

doi:10.11937/bfyy.20171282

铁皮石斛围小丛壳菌的生物学特性

王 艳, 张桂芳, 闫小巧, 李一凡, 赖小平

(广州中医药大学 中医药数理工程研究院, 广东省中药新药研发重点实验室, 广东 广州 510006)

摘 要:以近期分离鉴定的铁皮石斛炭疽病原新纪录种铁皮石斛围小丛壳菌(*Glomerella cingulata*)为试材,采用组织培养的方法系统研究了铁皮石斛围小丛壳菌的生物学特性。以期找到高效快速的防治方法,以解决铁皮石斛炭疽病频繁发生且有日益加重趋势的问题。结果表明:铁皮石斛围小丛壳菌菌丝适应性强,在不同培养基均能生长,在PDA培养基上生长最快;在10~35℃下均可以生长,25~30℃下较适合菌丝体的生长,28℃菌丝生长最快,产子囊壳最多;不同光照条件下生长均较好,但光照可促进子囊壳的产生;在pH 5~12下均可生长,但pH 8时菌丝生长最快,pH 9时子囊壳产量最高;在不同碳氮源上均可生长,山梨醇对菌丝的生长最有利,在麦芽糖碳源上菌丝浓密,子囊壳的产量达到最高;菌丝对蛋白胨氮源的利用率最高。菌丝体的水浴致死条件是50℃。

关键词:铁皮石斛;围小丛壳菌;生物学特性

中图分类号:S 682.31 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2018)11-0061-06

铁皮石斛(*Dendrobium officinale* Kimura et Migo)属兰科石斛属草本植物,具有益胃生津、滋阴清热的功效。目前铁皮石斛主要来源于人工种植,除作为中药材使用外,也不断被开发成各类保健产品。随着铁皮石斛需求量的增加,其种植面积不断被扩大,主要集中在广东、云南、浙江等地区,且以大棚栽培为主。大棚栽培可以控制光照、温度、湿度、基质、种植密度等条件,不易受地理环境的影响,且铁皮石斛产量高、质量佳,所以

该种植模式被广泛应用。但铁皮石斛生长所需的高温、高湿的环境也为有害病菌提供了适宜的生长环境,尤其在大棚不易通风、使用年限较久、不及时更换基质等情况下,稍有管理不当,就易滋生病菌,加重病害。

华南地区因常年高温、湿度较大,更是各种病害高发易发的地区,而且每次爆发持续时间久^[1],该地区种植的铁皮石斛更易爆发多种病害,如白绢病(*Sclerotium rolfsii*、*Athelia rolfsii*)、黑斑病(*Alternaria tenuissima*)、茎腐病(*Fusarium incarnatum*、*Lasiodiplodia theobromae*)、灰霉病(*Botrytis cinerea*)^[2-4]、软腐病(*Pythium ultimum*)^[5]、炭疽病(*Colletotrichum dematium*)^[6]、疫病(*Phytophthora nicotianae*)^[7]等,不仅影响铁皮石斛药材外观,还影响药材的质量与产量,造成严重的经济损失。因此,防治病害的发生也成为铁皮石斛种植产业的关键环节,若要快速高效防治病害必须了解病原菌的生长特性。课题组近期鉴定出铁皮石斛炭疽病原新纪录种围小丛壳菌,为系统全面了解该病原菌,试验对已鉴定的铁皮石斛炭疽菌新纪录种围小丛壳菌(*Glomerella*

第一作者简介:王艳(1990-),女,硕士研究生,研究方向为中药资源与开发。E-mail:1479723955@qq.com.

责任作者:张桂芳(1980-),女,河南开封人,博士,副教授,现主要从事中药资源开发利用等研究工作。E-mail:zhanggf@gzucm.edu.cn.

