酸等有机酸也有化感作用^[2,3]。但日本曲霉在什么样的条件下对高等植物会产生化感作用还不清楚, 本文主要报道了营养和环境条件对该菌化感作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

在华南农业大学长岗山桉树林下采集土壤样品, 用稀释分离法获得微生物菌种日本曲霉(*Aspergillus japonicus* Saito)^[4]。

受体植物稗草(*Echinochloa crusgalli*)种子由南开大学元素有机化学研究所全国农药生物测定中心提供。萝卜(*Raphanus sativus*)和油菜(*Brassica campestris*)种子购于广东省农业科学院。

1.2 营养条件对日本曲霉化感作用的影响

1.2.1 固体培养基 微生物培养的固体培养基选用马丁氏和 PDA 培养基^[4]。每个 50 mL 的三角瓶装 10 mL 的固体培养基, 接种日本曲霉后 30℃ 恒温培养 9 d, 用 10 mL 水或丙酮抽提 6 h, 抽提物用细菌过滤器过滤, 水提液定容至 10 mL, 均分 2 份放在 50 mL 的烧杯中; 丙酮提取液均分为 2 份于 2 个烧杯中, 让丙酮挥发干, 加入 5 mL 蒸馏水, 放入种子进行生物测定。

1.2.2 液体培养基 选用的液体培养基有^[4,5]: 玉米粉培养基(CM)、复合马铃薯葡萄糖培养基(CPD)、燕麦培养基(OM)、马丁氏培养基(Martin)和查氏培养基(Czapek dox)。接种后 25℃ 恒温培养 6 d, 用细菌过滤器过滤菌丝, 发酵液用 MP-120 pH 计测定 pH 值, 对稀释 4 倍的发酵液以及该稀释液用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7 后的溶液进行生物测定, 若发酵液的 pH 值已经接近中性, 则不再调节发酵液的 pH 值。

1.2.3 不同无机盐和维生素 B₁ 所有 5 种配方中每 1 000 mL 中均含有 200 g 马铃薯煮出液, 20 g 葡萄糖, 20 g 玉米粉的浸提液(60~70℃ 水浴浸提 1 h)。培养基配方: (1) KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g; (2) KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, CaCO₃ 1.0 g; (3) KH₂PO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, K₂HPO₄ 0.5 g; (4) 用 NaOH 调节 pH 值至 8.0; 5) 维生素 B₁ 10 mg。培养基灭菌后均接种日本曲霉, 25℃ 培养 4 d, 过滤菌丝, 用稀释 4 倍的发酵液以及该稀释液用 NaOH 调节 pH 值至 7 后的溶液进行生物测定。

1.2.4 不同营养水平 在每个灭菌过的培养皿(d=10 cm)内垫上 1 张定性滤纸(d=11 cm)。将正常配制的马铃薯葡萄糖(PD)培养基分别稀释 10、5 和 2 倍 3 个浓度, 灭菌后每皿加入 10 mL 不同营养水平的 PD 培养基, 放入 20 粒种子, 并接种日本曲霉。对照每皿加入 10 mL 无菌水且不接种菌。25℃ 培养 4 d 后测量幼苗的根长和苗长。

1.3 环境条件对日本曲霉化感作用的影响

1.3.1 温度 分别在 15、20、25、30℃ 的恒温培养箱

收稿日期: 2002-05-10

作者简介: 曾任森(1965-), 男, 副教授, 博士。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39770136); 广东省自然科学基金资助项目(990682); 中科院鹤山丘陵综合试验站开

21994-2006 Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中用 PDA 培养日本曲霉。每个 50 mL 的三角瓶中装 10 mL 的培养基, 每个温度培养 12 瓶。培养 9 d 后每瓶加入 10 mL 的丙酮先提取 30 min, 倒出丙酮后合并 12 瓶的培养基和真菌, 加入 200 mL 丙酮再提取 36 h, 合并 2 次丙酮提取物, 过滤, 滤液减压浓缩至干, 用 60 mL 的蒸馏水溶解提取物, 测定该提取物对稗草和油菜种子萌发的影响, 测定其 5 倍稀释液对幼苗生长的影响。培养温度 25℃, 培养 36 h 后记录发芽率, 4 d 后记录幼苗的根长和苗长。

