

# 蓝光诱导的胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) 类胡萝卜素积累

付鸣佳<sup>1,2</sup> 王小菁<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>华南师范大学生命科学院 广东省植物发育生物工程重点实验室 广州 510631)

(<sup>2</sup>江西师范大学生命科学院 南昌 330027)

**摘 要** 胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)为一种丝状真菌,蓝光照射可诱导类胡萝卜素的积累。光镜下观察表明,蓝光可诱导胶孢炭疽菌菌丝积累色素颗粒,而黑暗和红光处理却无此现象。类胡萝卜素的积累受蓝光光照强度的影响。28℃且蓝光为 $6.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 时,类胡萝卜素积累量可随光照时间延长呈增长趋势,在第5天达到最高峰为 $71.8\mu\text{g/g}$  FW,随后含量下降。此外,胶孢炭疽菌在黑暗中预培养的时间也影响蓝光的诱导反应。

**关键词** 胶孢炭疽菌 蓝光 类胡萝卜素

中图分类号:Q939.9 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)05-0795-04

类胡萝卜素(Carotenoid)是一类呈黄色、橙红色或红色的由8个异戊二烯基本单位组成的多烯类化合物。利用微生物生产类胡萝卜素是获得生物资源型类胡萝卜素的重要途径。有关真菌产类胡萝卜素的研究时有报道,包括深红酵母(*Rhodotorula rubra*)、青霉(*Penicillium* sp. PT95)、赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*)、须霉(*Phycomyces blakesleeanus*)和脉孢菌(*Neurospora crassa*)等<sup>[1-6]</sup>。蓝光诱导真菌产类胡萝卜素的研究不多,主要在脉孢菌中有报道<sup>[7,8]</sup>。至今未见有关于蓝光诱导胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)产类胡萝卜素的研究报道。

胶孢炭疽菌属于囊菌亚门(Ascomycotina)、腔胞纲(Coelomycetes)、黑盘孢目(Melanconiales)、炭疽菌属(*Colletotrichum*)的真菌。其寄主繁多,分布广泛<sup>[9]</sup>。本文对胶孢炭疽菌菌丝在蓝光诱导下类胡萝卜素的积累进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种** 胶孢炭疽菌分离自墨兰(*Cymbidium sinense* Wild)炭疽病发病叶片,华南师范大学王利国博士提供,4℃保存。使用前接种于马铃薯蔗糖琼脂培养基平皿中,28℃倒置培养,经两次活化。

**1.1.2 培养基** 为马铃薯蔗糖琼脂培养基,其中每升含马铃薯200g、蔗糖20g、脂20g,pH7.0,55kPa灭菌20min。

**1.1.3 蓝光光源** 蓝色和红色荧光灯为40W,由广州灯泡厂生产,蓝光和红光荧灯光源分别通过日本Toshiba Lighting & Technology Corp生产的蓝色滤膜(#73)和红色滤膜(#20)

而获得蓝光和红光。蓝光最强波长为450nm,半高宽为50nm;红光最强波长为660nm,半高宽为20nm。培养皿置于光下,调节培养皿与光源的距离而获得不同光照强度的蓝光,每个培养皿上五点测定光强度,取平均值。用日本产Optical Power Meter TQ8210型手持测定仪测定光照强度。

### 1.2 光照培养和形态观察

菌种接入平板培养基后,28℃黑暗培养3d,待长出直径约2cm的白色菌落后,分别置于蓝光、红光和黑暗条件下继续培养7d,期间不断观察菌落颜色变化,光学显微镜下观察菌丝体并拍照。

### 1.3 光照对胶孢炭疽菌菌丝类胡萝卜素积累的影响

28℃下,将黑暗培养5d的胶孢炭疽菌培养皿置于 $6.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光照强度的蓝光或红光下培养,不同时间间隔取样,称取菌丝体的鲜重(Fresh weight,FW)并立即液氮处理,冻存于-20℃,待取样全部结束后同时提取类胡萝卜素。

在黑暗预培养实验中,分别以黑暗培养4d和5d的胶孢炭疽菌,置于不同强度的蓝光下25℃培养。光照3d后立即取样,称菌丝体鲜重后立即进行液氮处理,提类胡萝卜素。

### 1.4 类胡萝卜素的提取和含量测定

参照杨文等方法<sup>[4]</sup>并稍作改进:用研棒在1.5mL离心管中研磨菌丝体,0.1g新鲜菌丝体加入1mL 3mol/L盐酸,室温下浸泡2.5h,沸水浴4min,迅速冷却,10000 r/min离心10 min,双蒸水水洗两次,加入1mL丙酮振荡30 min,提取类胡萝卜素,5000r/min离心15min,取上清液,在Shimadzu UV-2450紫外-可见分光光度计上测定474nm处的吸光值,类胡萝卜素含量按以下公式计算:

类胡萝卜素的含量( $\mu\text{g/g}$ 鲜菌丝体) =  $OD_{474} \cdot D \cdot V / 0.16 \cdot \text{FW}$

基金项目 国家自然科学基金项目(30170558)

\* 通讯作者。Tel: 86-20-85216417; E-mail: wangxj@scnu.edu.cn; wangxj1955@yahoo.com

作者简介 付鸣佳(1964-)男,江西高安市人,副教授,博士,主要从事资源微生物与植物病毒学研究。E-mail: mingjiafu@yahoo.com.cn

收稿日期 2005-02-21,修回日期 2005-04-20

其中  $OD_{474}$  为 474nm 处的吸光值,  $D$  为稀释倍数,  $V$  为加入的丙酮体积 (mL),  $FW$  为菌丝体鲜重, 0.16 为类胡萝卜素的克分子消光系数。

### 1.5 吸收光谱测定

将上述类胡萝卜素丙酮提取液和标准  $\beta$ -胡萝卜素 (Sigma 产品) 丙酮溶液在 Shimadzu UV-2450 紫外-可见分光光度计下进行 600nm ~ 360nm 的光谱扫描并记录曲线。

## 2 结果

### 2.1 不同光照处理后菌落颜色变化和菌丝体中色素的积累

将黑暗培养 3d 的胶孢炭疽菌分别置于黑暗、红光和蓝光下 28℃ 继续培养一段时间后观察拍照。黑暗和红光条件下培养的胶孢炭疽菌菌落仍为白色, 没有形成橙红色的菌落 (图版 II-A-a, b), 其中黑暗培养的菌落较为稀疏, 而红光培养的菌落较为致密。蓝光光照第 1 天, 菌落颜色开始发生变化, 由浅橙色逐渐变成橙红色, 在第 5 天达到最深, 第 6 天菌落开始老化, 颜色变浅。蓝光中菌落的菌丝密度大 (图版 II-A-c)。这些结果表明蓝光可导致色素在菌丝体中的积累。

在普通光学显微镜 (600×) 下可以看出, 黑暗和红光下培养的胶孢炭疽菌菌丝里基本没有色素颗粒存在 (图版 II-B-a)。而蓝光下的菌丝里分布着许多红褐色色素颗粒, 且所有的菌丝颜色都形成较深的黄褐色, 表明蓝光诱导胶孢炭疽菌的菌丝中产生色素 (图版 II-B-b)。

### 2.2 菌丝色素的紫外-可见光光谱分析

与  $\beta$ -胡萝卜素的吸收光谱相比较, 胶孢炭疽菌菌丝所产生色素光谱的肩峰不明显, 而且吸收峰有红移的现象,  $\beta$ -胡萝卜素的最大吸收峰在 452nm 处, 而胶孢炭疽菌所产生色素的吸收峰在 474nm 处 (图 3)。类胡萝卜素的光吸收主要取决于分子内的吸光色素基团, 主要的吸光色素基团为系列共轭双键构成的多烯结构, 最大吸收峰与共轭双键数有直接的关系, 每增加一个共轭双键, 最大吸收峰向红外方向漂移 7 ~ 35nm; 另外, 多烯链上增加一个羧基也会使最大吸收峰向红外方向漂移约 28nm<sup>[10]</sup>。结果表明 (图版 II-C), 胶孢炭疽菌所产生色素属于类胡萝卜素, 其最大吸收峰红移的原因可能有两个: 一是这种类胡萝卜素不是单一的色素, 可能还存在一些含氧衍生物; 二是类胡萝卜素中有的组分比  $\beta$ -胡萝卜素多一个共轭双键, 或是多烯链上增加了羧基, 使光学特性发生了变化。

### 2.3 蓝光诱导菌丝类胡萝卜素的积累

胶孢炭疽菌在 28℃ 黑暗中培养 5d, 而后分别置于  $6.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  的蓝光和红光下 7d 或继续在黑暗中培养 7d, 每隔 24h 取样并提取类胡萝卜素。结果表明胶孢炭疽菌菌丝在黑暗中类胡萝卜素的含量很低, 且无随时间而增加的趋势; 在红光下培养的结果与黑暗基本相同。而在蓝光下培养的菌丝, 第 1 天的色素积累量就可达到  $23.45\mu\text{g/g}$  FW, 第 3 天到第 5 天之间增长最快, 第 5 天达到最高峰, 类胡萝卜素含量为  $71.82\mu\text{g/g}$  FW; 由第 6 天开始, 色素含量降低, 到第 7