基金项目:广东省省级科技计划科技基础条件建设领域资助项目(2014A030304059);广东省省级科技计划科技应用型科技研发专项资金资助项目(2015B020234008);国家自然科学基金资助项目(81001601);广东省优秀青年教师培养计划资助项目(yq2014042);粤港澳岭南中药综合开发研究资助项目(2014DFH30010)。

收稿日期:2017-07-18

cingulata)进行了较为全面系统的生物学特性研究,以期高效快速的防治病害提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2015年10月采集广东省潮州市饶平县铁皮石斛种植基地感染炭疽病的铁皮石斛样品,并鉴定为围小丛壳菌(*Glomerella cingulata*), Gen-Bank 登录号为 PRJNA328188。

1.2 试验方法

1.2.1 培养基的选择

将直径为5 mm的菌丝块接种到PDA培养基、马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA)、玉米粉培养基(CMA)、燕麦片培养基(OMA)、胡萝卜培养基(CA)、查氏培养基(Czapek)^[8]、水琼脂培养基(WA)上,28℃暗培养。7 d后观察菌落形态,用十字交叉法测量菌落直径,第14天观察记录子囊壳分布情况及数量,重复3次。

1.2.2 温度的选择

将直径为5 mm的菌丝块接到PDA培养基上,分别放入不同的恒温培养箱中,于10、15、20、25、28、30、35、40℃暗培养。7 d后观察菌落形态,用十字交叉法测量菌落直径,第14天观察记录子囊壳分布情况及数量,重复3次。

1.2.3 光照条件的选择

将直径5 mm的菌丝块接入PDA培养基上,在全光照、12 h光照/12 h黑暗、全黑暗3种光照条件下,28℃培养^[9]。7 d后观察菌落形态,用十字交叉法测量菌落直径,第14天观察记录子囊壳分布情况及数量,重复3次。

1.2.4 pH的选择

用1.0 mol·L⁻¹氢氧化钠或1.0 mol·L⁻¹盐酸溶液将PDA培养基调节至pH为5、6、7、8、9、10、11、12(pH计检测)。将直径5 mm的菌丝块接在含不同pH的PDA培养基上,28℃下暗培养。7 d后观察菌落形态,用十字交叉法测量菌落直径,第14天观察记录子囊壳分布情况及数量,重复3次。

1.2.5 碳、氮源的选择

以PDA培养基为基础培养基,将葡萄糖分别换成等质量的蔗糖、麦芽糖、山梨醇、甘露醇、木

薯淀粉、可溶性淀粉,以筛选最适碳源;以Czapek培养基为基础培养基,将硝酸钠分别换成等质量的硝酸钾、硝酸铵、赖氨酸、甘氨酸、蛋白胨,以筛选最适氮源。将直径5 mm的菌丝块接入不同碳源、氮源的培养基上,28℃暗培养。7 d后观察菌落形态,用十字交叉法测量菌落直径,第14天观察记录子囊壳分布情况及数量,重复3次。

1.2.6 菌丝致死温度的测定

将直径5 mm的菌丝块放入装有1 mL无菌重蒸水的2 mL洁净离心管中,每离心管放入3块。在温度为40、45、50、55、60、65、70℃的水浴锅中分别静置10 min,结束后立即取出降至室温,将菌丝块的菌丝面贴于PDA平板上,以未经处理的菌丝块为对照(CK),试验平行3次。28℃暗培养,定时观察记录各处理菌丝块的生长情况。

1.3 数据分析

采用SPSS 21.0软件对试验数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 不同培养基对菌丝生长情况的影响

