

研究报告

非洲哈茨木霉 LMNS-M9 的鉴定、生物学特性及其对藜麦的促生作用

田淼, 彭玉飞, 吕红, 秦楠, 任璐, 殷辉*, 赵晓军*

山西农业大学植物保护学院, 山西 太原 030031

田淼, 彭玉飞, 吕红, 秦楠, 任璐, 殷辉, 赵晓军. 非洲哈茨木霉 LMNS-M9 的鉴定、生物学特性及其对藜麦的促生作用[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3848-3865.

TIAN Miao, PENG Yufei, LÜ Hong, QIN Nan, REN Lu, YIN Hui, ZHAO Xiaojun. *Trichoderma afroharzianum* LMNS-M9: identification, biological characteristics, and growth-promoting effect on quinoa[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3848-3865.

摘要:【背景】藜麦作为风靡全球的功能性食品, 其种子内生非洲哈茨木霉的研究尚未见报道。

【目的】从藜麦种子中筛选出有抑菌活性的内生真菌, 分析其抑菌和促生作用。【方法】通过形态学及 ITS、*tef1* 和 *rpb2* 基因序列等方法对筛选出的内生真菌进行鉴定; 采用平板对峙和平板倒扣等方法测定内生真菌的抑菌活性; 利用盆栽试验测定内生菌株对藜麦生长的影响。【结果】综合形态学特征和系统发育分析结果, 确定菌株 LMNS-M9 为非洲哈茨木霉(*Trichoderma afroharzianum*)。30 °C、pH 5.0 和镁离子适宜菌株 LMNS-M9 菌丝生长和产孢; 葡萄糖、乳糖、蛋白胨、磷酸二氢钾适宜菌株 LMNS-M9 菌丝生长; 葡萄糖、硝酸铵、磷酸氢二钾适宜菌株 LMNS-M9 产孢。菌株 LMNS-M9 对 *Botrytis cinerea*、*Ascochyta caulina*、*Fusarium citri*、*Alternaria alternata* 和 *Trichothecium roseum* 的抑制率分别为 12.53%、51.96%、52.38%、59.25%和 62.04%, 挥发物的抑制率分别为 35.86%、61.54%、33.33%、41.95%和 59.09%。菌株 LMNS-M9 可接触或缠绕病原菌(*B. cinerea*、*A. caulina*、*F. citri*、*A. alternata*)的菌丝, 致使其断裂、消解。盆栽试验发现, 菌株 LMNS-M9 可促进藜麦种子提前 2 d 萌发, 并使幼苗根长、地下部鲜重和地下部干重分别增加 71.88%、104.66%和 68.89%。【结论】从藜麦种子中分离的内生真菌鉴定为非洲哈茨木霉(*T. afroharzianum*), 能抑制 5 种病原菌, 同时可促进藜麦出苗和根系生长, 具有较好的生防潜力。

关键词: 藜麦; 内生真菌; 病原菌; ITS、*tef1* 和 *rpb2* 基因序列; 抑制率; 重寄生现象; 固态发酵

资助项目: 山西省重点研发计划(2022ZDYF117); 山西省基础研究计划(20210302123419); 山西省现代农业产业技术体系建设专项(2023CYJSTX03-32); 杂粮病虫害综合防控技术集成与示范(TYGC23-03)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Shanxi Province (2022ZDYF117), the Fundamental Research Program of Shanxi Province (20210302123419), the Earmarked Fund for Modern Agro-industry Technology Research System of Shanxi Province (2023CYJSTX03-32), and the Integration and Demonstration of Comprehensive Prevention and Control Technology of Multi-grain Diseases, Pests and Grasses (TYGC23-03).

*Corresponding authors. E-mail: ZHAO Xiaojun, zhaoxiaojun0218@163.com; YIN Hui, yinhui0806@163.com

Received: 2023-02-24; Accepted: 2023-04-05; Published online: 2023-05-15

Trichoderma afroharzianum LMNS-M9: identification, biological characteristics, and growth-promoting effect on quinoa

TIAN Miao, PENG Yufei, LÜ Hong, QIN Nan, REN Lu, YIN Hui*, ZHAO Xiaojun*

College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, Shanxi, China

Abstract: [Background] Quinoa is an example of functional food that is popular all over the world, while little has been reported about the endophyte *Trichoderma afroharzianum* of quinoa seeds. **[Objective]** To determine the antimicrobial activity and growth-promoting effect of endophytic fungi isolated from quinoa seeds. **[Methods]** The isolated endophytic fungi were identified based on morphology and the ITS, *tef1*, and *rpb2* gene sequences characteristics. The antimicrobial effects of endophytic fungi were determined by plate confrontation method and plate culture method. The growth-promoting effect of the strain on quinoa was determined by pot experiment. **[Results]** The strain LMNS-M9 was identified as *T. afroharzianum*. The mycelial growth and sporulation of strain LMNS-M9 were promoted at 30 °C, pH 5.0, and the presence of magnesium ion. Glucose, lactose, peptone, and potassium dihydrogen phosphate were suitable for mycelial growth of strain LMNS-M9, and glucose, ammonium nitrate, and dipotassium hydrogen phosphate were suitable for sporulation. LMNS-M9 showed inhibitory activity against *Botrytis cinerea*, *Ascochyta caulina*, *Fusarium citri*, *Alternaria alternata*, and *Trichothecium roseum*, with the inhibition rates of 12.53%, 51.96%, 52.38%, 59.25%, and 62.04%, respectively. The volatiles showed the inhibition rates of 35.86%, 61.54%, 33.33%, 41.95%, and 59.09%, respectively. LMNS-M9 could contact or entangle the mycelia of pathogens (*B. cinerea*, *A. caulina*, *F. citri*, and *A. alternata*) to rupture or lyse the mycelia. The pot experiment showed that LMNS-M9 advanced the germination of quinoa seeds by 2 days. Furthermore, LMNS-M9 increased the root length, underground fresh weight, and underground dry weight of quinoa seedlings by 71.88%, 104.66%, and 68.89%, respectively. **[Conclusion]** The endophytic fungus isolated from quinoa seeds was identified as *T. afroharzianum*. It inhibited the growth of five pathogens and promoted the root growth of quinoa, demonstrating good biocontrol potential.

Keywords: quinoa; endophytic fungi; pathogens; ITS, *tef1*, and *rpb2* gene sequences; inhibition rate; mycoparasitism; solid-state fermentation

藜麦是一种原产于南美洲安第斯山脉的谷物, 富含多种氨基酸、矿物质、维生素等, 能满足人体全部营养需求^[1]。我国藜麦种植面积约 1.7 万 hm², 主要产区为甘肃省、内蒙古自治区、山西省、云南省和青海省等^[2]。藜麦种植

中, 病害是制约产业发展的因素之一, 主要有霜霉病^[3]、叶斑病^[4]、灰霉病^[5]、穗腐病^[6]和黑茎病^[7]等, 影响其产量和品质。生物防治因其符合生态农业的理念而备受关注, 木霉是目前研究和应用最多的真菌类生防制剂, 因此探索

木霉生防措施对丰富藜麦病害综合治理具有重要意义^[8]。

木霉(*Trichoderma*)是一类研究和应用非常广泛的生防真菌,隶属于囊菌门肉座菌科^[9],囊括约 280 个物种^[10-11]。木霉属中多数物种为腐生真菌,主要存在于草地、农田、坡沟、腐殖质等潮湿的生境中^[12-13]。研究表明,木霉菌[哈茨木霉(*T. harzianum*)、棘孢木霉(*T. asperellum*)、绿色木霉(*T. viride*)等]具有多种生防机制,如抑制病原菌生长、产生次级代谢产物、诱导植物抗病性、降解土壤和污水中的有毒物质等^[14-15]。其中哈茨木霉是木霉属中的典型代表^[16],已被开发成多种商品应用于番茄、黄瓜、葡萄、人参等果蔬植物灰霉病^[17],以及烟草赤星病、葡萄霜霉病、人参立枯病、番茄立枯病、百合根腐病等病害的防治(<http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>)。哈茨木霉复合种的分类一直以来备受争议,直到 2015 年,Chaverri 等^[9]将其修订为 14 个不同的物种,并新增了包括非洲哈茨木霉(*T. afroharzianum*)在内的 9 个新种。非洲哈茨木霉因源自非洲而得名,在意大利^[9]、秘鲁^[9]、日本^[9]、马来西亚^[18]、伊朗^[19]、韩国^[20]和中国^[21]等国家已有报道。非洲哈茨木霉通过产生细胞壁降解酶(β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶等)破坏病原菌[灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)]的细胞壁,使其停止生长或侵染^[22];此外,非洲哈茨木霉可通过增强番茄体内多酚氧化酶(polyphenol oxidase)、过氧化物酶(peroxidase)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)等防御保护酶的活性来提高寄主抗病性^[23],促进番茄的根长、株高和干重等^[24]。

已报道木霉属真菌也可作为内生菌存在于可可树、香蕉、茶条槭、玉米、苦瓜等植物,

如 *T. asperellum*、绿木霉(*T. virens*)、*T. harzianum* 等分离自叶片、根系、种子等^[25-28]。玉米种子内生 *T. asperellum* 可抑制玉蜀黍拟巨座壳(*Magnaporthiopsis maydis*)菌丝生长,并显著提高幼苗株高及干重^[27]。藜麦种子内生真菌丰富多样,主要为链格孢属(*Alternaria*)、镰刀菌属(*Fusarium*)、茎点霉属(*Phoma*)等;其中损毁链格孢(*A. destruens*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、多主枝孢(*Cladosporium herbarum*)等有抑菌促生或减轻金属元素胁迫等功能^[29]。目前对藜麦种子中有益内生菌株的研究相对较少,本试验旨在从藜麦种子中筛选出具有抑菌活性的内生真菌,通过形态学、ITS、*tefl* 和 *rpb2* 基因序列及生物学等方法对其进行鉴定,并分析其抑菌和促生作用,以期利用非洲哈茨木霉 LMNS-M9 防治藜麦病害提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

