

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.004.021

# 山东省侧柏枝枯病病原菌鉴定及其致病性测定

刘在哲<sup>1,2</sup>, 亓玉昆<sup>2</sup>, 吕娟<sup>3</sup>, 张玉娇<sup>1</sup>, 张伟<sup>4</sup>, 刘云<sup>1</sup>,  
付翠翠<sup>1</sup>, 刘慤<sup>2</sup>, 刘保友<sup>4</sup>, 王清海<sup>2\*</sup>

(1. 济南市林场, 山东 济南 250014; 2. 山东省林业科学研究院, 山东 济南 250014; 3. 济南市园林和林业科学研究院, 山东 济南 250103; 4. 山东省烟台市农业科学研究院, 山东 烟台 265500)

**摘要:** [目的] 明确引起山东省济南市侧柏枝枯病的病原菌种类, 为该病的防控提供依据。[方法] 采用组织分离法和单孢分离法进行病原分离纯化, 通过形态学和多基因系统发育分析 (ITS、TEF-1 $\alpha$ 、TUB2) 相结合的方法对分离菌株进行鉴定, 通过人工接种测定其致病性。[结果] 菌落初期白色, 菌落中间簇状, 后期菌落深灰绿色, 背面黑褐色。分生孢子单孢透明, 梭形、椭圆形、卵球形。根据形态特征和多基因系统发育分析将分离菌株鉴定为 *Neofusicoccum oculatum* Sakalidis, M. L., Burgess, T. I.。人工接种分离菌株, 均可以引起侧柏枝条、鳞叶发病, 症状与田间一致。从发病部位同样可以分离获得接种菌株。[结论] 明确了 *N. oculatum* 是引起山东省济南市林场侧柏枝枯病的致病菌。

**关键词:** 侧柏枝枯病; 病原鉴定; 形态特征; 多基因系统分析; 序列; 分类

**中图分类号:** S436.65

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1001-1498(2022)04-0197-08

侧柏 (*Platycladus orientalis* (L.) Franco), 属柏科 (Cupressaceae) 侧柏属 (*Platycladus*) 常绿乔木, 耐干旱贫瘠, 适应范围广, 是我国荒山造林的先锋树种, 也是重要的园林绿化树种, 除新疆、青海外, 全国均有分布。侧柏种植在防风固沙、调节生态气候等方面具有重要意义。侧柏是高龄树种, 一些历史风景名胜地现存的古柏更是中华民族五千年历史文明的见证及珍贵历史文化遗产, 具有极其重要的自然景观价值和历史价值。

侧柏叶枯病是一种重要的侧柏叶部病害, 在我国江苏、安徽、陕西等地大面积发生, 在江苏盱眙县侧柏被害率达 100%, 病情指数高达 50.0 以上, 危害严重时, 侧柏干枯死亡, 已成为我国侧柏最重要的病害之一<sup>[1]</sup>。目前的研究表明, *Alternaria pruni* McAlpine<sup>[2]</sup>、*A. alternata* (Fr.) Keissler、

*Pestalotiopsis gracilis* (Kleb.) Steyaert、*Chloroscypha platycladus* Y. S. Dai<sup>[3]</sup>、*Monochaetia* sp.<sup>[4]</sup> 和 *Keithia thujina* Durand<sup>[5]</sup> 均可以引起侧柏叶枯病。由于生长地理位置及生境差异, 病原有所不同。2020 年作者发现在济南市林场、千佛山风景区等侧柏林中, 侧柏鳞叶出现枯黄脱落现象, 病株率达 90% 以上, 危害严重的侧柏整株枯死。济南市侧柏面积 8.25 万 hm<sup>2</sup>, 侧柏枝枯病主要发生于枝叶部, 造成侧柏树势衰弱, 可能诱发双条杉天牛、小蠹虫等次期性害虫的危害, 造成侧柏林成片干枯, 影响绿化效果, 造成严重的生态和经济损失。为有效控制危害, 明确病原种类是十分必要的。因此, 本研究通过形态特征、多基因系统发育分析以及致病性测定, 明确在济南市引起侧柏枝枯的致病因子, 以期为该病害的发生、流行

收稿日期: 2022-02-09 修回日期: 2022-03-02

基金项目: 山东省住房和城乡建设厅研究开发项目 (2021-K2-6)

作者简介: 刘在哲, 男, 高级工程师, 主要从事园林林木病理学研究。E-mail: liuzai zhe1969@126.com

\* 通讯作者: E-mail: wqhai@126.com

规律及其防治提供参考依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

感病的侧柏枝条及鳞叶, 从山东省济南市佛慧山 (36°37'37" N, 117°2'44" E)、仰山 (36°36'26" N, 117°1'43" E)、蚂蚱鞍子山 (36°37'21" N, 117°44'46" E)、廻龙山 (36°37'25" N, 117°4'26" E) 侧柏林采集。

