

萱草叶斑病的病原鉴定及其生物学特性

高 晋¹, 曾桂萍¹, 宋莉莎¹, 赵 致^{1,2}, 李 忠^{1,2,*}

(¹贵州大学农学院, 贵阳 550025; ²贵州省药用植物繁育与种植重点实验室, 贵阳 550025)

摘 要: 为明确在贵州发现的萱草 (*Hemerocallis fulva*) 叶斑病病原菌及其生物学特性, 采用组织分离法和离体接种法分别对其病原菌进行分离和致病性测定, 利用形态学及 ITS 基因序列分析对病原菌进行鉴定并对其生物学特性进行研究。鉴定结果表明: 分离得到的萱草叶斑病病原菌株 (编号为 XCS369) 的菌丝为灰白色、绒毛状, 菌落中心隆起呈灰褐色, 背面橄榄绿色, 培养 15 d 表面可产生白色孢子粉; 分生孢子光滑, 无色, 椭圆至长椭圆形。在以 ITS 基因序列构建的系统发育树中, XCS369 与古巴炭角菌 (*Xylaria cubensis*) 聚于一支, 且支持率达 99%, 结合形态特征与系统发育分析将其鉴定为古巴炭角菌。该菌菌丝最适生长温度为 25~28 °C, 最适 pH 7, 在马铃薯葡萄糖培养基上生长最快, 对碳源麦芽糖、氮源酵母浸粉的利用最高, 菌丝生长对光照不敏感。

关键词: 萱草; 叶斑病; 病原鉴定; 古巴炭角菌; 生物学特性

中图分类号: S 948.116

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2020) 01-0169-10

Identification and Biological Characteristics of Pathogen Causing Leaf Spot Disease of *Hemerocallis fulva*

GAO Jin¹, ZENG Guiping¹, SONG Lisha¹, ZHAO Zhi^{1,2}, and LI Zhong^{1,2,*}

(¹Agriculture College, Guizhou University, Guiyang 550025, China; ²Guizhou Key Laboratory of Medicine Plants Breeding and Cultivation, Guiyang 550025, China)

Abstract: To clarify the pathogen causing leaf spots of *Hemerocallis fulva* in Guizhou Province and its biological characteristic, the pathogen was obtained by using the method of tissue isolation. Its pathogenicity was tested *in vitro* inoculated leaves, and the pathogen was classified and identified with morphology and ITS gene sequence analyse, the biological characteristic of pathogen were also studied. The results showed that the strain isolated from leaf brown spots of *Hemerocallis fulva* was numbered as XCS369, its main diagnostic feature were as followed: the mycelia was grayish white and villous, colony center ridge is taupe, back olive green, and the back of colonies were olive green. After 15 days of cultivation, it could produce white sporangium powder. Its smooth and colorless conidia appeared elliptical or oblong. The phylogenetic tree based on ITS gene sequence showed that XCS369 strain was clustered together with *Xylaria cubensis*, supported by 99%. Together with the morphology characteristics and phylogenetic analysis, it was identified as one member of *Xylaria cubensis*. The research of biological characteristics showed that the mycelia of XCS369 strain grew faster on potato dextrose medium of pH 7

收稿日期: 2019-09-05; **修回日期:** 2019-10-06

基金项目: 贵州省人才基地建设项目 (黔人领发[2013]15号); 科技部科技惠民计划项目 (2013GS520101-08)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhongzhongligzu@163.com)

and had the highest utilization of carbon source maltose and nitrogen source yeast extract powder at 25 - 28 °C, and it was insensitive to light.

Keywords: *Hemerocallis fulva*; leaf spot disease; pathogens identification; *Xylaria cubensi*; biological characteristics

萱草 (*Hemerocallis fulva*) 是百合科 (Liliaceae) 多年生宿根草本植物 (张俊 等, 2018)。中国是萱草属植物种类最全、分布范围最广的国家, 其有 14 个种, 中国原产 11 个种, 占全世界的 80% (赵天荣 等, 2015; 任阳, 2017)。萱草具有较高的药用价值, 其入药的部位主要为萱草根和萱草花, 具有清热利尿、凉血止血的功效 (冯博, 2013; 黄昕蕾, 2013); 医学研究发现, 萱草还具有抗抑郁、抗氧化和分解脂肪的作用 (Kaneshiro et al., 2005; Bor et al., 2006; 陈国中 等, 2008)。此外, 萱草还是我国传统的庭院观赏植物, 具有极佳的观赏价值 (尤静, 2013; 张伟, 2014)。

目前, 萱草上各类病害频发, 严重影响了其产量和品质。已报道的萱草病害主要包括由柄锈菌 (*Puccinia hemerocallidis*) 引起的锈病 (蔡祝南 等, 2002)、齐整小核菌 (*Sclerotium rolfsii*) 引起的白绢病 (董国堃 等, 2005)、百合科刺盘孢 (*Colletotrichum liliacearum*) 引起的炭疽病 (姜风丽 等, 1996)、泡状葡萄柄霉菌 (*Stemphylium vesicarium*) 引起的叶枯病 (罗宽和任新国, 1991) 以及 *Kabatiella microsticta* 引起的叶枯病 (白庆荣 等, 2013) 等。然而, 关于萱草叶斑病的研究报道较少, 仅见罗宽等 (1989) 报道的由同色镰孢菌 (*Fusarium concolor*) 引起的萱草叶斑病。

