

研究报告

# 四株滇牡丹内生木霉的鉴定及促生抗病功能分析

张丽丽<sup>1</sup>, 巫雨蓝<sup>2</sup>, 钟秀玥<sup>2</sup>, 王俊威<sup>1</sup>, 王娟<sup>\*2</sup>, 潘悦<sup>\*2</sup>

1 西南林业大学 地理与生态旅游学院, 云南 昆明 650224

2 西南林业大学 林学院, 云南 昆明 650224

张丽丽, 巫雨蓝, 钟秀玥, 王俊威, 王娟, 潘悦. 四株滇牡丹内生木霉的鉴定及促生抗病功能分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2140-2155.

ZHANG Lili, WU Yulan, ZHONG Xiuyue, WANG Junwei, WANG Juan, PAN Yue. Identification and characterization of four endophytic *Trichoderma* strains capable of promoting plant growth and inhibiting plant pathogens from *Paeonia delavayi*[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2140-2155.

**摘要:**【背景】滇牡丹生长周期较长且容易受到多种病害侵染,亟待寻求安全、生态和高效的滇牡丹促生抗病新方法。【目的】鉴定4株滇牡丹优势内生木霉(*Trichoderma*)种类并开展促生抗病功能筛选,以确定具有促生抗病功能的潜力菌株。【方法】采用分子系统发育分析和形态学方法鉴定4株滇牡丹内生木霉种类,结合定性和定量方法测定4株木霉的溶磷、解钾、产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)和产铁载体活性,并采用平板对峙法测定4株木霉对滇牡丹主要病害病原真菌的抑制效果。【结果】4株滇牡丹内生木霉鉴定为装絮木霉(*Trichoderma tomentosum*)、东方木霉(*T. orientale*)、盖姆斯木霉(*T. gamsii*)和近渐绿木霉(*T. paraviridescens*)。促生抗病功能筛选的结果表明,*T. gamsii*具有溶磷能力,溶磷活性为14.89 mg/L, *T. gamsii*和*T. orientale*具有解钾能力,解钾活性分别为24.16 mg/L和26.32 mg/L。同时,*T. paraviridescens*和*T. orientale*具有固氮活性。另外,*T. gamsii*还具有产IAA和产铁载体能力,其产IAA能力为51.92 mg/L,铁载体含量为56.70%。此外,*T. gamsii*对滇牡丹3种主要病害病原真菌交链孢霉(*Alternaria alternata*)、刺盘孢菌(*Collectorichum sp.*)和枝孢菌(*Cladosporium sp.*)的抑制率分别为52.24%、44.23%和31.78%,显著高于其余3株木霉。【结论】4株滇牡丹内生木霉*T. tomentosum*、*T. orientale*、*T. gamsii*和*T. paraviridescens*均具有一定的促生或抗病功能,其中*T. gamsii*同时具有溶磷、解钾、产IAA、产铁载体和抗病能力,是理想的功能型潜力菌株。

**关键词:**滇牡丹; 内生木霉; 种类鉴定; 促生抗病

资助项目: 云南省农业联合专项(202101AK070265)

This work was supported by the Agricultural Joint Special Project of Yunnan Province (202101AK070265).

\*Corresponding authors. E-mail: WANG Juan, schima@163.com; PAN Yue, panyue96@163.com

Received: 2024-09-05; Accepted: 2024-11-16; Published online: 2024-12-23

# Identification and characterization of four endophytic *Trichoderma* strains capable of promoting plant growth and inhibiting plant pathogens from *Paeonia delavayi*

ZHANG Lili<sup>1</sup>, WU Yulan<sup>2</sup>, ZHONG Xiuyue<sup>2</sup>, WANG Junwei<sup>1</sup>, WANG Juan<sup>\*2</sup>, PAN Yue<sup>\*2</sup>

1 School of Geography and Ecotourism, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China

2 Forestry College, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China

**Abstract:** [Background] *Paeonia delavayi* has a long growth period and is susceptible to a variety of diseases. It is urgent to find a safe, eco-friendly, and efficient method for promoting the growth and enhancing the disease resistance of *P. delavayi*. [Objective] To identify four dominant endophytic *Trichoderma* strains of *P. delavayi* and examine their functions of promoting plant growth and inhibiting plant pathogens. [Methods] Molecular phylogenetic analysis and morphological observation were employed to identify the four endophytic *Trichoderma* strains from *P. delavayi*. Qualitative and quantitative methods were used to determine the phosphorus-solubilizing, potassium-solubilizing, indole-3-acetic acid (IAA)-producing, and siderophore-producing activities of the four strains. The plate confrontation method was employed to determine the inhibitory effects of the four strains on the main pathogenic fungi of *P. delavayi*. [Results] The four endophytic *Trichoderma* strains were identified as *T. tomentosum*, *T. orientale*, *T. gamsii*, and *T. paraviridescens*. *T. gamsii* had the ability to solubilize phosphorus, with the phosphorus-solubilizing activity of 14.89 mg/L. *T. gamsii* and *T. orientale* had the ability to solubilize potassium, with the potassium-solubilizing activities of 24.16 mg/L and 26.32 mg/L, respectively. *T. paraviridescens* and *T. orientale* had nitrogen-fixing activity. Furthermore, *T. gamsii* had the ability to produce IAA and siderophores, with the IAA production of 51.92 mg/L and the siderophore content of 56.70%. The inhibition rates of *T. gamsii* on *Alternaria alternata*, *Collectorichum* sp., and *Cladosporium* sp. were 52.24%, 44.23%, and 31.78%, respectively, which were significantly higher than those of the other three *Trichoderma* strains. [Conclusion] *T. tomentosum*, *T. orientale*, *T. gamsii*, and *T. paraviridescens* could promote plant growth and inhibit plant pathogens. Among them, *T. gamsii* had the abilities to solubilize phosphorus and potassium, produce IAA and siderophores, and inhibit plant pathogens, serving as an ideal functional potential strain.

**Keywords:** *Paeonia delavayi*; endophytic *Trichoderma*; species identification; promoting plant growth and inhibiting plant pathogens

滇牡丹 (*Paeonia delavayi*) 属芍药科 (*Paeoniaceae*) 芍药属 (*Paeonia*) 牡丹组 (sect. *Moutan*) 肉质花盘亚组 (subsect. *Delavayanae*)<sup>[1]</sup>, 是国家二级保护野生植物, 主要分布于滇西北至藏东南和川西南海拔 1 900–4 200 m 的山地<sup>[2]</sup>。滇牡丹的花色丰富, 种子富含多种不饱和脂肪

酸, 根皮可入药<sup>[3]</sup>, 是我国西南地区兼具观赏、油用和药用价值的特色植物资源。近年来, 云南省多地积极开展滇牡丹推广种植, 然而其生长周期较慢, 种子繁育需 3 年开花, 并且培育过程中容易受到黑斑病、红斑病和炭疽病等病害侵染, 严重降低植株的品质和产量。此外,

长期以来施用化学肥料和杀菌剂带来了土壤板结、植株抗药性增强以及农药残留等系列问题，因此，亟待寻求安全、生态和高效的滇牡丹促生抗病新途径。

植物内生真菌作为定殖在植物组织内部但不会引起寄主发生病害的真菌类群，一些种类与植物的营养摄取、生长发育以及免疫调节紧密相关<sup>[4]</sup>。前期研究表明，木霉(*Trichoderma*)是滇牡丹内生真菌的主要类群。木霉的一些种类不仅可产生植物生长调节剂促进寄主生长<sup>[5-6]</sup>，还能降低因外源植物调节剂浓度过高对寄主产生的抑制作用<sup>[7]</sup>。再者，一些木霉还能通过增加土壤中难溶化合物的溶解性以及微量营养元素的可利用性，提高植物对矿质元素的吸收<sup>[8]</sup>，例如，合成对铁有较强亲和力的铁载体，与不溶性Fe<sup>3+</sup>结合转化为可溶的Fe<sup>2+</sup><sup>[9]</sup>，将土壤中不溶或难溶的含磷或含钾化合物分解成植物可吸收的游离磷或游离钾<sup>[10]</sup>，以及将大气中的无机态氮固定为化合态氮供植物利用<sup>[11]</sup>等。此外，一些木霉种类能通过重寄生、抗生或诱导寄主系统抗性等方式对多种植物病原菌起到抑制作用<sup>[12]</sup>。然而，目前关于滇牡丹内生木霉的报道极少，仅见有限的关于根际木霉促生功能的研究<sup>[13]</sup>。

本研究对前期分离获得的4个滇牡丹内生木霉的代表菌株进行基于形态学和分子生物学的物种鉴定，并分别开展溶磷、解钾、固氮、产吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、产铁载体以及对滇牡丹主要病原真菌的拮抗能力的测定，以筛选具有促生抗病功能的潜力菌株，为滇牡丹促生抗病微生物菌剂的研发提供参考依据和数据支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

供试木霉菌株CGMCC 3.25645、CGMCC 3.27435和CGMCC 3.27436于2019年6月分离自云南省大理洱源县(E100°9', N26°6', 海拔2 670 m)野生滇牡丹植株根部，CGMCC 3.27438

于相同时期分离自云南省昆明嵩明县(E102°44', N25°12', 海拔2 025 m)野生滇牡丹植株根部，经DNA提取和ITS片段扩增、测序<sup>[13]</sup>，确定为木霉属菌株，上述菌株均保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心。病原指示菌交链孢霉(*Alternaria alternata*)、刺盘孢菌(*Collectorichum* sp.)和枝孢菌(*Cladosporium* sp.)于2021年从云南省滇牡丹主要种植基地黑斑病、红斑病和炭疽病的典型病叶上分离，经ITS鉴定和致病性检测，确定为导致其叶部主要病害的病原真菌<sup>[14]</sup>。