### 1.2 方法

**1.2.1 侧柏病组织疑似病原菌分离及分离菌单孢培养** 采用组织分离法。先用 70% 乙醇将样品表面消毒, 然后在侧柏细枝、鳞叶病健交界处利用无菌解剖刀取 5 mm<sup>2</sup> 的组织块, 依次用 3% 次氯酸钠浸泡 1 min, 无菌水冲洗 3 次。将处理好的组织块置于 PDA 平板上, 每个平皿放置 5 块, 25 °C 培养 3 d。将生长的菌落纯化转接至新的 PDA 平板上, 25 °C 下培养, 采取孢子稀释分离法获取单菌落。分离获得的菌株均保存于山东省林业科学研究院森林保护研究所。

**1.2.2 分离菌致病性测定** 分离菌株致病性测定采用室内离体接种法及室外活体接种法。室内离体接种法, 选择健康的侧柏细枝条, 自来水冲洗干净, 晾干后, 用 70% 酒精表面消毒, 备用。将分离获得的菌株在 PDA 培养基上培养 5 d, 在菌落边缘用打孔器制作菌饼 ( $\phi = 5$  mm), 转移至低营养琼脂培养基 (SNA) 平板上, 菌饼菌丝贴在平板上, 在菌饼周围放置 2 根无菌松针, 紫外灯照射条件下培养 10 d 诱导产孢。将孢子配置成 10<sup>6</sup> 孢

子·mL<sup>-1</sup> 孢子悬浮液, 备用。先用无菌的挑针 ( $\phi = 0.5$  mm) 轻微刺伤鳞叶, 在伤口处滴 200  $\mu$ L 孢子悬浮液, 以无菌水为对照。将处理后的枝条置于含有少量无菌水的无菌烧杯中, 用保鲜膜封闭, 置于 25 °C 恒温培养箱中培养 7 d, 观察。每组试验各做 5 次平行处理, 重复 2 次。

室外活体接种, 选用健康无病生长一致的播种 2 年生盆栽侧柏苗进行活体接种。鳞叶用挑针刺伤, 干基部用无菌手术刀做“T”伤口, 在伤口处滴 200  $\mu$ L 孢子悬浮液, 并放上无菌水浸湿的脱脂棉, 用剪好的封口膜包扎, 以接种无菌水为对照。为了防止水分蒸发过快, 每一株侧柏用黑色塑料袋包裹, 2 d 后除去黑色塑料袋, 每天进行观察; 每组试验各做 5 次平行处理, 重复 2 次。

### 1.2.3 病原鉴定

**1.2.3.1 形态特征观察** 将分离获得的单孢菌株在 PDA 培养基平板活化培养 5 d, 在菌落边缘利用打孔器制作菌饼 ( $\phi = 5$  mm), 将菌饼置于 PDA、MEA 平板中央, 每个平板置 1 块菌饼, 25 °C、12 h 照射/12 h 黑暗交替培养, 观察记录菌落特征。

**1.2.3.2 分子生物学鉴定** DNA 的提取采用改进的 CTAB 法。扩增的目的基因分别为核糖体转录间隔区序列 (ITS)、翻译延伸因子-1 $\alpha$  (*TEF1- $\alpha$* )、 $\beta$ -微管蛋白 (*TUB2*)。引物序列及扩增反应条件参数见表 1。扩增反应体系为 25  $\mu$ L, 其中 2  $\mu$ L DNA 模板、8.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O、12.5  $\mu$ L Taq 酶 mix、各 1  $\mu$ L 上下游引物。PCR 扩增产物由上海派森诺生物科技有限公司进行双向测序。

表 1 PCR 扩增所用引物及反应程序

Table 1 Primers used in this study, with sequence and PCR conditions

基因 Gene	引物 Primer	序列 Sequence	预变性 Initial denaturation		变性 Denaturation		退火 Annealing		延伸 Extension		最后延伸 Final extension	
			°C	min	°C	s	°C	s	°C	min	°C	min
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	95	5	94	30	58	30	72	1.5	72	7
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC										
<i>TEF1-<math>\alpha</math></i>	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	94	5	94	30	52	30	72	1.5	72	7
	EF-986R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC										
<i>TUB2</i>	BT-2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	94	5	94	45	55	30	72	45	72	10
	BT-2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGCC										

将获得的 ITS、*TEF1- $\alpha$*  和 *TUB2* 序列提交 NCBI 数据库, 并利用 Blast 进行比对。选取 38 株 *Neofusicoccum* sp. 菌株作为参考菌株, 以 *Botryosphaeria dothidea* (CBS 115476)、

*Dothiorella iberica* (CBS 115041) 和 *D. sarmentorum* (IMI63581b) 作为外围菌株 (表 2)。利用 Fasta alignment joiner 软件 ([https://users-birc.au.dk/~palle/php/fabox/alignment\\_joiner.php](https://users-birc.au.dk/~palle/php/fabox/alignment_joiner.php))

#) 通过首尾相连的方法, 将 ITS、*TEF1- $\alpha$*  和 *TUB2* 基因串联。利用 MEGA 7.0 软件, 采用最大似然法 (Maximum Likelihood) 构建多基因系统发育

