

任艳玲, 刘斌, 陈艳露, 等. 东方圆盘菌 *Orbilina orientalis* 及其无性型[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(2): 57-60.

# 东方圆盘菌及其无性型

任艳玲<sup>1,2</sup>, 刘斌<sup>1</sup>, 陈艳露<sup>1</sup>, 李永江<sup>1</sup>

(1 广西大学农学院/应用微生物研究所, 广西南宁 530005; 2 贵州轻工职业技术学院, 贵州贵阳 550000)

**摘要:**【目的】东方圆盘菌 *Orbilina orientalis* 及其无性型的鉴定. 【方法】从枯树枝上采集标本; 通过子囊孢子弹射法分离到其无性型. 【结果和结论】该标本被鉴定为 *Orbilina orientalis*; 无性型被鉴定为 *Drechlerella* cf. *brochopaga*; 建立了有性型 *Orbilina orientalis* 和无性型 *Drechlerella* cf. *brochopaga* 之间的对应关系.

**关键词:** 东方圆盘菌有性型; 东方圆盘菌无性型; 有性型无性型对应关系

中图分类号: Q939.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2014)02-0057-04

## *Orbilina orientalis* and its anamorph

REN Yanling<sup>1,2</sup>, LIU Bin<sup>1</sup>, CHEN Yanlu<sup>1</sup>, LI Yongjiang<sup>1</sup>

(1 Agricultural College, Guangxi University/Institute of Applied Microbiology, Nanning 530005, China;  
2 Guizhou Light Industrial Vocational College, Guiyang 550000, China)

**Abstract:** 【Objective】To identify the *Orbilina orientalis* collected from dead branches. 【Method】Its anamorph was isolated from the ascospores of *Orbilina orientalis*. 【Result and conclusion】The anamorph was identified as *Drechlerella* cf. *brochopaga*. The connection between anamorph *Orbilina orientalis* and teleomorph *Drechlerella* cf. *brochopaga* was established.

**Key words:** *Orbilina orientalis*; *Drechlerella* cf. *brochopaga*; teleomorph-anamorph connection

Nannfeldt<sup>[1]</sup> 1932 年建立了圆盘菌科 Orbiliaceae, Fries<sup>[2]</sup> 1835 年以 *Orbilina leucostigma* Fr. 为模式种建立了圆盘菌属 *Orbilina* Fries. 该属的典型特征是子囊盘较小, 颜色鲜亮, 蜡质, 半透明. 刘斌等<sup>[3]</sup> 2007 年报道 CABI 数据库中收录了该属 247 个名称, 但其中仅有 50 个左右是圆盘菌属成员, 2001 年 Kirk 等<sup>[4]</sup> 主编的《Dictionary of the Fungi》仅承认 34 个种, 目前报道的来自中国的圆盘菌有 32 个种<sup>[3,5-16]</sup>. 该菌存在有性型和无性型, 这给真菌分类带来了巨大的挑战, 因此, 找到有性型和无性型的对应关系显得尤为重要, 本研究于 2012 年 8 月对广西武鸣县大明山地区进行了调查和研究, 发现了东方圆盘菌 *Orbilina orientalis* (Raitv.) Baral, 并通过分离得到其对应的无性型.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2012 年 8 月 3 日于广西壮族自治区武鸣县大明山采集到东方圆盘菌 *Orbilina orientalis* (Raitv.) Baral, 该标本保存于广西大学应用微生物研究所标本室. 照相及观察所用显微镜: 尼康 ECLIPSE 80i 显微镜、尼康 SZ-ST 解剖镜、尼康 Digital · Slight DS-LI 显微摄影系统.

### 1.2 形态学观察及无性型的获得

通过对标本的宏观观察和切片, 记录其形态特征并拍照. 无性型的获得是采用子囊孢子弹射法, 即用无菌的、直径为 5 mm 的打孔器在 20 g · L<sup>-1</sup> 水琼

收稿日期: 2013-04-09 优先出版时间: 2014-01-03

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20140103.0829.017.html>

作者简介: 任艳玲 (1980—), 女, 博士研究生, E-mail: 43182481@qq.com; 通信作者: 刘斌 (1966—), 男, 教授, 博士, E-mail: liubin@gxu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30860006)

脂平板中央打孔,将该琼脂块取出并贴于培养皿盖内,挑取1个子囊盘置于琼脂块表面,盖上培养皿后正置于桌上,让子囊孢子向下弹射到培养基上.培养皿盖每隔2 h 旋转1次,并在培养皿底部标记弹射的位置,弹射完毕后可获得不同的孢子印,转接到PDA培养基上,子囊孢子萌发后转接分离获得纯培养.