由表1可知,菌丝在CA培养基上生长速率最快,菌落直径为9.22 cm,与其它培养基呈显著差异,白色气生菌丝绒状但不够浓密,背面观呈白色散射状,中间稍桔色,子囊壳也较少。PDA、OMA、Czapek培养基上菌丝生长速度无显著差异,菌落直径8 cm左右,PDA上菌丝生长非常浓密,圆形菌落较整齐,背面淡桔色至桔色,偶有深色轮环,正面白色菌丝絮状;OMA菌落背面稍黄色,中央白色絮状菌丝耸起,生长速率快但产生子囊壳少。PSA、CMA培养基上菌落直径无显著差异,PSA上菌丝生长非常浓密,背面观呈桔色,气生菌丝浓密白色,绒絮状,子囊壳产量较PDA多。CMA上菌丝较稀疏,菌落背面偶有桔色轮环。WA上菌丝生长最慢,菌落直径为5.78 cm,与其它培养基呈显著差异,且非常稀疏,不易观察,与Czapek相似均极不易产生子囊壳。培养后期有些菌落的颗粒状物上出现桔色粘液状的孢子团,将颗粒状物制成水装片观察到子囊及子囊孢子(图1)。

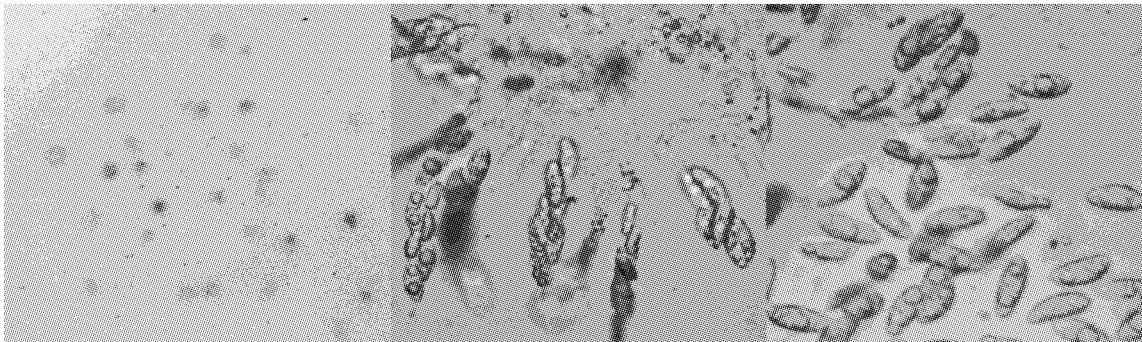


图 1 菌落上的颗粒状物(左)、围小丛壳菌子囊(中)及子囊孢子(右)

Fig. 1 Particulate matter on colony(left) ,ascus(middle) and ascospores(right) of *Glomerella cingulata*

表 1 不同培养基对菌丝生长情况的影响

Table 1 Effects of different culture media on the growth of mycelia

培养基 Culture medium	菌落直径 Colony diameter/cm	菌丝浓密度 Mycelial density	子囊壳产量 Perithecium yield
PDA	8.00±0.05c	+++++	+++
PSA	7.63±0.21b	+++++	++++
CMA	7.65±0.13b	++	++++
OMA	8.02±0.15c	++	+++
CA	9.22±0.06d	+++	++
Czapek	7.95±0.05c	+++	+
WA	5.78±0.03a	+	+

注:不同小写字母代表差异显著($P<0.05$),下同。+:菌丝非常稀疏,子囊壳数量 ≤ 5 ; ++:菌丝稀疏, $5<$ 子囊壳数量 ≤ 15 ; +++:菌丝浓密, $15<$ 子囊壳数量 ≤ 30 ; ++++:菌丝较浓密, $30<$ 子囊壳数量 ≤ 50 ; +++++:菌丝非常浓密,子囊壳数量 >50 。下同。+代表菌丝的浓密度和子囊壳的数量, +越多代表菌丝生长越浓密,子囊壳数量越多。

Note: Different lowercase letters represent significant differences ($P<0.05$), +: mycelium is very sparse, quantity of the perithecium ≤ 5 . ++: mycelium sparse, $5<$ quantity of the perithecium ≤ 15 . +++: mycelium thickening, $15<$ quantity of the perithecium ≤ 30 , ++++: mycelium is thicker, $30<$ quantity of the perithecium ≤ 50 . +++++: mycelium is very dense, quantity of the perithecium >50 . The same below. + represents the density of mycelium and the quantity of perithecium.

