



研究报告

新疆野果林木霉分离鉴定、抑菌作用及固态发酵配方优化

田桢¹ 曹传旺¹ 季世达^{2,3} 刘斌^{1,2} 刘志华^{*1,2}

1 东北林业大学林学院 黑龙江 哈尔滨 150040

2 沈阳农业大学林学院 辽宁 沈阳 110866

3 中国科学院新疆生态与地理研究所 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要:【背景】新疆野苹果病害发生严重,而木霉(*Trichoderma* spp.)是重要的植物病害生防菌,因此可利用其对新疆野苹果病害进行防治。【目的】分离鉴定新疆野果林木霉菌株,分析其对新疆野苹果2种病原菌的抑菌能力,为新疆野苹果专用木霉菌肥的制备提供菌种资源。【方法】利用平板稀释法对新疆野果林4种草本植物根围木霉菌进行分离,通过形态学与分子生物学方法进行菌种鉴定,平板对峙试验检测其抑菌能力并优化木霉菌株的固态发酵配方。【结果】共分离得到2种木霉菌共42株,分别为34株棘孢木霉(*T. asperellum*)和8株深绿木霉(*T. atroviride*);棘孢木霉 TasT01 对苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*, Cgl)和苹果斑点落叶病原菌(*Alternaria alternaria* f. sp. *mali*, Aal)的抑菌率分别为58.60%和57.14%;深绿木霉 TatT35 对 Cgl 和 Aal 的抑菌率分别为43.86%和36.90%。进一步显微镜观察发现, TasT01 可通过菌丝缠绕的方式抑制2种病原菌的生长。TatT35 菌株固态发酵配方为稻壳90%、麦麸10%、(NH₄)₂SO₄ 0.5%时,孢子浓度达1.0×10⁸个/g。【结论】TasT01 和 TatT35 对新疆野苹果2种病原菌都有很好的抑制效果,固态发酵配方优化后可以提高孢子浓度,该研究结果为新疆野苹果真菌病害的生物防治提供了可借鉴的方法。

关键词: 木霉菌, 新疆野苹果, 分离, 鉴定, 抑菌能力, 固态发酵

Isolation and identification of *Trichoderma* strains, and antifungal effects and solid-state fermentation recipe optimization from Xinjiang wild fruit forest

TIAN Zhen¹ CAO Chuanwang¹ JI Shida^{2,3} LIU Bin^{1,2} LIU Zhihua^{*1,2}

1 College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China

2 College of Forestry, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866, China

3 Xinjiang Institute of Ecology and Geography, Chinese Academy of Sciences, Urumqi, Xinjiang 830011, China

Abstract: [Background] The Xinjiang wild apple are suffering serious diseases, and *Trichoderma* is an important plant disease biocontrol fungus, so it can be used to prevent and control wild apple diseases in Xinjiang. [Objective] In order to isolate and identify the *Trichoderma* isolates from wild fruit forests in

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2016YFC0501505); National Natural Science Foundation of China (31870627)

*Corresponding author: E-mail: LZHNEFU@126.com

Received: 10-05-2021; Accepted: 01-06-2021; Published online: 22-07-2021

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC0501505); 国家自然科学基金面上项目(31870627)

*通信作者: E-mail: LZHNEFU@126.com

收稿日期: 2021-05-10; 接受日期: 2021-06-01; 网络首发日期: 2021-07-22

Xinjiang, determine their antifungal ability against two pathogens of wild apples (*Malus sieversii*), and provide the biocontrol fungal resources for the preparation of “Special *Trichoderma* Biofertilizer for Xinjiang wild apple”. [Methods] *Trichoderma* strains were isolated by plate dilution method from the rhizosphere of 4 herbaceous plants in Xinjiang wild fruit forest. Species identification was performed by morphology and molecular biology, and the antifungal ability of *Trichoderma* isolates was tested by plate confrontation tests, and the solid-state fermentation formula of *Trichoderma* strains was optimized. [Results] The results show that 2 *Trichoderma* species (total 42 strains) were isolated, including 34 *T. asperellum* isolates and 8 *T. atroviride* isolates. The inhibitory rates of *T. asperellum* T01 (TasT01) against *Colletotrichum gloeosporioides* (Cgl) and *Alternaria alternaria* f. sp. *mali* (Aal) were 58.60% and 57.14%, respectively; and the inhibitory rates of *T. atroviride* (TatT35) to Cgl and Aal were 43.86% and 36.90%, respectively. Further microscopic observation showed that TasT01 could inhibit the growth of both pathogens through hypha coiling. The solid-state fermentation formula of TatT35 strain was 90% rice husk, 10% wheat bran, 0.5% (NH₄)₂SO₄. And the spore concentration could reach 1.0×10⁸/g spores. [Conclusion] TasT01 and TatT35 have good inhibitory effects on the two pathogens of Xinjiang wild apple, and the spore concentration significantly increased after the solid-state fermentation formula was optimized. The results provide a reference for biological control of fungal diseases of Xinjiang wild apple.

Keywords: *Trichoderma*, Xinjiang wild apple, isolation, identification, antifungal ability, solid state fermentation

新疆野苹果(塞威士苹果 *Malus sieversii*)为蔷薇科苹果属乔木,是第三纪孑遗物种,被认为是现代栽培苹果的始祖^[1]。新疆野苹果种群是重要天然种质基因库,在长期进化过程中积累了许多与抗逆相关的优良基因^[2]。近年来由于人为活动及病虫害的发生,伊犁野果林已由1959年的93.30 km²减少到1998年的33–40 km²,甚至新源等地的一些野果林已被山地草原所取代^[3]。现今由于受到苹果小吉丁虫(*Agrilus mali*)的影响,苹果腐烂病发生情况逐年加重^[4],新疆野苹果树病害还有苹果白粉病(*Podosphaera leucotricha*)、苹果黑星病(*Venturia inaequalis*)及苹果褐斑病(*Marssonina maii*)等^[5]。

木霉(*Trichoderma* spp.)是在植物病害生物防治中研究和应用得非常广泛的一类生防真菌,是全球范围内广泛分布的真菌之一,可存在于土壤和各种环境中,在土壤中分布尤多,因此常被认为是土壤习居真菌^[6]。木霉对苹果(*Malus domestica*)真菌病害的防治机制已经得到了广泛的研究。木霉能直接抑制苹果病原菌生长,也可以通过重寄生方式间接抑制病原菌生长,例如木霉对引起苹果霉心病的病原菌粉红单端孢(*Trichothecium roseum*)、砖红镰

刀菌(*Fusarium lateritium*)、苹果链格孢(*Alternaria mali*)^[7]和引起苹果采后青霉病的病原菌扩展青霉P1 (*Penicillium expansum* P1)^[8]及引起苹果树腐烂病的病原菌(*Valsa ceratosperma*)均有抑制作用^[9];哈茨木霉(*T. harzianum*) T88 菌株和深绿木霉(*T. atroviride*) T95 菌株对苹果树腐烂病病原菌 [*V. ceratosperma* (Tode et Fr.)M 菌株具有重寄生作用,最终使病原菌的菌丝细胞原生质浓缩、菌丝断裂等^[10]。木霉的代谢产物对苹果病原菌同样有抑制作用,例如长枝木霉(*T. longibrachiatum*) T6 发酵液粗提物对苹果腐烂病病原菌 (*Valsa mali*)和苹果斑点落叶病病原菌的菌丝生长具有较强的抑制作用,其抑制率分别为100%和93.32%^[11]。木霉菌 Td 系列菌株代谢产物的室内抑菌谱研究发现,Td31 的代谢产物对苹果轮纹病菌 (*Physalospora piricol*)和苹果炭疽病菌 (*Gloeosporium fructigenum*)的抑制作用最强^[12]。同时,木霉还可以与其他杀菌剂联合使用来防治苹果病害,中生菌素2000倍和木霉菌 T2 复配对苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria dothidea*) LW182 菌株抑制的增效作用最高,48 h 增效比为1.23,72 h 增效比为1.36^[13]。木霉 T₄₂ 与枯草芽胞杆菌

(*Bacillus subtilis*) B_S-6、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) PS-1 组成的复合生物制剂可有效抑制苹果轮纹病菌(*P. piricol*)的生长,田间试验表明,复合制剂防治苹果轮纹病的相对防效为 84.2%,与波尔多液交替喷施的防效与化学农药无显著差异,并可增加百果鲜重,用以浸果可以减少贮存期苹果烂果病的发生^[14]。

