

洛阳地区烟田土壤木霉菌的分离鉴定 及其拮抗作用测定

田艳艳¹,赵世民²,李 彰²,江 凯²,康业斌^{1*}

(1. 河南科技大学 林学院,河南 洛阳 471003; 2. 河南省烟草公司 洛阳市烟草公司,河南 洛阳 471023)

摘要: 为了明确洛阳地区烟田土壤中拮抗木霉的种类,以洛阳市嵩县、洛宁县和汝阳县烟草不同生育时期的烟田土壤为样本,用平板稀释法分离获得 24 个木霉菌株。根据形态学特征结合 ITS 序列分析,将其鉴定为哈茨木霉(*Trichoderma harzianum* Rifai)、绒毛木霉(*Trichoderma tomentosum* Bissett, Kubicek & Szakacs)、毛簇木霉(*Trichoderma velutinum* Bissett, Kubicek & Szakacs)、棘孢木霉(*Trichoderma asperellum* Samuels)和深绿木霉(*Trichoderma atroviride* Karsten),其中哈茨木霉为优势种。通过平板对峙法测定木霉菌对烟草疫霉、瓜果腐霉和尖孢镰刀菌的拮抗作用,结果表明,哈茨木霉、棘孢木霉和深绿木霉对尖孢镰刀菌、烟草疫霉、瓜果腐霉均有较好的拮抗效果,毛簇木霉对烟草疫霉和尖孢镰刀菌有较好的拮抗效果,绒毛木霉对烟草疫霉和瓜果腐霉有较好的拮抗效果。

关键词: 烟田土壤; 木霉菌; 形态鉴定; 分子鉴定; 烟草病害; 拮抗作用

中图分类号: S435.72;S476 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)11-0079-06

Isolation and Identification of *Trichoderma* from Tobacco Growing Soil of Luoyang and Determination of Their Inhibition Effects

TIAN Yanyan¹, ZHAO Shimin², LI Zhang², JIANG Kai², KANG Yebin^{1*}

(1. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China;

2. Luoyang Tobacco Company of Henan Province, Luoyang 471023, China)

Abstract: In order to identify the variety of antagonistic *Trichoderma* in soil of tobacco plants in Luoyang region, the soils of tobacco fields from Songxian, Luoning and Ruyang were sampled at different stages during tobacco growing period. Twenty four isolates of *Trichoderma* were obtained by plate dilution method. Through the identification based on morphology and analysis of rDNA-ITS sequence, these isolates were identified as five species, namely *Trichoderma harzianum* Rifai, *Trichoderma tomentosum* Bissett, Kubicek & Szakacs, *Trichoderma velutinum* Bissett, Kubicek & Szakacs, *Trichoderma asperellum* Samuels and *Trichoderma atroviride* Karsten, of which *Trichoderma harzianum* Rifai was a super *Trichoderma* species from the soil of tobacco plants in Luoyang. Their inhibition effects were tested via the method of confrontation on PDA against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hean) Toker, *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick and *Fusarium oxysporum* Schlecht, and the result showed that *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma asperellum* had good inhibition against all the three tobacco pathogens, *Trichoderma velutinum* had good inhibition against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Fusarium oxysporum*, while *Trichoderma tomentosum* had good inhibition against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Pythium aphanidermatum*.

Key words: soil of tobacco field; *Trichoderma*; morphological identification; molecular identification; tobacco diseases; inhibition effect

收稿日期:2015-04-24
基金项目:河南省烟草公司科技项目(2012M10);洛阳市烟草公司项目(2014M06)
作者简介:田艳艳(1987-),女,河南新乡人,在读硕士研究生,研究方向:植物免疫。E-mail:15138751943@163.com
* 通讯作者:康业斌(1964-),男,河南南阳人,教授,博士,主要从事植物免疫研究。E-mail:kangyb999@163.com

