

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201707021

## 白及植株上一种真菌病害的分离与鉴定\*

柯尚艳<sup>1#</sup>, 杨林毅<sup>1#</sup>, 陈 潞<sup>1</sup>, 孙 媛<sup>2</sup>, 李孟霞<sup>3</sup>, 文国松<sup>3</sup>, 赵明富<sup>1\*\*</sup>, 徐绍忠<sup>3\*\*</sup>

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 云南 昆明 650201; 2. 文山州植保植检站, 云南 文山 663099;

3. 云南农业大学, 云南省中药材规范化种植技术指导中心, 云南 昆明 650201)

**摘要:**【目的】为明确引起白及叶片产生黑褐色轮纹状干枯的病原菌。【方法】将采自云南省富宁县的该病害样品进行分离纯化, 并通过初步形态学鉴定; 进一步通过柯赫氏法则再次验证分离得到的菌株是否能引起白及发病; 通过形态学观察和 rDNA-ITS 序列分析的方法鉴定该菌。【结果】该菌株能引起白及发病, 并最终鉴定出该菌为黑轮层炭壳(*Daldinia* sp.), 菌株编号 BJ-HLCTK。显微结构观察结果: 中间黑褐色, 边缘灰白色, 同心轮纹, 贴基生长, 气生菌丝生长较慢, 菌丝呈绒毛状; 菌丝有隔膜, 具分枝, 宽 9~20 μm, 平均宽 13 μm。孢子不等边椭圆形或肾脏形, 11~16 (17.8) μm×6~9 (10.2) μm。ITS 序列与黑轮层炭壳菌(*Daldinia concentrica*) 同源性最高, 相似度达 97.1%。【结论】菌株 BJ-HLCTK 属于炭球菌属(*Daldinia* sp.), 与该属真菌黑轮层炭壳种(*D. concentrica*) 最为接近。该菌主要危害多种阔叶树种, 被害木质部形成杂斑腐朽。本研究首次报道该病原菌自然侵染白及。

**关键词:** 白及; 黑轮层炭壳菌; 分离与鉴定

中图分类号: S 435.672

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2018) 03-0405-05

## Isolation and Identification of a Fungal Disease from *Bletilla striata*

KE Shangyan<sup>1</sup>, YANG Linyi<sup>1</sup>, CHEN Lu<sup>1</sup>, SUN Yuan<sup>2</sup>, LI Mengxia<sup>3</sup>,WEN Guosong<sup>3</sup>, ZHAO Mingfu<sup>1</sup>, XU Shaozhong<sup>3</sup>

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. Station of Plant Protection and Quarantine in Wenshan Prefecture, Wenshan 663099, China; 3. Standardized Production Technical Guidance Center of Chinese Medicinal Materials, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** [Purpose] In order to clear the pathogen causing leaf lesion with brown-black circle spot of *Bletilla striata*. [Method] This study was isolated and purified the sample of *B. striata* collected from Funing County, Yunnan Province, through morphological identification and verification of Koch's Postulates to verify if the strain could cause the same disease of *B. striata*. [Result] The strain could cause the same disease of *B. striata* as the sample, and it was finally identified as *Daldinia* sp. by morphological observation and rDNA-ITS sequence analysis. The strain was numbered BJ-HTKLC, the colony morphology and microstructure were described as following: black brown in middle, marginal gray, concentric whorl, attachment base growth, aerial mycelium growth slower,

收稿日期: 2017-07-17

修回日期: 2017-12-12

网络出版时间: 2018-06-26

\*基金项目: 云南省科技惠民项目(2015RA083)。

作者简介: #对本文贡献等同, 为并列第一作者。柯尚艳(1992—), 女, 陕西安康人, 在读硕士研究生, 主要从事植物病理研究。E-mail: 2418842523@qq.com; 杨林毅(1992—), 男, 河南林州人, 在读硕士研究生, 主要从事植物病理研究。E-mail: 13503804902@163.com

\*\*通信作者 Corresponding authors: 赵明富(1975—), 男, 云南宣威人, 博士, 副教授, 主要从事植物病理和微生物研究。E-mail: zhaomingfu@163.com; 徐绍忠(1969—), 男, 云南昆明人, 博士, 副教授, 主要从事中药材研究。E-mail: 2737308675@qq.com

网络出版地址: [http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).201707021](http://dx.doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).201707021)

hyphae villous; hyphae with septa, branched, 9-20  $\mu\text{m}$  wide, average 13  $\mu\text{m}$  wide, spore morphology were elliptical or kidney line, 11-16 (17.8)  $\mu\text{m} \times 6-9$  (10.2)  $\mu\text{m}$ . ITS sequence had the highest similarity to *D. concentrica*, which was 97.1%. [Conclusion] BJ-HLCTK belongs to the genus of *Daldinia* sp., and which has the highest close to fungus *D. concentrica* species (*D. concentrica*). The fungus is mainly harmful to a variety of broad-leaved tree species and damaged xylem to form mottled rot. In this study, we first reported that the host of this pathogen was *Rhizoma Bletillae*.