树, 循环 1 000 次, 并以自展支持率 (Bootstrap) 校对检测。

表 2 用于系统发育分析的参考菌株序列

Table 2 Strains and sequences of the genus *Neofusicoccum* used in this study

种类 Species	菌株编号 Cultre accession	寄主 Host	国家 Country	基因编号 GenBank accessions		
				ITS	<i>TEF-1<math>\alpha</math></i>	<i>TUB2</i>
<i>Neofusicoccum algeriense</i>	CBS137504	<i>Vitis vinifera</i>	Algeria	KJ657702	KJ657715	KX505915
<i>N. algeriense</i>	CAA322	<i>Eucalyptus globulus</i>	-	KX505906	KX505894	KX505916
<i>N. andinum</i>	CBS117453	<i>Eucalyptus</i> sp.	Venezuela	AY693976	AY693977	KX464923
<i>N. arbuti</i>	CBS116131	<i>Arbutus menziesii</i>	USA	AY819720	KF531792	KF531793
<i>N. australe</i>	CMW6837	<i>Acacia</i> sp.	Australia	AY339262	AY339270	AY339254
<i>N. batangarum</i>	CBS124924	<i>Terminalia catappa</i>	Africa	FJ900607	FJ900653	FJ900634
<i>N. brasiliense</i>	CMM1338	<i>Mangifera indica</i>	Brazil	JX513630	JX513610	KC794031
<i>N. buxi</i>	CBS113714	<i>B. sempervirens</i>	France	KX464164	KX464677	KX464954
<i>N. cordaticola</i>	CBS123634	<i>Syzygium cordatum</i>	South Africa	EU821898	EU821868	EU821838
<i>N. corticosae</i>	CBS120081	-	-	DQ923533	KX464682	KX464958
<i>N. cryptoaustrale</i>	CMW23785	<i>Eucalyptus</i> sp.	South Africa	FJ752742	FJ752713	FJ752756
<i>N. eucalypticola</i>	CBS115766	<i>Eucalyptus rossii</i>	Australia	AY615143	AY615135	AY615127
<i>N. eucalypticola</i>	CBS115679	<i>Eucalyptus rossii</i>	Australia	AY615141	AY615133	AY615125
<i>N. hellenicum</i>	CERC1947	<i>Pistachia vera</i>	Greece	KP217053	KP217061	KP217069
<i>N. illicii</i>	CGMCC3.18311	<i>Illicium verum</i>	China	KY350150	KY817756	KY350156
<i>N. kwambonambiense</i>	CBS123639	<i>Syzygium cordatum</i>	South Africa	EU821900	EU821870	EU821840
<i>N. lumnitzerae</i>	CMW41469	-	-	KP860881	KP860724	KP860801
<i>N. luteum</i>	CBS110299	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	AY259091	AY573217	DQ458848
<i>N. macroclavatum</i>	WAC12444	<i>Eucalyptus globulus</i>	Australia	DQ093196	DQ093217	DQ093206
<i>N. mangiferae</i>	CBS118531	<i>Mangifera indica</i>	Australia	AY615185	DQ093221	AY615172
<i>N. mangroviorum</i>	CMW41365	-	-	KP860859	KP860702	KP860779
<i>N. mediterraneum</i>	CBS121718	<i>Eucalyptus</i> sp.	Greece	GU251176	GU251308	GU251836
	CBS128008	<i>Eucalyptus grandis</i> hybrid	Australia	EU301030	EU339509	EU339472
	MUCC286	<i>Eucalyptus pellita</i>	Australia	EU736947	EU339511	EU339474
<i>N. oculatum</i>	CBL-02*	<i>Platyclusus orientalis</i>	China	OM283294	OM315202	OM403995
	CBL-03*	<i>Platyclusus orientalis</i>	China	OM283295	OM315203	OM691696
	CBCB-02*	<i>Platyclusus orientalis</i>	China	OM283296	OM315204	OM403996
<i>N. parvum</i>	CMW9081	<i>Actinidia deliciosa</i>	New Zealand	AY236943	AY236888	AY236917
<i>N. parvum</i>	CBS110301	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	AY259098	AY573221	EU673095
<i>N. pennatisporum</i>	MUCC510	<i>Vitis vinifera</i>	-	EF591925	EF591976	EF591959
<i>N. pistaciae</i>	CBS595.76	<i>Pistachia vera</i>	Greece	KX464163	KX464676	KX464953
<i>N. pistaciarum</i>	CBS113083	<i>Pistachia vera</i>	USA	KX464186	KX464712	KX464998
<i>N. protearum</i>	CBS114176	-	South Africa	AF452539	KX464720	KX465006
<i>N. ribis</i>	CBS115475	<i>Ribes</i> sp.	USA	AY236935	AY236877	AY236906
<i>N. sinense</i>	CGMCC3.18315	-	China	KY350148	KY817755	KY350154
<i>N. stellenboschiana</i>	CBS282.70	-	-	KX464225	KX464758	KX465051
<i>N. terminaliae</i>	CMW26679	-	-	GQ471802	GQ471780	KX465052
<i>N. umdonicola</i>	CBS123645	<i>Syzygium cordatum</i>	South Africa	EU821904	EU821874	EU821844
<i>N. ursorum</i>	CMW24480	<i>Eucalyptus</i> sp.	South Africa	FJ752746	FJ752709	KX465056
<i>N. viticlavatum</i>	CBS112878	<i>Vitis vinifera</i>	South Africa	AY343381	AY343342	KX465058
<i>N. vitifusiforme</i>	CBS110887	<i>Vitis vinifera</i>	South Africa	AY343383	AY343343	KX465061
<i>Dothiorella iberica</i>	CBS115041	<i>Quercus ilex</i>	Spain	AY573202	AY573222	EU673096
<i>D. sarmentorum</i>	IMI63581b	<i>Ulmus</i> sp.	United Kingdom	AY573212	AY573235	EU673102
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CBS115476	<i>Prunus</i> sp.	Switzerland	AY236949	AY236898	AY236927