2.2 不同温度对菌丝生长情况的影响

由表 2 可知,温度对菌丝生长速度、浓密度及子囊壳产量影响程度较大。菌丝在 28℃ 下生长速度最快,菌落直径为 7.88 cm,与其它温度差异显著,气生菌丝浓密,产生的子囊壳与其它温度条件下相比也最多。25、30℃ 下菌丝生长也非常浓密,生长速度相近无显著差异,菌落直径分别为 6.75、6.83 cm,背面呈白色至桔色,但生长速度稍慢,30℃ 时产生的子囊壳较少一些。10~20℃ 下不易产生子囊壳,生长速度也慢,菌丝也不够浓密,背面观呈淡黄色。35℃ 时菌丝生长速度很慢,菌落直径为 1.03 cm,菌丝紧贴于培养基,菌

表 2 不同温度对菌丝生长情况的影响

Table 2 Effects of different temperature on the growth of mycelia

温度 Temperature /℃	菌落直径 Colony diameter/cm	菌丝浓密度 Mycelial density	子囊壳产量 Perithecium yield
10	2.82±0.15c	+++	+
15	4.12±0.27d	++++	+
20	4.65±0.18e	++++	+
25	6.75±0.18f	+++++	+++
28	7.88±0.16g	+++++	+++
30	6.83±0.50f	+++++	++
35	1.03±0.15b	+	+
40	0.00±0.00a	—	—

落稀疏,背面呈桔黄色,极不易产生子囊壳,生长状况很差。菌丝长时间处于 40 ℃ 下死亡,不能再萌发。

2.3 不同光照条件对菌丝生长情况的影响

由表 3 可知,光照条件对菌丝生长速度、浓密度及子囊壳产量影响程度较小。全光照条件下菌丝生长速度较慢,菌落直径为 7.27 cm,与光照与黑暗交替、全黑暗条件呈显著性差异,但能促进子囊壳的产生,气生菌丝依然白色浓密絮状,背面呈桔红色。菌丝在全黑暗、光照与黑暗交替条件下菌落直径无显著性差异,气生菌丝浓密绒絮状呈白色,菌落背面呈桔色。总的来说光照条件对菌丝浓密度几乎不产生影响,光照可促进产生子囊壳,但减慢生长速率,黑暗正好与此相反。

表 3 不同光照条件对菌丝生长情况的影响

光照条件 Light condition	菌落直径 Colony diameter/cm	菌丝浓密度 Mycelial density	子囊壳产量 Perithecium yield
全光照 Full light	7.27±0.08a	+++++	++++
12 h 光照/12 h 黑暗 12 h light/12 h dark	7.73±0.15b	+++++	+++
全黑暗 Full darkness	7.92±0.07b	+++++	+++

2.4 不同 pH 对菌丝生长情况的影响

由表 4 可知,该菌体可生长的 pH 范围很大,且菌丝生长速度、浓密度、子囊壳的产量总体较好。在 pH 5~7 时菌落依次增大,菌落直径分别为 7.92、7.95、8.10 cm,白色绒絮状的气生菌丝非常浓密,菌落背面淡桔色至桔色,子囊壳产量随 pH 的升高而增加。菌丝在 pH 为 8 时生长速度变慢,与 pH 为 5 时菌落直径无显著性差异,但子囊壳的产量达到最大值,培养后期颗粒状物上偶有淡桔色至桔色粘状孢子团。pH 为 9 时菌落直径最大为 8.60 cm,生长速率可达 1.23 cm·d⁻¹,与其它 pH 均呈显著性差异,但子囊壳产量减少,菌落背面观呈淡桔色,有 1~3 个灰色轮环。之后随 pH 的升高,生长速度随之减慢,菌丝浓密度及子囊壳产量也随之减弱,但气生菌丝依然呈白色絮状。

