

# 对三种苹果病原菌具抑制作用的新疆野苹果内生真菌的分离与鉴定

王亚红<sup>1</sup>, 李永丽<sup>1</sup>, 常乐<sup>1</sup>, 余海如<sup>1</sup>, 周洲<sup>1\*</sup>, 曲良建<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>河南科技大学林学院, 河南洛阳 471023; <sup>2</sup>中国林业科学研究院森林生态环境与森林保护研究所·

国家林业和草原局森林保护重点实验室, 北京 100091)

**摘要:**【目的】通过分离鉴定对苹果枝干病害有抑制作用的新疆野苹果枝干内生真菌,为苹果病害生物防治提供新型菌种资源。【方法】采用组织分离法从新疆野苹果枝干中分离内生真菌,平板对峙试验筛选对苹果树3种致病菌均具有显著抑菌作用的菌株,结合形态学、分子生物学分析,确定菌株的分类地位。【结果】共分离获得内生真菌75株,从其中筛选出对苹果树3种病原菌均具较强抑菌作用的菌株5株(E-m6、S-p5、S-m2、S-p6、E-p5)。对葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 的最高抑菌率为73.39%,对胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 的最高抑菌率为73.52%,对苹果拟茎点霉 *Phomopsis mali* 的最高抑菌率为82.19%。结合形态学和ITS序列和TUB基因序列分析,菌株E-m6和S-p5为黑曲霉 *Aspergillus niger*, S-m2为黄曲霉 *Aspergillus flavus*, S-p6为 *Rosellinia* sp., E-p5为球毛壳菌 *Chaetomium globosum*。【结论】从新疆野苹果枝条中筛选出具生防潜力的内生真菌菌株5株,为苹果枝干病害的生物防治提供了新的微生物资源,同时也为新疆野苹果内生菌研究奠定了基础。

**关键词:**新疆野苹果; 内生真菌; 抑菌作用; 葡萄座腔菌; 胶孢炭疽菌; 苹果拟茎点霉

中图分类号:S661.1 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2020)03-0390-07

## Isolation and identification of endophytic fungi resistant to three apple pathogens from the branches of *Malus sieversii*

WANG Yahong<sup>1</sup>, LI Yongli<sup>1</sup>, CHANG Le<sup>1</sup>, YU Hairu<sup>1</sup>, ZHOU Zhou<sup>1\*</sup>, QU Liangjian<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Forestry College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, Henan, China; <sup>2</sup>Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry/Key Laboratory of Forest Protection, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China)

**Abstract:**【Objective】In order to provide new fungi resources for the biological control of apple diseases, the endophytic fungi from healthy branches of *Malus sieversii* were isolated and identified. 【Methods】Endophytic fungi were isolated from branches of *M. sieversii* by tissue separation method. Strains were screened out with significant antagonism activity against three pathogens (*Botryosphaeria dothidea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phomopsis mali*) of apple trees. The morphology and molecular biology were applied to determine the classification of the strains. 【Results】A total of 75 endophytic fungi were isolated, among which 56 strains were from the phloem and 19 strains from the xylem. Five strains (E-m6, S-p5, S-m2, S-p6 and E-p5) were screened out with strong inhibitive effects on mycelia growth of three apple tree pathogens. The highest inhibitory rates of the selected strains against *B. dothidea*, *C. gloeosporioides* and *P. mali* were 73.39%, 73.52% and 82.19%, respectively. The lengths of ITS regions of E-m6, S-p5, S-m2, S-p6 and E-p5 were 593 bp, 554 bp, 585 bp, 430 bp and 575 bp, respectively; and the length of TUB gene of S-p6 was 420 bp. Combined with morphological, ITS and TUB phylogenetic trees analysis, the strains E-m6 and S-p5 were identified as *Aspergillus ni-*

收稿日期:2019-07-28 接受日期:2019-12-27

基金项目:十三五国家重点研发计划课题(2016YFC0501503);国家自然科学基金(31600519,31870638)

作者简介:王亚红,女,在读硕士研究生,研究方向:森林保护。Tel:18437967196, E-mail:2654255637@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. E-mail:zhouzhouhaust@163.com; E-mail:qulj2001@caf.ac.cn

ger, S-m2 was identified as *Aspergillus flavus*, S-p6 was identified as *Rosellinia* sp., and E-p5 was identified as *Chaetomium globosum*.【Conclusion】In this study, five strains of endophytic fungi with biocontrol potential were screened out from *M. sieversii* branches, which could provide not only new microbial resources for the biological control of apple stem diseases, but also a basis for the study on endophytes of *M. sieversii* in the future.