2018 年 6 月, 在贵州省施秉县牛大场镇中药材基地栽培的萱草植株上发现了一种叶部新病害, 主要在叶片中部产生单个或多个梭形或不规则黄褐色病斑, 干燥条件下易破裂, 发病率为 10.8%, 病叶率约为 20%。为明确该病的病原菌, 本研究中对该病害进行了病原菌分离鉴定和致病性测定以及病原菌生物学特性研究, 以期当地萱草叶斑病的发生、流行规律和综合防治研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离

供试感病萱草为白天开花型的黄花萱草 (黄花菜), 采自贵州省施秉县牛大场镇中药材种植基地, 选取 6 片带有典型病症的叶片和 2 个完整植株带回实验室进行病原菌的分离培养。基础培养基为马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基。

采用组织分离法 (方中达, 1998) 从萱草叶片病健交界处切取 5 mm × 5 mm 叶片, 在 75%乙醇中浸泡 10 s, 然后置于 0.1%酸性升汞浸泡 3 min, 用无菌水将组织冲洗 4 次, 最后用无菌吸水纸吸干, 将其接种至含链霉素、青霉素的 PDA 平板上, 于 25 °C 恒温培养箱中培养 5 d 后仅分离得到 1 个菌株。挑取菌落边缘少量菌丝体进行转接培养, 并进行单孢分离获得纯培养物 (代表菌株 XCS369)。该菌株于 25 °C 培养 7 d 后, 转接到 PDA 培养基上作为菌种保存, 备用。

1.2 病原菌致病性测定

按照柯赫氏法则进行致病性测定。选取健康萱草叶片, 用无菌水冲洗, 75%乙醇表面消毒, 贴菌片法接种。用直径 5 mm 的打孔器在保存的分离菌株菌落边缘打取菌片, 用灭菌针在叶片上均匀刺伤 2 个 5 mm 以内的定点, 接种菌片, 每片叶接种 1 块菌片, 覆盖全部刺伤点, 以不接菌的健康

叶片为对照。每个处理重复 3 次, 25 °C 保湿 (湿度 90%) 培养, 观察并记录发病情况。

1.3 病原菌形态学和分子生物学鉴定

将分离得到的致病菌株接种到 PDA 平板上, 25 °C 恒温培养 7 d 后, 观察记录菌落特征及生长情况。待产孢后用光学显微镜拍摄产孢结构及孢子形态。

按照 DNA 提取试剂盒 GD2416 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 说明书提取病原菌基因组 DNA。选择引物 ITS (ITS1: 3'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-5'; ITS4: 3'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-5') (Mackay et al., 1999) 对菌株进行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μ L: 2 \times PCR 反应缓冲液 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L, 引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L。引物均委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。ITS 基因 PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环。反应结束后进行 1.2% 琼脂电泳检验, PCR 产物送生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。将所得到的核苷酸序列在 GenBank 里进行同源性比对。根据同源性比对结果, 参考 Stefańczyk 等 (2016) 的方法选取同源性最高 (99%) 的炭角菌属 (*Xylaria*) 菌株 30 个, 并下载其相应的 ITS (ITS1/ITS4) 基因序列, 基于最大简约法 (任静 等, 2016) 利用 PAUP* 4.0 软件 (Swofford, 2002) 构建系统发育树。

1.4 病原菌生物学特性测定

1.4.1 培养基对病原菌菌丝生长的影响试验

7 种培养基包括: PDA 培养基 (去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 15 g、琼脂粉 20 g、水 1 000 mL)、牛肉膏蛋白胨 (beef extract peptone, BEP) 培养基 (牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL)、萨式 (Saxon glucose Agar medium, SDAY) 培养基 (葡萄糖 40 g、蛋白胨 10 g、酵母浸粉 10 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL)、马铃薯蔗糖琼脂 (potato sucrose agar, PSA) 培养基 (去皮马铃薯 200 g、蔗糖 15 g、琼脂粉 20 g、水 1 000 mL)、察氏 (Czapek) 培养基 (硝酸钠 2 g、磷酸氢二钾 1 g、氯化钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL)、燕麦琼脂 (oatmeal agar, OA) 培养基 [燕麦片 (加水煮 1 h 过滤) 30 g, 琼脂 17 g, 水 1 000 mL]、玉米粉琼脂 (corn meal agar, CMA) 培养基 [玉米粉 (加水煮 1 h 过滤) 200 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL]。病原菌接种于 PDA 培养基, 28 °C 培养 5 d, 沿菌落边缘打取菌饼 (直径 5.0 mm), 接于上述 7 种培养基 (PDA、BEP、SDAY、PSA、Czapek、OA、CMA) 平板中央, 25 °C 恒温培养。

1.4.2 病原菌对碳、氮源的利用试验

参照张笑宇等 (2017) 的研究方法测定病原菌对碳、氮源的利用特性: 以 Czapek 培养基为基础培养基, 选用葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、乳糖等为碳源, 硝酸钠、蛋白胨、酵母浸粉、磷酸氢二胺、硫酸铵等为氮源, 以不含碳源及氮源的基础培养基为对照。用直径为 5.0 mm 的打孔器在活化 7 d 后的菌落边缘打取菌块, 接种至含有不同碳源或氮源的培养基上于 25 °C 恒温培养。

