



## 研究报告

## 苹果树腐烂病生防真菌 Z-12A 的鉴定及其生防效果

薛应钰<sup>\*1</sup> 李兴昱<sup>1</sup> 李发康<sup>1</sup> 苟攀宁<sup>1</sup> 李龙<sup>2</sup> 徐秉良<sup>1</sup>

1 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 甘肃 兰州 730070

2 临夏回族自治州农业科学院 甘肃 临夏 731100

**摘要:**【背景】由苹果黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)引起的苹果树腐烂病是我国苹果产区的毁灭性病害之一,具有分布广、危害重和防治难等特点,严重制约着苹果产业的发展,急需寻找一种对该病高效、安全的防治措施。【目的】明确一株分离自甘肃省静宁县苹果树根际土壤的生防菌株 Z-12A 的分类地位,评价其对苹果树腐烂病的生防潜力。【方法】结合形态学特征和 rDNA ITS 序列分析对拮抗菌株 Z-12A 进行鉴定,采用生长速率法测定了其生物学特性;采用平板对峙培养法和生长速率法测定菌株 Z-12A 对苹果树腐烂病菌菌丝生长的影响;利用菌株 Z-12A 活菌和发酵液分别处理苹果枝条及小白鼠测定其生物安全性;使用离体枝条烫伤接种法测定菌株 Z-12A 对腐烂病的防治效果。【结果】形态学观察和 rDNA ITS 序列分析结果表明该菌株为埃及青霉(*Penicillium egyptiacum*)。该生防菌菌丝生长的最适培养基是萨氏培养基(Sabouraud Dextrose Agar With Yeast Extract, SDAY),而高氏 1 号培养基(Gauze's Medium No.1, GA)上产孢量最大;菌丝生长和产孢的最佳碳源是木糖,最佳氮源是硝酸钾;菌丝生长的最佳 pH 为 5.0,最适宜产孢的 pH 为 7.0;25 °C 时菌丝生长最快,产孢的最适温度为 10 °C。平板对峙试验表明菌株 Z-12A 对苹果树腐烂病菌抑制率为 88.71%,发酵液在培养皿内的抑菌率为 61.07%;显微观察显示菌株 Z-12A 可使苹果树腐烂病菌菌丝畸形及细胞原生质外渗;其发酵液对离体枝条防效为 66.69%;安全性评价表明菌株 Z-12A 对苹果树和小白鼠安全。【结论】菌株 Z-12A 对苹果树腐烂病具有较强的生物防治效果,具有一定的生防潜能,可为该病生防菌剂的选择提供新的菌种资源。

**关键词:** 埃及青霉, 生物学特性, 苹果黑腐皮壳菌, 生防效果

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2016YFD0201100); Agricultural Biotechnology Research and Application Development Project of Department of Agriculture and Animal Husbandry of Gansu Province (GNSW-2012-27)

**\*Corresponding author:** E-mail: xueyy@gsau.edu.cn

**Received:** 21-01-2020; **Accepted:** 02-04-2020; **Published online:** 04-06-2020

**基金项目:** 国家重点研发计划(2016YFD0201100); 甘肃省农牧厅农业生物技术研究与应用开发项目(GNSW-2012-27)

**\*通信作者:** E-mail: xueyy@gsau.edu.cn

**收稿日期:** 2020-01-21; **接受日期:** 2020-04-02; **网络首发日期:** 2020-06-04

## Identification of Z-12A fungus for biocontrol of apple tree canker

XUE Yingyu<sup>\*1</sup> LI Xingyu<sup>1</sup> LI Fakang<sup>1</sup> GOU Panning<sup>1</sup> LI Long<sup>2</sup> XU Bingliang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Biocontrol Engineering Laboratory of Crop Diseases and Pests of Gansu Province; College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

<sup>2</sup> Academy of Agricultural Sciences of Linxia Hui Autonomous Prefecture, Linxia, Gansu 731100, China

**Abstract:** **[Background]** Apple tree canker is one of the destructive diseases that caused by *Valsa mali* in many apple production areas of China with the characteristics of widespread distribution, serious damage, and was difficulty in controlling. Also, the disease of apple tree canker that has been severely restricted the development of apple industry. Therefore, it is urgent to develop an effective measure in control of apple tree canker disease. **[Objective]** To determine the taxonomic position of antagonistic Z-12A strain that has been isolated from the rhizosphere soil of apple trees in Jingning, Gansu province; and evaluate the biocontrol potential of Z-12A against *V. mali* *in vitro*. **[Methods]** The species of the Z-12A strain and the biological characteristics were identified and determined by the combination of morphological characteristics and ITS sequence analysis, and the plate growth rate method, respectively. The inhibitory efficiency of Z-12A against the pathogens growth was evaluated by dual culture and colony diameter assay, and the detached apple twigs method *in vitro*. The biosafety on apple branches and mice was determined using the Z-12A strain and its fermented broth, respectively. **[Results]** The strain of Z-12A was identified as *Penicillium egyptiacum* using the morphological characteristics and ITS sequence analysis. SDYA and GA were screened as the optimum media for the Z-12A strain hypha growth and spores production, respectively. Xylose and KNO<sub>3</sub> were screened as the optimum carbon and nitrogen sources, respectively. The optimum pH and temperatures for hypha growth were at 5.0 and at 25 °C, and 7.0 and 10 °C for spores production. The inhibitory rates of Z-12A strain against *V. mali* was 88.71% and 61.07% using the plate confrontation and fermentation broth, respectively. Microscopic observation showed that the strain of Z-12A can make the mycelium of *V. mali* deformity and cell protoplast exosmosis. Additionally, the control efficacy of Z-12A fermentation broth was 66.69% after application in apple twigs *in vitro*, and also was safe for apple branches and mice after application. **[Conclusion]** These results indicate that the strain of Z-12A has strong inhibitory activity against *V. mali*, and exhibited significant bio-control potential *in vitro*. Thus, our results provide a new bio-control resource in controlling apple tree canker disease in future.

**Keywords:** *Penicillium egyptiacum*, biological characteristics, *Valsa mali*, biocontrol effect

中国是全球苹果生产大国, 现已形成西北黄土高原、环渤海湾两个优势产区和黄河故道重要产区以及西南冷凉区、新疆等特色产区, 2017年苹果种植面积已达 232.38 万 hm<sup>2</sup>, 产量为 4 388.23 万 t, 二者均占全球 50%左右<sup>[1]</sup>。然而中国单位面积产量还不到美国、意大利等国家的 1/3-1/2, 病害严重发生是造成我国苹果单产水平不高的重要原因<sup>[2]</sup>。其中, 由苹果黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)引起的苹果树腐烂病是危害我国苹果生产的毁灭性病害之一, 该菌可以侵染苹果树的果实、主枝、主干等多个部位, 造成苹果质量和产量下

降, 严重时甚至造成整树枯死和毁园<sup>[3]</sup>。苹果树腐烂病在我国苹果产区的总体株发病率高达 52.5%, 发病严重的果园死亡率达 5%<sup>[4]</sup>。我们调查发现苹果树腐烂病在甘肃省的发生十分普遍, 2014年发病率达到 41.09%, 个别果园发病率高达 60%<sup>[5]</sup>。苹果树腐烂病分布范围广、危害程度重、防治极难, 被称为苹果树的“癌症”<sup>[6]</sup>。现阶段生产上对苹果树腐烂病的防治主要通过刮除病疤后涂抹化学药剂或全树喷淋化学药剂等措施<sup>[7]</sup>。但是, 一方面腐烂病菌从剪锯口等伤口侵染苹果枝干木质部, 在木质部导管内生长扩展并长期潜