木霉是一种表现良好的生态生防因子,我们对新疆野果林土壤木霉菌进行分离鉴定并研究其生防效果,可以为新疆野苹果病害防治提供科学指导,也可以改善野苹果树根围土壤的生态环境,保护其优质的种质资源。试验首先采用孟加拉红平板稀释法对野果林草本植物根围土壤中木霉菌株进行分离,并结合形态学方法与分子生物学方法对木霉菌株进行鉴定;然后通过木霉菌株与苹果胶孢炭疽(*Colletotrichum gloeosporioides*)、苹果斑点落叶病病原菌(*A. alternate* f. sp. *mali*)的平板对峙试验进行拮抗菌株筛选和生防潜力测定;最后优化木霉菌株的固态发酵配方,以期新疆野苹果病害生物防治提供优质生防菌资源。

1 材料与方法

1.1 土壤样品

土壤样品于 2017 年 5 月采集自新疆伊犁新源县野果林(北纬 N43°22'38.14", 东经 E83°34'6.42")中的狭叶荨麻(*Urtica angustifolia*)、杨铁叶(*Rumex patientia*)、车前(*Plantago asiatica*)和蒲公英(*Taraxacum mongolicum*)这 4 种植物的根围土壤(表 1)。

1.2 木霉菌的分离及纯化

分离方法参考周畅等^[15]的实验方法,采用孟加拉红平板分离法分离木霉菌菌株。取 5 g 土样溶

于 45 mL 的无菌水中制成浓度为 10^{-1} 的土壤悬浮液,依次将其稀释成浓度为 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 的悬浮液。将孟加拉红培养基倒入培养皿中,放置冷却凝固后各取 200 μ L 土壤悬浮液用灭菌的涂布器涂布。每个浓度设置 5 个重复,同时设置灭菌水涂布和干涂布 2 个对照,放进 28 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养。木霉菌株在孟加拉红培养基上生长 3 d 后,将其分别转接到 PDA 斜面培养基上进行单株培养,观察接种好的木霉菌株的生长情况并进行菌株统计。将所有分离的木霉菌株进行编号,将每株木霉转接 3 个试管斜面于 28 $^{\circ}$ C 扩大培养,待其长满整个平面后,用无菌水制作孢子悬浮液,然后进行甘油保存。

1.3 木霉分离株形态与分子鉴定

鉴定方法同样参考周畅等^[15]的实验方法,按照 Gams&Bissett 分类系统进行形态鉴定。利用光学显微镜及扫描电镜观察分生孢子梗及分生孢子形态。将待观察的木霉菌株接种到 PDA 平板上,在 28 $^{\circ}$ C 下培养 72 h,待菌落长满整个平板,观察菌落特征记录并拍照保存。此外,取少量菌丝制成临时玻片,棉兰染色后利用光学显微镜观察分生孢子梗和分生孢子的特征,记录拍照存档。在培养的 PDA 平板上切取 1 cm \times 1 cm \times 0.2 cm 的带菌丝的小块,干燥后利用扫描电镜进行观察。

基于木霉的 ITS 4/5、*tefl* 和 *rpb2* 序列分别构建系统发育树,在分子生物学水平上进行鉴定^[16]。首先将木霉接种到 PDA 培养基上,用接种环将菌丝体挑入 PDB 液体培养基中于 28 $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 48 h,用 8 层纱布过滤得到菌丝体,冷冻备用。利用真菌 DNA 提取试剂盒提取木霉菌丝体 DNA。以此为模板进行序列扩增。采用引物

表 1 新疆野果林土壤样品的采集

Table 1 Collection of soil samples from Xinjiang wild fruit forests

植物名称 Plant name	坡向 Aspect	海拔 Altitude (km)	取样土层深度 Sampled soil depth (cm)
狭叶荨麻 <i>U. angustifolia</i>	东 East	1 420	<25
杨铁叶 <i>R. patientia</i>	东 East	1 420	<25
车前 <i>P. asiatica</i>	东 East	1 420	<25
蒲公英 <i>T. mongolicum</i>	东 East	1 420	<25

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')扩增 ITS 序列、引物 EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAG AAGG-3')和 tef1LLErev (5'-AACTTGCAGGCAAT GTGG-3')扩增 *tefl* 序列、引物 frpb2-5f [5'-GA(T/C) GA(T/C)(A/C)G(A/T)GATCA(T/C)TT(T/C)GG-3'] 和 frpb2-7cr [5'-CCCAT(A/G)GCTTG(T/C)TT(A/G) CCCAT-3']扩增 *rpb2* 序列^[16]。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。1%的琼脂糖凝胶电泳检测后使用 Promega 胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化, 然后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

将测序结果使用上海交通大学木霉菌菌种保藏管理中心 MMIT 系统^[16] (网址: <http://mmit.china-cctc.org/>)中工具进行比对, 最终确定木霉种类。从 NCBI 下载获得同种木霉的 ITS、*tefl* 和 *rpb2* 序列, 使用 MEGA X 中最大似然法(Maximum Likelihood Method, ML)构建系统发育树。

1.4 木霉菌对苹果病原菌抑菌能力测定

苹果炭疽病病原菌胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)与苹果斑点落叶病病原菌链格孢菌(*A. alternata* f. *sp. mali*)为本实验室保存。

用灭过菌的打孔器分别取直径 0.6 cm 棘孢木霉 TasT01、深绿木霉 TatT35、病原菌胶孢炭疽菌、链格孢菌的菌饼, 在距 PDA 平板边缘约 2 cm 的相对应的 2 点上分别接种木霉菌饼和病原菌菌饼, 2 种木霉的菌饼分别与 2 种病原菌菌饼进行平板对峙, 以单独接入病原菌的平板为对照。密封并置于 28 °C 培养箱中培养, 在第 1-6 天记录对峙条件下病原菌菌落的生长半径和非对峙条件下对照菌落生长半径。每组试验 3 个重复。抑菌率(%)=(单独培养菌落半径-对峙菌落半径)/单独培养菌落半径×100^[17]。木霉菌株对病原菌的拮抗系数采用 5 级分级标准^[18]。I 级: 木霉菌丝体占据平皿 100%; II 级: 木霉菌丝占据平皿>2/3; III 级: 1/3<木霉菌

丝占据平皿<2/3; IV 级: 木霉菌丝占据平皿<1/3; V 级: 病原菌占据平皿 100%。

在光学显微镜下观察上述对峙培养条件下木霉与胶孢炭疽菌、苹果斑点落叶病病原菌菌落相交处的菌丝体, 观察二者的平行生长及缠绕情况, 从而明确木霉与病原菌的互作方式。

1.5 深绿木霉 T35 固态发酵配方优化

在实验室木霉发酵专利“一种小规模木霉菌固态发酵方法”的基础上^[19], 对深绿木霉 T35 菌株的发酵配方进行优化。分别从不同稻壳麦麸含量比和 (NH₄)₂SO₄ 含量 2 个方面进行配方优化。首先设定 (NH₄)₂SO₄ 含量 0.5%和含水量 300%不变, 按照稻壳:麦麸质量比为 80:20、85:15、90:10 这 3 个梯度配制发酵料; 然后设定发酵料中稻壳含量 90%、麦麸含量 10%和含水量 300%不变, 按照 (NH₄)₂SO₄ 含量 0.5%、0.3%、0.1%这 3 个梯度配制发酵料, 每包灭菌袋中装入发酵料 150 g, 搅拌均匀后 1×10⁵ Pa 灭菌 2 h, 将袋中的发酵料倒入无菌托盘中均匀平铺, 在每个托盘中倒入浓度为 10⁶ 个孢子/mL 的深绿木霉孢子悬浮液 5 mL, 混合均匀, 在 28 °C 培养 5 d, 然后使其慢慢干燥。之后用血球计数板计算孢子悬浮液中孢子个数, 重复 3 次取平均值。

2 结果与分析

2.1 木霉的分离

在狭叶荨麻(*U. angustifolia*)、杨铁叶(*R. patientia*)、车前(*P. asiatica*)和蒲公英(*T. mongolicum*)这 4 种植物根围分别分离出 11、5、9、17 株木霉, 共 42 株(表 2), 其中棘孢木霉 34 株、深绿木霉 8 株, 棘孢木霉在不同植物根围均有分布, 而且数量多于深绿木霉。