1.4.3 不同温度对病原菌菌丝生长的影响试验

取直径 5.0 mm 的菌饼移至灭菌处理后的 PDA 培养基平板上, 分别置于 5、10、18、20、25、28、30、35、37 和 40 °C 共 10 个温度下培养。

1.4.4 不同 pH 值对病原菌菌丝生长的影响试验

用 1 mol \cdot L⁻¹ HCl 和 1 mol \cdot L⁻¹ NaOH 将 PDA 培养基分别调整为 pH 4、5、6、7、8、9、10, 用直径 5.0 mm 的打孔器在活化 7 d 后的菌落边缘打取菌饼, 并接种于不同 pH 的 PDA 平板中央, 于 25 °C 下恒温培养。

1.4.5 光照对病原菌菌丝生长的影响试验

用直径 5.0 mm 的打孔器在活化 7 d 后的菌落边缘打取菌饼，并接种至 PDA 平板中央，分别于 24 h 黑暗、12 h 明暗交替和 24 h 光照下 25 °C 恒温培养。

1.5 数据分析

上述试验均重复 3 次，培养 3、5 和 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径。利用 SPSS 18.0 软件进行数据统计分析，采用邓肯氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 萱草叶斑病田间发病症状

病害症状主要见于萱草叶片中部，叶片上产生单个或多个梭形至不规则病斑，病斑中央黄色，外圈棕褐色，并伴有黄色晕圈，干燥条件下易破裂、穿孔（图 1）。发病严重时可形成较大病斑导致植株枯死。将病害标本置于体视镜下未观察到病原物的形态特征，根据发病特征，命名该病害为萱草叶斑病。

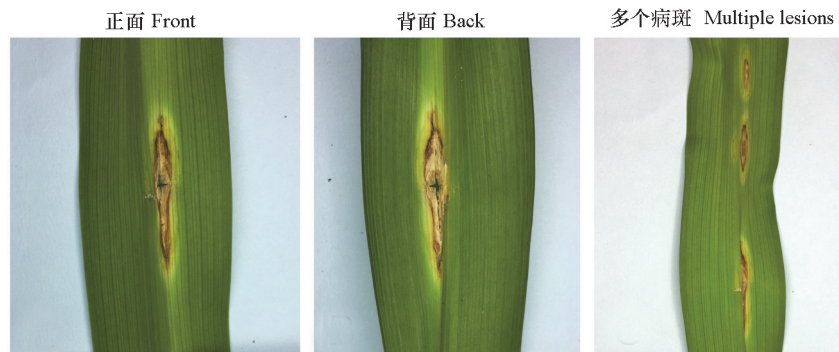


图 1 萱草叶斑病田间发病症状
Fig. 1 Symptoms of leaf spot disease of *Hemerocallis fulva*

2.2 病原菌的致病性

将分离纯化得到的菌株（XCS369）按柯赫氏法则接种，6 d 后叶片开始发病（图 2），产生中央

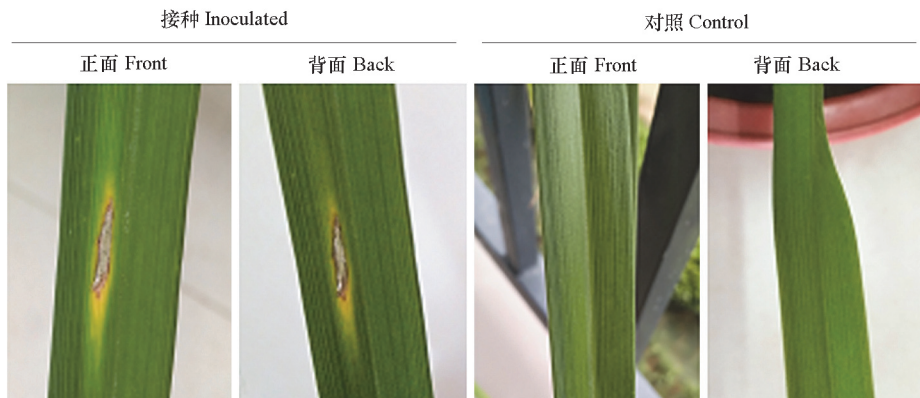


图 2 接种萱草叶斑病原菌后叶片发病症状（12 d）
Fig. 2 Symptoms of leaf inoculation after inoculation of *Hemerocallis fulva* leaf spot (12 d)

黄色、外圈棕褐色、并伴有黄色晕圈的梭形病斑, 12 d 后菌丝穿透叶肉组织, 致使病斑扩大; 对照叶片未见发病 (图 2)。回接叶片发病症状与原病害样本症状相同 (图 1), 从发病叶片再分离的病原菌与原接种菌种相同, 证实了该菌株为致病菌, 且致病性强, 易通过伤口侵染。

2.3 病原菌的形态特征

如图 3 所示, 分离得到的菌株在 PDA 培养基上菌落近圆形; 气生菌丝灰白色, 绒毛状平铺; 菌落中心隆起呈灰褐色, 菌落外圈白色, 背面橄榄绿色; 培养 15 d, 表面可产生白色孢子粉 (图 3); 菌丝上直接产生有分枝的分生孢子梗, 分生孢子梗的顶端产生分生孢子; 分生孢子光滑, 无色, 椭圆至长椭圆形, 大小为 $4.49 \sim 11.69 \mu\text{m} \times 2.11 \sim 4.15 \mu\text{m}$ (图 4)。根据形态学特征可初步将其鉴定为炭角属 (*Xylaria*) 真菌。

