

研究报告

粮食上木霉菌的分离鉴定及其生防效果

祁智慧^{1,2}, 庄媛^{1,3}, 张海洋^{1,2}, 田琳^{1,2}, 唐芳^{*1,2}

1 国家粮食和物资储备局科学研究院, 北京 100037

2 粮食储运国家工程研究中心, 北京 102209

3 北京农学院, 北京 102206

祁智慧, 庄媛, 张海洋, 田琳, 唐芳. 粮食上木霉菌的分离鉴定及其生防效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 2860-2875.

QI Zhihui, ZHUANG Yuan, ZHANG Haiyang, TIAN Lin, TANG Fang. Isolation, identification, and biocontrol efficacy determination of *Trichoderma* spp. on grains[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 2860-2875.

摘要: 【背景】粮食在生长和收储期极易受到病原真菌或产毒真菌的污染, 造成严重的损失。众多实践证明木霉属(*Trichoderma*)可以有效防治植物病原真菌。【目的】鉴定和筛选能有效抑制粮食常见危害真菌的木霉生防菌株, 开发生防菌剂, 保障粮食生产安全。【方法】从粮食上分离筛选出35株木霉, 通过多基因系统发育分析和形态学观察方法进行菌种鉴定, 利用平板对峙试验筛选出对粮食常见危害真菌有抑制作用的菌株。【结果】35株木霉分属于8个种, 分别为非洲哈茨木霉(*Trichoderma afroharzianum*)、类棘孢木霉(*Trichoderma asperelloides*)、*Trichoderma amoenum*、近深绿木霉(*Trichoderma paratroviride*)、*Trichoderma obovatum*、长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*)、东方木霉(*Trichoderma orientale*)和深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)。对峙试验结果表明, 这8种木霉对于粮食上分离到的10种危害真菌均具有较好的抑制效果。非洲哈茨木霉(*T. afroharzianum*)和长枝木霉(*T. longibrachiatum*)的抑菌效果优于其他物种, 其中非洲哈茨木霉 a91 菌株的抑菌效果最佳, 对9种危害真菌的抑菌率均在65%以上。【结论】本研究筛选的木霉菌株具有较高的生防潜力, 对于粮食作物上常见的病原菌和产毒真菌有较好的抑制效果。

关键词: 粮食; 木霉; 鉴定; 抑菌作用

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZX2202)

This work was supported by the Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (ZX2202).

*Corresponding author. E-mail: tf@ags.ac.cn

Received: 2022-09-19; Accepted: 2023-02-07; Published online: 2023-03-31

Isolation, identification, and biocontrol efficacy determination of *Trichoderma* spp. on grains

QI Zhihui^{1,2}, ZHUANG Yuan^{1,3}, ZHANG Haiyang^{1,2}, TIAN Lin^{1,2}, TANG Fang^{*1,2}

1 Academy of National Food and Strategic Reserves Administration, Beijing 100037, China

2 National Engineering Research Center of Grain Storage and Logistics, Beijing 102209, China

3 Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

Abstract: [Background] Grains are easily contaminated by pathogenic fungi and toxigenic fungi during the growth, harvest, and storage stages, which results in serious losses. Practices and studies have proved that the pathogenic fungi of plants can be controlled effectively by *Trichoderma* species. [Objective] To identify and screen the strains for the biocontrol of *Trichoderma* on grains and develop biocontrol fungicides for ensuring grain security. [Methods] In this study, 35 strains of *Trichoderma* were isolated from grains. They were identified based on both multi-gene phylogenetic relationship and morphological characteristics. Plate confrontation experiments were conducted to select the strains with antagonistic effects on common deleterious fungi. [Results] Eight species of *Trichoderma* were identified, including *Trichoderma afroharzianum*, *Trichoderma asperelloides*, *Trichoderma amoenum*, *Trichoderma paratroviride*, *Trichoderma obovatum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma orientale*, and *Trichoderma atroviride*. The antagonistic assay demonstrated that these eight *Trichoderma* species had antagonism on 10 deleterious fungal species from grains. The antifungal efficacy of *T. afroharzianum* and *T. longibrachiatum* was better than that of other species. The a91 strain of *T. afroharzianum* showed the best antifungal efficacy, with the inhibition rates more than 65% against 9 deleterious fungal species. [Conclusion] The *Trichoderma* strains screened out in this study have great application potential for biocontrol and strong inhibitory effect on common pathogenic fungi and toxigenic fungi isolated from grain crops.

Keywords: grains; *Trichoderma* spp.; identification; antifungal effect

小麦、玉米和稻谷是我国重要的战略储备粮种,其数量、品质和卫生安全十分重要。研究发现粮食作物在生长和收储期易受各种病原真菌和产毒真菌的侵染,导致粮食减产或真菌毒素污染^[1]。例如,脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)是小麦及小麦制品中的主要污染毒素,与赤霉病(*Fusarium* head blight, FHB)的暴发有关,禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)和串珠镰孢(*Fusarium verticillioides*)在小麦孕穗期至成熟期感染麦穗会引起 FHB,也预示着该地区收获的

小麦面临 DON 毒素超标的风险^[2]。然而镰孢属(*Fusarium*)引起的病害和毒素污染仅代表粮食上少数真菌的特性。粮食上真菌种类繁多,有些物种可以侵染粮食作物引起病害甚至产生真菌毒素污染,还有一些物种对产毒真菌或病原菌具有较强的抑制作用,可作为粮食作物上危害真菌的生物防治剂^[3-4]。

木霉(*Trichoderma* spp.)是在植物病害生物防治中研究和应用非常广泛的一类生防真菌,普遍存在于土壤、植物种子、叶围等各种环境

中, 对环境的适应性很强^[5]。研究表明木霉属至少有 25 个种对病原真菌具有生防作用^[4], 其中一些菌种已经商业化作为生物农药或生物肥料^[6]。目前国内注册登记的木霉生防制剂主要用于果蔬种植且生防效果参差不齐, 因此, 木霉作为粮食作物病原菌和产毒真菌生防菌剂的开发和应用具有广阔的发展前景。

木霉生防菌剂应用比较广泛的菌株包括非洲哈茨木霉 T22、绿色木霉 LTR-2、哈茨木霉 SH2303 和 SQR-T-037 等, 主要用于果蔬的病害防治^[7]。He 等^[8]研究了木霉生物防治剂对禾谷镰孢和串珠镰孢引起的玉米茎腐病和穗腐病的防治效果, 发现棘孢木霉的生物防治剂能有效抑制玉米茎腐病和穗腐病, 在棘孢木霉处理的土壤中生长的玉米茎和穗中, 脱氧雪腐镰刀菌烯醇和伏马菌素的积累明显减少。Swain 等^[9]研究表明, 从树皮中分离的木霉菌株可作为水稻的潜在生物防治剂和生物肥料直接用于水稻种子, 能有效控制土传病害的发生并增强水稻种子的发芽率和活力。我国专门针对粮食作物病原菌和产毒真菌生防菌剂开发的研究较少, 市面上缺少粮食作物专用的木霉菌生物防治剂, 所以有必要寻求更多对粮食作物病原真菌和产毒真菌更有效的木霉菌株加入生物防治的队伍中, 为深入探究木霉菌与其他微生物联合作用的抑菌机制、开发用于粮食作物生长过程的复合生防菌剂奠定基础。