为比较不同溶剂提取物的活性, 将日本曲霉 25℃的培养物按上述同样的方法用水和丙酮提取, 对提取液的 10 倍稀释液及用 0.5 mmol/L NaOH 调节 pH 至 7 的溶液进行生物测定。

1.3.2 pH 值 PD 培养基的 5 倍稀释液用 1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 调节成不同的 pH 值, 按 1.2.4 的方法进行接种和生物测定, 受体为油菜。各种 pH 条件分别设置相应的对照, 即相同的 pH、营养和无菌条件, 但不接种日本曲霉。

1.4 生物测定和统计方法

采用“小杯法”测定物质的生物活性^[9]。用邓肯氏新复极差法测验不同处理的差异显著性。按 Wil-iamson^[7]方法计算化感作用响应指数(RI)。

2 结果与分析

2.1 营养条件对日本曲霉化感作用的影响

2.1.1 不同固体培养基的影响 用 PDA 和马丁氏固体培养基培养日本曲霉, 发现 PDA 培养基培养的日本曲霉无论是水提取物还是丙酮提取物, 对萝卜和稗草幼苗生长的抑制作用都很强(表 1), 对萝卜根和苗生长的抑制达到 100%, 对稗草根生长的抑制为 98%。而马丁氏培养基培养的无论是水提取物还是丙酮提取物, 抑制作用均显著低于 PDA 培养的提取物。对萝卜根生长的抑制作用分别为 59.1% 和 78.4%, 对萝卜苗生长的抑制作用分别为 66.7% 和 68.3%; 对稗草根生长的抑制作用分别为 58% 和 64%, 对稗草苗生长则完全失去抑制作用。说明在不同的营养基质中日本曲霉的化感作用会有不同的表现。

2.1.2 不同液体培养基的影响 不同液体培养基培养日本曲霉的发酵液对油菜和稗草幼苗生长的影响结果见表 2。

CPD、OM 两种培养基的发酵产物能完全抑制油菜的幼苗生长, 种子也不能萌发。CM 培养基的发酵产物使油菜的种子萌发率只有对照的 25%, 且萌发的种子其幼苗的根也完全不能生长, 苗长只有对照

表 1 不同营养培养的日本曲霉丙酮和水提取物对萝卜和稗草幼苗生长的影响¹⁾

Tab. 1 Effects of water and acetone extracts of <i>A. japonicus</i> cultured in different media on the seedling growth of radish and barnyardgrass						cm
培养基 culture media	提取溶剂 extraction solvents	萝卜 radish		稗草 barnyardgrass		
		I(根 root)	I(苗 shoot)	I(根 root)	I(苗 shoot)	
CK (non-extract)		8.8±3.6a	6.0±2.5a	5.0±1.7a	5.8±3.3a	
马丁氏 Martin	水 water	3.6±1.3b	2.0±1.4b	2.1±1.2b	4.6±3.8a	
	丙酮 acetone	1.9±1.0b	1.9±0.9b	1.8±0.5b	4.0±2.3a	
马铃薯 PDA	水 water	0c	0c	0.1±0.1c	1.2±0.3b	
	丙酮 acetone	0c	0c	0.1±0.1c	1.1±0.4b	

1) 同一列数字后的小写英文字母不同代表差异显著(α=0.05)