2.2 形态鉴定

通过对孢子颜色、是否产色素和产孢簇特征观察, 将 42 株(T01-T42)木霉分为 2 组, 从每组中选择 1 株接种于 PDA 平板培养基观察菌落生长状况; 通过使用光学显微镜及扫描电镜观察木霉的分生孢子梗和分生孢子的特征鉴定木霉种类。

表 2 木霉的种类和数量

Table 2 Species and number of *Trichoderma*

植物种类 Plant species	编号 No.	木霉种类 <i>Trichoderma</i> species	木霉菌株数目 Numbers of <i>Trichoderma</i> strains	木霉总菌株数目 Total numbers of <i>Trichoderma</i> strains
狭叶荨麻 <i>U. angustifolia</i>	T01-T11	棘孢木霉 <i>T. asperellum</i>	11	11
杨铁叶 <i>R. patientia</i>	T12-T16	棘孢木霉 <i>T. asperellum</i>	5	5
车前 <i>P. asiatica</i>	T35-T42	深绿木霉 <i>T. atroviride</i>	8	9
	T17	棘孢木霉 <i>T. asperellum</i>	1	
蒲公英 <i>T. mongolicum</i>	T18-T34	棘孢木霉 <i>T. asperellum</i>	17	17

T01 分离株在 PDA 培养基上 28 °C 培养 5 d 后木霉菌落铺满整个平面, 由密集的分生孢子构成, 接近中部的位置为黑绿色的分生孢子, 不产生气生菌丝, 无扩散性色素, 无明显气味(图1A)。在光学显微镜下观察发现分生孢子梗主轴顶端下面产生的初次分枝常呈对生, 与主轴的夹角近 90°, 瓶梗一般生长在分枝的顶部, 瓶梗为安瓿形, 只是在中间部位略微变粗, 基部稍微有缢缩, 瓶梗 2-3 轮生(图 1B、1C)。分生孢子绿色, 球形至亚球形(图1D)。电镜下 T01 形态特征与光学显微镜下基本一致, 更形象具体, 分生孢子表面有明显的疣突纹饰(图1E), 形态鉴定初步判断为棘孢木霉。

T35 分离株在 PDA 培养基上 28 °C 培养 5 d 后长满整个平板, 木霉菌落形成清晰的边界(图 1F)。无扩散性色素, 有甜味。在光学显微镜下观察发现分生孢子梗常呈对生, 分枝角度近似 90°; 初级分生孢子梗离主轴顶端越远则越长, 分枝结构呈金字塔形。瓶梗一般 2-4 个轮生, 最顶端瓶梗一般为圆柱形, 只在尖端下部缢缩, 像细颈状; 瓶梗的下部烧瓶形, 中间部位加粗, 到顶部缢缩, 瓶梗基部略微缢缩(图 1G、1H)。分生孢子绿色, 亚球形至卵圆形, 光滑(图 1I)。电镜下 T35 形态特征与光学显微镜下基本一致, 分生孢子壁薄, 易失水皱缩, 分生孢子光滑, 分生孢子团表面有膜覆盖(图 1J), 形态鉴定初步判断为深绿木霉。

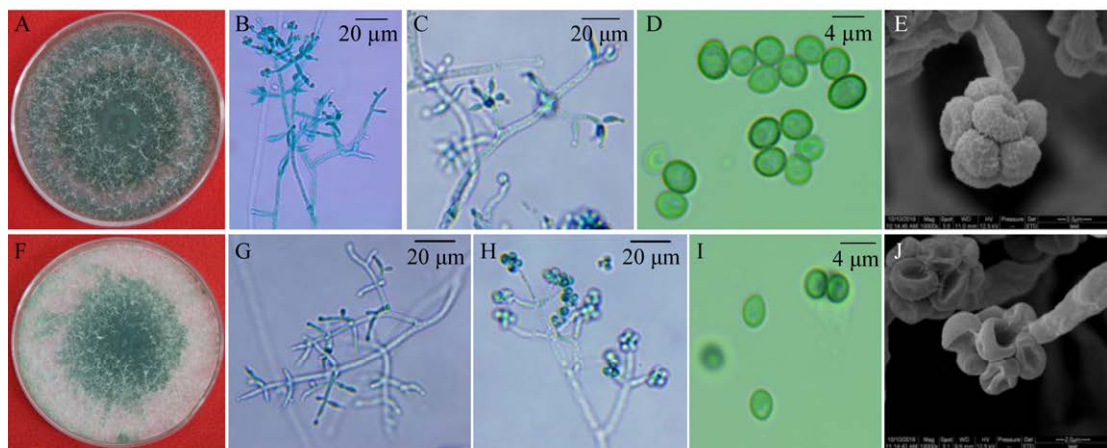


图 1 T01 和 T35 木霉分离株在 PDA 培养基上的形态

Figure 1 Morphology of *Trichoderma* isolates T01 and T35 on PDA medium

注: A-E: T01; F-J: T35。A、F: 菌落形态。B、C、G、H: 光学显微镜下分生孢子梗(400×); D、I: 光学显微镜下分生孢子(1 000×); E、J: 电镜下的分生孢子(10 000×)

Note: A-E: T01; F-J: T35. A, F: Colony morphology. B, C, G, H: Conidiophore under light microscope (400×); D, I: Conidia under light microscope (1 000×); E, J: Conidia under electron microscope (10 000×)

2.3 木霉分子鉴定及系统发育分析

将 T01 木霉分离株 ITS、*tef1* 和 *rpb2* 序列提交 NCBI, GenBank 登录号分别为 MW714925、MW748224 和 MW748226。将 3 条序列分别提交到上海交通大学木霉菌种保藏中心 MMIT 系统, 经 3 个数据库序列比对之后, 最终得出的结果为棘孢木霉(*T. asperellum*)和昆明木霉(*T. kunmingense*); T35 木霉菌株 ITS、*tef1* 和 *rpb2* 序列 GenBank 登录号分别为 MW714926、MW748225 和 MW748227, 分别提交 3 条序列后, 最终得出的结果为深绿木霉(*T. atroviride*)、北京木霉(*T. beijingense*)、近深绿木霉(*T. paratroviride*)和绿色木霉(*T. viride*)。从 NCBI 的 GenBank 数据库中下载得到已知种棘孢木霉、

昆明木霉和深绿木霉、北京木霉、近深绿木霉、绿色木霉的 *tef1*、*rpb2* 和 ITS 序列, 构建系统发育树。

木霉菌株 T01 的 *tef1* 序列虽然与棘孢木霉和昆明木霉在同一分支(图 2), 但 T01 菌株 *rpb2* 和 ITS 序列与其他棘孢木霉在同一分支(图 3, 图 4), 由此推断 T01 菌株属于棘孢木霉; 木霉菌株 T35 的 *tef1* 和 *rpb2* 序列与北京木霉和绿色木霉不在同一分支, 序列差异较大(图 2, 图 3); 而对于深绿木霉与近深绿木霉, T35 菌株 *tef1* 序列与深绿木霉 KJ634780 在同一分支(图 2), T35 菌株的 *rpb2* 序列与近深绿木霉在同一分支(图 3), T35 菌株 ITS 序列与深绿木霉和近深绿木霉在同一分支, 无法区分(图 4), 所以无法确定 T35 菌株的种类。