### 1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基和马铃薯葡萄糖液体(potato dextrose broth, PDB)培养基参考文献[15]配制，低营养琼脂(synthetic low nutrient agar, SNA)培养基和玉米葡萄糖琼脂(cornmeal dextrose agar, CMD)培养基参考文献[16]配制，溶磷培养基、解钾培养基和阿须贝培养基参考文献[17]配制。

### 1.3 主要试剂和仪器

Premix *Taq*, 昆明硕擎生物科技有限公司；铬天青(chrome azurol sulphonate, CAS)检测液，北京酷莱博科技有限公司；Salkowski 比色液，福州飞净生物科技有限公司。恒温培养箱，上海博讯医疗生物仪器股份有限公司；高速冷冻离心机，四川蜀科仪器有限公司；PCR扩增仪，耶拿分析仪器有限公司；凝胶电泳成像仪，Syngene公司；荧光正置显微镜，Olympus公司；恒温摇床，上海知楚仪器有限公司；紫外可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司。

### 1.4 滇牡丹内生木霉的种类鉴定

#### 1.4.1 分子生物学鉴定

供试木霉菌株采用尿素提取法提取DNA<sup>[18]</sup>，并进行*TEF1*和*RPB2*片段的PCR扩增，其中*TEF1*引物为EF1-728F(5'-CATCGAGAAGTTC GAGAAGG-3')和TEF1LLErev(5'-AACTTGCAG GCAATGTGG-3')，*RPB2*引物为f*RPB2*-5F [5'-GA(T/C)GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT (T/C)GG-3']和f*RPB2*-7cR [5'-CCCAT(A/G)GCTTG

(T/C)TT(A/G)CCCAT-3'。PCR 反应体系(25 μL): Taq Master Mix 12.5 μL, Primer F (10 μmol/L) 0.5 μL, Primer R (10 μmol/L) 0.5 μL, DNA 模板 (500 ng/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5 μL。*TEF1* 基因的 PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 95 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。*RPB2* 基因的 PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 95 °C 60 s, 50 °C 60 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经凝胶电泳检测合格后送昆明硕擎生物科技有限公司进行目的片段的双向测序。结果序列采用 CExpress 软件拼接校对后上传至 NCBI 进行比对, 选取相似度较高且已发表的菌株作为参考序列。参考序列与结果序列进行基于贝叶斯(Bayesian, BI)分析法和最大似然(maximum likelihood, ML)法的系统发育分析。经 jModelTest0.1.1 构建贝叶斯法最适模型。系统发育树使用 MrBayes 3.1.2、通过马尔科夫链蒙特卡洛(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)法构建。在最适模型下随机运行 500 万代, 每 1 000 代取样 1 次, 去除 25% 的最初结果, 并通过最终的贝叶斯系统发育树计算后验概率。最大似然法使用软件 RAxML 构建, 缺省参数通过 RAxML-HPC Black-box 进行选择, 靴带值重复计算 1 000 次<sup>[19]</sup>。

#### 1.4.2 形态学鉴定

菌株于 PDA 培养基 25 °C 黑暗培养 7 d, 用直径 1 cm 的灭菌打孔器取菌块分别转接至 PDA、SNA 和 CMD 培养基, 25 °C 黑暗培养 3 d, 观察菌落形态特征。待菌株在 SNA 培养基上产孢后, 挑取气生菌丝或孢状结构制作水玻片, 光学显微镜下观察菌株的分生孢子梗、瓶梗、分生孢子形态及着生方式, 每类结构测量 30 次。

### 1.5 滇牡丹内生木霉促生抗病功能筛选

#### 1.5.1 溶磷活性的测定

将供试菌株接种在 PDA 培养基上, 25 °C 黑暗培养 5–7 d, 用直径 7 mm 的灭菌打孔器取菌落边缘菌饼接种在溶磷培养基上, 25 °C 黑暗培养 3 d, 观察菌饼周围有无透明圈<sup>[20]</sup>, 每个处理重复 3 次。若出现透明圈, 表明菌株具有溶磷

活性, 进一步测定透明圈直径, 直径越大, 表明该菌的溶磷活性越强。选取具有溶磷活性的菌株, 通过钼锑抗比色法测定其溶磷活性<sup>[21]</sup>。

#### 1.5.2 解钾活性的测定

参照 1.5.1 的方法, 将供试菌株的菌饼接种在解钾培养基上, 25 °C 黑暗培养 3 d, 观察菌饼周围有无透明圈<sup>[20]</sup>, 每个处理重复 3 次。若出现透明圈, 表明菌株具有解钾活性, 进一步测定透明圈直径, 直径越大, 表明该菌的解钾活性越强。选取具有解钾活性的菌株, 通过四苯硼酸钠重量法测定其解钾活性<sup>[22]</sup>。

#### 1.5.3 固氮活性的测定

参照 1.5.1 的方法, 将供试菌株的菌饼接种在阿须贝培养基上, 28 °C 黑暗培养 3 d, 观察菌饼周围有无透明圈, 每个处理重复 3 次。若出现透明圈, 表明菌株具有固氮活性, 进一步测定透明圈直径, 直径越大, 表明该菌的固氮活性越强<sup>[23]</sup>。

#### 1.5.4 产 IAA 活性的测定

供试菌株活化后接种于 PDB 培养基上, 28 °C、180 r/min 振荡培养 12 d, 经无油真空泵抽滤菌丝后收集发酵液。发酵液与 Salkowski 比色液等量混合后静置 30 min, 根据显色结果确定菌株是否具有产 IAA 能力, 混合液颜色越深, 说明其产 IAA 能力越强, 不变色则说明菌株不具备产 IAA 能力<sup>[20]</sup>。采用沙尔科夫斯基反应检测初筛菌株的 IAA 含量<sup>[24]</sup>。

#### 1.5.5 产铁载体活性的测定

参照 1.5.4 的方法制备供试菌株的发酵液, 将发酵液与 CAS 检测液等比例混合, 静置 30 min, 以 CAS 检测液作为对照, 当混合液颜色变为红色或橙红色, 表示该菌具有产铁载体活性。将初筛菌株的发酵液于 180 r/min 离心 10 min, 取上清与 CAS 检测液等量混合, 同时也将未接菌的 PDB 培养基离心后的上清与 CAS 检测液等量混合, 避光静置 1 h, 分光光度计测定二者  $OD_{630}$  处吸光度值, 通过计算铁载体活性单位 (siderophore units, SU) 表示铁载体产量, 具体公式如下:

$$SU (\%) = [(A_r - A_s)/A_r] \times 100 \quad (1)$$

其中,  $A_r$  为未接菌液体培养基与 CAS 检测液混合后的吸光度值,  $A_s$  为真菌发酵液与 CAS 检测液混合后的吸光度值<sup>[25]</sup>。

### 1.5.6 拮抗功能筛选

分别将滇牡丹病原指示菌和供试木霉接种于 PDA 培养基上, 28 °C 黑暗培养 7 d, 用直径 5 mm 的灭菌打孔器分别取木霉和病原真菌菌饼, 对称置于 PDA 培养基两侧, 2 个菌饼相距 5 cm, 以仅接种相同直径的病原菌菌饼为对照, 28 °C 黑暗培养 7 d, 每个处理重复 3 次, 测量处理组和对照组中病原真菌的径向生长直径, 并按公式(2)计算抑制率(inhibition percentage, I):

$$I (\%) = (C_n / C_0) / C_n \times 100\% \quad (2)$$

其中,  $C_n$  为对照中病原真菌的径向生长直径,  $C_0$  为处理组中病原真菌的径向生长直径。

### 1.6 数据处理

不同木霉菌株对滇牡丹主要病原真菌的抑制率使用 SPSS25.0 进行单因素方差分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 四株滇牡丹内生木霉的种类鉴定结果

基于 TEF1 和 RPB2 基因片段构建的系统发育树显示(图 1), 4 株供试木霉分别位于不同的分类单元。其中, 菌株 CGMCC 3.27436 与装絮木霉(*Trichoderma tomentosum*) GZDS 1101、*T. tomentosum* GZDS 1102 和 *T. tomentosum* GZDS 1103, CGMCC 3.27438 与东方木霉(*Trichoderma orientale*) E225, CGMCC 3.27435 与近渐绿木霉(*Trichoderma paraviridescens*) S122、*T. paraviridescens* S16 和 *T. paraviridescens* S36 位于相同支系, 并且贝叶斯后验概率和最大似然靴带值均为 1.00 和 100%。此外, CGMCC 3.25645 与盖姆斯木霉(*Trichoderma gamsii*) CGMCC 3.23532 和 *T. gamsii* GJS 04.09 聚为一支, 贝叶斯后验概率和最大似然靴带值分别为 1.00 和 93%。

基于系统发育分析和菌落、微观形态观察(图 2 和表 1), 确定 CMGCC 3.27438、CMGCC

3.27436、CGMCC 3.25645、CMGCC 3.27435 这 4 株滇牡丹内生木霉分别为 *T. orientale*、*T. tomentosum*、*T. gamsii* 和 *T. paraviridescens*。