藜麦成熟期,在山西省静乐县藜麦(品种:稼祺 100)种植区随机采集穗部样品 10 份,自然风干、备用;盆栽试验供试藜麦品种为稼祺 100。

1.1.2 供试菌株

供试 5 种病原菌分别为交链格孢菌(*A. alternata*) LGB-h^[30]、灰葡萄孢菌(*B. cinerea*) LMHM2^[5]、柑橘镰刀菌(*F. citri*) LMSF-ld01^[6]、粉红单端孢菌(*Trichothecium roseum*) LMSF-fh05^[6]、茎生壳二孢菌(*Ascochyta caulina*) LMHS-3^[7],均为本实验室分离保存菌种。

1.1.3 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(g/L):马铃薯葡萄糖琼脂 46.0;合成低营养琼脂(SNA)培养基参照 Nirenberg^[31]的方法配制;玉米粉

葡萄糖琼脂(CMD)培养基参照 Qin 等^[32]的方法配制; 基本培养基参照李琳等^[33]的方法配制。

1.1.4 主要试剂和仪器

Taq PCR Master Mix、DNA Ladder Mix Marker、PCR 引物、Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 扩增仪, Applied Biosystems 公司; 智能人工气候箱, 宁波东南仪器有限公司; 微分干涉显微镜及成像系统, Olympus 公司; pH 计, 上海梅特勒-托利多国际有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离与培养

将供试种子标本依次用 75%乙醇浸泡 1 min, 1%次氯酸钠浸泡 5 min, 75%乙醇浸泡 1 min, 无菌水漂洗 3 次, 取最后一次漂洗液作为空白对照。将漂洗后的籽粒置于无菌环境中自然风干, 然后接种至 PDA 培养基, 25 °C 黑暗培养。待种子表面形成菌落后, 用接种针挑取边缘菌丝于 PDA 培养基上 25 °C 培养、反复纯化 3–5 代, 最后将纯化的菌株 4 °C 低温保存^[34]。

1.2.2 菌株形态学观察

将分离的菌株分别接种于 CMD、PDA 和 SNA 培养基上, 25 °C 培养 7 d, 观察菌落形态(包括颜色、质地等)。采用改良插片法观察菌株显微形态, 用显微镜观察分生孢子、瓶梗等形态, 并测量相关显微数据^[35]。

1.2.3 菌株分子鉴定

收集培养 7 d 的菌株菌丝, 液氮研磨成粉,

采用真菌基因组抽提试剂盒提取 DNA, 应用引物对菌株 LMNS-M9 的 ITS、*tefl* 和 *rpb2* 基因进行扩增(表 1)。其中 ITS 基因扩增选择引物对 ITS1/ITS4^[36], *tefl* 基因扩增选择引物对 EF1-728F/TEF1LLErev^[37-38], 设计 *rpb2* 基因引物对 Frpb2-F/Frpb2-R, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系(25 μL): *Taq* PCR Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10.0 μmol/L)各 1.0 μL, 模板 DNA 1.0 μL, ddH₂O 9.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 57 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 测序结果提交至 GenBank 数据库(表 2)。将菌株 LMNS-M9 的 ITS 基因测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 检索和比对分析。同时将菌株 LMNS-M9 的 *tefl* 和 *rpb2* 基因序列与木霉属相关种的序列进行比对, 采用邻接法(neighbor-joining method, 软件 PAUP v4.0b10)进行系统发育分析, 重复 1 000 次。

1.2.4 菌株生物学特性研究

不同营养(碳源、氮源、磷酸盐和金属离子)对菌丝生长和产孢的影响: 在基本培养基基础上, 将葡萄糖替换为等质量的蔗糖和乳糖为碳源, 将硝酸铵替换为等质量的蛋白胨和硫酸铵为氮源, 将磷酸氢二钾替换为等质量的磷酸二氢钾为磷酸盐, 将硫酸镁替换为等质量的硫酸铜和碳酸钙为金属离子, 进而配制成不同碳源、氮源、磷酸盐、金属离子的培养基。将

表 1 本研究中涉及的引物

Table 1 Primers used in this study

Gene name	Primers name	Sequences (5'→3')	Product size (bp)
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	546
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
<i>tefl</i>	EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	1 241
	TEF1LLErev	AACTTGCAGGCAATGTGG	
<i>rpb2</i>	Frpb2-F	CCTGCTGGCCAAGCTGT	944
	Frpb2-R	CAGATACCTAAGATCATAC	

表 2 用于多基因序列分析的菌株及序列登录号

Table 2 Strains and GenBank accession numbers used in this study

Species	Strain No.	Geographical origin	GenBank accession No.		
			ITS	<i>tefl</i>	<i>rpb2</i>
<i>T. afroharzianum</i>	LMNS-M9	Shanxi, China	OQ472509	OQ509672	OQ686718
	T22	Colombia; New York	AF469188	AF469194	KP009145
	G.J.S. 00-24	Mexico	AF443922	AF443940	FJ442726
	CBS 130439	Montana, USA	FJ442671	FJ463401	—
	CBS 124620	Peru	FJ442265	FJ463301	FJ442691
	CBS 124614	Peru	FJ442233	FJ463298	FJ442709
	CBS 130443	Peru	FJ442214	FJ463302	FJ442740
	G.J.S. 05-113	Italy	FJ442235	FJ463378	—
	CBS 134709	—	KP115287	KP115273	—
	G.J.S. 97-263	Japan	AF194010	AF348091	—
	G.J.S. 97-268	Japan	AF194015	AF348105	—
	G.J.S. 99-225	Cameroon	AY027781	AF348106	—
	Z19	Shandong, China	KR911900	KR911897	—
	SC098	Sichuan, China	OK335763	OK338641	—
	TM2-4	Beijing, China	MK779176	MK779175	MK779174
<i>T. afarasin</i>	CBS 130501	Cameroon	FJ442630	FJ463327	—
	CBS 130755	Cameroon	AY027784	AF348093	—
<i>T. atrobrunneum</i>	G.J.S. 05-467	UK	FJ442628	FJ463303	—
	G.J.S. 05-469	UK	FJ442629	FJ463304	—
<i>T. camerunense</i>	CBS 137272	Cameroon	AY027780	AF348107	—
<i>T. endophyticum</i>	DIS 221D	Ecuador	FJ442248	FJ463389	FJ442794
	DIS 220K	Ecuador	FJ442270	FJ463328	FJ442765
<i>T. guizhouense</i>	CBS 134707	—	KP115286	KP115271	—
	G.J.S. 85-119	Indonesia	AF443923	AF443941	FJ442718
<i>T. harzianum</i>	CBS 226.95	UK	AJ222720	AF348101	AF545549
	CBS 227.95	UK	AJ222721	AF348100	—
<i>T. inhamatum</i>	CBS 273.78	Colombia	FJ442680	AF348099	FJ442725
<i>T. lentiforme</i>	CBS 100542	Guiana, French	AF469189	AF469195	—
	DIS 167E	Brazil	FJ442644	FJ463333	FJ442764
<i>T. lixii</i>	CBS 110080	Thailand	AF443920	AF443938	KJ665290
<i>T. neotropiale</i>	G.J.S. 11-185	Peru	HQ022407	HQ022771	—
	G.J.S. 11-198	Peru	FJ884107	FJ967803	—
<i>T. pyramidale</i>	CBS 135574	Italy	—	KJ665699	KJ665334
<i>T. rifaii</i>	CBS 130745	Panama	FJ442621	FJ463321	FJ442720
<i>T. simmonsii</i>	CBS 123765	North Carolina, USA	AF443918	AF443936	FJ442798
	CBS 130431	Maryland, USA	AF443917	AF443935	FJ442757
<i>T. aggressivum</i>	CBS 100525	UK	AF057600	AF348095	AF545541

—: 无数据

—: No data.

菌株 LMNS-M9 的菌饼(直径 5 mm)接种至上述培养基, 25 °C 培养, 重复 3 次。2 d 时采用十字交叉法测量菌落直径, 计算不同培养基条件下菌丝的生长速率。7 d 时用血球计数板计算产孢量^[39]。

不同 pH 对菌丝生长和产孢的影响: 待灭菌后的 PDA 培养基冷却至 80 °C 左右, 用 1 mol/L NaOH 和 HCl 溶液将 pH 值分别调整至 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0, 将菌株 LMNS-M9 的菌饼接种于不同 pH 的 PDA 培养基上, 25 °C 培养, 重复 3 次。计算不同 pH 条件下菌丝的生长速率和产孢量。

不同温度对菌丝生长和产孢的影响: 将菌株 LMNS-M9 的菌饼接种至 PDA 培养基上, 分别置于 20、25、30 和 35 °C 培养, 重复 3 次。计算不同温度条件下菌丝的生长速率和产孢量。

菌丝生长速率(mm/d)=(菌落直径-菌饼直径)/2;
产孢量(CFU/mL)=[(X₁+X₂+X₃+X₄+X₅)/80]×400×10⁴×稀释倍数, 其中 X₁-X₅ 为 5 个中方格中的分生孢子数。

1.2.5 菌株抑菌作用测定

抑菌作用测定: 将菌株 LMNS-M9 于 PDA 培养基、25 °C 培养 5 d, 在其菌落边缘取菌饼。将菌株 LMNS-M9 的菌饼接种至距离 PDA 培养基边缘 5 mm 处, 在其中心对称点接种供试病原菌的菌饼, 只接种病原菌为对照, 25 °C 培养, 重复 3 次。7 d 时观察并测量菌落半径, 计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照的菌落半径-处理的菌落半径)/(对照的菌落半径-菌饼半径)×100。

竞争作用测定: 参照 Bell 等^[40-41]的方法对木霉拮抗系数进行分级, I级: 木霉菌丝覆盖率 100%; II级: 木霉菌丝覆盖率>2/3; III级: 1/3<木霉菌丝覆盖率<2/3; IV级: 木霉菌丝覆盖率<1/3; V级: 病原菌菌丝覆盖率 100%。