**Keywords:** *Bletilla striata*; *Daldinia concentrica*; isolation and identification

白及 [*Bletilla striata* (Thunb. ex A. Murray) Rchb. f.] 为兰科 (Orchidaceae) 白及属 (*Bletilla* Rchb. f.) 地生植物, 主要分布于贵州、云南、四川等省, 在长江流域及其以南各省区亦有分布<sup>[1]</sup>。据目前报道白及属植物约有 6 种, 主要分布于缅甸北部经中国至日本。中国主产 4 种, 分别为华白及 (*B. sinensis*)、黄花白及 (*B. ochracea* Schhr.)、小白及 [*B. formosana* (Hayata) Schhr.] 和白及 (*B. striata*)。分布于北起江苏、河南, 南至台湾, 东起浙江, 西至西藏东南部<sup>[2]</sup>。据 GUAN 等<sup>[3]</sup>研究表明: 中国目前利用各种色谱技术已从白及块茎中分离得到 17 种化合物, 有广泛的药用价值及园林价值。白及块茎具有收敛止血、消肿生肌、清热利湿的功效, 用于治疗咯血、外伤出血、疮疡肿毒、皮肤皲裂等症状<sup>[3-4]</sup>; 其花色丰富, 端庄典雅, 有白色、粉色和蓝色等多种色调<sup>[5]</sup>, 被誉为“中国洋兰”, 具有很高的观赏价值, 常用于花径、花坛及林下的地被植物等。魏进等<sup>[6]</sup>报道白及常见的病害有茎腐病 (*Tubercularia abutilonis* Katsura)、根腐烂病 (*Helicobasidium albicans*)、叶褐斑病 (*Sphaeropsis cruenta*)、叶斑灰霉病 (*Botrytis cinerea*)。本研究于白及病害样品中鉴定出的黑轮层炭壳菌 (*Daldinia concentrica*), 不但影响白及的药用价值和观赏价值, 而且会削弱长势, 严重时则导致白及枯死, 造成重大经济损失和药用价值。本研究旨在确定云南省富宁县白及植株上的病害, 对其病原进行分离鉴定, 明确其分类地位, 以期探索该病害的防治措施提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集和病原菌分离

2016 年 9 月 10 日, 从云南富宁采集白及发病植株以及健康白及植株若干, 带回实验室进行病原菌的分离和纯化。选取病叶, 切取病健交界

处的组织用无菌水冲洗 3 次, 随后在 75% 乙醇中表面消毒 3~5 min, 最后再用无菌水冲洗 3 次, 放在灭菌的滤纸上吸干水分, 然后剪成约 5.0 mm  $\times$  5.0 mm 的组织块, 置于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 平板上, 在 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 3~4 d 后, 挑取菌落边缘的菌丝转接培养、纯化。另外, 取健康植株外植体进行组织培养, 为后续的回接试验做准备。

### 1.2 致病性试验

将供试菌株在 PDA 平板上活化培养 7~8 d 后, 用无菌的、直径为 5.0 mm 的打孔器打取菌饼。选取温室种植 10 个月的健康白及, 用灭菌小刀将白及嫩叶表皮轻微划 2 个伤口, 把菌饼正面贴向伤口, 用已浸湿无菌水的无菌脱脂棉保湿。试验设置 3 次重复, PDA 作为空白对照, 跟踪观察致病结果并做好记录, 若发病, 则对病斑再进行组织分离, 分离得到与原始接种菌株培养特征一致的菌株则可确定为该病的病原菌。

### 1.3 病原菌形态特征观察

将分离获得的病原菌接种在 PDA 平板上培养 3 d 后, 进行菌落形态观察和显微形态鉴定, 具体方法参照《中国真菌志》<sup>[7]</sup>以及《真菌鉴定手册》<sup>[8]</sup>。之后将菌株接种到马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PSA 培养基有利于产生孢子), 置于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中, 培养 7 d 后待菌丝布满整个培养基之后, 采取两种方法进行光学显微镜观察病原菌孢子形态特征。方法一: 常规观察, 即挑取适量菌丝于载玻片上, 具体制片流程参照《微生物学实验》(第 4 版); 方法二: 快速徒手切片观察, 直接取病原菌组织进行培养, 具体操作方法参照张书敏等<sup>[9]</sup>的方法, 略有改进。

