

## 楚雄华山松种子园无性系幼苗叶枯病病原菌鉴定

吕则佳<sup>1</sup>, 陈健鑫<sup>1</sup>, 冯 峻<sup>3</sup>, 朱 艳<sup>1</sup>, 董云祥<sup>4</sup>, 罗正平<sup>4</sup>, 马焕成<sup>2</sup>, 伍建榕<sup>1,2\*</sup>

(1. 云南省高校森林灾害预警控制重点实验室, 西南林业大学 生物多样性保护学院, 云南 昆明 650224;

2. 西南地区生物多样性保育国家林业和草原局重点实验室, 西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224;

3. 云南省林木种苗工作站, 云南 昆明 650215; 4. 楚雄市林业和草原局国有林场, 云南 楚雄 675000)

**摘 要:**为明确楚雄市华山松种子园无性系幼苗叶枯病的病原, 采用传统形态学和分子生物学相结合的方法对华山松叶枯病进行病原鉴定。结果表明, 引起华山松叶枯病的病原菌为胡枝子拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis lespedezae*)和互隔链格孢(*Alternaria alternata*)。

**关键词:**叶枯病; 病原鉴定; 华山松种子园; 无性系; 楚雄

**中图分类号:**S763

**文献标志码:**A

**文章编号:**1001-7461(2022)04-0181-07

### Pathogen Identification of Leaf Blight of Clone Seedlings of *Pinus armandii* at Seed Orchard in Chuxiong City

LÜ Ze-jia<sup>1</sup>, CHEN Jian-xin<sup>1</sup>, FENG Jun<sup>3</sup>, ZHU Yan<sup>1</sup>, DONG Yun-xiang<sup>4</sup>, LUO Zheng-ping<sup>4</sup>,  
MA Huan-cheng<sup>2</sup>, WU Jian-rong<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Universities of Yunnan Province, College of Biodiversity Conservation,

Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China; 2. Key Laboratory of Biodiversity Conservation in Southwest China,

National Forestry and Grassland Administration, College of Biodiversity Forestry, Southwest Forestry University,

Kunming 650224, Yunnan, China; 3. Yunnan Work Station of Forest Seedling, Kunming 650215, Yunnan, China;

4. Chuxiong Bureau of Forestry and Grassland, Chuxiong 675000, Yunnan, China)

**Abstract:** The method of combining traditional morphology and molecular biology was used to identify the pathogens of leaf blight of clone seedlings of *Pinus armandii* at seed orchard in Chuxiong City of Yunnan Province. *Pestalotiopsis lespedezae* and *Alternaria alternata* were identified.

**Key words:** leaf blight; pathogen identification; *Pinus armandii* seed orchard; clone; Chuxiong City

华山松(*Pinus armandii*)是松科(Pinaceae)松属(*Pinus*)植物<sup>[1]</sup>,是我国特有的用材树种、同时也是高海拔地区重要的造林树种之一<sup>[2-3]</sup>。华山松有较高的价值,针叶可提取芳香油;材质经软,耐腐,可做用材树种;种子饱满,可作干果供食用<sup>[4]</sup>;华山松在医用方面有着极高的价值,例如它的松塔提取物对 HIV 病毒活性有一定的抑制作用<sup>[5]</sup>。

云南楚雄紫溪山华山松无性系种子园位于 24°58'58"—25°04'00"N, 101°22'29"—101°26'07"E,海拔 2 200~2 400 m,年平均气温 12℃,年平均降雨

量 1 000 mm<sup>[6]</sup>。紫溪山自然保护区是一个重要的生态旅游景区,由于气候环境条件好,人流量大,加之又连续干旱,病虫害时常发生<sup>[7]</sup>,尤其华山松叶枯病发生严重,然而华山松是云南主要造林树种,在退耕还林、城乡绿化和用材林等建设中,发挥着举足轻重的作用,随着林业建设发展及其种植效益的凸显,社会对华山松的优良种子需求会越来越多。近年来对叶枯病的研究较多,例如,张凡等<sup>[8]</sup>对落羽杉赤枯病的病原进行了分离鉴定并分析了生物学特性。王忠民等<sup>[9]</sup>对油松的落针病、赤枯病病害进行了调查,

收稿日期:2021-08-13 修回日期:2021-10-13

基金项目:国家自然科学基金项目(31860208,31560207);国家重点研发计划(2019YFD100200X),西南林业大学木棉纤维人工林产业化培育省级创新团队项目(2018HC014);紫溪山华山松种子园不同无性系种子的抗病性评价(2019-2022)。