### 2.2 滇牡丹内生木霉的促生功能筛选结果

#### 2.2.1 溶磷活性测定结果

如图 3 所示, 经溶磷培养基检测, 4 株滇牡丹内生木霉中仅 *T. gamsii* (图 3A–3C) 在接菌点周围出现平均直径为(11±0.23) mm 的透明圈, 表明该菌具有溶磷活性。经定量检测, 其溶磷活性为(14.89±1.11) mg/L。

#### 2.2.2 解钾活性测定结果

经解钾培养基检测, 4 株滇牡丹内生木霉中 *T. gamsii* (图 4A–4C) 和 *T. orientale* (图 4D–4F) 在接菌点周围出现透明圈, 平均直径分别为(27±2.1) mm 和(26±1.4) mm, 经定量检测, 2 株菌的解钾活性分别为(24.16±1.51) mg/L 和(26.32±1.45) mg/L, 由此表明, *T. gamsii* 和 *T. orientale* 具有解钾活性, 且 *T. orientale* 的解钾能力较 *T. gamsii* 强(图 4)。

#### 2.2.3 固氮活性测定结果

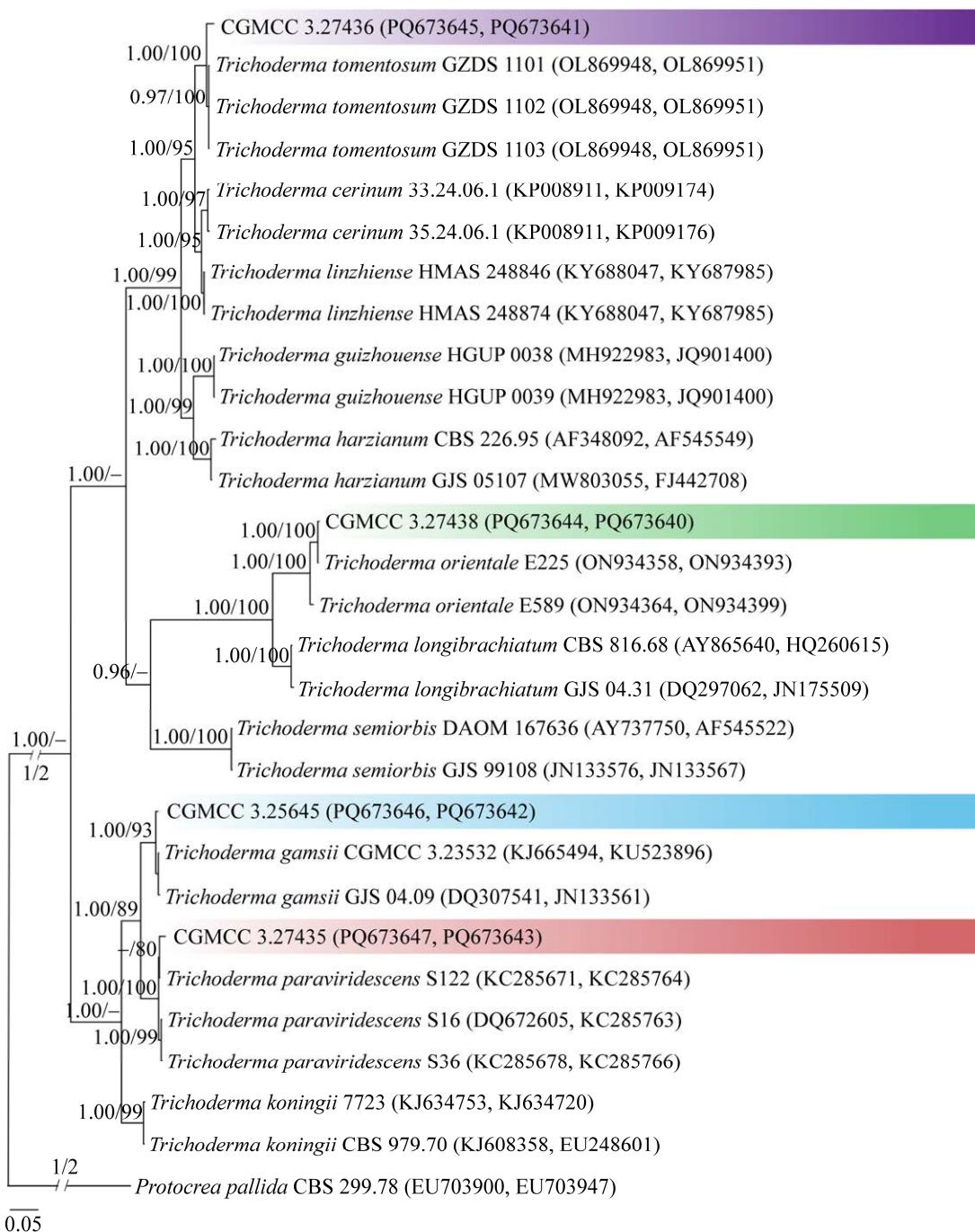
经阿须贝培养基检测, 4 株滇牡丹内生木霉中有 2 株在接菌点周围出现透明圈, 分别为 *T. paraviridescens* (图 5A–5C) 和 *T. orientale* (图 5D–5F), 产生的透明圈平均直径分别为(14±1.6) mm 和(13±1.3) mm, 由此表明, *T. paraviridescens* 和 *T. orientale* 具有固氮活性(图 5)。

#### 2.2.4 产 IAA 活性测定结果

如图 6 所示, 4 株滇牡丹内生木霉中仅 *T. gamsii* 的发酵液与 Salkowski 比色液混合的显色反应颜色变化呈粉红色。进一步检测 *T. gamsii* 发酵液的产 IAA 活性为(51.92±0.95) mg/L, 由此表明, *T. gamsii* 具有产 IAA 能力。

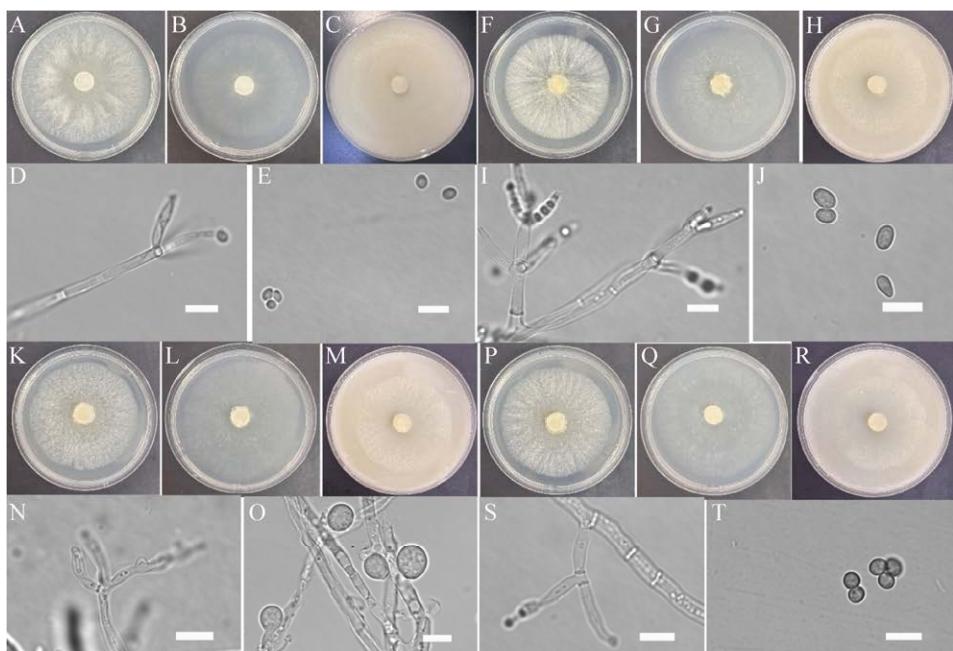
#### 2.2.5 产铁载体活性测定结果

四株滇牡丹内生木霉中, 仅 *T. gamsii* 的发酵液与 CAS 检测液混合的显色反应颜色变红。进一步开展定量检测, 显示 *T. gamsii* 的铁载体活性单位为(56.70±0.06)%, 表明该菌具备产铁载体的能力(图 7)。



**图 1 基于 *TEF1* 和 *RPB2* 联合基因的木霉真菌贝叶斯系统发育树** 图中括号内数值为菌株 *TEF1* 和 *RPB2* 基因的 GenBank 登录号；分支节点的标注为贝叶斯后验概率/最大似然靴带值(%)，贝叶斯后验概率<0.75 和最大似然靴带值<75%用“-”标识；标尺 0.05 代表序列的进化差异。

Figure 1 Bayesian phylogenetic tree of *Trichoderma* based on the combined *TEF1* and *RPB2* genes. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers of *TEF1* and *RPB2* genes of the strains. Branch nodes are Bayesian posterior probabilities/maximum likelihood bootstrap, Bayesian posterior probabilities <0.75 and maximum likelihood bootstrap<75% are recorded by “-”. The scale bar 0.05 represents sequence variance.