挥发物抑菌作用测定: 将菌株 LMNS-M9 和供试病原菌 25 °C 培养 5 d, 取其菌饼分别接种到 PDA 培养基中心。将接种病原菌的 PDA 培养基倒扣在接种菌株 LMNS-M9 的 PDA 培养基上方, 封口膜封口, 以空白 PDA 培养基与接种病原菌的 PDA 培养基倒扣为对照, 25 °C 培养, 重复 3 次。7 d 时采用十字交叉法测量病原菌菌落直径, 计算抑菌率。

抑菌率(%)=(对照的菌落直径-处理的菌落直径)/(对照的菌落直径-菌饼直径)×100。

重寄生作用测定: 将菌株 LMNS-M9 和供试病原菌 25 °C 培养 3 d, 收集菌丝, 用无菌水洗脱制成菌丝悬浮液。待灭菌的 PDA 培养基冷却至 50 °C 左右, 取 1 mL 均匀涂布于无菌载玻片, 大小约 4.0 cm×2.5 cm×0.1 cm。待其凝固后, 分别取菌株 LMNS-M9 和供试病原菌的菌丝悬浮液 20 μL, 接种至上述涂片两端(间隔 2 cm), 置于铺有灭菌湿滤纸的培养皿中, 25 °C 培养 1-2 d, 重复 3 次, 用显微镜观察重寄生现象。

1.2.6 菌株促生作用测定

将无菌的育苗基质均匀平铺在无菌托盘中(50 cm×36 cm×3 cm), 取 50 个菌饼接种至基质表面, 保鲜膜覆盖保湿, 25 °C 培养 5 d, 待菌丝布满整个基质后混合均匀, 称取 1 g 基质加入 100 mL 无菌水中, 使用血球计数板统计产孢量。

将发酵好的基质分装于塑料育苗盆(口径 11 cm, 底径 8 cm, 盆高 10 cm), 每盆播种供试藜麦种子 10 粒, 以未发酵的无菌基质为对照, 重复 5 次。播种后 2-4 d, 每天统计出苗率; 35 d 时挖出幼苗, 测量株高、根长及鲜重(地上部和地下部)。最后将其置于 105 °C 烘箱中 30 min, 烘干, 测量其干重, 参照赵玳琳等^[42]的方法进行评估。

2 结果与分析

2.1 菌株 LMNS-M9 的生物学特性

2.1.1 形态特征

本研究从藜麦种子中共分离到内生真菌 9 株, 其中菌株 LMNS-M9 对藜麦病害病原有较好的抑菌作用。因此, 选取菌株 LMNS-M9 进行系统研究。培养 7 d 时, 菌株 LMNS-M9 在 3 种培养基上的菌落形态、质地及颜色等差异明显。在 SNA 培养基上菌丝稀疏, 白色至浅绿色(图 1A、1B)。在 PDA 培养基上菌丝丰富, 绒毛状或棉絮状, 正面呈黄绿色至绿色, 产孢簇呈环状分布、并向外扩展, 背面白色至浅黄色(图 1C、1D); 在 CMD 培养基上菌丝丰富, 棉絮状, 正面白色至深绿色, 背面白色至黄色(图 1E、1F)。

在 PDA 培养基上可观察到黄绿色的产孢簇(图 2A、2B); 分生孢子梗呈金字塔形, 主轴锐角或 90°分枝(图 2C、2D), 各分枝和主轴末端多轮生 3–4 个瓶梗(至多 5 个), 瓶梗安瓿状至烧瓶状, 大小(5.6–12.3) $\mu\text{m} \times (2.2\text{--}3.6) \mu\text{m}$, 平均 9.3 $\mu\text{m} \times 2.9 \mu\text{m}$ (图 2E、2F); 分生孢子着生在瓶梗顶端, 球形至卵圆形, 大小(2.9–6.3) $\mu\text{m} \times (2.3\text{--}4.0) \mu\text{m}$, 平均 4.1 $\mu\text{m} \times 2.9 \mu\text{m}$ (图 2G、2H)。在 SNA 培养基上, 瓶梗大小为(5.9–12.9) $\mu\text{m} \times (2.0\text{--}3.8) \mu\text{m}$, 平均 9.3 $\mu\text{m} \times 3.2 \mu\text{m}$; 分生孢子大小为(2.5–4.2) $\mu\text{m} \times (2.1\text{--}3.6) \mu\text{m}$, 平均 3.4 $\mu\text{m} \times 2.9 \mu\text{m}$ 。在 CMD 培养基上, 瓶梗大小为(5.9–16.2) $\mu\text{m} \times (2.2\text{--}4.2) \mu\text{m}$, 平均 10.2 $\mu\text{m} \times 3.1 \mu\text{m}$; 分生孢子大小为(2.8–4.2) $\mu\text{m} \times (2.2\text{--}3.6) \mu\text{m}$, 平均 3.4 $\mu\text{m} \times 3.0 \mu\text{m}$ 。

2.1.2 基于 ITS、*tef1* 和 *rpb2* 基因的系统发育分析

菌株 LMNS-M9 的 ITS、*tef1* 和 *rpb2* 基因序列长度分别为 546、1 241 和 944 bp。将 ITS 基因序列与 NCBI 数据库中相近菌株的序列进行 BLAST 比对, 发现其与 *T. afroharzianum*

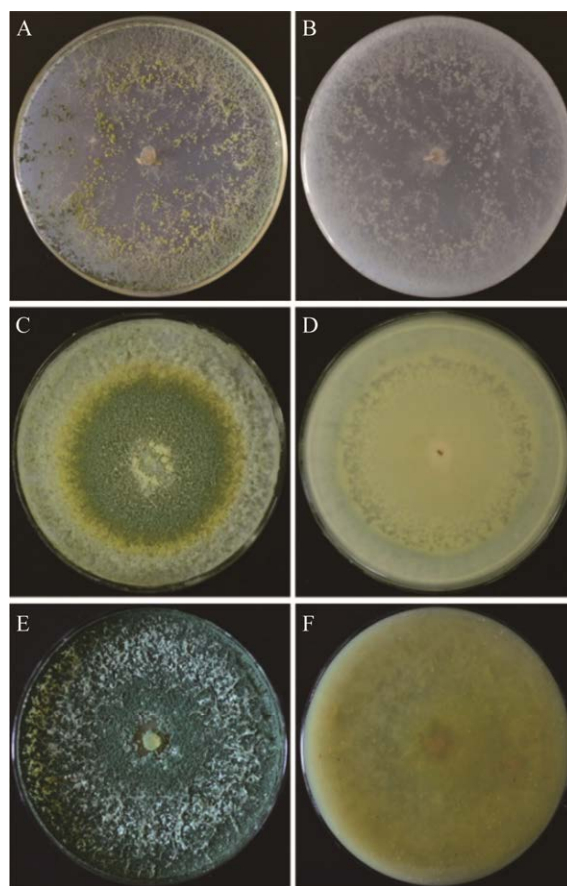


图 1 菌株 LMNS-M9 在不同培养基上的菌落形态 A–B: SNA 培养基上的菌落正面和背面形态. C–D: PDA 培养基上的菌落正面和背面形态. E–F: CMD 培养基上的菌落正面和背面形态

Figure 1 Colony morphology of strain LMNS-M9 on different media. A–B: Colony morphology on the upside and downside of SNA. C–D: Colony morphology on the upside and downside of PDA. E–F: Colony morphology on the upside and downside of CMD.

(MK779176、AF194010、KP115287 和 FJ442214)、*T. lixii* (AF443920)、*T. simmonsii* (AF443917) 和 *T. guizhouense* (KP115286) 的相似性高达 100%, 无法区分以上几个物种。以 *tef1* 基因序列构建系统发育树发现, 菌株 LMNS-M9 与 Z19、CBS 124614、TM2-4、SC098、G.J.S. 97-268、G.J.S. 99-225、CBS 130443、CBS 124620、CBS

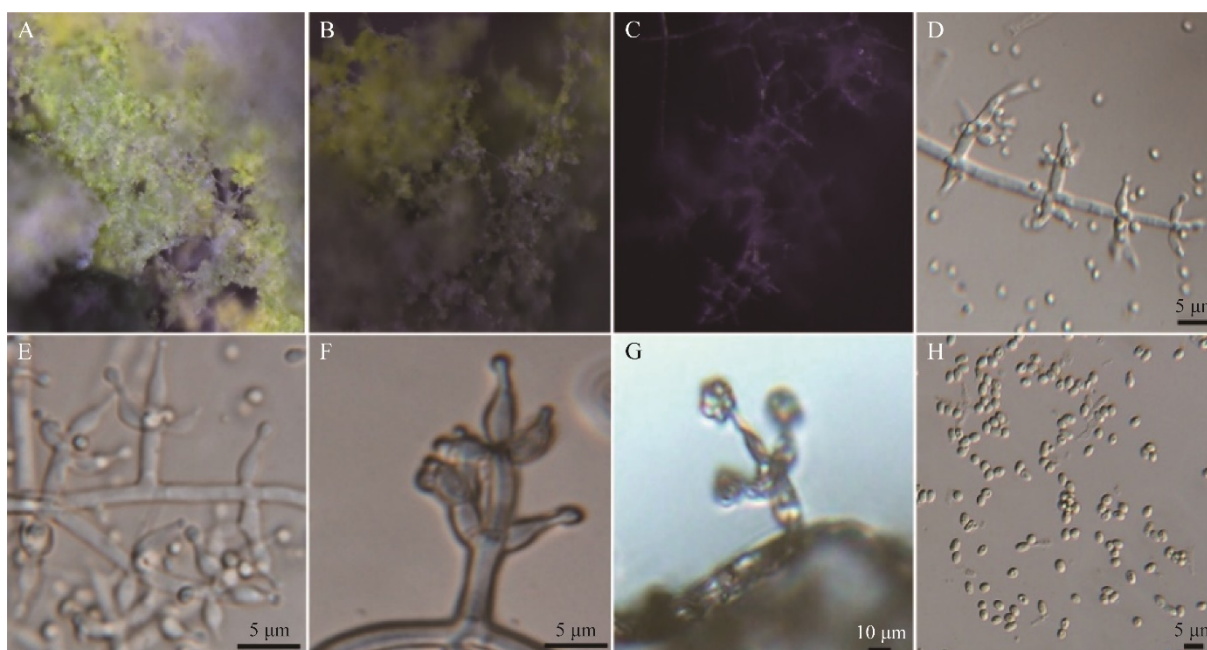


图2 菌株 LMNS-M9 在 PDA 培养基上的显微形态特征 A-B: 产孢簇. C-D: 分生孢子梗. E-F: 瓶梗. G-H: 分生孢子

Figure 2 Microscopic characteristics of strain LMNS-M9 on PDA. A-B: Pustules. C-D: Conidiophores. E-F: Phialides. G-H: Conidia.