伏, 化学药剂很难直接杀死病原<sup>[8]</sup>; 另一方面, 长期使用化学农药致使果园生态环境恶化、果实品质下降, 甚至可能引起食品安全问题<sup>[9]</sup>。因此, 寻找能够替代传统化学农药的途径防治苹果树腐烂病已成为生产上亟待解决的问题。

生物防治具有高效、安全、低毒等特点, 是替代化学防治来减轻苹果树腐烂病危害的重要策略之一, 符合国家提出的“双减”战略, 目前已成为国内外学者研究的焦点<sup>[10-11]</sup>。利用生防微生物进行苹果树腐烂病的防治已有报道。徐涛等<sup>[12]</sup>用分离到的 126 株内生真菌与苹果树腐烂病菌进行对峙培养, 共有 42 株菌对苹果树腐烂病菌的生长有抑制作用, 占供试菌株的 34%, 抑制率在 40% 以上的有 24 株, 均为链格孢属 (*Alternaria*) 真菌。张伟宁<sup>[13]</sup>从苹果树老皮上分离到一株球毛壳菌 (*Chaetomium globsum*) 61239, 其可使苹果树腐烂病菌菌丝顶端膨大, 抑制苹果树腐烂病菌分生孢子的萌发。Xin 等<sup>[14]</sup>研究表明螺旋毛壳 (*C. spirale*) 对苹果树腐烂病菌有较强的重寄生和拮抗作用。赵倩等<sup>[15]</sup>从苹果树皮内分离出一株落葵链格孢 (*A. basellae*) A167, 其对苹果树腐烂病有优良防效, 可以使腐烂病菌菌丝不规则弯曲、分枝增多、变粗、顶端钝圆, 部分菌丝原生质外溢。但是, 应用防治苹果树腐烂病的生防真菌相对比较少, 多集中在链格孢属和毛壳属等。因此, 本研究以分离、筛选自甘肃省静宁县的菌株 Z-12A 为材料, 以苹果树腐烂病菌为靶标菌, 测定菌株 Z-12A 对苹果树腐烂病菌的室内抑菌效果及离体枝条防效, 明确其分类地位和生物学特性并进行安全性评价, 以期为苹果树腐烂病的生物防治提供潜在的资源菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

生防真菌 Z-12A 从甘肃省静宁县苹果树根际采集土壤, 分离、筛选获得并保存于甘肃农业大学植物保护学院植物病理学实验室; 苹果黑腐皮壳菌 (*Valsa mali*) 由本实验室保存。菌株 Z-12A 和

苹果黑腐皮壳菌在 PDA 培养基中于 28 °C 暗培养 7 d 待用。

### 1.2 供试培养基

高氏一号培养基 (Gauze's Medium No.1, GA) 和查彼克氏培养基 (Czapek) 按照文献 [16] 配制, 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato Dextrose Agar, PDA)、淀粉琼脂培养基 (Starch Yeast Extract Agar, SYA) 和萨氏培养基 (Sabouraud Dextrose Agar with Yeast Extract, SDAY) 按照文献 [17] 配制, LB 培养基按照文献 [18] 配制, 马铃薯琼脂培养基 (Potato Agar, PA) 按照文献 [19] 配制。

### 1.3 主要试剂和仪器

真菌基因组 DNA 提取试剂盒, 北京擎科生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。智能人工气候箱, 上海跃进医疗器械有限公司; 蔡司显微镜, 北京普瑞赛司仪器有限公司; 酸度计, 上海精密仪器仪表有限公司。

### 1.4 菌株 Z-12A 对苹果树腐烂病菌的抑制作用

#### 1.4.1 菌株 Z-12A 活菌对苹果树腐烂病菌的抑制作用

采用平板对峙培养法<sup>[20]</sup>。将苹果树腐烂病菌用无菌打孔器打成 5 mm 的菌饼, 接种于 9 cm PDA 平板中央, 以腐烂病菌为中心, 在 PDA 平板背面用“十”字交叉法做标记, 在“十”字两端距中心靶标菌 15 mm 处接菌株 Z-12A 菌饼, 以仅接苹果树腐烂病菌的平板为对照, 每个处理 3 个重复, 于 28 °C 培养箱培养。待对照菌丝铺满整个平板时, 利用“十”字交叉法测量各菌落直径, 计算抑菌率。同时, 利用显微镜观察受抑制菌落边缘菌丝的形态变化。

抑菌率 (%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (处理菌落直径 - 5) × 100 (1)

#### 1.4.2 菌株 Z-12A 发酵液对苹果树腐烂病菌的抑制作用

采用菌丝生长速率法<sup>[21]</sup>。将在 PDA 培养基培养 7 d 的菌株 Z-12A 接入 80 mL PDB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 7 d, 8 000 r/min

离心 15 min 取上清液, 以孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的细菌过滤器过滤得到无菌发酵滤液, 无菌发酵滤液与冷却至 45  $^{\circ}\text{C}$  左右的 PDA 培养基以 1:2 的体积比混合, 制成含发酵滤液的 PDA 平板。将直径 5 mm 腐烂病菌菌饼接种于含药平板中央, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d, 以不含发酵液的 PDA 平板作为对照。每组 3 个重复, 测定菌株 Z-12A 发酵液对苹果树腐烂病菌的抑制效果。根据对照组和处理组的菌落直径大小, 按照公式(1)计算抑菌率。

### 1.5 菌株 Z-12A 的鉴定

将菌株 Z-12A 接种于 PDA 培养基上, 28  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 7 d, 根据其菌落形态、菌丝直径、孢子大小、形态和着生方式对其进行形态学鉴定。同时, 由北京擎科生物科技有限公司西安分公司利用真菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 Z-12A 的基因组总 DNA, 采用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') PCR 扩增菌株 Z-12A 的 ITS rDNA 并进行序列测定。PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): 10 $\times$ PCR Reaction Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ , 引物 ITS1/ITS4 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ , 超纯水补足至 25  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 54  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。将菌株 Z-12A 的 rDNA ITS 拼接序列的测定结果用 BLAST 工具在 GenBank 数据库中进行同源序列对比。利用 BLAST 的结果, 通过 MEGA 7.0 软件构建菌株 Z-12A 的系统发育树。

### 1.6 菌株 Z-12A 生物学特性

#### 1.6.1 不同培养基对菌株 Z-12A 生长及产孢的影响

将在 PDA 培养基培养 10 d 的菌株 Z-12A 打成 5 mm 菌饼, 接种在以下 6 种培养基平板中央: PDA 培养基、SYA 培养基、查彼克氏培养基、GA 培养基、SDAY 培养基、LB 培养基。每个处理 5 次重复, 28  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 7 d, 利用“十”字交叉法

测量菌落直径, 计算平均生长速率。利用直径为 5 mm 打孔器在菌落中央至边缘 1/2 处打取菌饼, 挑取菌饼于 50 mL 离心管内, 加入 10 mL 0.05% 吐温-80 无菌水, 充分振荡后用血球计数板计数, 计算产孢量<sup>[22]</sup>。