天仅有  $50.60\mu\text{g/g}$  FW。

将 25℃ 黑暗中培养 5d 的胶孢炭疽菌置于不同光照强度的蓝光下, 分别于 1d 和 6d 后测定菌丝类胡萝卜素含量。蓝光处理时间为 1d 的条件下,  $10.1\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  的蓝光所诱导的类胡萝卜素含量最高; 蓝光处理时间为 6d 条件下,  $12.6\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  的蓝光诱导的类胡萝卜素含量最高。

### 2.4 黑暗预处理对蓝光诱导类胡萝卜素积累的影响

分别以 25℃ 黑暗培养 4d 和 5d 的胶孢炭疽菌置于不同强度的蓝光下光照 3d。结果表明, 黑暗预培养 4d 后  $10.3\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  蓝光可诱导类胡萝卜素积累出现高峰; 而黑暗预培养 5d 后  $8.9\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  蓝光诱导类胡萝卜素积累达到最大值。两种条件下产类胡萝卜素的最大值很接近。

## 3 讨论

胶孢炭疽菌是一种可寄生于多种农林植物, 并引起农林植物较为严重病害的真菌<sup>[9]</sup>。本研究表明, 蓝光诱导该菌菌丝中类胡萝卜素的积累。通过提取胶孢炭疽菌菌丝中的色素进行可见光-紫外扫描, 可知该色素在 600 ~ 360nm 之间有吸收峰 (图 3), 但与  $\beta$ -胡萝卜素是不同的类胡萝卜素, 其结构仍有待于进一步确定。我们的研究为蓝光诱导真菌类胡萝卜素积累提供又一个实验证据。胶孢炭疽菌在黑暗和红光下无类胡萝卜素积累, 而只受蓝光的诱导, 说明在一定的波长范围内, 短波长的光照可能作为一种光信号, 激活类胡萝卜素生物合成的酶, 并促使类胡萝卜素在胶孢炭疽菌菌丝体中的生物合成, 从类胡萝卜素颗粒在菌丝中的沉积也可直接看到蓝光的作用 (图 2)。有报道<sup>[11, 12]</sup>表明, 在植物中, 蓝光通过影响类胡萝卜素合成相关酶的活性促进类胡萝卜素的合成, 而胶孢炭疽菌中是否如此还需进一步探讨。

胶孢炭疽菌类胡萝卜素在菌丝体当中的积累, 一方面受蓝光光照时间的影响, 另一方面也受蓝光强度的影响。根据研究结果, 蓝光诱导类胡萝卜素在胶孢炭疽菌中的积累可有这么 3 种情况出现: (1) 在一定蓝光光照强度范围内, 类胡萝卜素的积累随时间的增加而增加, 但到一定时间以后类胡萝卜素的积累反而减少。这可能是随菌丝体的生长和营养成分的消耗, 为类胡萝卜素生物合成的营养成分也会减少, 因此会出现类胡萝卜素生物合成过程中的时间峰值, 这种情况一般主要出现在菌丝体将要长满整个培养皿时。(2) 在一定蓝光光照强度范围内, 类胡萝卜素的积累也受光照强度的影响, 表现在低光强下, 随光照强度的增加而促使类胡萝卜素在胶孢炭疽菌菌丝体中积累, 而过强的蓝光光照反而会减弱类胡萝卜素的生物合成。(3) 黑暗预培养时间不同, 胶孢炭疽菌菌丝体的生长发育出现差异, 可能导致菌丝体对蓝光的敏感性不同。

蓝光诱导胶孢炭疽菌类胡萝卜素积累的机理和蓝光信号转导途径的阐明对于蓝光影响真菌代谢的研究有重要意义, 需要进一步的深入研究。

## 参 考 文 献

- [1] 韩建荣,王肖娟,原香娥.青霉 PT95 菌株菌核内产生类胡萝卜素的积累.微生物学通报,1998,25(6):319-321.
- [2] 韩建荣,徐 军.青霉 PT95 菌株固态发酵产生类胡萝卜素的积累.微生物学报,1999,39(2):148-153.
- [3] 戴亦军,陆 玲,秦怀兰,等.类胡萝卜素产生菌深红酵母(*Rhodotorula rubra*)的培养条件的优化研究.生物技术,1997,7(2):30-34.
- [4] 杨 文,刘 炯,吴晨曦.从红酵母中提取色素.食品与发酵工业,1993,4:24-28.
- [5] Avalos J, Cerda -Olmedo E. Carotenoid mutants of *Gibberella fujikuroi*. *Curr Genet*, 1987, 11: 505-511.
- [6] Avalos J, Bejarano E R, Cerda-Olmedo E. Photoinduction of carotenoid biosynthesis. *Methods Enzymol*, 1993, 214: 283-294.
- [7] Nelson M A, Morelli G, Carattoli A, et al. Molecular cloning of a

