



云杉叶枯病新病原的鉴定及其生物学特性测定

李柘柘, 崔凌霄, 魏立娟, 金梦军, 马 婷, 杨成德

(甘肃农业大学 植物保护学院/甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070)

摘 要 在甘肃省天水市林区采集到一种症状与已报道略有差别的云杉叶枯病,对病原菌进行分离与鉴定,并测定其致病性和生物学特性。结果表明,在云杉上引起叶枯病症状的分离物 SJ1 菌丝呈白色、红橙色、深黄棕色,后期菌落表面出现红黑色液滴,分生孢子黑色,扁圆形或近球形,表面有褶皱。*ITS*、*TUB2* 和 *RPB2* 基因序列分析表明其与黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)同源性最高,且在系统发育树上聚在一起,因此将其鉴定为黑附球菌(*E. nigrum*)。生物学特性测定结果表明,最适菌丝生长的培养基为麦芽浸粉琼脂培养基,温度为 25 ℃,pH 为 7,光照对菌丝生长影响不大,最适碳、氮源分别为淀粉和蛋白胨,氮源为尿素时不生长。

关键词 云杉叶枯病;黑附球菌;鉴定;生物学特性

云杉(*Picea asperata*)是中国特有的云杉属森林树种^[1],为高大常绿乔木,多在山地形成水源涵养林^[2],是北方针叶林的特征种。云杉属植物可用作建筑、乐器和造纸等^[3-5],也是很受欢迎的绿化和园艺观赏树木^[6]。然而,云杉病害降低了云杉的经济和生态价值。云杉育苗期的病害主要有立枯病(*Rhizoctonia solani*)、灰霉病(*Botrytis cinerea*)和雪枯病(*Lophophacidium hyperboreum*);成林云杉的病害主要有叶锈病(*Chrysomyxa* spp.)、叶疫病(*Rhizosphaera kalkhoffii*)、球果锈病(*Thekopsora areolata*)和立木腐朽病(*Trametes pubescens*)。

云杉叶枯病是一种叶部病害,植株被感染后针叶枯萎,造成巨大的经济损失。袁自清^[7]报道了一种云杉叶枯病症状,受感染针叶褪绿变枯黄色,枯死后不脱落,枯死的针叶上埋生有黑色小点;在江西省发现针叶上出现褐色病斑的叶枯病^[8],病斑周围有半透明环带,老叶上病斑颜色比新叶要深;Janosikova-Heckova 等^[9]观察到一种云杉叶枯病症状,被侵染的针叶上有红色或棕色条带,针头枯死呈红棕色,针叶上有黑色的子实体。2020 年在甘肃省天水市调查时,发现一种症状与已报道略有差别的云杉叶枯病,发病部位呈

深黄色,病健交界处呈黑色,病斑逐渐向外扩展,最后整片针叶变黄脱落。枯死针叶表面出现黑点,湿度大时叶基部和枝条被白色菌丝层覆盖(图 1-A)。因此,本试验对其进行了病原菌分离、鉴定、致病性和生物学特性测定,以期云杉叶枯病的诊断和科学防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 云杉叶枯病菌的分离与致病性测定

采用组织分离法对收集自甘肃省天水市林区具有典型叶枯病症状的云杉针叶进行分离,从病健交界处切下长 1 cm 的针叶组织,用 75% 的乙醇消毒 30 s,用无菌水冲洗 3 次后在无菌滤纸上干燥,然后将它们置于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上,25 ℃避光培养 3~5 d,经单菌落分离纯化后,4 ℃储存,备用。

通过柯赫氏法则进行致病性测定。先用接种离体植物的方法进行致病性试验^[10]。用 75% 的乙醇对离体健康的枝条进行消毒,无菌水洗涤,风干后使用。将枝条放置在覆盖有两张无菌滤纸的培养皿中,树枝柄部用无菌棉包裹,滤纸和无菌棉用无菌水保持湿润。每个处理和对照都在单独的树枝上和培养皿中进行,接种前用无菌昆虫针轻

收稿日期:2022-03-10 修回日期:2022-04-04

基金项目:甘肃省林草局项目(GFG2019-366-3)。

第一作者:李柘柘,男,硕士研究生,从事植物病理学研究。E-mail:645773775@qq.com

通信作者:杨成德,男,博士,教授,从事植物病理学研究。E-mail:yangcd@gsau.edu.cn

轻刺破每个针叶的角质层,将培养 5 d 的分离物菌丝或孢子悬浮液喷洒在刺破的针叶上,对照喷洒无菌水。所有接种和对照处理在 25 ℃ 的培养箱中 12 h 光照和 12 h 黑暗交替培养,观察发病情况,叶枯病出现后重新分离,3 次重复。对离体树枝上针叶造成叶枯病的分离物用相同的方法接种于活体云杉上再次进行致病性测定,同样每个处理和对照都在单独的树枝上进行,喷撒悬浮液和无菌水后用塑料袋保湿 48 h^[11],观察发病情况进行再分离,重复 3 次。