木霉 (*Trichoderma*) 是一类分布广泛的土壤习居菌,前人研究表明,该属的一些种对植物多数病原菌具有寄生或拮抗作用,可用于防治由疫霉菌 (*Phytophthora*)、腐霉菌 (*Phythium*)、镰刀菌 (*Fusarium* spp.)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、齐整小核菌 (*Sclerotium rolfsii*) 等引起的植物病害^[1-3]。木霉由于广泛的适应性、产生拮抗物的多样性和寄生的广谱性,作为生物防治的优势菌,在植物病害生物防治中的应用越来越受到重视。豫西地区为河南省主要产烟区,多年连作使烤烟土传病害发生严重。本研究对洛阳地区烟田土壤木霉菌进行分离鉴定,并测定其对烟草主要土传真菌病害的拮抗作用,为进一

步研究木霉菌的生防价值提供参考。

1 材料和方法

1.1 土样采集

2013 年 5—9 月,在河南省洛阳市的嵩县、汝阳县、洛宁县,选择植烟 1~3 a、4~6 a 及 6 a 以上的田块各 1 块。分别在烤烟的苗期、团棵期、旺长期以及采收期取样(表 1)。取样时每块田随机选取 5 个点,去除表层 3 cm 的土壤,用取土器取出 3~20 cm 土壤,混匀后按照四分法保留样品,带回实验室后挑出根系、砂砾等杂物,在室内风干,过孔径 840 μm 筛备用。

表 1 洛阳烟田土壤木霉菌分离土样基本信息

采样地点	样品代号	连作年限/a	烟草品种	经度	纬度	海拔高度/m
嵩县南安村	SM1、ST1、SW1、SC1	1	豫烟 9 号	112°09′01″	34°16′56″	464.54
嵩县张庄村	SM3、ST3、SW3、SC3	4	优选一号	112°08′55″	34°17′59″	489.47
嵩县杨湾村	SM6、ST6、SW6、SC6	9	秦烟 96	112°10′23″	34°18′12″	436.41
洛宁王窑村	LM1、LT1、LW1、LC1	1	中烟 100	111°38′58″	34°25′53″	546.87
洛宁王村	LM3、LT3、LW3、LC3	5	龙江 981	112°26′09″	34°11′05″	563.75
洛宁祝家园村	LM6、LT6、LW6、LC6	26	地方品种	111°35′40″	34°27′14″	605.81
汝阳张河村	RM1、RT1、RW1、RC1	3	秦烟 96	112°26′08″	34°11′06″	470.16
汝阳张河村	RM3、RT3、RW3、RC3	5	秦烟 96	112°26′09″	34°11′05″	476.20
汝阳张河村	RM6、RT6、RW6、RC6	7	秦烟 96	112°25′46″	34°11′10″	489.18

注:S. 嵩县; L. 洛宁; R. 汝阳; M. 苗期; T. 团棵期; W. 旺长期; C. 采收期。下同

1.2 土壤木霉菌的分离

1.2.1 土壤悬浮液的制备 在无菌操作台上,称取 1 g 土样加入盛有 99 mL 无菌水和无菌玻璃珠的三角瓶中,在振荡器上振荡 30 min,使土样均匀分散在稀释液中,制成 10⁻² 土壤悬浮液。用无菌枪头吸取 0.5 mL 的土壤悬浮液注入盛有 4.5 mL 无菌水的试管中,振荡摇匀依次制成 10⁻³、10⁻⁴ 土壤悬浮液。

1.2.2 木霉的分离与纯化 选择马丁氏培养基^[4]按照平板稀释法分离。待培养 5 d 长出肉眼可识别的菌落后,挑取单个菌落至 PDA 平板上 25 ℃ 光/暗 (12 h/12 h) 条件下进一步纯化培养,依据菌落特征与生长速率进行分组。