**Key words:** *Malus sieversii*; Endophytic fungi; Antifungal activity; *Botryosphaeria dothidea*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Phomopsis mali*

植物内生真菌是在其生活史某一时期生活在植物组织内,对植物组织没有引起明显病害的一类真菌<sup>[1]</sup>。植物内生真菌与宿主之间共享复杂的关系网,化石证据表明内生菌随着高等植物演变<sup>[2]</sup>与宿主植物共生进化<sup>[3]</sup>,建立了互惠有益的联盟<sup>[4]</sup>。从干旱荒漠地区的甘草 *Glycyrrhiza uralensis* 分离的内生放线菌表现出耐盐碱、干旱等抗逆能力<sup>[5]</sup>。盐地碱蓬 *Suaeda salsa* 具强耐盐性特性,多个生态位微生物群落结构及分布图谱分析发现其体内蕴含大量且功能新颖的菌株<sup>[6]</sup>。

关于对植物病害具有防治作用的内生真菌相关研究最近也有一些报道。例如,从山豆根 *Sophora tonkinensis* 分离出内生真菌对3种三七 *Panax notoginseng* 病原真菌有显著的抑制活性<sup>[7]</sup>。一株银杏内生真菌 *Chaetomium globosum* CDW7 在体外对9种植物致病真菌具有很强的抑制活性,其发酵液成功抑制油菜体内感染 *Sclerotinia sclerotiorum* 的发病<sup>[8]</sup>。新疆野苹果(*Malus sieversii*)又名塞威氏苹果,是我国重要的野生果树资源<sup>[9]</sup>,是现代栽培苹果的原始祖先<sup>[10]</sup>,被列为中国二级重点保护植物和国家生物多样性优先保护物种<sup>[11]</sup>;其遗传资源丰富多样,在种质资源保护和利用方面具有重要价值<sup>[12]</sup>。但目前国内关于新疆野苹果内生菌的研究鲜有报道,李芳等<sup>[13]</sup>对新疆野苹果茎组织培养过程中出现的11株内生真菌进行了分离,但关于用于生物防治内生真菌的筛选尚无研究报道。苹果枝干病害严重影响我国苹果产业发展,过度依赖化学农药的弊端日益严重,开发环境友好的生物防治方法具有重要的现实意义。新疆野苹果具有抗病虫等特性,挖掘其内生真菌资源有望为苹果等果树的生物防治提供新的微生物资源。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

新疆野苹果健康枝条于2017年7月采集于新

疆伊犁地区巩留县野果林。

苹果病害病原菌:葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*、胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和苹果拟茎点霉 *Phomopsis mali* 均由河南科技大学林学院林业生物技术试验室分离保存。

内生真菌分离培养基:PDA 培养基<sup>[14]</sup>、MEA 培养基<sup>[15]</sup>、孟加拉红琼脂培养基(RBA)<sup>[16]</sup>、水琼脂培养基(WA)<sup>[16]</sup>、MS 培养基<sup>[17]</sup>。

### 1.2 方法

1.2.1 新疆野苹果枝干内生真菌的分离与纯化 采用组织分离法分离新疆野苹果韧皮部和木质部内生真菌。健康的新疆野苹果枝干韧皮部和木质部剥离,分别剪成长宽为5 mm×5 mm 左右的组织块。组织块经75%( $\varphi$ )的酒精消毒30 s,1%次氯酸钠消毒3 min,无菌水漂洗3次后;组织块放置于含氨苄青霉素(50 mg·L<sup>-1</sup>)的培养基表面<sup>[14]</sup>,于28 ℃恒温培养箱中无光照培养;最后一次漂洗的无菌水作为对照涂布于培养基表面。观察内生真菌生长情况,待组织块周围长出菌丝,挑针挑取菌落边缘菌丝或菌块,转移至新的培养基中进行纯化培养,经3次纯化得到单一菌株保存备用。

1.2.2 具抑菌作用内生真菌的筛选 采用平板对峙试验,测定内生真菌对葡萄座腔菌、胶孢炭疽菌、苹果拟茎点霉生长抑制效果,筛选具有抑菌作用的内生真菌。初次筛选:在PDA 平板中央放置病原菌菌饼(直径7 mm),四周距病原菌2.5 cm 放置不同内生真菌菌饼(直径7 mm),3次重复;对照组不放置内生真菌。2~3 d后,观察统计处理组内生真菌对应病原菌菌落半径,得到具抑菌活性内生真菌。初次筛选菌株进行再次筛选,操作方法与初次筛选基本相同;不同地方为病原菌四周放置相同内生真菌。2~3 d后,统计对照组和处理组病原菌半径,根据菌丝生长速率法计算抑菌率,抑菌率/%=[(对照菌落半径-处理菌落半径)/(对照菌落半径-菌饼半径)]×100,筛选抑菌率高的内生真菌菌株。