1.2 病原菌鉴定

1.2.1 形态学鉴定 将菌株接到 PDA 培养基中心,25 ℃ 避光培养,观察菌落形态和色素颜色,然后在光学显微镜下观察分生孢子的形状和大小,至少随机选择 50 个分生孢子测量大小。

1.2.2 分子生物学鉴定 按公司说明书使用 HP 真菌 DNA 试剂盒 D3195(Omega Bio-Tek, 中国)提取病原菌基因组 DNA,DNA 样品于一 20 ℃ 保存,备用。使用核糖体 RNA 序列(ITS)、 β -微管蛋白(*TUB2*)基因^[12]和 RNA 聚合酶 II 第 2 大亚基(*RPB2*)基因^[13]进行 PCR 扩增。

PCR 在含有 1 μ L DNA 模板、上下游引物各 1 μ L、12.5 μ L 2 $\times$ Easy-Taq PCR Super Mix(中国天启基因生物技术有限公司)、9.5 μ L ddH₂O₂ 的 25 μ L 反应体系中进行。扩增引物如表 1 所示,引物由天启基因生物技术有限公司合成。

ITS 基因序列的扩增程序为 95 ℃ 预变性 3 min,95 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。*TUB2* 基因序列的扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,34 个循环,72 ℃ 延伸 7 min。*RPB2* 基因序列的扩增程序为 94 ℃ 预变性 2 min,94 ℃ 变性 30 s,54 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环,72 ℃ 延伸 2 min。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,送天启基因生物技术有限公司进行测序。测序结果与 NCBI 核苷酸数据库中的已知序列进行 BLAST 比对,并下载已知的同源序列。将测序结果提交至 GenBank 获取登录号。采用 MEGA 7.0 中的邻接法构建系统发育树,并进行 1 000 次 bootstrap 测试,计算系统发育树中节点的置信度。

表 1 引物序列

Table 1 Primer information

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
ITS	ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCCTGCGG-3')
TUB2	Bt2a(5'-GGTAACCAATCGGTGCTGCTTTC-3')
RPB2	5F2(5'-GGGGWGAYCAGAAGAAGGC-3')

1.3 病原菌生物学特性测定

1.3.1 供试培养基 参考董汉松^[14]的方法,配制马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、虎红琼脂(rose bengal agar, RBA)培养基、胡萝卜琼脂(carrot agar, CA)培养基、马铃薯蔗糖琼脂(potato sucrose agar, PSA)培养基、麦芽浸粉琼脂(malt extract agar, MEA)培养基、察氏(Czapek agar, CZA)培养基、水琼脂(water agar, WA)培养基、马铃薯胡萝卜琼脂(potato carrot agar, PCA)培养基和燕麦片琼脂(oatmeal agar, OMA)培养基。

1.3.2 培养基对菌丝生长的影响 配制 9 种供试培养基。用直径为 0.5 cm 的无菌打孔器取供试菌株的菌饼,接入到培养基中央,再放入培养箱,25 ℃ 黑暗培养 6 d,重复 3 次。用十字交叉法测量菌落直径。

1.3.3 温度对菌丝生长的影响 温度条件为 5、10、15、20、25、30、35 和 40 ℃,将菌饼接入最适培

养基中央,培养箱中黑暗培养 6 d,其他同“1.3.2”。

1.3.4 pH 对菌丝生长的影响 用 0.1 mol/L 的 NaOH 和 HCl 调 pH,选择 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 共 8 个梯度,将菌饼接入不同 pH 的最适培养基中央,25 ℃ 黑暗培养 6 d,其他同“1.3.2”。

1.3.5 光照对菌丝生长的影响 将病原菌菌饼接入到最适培养基中央,分别在 12 h 光照和 12 h 黑暗交替、全光照和全黑暗的培养箱中 25 ℃ 恒温培养 6 d,其他同“1.3.2”。