**图 2 四株滇牡丹内生木霉在不同培养基上的菌落和微观形态特征** A–E: 菌株 CGMCC 3.27438 在马铃薯葡萄糖琼脂、低营养琼脂培养基和玉米葡萄糖琼脂培养基上 25 °C 培养 3 d 的菌落形态、分生孢子梗和瓶梗及分生孢子。F–J: 菌株 CGMCC 3.27436 在 PDA、SNA 和 CMD 培养基上 25 °C 培养 3 d 的菌落形态、分生孢子梗和瓶梗及分生孢子。K–O: 菌株 CGMCC 3.25645 在 PDA、SNA 和 CMD 培养基上 25 °C 培养 3 d 的菌落形态、分生孢子梗和瓶梗及厚垣孢子。P–T: 菌株 CGMCC 3.27435 在 PDA、SNA 和 CMD 培养基上 25 °C 培养 3 d 的菌落形态、分生孢子梗和瓶梗及分生孢子。标尺: 5 μm。

Figure 2 Colony morphology and microscopic characteristics of four endophytic *Trichoderma* spp. on different media. A–E: Colony morphology, conidiophores, branches, phialides and conidia of strain CGMCC 3.27438 on potato dextrose agar (PDA), synthetic low nutrient agar (SNA) and cornmeal dextrose agar (CMD) at 25 °C for 3 days; F–J: Colony morphology, conidiophores, branches, phialides and conidia of strain CGMCC 3.27436 on PDA, SNA and CMD at 25 °C for 3 days. K–O: Colony morphology, conidiophores, branches, phialides and chlamydospore of strain CGMCC 3.25645 on PDA, SNA and CMD at 25 °C for 3 days. P–T: Colony morphology, conidiophores, branches, phialides and conidia of strain CGMCC 3.27435 on PDA, SNA and CMD at 25 °C for 3 days. Scale bars: 5 μm.

**表 1 四株滇牡丹内生木霉在不同培养基上的菌落和微观形态特征描述**

Table 1 Description of colony and microscopic morphology of four endophytic *Trichoderma* spp. on different media

菌株编号 Number of strain	马铃薯葡萄糖琼脂 Potato dextrose agar (PDA)	低营养琼脂培养基 Synthetic low nutrient agar (SNA)	玉米葡萄糖琼脂 Cornmeal dextrose agar (CMD)	微观形态 Microscopic morphology
CGMCC 3.27438	菌落圆形, 白色, 菌丝致密, 5 d 覆 盖平板(图 2A)	菌落圆形, 白色, 菌丝稀疏, 7 d 覆 盖平板(图 2B)	菌落圆形, 菌丝透 明, 7 d 覆盖平板 (图 2C)	分生孢子梗一级分枝产生单个瓶梗, 瓶梗圆柱形, 大小[(7.8)–8.1–9.4(–12.4)] μm× [(1.4)–1.6–2.2(–2.3)] μm, 长宽比 (3.9)–4.0–5.6(–5.7), 分生孢子卵形至椭圆形, 大小 [(1.8)–2.1–2.8(–2.9)] μm×[(1.4)–1.6–2.1(–2.3)] μm, 长 宽比(0.9)–1.0–1.5(–1.7) (图 2D–2E)
	Colonies circular, white, mycelium dense, covering the plate after 5 days (Figure 2A)	Colonies circular, white, mycelium sparse, covering the plate after 7 days (Figure 2B)	Colonies circular, mycelium hyaline, covering the plate after 7 days (Figure 2C)	

(待续)

(续表 1)

菌株编号 Number of strain	马铃薯葡萄糖琼脂 Potato dextrose agar (PDA)	低营养琼脂培养基 Synthetic low nutrient agar (SNA)	玉米葡萄糖琼脂 Cornmeal dextrose agar (CMD)	微观形态 Microscopic morphology
CGMCC 3.27436	菌落圆形, 菌丝白色, 5 d 覆盖平板 (图 2F) Colonies circular, mycelium white, covering the plate after 5 days (Figure 2F)	菌落浅黄色, 菌丝绒毛状, 7 d 覆盖平板(图 2G) Colonies light yellow, mycelium cottony, covering the plate after 7 days (Figure 2G)	菌落浅黄色, 菌丝稀疏, 7 d 覆盖平板(图 2H) Colonies light yellow, mycelium sparse, covering the plate after 7 days (Figure 2M)	Conidiophores primary branches tending to produce phialides singly. Phialides cylindrical, [(7.8–)8.1–9.4(–12.4)] $\mu\text{m} \times [(1.4–)1.6–2.2(–2.3)] \mu\text{m}, \text{length/width ratio } (3.9–)4.0–5.6(–5.7). \text{ Conidia oblong to ellipsoidal, } [(1.8–)2.1–2.8(–2.9)] \mu\text{m} \times [(1.4–)1.6–2.1(–2.3)] \mu\text{m, l/w ratio } (0.9–)1.0–1.5(–1.7) \text{ (Figure 2D–2E)}$ 分生孢子梗二级分枝呈树状, 瓶梗大多向上弯曲, 大小为[(4.5–)5.2–8.6(–11.5)] $\mu\text{m} \times [(1.3–)1.9–2.7(–3.0)] \mu\text{m, 长宽比 } (1.7–)2.4–5.4(–7.6), \text{ 分生孢子光滑, 椭圆至卵圆形, 大小为 } [(1.8–)2.5–3.2(–3.6)] \mu\text{m} \times [(1.2–)1.7–2.4(–3.0)] \mu\text{m, 长宽比 } (1.0–)1.2–1.5(–1.8) \text{ (图 2I–2J)}$ Conidiophores the secondary branches showing in a tree fashion. Phialides mostly curved upwards, [(4.5–)5.2–8.6(–11.5)] $\mu\text{m} \times [(1.3–)1.9–2.7(–3.0)] \mu\text{m, l/w ratio } (1.7–)2.4–5.4(–7.6). \text{ Conidia smooth, ellipsoidal to oblong, } [(1.8–)2.5–3.2(–3.6)] \mu\text{m} \times [(1.2–)1.7–2.4(–3.0)] \mu\text{m, length/width ratio } (1.0–)1.2–1.5(–1.8) \text{ (Figure 2I–2J)}$
CGMCC 3.25645	菌落白色, 菌丝致密, 7 d 覆盖平板 (图 2K) Colonies white, mycelium dense, covering the plate after 7 days (Figure 2K)	菌落白色, 7 d 覆盖平板(图 2L) Colonies white, mycelium covering the plate after 7 days (Figure 2L)	菌落白色, 菌丝稀疏, 7 d 覆盖平板 (图 2M) Colonies white, mycelium sparse, covering the plate after 7 days (Figure 2M)	分生孢子梗均匀分枝, 常见单生瓶梗, 瓶梗中部膨大, 大小为[(3.0–)6.5–7.5(–8.5)] $\mu\text{m} \times [(1.6–)1.8–2.0(–2.2)] \mu\text{m, 长宽比 } (3.5–)3.6–3.8(–5.3), \text{ 不产生明显的分生孢子, 厚垣孢子光滑, 球形或亚球形, 大小为 } [(4.4–)4.8–6.3(–7.8)] \mu\text{m} \times [(3.6–)4.1–5.2(–7.6)] \mu\text{m, 长宽比 } (0.8–)1.0–1.4(–1.8) \text{ (图 2N–2O)}$ Conidiophores uniformly branched, solitary phialides common, at most swollen in the middle, [(3.0–)6.5–7.5(–8.5)] $\mu\text{m} \times [(1.6–)1.8–2.0(–2.2)] \mu\text{m, l/w ratio } (3.5–)3.6–3.8(–5.3). \text{ Conidia often obscure, chlamydospores smooth, globose or subglobose, } [(4.4–)4.8–6.3(–7.8)] \mu\text{m} \times [(3.6–)4.1–5.2(–7.6)] \mu\text{m, length/width ratio } (0.8–)1.0–1.4(–1.8) \text{ (Figure 2N–2O)}$
CGMCC 3.27435	菌落白色, 菌丝致密, 翠状, 5 d 覆盖平板(图 2P) Colonies white, mycelium dense, cottony, covering the plate after 5 days (Figure 2P)	菌落白色, 菌丝稀疏, 7 d 覆盖平板 (图 2Q) Colonies white, mycelium sparse, covering the plate after 7 days (Figure 2Q)	菌落透明, 菌丝稀疏, 7 d 覆盖平板 (图 2R) Colonies hyaline, mycelium sparse, covering the plate after 7 days (Figure 2R)	分生孢子梗二级分枝呈树状对称, 瓶梗有时弯曲, 大小为[(7.1–)7.4–11.8(–12.9)] $\mu\text{m} \times [(1.6–)1.9–2.5(–2.8)] \mu\text{m, 长宽比 } (3.1–)3.8–5.9(–6.5), \text{ 分生孢子球形至近球形, 大小为 } [(2.0–)2.2–2.4(–3.0)] \mu\text{m} \times [(1.9–)2.1–2.5(–2.7)] \mu\text{m, 长宽比 } (0.8–)1.0–1.2(–1.4) \text{ (图 2S–2T)}$ Conidiophores the secondary branches generally paired in a tree fashion. Phialides sometimes curved, [(7.1–)7.4–11.8(–12.9)] $\mu\text{m} \times [(1.6–)1.9–2.5(–2.8)] \mu\text{m, l/w ratio } (3.1–)3.8–5.9(–6.5). \text{ Conidia globose or subglobose, } [(2.0–)2.2–2.4(–3.0)] \mu\text{m} \times [(1.9–)2.1–2.5(–2.7)] \mu\text{m, length/width ratio } (0.8–)1.0–1.2(–1.4) \text{ (Figure 2S–2T)}$