1.2.3 菌株鉴定 (1)形态学鉴定。对筛选出的内生真菌进行形态学观察。观察内生真菌在培养基上菌落形状、颜色等。制作临时玻片观察菌丝、产孢结构、孢子形态等特征,依据文献[18]中的方法初步确定内生真菌种属地位。(2)ITS 和 TUB 序列测定。灭菌刀片刮取新鲜内生真菌菌丝,利用 CTAB 法提取内生真菌 DNA。PCR 扩增引物: ITS1(5'-TCCGTAGGTGAAACCTGCGG-3') 和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'); TUB2a(5'-GG-TAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3') 和 TUB2b(5'-ACCCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3')。利用 ITS 引物对 5 株内生真菌进行扩增,TUB 引物对菌株 S-p6 进行扩增。扩增程序为 95 °C 预变性 3 min; 98 °C 变性 10 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增片段, 经 1% (w) 的琼脂糖凝胶电泳检测后,由生工生物工程(上海)股份有限公司对目的片段进行测序。

1.2.4 试验分析与统计方法 抑菌数据采用 SPSS 19.0 软件进行方差分析, One-way ANOVA 法进行显著性比较; PCR 产物测序结果在 GenBank 数据库中进行 Blast 相似性比对, 使用 Clustal X2 进行多序列比对, 用 MEGA 7.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 新疆野苹果枝干内生真菌分离结果

从 5 种培养基中共培养出新疆野苹果韧皮部和木质部内生真菌 75 株。不同培养基和枝条不同组织中分离出内生真菌的数量差别明显(表 1), 从韧皮部共获得 56 株, 木质部共获得 19 株, 水琼脂培养基未分离到木质部内生真菌, 韧皮部和木质部在其他培养基中均分离出内生真菌, 木质部和韧皮部分离内生真菌菌株数量比约为 1:3。

表 1 不同培养基和不同组织分离到的内生真菌菌株数量

Table 1 Number of endophytic fungal strains isolated from different media and different tissues

组织 Tissue	培养基 Medium						总数 Total
	PDA	RBA	MEA	MS	WA		
韧皮部 Phloem	9	5	15	21	6	56	
木质部 Xylem	1	2	12	4	0	19	

### 2.2 具抑菌作用内生真菌初次筛选和再次筛选

75 株内生真菌初次筛选, 得到 6 株内生真菌对

葡萄座腔菌、胶孢炭疽菌、苹果拟茎点霉均表现出较强抑菌作用, 菌株编号为 E-m6、S-p5、S-m2、S-p6、E-p5 和 S-p14。

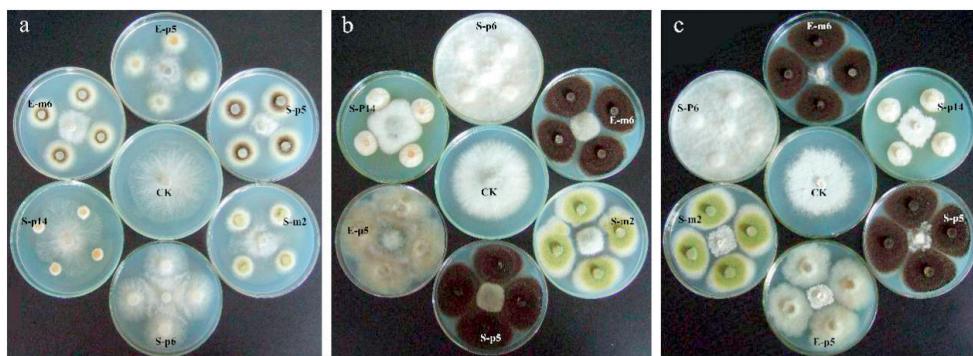
内生真菌 E-m6、S-p5、S-m2、S-p6、S-p14、E-p5 经抑菌活力再次筛选, 对葡萄座腔菌的抑菌率分别为  $68.42\% \pm 2.32\%$ 、 $73.39\% \pm 3.96\%$ 、 $58.48\% \pm 1.83\%$ 、 $66.96\% \pm 2.82\%$ 、 $40.94\% \pm 1.34\%$ 、 $59.36\% \pm 0.51\%$ ; 菌株 S-p5 抑菌活性最强, 抑菌率与其他菌株均存在显著差异( $p < 0.05$ ); 其次是菌株 E-m6 和 S-p6, 第三为 S-m2 和 E-p5, 最后是 S-p14。6 株内生真菌对胶孢炭疽菌抑菌率分别为  $72.96\% \pm 0.86\%$ 、 $73.52\% \pm 0.49\%$ 、 $69.30\% \pm 2.13\%$ 、 $73.52\% \pm 3.42\%$ 、 $52.39\% \pm 0.49\%$ 、 $61.13\% \pm 2.24\%$ ; 菌株 S-p6、S-p5 和 E-m6 对胶孢炭疽菌抑菌作用强, 显著高于另外 3 株菌株( $p < 0.05$ ), 其次是菌株 S-m2 抑菌活性较强, 再次为 E-p5, 菌株 S-p14 的抑菌作用最低。内生真菌 E-m6、S-p5、S-m2、S-p6、S-p14、E-p5 对苹果拟茎点霉表现的抑制活性略高于另外 2 种供试病原, 抑菌率分别为  $82.19\% \pm 5.47\%$ 、 $77.26\% \pm 1.90\%$ 、 $74.52\% \pm 2.85\%$ 、 $78.36\% \pm 2.07\%$ 、 $64.93\% \pm 0.95\%$ 、 $78.90\% \pm 2.07\%$ ; E-m6、E-p5、S-p6 和 E-p5 对苹果拟茎点霉抑制作用最强, 显著高于另外 2 个菌株( $p < 0.05$ ), S-m2 次之, S-p14 抑菌作用最低。