表 2 不同营养液体培养的日本曲霉发酵液对油菜和稗草幼苗生长的影响¹⁾

Tab. 2 Effects of the broth of <i>A. japonicus</i> cultured in different liquid media on the seedling growth of rape and barnyardgrass						cm
培养基 culture media	pH	油菜 rape		稗草 barnyardgrass		
		I(根 root)	I(苗 shoot)	I(根 root)	I(苗 shoot)	
CK	6.45	2.2±0.7a	1.7±0.5c	2.7±0.8ab	2.7±1.1a	
CPD	2.56	0d	0f	0±0.1f	1.1±0.2b	
	7.00	0.4±0.1c	0.5±0.4e	1.3±0.7cd	1.1±0.4b	
	2.56	0d	0f	0.7±0.8e	1.5±0.5b	
OM	7.00	0.4±0.3c	0.9±0.3d	0.3±0.6cd	1.2±0.4b	
	2.71	0d	0.4±0.6e	1.3±0.5d	1.5±0.6b	
CM	7.00	0.4±0.1c	1.0±0.3d	1.8±0.6bc	1.6±0.5b	
	6.56	2.0±0.7a	2.5±0.4a	2.4±0.8b	2.9±1.3a	
Czapek dox	7.04	1.4±0.5b	2.1±0.4b	3.0±1.1a	3.0±1.2a	

1) 同一列数字后的小写英文字母不同代表差异显著(α=0.05)

的21.2%。将它们的pH值调节到7后,抑制作用显著下降,这3种发酵液调节pH后对油菜种子发芽没有抑制作用。但pH值调节到7后,这3种发酵液对油菜幼苗生长仍然有显著的抑制作用,对根生长的抑制都为81.8%,CPD、OM和CM培养的发酵液对苗生长的抑制分别为70.6%、47.1%和41.2%。马丁氏培养基对油菜幼苗根生长没有抑制作用,对幼苗的地上部生长还有显著的促进作用。查氏培养基的发酵产物对油菜幼苗根生长有一定抑制作用,对地上部生长却有促进作用。

CPD、OM和CM3种培养基的发酵产物在调节pH值前和调节pH值至7后对稗草幼苗生长均有抑制作用,调节pH值至7后CPD和CM的发酵产物对根生长的抑制作用显著下降,但这3种发酵液对稗草幼苗地上部生长的抑制并没有显著下降。CPD的发酵产物对根生长的抑制为100%,并且有25%的稗草种子不能萌发。马丁氏培养基和查氏培养基的发酵产物对稗草幼苗生长没有显著的影响作用。

用马丁氏和查氏营养培养的发酵液pH分别为6.56和7.04,对幼苗生长无抑制作用,而其他营养培养的对幼苗生长有抑制作用的发酵液 $pH \leq 2.71$,说明是否产生有机酸与日本曲霉有无化感作用有密切关系。将酸性强的发酵液pH调节至7后对幼苗生长的抑制作用下降,但仍有强烈的抑制作用,证明该菌大量分泌有机酸使环境中pH过低是引起植物生长受抑制的一个重要原因,然而更重要的是该菌产生的化感作用物质直接抑制植物的生长。

可见,日本曲霉在不同的基质中生长,其产生的

化感作用差异很大,在有的基质中不产生抑制作用,甚至促进植物的生长。查氏培养基为全合成培养基,可能缺乏日本曲霉产生化感作用物质的某些必需的生长因子。马丁氏培养基中的氮源为蛋白胨,来自动物,该菌不能有效利用。

2.1.3 无机盐和维生素B₁的影响 在基本的碳源和氮源不改变的情况下,日本曲霉所有配方的发酵产物对稗草和萝卜的幼苗生长均有显著抑制作用(表3)。将发酵液pH值调整至7,抑制作用多数情况有显著下降,但对幼苗生长的抑制仍然很显著。在配方(2)中加入1g CaCO₃,以便确定发酵过程中产生的有机酸被中和后,生物活性是否会下降。结果显示, CaCO₃使发酵液的pH值提高(由2.24升到2.64),但生物活性也显著下降。配方(3)中加入K₂HPO₄,与KH₂PO₄一起构成缓冲液,结果发酵原液的pH值提高到2.54,但抑制稗草和萝卜2种受体幼苗生长的生物活性同配方(1)比较没有显著改变。配方(4)在发酵前将培养基的pH调节至8,发酵后原液的pH值提高到3.04,生物活性明显低于配方(1),也低于配方(2)。配方(4)发酵液在pH值未调整时,生物活性也低于其他配方发酵液将pH调节到7后的生物活性。可见,培养基质的酸碱度对日本曲霉的化感作用有比较大的影响。配方(5)在配方(1)的基础上增加了维生素B₁,发酵后的pH值略有下降,pH为2.10,生物活性与配方(1)比较,对稗草、萝卜2种受体的幼苗根和苗的生长抑制均没有显著差异。这可能是由于在马铃薯和玉米粉的提取液中已含有足够数量的维生素供日本曲霉生长使用。

