

DOI: 10.11686/cyxb2024365

http://cyxb.magtech.com.cn

杜化迎, 张玉洲, 赵楠, 等. 棘孢木霉 bai5 对紫花苜蓿根腐病原菌的抑菌效果及其促生作用研究. 草业学报, 2025, 34(8): 179—190.

DU Hua-ying, ZHANG Yu-zhou, ZHAO Nan, et al. *Trichoderma asperellum* bai5 inhibits root rot pathogens of alfalfa (*Medicago sativa*) and promotes alfalfa plant growth. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(8): 179—190.

棘孢木霉 bai5 对紫花苜蓿根腐病原菌的 抑菌效果及其促生作用研究

杜化迎^{1**}, 张玉洲^{2**}, 赵楠², 虎妍¹, 王一冬¹, 刘腾达¹, 顾沛雯¹, 于泽洋^{1*}

(1. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:为挖掘对紫花苜蓿根腐病致病菌具有抑制作用的有益菌株,本研究采用稀释分离法从白桦根围土壤中分离、获得1株真菌 bai5,通过形态学和分子生物学鉴定,确定为棘孢木霉。以紫花苜蓿常见的7种根腐病原菌(燕麦镰刀菌 FAV-7、木贼镰刀菌 FEQ-10、锐顶镰刀菌 FAC-11、厚垣镰刀菌 FCH-13、三线镰刀菌 FTR-14、尖孢镰刀菌 FOX-15、茄病镰刀菌 FSO-16)为靶标菌,利用两点对峙法、固体稀释法、平板对扣法综合评估 bai5 菌株对病原菌的抑制作用,结果表明,在对峙培养下, bai5 对7种病原菌的抑制率均大于69%;在发酵滤液抑菌试验中, bai5 对 FAC-11、FTR-14、FEQ-10、FCH-13、FAV-7 和 FSO-16 的抑制率分别为 63.14%、49.80%、40.78%、33.33%、16.08%、8.20%,而对 FOX-15 无抑制效果;棘孢木霉 bai5 的挥发性物质对 FTR-14 和 FAC-11 的抑制率分别高达 74.51%、72.00%。通过对 bai5 菌株的生物学特性和促生特性分析,结果表明,棘孢木霉 bai5 生长速度快,不仅具有较强的抗逆能力,还具有固氮和产纤维素酶能力。通过盆栽试验,测定棘孢木霉 bai5 对紫花苜蓿生长和生理指标的影响,结果表明, bai5 能够显著提高紫花苜蓿的鲜重、地上部长、干重、叶绿素含量和可溶性糖含量。综上,棘孢木霉 bai5 是具有较高开发价值的生防真菌,可以抑制7种苜蓿根腐病原菌生长并显著促进苜蓿生长。

关键词:棘孢木霉;分离鉴定;苜蓿根腐病;镰刀菌;抑菌效果;促生

Trichoderma asperellum bai5 inhibits root rot pathogens of alfalfa (*Medicago sativa*) and promotes alfalfa plant growth

DU Hua-ying^{1**}, ZHANG Yu-zhou^{2**}, ZHAO Nan², HU Yan¹, WANG Yi-dong¹, LIU Teng-da¹, GU Pei-wen¹, YU Ze-yang^{1*}

1. College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 2. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

Abstract: The aim of this work was to screen for fungal biocontrol strains with inhibitory effects on the pathogens causing root rot of alfalfa (*Medicago sativa*). To this end, the fungal strain bai5 was isolated and obtained from the soil surrounding the roots of *Betula platyphylla* by the dilution isolation method. This strain was identified as *Trichoderma asperellum* through morphological and molecular biological identification methods. Seven common root rot pathogens of alfalfa (*Fusarium avenaceum* FAV-7, *Fusarium equiseti* FEQ-10, *Fusarium acuminatum* FAC-11, *Fusarium chlamydosporum* FCH-13, *Fusarium tricinctum* FTR-14, *Fusarium oxysporum* FOX-15, *Fusarium*

收稿日期: 2024-09-24; 改回日期: 2024-12-13

基金项目: 宁夏重点研发计划项目(2023BCF01026-04)和高等学校科学研究项目(NYG-2024-029)资助。

作者简介: 杜化迎(2000—),女,河北邢台人,在读硕士。E-mail: 2190880851@qq.com; 张玉洲(1994—),女,内蒙古呼和浩特人,在读博士。

E-mail: zyzslbc@163.com. ** : 共同第一作者 These authors contributed equally to this work.

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: yzxn@126.com

solani FSO-16) were used as target pathogens, and the inhibitory effect of strain bai5 on these pathogens was comprehensively evaluated using the two-point standoff method, the solid dilution method, and the plate-pair buckling method. The inhibitory rate of strain bai5 against the seven fungal pathogens was higher than 69% in the standoff culture test. In the fermentation filtrate inhibition test, strain bai5 inhibited the growth of FAC-11, FTR-14, FEQ-10, FCH-13, FAV-7, and FSO-16 by 63.14%, 49.80%, 40.78%, 33.33%, 16.08%, and 8.20%, respectively, but it had no inhibitory effect on FOX-15. The volatile compounds of strain bai5 inhibited the growth of FTR-14 and FAC-11 by up to 74.51% and 72.00%, respectively. Analyses of the biological properties and growth-promoting characteristics of strain bai5 showed that it grows fast, is strongly stress resistant, and has nitrogen-fixation and cellulase-producing abilities. The effect of *T. asperellum* bai5 on the growth and physiological indexes of pot-grown alfalfa plants was determined. The results show that bai5 significantly increased the fresh weight, height of above-ground parts, dry weight, chlorophyll content, and soluble sugars content of alfalfa plants. In conclusion, *T. asperellum* bai5 can inhibit the growth of at least seven root rot fungi of alfalfa and significantly promote alfalfa plant growth. Therefore, it is a biocontrol fungus with high development potential.

Key words: *Trichoderma asperellum*; separation and identification; alfalfa root rot disease; *Fusarium*; antibacterial effect; promote growth

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是一种多年生豆科草本植物, 富含蛋白质、膳食纤维、矿物质和维生素等营养物质^[1]。该植物也是优质牧草的重要来源, 在世界范围内被广泛种植^[2]。此外, 由于近年来饲料工业的发展促使苜蓿的种植和利用显著增加, 对苜蓿的产量提出了更高的要求。然而, 根腐病作为紫花苜蓿的常见病害, 主要由镰刀属病原菌引起, 普遍发生于我国主要苜蓿种植区, 发病率达 15%~40%, 高峰时发病率可达 92%, 严重影响了苜蓿的产量和品质^[3]。患根腐病的植株前期生长缓慢, 后期茎叶枯萎, 根部维管束变褐, 侧根大量腐烂死亡^[4]。目前, 苜蓿根腐病的防治主要依靠化学药剂和选育抗病品种。然而, 化学制剂对人体健康有害, 长期使用不仅会造成土壤和水污染, 还会诱导病原菌产生抗性, 造成根腐病难以防控的后果^[5-6]; 而选育抗病品种存在工作量大、周期长、成本投入大和抗病性退化等问题^[7]。因此, 探索安全绿色的生防制剂来防治苜蓿根腐病是解决这一问题的有效手段之一, 也是农业绿色可持续发展的有效保障^[8]。

木霉 (*Trichoderma* spp.) 是重要的植物病害生防真菌, 几乎存在于所有环境 (包括农业、林业、山地、草原和沙漠生态系统以及淡水和海水) 中, 并且可以在各种基质上迅速生长、产生大量孢子^[9]。还可以通过多种作用发挥生防潜能, 如重寄生作用、抗生作用、竞争作用、抵抗逆境压力、增强植物抗氧化防御、改变生态条件和促进植物生长等^[10-12]。有研究表明, 棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*) M2 对 8 种植物病原菌均具有良好的抑菌效果^[13]; 棘孢木霉 152-42 不仅具有耐高温和高盐碱的特性, 还能够显著降低草坪褐斑病和币斑病的发病程度^[14]; 棘孢木霉 CMT10 不产吲哚-3-乙酸 (3-indoleacetic acid, IAA), 但对草莓 (*Fragaria* × *ananassa*) 株高、根长、总鲜重、根鲜重、茎鲜重均有促进作用^[15]。因此, 木霉菌在农业生产和环境保护等领域展现了巨大的应用前景。

