

# 温度对茄病镰刀菌生长情况及产孢量的影响

董贤慧 钱涛 高维娟 贺小平  
(承德医学院病理生理学教研室,承德 067000)

**【摘要】 目的** 探讨不同孵育温度对茄病镰刀菌生长状态的影响,为获得大量孢子寻找较好方案。**方法** 茄病镰刀菌按孵育温度不同分为 6 组, A 组、B 组、C 组、D 组、E 组分别于 20℃、25℃、30℃、35℃、37℃ 温箱黑暗孵育 7 d, F 组于 35℃ 温箱黑暗孵育 3 d 再于 25℃ 温箱黑暗孵育至 7 d, 各组在培养 24 h、3 d、5 d、7 d 时分别用游标卡尺测量各组菌落直径, 在培养 3 d、5 d、7 d 时用血平板计数器计数产孢量。**结果** 在 20~30℃ 范围内茄病镰刀菌菌落生长速度随温度升高而增快, 在 30~37℃ 范围内菌落生长速度随温度升高而减慢, F 组产孢量较多 (为  $1.025 \times 10^8$  CFU/mL), 而菌丝相对较少。**结论** 茄病镰刀菌在 20~37℃ 范围内均可以生长, 30℃ 较适合茄病镰刀菌菌落生长, 35℃ 温箱孵育 3 d 再于 25℃ 温箱孵育至 7 d 是获得大量孢子而非菌丝的较好方案。

**【关键词】** 温度; 茄病镰刀菌; 产孢量

**【中图分类号】** R 379.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-3827(2011)01-0022-04

## Effect of temperature on the growth and spore production of *Fusarium solani*

DONG Xian-hui, QIAN Tao, GAO Wei-juan, HE Xiao-ping  
(Pathophysiology Apartment of Chengde Medical University, Chengde 067000)

**【Abstract】 Objective** To investigate the influence of temperature on the growth, sporulation quantity and pathogenicity of *Fusarium solani*. To find out the best way for promoting conidial production of *Fusarium solani*. **Methods** *Fusarium solani* from 5 different groups were incubated in dark for 7 days at 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, and 37℃, respectively. Group F was incubated in dark for 3 days at 35℃, and at 25℃ for the next 4 days. The diameters of the colonies were measured by vernier caliper on 24 h, 3 d, 5 d, and 7 d. Conidial production was determined by hematometer on 3 d, 5 d, and 7 d. **Results** Between The growing speed of *Fusarium solani* colony increased during 20℃ to 30℃, while decreased during 30℃ to 37℃ with the temperature going up. **Conclusions** *Fusarium solani* began to grow and produced conidiospore at 20 to 35℃. The pathogenicity of the *Fusarium solani* was affected by temperature obviously, with 30℃ as the suitable temperature. Incubation at 35℃ for 3 days and at 25℃ for consecutive 4 days was good for sporulation.

**【Key words】** temperature; *Fusarium Solani*; conidial production

[ Chin J Mycol, 2011, 6(1): 22-25 ]

近年来,真菌引起的疾病逐渐增多,越来越多的学者投入到真菌的致病性、耐药性及抗真菌药物的研究当中,制备真菌孢子悬液是建立这些研究动

物模型的重要一环。通常认为 1 个孢子即为 1 个菌落形成单位,孢子悬液的浓度以 CFU (colony forming unit)/mL 为单位,在真菌培养中获得大量孢子正是制备孢子悬液的前提。我们的实验以茄病镰刀菌为例,通过改变孵育温度来观察其菌丝生长及产孢量的变化,为获得大量孢子而非菌丝寻找较好方案。

基金项目:国家科技支撑计划重大项目(2007BAI26B07).  
作者简介:董贤慧,女(汉族),硕士研究生在读. E-mail: dongxianhuitj@126.com  
通讯作者:高维娟, E-mail: gwj6088@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与培养基

茄病镰刀菌 (由中科院微生物研究所提供, 编号为 3. 5840)。PDA 培养基 (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK)。