#### 1.6.2 碳、氮源对菌株 Z-12A 生长及产孢的影响

参照丁锐等<sup>[19]</sup>方法, 以 PA 培养基为基础, 分别添加 2% (质量分数) 葡萄糖、蔗糖、淀粉、甘露糖、果糖、肌醇、木糖, 28  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 7 d, 检测碳源对菌株 Z-12A 生长及产孢量的影响; 以 2% 葡萄糖作为碳源, 分别添加 2% (质量分数) 尿素、硝酸钾、酪氨酸、硝酸钠, 28  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 7 d, 测定氮源对菌株 Z-12A 生长及产孢量影响。生长速率及产孢量测定方法同 1.6.1。

#### 1.6.3 pH 对菌株 Z-12A 生长及产孢的影响

制备 PDA 培养基, 利用 1 mol/L 盐酸与 1 mol/L 氢氧化钠将 PDA 培养基 pH 分别调节为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 后, 1 $\times$ 10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min, 将 5 mm 菌株 Z-12A 菌饼接种于各处理培养基中, 每个处理 5 个重复, 置于 28  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 7 d, 菌株生长速率及产孢量测定方法同 1.6.1。

#### 1.6.4 温度对菌株 Z-12A 生长及产孢的影响

将菌株 Z-12A 接在 PDA 培养基上, 分别置于 10、15、20、25、28、30、35、40  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 7 d, 每个处理 5 个重复, 菌株生长速率及产孢量测定方法同 1.6.1。

### 1.7 菌株 Z-12A 发酵液对苹果树腐烂病的离体枝条防效测定

参照臧睿等<sup>[23]</sup>的烫伤接种法, 选取 2 年生粗细均匀的红富士苹果树健康枝条, 每根枝条截成 15 cm 作为接种材料, 自来水冲洗干净晾干后, 将枝条两端用石蜡封口, 利用无菌水冲洗 2 次, 75% 酒精进行表面消毒, 再用无菌水将残留酒精冲洗干净, 晾干。利用直径为 5 mm 的铁钉帽将树皮烫伤, 分别在伤口处涂抹稀释倍数为 0、10、50、100 倍的菌株 Z-12A 发酵液, 接种腐烂

病菌菌饼,以只接腐烂病的枝条作为对照。每个处理重复 3 次,将处理的枝条置于酒精消毒后铺有灭菌湿纱布的白色瓷盘(30 cm×20 cm)内,保鲜膜封口,置于 28 °C 黑暗条件下保湿培养,观察并记录枝条发病情况,10 d 后测量病斑直径,按照公式(2)和(3)分别计算病斑面积和防治效果。

$$\text{病斑面积} = 1/4 \times \pi \times \text{长径} \times \text{短径} \quad (2)$$

$$\text{防治效果}(\%) = (\text{对照病斑面积} - \text{处理病斑面积}) / \text{对照病斑面积} \times 100 \quad (3)$$

## 1.8 菌株 Z-12A 的安全性评价

### 1.8.1 菌株 Z-12A 对苹果枝条的致病性测定

按照 1.7 的方法,将长度为 15 cm 的红富士 2 年生健康枝条封口、消毒,置于超净工作台晾干后,用直径为 5 mm 的铁钉帽烫伤,再用无菌水将烫伤处清洗干净,接菌株 Z-12A 菌饼( $\phi=5$  mm),以接空白 PDA 为对照,处理和对照各 5 个枝条。25 °C 保湿培养 7 d 后,采用“十”字交叉法测量病斑长度,根据公式(2)计算病斑面积。

### 1.8.2 菌株 Z-12A 对小白鼠的急性毒性测定

参照郝晓娟<sup>[24]</sup>的方法,选取体重大约为 20 g 的小白鼠,将菌株 Z-12A 发酵液按照 3 000 mg/kg

对小白鼠进行灌胃处理,以灌入灭菌的空白液体发酵培养基的小白鼠作为对照,各处理均 10 只小鼠(雌鼠/雄鼠各 5 只)。正常饲养,连续培养观察 10 d,记录小白鼠死亡率及体重变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 Z-12A 对苹果树腐烂病菌的抑制作用

菌株 Z-12A 与苹果树腐烂病菌在 PDA 平板对峙培养过程中,其对苹果树腐烂病菌的生长具有明显的抑制作用(图 1)。对照组及处理组经“十”字交叉法测量腐烂病菌直径后计算其抑菌率,平板对峙抑菌率为  $88.71\% \pm 1.11\%$ ;菌株 Z-12A 发酵滤液的抑菌率为  $61.07\% \pm 1.37\%$ ,菌株 Z-12A 对苹果树腐烂病菌的抑制效果较为显著。

对峙培养后,挑取与菌株 Z-12A 交界处的腐烂病菌菌丝于显微镜下观察,菌株 Z-12A 对腐烂病菌菌丝的生长具有显著影响。与对照正常生长的腐烂病菌菌丝(图 2A)相比,受菌株 Z-12A 抑制的腐烂病菌菌丝(图 2B、2C)扭曲变形、节间缩短、变细且易断裂。



图 1 对峙培养时菌株 Z-12A 对苹果黑腐皮壳菌菌丝生长的影响

Figure 1 Effect of strain Z-12A on *Valsa mali* in confrontation culture

注: A: 对照; B: 处理

Notes: A: Control; B: Treated

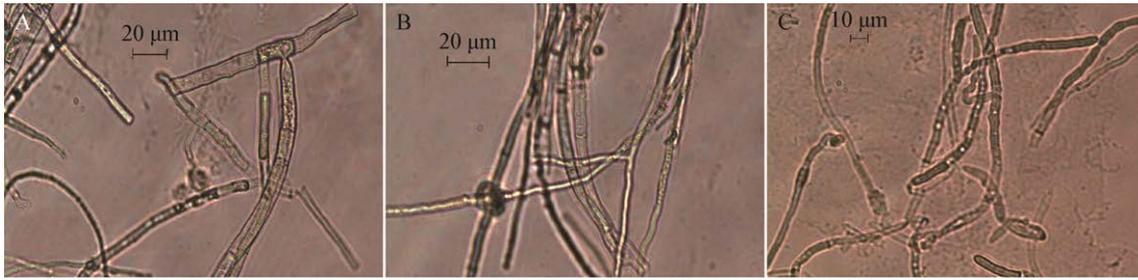


图 2 对峙培养中菌株 Z-12A 对苹果黑腐皮壳菌菌丝形态的影响

Figure 2 Inhibition effect of strain Z-12A on mycelia morphology of *Valsa mali*

注: A: 正常菌丝; B: 菌丝纤细易断裂; C: 菌丝扭曲变形节间缩短

Notes: A: Normal mycelia; B: Mycelium is slender and easy to break; C: Mycelial deformation while internode shortened

## 2.2 菌株 Z-12A 的鉴定

菌株 Z-12A 在 PDA 培养基上暗培养 7 d 的菌落形态如图 3A 所示, 菌落表面绒状, 较厚, 正面颜色为香槟黄色, 边缘颜色呈象牙色, 中央凸起, 以同心圆轮纹状向外扩展, 稍具放射性褶皱; 菌落背面如图 3B 所示, 透过培养基可以观察到背面颜色为金色, 边缘为亮卡其色; 并且菌株 Z-12A 在 PDA 培养基内生长过程中还会产生少量绿黄色色素; 菌丝(图 3D)有横隔, 分生孢子梗较为光滑, 部分菌丝顶端具对称或不对称的帚状分枝, 着生有 2-4 个小梗; 在菌丝上及菌丝顶端着生成串的球状孢子, 孢子直径为(2.6-3.0)  $\mu\text{m}$  × (2.6-3.0)  $\mu\text{m}$  (图 3C)。