镰刀菌作为引起苜蓿根腐病的一类优势菌, 已报道的该病害致病镰刀菌有尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、锐顶镰刀菌 (*Fusarium acuminatum*)、木贼镰刀菌 (*Fusarium equiseti*)、茄病镰刀菌 (*Fusarium solani*)、三线镰刀菌 (*Fusarium tricinctum*)、厚垣镰刀菌 (*Fusarium chlamydosporum*)、燕麦镰刀菌 (*Fusarium avenaceum*)^[16-17]等。为挖掘对紫花苜蓿根腐病病原菌有抑菌效果及促进紫花苜蓿生长的木霉菌株, 本研究以这 7 种镰刀菌为靶标菌, 以白桦 (*Betula platyphylla*) 根围土壤中分离获得的棘孢木霉 bai5 为拮抗菌, 测定 bai5 对供试病原的抑菌效果; 明确棘孢木霉 bai5 的生物学特性以及对紫花苜蓿的促生作用, 以期高效的微生物杀菌剂、菌肥的研制、开发和合理应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试拮抗菌:从采自哈尔滨市东北林业大学实验林场和帽儿山实验林场的白桦根围土壤中分离获得1株棘孢木霉 bai5。

供试病原菌:燕麦镰刀菌 FAV-7、木贼镰刀菌 FEQ-10、锐顶镰刀菌 FAC-11、厚垣镰刀菌 FCH-13、三线镰刀菌 FTR-14、尖孢镰刀菌 FOX-15、茄病镰刀菌 FSO-16,均分离自宁夏回族自治区银川市地区苜蓿根腐病株,前期经过形态学和 rDNA-ITS、 β -tubulin 基因扩增鉴定后保存于宁夏大学农学院分子生物学实验室。

供试培养基为马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 琼脂培养基 (potato dextrose agar medium, PDA): 200 g 马铃薯, 琼脂粉 15 g, 葡萄糖 20 g, 蒸馏水 1000 mL; 马铃薯葡萄糖肉汤培养基 (potato dextrose broth, PDB): PDA 培养基不加琼脂; 无机磷酸三钙培养基: 硫酸铵 0.5 g、氯化钠 0.2 g、磷酸三钙 5 g、氯化钾 0.2 g、硫酸锰 0.03 g、硫酸亚铁 0.03 g、葡萄糖 10 g、七水硫酸镁 0.03 g、酵母浸出粉 20 g、琼脂 20 g 和纯水 1000 mL; 亚力山德罗夫培养基: 磷酸氢二钠 2 g、钾长石粉 1 g、七水硫酸镁 0.5 g、碳酸钙 0.1 g、氯化铁 0.05 g、蔗糖 5 g、琼脂 18~20 g 和纯水 1000 mL; 羧甲基纤维素钠培养基: 氯化钾 0.5 g、七水硫酸镁 0.5 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸铵 2 g、羧甲基纤维素钠 10 g、琼脂 15 g 和纯水 1000 mL; 蛋白酶培养基: 脱脂奶粉 10 g、琼脂 15 g 和纯水 1000 mL; 孟加拉红培养基 (rose bengal medium, RB): 蛋白胨 5 g、葡萄糖 10 g、磷酸二氢钾 1 g、硫酸镁 0.5 g、琼脂 20 g、孟加拉红 0.03 g、氯霉素 0.1 g; 阿须贝氏培养基: 磷酸二氢钾 0.2 g、硫酸镁 0.2 g、氯化钠 0.2 g、碳酸钙 5 g、甘露醇 10 g、硫酸钙 0.1 g 和嗜铁素检测培养基 (chrome azurol S agar medium, CAS): 铬天青 S 60.5 mg、十六烷基三甲基溴化铵 72.9 mg、六水氯化铁 2.645 mg、二水磷酸二氢钠 295.25 mg、十二水磷酸氢二钠 1213.5 mg、氯化铵 125 mg、磷酸二氢钾 37.5 mg、氯化钠 62.5 mg、琼脂 9000 mg, 购自海博生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 bai5 菌株的分离与形态鉴定 采用土壤稀释法分离纯化菌落^[18]。2018年10月,采集哈尔滨市东北林业大学实验林场和帽儿山实验林场的白桦根围土壤,将采集的根围土样装入无菌采样袋标记后带回实验室去除砂石、枝叶、细根等杂质后混匀,置于4℃冰箱保存待用。取1g土壤置于含有无菌蒸馏水的10mL无菌离心管中,在摇床上加入无菌研磨珠以180 r·min⁻¹振摇1h。用无菌蒸馏水将样品稀释10⁻¹至10⁻⁵倍,并将不同浓度稀释液200 μ L涂布于RB平板上,设置3个重复。在28℃下培养5d后,将木霉菌落转移到新的PDA培养基中进行纯化,获得单一菌株后进行保存。

2024年7月,通过观察进行形态鉴定。将纯化的木霉 bai5 接种在PDA平板上,并在黑暗中于28℃倒置培养7d。观察菌落的宏观形态,包括培养基表面正反两面的纹理和有无色素沉着等特征,并留存菌落的图像。使用光学显微镜(Olympus BX51,日本)观察显微形态,包括分生孢子和分生孢子梗。使用莱卡体式显微镜(SP5,德国)观察木霉菌株孢子簇的形态特征。依赖于前人研究^[18]中发现的木霉菌描述进行形态学鉴定。

1.2.2 bai5 菌株的分子鉴定 打取直径为0.5 cm的真菌 bai5 菌饼5个,置于300 mL PDB培养基中于(28±2)℃、180 r·min⁻¹下摇培7d获得发酵液,使用4层无菌纱布过滤获得菌丝体,并使用DNA提取试剂盒(OMEGA)提取总DNA。用超微量分光光度计(Simpli Nano,美国)检测DNA浓度后,以提取的DNA为模板,分别选择内转录间隔区(internal transcribed spacers, ITS)引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和翻译延伸因子1- α (translation elongation factor, tef 1- α)引物 EF1-728F(5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3')/Tef1R(5'-GCCATCCTTGAGATACCAGC-3')进行PCR扩增。聚合酶链式反应(PCR)体系为20 μ L: 双蒸水(ddH₂O, 7 μ L)、正向引物(1 μ L)、反向引物(1 μ L)、DNA模板(1 μ L), 2×Taq Mix(10 μ L)^[19]。PCR程序为:95℃预变性5 min;95℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸30 s(38个循环);72℃总延伸15 min。

采用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,引物合成及测序委托生工生物工程(上海)股份有限公司完成。获得的序列在NCBI数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和上海交通大学木霉菌菌种保藏管理中心

(<http://mmit.china-cctc.org/action1.php>)进行在线比对,基于ITS和TEF1- α 基因序列在MEGA 11.0软件中使用最大似然法(maximum likelihood, ML)联合构建系统发育树,并使用chiplot(<https://www.chiplot.online/>)对发育树进行优化,确定木霉 bai5 的分类地位。经鉴定后,将序列提交 Genbank 获得登录号。

1.2.3 棘孢木霉 bai5 的抑菌率测定 采用平板对峙法测定木霉菌对7种病原菌的拮抗作用^[20]。在距离PDA平板(直径9 cm)直径最外围相对应2点上分别接种病原菌和木霉菌菌饼(直径5 mm)各1片,置于28 °C倒置暗培养,当对照病原菌菌落近乎长满平板时,记录对峙条件下木霉菌与病原菌菌落的生长半径及非对峙条件下对照菌落的生长半径,每个处理设置3个重复。

木霉菌抑菌率(%)=(对照病原菌菌落半径-对峙培养的病原菌菌落半径)/对照病原菌菌落半径 \times 100

1.2.4 棘孢木霉 bai5 无菌发酵液的抑菌率测定 取5个直径为5 mm的木霉菌菌饼接种于300 mL PDB培养液中,28 °C下180 r \cdot min⁻¹振荡培养,于培养第7天将发酵液通过4层无菌纱布过滤去除大部分菌丝体,8000 r \cdot min⁻¹、4 °C离心10 min,取上清液,用0.22 μ m微孔滤膜过滤3次,获得无菌发酵液置于4 °C冰箱备用。采用固体稀释法,待灭菌PDA培养基冷却至55 °C左右,将木霉菌无菌发酵液与培养基以1:1混合倒取平板,打取直径为0.5 cm的病原菌菌饼接种于含棘孢木霉 bai5 无菌发酵液的PDA平板上,以PDB和PDA培养基1:1混合的平板接种病原菌为对照,(28 \pm 2) °C下培养至对照病原菌长满平板后测量各处理菌落直径,计算抑菌率^[21]。每个处理设置3个重复。