本研究采用形态学观察及多基因系统发育分析相结合的方法对粮食籽粒上分离到的木霉菌株进行鉴定, 通过木霉菌与粮食籽粒上常见病原真菌及产毒真菌的对峙试验, 进行木霉菌生防潜力测定, 以期筛选出高效拮抗的木霉菌株, 为粮食真菌病害和真菌毒素污染的生物防治提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究的材料为我国各省粮油质检站及粮库收集到的收获期(从田间收获)及储藏期(粮仓储藏)小麦、稻谷和玉米样品。稻谷样品取自黑龙江、吉林、辽宁、北京、宁夏、四川、重庆、安徽、湖北、湖南、江西、福建和广西这 13 个地区, 共 78 份样品。小麦样品取自河北、江苏、安徽、山东、河南、山西、内蒙古、湖北、四川、陕西、甘肃和新疆这 12 个地区, 共 200 份样品。玉米样品取自辽宁和广东, 共 32 份。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 18.0; 玉米粉琼脂(cornmeal dextrose agar, CMD)培养基(g/L): 玉米粉 40.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 18.0; 麦芽提取物琼脂(malt extract agar, MEA)培养基(g/L): 麦芽提取物 20.0, 琼脂 18.0; Nirenberg SNA 培养基(g/L): 磷酸二氢钾 1.0, 硝酸钾 1.0, 硫酸镁 0.5, 氯化钾 0.5, 葡萄糖 0.2, 蔗糖 0.2, 琼脂 18.0。

十六烷基三甲基溴化铵(CTAB), 宝泰克生物科技公司; 2×Taq PCR Mix 和 DL2000 DNA Marker, 天根生化科技(北京)有限公司; 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。科研级生物显微镜, Zeiss 公司; PCR 仪, Biometra 公司; 凝胶成像分析仪, Bio-Rad 公司。

1.2 菌株的分离

选择 PDA 培养基采用梯度稀释平板法对粮食样品中的真菌进行分离。取 25 g 粮食样品于 225 mL 的无菌水中充分振荡洗涤制成浓度为 10^{-1} 的菌悬液, 依次将其稀释成浓度为 10^{-2} 和 10^{-3} 的菌悬液。取 1 mL 菌悬液于无菌培养皿中, 将 15–30 mL 冷却至 50 °C 左右已加 50 µg/mL 氯霉素的 PDA 培养基倒入含菌悬浮

液的培养皿中。25 °C培养 5–7 d 后, 待菌落长出后统计菌落数并挑取单菌落边缘转移至新的平板上培养, 转接 3–4 次后获得纯化菌株。

1.3 菌株的鉴定

1.3.1 形态特征鉴定

菌落形态观察基于 PDA、CMD、MEA 和 Nirenberg SNA 培养基, 在 25 °C 培养箱中培养 7 d, 观察菌落生长速度、生长新区的特征、颜色、结构、质地及其变化, 确认培养物的气味等。微观形态特征观察使用科研级生物显微镜, 观察分生孢子梗、分生孢子及厚垣孢子的形态特征^[10]。

1.3.2 分子鉴定

使用改良的 CTAB 法提取所获得纯菌株的基因组 DNA。然后对菌株的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)进行 PCR 扩增和测序, 然后将基因序列在 GenBank 中进行 BLAST 比对, 经比对分析筛选出木霉菌株。然后对初步确认为木霉菌株的聚合酶 II 第二大亚基(RNA polymerase II subunit B, *rpb2*)和翻译延长因子 1 α (translation elongation factor 1- α , *tefl*)基因进行 PCR 扩增和测序。其中 ITS 扩增选择引物对 ITS4/ITS1, *rpb2* 基因扩增选择引物对 fRPB2-5f/fRPB2-7cr, *tefl* 基因扩增选择引物对 EF1-728F/TEF1LLErev (表 1)^[10]。PCR 反应体系(25 μ L): 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 模板 DNA (50 ng/ μ L) 1 μ L, 2 \times Taq PCR Mix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR

引物的信息及 PCR 反应的循环参数见表 1^[11]。

将获得的全部 ITS、*rpb2* 和 *tefl* 基因序列进行在线同源比对分析, 并根据比对结果从 GenBank 下载与之相关的参考序列。用 MEGA 7 软件将全部序列比对并矫正后, 用 MEGA X 软件按 ITS-*rpb2*-*tefl* 的顺序首尾相连, 菌株 *Protocrea farinosa* CPK3144 作为外群。系统发育分析在 RaxML 软件中进行, 选择 GTR-GAMMA 模型进行计算, 采用最大似然(maximum likelihood, ML)法构建系统发育树, 系统发育树的每个分支的统计学显著性分析以自展(bootstrap)进行检验, 重复次数为 1 000 次。Bootstrap>50%的显示在各个进化分支节点上。

1.4 粮食常见危害真菌的拮抗木霉菌株筛选

1.4.1 粮食危害真菌

本试验室前期开展的粮食真菌多样性研究中获得了大量菌株, 完成菌种鉴定后对单菌株进行了保藏。根据前人的研究^[12], 选择粮食上分离的常见病原真菌和产毒真菌共 10 株开展后续对峙试验。具体菌株包括层出镰孢(*F. proliferatum*) F26、串珠镰孢(*F. verticillioides*) N49、禾谷镰孢(*F. graminearum*) E45、黄曲霉(*Aspergillus flavus*) S17、黑曲霉(*Aspergillus niger*) S36、链格孢(*Alternaria alternata*) E2、粉红单端孢(*Trichothecium roseum*) E427、澳大利亚弯孢(*Curvularia australiensis*) H34、新月弯孢(*Curvularia lunata*) N26 和卷枝毛霉(*Mucor circinelloides*) E781。

表 1 不同基因对应的 PCR 引物及反应条件

Table 1 Details of genes with PCR primers and reaction conditions

| 基因 | 引物名称 | 引物序列 | 反应条件 |
|-------------|-------------|-------------------------|--|
| Gene | Primer name | Primer sequence (5'→3') | Reaction condition |
| ITS | ITS1/ITS4 | CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA | 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C |
| | | TCCTCCGCTTATTGATATGC | 1 min, 35 cycles; 72 °C 10 min |
| <i>rpb2</i> | fRPB2-5f/ | GAYGAYMGWGATCAYTTYGG | 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C |
| | fRPB2-7cr | CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT | 2 min, 35 cycles; 72 °C 10 min |
| <i>tefl</i> | EF1-728F/ | CATCGAGAAGTTCGAGAAGG | 94 °C 3 min; 94 °C 30 s; 56 °C 30 s, 72 °C |
| | TEF1LLErev | AACTTGCAGGCAATGTGG | 2 min, 30 cycles; 72 °C 10 min |

1.4.2 对峙试验

采用直径 6 mm 打孔器在已活化培养 7 d 的上述 10 种危害真菌菌株和木霉菌株的菌落边缘打取菌块, 在距离 PDA 平板(直径 9 cm)边缘约 10 mm 相对应的两点上分别接种直径 6 mm 的危害真菌和木霉菌菌块各 1 片, 置于 28 °C 暗培养。在 3–11 d 时采用十字交叉法测定并记录对峙和非对峙条件下危害真菌的菌落生长半径。每组试验 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]×100。

挑取上述对峙培养条件下木霉菌与危害真菌菌落相交处的菌丝体, 在显微镜下观察二者相互作用, 用显微镜配套镜头 Axio Cam MRc5 和 Zen 软件进行拍照和图片处理, 进一步明确木霉菌株对粮食危害真菌的抑制作用机制。

1.4.3 数据统计

利用 SPSS 19.0 进行数据统计, 结果以平均值±标准差表示。采用单因素方差分析 ANOVA 对不同木霉菌株的抑菌率进行差异统计分析, 并使用 Tukey HSD 对方差分析结果进行事后检验。