6 株内生真菌经再次筛选, 记录对 3 种苹果病原菌的抑菌作用(图 1), 统计抑菌率见图 2。最终筛选出 E-m6、S-p5、S-m2、S-p6、E-p5 这 5 株内生真菌, 均很好地抑制了 3 种苹果病原菌的生长, 表现出抑菌活性高。

### 2.3 具抑菌作用内生真菌的鉴定

2.3.1 形态特征 菌株 E-p5 在 PDA 培养基上, 菌落不规则圆形, 初期白色, 后期由暗黄色变为橄榄绿色; 卵圆形子囊果有附属丝, 直径  $(73.33\text{--}106.67)\mu\text{m} \times (56.67\text{--}93.33)\mu\text{m}$ , 子囊棍棒状, 具柄, 簇生。子囊孢子两侧平滑, 两端突起, 孢子  $(8.33\text{--}11.67)\mu\text{m} \times (6.67\text{--}8.33)\mu\text{m}$ (图 3-a~b)。初步将该菌定为球毛壳菌 *Chaetomium globosum*。

菌株 E-m6 和 S-p5 菌落形态及显微结构相似, 菌落均为圆形, 初期菌丝白色, 产孢后表面突起为毛绒状, 菌落黑色, 边缘粗糙; 顶囊球形, 着生大量球形分生孢子, 孢子直径为  $(2.5\text{--}3.33)\mu\text{m}$ (图 3-c~d), 初步确定菌株 E-m6 和 S-p5 为黑曲霉 *Aspergillus niger*。



a. 病原菌为葡萄座腔菌; b. 病原菌为胶孢炭疽菌; c. 病原菌为苹果拟茎点霉。

a. The pathogen was *Botryosphaeria dothidea*; b. The pathogen was *Colletotrichum gloeosporioides*; c. The pathogen was *Phomopsis malii*.

图1 6株内生真菌对3种苹果病原菌的抑菌作用

Fig. 1 Antibacterial effect of six endophytic fungi on three apple pathogens

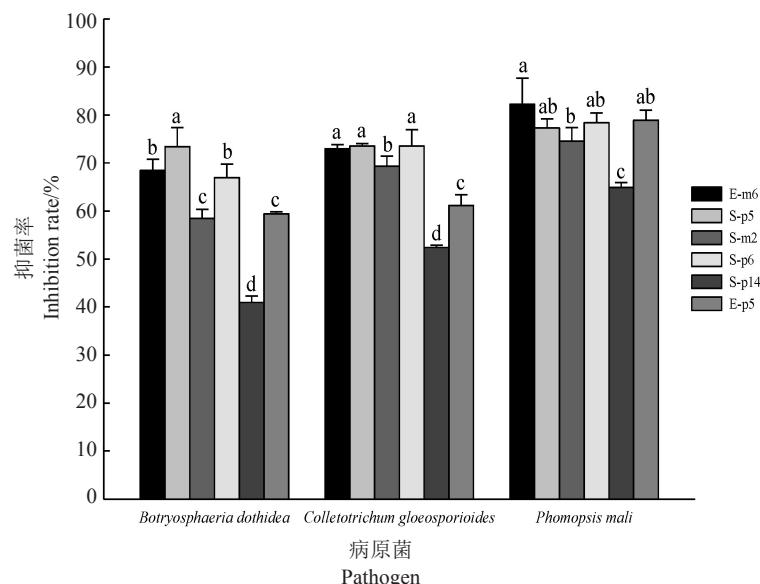
图中数据为平均抑菌率±标准差。字母表示数据经Duncan氏新复极差法检验在  $p < 0.05$  差异显著。The data in the figure means the average inhibition rate  $\pm$  SD. The letters indicate that the data is significantly different at the 0.05 level by Duncan's new multiple range test.