抑菌率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径 \times 100

1.2.5 棘孢木霉 bai5 挥发性产物抑菌作用测定 采用平板对扣法测定 bai5 菌株挥发性物质对7种病原菌的抑制效果^[22]。打取木霉菌和病原菌的菌饼(直径=5 mm)接入PDA平板中央,将接入病原菌的PDA培养基平板倒扣于接种有木霉菌的PDA平板上,以只接种病原菌而未接种木霉菌的倒扣平板为对照,于28 °C恒温培养箱中培养,每个处理3个重复。待对照病原菌长满平板时测量菌落直径并计算抑菌率。抑菌率计算同1.2.4。

1.2.6 棘孢木霉 bai5 的生长速度和抗逆性测定 吸取棘孢木霉 bai5 孢子悬浮液(10⁷个 \cdot mL⁻¹)2.5 μ L接种到PDA平板边缘上静置10 min,然后用封口膜密封置于(28 \pm 2) °C下黑暗培养,设置3个重复,并在72 h使用直尺测量菌落半径。

为了研究棘孢木霉 bai5 对贫瘠土和盐碱土等恶劣环境的耐受性,建立模拟恶劣环境的培养基测定木霉菌 bai5 抗逆性^[23]。打取直径0.5 cm的棘孢木霉 bai5 菌饼分别接种于不同营养(4、2、1、3/4、1/2、1/4、1/8、1/16、0倍营养)的PDA培养基、加入NaCl(2%、4%、6%、8%、10% NaCl)的PDA培养基和加入NaHCO₃(0.1%、0.4%、0.7%、1.0%、1.3% NaHCO₃)的PDA培养基进行营养胁迫、盐胁迫和碱胁迫,置于(28 \pm 2) °C下黑暗培养40 h后测量菌落生长直径,每个处理3个重复。

1.2.7 棘孢木霉 bai5 促生特性测定 采用Salkowski比色法测定其产生生长素(indole acetic acid, IAA)的能力^[24];使用无机磷酸三钙培养基检测菌株产无机磷的能力^[25];通过亚力山德罗夫培养基检测菌株解钾能力^[25];采用CAS检测培养基对其产铁载体的能力进行定性检测^[26];利用羧甲基纤维素钠培养基测定 bai5 产纤维素酶的能力^[26];通过阿须贝氏培养基测定菌株固氮能力^[25];使用蛋白酶培养基定性菌株 bai5 是否产蛋白酶^[27]。所有检测设置3次重复。

打取5个直径5 mm的棘孢木霉 bai5 菌饼置于300 mL PDB培养基中28 °C、180 r \cdot min⁻¹振荡培养7 d,使用4层无菌纱布过滤后在冷冻离心机(Sigma 3K,美国)4 °C、10000 r \cdot min⁻¹离心10 min获得上清液,取0.5 mL上清液加入等体积Salkowski比色液混合,分别以等量50 mg \cdot L⁻¹标准品和空白培养基为阳性对照和阴性对照,室温避光显色30 min,观察颜色变化,若溶液颜色变红则表示产生IAA。打取直径为5 mm的*T. asperellum* bai5菌饼,分别接种于无机磷酸三钙培养基、亚力山德罗夫培养基、CAS检测培养基和蛋白酶培养基28 °C培养7 d后观察是否有透明圈产生,透明圈越大则能力越强。取直径5 mm的 bai5 菌饼接种于羧甲基纤维素钠培养基28 °C培养7 d后用1 g \cdot L⁻¹刚果红染色30 min、1 mol \cdot L⁻¹ NaCl溶液脱色处理30 min,观察水解圈情况。取直径5 mm的 bai5 菌饼接种于阿须贝氏培养基28 °C培养7 d转接3次,观察生长情况。设置3个重复。

1.2.8 棘孢木霉 bai5 的促生效果 在 PDA 平板上培养 7 d 的棘孢木霉 bai5 使用无菌水洗脱,制备浓度为 10^7 个·mL⁻¹ 的孢子悬浮液备用。

通过本实验室前期试验结果,选取产孢量最优的发酵配方(无菌水 250%、葡萄糖 4.87%、蛋白胨 4.87%、磷酸二氢钠 1.17%、葡萄枝条粉末 100%)进行棘孢木霉 bai5 的固态发酵。使用宽 12.5 cm×长 23 cm×高 15 cm 的长方形盆加入 500 g 的葡萄枝条粉末、1.25 L 无菌水、24.35 g 葡萄糖、24.35 g 蛋白胨、5.85 g 磷酸二氢钠,加盖灭菌冷却至常温后在无菌条件下接种棘孢木霉 bai5 孢子悬浮液 1 mL,于 (28 ± 2) °C 下发酵 12 d 后加入 500 mL 无菌水进行洗脱备用。

本试验于 2024 年 8 月在宁夏大学农学院植物病理学实验室内进行。将购自宁夏上古农牧业开发有限公司的“甘农三号”紫花苜蓿种子浸入 75% 乙醇 5 min,1% 次氯酸钠 2 h,无菌水冲洗 3 次后种入等量无菌营养土的盆中,每盆放入 20 粒种子,设置处理组和对照组,处理组每盆加入棘孢木霉 bai5 固态发酵洗脱液 500 mL,对照组则加入等量无菌水,每组 3 个重复。每 10 d 每盆浇 500 mL 无菌水,4 d 时统计发芽率,在 35 d 后分析统计处理和对照苜蓿植株的鲜重、根长、地上部长、叶片数、发芽率、干重、叶绿素含量和可溶性糖含量,每组 3 次重复。取鲜草样放入 105 °C 烘箱内杀青 10 min,65 °C 烘干至恒重,称量干重;取 0.1 g 新鲜叶片浸泡于 10 mL 无水乙醇中,常温暗处理至叶片完全褪色,使用紫外分光光度计(L5S,中国)测定溶液在 665 和 649 nm 处的吸光值,按照下述公式计算叶绿素含量;通过可溶性糖试剂盒(Solarbio)测定叶片可溶性糖含量。

$$\text{叶绿素a含量} = (13.95 \times \text{OD}_{665} - 6.88 \times \text{OD}_{649}) / \text{鲜重}$$

$$\text{叶绿素b含量} = (24.96 \times \text{OD}_{649} - 7.32 \times \text{OD}_{665}) / \text{鲜重}$$

$$\text{叶绿素含量} = \text{叶绿素a含量} + \text{叶绿素b含量}$$

1.3 数据分析

利用 Excel 2021 进行试验数据整理,运用 SPSS 26.0 进行统计分析,采用 Duncan's 新复极差法和独立样本 *t* 检验对数据进行差异显著性分析。采用 OriginPro 2024 作图,运用 MEGA 11.0 构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 bai5 菌株的分离、培养和鉴定

采用稀释分离法在白桦根围土壤分离纯化获得单一真菌菌株 bai5。该菌株在 PDA 培养基上生长迅速,气生菌丝在 3 d 内向四周辐射生长完全覆盖整个培养皿。菌落最初呈白色,但随后变为绿色和白绿色,大量产生绿色分生孢子(图 1A)。显微镜下观察到整个分枝呈锥形,顶端有 2~5 个瓶梗,瓶梗为安培瓶状,中部膨大,末端为分生孢子。侧枝由主轴发出,与主轴成 90° 角,轮生(图 1D)。分生孢子为球形或卵圆形,直径 2~4 μm(图 1F)。综上所述,初步鉴定 bai5 真菌菌株为木霉菌。

对木霉 bai5 的 ITS 区和 *tef* 1-α 区进行扩增和测序,将测序结果上传至 NCBI,获得 GenBank 登录号分别为 MK377313 和 PQ280304。基于 ITS 和 *tef* 1-α 基因序列构建的系统发育树显示,木霉 bai5 与棘孢木霉聚为一支,具有较高的同源性(图 2)。因此,通过形态学特征和分子生物学分析,将 bai5 菌株鉴定为棘孢木霉。