以菌株 Z-12A 基因组 DNA 为模板, 采用真菌通用引物对 ITS1/ITS4 进行 PCR 扩增得到 rDNA ITS 产物长度为 750 bp。测序后, 将测序结果提交

至 GenBank 数据库进行 BLAST 检索, 下载相似性较高的数据, 与菌株 Z-12A 的 rDNA ITS 序列组成数据集, 对获得的同源序列利用 MEGA 7.0 软件 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 从图 4 可以看出, Z-12A 与青霉属(*Penicillium*)真菌处于一个大分支内, 又与埃及青霉(*Penicillium egyptiacum*) (MH860530.1)亲缘关系最近。结合菌株 Z-12A 在 PDA 平板上的培养特性及形态特征, 将其初步鉴定为埃及青霉(*Penicillium egyptiacum*), 菌株的 ITS rDNA GenBank 登录号为 MN994345。

### 2.2.1 培养基种类对菌株 Z-12A 生长及产孢的影响

菌株 Z-12A 在不同培养基上其生长速率及产孢量差异较为显著, 在 SDAY 及 LB 培养基上生长较快, 生长速率分别为 4.70 mm/d 和 4.67 mm/d; 在 SYA 培养基上生长最慢, 生长速率仅为 1.34 mm/d;

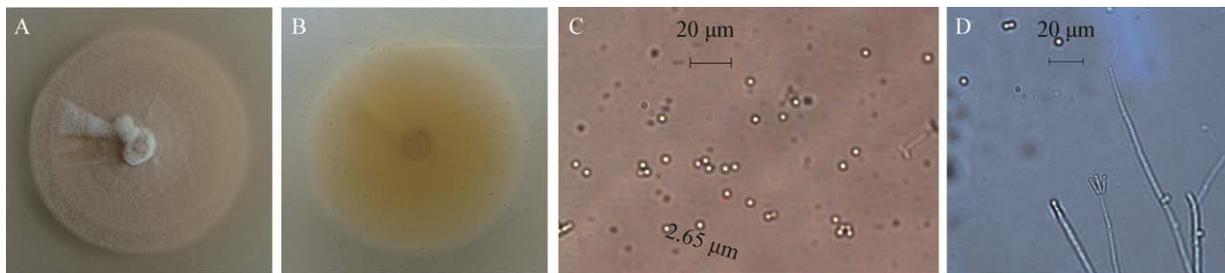


图 3 菌株 Z-12A 在 PDA 上培养 7 d 的形态特征

Figure 3 Morphological characteristics of strain Z-12A on the PDA medium for 7 days

注: A: 菌落正面; B: 菌落反面; C: 分生孢子; D: 菌丝形态

Notes: A: The front side of colony; B: Dorsal surface of colony; C: The conidia; D: Mycelial morphology

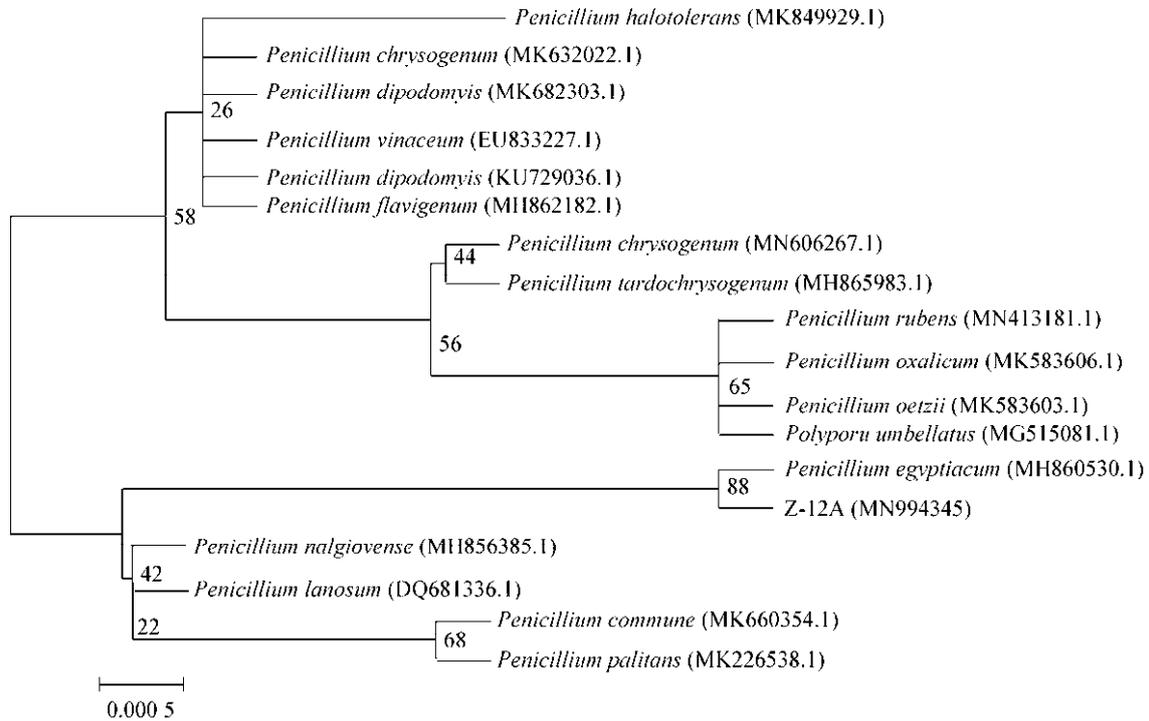


图 4 菌株 Z-12A 基于 rDNA ITS 序列构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of strain Z-12A based on rDNA ITS sequences

注: 括号内数值为菌株在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字表示自展支持值; 标尺表示每个核苷酸位点上的替换值

Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Values above the branches are parsimony bootstrap; The value on the scale represents each nucleotide sites replacement value

在 GA 培养基上菌株 Z-12A 产孢量最大, 其产孢量为  $2.55 \times 10^8$  spores/cm<sup>2</sup>, 在 LB 培养基上产孢量最少, 仅为  $0.68 \times 10^8$  spores/cm<sup>2</sup>。可见, 在所选 6 种培养基中, SDAY 及 LB 培养基适合菌株 Z-12A 的生长, GA 培养基则为最适产孢培养基(图 5)。

### 2.2.2 碳、氮源对菌株 Z-12A 生长及产孢的影响

菌株 Z-12A 在不同碳源下其生长速率及产孢量差异显著, 其中以木糖作为碳源时生长速率最快, 达到 5.08 mm/d; 以肌醇作为碳源时生长速率最慢, 生长速率仅为 2.66 mm/d; 当以蔗糖作为碳源时其产孢量为  $2.04 \times 10^8$  spores/cm<sup>2</sup>, 在所选碳源中产孢量最高; 以木糖作为碳源时其产孢量为  $1.88 \times 10^8$  spores/cm<sup>2</sup>, 与蔗糖差异较小; 以甘露糖作为碳源其产孢量最少, 为  $5.8 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>。可见以木糖作为碳源较适合菌株 Z-12A 的生长及产孢(图 6)。