- Neurospora crassa* carotenoid biosynthetic gene (*albino-3*) regulated by blue light and the products of the white collar genes. *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 1271-1276.
- [8] Schmidhauser T J, Lauter F R, Russo V E A, et al. Cloning, sequence and photoregulation of *al-1*, a carotenoid biosynthetic gene of *Neurospora crassa*. *Mol Cell Biol*, 1990, 10: 5064-5070.
- [9] 刘昌芬.主要热带和亚热带经济作物的胶孢炭疽菌.云南热作科技,1995,18(4):27-29.
- [10] 黄 健,刘建国.类胡萝卜素的分析测定.青岛化工学院学报,2001,22(3):223-228.
- [11] Albrecht M, Sandmann G. Light-stimulated carotenoid biosynthesis during transformation of maize etioplasts is regulated by increased activity of isopentenyl pyrophosphate isomerase. *Plant Physiol*, 1994, 105: 529-534.
- [12] Harding R W, Shropshire W Jr. Photocontrol of carotenoid biosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol*, 1980, 31: 217-238.

Accumulation of carotenoid in *Colletotrichum gloeosporioides* induced by blue lightFU Ming-jia<sup>1,2</sup> WANG Xiao-jing<sup>1\*</sup><sup>(1)</sup> College of Life Science, South China Normal University, Guangdong Key Lab of Biotechnology for Plant Development, Guangzhou 510631, China)<sup>(2)</sup> College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang 330027, China)

**Abstract:** Blue light induced carotenoid accumulation in filamentous fungus-*Colletotrichum gloeosporioides*. The pigment particles were observed in the fungal mycelium by microscope after blue light irradiation. The pigmentation was not found in the fungal mycelium either cultured under dark condition or cultured in red light. The accumulation of the carotenoid was regulated by blue light intensity. When *C. gloeosporioides* was incubated in blue light of  $6.5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  under 28°C, carotenoid content increased with the irradiation time and reached to a peak of  $71.8\mu\text{g/g}$  FW at 5d. The treatment of dark pre-culture of *C. gloeosporioides* also had effect on the production of the pigment induced by blue light.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides*, Blue light, Carotenoid

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (30170558)

\* Corresponding author. Tel: 86-20-85216417; E-mail: wangxj@sncu.edu.cn; wangxj1955@yahoo.com

First author: mingjiafu@yahoo.com.cn

Received date: 02-21-2005

## 科学出版社生命科学编辑部新书推介

## 《DNA 科学导论》

(美)D.A.米克勒斯, G..A.弗里尔, D.A.克罗蒂 著 陈永青, 谢建平, 等译 明凤, 余龙 校

2005 年 5 月出版 ISBN 7-03-013943-7 定价 ¥5.00 元

本书是冷泉港实验室出版社出版的 DNA Science: A First Course 第二版的中文翻译版, 将 DNA 科学生动地介绍给读者, 深入浅出阐释实验技术, 展示了现今研究的最前沿, 让读者深入了解当今的实验技术, 介绍学科发展中的重要人物和他们做的一些重要实验。主要内容包括: 遗传学的基本原理、DNA 的结构和功能、基因调控、小规模及大规模的 DNA 分析技术、研究单基因的现代技术、全基因组分析的现代方法、癌症的 DNA 科学、DNA 科学在人类遗传和进化中的应用、人类物种形成问题等等。本书所包含的思想和技术是 DNA 实验操作中必需的、最基本思想和技术, 借助本书能正确地预见和阐释在未来很多年里科学发展的主流趋势。适于生物化学、分子生物学、细胞生物学、遗传学、免疫学、蛋白质组学、功能基因组学等生命科学相关领域研究所、高校相关院系、实验室的教师、研究生、科研人员, 以及生物技术企业的研发者和决策者参考阅读。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)。

邮购地址: 100717 北京东黄城根北街 16 号科学出版社 科学分社 联系人 阮芯 联系电话 010-64034622(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn> 欢迎致电索要书目 010-64012501