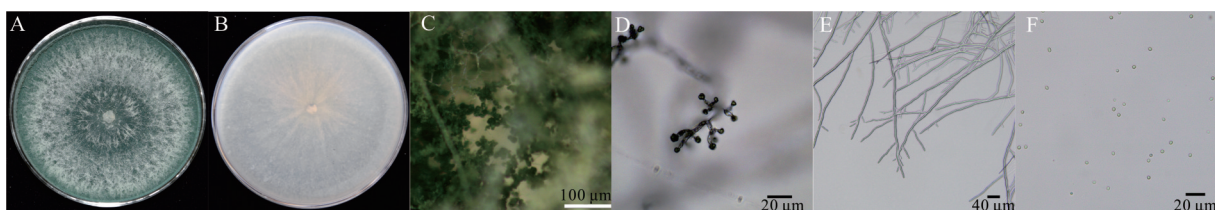


图 1 bai5 菌株在 PDA 培养基上的形态学特征

Fig. 1 Morphological characteristics of bai5 strain on PDA medium

A, B: PDA 培养基上 bai5 菌株菌落的正面和背面形态 The frontal and abaxial morphology of bai5 strain colonies on PDA medium; C, D: bai5 菌株的孢子簇和分生孢子梗 The spore clusters and conidiophores of bai5 strain; E, F: bai5 菌株的菌丝和分生孢子 The mycelium and conidia of bai5 strain.

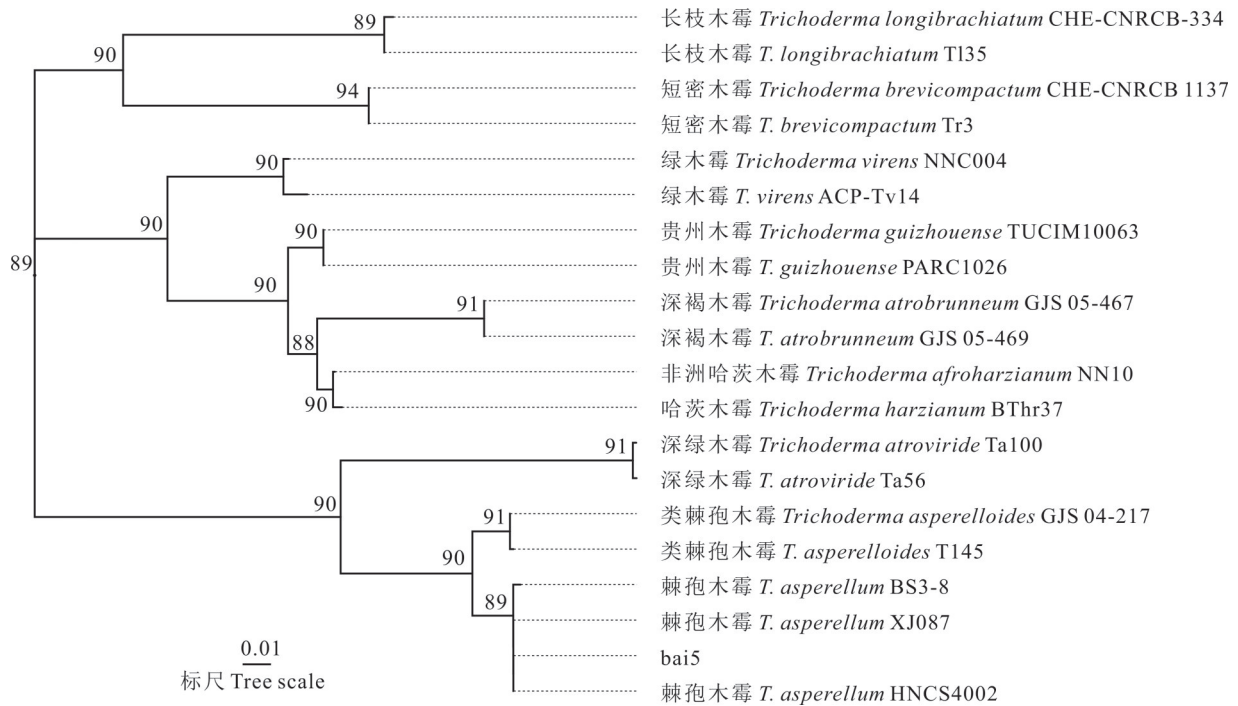


图2 基于 ITS 和 *tef 1-α* 序列联合构建 bai5 菌株及相关近缘种的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain bai5 and related relatives based on the joint construction of ITS and *tef 1-α* sequences

2.2 棘孢木霉 bai5 对 7 种镰刀菌的抑制效果

采用双重培养法评价棘孢木霉 bai5 对燕麦镰刀菌 FAV-7、木贼镰刀菌 FEQ-10、锐顶镰刀菌 FAC-11、厚垣镰刀菌 FCH-13、三线镰刀菌 FTR-14、尖孢镰刀菌 FOX-15、茄病镰刀菌 FSO-16 的抗真菌效果(图3)。结果表明,棘孢木霉 bai5 可以迅速占领共有营养空间,对峙培养 72 h 时,与各个病原菌菌落边缘完全接触,可以抑制病原菌正常生长,随后,棘孢木霉 bai5 菌丝会进一步侵入病原菌菌落,并在病原菌菌落中开始产孢。棘孢木霉 bai5 对供试病原菌的径向菌丝生长均有抑制作用,对锐顶镰刀菌 FAC-11 的抑制率最高(85.49%),对三线镰刀菌 FTR-14 的抑制率次之(82.35%),其次是对尖孢镰刀菌(77.65%)和茄病镰刀菌(76.86%)的抑制率。相比之下,对厚垣镰刀菌 FCH-13 的抑制效果最差(69.41%)。

2.3 棘孢木霉 bai5 无菌发酵液对 7 种镰刀菌的抑菌效果

棘孢木霉 bai5 在 PDB 液体培养基中进行振荡发酵,过滤后获得无菌发酵滤液,采用十字交叉法测定次生代

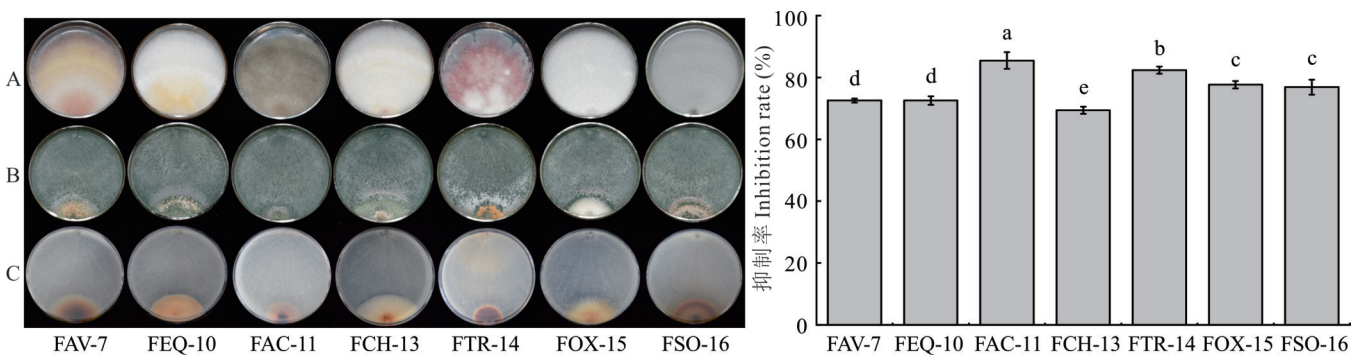


图3 棘孢木霉 bai5 菌丝对 7 种镰刀菌的抑制效果

Fig.3 Inhibition effect of the mycelium of *T. asperellum* bai5 on seven species of *Fusarium* spp.

A~C: 棘孢木霉 bai5 和 7 种镰刀菌对峙培养,其中 A 为对照,B、C 分别为共生长的正面和背面 Confrontation cultures of *T. asperellum* bai5 and seven *Fusarium* species, where A is the control and B, C are the front and back of the co-growth, respectively; 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),下同 Different lowercase letters indicate the significant differences ($P < 0.05$), the same below.