134709、G.J.S.97-263、T22、CBS 130439、G.J.S. 05-113 和 G.J.S. 00-24 共 15 株 *T. afroharzianum* 以 98% 的自展支持率聚为一个分支(图 3A), 区别于木霉属其他种。在以 *rpb2* 基因序列构建的系统发育树中, 菌株 LMNS-M9 与 G.J.S. 00-24、CBS 124620、T22、CBS 130443、TM2-4 和 CBS 124614 共 7 株 *T. afroharzianum* 以 100% 的自展支持率聚为一个分支, 与木霉属其他种明显区分开来(图 3B)。综合形态学和系统发育分析确定菌株 LMNS-M9 为非洲哈茨木霉(*T. afroharzianum*)。

2.1.3 不同营养对菌株 LMNS-M9 菌丝生长和产孢的影响

三种碳源相比, 菌株 LMNS-M9 在含葡萄糖和乳糖的培养基上生长速率显著高于含蔗糖的培养基, 在含葡萄糖和乳糖的培养基上生长速率为 21.4 mm/d 和 20.3 mm/d, 二者差异不显

著。3 种氮源相比, 菌株 LMNS-M9 在含蛋白胨的培养基上生长速率显著高于含硝酸铵和硫酸铵的培养基, 生长速率为 27.8 mm/d。两种磷酸盐相比, 磷酸二氢钾显著高于磷酸氢二钾, 生长速率为 26.9 mm/d。3 种金属离子相比, 菌株 LMNS-M9 在含硫酸镁的培养基上生长速率显著高于含碳酸钙和硫酸铜的培养基, 生长速率为 21.4 mm/d (图 4A)。

三种碳源相比, 菌株 LMNS-M9 在含葡萄糖的培养基上的产孢量显著高于含蔗糖和乳糖的培养基, 产孢量范围为 1.8×10^6 – 23.8×10^6 CFU/mL。3 种氮源相比, 菌株 LMNS-M9 在含硝酸铵的培养基上的产孢量显著高于含蛋白胨和硫酸铵的培养基, 产孢量范围为 1.0×10^6 – 23.8×10^6 CFU/mL。两种磷酸盐相比, 磷酸氢二钾显著高于磷酸二氢钾, 产孢量范围为 4.0×10^6 – 23.8×10^6 CFU/mL。3 种金属离子相比, 菌株 LMNS-M9 在含硫酸镁

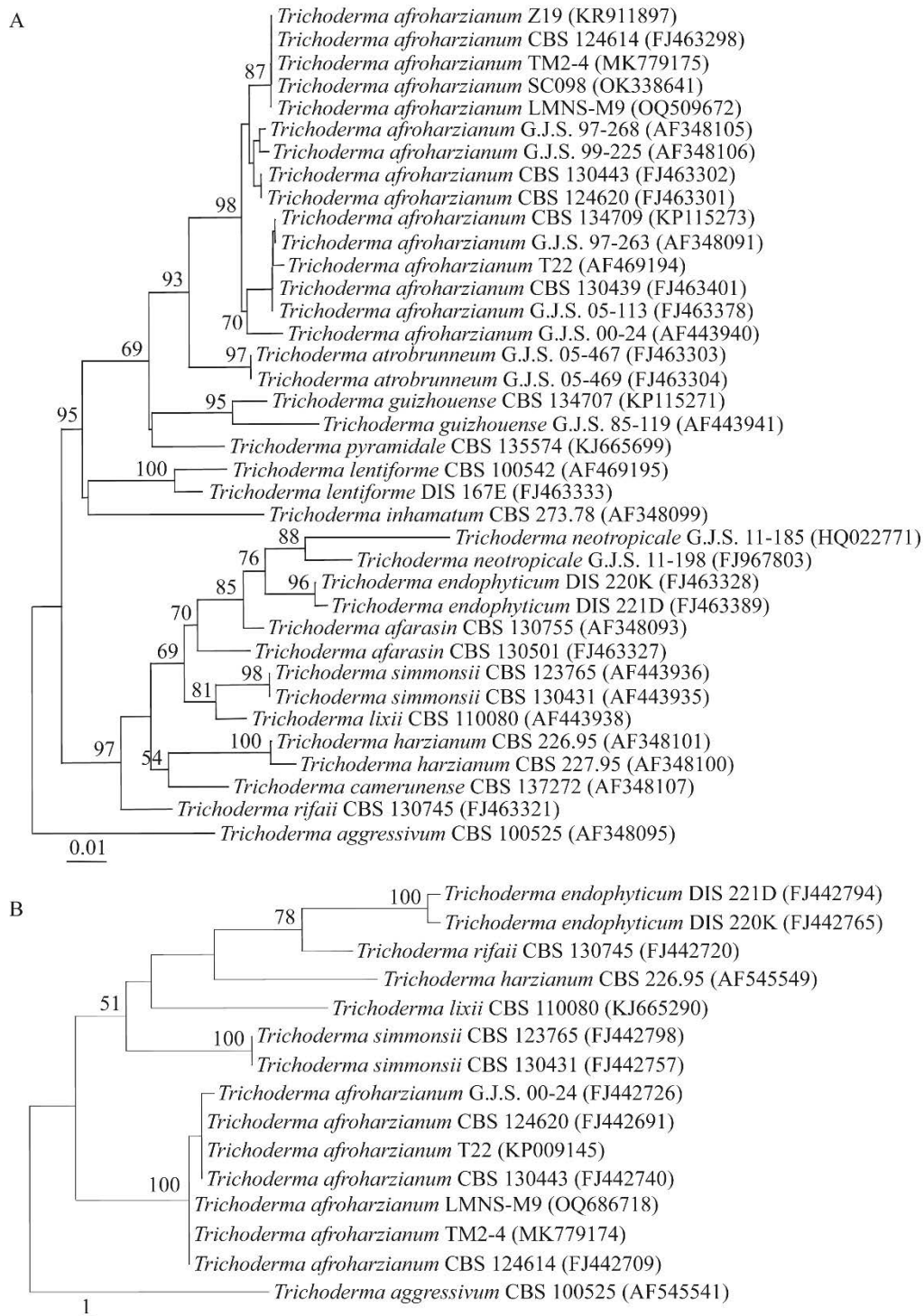


图3 菌株 LMNS-M9 基于 *tef1* 基因序列(A)和 *rpb2* 基因序列(B)构建的系统发育树 括号内为序列的 GenBank 登录号; 分支点数据代表 bootstrap 的支持率; 分支长度代表进化距离

Figure 3 The phylogenetic tree based on *tef1* gene sequences (A) and *rpb2* gene sequences (B) of strain LMNS-M9. The GenBank accession numbers of aligned sequences were shown in the parenthesis; Values at branch nodes represent bootstrap value; The length of branch represents the evolutionary distance.

的培养基上的产孢量显著高于含碳酸钙和硫酸铜的培养基, 产孢量范围为 $0.0\text{--}23.8\times 10^6$ CFU/mL (图 4B)。

2.1.4 不同 pH 对菌株 LMNS-M9 菌丝生长和产孢的影响

pH 对菌株 LMNS-M9 的菌丝生长有显著影

响, 适宜 pH 值为 5.0–6.0, 生长速率为 32.2–33.5 mm/d, 显著高于其他 pH。当 $\text{pH}<2.0$ 时, 生长速率显著降低, 小于 8.9 mm/d; 当 $\text{pH}>9.0$ 时, 生长速率趋近于 0 mm/d (图 4C)。