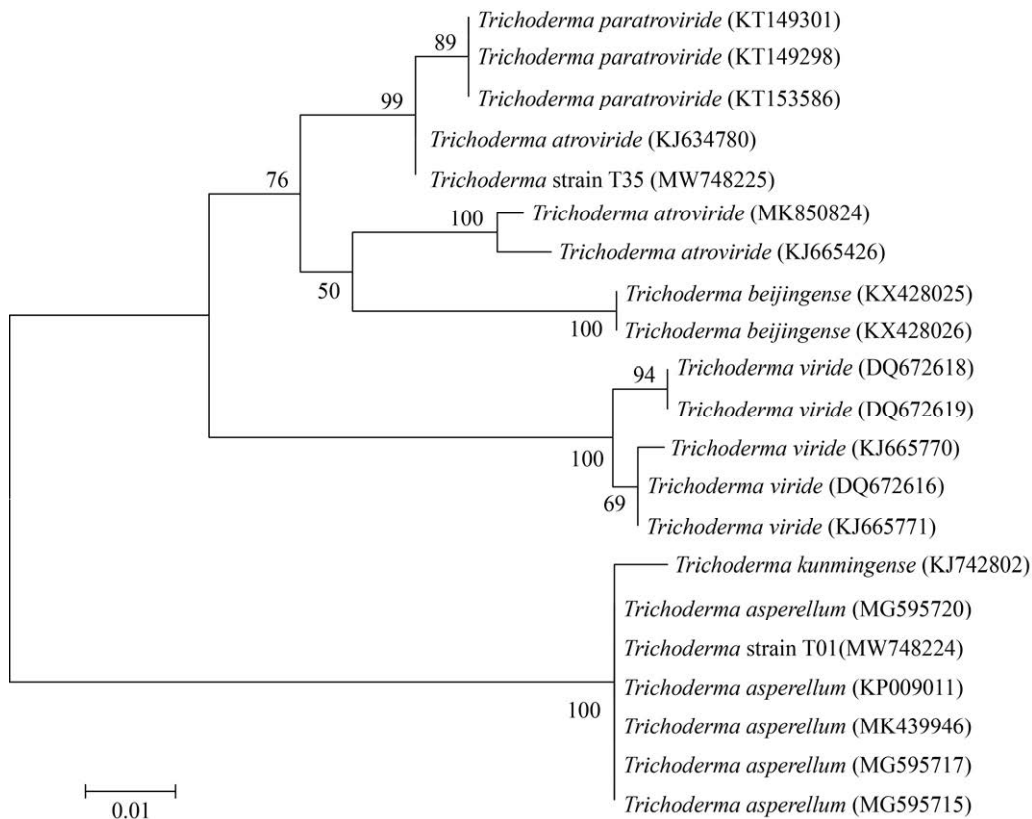


图 2 木霉分离株 T01 和 T35 基于 *tef1* 序列的系统发育树

Figure 2 The phylogenetic tree of *Trichoderma* isolates T01 and T35 based on *tef1* sequence

注: Bootstrap 次数设置为 1 000; 分支点上的数字表示置信度; 括号内表示 GenBank 登录号; 标尺表示遗传变异度

Note: Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate degree of confidence; The parentheses represent the GenBank login number; The scale represents the degree of genetic variation

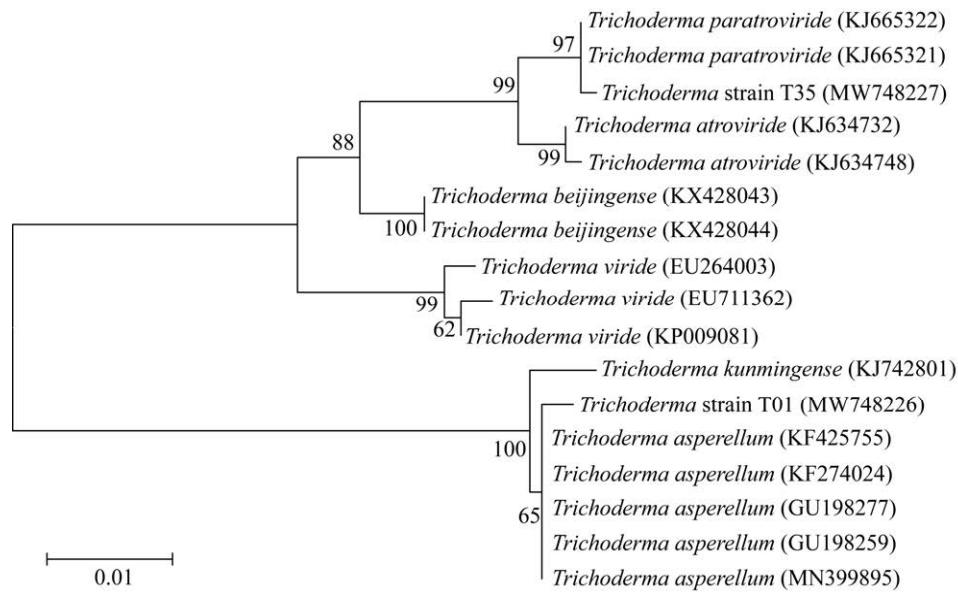


图 3 木霉分离株 T01 和 T35 基于 *rpb2* 序列的系统发育树

Figure 3 The phylogenetic tree of *Trichoderma* isolates T01 and T35 based on *rpb2* sequence

注: Bootstrap 次数设置为 1 000; 分支点上的数字表示置信度; 括号内表示 GenBank 登录号; 标尺表示遗传变异度

Note: Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate degree of confidence; The parentheses represent the GenBank login number; The scale represents the degree of genetic variation

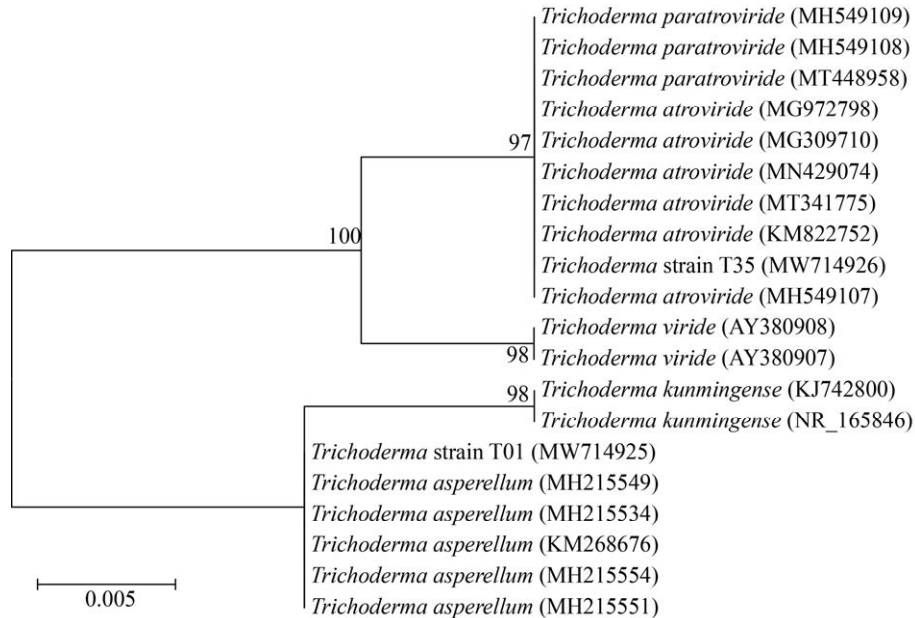


图 4 木霉分离株 T01 和 T35 基于 ITS 序列的系统发育树

Figure 4 The phylogenetic tree of *Trichoderma* isolates T01 and T35 based on ITS sequence

注: Bootstrap 次数设置为 1 000; 分支点上的数字表示置信度; 括号内表示 GenBank 登录号; 标尺表示遗传变异度

Note: Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate degree of confidence; The parentheses represent the GenBank login number; The scale represents the degree of genetic variation

进一步结合形态学特征和系统发育树分析发现, T01 木霉分离株 ITS 序列、*tefl* 序列和 *rpb2* 序列均与棘孢木霉在同一分支, 并且从形态上看, 昆明木霉瓶梗有时会有 5 个轮生^[20], 而 T01 木霉分离株瓶梗有 2-3 个轮生, 结合形态学特征与系统发育树确定 T01 分离株为棘孢木霉(TasT01)。T35 木霉分离株的 *tefl* 序列和 *rpb2* 序列均与北京木霉和绿色木霉不在同一分支, 而且从形态学上看, T35 木霉菌株有甜味, 北京木霉无明显气味^[21], T35 木霉分离株分生孢子呈亚球形至卵圆形, 光滑, 而绿色木霉分生孢子呈球形或长椭圆形, 表面粗糙, 布满小刺^[22], 由此判断 T35 木霉分离株不属于北京木霉和绿色木霉。对于近深绿木霉和深绿木霉, T35 木霉分离株 ITS 序列、*tefl* 序列和 *rpb2* 序列分支情况各不相同, 无法判断木霉种类, 结合形态学特征, 近深绿木霉菌落中心区域为灰绿色, 边缘处为黄色和白色, 而且有腐臭刺鼻的味道^[23], 这与 T35 菌株形态特征不符, 由此确定 T35 木霉分离株为深绿木霉(TatT35)。