谢非挥发性产物对7种镰刀菌的抑制作用(图4)。除尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌外的5个病原菌生长状况与对照相比均有拮抗效果。这表明棘孢木霉 bai5 在生长过程的非挥发性次生代谢产物对尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌的抑制效果不明显,而对其他5种镰刀菌均有不同程度的抑制作用。其对锐顶镰刀菌的抑制效果最好,抑制率为63.14%;对三线镰刀菌、木贼镰刀菌和厚垣镰刀菌的抑制率相对较高,分别为49.80%、40.78%和33.33%;对燕麦镰刀菌和茄病镰刀菌的抑制率较低,均小于20%;而对尖孢镰刀菌无抑制效果。

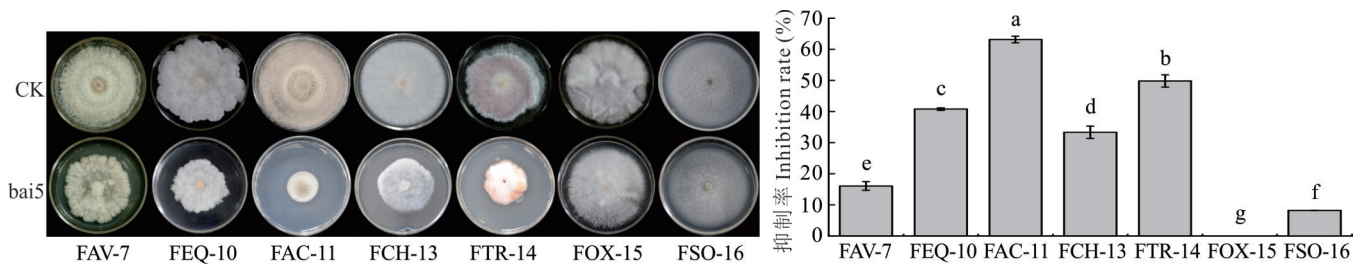


图4 棘孢木霉 bai5 无菌发酵滤液对7种镰刀菌的抑制效果

Fig. 4 Inhibitory effect of sterile fermentation filtrate of *T. asperellum* bai5 on seven species of *Fusarium* spp.

2.4 棘孢木霉 bai5 挥发性物质对7种镰刀菌的抑制效果

棘孢木霉 bai5 的挥发性物质对供试7种病原菌均具有抑制作用,平均抑菌率为55.36%(图5)。其对三线镰刀菌和锐顶镰刀菌的抑制作用远大于木贼镰刀菌、尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌,其中对三线镰刀菌和锐顶镰刀菌的抑制率分别高达74.51%、72.00%,而对木贼镰刀菌、尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌的抑制率仅为47.06%、40.00%和43.92%。

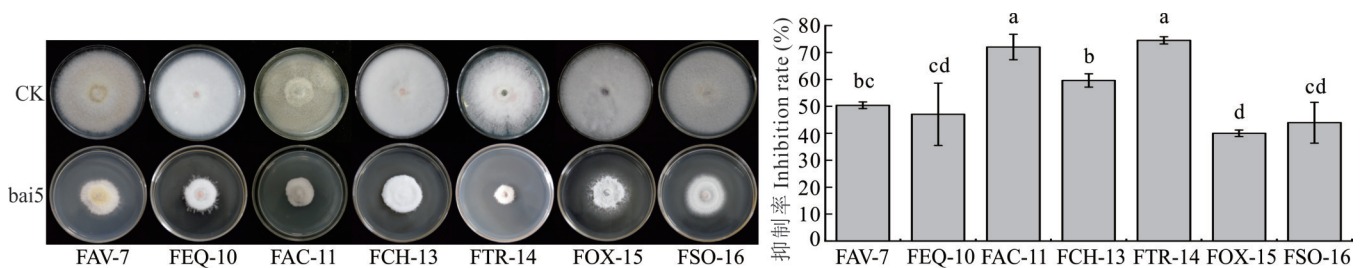


图5 棘孢木霉 bai5 挥发性物质对7种镰刀菌的抑制效果

Fig. 5 Inhibitory effect of volatiles of *T. asperellum* bai5 on seven species of *Fusarium* spp.

2.5 棘孢木霉 bai5 的生长速度和抗逆性能

棘孢木霉 bai5 在不同营养程度、盐浓度和碱浓度培养基中生长40 h后测量菌落直径(图6和图7)。结果表明,棘孢木霉 bai5 在4、2、1、1/2、1/4、3/4、1/8、1/16、0倍营养的PDA培养基上均能生长,大多数生长直径都可超过5 cm。在营养浓度过高时(2倍营养的PDA培养基),其生长并未受到显著影响,生长直径甚至更优。在4、3/4和1/2倍营养的PDA培养基上,棘孢木霉 bai5 的直径分别为6.50、6.67和6.67 cm。然而,在1/16倍营养的PDA培养基上,棘孢木霉 bai5 的直径最小,仅有4.50 cm,并且在1/16和0倍营养的PDA培养基上出现产孢量减少、菌丝稀少和菌落厚度变薄的情况。棘孢木霉 bai5 在盐浓度为2%、4%、6%、8%和10%的培养基上均能生长,但菌落直径相差较大。当培养基的盐浓度为2%时,菌落直径最大(8.5 cm)。当培养基的盐浓度为10%时,菌落直径最小(0.58 cm),棘孢木霉 bai5 可以以极为缓慢的速度生长。随着培养基盐浓度的增大,棘孢木霉 bai5 的生长直径越小,生长速度越缓慢。在碱浓度为0.1%、0.4%和0.7%的培养基中,棘孢木霉 bai5 可以生长,但是在碱浓度为0.7%培养基中生长极为缓慢。而在碱浓度为1.0%和1.3%的培养基中棘孢木霉 bai5 几乎无法生长。相比于不同营养和高盐环境,棘孢木霉 bai5 对高碱环境更为敏感。

将棘孢木霉 bai5 孢子悬浮液定量接种到 PDA 培养基上, 72 h 后测量菌落半径, 结果表明, 棘孢木霉 bai5 生长速度快, 平均半径为 6.23 cm (图 7A)。

