

短密木霉菌株 GAS1-1 的分离鉴定、拮抗作用及其生物学特性

郭 成¹ 张小杰² 张有富³ 王春明⁴ 周天旺⁴ 李敏权^{1*}

(1. 甘肃农业大学草业学院, 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学植物保护学院, 兰州 730070; 3. 河西学院农业与生物技术学院, 张掖 734000; 4. 甘肃省农业科学院植物保护研究所, 兰州 730070)

摘要: 为了解短密木霉 *Trichoderma brevicompactum* 对植物病害的生防作用及其生物学特性, 利用稀释平板分离法从甘肃省景泰县马铃薯连作田植株根际土壤中分离获得 1 株木霉菌株 GAS1-1, 经形态观察、rDNA-ITS 和 EF-1 α 序列分析明确其分类地位; 用生物学方法研究该菌的营养生长和产孢条件; 采用对峙培养法测定该菌株对 5 种植物病原真菌的抑制作用。结果表明, 基于形态学特征和基因序列分析结果, 菌株 GAS1-1 被鉴定为短密木霉 *Trichoderma brevicompactum*, 为甘肃省木霉新记录种。该菌株对玉米镰孢茎腐病菌 *Fusarium graminearum*、玉米穗腐病菌 *F. verticillioides*、棉花枯萎病菌 *F. oxysporum*、玉米腐霉茎腐病菌 *Pythium inflatum* 和灰葡萄孢霉 *Botrytis cinerea* 均具有较好的拮抗效果, 尤其对玉米腐霉茎腐病菌的抑制作用最好, 抑菌率达 100.00%。该菌株营养生长和产孢的最适碳源和氮源分别为葡萄糖和酵母膏; 其在 15~35℃ 均可生长, 菌丝最适生长温度为 30℃, 最佳产孢温度为 25℃; 在 pH 5~12 的培养基上菌丝均可生长, 菌丝最适生长和产孢的 pH 均为 5; 24 h 黑暗条件下菌丝营养生长最快, 12 h 光暗交替条件有利于产孢; 孢子致死温度为 69℃, 10 min。表明短密木霉菌株 GAS1-1 具有较好的生防应用潜力。

关键词: 短密木霉; 拮抗作用; 生物学特性

Isolation, identification, antagonistic effect and biological characteristics of *Trichoderma brevicompactum* strain GAS 1-1

Guo Cheng¹ Zhang Xiaojie² Zhang Youfu³ Wang Chunming⁴ Zhou Tianwang⁴ Li Minquan^{1*}

(1. College of Prataculture, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China; 2. College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, Gansu Province, China; 3. College of Agriculture and Biotechnology, Hexi University, Zhangye 734000, Gansu Province, China; 4. Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, Gansu Province, China)

Abstract: In order to investigate the biological characteristics of *Trichoderma brevicompactum* and bio-control of *T. brevicompactum* against plant diseases, a *Trichoderma* strain GAS1-1 was isolated from rhizosphere soils of continuously cropped potato in Jingtai County, Gansu Province. The taxonomic status of strain GAS1-1 was confirmed with morphologic observation, rDNA-ITS and EF-1 α sequence analysis. Nutritional growth and sporulation conditions of strain GAS1-1 were ascertained by using biological method. The inhibitory effect of the strain GAS1-1 against five plant pathogenic fungi was determined by dual culture. The results of morphological and sequence analysis showed that the strain GAS1-1 was identified as *T. brevicompactum*, which is a firstly recorded *Trichoderma* species in Gansu. The

基金项目: 甘肃省农牧厅生物技术研究与应用开发项目(GNSW2014-16), 国家公益性行业(农业)科研专项(201503112), 甘肃省科技厅青年科技基金计划(18JR3RA258)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: lmq@gsau.edu.cn

收稿日期: 2018-04-20

strain showed strong antagonistic activity against *Fusarium graminearum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *Pythium inflatum* and *Botrytis cinerea*. In particular, it produced the highest antifungal activity against *P. inflatum* with an inhibition ratio of 100.00%. The study of biological characteristics showed that the optimum carbon and nitrogen sources of the strain were glucose and yeast extract for mycelial growth and sporulation, respectively. The strain could grow at 15–35°C, and the optimal hyphal growth and sporulation temperatures were 30°C and 25°C, respectively. The strain could grow at pH 5–12, and the optimal pH value for hyphal growth and sporulation was pH 5. The most favorable condition for mycelial growth was 24 h dark photoperiod, while the condition of alternative 12 h light and 12 h dark was the most favorable to its sporulation. The lethal temperature for spores was 69°C for 10 min. It suggested that this strain of *T. brevicompactum* has biocontrol potential against plant diseases.

Key words: *Trichoderma brevicompactum*; antagonist effect; biological characteristics

木霉属 *Trichoderma* Pers. 是世界性分布真菌, 主要生长于土壤、作物根际、叶围、种子、球茎、腐烂的木材及杂草中, 因其在工业酶制剂、抗生素及生物防治等方面的应用价值而得到广泛关注 (Weindling, 1932; Ghisalberti, 2002; Harman et al., 2004)。大量研究结果表明, 木霉菌对多种植物病菌具有拮抗活性, 而且定殖能力强, 可通过竞争、重寄生、抗生和协同拮抗作用等多种机制来起到生防作用 (Harman et al., 2004; 王芳, 2006)。木霉可通过寄生吸附在寄主菌丝上, 分泌胞外酶等溶解细胞壁后穿透寄主菌丝吸取营养 (Bae, 2011), 或通过分泌多种次生代谢产物抑制或直接杀死病原菌 (Saravanar et al., 2016), 从而起到防治菜豆锈病、可可豆荚念珠病、丛枝病和黑荚病等植物病害的作用 (Krauss & Soberanis, 2002; Burmeister & Hau, 2009)。木霉菌还可与植物建立互惠共生关系, 促进植物生长或诱导植物产生抗病性等 (Zhang et al., 2014; 杨兴堂, 2016; 李松鹏等, 2018)。