第一作者:吕则佳。研究方向:森林病理学。E-mail:1064858477@qq.com

\* 通信作者:伍建榕,博士,教授,博士生导师。研究方向:森林病理学和资源微生物利用。E-mail:1176279044@qq.com

总结了发病的症状及规律。目前,对华山松的研究主要集中在其种子的结实量性状、地理种群的遗传变异、种子开花习性以及与华山松息息相关的昆虫等方面<sup>[10-11]</sup>,对于华山松叶枯病此类病害研究鲜有报道。

准确鉴定病原菌是研究病害发生规律及防治的基础。林晓民等<sup>[12]</sup>和张志华等<sup>[13]</sup>提出了结合核酸序列在 ITS 区对病原菌进行鉴定。本研究对楚雄紫溪山华山松种子园叶枯病的发生情况进行调查,通过分离华山松叶枯病的病原,运用形态学特征及分子生物学相结合的方法鉴定病原,同时在华山松幼苗上接种分离获得的纯培养物,验证其致病性以初步探索华山松幼苗叶枯病的病原种类,为华山松病害防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试标本及种子:2019 年 9 月至 2021 年 6 月,在楚雄华山松无性系种子园采集症状明显的病叶,用信封保存带回实验室;同时将华山松幼苗采集后用尼龙网袋带回实验室备用。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 17 g,蒸馏水 1 000 mL)。

供试试剂:生工柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、2× San Taq PCR Mix、DNA 分子量标准 Marker、4S Green Plus 核酸染料、基因 18S *rRNA*、 $\beta$ -*tubulin* (*TUB*)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gpd*)和 *Alt a1* 引物,上述试剂盒及基因引物均购置于上海生工生物工程股份有限公司。

### 1.2 华山松幼苗叶枯病的调查

2019 年 9 月至 2021 年 6 月,对华山松无性系种子园叶枯病的发生情况进行调查,分别调查 5 个样地,每个样地随机调查 40 株,每株在东南西北 4 个方向观察华山松叶枯的病叶数,并根据危害的程度参照杨光道<sup>[14]</sup>分级标准进行病害等级划分(表 1)。统计并整理 5 个样地的发病株数,计算发病率及病情指数。

### 1.3 华山松叶枯病病原菌分离及形态观察

病原菌分离方法参照方中达<sup>[15]</sup>采用组织分离法。将消毒组织块移至 PDA 平板中,在恒定的 25 ℃ 生化培养箱中培养,待菌落长出后,接种针经酒精灯外焰灼烧冷却后挑取单菌落菌丝接种至 PDA 平板上纯化 2~3 次,纯菌落接种于试管斜面 4 ℃ 保存。将纯菌落重新接种至新的 PDA 平板上,在生化培养箱中 25 ℃ 培养 7 d,在显微镜下观察培养菌株的分生孢

子形态,并测量分生孢子的大小。肉眼观察纯培养物的菌丝颜色及是否分泌色素等性状并做好记录。

表 1 华山松叶枯病的分级标准

Table 1 The classification standard of leaf blight of *Pinus armandii*

病害等级	分级标准	代表数值
I	植株健康,不发病	0
II	针叶枯死率 $\leq 25\%$	1
III	$25\% < \text{针叶枯死率} \leq 50\%$	2
IV	$50\% < \text{针叶枯死率} \leq 75\%$	3
V	针叶枯死率 $> 75\%$	4

### 1.4 华山松叶枯病诱发性致病性试验

利用柯赫式法则验证病原菌的致病性。将获得的菌株接种至 PDA 平板上,在 25 ℃ 恒温条件下培养 10 d,用 4 mL 无菌水洗涤分生孢子后转移至 10 mL 的离心管中,使用血球计数板计数后调节孢子悬浮液的浓度至  $1 \times 10^7$  个/mL。把 50% 的甘油经灭菌后与孢子悬浮液依照 1:4(v/v)充分混匀后备用。用 75% 的酒精将华山松幼苗的针叶进行表面消毒自然干燥后,使用无菌的竹签轻刺针叶至有微伤口,使用移液枪吸取 2 mL 孢子悬浮液置于喷瓶中,用 2 mL 孢子悬浮液等量喷 5 盆华山松幼苗针叶,每盆的体积为 400  $\mu$ L,使其孢子悬浮液均匀的喷雾至整株华山松幼苗针叶上,空白对照组喷雾等量体积的蒸馏水,接种病原菌组与对照组同时都设置 3 次重复。接种处理时先把单一菌株接种至华山松植株上,后将 2 个菌株相互交叉接种至华山松植株上,7 d 后观察发病情况,对出现相似症状的样本进行分离鉴定。

### 1.5 病原菌的形态学特征鉴定

选择病症病状明显的有效标本,进行徒手切片,在光学显微镜(尼康,上海)下观察病原菌的分生孢子盘和分生孢子形态,并测量分生孢子的大小,使用手机拍照记录。根据徒手切片所观察的病原菌形态特征,结合文献及书籍中所描述的病原菌形态特征,对病原菌种类进行识别与鉴定,以确定病原菌的分类地位<sup>[16]</sup>。

