

DOI:10.12403/j.1001-1498.20230359

落叶松枯梢病生防菌的筛选、鉴定及其生物学特性

钱莹莹^{1,2,3}, 邓 勋^{3,4*}, 王 铮¹, 宋小双^{3,4}, 梁 军^{1*}

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091; 2. 东北林业大学林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江省森林保护研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 4. 黑龙江省森林草原火灾及病虫害防控重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: [目的] 为获得落叶松枯梢病的生防菌。[方法] 通过对峙实验和发酵液复筛, 筛选获得对落叶松枯梢病菌 (*Neofusicoccum laricinum*) 具有较强抑制效果的菌株, 对筛选得到的菌株进行鉴定, 并对其生物学特性展开研究。[结果] 筛选得到 1 株对落叶松枯梢病病原菌有显著拮抗作用的土壤真菌 T2, 结合形态学以及分子生物学鉴定为钩状木霉 (*Trichoderma hamatum*)。其平板对峙抑菌率达到 74.16%, 发酵液的抑菌率达到 91.29%。发酵液对多种植物病原真菌均具有较强的抑菌作用, 对松球壳孢菌、金黄壳孢菌、杨灰星叶点霉和立枯丝核菌表现出强抑制作用, 抑菌率均为 92.00%, 对拟枝孢镰刀菌和杨生褐盘二孢菌的抑菌效果较好, 分别为 79.67% 和 62.67%。T2 能利用多种碳氮源、有广泛的酸碱度适应能力及较高的致死温度。[结论] 通过筛选得到的钩状木霉 T2 对落叶松枯梢病病原菌的拮抗作用显著, 抑菌谱广, 环境适应力强。本研究可为落叶松枯梢病的防治提供理论研究和基础。

关键词: 落叶松; *Neofusicoccum laricinum*; 生物防治; 钩状木霉

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2024)04-0182-11

落叶松枯梢病于 1938 年在日本北海道被发现^[1], 该病于上世纪 70 年代在我国东北地区报道发生, 目前已扩散至内蒙古、辽宁、吉林、黑龙江、山东、陕西、甘肃、江苏、安徽和江西等多个省份^[2]。落叶松枯梢病的病原菌为 *Neofusicoccum laricinum* (Sawada) Y. Hattori & C. Nakash., 病菌一般通过伤口潜入, 落叶松感病后, 嫩梢褪绿逐渐变为黑褐色, 弯曲下垂呈钩状, 已木质化的枝梢感病不弯曲, 叶逐渐枯萎脱落, 最终生长停止, 严重者形成小老树或全株枯死^[3]。松枯梢病传播范围广、危害严重, 给我国林业经济造成重大损失^[4-6]。目前的防治措施有营林技术措施、化学防治和生物防治。其中化学防治应用广, 效果明显, 但是长期施用化学农药, 不但会有带来耐药性病原菌株的风

险, 还会提高成本和污染环境^[7-8]。因此, 生物防治是目前备受关注的防治森林病害的有效方法^[9-10]。

根际土壤微生物和植物内生菌有巨大的生防潜力。根际是植物根系与土壤物质能量交换的场所, 在根际土壤微生物与植物的互作中, 植物招募有益微生物, 这些微生物可以促进植物生长, 提高其抗病能力^[11-12]。植物内生菌在与植物的长期共存里, 一些内生菌可以分泌抗菌物质抵抗病菌侵染植物, 不同的植物部位, 其内生菌种类和丰度也存在差异^[13-14]。生防菌可以通过定殖竞争作用, 拮抗作用, 诱导抗性和重寄生等多种作用机制, 抑制或杀死植物病原菌, 达到生物防治的作用, 生物防治不仅对环境友好、效果突出还价格低廉^[15-17]。目前科

收稿日期: 2023-09-11 修回日期: 2023-11-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (项目编号: 2021YFD1400300), 黑龙江省省属科研院所科研业务费项目 (CZKYF2022-1-B031)

* 通讯作者: 邓勋, 博士, 研究员。研究方向: 森林保护学。Email: dxhappy@126.com 梁军, 博士, 研究员。研究方向: 森林保护学。

Email: liangjun@caf.ac.cn

学界有一些关于松枯梢病生防菌的研究, 蒋萍从松树针叶上分离筛选松枯梢病拮抗细菌, 筛选出防效达 60% 以上的拮抗细菌^[18]。黄洁芳发现新洋葱伯克霍尔德菌的代谢物对松枯梢病菌有拮抗作用^[19]。Yun Dai 发现 *Bacillus pumilus* Meyer & Gottheil 对松枯梢病的防治效果明显, 有效抑制病害发生^[20]。张铭筛选出一种对松枯梢病原菌有显著抑制效果的土壤真菌 M75, 该真菌被鉴定为森吉木霉 (*Trichoderma songyi* M.S.Park, S.Y.Oh & Y.W. Lim)^[21]。但是落叶松枯梢病的生防菌目前鲜见报道。