1.3 木霉菌的鉴定

1.3.1 形态学鉴定 菌株在 PDA 培养基上培养至菌落接近培养皿边缘时,挑取培养菌丝制作临时水

玻片,在光学显微镜下观察记录分生孢子梗、分生孢子的形状并拍照。

1.3.2 分子生物学鉴定 刮取培养 5~7 d 的菌丝体约 50 mg,采用 CTAB 法^[5-6]提取基因组 DNA。利用通用引物 ITS5 (5′ - GGAAGTAAAAGTCGTAA-CAAGG - 3′) 和 ITS4 (5′ - TCCTCCGCTTATT-GATATGC - 3′) 对所提取的 DNA 进行 PCR 扩增,反应在 25 μL 体系中进行。PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,46 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 ℃ 充分延伸 10 min,扩增产物在 4 ℃ 条件下保存。取 5 μL 扩增产物,与 1 μL loading buffer 混匀,加入 1% 琼脂糖凝胶孔中,用 DNA Marker 作对照,在 1×TAE 电泳缓冲液中电泳,以凝胶成像系统检测 PCR 扩增产物大小。观察到合适的条带后,将所对应的原始扩增产物(未纯

化)40 μL 送往生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 比对,并使用 ClustalX(1.83)软件对测定序列进行校准,利用 MAGA 5 软件^[7]以距离法^[8]构建系统发育树。

1.4 木霉对植物病原菌拮抗作用的测定

供试病原菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht)、烟草疫霉菌[*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hean) Toker]、瓜果腐霉[*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick],分别从感染烟草枯萎病、烟草黑胫病和烟草猝倒病的材料上分离,由河南科技大学植物免疫学实验室提供。

将木霉与尖孢镰刀菌、烟草疫霉菌在 PDA 培养基上活化 5 d 后,用直径 6 mm 的打孔器打取木霉菌、尖孢镰刀菌、烟草疫霉菌的菌饼,在距离 PDA 平板中心 2.5 cm 的相对点上分别接种木霉菌和尖孢镰刀菌以及木霉菌和疫霉菌,以不接木霉菌、只接尖孢镰刀菌和只接疫霉菌的 PDA 平板为对照,置于 25 ℃ 恒温箱中培养,每个处理重复 3 次。接种后第 2 天逐日测量两接种点连线上尖孢镰刀菌及烟草疫霉菌的菌落半径,直到两菌落半径不再变化,计算抑菌率。并观察是否有抑菌圈产生,若产生抑菌圈测

量其宽度。

将木霉与瓜果腐霉接种在 PSA 培养基上培养 5 d 后,用直径 6 mm 的打孔器分别打取菌饼,在距离 PSA 平板中间 2.5 cm 处先接种木霉菌,48 h 后在相对位置上接种瓜果腐霉,置于 25 ℃ 恒温箱中培养,接种后逐日测量两接种点连线上腐霉的半径及抑菌圈的大小,计算抑菌率,每个处理重复 3 次。

抑菌率 = (病原菌对照菌落半径 - 病原菌指向木霉菌半径) / 病原菌对照菌落半径 × 100%

拮抗系数分级标准^[9]: I 级,木霉菌丝占平皿的 100%; II 级,木霉菌丝占平皿的 2/3 以上; III 级,木霉菌丝占平皿的 1/3 ~ 2/3; IV 级,木霉菌丝占平皿的 1/3 以下; V 级,病原菌丝占平皿的 100%。

2 结果与分析

2.1 土壤木霉菌的分离结果

通过对 36 份土壤样品的分离共获得 24 株木霉菌,其中旺长期烟田分离出的菌株数量最多,达到 10 株,苗期和采收期的最少(表 2)。依据木霉菌在 PDA 培养基上培养 5 d 的菌落特征及生长速率,将分离的木霉菌分为 7 组。