生物防治符合我国倡导的减少化肥和农药使用量的“两减”植物保护新理念, 因此, 寻找开发新型绿色安全、经济有效的生防菌资源显得尤为重要 (李松鹏等, 2018)。根据文献记载, 木霉属真菌已报道有 250 余种 (秦文韬等, 2016), 截止 2014 年我国已报道有 91 种 (朱兆香和庄文颖, 2014), 表明我国具有丰富的木霉菌资源和生物多样性 (李松鹏等, 2018)。目前, 国内外研究拮抗作用较好的木霉菌为哈茨木霉 *T. harzianum*、绿色木霉 *T. viride* 和长枝木霉 *T. longibrachiatum*, 已应用于菜豆锈病 (Burmeister & Hau, 2009)、水稻纹枯病 (史凤玉等, 2005; 刘路宁等, 2010)、葡萄灰霉病 (王勇等, 2012)、黄瓜枯萎病 (谷祖敏和毕卉, 2016)、禾谷胞囊线虫病 (Zhang et al., 2014)、油菜茎基溃疡病 (Dawidziuk et al., 2016)、

可可豆荚念珠病、丛枝病和黑荚病 (Krauss & Soberanis, 2002) 等植物病害的生物防治。Dawidziuk et al. (2016) 研究发现长枝木霉对油菜茎基溃疡病菌 *Leptosphaeria maculans* 有抑制作用, 在秋季喷洒分生孢子液, 有助于减少油菜茎点霉叶斑病的发病率和严重程度; 同时有助于降解植物病残体和分解病原体, 提高了油菜的抗病性。李松鹏等 (2018) 研究发现, 2 株哈茨木霉菌株 3S1-13 和 4S2-46 不仅可以防治水稻纹枯病, 而且对水稻种子发芽及生长具有促生作用。刘路宁等 (2010) 研究发现, 绿色木霉菌株 TY009 除可以防治水稻纹枯病外, 并兼具稻瘟病和稻曲病的生防潜力。

甘肃省景泰县地处黄土高原与腾格里沙漠过渡地带, 为甘肃省河西走廊东端门户, 属温带干旱型大陆气候, 是我国除青藏高原外光热资源最丰富的地区之一, 属于典型的草地和农田生态系统, 具有极其丰富的真菌资源。本研究将从甘肃省景泰县马铃薯连作田植株根际土壤中分离筛选出对多种植物病原真菌具有拮抗作用的木霉菌株, 通过形态观察、rDNA-ITS 和 EF-1 α 序列分析明确其分类地位; 采用生物学方法分析该菌株的营养生长和产孢条件, 以期为该菌株的开发利用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: 供试 5 种病原菌分别为玉米镰孢茎腐病菌 (禾谷镰孢 *Fusarium graminearum*)、玉米穗腐病菌 (拟轮枝镰孢 *F. verticillioides*)、棉花枯萎病菌 (尖孢镰孢 *F. oxysporum*)、玉米腐霉茎腐病菌 (肿囊腐霉 *Pythium inflatum*) 及葡萄灰霉病菌 (灰葡萄孢霉 *Botrytis cinerea*) 均为甘肃省农业科学院植物保护研究所禾谷类病害研究室保存菌株。

供试培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 15 g、琼脂粉 12 g、蒸馏水 1 000 mL;特殊营养琼脂(spezieller nährstoffarmer agar, SNA)培养基:KH₂PO₄ 1 g、KNO₃ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KCl 0.5 g、蔗糖 0.2 g、葡萄糖 0.2 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL;马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)培养液:马铃薯 200 g、葡萄糖 15 g、蒸馏水 1 000 mL;水琼脂(water agar, WA)培养基:琼脂粉 12 g、蒸馏水 1 000 mL;碳(氮)源基础培养基:NaNO₃ 3 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KCl 0.5 g、FeSO₄ 0.01 g、蔗糖 20 g、琼脂 12 g、蒸馏水 1 000 mL。

试剂及仪器:琼脂粉、葡萄糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖、果糖、甘露醇、可溶性淀粉、DL-天门冬酰胺、牛肉膏、酵母膏、硝酸钾、硫酸铵、蛋白胨、尿素,甘肃瑞通生物科技有限公司;真菌基因组DNA快速提取试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司。PRX-450C人工气候箱,宁波海曙赛福实验仪器厂;DYY-12型电泳仪,北京市六一仪器厂;7500 ABI Real-Time PCR System,美国ABI公司;BX43F光学显微镜,日本Olympus公司。

1.2 方法

1.2.1 土样采集及分离

2011年7月,从甘肃省景泰县国营条山农场马铃薯连作试验田,按五点取样法采集马铃薯植株周围0~20 cm耕作层土壤样品,经混合均匀后装入无菌袋中并编号,带回实验室后在4℃冰箱中保存备用。采用稀释平板分离法进行土壤真菌分离,培养2 d后,挑取单个菌落于PDA平板上纯化培养,分离获得菌株GAS1-1。将纯化后的菌株GAS1-1于WA培养基上保存备用。