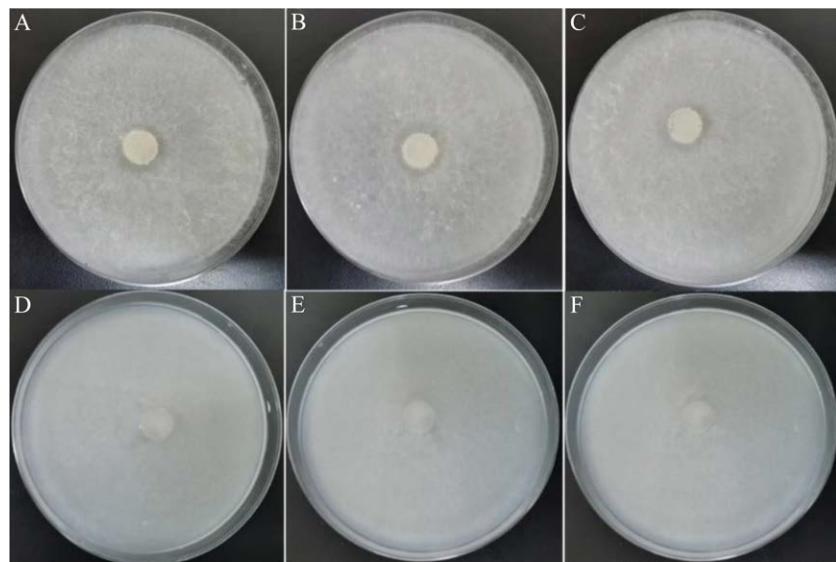


图 3 滇牡丹内生木霉的溶磷活性

Figure 3 Phosphorus-dissolving activity of endophytic *Trichoderma* from *Paeonia delavay*. A–C: *T. gamsii*; D–F: CK.

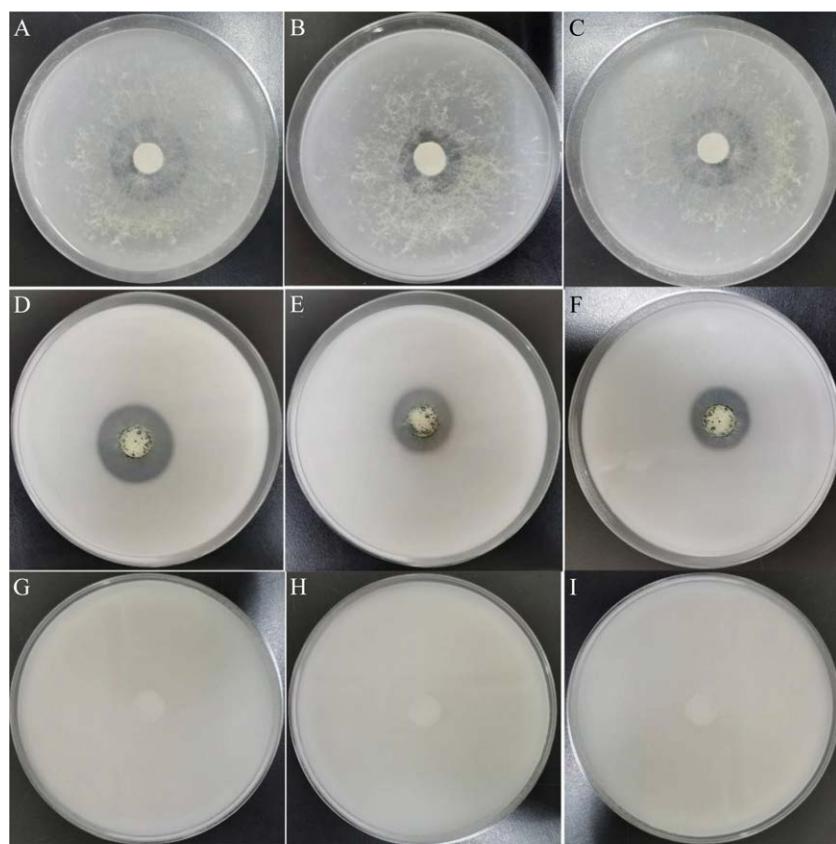


图 4 滇牡丹内生木霉的解钾活性

Figure 4 Potassium-solubilizing activity of endophytic *Trichoderma* from *Paeonia delavay*. A–C: *T. gamsii*; D–F: *T. orientale*; G–I: CK.

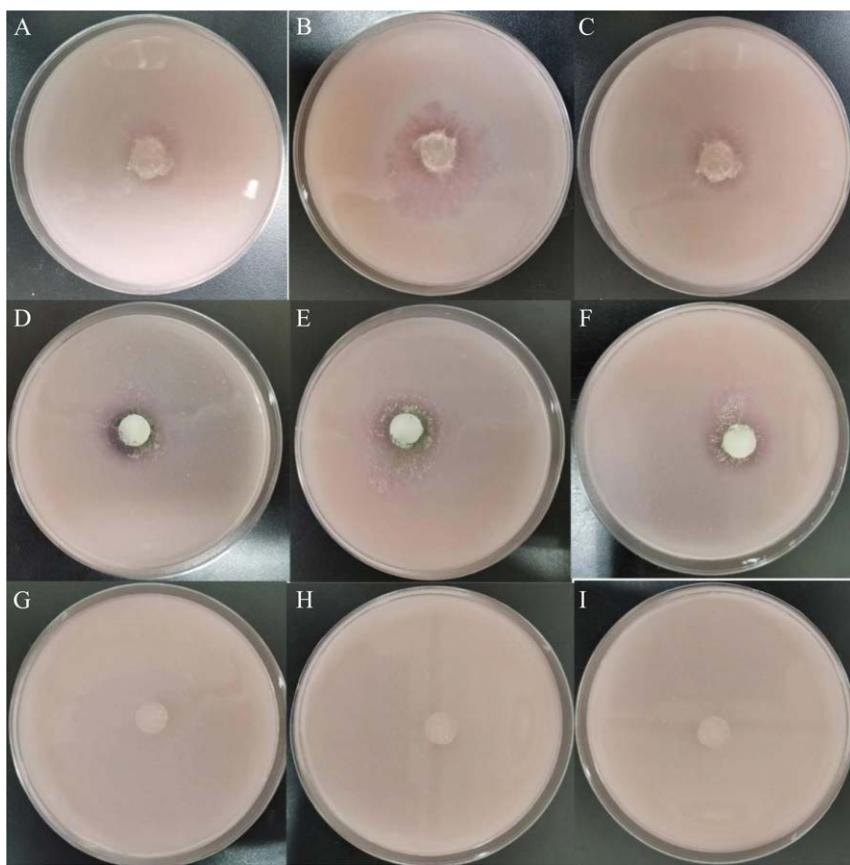


图 5 滇牡丹内生木霉的固氮活性

Figure 5 Nitrogen fixation activity of endophytic *Trichoderma* from *Paeonia delavay*. A–C: *T. paraviridescens*; D–F: *T. orientale*; G–I: CK.

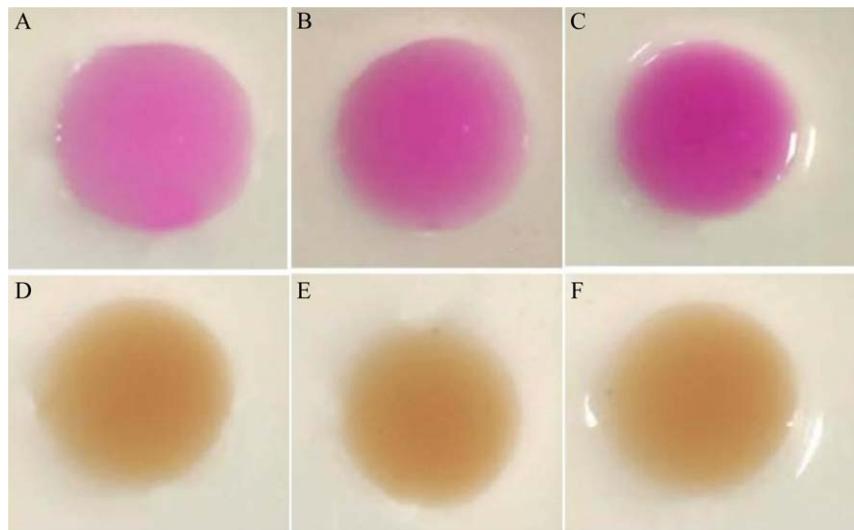


图 6 滇牡丹内生木霉产吲哚-3-乙酸活性 A–C: 盖姆斯木霉; D–F: CK (PDB 培养基)。

Figure 6 Indole-3-acetic acid (IAA) activity of endophytic *Trichoderma* from *Paeonia delavay*. A–C: *T. gamsii*; D–F: CK (PDB medium).