\*表示的是研究菌株。

\*=Strains collected in the present study.

## 2 结果与分析

### 2.1 侧柏枝枯病症状

危害叶片, 多由叶片前端或中部枯黄、变褐枯

死。危害细枝, 呈段斑状变褐 (图 1a, b)。在枯死的鳞叶和细枝上产生黑色的颗粒物 (图 1d)。树冠内部和下部发生严重。严重时, 叶片大量脱



落, 枝条枯死, 在主干或枝干上萌发出一丛丛的小枝叶, 形成所谓“树胡子”。连续数年受害, 最终全

株枯死 (图 1c)。

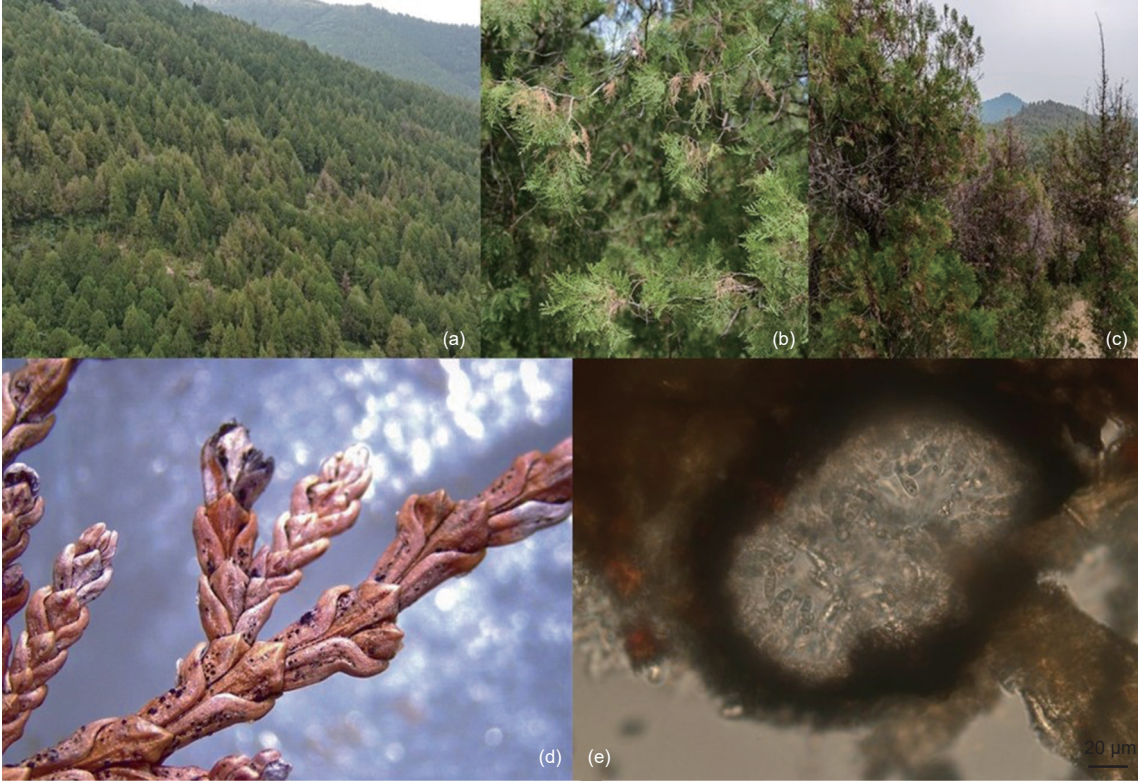


图 1 侧柏枝枯病症状 (a)~(c) 林间症状; (d) 在侧柏鳞叶和枝条上产生的子实体; (e) 分生孢子器纵切面

Fig. 1 Shoot blight disease symptom on *Platycladus orientalis*; (a)~(c) symptom in the field; (d) fruiting bodies produced on leaves and shoots (e) longitudinal section of pycnidium Bars=20  $\mu\text{m}$