菌株 Z-12A 在不同氮源下的生长及产孢都具

有明显差异, 当以尿素作为氮源时菌株 Z-12A 无法生长; 最适宜的氮源为硝酸钾, 当以硝酸钾为氮源时, 菌株 Z-12A 的生长速率及产孢量在所选氮源中都是最高的, 其生长速率为 4.45 mm/d, 产孢量为  $1.63 \times 10^8$  spores/cm<sup>2</sup>; 当以酪氨酸为氮源时, 菌株 Z-12A 产孢量与硝酸钾相同, 但生长速率为 3.29 mm/d, 明显低于硝酸钾和硝酸钠。所以, 硝酸钾较适合菌株 Z-12A 的生长及产孢(图 7)。

### 2.2.3 培养基 pH 对菌株 Z-12A 生长及产孢的影响

在培养基 pH 4.0–10.0 条件下, 菌株 Z-12A 的生长所受影响较小, 生长速率为 4.21–4.63 mm/d; pH 为 5.0 时, 菌落生长速度最快, 生长速率为 4.63 mm/d; pH 为 7.0 时, 该菌产孢量最高, 为  $1.27 \times 10^8$  spores/cm<sup>2</sup>; 当 pH 为 4.0 时, 产孢量最少, 仅为  $4.2 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>; 在 pH 为 7.0–9.0 时, 菌株 Z-12A 产孢量差异较小。可见菌株 Z-12A 较为适宜在中性偏酸性条件下生长和产孢(图 8)。

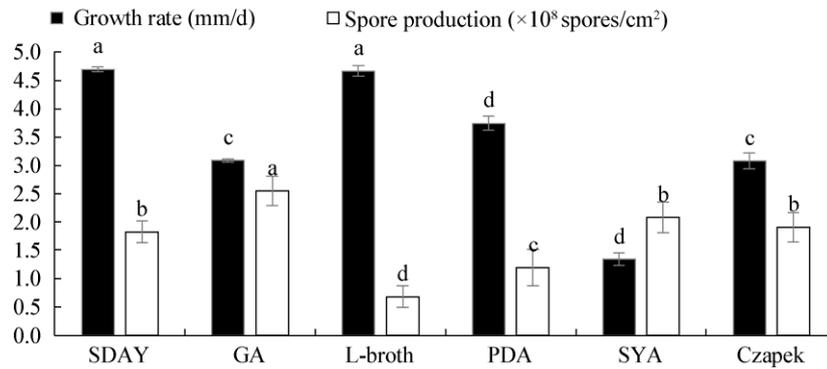


图 5 菌株 Z-12A 在不同培养基上的生长速率及产孢量

Figure 5 Growth rate and spore production of strain Z-12A on different media

注: 图中相同字母表示在 0.05 水平差异不显著(Duncan's 极复极差法). 下同

Note: Data with different lowercase letters in the same column indicated significantly different at 0.05 level. The same below

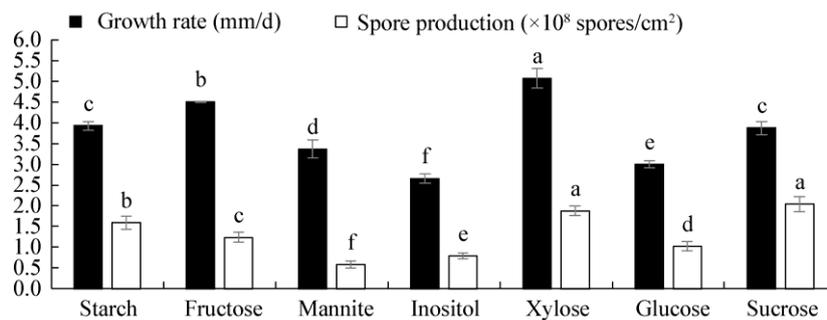


图 6 不同碳源对 Z-12A 菌株生长和产孢的影响

Figure 6 Growth rate and spore production of strain Z-12A on different carbon sources

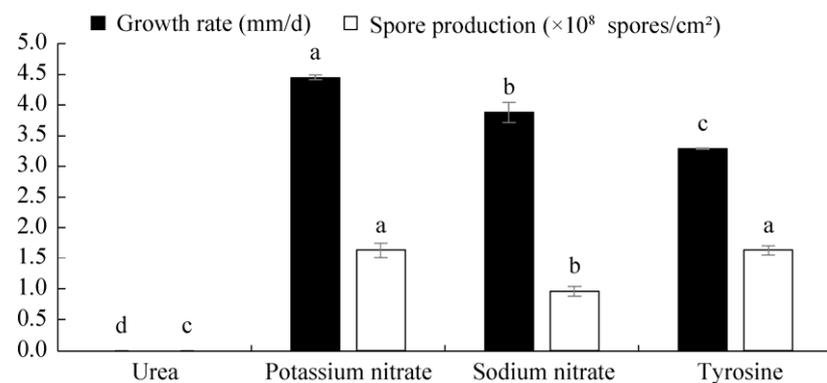


图 7 不同氮源对菌株 Z-12A 生长和产孢的影响

Figure 7 Growth rate and spore production of strain Z-12A on different nitrogen sources

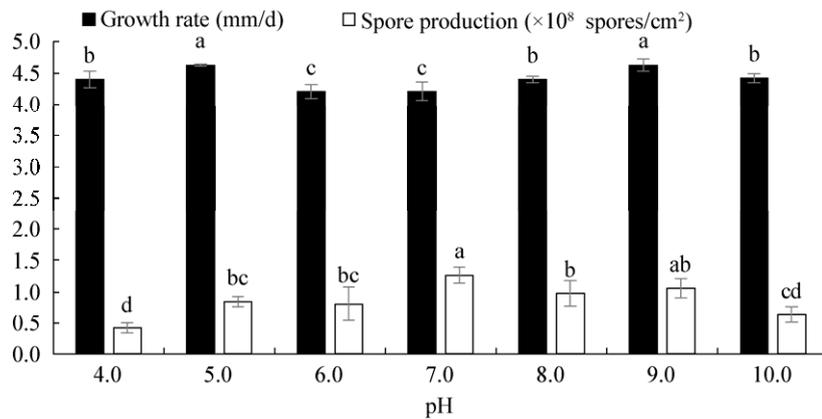


图 8 pH 对菌株 Z-12A 生长和产孢的影响

Figure 8 Growth rate and spore production of strain Z-12A on different pH

#### 2.2.4 温度对菌株 Z-12A 生长及产孢的影响

在温度较高的环境下, 菌株 Z-12A 的生长速率会受到较大影响, 产孢量也较低, 当温度达到 35 °C 后菌株 Z-12A 无法生长; 在低温环境下, 菌株 Z-12A 的生长速率会受到影响, 但在一定程度范围内会提高菌株 Z-12A 的产孢量。当生长温度为 10 °C 时, 菌株 Z-12A 产孢量最高, 为  $1.53 \times 10^8$  spores/cm<sup>2</sup>, 但生长速率较低, 为 2.38 mm/d。在 15、25 和 28 °C 条件下, 菌株 Z-12A 的生长速率差异较小且生长速率较高, 生长温度为 25 °C 时其生长速率最高, 为 3.39 mm/d, 但产孢量较小, 仅为  $4.8 \times 10^7$  spores/cm<sup>2</sup>; 当温度为 28 °C 时其产孢量较高, 为  $1.24 \times 10^8$  spores/cm<sup>2</sup>, 所以菌株 Z-12A 的较适宜培养温度为 28 °C (图 9)。