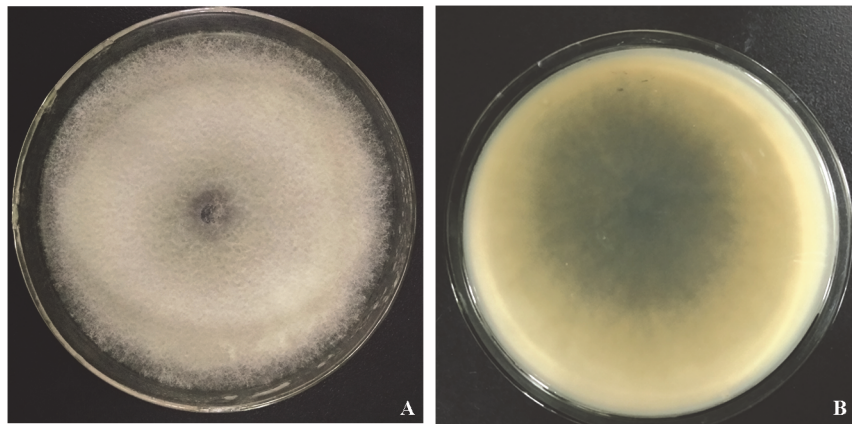


图 3 病原菌的菌落正面 (A) 和反面 (B)

Fig. 3 Colony of the pathogen front (A) and back (B)

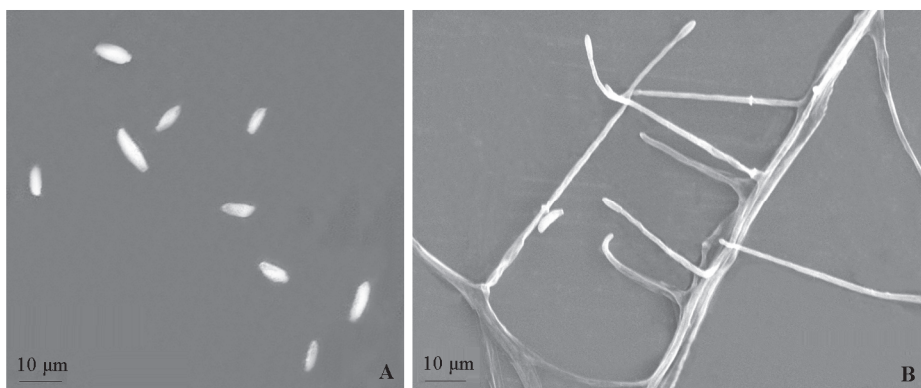


图 4 病原菌分生孢子 (A) 和分生孢子梗 (B)

Fig. 4 Pathogens conidia (A) and conidiophores (B)

2.4 系统发育分析

在基于 ITS1/ITS4 基因序列的系统发育树中 (图 5), 以蝉棒束孢 GZUIFR-4606 (*Isaria xylariiformis*) 为外群, 菌株 XCS369 与古巴炭角菌 *Xylaria cubensis* 聚集于一个类群, 且支持率达 99%。结合菌株 XCS369 的形态特征和 ITS 基因序列分析将其鉴定为古巴炭角菌 *Xylaria cubensis*, 将其 ITS 序列提交至 GenBank, 获得序列登录号为 MK747250。

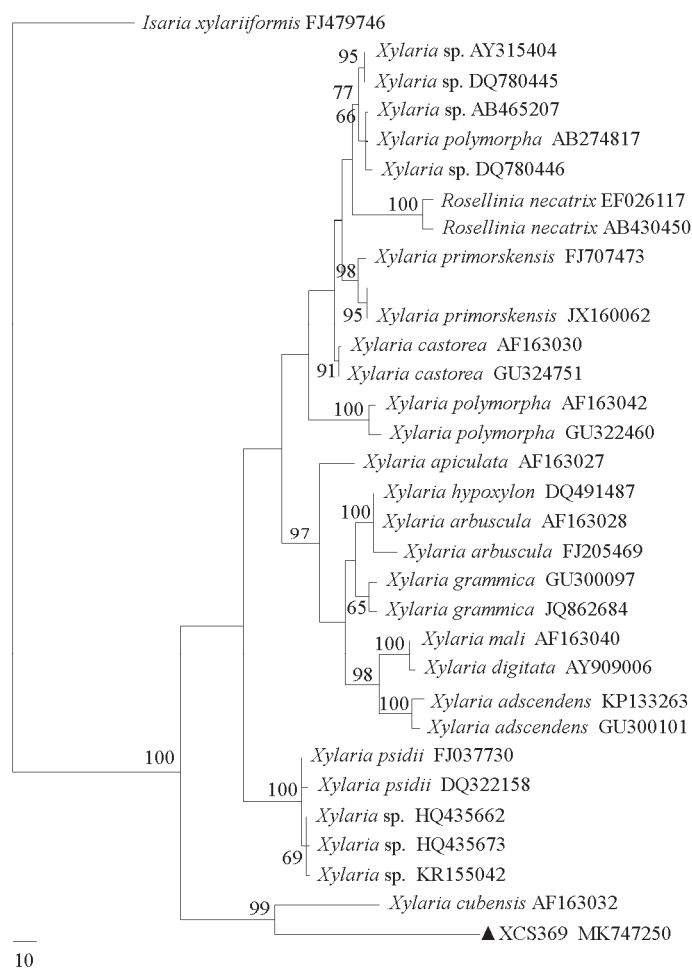


图 5 基于 ITS 基因序列构建的萱草病原菌菌株的系统发育树

▲为本试验所用菌株。

Fig. 5 Phylogenetic tree of a strain of *Hemerocallis* pathogen strain based on ITS gene sequence

▲Means the strain used in this study.