图2 内生真菌对3种苹果病原菌的抑菌作用

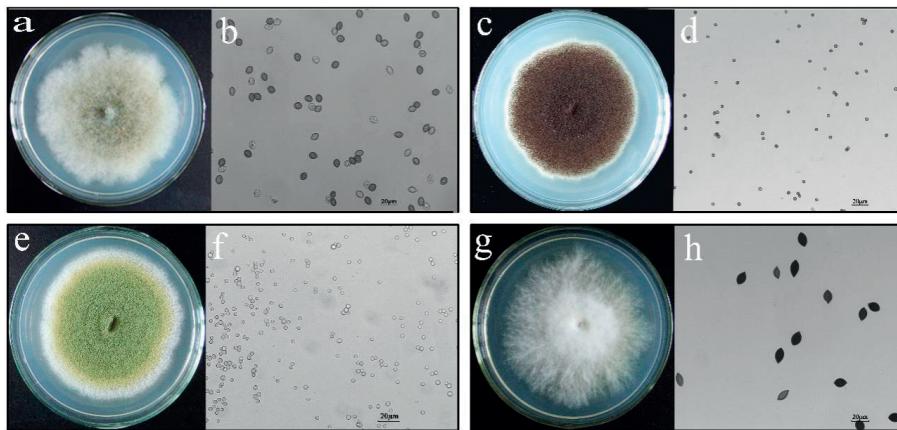
Fig. 2 The inhibition effect of endophytic fungi to *Botryosphaeria dothidea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phomopsis malii*

菌株S-m2菌落圆形,初期菌丝白色,后期表面黄绿色,有同心圆轮廓,边缘粗糙,菌丝稀薄,菌落由外向内为白色—暗黄色—绿色;显微镜中菌丝有隔膜,有假根,菌丝顶端直接产生分生孢子梗,梗端呈球形,分生孢子为光滑球形,直径(3.33~5.00) $\mu\text{m}$ (图3-e~f)。此菌株与曲霉属中黄曲霉 *Aspergillus flavus* 形态特征吻合。

菌株S-p6菌落不规则圆形,菌丝白色棉絮状且生长迅速,后期菌落表面有黑色颗粒产生,子囊孢子(13.33~20.00) $\mu\text{m} \times (8.33~11.67)\mu\text{m}$ (图3-g~h),不对称椭圆形,两端尖。初步确定为座坚壳属

*Rosellinia*。

2.3.2 菌株ITS和TUB基因序列分析 通用引物ITS1和ITS4扩增内生真菌目的基因片段,电泳检测在500 bp左右显示明亮且单一条带。核苷酸序列测定菌株E-m6、S-p5、S-m2、S-p6、E-p5片段大小分别为593、554、585、430、575 bp,通过NCBI数据库中的BLAST同源进化分析,与GenBank中的已知序列进行比对,构建系统发育树(图4-a),发现菌株E-m6与 *A. niger*(MK203789)位于同一系统发育分支, S-p5与 *A. niger*(MH748159)位于同一系统发育分支,相似率均为100%;S-m2与 *A. flavus*(MH279408)



a. 菌株 E-p5 菌落; b. 菌株 E-p5 子囊孢子; c. 菌株 E-m6 和 S-p5 菌落; d. 菌株 E-m6 与 S-p5 菌落分生孢子; e. 菌株 S-m2 菌落; f. 菌株 S-m2 分生孢子; g. 菌株 S-p6 菌落; h. 菌株 S-p6 子囊孢子。

a. Colony of strain E-p5; b. Ascospores of strain E-p5; c. Colony of strain E-m6 and S-p5; d. Conidia of strain E-m6 and S-p5; e. Colony of strain S-m2; f. Conidia of strain S-m2; g. Colony of strain S-p6; h. Ascospores of strain S-p6.

图3 内生真菌菌落及孢子的形态特征

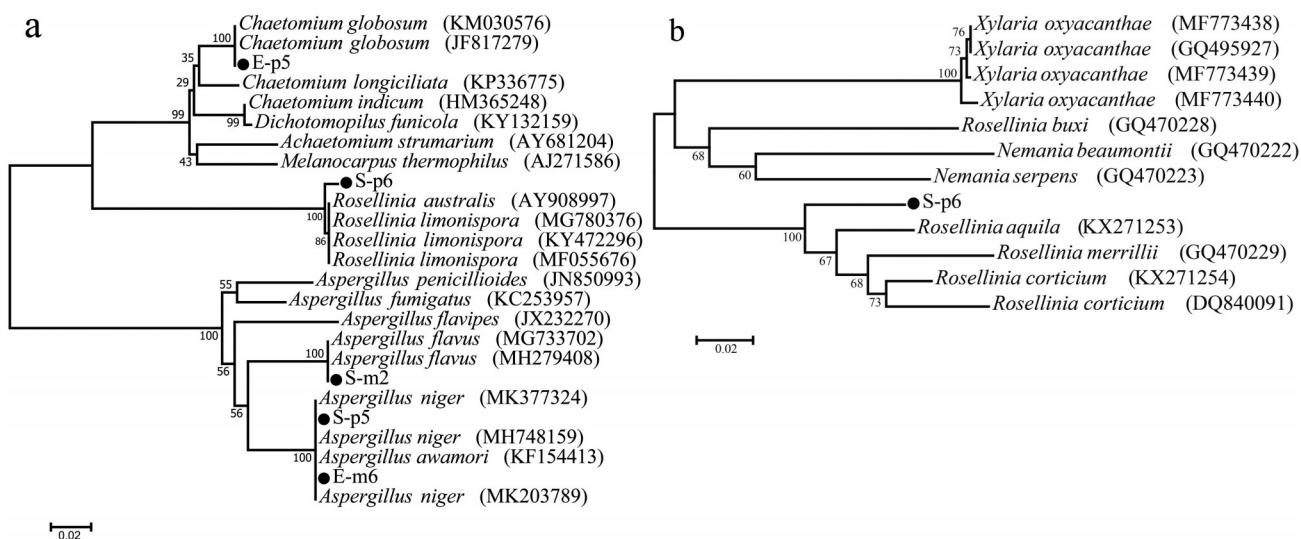
Fig. 3 Colony and spore morphology of endophytic fungi