表3 含有维生素B₁和不同无机盐的PD培养基培养日本曲霉发酵产物对稗草和萝卜幼苗生长的影响¹⁾

Tab. 3 Effects of the diluted broth (×4) of *A. japonicus* cultured in PD media with different inorganic salts and vitamin B₁ on the seedling growth of barnyardgrass and radish

培养基配方 culture media	pH	稗草 barnyardgrass		萝卜 radish	
		I(根 root)	I(苗 shoot)	I(根 root)	I(苗 shoot)
CK	6.45	3.9±0.7a	4.3±1.1a	8.0±2.1a	5.8±1.3a
(1)	2.84	0.2±0.2g	1.1±0.3gh	0.5±0.4g	1.4±1.1g
(2)	7.00	1.9±0.6e	1.7±0.5cde	1.4±1.2ef	2.6±1.6ef
	3.33	0.7±0.5f	1.3±0.3fg	2.1±1.1de	3.7±1.2cd
(3)	7.00	2.3±0.7cd	1.6±0.7def	2.9±1.5c	3.5±1.5de
	3.03	0.2±0.1g	1.1±0.3gh	0.9±0.7fg	1.9±1.2fg
(4)	7.00	1.8±0.5e	1.6±0.6ef	1.0±0.7fg	2.9±1.5de
	3.48	2.6±0.6b	2.0±0.4cd	3.8±1.4b	4.7±1.4b
(5)	7.00	2.4±0.7bc	2.7±0.8b	2.5±1.7cd	4.3±1.4bc
	2.72	0.1±0.1g	1.0±0.3h	0.6±0.5fg	1.7±1.5g
	7.00	2.1±0.5de	2.0±0.5c	1.3±1.0ef	3.3±1.9de

1) 同一列数字后的小写英文字母不同代表差异显著(α=0.05)

可见, 在基本的碳源和氮源不改变的情况下, 所有配方的日本曲霉发酵产物均有化感作用. 改变无机盐的组成化感作用强度会发生改变. 缓冲溶液可以缓冲 pH 值的变化, 但不会影响化感作用的强度.

2.1.4 营养水平对日本曲霉化感作用的影响 在不同营养水平下将日本曲霉接种到油菜和萝卜的种子表面, 结果显示(图 1a), 在完全没有营养的条件下, 该菌只有对油菜幼苗的根生长有显著的抑制, 对油菜苗长和萝卜幼苗的根和苗的生长没有显著的抑制作用. 当有 1/10 PD 营养时, 对萝卜根生长就产生显著抑制, 当有 1/5 PD 营养时, 对油菜和萝卜幼苗的根和苗生长均有很显著的抑制, 对幼苗根生长的抑制分别为 78.6%和 77.8%, 当进一步将营养提高到 1/2 PD 营养时, 油菜幼苗发芽后停止生长, 萝卜幼苗根和苗的生长也分别受抑制 81.5%和 41.7%. 说明培养基营养越丰富, 日本曲霉的化感作用活性越强.