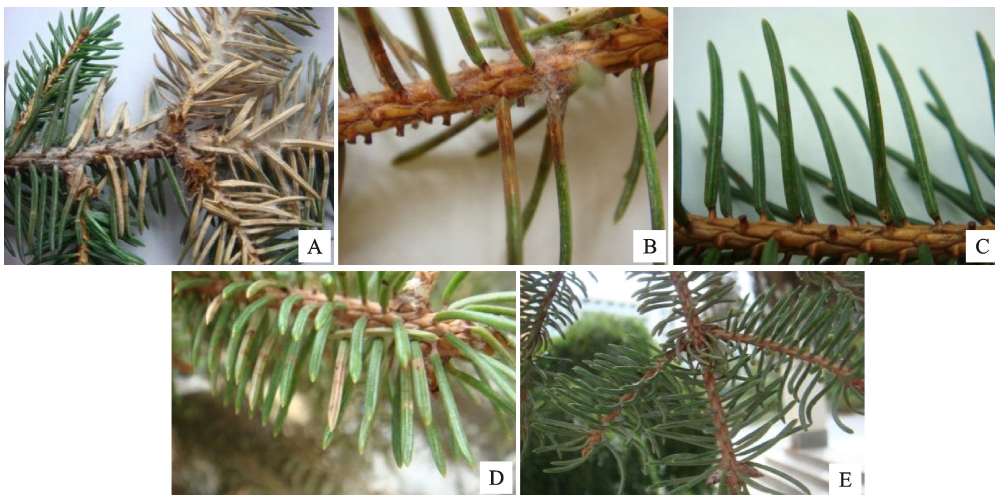
1.3.6 碳、氮源对菌丝生长的影响 以 CZA 培养基为基础培养基和对照,替换其中的碳、氮源。供试碳源为:蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、淀粉、木糖、果糖、阿拉伯糖和乳糖。氮源为:硝酸钠、蛋白胨、甘氨酸、脯氨酸、氯化铵、硫酸铵、尿素、亮氨酸、硝酸铵和苯丙氨酸。制作不同的碳、氮源培养基(对照的碳、氮源为蔗糖和硝酸钠),将病原菌接入到培养基中央,25 ℃ 黑暗培养 6 d,其他同“1.3.2”。

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离和致病性测定

根据菌落形态,获得 5 株真菌分离物,编号为 SJ1-SJ5。通过将菌丝体悬浮液(来自培养 5 d 的分离物 SJ1)和分生孢子悬浮液(每毫升含 10^6 个分生孢子,来自培养 5 d 的分离物 SJ2-SJ5)喷洒在离体枝条的针叶上来进行接种。在 7 d 内,只

有接种了 SJ1 的针叶表现出与最初从森林中采集的样本相似的症状,而对照和接种其他分离物的针叶不发病(图 1-B,1-C)。接种 SJ1 的针叶在活体植株上 7 d 内出现上述典型症状,针叶上出现病斑,之后逐渐扩展,针叶变黄和枯萎,最终从树上脱落,对照不发病(图 1-D,1-E)。从接种后发病的针叶中重新分离,得到与菌株 SJ1 菌落特征相同的分离物,证实 SJ1 是云杉叶枯病的病原物。



A. 从森林中采集的云杉病叶;B. 用菌株 SJ1 接种离体枝条针叶的症状;C. 用无菌水接种离体枝条针叶的对照;D. 用菌株 SJ1 接种活体枝条针叶出现症状;E. 用无菌水接种活体枝条针叶的对照

A. Diseased needles of *P. asperata* collected from forest; B. Symptoms of SJ1 strain inoculation on the needles of detached branches; C. needles of detached branches inoculated with sterile water as control; D. Symptoms of SJ1 strain inoculation on the needles of vivo branches; E. needles of vivo branches inoculation with sterile water as control

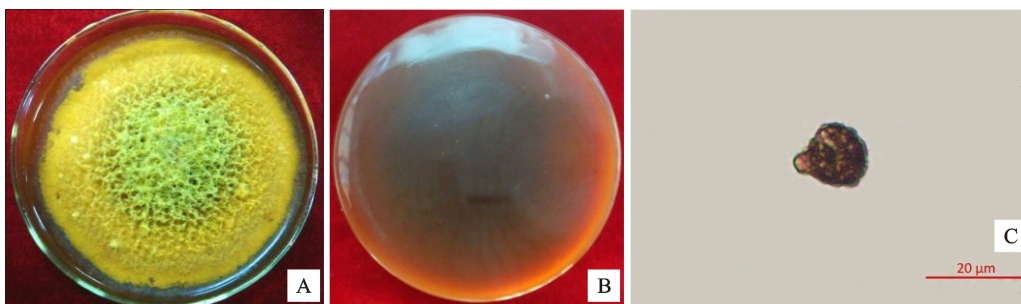
图 1 云杉叶枯病林间和接种后症状

Fig. 1 Symptoms of *P. asperata* needle blight in forest and after inoculation

2.2 病原菌鉴定

2.2.1 形态学鉴定 将 SJ1 在 PDA 培养基上培养,初期菌丝呈白色絮状,然后由红橙色变为深黄褐色,培养后期出现气生菌丝,菌落表面出现红黑

色液滴,背面为红橙色(图 2-A,2-B)。分生孢子黑色,扁圆形或近球形,表面有褶皱,未成熟的分生孢子有淡色的柄细胞,大小为 $12.10\ \mu\text{m} \sim 28.82\ \mu\text{m} \times 11.58\ \mu\text{m} \sim 16.66\ \mu\text{m}$ ($n=50$)(图 2-C)。