2.4 木霉菌与病原菌的对峙试验

通过对峙平板试验发现, 与 2 种病原菌的对照

相比(图 5A-5D), TasT01 和 TatT35 均对 Aal 和 Cgl 有一定的抑制作用。培养到第 6 天时发现, TasT01 对 Aal 和 Cgl 的拮抗等级与 TatT35 对 Cgl 的拮抗等级均为 I 级, 而 TatT35 对 Aal 的拮抗等级为 II 级, 拮抗能力较弱。

通过观察发现, TasT01 对 Aal 的抑制能力较弱, 木霉菌丝覆盖整个平面并在 Aal 上少量产孢(图 5E、5F), 而 TasT01 对 Cgl 的抑制能力较强, 木霉菌丝已完全覆盖 Cgl 的菌丝并在其上大量产孢(图 5G、5H); 与 TasT01 相比, TatT35 对 2 种病原菌的抑制能力较弱, TatT35 对 Aal 的抑制能力弱于 Cgl, 对于 Aal, 木霉菌丝未完全覆盖(图 5I、5J), 而在 Cgl 菌丝上有产孢(图 5K、5L)。

在与木霉菌对峙培养的条件下, 2 种病原菌的生长曲线均低于对照。而且在与 TasT01 对峙培养条件下, 2 种病原菌的生长曲线均低于与 TatT35 对峙培养条件下的生长曲线(图 6A、6B)。通过计算发现, 在第 6 天时, TasT01 菌株对 Cgl 的抑菌率达到 58.48%, 对 Aal 的抑菌率达到 57.01%; TatT35 对 Cgl 的抑菌率达到 43.86%, 对 Aal 的抑菌率达到 43.85% (表 3)。综合分析, TasT01 的抑菌效果好于 TatT35。

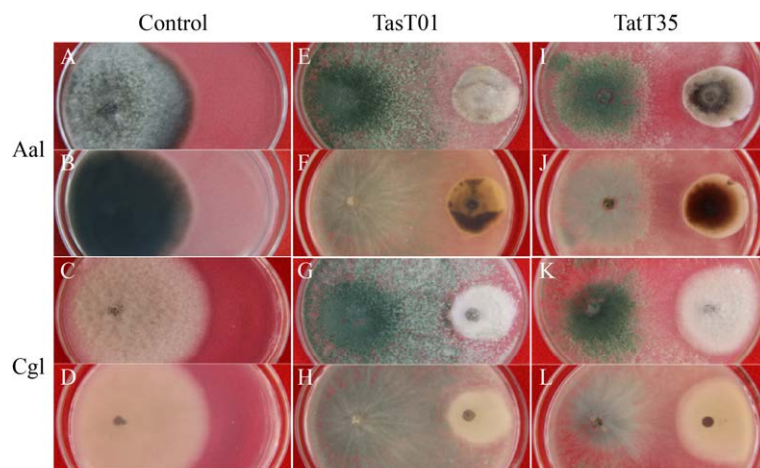


图 5 TasT01 与 TatT35 对 Aal 及 Cgl 的平板对峙

Figure 5 Plate confrontation of TasT01 and TatT35 on Aal and Cgl

注: A、B: Aal 平板形态; C、D: Cgl 平板形态; E、F: TasT01 与 Aal 平板对峙; G、H: TasT01 与 Cgl 平板对峙; I、J: TatT35 与 Aal 平板对峙; K、L: TatT35 与 Cgl 平板对峙

Note: A, B: The plant morphology of Aal; C, D: The plant morphology of Cgl; E, F: Plate confrontation of TasT01 and Aal; G, H: Plate confrontation of TasT01 and Cgl; I, J: Plate confrontation of TatT35 and Aal; K, L: Plate confrontation of TatT35 and Cgl

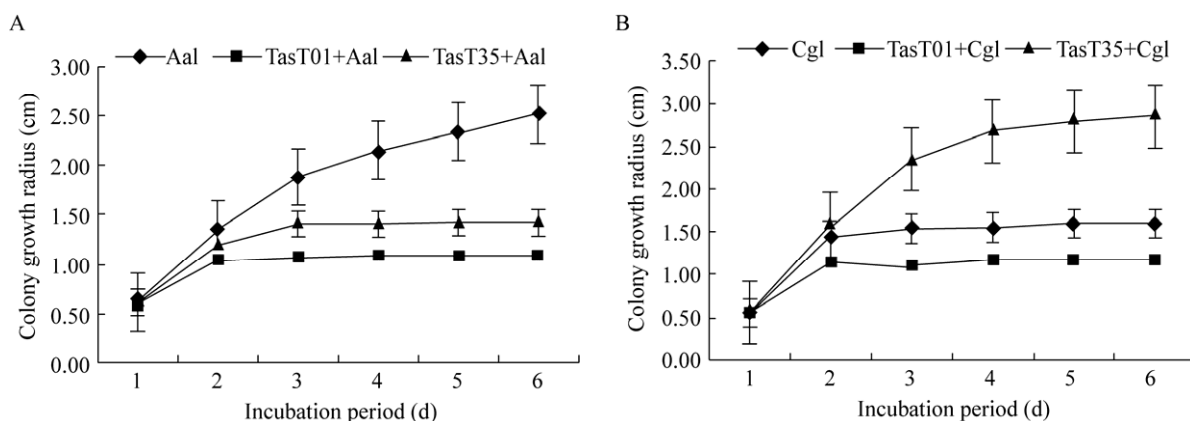


图6 在与木霉对峙培养条件下 Aal 与 Cgl 的生长曲线

Figure 6 The growth curve of Aal and Cgl under the condition of confrontation culture with *Trichoderma*

注: A: Aal 的生长曲线; B: Cgl 的生长曲线

Note: A: The growth curve of Aal; B: The growth curve of Cgl

表3 TasT01 与 TatT35 木霉菌株对 Aal 及 Cgl 病原菌的抑菌率

Table 3 The inhibition rates of TasT01 and TatT35 *Trichoderma* strains against Aal and Cgl pathogens

Strains	3 d	4 d	5 d	6 d
TasT01-Aal	0.431 1±0.062 9bcd	0.496 1±0.043 9de	0.537 0±0.040 3e	0.570 1±0.037 4e
TasT01-Cgl	0.530 9±0.017 4e	0.558 5±0.038 3e	0.575 9±0.036 8e	0.584 8±0.036 0e
TatT35-Aal	0.250 7±0.029 3a	0.344 2±0.051 2b	0.395 3±0.049 1bc	0.438 5±0.045 6cd
TatT35-Cgl	0.341 9±0.014 1b	0.421 6±0.015 2bcd	0.426 5±0.014 6bcd	0.438 6±0.014 3cd

注: 数据为抑菌率平均值±标准差。不同小写字母表示经 Duncan 法检验 2 种木霉菌对 2 种病原菌抑菌率平均值有显著差异 ($P < 0.05$)

Note: Datum are the mean of the inhibition rates ± standard deviation. Different lowercase letters indicate that there is significant difference in the mean inhibitory rate of the two *Trichoderma* species against the two pathogens tested by Duncan's method ($P < 0.05$)

2.5 TasT01 菌丝对 2 种病原菌抑制作用的显微观察

在对峙培养条件下, 木霉菌丝与病原菌的菌丝接触, 由于其生长速度快, 会覆盖病原菌的菌丝并可在其上产孢, 从而抑制病原菌菌丝的生长。为了进一步明确木霉与病原菌的互动方式, 通过显微镜观察木霉菌落与病原菌菌落的交界处, 发现 TasT01 菌丝可以缠绕在 Aal 及 Cgl 的菌丝上(图 7)。

2.6 深绿木霉 T35 固体发酵配方优化

接种深绿木霉孢子悬浮液 8 d 后, 设定 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量为 0.5% 不变, 稻壳麦麸比为 80:20、85:15 和 90:10 的托盘中发酵料的绿色依次加深(图 8A); 设定稻壳麦麸比为 90:10 不变, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