1.2.2 菌株GAS1-1的鉴定

形态学鉴定:将菌株GAS1-1接种在PDA平板上活化后,用经灭菌的直径6 mm打孔器制取菌饼,分别接种于PDA平板和SNA平板中央,设3次重复。在25℃恒温黑暗条件下培养,定期观察菌落形态、气生菌丝、颜色、色素等特征,以48 h的菌落平均直径计算日生长速率。在菌落开始生长到菌落颜色出现明显变化期间,逐日挑取培养物制片,光学显微镜下观察子实体形态特征,共观察50个视野,每视野观察子实体20个。参照杨合同(2009)木霉菌鉴定方法对GAS1-1菌株进行形态鉴定。

分子生物学鉴定:在形态学鉴定的基础上,选用PD培养液对菌株GAS1-1进行菌丝体培养,离心后

用滤纸过滤回收菌丝体。选用EF-1 α 引物(Carbone & Kone, 1999):EF1-728F(5'-CATCGAGAAGTTCG-AGAAGG-3')和EF1-986R(5'-TACTTGAAGGA-ACCCTTACC-3');rDNA-ITS通用引物:ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCC-TCCGCTTATTGATATGC-3')进行PCR扩增,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μ L反应体系:ddH₂O 9.5 μ L、2 \times PCR Master Mix 12.5 μ L、DNA模板1 μ L、10 μ mol/L上下游引物各1 μ L。反应程序:95℃预变性3 min;95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸60 s,共35个循环;最后72℃延伸5 min。扩增产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。获得的序列与从GenBank数据库中获取的相关木霉EF-1 α 和rDNA-ITS序列进行比对,利用DNASar软件以邻接法构建系统发育树,确定菌株的分类地位。

1.2.3 菌株GAS1-1对植物病原真菌的拮抗作用

采用平板对峙培养法进行抑菌试验,将PDA平板上培养3 d的菌株GAS1-1和5种真菌病原菌分别用直径6 mm打孔器制成取菌饼,将菌株GAS1-1菌饼与玉米镰孢茎腐病菌、玉米穗腐病菌、棉花枯萎病菌、玉米腐霉茎腐病菌及葡萄灰霉病菌的菌饼分别接种在PDA平板两侧,2个菌饼相距6 cm,以只接种病原菌为对照,设5次重复,25℃恒温培养5 d后,观察记录病原菌和菌株GAS1-1菌落生长半径,计算抑菌效果(朱廷恒等,2004;康萍芝等,2007)。抑菌效果=(对照病菌菌落半径-平板对峙培养病菌菌落半径)/对照病菌菌落半径 \times 100%。

1.2.4 菌株GAS1-1生物学特性的测定

碳、氮源对菌株GAS1-1营养生长和产孢的影响:以等重量的葡萄糖、乳糖、麦芽糖、果糖、甘露醇、可溶性淀粉分别置换碳源基础培养基中的蔗糖制备不同碳源的培养基;以等重量的DL-天门冬酰胺、牛肉膏、酵母膏、硫酸铵、蛋白胨、尿素分别置换氮源基础培养基中的硝酸钠制备不同氮源的培养基,将菌株GAS1-1在PDA平板上28℃培养3 d,用经灭菌的直径6 mm打孔器切取菌落边缘菌饼,移至上述不同培养基中央,于25℃黑暗培养2 d。每处理设3次重复,2 d后用十字交叉法测量菌落生长直径,5 d后用血球计数板镜检产孢量(方中达,1998)。

温度对菌株GAS1-1营养生长与产孢量的影响:将直径6 mm的菌饼移至PDA平板中央,分别于5、10、15、20、25、28、30和35℃下黑暗培养,测定菌落生长速率和产孢量,每处理设3次重复,2 d后

用十字交叉法测量菌落生长直径,5 d后用血球计数板镜检产孢量。

pH对菌株 GAS1-1 营养生长与产孢量的影响:用0.1 mol/L的HCl和0.1 mol/L的NaOH将经灭菌的PDA培养基pH分别调节为3、4、5、6、7、8、9、10、11和12,接种菌饼后25℃黑暗条件下培养,测定菌落生长速率和产孢量,每处理设3次重复,2 d后用十字交叉法测量菌落生长直径,5 d后用血球计数板镜检产孢量。

光照对菌株 GAS1-1 营养生长与产孢量的影响:将直径6 mm的菌饼移至PDA平板中央,在人工气候箱内设置24 h连续黑暗、24 h连续光照(40 W日光灯)、12 h光暗交替的3种光照条件于25℃下进行培养。测定菌落生长速率和产孢量,每处理设3次重复,2 d后用十字交叉法测量菌落生长直径,5 d后用血球计数板镜检产孢量。

菌株 GAS1-1 分生孢子的致死温度测定:参照郭成等(2016)方法共设40、45、50、55、60、65、70、75和80℃,处理时间为10 min,观察分生孢子萌发情况。根据试验结果,再分别将2 mL孢子悬浮液置于66、67、68、69℃恒温水浴锅中处理10 min,确定孢子

的致死温度。

1.3 数据分析

采用 Excel 2010 进行数据处理,并采用 DPS 2005 软件进行单因素方差分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 菌株 GAS1-1 鉴定