本研究拟通过对峙实验和发酵液复筛, 筛选获得对落叶松枯梢病菌 (*Neofusicoccum laricinum*) 具有较强抑制效果的菌株, 对筛选得到的菌株进行鉴定, 并对其生物学特性展开研究, 为实际生产中防治落叶松枯梢病奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试病原菌: 落叶松枯梢病原菌 *Neofusicoccum laricinum*, 编号 K7, 由中国林业科学研究院森林生态环境与自然保护研究所森林病理学实验室分离、鉴定和保存。立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani* J. G. Kühn)、链格孢 (*Alternaria alternata* (Fr.) Keissl.)、松球壳孢菌 (*Sphaeropsis sapinea* (Fr.) Fuckel)、杨生褐盘二孢菌 (*Marssonina brunnea* (Ellis & Everh.) Magnus)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gleosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.)、金黄壳囊孢菌 (*Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr.)、杨灰星叶点霉 (*Phyllosticta populea* Sacc.)、拟枝孢镰刀菌 (*Fusarium sporotrichioides* Sherb.) 均由黑龙江省林业科学院森林保护研究所提供。

供试培养基如下, 麦芽浸粉培养基 (MEA 培养基)^[22]; 低营养琼脂培养基 (SNA 培养基)^[23]; 马铃薯葡萄糖培养基 (PDA 培养基): 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 17.0 g, 马铃薯粉 200.0 g, 硫酸镁 0.75 g, 磷酸二氢钾 0.75 g, 氯化钙 0.01 g, 维生素 B1 0.01 g, 蒸馏水 1.0 L; 玉米粉培养基 (CMD 培养基): 玉米粉 40 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗菌来源地点 供试拮抗真菌来源于黑龙江 9 个地点, 地点详细信息如表 1。

1.2.2 拮抗菌初筛 采用平板对峙培养法, 将落叶松枯梢病病原菌与拮抗菌株对峙培养。对峙培养于 25 ℃ 条件下, 培养 14 d, 记录病原菌菌落指向拮抗真菌的生长半径, 参考赫俊阳^[24]计算病原菌被抑制率 (Inhibition rate of pathogenic bacteria)、拮抗菌被抑制率 (Inhibition rate of antagonistic bacteria) 和拮抗菌相对抑制效果 (Relative inhibition effect)。

计算公式:

$$IR_a = [(R_{cka} - R_a) / R_{cka}] \times 100\%$$

$$IR_b = [(R_{ckb} - R_b) / R_{ckb}] \times 100\%$$

$$RIE = IR_a / IR_b$$

式中: IR_a 为病原菌被抑菌率, R_{cka} 为对照病原菌菌落半径, R_a 为对峙培养的病原菌菌落半径, IR_b 为拮抗菌被抑制率, R_{ckb} 为对照拮抗菌菌落半径, R_b 为对峙培养的拮抗菌菌落半径, RIE 为相对抑制效果。

1.2.3 拮抗菌复筛 将筛选出的 10 株高效拮抗真菌制备无菌发酵滤液, 测定各拮抗菌的无菌发酵滤液对落叶松枯梢病病原菌的抑制率^[21]。打取拮抗菌株菌饼, 接入 PDB 培养基。在 150 r·min⁻¹、25 ℃ 条件下振荡培养 4 d, 发酵液转移至无菌离心管, 于 4 ℃、12 000 r·min⁻¹ 的高速冷冻离心机中离心 10 min, 弃沉淀, 收集上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 发酵液与培养基的比例为 1:5, 摇匀, 制备平板, 随后将直径 7 mm 的 K7 菌饼接种在平板中央, 以添加等量无菌水作为对照组, 每组 3 个重复。将平板倒置培养于 25 ℃ 培养箱中, 14 d 后在平板后十字画线, 采用菌丝生长速率法对拮抗菌复筛抑菌率进行计算, 通过如下公式计算确定抑菌率 (Bacterial inhibition rate)。

$$IR = [(D_{ck} - D) / D_{ck}] \times 100\%$$

式中, IR 为抑菌率, D_{ck} 为病原菌对照菌落直径 (Diameter of control colony), D 为处理组菌落直径 (Diameter of treated colonies)。