表 4 不同 pH 对菌丝生长情况的影响

pH	菌落直径 Colony diameter/cm	菌丝浓密度 Mycelial density	子囊壳产量 Perithecium yield
5	7.92±0.12a	+++++	+++
6	7.95±0.05ab	+++++	++++
7	8.10±0.05c	+++++	++++
8	7.93±0.06a	+++++	+++++
9	8.60±0.04f	+++++	+++
10	8.45±0.05e	++++	++
11	8.25±0.05d	+++	+
12	8.07±0.07bc	+++	+

2.5 不同碳源对菌丝生长情况的影响

由表 5 可知,菌丝体对供试的多种碳源均能有效利用。菌丝在山梨醇碳源上生长最快,菌落直径为 8.83 cm,生长速率可达 1.26 cm·d⁻¹,与其它碳源呈显著性差异,子囊壳的产量也较高,但菌丝不够浓密,中央增厚的气生菌丝呈纯白色,背面观中间发黄,菌落稍呈散射状展开,培养后期,培养基被染成灰色。其次为甘露醇、葡萄糖,菌落直径为 8.52、8.00 cm,与其它碳源也均呈显著性差异,但甘露醇产生较少的子囊壳,绒状气生菌丝白色至淡桔色,在菌落中央明显增厚,反面观呈桔黄色,生长后期变为灰黑色。麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉碳源培养基上的菌落直径无显著性差异,麦芽糖碳源上子囊壳的产量最高,菌落背面桔色至桔红色,气生菌丝白色浓密,培养后期有桔色孢子团出现;可溶性淀粉碳源上菌丝生长速率较慢,整齐的圆形菌落背面中央暗黄色,气生菌丝白色细柔。菌丝在木薯淀粉碳源上生长最差,但培养后期菌落中央出现很多桔色孢子团(图 2)。

表 5 不同碳源对菌丝生长情况的影响

碳源 Carbon source	菌落直径 Colony diameter/cm	菌丝浓密度 Mycelial density	子囊壳产量 Perithecium yield
葡萄糖 Glucose	8.00±0.05c	+++++	+++
麦芽糖 Maltos	7.67±0.24b	+++++	+++++
蔗糖 Sucrose	7.63±0.21b	+++++	++++
甘露醇 Mannitol	8.52±0.03d	++++	++
山梨醇 Sorbitol	8.83±0.12e	+++	++++
可溶性淀粉 Soluble starch	7.42±0.03ab	++++	++++
木薯淀粉 Cassava starch	7.30±0.30a	+++	+++

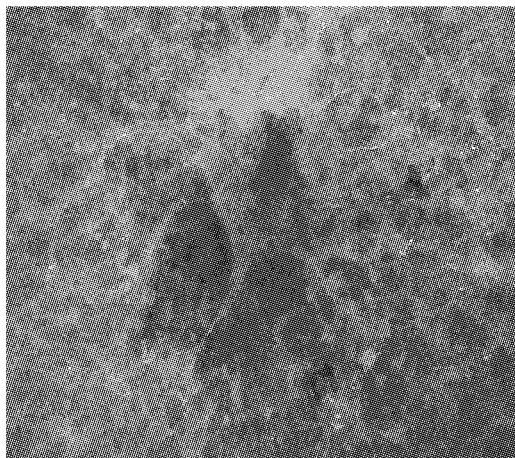


图 2 木薯淀粉碳源上的桔色孢子团
Fig. 2 Orange spore clusters on the carbon source of cassava starch