表 2 分离获得的木霉菌株

菌株编号	菌株来源	采样时期	菌株编号	菌株来源	采样时期
S1 - 1	嵩县南安	苗期	R1 - 13	汝阳张河	采收期
S1 - 2	嵩县南安	苗期	R3 - 14	汝阳张河	苗期
S1 - 3	嵩县南安	苗期	R3 - 15	汝阳张河	旺长期
S1 - 4	嵩县南安	团棵期	R3 - 16	汝阳张汝	旺长期
S1 - 5	嵩县南安	团棵期	R3 - 17	汝阳张河	旺长期
S1 - 6	嵩县南安	旺长期	R6 - 18	汝阳张河	旺长期
S1 - 7	嵩县南安	旺长期	L1 - 19	洛宁王窑	采收期
S1 - 8	嵩县南安	旺长期	L1 - 20	洛宁王窑	团棵期
S3 - 9	嵩县张庄	团棵期	L1 - 21	洛宁王窑	采收期
S6 - 10	嵩县杨湾	旺长期	L6 - 22	洛宁祝家园	团棵期
S6 - 11	嵩县杨湾	旺长期	L6 - 23	洛宁祝家园	团棵期
R1 - 12	汝阳张河	采收期	L6 - 24	洛宁祝家园	旺长期

注:字母后边紧接的数字 1、3、6 分别代表植烟 1~3 a、4~6 a 和 6 a 以上的烟田。

第 1 组:菌落先产生白色菌丝,菌丝棉絮状,3 d 后菌落从接种点开始变为绿色,老熟时为暗绿色,菌落背面黄绿色,包含 S1 - 1、S1 - 6、L1 - 19 三个菌株,挑选 S1 - 6 为代表菌株。

第 2 组:菌落先产生白色菌丝,后来从接种点处变绿,3 d 后菌落长满全皿,菌丝棉絮状,菌落中间深绿色向外逐渐变浅,外围白色,背面深黄绿色,包含 S1 - 2、S1 - 3、S1 - 4、S1 - 5、S6 - 10、S6 - 11、R3 - 15、R3 - 16、R6 - 18,挑选 R3 - 15 为代表菌株。

第 3 组:菌落外围菌丝白色,菌丝较少,中间绿

色,菌丝较多,棉絮状,后期菌落表面呈颗粒状,菌落变成墨绿色,菌落背面接种点处黄绿色,外围浅绿色,包含 L1 - 20。

第 4 组:菌丝较细,丛毛状,初为白色,后逐渐呈现浅绿色,菌落反面灰白色。包含 S1 - 7、S1 - 8、S3 - 9、L6 - 22、L6 - 23、L6 - 24,挑选 S1 - 7 为代表菌株。

第 5 组:菌落生长较快,25 ℃ 培养 72 h 菌落直径达到 8.5 cm 以上,菌落中间深绿色,到后期菌落表面有缠绕的白色菌丝,背面奶白色,包含 R1 - 12、R1 - 13,挑选 R1 - 12 为代表菌株。

第 6 组:菌落生长迅速,4 d 后直径达 8 cm 以上,老熟时呈暗黄色,包含 R3 - 14、R3 - 17,挑选 R3 - 14 为代表菌株。

第 7 组:菌落生长较快,气生菌丝卷毛状,白色至灰绿色,产孢簇呈同心轮纹状排列,产孢簇表面为毛发状,菌落反面为暗黄色,包含 L1 - 21。

2.2 木霉菌的鉴定结果

2.2.1 形态学鉴定 S1 - 6、R3 - 15 和 L1 - 20 菌株分生孢子梗和分生孢子相似。分生孢子梗初级分枝几乎呈直角,或稍微向上弯曲,二级分枝复杂,呈旋涡状排列,整个结构类似于金字塔形状,终极分枝多数为单细胞;瓶梗坛型;分生孢子球形或近球形,与哈茨木霉的形态特征相似^[10-11]。