1.2.4 T2 的鉴定 形态鉴定: 将筛选得到的拮抗真菌分别接种于 PDA、MEA、CMD 和 SNA 培养基上, 观察菌丝和菌落形态特征, 通过紫外灯诱导其产生分生孢子, 观测并记录分生孢子与分生孢子梗的形态。

分子生物学鉴定: 采用 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 提取待测菌株的

表 1 地点详细信息

Table 1 Detailed information of sampling locations

样品编号	采集地点	纬度	经度	海拔	采集时间
Sample number	Collection location	Latitude (N)	Longitude (N)	Elevation/km	Time
PT0011(1)	穆稜林业局和平林场84林班2小班	43°53'1.13"	130°6'2.58"	0.652	2022.5.20
PT0011(2)	穆稜林业局和平林场84林班3小班	43°53'1.13"	130°6'2.58"	0.652	2022.5.20
PT0011(3)	穆稜林业局和平林场84林班4小班	43°53'1.13"	130°6'2.58"	0.652	2022.5.20
PT10	穆稜东北红豆杉国家级自然保护区84林班11小班	43°52'2"	130°7'6"	0.634	2022.5.20
PT0012(1)	牡丹江市宁安三山林场	44°12'39.23"	130°7'33.03"	0.537	2022.5.21
PT0012(2)	牡丹江市宁安三山林场	44°12'39.23"	130°7'33.03"	0.537	2022.5.21
PT0012(3)	牡丹江市宁安三山林场	44°12'39.23"	130°7'33.03"	0.537	2022.5.21
PT0005	牡丹江市海林市火龙沟林场	44°28'34.37"	128°58'20.48"	0.517	2022.5.22
PT0006	牡丹江市海林市火龙沟林场	44°28'34.37"	128°58'20.48"	0.517	2022.5.22
PT00010	东京城林业局苇子沟林场	43°59'9.12"	129°5'22.47"	0.352	2022.5.23
PT0009	绥阳林业局刘桥沟林场6林班	43°45'3.23"	130°34'33.12"	0.401	2022.5.25
PT0014	大海林林业局海源林场155林班2小班	44°3'23.93"	128°6'34.75"	1.340	2022.5.27
PT0015	大海林林业局海源林场156林班3小班	44°4'10.11"	128°8'36.96"	1.148	2022.5.27
PT0016	大海林林业局长汀经营所69林班3小班	44°30'12.48"	128°52'15.54"	0.386	2022.5.27
5246	虎林市虎头镇虎头村	46°12'36"	133°36'5.22"	0.080	2022.6.9
1688	虎林市虎头镇虎头村	45°55'48"	133°33'51.8"	0.087	2022.6.9
5265	虎林市虎头镇虎头村	45°55'46.1"	133°32'52.3"	0.064	2022.6.9
PT0018	哈尔滨市通河县	46°2'25.67"	133°39'31.93"	0.061	2022.7.6
PT0019	加格达奇大兴安岭技术推广站（1）	50°18'19.75"	124°7'11.50"	0.392	2022.7.14
PT0020	加格达奇大兴安岭技术推广站（2）	50°18'19.75"	124°7'11.50"	0.392	2022.7.14
PT0021	加格达奇大兴安岭技术推广站（1）	50°18'46.57"	124°6'48.95"	0.377	2022.7.14
PT0022	加格达奇大兴安岭技术推广站（2）	50°18'46.57"	124°6'48.95"	0.377	2022.7.14
PT0023	加格达奇大兴安岭技术推广站（3）	50°18'46.57"	124°6'48.95"	0.377	2022.7.14
PT0024	伊春乌翠区（1）	47°24'47.66"	128°41'35.32"	0.443	2022.7.19
PT0025	伊春乌翠区（2）	47°24'47.66"	128°41'35.32"	0.443	2022.7.19
PT0026	伊春乌翠区（3）	47°24'47.66"	128°41'35.32"	0.443	2022.7.19

DNA，引物为真菌通用引物 ITS1（5'-TCCGTAGG TGAACCTGCGG-3'），ITS4（5'-TCCTCCGCTTA TTGATATGC-3'），反应体系（40 μL）为：2 × TaqPCRMasterMix 20 μL，上下游引物各（5 μmol·L⁻¹）2 μL，DNA 模版 2 μL，ddH₂O 14 μL。PCR 产物送至北京华大基因科技股份有限公司测序，测序结果在 NCBI 中 BLAST 比对，选取同源性较高的相关菌株序列，采用邻接法（Neighbor-Joining）在 MEGA-X 中构建系统发育树。

1.2.5 拮抗菌发酵液的抑菌谱 采用菌丝生长速率法测定拮抗真菌发酵液对 8 种常见的植物病原真菌：立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*）、链格孢（*Alternaria alternata*）、松球壳孢菌（*Sphaeropsis sapinea*）、杨生褐盘二孢菌（*Marssonina brunnea*）、

胶孢炭疽菌（*Colletotrichum gleosporioidies*）、金黄壳囊孢菌（*Cytospora chrysosperma*）、杨灰星叶点霉（*Phyllosticta populea*）、拟枝孢镰刀菌（*Fusarium sporotrichioides*）的抑菌活性，抑菌率计算公式同 1.2.3。

1.2.6 生防菌的生物学特性研究 不同碳源和氮源对菌丝生长的影响：以察氏培养基为基础培养基，碳源（麦芽糖、蔗糖、葡萄糖、乳糖、甘露醇和淀粉）与氮源（酵母膏、蛋白胨、牛肉膏、磷酸氢二铵、硫酸铵、硝酸钠和硝酸铵）分别替换培养基中的蔗糖与硝酸钠。将菌株 T2 接种上述培养基中，每个处理 3 个重复，25 ℃ 恒温培养 2 d 后用十字交叉法测量菌落直径。制备液体察氏培养基，T2 菌株活化 4 d 后，打取菌饼置于液体培养基

中, 150 r·min⁻¹, 25 ℃ 震荡培养 4 d 后测量菌丝重量。

pH 对菌丝生长的影响: 将 PDA、PDB 培养基 pH 调配成 4、5、6、7、8、9、10、11。接种菌株 T2, 每个处理 3 个重复。

光照对菌丝生长的影响: 分别置于 25 ℃ 的 24 h 连续黑暗、24 h 连续光照、12 h 光暗交替的 3 种光照条件下培养, 每个处理 3 个重复。

钩状木霉 T2 的致死温度: 共设置了 40、45、50、55、60、65、70、75、80 ℃, 处理时间为 10 min。每个温度处理 5 个重复。根据试验结果再分别设置 45、46、47、48、49 ℃ 处理 10 min, 确定该菌的致死温度。