2 结果与分析

2.1 木霉菌株的形态鉴定

从粮食样品共分离获得 35 株木霉, 根据菌落特征和显微形态特征观察(表 2 和图 1、图 2), 结果表明 35 个木霉菌株属于 8 个物种, 即非洲哈茨木霉(a69、a77、a78、a80、a90、a91、a92、a93、a98、a115、a124、a141、E708、E873、E874、H23)、类棘孢木霉(a67、a102、a103、a104、a105)、*T. amoenum* (a126)、近深绿木霉(a131)、*T. obovatum* (E94、E95)、长枝木霉(E105、E106、E356、E357、E475、E473、D612)、东

方木霉(E225、E589)和深绿木霉(E339)。

2.2 木霉菌株分子鉴定及系统发育分析

采用基于 3 个基因片段的多位点系统发育分析方法, 对木霉属菌株进行鉴定(图 3)。最终得到的比对数据集包含 35 个分离菌株和 80 个标准菌株(图 3), 包括 2 091 个碱基(ITS 为 546, *rpb2* 为 666, *tef1* 为 879, 包括比对间隙), 菌株 *P. farinosa* CPK 3144 作为外群。最终确认木霉属的 35 个菌株分别为非洲哈茨木霉、类棘孢木霉、*T. amoenum*、近深绿木霉、*T. obovatum*、长枝木霉、东方木霉和深绿木霉。研究相关分离株的基因序列已经全部提交至 GenBank 数据库, 登录号见表 3。

2.3 木霉菌对粮食危害真菌的抑制作用

2.3.1 不同木霉菌对粮食危害真菌的抑菌效果差异比较

选择代表性木霉属菌株, 包括: 非洲哈茨木霉 7 株(a69、a80、a91、a98、a124、E874、H23), 类棘孢木霉 1 株(a67), *T. amoenum* 1 株(a126), 近深绿木霉 1 株(a131), *T. obovatum* 1 株(E95), 长枝木霉 3 株(E357、E475、D612), 东方木霉 1 株(E589)和深绿木霉 1 株(E339), 共 16 个菌株作为拮抗菌株, 与粮食上分离的 10 个危害真菌菌株(1.3.1)进行对峙试验。培养第 11 天时, 16 个分离株抑菌效果的差异比较见表 4, 将对每种危害真菌抑制效果前 2 名的菌株及其抑菌率进行汇总整理, 结果见表 5。对危害菌抑菌效果最明显的木霉菌株的平板对峙效果见图 4。分析可知, 16 株木霉菌对 10 种粮食危害真菌均有一定的抑制作用, 抑菌率为 40%–80%, 不同物种或同一物种的不同分离株对同一种危害真菌的抑菌能力不同。非洲哈茨木霉的抑菌效果明显优于其他物种。非洲哈茨木霉 a91 的抑菌效果最好, 其对链格孢 E2、层出镰孢 F26、禾

表 2 木霉属物种的主要形态特征

Table 2 Main morphological characteristics of *Trichoderma*

| 菌种 Specie | 菌株 Strain | 分生孢子 Conidium | 气味 Odor |
|-----------------------------------|--|--|--|
| 非洲哈茨木霉 <i>T. afroharzianum</i> | a69, a77, a78, a80, a90, a91, a92, a93, a98, a115, a124, a141, E708, E873, E874, H23 | 分生孢子近球形至卵形, 光滑, 绿色至深绿色, 很少出现黄色 Conidia subglobose to ovoid, smooth, green to dark green with age, infrequently yellow (2.0–4.5) μm ×(2.0–4.0) μm | 有甜味 A sweet odor |
| 类棘孢木霉 <i>T. asperelloides</i> | a67, a102, a103, a104, a105 | 分生孢子近球形至椭圆形, 表面具细疣, 绿色至深绿色 Conidia subglobose to oval, finely warted, green to dark green (2.7–5.0) μm ×(2.2–4.0) μm | 无明显气味 No distinctive odor |
| <i>T. amoenum</i> | a126 | 分生孢子椭圆形或近于似球体, 绿色, 光滑 Conidia oval or subspheroidal, green, smooth (2.5–3.2) μm ×(2.1–3.0) μm | 气味模糊 Odor indistinct |
| 近深绿木霉 <i>T. paratroviride</i> | a131 | 分生孢子球形或近球形, 绿色, 光滑 Conidia globose or subglobose, green, smooth (3.0–4.0) μm ×(3.0–3.7) μm | 有强烈的椰香味 Odor strongly coconut-like |
| <i>T. obovatum</i> | E94, E95 | 分生孢子球形、椭圆形至倒卵形, 较少呈现长方形, 绿色, 光滑 Conidia globose, oval to obovate, less commonly oblong, green, smooth (3.2–3.8) μm ×(3.0–3.6) μm | 产生令人愉快的模糊气味 Especially pleasant and indistinct odor noted |
| 长枝木霉 <i>T. longibrachiatum</i> | E105, E106, E356, E357, E475, E473, D612 | 分生孢子宽椭圆形, 绿色, 壁光滑 Conidia broadly oval, green, smooth-walled (2.0–3.0) μm ×(2.0–6.0) μm | 产生令人愉快的模糊气味 Especially pleasant and indistinct odor noted |
| 东方木霉 <i>T. orientale</i> | E225, E589 | 分生孢子长方形至宽椭圆形, 绿色, 光滑 Conidia oblong to broadly oval, green, smooth (3.2–10.5) μm ×(2.0–5.2) μm | 有甜味 A sweet odor |
| 深绿木霉 <i>T. atroviride</i> | E339 | 分生孢子近球形至卵形, 深绿色, 光滑 Conidia subglobose to ovoid, dark green, smooth 2.5–4.0 μm | 有椰香味 Odor coconut-like |

谷镰孢 E45、黄曲霉 S17、粉红单端孢霉 E427 和新月弯孢 N26 的抑菌率均在 70%以上, 对串珠镰孢 N49、黑曲霉 S36 和澳大利亚弯孢 H34 的抑菌率也在 65%以上。非洲哈茨木霉 a98、a124 和 E874 也有较好的抑菌效果, 对除卷枝毛霉 E781 外的 9 种危害真菌的抑菌率达

55%以上。长枝木霉 E475 和 D612 对除黑曲霉 S36 和澳大利亚弯孢 H34 外的其余 8 种危害真菌的抑菌率均在 55%以上, 也有较好的抑菌效果。试验中, 近深绿木霉 a131 对层出镰孢 F26 和卷枝毛霉 E781 的抑菌效果优于其他木霉菌株。