L1 - 21 菌株分生孢子梗透明,基部粗,逐渐变细,初级分枝短,有 2 ~ 4 个细胞,呈旋涡状排列;终极分枝多数为单细胞,膨大或者桶形;分生孢子阔椭圆形,与绒毛木霉的形态特征相似^[10-11]。

S1 - 7 菌株的分生孢子梗在近基部位置的分枝一般成对,或者 3 个排列成轮状,接近顶部的位置一般对生或单生,分枝较短;瓶梗安瓿型,具有一个较细的颈部,轮枝状或者不规则排列;分生孢子椭圆形,与毛簇木霉的形态特征相似^[10-11]。

R1 - 12 菌株分生孢子梗产生成对的侧生分枝;瓶梗呈旋涡状排列,每一组一般具有 3 ~ 4 个瓶梗;分生孢子球形,与棘孢木霉形态特征相似^[10-11]。

R3 - 14 菌株分生孢子梗成对着生,分枝角度近 90°;瓶梗形状多样;分生孢子绿色,亚球形至卵圆形,与深绿木霉的形态特征相似^[10-11]。

2.2.2 分子生物学鉴定 对木霉菌株进行 PCR 扩增后得到了 550 bp 左右的条带。将 PCR 产物测序后,共获得 5 种不同的序列,经过整合后获得的序列长度分别为 550、553、553、534、539 bp。在 GenBank 上比对结果表明,S1 - 6、R3 - 15 和 L1 - 20 菌株与登录号为 KJ755188.1 (*Trichoderma harzianum* Rifai) 等的 ITS 序列同源性达 90.87% 以上,L1 - 21 菌株与登录号为 KC155357.1 (*Trichoderma tomentosum* Bissett, Kubicek & Szakaes) 等的 ITS 序列同源性达到 97.49% 以上,S1 - 7 菌株与序列号 DQ083010.1 (*Trichoderma velutinum*) 等的 ITS 序列同源性达到 94.59% 以上,R1 - 12 菌株与序列号为 KJ588236.1 (*Trichoderma asperellum* Samuels) 等的 ITS 序列的同源性达到 96.45% 以上,R3 - 14 菌株与序列号 AF501329.1 (*Trichoderma atroviride* Karsten) 等的 ITS 序列同源性达到 94.31% 以上。

待鉴定菌株和相关序列构建的系统发育树

(图 1) 也表明,S1 - 6、R3 - 15 和 L1 - 20 菌株与 *Trichoderma harzianum* 有较近的亲缘关系,L1 - 21 菌株与 *Trichoderma tomentosum* 有较近的亲缘关系,S1 - 7 菌株与 *Trichoderma velutinum* 有较近的亲缘关系,R1 - 12 菌株与 *Trichoderma asperellum* 有较近的亲缘关系,R3 - 14 菌株与 *Trichoderma atroviride* 有较近的亲缘关系。结合形态学鉴定结果,将 S1 - 6、R3 - 15 和 L1 - 20 菌株鉴定为哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum* Rifai), L1 - 21 菌株鉴定为绒毛木霉 (*Trichoderma tomentosum* Bissett, Kubicek & Szakaes), S1 - 7 菌株鉴定为毛簇木霉 (*Trichoderma velutinum* Bissett, Kubicek & Szakaes), R1 - 12 菌株鉴定为棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum* Samuels), R3 - 14 菌株鉴定为深绿木霉 (*Trichoderma atroviride* Karsten)。

2.3 木霉菌对植物病原真菌的拮抗作用

本研究中测得的 7 个木霉菌株分属于 5 个不同的种,其中 S1 - 6、R3 - 15、L1 - 20 均为哈茨木霉,因此挑选 L1 - 20 作为哈茨木霉的代表菌株,与其他 4 个不同种的木霉菌株同时测定对植物病原菌的拮抗作用。