### 1.4 病原菌 rDNA-ITS 序列 PCR 扩增与分析

1.4.1 基因组 DNA 的提取以及 rDNA-ITS PCR 扩增  
对在 28  $^{\circ}\text{C}$  恒温条件下于 PSA 平板上纯化培养 7 d 的病原菌进行真菌总 DNA 提取, 具体方

法参考文献[10-11]的方法。利用真菌扩增通用引物对扩增提取的病原菌 rDNA 的 ITS 区。

ITS1: 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3';

ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。

采用 2×Power Taq PCR MasterMix 试剂盒进行 PCR 扩增, 其反应总体积为 50 μL: 11 μL DNA 模板, 2×Power Taq PCR MasterMix 酶 25 μL, 1 对引物 ITS1/4(10mmol/μL) 各 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 10 μL。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 40 s; 55 °C 退火 40 s; 72 °C 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 保温 10 min, PCR 产物于 4 °C 暂时保存, 取出后, 放于 -20 °C 保存。取 3 μL PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (100 V, 37 min), 检测, 将符合预期大小片段的 PCR 产物条带纯化, 委托铂尚生物技术 (上海) 有限公司完成测序。用 Bioedit 软件和 BLAST 进行多序列比对分析, 提交序列至 GenBank。

#### 1.4.2 序列分析

将测序之后的序列输入 NCBI 数据库, 进行 BLAST 比对, 在 GenBank 数据库中下载同源性较高的 7 个菌株核苷酸序列, 采用 Bioedit 软件进行多序列比对, 将已下载的菌株序列与黑轮层炭壳菌进行核苷酸序列同源性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 病害症状

该病原菌主要危害白及叶缘和叶尖, 侵染初期, 主要表现为叶片失绿发黄, 表面干枯。侵染中后期, 叶片失去水分和养分, 由边缘向中间逐渐形成黑色轮层, 形似被火烧过一般 (图 1)。

### 2.2 病原菌致病性确定

通过对感病样品的分离和纯培养, 获得菌株 BJ-HLCTK, 在回接试验中, 该菌在白及叶片上再次发病, 接种后每天进行形态观察并记录相关症状变化情况, 持续观察 10 d 左右, 发现此症状与之前采样的白及病症一致 (图 2)。

### 2.3 病原菌形态特征

#### 2.3.1 菌落形态特征

初期菌落生长较慢, 近圆形, 较整齐, 正面深灰色至灰白色, 贴基生长, 气生菌丝生长较慢, 呈绒毛状; 背面中间呈现黑褐色, 边缘灰白色, 培养后期菌丝黑褐色, 有同心轮纹 (图 3), 无异味, 生长速度 7.92~9.84 mm/d。



注: 红色箭头指向是明显病害症状。

Note: The red arrow is pointing to the obvious symptoms of disease.

图 1 富宁白及叶部黑轮层炭壳菌的危害症状

Fig. 1 Symptoms of *D. concentrica* on *B. striata* from Funing



图 2 温室白及接种发病症状图

Fig. 2 Symptom caused by the inoculated fungus on *B. striata* in greenhouse

### 2.3.2 病原菌显微形态观察

在光学显微镜下观察菌丝、孢子形态, 结果显示: 菌丝体具隔膜, 有分支, 宽 9~20 μm, 平均宽 13 μm (图 4)。轮层炭壳属真菌因子座相对较大, 子座内部具深浅不同的轮纹, 易于鉴定。接种发病的白及叶片组织徒手切片观察, 发现孢子不等边椭圆形或肾脏形, 大小 11~16 μm×6~9 μm (图 5)。

### 2.4 rDNA-ITS 序列分析

BJ-HLCTK 经扩增获得片段大小为 575 bp, 登录号 KR154932, 与相关分离物在相应区域进行核苷酸序列同源性分析 (表 1) 表明: BJ-HLCTK 与序列登录号为 KC895542 的 *D. eschscholtzii* 相似度达 97.1%; 与序列登录号为 GU066682 *Daldinia* sp. 的核苷酸序列同源性为 96.8% (表 2)。