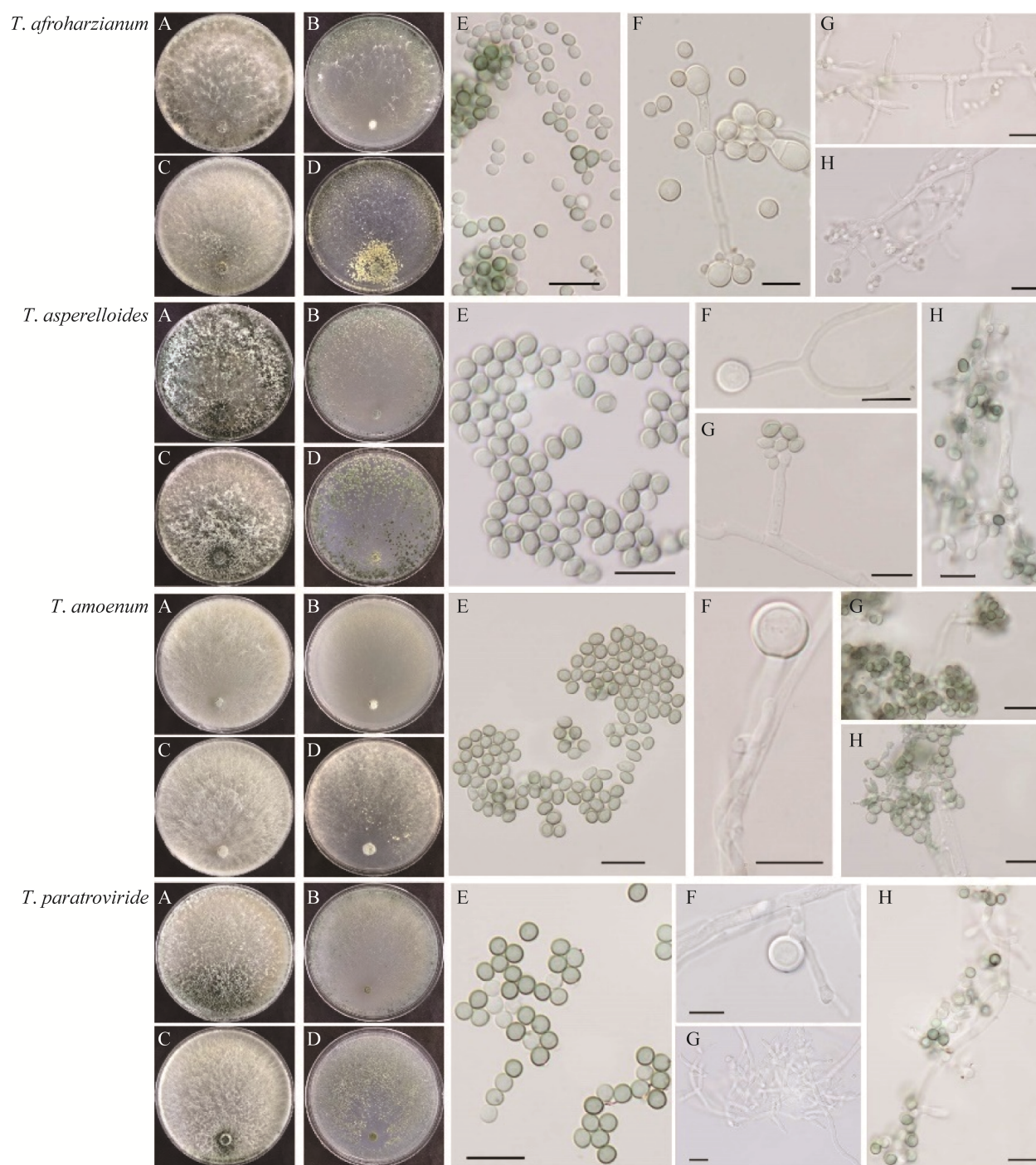


图 1 非洲哈茨木霉、类棘孢木霉、*Trichoderma amoenum* 和近深绿木霉的形态特征 A: CMD 培养基. B: MEA 培养基. C: PDA 培养基. D: Nirenberg SNA 培养基. E: 分生孢子. F: 厚垣孢子. G、H: 分生孢子梗和瓶梗. 标尺: 10 μm

Figure 1 Morphological characteristics of *Trichoderma afroharzianum*, *Trichoderma asperelloides*, *Trichoderma amoenum* and *Trichoderma paratroviride*. A: CMD medium. B: MEA medium. C: PDA medium. D: Nirenberg SNA medium. E: Conidia. F: Chlamydospores. G, H: Conidiophores and phialides. Bar: 10 μm .

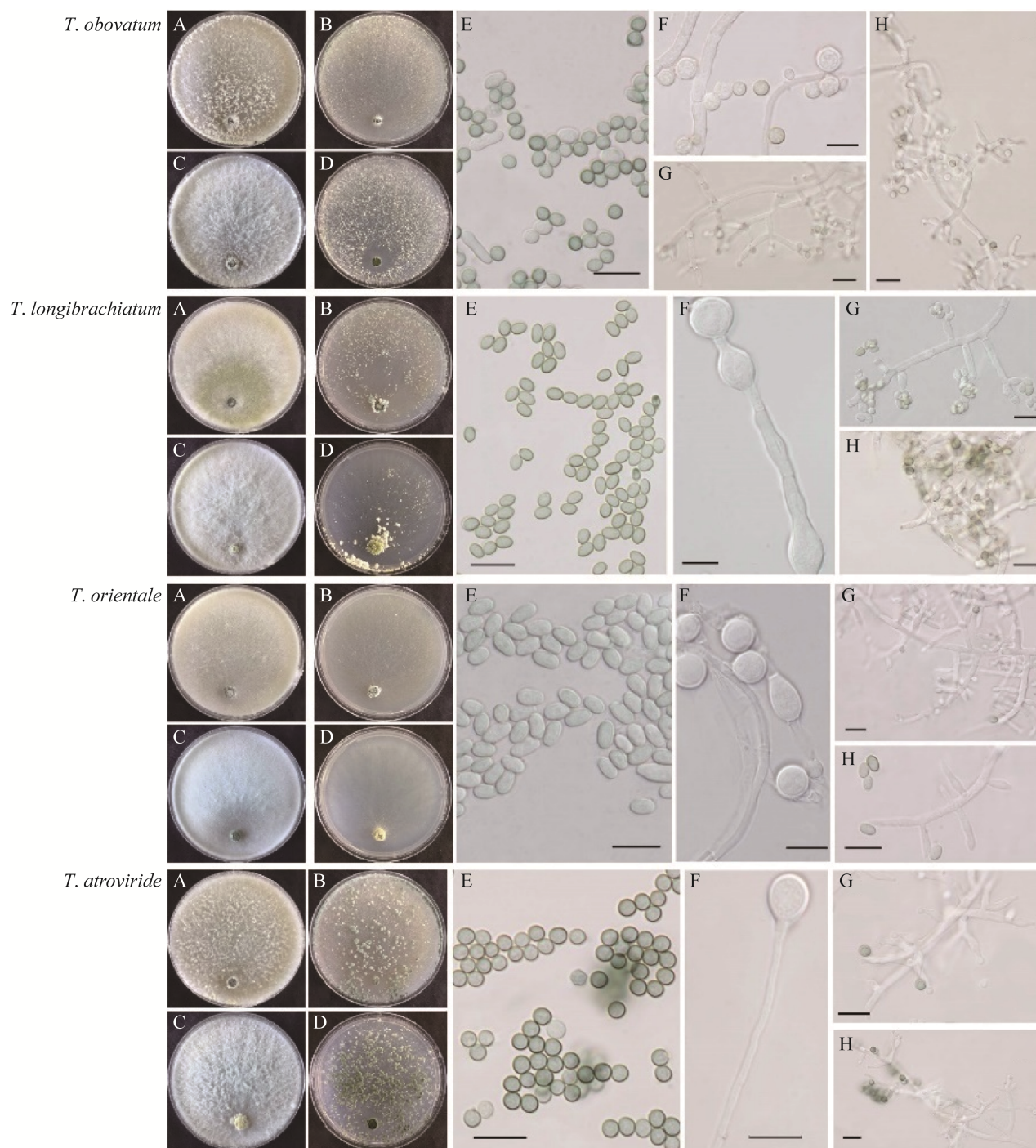


图 2 *Trichoderma obovatum*、长枝木霉、东方木霉和深绿木霉的形态特征 A: CMD 培养基. B: MEA 培养基. C: PDA 培养基. D: Nirenberg SNA 培养基. E: 分生孢子. F: 厚垣孢子. G、H: 分生孢子梗和瓶梗. 标尺: 10 μm

Figure 2 Morphological characteristics of *Trichoderma obovatum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma orientale* and *Trichoderma atroviride*. A: CMD medium. B: MEA medium. C: PDA medium. D: Nirenberg SNA medium. E: Conidia. F: Chlamydospores. G, H: Conidiophores and phialides. Bar: 10 μm .