2.5 病原菌生物学特性

2.5.1 不同培养基对病原菌菌丝生长的影响

由表 1 可见，病原菌在不同培养基上菌丝生长速度存在明显差异。在 PDA 培养基上菌丝生长最

表 1 不同培养基中病原菌菌落直径

Table 1 Diameter of pathogen colonies in different media

培养基 Medium	3 d	5 d	7 d
PDA	53.00 ± 3.60 a	66.66 ± 13.19 a	69.00 ± 15.15 ab
BEP	44.50 ± 0.50 b	55.50 ± 2.64 ab	51.00 ± 2.29 c
SDAY	44.17 ± 1.76 b	54.83 ± 8.08 ab	57.17 ± 11.72 bc
PSA	43.83 ± 2.46 b	59.83 ± 3.51 ab	66.50 ± 9.16 abc
OA	38.50 ± 4.00 c	49.00 ± 0.87 b	30.83 ± 4.48 a
Czapek	17.50 ± 1.80 d	25.50 ± 1.50 c	32.17 ± 3.21 d
CMA	7.33 ± 2.75 e	18.67 ± 6.65 c	34.83 ± 7.76 d

注：小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著，下同。

Note: Lowercase letters indicate a significant difference in $P < 0.05$ level, the same below.

快, 培养 7 d 时, 菌落直径可达 69.00 mm。在 SDAY 和 PSA 培养基上病原菌气生菌丝较发达, 而在其他培养基上气生菌丝稀疏, 尤以 Czapek 培养基上最少。

2.5.2 病原菌对碳源和氮源的利用

如表 2 所示, 在供试碳源培养基中, 病原菌在 25 °C 恒温培养均能生长, 对麦芽糖利用最好, 培养 7 d 时, 菌落直径为 73.33 mm; 其次为乳糖, 菌落直径为 57.00 mm; 对葡萄糖的利用最差, 菌落直径为 31.33 mm。在氮源的利用试验中, 病原菌对酵母浸粉和蛋白胨的利用最好, 菌落直径分别为 87.00 和 84.50 mm; 硝酸钠、磷酸氢二铵和硫酸铵对菌丝生长的影响无明显差异。

表 2 不同碳源和氮源对病原菌菌落直径的影响

碳源 Carbon source	3 d			5 d			7 d		
	3 d	5 d	7 d	3 d	5 d	7 d	3 d	5 d	7 d
麦芽糖 Maltose	40.33 ± 1.0 a	48.83 ± 1.76 a	73.33 ± 1.44 a	酵母浸粉 Yeast extract	50.50 ± 1.80 a	75.00 ± 1.50 a	87.00 ± 0.00 a		
可溶性淀粉 Soluble starch	39.50 ± 1.00 a	34.00 ± 1.50 ab	55.83 ± 5.3 ab	蛋白胨 Peptone	46.33 ± 0.76 a	68.33 ± 2.93 b	84.50 ± 4.33 a		
乳糖 Lactose	26.83 ± 10.01 d	39.67 ± 16.82 ab	57.00 ± 21.21 ab	硫酸铵 Ammonium sulfate	16.50 ± 1.00 b	24.00 ± 2.78 c	30.83 ± 4.48 b		
葡萄糖 Glucose	14.67 ± 7.01 c	24.8 ± 14.01 b	31.33 ± 15.17 c	磷酸氢二铵 Diammonium hydrogen phosphate	14.16 ± 0.57 b	17.67 ± 2.08 d	21.50 ± 2.29 b		
蔗糖 Sucrose	20.0 ± 0.10 bc	24.8 ± 14.01 b	31.33 ± 15.17 c	硝酸钠 Sodium nitrate	15.33 ± 7.07 b	19.50 ± 6.53 cd	29.50 ± 12.57 b		
对照 Control	5.0 ± 0.0 d	5.0 ± 0.0c	5.0 ± 0.0 d	对照 Control	5.00 ± 0.00 c	5.00 ± 0.00 e	5.00 ± 0.00 c		

2.5.3 不同温度对病原菌菌丝生长的影响

如表 3 所示, 病原菌对温度的适应范围较宽, 菌丝在 10 ~ 30 °C 内均可生长, 培养 7 d 时菌落直径为 29.16 ~ 84.33 mm。最适宜的温度为 25 ~ 28 °C, 菌落直径为 78.80 ~ 84.33 mm; 培养温度较低 (10 °C 以下) 或较高 (35 °C 以上) 时生长慢甚至不生长; 培养温度为 10、18 和 20 °C, 菌丝长势较弱, 生长速度较慢; 培养温度较高 (30 °C) 时生长情况减弱, 菌落直径为 44.00 mm; 在 35 °C 培养条件下不生长。