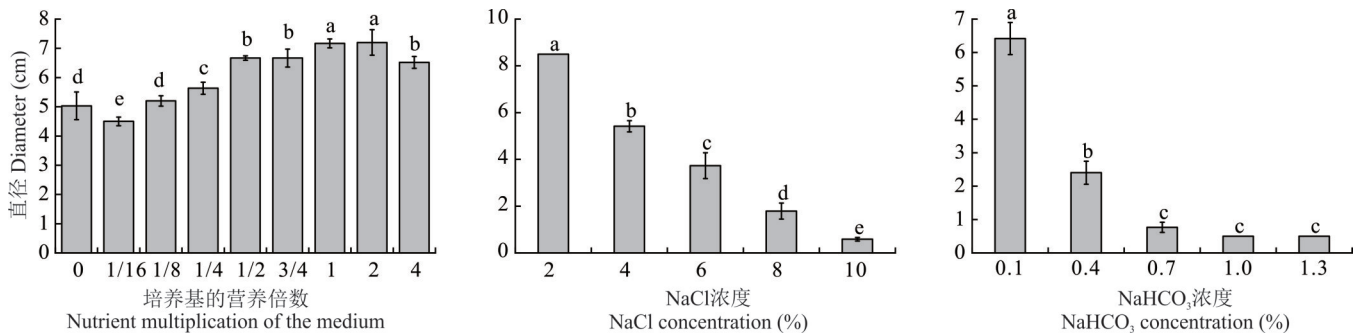


图 6 棘孢木霉 bai5 的抗逆能力

Fig. 6 Inhibitory effect of *T. asperellum* bai5

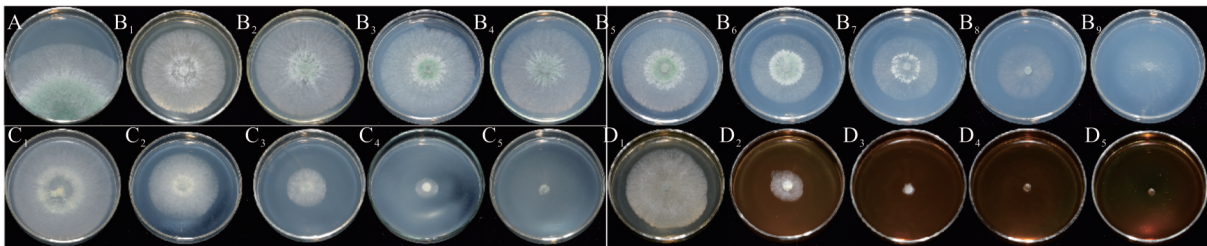


图 7 棘孢木霉 bai5 的生长速率和抗逆性能

Fig. 7 Growth rate and resistance properties of *T. asperellum* bai5

A: 棘孢木霉 bai5 72 h 生长速率 Growth rate of *T. asperellum* bai5 at 72 hours; B₁~B₉: 分别为棘孢木霉 bai5 在 4、2、1、3/4、1/2、1/4、1/8、1/16、0 倍营养的 PDA 培养基上生长 40 h 的菌落 40 hours growth of colonies of *T. asperellum* bai5 on 4, 2, 1, 3/4, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, and 0 nutrient PDA medium, respectively; C₁~C₅: 分别为棘孢木霉 bai5 在 2%、4%、6%、8% 和 10% NaCl 培养基上生长 40 h 的菌落 Colonies of *T. asperellum* bai5 grown for 40 hours on 2%, 4%, 6%, 8% and 10% NaCl medium, respectively; D₁~D₅: 分别为棘孢木霉 bai5 在 0.1%、0.4%、0.7%、1.0% 和 1.3% 的 NaHCO₃ 培养基上生长 40 h 的菌落 40 hours growth of colonies of *T. asperellum* bai5 on 0.1%, 0.4%, 0.7%, 1.0% and 1.3% NaHCO₃ medium, respectively.

2.6 棘孢木霉 bai5 的促生作用

经过 Salkowski 比色法测定, bai5 的液体颜色不变, 说明 bai5 菌株不具有产 IAA 的能力 (图 8A)。棘孢木霉 bai5 在无机磷酸三钙培养基、亚力山德罗夫培养基、CAS 检测培养基和蛋白酶培养基上不产生透明圈, 表明其没有溶磷、解钾、产铁载体和产蛋白酶的能力 (图 8B~D 和图 8G)。但其可以在羧甲基纤维素钠培养基上产生水解圈 (图 8E), 也可以在阿须贝氏培养基上转接 3 次生长菌丝并产孢 (图 8F), 说明 bai5 菌株具有产纤维素酶和固氮能力。另外其可以在无机磷酸三钙培养基、亚力山德罗夫培养基、CAS 检测培养基和蛋白酶培养基上生长, 其中, 在蛋白酶培养基上生长良好, 产孢量较多 (图 8G); 在亚力山德罗夫培养基中菌丝生长稀疏, 产孢有限, 孢子呈点状分布 (图 8B); 在 CAS 检测培养基上生长缓慢 (图 8D)。

2.7 棘孢木霉 bai5 对紫花苜蓿的促生效果

将灭菌的紫花苜蓿种子分别种植于棘孢木霉 bai5 处理和无菌水对照的盆中 4 d 统计发现, 处理组和对照组的发芽率无显著差异。在苜蓿生长 35 d 后观察发现, 与对照组相比, 处理组的苜蓿鲜重、地上部长、干重、叶绿素含量和可溶性糖含量均显著增加, 并且处理组侧根数量多于对照组, 但是两组的根长和叶片数量未见显著变化 (图 9, 表 1)。此外, 苜蓿植株的鲜重、地上部长、干重、叶绿素含量和可溶性糖含量的增长率分别为 28.00%、28.87%、66.67%、32.51% 和 30.77%。

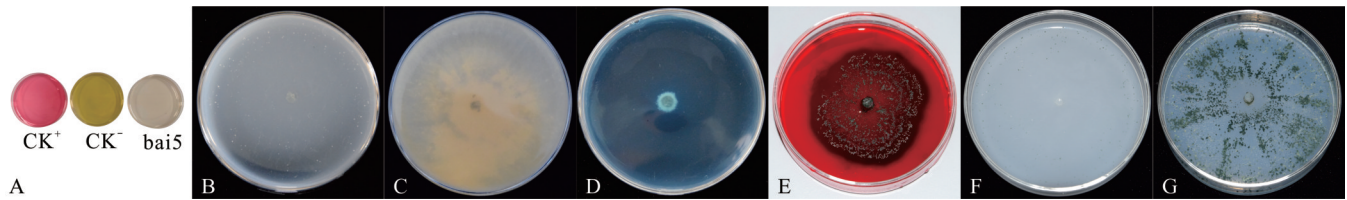


图 8 棘孢木霉 bai5 对紫花苜蓿的促生作用

Fig. 8 Growth-promoting function of *T. asperellum* bai5 on alfalfa

A: 产 IAA 能力 Indole acetic acid (IAA) production capacity; B: 溶钾能力 Potassium solubilisation capacity; C: 溶磷能力 Phosphorus solubilisation capacity; D: 产铁载体能力 Iron carrier production capacity; E: 产纤维素酶能力 Cellulase production capacity; F: 固氮能力 Nitrogen fixation capacity; G: 产蛋白酶能力 Protease-producing capacity.

3 讨论

木霉存在于多种生态系统中,是防治植物病害的重要生防菌种,对多种植物病原菌具有显著抑制作用。薛德星等^[28]研究发现棘孢木霉 GT30 对大蒜白斑病菌 (*Stemphylium eturmiunum*) 和葡萄炭疽病菌 (*Colletotrichum truncatum*) 抑菌率分别为 63.7% 和 61.4%。李佳昕等^[29]从分离的木霉菌中筛选出 1 株棘孢木霉 GH-20, 其对整齐小核菌 (*Sclerotium rolfsii*) 抑菌率高达 89.93%。本研究从哈尔滨白桦根围土壤中经过分离纯化获得一株木霉 bai5, 结合形态学和分子生物学鉴定, 确定菌株 bai5 为棘孢木霉。对峙试验结果发现该菌株对苜蓿根腐病原菌具有优良的抑制效果, 抑菌谱较广, 生长速度远快于各种靶标菌, 可以

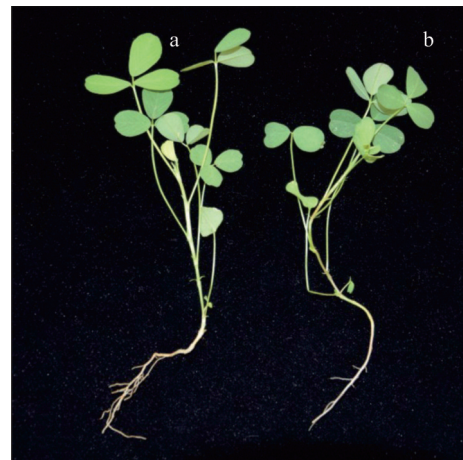


图 9 棘孢木霉 bai5 对紫花苜蓿的促生效果

Fig. 9 Growth-promoting effect of *T. asperellum* bai5 on alfalfa

a: 棘孢木霉 bai5 处理 *T. asperellum* bai5 treatment; b: 无菌水对照 Sterile water control.

表 1 棘孢木霉 bai5 对紫花苜蓿的促生效果

Table 1 Growth-promoting effect of *T. asperellum* bai5 on alfalfa

处理 Treatment	FW ($\text{g}\cdot\text{plant}^{-1}$)	RL (cm)	LAP (cm)	NB	GR (%)	DW ($\text{g}\cdot\text{plant}^{-1}$)	CC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	SSC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
对照 Control	0.25±0.03	9.87±0.91	5.30±0.44	17.67±1.15	66.67±6.01	0.030±0.005	95.79±2.22	0.65±0.08
棘孢木霉 bai5	0.32±0.03*	11.17±2.08	6.83±1.04*	17.67±2.31	68.89±8.22	0.050±0.004*	126.93±6.59*	0.85±0.06*

FW: 鲜重 Fresh weight; RL: 根长 Root length; LAP: 地上部长 Length of the aboveground part; NB: 叶片数 Number of blades; GR: 发芽率 Germination rate; DW: 干重 Dry weight; CC: 叶绿素含量 Chlorophyll content; SSC: 可溶性糖含量 Soluble sugar content; *: $P < 0.05$; 数据用平均值±标准差表示 Data are represented as means±standard deviation.