A. 菌落正面;B. 菌落反面;C. 分生孢子(标尺=20 μm)

A. Front side of SJ1 colony; B. Back side of SJ1 colony; C. Conidia of SJ1(bar=20 μm)

图 2 菌株 SJ1 的形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of strain SJ1

2.2.2 分子生物学鉴定 提取 SJ1 的基因组 DNA,用引物扩增核糖体 RNA 序列(*ITS*)、 β -微管蛋白(*TUB2*)和 RNA 聚合酶 II 第 2 大亚基(*RPB2*)基因,分别得到大小为 545、347 和 939 bp 的基因片段,所得序列上传至 GenBank 中(登录号 MW725153、MW751459 和 MW788323)。

在与 GenBank 中的序列进行 BLAST 比较后构建系统发育树,SJ1 的 *ITS*、*TUB2* 和 *RPB2*

的基因序列与黑附球菌 *Epicoccum nigrum* (GenBank 登录号 MW227323、MW186822 和 MW186823)的基因序列同源性分别为 100%、98.36%和 99.79%,使用 MEGA 7.0 邻接法对 3 个基因联合进行系统发育分析,发现菌株 SJ1 与菌株 *E. nigrum* 聚在一起(图 3)。根据形态学^[15]和分子生物学特征,SJ1 被鉴定为黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)。

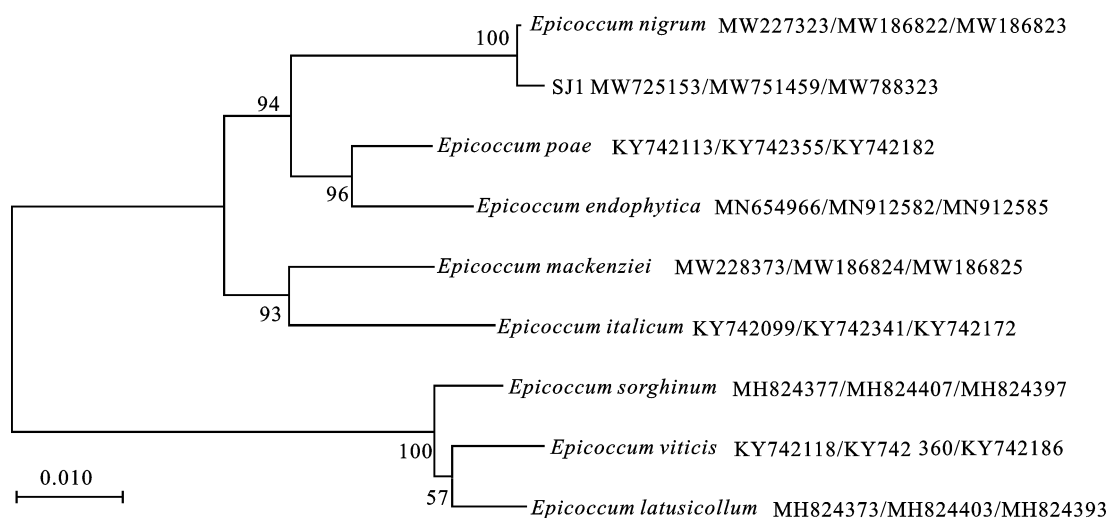


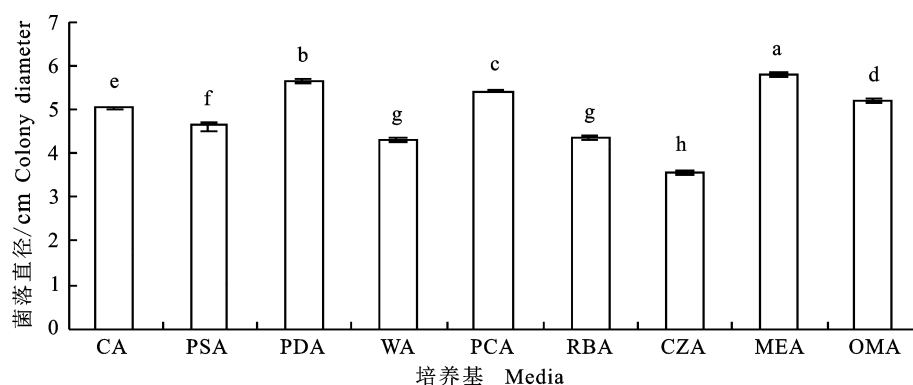
图 3 菌株 SJ1 基于 *ITS*、*TUB2* 和 *RPB2* 基因联合构建的多位点系统发育树