### 1.6 病原菌的分子生物学鉴定及系统发育树构建

通过生工柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取病原菌 DNA,以提取的 DNA 为模板扩增 18S *rRNA*、 $\beta$ -*tubulin*、*gpd* 和 *Alt a1* 基因。PCR 反应体系总体积为 50  $\mu$ L,反应液为:2× San Taq PCR Mix 25  $\mu$ L,引物(10  $\mu$ mol/L)各 1.5  $\mu$ L,模板 DNA 2  $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ L。PCR 所用的基因引物、序列和反应条件见表 2。PCR 扩增的产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,将有条带的产物送至昆明硕擎生物

科技有限公司测序。将测序公司返回的结果利用 DNAMAN 8 拼接在一起并提交至 NCBI 进行比对。从 GenBank 中选取并下载与菌株相关的 ITS、 $\beta$ -tubulin、gpd 和 Alt a1 序列,利用 MEGA 6 中的邻接法(Neighbor-Joining,NJ)构建系统发育树,以 1 000 进行 bootstrap 校验。

表 2 本研究 PCR 采用的引物及反应条件  
Table 2 Primers and reaction conditions for PCR used in this study

基因	引物	序列/5'-3'	反应条件
18S rRNA	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	94 ℃ 3 min [94 ℃ 30 s,56 ℃ 40 s,72 ℃ 50 s]×35 72 ℃ 10 min
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
TUB	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	94 ℃ 2 min [94 ℃ 30 s,62 ℃ 40 s,72 ℃ 60 s]×35 72 ℃ 3 min
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC	
gpd	gpd1	CAACGGCTTCGGTCGCATTG	94 ℃ 5 min [94 ℃ 30 s,60 ℃ 40 s,72 ℃ 50 s]×35 72 ℃ 10 min
	gpd2	GCCAAGCAGTTGGTTGTGC	
Alt a1	Alt-for	ATGCAGTTCACCACCATCGC	94 ℃ 5 min [94 ℃ 30 s,60 ℃ 40 s,72 ℃ 50 s]×35 72 ℃ 10 min
	Alt-rev	ACGAGGGTGAYGTAGGCGTC	

2 结果与分析

2.1 华山松叶枯病调查

对华山松种子园及周边地区的华山松叶部的发病情况进行了跟踪调查。调查发现,该病害主要危害华山松的嫩叶。病原物多数由叶缘或叶尖开始侵染,发病时针叶初期呈现黄褐色小斑,后扩大变成暗褐色,最后针叶整条枯死掉落(图 1)。对华山松叶枯病进行专题调查,结果显示,华山松种子园叶枯病的发病率为 81.54%±0.144,病情指数为 50.51±0.136。

2.2 华山松叶枯病致病菌分离鉴定

2.2.1 病原菌的分离 将华山松叶枯病的标本在实验室内进行病原菌分离。分离试验共分离了 60 个平板,获得 5 个菌株,分别标号为 HSS1—HSS5。出现的频率分别是 41.67%、33.33%、11.67%、8.30%和 5.00%,其中 HSS1 号菌株出现频率最高,HSS2 号菌株出现频率次高,并且明显多于另外 3 个分离菌,为优势菌株。

2.2.2 柯赫式法则致病性验证 将纯化获得的 5 种分离菌株进行了致病性验证试验。结果发现,在 5~7 d 时,HSS1 号菌株在华山松的叶片上首先表现出病症,症状表现为华山松幼苗先从叶尖或者叶缘枯死,开始时为灰绿色,逐渐会有黄褐色病斑产生,最后针叶变为赤褐色并且干枯卷曲,发病症状与自然条件下症状相同。回接的华山松幼苗叶枯部位经再次分离后能获得和原培养物一致的菌株,其菌落形态和菌丝颜色与原接种物 HSS1 号菌株一致,符合柯赫氏法则条件。该试验结果表明,HSS1 号真菌为引起华山松叶枯病的致病菌。同样,对其他 4 个菌株进行致病性验证,除了 HSS2 得到和最初分离的纯培养物一致,其余均不满足柯赫式法则,表

明 HSS2 号真菌也是引起华山松叶枯病的致病菌。将 HSS1 号菌株与 HSS2 号菌株相互交叉接种,结果发现 2 个菌株的幼苗发病均比单一接种的幼苗发病严重,表明 HSS1 号菌株与 HSS2 号菌株相互侵染会加重华山松叶枯病的发病程度(图 2)。