2.1.1 菌株 GAS1-1 的形态特征鉴定

菌株 GAS1-1 在 PDA 平板上气生菌丝体发达,菌落绒毛状至毡状,白色,浓厚蓬松,突起,呈明显同心圆状,5 d后 PDA 平板上长满大量深绿色或黄绿色孢子,背面黄褐色。在 SNA 平板上菌丝透明,稀疏,白色絮状,5 d后产生青绿色孢子,分生孢子少,散布于整个平皿,边缘较多,有醇香味。分生孢子梗主轴较粗,侧枝短粗,产孢细胞安瓶状,基部膨大,颈部缢缩,4~8个簇生在枝端或分生孢子梗上。分生孢子卵圆形,光滑,大小为 $2.3\sim 2.7\ \mu\text{m}\times 2.0\sim 2.6\ \mu\text{m}$ (图1)。根据菌株 GAS1-1 的培养特性和形态特征,初步确定该菌株为短密木霉 *Trichoderma brevicompactum*。

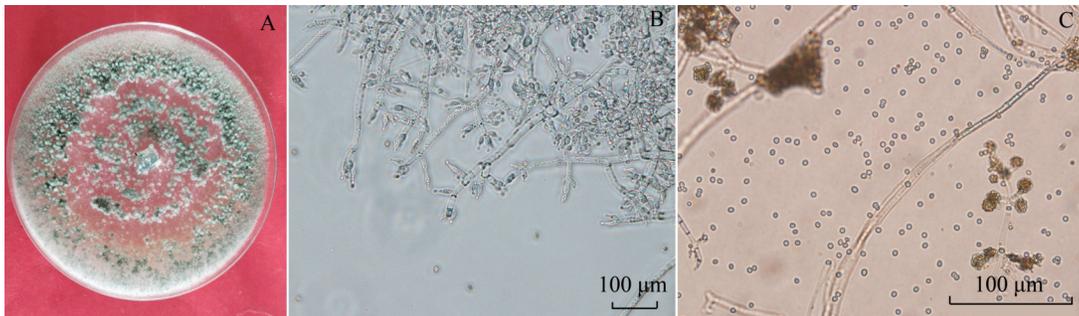


图1 菌株 GAS1-1 的形态特征

Fig. 1 The morphological characteristics of strain GAS1-1

A: PDA 培养基上的菌落; B: 分生孢子梗; C: 分生孢子。A: The colony on PDA medium; B: conidiophore; C: conidia.

2.1.2 菌株 GAS1-1 的 EF-1 α 和 rDNA-ITS 序列分析

经测序,菌株 GAS1-1 的 EF-1 α 和 ITS 片段长度分别为 341 bp 和 563 bp, GenBank 中注册登录号分别为 MH424921 和 MH424920。经与 GenBank 数据库中木霉菌 EF-1 α 序列比对,发现与短密木霉 (AB558910、AY857297、EU280061、EU280057、JQ040472、GU592404、HM234081、EU280056) 的相似性达 99%, 利用 DNASTar 软件构建系统发育树,发现菌株 GAS1-1 与上述菌株位于系统发育树的同一分支,其中与短密木霉 (EU280057) 的亲缘关系最近(图 2-a)。经在 GenBank 上比对,发现菌株 GAS1-1 的 rDNA-ITS 序列与短密木霉 (KX092002、

KC561068、KU851839、KC884785、HQ596986) 的相似性达 100%, 利用 DNASTar 软件构建系统发育树,发现菌株 GAS1-1 与上述菌株位于系统发育树的同一分支,聚为一类,其中与短密木霉 (KX092002、KC561068) 的亲缘关系最近(图 2-b)。

2.2 菌株 GAS1-1 对植物病原菌的抑菌效果

通过平板对峙培养,5 d 时短密木霉菌株 GAS1-1 对玉米穗腐病菌、玉米腐霉茎腐病菌、玉米镰孢茎腐病菌、葡萄灰霉病菌和棉花枯萎病菌的抑菌率分别为 61.67%、100.00%、66.86%、77.08% 和 67.86%, 表明短密木霉菌株 GAS1-1 对上述 5 种病原菌均有较好的抑制作用,对玉米腐霉茎腐病菌的抑菌效果最好。

2.3 短密木霉菌株 GAS1-1 的生物学特性

2.3.1 碳源和氮源对菌落生长和产孢的影响

短密木霉菌株 GAS1-1 可利用多种碳、氮源。在营养生长试验中,葡萄糖最能促进该菌株菌落生长,平均菌落直径为 56.83 mm,显著高于其它 6 种碳

源;其次为乳糖、麦芽糖和果糖;再次为甘露醇和淀粉;该菌株对蔗糖利用效果最差。在氮源利用中,以酵母膏的效果最好,菌株 GAS1-1 平均菌落直径为 38.17 mm;其次为天门冬酰胺、蛋白胨、硫酸铵、牛肉膏和硝酸钠,而尿素利用效果较差(表 1)。