1.3 数据分析

利用 Excel2003 整理实验数据, 在 SPSS19.0 对数据进行统计分析, 并应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验, 显著性水平设置为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌平板初筛

供试拮抗真菌共 103 株, 分别与 K7 进行对峙培养, 选取抑菌率前 10 的菌株, 见表 2。其中, 菌株 T153、T2 表现出较强的抑菌效果, 在与 K7 对峙培养时, 菌株 T153、T2 能有效竞争平板内的生长空间, 限制了病原菌菌丝的生长和扩展,

使病原菌的菌落无法向平板四周延伸 (图 1)。在连续培养 14 d 后, 对照组的病原菌菌落正常生长, 菌落半径分别为 4.24 cm 和 4.64 cm, 而在接种菌株 T153、T2 的平板上, T153、T2 的菌落半径分别为 4.10 cm 和 3.80 cm, K7 菌落生长半径仅为 0.90 cm 和 1.20 cm, 拮抗真菌 T153、T2 对松枯梢病病原菌的平板初筛抑菌率分别为 78.89% 和 74.16%。

表 2 高效拮抗真菌抑菌率

Table 2 Bacteriostatic rate of highly effective antagonistic fungi

菌株号 Number	病原菌被抑制率 IR _a /%	拮抗菌被抑制率 IR _b /%	相对抑制效果 RIE
T153	78.89 ± 2.33a	41.38 ± 1.77c	1.91 ± 0.13a
T2	74.16 ± 1.32a	45.71 ± 1.31a	1.62 ± 0.07b
T90	72.84 ± 3.80a	46.62 ± 3.00a	1.57 ± 0.18b
T138	72.81 ± 1.32a	46.57 ± 1.00a	1.56 ± 0.08b
T148	71.84 ± 2.69a	45.62 ± 1.57b	1.58 ± 0.11b
J19	71.69 ± 1.17b	45.71 ± 0.65a	1.57 ± 0.04b
T149	70.34 ± 1.35b	46.52 ± 0.54a	1.51 ± 0.04b
T146	70.32 ± 2.72b	46.52 ± 1.24a	1.51 ± 0.10b
T135	69.65 ± 3.52b	48.67 ± 3.05a	1.44 ± 0.18b
T141	66.54 ± 3.02c	48.81 ± 1.43a	1.37 ± 0.10b

注: 表中数据为平均数 ± 标准差, 不同小写字母表示在 $p<0.05$ 水平差异显著。下同

Notes: Data in the table are the mean ± SD, there was significant difference at the level of $p<0.05$. The same below

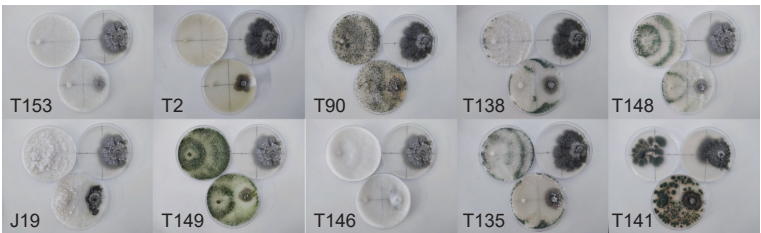


图 1 抑菌率前 10 的菌株

Fig. 1 Top 10 strains with bacteriostatic rate

根据病原菌被抑制率、潜在生防菌被抑制率和相对抑制效果初定效果较好的前 10 株为落叶松枯梢病高效拮抗菌的备选菌株, 包括菌株 T153 (78.89%)、T2 (74.16%)、T90 (72.84%)、T138 (72.81%)、T148(71.84%)、J19 (71.69%)、T149 (70.34%)、T146 (70.32%)、T135 (69.65%)、T141 (66.54%), 在对峙培养中, 可有效抑制病

原菌的生长。

2.2 拮抗菌平板复筛

采用 PDB 液体培养基对高效拮抗菌株进行发酵处理, 获得无菌发酵滤液, 测定高效拮抗菌株非挥发性代谢产物对 K7 的抑制作用。采用十字交叉法测量 K7 在添加了高效拮抗菌株无菌发酵滤液平板上扩展的菌落直径结果如图 2 所示。

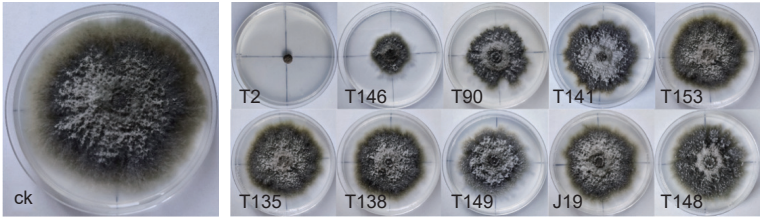


图 2 不同拮抗真菌发酵液抑菌效果

Fig. 2 Bacteriostatic effect of fermentation broth of different antagonistic fungi

病原菌 K7 在含有 T2 发酵液的培养基上菌丝生长受到显著的抑制，在连续培养 14 d 后，受到 T2 发酵液抑制的 K7，菌饼上长出白色菌丝，但菌落无扩展，在相同时间内，对照组菌落直径为 8.04 cm，通过抑菌率公式计算发酵液复筛抑菌率，如表 3 其发酵液复筛抑菌率为 91.29%，抑菌效果最好。