### 1.3 总DNA提取及系统树的构建

对该菌无性型进行纯培养,参照Doyle等<sup>[17]</sup>的方法.引物为ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; LR5: 5'-TCCTGAGGGAAACTTCG-3'. PCR反应体系: 10×PCR Buffer (含Mg<sup>2+</sup>) 5 μL, 2.5 mmol·L<sup>-1</sup> dNTP 4 μL, 1.0 μmol·L<sup>-1</sup>引物ITS1 2 μL, 1.0 μmol·L<sup>-1</sup>引物LR5 2 μL, 5 U·μL<sup>-1</sup> Taq聚合酶0.5 μL, 模板DNA 1.5 μL, 最后加双蒸水至50 μL. PCR反应条件为94℃, 5 min; 94℃ 1 min, 54℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 10 min. 将所得序列测序后与GenBank上的相关序列用Clustal X软件<sup>[18]</sup>进行对比,并用MEGA 3.0<sup>[19]</sup>中的Neighbor-Joining法构建该序列的系统发育树.

## 2 结果与分析

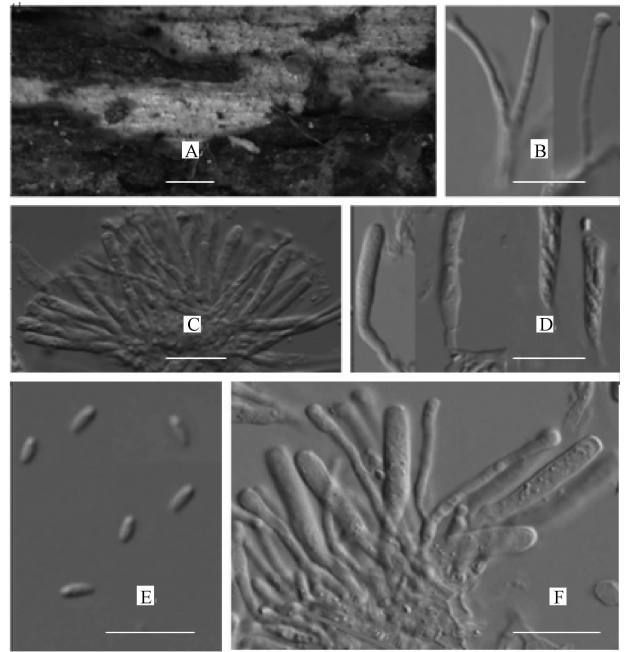
### 2.1 东方圆盘菌的形态学观察

子囊盘(图1A)表生于空中悬挂的枯树枝,无柄,蜡质,半透明,盘中央紧贴基部,光滑,平整,新鲜时半透明,浅黄色,干后橙黄色,具有平滑的边缘,盘直径为0.3~1.1 mm;外囊盘被由近球形或者球形细胞组成,直径为3.4~6.6 μm,细胞壁薄或者轻微加厚,边缘细胞加长;子囊(图1C、1D、1F)为圆柱形至棍棒形,长度为29.8~36.2 μm,宽度为3.2~4.4 μm,顶部钝圆形或者平截形,基部逐渐变细,有时呈L形,具有8个子囊孢子;子囊孢子(图1E)透明,无隔,长椭圆形至短柱形,两端钝圆,长度为3.1~4.3 μm,宽度为1.2~1.5 μm,在子囊内不重叠并且单排排列,一端具有一个折光性很强的球形孢子体,孢子体直径为0.8~1.1 μm,充满整个子囊孢子的顶端;侧丝(图1B)无色,透明,无分隔,顶端膨大成球形或轻微膨大,球形直径为2.1~2.8 μm.

### 2.2 东方圆盘菌无性型

东方圆盘菌在PDA培养基上25℃培养8 d,如图2所示,菌落直径为42 mm,边缘生长整齐且均匀;菌丝无色透明,有分隔和分枝,宽度为2.1~3.1 μm;分生孢子梗直立,长度为80~220 μm,基部宽2.1~2.8 μm,顶端常具有短的小分枝,一般为2~5个,分枝宽度为1.6~1.9 μm,长度为2.8~4.5 μm,在每个小分枝顶端着生1个分生孢子;分生孢子形