Fig. 3 Multilocus phylogenetic tree constructed with *ITS*, *TUB2* and *RPB2* genes of strain SJ1

2.3 生物学特性

2.3.1 培养基对菌丝生长的影响 黑附球菌 SJ1 在 9 种供试培养基上均能生长,最适菌丝生长的为 MEA 培养基,菌落直径达 5.78 cm,显著大于其他培养条件($P < 0.05$),而在 CZA 培养基

上生长最慢,菌落直径仅 3.57 cm。在 PCA 和 OMA 培养基上气生菌丝较稀疏,在 WA 培养基上基本不生长,而在其余培养基上气生菌丝生长繁茂(图 4)。



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同

Different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$). The same below

图 4 SJ1 菌丝在不同培养基上的生长情况

Fig. 4 Effect of media on mycelial growth of *E. nigrum* SJ1

2.3.2 温度对菌丝生长的影响 黑附球菌 SJ1 在 10 到 30 °C 下均能生长且气生菌丝繁茂,在

35 °C 下基本不生长,而在 5 °C 和 40 °C 时菌落不生长。从 10 °C 到 25 °C,菌落直径逐渐增大,在

25 ℃时菌落直径显著大于其他温度条件($P < 0.05$),从 25 ℃到 30 ℃,菌落直径减小,说明 25 ℃为菌丝最适生长温度(图 5)。

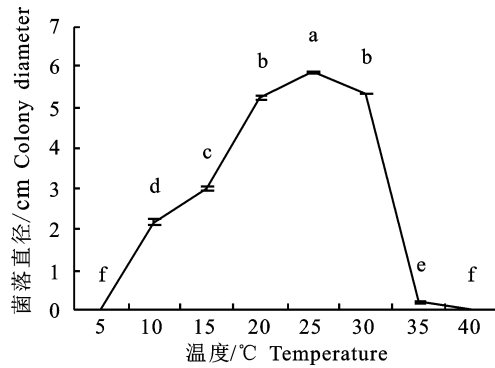


图 5 SJ1 菌丝在不同温度的生长情况

Fig. 5 Effect of temperature on mycelial growth of *E. nigrum* SJ1

2.3.3 pH 对菌丝生长的影响 黑附球菌 SJ1 在 pH 为 4 到 11 范围内均能生长且气生菌丝繁茂。pH 为 4 时生长最慢,菌落直径为 5.68 cm。pH 由 4 到 7 时,菌落直径逐渐变大,在 pH 为 7 时菌落直径最大,菌落直径达 6.95 cm,pH 由 7 到 11 时,菌落直径逐渐变小。说明在过酸和过碱条件菌丝生长均会受到抑制(图 6)。

2.3.4 光照对菌丝生长的影响 黑附球菌 SJ1 在不同光照下均能生长且气生菌丝繁茂,12 h 光照和 12 h 黑暗交替培养条件最适菌丝生长,菌落直径达 5.63 cm,全黑暗条件下菌丝生长最慢,菌落直径为 5.27 cm。各光照条件下差异不显著(图 7)。

2.3.5 碳源对菌丝生长的影响 黑附球菌 SJ1 在不同碳源下均能生长,但碳源为乳糖和淀粉时

气生菌丝较稀疏,为其余碳源时气生菌丝繁茂;碳源为淀粉时菌丝生长最快,菌落直径达 5.12 cm,为麦芽糖时生长最慢,菌落直径仅 3.90 cm,除麦芽糖外的其余碳源均对菌丝生长有促进作用(图 8)。