菌株 LMNS-M9 在 pH 值为 4.0–9.0 时可产孢, 最适 pH 值为 5.0, 产孢量为 16.8×10^6 CFU/mL,

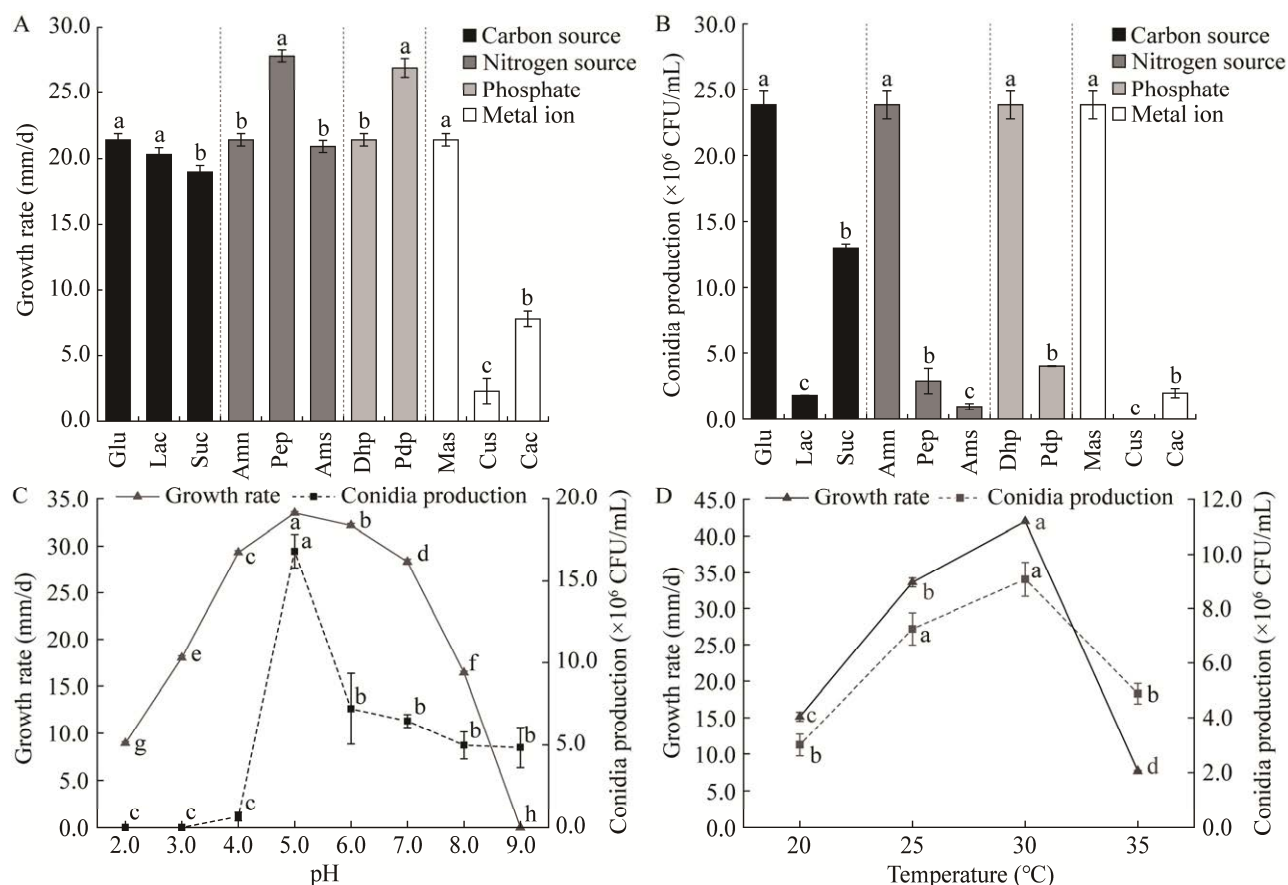


图 4 不同营养、pH 和温度对菌株 LMNS-M9 菌丝生长和产孢的影响 A: 不同营养对菌株 LMNS-M9 菌丝生长的影响. B: 不同营养对菌株 LMNS-M9 产孢的影响. C: 不同 pH 对菌株 LMNS-M9 菌丝生长和产孢的影响. D: 不同温度对菌株 LMNS-M9 菌丝生长和产孢的影响. Glu: 葡萄糖; Lac: 乳糖; Suc: 蔗糖; Amn: 硝酸铵; Pep: 蛋白胨; Ams: 硫酸铵; Dhp: 磷酸氢二钾; Pdp: 磷酸二氢钾; Mas: 硫酸镁; Cus: 硫酸铜; Cac: 碳酸钙. 图中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$), 下同

Figure 4 Effects of different nutrition, pH and temperature on mycelial growth and sporulation of strain LMNS-M9. A: Effects of different nutrition on mycelial growth of strain LMNS-M9. B: Effects of different nutrition on sporulation of strain LMNS-M9. C: Effects of different pH on mycelial growth and sporulation of strain LMNS-M9. D: Effects of different temperature on mycelial growth and sporulation of strain LMNS-M9. Glu: Glucose; Lac: Lactose; Suc: Sucrose; Amn: Ammonium nitrate; Pep: Peptone; Ams: Ammonium sulfate; Dhp: Dipotassium hydrogen phosphate; Pdp: Potassium dihydrogen phosphate; Mas: Magnesium sulphate; Cus: Cupric sulfate; Cac: Calcium carbonate. Different lowercase letters represent significant differences ($P<0.05$), the same below.

显著高于其他 pH。当 pH<4.0 或 pH>6.0 时,产孢量显著降低,低于 7.2×10^6 CFU/mL; 当 pH<3.0 时,菌株 LMNS-M9 不产孢(图 4C)。

2.1.5 不同温度对菌株 LMNS-M9 菌丝生长和产孢的影响

适宜菌株 LMNS-M9 菌丝生长的温度为 25–30 °C, 生长速率为 33.6–42.0 mm/d; 当低于 20 °C 或高于 35 °C 时, 生长速率显著下降, 低于 15.1 mm/d (图 4D)。适宜菌株 LMNS-M9 产孢的温度为 30 °C, 产孢量最大为 9.1×10^6 CFU/mL; 当低于 25 °C 或高于 35 °C 时, 产孢量显著下降, 低于 4.9×10^6 CFU/mL (图 4D)。

2.2 菌株 LMNS-M9 对病原菌的抑制作用

菌株 LMNS-M9 对 5 种病原菌有不同程度的抑制作用。对峙培养 7 d 时, 菌株 LMNS-M9 与 *B. cinerea* 和 *T. roseum* 的交界处产生黄褐色条带, 与 *A. caulina* 间有明显抑菌带(图 5A), 拮抗指数为 II–III 级, 其中对 *T. roseum* 的拮抗作用最高, 拮抗指数为 II 级, 对 *B. cinerea* 的拮抗作用最低, 拮抗指数为 III 级; 对峙培养 12 d 时, 菌株 LMNS-M9 能覆盖 *A. caulina*、*F. citri* 和 *A. alternata* 这 3 种病原菌的菌落(图 5B)。7 d 时, 菌株 LMNS-M9 对 *B. cinerea*、*A. caulina*、*F. citri*、*A. alternata* 和 *T. roseum* 的平板对峙抑

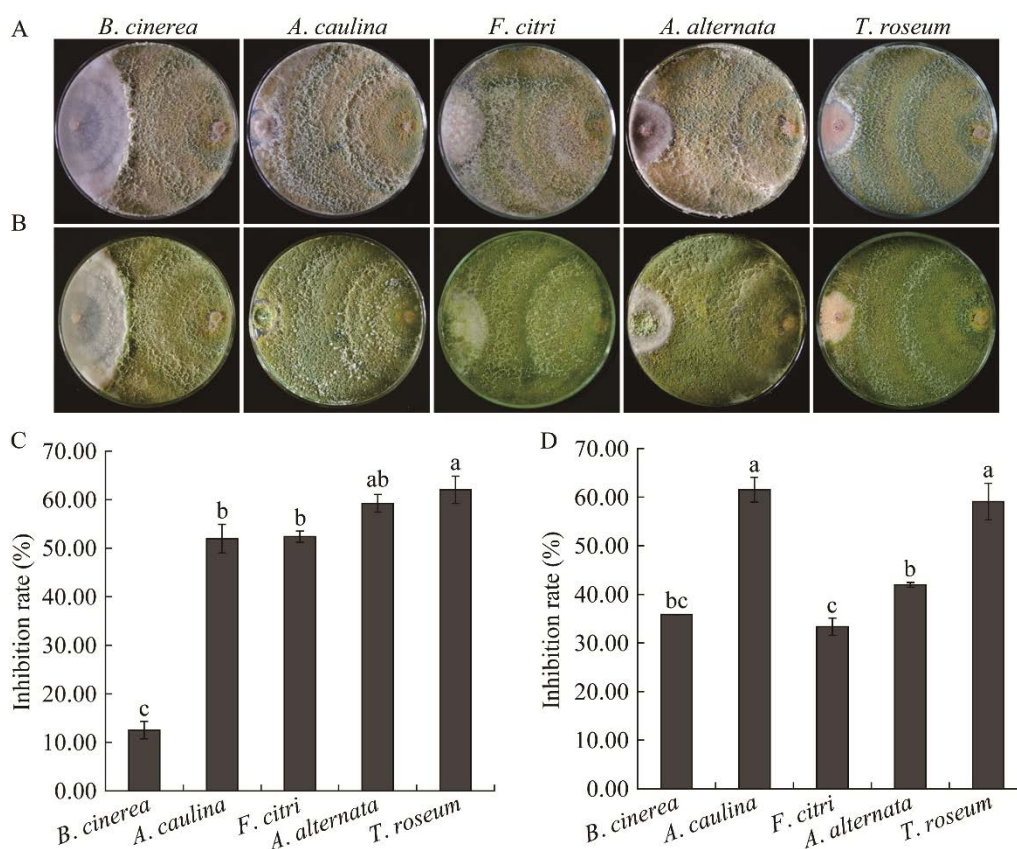


图 5 菌株 LMNS-M9 对病原菌的抑制作用 A: 菌株 LMNS-M9 与病原菌对峙培养 7 d 的菌落. B: 菌株 LMNS-M9 与病原菌对峙培养 12 d 的菌落. C: 对峙培养的抑制率(7 d). D: 倒扣培养的抑制率(7 d)

Figure 5 Inhibitory effect of strain LMNS-M9 against pathogens. A: Colonies of strain LMNS-M9 against pathogens for 7 d. B: Colonies of strain LMNS-M9 against pathogens for 12 d. C: The inhibition rate of flat plate confrontation (7 d). D: The inhibition rate of plate culture (7 d).