图 3 基于多基因序列(ITS、*rpb2* 和 *tef1*)构建的木霉菌株系统发育树 分支上的数字表示自展支持率, 只显示自展支持率大于 50% 的值. 比例尺 0.1 表示 100 个核苷酸中有 10 个被替换. 括号内表示 GenBank 登录号. 两条斜线表示一些分支为适合排版而进行缩短, 斜线旁边标注分支缩短的倍数

Figure 3 Phylogenetic tree of inferred from *Trichoderma* combined ITS, *rpb2* and *tef1*. Numbers above branches are bootstrap values, only values above 50% are indicated. The tree scale 0.1, represented ten out of 100 nucleotides were replaced. The parentheses represent the GenBank login number. Two diagonal lines indicated some branches were shortened to fit them to the page, the number of times a branch was shortened indicated next to the lines.

表 3 本研究分离的木霉菌株在 GenBank 的登录号

Table 3 *Trichoderma* strains isolated in this study and their access number in GenBank

| 分离株 Strains | 菌株编号 Strain No. | <i>rpb2</i> | <i>tefl</i> | ITS |
|---------------------------|-----------------|-------------|-------------|----------|
| <i>T. afroharzianum</i> | a69 | ON934370 | ON934335 | ON844145 |
| | a77 | ON934371 | ON934336 | ON844146 |
| | a78 | ON934372 | ON934337 | ON844147 |
| | a80 | ON934373 | ON934338 | ON844148 |
| | a90 | ON934374 | ON934339 | ON844149 |
| | a91 | ON934375 | ON934340 | ON844150 |
| | a92 | ON934376 | ON934341 | ON844151 |
| | a93 | ON934377 | ON934342 | ON844152 |
| | a98 | ON934378 | ON934343 | ON844153 |
| | E708 | ON934400 | ON934365 | ON844174 |
| | E873 | ON934401 | ON934366 | ON844175 |
| | E874 | ON934402 | ON934367 | ON844176 |
| | H23 | ON934403 | ON934368 | ON844178 |
| | a115 | ON934383 | ON934348 | ON844158 |
| | a124 | ON934384 | ON934349 | ON844159 |
| | a141 | ON934387 | ON934352 | ON844162 |
| <i>T. asperelloides</i> | a67 | ON934369 | ON934334 | ON844144 |
| | a102 | ON934379 | ON934344 | ON844154 |
| | a103 | ON934380 | ON934345 | ON844155 |
| | a104 | ON934381 | ON934346 | ON844156 |
| | a105 | ON934382 | ON934347 | ON844157 |
| <i>T. amoenum</i> | a126 | ON934385 | ON934350 | ON844160 |
| <i>T. paratroviride</i> | a131 | ON934386 | ON934351 | ON844161 |
| <i>T. obovatum</i> | E94 | ON934389 | ON934354 | ON844163 |
| | E95 | ON934390 | ON934355 | ON844164 |
| <i>T. longibrachiatum</i> | E105 | ON934391 | ON934356 | ON844165 |
| | E106 | ON934392 | ON934357 | ON844166 |
| | E356 | ON934395 | ON934360 | ON844169 |
| | E357 | ON934396 | ON934361 | ON844170 |
| | E473 | ON934397 | ON934362 | ON844171 |
| | D612 | ON934388 | ON934353 | ON844177 |
| | E475 | ON934398 | ON934363 | ON844172 |
| <i>T. orientale</i> | E225 | ON934393 | ON934358 | ON844167 |
| | E589 | ON934399 | ON934364 | ON844173 |
| <i>T. atroviride</i> | E339 | ON934394 | ON934359 | ON844168 |

表 4 木霉菌株对粮食危害真菌的抑菌率

Table 4 The inhibition rate of *Trichoderma* strains against deleterious fungi on grains

| 菌种 Specie | 菌株 编号 Strain | 链格孢 <i>A. alternata</i> | 串珠镰孢 <i>F. verticillioides</i> | 禾谷镰孢 <i>F. graminearum</i> | 层出镰孢 <i>F. proliferatum</i> | 黄曲霉 <i>A. flavus</i> | 黑曲霉 <i>A. niger</i> | 粉红单端孢霉 <i>T. roseum</i> (%) | 澳大利亚弯孢 <i>C. australiensis</i> | 新月弯孢 <i>C. lunata</i> | 卷枝毛霉 <i>Mucor circinelloides</i> |
|---------------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| | No. | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| <i>T. afroharzianum</i> | a69 | 67.2±1.2abcde | 65.6±1.6abc | 64.1±5.0ab | 50.0±1.6abc | 67.6±3.9c | 56.0±2.0abc | 67.6±2.9abcd | 55.2±4.7abc | 77.0±3.6b | 52.0±8.0ab |
| | a80 | 67.6±1.5abcde | 63.7±0.5ab | 72.2±4.1abc | 55.0±10.1abc | 69.6±3.3c | 60.0±7.2abc | 72.0±5.4abcde | 59.6±1.8cd | 72.1±0.8ab | 52.4±6.6ab |
| | a91 | 78.2±2.3f | 66.7±1.0abc | 79.9±4.4c | 71.2±6.4d | 81.9±4.9d | 66.3±4.0c | 80.4±1.8e | 68.4±2.4d | 73.9±2.1ab | 56.2±4.7ab |
| | a98 | 71.0±0.6cdef | 73.2±4.1bc | 71.4±2.3abc | 63.5±6.8bcd | 73.3±2.6cd | 65.3±3.1bc | 74.1±4.1bcde | 55.7±4.0abc | 71.6±2.3ab | 56.2±4.7ab |
| | a124 | 75.6±3.2ef | 67.8±2.5abc | 71.8±2.7abc | 62.5±5.7abcd | 72.2±0.7cd | 61.3±3.1bc | 72.0±6.8abcde | 61.5±3.1cd | 73.4±3.4ab | 48.2±7.4a |
| <i>T. asperelloides</i> | E874 | 71.8±2.3cdef | 72.1±1.6bc | 77.3±0.8bc | 66.7±1.1cd | 70.6±1.9cd | 65.3±2.3bc | 78.0±1.0de | 60.5±3.2cd | 73.9±2.8ab | 56.0±6.1ab |
| | H23 | 74.0±3.9def | 67.8±8.1abc | 68.7±6.0abc | 53.2±5.7abc | 69.0±0.9c | 65.3±5.0bc | 75.6±1.0cde | 59.5±6.5cd | 70.3±2.7ab | 54.7±4.8ab |
| | a67 | 66.4±3.1abcd | 64.5±4.7ab | 72.5±5.7abc | 48.9±3.3ab | 55.6±5.5ab | 60.7±3.1abc | 69.0±1.0abcde | 56.1±1.9abc | 70.3±2.7ab | 53.3±7.1ab |
| <i>T. amoenum</i> | a126 | 72.1±0.6cdef | 67.2±5.7abc | 71.7±4.8abc | 57.8±1.4abcd | 70.6±2.2cd | 61.3±3.1abc | 72.9±1.4bcde | 59.6±3.3cd | 73.4±3.4ab | 48.2±7.4a |
| <i>T. paratroviride</i> | a131 | 58.8±0.6a | 74.9±3.4c | 65.8±5.6abc | 51.0±3.2abc | 63.1±1.3bc | 53.3±2.3abc | 68.4±2.7abcd | 57.0±0.8bc | 67.1±0.8a | 68.9±3.1b |
| <i>T. obovatum</i> | E95 | 61.0±8.2ab | 58.5±3.3bc | 64.4±7.3ab | 52.0±10.3abc | 50.2±9.5a | 50.7±9.0a | 63.1±2.7ab | 46.1±4.7ab | 67.6±2.7ab | 45.8±9.1a |
| <i>T. longibrachiatum</i> | E357 | 72.5±0.4cdef | 72.7±1.0bc | 71.3±3.6abc | 59.3±4abcd | 70.6±2.4cd | 51.3±2.3ab | 64.3±3.1abc | 56.1±3.2abc | 73.4±4.8ab | 54.7±8.1ab |
| | E475 | 64.1±2.4abc | 61.2±1.0a | 70.3±3.2abc | 59.3±4abcd | 65.8±3.5bc | 48.0±6.9a | 78.0±3.7de | 45.6±2.8a | 75.2±2.1ab | 62.7±2.7ab |
| | D612 | 68.7±3.6bcde | 64.5±1.0ab | 65.9±3.9abc | 65.7±4.4bcd | 70.5±3.4cd | 54.0±3.5abc | 76.8±6.2de | 51.7±4.5abc | 70.3±4.1ab | 59.1±8.2ab |
| <i>T. orientale</i> | E589 | 65.7±0.5abcd | 64.5±1.9ab | 72.4±1.1abc | 56.3±2.7abcd | 69.0±3.5c | 53.3±1.2abc | 70.2±5.2abcde | 55.2±3.4abc | 71.2±5.5ab | 52.4±7.7ab |
| <i>T. atroviride</i> | E339 | 68.7±3.1bcde | 65±1.9abc | 61.7±8.3a | 45.7±7.7a | 47.0±4.2a | 56.7±7.0abc | 60.7±4.7a | 46.9±4ab | 68.5±4.1ab | 46.2±6.3a |