2.6 不同氮源对菌丝生长情况的影响

由表 6 所示,菌丝体对供试多种氮源的利用率有显著差异,与碳源培养基相比,菌落较为稀薄,且均不利于颗粒状物子囊壳的产生,可能与选择的基础培养基 Czapek 有关。促进菌丝快速生长的氮源为蛋白胨,菌落直径为 8.55 cm,分别与其它氮源菌落直径呈显著性差异,白色气生菌丝蓬松浓密,背面呈桔红色。其次为硝酸钾,菌落直径为 8.38 cm,也与其它氮源呈显著性差异,背面观不整齐的菌落呈辐射状,有黄色晕圈,淡黄色气生菌丝绒状。硝酸钠与甘氨酸氮源上菌丝生长速度没有显著差异,前者菌落偏黄,后者菌落偏桔色。赖氨酸氮源上菌落直径与其它氮源有显著差异,气生菌丝浅黄色絮状,不整齐的菌落淡黄色,培养后期菌丝及培养基变为灰黑色。硝酸铵菌落紧实不整齐且生长最慢,背面浅桔色至桔色,绒状气生菌丝白色至淡桔色。

2.7 菌丝致死温度的确定

40~45 °C 水浴处理后菌丝块均可生长,生长速度及菌丝浓密度与对照组相比无显著差异,40 °C 水浴处理后的颗粒状物子囊壳的产量与对照也无显著差异,45 °C 水浴处理后子囊壳产量明显下降,55 °C 以上水浴处理后菌丝不能生长。因此,该菌丝体的水浴致死温度条件为 50 °C。

表 6 不同氮源对菌丝生长情况的影响

Table 6 Effects of different nitrogen sources on the growth of mycelia

氮源 Nitrogen source	菌落直径 Colony diameter/cm	菌丝浓密度 Mycelial density	子囊壳产量 Perithecium yield
硝酸钾 Potassium nitrate	8.38±0.12d	+++	+
硝酸钠 Sodium nitrate	7.95±0.05c	+++	+
硝酸铵 Ammonium nitrate	6.25±0.10a	++++	+
赖氨酸 Lysine	7.07±0.10b	+++	+
甘氨酸 Glycine	7.85±0.05c	+++	+
蛋白胨 Peptone	8.55±0.05e	++++	+

3 讨论与结论

该研究发现铁皮石斛围小丛壳菌在 PSA、CMA 上的生长速度比 PDA 慢些,与秦建彬等^[10]的研究结果较为一致。该研究结果还表明,铁皮石斛围小丛壳菌在 10~35 °C 下均可以生长,长时间处于 40 °C 下菌丝体死亡不能再萌发,25~30 °C 下较适合菌丝体的生长,28 °C 时菌丝生长最浓密,速度最快,产生的子囊壳也最多,该结果与林雪坚等^[11]的研究一致。菌丝在全黑暗下生长速率最快,12 h 光照/12 h 黑暗下生长速率变慢,但子囊壳数量增多,全光照条件下菌丝生长显著变慢,但子囊壳的产量最高,与王冰等^[12]的光照促进产生子囊壳的研究相吻合。菌丝体在 pH 5~12 条件下生长状况均较好,但秦建彬等^[10]和林雪坚等^[11]研究发现的病原围小丛壳菌菌丝在 pH 11~12 下不能生长,但该研究分离鉴定的围小丛壳菌在 pH 11~12 下仍能生长,表明该试验菌具有很好的耐受酸碱能力。该菌对供试碳氮源的利用率较好,综合比较菌丝在葡萄糖、麦芽糖、蔗糖碳源和蛋白胨氮源上生长状况更好,该菌的水浴致死条件为 50 °C。

铁皮石斛围小丛壳菌(*Glomerella cingulata*)可在多种培养基上生长,适宜温度为 25~30 °C,对 pH 5~12 酸碱度的耐受力好,菌丝在不同光照条件下也能很好生长,并能利用葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、可溶性淀粉、木薯淀粉、硝酸钾、硝酸钠、硝酸铵、赖氨酸、甘氨酸、蛋白胨等多种不同的碳氮源,这也成为该病害寄主种类多、发生地区广、发生频繁且持久的重要因素。但在不同的培养条件下,菌落的形态、菌丝浓密度、