### 1.2 实验方法

将茄病镰刀菌菌种 (真空保存孢子粉) 溶于生理盐水, 转接在新鲜的 PDA 斜面上。27℃ 温箱孵育 7 d, 选择生长良好的菌落连续转接 2 次培养。取含有 0.1% 吐温 80 的无菌盐水 1 mL, 涂满整个菌落, 用吸液管尖端轻轻地刺破菌落使之与盐水混匀, 把含孢子和菌丝的混悬液移入无菌试管, 静置 5 min, 待重颗粒沉淀后将上层均一化的悬浮液转入另一无菌试管, 盖紧盖子置于涡流器 15 s 使悬浮液充分混匀, 梯度稀释, 在显微镜下用血细胞计数板计数, 调整浓度至  $1.6 \times 10^6$  CFU/mL。取 1  $\mu$ L 菌悬液接种于培养皿固体培养基中央, A、B、C、D、E 各组分别于 20℃、25℃、30℃、35℃、37℃ 温箱黑暗孵育 7 d, F 组于 30℃ 温箱黑暗孵育 3 d 再于 25℃ 温箱黑暗孵育至 7 d, 每组各 12 个平皿。在培养 24 h、3 d、5 d、7 d 时分别用游标卡尺测量各组菌落直径, 显微镜下观察其生长情况。并于培养 3 d、5 d、7 d 时各组随机选取 3 个平皿用含有 0.1% 吐

温 80 的无菌生理盐水 5 mL 反复冲洗菌落菌面, 洗净培养皿中的孢子, 分别在显微镜下用血细胞计数板测定孢子含量。

### 1.3 统计学方法

菌落直径  $d$  用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 Duncan 新复极差测验对结果进行比较。

## 2 结果

### 2.1 茄病镰刀菌的生长情况 (见图 1)

### 2.2 不同温度对茄病镰刀菌菌落直径的影响

不同温度和培养时间下菌落累计生长直径差异显著性检验结果见表 1、图 2。

### 2.3 不同温度对茄病镰刀菌产孢量的影响结果 (见表 2)

在 20 ~ 37℃ 范围内, 茄病镰刀菌均可以生长。在 20 ~ 30℃ 温度范围内茄病镰刀菌菌株的菌落生长速度以及产孢量随温度升高而增加, 在 30 ~ 37℃ 温度范围内菌落生长速度以及产孢量呈现出随温度升高而减少。第 7 天时, 30℃ 组产孢量高于其他各组, 但其菌落面积也最大, 大量的菌丝会影响孢子计数, 而 F 组获得的孢子数仅次于 C 组 (30℃), 而菌丝相对较少。

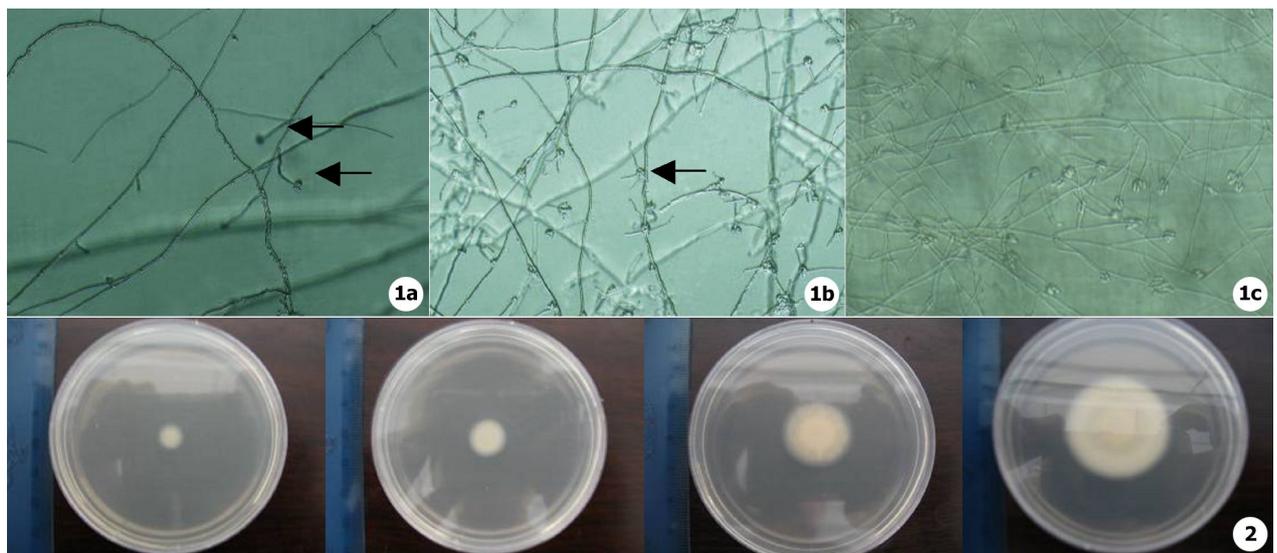


图 1 a. 30℃ 温箱孵育 48 h, 可见有分生孢子开始形成; b. 30℃ 温箱孵育 3 d, 可见有分生孢子出芽生长; c. 30℃ 温箱孵育 5 d, 菌丝生长较快, 较多孢子生成 图 2 F 组菌种生长不同时间菌落变化 (自左至右): 24 h, 3 d, 5 d, 7 d