#### 2.3 菌株 Z-12A 发酵液对苹果树腐烂病的离体枝条防效测定

如图 10 所示, 将菌株 Z-12A 发酵液稀释为不同倍数后, 在离体枝条上对苹果树腐烂病具有不同程度的防治作用, 病斑面积显著低于对照组。由表 1 可以看出, 发酵液原液的防治效果最佳, 防效达到 66.69%; 发酵液稀释 50 倍时防效为 25.25%; 当稀释 100 倍时防效降至 12.77%, 表明菌株 Z-12A 发酵液对苹果树腐烂病具有一定防治效果, 但随着菌株 Z-12A 发酵液稀释倍数的增

大, 其对离体枝条上苹果树腐烂病的防治效果逐渐降低, 病斑面积逐渐增大。

#### 2.4 生防菌株 Z-12A 的生物安全性评价

##### 2.4.1 菌株 Z-12A 对苹果树枝条的致病性测定结果

试验结果表明(表 2), 菌株 Z-12A 经烫伤接种 7 d 后, 苹果树枝条的病斑面积为 24.91 mm<sup>2</sup>, 对照的病斑面积为 22.77 mm<sup>2</sup>, 两者差异不显著 ( $P < 0.05$ ), 说明菌株 Z-12A 对苹果树没有致病性。

##### 2.4.2 菌株 Z-12A 对动物急性毒性的测定结果

试验结果表明(表 3), 经菌株 Z-12A 发酵液灌胃处理的小白鼠并没有出现中毒症状。整个试验过程中, 试验组与对照组的小白鼠生长状态都正常, 无死亡情况, 死亡率均为 0; 10 d 后对照组雌鼠与雄鼠平均体重分别为 27.10 g 和 27.63 g, 经菌株 Z-12A 发酵液处理的雌鼠与雄鼠平均体重分别为 27.09 g 和 27.42 g, 两者差异不显著 ( $P < 0.05$ ), 菌株 Z-12A 发酵液对小白鼠的半致死量  $LD_{50} > 3000$  mg/kg。

### 3 讨论与结论

苹果树腐烂病作为苹果产业最致命的病害之一, 严重限制了苹果的产量<sup>[25]</sup>。现阶段对苹果树腐烂病的防治主要依靠化学防治, 但随着人们对环境条件及果实品质要求的逐渐提高, 化学防治将会受到更多制约, 所以生物防治将成为防治植物病害的重要手段<sup>[26]</sup>。本研究对分离自甘肃省静

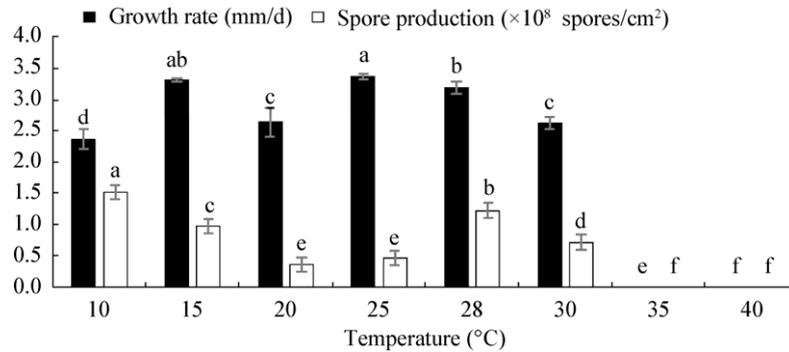


图 9 温度对菌株 Z-12A 生长和产孢的影响

Figure 9 Growth rate and spore production of strain Z-12A on different temperature



图 10 菌株 Z-12A 发酵液处理后离体枝条上的病斑扩展情况

Figure 10 Lesion area expansion on detached twigs after treated with fermentation liquid of strain Z-12A

注: A: 原液; B: 稀释 10 倍; C: 稀释 50 倍; D: 稀释 100 倍; CK: 对照

Notes: A: Raw liquid; B: Dilute 10 times; C: Dilute 50 times; D: Dilute 100 times; CK: Control

表 1 菌株 Z-12A 对苹果树腐烂病的离体枝条防治效果  
Table 1 Control efficiency of strain Z-12A on detached twigs inoculated with *V. mali* for apple tree

稀释倍数	病斑面积	防治效果
Dilution time (folds)	Scab area (cm <sup>2</sup> )	Control efficiency (%)
0	5.72±0.19e	66.69±1.12a
10	8.98±0.46d	47.66±2.68b
50	12.83±0.30c	25.25±1.75c
100	14.96±0.44b	12.77±2.55d
CK	17.16±0.35a	—

注: —: 无数据; 同列不同小写字母表示 0.05 水平差异显著。下同  
Note: —: No data; Data with the different lowercase letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level. The same below

表 2 菌株 Z-12A 对苹果树枝条的致病性测定结果(各重复的病斑面积, mm<sup>2</sup>)

Table 2 The results of pathogenicity test of strain Z-12A to apple tree branches (scab area of repetitions, mm<sup>2</sup>)

处理	编号 No.					平均
	1	2	3	4	5	Average
Z-12A	24.96	24.96	24.97	24.68	24.98	24.91±0.13a
CK	22.85	22.72	22.74	22.96	22.56	22.77±0.15a

表 3 菌株 Z-12A 发酵液对小白鼠生长的影响

Table 3 Effect of fermentation broth of strain A-12A on the growth of mouse

处理	雌鼠 Female mouse		雄鼠 Male mouse	
	体重	死亡率	体重	死亡率
Treatment	Weight (g)	Death rate (%)	Weight (g)	Death rate (%)
Z-12A	27.09±0.37a	0	27.42±0.41a	0
CK	27.10±0.21a	0	27.63±0.53a	0

宁县苹果根际土壤的菌株 Z-12A 进行了形态观察及 rDNA ITS 序列分析, 鉴定为埃及青霉 (*Penicillium egyptiacum*)。该菌对苹果树腐烂病菌菌丝的生长具有较好的抑制作用, 经发酵滤液处理的离体枝条试验显示, 苹果树腐烂病病斑面积均显著低于对照, 表明埃及青霉 Z-12A 对苹果树腐烂病具有较好的防治效果。

微生物防治在实际应用过程中, 菌株常受外界环境的影响而导致防治效果较差。因此, 本试验利用不同培养基、碳氮源、pH、温度探究了埃及青霉 Z-12A 在不同环境下的生长及产孢特性。结果