显著压缩和挤占对方生存空间, 与前人研究结果一致。此外, bai5 在 4、2、1、1/2、1/4、3/4、1/8、1/16、0 倍营养程度和 2%、4%、6%、8% 以及 10% 盐浓度的培养基上均能生长, 表现出较强的适应能力, 因此具有在恶劣土壤环境下防治植物病害的潜力。

本研究结果表明, 棘孢木霉 bai5 挥发性代谢产物对三线镰刀菌的抑制作用最强, 抑制率为 74.51%。相反, 对尖孢镰刀菌的抑菌效果最低, 仅为 40%, 而非挥发性代谢产物对锐顶镰刀菌的抑制效果最好, 抑制率为 63.14%。木霉拮抗作用涉及多种因素, 挥发性代谢物的抑菌率与非挥发性代谢物的抑菌率不一定相关, 与 Ma 等^[30]的研究结果一致。Amin 等^[31]先前的研究表明, 木霉衍生的挥发性有机化合物会抑制包括尖孢镰刀菌、芸薹生链格孢 (*Alternaria brassicicola*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 在内多种致病真菌的菌丝生长。陶玲芸等^[32]

通过顶空固相微萃取气质联用法测定出棘孢木霉 ZJSX5003 和 GDFS1009 中挥发性次级代谢产物主要是醇类和酮类,进一步通体外抑菌试验表明过 6-正戊基-2H-吡喃-2-酮(6-PAP)具有较好的抑制尖孢镰孢菌的效果。而本研究的木霉 bai5 菌株也产生抗真菌代谢物,可以抑制病原菌菌丝生长。为了获得更深入的了解,需要进一步的研究来分离和纯化挥发性代谢产物中存在的单个成分,并评估这些代谢物所表现出的抗真菌谱。郑传奇等^[33]研究发现钩状木霉发酵液的发酵时间在 15 和 9 d 时对薏苡黑粉菌(*Ustilago coicis*)和辣椒炭疽菌(*Colletotrichum capsici*)的抑菌率相比于 7 d 时高,表明钩状木霉无菌发酵滤液的抑菌效果与发酵时间相关,不同发酵时间无菌发酵滤液的抑菌效果有显著差异。本研究中使用棘孢木霉 bai5 同一时间的无菌发酵滤液对部分靶标病原菌进行抑菌试验,结果发现 bai5 菌株对部分靶标病原菌抑制率低,根据前人研究发现,后续可对该菌株不同发酵时间无菌发酵滤液的抑菌效果进行测定,明确其非挥发性代谢产物最大抑菌效果的最佳发酵时间。

有研究发现,棘孢木霉表现出溶磷、产 IAA 和产铁载体能力^[34]。Li 等^[35]研究发现棘孢木霉 CHF78 具有溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的能力并产生纤维素酶、铁载体、IAA、蛋白酶和几丁质酶,促进番茄(*Solanum lycopersicum*)植株的生长。本研究结果显示棘孢木霉 bai5 具有产纤维素酶和固氮能力,而没有产蛋白酶、产铁载体、溶磷和解钾能力,这与张晓梦等^[13]研究发现棘孢木霉 M2 具有产纤维素酶、蛋白酶、铁载体和溶磷能力的结果不同,说明棘孢木霉促生因子具有种间差异。姚晨斌等^[36]研究表明棘孢木霉 Ta-0101 有一定的促生能力和水解酶活性,可以使烟草(*Nicotiana tabacum*)植株最大叶面积增加 56.55%,地上部鲜重提高 136.69%,根系鲜重提高 140.28%。本研究定性测定了棘孢木霉 bai5 的促生能力,发现该菌能促进紫花苜蓿的植株生长,但对其根长、叶片数量和发芽率并无显著促进效果,可能是由于 bai5 的洗脱液浓度并非最适浓度,后续可增加和减少洗脱液的孢子量,分析对植株生长的影响变化,寻找促进紫花苜蓿生长最适的孢子浓度。

4 结论

从哈尔滨市白桦根围土壤分离得到棘孢木霉 bai5 对包括燕麦镰刀菌 FAV-7、木贼镰刀菌 FEQ-10、锐顶镰刀菌 FAC-11、厚垣镰刀菌 FCH-13、三线镰刀菌 FTR-14、尖孢镰刀菌 FOX-15、茄病镰刀菌 FSO-16 在内的 7 种病原菌均有抑制作用,抑菌谱广,尤其是对锐顶镰刀菌 FAC-11 的综合抑制效果最好。棘孢木霉 bai5 的生长速率快,生防机制是以竞争作用为主,抗生作用为辅。在模拟贫瘠土和盐碱土等恶劣环境的培养基上,棘孢木霉 bai5 在不同营养程度和盐胁迫的培养基上生长良好,但对于碱性环境较为敏感,整体抗逆能力较强,可以在不良环境下生长,同时还可以促进紫花苜蓿的生长。综上所述,棘孢木霉 bai5 具有开发为生防菌剂的潜力。

参考文献 References:

- [1] Zhou Q, Luo D, Chai X T, *et al.* Multiple regulatory networks are activated during cold stress in *Medicago sativa* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(10): 3169.
- [2] Zhou Q, Chen T L, Wang Y R, *et al.* The development of 204 novel EST-SSRs and their use for genetic diversity analyses in cultivated alfalfa. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 57: 227–230.
- [3] Yuan Q H. Advances in alfalfa diseases in China. *Plant Protection*, 2007, 33(1): 6–10.
袁庆华. 我国苜蓿病害研究进展. *植物保护*, 2007, 33(1): 6–10.
- [4] Berg L E, Miller S S, Dornbusch M R, *et al.* Seed rot and damping-off of alfalfa in Minnesota caused by *Pythium* and *Fusarium* species. *Plant Disease*, 2017, 101(11): 1860–1867.
- [5] Leroch M, Kretschmer M, Hahn M. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in south west Germany. *Journal of Phytopathology*, 2011, 159(1): 63–65.
- [6] Hawkins N J, Chris B, Andrea D, *et al.* The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2018, 94(1): 135–155.
- [7] Yang J F. Isolation and identification of the pathogens causing root rot disease in alfalfa and the evaluation of alfalfa resistant varieties resistance to *Fusarium* spp. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2021.
杨剑锋. 苜蓿根腐病原菌分离鉴定及不同苜蓿品种对镰刀型根腐病抗性评价. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2021.
- [8] Volpiano C G, Lisboa B B, Granada C E, *et al.* Rhizobia for biological control of plant diseases//Microbiome in plant health and