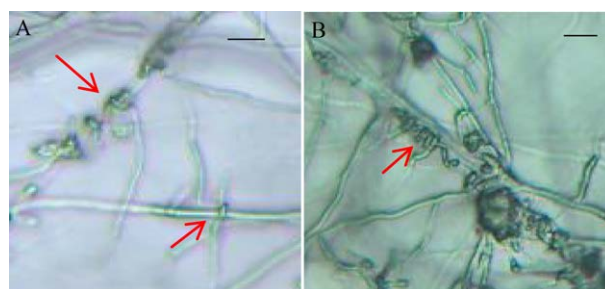


图7 TasT01 菌丝对 Aal 及 Cgl 菌丝的缠绕

Figure 7 The entanglement of Aal and Cgl hyphae by TasT01 hyphae

注: A: TasT01 菌丝对 Aal 菌丝的缠绕; B: TasT01 菌丝对 Cgl 菌丝的缠绕。标尺=20 μm, 箭头代表缠绕部分

Note: A: The entanglement of Aal hyphae by TasT01 hyphae; B: The entanglement of Cgl hyphae by TasT01 hyphae. Bar=20 μm, the arrow represents the winding part

含量为 0.5% 时发酵料绿色最深(图 8B)。从发酵料中稻壳麦麸不同含量比方面来看, 稻壳麦麸比为 80:20 和 85:15 的产孢量分别为 1.67×10^7 个/g 和 2.43×10^7 个/g, 而稻壳麦麸比为 90:10 的配方产孢量最多, 可达 1.0×10^8 个/g (图 8C); 从发酵料中 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量来看, 设定稻壳麦麸比为 90:10 不

变, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量为 0.3% 的配方孢子浓度为 5.10×10^7 个/g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量为 0.1% 的配方孢子浓度为 8.08×10^7 个/g, 而 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量为 0.5% 的配方孢子浓度为 1.0×10^8 个/g (图 8D)。综合来看, 经配方优化后, 稻壳麦麸比为 90:10、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量为 0.5% 的配方产孢最多。

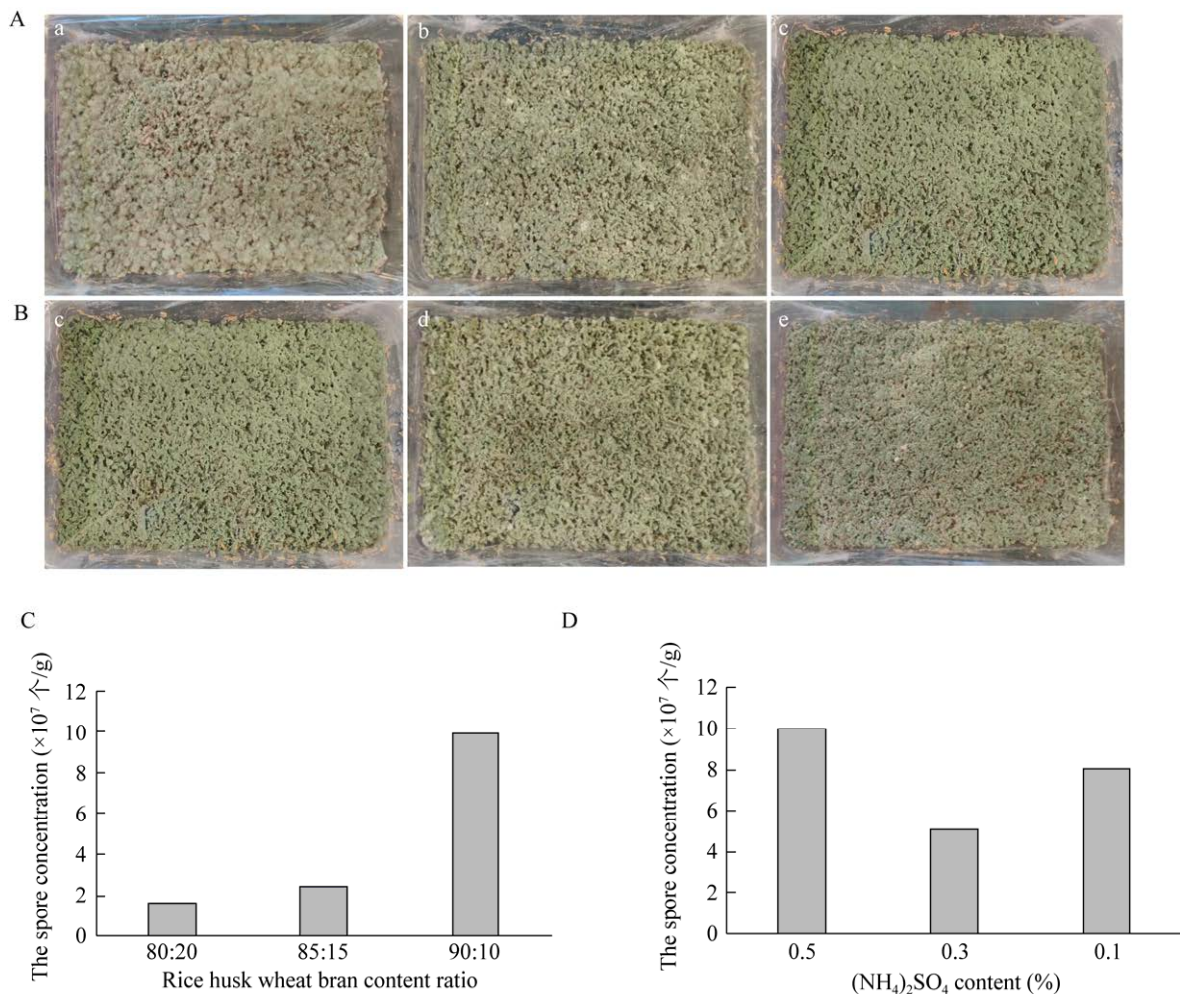


图 8 深绿木霉 T35 固态发酵料及孢子含量测定

Figure 8 Determination of solid fermentation material and spore content of *T. atroviride* T35

注: A、B: 不同发酵配方下 T35 菌株固态发酵料。a: 稻壳 80%, 麦麸 20%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%; b: 稻壳 85%, 麦麸 15%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%; c: 稻壳 90%, 麦麸 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%; d: 稻壳 90%, 麦麸 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%; e: 稻壳 90%, 麦麸 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%。C: 不同稻壳麦麸含量比木霉孢子浓度; D: 不同 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 含量木霉孢子浓度

Note: A, B: Solid-state fermentation feed of T35 strain under different fermentation recipes. a: Rice husk 80%, wheat bran 20%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%; b: Rice husk 85%, wheat bran 15%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%; c: Rice husk 90%, wheat bran 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5%; d: Rice husk 90%, wheat bran 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%; e: Rice husk 90%, wheat bran 10%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%. C: *Trichoderma* spore concentration of different rice husk wheat bran content ratio; D: *Trichoderma* spore concentration of different $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ content

3 讨论与结论

木霉是一种优良的植物真菌病害生防菌,能适应多种不同的环境,而且其种类和数量会随着生存环境的不同而产生变化。在韩国湿地土壤中分离出 18 株 9 种菌,分别为深绿木霉(*T. atroviride*)、绿木霉(*T. virens*)、毛簇木霉(*T. velutinum*)、哈茨木霉(*T. harzianum*)、棘孢木霉(*T. asperellum*)、拟康宁木霉(*T. koningiopsis*)、黄绿木霉(*T. aureoviride*)、黑甲肉座菌(*Hypocrea lixi*)和康宁木霉(*T. koningii*)^[24]。在贵州地区土壤和腐木样品中共分离出 11 株 4 种菌,分别为绿色木霉(*T. viride*)、哈茨木霉(*T. harzianum*)、钩状木霉(*T. hamatum*)和棘孢木霉(*T. asperellum*)^[25]。本试验从新疆新源县野果林狭叶荨麻(*U. angustifolia*)、杨铁叶(*R. patientia*)、车前(*P. asiatica*)和蒲公英(*T. mongolicum*)这 4 种植物根围土壤中共分离出 2 种 42 株,分别为棘孢木霉(*T. asperellum*)和深绿木霉(*T. atroviride*)。表明在不同地区不同环境下木霉的种类数量差异很大,优势木霉种也有所差别。这就提示我们在木霉应用时最好使用相同土壤类型下的木霉菌,利用“适地适木霉”的原则,以发挥其最大生防效果。