2.3.1 对烟草疫霉的拮抗作用 对峙培养 4 d 后,木霉菌开始对疫霉表现出抑制作用,形成了较明显的抑菌圈,后来木霉菌丝继续扩展,逐渐把疫霉菌菌落包围、覆盖,疫霉菌停止生长,抑菌圈也逐渐消失。有些木霉菌株和疫霉菌的抑菌圈则一直存在,且越来越明显,L1 - 20 菌株和疫霉菌的抑菌圈宽度达到了 7.6 mm,且疫霉菌菌落逐渐变黄,1 周后菌落基本被完全覆盖。R1 - 12 菌株的抑菌率最高,达到了 89.58%,且拮抗系数为 I 级(表 3);该菌株生长迅速,与病原菌接触后 2 d 内将病原菌完全覆盖。S1 - 7、R3 - 14 和 L1 - 21 菌株最终都呈现对抗生长的状态,抑菌圈不明显,在显微镜下可以观察到 R3 - 14 菌株的菌丝缠绕在疫霉菌菌丝上。

2.3.2 对瓜果腐霉的拮抗作用 接种腐霉后 24 h 两菌落开始接触,腐霉菌丝的生长受到抑制。R3 - 14、L1 - 20 菌株与病原菌接触的部位产生黄色的条带,且黄色条带逐渐变宽,5 d 后整个腐霉菌落基本上完全变成黄色。木霉继续生长,逐渐覆盖病原菌,1 周后基本完全覆盖病原菌的菌落。R1 - 12 菌株抑菌率最大,达 80.95%,拮抗系数达 I 级,该菌株生长最快,5 d 后将病原菌菌落完全覆盖。R3 - 14、L1 - 20、L1 - 21 三个菌株生长较为缓慢,对瓜果腐霉也均有不同程度的拮抗效果;S1 - 7 对瓜果腐霉无明显拮抗作用(表 4)。

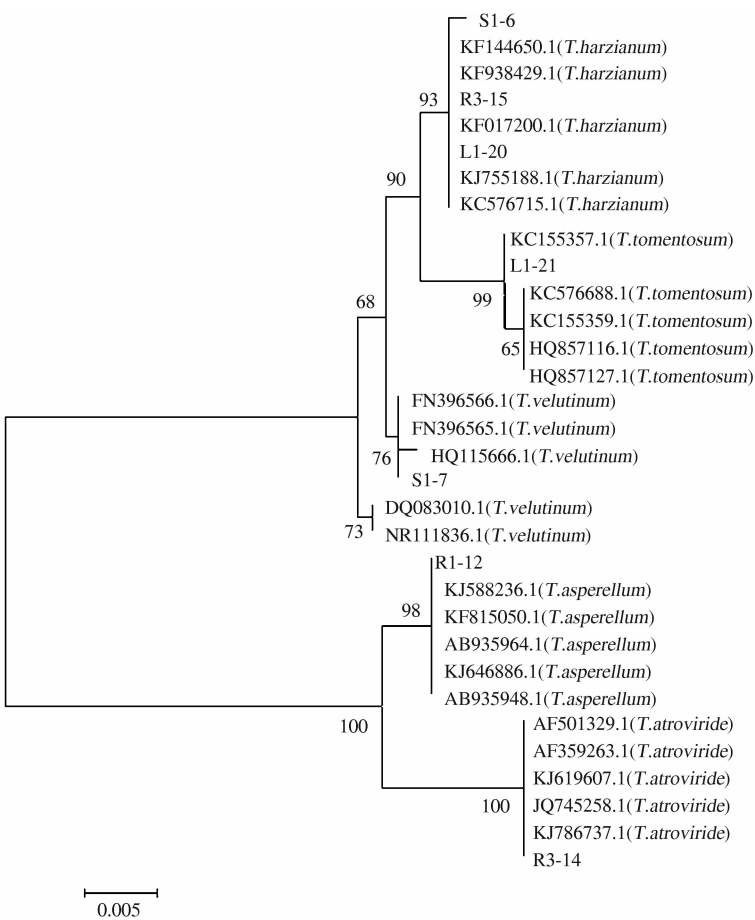


图 1 待鉴定菌株基于 ITS 序列的系统发育树

表 3 木霉菌对烟草疫霉的拮抗效果

菌株编号	抑菌率/%	拮抗系数	抑菌圈宽度/mm
S1 - 7	77.59	I ~ II	不明显
R1 - 12	89.58	I	不明显
R3 - 14	81.25	I ~ II	不明显
L1 - 20	82.98	I ~ II	7.6
L1 - 21	81.63	I ~ II	不明显