2.2.3 华山松叶枯病病原形态学鉴定 将 HSS1 病原菌接种到 PDA 培养基上进行培养,7 d 时病原菌纯菌落正面为白色,背面为淡黄色,有轮纹;10 d 时 HSS1 病原菌开始产孢,在菌落表面形成黑色浓稠黏液;将 HSS2 号菌接种到 PDA 培养基上,7 d 时病原菌的纯菌落正面中间为灰白色,边缘灰黑色,菌丝绒毛状;背面初期为白色,后期逐渐颜色加深变成黑色(图 3)。

HSS1 病原菌的分生孢子盘为黑色。分生孢子为纺锤形,有 3~4 个隔膜,由 5 个细胞组成,分生孢子平均大小为 22.1 μm×6.1 μm,中间 3 个细胞呈浅褐色,长为 13.2~17.9 μm。两端细胞圆锥形,无色透明。分生孢子顶端细胞上着生 2~3 根无色附属丝,顶端的附属丝长 9.4~18.2 μm,基部细胞上着生 1 根附属丝,中生,长 3.5~13.4 μm。HSS2 号菌的分生孢子串生成链状,基部稍钝圆,有纵横分隔,分生孢子大小平均为 18.9~8.1 μm(图 4)。

2.2.4 华山松叶枯病病原分子鉴定 联合 ITS 和  $\beta$ -tubulin 基因片段对 HSS1 号病原菌构建系统发育树,菌株 HSS1 与 *P. lespedezae* 聚为一支,结合形态学鉴定和分子生物学鉴定结果,初步鉴定引起华山松叶枯病的 HSS1 号病原菌为胡枝子拟盘多毛孢(*P. lespedezae*);联合 ITS、gpd 和 Alt a1 基因片段对 HSS2 号病原菌构建系统发育树,菌株 HSS2 与 *A. alternata* 聚为一支,结合形态学特征将 HSS2 号病原菌鉴定为互隔链格孢(*A. alternata*)(图 5、图 6)。

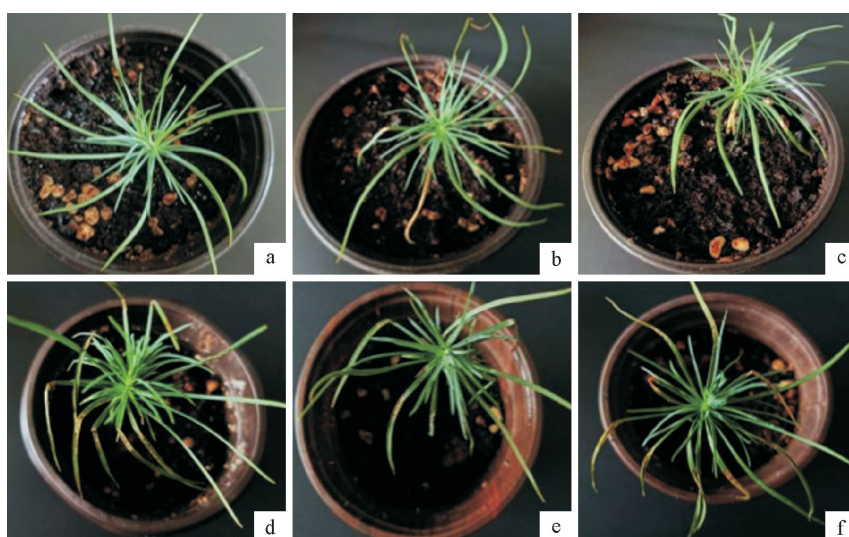




注:a—d:针叶染病症状。

图1 华山松叶枯病症状

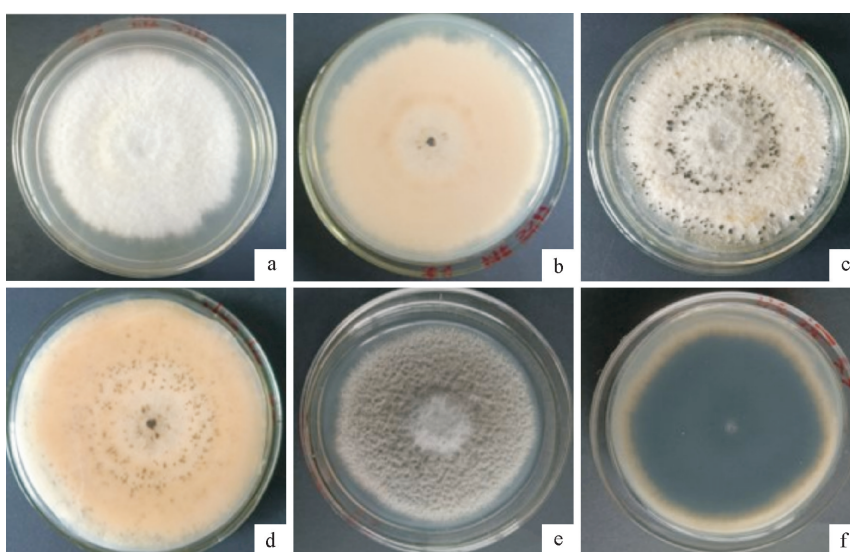
Fig. 1 Symptoms of leaf blight of *P. armandii*