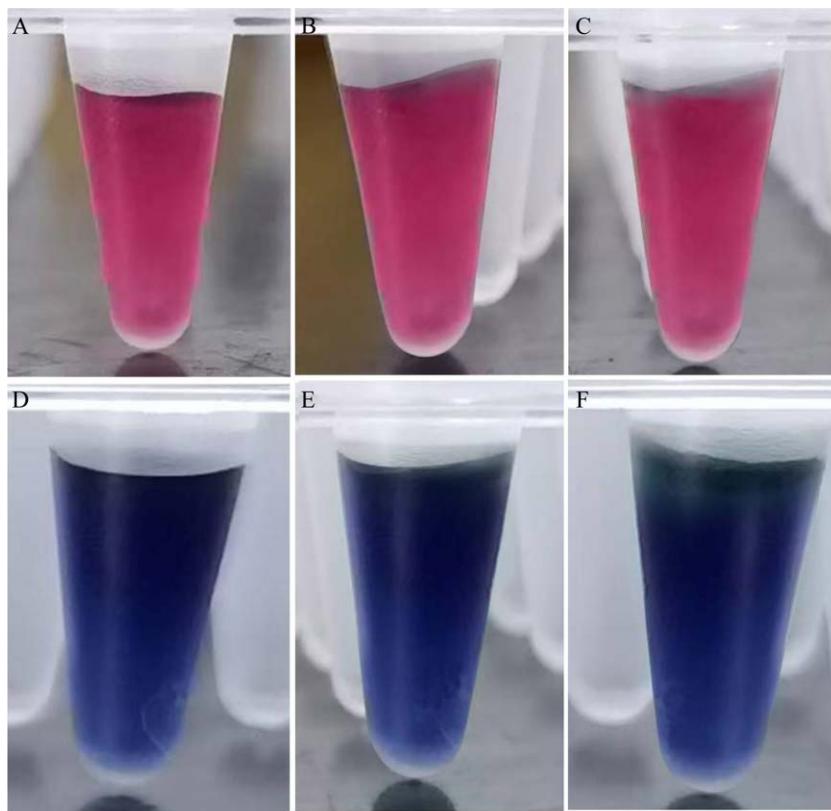


图 7 滇牡丹内生木霉产铁载体活性 A–C: 盖姆斯木霉; D–F: CK (CAS 检测液)。

Figure 7 Siderophore-producing ability of endophytic *Trichoderma* from *Paeonia delavayi*. A–C: *T. gamsii*; D–F: CK (CAS detection solution).

### 2.2.6 抗病能力

如表 2 和图 8 所示, *T. gamsii* 对 *Alternaria alternata*、*Collectorichum* sp. 和 *Cladosporium* sp. 的抑制率最高, 分别为 52.24%、44.23% 和 31.78%, 显著高于其余 3 株木霉。其次是 *T. orientale*, 对 *Collectorichum* sp. 和 *Cladosporium* sp. 的抑制率分别为 39.92% 和 29.21%, 再者 *T. tomentosum* 对 *Collectorichum* sp. 的抑制率为 39.92%, 但对 *A. alternata* 无明显抑制效果, 相反, *T. paraviridescens* 对 *A. alternata* 的抑制率为 23.8%, 但对 *Collectorichum* sp. 无明显抑制效果。由此表明, *T. gamsii* 对滇牡丹 3 种病害主要病原真菌的抑制效果最好。

## 3 讨论

本研究通过 *TEF1* 和 *RPB2* 这 2 个片段联合

构建供试木霉与近缘菌株的系统发育树, 表明 4 株供试木霉分别与装絮木霉(*T. tomentosum*)、东方木霉(*T. orientale*)、盖姆斯木霉(*T. gamsii*)和近渐绿木霉(*T. paraviridescens*)的已知序列位于同一分支, 并且贝叶斯后验概率和最大似然靴带值较高。同时, 结合参考菌株的分类学文献, 以及与供试菌株的菌落和微观形态特征进行比对<sup>[26–28]</sup>, 最终确定 4 株内生木霉为 *T. tomentosum*、*T. orientale*、*T. gamsii* 和 *T. paraviridescens*。

相关研究表明, 植物促生菌能通过促进营养元素迁移和活化根际养分等途径, 促进植物对矿质营养的吸收<sup>[29]</sup>。例如, 植物典型促生菌木霉的多个种类能溶解不同的磷酸盐以提高植物对磷养分的吸收<sup>[30]</sup>。本研究结果显示 *T. gamsii* 具有溶磷能力, 而 *T. paraviridescens* 无溶磷能力, 这与顾英杰等<sup>[13]</sup>报道发现滇牡丹根际木霉

表 2 滇牡丹内生真菌对病原真菌抑制率

Table 2 The inhibition rate of endophytic *Trichoderma* on pathogenic fungi of *Paeonia delavayi*

Strain	抑制率 Inhibitory rates (%)		
	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Collectorichum sp.</i>	<i>Cladosporium sp.</i>
<i>T. orientale</i>	15.32±1.22c	39.92±1.79b	29.21±1.06b
<i>T. gamsii</i>	52.24±0.71a	44.23±1.5a	31.78±1.68a
<i>T. tomentosum</i>	2.78±0.32d	39.92±1.78b	20.74±1.28c
<i>T. paraviridescens</i>	23.80±1.09b	4.31±0.4c	20.74±1.28c

表中数据为平均值±标准差, 不同小写字母表示不同内生木霉对同种病原真菌的抑制率在  $P<0.05$  水平差异显著。

Data are mean±SD, different lowercase letters indicate that the inhibition rates of different endophytic *Trichoderma* on the same pathogenic fungi are significantly different at  $P<0.05$ .

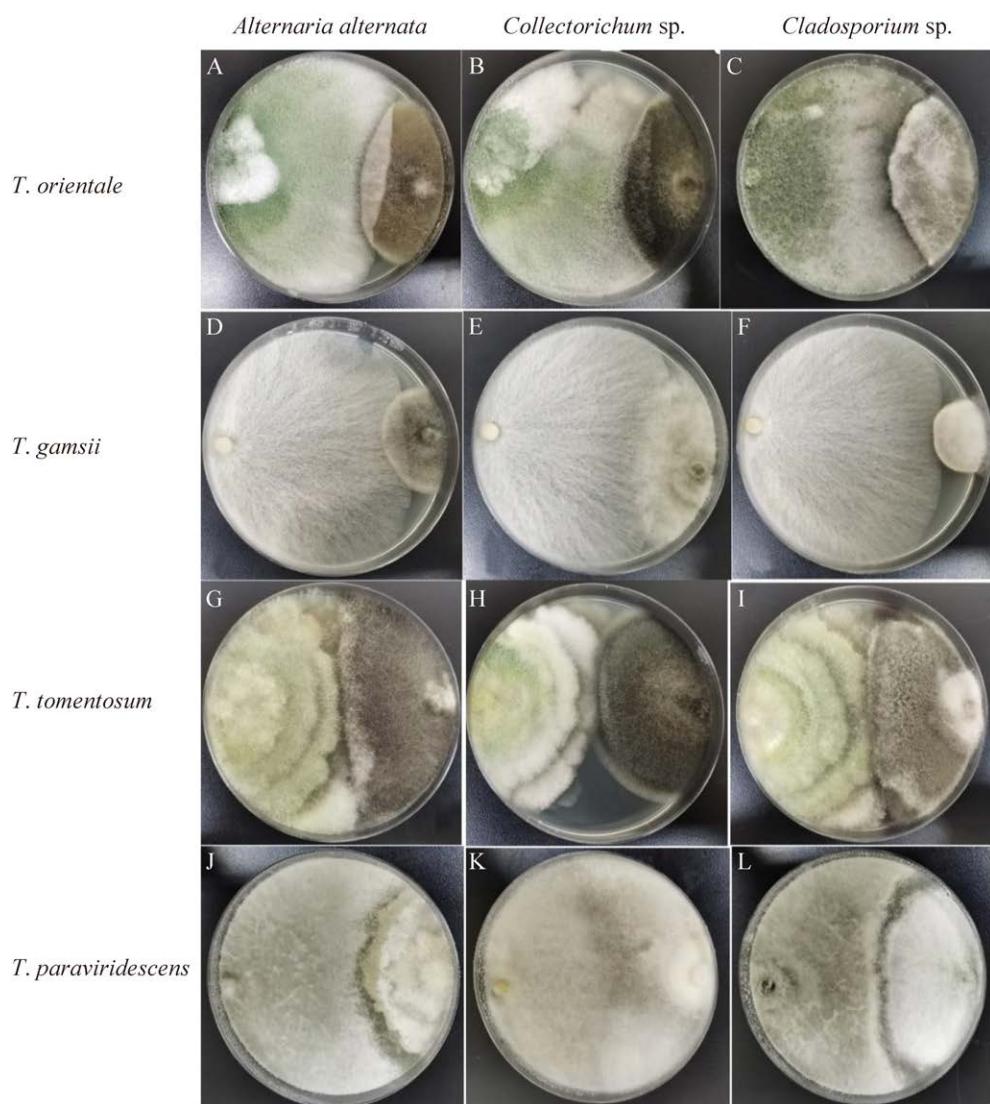


图 8 滇牡丹内生真菌对病原真菌拮抗图

Figure 8 The antagonistic diagram of endophytic *Trichoderma* on pathogenic fungi of *Paeonia delavayi*.