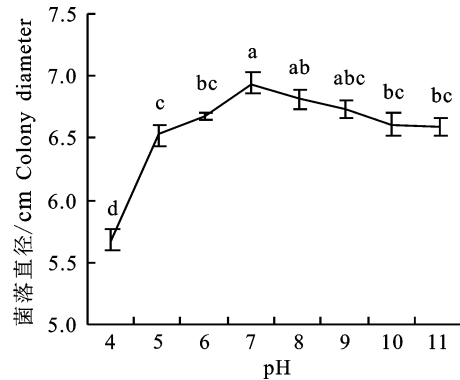


图 6 不同 pH 下 SJ1 菌丝的生长

Fig. 6 Effect of pH on mycelial growth of *E. nigrum* SJ1

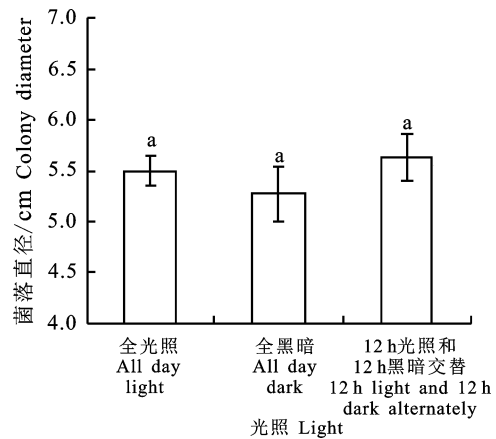


图 7 SJ1 菌丝在不同光照处理的生长状况

Fig. 7 Effect of light on mycelial growth of *E. nigrum* SJ1

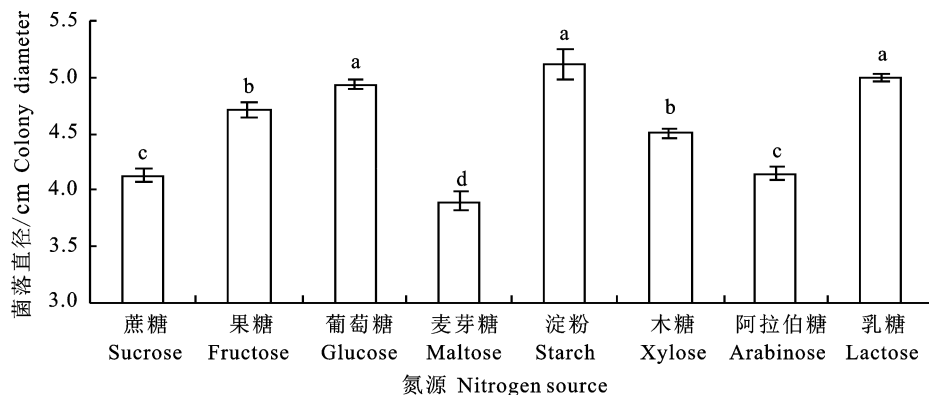


图 8 不同碳源下 SJ1 菌丝的生长

Fig. 8 Effect of carbon source on mycelial growth of *E. nigrum* SJ1

2.3.6 氮源对菌丝生长的影响 黑附球菌 SJ1 在氮源为尿素时不生长,其余氮源条件下均能生长,但氮源为亮氨酸和蛋白胨时气生菌丝较稀疏,为其余氮源时气生菌丝繁茂;氮源为蛋白胨时生

长最快,菌落直径达 5.15 cm,且与对照差异显著 ($P < 0.05$),除氮源为蛋白胨外,其余氮源均对菌丝有抑制作用(图 9)。

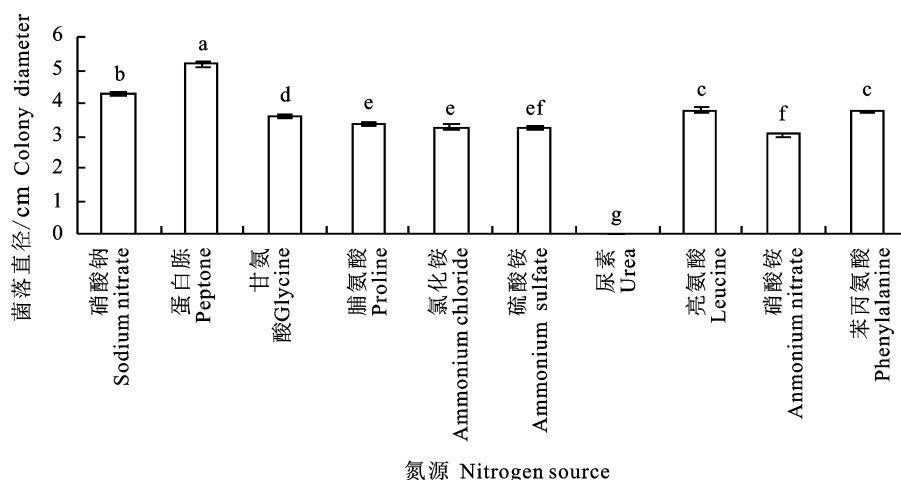


图 9 不同氮源下 SJ1 菌丝的生长

Fig. 9 Effect of nitrogen source on mycelial growth of *E. nigrum* SJ1

3 讨论与结论

叶枯病导致云杉针叶的枯萎和病变,在本研究中发现一种新的云杉叶枯病病害,通过形态学和多位点序列分析,结合柯赫氏法则验证,最终确定云杉叶枯病的病原菌为黑附球菌。袁自清^[7]发现云杉巴氏腔孢(*Barria piceae*)可引起云杉叶枯病,在江西省报道了一种由杉木假单孢杆菌(*Pseudomonas cunninghamiae* sp. nov.)引起的叶枯病^[8],Janosikova-Heckova 等^[9]观察到的云杉叶枯病是由 *Dothistroma septosporum* 引起的,由黑附球菌造成的云杉叶枯病为首次报道。