注:a为接种无菌水(对照组);b为接种 HSS1 号菌株;c为接种 HSS2 号菌株;d为先接种 HSS1 号菌株后接种 HSS2 号菌株;e为同时接种 HSS1 和 HSS2 号菌株;f为先接种 HSS2 号菌株后接种 HSS1 号菌株。

图2 华山松幼苗接种分离菌株 7 d 后的症状

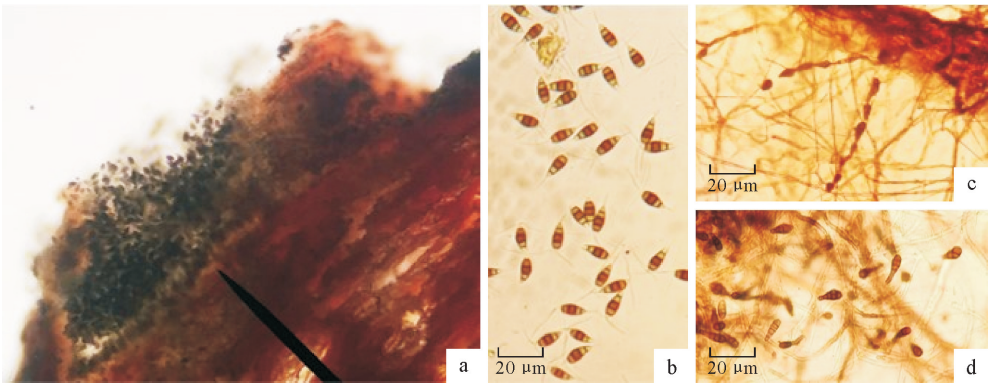
Fig. 2 Symptoms of *P. armandii* seedlings inoculated with isolated strains for 7 days



注:a、b 为 HSS1 号菌培养 7 d 菌落;c、d 为 HSS1 号菌培养 10 d 菌落;e、f 为 HSS2 号菌培养 7 d 菌落。

图3 病原菌在 PDA 培养基上纯菌落形态

Fig. 3 Morphology of pure colony of pathogens on PDA medium



注: a 为 HSS1 号菌的分生孢子盘; b 为 HSS1 号菌的分生孢子; c, d 为 HSS2 号菌的分生孢子。

图 4 华山松叶枯病原菌的形态特征

Fig. 4 Morphological characteristics of pathogens of leaf blight of *P. armandii*

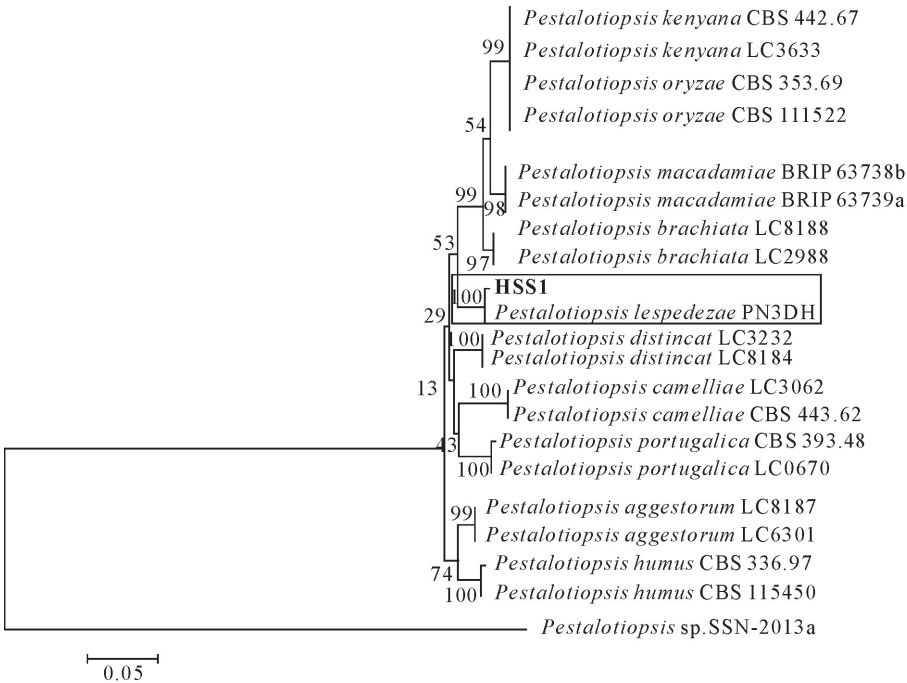


图 5 联合 ITS 和  $\beta$ -tubulin 基因片段对 HSS1 号病原菌构建系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of HSS1 based on the concatenated data of ITS and  $\beta$ -tubulin sequences