*T. paraviridescens* 无溶磷能力的结果相似。再者,木霉释放的有机酸例如柠檬酸、草酸和酒石酸等能溶解含钾矿物释放钾离子,提高植物对钾元素的吸收和利用<sup>[31]</sup>。本研究中 *T. gamsii* 和 *T. orientale* 具解钾能力,与王俊威等<sup>[6]</sup>研究发现蒜头果内生木霉 *T. gamsii* 具有较强的解钾能力结果相似。除上述种类外,相关报道显示,具有解钾活性的木霉菌还有拟康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)和康宁木霉(*Trichoderma koningii*)等<sup>[13,32]</sup>。本研究中 *T. paraviridescens* 和 *T. orientale* 具有固氮活性,但目前仅进行了定性测定,下一步还将通过凯氏法测定上述木霉的固氮能力<sup>[33]</sup>。一些木霉基因组中含有植物激素合成相关基因,调控生长素等的合成和分泌,并参与激活植物内源生长素的转运和信号转导<sup>[34]</sup>。目前已报道一些木霉主要通过色氨酸依赖途径即吲哚丙酮酸途径、吲哚乙酰胺途径、吲哚乙腈途径和色胺途径合成 IAA,其 IAA 生物合成中的关键基因涉及吲哚乙酰胺水解酶基因 *iaaH2*、腈水解酶基因 *nit1* 和 *nit2*,以及吲哚乙醛脱氢酶基因 *ald1* 和 *ald2*<sup>[35-36]</sup>。另外,一些木霉能产生铁载体,螯合土壤铁氢氧化物中的铁离子,以提高土壤中铁的有效性,尤其在缺铁条件下,木霉可分泌多种类型的铁载体,促进植物对的铁吸收<sup>[37]</sup>。本研究中 *T. gamsii* 同时具备产 IAA 和铁载体能力,这与王俊威等<sup>[6]</sup>和杨云天<sup>[38]</sup>的研究结果相似,而另一株滇牡丹内生木霉 *T. paraviridescens* 无产 IAA 和铁载体能力,也与顾英杰等<sup>[13]</sup>研究滇牡丹根际木霉的促生功能结果相符。

关于木霉的抗菌机制主要包括重寄生、抗生和诱导寄主抗性作用,在与病原菌的拮抗过程中,木霉与病原菌争夺空间和养分<sup>[39]</sup>,并分泌蛋白酶、脂肪酶和纤维素酶等多种细胞壁降解酶<sup>[40]</sup>,破坏、溶解病原菌细胞壁,同时产生对病原菌有抑制作用的次生代谢产物<sup>[41]</sup>。这一过程主要受细胞壁合成、能量代谢及抗菌化合

物的合成与分泌相关基因调控<sup>[42]</sup>。本研究中, *T. gamsii* 对滇牡丹黑斑病、红斑病和炭疽病病原真菌的抑制效果最好,相关研究表明,该菌对水稻立枯病病菌(*Rizoctonia solani*)、终极腐霉(*Pythium ultimum*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和棉花立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)均有抑制效果<sup>[43-44]</sup>,由此表明该菌具有广谱抗菌能力。本研究结果显示, *T. tomentosum* 和 *T. orientale* 对滇牡丹刺盘孢菌(*Collectorichum sp.*)和枝孢菌(*Cladosporium sp.*)有一定抑制作用,相关研究发现,上述 2 种木霉对西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*R. solani*)和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)也有抑制效果<sup>[45]</sup>。本研究中, *T. paraviridescens* 对滇牡丹 3 种病害病原真菌的抑制率较低,但另有研究结果表明该菌对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)抑菌率在 80%以上<sup>[46]</sup>,由此说明,不同木霉菌株对同种病原菌的抑制效果不同,同种木霉对不同病害的抑制效果也存在明显差异,因此,根据防治对象筛选抑菌效果理想的菌株是有效开展木霉防治的前提。

下一步将通过供试菌株接种滇牡丹种子和幼苗,测定木霉定殖对种子萌发和幼苗生长发育的影响及其对主要病害的抑制作用,结合木霉促生抗病功能筛选研究,进一步确定理想的促生抗病菌株,为滇牡丹微生物资源的开发利用奠定基础。

## 4 结论

本研究对 4 株滇牡丹内生真菌进行分子生物学和形态学鉴定,确定其种类为 *T. tomentosum*、*T. orientale*、*T. gamsii* 和 *T. paraviridescens*。通过开展促生抗病功能筛选研究,结果表明, *T. gamsii* 具有溶磷活性, *T. gamsii* 和 *T. orientale* 具有解钾活性, *T. paraviridescens* 和 *T. orientale* 具有固氮活性。同时, *T. gamsii* 还具有产 IAA 和产铁载体能力。此外, *T. gamsii* 对滇牡丹 3 种

病害病原真菌的抑制率均显著高于其余3株木霉。由此表明, *T. gamsii* 是具有较好促生抗病功能的潜力菌株。

### 作者贡献声明

张丽丽: 论文框架设计, 完成主体实验, 数据分析及论文撰写; 巫雨蓝、钟秀玥、王俊威: 参与实验数据收集; 王娟: 确定研究方向, 分配任务, 协调团队成员的工作; 潘悦: 实验和论文写作指导, 参与全文的审阅和修改, 把关数据和结论的准确性。

### 作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

### REFERENCES

- [1] 洪德元, 潘开玉. 芍药属牡丹组的分类历史和分类处理[J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 351-368.  
HONG DY, PAN KY. Classification history and treatment of *Paeonia* sect. *Moutan* (*Paeoniaceae*)[J]. Journal of Systematics and Evolution, 1999, 37(4): 351-368 (in Chinese).
- [2] ZHAO YJ, YIN GS, PAN YZ, TIAN B, GONG X. Climatic refugia and geographical isolation contribute to the speciation and genetic divergence in Himalayan-Hengduan tree peonies (*Paeonia delavayi* and *Paeonia ludlowii*)[J]. Frontiers in Genetics, 2021, 11: 595334.
- [3] 龙正莉, 杨立新, 杨蓉, 郎八一, 王娟. 牡丹组植物的药用民族植物学研究与考证[J]. 广西植物, 2021, 41(2): 308-317.  
LONG ZL, YANG LX, YANG R, LANG BY, WANG J. Medicinal ethnobotany research on *Paeonia* sect. *Moutan* through textual evidence[J]. Guihaia, 2021, 41(2): 308-317 (in Chinese).
- [4] OMACINI M, CHANETON EJ, GHERSA CM, MÜLLER CB. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs[J]. Nature, 2001, 409(6816): 78-81.
- [5] VINALE F, SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI EL, MARRA R, BARBETTI MJ, LI H, WOO SL, LORITO M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2008, 72(1/2/3): 80-86.
- [6] 王俊威, 雷小铃, 陈婉东, 潘悦, 王娟. 两株蒜头果内生木霉的物种鉴定及其对幼苗的促生作用研究[J]. 江西农业大学学报, 2023, 45(2): 273-284.  
WANG JW, LEI XL, CHEN WD, PAN Y, WANG J. Identification of two endophytic *Trichoderma* strains in *Malania oleifera* and their growth promoting effects on seedlings[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2023, 45(2): 273-284 (in Chinese).
- [7] MARRA R, AMBROSINO P, CARBONE V, VINALE F, WOO SL, RUOCCO M, CILIENTO R, LANZUISE S, FERRAIOLI S, SORIENTE I, GIGANTE S, TURRÀ D, FOGLIANO V, SCALA F, LORITO M. Study of the three-way interaction between *Trichoderma atroviride*, plant and fungal pathogens by using a proteomic approach[J]. Current Genetics, 2006, 50(5): 307-321.
- [8] MOHARAM MHA, NEGIM OO. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease in cucumber with improvement of growth and mineral uptake using some antagonistic formulations[J]. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences, 2012, 77(3): 53-63.
- [9] TYŚKIEWICZ R, NOWAK A, OZIMEK E, JAROSZUK-ŚCISEŁ J. *Trichoderma*: the current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(4): 2329.
- [10] 张文军. 油莎豆内生真菌分离鉴定及其促生性能与生防作用研究[D]. 喀什: 喀什大学硕士学位论文, 2024.  
ZHANG WJ. Isolation and identification of endophytic fungi from *Cyperus esculentus* L. and study on its growth-promoting performance and biocontrol effect[D]. Kashi: Master's Thesis of Kashi University, 2024 (in Chinese).
- [11] 杨刚. 麋子溶磷、固氮内生菌的筛选及应用效应分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2020.  
YANG G. Screening and application effect analysis of phosphorus-dissolving and nitrogen-fixing endophytes from broomcorn millet[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A & F University, 2020 (in Chinese).
- [12] KUMAR R, MUKHERJEE PK. *Trichoderma virens* Bys1 may competitively inhibit its own effector protein Alt a 1 to stabilize the symbiotic relationship with plant-evidence from docking and simulation studies[J]. 3 Biotech, 2021, 11(3): 144.
- [13] 顾英杰, 王娟, 杨贵钗, 陈婉东, 王俊威, 潘悦. 3种滇牡丹根际木霉的促生功能及其对幼苗生长的影响[J]. 南方农业学报, 2022, 53(9): 2487-2496.  
GU YJ, WANG J, YANG GC, CHEN WD, WANG JW, PAN Y. Growth promoting function of three *Trichoderma* species in *Paeonia delavayi* rhizosphere and their effects on seedling growth[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(9): 2487-2496 (in Chinese).
- [14] 潘悦, 杨贵钗, 陈婉东, 刘建福, 王俊威, 王娟. 云南省3个海拔区域滇牡丹主要叶部病害发生动态分析[J]. 植物保护, 2023, 49(6): 258-266.  
PAN Y, YANG GC, CHEN WD, LIU JF, WANG JW, WANG J. Occurrence dynamics analysis of main leaf disease of *Paeonia delavayi* in three altitude areas of Yunnan province[J]. Plant Protection, 2023, 49(6): 258-266.
- [15] 李亚航, 施艳娥, 巴顿, 丁卓, 崔浩楠. 不同pH值对黄瓜枯萎病致病菌生长影响的研究[J]. 东北农业科学, 2024, 49(5): 69-73.  
LI YH, SHI YE, BA D, DING Z, CUI HN. Study on the effect of different pH environments on the growth of