表 3 不同温度下病原菌菌落直径

温度/°C Temperature	3 d	5 d	7 d
5	5.00 ± 0.00 d	5.00 ± 0.00 d	5.00 ± 0.00 f
10	25.33 ± 17.13 b	27.33 ± 13.73 bcd	29.16 ± 15.50 d
18	25.33 ± 1.15 b	53.33 ± 2.46 abc	63.83 ± 0.57 c
20	26.17 ± 0.57 b	52.00 ± 4.76 abc	67.00 ± 12.21 bc
25	54.33 ± 1.44 a	71.66 ± 2.36 a	84.33 ± 4.61 a
28	51.40 ± 0.17 a	68.10 ± 2.76 ab	78.80 ± 0.89 ab
30	15.83 ± 0.28 c	36.33 ± 7.24 abc	44.00 ± 1.00 ef
35	5.00 ± 0.00 d	5.00 ± 0.00 d	5.00 ± 0.00 f
37	5.00 ± 0.00 d	5.00 ± 0.00 cd	5.00 ± 0.00 de
40	5.00 ± 0.00 d	5.00 ± 0.00 d	5.00 ± 0.00 f

2.5.4 不同 pH 值对病原菌菌丝生长的影响

如表 4 所示, 病原菌对酸碱度适应范围较宽, 在 pH 4 ~ 10 范围内均可生长, 以 pH 6 ~ 9 时生

长速度较快, 培养 7 d 平均菌丝生长直径为 74.00 ~ 83.50 mm。中性条件下 (pH 7) 菌丝生长速度最快, 而且菌丝浓密、长势旺盛, 最适宜病原菌的生长。

表 4 不同 pH 下病原菌菌落直径
 Table 4 Colony diameter of pathogenic bacteria at different pH

pH	3 d	5 d	7 d
4	12.33 ± 3.33 f	13.50 ± 1.50 d	16.00 ± 3.27 c
5	35.83 ± 1.53 d	47.83 ± 6.50 c	52.66 ± 15.17 b
6	46.33 ± 1.44 c	67.16 ± 10.11 ab	76.66 ± 17.89 a
7	66.00 ± 1.32 a	79.83 ± 6.25 a	83.50 ± 6.06 a
8	57.33 ± 3.05 b	74.00 ± 5.19 ab	79.00 ± 6.94 a
9	17.50 ± 6.00 e	57.66 ± 13.28 bc	74.00 ± 3.04 ab
10	13.33 ± 0.57 f	13.66 ± 1.50 d	18.00 ± 2.20 c

2.5.5 不同光照对病原菌菌丝生长的影响

如表 5 所示, 病原菌在 24 h 持续光照、24 h 持续黑暗、12 h 光暗交替处理条件下培养 7 d, 菌落平均直径分别为 83.00、87.00、78.16 mm, 这 3 种个光照条件对菌丝生长的影响无明显差异。

表 5 不同光照条件下病原菌菌落直径
 Table 5 Colony diameter of pathogenic bacteria under different light conditions

光照条件 Lighting condition	3 d	5 d	7 d
光照 Light	62.33 ± 5.96 a	79.33 ± 13.27 a	83.00 ± 6.90 a
黑暗 Dark	52.33 ± 3.32 a	75.00 ± 3.00 a	87.00 ± 0.00 a
12 h 明暗交替 12 h bright and dark alternately	55.66 ± 6.25 a	76.00 ± 11.53 a	78.16 ± 3.25 a

3 结论与讨论

罗宽等 (1989) 报道同色镰孢菌 (*Fusarium concolor*) 可引起萱草叶斑病, 本研究中新发现的萱草叶斑病的病原菌为古巴炭角菌 (*Xylaria cubensis*), 表明萱草叶部病害可由不同种类的病原菌引起。国内外尚未见由古巴炭角菌 (*Xylaria cubensis*) 引起萱草叶斑病的报道。

炭角菌属 (*Xylaria* Hill ex Schrank, 原名鹿角菌属) 是子囊菌亚门, 核菌纲, 球壳目炭角菌科 (*Xylariaceae*) 最早被描述的一个属 (金一平等, 2015; 高聪等, 2016), 其分布区域广泛, 不同地区的学者对其描述有差异 (Rogers & Samuels, 1986; Whalley, 1996), 使得炭角菌属真菌的分类鉴定存在一定困难。马海霞 (2011) 和黄谷 (2014) 采用形态学和分子系统学的方法对中国的炭角菌属物种进行分类研究, 但分类标准不同。炭角菌属真菌大多以腐生为主, 目前有关研究多围绕其资源分布、分类地位等展开 (申进文等, 2008); 对其引起病害的报道较少, 申进文等 (2008) 报道了叉状炭角菌 (*Xylaria pedunculata*) 可引起鸡腿菇总状炭角菌病; 姚珂等 (2016) 报道了薛凡尼氏炭角菌 (*Xylaria schweinitzii*) 可引起慈竹的叶褐斑病。

本研究中分离的菌株最适生长温度、pH 以及致死温度与申进文等 (2008) 报道的炭角菌属真菌基本保持一致。申进文等 (2008) 报道菌丝生长的最适碳氮源分别为玉米粉和黄豆粉, 本研究中为麦芽糖和酵母浸粉, 这可能是供试碳源氮源不同、或存在种间差异。

本研究中从萱草发病叶片上分离到一株致病菌, 结合其形态及 ITS 序列分析确定了该叶斑病病原菌为古巴炭角菌 (*Xylaria cubensis*), 并对其生物学特性进行了研究, 以期为该病害的发生、流行规律及防治提供理论依据。