2.2 环境因素对日本曲霉化感作用的影响

2.2.1 温度 在不同的温度条件下培养日本曲霉, 结果发现在 15~30℃范围内, 随着温度的升高生长速度显著加快. 在 30℃时日本曲霉生长最快, 24 h 内整个 50 mL 的三角瓶就长满了菌丝, 48 h 出现大量的分生孢子. 15℃条件下, 生长 9 d 后仍然未完全布满固体培养基表面. 不同温度下培养的日本曲霉用丙酮抽提得到的提取物, 经生物活性测定表明(图 1b, 图 1d), 在 25 和 20℃条件下得到的培养物抑制种子萌发和幼苗生长的活性最强, 25℃下对稗草和油菜种子发芽的抑制分别为 85.9%和 88.3%, 20℃下对稗草和油菜种子发芽的抑制分别为 88%和 85%. 这 2 个温度之间的生物活性差异不显著. 其次是 15℃, 而 30℃条件下得到的培养物生物活性最差, 对稗草种子发芽的影响没有达到显著水平($\alpha=0.05$), 对油菜种子发芽的抑制为 24.8%, 显著低于 15℃条件下得到的培养物的 66.7%的抑制率. 15℃条件下得到的培养物对油菜幼苗地上部生长的抑制也显著强于 30℃条件下得到的培养物.

可见, 在 25 和 20℃的温度条件下日本曲霉的化感作用最强, 30℃条件下化感作用最弱, 化感作用的强弱并非直接与生长呈正相关关系, 15℃时虽然生长很慢, 但化感作用比生长最快的 30℃要强. 在 15~30℃条件下化感作用最弱, 化感作用的强弱并非直接与生长呈正相关关系, 15℃时虽然生长很慢, 但化感作用比生长最快的 30℃要强. 在 15~30℃条件下丙酮提取物的 pH 值分别为 2.92、2.57、2.39 和 3.30 (图 1c). 25℃时培养物的 pH 值最低, 其次是 20℃, 而 30℃时 pH 值最高. 这说明, 日本曲霉的化

感作用强度与产生的有机酸有密切关系, 产酸少, pH 值高, 化感作用弱; 产酸多, pH 值低, 化感作用强. 这也证明, 有机酸是日本曲霉化感作用物质的重要组成部分, 但除有机酸外, 还有其他化感作用物质^[4].

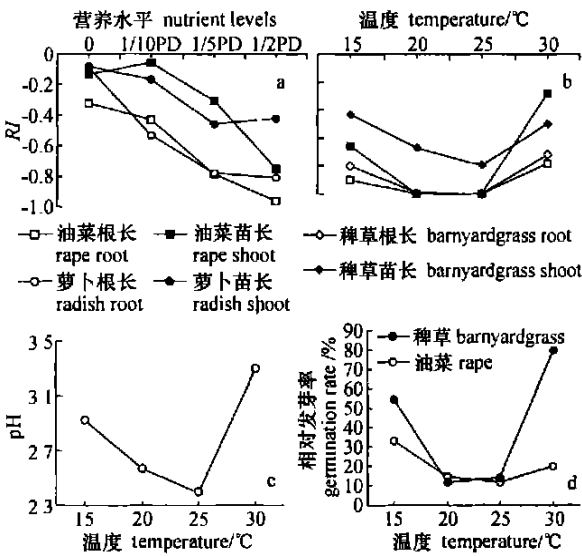


图1 营养水平和环境因素对日本曲霉化感作用的影响
Fig.1 Allelopathic potentials affected by nutrients and environmental conditions

2.2.2 pH 值 将 1/5 的 PD 培养基调节成不同的 pH 值, 测定培养基酸碱性对日本曲霉直接接种到油菜种子表面后对幼苗生长的影响. 结果表明(表 4), 各种 pH 条件下, 日本曲霉对油菜幼苗的根和苗生长均有极显著的抑制作用, 而且对幼苗根生长的抑制比对苗生长的抑制作用强.