数据为接种木霉菌第 11 天时 3 个样本重复的平均值±标准差。不同小写字母标记的不同木霉菌株对每种危害真菌的抑菌率平均值有显著差异 ($P<0.05$)。抑菌率最高值以黑色加粗标注

Data are mean±standard deviation (SD) of 3 sample replicates on the 11th day of inoculation. Mean values labeled with different lowercase letters for each inhibition rate of different *Trichoderma* strains were significantly different ($P<0.05$). The maximum inhibition rate is in black and bold.

表 5 对危害真菌抑菌效果最明显的 2 个菌株及其抑菌率

Table 5 The two strains with the most obvious antagonism effect on deleterious fungi and their inhibition rate

| 危害真菌 Deleterious fungi | 菌株 1 Strain 1 | 抑制率 Inhibition rate (%) | 菌株 2 Strain 2 | 抑制率 Inhibition rate (%) |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 链格孢 <i>A. alternata</i> | <i>T. afroharzianum</i> a91 | 78.2±2.3 | <i>T. afroharzianum</i> a124 | 75.6±3.2 |
| 串珠镰孢 <i>F. verticillioides</i> | <i>T. paratroviride</i> a131 | 74.9±3.4 | <i>T. afroharzianum</i> a98 | 73.2±4.1 |
| 禾谷镰孢 <i>F. graminearum</i> | <i>T. afroharzianum</i> a91 | 79.9±4.4 | <i>T. afroharzianum</i> E874 | 77.3±0.8 |
| 层出镰孢 <i>F. proliferatum</i> | <i>T. afroharzianum</i> a91 | 71.2±6.4 | <i>T. afroharzianum</i> E874 | 66.7±1.1 |
| 黄曲霉 <i>A. flavus</i> | <i>T. afroharzianum</i> a91 | 81.9±4.9 | <i>T. afroharzianum</i> a98 | 73.3±2.6 |
| 黑曲霉 <i>A. niger</i> | <i>T. afroharzianum</i> a91 | 66.3±4.0 | <i>T. afroharzianum</i> a98 | 65.3±3.1 |
| 粉红单端孢霉 <i>T. roseum</i> | <i>T. afroharzianum</i> a91 | 80.4±1.8 | <i>T. afroharzianum</i> E874 | 78.0±1.0 |
| 澳大利亚弯孢 <i>C. australiensis</i> | <i>T. afroharzianum</i> a91 | 68.4±2.4 | <i>T. afroharzianum</i> a124 | 61.5±3.1 |
| 新月弯孢 <i>C. lunata</i> | <i>T. afroharzianum</i> a69 | 77.0±3.6 | <i>T. afroharzianum</i> a91 | 73.9±2.1 |
| 卷枝毛霉 <i>M. circinelloides</i> | <i>T. paratroviride</i> a131 | 68.9±3.1 | <i>T. longibrachiatum</i> E475 | 62.7±2.7 |

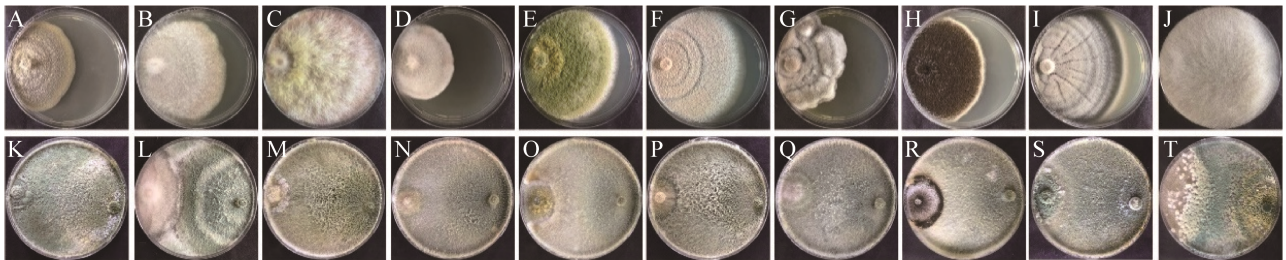


图 4 抑菌效果最好的木霉菌株与不同危害真菌的平板对峙 A–J: 危害真菌阴性对照, 链格孢、串珠镰孢、禾谷镰孢、层出镰孢、黄曲霉、粉红单端孢霉、澳大利亚弯孢、黑曲霉、新月弯孢和卷枝毛霉。K–T: 对危害真菌抑菌效果最明显的木霉属菌株的平板对峙, 顺序同上

Figure 4 Plate confrontation of *Trichoderma* strains with the best inhibition and different deleterious fungal species. A–J: Deleterious fungi as negative control, *Alternaria alternata*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium proliferatum*, *Aspergillus flavus*, *Trichoderma roseum*, *Curvularia australiensis*, *Aspergillus niger*, *Curvularia lunata* and *Mucor circinelloides*. K–T: Plate confrontation of *Trichoderma* strains with the most obvious antagonism effect on deleterious fungi, the order as above.