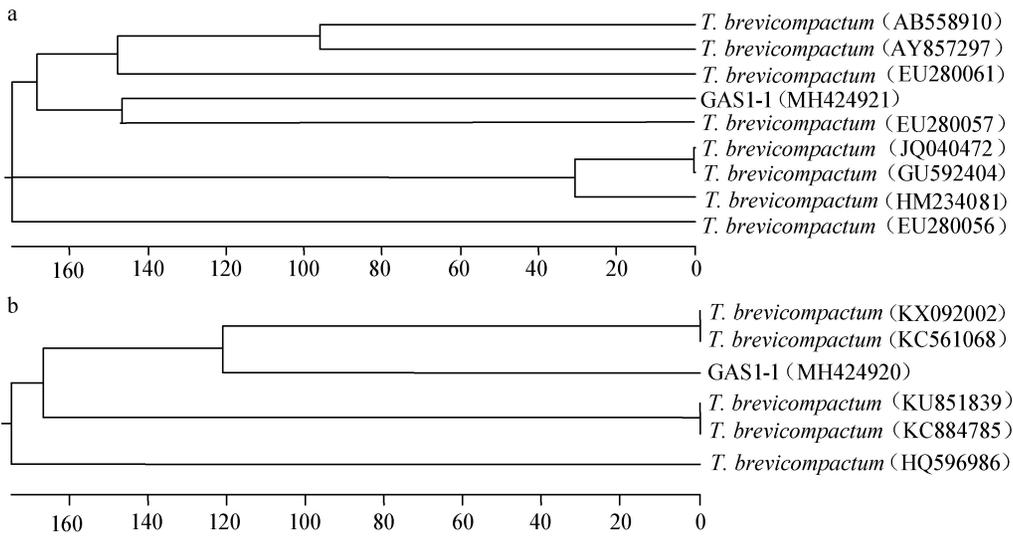


图 2 基于 EF-1 α (a)和 rDNA-ITS(b)序列构建菌株 GAS1-1 及其相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of isolate GAS1-1 and other related isolates based on EF-1 α (a) and rDNA-ITS (b) sequences

在碳源产孢试验中,发现葡萄糖和果糖最能促进菌株 GAS1-1 产孢,其中葡萄糖效果最好,平均产孢对数值为 10.00;其次为麦芽糖、甘露醇和乳糖;而蔗糖未

见促进产孢。在氮源产孢试验中,酵母膏效果最好,平均产孢对数值为 9.51;其次为蛋白胨、天门冬酰胺、硫酸铵、牛肉膏和硝酸钠,而尿素效果最差(表 1)。

表 1 碳源与氮源对菌株 GAS1-1 菌落生长和产孢的影响

Table 1 Effects of carbon and nitrogen sources on colony growth and sporulation quantity of strain GAS1-1

碳源 Carbon source	菌落直径 Colony growth (mm)	产孢量对数值 Common logarithm of sporulation	氮源 Nitrogen source	菌落直径 Colony growth (mm)	产孢量对数值 Common logarithm of sporulation
葡萄糖 Dextrose	56.83±0.73 a	10.00±0.01 a	天门冬酰胺 Asparagine	36.00±0.58 b	8.91±0.05 b
蔗糖 Sucrose	18.17±2.62 c	0.00±0.00 g	牛肉膏 Beef extract	32.00±0.58 c	8.59±0.04 cd
麦芽糖 Maltose	45.50±0.58 b	9.68±0.02 c	酵母膏 Yeast extract	38.17±1.88 a	9.51±0.01 a
乳糖 Lactose	48.33±0.93 b	9.40±0.01 e	硝酸钠 Sodium nitrate	23.33±0.88 d	8.51±0.03 de
果糖 Fructose	45.50±0.76 b	9.90±0.01 b	硫酸铵 Ammonium sulfate	32.50±0.29 c	8.66±0.03 c
甘露醇 Mannitol	35.17±2.89 c	9.55±0.01 d	蛋白胨 Peptone	35.33±0.33 b	8.98±0.02 b
淀粉 Starch	29.67±0.67 d	8.47±0.04 f	尿素 Urea	2.83±0.17 e	8.47±0.04 e

表中数据为平均数±标准差。同列不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3.2 温度对菌落生长和产孢的影响

菌株 GAS1-1 对温度的适应范围较广,除在 5℃ 和 10℃ 下培养 2 d 未见生长外,菌丝在 15~35℃ 均可生长,最适生长温度为 30℃,其次为 25℃,平均菌落直径分别为 56.80 mm 和 44.30 mm;当温度高于 35℃ 时菌落生长速率明显下降(图 3-A)。在温度产孢试验中,发现菌株 GAS1-1 适宜产孢温度范围为

10~35℃,其中最适产孢温度为 25℃,平均产孢对数值为 9.99,低于 5℃ 未见产孢(图 3-B)。

2.3.3 pH 对菌落生长与产孢量的影响

pH 3 时 PDA 平板不凝固, pH 4 时 PDA 平板凝固较差。菌株 GAS1-1 对酸碱度适应范围较广,在 pH 5~10 范围内均可生长,但以 pH 5 时菌落生长速度最快,平均菌落直径为 58.00 mm。随着 pH 的升

高,菌丝生长速度开始下降(图4-A)。在pH 5时,该菌株产孢量最高,平均产孢对数值为10.28。但在其它pH处理条件下,产孢量逐渐下降,差异显著(图4-B)。

在其它pH处理条件下,产孢量逐渐下降,差异显著(图4-B)。

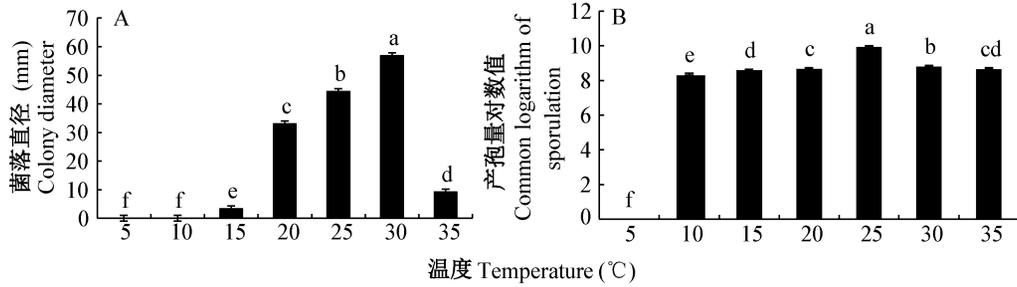


图3 温度对菌株 GAS1-1 菌落生长和产孢量的影响

Fig. 3 Effects of temperature on colony growth and sporulation quantity of strain GAS1-1

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在P<0.05水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference at P<0.05 level by Duncan's new multiple range test.