3 结论与讨论

对从华山松幼苗病叶上分离得到的真菌进行了形态学鉴定及分子生物学鉴定,形态学鉴定与分子生物学鉴定结果一致,经致病性测定,最后确定了引起华山松幼苗叶枯病的病原菌为胡枝子拟盘多毛孢(*P. lespedezae*)和互隔链格孢(*A. alternata*)。这在国内华山松上属于首次发现及报道。

近年来随着华山松在我国种植面积不断扩大,病害问题也愈发凸显。华山松易感染叶枯病,该病引起叶片变黄、变枯,提前落叶,影响了华山松的生长发育。目前对华山松叶枯病的研究尚属空白。本研究通过对华山松幼苗叶枯病的症状观察、病原的形态学鉴定和分子生物学鉴定,确定了华山松叶

枯病的病原为胡枝子拟盘多毛孢(*P. lespedezae*)和互隔链格孢(*A. alternata*)2种,这与匙明强等<sup>[17]</sup>报道的水杉赤枯病两种病原为同属的不同种。本研究为了明确 *P. lespedezae* 与 *A. alternata* 的关系,将 *P. lespedezae* 与 *A. alternata* 2个菌株相互接种,发现接种2个菌株的幼苗发病均比单一接种的幼苗发病严重,这也明确了 *P. lespedezae* 与 *A. alternata* 的关系:2个菌株均为引起华山松叶枯病的病原,当2个菌株相互侵染华山松幼苗时会加重叶枯病的发病程度。经过查阅相关的文献资料发现,前人报道的油松<sup>[18]</sup>、马尾松<sup>[19]</sup>、杉木<sup>[20-21]</sup>和樟子松<sup>[22]</sup>的发病特点及症状相似,表现在发病初期,叶片从叶尖开始发生干枯逐渐变成褐色,初期显黄色段斑,病斑和健康组织交界处常有暗红色的环圈,后期病叶表面

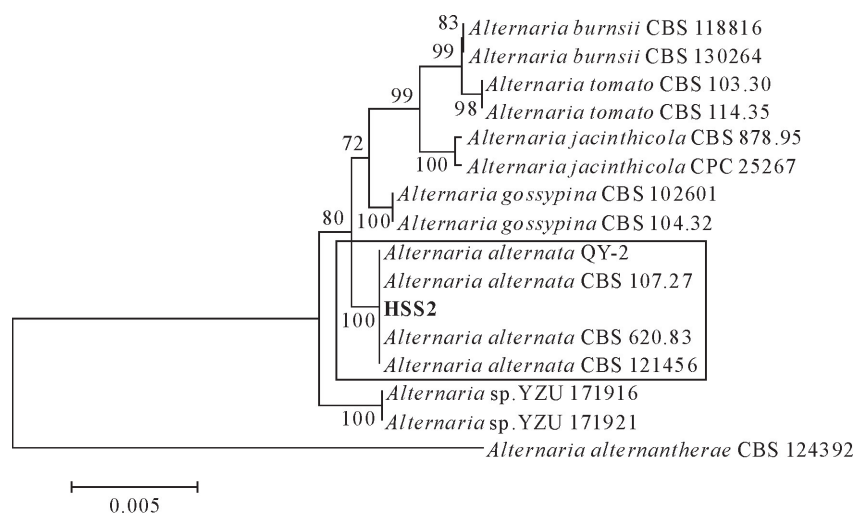


图6 联合 ITS、*gpd* 和 *Alt a1* 基因片段对 HSS2 号病原菌构建系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic tree of HSS2 based on the concatenated data of ITS, *gpd* and *Alt a1* sequences

产生黑色的小点,严重时导致华山松提前落叶或幼苗死亡。但不同的是病原是该病原菌同属下的其他种,如引起油松和马尾松赤枯病的病原为枯斑盘多毛孢(*P. funerea*)<sup>[18-19]</sup>。而引起樟子松赤枯病的病原为柠檬拟盘多毛孢(*P. citrina*)<sup>[22]</sup>。