木霉种类鉴定一般通过 *TrichOKey* 和 *TrichoBLAST* 工具进行分子鉴定^[26-28], *TrichOKey* 和 *TrichoBLAST* 工具促进了木霉的相关研究。将 ITS1 和 ITS2 得到的木霉寡核苷酸序列通过 *TrichOKey* 1.0 进行比对,但不能区分 6 组木霉之间的差异, *TrichOKey* 2.0 虽然增加了 *tefl* 和 *rpb2* 序列,但也不能准确区分木霉种类,木霉种类还可以借助 *TrichoBLAST* 进行鉴定^[29]。这些工具虽然能区分大部分种类的木霉,但是 2015 年的一份报告已经列出了 256 个在 *TrichOKey* 和 *TrichoBLAST* 数据库中未更新的已被接受的木霉名称。然而木霉多位点鉴定系统(Multilocus Identification System for *Trichoderma*, MIST)包括 ITS rDNA、*tefl* 和 *rpb2* 这 3 个系统发育标记数据库和一个可以利用系统发育标记信息进行物种鉴定的检索程序^[16]。该系统

是目前可以有效进行木霉特异性鉴定的工具。

方圆等^[30]从新疆野苹果树根围中分离出 3 种 39 株木霉,分别为俄罗斯木霉(*T. rossicum*) 22 株、渐绿木霉(*T. viridescens*) 13 株、哈茨木霉(*T. harzianum*) 4 株,其中优势生防木霉菌种为俄罗斯木霉 T7 和哈茨木霉 T2。该试验在新疆野果林狭叶荨麻(*U. angustifolia*)、杨铁叶(*R. patientia*)、车前(*P. asiatica*)和蒲公英(*T. mongolicum*)这 4 种草本植物根围分离木霉菌,结果为狭叶荨麻(*U. angustifolia*)、杨铁叶(*R. patientia*)和蒲公英(*T. mongolicum*)这 3 种草本植物根围均仅分离到棘孢木霉,分别为 17、11、5 株,车前(*P. asiatica*)根围有棘孢木霉(*T. asperellum*)与深绿木霉(*T. atroviride*)这 2 种木霉,分别为 1 株和 8 株。结果表明,4 种草本植物根围木霉均有棘孢木霉,木霉种类较单一,分布范围较广。草本植物和木本植物根围木霉的种类存在差异,表明同一个生境中不同的植物能够富集不同的木霉种,木霉的丰度也存在差异。

通过对峙培养试验和显微观察发现,从草本植物根围分离出的 TasT01 和 TatT35 对来自苹果上的 2 种病原真菌均表现出了一定的拮抗作用和抑制作用,但不同木霉对同一种病原菌的抑制作用有强弱差异,同一种木霉对不同种病原菌的抑制作用也不同。棘孢木霉 T3 对高粱炭疽病菌 C1 (*C. graminicola* C1)菌株的抑制率可达 76.47%^[31],深绿木霉菌株 IC-11 和 IC-12 对胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)和链格孢菌(*A. alternata*)抑制率都较低^[32]。本试验中, TasT01 对 Cgl 的抑制效果最好,6 d 时抑制率可达到 58.48%,而 TatT35 对 2 种病原菌的抑制率都低于 TasT01。综合对 2 种病原菌的抑制效果,棘孢木霉的抑制效果优于深绿木霉。

进一步探究木霉菌丝对病原菌的抑制机理,发现木霉菌对于空间和营养有强烈的竞争能力,还可以通过菌丝缠绕寄生于病原菌的菌丝上实现重寄生抑制病原菌生长。生防贵州木霉(*T. guizhouense*) NJAU 4742 对多种病原菌有重寄生作用^[33],棘孢木

霉 GYSW-6m1 菌丝可通过接触、缠绕和穿透病菌草莓炭疽菌 LC0220 的菌丝并引起菌丝消解断裂^[34]。在该试验中发现 TasT01 菌丝对于 2 种病原菌菌丝的缠绕, 而未发现 TatT35 菌丝对 2 种病原菌菌丝有接触缠绕, 可能由于 TatT35 对这 2 种病原菌存在其他的拮抗机制, 有待进一步研究。

深绿木霉 T35 菌株固态发酵在刘志华等^[19]“一种小规模木霉菌固态发酵方法”专利方法基础上进行优化, 提高稻壳麦麸比例可以增加托盘内氧气量, 利于木霉产孢, 设置稻壳麦麸含量比从 80:20、85:15 到 90:10, 发现稻壳麦麸比为 90:10 时产孢量最多; 将原配方中的玉米面与黄豆粉换成 0.5% (NH₄)₂SO₄ 为木霉生长提供营养, 但营养过多会不利于木霉产孢, 从而设置 0.5%、0.3% 和 0.1% 这 3 个不同 (NH₄)₂SO₄ 含量梯度。然而发现 (NH₄)₂SO₄ 含量越少反而产孢量越少, 分析原因可能是因为营养过少影响木霉生长, 所以优化后的配方为: 稻壳 90%, 麦麸 10%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%。

未来试验中将会利用从新疆野果林分离出的木霉制备新疆野苹果专用微生物菌肥, 并用于病害的防治, 研究木霉对防治新疆野苹果病害的实际效果和作用, 可为新疆新源县新疆野苹果的保护和恢复提供指导和优良生防菌剂。

REFERENCES

- [1] Naizaier R, Qu ZZ, Wu SL, Tian XM. The complete chloroplast genome of *Malus sieversii* (Rosaceae), a wild apple tree in Xinjiang, China[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2019, 4(1): 983-984
- [2] Yu SS, Zhao WX, Yao YX, Qin WQ, Yan W, Song WW. Investigation on the habitat conditions of Xinjiang Wild Apple[A]//Chinese Horticultural Society. Collection of abstracts of the 2019 academic annual meeting of the Chinese Society of Horticulture[C]. Zhengzhou, 2019 (in Chinese)
于少帅, 赵文霞, 姚艳霞, 覃伟权, 阎伟, 宋薇薇. 新疆野苹果生境条件的调查[A]//中国园艺学会 2019 年学术年会暨成立 90 周年纪念大会论文集[C]. 郑州, 2019
- [3] Bai L, Yan GR, Xu Z. Study on *Phyto*-diversity and conservation of the wild fruit forest of Tianshan mts in Xinjiang[J]. Arid Zone Research, 1998, 15(3): 10-13 (in Chinese)
- [4] Chen YJ. Protection and restoration of wild apple forest resources in Xinyuan County, Xinjiang[J]. Beijing Agriculture, 2015(27): 98-99 (in Chinese)
陈燕君. 新疆新源县野苹果林资源保护与恢复[J]. 北京农业, 2015(27): 98-99
- [5] Yan GR, Xu Z. Study on the wild fruit tree diseases of Tianshan mountains and their distribution in Xinjiang[J]. Arid Zone Research, 2001, 18(2): 47-49 (in Chinese)
阎国荣, 许正. 天山野生果树主要病害及其分布[J]. 干旱区研究, 2001, 18(2): 47-49
- [6] You JQ, Wu MD, Li GQ. Application and mechanism of *Trichoderma* in biological control of plant disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(6): 966-976 (in Chinese)
尤佳琪, 吴明德, 李国庆. 木霉在植物病害生物防治中的应用及作用机制[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(6): 966-976
- [7] Zhang WJ, Mao WX, Zhang SW, Xue YY, Xu BL. Efficiency of *Trichoderma atroviride* T2 strain in controlling of apple mould core[J]. China Fruits, 2018(5): 11-14 (in Chinese)
张文军, 毛维兴, 张树武, 薛应钰, 徐秉良. 深绿木霉 T2 菌株对苹果霉心病的防治效果研究[J]. 中国果树, 2018(5): 11-14
- [8] Batta YA. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 96(3): 281-288
- [9] Zhang J, Zhang SW, Xu BL, Gu LJ, Xue YY. Determining antifungal spectrum and mechanism of *Trichoderma longibrachiatum* *in vitro*[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2014, 22(6): 661-667 (in Chinese)
张瑾, 张树武, 徐秉良, 古丽君, 薛应钰. 长枝木霉菌抑菌谱测定及其抑菌作用机理研究[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(6): 661-667
- [10] Gao KX, Liu XG, Guo RF, Gao BJ, Zhu TB. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on five plant pathogenic fungi[J]. Journal of Shandong Agricultural University: Natural Science, 2002, 33(1): 37-42 (in Chinese)
高克祥, 刘晓光, 郭润芳, 高宝嘉, 朱天博. 木霉菌对五种植物病原真菌的重寄生作用[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2002, 33(1): 37-42
- [11] Zhang JH, Xu BL, Zheng YY, Zhang SW. Stability and antimicrobial activity of the extract of fermentation liquor from *Trichoderma longibrachiatum* T6[J]. Agrochemicals, 2015, 54(5): 330-333 (in Chinese)
张建华, 徐秉良, 郑宇宇, 张树武. 长枝木霉 T6 发酵液