## 2.2 分离菌株致病性

从 4 个地点共采集样品 20 份, 分离获得菌株 87 株。根据菌落形态特征分为 3 种类型, 其中链格孢属真菌 27 株 (31.0%), 细菌菌株 4 株 (4.6%), 其余为 1 种真菌共 56 株 (64.4%), 菌落形态特征一致, 分生孢子形态与侧柏鳞叶和枝条上子实体分生孢子形态相似 (图 1e)。

选择代表性菌株 CBL-02、CBL-03 和 CBCB-02 菌株室内离体接种 7 d 后, 在鳞叶、枝条接种部位, 均可以引起相同症状, 致使侧柏鳞叶变色, 形成黑褐色病斑 (图 2a), 枝条接种点黑褐色 (图 2d)。显微观察, 在鳞叶、枝条接种部位均有黑色子实体产生 (图 2b~d)。而空白对照未出现相应症状 (图 2f)。室外活体接种 30 d 后, 在接种部位侧柏鳞叶变黄、枯死 (图 2e)。接种 60 d, 枝条、鳞叶干枯脱落, 侧柏整株死亡 (图 2g), 与田间观察症状一致。从接种发病部位重新分离, 获得的菌株与接种菌株形态特征一致。表明, 分离菌株为侧柏枝枯病的病原菌。

## 2.3 侧柏枝枯病病原菌鉴定

在 PDA 培养基上, 初期白色, 稀疏, 向四周扩散, 培养 5 d 后, 菌落达到平板边缘 ( $\phi = 70 \text{ mm}$ ), 菌丝开始呈现白色絮状, 菌丝致密, 中期颜色逐渐变成灰色 (图 3a), 后期呈现深灰绿色, 背面黑褐色, 边缘完整 (图 3b)。在 MEA 培养基上, 初期白色, 絮状向四周扩散生长, 后渐变为灰白色。培养 3 d, 菌落达到平板边缘 ( $\phi = 70 \text{ mm}$ ), 菌落边缘完整 (图 3d), 后期灰色、灰褐色, 背面深灰绿色 (图 3e)。没有观察到有性特征。分生孢子器于 7 d 内产生于松针上, 单生或聚生, 外面包被白色菌丝, 暗褐色至黑色 (图 3c)。分生孢子单孢透明、梭形、椭圆形、卵球形, 顶端钝圆, 基部平截, 有时两端变窄。无隔膜, 表面光滑, 大小为  $20.6 \pm 2.4 \mu\text{m} \times 7.6 \pm 1.2 \mu\text{m}$  ( $L/W = 2.7$ ,  $n = 50$ ) (图 3f)。

## 2.4 侧柏枝枯病病原菌多基因序列分析

CBL-02、CBL-03、CBCB-02 菌株与 38 株 *Neofusicoccum* spp. 参考菌株进行比对, 以





图 2 致病性试验 (a) ~ (c) 侧柏叶片接种 CBCB-02 菌株 7 d 后症状及子实体; (d) 侧柏枝条接种 CBCB-02 菌株 7d 后症状及子实体; (e) 2 年生侧柏苗接种 CBCB-02 菌株 30 d 症状; (f) 对照; (g) 2 年生侧柏苗接种 CBCB-02 菌株 60 d 症状; 左边为对照, 右边为处理。

Fig. 2 Pathogenicity test; (a)~(c) symptoms on *Platycladus orientalis* leaves inoculated with isolate CBCB-02 for 7 d; (d) symptoms on inoculation sites of *P. orientalis* shoot; (e) symptoms on seedlings (2-years) inoculated with isolate CBCB-02 for 30 d; (f) inoculated with sterile distilled water; (g) symptoms on seedlings (2-years) inoculated with isolate CBCB-02 for 60 d, L: control, R: treated