表明: (1) 埃及青霉 Z-12A 对营养要求较低, 在不同培养基上都可以正常生长及产孢, 其中在 SDAY 培养基上生长最快, 在 GA 培养基上产孢量最高; 其可以利用多种碳、氮源, 在选择 7 种碳源培养基上都可以较好地生长, 其中以木糖作为碳源时其生长速率及产孢量都最高, 可作为埃及青霉 Z-12A 的最佳碳源; 在选择 7 种氮源中, Z-12A 无法利用尿素作为氮源, 其他氮源对其生长及产孢影响较小, 以硝酸钾为埃及青霉 Z-12A 的生长及产孢最佳氮源。(2) 埃及青霉 Z-12A 在 10–30 °C 范围内都可以生长及产孢, 其中 15 °C 及 25 °C 条件下较适宜其生长; 当温度超过 30 °C 时, 其生长及产孢会受到抑制; 当温度低于 25 °C 后, 随着温度的降低, 其产孢量会逐渐增加。(3) 生长环境的酸碱度对埃及青霉 Z-12A 的生长及产孢影响较小, 在 pH 4.0–10.0 范围内其生长速率及产孢量差异较小, 但在中性偏碱条件下更有利于其产孢。通过对埃及青霉 Z-12A 的生物学特性进行测定, 结果表明埃及青霉 Z-12A 可以较好地适应各种生长条件, 一定程度上适应自然条件下的各种不利因素, 维持其应有的抑菌活性。但由于自然环境更加复杂, 不同于生物学特性探究过程中的定性定量试验, 所以面对复杂的田间环境, 还需进一步探究。

菌株 Z-12A 与苹果树腐烂病菌平板对峙培养的抑菌率达到 88.71%, 高于邓振山等<sup>[27]</sup>从苹果树中分离出的 4 株内生真菌 G2、G9、J32 和 Y40 对苹果树腐烂病的平板对峙抑制率(分别为 69.64%、58.93%、67.86%、67.88%)。然而菌株 Z-12A 发酵滤液原液对苹果树腐烂病菌的抑菌率为 61.07%, 低于平板对峙培养的抑菌效果。原因可能是由于平板对峙过程中菌株 Z-12A 产生一些代谢产物抑制腐烂病菌生长的同时, 还对腐烂病菌的生长具有竞争作用, 而发酵滤液则仅依靠菌株 Z-12A 代谢产物对腐烂病菌的生长产生抑制作用<sup>[28]</sup>。因此, 可以通过进一步优化发酵条件提高 Z-12A 的活性物质产量, 进而提升其发酵液的抑菌效果。

另外, 虽然菌株 Z-12A 对苹果树腐烂病具有较好的防治效果, 但是在实际应用过程中还需要考虑其潜在的致病力及对人畜的过敏反应。通过测定菌株 Z-12A 发酵液对苹果枝条的致病性及对小白鼠的急性经口毒性, 发现菌株 Z-12A 对苹果树无致病性且对小鼠的半致死量  $LD_{50} > 3\ 000\ \text{mg/kg}$ , 初步证明了菌株 Z-12A 对植物及动物均较为安全, 无潜在风险。

综上所述, 本试验探究了埃及青霉 Z-12A 对苹果树腐烂病菌的皿内抑制效果、枝条离体防效、生物学特性及其生物安全性, 为开展苹果树腐烂病的生物防治提供了菌种资源, 也为埃及青霉 Z-12A 的进一步开发利用提供了理论基础, 但对其发酵工艺的优化和田间防效还需进一步试验。

## REFERENCES

- [1] Wang JZ, Mao ZQ, Cong PH, Lü DG, Ma FW, Reng XL, Shu HR, Li BH, Guo YR, Hao YJ, et al. Fruit scientific research in New China in the past 70 years: apple[J]. Journal of Fruit Science, 2019, 36(10): 1255-1263 (in Chinese)  
王金政, 毛志泉, 丛佩华, 吕德国, 马锋旺, 任小林, 束怀瑞, 李保华, 郭玉蓉, 郝玉金, 等. 新中国果树科学研究 70 年——苹果[J]. 果树学报, 2019, 36(10): 1255-1263
- [2] Hu QY, Hu TL, Wang YN, Wang ST, Cao KQ. Survey on the occurrence and distribution of apple diseases in China[J]. Plant Protection, 2016, 42(1): 175-179 (in Chinese)  
胡清玉, 胡同乐, 王亚南, 王树桐, 曹克强. 中国苹果病害发生与分布现状调查[J]. 植物保护, 2016, 42(1): 175-179
- [3] Li L, Zhang SW, Chen DW, Xu BL. Evaluation of the control efficacy of five mineral source pesticide against the plant pathogen of *Valsa mali*[J]. Plant Protection, 2019, 45(2): 247-252 (in Chinese)  
李丽, 张树武, 陈大为, 徐秉良. 5 种矿物源药剂对苹果树腐烂病菌室内防效评价[J]. 植物保护, 2019, 45(2): 247-252
- [4] Cao KQ, Guo LY, Li BH, Sun GY, Chen HJ. Investigations on the occurrence and control of apple canker in China[J]. Plant Protection, 2009, 35(2): 114-117 (in Chinese)  
曹克强, 国立耘, 李保华, 孙广宇, 陈汉杰. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 114-117
- [5] Xue YY, Jin XG, Li HJ, Zhang SW, Xu BL, Fan WZ. Investigation on the occurrence and control of apple canker