黑附球菌多分布于空气和土壤中,其代谢产物有抗菌和抗生物膜活性作用^[16],但其也可引起茶树褐斑病^[17]、水稻穗褐变病^[18]和豇豆叶斑病^[19]等植物病害,而作为一种危害云杉的新病原,研究其生物学特性对其防治有着重要意义。SJ1 在 PDA 培养基上培养后期菌落中央呈黄褐色,菌落形态与引起水稻穗褐变病的黑附球菌落相似^[18],而王俊丽等^[20]从火龙果茎中分离得到的黑附球菌落中央呈浅黄白色,这可能与病原菌寄主不同有关。本研究发现黑附球菌菌丝可有效利用多种碳、氮源,最适碳源为淀粉,与 Beverly 等^[21]的研究结果一致,最适氮源为蛋白胨,碳源为麦芽糖时生长最慢,而在氮源为尿素时不生长,这为其防治提供了有益的思路。

本研究对云杉叶枯病病原进行了分离、鉴定和生物学特性测定,为云杉叶枯病的诊断和防治提供技术参考。但作为新病害,其流行规律、致病机制及综合防治方法等还需进一步研究。

参考文献 Reference:

- [1] 张建伟,王军辉,马建伟.粗枝云杉胚性愈伤组织增殖后期的体细胞胚发生方式转变[J].植物生理学报,2014,50(2):197-202.
ZHANG J W, WANG J H, MA J W. The way change of somatic embryogenesis at the late stage of embryogenic callus proliferation of *Picea asperata* Mast [J]. *Plant Physiology Journal*, 2014, 50(2): 197-202.
- [2] 徐峥静茹,杨晓梅,陈静,等.疏伐对不同林龄云杉人工林地被层水源涵养能力的影响[J].应用与环境生物学报,2021,27(3):657-666.
XU ZH J R, YANG X M, CHEN J, et al. Effect of thinning on the water conservation capacity of *Picea asperata* of different ages [J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2021, 27(3): 657-666.
- [3] THORSTEN S. Wood constructions for sustainable building renovation [J]. *Advanced Materials Research*, 2018, 1150: 67-72.
- [4] DINULICA F, STANCIU M D, SAVIN A. Correlation between anatomical grading and acoustic-elastic properties of resonant spruce wood used for musical instruments [J]. *Forests*, 2021, 12(8): 1122.
- [5] 四川省云杉纸浆材协作组.云杉人工林材性变异的初步研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2001,29(3):