表 3 不同拮抗真菌发酵液抑菌率

Table 3 Bacteriostatic rate of fermentation broth of different antagonistic fungi

菌株号 Number	对照菌落直径 D_{CK}/cm	处理菌落直径 D/cm	抑菌率 IR/%
T2	8.04 ± 0.16	0.70 ± 0.00	91.29 ± 0.18a
T146		4.45 ± 0.16	44.71 ± 1.01b
T90		6.09 ± 0.41	24.34 ± 1.42c
T141		7.00 ± 0.42	12.95 ± 1.02d
T153		7.18 ± 0.43	10.64 ± 0.52d
T135		7.23 ± 0.14	10.09 ± 0.78d
T138		7.37 ± 0.16	8.36 ± 1.04d
T149		7.41 ± 0.04	7.85 ± 0.72d
J19		7.54 ± 0.16	6.22 ± 0.27d
T139		7.69 ± 0.26	4.42 ± 0.18e

2.3 拮抗菌 T2 的鉴定

2.3.1 形态鉴定 在 PDA 培养基上，T2 菌株于 25 ℃ 培养 4 d，菌落直径为 60~70 mm，5 d 长满平板，生长速率为 15.0~17.5 mm·d⁻¹，生长速度较快。菌落圆形，轮廓清晰，气生菌丝白色，卷毛状，产孢簇分布为同心轮纹状，表面呈绒毛状，初为白色，后期为蓝绿色，反面无色，菌落有椰子味气体产生（图 3A）。在 MEA 培养基上的培养特征和菌落形态与 PDA 较一致，气生菌丝略少于 PDA 培养基（图 3B），在 CMD 培养基上，观察到 T2 菌株所产生的气生菌丝较少，直径略小于 MEA 培养基，菌落不清晰（图 3C）。在 SNA 培

养基上，在相同条件下培养，测量得到的菌落直径最小，变化范围为 55~60 mm，菌落不清晰，气生菌丝不发达（图 3D）。

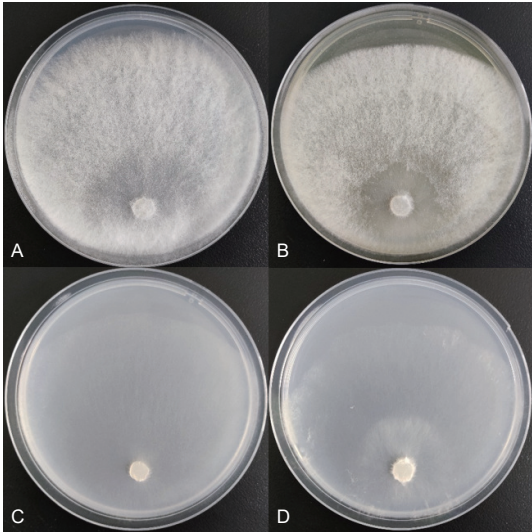


图 3 不同培养基 T2 菌落形态

Fig. 3 Colony morphology of T2 in different media

培养在 SNA 培养基上的 T2 菌株，在紫外线照射 15 min 后，移至 25 ℃ 恒温培养箱中连续培养 3 d 后，菌丝上稀疏地产生分生孢子梗如图 4，分生孢子梗透明，壁光滑，梗的主轴上半部分常常弯曲或呈钩状，下部有多级分枝，初级分枝粗短，常有复杂的再次分枝，次级分枝肥壮粗短，瓶梗安瓿形或椭圆形，基部溢缩，顶端变细，中间膨大。分生孢子椭圆形，尖端阔圆形，基部稍尖，壁光滑，呈浅绿色，大小为 (3.9~5.6) μm × (2.8~4.0) μm。依据上述形态特征结合魏景超《真菌鉴定手册》和张广志的木霉检索表，将菌株 T2 初步鉴定为木霉属真菌 (*Trichoderma* sp.) [25]。

2.3.2 拮抗菌 T2 的分子生物学鉴定 拮抗真菌 T2 的 PCR 产物经测序后，在 NCBI 中 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 BLAST 比对分析，发现该序列与钩状木霉 *Trichoderma hamatum*

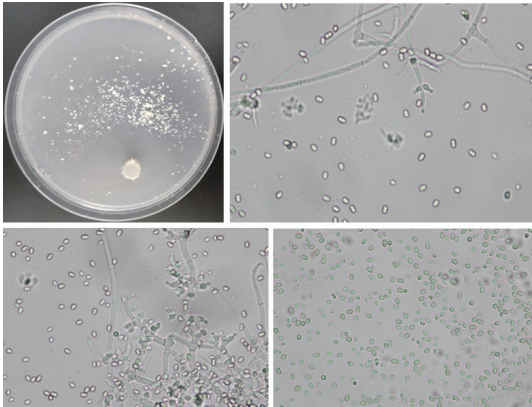


图 4 拮抗真菌 T2 的显微结构图 (400x)
Fig. 4 Microstructure of antagonistic fungus T2 (400x)

(Bonord.) Bainier 最为接近，相似度达 99%。选取同源性较高的序列与 T2 构建系统发育树，如图 5，在系统发育树上菌株 T2 与 *T. hamatum* 聚在一个分支上，结合其形态特征明确木霉菌 T2 为钩状木霉。