2.3.2 木霉菌对危害真菌抑菌效果的显微观察

由上述分析可知, 在对峙培养条件下, 当木霉菌的菌丝体和危害真菌的菌丝体相互接触时, 由于木霉的菌落生长快, 很快将危害真菌的菌丝体覆盖, 对危害真菌产生抑制或拮抗作用, 使危害真菌的生长明显受到抑制。将对峙生长的平板菌落进行显微观察, 由图 5A–5D 可以观察到危害真菌的菌丝逐步降解为碎片

状, 图 5E–5G 展示了菌丝降解消融的状况, 由图 5H–5J 可观察到危害真菌的菌丝隔膜处会逐步发生溶解和断裂情况, 图 5K–5M 可观察到木霉菌菌丝体通过接触危害真菌的菌丝体并对其缠绕, 图 5N–5P 展示了木霉菌菌丝体穿透危害真菌的菌丝体并在其菌丝内寄生, 图 5A、5E、5H 为危害真菌菌丝的正常状态。

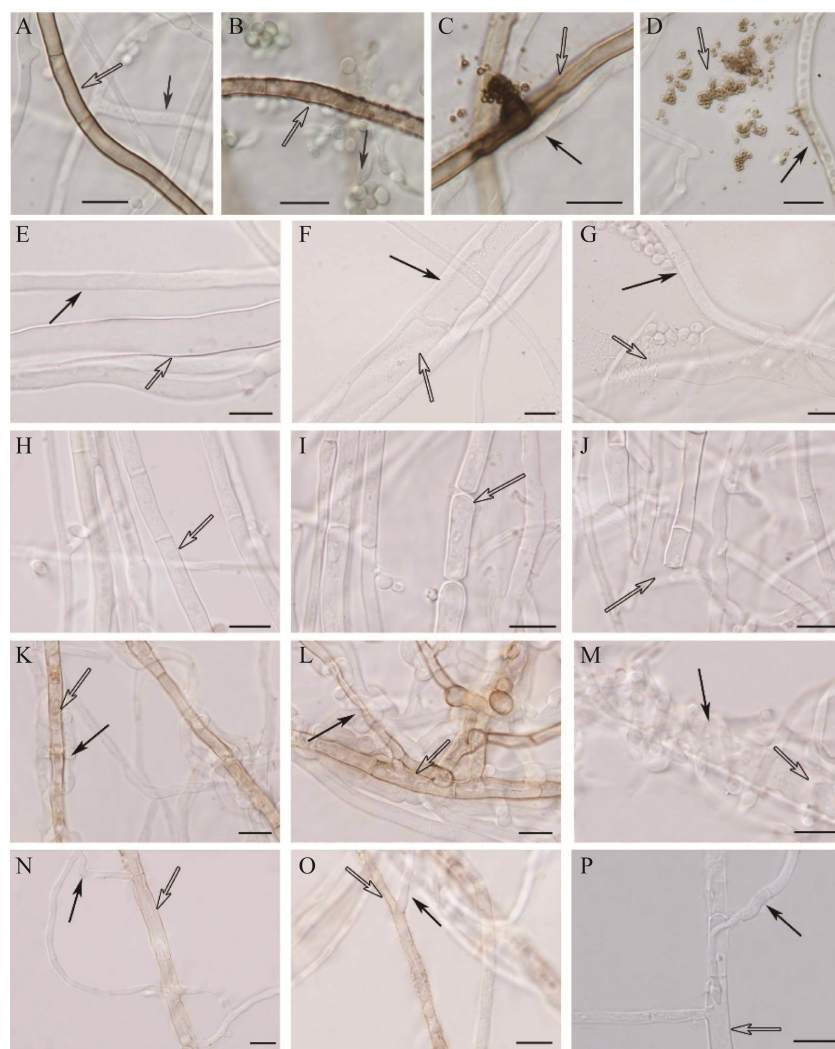


图5 对峙培养中木霉菌对危害真菌抑制作用的显微结构观察 A-P: 分别为木霉菌的菌丝裂解、缠绕和插入危害菌的菌丝. 黑色空心箭头指向危害真菌的菌丝, 黑色实心箭头指向木霉菌的菌丝. 标尺=10 μm

Figure 5 Microstructural observation on the inhibition of *Trichoderma* spp. on deleterious fungal species under confrontation culture. A-P: Hyphae of *Trichoderma* lysed, twined and inserted into the hyphae of deleterious fungi. Hollow black arrow indicates hyphae of *Trichoderma* spp., filled black arrow indicates hyphae of deleterious fungi. Bar=10 μm .

3 讨论与结论

木霉是植物病害生物防治中研究和应用非常广泛的一类真菌。因其具有良好的抑菌性能, 属内已有部分菌种作为生物农药或者生物肥料商业化, 广泛应用于植物病原菌的防治^[13], 但它们的广泛应用仍受田间条件下生物因素(目标

植物、病原体、宿主范围和区域分布等)和非生物因素(干旱、温度、湿度、化学残留和土壤肥力等)的影响, 防治功效受阻碍^[14]。因此, 从粮食籽粒上分离适于粮食种植的生防木霉菌, 对其在粮食上产毒真菌和病原真菌生物防治方面的应用和推广具有重要意义。

木霉属内不同物种的生防功能与代谢产物

都不相同^[15], 在研究木霉菌株生防潜力之前需对其进行准确的分类鉴定, 以免造成混淆以及在制剂生产过程中产生不必要的干扰^[16]。根据近几年文献报道, 木霉属的物种鉴定通常选择 ITS、*rpb2* 和 *tefl* 等基因片段, 结合数据库已有的标准序列片段进行分析, 可区分其种内与种间序列差异, 避免部分种的错误鉴定^[10,17]。本研究通过对小麦、稻谷和玉米籽粒上木霉菌进行分离培养, 筛选出 35 株木霉, 通过形态学和 ITS-*rpb2-tefl* 多基因联合构建系统发育树, 对分离株进行鉴定, 确定粮食籽粒上分到的木霉菌为 8 个种。说明木霉菌株可以定殖于粮食籽粒上, 但数量较少, 并不是优势真菌, 这与 Pitt 等^[18]的报道一致。

国内外大量的研究结果表明, 木霉的抑菌作用具有广谱性及多种拮抗机制并存等优势^[19]。本试验同时针对粮食上常见的 10 种危害真菌(包括产毒真菌和病原真菌), 采用对峙培养法进行拮抗潜力的测定, 发现粮食上分离的木霉属菌株对这 10 种危害真菌均具有抑制作用。由于不同的病原菌菌丝生长能力与产孢时间不同, 同一木霉菌株对不同危害真菌的抑菌效果不同, 而不同的木霉菌物种或同一物种的不同分离株对于同一种真菌的抑菌效果也不同^[20]。Sharma 等^[21]研究了哈茨木霉 ThHP-3 对 4 种病原真菌的拮抗机理, 发现木霉在与不同宿主相互作用的不同阶段表现出不同的转录组学反应, 证实木霉菌株对病原真菌的拮抗作用具有宿主特异性。本次测试的 8 种木霉中, 非洲哈茨木霉和长枝木霉对于粮食上危害真菌的总体抑菌效果较好, 抑菌谱广。其中非洲哈茨木霉 a91 对 9 种危害菌的抑菌率达到 65%以上, 而同一菌种不同菌株的抑菌效果存在较大差异, 抑菌率相差 5%–20%, 这与前人的研究结果^[20]一致。分离株获取的粮食籽粒来

源不同, 生存环境及共生菌群不同, 可能会影响菌株的代谢途径, 进而影响其抑菌效果。

通过对木霉菌菌丝与危害菌菌丝交界处显微观察发现, 有些木霉菌株和危害真菌的菌丝会发生缠绕、穿透入侵的现象, 与文献报道中提到的重寄生现象^[22]一致, 有些木霉菌株的菌丝会使危害真菌的菌丝发生融断或消解。产生这一现象的原因可能是木霉在代谢过程中产生了抑制病原菌的拮抗性物质, 如木霉素、胶霉素、绿木霉素、抗菌肽等, 从而造成了危害真菌菌丝的断裂解体^[23]。根据文献报道, 非洲哈茨木霉对于多种植物病原菌均具有抑制作用^[24]。Khruengsai 等^[25]研究发现非洲哈茨木霉产生的挥发性化合物对尖孢镰孢(*F. oxysporum*)和层出镰孢具有很强的抗菌活性, 我们筛查的抑菌效果最佳的非洲哈茨木霉菌株在显微镜下能观察到明显的菌丝缠绕和菌丝溶解的结构, 推测其具有多重抑菌机制, 具体哪种机制发挥主要作用还有待进一步研究确定。