- in Gansu Province[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2015, 50(6): 81-87 (in Chinese)  
薛应钰, 靳小刚, 李海军, 张树武, 徐秉良, 范万泽. 甘肃省苹果树腐烂病发生和防治情况调查[J]. 甘肃农业大学学报, 2015, 50(6): 81-87
- [6] Li JZ, Wang Y, Li YX, Zhuo XY, Wang ZX, Zhao XL, Wang MC, Hou YL, Li XY. Research progress and prospect on *Valsa mali* Miyabe & Yamada[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(21): 7222-7227 (in Chinese)  
李江舟, 王耀, 李元秀, 卓馨怡, 王子烜, 赵雪丽, 王美超, 侯义龙, 李晓艳. 苹果树腐烂病研究进展与展望[J]. 分子植物育种, 2019, 17(21): 7222-7227
- [7] Zhai HZ, Hu TL, Chen Q, Cao KQ. Control effect of 10 fungicides against apple *Valsa* canker[J]. Plant Protection, 2012, 38(3): 151-154,171 (in Chinese)  
翟慧者, 胡同乐, 陈曲, 曹克强. 10种化学杀菌剂对苹果树腐烂病的防效评价[J]. 植物保护, 2012, 38(3): 151-154,171
- [8] Wang XH, Pan TT, Lian S, Wang CX, Li BH. Effects of environmental factors on the growth and extension of *Valsa mali* in the xylem of apple branches[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2018, 51(17): 3291-3301 (in Chinese)  
王晓焕, 潘彤彤, 练森, 王彩霞, 李保华. 环境因子对腐烂病菌在苹果枝条木质部内生长扩展的影响[J]. 中国农业科学, 2018, 51(17): 3291-3301
- [9] Dou YN, Niu SQ, Dou JT, Zhao D, Zheng DD, Zhou X, Wang Y, Zhu XT, Kong WB. Screening, identification and preliminary study on biocontrol effect of antagonistic *Bacillus* against the pathogen of *Valsa mali* for apple tree[J]. Microbiology China, 2018, 45(12): 2684-2694 (in Chinese)  
豆雅楠, 牛世全, 豆建涛, 赵丹, 郑豆豆, 周璇, 王彦, 朱学泰, 孔维宝. 芽孢杆菌拮抗苹果树腐烂病菌的筛选、鉴定及抑菌活性初探[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2684-2694
- [10] Berdeni D, Cotton TEA, Daniell TJ, Bidartondo MI, Cameron DD, Evans KL. The effects of arbuscular mycorrhizal fungal colonisation on nutrient status, growth, productivity, and canker resistance of apple (*Malus pumila*) [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1461
- [11] Cheng C, Zhao YC, Li HX, He F, Cao SF, Yang XL, Qiang GL, Liu FQ. Control effect of HSAF from *Lysobacter enzymogenes* OH11 on pear *Valsa* canker[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017, 33(1): 114-120 (in Chinese)  
程超, 赵延存, 李红旭, 何锋, 曹素芳, 杨晓蕾, 钱国良, 刘凤权. 产酶溶杆菌 OH11 代谢产物 HSAF 对梨树腐烂病的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(1): 114-120
- [12] Xu T, Hu TL, Wang YN, Wang ST, Cao KQ. Isolation of endophytic fungi from apple bark and their potential for biological control of *Valsa ceratosperma* [J]. Acta Phytopythologica Sinica, 2012, 39(4): 327-333 (in Chinese)  
徐涛, 胡同乐, 王亚南, 王树桐, 曹克强. 苹果树皮内生真菌的分离及其对腐烂病的生物防治潜力[J]. 植物保护学报, 2012, 39(4): 327-333
- [13] Zhang WN. Study on the classification and identification of antagonistic strain 61239 and ITS biocontrol effect [D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2017: 25-29 (in Chinese)  
张伟宁. 拮抗毛壳菌 61239 的分类鉴定及其生防作用研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2017: 25-29
- [14] Xin YF, Shang JJ. Bio-control trials of *Chaetomium spirale* ND35 against apple canker [J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(2): 121-124
- [15] Zhao Q, Hu TL, Wang ST, Wang YN, Liu YJ, Cao KQ. Biocontrol efficacy of endophytic *Alternaria* Al67 from apple bark against apple tree *Valsa* canker [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2014, 37(3): 75-82 (in Chinese)  
赵倩, 胡同乐, 王树桐, 王亚南, 刘钰娇, 曹克强. 苹果树皮内生链格孢 Al67 对苹果树腐烂病的生防潜力研究 [J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(3): 75-82
- [16] Microbe Department of Institute of Soil Science, Chinese Academy of Sciences. Soil Microorganism Research Method [M]. Beijing: Science Press, 1985: 45-47 (in Chinese)  
中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社, 1985: 45-47
- [17] Wang J, Hu JH, Long YL, Zhou N, Peng FG, Yao TS. Biological characteristics of a strain of *Cladosporium cladosporioides* that is highly pathogenic to *Panonychus citri* (McGregor) [J]. Chinese Journal of Applied Entomology, 2016, 53(1): 22-29 (in Chinese)  
王娟, 胡军华, 龙艳玲, 周娜, 彭风格, 姚廷山. 柑桔全爪螨高致病力菌株芽枝状枝孢霉的生物学特性研究 [J]. 应用昆虫学报, 2016, 53(1): 22-29
- [18] Wang F, Xiang J, Hu JH, Li CF, Chen RN, Chen SJ, Qing YL, Qin SL. Biological characteristics and insecticidal activity of a high pathogenic strain of *Penicillium ochrochloron* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(4): 576-585 (in Chinese)  
王帆, 向剑, 胡军华, 李春峰, 陈若霓, 陈仕江, 卿玉玲, 秦少容. 一株高致病力赭绿青霉的生物学特性及杀虫活性 [J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(4): 576-585
- [19] Ding R, Zhang HQ, Chen XH, Lin H, Qu B. Identification and biological characteristics of one antagonistic fungal

- strain against *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(4): 174-178 (in Chinese)
- 丁锐, 张浩琪, 陈旭辉, 林浩, 曲波. 一株油菜菌核病拮抗真菌的鉴定及生物学特性研究[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(4): 174-178
- [20] Yang S, Liu HX, Fan WZ, Li XY, Xue YY. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Cytospora* spp.[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2019, 54(4): 100-106 (in Chinese)
- 杨树, 刘海霞, 范万泽, 李兴昱, 薛应钰. 苹果树腐烂病菌拮抗细菌筛选及鉴定[J]. *甘肃农业大学学报*, 2019, 54(4): 100-106
- [21] Wang B, Niu SQ, Da WY, Li HY, Hu JL, Zhao GJ. Screening of actinomycetes on antagonism to *Rhizoctonia solani* isolated from saline-alkali soils in Hexi Corridor[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2014(1): 156-160 (in Chinese)
- 王蓓, 牛世全, 达文燕, 李海云, 胡娇龙, 赵国杰. 河西走廊盐碱土壤中抗立枯丝核菌的放线菌筛选[J]. *生物技术通报*, 2014(1): 156-160
- [22] Lu JJ, Xia JF, Zhuang F, Xu R, Zeng TX, Li YH. Identification and biological characterization of mycoparasitic fungus *Clonostachys rosea* isolated from sawfly *Cephalcia chuxiongica*[J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(3): 622-631 (in Chinese)
- 芦俊佳, 夏举飞, 庄飞, 徐荣, 曾廷潇, 李永和. 楚雄腮扁叶蜂虫生真菌粉粘帚霉的鉴定及其生物学特性[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(3): 622-631
- [23] Zang R, Huang LL, Kang ZS, Wang XL. Biological characteristics and pathogenicity of different isolates of *Cytospora* spp. isolated from apple trees in Shaanxi Province[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37(4): 343-351 (in Chinese)
- 臧睿, 黄丽丽, 康振生, 王旭丽. 陕西苹果树腐烂病菌 (*Cytospora* spp.)不同分离株的生物学特性与致病性研究[J]. *植物病理学报*, 2007, 37(4): 343-351
- [24] Hao XJ. Study on antagonistic bacteria for biocontrol of the *Fusarium* wilt[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2006: 62 (in Chinese)
- 郝晓娟. 作物枯萎病生防细菌的研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2006: 62
- [25] Yin ZY, Liu HQ, Li ZP, Ke XW, Dou DL, Gao XN, Song N, Dai QQ, Wu YX, Xu JR, et al. Genome sequence of *Valsa* canker pathogens uncovers a potential adaptation of colonization of woody bark[J]. *The New Phytologist*, 2015, 208(4): 1202-1206
- [26] Li ZP, Gao XN, Kang ZS, Huang LL, Fan DY, Yan X, Kang ZS. *Saccharothrix yanglingensis* strain Hhs.015 is a promising biocontrol agent on apple *Valsa* canker[J]. *Plant Disease*, 2016, 100(2): 510-514
- [27] Deng ZS, Ma YR, He Y, Li C, Wang F, He XL, Zhao RH. Screening endophytic bacteria strains of anti-apple tree decay (*Valsa ceratosperma*) from apple trees and their control effect[J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36(4): 16-21 (in Chinese)
- 邓振山, 马亚茹, 何园, 李超, 汪飞, 贺晓龙, 赵瑞华. 苹果树内生菌筛选及其对苹果腐烂病防治效果[J]. *微生物学杂志*, 2016, 36(4): 16-21
- [28] Xue YY, Fan WZ, Zhang SW, Xu BL. Screening, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycetes against the pathogen of *Cytospora* sp. for apple tree[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(10): 3379-3386 (in Chinese)
- 薛应钰, 范万泽, 张树武, 徐秉良. 苹果树腐烂病菌拮抗放线菌的筛选、鉴定及防效[J]. *应用生态学报*, 2016, 27(10): 3379-3386