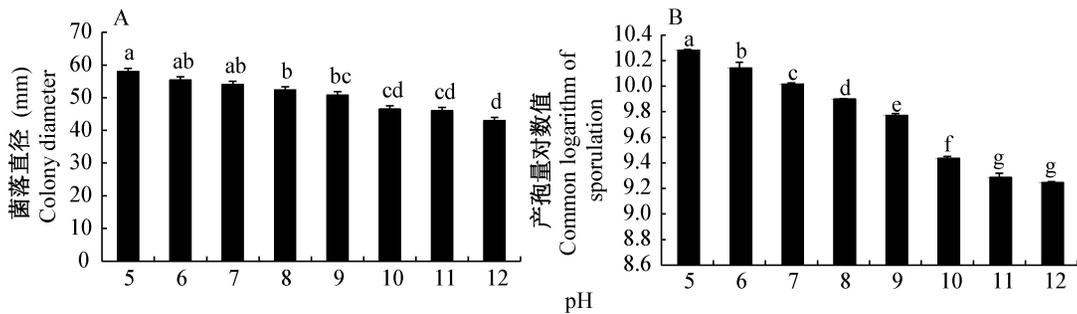


图4 pH对菌株 GAS1-1 菌丝营养生长和产孢量的影响

Fig. 4 Effects of pH values on colony growth and sporulation quantity of strain GAS1-1

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在P<0.05水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference at P<0.05 level by Duncan's new multiple range test.

2.3.4 光照对菌落生长和产孢量的影响

菌株 GAS1-1 对光照条件要求不太严格,在完全黑暗、12 h光暗交替处理和24 h连续光照培养2 d时,

菌落直径存在显著差异,完全黑暗处理显著高于其它2个处理,平均菌落直径为56.83 mm(图5-A)。另外,不同光照处理下对产孢影响存在显著差异(图5-B)。

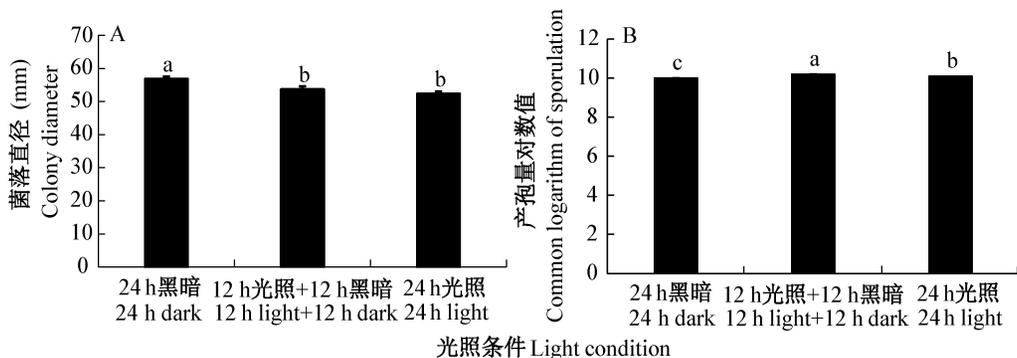


图5 光照对菌株 GAS1-1 菌落生长及产孢量的影响

Fig. 5 Effects of light on mycelium growth and sporulation quantity of strain GAS1-1

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在P<0.05水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters on the bars indicate significant difference at P<0.05 level by Duncan's new multiple range test.

2.3.5 菌株 GAS1-1 分生孢子的致死温度

菌株 GAS1-1 分生孢子在70~80℃处理10 min

后不能萌发,但在40~65℃条件下能萌发。当温度控制在66、67和68℃时,分生孢子仍能萌发(5 d),

但在 69℃ 温度下未观察到有分生孢子萌发,也未见形成菌落,表明该菌株分生孢子的致死温度为 69℃, 10 min。

3 讨论

本研究在形态学鉴定方面主要参考杨合同(2009)的木霉鉴定方法,种间形态学鉴定主要依据产孢区的形状,分生孢子梗的分枝方式及大小,瓶梗的着生方式、形状、大小和数量,分生孢子的形状、大小和培养基上菌落的培养性状和特征进行鉴别。Kopchinskiy et al. (2005) 报道短密木霉在形态学上易与哈茨木霉 *T. harzianum* 混淆,利用 EF-1 α 和 rDNA-ITS 进行联合比对可作为木霉菌种间鉴定的重要依据。因此,本研究经查阅资料和形态比对发现,前者分生孢子呈卵圆形,且光滑,而后者呈球形,表面有刺;同时也采用 EF-1 α 和 rDNA-ITS 序列分析作为联合鉴别手段,提高了鉴定结果的准确性。