位于同一系统发育分支,相似率为100%;E-p5与*Chaetomium globosum*(JF817279)位于同一系统发育分支,相似率为100%。S-p6与*Rosellinia*属位于同一系统发育分支,S-p6菌株ITS序列与菌株*Rosellinia limonispora*(MG780376)相似性最高为99.75%(图4-a),与*Rosellinia australis*(AY908997)相似率为99.51%,但不能确定其种名。

*TUB*基因序列进一步分析,S-p6的*TUB*核苷酸序列为420 bp,系统发育分析表明,S-p6与菌株

*Rosellinia aquila*(KX271253)相似性率最高,为92.89%(图4-b);由于NCBI数据库中没有菌种*R. limonispora*和*R. Australis*相关的*TUB*基因序列记录,S-p6的*TUB*比对结果中未能包含*R. limonispora*和*R. Australis*,说明目前*Rosellinia*属的研究还不够深入,缺乏一些基础的基因序列信息,现有结果可将菌株S-p6归入座坚壳属。

2.3.3 内生真菌鉴定 新疆野苹果内生真菌根据形态特征和rDNA-ITS序列结果分析,最终鉴定E-m6



a. ITS 基因序列; b. TUB 基因序列。括号里是 GenBank 登录号,●是待测菌株。

a. ITS gene sequence; b. TUB gene sequence. In parentheses is the GenBank accession number, ● is the strain to be tested.

图4 基于 rDNA-ITS、TUB 基因序列构建的系统发育树

Fig. 4 The phylogenetic tree based on sequences of rDNA-ITS and TUB gene

和 S-p5 为黑曲霉, S-m2 为黄曲霉, E-p5 为球毛壳菌; 菌株 S-p6 与已公布的近似菌株在形态特征和 ITS、TUB 序列上均存在一定差异, 可能是一个暂未报道的新菌种, 暂记为 *Rosellinia* sp.。

### 3 讨 论

笔者首次报道了从新疆野苹果枝干中分离的 5 株具有强抑菌活性的内生真菌, 对 3 种重要的苹果枝干病害病原菌均有强烈的拮抗作用, 具有很大的生防应用潜力。研究获得的 2 株黑曲霉 E-m6 和 S-p5 的抑菌作用最强, 抑菌率超过 70%。之前关于黑曲霉的研究多是在食品发酵工业、酶制剂、生物饲料、生物肥料、基因编辑上等领域<sup>[19-21]</sup>, 近来也有少量关于黑曲霉用于生物防治的报道。刘士平等<sup>[22]</sup>发现了一株黑曲霉 JS-1 对稻瘟病菌 *Pyricularia grisea* 具有很强的拮抗作用, 发酵液可用于制备稻瘟病抑菌剂。张素等<sup>[23]</sup>研究黑曲霉菌丝体超临界萃取物 (SE), 发现能破坏链格孢细胞膜正常功能、影响细胞结构和呼吸代谢等抑制其生长。牛军等<sup>[24]</sup>从 10 株专性海洋真菌中筛选出一株黑曲霉 COF01 对棉花枯萎病菌 *Fusarium vasinfectum*、稻瘟病菌等 6 种植物病原菌均有较好的抑菌作用。李颂等<sup>[25]</sup>发现黑曲霉次生代谢产物可以提高番茄根系几种防御酶(苯丙氨酸解氨酶、多酚氧化酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、过氧化物酶)的活性, 能明显控制根结线虫种群数量; 关于黑曲霉在植物体内的定殖、促进宿主生长、提高植物抗逆等研究还未见报道。内生真菌在诱导植物生长发育及植物抗生物和非生物胁迫过程中发挥着重要作用<sup>[26]</sup>, 感染内生真菌的宿主植物生长状况往往更具优势。笔者从新疆野苹果枝干中分离出 5 株具有强抑菌活性的内生真菌, 理论上这几株菌具有定殖在苹果树体内的先天优势, 后期有必要进一步开展在苹果苗木上的定殖及防效试验, 以及这些内生真菌对苹果病原菌的抗病机制分析。