制率依次为 12.53%、51.96%、52.38%、59.25%和 62.04% (图 5C); 挥发物的抑制率依次为 35.86%、61.54%、33.33%、41.95%和 59.09% (图 5D)。

对峙培养发现菌株 LMNS-M9 的菌丝可接触、缠绕 *B. cinerea*、*A. caulina*、*F. citri* 和 *A. alternata* 的菌丝(图 6 黑色箭头所指), 使 *B. cinerea*、*F. citri*、*A. alternata* 的菌丝断裂、消解(图 6 白色箭头所指)。菌株 LMNS-M9 与 *T. roseum* 的菌丝生长互不影响, 对照组病原菌正常生长(图 6B)。

2.3 菌株 LMNS-M9 对藜麦幼苗生长的影响

接种菌株 LMNS-M9 5 d 后, 基质表层逐渐

变绿, 孢子量为 3.3×10^8 CFU/g (图 7A)。播种后 2 d, 相比对照在含非洲哈茨木霉 LMNS-M9 的基质上显著使藜麦提早出苗; 在含非洲哈茨木霉 LMNS-M9 的基质上藜麦的出苗率为 69.0%, 对照出苗率为 30.0%; 4 d 时, 两组相比出苗率无显著性差异(图 7B、7C)。35 d 时, 相比对照, 在含非洲哈茨木霉 LMNS-M9 的基质上藜麦幼苗的根长显著长于对照, 为 9.32 cm; 而株高无显著性差异, 分别为 10.53 cm 和 10.10 cm (图 7D、7E)。相比对照, 在含非洲哈茨木霉 LMNS-M9 的基质上藜麦幼苗的地上部鲜重、地下部鲜重、地下部干重显著高于对照, 为 0.959 0、0.057 1 和 0.007 6 g (图 7F、7G)。

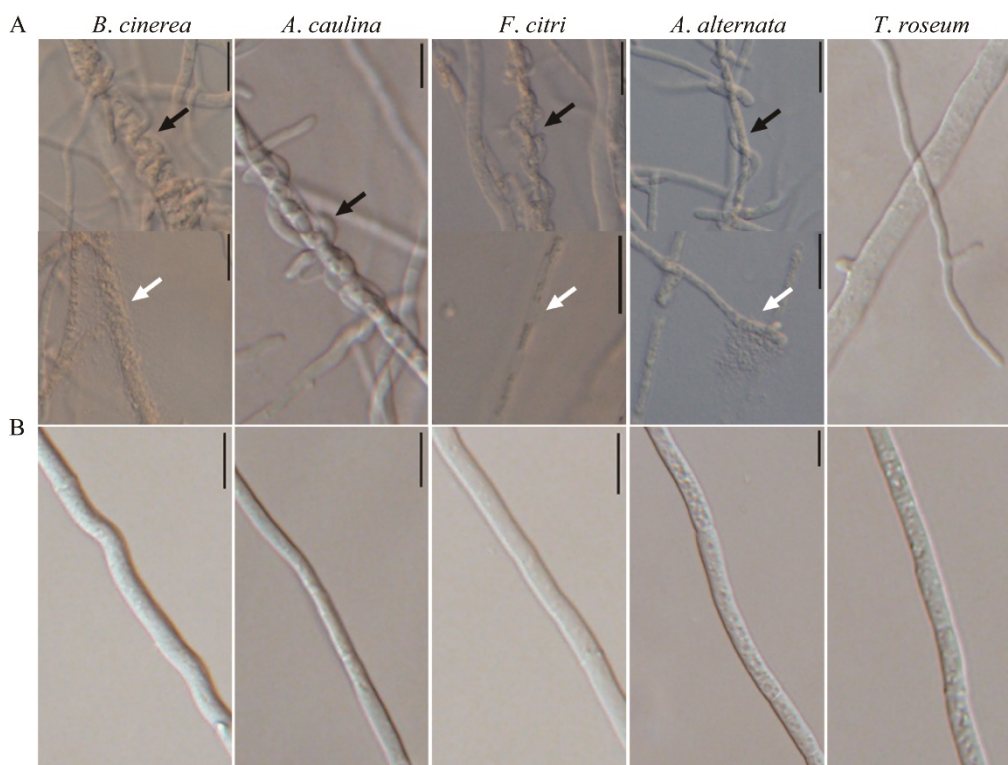


图 6 菌株 LMNS-M9 对病原菌的重寄生作用 A: 处理组. B: 对照组. 黑色箭头: 菌株 LMNS-M9 对病原菌菌丝的缠绕; 白色箭头: 病原菌菌丝断裂或消解; 标尺=10 μ m

Figure 6 The mycoparasitism effects of strain LMNS-M9 against pathogens. A: Treatment groups. B: Control groups. Black arrow: Entanglement of strain LMNS-M9 mycelia on pathogen mycelia; White arrow: Rupture and digestion of pathogen mycelia; Bars=10 μ m.

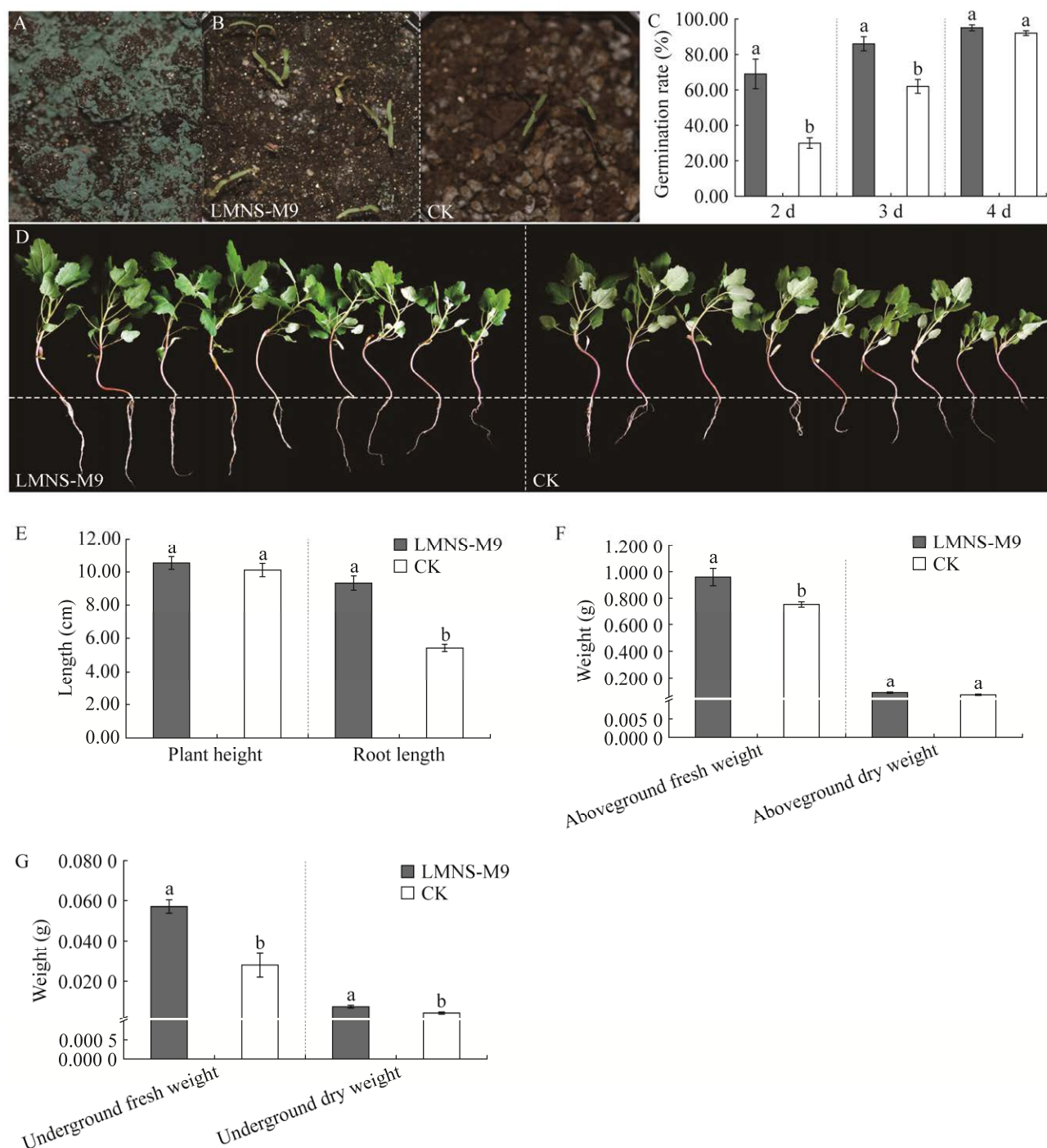


图7 菌株 LMNS-M9 对藜麦生长的影响 A: 菌株 LMNS-M9 的固态发酵. B: 出苗情况(2 d). C: 出苗率. D: 幼苗生长情况. E: 株高、根长. F: 地上部鲜重、干重. G: 地下部鲜重、干重

Figure 7 Effect of strain LMNS-M9 on the growth of quinoa. A: Solid-state fermentation of strain LMNS-M9. B: Germination condition (2 d). C: Germination rate. D: Seedling growth condition. E: Plant height and root length. F: Aboveground fresh and dry weight. G: Underground fresh and dry weight.

3 讨论与结论

ITS、*tef1*、*rpb2*、*cal* 和 *act* 等基因是木霉属各个物种鉴定的常用基因^[9]。ITS 基因在木霉属种的水平上相对保守, 通常难以区分亲缘关系较近的物种^[43]。本研究菌株 LMNS-M9 的 ITS 基因序列与 *T. afroharzianum*、*T. lixii*、*T. simmonsii* 和 *T. guizhouense* 的序列基本一致, 无法将其区分。上述 5 个基因中 *tef1* 和 *rpb2* 使用频率最高, 依据其将多个新种归为哈茨木霉, 如近哈茨木霉(*T. anaharzianum*)^[43]、亚洲木霉(*T. asiaticum*)^[43]和褐红木霉(*T. rufobrunneum*)^[44]等。本研究通过 *tef1* 和 *rpb2* 基因系统发育分析, 发现菌株 LMNS-M9 与 *T. afroharzianum* 亲缘关系最近, 将其鉴定为非洲哈茨木霉。非洲哈茨木霉菌株 LMNS-M9 菌丝生长和产孢的适宜温度为 30 °C, 此结果与前人研究结果^[21]一致。李婉云等^[45]报道的非洲哈茨木霉 BB1 最适生长和产孢 pH 值为 6.0, 而菌株 LMNS-M9 在 pH 值为 5.0 时生长最快且产孢量最大, 说明菌株 LMNS-M9 更适合在偏酸、偏暖的环境中生存。据报道, 在非洲哈茨木霉固体发酵培养基中加入葡萄糖、硫酸铵、磷酸二氢钾、硫酸镁后, 可将其产孢量提高至 50 亿/g^[46]。菌株 LMNS-M9 在含葡萄糖和硫酸镁的培养基上菌丝生长最快且产孢量最大。有所不同的是, 磷酸二氢钾和硫酸铵对菌株 LMNS-M9 的产孢量无显著提高, 而硝酸铵和磷酸氢二钾可显著提高其产孢量, 表明不同来源的非洲哈茨木霉对不同营养成分的利用有所差异^[46]。此外, 菌株 LMNS-M9 在含硫酸铜的培养基上生长缓慢且不产孢, 表明铜离子可能对其生长、产孢等有影响。因此, 在菌株 LMNS-M9 的应用中可关注基质、土壤等环境中铜离子的含量。