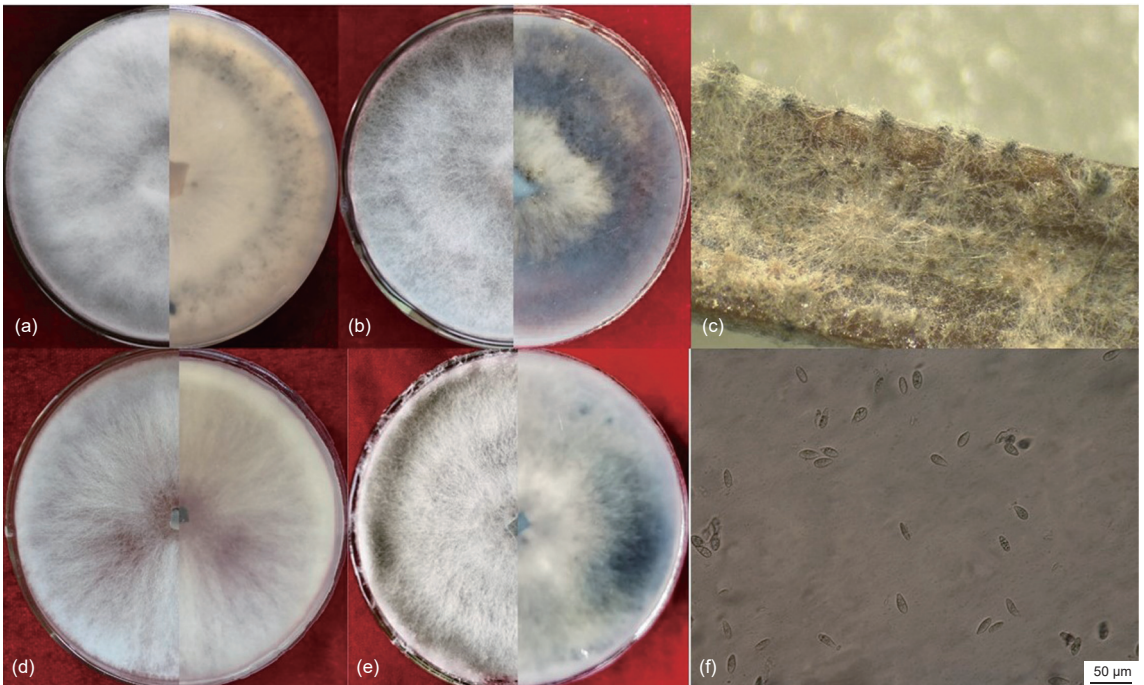


图 3 侧柏枝枯病菌形态特征 (a) ~ (b) 菌落形态 (PDA 培养 7 d, 14 d); (c) 诱导培养基中着生在松针上的分生孢子座; (d) ~ (e) 菌落形态 (MEA 培养 3 d, 7 d); (f) 分生孢子

Fig. 3 *Neofusicoccum occulatum* (a)~(b) cultural character (cultured on PDA for 7 d, 14 d), (c) conidiomata formed on pine needles in culture, (d)~(e) cultural character (cultured on MEA for 3 d, 7 d), (f) conidia, Bars=50 μm

*Botryosphaeria dothidea* CBS115476、  
*Dothiorella iberica* CBS115041、*D. sarmentorum*

IMI63581B 为外围菌株, 基于 ITS、*TEF1-α*、*TUB2* 基因序列数据, 运用最大似然法 (Maximum

Likelihood) 构建进化树。CBL-02, CBL-03 和 CBCB-02 菌株与 *Neofusicoccum occulatum* 聚在一个进化分枝上, 自展支持率为 89% (图 4)。

合分离菌株形态特征、培养性状以及多基因系统发育分析, 本试验获得的菌株为 *N. occulatum* Sakalidis, M. L., Burgess, T. I.。