本研究发现个别木霉菌株的抑菌效果明显且抑菌谱广, 具有开发粮食产毒真菌和病原菌生物防菌剂的潜力。木霉可通过种子处理, 或通过菌丝体制剂、分生孢子制剂和厚垣孢子制剂施拌到土壤中, 发挥抑制病原菌的作用^[14]。但在实际生产过程中, 抑菌效果及以何种抑制机制为主还有待于深入研究。此外, 实际生产环境情况复杂, 木霉的定殖能力和生存能力会受到影响, 其生防效果存在不稳定性, 不同木霉菌株的组合或与其他微生物群体构建复合菌群有助于提高菌株目标生防的生存能力和稳定性^[26], 这也是我们今后研究关注的重点问题。木霉绝大多数对人类无害, 但有些种类能够感染人类造成木霉病, 所以筛选到的木霉菌株的安全性问题也需进行确认^[27]。

REFERENCES

- [1] SCHIRO G, MÜLLER T, VERCH G, SOMMERFELD T, MAUCH T, KOCH M, GRIMM V, MÜLLER MEH. The distribution of mycotoxins in a heterogeneous wheat field in relation to microclimate, fungal and bacterial abundance[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(1): 177-190.
- [2] STĘPIEŃ Ł, CHEŁKOWSKI J. *Fusarium* head blight of wheat: pathogenic species and their mycotoxins[J]. *World Mycotoxin Journal*, 2010, 3: 107-119.
- [3] FILIZOLA PRB, LUNA MAC, de SOUZA AF, COELHO IL, LARANJEIRA D, CAMPOS-TAKAKI GM. Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 89.
- [4] THAMBUGALA KM, DARANAGAMA DA, PHILLIPS AJL, KANNANGARA SD, PROMPUTTHA I. Fungi vs. fungi in biocontrol: an overview of fungal antagonists applied against fungal plant pathogens[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 604923.
- [5] CARRO-HUERGA G, MAYO-PRIETO S, RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ Á, GONZÁLEZ-LÓPEZ Ó, GUTIÉRREZ S, CASQUERO PA. Influence of fungicide application and vine age on *Trichoderma* diversity as source of biological control agents[J]. *Agronomy*, 2021, 11(3): 446.
- [6] WOO SL, RUOCCO M, VINALE F, NIGRO M, MARRA R, LOMBARDI N, PASCALE A, LANZUISE S, MANGANIELLO G, LORITO M. *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture[J]. *The Open Mycology Journal*, 2014, 8(1): 71-126.
- [7] ALFIKY A, WEISSKOPF L. Deciphering *Trichoderma*-plant-pathogen interactions for better development of biocontrol applications[J]. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 2021, 7(1): 61.
- [8] HE AL, SUN JN, WANG XH, ZOU LW, FU B, CHEN J. Reprogrammed endophytic microbial community in maize stalk induced by *Trichoderma asperellum* biocontrol agent against *Fusarium* diseases and mycotoxin accumulation[J]. *Fungal Biology*, 2019, 123(6): 448-455.
- [9] SWAIN H, ADAK T, MUKHERJEE AK, MUKHERJEE PK, BHATTACHARYYA P, BEHERA S, BAGCHI TB, PATRO R, SHASMITA, KHANDUAL A, BAG MK, DANGAR TK, LENKA S, JENA M. Novel *Trichoderma* strains isolated from tree barks as potential biocontrol agents and biofertilizers for direct seeded rice[J]. *Microbiological Research*, 2018, 214: 83-90.
- [10] INGLIS PW, MELLO SCM, MARTINS I, SILVA JBT, MACÊDO K, SIFUENTES DN, VALADARES-INGLIS MC. *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*[J]. *PLoS One*, 2020, 15(3): e0228485.
- [11] JAKLITSCH WM, VOGLMAYR H. Biodiversity of *Trichoderma* (*Hypocreaceae*) in Southern Europe and Macaronesia[J]. *Studies in Mycology*, 2015, 80: 1-87.
- [12] KATSURAYAMA AM, MARTINS LM, IAMANAKA BT, FUNGARO MHP, SILVA JJ, PITT JI, FRISVAD JC, TANIWAKI MH. Fungal communities in rice cultivated in different Brazilian agroclimatic zones: from field to market[J]. *Food Microbiology*, 2020, 87: 103378.
- [13] OLIVEIRA CM, ALMEIDA NO, CORTES MV, JUNIOR ML, da ROCHA MR, ULHOA C. Biological control of *Pratylenchus brachyurus* with isolates of *Trichoderma* spp. on soybean[J]. *Biological Control*, 2021, 152: 104425.
- [14] FERREIRA FV, MUSUMECI MA. *Trichoderma* as biological control agent: scope and prospects to improve efficacy[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(5): 90.
- [15] SUN JZ, PEI YF, LI EW, LI W, HYDE KD, YIN WB, LIU XZ. A new species of *Trichoderma hypoxylon* harbours abundant secondary metabolites[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37369.
- [16] 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).
- [17] ZHU ZX, ZHUANG WY. *Trichoderma* (*Hypocrea*) species with green ascospores from China[J]. *Persoonia*, 2015, 34: 113-129.
- [18] PITT JI, HOCKING AD. *Fungi and Food Spoilage*[M]. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2009.
- [19] VERMA M, BRAR SK, TYAGI RD, SURAMPALLI RY, VALÉRO JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 37(1): 1-20.
- [20] PRABHAKARAN N, PRAMEELADEVI T, SATHIYABAMA M, KAMIL D. Screening of different

- Trichoderma* species against agriculturally important foliar plant pathogens[J]. Journal of Environmental Biology, 2015, 36(1): 191-198.
- [21] SHARMA V, SALWAN R, SHARMA PN, KANWAR SS. Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: universal yet host specific response[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017, 95: 72-79.
- [22] DRUZHININA IS, SEIDL-SEIBOTH V, HERRERA-ESTRELLA A, HORWITZ BA, KENERLEY CM, MONTE E, MUKHERJEE PK, ZEILINGER S, GRIGORIEV IV, KUBICEK CP. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(10): 749-759.
- [23] VITERBO A, RAMOT O, CHERNIN L, CHET I. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. in the biocontrol of fungal plant pathogens[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 81(1): 549-556.
- [24] ZHANG XJ, HARVEY PR, STUMMER BE, WARREN RA, ZHANG GZ, GUO K, LI JS, YANG HT. Antibiosis functions during interactions of *Trichoderma afroharzianum* and *Trichoderma gamsii* with plant pathogenic *Rhizoctonia* and *Pythium*[J]. Functional & Integrative Genomics, 2015, 15(5): 599-610.
- [25] 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.
- [26] CHEN T, NOMURA K, WANG XL, SOHRABI R, XU J, YAO LY, PAASCH BC, MA L, KREMER J, CHENG YT, ZHANG L, WANG N, WANG ET, XIN XF, HE SY. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere[J]. Nature, 2020, 580(7805): 653-657.
- [27] 张公杰, 李东明. 木霉病的研究现状[J]. 菌物学报, 2019, 38(8): 1287-1297.
- ZHANG GJ, LI DM. Trichodermasis: a review of the literature[J]. Mycosystema, 2019, 38(8): 1287-1297 (in Chinese).