### 4 结 论

从健康的新疆野苹果枝干中共分离出 75 株内生真菌, 从韧皮部得到 56 株, 木质部得到 19 株, 新疆野苹果枝干韧皮部内生真菌的数量多于木质部。经平板对峙试验初筛和复筛, 获得 5 株对 3 种苹果枝干病害均具较高抑菌作用。结合形态学及

分子生物学鉴定, 内生真菌 E-m6 和 S-p5 为黑曲霉、S-m2 为黄曲霉、E-p5 为球毛壳菌、S-p6 为 *Rosellinia* sp., 为果树病害生物防治提供了新的真菌资源。

### 参 考 文 献 References:

- [1] 郭顺星. 药用植物内生真菌研究现状和发展趋势[J]. 菌物学报, 2018, 37(1): 1-13.  
GUO Shunxing. The recent progress and prospects of research on endophytic fungi in medicinal plants[J]. Mycosystema, 2018, 37(1): 1-13.
- [2] REDECKER D, KODNER R, GRAHAM L E. Glomalean fungi from the Ordovician[J]. Science, 2000, 289(5486): 1920-1921.
- [3] YAN J F, BROUGHTON S J, YANG S L, GANGE A C. Do endophytic fungi grow through their hosts systemically? [J]. Fungal Ecology, 2015, 13: 53-59.
- [4] SCHULZ B, BOYLE C. The endophytic continuum[J]. Mycological Research, 2005, 109(6): 661-686.
- [5] 申枚灵, 赵翀, 廖萍, 李静, 程雪芬, 李成成, 张琴, 李艳宾, 张利莉, 赵珂. 塔里木盆地光果甘草内生放线菌的分离鉴定及抗逆、促生特性[J]. 草业科学, 2018, 35(7): 1624-1633.  
SHEN Meiling, ZHAO Chong, LIAO Ping, LI Jing, CHENG Xuefen, LI Chengcheng, ZHANG Qin, LI Yanbin, ZHANG Lili, ZHAO Ke. The isolation and identification of endophytic actinobacteria from *Glycyrrhiza glabra* in the Tarim basin and their stress resistance and ability to promote plant growth[J]. Pratacul-tural Science, 2018, 35(7): 1624-1633.
- [6] YUAN Z L, DRUZHININA I S, LABBÉ J, REDMAN R, QIN Y, RODRIGUEZ R, ZHANG C L, TUSKAN G A, LIN F C. Specialized microbiome of a halophyte and its role in helping non-host plants to withstand salinity[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32467.
- [7] YAO Y Q, LAN F, QIAO Y M, WEI J G, HUANG R S, LI L B. Endophytic fungi harbored in the root of *Sophora tonkinensis* Gapnep: Diversity and biocontrol potential against phytopathogens[J]. Microbiology Open, 2017, 6(3): 437.
- [8] ZHAO S S, ZHANG Y Y, YAN W, CAO L L, XIAO Y, YE Y H. *Chaetomium globosum* CDW7, a potential biological control strain and its antifungal metabolites[J]. Fems Microbiology Letters, 2017, 364(3): fnw287.
- [9] 王泽华, 秦伟, 马依努尔姑·吐地. 不同生境新疆野苹果休眠枝条抗寒性鉴定[J]. 新疆农业大学学报, 2016, 39(2): 106-111.  
WANG Zehua, QIN Wei, MAYNUR Turdi. Identification of freezing resistance of dormant branches of *Malus sieversii* in different habitats[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2016, 39(2): 106-111.
- [10] 闫鹏, 韩立群, 梅闯, 刁永强, 许正, 张学超, 马凯, 艾沙江·买买提, 王继勋. 新疆野苹果(*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.)植物学性状遗传多样性及相关性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(4): 683-689.