林润泽(2016)通过平板对峙培养,筛选出 1 株短密木霉对灰葡萄孢霉菌抑菌效果较好,6 株短密木霉对尖孢镰孢具有较好的抑菌效果,抑菌率均达 75% 以上;吴紫燕等(2017)利用 2 株短密木霉的液体发酵液,对玉蜀黍赤霉菌 *Gibberella graminis*、黄瓜灰霉病菌 *B. cinerea*、小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis*、番茄早疫病病菌 *Alternaria solani* 和棉花枯萎病菌 *F. vasinfectum* 这 5 种植物病原菌的抑菌率达 72% 以上。上述研究表明,短密木霉具有较好的生防应用潜力。本研究也发现类似现象,短密木霉菌株 GAS1-1 对玉米镰孢茎腐病菌、玉米穗腐病菌、棉花枯萎病菌、玉米腐霉茎腐病菌和葡萄灰霉病菌 5 种植物病原真菌的抑菌率达 60% 以上,其中 5 d 后对玉米腐霉茎腐病菌的抑菌率达 100%, 5 d 后玉米腐霉茎腐病菌长势逐渐被削弱,菌落变的比较稀疏,边缘凹陷,短密木霉菌丝侵入玉米腐霉茎腐病菌内部,平板接种 7 d 时短密木霉菌丝向病原菌菌落内部扩展数量迅速增加,玉米腐霉茎腐病菌可被短密木霉完全覆盖,并且伴有绿色孢子堆的产生,表明该菌株对玉米腐霉茎腐病菌的拮抗能力较强。另外,发现该菌株对葡萄灰霉病菌的抑菌效果为 77.08%, 与王勇等(2012)、康萍芝等(2007)和林润泽(2016)的研究结果相似。

通过对短密木霉菌株 GAS1-1 生物学特性的研究,发现该菌株可利用的碳、氮源较多,但葡萄糖和酵母膏最有利于其营养生长和产孢,显著优于其它碳源或氮源,这与杨兴堂(2016)对短密木霉菌株

Tb-50 的研究结果类似。本研究发现该菌株营养生长的最佳条件为:30℃ 和完全黑暗条件下营养生长最快,25℃ 和光暗交替有利于产孢。试验结果显示,短密木霉菌株 GAS1-1 喜欢偏酸性环境,与杨合同(2009)结论较为一致。本研究还发现该菌株的致死温度为 69℃, 10 min,表明该菌株具有一定的耐高温性,与郭成等(2016)对俄罗斯木霉 *T. rossicum* 耐高温的研究结果较一致。这可能与 2 株菌株都来自景泰县有关,景泰县位于甘肃省中部,地处黄土高原与腾格里沙漠过渡地带,夏季温度极高。特殊的生境决定了来自该地区的菌株在生物学特性方面有一定的差异,特别是在耐高温上存在特异性(郭成等, 2016)。

本研究结果表明,短密木霉菌株 GAS1-1 对多种植物病原菌具有生物防治潜力,特别是对于由玉米腐霉茎腐病菌引起的植物病害防治效果更好。但关于该菌株对植物病原菌的作用机制以及在田间实际应用还有待于深入研究。

参 考 文 献 (References)

- Bae H. 2011. *Trichoderma* species as abiotic and biotic stress quenchers in plants. *Research Journal of Biotechnology*, 6(3): 73-79
- Burmeister L, Hau B. 2009. Control of the bean rust fungus *Uromyces appendiculatus* by means of *Trichoderma harzianum*: leaf disc assays on the antibiotic effect of spore suspensions and culture filtrates. *BioControl*, 54(4): 575-585
- Carbone I, Kone LM. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3): 553-556
- Dawidziuk A, Popiel D, Kaczmarek J, Strakowska J, Jedryczka M. 2016. Optimal *Trichoderma* strains for control of stem canker of brassicas: molecular basis of biocontrol properties and azole resistance. *BioControl*, 61(6): 755-768
- Fang ZD. 1998. Study method of plant disease (3rd edition). Beijing: China Agriculture Press, pp. 122-137 (in Chinese) [方中达. 1998. 植物研究方法(第3版). 北京: 中国农业出版社, pp. 122-137]
- Harman GE, Petzoldt R, Comis A, Chen J. 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 94(2): 147-153
- Ghisalberti EL. 2002. Anti-infective agents produced by the hyphomycetes genera *Trichoderma* and *Gliocladium*. *Current Medicinal Chemistry*, 1(4): 343-374
- Gu ZM, Bi H. 2016. Influence factors of control efficacy against cucumber *Fusarium* wilt with *Trichoderma longibrachiatum*. *Agrochemicals*, 55(1): 58-60 (in Chinese) [谷祖敏, 毕卉. 2016. 长枝