References

- Bai Qing-rong, Han Shuang, Zhao Ying, Li Hai-yang, Liang Jun-yi, Gao Jie. 2013. Biological characteristics and fungicide sensitivity of *Kabatiella microsticta* causing daylily leaf streak. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (12): 2513 - 2519. (in Chinese)
- 白庆荣, 韩双, 赵莹, 李海洋, 梁峻玮, 高洁. 2013. 萱草叶枯病菌生物学特性及对药剂敏感性研究. *园艺学报*, 40 (12): 2513 - 2519.
- Bor J Y, Chen H Y, Yen G C. 2006. Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *J Agric Food Chem*, 54 (5): 1680 - 1686.
- Cai Zhu-nan, Zhang Zhong-yi, Ding Meng-ran, Lei Zeng-pu. 2002. Prevention and control of flower pests and diseases. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 蔡祝南, 张中义, 丁梦然, 雷增普. 2002. 花卉病虫害防治大全. 北京: 中国农业出版社.
- Chen Guo-zhong, Zhang Chang-xi, Fan Yong-sheng, Chen Jian-bo. 2008. Treatment of 156 cases of functional insomnia with *Hemerocallis* Kangyu decoction. *Zhejiang Journal of Traditional Chinese Medicine*, 43 (7): 397. (in Chinese)
- 陈国中, 张昌禧, 范永生, 陈坚波. 2008. 萱草抗郁方治疗功能性失眠症 156 例. *浙江中医杂志*, 43 (7): 397.
- Dong Guo-kun, Zhang Hui-qin, Shen Jian-xin. 2005. Occurrence and control of main diseases of Taizhou Jincai. *Journal of Changjiang Vegetables*, (9): 35 - 36. (in Chinese)
- 董国焯, 张惠琴, 沈建新. 2005. 台州金针菜主要病害的发生及防治. *长江蔬菜*, (9): 35 - 36.
- Fang Zhong-da. 1998. Methodology of plant pathology. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 方中达. 1998. 植物病理学研究方法. 北京: 中国农业出版社.
- Feng Bo. 2013. Screening of anti aphid of the genus of *Hemerocallis* and related soluble suger and flavonoid analysis[M. D. Dissertation]. Changchun: Jilin Agricultural University. (in Chinese)
- 冯博. 2013. 萱草属植物抗蚜筛选及与之相关的可溶性糖和类黄酮分析[硕士论文]. 长春: 吉林农业大学.
- Gao Cong, Luo Jun, Liu Xia, Ma Lin, Yuan Xiao-hong. 2016. Progress in chemical constituents and biological activities of fungi from the genus *Xylaria*. *Mycosystema*, 35 (7): 767 - 781. (in Chinese)
- 高聪, 罗俊, 刘霞, 马林, 袁小红. 2016. 炭角菌属真菌化学成分与生物活性研究进展. *菌物学报*, 35 (7): 767 - 781.
- Huang Gu. 2014. Taxonomy of *Xylaria* in south China. Zhengzhou: Henan University of Technology. (in Chinese)
- 黄谷. 2014. 中国南方炭角菌属的分类研究[硕士论文]. 郑州: 河南工业大学.
- Huang Xin-lei. 2013. Study on the flower color and flavonoid pigment of *Valeriana* [M. D. Dissertation]. Baoding: Agricultural University of Hebei. (in Chinese)
- 黄昕蕾. 2013. 萱草属植物花色及其类黄酮色素的研究[硕士论文]. 保定: 河北农业大学.
- Jin Yi-ping, Yang Zhi-jun, Luo Min-yu. 2015. Metabolites of endophytic fungus *Xylaria* sp. with biological activities. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 50 (21): 1853 - 1856. (in Chinese)
- 金一平, 杨志钧, 罗敏玉. 2015. 植物内生真菌炭角菌属 HCCB03890 代谢产物及生物活性的研究. *中国药理学杂志*, 50 (21): 1853 - 1856.
- Jiang Feng-li, Niu You-min, Gu Wen-qi. 1996. Study on alfalfa *anthracnose*. *Garden Science and Technology Information*, (4): 16 - 21. (in Chinese)
- 姜凤丽, 钮友民, 顾文琪. 1996. 萱草炭疽病的研究. *园林科技信息*, (4): 16 - 21.
- Kaneshiro T, Suzui M, Takamatsu R, Murakami A, Ohigashi H, Fujino T, Yoshimi N. 2005. Growth inhibitory activities of crude extracts obtained from herbal plants in the Ryukyu islands on several human colon carcinomacell lines. *Asian Pac J Cancer Prev*, 6 (3): 353 - 358.
- Luo Kuan, Ren Xin-guo. 1991. Pathogen of grassleaf/daylily leaf blight. *Journal of Hunan Agricultural College*, (4): 696 - 702. (in Chinese)
- 罗宽, 任新国. 1991. 黄花菜叶枯病病原研究. *湖南农学院学报*, (4): 696 - 702.
- Luo Kuan, Ren Xin-guo, Shen Gui-he, Li Yun. 1989. On study of grassleaf daylily (*hemerocallis minor*) leaf spot disease. *Journal of Plant Protection*, (2): 81 - 85. (in Chinese)
- 罗宽, 任新国, 申贵和, 李筠. 1989. 黄花菜叶斑病研究. *植物保护学报*, (2): 81 - 85.
- Mackay G J, Brown A E, Bjourson A J, Mercer P C. 1999. Molecular characterisation of *Alternaria linicola* and its detection in Linseed. *European Journal of Plant Pathology*, 105 (2): 157 - 166.
- Ma Hai-xia. 2011. Taxonomy and Molecular Phylogeny of several genera of *Xylariaeae* from China[Ph. D. Dissertation]. Changchun: Jilin