Fig. 1 a. Incubation at 30℃ for 48 hours, with conidium forming; b. Incubation at 30℃ for 3 days, with conidium growing; c. Incubation at 30℃ for 5 days, with faster hypha growing and more spore forming Fig. 2 Changes of *Fusarium Solani* colonies from group F (from left to right: 24 hour, 3 day, 5 day, and 7 day)

表 1 温度对茄病镰刀菌菌落直径的影响 ( $\bar{x} \pm s$ , cm)Tab. 1 Influence of temperature on the growth of *Fusarium Solani* ( $\bar{x} \pm s$ , cm)

温度 (°C)	不同时间菌落直径			
	24 h	3 d	5 d	7 d
20	0.300 ± 0.015Cc	1.132 ± 0.011Dd	2.453 ± 0.013Dd	3.540 ± 0.013Dd
25	0.356 ± 0.029Bb	2.202 ± 0.019Bb	3.981 ± 0.012Bb	5.561 ± 0.009Bb
30	0.978 ± 0.014Aa	2.957 ± 0.013Aa	5.746 ± 0.005Aa	8.206 ± 0.015Aa
35	0.367 ± 0.016Bb	1.223 ± 0.014Cc	3.031 ± 0.013Cc	5.566 ± 0.014Bb
37	0.268 ± 0.014Dd	1.128 ± 0.021Dd	2.326 ± 0.014Ee	2.957 ± 0.013Ee
35 ~ 25	0.366 ± 0.015Bb	1.227 ± 0.018Cc	2.217 ± 0.013Ff	4.156 ± 0.011Cc

注: Duncan 新复极差测验, 表中数据后面的字母相同代表差异不显著; 大写字母在 0.05 水平时差异显著性; 小写字母表示在 0.01 水平时差异显著性

表 2 温度对茄病镰刀菌产孢量的影响 (CFU/mL)

Tab. 2 Influence of temperature on spore production of *Fusarium Solani* (CFU/mL)

温度 (°C)	不同时间产孢量		
	3 d	5 d	7 d
20	8.364 × 10 <sup>6</sup> Ee	1.058 × 10 <sup>7</sup> Ee	4.352 × 10 <sup>7</sup> Dd
25	1.248 × 10 <sup>7</sup> Bb	5.126 × 10 <sup>7</sup> Cc	8.176 × 10 <sup>7</sup> Cc
30	4.204 × 10 <sup>7</sup> Aa	9.704 × 10 <sup>7</sup> Aa	8.192 × 10 <sup>8</sup> Aa
35	9.329 × 10 <sup>6</sup> Cc	7.852 × 10 <sup>7</sup> Bb	8.040 × 10 <sup>7</sup> Cc
37	8.849 × 10 <sup>6</sup> Dd	1.065 × 10 <sup>7</sup> Ee	2.058 × 10 <sup>7</sup> Ee
35 ~ 25	9.335 × 10 <sup>6</sup> Cc	2.485 × 10 <sup>7</sup> Dd	1.025 × 10 <sup>8</sup> Bb

注: Duncan 新复极差测验, 表中数据后面的字母相同代表差异不显著; 大写字母在 0.05 水平时差异显著性; 小写字母表示在 0.01 水平时差异显著性

### 3 讨 论

镰刀菌是土壤中常见的腐生菌, 其生态适应性强, 甚至可生存于沙漠及北极地区, 可致人类感染, 属条件致病性真菌<sup>[1]</sup>。镰刀菌引起的感染包括皮肤感染、甲真菌病、角膜炎、眼内炎、鼻窦炎、腹膜炎、骨髓炎等。综合印度<sup>[2]</sup>、美国南部<sup>[3]</sup> 和我国<sup>[4,5]</sup> 的一些研究报道, 镰刀菌是引起真菌性角膜炎 (fungal keratitis, FK) 最常见的真菌菌属<sup>[6]</sup>, 而茄病镰刀菌是最为常见的引起人类感染的镰刀菌, 其引起的真菌性角膜炎预后差, 可引起严重的角膜溃疡, 常导致角膜穿孔、眼内炎, 甚至角膜盲以及眼

球丧失等。近年来, 其发病率在我国明显升高<sup>[7,8]</sup>, 已成为角膜盲的首要病因<sup>[9,10]</sup>。目前, 探讨该病发病机制以及研究高效、低毒的抗真菌药物已成为众多学者的研究方向。

真菌孢子悬液的制备是科学研究中的一个重要环节, 参考国内外相关文献发现众多学者真菌培养温度和时间不一, 悬液制备方案不同, 建立动物模型选取孢子悬液浓度不一, 这些都不利于循证医学的发展以及多中心研究的实施。本实验仅以较为常见的镰刀菌为例, 抛砖引玉, 希望能引起同仁的重视, 以达成共识来寻找一条较好的真菌孢子悬液制备方案。