- 29-34.
- Sichuan *Picea asperata* Pulpwood Cooperation Group. A preliminary study on variation pattern of wood nature for *Picea asperata* plantation [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2001, 29(3): 29-34.
- [6] 杨传杰, 张君霞, 黄鑫. 粗枝云杉对 4 种常见园林配置植物种子萌发的化感作用[J]. *甘肃农业大学学报*, 2018, 53(2): 103-107, 112.
- YANG CH J, ZHANG J X, HUANG X. Allelopathy of *Picea asperata* to seed germination of four common garden configuration plants [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2018, 53(2): 103-107, 112.
- [7] 袁自清. 我国新发现的几种云杉病害及其新记录真菌[J]. *八一农学院学报*, 1995, 18(1): 42-47.
- YUAN Z Q. Some new diseases and new record fungi on *Picea schrenkiana* in Xinjiang, China [J]. *Journal of August 1st Agri. College*, 1995, 18(1): 42-47.
- [8] 南京林产工业学院, 江西省森林病虫害防治试验站, 江西省进贤县北岭林场. 杉木叶枯病病原细菌—杉木假单胞杆菌 (*Pseudomonas cunninghamiae* sp. nov.) [J]. *微生物学报*, 1977, 17(3): 179-182.
- Nanjing Forest Products Industrial College, Forest Pest Control Experimental Station of Jiangxi Province, Beiling Forestry Station of Jinxian County Jiangxi Province. The bacterium which causes needle blight of Chinese fir: *Pseudomonas cunninghamiae* sp. nov. [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1977, 17(3): 179-182.
- [9] JANOSIKOVA-HECKOVA Z, ONDRUSKOVA E, BARTA M, et al. The hosts and geographic range of *Dothistroma needle blight* in Slovakia [J]. *Forest Pathology*, 2018, 48(3): e12421.
- [10] LI L, SHI H, ZHANG S, et al. First report of *Lasiodiplodia gilanensis* causing twig and leaf blight on *Machilus thunbergii* in Zhejiang province of China [J]. *Plant Disease*, 2018, 102(10): 2029.
- [11] GUTHA R V, PALANNA K B, PRAVEEN B, et al. First confirmed report of leaf blight on Browntop millet caused by *Bipolaris setariae* in southern peninsular India [J]. *Plant Disease*, 2021, 105(5): 1561.
- [12] LOUSIE G N, DONALDSON G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(4): 1323-1330.
- [13] CHEN Q, HOU L W, DUAN W J, et al. Didymellaceae revisited [J]. *Studies in Mycology*, 2017, 87(C): 105-159.
- [14] 董汉松. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012: 14-16.
- DONG H S. Methods in Plant Pathology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012: 14-16.
- [15] LCDL F, MELO F, AGUILAR-VILDOSO C I, et al. Polyphasic analysis of intraspecific diversity in *Epicoccum nigrum* warrants reclassification into separate species [J]. *Plos One*, 2011, 6(8): e14828.
- [16] QADER M M, HAMED A A, SOLDATOU S, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of the fungal metabolites isolated from the marine endophytes *Epicoccum nigrum* M13 and *Alternaria alternata* 13A [J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(4): 232-232.
- [17] YIN Q, JIANG S, LI D, et al. First report of *Epicoccum nigrum* causing brown leaf spot in tea in Guizhou province, China [J]. *Plant Disease*, 2022, 106(1): 321.
- [18] 台莲梅, 姜小玉, 靳学慧, 等. 黑龙江省水稻稻褐变病原菌的分离与鉴定[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(6): 1776-1786.
- TAI L M, JIANG X Y, JIN X H, et al. Isolation and identification of pathogen causing rice panicle browning in Heilongjiang province [J]. *Microbiology China*, 2020, 47(6): 1776-1786.
- [19] YELANDUR S D, SHIVANNEGOWDA M, KESTUR N A, et al. First report of *Epicoccum nigrum* associated with leaf spot disease of cowpea (*Vigna unguiculata*) from India [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2021, 103(2): 391-392.
- [20] 王俊丽, 任建国, 刘红美. 一种引起火龙果茎病害的病原菌鉴定[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(10): 307-311.
- WANG J L, REN J G, LIU H M. Identification of the pathogen causing pitaya stem disease [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2014, 30(10): 307-311.
- [21] BEVERLY S B, ESTELLE L. The influence of nutrition on the growth and sporulation of two strains of *Epicoccum nigrum* [J]. *Mycologia*, 2018, 73(2): 238-243.

Identification of A Novel Pathogen of Needle Blight of *Picea asperata* and Its Biological Characteristics

LI Zhezhe, CUI Lingxiao, WEI Lijuan, JIN Mengjun, MA Ting and YANG Chengde

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Biocontrol Engineering Laboratory of
Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract In the forest region of Tianshui in Gansu province, a *Picea asperata* needle blight with symptom slightly different from those previously reported ones we collected. The pathogenic fungi were isolated, identified, and their pathogenicity and biological characteristics were assessed. The results revealed that the mycelial of the isolate SJ1 inducing needle blight symptoms on *P. asperata* was white, reddish-orange and dark yellowish-brown in color, had red black droplets on the anaphase colony's surface. Conidia had wrinkles on the surface and were dark, oblate or nearly spherical. The *ITS*, *TUB2* and *RPB2* genes had the most identity with *Epicoccum nigrum* and clustered together on the phylogenetic tree, indicating that the pathogen SJ1 was *E. nigrum*. According to the biological characteristics, malt extract agar was the best medium for *E. nigrum*. The optimum temperature for mycelial growth was 25 °C, the pH was 7, the light conditions had minimal effect on mycelial growth, the carbon and nitrogen sources were starch and peptone, the mycelial did not grow when the nitrogen source was urea.

Key words *P. asperata* needle blight; *E. nigrum*; Identification; Biological characteristics

Received 2022-03-10

Returned 2022-04-04

Foundation item Project of Gansu Forestry and Grass Bureau(No. GFG2019-366-3).

First author LI Zhezhe, male, master student, Research area: plant pathology. E-mail: 645773775@qq.com

Corresponding author YANG Chengde, male, Ph. D, professor. Research area: plant pathology. E-mail: yangcd@gsau.edu.cn

(责任编辑: 郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)