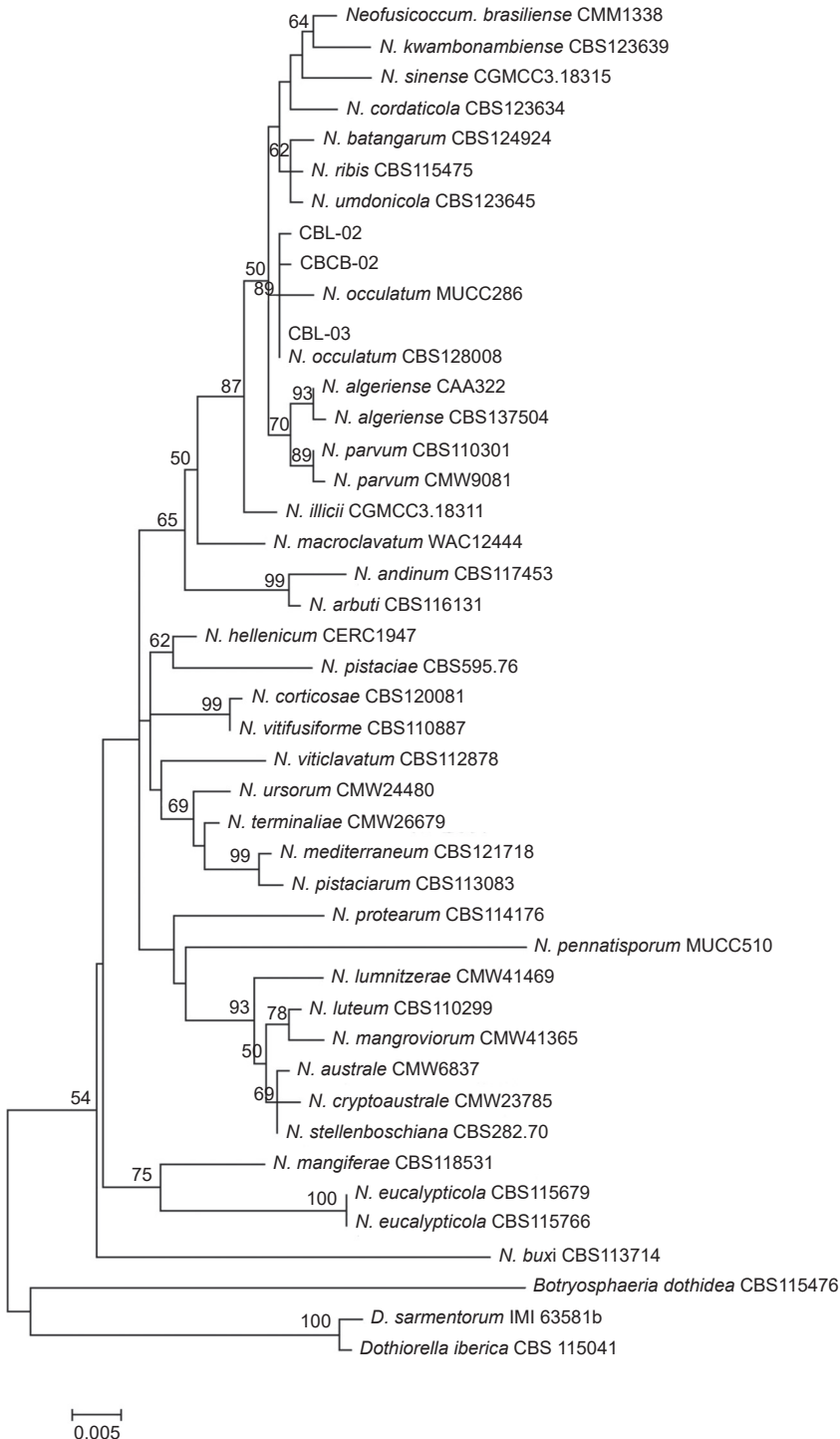


图 4 利用最大似然法基于侧柏叶枯病菌 ITS、*TEF-1 $\alpha$*  和 *TUB2* 的基因数据构建的系统发育树。自展支持率标于节点处, 以 *Botryosphaeria dothidea* CBS115476、*Dothiorella sarmentorum*、*D. iberica* 为外围菌株, 标尺指示 0.005 步变化。

Fig. 4 Phylogenetic tree of all isolates tested with allied taxa calculated with sequence data of concatenated ITS, *TEF-1 $\alpha$*  and *TUB2* using maximum likelihood method (1,000 bootstrap replicates; bootstrap values indicated at nodes. *Botryosphaeria dothidea*, *Dothiorella sarmentorum* and *D. iberica* represent the out group. The scale bar indicates the number of expected changes per site.

### 3 讨论

*N. occulatum* 是 Sakalidis 2011 年<sup>[6]</sup>首次在澳大利亚的桉树 (*Eucalyptus* spp.), 瓦勒迈杉 (*Wollemia nobilis* W. G. Jones, K. D. Hill & J. M. Allen) 上分离获得。已有研究表明, *N. occulatum* 已在非洲 (乌干达)、大洋洲 (澳大利亚、美国夏威夷)、南美洲 (乌拉圭)、亚洲 (泰国) 等 5 个国家有分布, 可以危害南洋杉 (*Araucaria cunninghamii* Sweet), 邓恩桉 (*Eucalyptus dunnii* Maiden), 大桉 (*E. grandis* W. Mill ex Maiden), 巨桉杂交种 (*E. grandis* hybrid), 粗皮桉 (*E. pellita* F. V. Muell.), 桉树 (*Eucalyptus* sp.), 尾叶桉和赤桉杂交种 (*Eucalyptus urophylla* S. T. Blake x *E. camaldulensis* Dehnh.), 瓦勒迈杉 (*W. nobilis*), 银桦 (*Grevillea* sp.), *Blepharocalyx salicifolius* (Kunth) O. Berg, 蓝莓 (*Vaccinium* spp.), 葡萄 (*Vitis vinifera* L.), 束花石斛 (*Dendrobium chrysanthum* Wall. ex Lindl.) 等寄主植物<sup>[7-9]</sup>。本研究结果表明 *N. occulatum* 已在我国有分布, 这是国内有关 *N. occulatum* 的首次报道。目前, 对 *N. occulatum* 的研究仅局限分类研究, 其生物学、生态学、流行病学、种群遗传结构和有效的防治措施尚需进一步系统研究。

据已有的文献报道, 新壳梭孢属真菌 (*Neofusicoccum* sp.) 可以危害美国扁柏 (*Chamaecyparis lawsoniana* (A. Murray bis) Parlatores)、日本扁柏 (*Ch. Obtuse* (Siebold et Zuccarini) Enlicher)、日本花柏 (*Ch. pisifera* (Siebold et Zuccarini) Enlicher)、柏木 (*Cupressus funebris* Endl.)、地中海柏木 (*Cu. sempervirens* L.)、欧洲刺柏 (*Juniperus communis* L.)、北美香柏 (*Thuja occidentalis* L.)、北美乔柏 (*T. plicata* Donn ex D. Don)、罗汉柏 (*Thujopsis dolabrata* (Thunberg ex L. f.) Sieb. et Zucc.)、巨杉 (*Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) J. Buchholz)<sup>[10]</sup>, 尚未见危害