在实验条件下,茄病镰刀菌菌落生长较快,呈棉花状,年轻菌落为白色,最后可呈粉红色。显微镜下观察发现,茄病镰刀菌菌丝成 90° 出芽生长,分生孢子有 14 个隔,其大分生孢子较粗壮,小分生孢子多呈假头状排列,产孢细胞较长。成熟孢子的形状呈典型的镰刀形或新月形。

本实验研究结果表明,在 20 ~ 37℃ 范围内,茄病镰刀菌均可以生长,在 20 ~ 30℃ 温度范围内茄病镰刀菌的菌落生长速度以及产孢量呈现出随温度升高而增加,在 30 ~ 37℃ 温度范围内菌落生长速度以及产孢量随温度升高而减少,说明温度是影响茄病镰刀菌生长和产孢的一个重要因素。由产孢量结果可知,30℃ 组产孢量相对大于其他各组,但其菌丝生长较快,菌落面积大,菌丝的大量形成会影响到孢子计数,而将菌株于 35℃ 温箱孵育 3 d 再于 25℃ 温箱孵育至 7 d 的方法是促进孢子形成而非菌丝生长的较好方案,考虑与菌株通过产孢来抵御低温有关。由于大量菌丝生长会影响孢子计数,35℃ 温箱孵育 3 d 再于 25℃ 温箱孵育至 7 d 是产孢较多而菌丝形成较少的一种方法,所以我们认为该方法是制备茄病镰刀菌孢子悬液的较好方案。

#### 参 考 文 献

[1] Mayayo E, Pujol I, Guarro J. Experimental pathogenicity of four

opportunistic *Fusarium* species in a murine model[J]. J Med Microbiol, 1999, 48(4):363-366.

[2] Chowdhary A, Singh K. Spectrum of fungal keratitis in north India[J]. Cornea, 2005, 24(1):8-15.

[3] Liesegang TJ, Forster RK. Spectrum of microbial keratitis in South Florida[J]. Am J Ophthalmol, 1980, 90(1):38-47.

[4] Xie L, Zhong W, Shi W, et al. Spectrum of fungal keratitis in north china[J]. Ophthalmology, 2006, 113(11):1943-1948.

[5] Qiu WY, Yao YF, Zhu YF, et al. Fungal spectrum identified by a new slide culture and *in vitro* drug susceptibility using Etest in fungal keratitis[J]. Current Eye Research, 2005, 30(12):1113-1120.

[6] Hot A, Mazighi M, Lecuit M, et al. Fungal internal carotid artery aneurysms: successful embolization of an Aspergillus-associated case and review[J]. Clin Infect Dis, 2007, 45(12):156-161.

[7] Sun XG, Zhang Y, Li R, et al. Etiological analysis on ocular fungal infection in the period of 1989-2000[J]. Chin Med J (Engl), 2004, 117(4):598-600.

[8] Srinivasan M. Fungal keratitis[J]. Curr Opin Ophthalmol, 2004, 15(4):321-327.

[9] 谢立信, 翟华蕾. 穿透性角膜移植术治疗真菌性角膜溃疡穿孔[J]. 中华眼科杂志, 2005, 41(1):1009-1013.

[10] 钟文贤, 谢立信. 真菌性角膜炎发病机制的研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2007, 43(4):381-384.

[收稿日期] 2010-09-27

[本文编辑] 卫凤莲

## 欢迎订阅《中国真菌学杂志》

《中国真菌学杂志》是由国家新闻出版总署批准出版发行的高级医学学术期刊,由上海长征医院主办,现已被“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”收录。

本刊主要报道我国真菌学特别是医学真菌学的最新研究进展,内容涉及基础医学及临床医学中的大部分专业,以从事皮肤、感染、血液、呼吸、器官移植、肿瘤、急救、创伤、检验等与真菌感染专业有关的中高级医务人员、研究人员及从事微生物学、分子生物学及药学等基础研究的研究人员为主要读者群,是真菌学工作者之间交流的窗口和平台。辟有:专家论坛、论著、论著摘要、技术和方法、学术讲座、继续医学教育、综述、真菌病治疗和疑难病例分析等栏目。

本刊为双月刊,大 16K,铜版纸彩色印刷,每期定价 9.8 元,全年共 58.8 元。可在当地邮局订阅(邮发代号 4-799),漏订者可来函本刊编辑部办理邮购。地址:上海市凤阳路 415 号《中国真菌学杂志》编辑部 邮编:200003 联系人:王飞 电话:021-81885496 传真:021-81885497 电子邮箱:zgjxzz@126.com