- 木霉 THLJ 菌株防治黄瓜枯萎病影响因素分析. 农药, 55(1): 58-60]
- Guo C, Zhang XR, Zhang JG, Li MQ, Xu SJ, Wang TY. 2016. Biological characteristics of *Trichoderma rossicum* strain GAU 1-X-2. Pratacultural Science, 33(12): 2391-2397 (in Chinese) [郭成, 张新瑞, 张军高, 李敏权, 徐生军, 王天玉. 2016. 俄罗斯木霉菌株 GAU 1-X-2 的生物学特性. 草业科学, 33(12): 2391-2397]
- Kang PZ, Zhang LR, Shen RQ. 2007. Antagonism of eleven *Trichoderma* species against *Botrytis cinerea* in grape. Chinese Agricultural Science Bulletin, 23(8): 392-395 (in Chinese) [康萍芝, 张丽荣, 沈瑞清. 2007. 11 种木霉菌对葡萄灰霉病菌的拮抗作用. 中国农学通报, 23(8): 392-395]
- Kopchinskiy A, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS. 2005. Tricho BLAST: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. Mycological Research, 109(6): 658-660
- Krauss U, Soberanis W. 2002. Effect of fertilization and biocontrol application frequency on cocoa pod disease. Biological Control, 24(1): 82-89
- Li SP, Cui LL, Cheng JS, Chen T, Fu YP, Xie JT. 2018. Assessment of two *Trichoderma harzianum* strains for biocontrol against rice sheath blight and growth promotion of rice. Acta Phytopathologica Sinica, 48(1): 98-107 (in Chinese) [李松鹏, 崔琳琳, 程家森, 陈桃, 付艳苹, 谢甲涛. 2018. 两株哈茨木霉菌株防治水稻纹枯病及促进水稻生长的潜力研究. 植物病理学报, 48(1): 98-107]
- Lin RZ. 2016. Northeast farmland *Trichoderma* identification, evaluation and cellulose activity optimization of fermentation conditions. Master Thesis. Shenyang: Shenyang Agricultural University (in Chinese) [林润泽. 2016. 东北农田木霉菌的鉴定、酶活评价及其纤维素酶发酵工艺. 硕士学位论文. 沈阳: 沈阳农业大学]
- Liu LN, Tu YL, Zhang JZ. 2010. Biocontrol potential of *Trichoderma virens* strain TY009 against rice sheath blight and other main fungal diseases. Scientia Agricultura Sinica, 43(10): 2031-2038 (in Chinese) [刘路宁, 屠艳拉, 张敬泽. 2010. 绿木霉菌株 TY009 防治纹枯病等水稻主要真菌病害的潜力. 中国农业科学, 43(10): 2031-2038]
- Qin WT, Chen K, Zhuang WY. 2016. Five *Trichoderma* species new to China and notes on two other widespread species. Mycosystema, 35(8): 994-1007 (in Chinese) [秦文韬, 陈凯, 庄文颖. 2016. 木霉属 5 个中国新记录种及 2 种木霉在中国的新分布. 菌物学报, 35(8): 994-1007]
- Saravanan K, Yu CJ, Dou K, Wang M, Li YQ, Chen J. 2016. Synergistic effect of *Trichoderma*-derived antifungal metabolites and cell wall degrading enzymes on enhanced biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Biological Control, 94(23): 37-46
- Shi FY, Zhu YP, Yang WL. 2005. Studies on antagonism of *Trichoderma longibrachiatum* against *Rhizoctonia solania* in rice. Chinese Agricultural Science Bulletin, 21(2): 264-265, 271 (in Chinese) [史凤玉, 朱英波, 杨文兰. 2005. 长枝木霉 T8 对水稻纹枯病菌拮抗的作用研究. 中国农学通报, 21(2): 264-265, 271]
- Wang F. 2006. Studies on the antagonistic mechanism, promotion and preparation of *Trichoderma aureoviride*. Master Thesis. Lanzhou: Gansu Agricultural University (in Chinese) [王芳. 2006. 深绿木霉的拮抗机理、促生作用及制剂加工研究. 硕士学位论文. 兰州: 甘肃农业大学]
- Wang Y, Wang WL, Huo JF, Liu CY, Hao YJ. 2012. The screen of the antagonism of *Trichoderma* spp. against *Botrytis cinerea* and sequence analysis of translation elongation factor. Chinese Agricultural Science Bulletin, 28(9): 209-213 (in Chinese) [王勇, 王万立, 霍建飞, 刘春艳, 郝永娟. 2012. 灰葡萄孢霉高效拮抗木霉菌株的筛选及其翻译延伸因子序列分析. 中国农学通报, 28(9): 209-213]
- Weindling R. 1932. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. Phytopathology, 22: 837-845
- Wu ZY, Shen SL, Mi F, Mao WL. 2017. Diversity and antagonizing effects of *Trichoderma* spp. in crop rhizosphere soils. Journal of Fungal Research, 15(3): 177-182, 187 (in Chinese) [吴紫燕, 沈少力, 糜芳, 毛伟力. 2017. 作物根围土壤木霉菌物种多样性及其体外拮抗病原菌效应. 菌物研究, 15(3): 177-182, 187]
- Yang HT. 2009. Classification and identification of *Trichoderma*. Beijing: China Earth Press, pp. 1-389 (in Chinese) [杨合同. 2009. 木霉分类与鉴定. 北京: 中国大地出版社, pp. 1-389]
- Yang XT. 2016. The identification, biological characteristics and inhibitive effect of soil-borne pathogenic fungi of three kinds of *Trichoderma* spp. and the growth-promoting on *Impatiens balsamina*. Master Thesis. Harbin: Northeast Forestry University (in Chinese) [杨兴堂. 2016. 3 株木霉菌的鉴定、生物学特性和抑菌能力及其对凤仙花的促生作用. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北林业大学]
- Zhang SW, Gan YT, Xu BL. 2014. Efficacy of *Trichoderma longibrachiatum* in the control of *Heterodera avenae*. BioControl, 59(3): 319-331
- Zhu TH, Xing XP, Sun SD. 2004. The antagonism mechanism and diseases control trials of *Trichoderma* strain T₉₇ against several plant fungal pathogens in greenhouse. Journal of Plant Protection, 31(2): 139-144 (in Chinese) [朱廷恒, 邢小平, 孙顺娣. 2004. 木霉 T₉₇ 菌株对几种植物病原真菌的拮抗作用机制和温室防治试验. 植物保护学报, 31(2): 139-144]
- Zhu ZX, Zhuang WY. 2014. Current understanding of the genus *Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycota). Mycosystema, 33(6): 1136-1153 (in Chinese) [朱兆香, 庄文颖. 2014. 木霉属研究概况. 菌物学报, 33(6): 1136-1153]

(责任编辑:王璇)