- 稳定性及粗提物抑菌活性[J]. 农药, 2015, 54(5): 330-333
- [12] Xian HQ, Li YH, Li SW, Lu XH. Study on antifungal spectrum of metabolites from *Trichoderma* Td series[J]. Journal of Qingdao Agricultural University: Natural Science, 2009, 26(1): 34-37 (in Chinese)
咸洪泉, 李雅华, 李树文, 陆秀华. 木霉菌 Td 系列菌株代谢产物的室内抑菌谱研究[J]. 青岛农业大学学报: 自然科学版, 2009, 26(1): 34-37
- [13] Ren FS, Wang Y, Zhai YF, Wang SY, Yu Y, Zhuang QY. Synergistic effect of *Trichoderma* and several chemical fungicides for control of *Botryosphaeria dothidea*[J]. Northern Horticulture, 2015(16): 111-115 (in Chinese)
任凤山, 王燕, 翟一凡, 王圣印, 于毅, 庄乾营. 木霉与几种化学杀菌剂协同防治苹果轮纹病[J]. 北方园艺, 2015(16): 111-115
- [14] Zhang LP, Zhang GW, Huang YL, Cheng HC, Dong C, Tian LS. Controlling apple ring rot with a mixed bioformulation[J]. Agrochemicals, 2006, 45(3): 201-203 (in Chinese)
张丽萍, 张根伟, 黄亚丽, 程辉彩, 董超, 田连生. 复合生物制剂防治苹果轮纹病[J]. 农药, 2006, 45(3): 201-203
- [15] Zhou C, Wang JJ, Fan HJ, Yang GQ, Liu ZH. Separation and identification of *Trichoderma* from the rhizosphere soil of *Prunus padus*[J]. Northern Horticulture, 2018(12): 88-95 (in Chinese)
周畅, 王金杰, 范海娟, 杨广琦, 刘志华. 稠李根围木霉的分离及鉴定[J]. 北方园艺, 2018(12): 88-95
- [16] Dou K, Lu Z, Wu Q, Ni M, Yu CJ, Wang M, Li YQ, Wang XH, Xie HL, Chen J, et al. MIST: a multilocus identification system for *Trichoderma*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(18): e01532-20
- [17] Liang XJ, Liu ZH, Zhang P, Gao M, Wu LW, Wang YD, Yu MY, Chen YC. *Trichoderma* spp. isolated from rhizosphere soil of wilt-resistant *Vernicia fordii* and their inhibition effects against *Fusarium oxysporum*[J]. Mycosystema, 2020, 39(5): 795-805 (in Chinese)
梁晓洁, 刘志华, 张平, 高暝, 吴立文, 汪阳东, 余孟杨, 陈益存. 抗油桐枯萎病木霉菌的分离鉴定及抑菌作用研究[J]. 菌物学报, 2020, 39(5): 795-805
- [18] Bell DK. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens[J]. Phytopathology, 1982, 72(4): 379
- [19] Liu ZH, Zhang RS, Wang JJ, Zhou C, Wang YC. Small-scale solid fermentation method for *Trichoderma*: CN105255949A[P]. 2016-01-20 (in Chinese)
刘志华, 张荣沭, 王金杰, 周畅, 王玉成. 一种小规模木霉菌固态发酵方法: CN105255949A[P]. 2016-01-20
- [20] Qiao M, Du X, Zhang Z, Xu JP, Yu ZF. Three new species of soil-inhabiting *Trichoderma* from southwest China[J]. MycoKeys, 2018(44): 63-80
- [21] Chen K, Zhuang WY. Seven soil-inhabiting new species of the genus *Trichoderma* in the Viride clade[J]. Phytotaxa, 2017, 312(1): 28-46
- [22] Yang HT. Classification and Identification of *Trichoderma*[M]. Beijing: China Land Press, 2009 (in Chinese)
杨合同. 木霉分类与鉴定[M]. 北京: 中国大地出版社, 2009
- [23] Jaklitsch WM, Voglmayr H. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in southern Europe and macaronesia[J]. Studies in Mycology, 2015, 80: 1-87
- [24] Saravanakumar K, Wang MH. Isolation and molecular identification of *Trichoderma* species from wetland soil and their antagonistic activity against phytopathogens[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2020, 109: 101458
- [25] Liu Q, Li S, Liang CK, Zhang HH, Wu J, Wang JF, Ran XQ. Isolation and identification of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici*[J]. Microbiology China, 2019, 46(4): 741-751 (in Chinese)
刘青, 李升, 梁才康, 张红辉, 吴静, 王嘉福, 冉雪琴. 贵州地区木霉菌分离鉴定及对辣椒疫霉的拮抗作用[J]. 微生物学通报, 2019, 46(4): 741-751
- [26] Meincke R, Weinert N, Radl V, Schlöter M, Smalla K, Berg G. Development of a molecular approach to describe the composition of *Trichoderma* communities[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 80(1): 63-69
- [27] Abd-Elsalam KA, Almohimeed I, Moslem MA, Bahkali AH. M13-microsatellite PCR and rDNA sequence markers for identification of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) species in Saudi Arabian soil[J]. Genetics and Molecular Research, 2010, 9(4): 2016-2024
- [28] Błaszczyk L, Popiel D, Chelkowski J, Koczyk G, Samuels GJ, Sobieralski K, Siwulski M. Species diversity of *Trichoderma* in Poland[J]. Journal of Applied Genetics, 2011, 52(2): 233-243
- [29] Zhang GZ, Yang HT, Zhang XJ, Hu JD, Guo K, Huang YJ, Li JS. A checklist of known species of *Trichoderma*[J]. Mycosystema, 2014, 33(6): 1210-1230 (in Chinese)
张广志, 杨合同, 张新建, 扈进冬, 郭凯, 黄玉杰, 李纪顺. 木霉现有种类名录[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1210-1230
- [30] Fang Y, Ji SD, Wang YC, Zhou C, Liu ZH. Isolation, identification and biocontrol characteristics of *Trichoderma* from the rhizosphere soil of *Malus sieversii*[J]. Journal of West China Forestry Science, 2019, 48(6): 111-119 (in Chinese)

- 方圆, 季世达, 王玉成, 周畅, 刘志华. 新疆野苹果根围木霉分离鉴定及生防特性研究[J]. 西部林业科学, 2019, 48(6): 111-119
- [31] Manzar N, Singh Y, Kashyap AS, Sahu PK, Rajawat MVS, Bhowmik A, Sharma PK, Saxena AK. Biocontrol potential of native *Trichoderma* spp. against anthracnose of great millet (*Sorghum bicolor* L.) from Tarai and hill regions of India[J]. Biological Control, 2021, 152: 104474
- [32] Ferreira FV, Herrmann-Andrade AM, Calabrese CD, Bello F, Vázquez D, Musumeci MA. Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of *Citrus* tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges (*Citrus sinensis* L. (Osbeck))[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 129(3): 712-727
- [33] Zhang J. The molecular mechanism of mycoparasitism of the biocontrol strain *Trichoderma guizhouense* NJAU 4742 I function research of the neutral metalloprotease NMP1 and reactive oxygen species[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- 张建. 生防木霉(*Trichoderma guizhouense* NJAU 4742)重寄生分子机理研究 I 中性金属肽酶 NMP1 和活性氧的功能分析[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2015
- [34] Zhao DL, He HY, Wu SP, Chen XJ, Tan QQ, Yang XH. Biocontrol mechanisms and control effects of *Trichoderma asperellum* GYSW-6m1 on strawberry anthracnose and growth-promoting effects on strawberry[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(4): 587-595 (in Chinese)
- 赵玳琳, 何海永, 吴石平, 陈小均, 谭清群, 杨学辉. 棘孢木霉 GYSW-6m1 对草莓炭疽病的生防机制及其防病促生作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(4): 587-595