生长速度、子囊壳的产量均有所不同,可为广东地区高效的防治方法提供依据。

参考文献

- [1] 邱道寿,刘晓津,郑锦荣,等. 棚栽铁皮石斛的主要病害及其防治[J]. 广东农业科学, 2011(增刊): 119-120.
- [2] 曹星星. 铁皮石斛病原真菌分离与鉴定及印度梨形孢促生作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [3] 李海明, 林江波, 王伟英, 等. 铁皮石斛白绢病菌的分离鉴定与抑菌药剂筛选[J]. 福建农业学报, 2015, 30(9): 901-904.
- [4] 赵桂华, 刘国华, 赵楠. 中国铁皮石斛茎腐病的病原鉴定[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4): 780-785.
- [5] 李向东, 王云强, 王卉, 等. 金钗石斛和铁皮石斛软腐病原菌的分离和鉴定[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(4): 249-252.
- [6] 赵桂华, 赵楠. 铁皮石斛叶斑病新病原: 黑线炭疽菌的分离鉴定及致病性测定[J]. 西部林业科学, 2016, 45(3): 20-25.
- [7] 李静, 张敬泽, 吴晓鹏, 等. 铁皮石斛疫病及其病原菌[J]. 菌物学报, 2008, 27(2): 171-176.
- [8] SUTTON B C. The genus *Glomerella* and its anamorph *colletotrichum*[A]//Bailey J A and Jeger M J *Colletotrichum*; Biology, Pathology and Control, Wallingford: CAB International, 1992: 1-26.
- [9] 罗金水, 卢松茂, 余智城, 等. 柑橘黑斑病新病原亚洲柑橘叶点霉生物学特性[J]. 福建农业学报, 2016, 31(2): 170-174.
- [10] 秦建彬, 魏翠华, 江昊. 福建大花蕙兰疫病病原菌生长特性研究[J]. 福建农业学报, 2015, 30(7): 705-708.
- [11] 林雪坚, 吴光金, 陈贻金, 等. 枣树焦叶病病原及发病规律的研究[J]. 中南林学院学报, 1993, 13(1): 58-63.
- [12] 王冰, 张路, 李保华, 等. 温度、湿度和光照对苹果炭疽叶枯病菌(*Glomerella cingulata*)产孢的影响[J]. 植物病理学报, 2015, 45(5): 530-540.

Biological Characteristics of *Glomerella cingulate* From *Dendrobium officinale*

WANG Yan, ZHANG Guifang, YAN Xiaoqiao, Li Yifan, LAI Xiaoping

(Mathematical Engineering Academy of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine/Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Development and Research of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510006)

Abstract: *Glomerella cingulata* is a new record species which was recently isolated anthrax pathogen from *Dendrobium officinale*, and was used as a test material. The biological characteristics of *Glomerella cingulata* were studied by the method of tissue culture, in order to find efficient and rapid prevention and control methods. To solve the problem of frequent occurrence of anthrax of *Dendrobium officinale* and its increasing trend. The results showed that the adaptability of *Glomerella cingulata* was strong and could grow on different medium. PDA was suitable for mycelial growth. It could grow at 10—35 °C, and it was suitable for the growth of mycelium at 25—30 °C. When the temperature was 28 °C, the dense mycelia grew the fastest and produced the highest perithecia. The growth was better under different light conditions. But the light could promote the perithecia. It could grow under pH 5—12, but mycelium growth rate was the fastest when the pH was 8. The yield of perithecia was the highest when the pH was 9. It could be grown on different carbon and nitrogen sources. Sorbitol was the best for mycelia growth. The mycelia was dense in the maltose carbon source media and perithecia production reached the highest. Mycelia had the highest efficiency using to peptone. The water bath lethal temperature of mycelium was 50 °C.

Keywords: *Dendrobium officinale*; *Glomerella cingulate*; biological characteristics