非洲哈茨木霉抑菌谱较广, 对

C. gloeosporioides^[22]、黄色镰刀菌(*F. culmorum*)^[22]、串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)^[46]、*F. oxysporum*^[47]、*B. cinerea*^[47]、果生链核盘菌(*Monilinia fructicola*)^[47]、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)^[48]和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)^[49]等均有抑制作用。研究表明, 非洲哈茨木霉 SC098^[22]、TM24^[23]和 T14^[50]对镰刀菌 *F. oxysporum* 和 *F. culmorum* 的抑制率范围为 43.40%–80.68%。本研究中菌株 LMNS-M9 对 *F. citri* 的抑制率介于菌株 SC098 和 TM24 之间, 为 52.38%, 且菌株 LMNS-M9 可接触、缠绕、消解 *F. citri*。非洲哈茨木霉对 *B. cinerea* 的生防作用研究较多, 菌株 SC098^[22]、TM24^[23]和 LTR-2^[51]可有效抑制 *B. cinerea*, 抑制率范围为 74.20%–100.00%; 其中, 菌株 LTR-2 可重寄生 *B. cinerea*^[52]。菌株 LMNS-M9 对 *B. cinerea* 的抑菌活性较低, 抑制率为 12.53%, 且可消解 *B. cinerea* 的菌丝。此外, 本研究首次发现非洲哈茨木霉 LMNS-M9 可抑制 *A. caulina*、*A. alternata* 和 *T. roseum*, 丰富了非洲哈茨木霉的抑菌谱。Khruengsaai 等^[53]研究发现汉桃叶内生非洲哈茨木霉产生的挥发性物质能够抑制层出镰刀菌(*F. proliferatum*)和 *F. oxysporum* 的生长, 抑制率为 89.78%–94.67%, 且均未观察到分生孢子。菌株 LMNS-M9 对 *B. cinerea*、*F. citri*、*A. caulina*、*A. alternata* 和 *T. roseum* 对峙培养的抑制率和倒扣培养的抑制率相当, 推测菌株 LMNS-M9 对 *B. cinerea*、*F. citri*、*A. caulina*、*A. alternata* 和 *T. roseum* 的抑制作用主要依赖于挥发性物质。

截至目前已报道非洲哈茨木霉能够促进圣女果、草莓、番茄、黄瓜、向日葵等植物的生长^[47-49]。菌株 SC098^[22]和 TM2-4^[24]可显著提高番茄的株高和根长, 分别提高了 36.10%和 34.68%; 菌株 838 可使向日葵幼苗的株高、鲜重、根冠比分别提高 58.82%、595.17%和 41.67%^[47]。本研究发现, 含非洲哈茨木霉 LMNS-M9 的基质对藜

麦幼苗根鲜重的促进作用最大, 为 104.66%。相比对照在含非洲哈茨木霉 LMNS-M9 的基质上藜麦可提早 2 d 出苗, 推测菌株 LMNS-M9 可促进藜麦种子的萌发, 进而加快幼苗形态建成和物质积累, 使在含非洲哈茨木霉 LMNS-M9 基质上的藜麦幼苗占据生长优势。

REFERENCES

- [1] 李振奇, 刘伊明, 李晓健, 许素娟. 国内外藜麦研究现状与趋势分析[J]. 河北农业科学, 2022, 26(4): 41-46.
LI ZQ, LIU YM, LI XJ, XU SJ. Current situation and trend analysis of quinoa research at home and abroad[J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2022, 26(4): 41-46 (in Chinese).
- [2] 任贵兴, 杨修仕, 么杨. 中国藜麦产业现状[J]. 作物杂志, 2015(5): 1-5.
REN GX, YANG XS, YAO Y. Current situation of quinoa industry in China[J]. Crops, 2015(5): 1-5 (in Chinese).
- [3] 殷辉, 周建波, 常芳娟, 吕红, 巩亮军, 赵晓军. 藜麦霜霉病病原菌鉴定[J]. 植物病理学报, 2018, 48(3): 413-417.
YIN H, ZHOU JB, CHANG FJ, LÜ H, GONG LJ, ZHAO XJ. Identification of pathogen causing downy mildew of *Chenopodium quinoa*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2018, 48(3): 413-417 (in Chinese).
- [4] 王建鹏, 卓玛曲措, 王延宇, 普仓, 旺姆. 藜麦叶斑病的分离鉴定及其生防菌的筛选[J]. 高原农业, 2020, 4(5): 463-469.
WANG JP, ZHUOMA QC, WANG YY, PU C, WANG M. Isolation and identification of quinoa leaf spot and screening of biocontrol bacterium[J]. Journal of Plateau Agriculture, 2020, 4(5): 463-469 (in Chinese).
- [5] 殷辉, 陈亚蕾, 秦楠, 周建波, 任璐, 赵晓军. 藜麦灰霉病病原菌鉴定及环境因子对其菌丝生长和分生孢子萌发的影响[J]. 植物保护学报, 2022, 49(3): 899-908.
YIN H, CHEN YL, QIN N, ZHOU JB, REN L, ZHAO XJ. Identification of the pathogen causing quinoa gray mold and effects of environmental factors on its mycelial growth and conidial germination[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(3): 899-908 (in Chinese).
- [6] YIN H, ZHOU JB, CHEN YL, REN L, QIN N, XING YL, ZHAO XJ. Morphology, phylogeny, and pathogenicity of *Trichothecium*, *Alternaria*, and *Fusarium* species associated with panicle rot on *Chenopodium quinoa* in Shanxi Province, China[J]. Plant Pathology, 2022, 71(2): 344-360.
- [7] YIN H, ZHOU JB, LÜ H, QIN N, CHANG FJ, ZHAO XJ. Identification, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Ascochyta caulina* (teleomorph: *Neocamarosporium calvescens*) associated with black stem on quinoa in China[J]. Plant Disease, 2020, 104(10): 2585-2597.
- [8] 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.
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).
- [9] CHAVERRI P, BRANCO-ROCHA F, JAKLITSCH W, GAZIS R, DEGENKOLB T, SAMUELS GJ. Systematics of the *Trichoderma harzianum* species complex and the re-identification of commercial biocontrol strains[J]. Mycologia, 2015, 107(3): 558-590.
- [10] BISSETT J, GAMS W, JAKLITSCH W, SAMUELS GJ. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015[J]. IMA Fungus, 2015, 6(2): 263-295.
- [11] 陈凯, 庄文颖. 中国木霉属七个土生新种(英文)[J]. 菌物学报, 2017, 36(11): 1441-1462.
CHEN K, ZHUANG WY. Seven new species of *Trichoderma* from soil in China[J]. Mycosystema, 2017, 36(11): 1441-1462 (in Chinese).
- [12] SAMUELS GJ. *Trichoderma*: systematics, the sexual state, and ecology[J]. Phytopathology, 2006, 96(2): 195-206.
- [13] 朱兆香, 庄文颖. 木霉属研究概况[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1136-1153.
ZHU ZX, ZHUANG WY. Current understanding of the genus *Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycota)[J]. Mycosystema, 2014, 33(6): 1136-1153 (in Chinese).
- [14] 孟素玲, 田彦梅, 顾欣, 孙小涵, 王新谱. 木霉的协同防病作用研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(3): 739-747.
MENG SL, TIAN YM, GU X, SUN XH, WANG XP. Research progress on synergistic disease prevention by *Trichoderma*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(3): 739-747 (in Chinese).
- [15] 张兴政, 姜红珊, 魏珩, 黄立龙, 程云清. 木霉菌 Strain T1122 分子鉴定及其降氮除磷效应研究[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2020, 41(2): 122-127.