拟盘多毛孢属 *Pestalotiopsis* sp. 是一类重要的病原菌,它会引起植物叶斑和叶枯症状,严重时导致植物死亡<sup>[23-24]</sup>。目前,对于拟盘多毛孢属形态鉴定有一定的难度,分子鉴定方面基于 ITS 基因鉴定得较多,但是现阶段仅靠 ITS 基因鉴定无法更好地鉴定属内的亲缘种<sup>[25]</sup>。本研究基于 ITS 和  $\beta$ -*tubulin* 2 个基因联合构建系统发育树,结合形态学特征,更加准确地鉴定了胡枝子拟盘多毛孢(*P. lespedezae*)是引起华山松叶枯病的病原之一。链格孢属(*Alternaria* sp.)的真菌在形态上很容易根据形态特征鉴定到属,如若需要准确鉴定到种的水平较难,这是因为小孢子种间序列相似性高,仅仅依靠 ITS 基因序列分析不能将小孢子种更好地区别开<sup>[26]</sup>。此时便需要结合多个基因引物来鉴定到种。本研究采用多对引物来扩增产物并联合 ITS、*gpd* 和 *Alt a1* 多基因构建系统发育树,结合形态学特征准确鉴定了互隔链格孢(*A. alternata*)是引起华山松叶枯病的另一个病原。本研究通过形态鉴定与分子鉴定相结合的方法明确了引起华山松叶枯病的病原菌,这为之后进一步研究病原菌的其他特性奠定了基础,同时也为之后病害的防治提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] 王若楠,白吉庆,王玛丽,等. 中国特有森林树种华山松的群体进化历史研究[J]. 西北植物学报, 2019, 39(1): 42-51.  
WANG R N, BAI J Q, WANG M L, et al. Evolutionary history of an endemic conifer tree *Pinus armandii* in China[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2019, 39(1): 42-51. (in Chinese)
- [2] 王秀荣,赵杨,孙文生. 华山松种子园无性系开花习性研究[J]. 吉林林业科技, 2007, 36(5): 1-6, 9.  
WANG X R, ZHAO Y, SUN W S. Blooming characteristics in clonal seed orchard of *Pinus armandii* [J]. Jilin Forestry Science and Technology, 2007, 36(5): 1-6, 9. (in Chinese)
- [3] 朱晓丹,李桐森,刘小珍,等. 华山松无性系种子园结实量与种实性状的关系[J]. 西南林学院学报, 2006, 26(2): 48-51.  
ZHU X D, LI T S, LIU X Z, et al. Studies on fruiting quantity of *Pinus armandii* clones in the seed orchard and the seed quality[J]. Journal of Southwest Forestry University, 2006, 26(2): 48-51. (in Chinese)
- [4] 李林强,李建科,刘迎利. 超声波处理提取华山松籽油的研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2003, 31(5): 115-117.  
LI L Q, LI J K, LIU Y L. Study on the extraction of seed kernel oil of *Pinus armandii* via ultrasonic treatment[J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry: Natural Science Edition, 2003, 31(5): 115-117. (in Chinese)
- [5] 张桢,李春艳,郑永唐,等. 华山松松塔体外抗 HIV 活性的研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(1): 25-26.  
ZHANG Z, LI C Y, ZHENG Y T, et al. In vitro anti-HIV activities of extracts from *Pinus armandii* franch[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2014, 25(1): 25-26. (in Chinese)
- [6] 赵树慎,李桐森. 华山松种子园营建技术[J]. 西南林学院学报, 1994, 14(2): 83-87.  
ZHAO S S, LI T S. A study on the technology of establishing *Pinus armandii* breeding gardens[J]. Journal of Southwest Forestry University, 1994, 14(2): 83-87. (in Chinese)
- [7] 赵仕光,景耀,张星耀,等. 陕西秦岭林区华山松疱锈病分布及危害研究[J]. 西北林学院学报, 1991, 6(3): 8-12.  
ZHAO S G, JING Y, ZHANG X Y, et al. Distribution and damage of armand pine blister rust (*Cronartum* sp.) in