表 4 木霉菌对瓜果腐霉的拮抗效果

菌株编号	抑菌率/%	拮抗系数
S1 - 7	—	—
R1 - 12	80.95	I
R3 - 14	79.98	II
L1 - 20	76.92	I ~ II
L1 - 21	73.75	III

注：“—”表示无明显拮抗作用，下同。

2.3.3 对尖孢镰刀菌的拮抗作用 对峙培养 3 d 后木霉菌开始对尖孢镰刀菌表现出抑制作用,之后木霉继续扩展,逐渐把尖孢镰刀菌包围,被包围的病原菌停止生长,大部分木霉菌株与病原菌形成了较明显的抑菌圈。其中,R1 - 12 菌株覆盖病原菌生长,且覆盖部分越来越多,抑制作用最强,抑菌率达到 80.95%,抑菌圈宽度为 5.5 mm,拮抗系数为

I ~ II 级(表 5)。S1 - 7 和 L1 - 20 菌株边缘的病原菌菌丝枯萎、塌陷。R3 - 14 菌株边缘的病原菌菌丝干枯且干枯的条带逐渐变宽,与病原菌呈现对抗生长的状况。

表 5 木霉菌对尖孢镰刀菌的拮抗效果

菌株编号	抑菌率/%	拮抗系数	抑菌圈宽度/mm
S1 - 7	79.03	II	2.7
R1 - 12	80.95	I ~ II	5.5
R3 - 14	79.98	III	5.6
L1 - 20	70.31	III	4.9
L1 - 21	—	—	—

3 结论与讨论

本试验结果表明,洛阳烟田土壤中具拮抗作用的木霉菌为哈茨木霉、绒毛木霉、毛簇木霉、棘孢木霉和深绿木霉,其中哈茨木霉为优势种。哈茨木霉、棘孢木霉和深绿木霉对尖孢镰刀菌、疫霉菌、瓜果腐霉 3 种病原菌均有较好的拮抗效果。毛簇木霉只对烟草疫霉和尖孢镰刀菌有拮抗作用,绒毛木霉只对烟草疫霉和瓜果腐霉有拮抗作用。

传统的木霉鉴定方法是基于形态特征,但由于

木霉形态特征的可变性大^[10],而不同种间菌株形态又相似,在实际鉴定中分辨有很大的困难,因此在形态上难以进行分类^[12]。而核糖体 DNA(rDNA)内转录间隔区(ITS)的序列分析是鉴定种尤其是形态相似种的有力工具。本研究通过分子生物学技术与形态学鉴定相结合,使木霉的分类和鉴定更准确,对开发和利用洛阳地区木霉菌资源具有重要的理论价值和实际意义。

木霉属真菌广泛存在于土壤等多种基质中,因其许多种具有广泛的拮抗作用而备受关注^[13]。本研究广泛调查和筛选了洛阳地区烟田土壤中对烟草土传真菌病害具有生防作用的木霉菌株,依据 Rifia 分类系统^[14-15]并结合分子生物学鉴定,将具有拮抗作用的木霉菌株鉴定为哈茨木霉、绒毛木霉、毛簇木霉、棘孢木霉和深绿木霉,其中哈茨木霉是洛阳地区烟田土壤中分布最广泛的木霉种类。