- Agricultural University. (in Chinese)
- 马海霞. 2011. 中国炭角菌科几个属的分类与分子系统学研究[博士学位]. 长春: 吉林农业大学.
- Ren Jing, Zeng Gui-ping, Zhao Zhi, Li Zhong. 2016. A new species of *Pilidiella* on the Polygonaceae. *Mycosystema*, 35 (9): 1056 - 1060. (in Chinese)
- 任 静, 曾桂萍, 赵 致, 李 忠. 2016. 生于蓼科植物上的小帽壳孢属一新种. *菌物学报*, 35 (9): 1056 - 1060.
- Ren Yang. 2017. The Morphological characteristics and molecular basis of plant development of *Hemerocallis*[M. D. Dissertation]. Changchun: Jilin Agricultural University. (in Chinese)
- 任 阳. 2017. 萱草属植物的形态学性状与分子标记研究[硕士论文]. 长春: 吉林农业大学.
- Rogers J D, Samuels G J. 1986. Ascomycetes of New Zealand 8. *Xylaria*. *New Zealand Journal of Botany*, 24: 615 - 650.
- Shen Jin-wen, Zhou Su-jing, Yu Hai-you, Zhang Biao, Zhou Hang. 2008. Studies on the biological characteristics of *Xylaria pedunculata*. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, (12): 75 - 77. (in Chinese)
- 申进文, 周素静, 余海尤, 张 彪, 周 航. 2008. 叉状炭角菌生物学特性研究. *河南农业科学*, (12): 75 - 77.
- Stefańczyk E, Sobkowiak S, Brylińska M, Śliwka J. 2016. Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 145 (4): 871 - 884.
- Swofford D L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates: 54 - 56.
- Whalley A J S. 1996. The xylariaceous way of life. *Wycol Res*, 100: 897 - 922.
- Yao Ke, Fan Jin-bo, Zhang Neng, Zhao Miao, Chen Bo, He Xin-sheng. 2016. Identification of molecular systems and optimization culture conditions of the *Xylaria schweinitzii* mycelium growing on bamboo. *Journal of Bamboo Research*, 35 (1): 35 - 40. (in Chinese)
- 姚 珂, 范进博, 张 能, 赵 苗, 陈 波, 贺新生. 2016. 一种竹生炭角菌的分子系统鉴定及其菌丝体培养条件优化. *竹子研究汇刊*, 35 (1): 35 - 40.
- You Jing. 2013. Domestication and cultivation of golden dolls *Hemerocallis* in the Taiyuan area. *Xiandai Horticulture*, 23: 28 - 29. (in Chinese)
- 尤 静. 2013. 金娃娃萱草在太原地区的驯化栽培. *现代园艺*, (23): 28 - 29.
- Zhang Jun, Wang Rong-mei, Wang Jin-yao, Hou Fei-fan, Kang Xiu-ping, Li Sen, Xing Guo-ming. 2018. Optimization of chromosome mounting technique and ploidy identification of *Hemerocallis*. *Journal of Hebei Agricultural University*, 41 (3): 42 - 48. (in Chinese)
- 张 俊, 王荣梅, 王金耀, 侯非凡, 亢秀萍, 李 森, 邢国明. 2018. 萱草属植物染色体制片技术优化及倍性鉴定. *河北农业大学学报*, 41 (3): 42 - 48.
- Zhang Shi-jie, Zhang Zhi-guo. 2018. Origin, distribution, classification and application of *Hemerocallis* plants. *Garden*, (5): 5 - 9. (in Chinese)
- 张世杰, 张志国. 2018. 萱草属植物的起源、分布、分类及应用. *园林*, (5): 5 - 9.
- Zhang Wei. 2014. Selection and application of perennial plants in roof greening in the north of China[M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 张 伟. 2014. 宿根花卉在北方地区屋顶绿化的选择和应用[硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Zhang Xiao-yu, Sun Xue-mei, Zhou Hong-you, Zhao Gui-qin, Wang Feng-wu, Gao Qing. 2017. Identification and biological characteristics of leaf spot pathogen *Drechslera avenacea* in oat. *Journal of Plant Protection*, 44 (3): 473 - 480. (in Chinese)
- 张笑宇, 孙雪梅, 周洪友, 赵桂琴, 王凤梧, 高 卿. 2017. 燕麦叶斑病原菌鉴定及其生物学特性. *植物保护学报*, 44 (3): 473 - 480.
- Zhao Tian-rong, Xu Zhi-hao, Huang Jian, Shi Yong-tai, Ni Jian-gang, Zhang Yan. 2015. The main reproductive mode test of *Hemerocallis*. *Zhejiang Agricultural Sciences*, (1): 82 - 85. (in Chinese)
- 赵天荣, 徐志豪, 黄 坚, 施永泰, 倪建刚, 张 艳. 2015. 大花萱草主要繁殖方式试验. *浙江农业科学*, (1): 82 - 85.