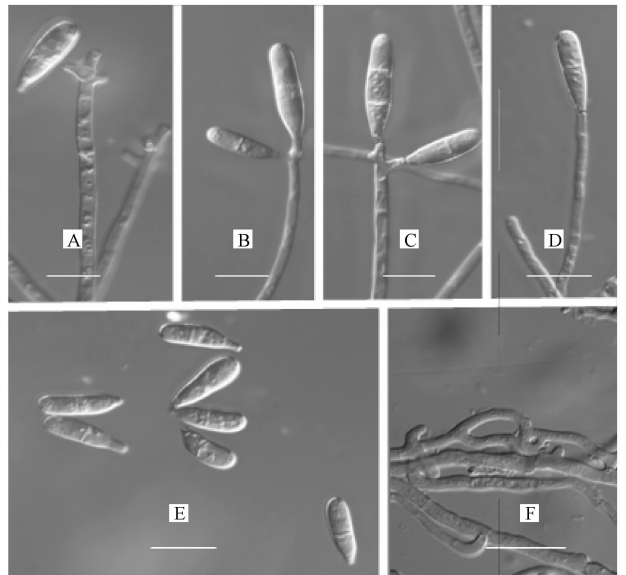
状为圆柱形至棍棒形,有的稍微弯曲,顶端半圆形,基部平截形,长度为14.3~20.9 μm,宽度为4.5~6.2 μm,1~3个分隔,以2个分隔为主.



A: 新鲜子囊盘;B:侧丝;C:子囊和侧丝;D:子囊;E:子囊孢子;F:子囊和侧丝. A:标尺=2 mm; B~F:标尺=10 μm.

图1 东方圆盘菌有性型形态特征

Fig. 1 The morphological characteristics of *Orbilia orientalis* teleomorph



A~D: 分生孢子梗和分生孢子;E:分生孢子;F:收缩环. A~F:标尺=15 μm.

图2 东方圆盘菌无性型形态特征

Fig. 2 The morphological characteristics of *Drechslerella* cf. *brochopaga* anamorph

### 2.3 分子系统学分析

对所测 *Drechslerella* cf. *brochopaga* 序列和从

GenBank 下载的 *Drechlerella brochopaga* (Drechsler) M. Scholler、*Drechlerella dactyloides* (Drechsler) M. Scholler、*Dactylella atractoides* Drechsler、*Dactylella cylindrospora* (R. C. Cooke) A. Rubner、*Orbilina querci* Bin Liu, Xing Z. Liu & W. Y. Zhuang、*Orbilina auricolor* (A. Bloxam) Sacc.、*Arthrobotrys superba* Corda、*Arthrobotrys cladodes* Drechsler、*Orbilina fimicola* Jeng & J. C. Krug、*Orbilina luteorubella* (Nyl.) P. Karst 序列用 Clustal X 软件进行对比,以 *Hyalorbilia brevisipitis* Bin Liu, Xing Z. Liu & W. Y. Zhuang 为外群,基于 ITS 序列构建系统发育树,系统发育树(图 3)用 MEGA 3.0 中的 Neighbor-Joining 法构建。

*Drechlerella cf. brochopaga* 及其相关序列构建的系统发育树明显形成 4 个聚集区,*Drechlerella cf. brochopaga*、*Drechlerella brochopaga*、*Drechlerella dactyloides* 聚集在一起,均以收缩环来捕食线虫;*Dactylella atractoides* 和 *Dactylella cylindrospora* 聚集在一起,不能诱导出捕食线虫的捕食器官;*Dactylellina haptospora* 和 *Orbilina querci* 聚集在一起,*Dactylellina haptospora* 和 *Orbilina querci* 的无性型以粘球来捕食线虫;*Orbilina auricolor*、*Arthrobotrys superba*、*Arthrobotrys cladodes* 和 *Orbilina fimicola* 聚集在一起,*Orbilina auricolor* 的无性型、*Arthrobotrys superba*、*Arthrobotrys cladodes* 和 *Orbilina fimicola* 的无性型以菌网来捕食线虫。