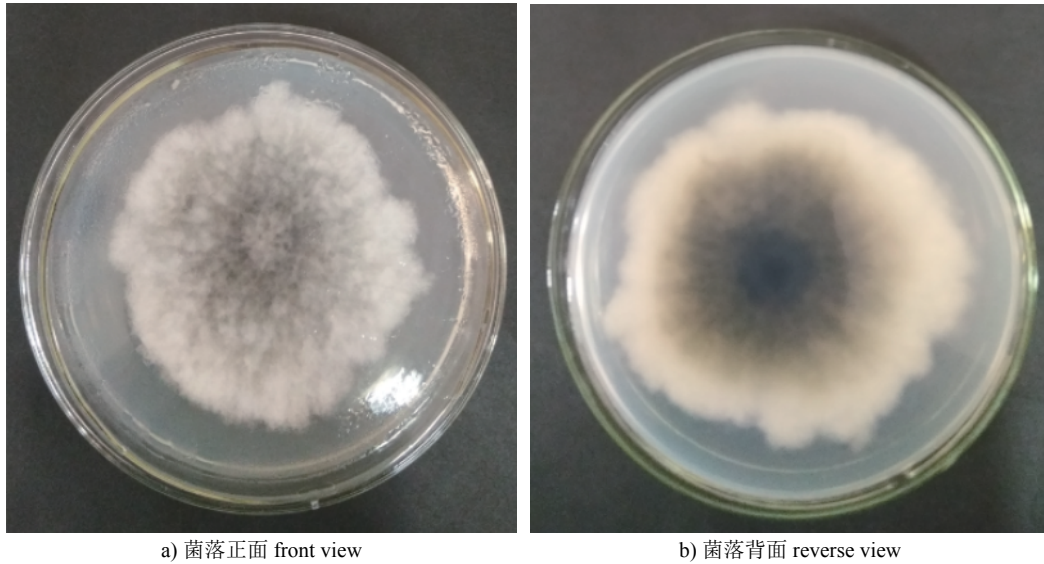


图 3 病原菌菌落形态特征

Fig. 3 Morphology of colonies characteristics



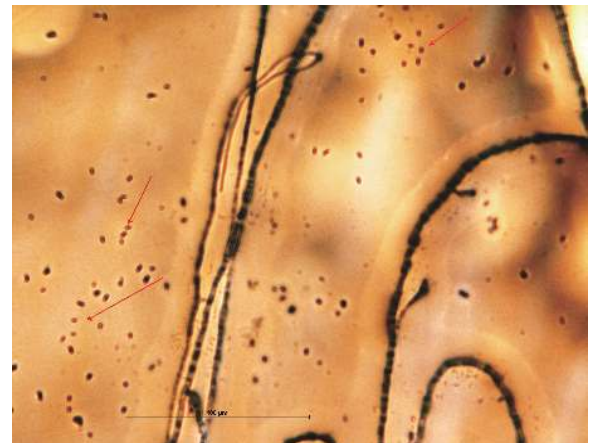
图 4 病原菌菌丝特征 (×40)

Fig. 4 Microscopic characteristics of hyphal structure of pathogenic fungi

表 1 用于同源性分析的相关菌株信息

Tab. 1 Information about the related strains used for homology analysis

登录号 accession No.	菌株 strain	来源 origin
KU571495	<i>Daldinia</i> sp.	印度 India
KC895542	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	
KR016835	fungal endophyte	巴布亚新几内亚 Papua New Guinea
GU066682	<i>Daldinia</i> sp.	马来西亚 Malaysia
GU222391	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	
KT355731	<i>Daldinia</i> sp.	印度 India
KU317718	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	中国 China



注：红色箭头指向部分是孢子。

Note: The red arrows point to the spores.

图 5 病原菌孢子特征 (×40)

Fig. 5 Microscopic characteristics of spore of pathogenic fungi

### 3 讨论

近年来，由于白及巨大的药用价值和市场需求，其栽培模式多样化，导致病原菌基数连年加大。目前发现该病原菌对云南富宁地区白及种植危害严重，造成品质和产量下降，导致大面积减产。

本研究通过对白及病原菌的分离和纯化，依据病原菌菌落和菌株显微形态观察，再结合分子鉴定，最后初步确定引起白及叶片碳化的病原分类地位，即该病原菌为轮层炭壳菌属，与黑轮层炭壳菌 (*D. onsenrica*) 最为接近。该菌系炭角菌

表 2 相关菌株相应区域核苷酸序列同源性比较  
Tab. 2 Comparison of nucleotide sequence homology of related strains