2.4 钩状木霉 T2 发酵液的抑菌谱测定

采用菌丝生长速率法测定拮抗真菌钩状木霉 T2 对立枯丝核菌等 8 种供试真菌的抑菌活性。结果如表 4 所示，T2 的无菌发酵滤液对多种植物病原真菌均具有较强的抑菌活性，其中对立枯丝核菌、金黄壳囊孢菌、松球壳孢菌和杨灰星叶点霉表

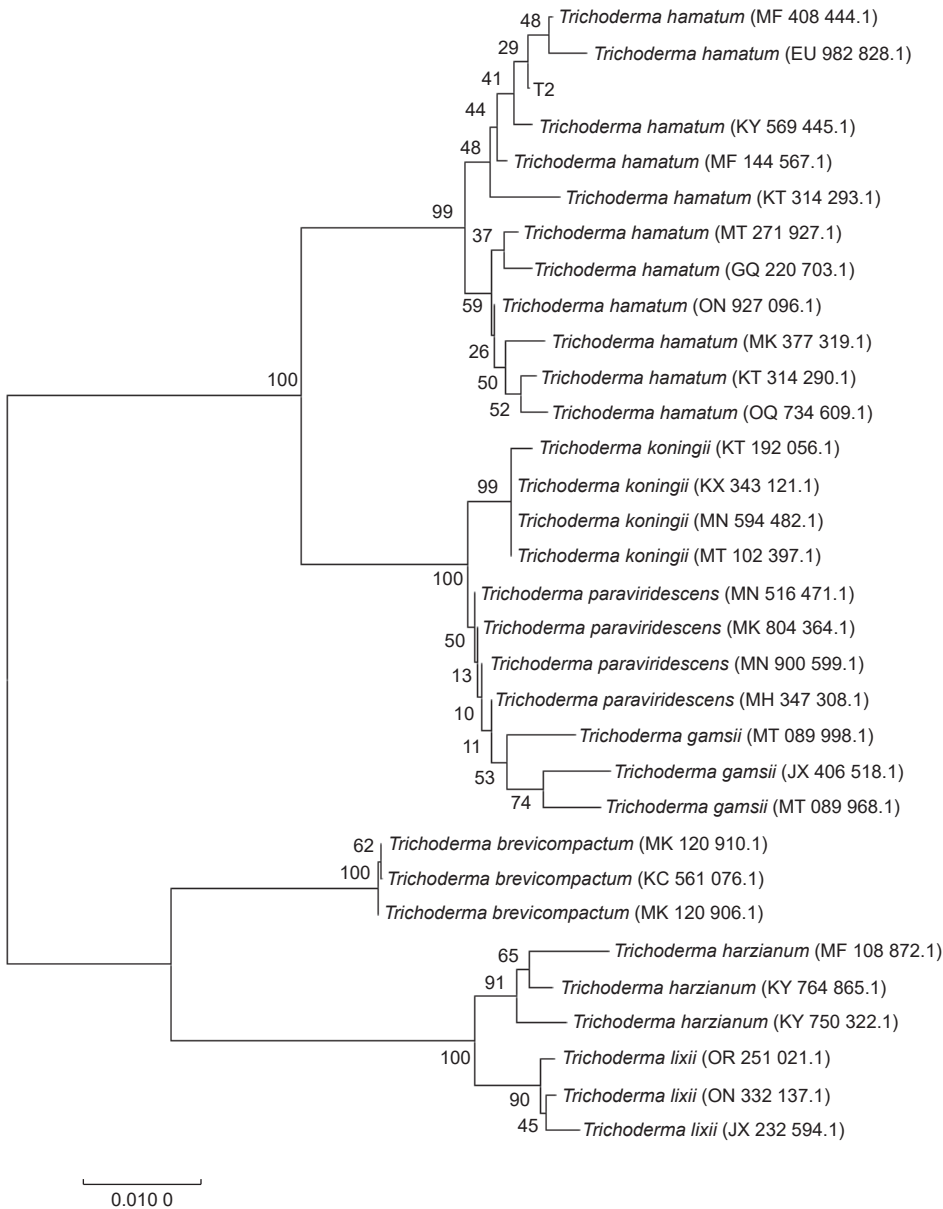


图 5 菌株 T2 基于 ITS 序列构建的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree based ITS sequences of strain T2

现出强抑制作用，抑菌率最高，均为 92.00%，对拟枝孢镰刀菌和杨生褐盘二孢菌的抑菌效果较好，分

别为 79.67% 和 62.67%。对胶孢炭疽菌和链格孢菌的抑菌效果一般，抑菌率分别为 49.33% 和 48.00%。

表 4 T2 发酵液抑菌谱测定

Table 4 Determination of bacteriostasis spectrum of T2 fermentation broth

序号 Number	病原真菌 Pathogenic fungi	种名 Species	抑菌率 IR/%
1	松球壳孢菌	<i>Sphaeropsis sapinea</i> (Fr.) Fuckel	92.00 ± 0.00a
2	金黄壳囊孢菌	<i>Cytospora chrysosperma</i> (Pers.) Fr.	92.00 ± 0.00a
3	杨灰星叶点霉	<i>Phyllosticta populea</i> Sacc.	92.00 ± 0.00a
4	立枯丝核菌	<i>Rhizoctonia solani</i> J. G. Kühn	92.00 ± 0.00a
5	拟枝孢镰刀菌	<i>Fusarium sporotrichioides</i> Sherb.	79.67 ± 0.58b
6	杨生褐盘二孢菌	<i>Marssonina brunnea</i> (Ellis & Everh.) Magnus	62.67 ± 1.16c
7	胶孢炭疽菌	<i>Colletotrichum gleosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.	49.33 ± 0.58d
8	链格孢菌	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl.	48.00 ± 2.00d