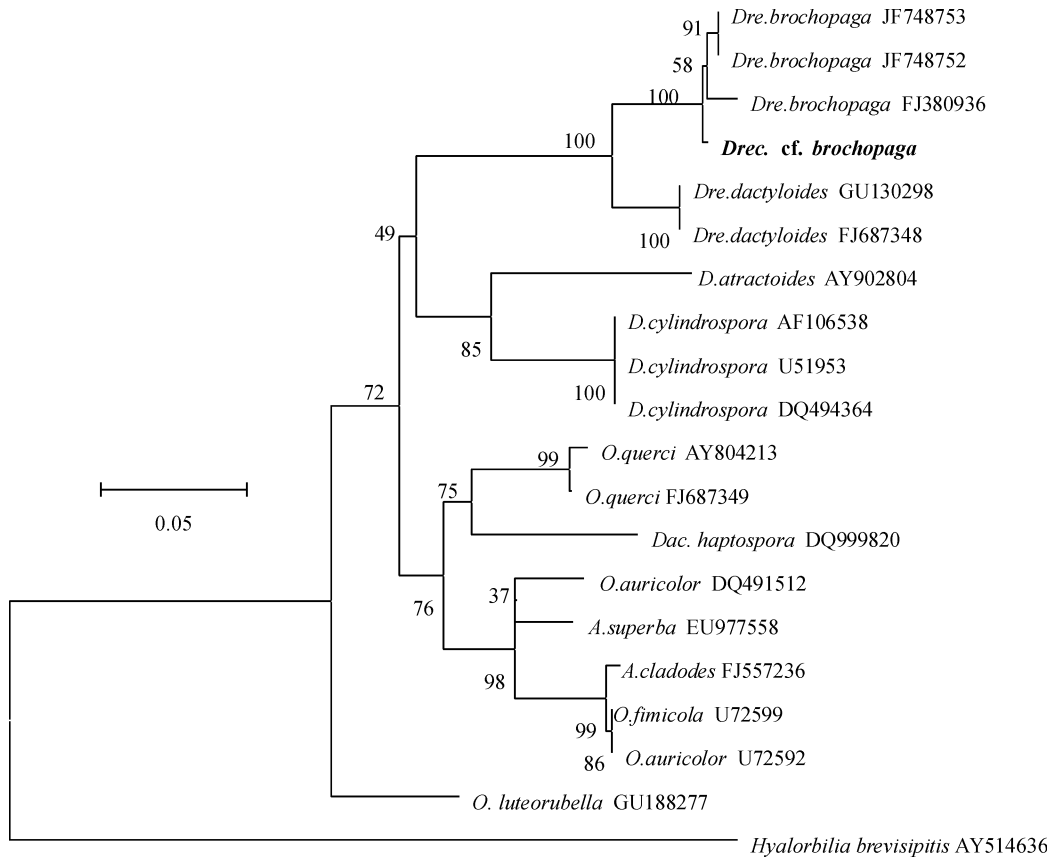


图 3 基于 ITS 序列构建的 *Drechlerella cf. brochopaga* 及其相关种的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *Drechlerella cf. brochopaga* and related species using the neighbor joining method based on ITS sequence data

### 3 讨论与结论

1991 年 Raitviir 最早报道了 *Orbilina orientalis*, 根据子囊盘边缘具有透明丝状物而将它归在 *Hyalinia* Boud. 中<sup>[20]</sup>;1994 年 Baral<sup>[21]</sup>认为子囊盘边缘具有透明丝状物在属的分类上意义不是太大,所以将 *Hyalinia* 处理为 *Orbilina* 的异名。本试验采集的材料中,子囊盘边缘没有观察到毛,这可能是种内差异造成的;*Orbilina orientalis* 与 *Orbilina epipora* Karst 子囊孢子相

似,但前者的孢子一端明显有 1 个折光性很强的孢子体,后者没有。

有性型与无性型的对应关系是真菌研究热点之一,圆盘菌属产生的无性型种类比较多,1997 年 Pfister<sup>[22]</sup>对圆盘菌属 7 个种产生的 13 个无性型菌株及 7 个来源于分生孢子的菌株进行 rDNA 18S 和 ITS 区间的序列分析,建立了系统发育树,所有供试的菌株均能很好地聚于圆盘菌科内。1997 年 Liou 等<sup>[23]</sup>也来自于 29 种捕食线虫丝孢菌和 5 种非捕食的种类

进行 ITS 及 5.8S 片段的序列分析,结果表明 28 种捕食线虫丝孢菌可根据捕食器官聚类为 4 个类群,即黏网、收缩环、有柄黏球和非收缩环、黏性柱和无柄黏球。本研究用东方圆盘菌的无性型菌株序列和 GenBank 下载的其他圆盘菌序列或者相关序列构建系统发育树,从系统发育树可以看出,该结果和 Liou 等<sup>[23]</sup>1997 年得出的结果相似,这些序列明显形成 4 个聚集区,即以收缩环来捕食线虫的聚集区、以粘球来捕食线虫的聚集区、以菌网来捕食线虫的聚集区和不能捕食线虫的聚集区。东方圆盘菌的无性型在系统发育树中位于以收缩环来捕食线虫的聚集区,这和形态学观察到的结果是一致的。另外,此无性型和 *Drechlerella brochopaga* 聚集在一起,形态上两者也比较相似,应该是同一个种,但两者之间也有一些不同,如前者分生孢子梗顶部为短分枝,后者分生孢子梗顶部为不明显的瘤突,并且前者产生的分生孢子也比后者小,两者的 ITS 序列也存在有差异,在此鉴定为 *Drechlerella cf. brochopaga*。