序列 sequence	LCTK	KC895542	KU571495	KR016835	GU066682	GU222391	KT355731	KU317718
BJ-HLCTK		97.1	95.2	59.6	96.8	94	92.2	96.7
KC895542	97.1		97	60.7	94.9	95.6	93.6	95.1
KU571495	95.2	97		63.1	97.2	95.9	96.5	94.4
KR016835	59.6	60.7	63.1		63.4	60.9	63.2	59.1
GU066682	96.8	94.9	97.2	63.4		94.6	98.1	91.3
GU222391	94	95.6	95.9	60.9	94.6		93.6	93.1
KT355731	92.2	93.6	96.5	63.2	98.1	93.6		91.1
KU317718	96.7	95.1	94.4	59.1	91.3	93.1	91.1	

目 (*Xylaria*)、炭角菌科 (*Xylariaceae*)、轮层炭壳属 (*Daldinia*)<sup>[12]</sup>。据有关研究表明: 黑轮层炭壳菌含有酮类色素——轮层炭壳酮 *Daldinones A* 和 *B*<sup>[13]</sup>。另外, STADLER 等<sup>[14]</sup>和尤雅等<sup>[15]</sup>发现: 黑轮层炭壳菌 (*D. concentrica*) 存在三萜类化合物, 也有相关报道该菌分泌 1 种新型联萜和 3 种新型的二苯甲酮衍生物抑制植物生长活性<sup>[16]</sup>。本研究首次从兰科植物白及上分离到轮层炭壳菌属真菌, 并经致病性验证初步确认其分类地位。该属真菌主要危害多种阔叶树种, 如白蜡树、山毛榉、枫树等, 其树枝被害木质部形成杂斑腐朽, 是木材腐朽菌之一<sup>[17-18]</sup>。本研究首次报道该病原真菌侵染白及。

#### [参考文献]

- MABBERLEY D J. The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants[M]. London: Cambridge University Press, 1997.
- 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 18 卷[M]. 北京: 科学出版社, 1999.
- GUAN H Y, YAN Y, WANG Y L, et al. Isolation and characterization of two new 2-isobutylmalates from *Bletilla striata*[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2016, 14(11): 871. DOI: 10.1016/S1875-5364(16)30104-2.
- 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- 陈灿, 陈海霞. 白芨繁殖研究进展[J]. 湖南农业科学, 2015(5): 135. DOI: 10.16498/j.cnki.hnnykx.2015.05.048.
- 魏进, 周玮, 李汶银. 贵州省白及病虫害种类调查与防治分析[J]. 现代农业科技, 2015(21): 150. DOI: 10.3969/j.issn.1007-5739.2015.21.088.
- 郭英兰, 刘锡琰. 中国真菌志: 第 20 卷: 菌绒孢属、钉孢属、色链隔孢属[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- 张书敏, 刘红云, 程金金, 等. 快速徒手切片法观察谷子和水稻叶片显微结构[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(7): 1527. DOI: 10.13417/j.gab.034.001527.
- HE Y Q. An improved protocol for fungal DNA preparation[J]. 菌物系统, 2000, 19(3): 434. DOI: 10.13346/j.mycosystema.2000.03.030.
- 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- 马海霞, LARISSA V, 李玉. 中国大陆地区轮层炭壳菌属的分类学研究[C]//中国菌物学会学. 2012 年中国菌物学会学术年会会议摘要, 2012.
- 曾详谓, 崔宝凯, 徐梅卿, 等. 中国储木及建筑木材腐朽菌 (II)[J]. 林业科学研究, 2008, 21(6): 783. DOI: 10.3321/issn:1001-1498.2008.06.009.
- STADLER M, BAUMGARTNER M, GROTHE T, et al. Concentricol, a taxonomically significant triterpenoid from *Daldinia concentrica*[J]. Phytochemistry, 2001, 56(8): 787. DOI: 10.1016/S0031-9422(01)00032-2.
- 尤雅, 姚珂, 贺新生. 光炭轮菌菌丝体培养条件研究[J]. 食品与发酵科技, 2014, 50(3): 46.
- HASHIMOTO T, TAHARA S, TAKAOKA S, et al. Structures of a novel binaphthyl and three novel benzophenone derivatives with plant-growth inhibitory activity from the fungus *Daldinia concentrica*[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 1994, 42(7): 1528. DOI: 10.1248/cpb.42.1528.
- 马海霞. 中国炭角菌科几个属的分类与分子系统学研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- 吴兴亮, 李泰辉, 宋斌, 等. 贵州木材腐朽菌物[J]. 贵州科学, 2010, 28(2): 8. DOI: 10.3969/j.issn.1003-6563.2010.02.002.

责任编辑: 何馨成