2.5 钩状木霉 T2 的生物学特性

2.5.1 碳源和氮源对菌丝生长的影响 钩状木霉 T2 能利用的碳源、氮源较为广泛。如表 5 所示，在碳源利用试验中，以淀粉为碳源，菌落生长直径最大为 6.13 cm，菌丝重量最高。其次麦芽糖、蔗糖、葡萄糖菌落大小非常接近，其中蔗糖菌丝重量较高。再次甘露醇和乳糖菌落直径较小。

表 5 不同碳源对菌株 T2 生长的影响

Table 5 Effect of different carbon sources on the growth of strain T2

碳源 Carbon source	菌落直径 Diameter of colony/cm	菌丝重量 Weight of mycelium/mg
蔗糖	5.48 ± 0.10b	170.67 ± 13.32b
葡萄糖	5.47 ± 0.08b	93.33 ± 5.69c
淀粉	6.13 ± 0.13a	339.00 ± 44.71a
乳糖	4.80 ± 0.18c	81.00 ± 5.29c
麦芽糖	5.49 ± 0.39b	41.33 ± 4.04d
甘露醇	5.31 ± 0.16b	93.33 ± 4.73c

如表 6 所示，在氮源利用试验中，以酵母膏为氮源，菌落生长直径最大为 6.13 cm，菌丝重量最高。其次为蛋白胨、硝酸钠、牛肉膏菌落直径较高，菌丝重量较高。再次为硫酸铵、硝酸铵、磷酸氢二铵。

2.5.2 pH 对菌丝生长的影响 如表 7 所示，钩状木霉 T2 对酸碱度适应范围较广，pH 为 4~9 均可生长，其中当 pH=5 时菌落直径与菌丝重量最大，随着 pH 值的升高，菌落直径与菌丝重量逐渐降低，当 pH=10 时，T2 不再生长。

2.5.3 光照对菌丝生长的影响 如表 8 所示，钩状木霉 T2 在仅光照或黑暗条件下菌落直径以及菌丝重量较为相似，无明显的差异，在光暗交替处理下菌落直径和菌丝重量均有明显的增加。

表 6 不同氮源对菌株 T2 生长的影响

Table 6 Effect of different nitrogen sources on the growth of strain T2

氮源 Nitrogen source	菌落直径 Diameter of colony/cm	菌丝重量 Weight of mycelium/mg
磷酸氢二铵	3.70 ± 0.12e	98.77 ± 1.16d
牛肉膏	5.20 ± 0.10c	579.00 ± 32.05a
硝酸钠	5.65 ± 0.03b	132.00 ± 11.53c
蛋白胨	5.90 ± 0.27ab	626.67 ± 128.59a
硫酸铵	4.48 ± 0.20d	315.33 ± 34.44b
酵母膏	6.13 ± 0.02a	648.33 ± 33.47a
硝酸铵	4.34 ± 0.06d	312.00 ± 51.16b

表 7 不同 pH 对菌株 T2 生长的影响

Table 7 Effect of different pH on the growth of strain T2

pH	菌落直径 Diameter of colony/cm	菌丝重量 Weight of mycelium/mg
pH=4	3.86 ± 0.05d	221.67 ± 6.11e
pH=5	5.59 ± 0.13a	354.33 ± 11.50a
pH=6	5.22 ± 0.12b	299.00 ± 11.53b
pH=7	4.30 ± 0.27c	254.33 ± 10.02d
pH=8	4.99 ± 0.23b	213.00 ± 7.54c
pH=9	3.75 ± 0.08d	191.33 ± 4.93f
pH=10	0	0
pH=11	0	0

表 8 不同光照条件对菌株 T2 生长的影响

Table 8 Effects of different light conditions on the growth of strain T2

光照	菌落直径	菌丝重量
Light	Diameter of colony/cm	Weight of mycelium/mg
全光照	5.28 ± 0.06b	406.67 ± 12.22b
全黑暗	5.29 ± 0.02b	421.67 ± 16.23b
半光照	5.70 ± 0.07a	469.33 ± 15.97a

2.5.4 钩状木霉 T2 的致死温度 T2 菌株在 50~80 ℃ 处理 10 min 后均无法生长, 但是在 45~49 ℃ 处理 10 min 均可生长, 且随着温度升高菌落直径不断降低。如表 9 所示, 当处理温度为 50 ℃ 时, 菌丝无法生长, 表明该菌株的致死温度为 50 ℃。

表 9 菌株 T2 的致死温度

Table 9 Lethal temperature of strain T2

温度	菌落直径
Temperature/ ℃	Diameter of colony/cm
45	4.83 ± 0.29a
46	4.06 ± 0.04b
47	3.78 ± 0.10c
48	3.68 ± 0.05c
49	3.58 ± 0.04c
50	0