东方圆盘菌的无性型可以产生捕食线虫的收缩环,而捕食线虫真菌是线虫病害的一个重要的生防因子,该菌经过进一步研究可以开发成生防制剂,用于农业线虫病害的防治,从而避免使用化学农药防治线虫病害带来的化学残留和环境污染,在经济和生态学上具有重要的价值。

#### 参考文献:

- [1] NANNFELDT J A. Studien über die morphologie und systematik der nicht-lichenisierten inoperculaten discomyceten; Series 8 [M]. Uppsala: A. B. L. Norblands Bokhandel, 1932: 5-337.
- [2] FRIES E M. Corpus florarum provincialium sueciae, I. floram scanicam [M]. Montana: Nabu Press, 1983: 394.
- [3] 刘斌, 刘杏忠, 庄文颖, 等. 圆盘菌属中国新记录种 [J]. 菌物学报, 2007, 26(4): 575-581.
- [4] KIRK P M, CANNON P F, DAVID J C, et al. Ainsworth & Aisby's dictionary of the fungi [M]. 9<sup>th</sup> Ed. Oxon: CABI Europe-UK, 2001.
- [5] YU Zefen, QIAO Min, ZHANG Ying, et al. *Pseudotriponidium*, a new anamorph genus connected to *Orbilia* [J]. Mycologia, 2011, 103(1): 164-173.
- [6] ZHANG Y, YU Z F, BARAL H O, et al. New species and records of *Orbilia* (Orbiliaceae, Ascomycota) from China [J]. Fungal Divers, 2009, 36: 141-153.
- [7] LIU Bin, LIU Xingzhong, ZHUANG Wenying, et al. Orbiliaceous fungi from Tibet, China [J]. Fungal Divers, 2006, 22: 107-120.
- [8] SU H Y, ZHANG Y, BARAL H O, et al. Four new spe-

- cies of *Orbiliaceae* from Yunnan, China [J]. Mycol Prog, 2011, 10(3): 373-381.
- [9] QIAO Min, ZHANG Ying, LI Shifu, et al. *Orbilia blumenaviensis* and its *Arthrobotrys* anamorph [J]. Mycol Prog, 2012, 11(1): 255-262.
- [10] LIU Bin, LIU Xingzhong, ZHUANG Wenying. *Orbilia querci* sp. nov. and its knob-forming nematophagous anamorph [J]. FEMS Microbiol Lett, 2005, 245(1): 99-105.
- [11] YU Zefen, KONG Yanjie, ZHANG Ying, et al. A new *dactylella* species from *Orbilia alba* [J]. J Microbiol, 2009, 47(3): 265-269.
- [12] YU Zefen, QIN Li, ZHANG Ying, et al. A new *Drechlerella* species isolated from *Orbilia cf. orientalis* [J]. Mycotaxon, 2009, 110: 253-259.
- [13] ZHANG Ying, YU Zefen, QIAO Min, et al. A new species of *Orbilia* from China [J]. Cryptogamie Mycol, 2006, 27(4): 289-294.
- [14] YU Z F, ZHANG Y, ZHANG K Q. *Orbilia dorsalia* sp. nov., the teleomorph of *Dactylella dorsalia* sp. nov. [J]. Cryptogamie Mycol, 2007, 28(1): 55-63.
- [15] YU Zefen, QIAO Min, ZHANG Ying, et al. *Orbilia vermiformis* sp. nov. and its anamorph [J]. Mycotaxon, 2007, 99: 271-278.
- [16] LI S F, YU Z F, ZHANG Y, et al. *Arthrobotrys nonseptata*, a new anamorph from an *Orbilia species* [J]. Mycotaxon, 2009, 109: 247-254.
- [17] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11-15.
- [18] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The CLUSTAL-X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [19] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Brief Bioinform, 2004, 5(2): 150-163.
- [20] 刘斌. 中国圆盘菌科分类及分子系统学研究 [D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2006.
- [21] BARAL H O. Comments on "outline of the ascomycetes-1993" [J]. Syst Ascomycetum, 1994: 113-128.
- [22] PFISTER D H. *Castor, pollux* and the life histories of fungi [J]. Mycologia, 1997, 89(1): 1-23.
- [23] LIU G Y, TZEAN S S. Phylogeny of the genus *Arthrobotrys* and allied nematode-trapping fungi based on rDNA sequences [J]. Mycologia, 1997, 89(6): 876-884.

【责任编辑 霍 欢】