- Shaanxi Province[J]. Journal of Northwest Forestry University, 1991, 6(3): 8-12. (in Chinese)
- [8] 张凡, 冯婷, 韩正敏, 等. 落羽杉赤枯病病原菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 植物保护学报, 2018, 45(4): 900-907. ZHANG F, FENG T, HAN Z M, *et al.* Biological characteristics and molecular identification the pathogen of *Taxodium* red blight[J]. Journal of Plant Protection, 2018, 45(4): 900-907. (in Chinese)
- [9] 王忠民, 林常松, 孙丽娟, 等. 油松落针病、赤枯病病害的调查[J]. 河北林业科技, 2014(3): 30-31.
- [10] 马勇, 王华, 窦报坤, 等. 寻甸县华山松和云南松主要害虫地理分布及危害程度调查研究[J]. 西北林学院学报, 2017, 32(5): 168-173, 312. MA Y, WANG H, DOU B K, *et al.* Geographical distribution and damage degree of *Pinus armandii* and *P. yunnanensis* in Xundian county[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2017, 32(5): 168-173, 312. (in Chinese)
- [11] 张蕾蕾, 陈辉, 陈霞. 华山松大小蠹的入侵对华山松挥发物成分的影响[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(2): 114-118. ZHANG L L, CHEN H, CHEN X. Effect of *Dendroctonus armandii* infection on the volatile constituents of *Pinus armandii* in Qinling Mountains[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(2): 114-118. (in Chinese)
- [12] 林晓民, 李振岐, 王少先. 真菌 rDNA 的特点及在外生菌根菌鉴定中的应用[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 120-125. LIN X M, LI Z Q, WANG S X. The characteristics of rDNA in fungi and its using for identification of ectomycorrhizal fungi[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2005, 14(2): 120-125. (in Chinese)
- [13] 张志华, 洪葵. 核酸序列直接分析在真菌鉴定方面的应用[J]. 华南热带农业大学学报, 2006, 12(2): 39-43. ZHANG Z H, HONG K. Application of nucleic ACID sequence analysis in fungi taxonomy[J]. Journal of South China University of Tropical Agriculture, 2006, 12(2): 39-43. (in Chinese)
- [14] 杨光道. 油茶品种对炭疽病的抗性机制研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009: 42-44.
- [15] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 122-124.
- [16] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 482-485, 566.
- [17] 匙明强, 王焱, 叶建仁, 等. 水杉赤枯病病原形态及分子鉴定[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2013, 37(5): 75-80. CHI M Q, WANG Y, YE J R, *et al.* Morphological and molecular identification of *Metasequoia* red blight[J]. Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition, 2013, 37(5): 75-80. (in Chinese)
- [18] 梁宏胜, 陈文普, 姜勇. 千家坪林区油松赤枯病调查及对策[J]. 陕西林业科技, 2004(3): 34-37. LIANG H S, CHEN W P, JIANG Y. Investigation and countermeasure on blight of *Pinus tabulaeformis* in Qianjiaping forest area[J]. Shaanxi Forest Science and Technology, 2004(3): 34-37. (in Chinese)
- [19] 梁秋霞, 潘锋英, 李端兴. 马尾松赤枯病发生规律及其防治技术[J]. 浙江林业科技, 2002, 22(4): 65-66, 84. LIANG Q X, PAN F Y, LI D X. Regularity of outbreak and control techniques of *Pinus massoniana* cercospora needle blight[J]. Journal of Zhejiang Forestry Science and Technology, 2002, 22(4): 64-65, 84. (in Chinese)
- [20] 曾思海. 杉木真菌病害研究概述[J]. 福建林业科技, 2001, 28(1): 35-39. ZENG S H. Summarizing the studies on fungal diseases of *Cunninghamia lanceolata* [J]. Journal of Fujian Forestry Science and Technology, 2001, 28(1): 35-39. (in Chinese)
- [21] 李六一. 杉木苗期赤枯病的发生规律与防治[J]. 安徽林业科技, 2009(1): 28, 30.
- [22] 徐阳, 任洪婷, 王朴, 等. 樟子松赤枯病病原菌研究[J]. 西部林业科学, 2017, 46(1): 91-95. XU Y, REN H T, WANG P, *et al.* Pathogenic Fungi of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* red blight[J]. Journal of West China Forestry Science, 2017, 46(1): 91-95. (in Chinese)
- [23] 韦继光, 徐同, 潘秀湖, 等. 拟盘多毛孢属的分类学研究进展[J]. 广西农业生物科学, 2006, 25(1): 78-85. WEI J G, XU T, PAN X H, *et al.* Progress of research on taxonomy of *Pestalotiopsis* [J]. Journal of Guangxi Agriculture and Biology Science, 2006, 25(1): 78-85. (in Chinese)
- [24] 韦继光, 徐同, 黄伟华, 等. 从分子系统发育探讨内生拟盘多毛孢与病原拟盘多毛孢的关系[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2008, 34(4): 367-373. WEI J G, XU T, HUANG W H, *et al.* Molecular phylogenetic investigation on relationship of endophytic and pathogenic *Pestalotiopsis* species[J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture and Life Sciences, 2008, 34(4): 367-373. (in Chinese)
- [25] MAHARACHCHIKUMBURA S S N, HYDE K D, GROENEWALD J Z, *et al.* *Pestalotiopsis* revisited[J]. Studies in Mycology, 2014, 79(11): 121-186.
- [26] 王义勋, 江明, 郑露, 等. 苍术黑斑病病原鉴定[J]. 植物病理学报, 2006, 36(5): 477-480. WANG Y X, JIANG M, ZHENG L, *et al.* Identification of pathogen causing dark leaf spot on *Atractylodes lancea* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(5): 477-480. (in Chinese)