- disease. Singapore: Springer, 2019: 315–336.
- [9] Chaverri P, Castlebury L A, Overton Barrie E, *et al.* *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. *Mycologia*, 2003, 95(6): 1100–1140.
- [10] Meng S L, Tian Y M, Gu X, *et al.* Research progress on synergistic disease prevention by *Trichoderma*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38(3): 739–747.
孟素玲, 田彦梅, 顾欣, 等. 木霉的协同防病作用研究进展. *中国生物防治学报*, 2022, 38(3): 739–747.
- [11] Cui X L, Li S G, Yang J, *et al.* Screening and identification of saline-alkali tolerant and tobacco black shank resistant *Trichoderma*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, 16(3): 81–89.
崔西苓, 李世贵, 杨佳, 等. 耐盐碱抗烟草黑胫病木霉菌株的筛选与鉴定. *中国农业科技导报*, 2014, 16(3): 81–89.
- [12] Ganuza M, Pastor N, Bocolini M, *et al.* Evaluating the impact of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 on indigenous microbial communities from field soils. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(2): 608–623.
- [13] Zhang X M, Tian Y Q, Pan X M, *et al.* Antifungal effect and plant growth promoting mechanism of two *Trichoderma* strains. *Journal of Southern Agriculture*, 2020, 51(11): 2713–2721.
张晓梦, 田永强, 潘晓梅, 等. 2株木霉抑菌效果及其促植物生长机制. *南方农业学报*, 2020, 51(11): 2713–2721.
- [14] Dong C X, Cui Y, Niu Q C, *et al.* The characteristics and biocontrol of *Trichoderma asperellum* against two turfgrass pathogens. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(5): 1102–1109.
董纯辛, 崔艺, 牛启尘, 等. 棘孢木霉特性及其对两种草坪病原菌的生防作用. *草地学报*, 2022, 30(5): 1102–1109.
- [15] Liu P, Yang R, Wang Z, *et al.* Biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* CMT10 against strawberry root rot disease. *Horticulturae*, 2024, 10(3): 2–16.
- [16] Wang L, Jia R F, Wang N, *et al.* Identification of pathogen of alfalfa root rot in Inner Mongolia. *Chinese Journal of Grassland*, 2024, 46(6): 103–116.
王乐, 贾瑞芳, 王娜, 等. 内蒙古自治区紫花苜蓿根腐病原菌鉴定. *中国草地学报*, 2024, 46(6): 103–116.
- [17] Ouyang J H, Li W, Zhang X H, *et al.* Research progress on control of alfalfa root rot by plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Grassland and Forage Science*, 2023(3): 1–5.
欧阳佳慧, 李旺, 张小华, 等. 牧草根际促生菌防治紫花苜蓿根腐病研究进展. *草学*, 2023(3): 1–5.
- [18] Xie J L, Li B, Liu J, *et al.* Isolation, identification, and evaluation of the saline-tolerant strain of *Trichoderma* spp. in the *Halogeton arachnoideus* rhizosphere. *Pratacultural Science*, 2021, 38(10): 1930–1937.
谢佳丽, 李宝, 刘佳, 等. 盐生草根际耐盐性木霉菌分离鉴定及其耐盐性评价. *草业科学*, 2021, 38(10): 1930–1937.
- [19] Ran L, Jiao Y, Ling J, *et al.* Biocontrol efficacy of *Trichoderma arundinaceum* strain 3199 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2024, 54(2): 429–435.
冉林, 焦阳, 凌键, 等. 茸状木霉3199菌株对黄瓜枯萎病的生物防治研究. *植物病理学报*, 2024, 54(2): 429–435.
- [20] Zhang Y M, Wang D, Wang Y, *et al.* *Trichoderma asperellum* PT-29 metabolites inhibit *Fusarium* toxin production. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51(21): 126–132.
张轶敏, 王东, 王煜, 等. 棘孢木霉PT-29代谢产物抑制镰刀菌毒素的产生. *江苏农业科学*, 2023, 51(21): 126–132.
- [21] Zhang S H. Isolation and identification of *Trichoderma* spp. and evaluation of biocontrol potential of *Trichoderma hamatum* on pear diseases. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2023.
张诗涵. 木霉的分离鉴定及钩状木霉对梨病害生防潜能的评价. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [22] Li Y T, Ma Y K, Yang S J, *et al.* Screening of antagonistic *Trichoderma* strains against *Colletotrichum gloeosporioides* in pepper. *Mycosystema*, 2023, 42(12): 2374–2387.
李叶彤, 马玉坤, 杨仕佳, 等. 抗辣椒炭疽病菌盘状刺盘孢的木霉菌的筛选. *菌物学报*, 2023, 42(12): 2374–2387.
- [23] Yu Z Y. Acquisition and production of *Trichoderma asperellum*-T46 and the analysis of its resistance induce mechanism on *Populus davidiana* × *P. alba* var. *pyramidalis*. Harbin: Northeast Forestry University, 2021.
于泽洋. 棘孢木霉T46的筛选、生产及诱导山新杨抗性机理研究. 哈尔滨: 东北林业大学, 2021.
- [24] Zheng Q H, Li F X, Liu G Y, *et al.* Screening of growth promoting endophytic fungi in abandoned fankou lead-zinc mine. *Journal of Hunan University of Technology*, 2022, 36(6): 55–61.
郑秋桦, 李富鑫, 刘广源, 等. 凡口铅锌矿废弃地植物促生长内生真菌的筛选. *湖南工业大学学报*, 2022, 36(6): 55–61.
- [25] Yang M G, Lu J J, Tian Y J, *et al.* Screening and identification of endophytic fungi from *Quercus spinosa* and determination of their growth-promoting functions. *Shandong Agricultural Sciences*, 2024, 56(4): 133–144.
杨明国, 芦俊佳, 田芸菁, 等. 刺叶高山栎(*Quercus spinosa*)内生真菌筛选鉴定及促生作用测定. *山东农业科学*, 2024,

56(4): 133–144.

- [26] Gong W F, Sun Y, Wang R Q, *et al.* Isolation of endophytes from rapeseeds in Tibet and screening of antagonistic bacteria with multiple plant growth promoting traits. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49(4): 1053–1062.
巩文峰, 孙玉, 王瑞琪, 等. 西藏油菜种子内生菌分离及具有多种促生特性的拮抗菌筛选. *植物保护学报*, 2022, 49(4): 1053–1062.
- [27] Huang D Y, Yu Z B, Wan Z Y, *et al.* Study on control effect of *Streptomyces phaeoluteichromatogenes* HEBRC45958 strain on *Corynespora* leaf spot of tomato. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2024, 26(11): 136–142.
黄大野, 余志斌, 万中义, 等. 产褐黄色链霉菌 HEBRC45958 菌株防控番茄棒孢叶斑病研究. *中国农业科技导报*, 2024, 26(11): 136–142.
- [28] Xue D X, Li M, Gao X X, *et al.* Isolation, identification and biological characteristics of *Trichoderma asperellum* GT30. *Shandong Agricultural Sciences*, 2023, 55(10): 118–123.
薛德星, 李美, 高兴祥, 等. 生防菌棘孢木霉的分离鉴定及生物学特性研究. *山东农业科学*, 2023, 55(10): 118–123.
- [29] Li J X, Cai C L, Wang Y, *et al.* Identification of *Trichoderma asperellum* and its biocontrol mechanisms against peanut southern blight. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38(6): 1534–1544.
李佳昕, 蔡晨亮, 王琰, 等. 棘孢木霉菌鉴定及其对花生白绢病生防机制的研究. *中国生物防治学报*, 2022, 38(6): 1534–1544.
- [30] Ma Y K, Li Y T, Yang S J, *et al.* Biocontrol potential of *Trichoderma asperellum* strain 576 against *Exserohilum turcicum* in *Zea mays*. *Journal of Fungi*, 2023, 9(9): 2–22.
- [31] Amin F, Razdan V K, Mohiddin F A, *et al.* Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* species against seven fungal plant pathogens *in-vitro*. *Journal of Phytology*, 2010, 2(10): 34–37.
- [32] Tao L Y, Zhang Y W, Li Y Q, *et al.* Antagonistic activity of volatile metabolites from *Trichoderma asperellum*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36(6): 1181–1189.
陶玲芸, 张怡雯, 李雅乾, 等. 棘孢木霉挥发性次级代谢产物检测及抑菌活性分析. *生物工程学报*, 2020, 36(6): 1181–1189.
- [33] Zheng C Q, Linghu M L, Shu Z Z, *et al.* Isolation, identification of *Trichoderma hamatum* and determination of its antibacterial activity on *Colletotrichum capsici* and *Ustilago coicis*. *Journal of Southern Agriculture*, 2023, 54(7): 2050–2059.
郑传奇, 令狐美林, 舒忠泽, 等. 钩状木霉的分离鉴定及对辣椒炭疽菌和薏苡黑粉菌的抑菌活性. *南方农业学报*, 2023, 54(7): 2050–2059.
- [34] Qi W, Zhao L. Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(4): 355–364.
- [35] Li Y T, Hwang S G, Huang Y M, *et al.* Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. *Crop Protection*, 2018, 110: 275–282.
- [36] Yao C X, Li X J, Liu C, *et al.* Screening and identification of three strains of *Trichoderma* spp. antagonizing *Fusarium oxysporum* and evaluation of their effects on promoting growth and disease control. *Acta Tabacaria Sinica*, 2022, 28(4): 96–105.
姚晨琥, 李小杰, 刘畅, 等. 3株拮抗烟草尖孢镰刀菌的木霉菌筛选鉴定及促生防病效果评价. *中国烟草学报*, 2022, 28(4): 96–105.