表 4 不同 pH 条件下接种日本曲霉对油菜幼苗生长的影响
Tab.4 Effects of *A. japonicus* inoculation in culture media with different pH on the seedling growth of rape (RI)

pH	I(根 root)	I(苗 shoot)	pH	I(根 root)	I(苗 shoot)
3	-0.634 **	-0.307 **	8	-0.690 **	-0.514 **
4	-0.667 **	-0.523 **	9	-0.867 **	-0.498 **
5	-0.746 **	-0.610 **	10	-0.579 **	-0.378 **
6	-0.581 **	-0.306 **	11	-0.689 **	-0.509 **
7	-0.565 **	-0.462 **			

3 结论

日本曲霉的化感作用与环境条件有密切的关系. 当营养条件丰富时, 化感作用显著增强. 在液体培养试验中, 查氏和马丁氏培养基的发酵产物无抑制作用, 可能是这 2 种培养基中缺乏必要的维生素

和微量元素,而马铃薯复合培养基、玉米和燕麦培养基含有天然的各种植物营养,这时日本曲霉均能产生化感作用,抑制植物幼苗生长。自然界土壤中含有各种植物的枯枝落叶和残体,可以为日本曲霉产生化感作用提供了必要的营养条件。

温度是影响日本曲霉化感作用的 1 个重要条件,在 20~25℃适宜的温度条件下,日本曲霉不仅能很好生长,而且能产生化感作用抑制植物的生长,在 30℃温度下,日本曲霉生长迅速,但对植物的化感作用大大减弱。在 15℃温度下,日本曲霉本身生长非常缓慢,产生化感作用影响植物生长的可能性不大。

本研究主要用生物测定的方法确定在不同环境和营养条件下日本曲霉化感作用的变化,对于主要化感物质黑麦酮酸 F 是否同样随环境和营养条件的改变而产生类似的变化还有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] 齐祖同.中国真菌志(第 5 卷):曲霉属及其相关有性型

[M] .北京:科学出版社,1997. 98—100.

[2] ZENG R S, LUO S M, SHI M B, et al. Allelopathy of *Aspergillus japonicus* SAITO on crops [J] . Agronomy Journal, 2001, 93(1): 60—64.

[3] ZENG R S, LUO S M, SHI Y H, et al. Physiological and biochemical mechanism of allelopathy of secalonic acid F on higher plants [J] . Agronomy Journal, 2001, 93(1): 72—79.

[4] 李阜棣,喻子牛,何绍江.农业微生物学实验技术[M] .北京:中国农业出版社,1996. 32—46.

[5] 方中达.植病研究方法[M] .北京:中国农业出版社,1998. 46—50.

[6] 韦琦,曾任森,孔垂华,等.胜红蓟地上部分化感作用物的分离和鉴定[J] .植物生态学报,1997, 21(4): 360—366.

[7] WILLIAMSON G B. Bioassays for allelopathy measuring treatment responses with independent control[J] . Journal of Chemical Ecology [J] . 1988, 14(1): 181—187.

Allelopathic Potentials of *Aspergillus japonicus* on Higher Plants Affected by Nutrients and Environmental Conditions

ZENG Ren-sen, LUO Shi-ming, SHI Mu-biao

(Institute of Tropical & Subtropical Ecology, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Allelopathic properties of a plant or microbe often depend on resource availability and environmental conditions. *Aspergillus japonicus* is a common soil-borne fungus, and also exists on the surface of seeds of some crops. Our previous work indicated that *A. japonicus* had allelopathic effects on higher plants. Studies showed that *A. japonicus* had allelopathic potentials when cultured in CPD, CM, OW media which consisted of natural plant nutrition, and no allelopathic potential when cultured in Martin and Czapek dox media which consisted of artificial nutrition. Allelopathic potentials increased with the increment of nutrient levels in the media. Temperature was important for allelochemical production. The fungus had very strong allelopathic potentials at 25 and 20℃. It grew very slowly at 15℃, and grew fastest at 30℃. But allelopathic potentials of the fungus grown at 15℃ was stronger than that at 30℃.

Key words: *Aspergillus japonicus*; allelopathy; nutrients; environmental conditions

【责任编辑 周志红】