- ZHANG XZ, JIANG HS, WEI H, HUANG LL, CHENG YQ. Molecular identification of strain T1122 and its effect on nitrogen and phosphorus reduction in sewage treatment[J]. Jilin Normal University Journal (Natural Science Edition), 2020, 41(2): 122-127 (in Chinese).
- [16] 吕黎, 许丽媛, 罗志威, 周艳, 郭帅, 丰来. 哈茨木霉生物防治研究进展[J]. 湖南农业科学, 2013(17): 92-95.
- LÜ L, XU LY, LUO ZW, ZHOU Y, GUO S, FENG L. Research progress of biocontrol effect of *Trichoderma harzianum*[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2013(17): 92-95 (in Chinese).
- [17] ELAD Y. TRICHODEX: Commercialization of *Trichoderma harzianum* T39-a case study[M]//JARVIS P. Agro Report, Biopesticides: Trends and Opportunities. Richmond: PJB Publications Ltd, 2001: 45-50.
- [18] CUMMINGS NJ, AMBROSE A, BRAITHWAITE M, BISSETT J, ROSLAN HA, ABDULLAH J, STEWART A, AGBAYANI FV, STEYAERT J, HILL RA. Diversity of root-endophytic *Trichoderma* from Malaysian Borneo[J]. Mycological Progress, 2016, 15(5): 50.
- [19] KARIMI K, BABAI AHARI A, ARZANLOU M, AMINI J, PERTOT I. Comparison of indigenous *Trichoderma* spp. strains to a foreign commercial strain in terms of biocontrol efficacy against *Colletotrichum nymphaeae* and related biological features[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 2017, 124(5): 453-466.
- [20] JANG S, KWON SL, LEE H, JANG Y, PARK MS, LIM YW, KIM C, KIM JJ. New report of three unrecorded species in *Trichoderma harzianum* species complex in Korea[J]. Mycobiology, 2018, 46(3): 177-184.
- [21] 张广志, 张新建, 陈泉, 李哲, 郭凯, 杨合同. 哈茨木霉复合种内 3 个中国新记录种的分离和鉴定[J]. 山东科学, 2015, 28(6): 43-46, 51.
- ZHANG GZ, ZHANG XJ, CHEN Q, LI Z, GUO K, YANG HT. Isolation and identification of three Chinese new records in *Trichoderma harzianum* species complex[J]. Shandong Science, 2015, 28(6): 43-46, 51 (in Chinese).
- [22] XUE M, WANG R, ZHANG CY, WANG WW, ZHANG FT, CHEN D, REN S, ZHANG MM, HOU JM, LIU T. Screening and identification of *Trichoderma* strains isolated from natural habitats in China with potential agricultural applications[J]. BioMed Research International, 2021, 2021: 7913950.
- [23] ZHAO J, LIU T, ZHANG DP, WU HL, ZHANG TT, DONG D. Biocontrol potential of *Trichoderma afroharzianum* TM24 against grey mould on tomato plants[J]. Current Microbiology, 2021, 78(12): 4115-4126.
- [24] ZHAO J, LIU T, LIU WC, ZHANG DP, DONG D, WU HL, ZHANG TT, LIU DW. Transcriptomic insights into growth promotion effect of *Trichoderma afroharzianum* TM2-4 microbial agent on tomato plants[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(5): 1266-1276.
- [25] 李梅, 田莹, 蒋细良. 植物内生木霉菌研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(2): 155-162.
- LI M, TIAN Y, JIANG XL. Advances in research on endophytic *Trichoderma* in plants[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(2): 155-162 (in Chinese).
- [26] QI FH, JING TZ, WANG ZX, ZHAN YG. Fungal endophytes from *Acer ginnala* Maxim: isolation, identification and their yield of gallic acid[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49(1): 98-104.
- [27] DEGANI O, REGEV D, DOR S. The microflora of maize grains as a biological barrier against the late wilt causal agent, *Magnaporthe oryzae* [J]. Agronomy, 2021, 11(5): 965.
- [28] KAUR T, BALA M, KUMAR G, VYAS A. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles via endophyte *Trichoderma viride* and evaluation of their antimicrobial and antioxidant properties[J]. Archives of Microbiology, 2022, 204(10): 620.
- [29] 王生萍, 杨郭林, 陈娟, 蒋先芝, 旺姆. 西藏昆诺阿藜种子可培养内生真菌多样性[J]. 菌物学报, 2022, 41(2): 204-213.
- WANG SP, YANG GL, CHEN J, JIANG XZ, WANG M. Culturable endophytic fungal diversity of quinoa seeds in Tibet, Southwest China[J]. Mycosystema, 2022, 41(2): 204-213 (in Chinese).
- [30] 陈亚蕾, 田淼, 孙江伟, 周建波, 任璐, 秦楠, 殷辉, 赵晓军. 昆诺阿藜链格孢叶斑病病原及其生物学特性[J]. 菌物学报, 2022, 41(5): 713-729.
- CHEN YL, TIAN M, SUN JW, ZHOU JB, REN L, QIN N, YIN H, ZHAO XJ. Biological characteristics of the pathogen causing *Alternaria* leaf spot on quinoa[J]. Mycosystema, 2022, 41(5): 713-729 (in Chinese).
- [31] NIRENBERG H. Untersuchungen Über Die Morphologische Und Biologische Differenzierung in der *Fusarium*-sektion Liseola[M]. Berlin:

- Kommissionsverlag Paul Parey, 1976: 1-117.
- [32] QIN WT, ZHUANG WY. Seven new species of *Trichoderma* (*Hypocreales*) in the *Harzianum* and *Strictipile* clades[J]. *Phytotaxa*, 2017, 305(3): 121-139.
- [33] 李琳, 张雅梅, 张祥辉, 刘金亮, 潘洪玉. 生防棘孢木霉 T31 菌株的分离筛选及其生物学特性[J]. *植物保护学报*, 2014, 41(1): 54-60.
- LI L, ZHANG YM, ZHANG XH, LIU JL, PAN HY. Isolation, identification and biological characters of *Trichoderma asperellum* T31[J]. *Journal of Plant Protection*, 2014, 41(1): 54-60 (in Chinese).
- [34] 鲍根生, 李春杰. 青藏高原高寒草地优势禾草-紫花针茅内生真菌分离和鉴定[J]. *草业学报*, 2016, 25(3): 32-42.
- BAO GS, LI CJ. Isolation and identification of endophytes infecting *Stipa purpurea*, a dominant grass in meadows of the Qinghai-Tibet Plateau[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(3): 32-42 (in Chinese).
- [35] 殷辉, 周建波, 吕红, 常芳娟, 秦楠, 翟世玉, 邢鲲, 赵飞, 赵晓军. 藜麦尾孢叶斑病的病原鉴定[J]. *植物病理学报*, 2019, 49(3): 408-414.
- YIN H, ZHOU JB, LÜ H, CHANG FJ, QIN N, ZHAI SY, XING K, ZHAO F, ZHAO XJ. Identification of the pathogen causing *Cercospora* leaf spot on quinoa[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 49(3): 408-414 (in Chinese).
- [36] 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.
- 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).
- [37] CARBONE I, KOHN LM. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. *Mycologia*, 1999, 91(3): 553-556.
- [38] JAKLITSCH WM, KOMON M, KUBICEK CP, DRUZHININA IS. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/Trichoderma*[J]. *Mycologia*, 2005, 97(6): 1365-1378.
- [39] 徐佳, 王燕春. 桔梗新病害: 匍柄霉叶斑病的病原生物学特性及药剂敏感性分析[J]. *菌物学报*, 2020, 39(2): 312-322.
- XU J, WANG YC. Fungicide sensitivity and biological characteristics of pathogen of new disease of bellflower (*Platycodon grandiflorum*)[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(2): 312-322 (in Chinese).
- [40] BELL DK, WELLS HD, MARKHAM CR. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens[J]. *Phytopathology*, 1982, 72(4): 379-382.
- [41] 田桢, 曹传旺, 季世达, 刘斌, 刘志华. 新疆野果林木霉分离鉴定、抑菌作用及固态发酵配方优化[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4696-4709.
- TIAN Z, CAO CW, JI SD, LIU B, LIU ZH. Isolation and identification of *Trichoderma* strains, and antifungal effects and solid-state fermentation recipe optimization from Xinjiang wild fruit forest[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(12): 4696-4709 (in Chinese).
- [42] 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.
- 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).
- [43] ZHENG H, QIAO M, LÜ YF, DU X, ZHANG KQ, YU ZF. New species of *Trichoderma* isolated as endophytes and saprobes from southwest China[J]. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 2021, 7(6): 467.
- [44] ZHU ZX, ZHUANG WY. *Trichoderma* (*Hypocrea*) species with green ascospores from China[J]. *Persoonia*, 2015, 34: 113-129.
- [45] 李婉云, 杨静雅, 赵爽, 李敏, 赵丽莉, 贺学礼. 纤维素降解木霉菌株的筛选及其生物学特性探究[J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(6): 698-708.
- LI WY, YANG JY, ZHAO S, LI M, ZHAO LL, HE XL. Screening and biological characteristics of cellulose degrading *Trichoderma* strains[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2021, 41(6): 698-708 (in Chinese).
- [46] 吴晓青, 张新建, 周方园, 周红姿, 赵晓燕, 谢雪迎, 王加宁. 一种利用非洲哈茨木霉 Ta97 制备的菌剂及其在防治重茬病害方面的应用: CN112322502A[P]. 2022-04-15.
- WU XQ, ZHANG XJ, ZHOU FY, ZHOU HZ, ZHAO XY, XIE XY, WANG JN. Microbial inoculum prepared from *Trichoderma afroharzianum* Ta97 and application of microbial inoculum to prevention and treatment of continuous cropping diseases: CN112322502A[P]. 2022-04-15 (in Chinese).

- [47] 赵娟, 刘伟成, 刘霆, 刘德文, 张殿朋, 吴慧玲, 董丹, 张涛涛, 田兆丰. 一株防病促生的非洲哈茨木霉及其应用: CN109182137A[P]. 2020-03-31.
ZHAO J, LIU WC, LIU T, LIU DW, ZHANG DP, WU HL, DONG D, ZHANG TT, TIAN ZF. Disease-prevention and growth-promoting *Trichoderma harzianum* and application thereof: CN109182137A[P]. 2020-03-31 (in Chinese).
- [48] 廉华, 陈玉蓉, 李梅, 李润哲, 张淳, 马光恕. 木霉菌对向日葵幼苗生理特性及菌核病防治效果的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2023, 41(1): 169-177.
LIAN H, CHEN YR, LI M, LI RZ, ZHANG T, MA GS. Effects of *Trichoderma* on physiological characteristics of sunflower seedlings and control efficacy against *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2023, 41(1): 169-177 (in Chinese).
- [49] 陈娜, 余昕彤, 梁铜文. 一株耐盐碱哈茨木霉及其在蔬果防病及促生中的用途: CN112501034A[P]. 2023-02-28.
CHEN N, YU XT, LIANG JW. Saline-alkaline tolerant *Trichoderma harzianum* and application thereof in disease prevention and growth promotion of vegetables and fruits: CN112501034A[P]. 2023-02-28 (in Chinese).
- [50] BOUANAKA H, BELLIL I, HARRAT W, BOUSSAHA S, BENBELKACEM A, KHELIFI D. On the biocontrol by *Trichoderma afroharzianum* against *Fusarium culmorum* responsible of *Fusarium* head blight and crown rot of wheat in Algeria[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2021, 31: 68.
- [51] 李作森, 何月秋, 夏贤仁. 5 个木霉菌株的抑菌谱及部分生物学特性[J]. 云南农业大学学报, 2004, 19(3): 267-271.
LI ZS, HE YQ, XIA XR. Inhibitory spectrum and partial biological traits of five *Trichoderma* isolates[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2004, 19(3): 267-271 (in Chinese).
- [52] WU XQ, LYU YP, REN H, ZHOU FY, ZHANG XJ, ZHAO XY, ZHANG GZ, YANG HT. Degradation of oxalic acid by *Trichoderma afroharzianum* and its correlation with cell wall degrading enzymes in antagonizing *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 133(5): 2680-2693.
- [53] KHRUENGSAI S, PRIPDEEVECH P, D'SOUZA PE, PANUWET P. Biofumigation activities of volatile compounds from two *Trichoderma afroharzianum* strains against *Fusarium* infections in fresh chilies[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2021, 101(14): 5861-5871.