- YAN Peng, HAN Liqun, MEI Chuang, DIAO Yongqiang, XU Zheng, ZHANG Xuechao, MA Kai, AISAJAN·mamat, WANG Jixun. Genetic diversity and correlation analysis of botanical characters in Xinjiang wild apple (*Malus sieversii* (Ledeb.) M. Roem.)[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2016, 17(4): 683-689.
- [11] 傅立国. 中国植物红皮书[M]. 北京: 科学出版社, 1991: 548-549.
- FU Liguo. China plant red data book[M]. Beijing: Science Press, 1991: 548-549.
- [12] 马闯, 杨美玲, 张云秀, 阎国荣, 许正. 新疆野苹果(*Malus sieversii*)种群年龄结构及其动态特征[J]. 干旱区研究, 2018, 35(1): 156-164.
- MA Chuang, YANG Meiling, ZHANG Yunxiu, YAN Guorong, XU Zheng. Age composition and dynamic characteristics of the main populations of endangered *Malus sieversii*[J]. Arid Zone Research, 2018, 35(1): 156-164.
- [13] 李芳, 邹妍, 刘彬, 张云秀, 龙鸿, 阎国荣. 新疆野苹果(*Malus sieversii*)内生菌的分离与鉴定[J]. 天津农学院学报, 2015, 22(4): 1-5.
- LI Fang, ZOU Yan, LIU Bin, ZHANG Yunxiu, LONG Hong, YAN Guorong. Isolation and identification of endophytic fungi in *Malus sieversii*[J]. Journal of Tianjin Agricultural College, 2015, 22(4): 1-5.
- [14] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 110-182.
- FANG Zhongda. Research methods of plant diseases[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 110-182.
- [15] 徐涛. 苹果树皮内生真菌的分离及其对腐烂病的生防作用[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- XU Tao. Isolation of endophytic fungi from apple bark and their biological control effect on *Valsa canker*[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2012.
- [16] 王勇, 王万立, 刘春艳, 郝永娟. 番茄红粉病致病病原的鉴定及其培养特性研究[J]. 华北农学报, 2008, 23(6): 97-100.
- WANG Yong, WANG Wanli, LIU Chunyan, HAO Yongjuan. Studies on identification and cultural characterization of *Trichothecium roseum*[J]. Acta Agriculturae Boreali- Sinica, 2008, 23(6): 97-100.
- [17] MURASHIGE T. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture[J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15(3): 473-497.
- [18] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 405-465.
- WEI Jingchao. Handbook for fungal identification[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979: 405-465.
- [19] ZHENG X M, ZHENG P, ZHANG K, CAIRNS T C, MEYER V, SUN J, MA Y. 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger*[J]. ACS Synthetic Biology, 2018: acssynbio.7b00456.
- [20] ZHENG X M, ZHENG P, SUN J B, SUN J B, KUN Z, MA Y H. Heterologous and endogenous U6 snRNA promoters enable CRISPR/Cas9 mediated genome editing in *Aspergillus niger*[J]. Fungal Biology & Biotechnology, 2018, 5(1): 2.
- [21] 罗明, 郝志刚. 黑曲霉及其应用研究进展[C]//北京市饲料工业协会, 中国农业科学院饲料研究所. 第二届饲料微生态制剂应用技术研讨会暨微生态制剂大会, 2012.09.21. 北京: 中国农业科学院饲料研究所, 2012: 2.
- LUO Ming, HAO Zhigang. Advances in *Aspergillus niger* and its application[C]//Beijing Feed Industry Association, Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences. The second Feed microecological preparation application technology seminar and microecological preparation conference, 2012.09.21. Beijing: Feed Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2012: 2.
- [22] 刘士平, 薛艳红. 一株具有稻瘟病拮抗作用的黑曲霉及其应用: 中国湖北, CN107058125A[P]. 2017-08-18.
- LIU Shiping, JIN Ersuo, HU Mengyan, LIU Huan, XUE Yan-hong. *Aspergillus niger* with antagonistic effect on *Magnaporthe oryzae* and its application: Hubei, China, CN107058125A[P]. 2017-08-18.
- [23] 张素, 袁洪威, 李祝, 肖洋, 吉玉玉, 唐婧红. 黑曲霉超临界萃取物抑制链格孢作用机制的初步研究[J]. 植物保护, 2019, 45(2): 57-63.
- ZHANG Su, YUAN Hongwei, LI Zhu, XIAO Yang, JI Yuyu, TANG Jinghong. Preliminary studies on the antifungal mechanism of supercritical extraction from *Aspergillus niger* against *Alternaria alternata*[J]. Plant Protection, 2019, 45(2): 57-63.
- [24] 牛军, 刘姝, 房耀维, 王淑军, 吕明生, 焦豫良, 潘建梅, 金志勇, 王思达, 朱晓杰. 一株抗菌海洋真菌的筛选、鉴定与发酵条件优化[J]. 淮海工学院学报(自然科学版), 2015, 24(4): 87-92.
- NIU Jun, LIU Shu, FANG Yaowei, WANG Shujun, LÜ Ming-sheng, JIAO Yuliang, PAN Jianmei, JIN Zhiyong, WANG Sida, ZHU Xiaojie. Screening, Identification, optimization of fermentation conditions of an antibacterial obligate marine fungus COF01[J]. Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Sciences Edition), 2015, 24(4): 87-92.
- [25] 李颂, 段玉玺, 朱晓峰, 陈立杰, 王媛媛, 潘琳琳. 黑曲霉次生代谢产物对番茄抗根结线虫病效果的影响[J]. 中国蔬菜, 2011, 1(4): 44-49.
- LI Song, DUAN Yuxi, ZHU Xiaofeng, CHEN Lijie, WANG Yuan-yuan, PAN Linlin. Effects of adding secondary metabolites of *Aspergillus niger* on resistance to tomato root-knot nematode[J]. China Vegetables, 2011, 1(4): 44-49.
- [26] RODRIGUEZ R J, WHITE JR J F, ARNOLD A E, REDMAN R S. Fungal endophytes: diversity and functional roles[J]. New Phytologist, 2009, 182(2): 314-330.