侧柏的报道, 是侧柏上发生的一种新病害。

### 4 结论

本研究通过组织分离、单孢纯化, 致病性测定, 表明获得的单孢菌株 CBL-02, CBL-03 和 CBCB-02 均可以引起侧柏枝枯病。通过形态学以及多基因系统发育分析, 证实分离获得菌株为 *N. occulatum*。

### 参考文献:

- [1] 李培琴, 明洁, 张舒瑶, 等. 黄帝陵侧柏叶枯病的病原菌鉴定及防治药剂筛选[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2021, 49(1): 74-84.
- [2] 朱凤美. 松柏类之一种新病害“叶炎症”[J]. 中华农学会报, 1922, 33: 21-29.
- [3] 戴雨生, 王学道, 林其瑞. 侧柏叶枯病原菌研究[J]. 南京林业大学学报, 1992, 46: 59-65.
- [4] 蒋金升, 田毅, 张文玉, 等. 洋县汉王山林侧柏叶枯病初步调查[J]. 陕西林业科技, 1984, 3: 11-13.
- [5] 赵怀谦. 园林病虫和防治[M]. 北京: 中国建筑工业出版社; 1978.
- [6] Sakalidis M L, Hardy G E S J, Burgess T I. Use of the Genealogical Sorting Index (GSI) to delineate species boundaries in the *Neofusicoccum parvum*-*Neofusicoccum ribis* species complex[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2011, 60: 333-344.
- [7] Scarlett K A, Shuttleworth L A, Collins D, et al. Botryosphaeriales associated with stem blight and dieback of blueberry (*Vaccinium* spp.) in New South Wales and Western Australia[J]. Australasian Plant Pathology, 2019, 48: 45-57.
- [8] Sakalidis M, Slippers B, Wingfield B D, et al. The challenge of understanding the origin, pathways and extent of fungal invasions: global populations of the *Neofusicoccum parvum*-*N. ribis* species complex[J]. Diversity and Distributions, 2013, 19: 873-883.
- [9] Ma X Y, Hyde K D, Phillips A J, et al. Three new host records of endophytic *Neofusicoccum* species reported from *Dendrobium* orchid[J]. Phytotaxa, 2021, 494: 193-207.
- [10] Zlatkovic M. Botryosphaeriaceae species occurring on various woody hosts in Serbia [D]. Novi-Sad: University of Novi Sad; 2016.



# Identification and Pathogenicity of *Neofusicoccum occulatum* the Agent Shoot Blight of *Platycladus orientalis* in Shandong Province, China

LIU Zai-zhe<sup>1,2</sup>, QI Yu-kun<sup>2</sup>, LV Juan<sup>3</sup>, ZHANG Yu-jiao<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>4</sup>, LIU Yun<sup>1</sup>,  
FU Cui-cui<sup>1</sup>, LIU Yin<sup>2</sup>, LIU Bao-you<sup>4</sup>, WANG Qing-hai<sup>2</sup>

(1. Jinan Forest Farm, Jinan, 250014, China; 2. Shandong Provincial Academy of Forestry, Jinan, 250014, China;  
3. Jinan Academy of Landscape and Forestry, Jinan, 250103, China; 4. Yantai Academy of  
Agricultural Sciences, Yantai 265500, China)

**Abstract:** [Objective] The pathogens causing shoot blight of *Platycladus orientalis* (L.) Franco in the Jinan Forest Farm, Shandong province were identified to provide a basis for the prevention and control of the disease. [Method] The pathogens were isolated from the lesion borders of *P. orientalis* by tissue isolation, and the pure cultures were obtained by monosporic isolation. The isolated strains were identified by combining morphological and polygenic phylogenetic analysis (ITS, *TEF-1 $\alpha$* , *TUB2*). [Result] Colonies were initially white, flattened with tufts of white mycelium. After 14 days, mycelium turned to be dark gray-green and dark brown on the back. Conidia are hyaline, unicellular, fusiform, ellipsoid, and cymbiform, ovoid. Three representative isolates (CBL-02, CLB-03, and CBCB-02) were used for pathogenicity tests and phylogenetic analyses. All the isolates tested could cause similar symptoms on the *P. orientalis*. The multi-locus phylogenetic tree was generated using the maximum parsimony method based on 3 genomic loci ITS, *TEF-1 $\alpha$* , and *TUB2*. In the maximum likelihood phylogenetic tree, all test isolates were clustered in *N. occulatum* clade with 89% bootstrap support. Based on the multi-gene phylogeny and morphology, all test isolates were identified as *N. occulatum* Sakalidis, M. L., Burgess, T. I. [Conclusion] It is clear that *N. occulatum* is the pathogenic bacteria causing shoot blight of *P. orientalis*, and *P. orientalis* in Jinan City, Shandong Province.

**Keywords:** shoot blight of *Platycladus orientalis*; identification; morphological characteristics; multilocus phylogenetic analyses; sequence; classification

(责任编辑: 崔 贝)