前人报道棘孢木霉对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)^[16]、灰葡萄孢(*Botrytis cinera*)、苹果腐烂病菌(*Fusarium oxysporum*)和黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)^[17]有强烈的抑制作用,本研究发现在烟田土壤中分离的棘孢木霉对烟草枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht)、烟草黑胫病菌(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hean) Toker)和烟草猝倒病菌(*Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick)也有抑制作用。另外,本研究还发现,毛簇木霉对烟草疫霉和尖孢镰刀菌有较好的拮抗效果,绒毛木霉对烟草疫霉和瓜果腐霉有拮抗效果,在国内系首次报道。

木霉菌以其生长、繁殖速度快,能迅速占领生长空间,与病原菌具有强烈的竞争作用而成为拮抗效果很好的生防菌,其拮抗机制极为复杂和多样^[18-20],本研究仅通过对峙培养测定了其拮抗作用,至于其发酵液的抑菌活性、大田中的拮抗效果以及其拮抗机制都有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 袁佐清. 土壤中木霉的分离纯化以及对植物病原真菌的拮抗研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(5): 132-135.
- [2] 杨合同, 唐文华, Ryder M. 木霉菌与植物病害的生物防治[J]. 山东科学, 1999, 12(4): 7-15, 20.
- [3] 黄丽丹, 陈玉惠. 生防菌及相关生物技术 in 植物病害防治中的应用[J]. 西南林学院学报, 2006, 26(1): 85-89.
- [4] 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [5] Loh J P, Kiew R U, Kee A N, et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) provides molecular markers for the identification of *Caladium bicolor* cultivars [J]. Annals of Botany, 1999, 84(2): 155-161.
- [6] Chang Y K, Veilleux R E, Iqbal M J. Analysis of genetic variability among *Phalaenopsis* species and hybrids using amplified fragment length polymorphism [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2009, 134(1): 58-66.
- [7] 刘琳, 刘洋, 刘红娟. 基于 16S rDNA 的系统发育分析在微生物进化关系中的应用[J]. 生物学通报, 2008, 43(11): 4-6.
- [8] 冯思玲. 系统发育树构建方法研究[J]. 信息技术, 2009(6): 38-40.
- [9] Bell D K, Wells H D, Markham C R. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens [J]. Phytopathology, 1982, 72(4): 379-382.
- [10] 杨合同. 木霉分类与鉴定[M]. 北京: 中国大地出版社, 2009.
- [11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [12] 孙军, 段玉玺, 吕国忠. 辽宁木霉属(*Trichoderma*)真菌的形态分类研究[J]. 菌物研究, 2006, 4(2): 38-44.
- [13] 张茹, 李金花, 柴兆祥, 等. 甘肃河西马铃薯根际生防木霉菌对接骨木镰刀菌的拮抗筛选及鉴定[J]. 草业学报, 2009, 18(2): 138-145.
- [14] Rifia M A. A revision of the genus *Trichoderma* [J]. Mycological Papers, 1969, 116: 1-56.
- [15] Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels G J, et al. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences [J]. Mycologia, 1997, 89(3): 442-460.
- [16] 夏伟, 张红, 颜艳伟, 等. 棘孢木霉 L4 对立枯丝核菌的拮抗机制[J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 477-478.
- [17] 夏伟, 颜艳伟, 张红, 等. 木霉菌 Tr10 的鉴定及其对几种病原菌的抑制作用[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(5): 2424-2426.
- [18] 高克祥, 王淑红, 刘晓光, 等. 木霉菌株 T88 对 7 种病原真菌的拮抗作用[J]. 河北林果研究, 1999, 14(2): 159-162.
- [19] 丁万隆, 程惠珍, 张国珍, 等. 木霉防治西洋参立枯病研究[J]. 中草药, 1994, 25(2): 91-92.
- [20] 茆振川, 侯桂凤. 木霉菌对侵染苹果枝条的轮纹病菌的抑制作用[J]. 落叶果树, 1996(3): 6-7.