- cucumber *Fusarium* wilt pathogen[J]. Journal of Northeast Agricultural Sciences, 2024, 49(5): 69-73 (in Chinese).
- [16] 陈迪. 木霉菌资源收集、鉴定与多功能评价[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2021.
- CHEN D. Collection, identification and multifunctional evaluation of *Trichoderma*[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2021 (in Chinese).
- [17] 张琳, 余红凤, 毕钰, 王志刚, 徐伟慧, 刘桂琳. 辣椒根际促生菌的筛选及促生效应分析[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(9): 2124-2136.
- ZHANG L, YU HF, BI Y, WANG ZG, XU WH, LIU GL. Screening of rhizosphere growth-promoting bacteria of pepper (*Capsicum annuum*) and analysis of their beneficial effects[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2024, 32(9): 2124-2136 (in Chinese).
- [18] 杜兴. 水生植物内生木霉物种多样性及分化研究[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2019.
- DU X. Title study on diversity and differentiation of *Trichoderma* in aquatic plants[D]. Kunming: Master's Thesis of Yunnan University, 2019.
- [19] STAMATAKIS A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies[J]. Bioinformatics, 2014, 30(9): 1312-1313.
- [20] 罗阳兰. 蕙兰内生真菌多样性及其促生能力的研究[D]. 汉中: 陕西理工大学硕士学位论文, 2019.
- LUO YL. Study on diversity and growth-promoting ability of endophytic fungi in *Cymbidium hybridum*[D]. Hanzhong: Master's Thesis of Shaanxi University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [21] 刘睿, 段平梅, 公培龙, 姚晨之. 磷钼蓝比色法测定洗衣凝珠中总五氧化二磷含量不确定度评定[J]. 中国洗涤用品工业, 2023(4): 22-28.
- LIU R, DUAN PM, GONG PL, YAO CZ. Uncertainty evaluation of determination of total phosphorus pentoxide content in laundry condensation beads by phosphomolybdenum blue colorimetric method[J]. China Cleaning Industry, 2023(4): 22-28 (in Chinese).
- [22] 赵枝刚, 张淑琴. 四苯硼酸钠重量法测定光卤石中钾含量结果的不确定度[J]. 辽宁化工, 2016, 45(6): 834-836.
- ZHAO ZG, ZHANG SQ. Determination of the uncertainty in measuring potassium content in carnallite by sodium tetraphenylborate weight method[J]. Liaoning Chemical Industry, 2016, 45(6): 834-836 (in Chinese).
- [23] REED SC, CLEVELAND CC, TOWNSEND AR. Functional ecology of free-living nitrogen fixation: a contemporary perspective[J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2011, 42: 489-512.
- [24] GANG S, SHARMA S, SARAF M, BUCK M, SCHUMACHER J. Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the salkowski method[J]. Bio-protocol, 2019, 9(9): e3230.
- [25] MACHUCA A, MILAGRES AF. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(3): 177-181.
- [26] ZHENG H, QIAO M, LV YF, DU X, ZHANG KQ, YU ZF. New species of *Trichoderma* isolated as endophytes and saprobes from southwest China[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(6): 467.
- [27] JAKLITSCH WM, SAMUELS GJ, DODD SL, LU BS, DRUZHININA IS. *Hypocreaf rufa/Trichoderma viride*: a reassessment, and description of five closely related species with and without warty conidia[J]. Studies in Mycology, 2006, 56: 135-177.
- [28] JANG S, JANG Y, KIM CW, LEE H, HONG JH, HEO YM, LEE YM, LEE DW, LEE HB, KIM JJ. Five new records of soil-derived *Trichoderma* in Korea: *T. albolutescens*, *T. asperelloides*, *T. orientale*, *T. spirale*, and *T. tomentosum*[J]. Mycobiology, 2017, 45(1): 1-8.
- [29] 陈玉, 李宇聪, 刘妍, 付严松, 缪有志, 张瑞福. 植物益生木霉-根系互作机制及其信号物质筛选策略[J]. 植物营养与肥料学报, 2023, 29(10): 1923-1931.
- CHEN Y, LI YC, LIU Y, FU YS, MIAO YZ, ZHANG RF. Mechanism of beneficial *Trichoderma*-root interaction and the screening strategy for signals[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2023, 29(10): 1923-1931 (in Chinese).
- [30] BONONI L, CHIARAMONTE JB, PANSA CC, MOITINHO MA, MELO IS. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp. from Amazon soils improve soybean plant growth[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 2858.
- [31] HARMAN GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp[J]. Phytopathology, 2006, 96(2): 190-194.
- [32] 张曼曼, 邓春生, 马金奉, 张燕荣, 耿兵, 李顺鹏. 多功能木霉的筛选及鉴定[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(8): 1571-1575.
- ZHANG MM, DENG CS, MA JF, ZHANG YR, GENG B, LI SP. Screening and identification of multi-functional *Trichoderma* spp[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2012, 31(8): 1571-1575 (in Chinese).
- [33] 龚文坤, 伍巧慧, 王钢, 杨劲明, 吕荣婷, 王蓓蓓. 火龙果根际促生微生物筛选及其效应[J]. 热带生物学报, 2024, 15(5): 632-638.
- GONG WK, WU QH, WANG G, YANG JM, LÜ RT, WANG BB. Screening of microorganisms promoting rhizosphere growth in dragon fruit[J]. Journal of Tropical Biology, 2024, 15(5): 632-638 (in Chinese).
- [34] JAROSZUK-ŚCISEŁ J, TYŚKIEWICZ R, NOWAK A, OZIMEK E, MAJEWSKA M, HANAKA A, TYŚKIEWICZ K, PAWLIK A, JANUSZ G. Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase *in vitro* synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DEMTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(19): 4923.
- [35] LIU QM, TANG SY, MENG XH, ZHU H, ZHU YY, LIU DY, SHEN QR. Proteomic analysis demonstrates a molecular dialog between *Trichoderma guizhouense* NJAU 4742 and cucumber (*Cucumis sativus* L.) roots: role in promoting plant growth[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2021, 34(6): 631-644.
- [36] 刘秋梅, 陈兴, 孟晓慧, 叶奇, 李托, 刘东阳, 沈其荣. 新型木霉氨基酸有机肥研制及其对番茄的促生效果[J]. 应用生态学报, 2017, 28(10): 3314-3322.
- LIU QM, CHEN X, MENG XH, YE Q, LI T, LIU DY, SHEN QR. Development of a new type of biological organic fertilizer and its effect on the growth promotion

- of tomato[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2017, 28(10): 3314-3322 (in Chinese).
- [37] ZHAO L, WANG Y, KONG S. Effects of *Trichoderma asperellum* and its siderophores on endogenous auxin in *Arabidopsis thaliana* under iron-deficiency stress[J]. International Microbiology, 2020, 23(4): 501-509.
- [38] 杨云天. 微生物种衣剂对玉米防病、促生作用及其机制初步研究[D]. 林芝: 西藏农牧学院硕士学位论文, 2023.  
YANG YT. Preliminary study on the effect and mechanism of microbial seed coating agent on disease prevention and growth promotion of maize[D]. Nyingchi: Master's Thesis of Xizang Agriculture and Animal Husbandry University, 2023 (in Chinese).
- [39] BEDINE BOAT MA, SAMEZA ML, IACOMI B, TCHAMENI SN, BOYOM FF. Screening, identification and evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol potential of common bean damping-off pathogens[J]. Biocontrol Science and Technology, 2020, 30(3): 228-242.
- [40] 危潇, 曹春霞, 黄大野, 姚经武, 袁勤峰. 木霉菌生防作用机制及协同防病的研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2024, 26(11): 126-135.  
WEI X, CAO CX, HUANG DY, YAO JW, YUAN QF. Research progress on biocontrol mechanism and synergistic disease prevention of *Trichoderma*[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2024, 26(11): 126-135 (in Chinese).
- [41] REINO JL, GUERRERO RF, HERNÁNDEZ-GALÁN R, COLLADO IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*[J]. Phytochemistry Reviews, 2008, 7(1): 89-123.
- [42] HALIFU S, DENG X, SONG XS, SONG RQ, LIANG X. Inhibitory mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*[J]. Plants, 2020, 9(7): 912.
- [43] 梁忠接. 新疆盖姆斯木霉 TXJ-1B 的分离鉴定及其拮抗作用评价[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学硕士学位论文, 2014.  
LIANG ZJ. Isolation, identification and antagonism evaluation of *Trichoderma* TXJ-1B from games, Xinjiang[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [44] 赵晓燕, 陈凯, 吴晓青, 赵忠娟, 李纪顺, 杨合同. 耐盐木霉菌株的分离鉴定及其抗菌促生作用[C]//中国植物病理学会青年学术研讨会. 2015.  
ZHAO XY, CHEN K, WU XQ, ZHAO ZJ, LI JS, YANG HT. Isolation and identification of *Trichoderma* strain with salt tolerance and its antibacterial and growth-promoting effects[C]//Youth Symposium of China Society of Plant Pathology. 2015 (in Chinese).
- [45] 王金亮. 中国云贵川渝陕农田生态系统木霉多样性及其生防菌株的筛选[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2017.  
WANG JL. Diversity of *Trichoderma* spp. and screening of biocontrol strains in farmland ecosystem of Yunguichuan, Chongqing and Shaanxi in China[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2017 (in Chinese).
- [46] 王强强. 滩涂湿地木霉菌资源筛选、评价及应用技术研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2018.  
WANG QQ. Screening evaluation and application technology of *Trichoderma* resources collected from tidal-flat and wetland[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai Jiao Tong University, 2018 (in Chinese).