3 讨论

本研究从 103 株真菌中筛选得到 1 株对落叶松枯梢病原菌有显著拮抗作用的土壤真菌 T2, 结合形态学以及分子生物学鉴定为钩状木霉 (*Trichoderma hamatum*)。木霉属 (*Trichoderma*) 真菌是自然界普遍存在的微生物^[26]。木霉对多种病原菌有拮抗作用, 如对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、镰刀菌 (*Fusarium* spp.)、齐整小核菌 (*Sclerotium rolfii* Sacc.)、疫霉菌 (*Phytophthora* spp.)、腐霉菌 (*Pythium* spp.)、链格孢菌 (*Alternaria alternata*) 等引起的幼苗立枯病、枯萎病、猝倒病、疫霉病、白绢病等病害具有较好的防治效果^[27-30]。许多木霉菌株还可以诱导植物系统抗性, 促进植物生长发育^[31-33]。盖姆斯木霉 (*Trichoderma gamsii* Samuels & Druzhin.) 已被发现可以提高豆科植物的 P 吸收, 促进光合作用^[34]。董斯琳发现哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum* Rifai) 可以增强植株镉转运能力, 减轻

镉胁迫对植株的伤害, 增强植物的抗逆性^[35]。郝大志发现海藻渣与木霉和芽胞杆菌的复合制剂提高了黄瓜叶片及根部的水杨酸、茉莉酸积累, 诱导叶片 JA、SA、ET 途径基因高水平表达^[36], 木霉菌具有广阔的发展前景。因此, 开发新的生防木霉资源对于病害绿色防控具有重要意义。

生防菌有多种作用机制, 各种作用机制依次或协同发挥抑菌作用, 比如抢夺病原菌生存的空间和营养, 以及分泌抑菌物质等, 单一的平板对峙实验容易遗漏具有生防潜力的木霉菌。钩状木霉 T2 的平板对峙抑菌率达到 74.16%, 发酵液的抑菌率达到 91.29%, T2 发酵液对病原菌 (*Neofusicoccum laricinum*) 有着更强烈的抑制作用, 这可能是 T2 在液体培养的过程中产生了更多有抑菌效果的次生代谢物质。木霉分泌次生代谢物质是其作为生防菌重要的机制之一, 比如聚酮类 (polyketides)、氨基酸及其衍生物 (amino acid and derivatives)、萜烯类 (terpenes) 等, 可以分成两大类, 即低分子量、挥发性的物质和有活性的高分子量物质^[37-40]。程鹏采用硫酸铵沉淀法从钩状木霉 YYH13 发酵液中分离得到了具有抑菌活性的蛋白质组分^[41]。目前钩状木霉 T2 产生的抑菌代谢产物并不明确, 还需要进一步的鉴定。

实验发现钩状木霉 T2 的发酵滤液对多种植物病原真菌均具有较强的抑菌作用, 其中对立枯丝核菌、杨灰星叶点霉、松球壳孢菌、金黄壳囊孢菌表现出强抑制作用, 抑菌率均为 92.00%, 对拟松枝镰刀菌和杨生褐盘二孢菌的抑菌效果较好, 分别为 79.67% 和 62.67%, 这说明钩状木霉 T2 抑菌谱较广。钩状木霉对立枯丝核菌、拟松枝镰刀菌、腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani* (Mart.) Sacc.)^[41]、辣椒疫霉菌^[42] 等抑制作用强, 这可能是因为钩状木霉来自土壤, 对土传病害的防治效果突出。除此之外, 钩状木霉对杨灰星叶点霉、金黄壳囊孢菌、杨生褐盘二孢菌、灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea* Pers.)^[43] 的抑制效果好, 这说明其对于防治叶部病害也具有生防潜力。实验发现钩状木霉 T2 发酵液对胶孢炭疽菌的抑制率为 49.33%, 较钩状木霉 YB-4-15 菌株的抑菌率低^[44], 这可能是因为种间差异或发酵培养条件不同。钩状木霉已被报道可防治辣椒疫病^[42]、北细辛菌核病^[45] 等, 但防治落叶松枯梢病是首次发现。

木霉属真菌不同种的分化程度较高,其生物学特性也存在较大的种间差异^[46]。开展生物学特性研究可以更好的了解其最适生长条件,为下一步的应用提供基础。通过对钩状木霉 T2 的生物学特性研究发现:淀粉和蔗糖作为碳源或酵母膏、蛋白胨、牛肉膏作为氮源,可以促进其生长发育;T2 在 pH 为 4~9 时生长有一定的差异,生长最适 pH 值为 5,致死 pH 值为 10;T2 的致死温度为 50 ℃;在每 12 h 光暗交替条件下 T2 生长量最大。木霉菌拥有优异的产酶能力,T2 的最优碳源为淀粉,这可能是因为其分泌淀粉酶,故能利用淀粉作为碳源。T2 能利用多种碳氮源、有广泛的酸碱度适应能力及较高的致死温度等,这些生物学特性表明该菌株有较强的环境适应力,与胡娴^[41]的实验结果一致。

4 结 论

本研究通过对峙实验及发酵液复筛实验,筛选出一株对落叶松枯梢病菌 (*Neofusicoccum laricinum*) 抑制效果强的木霉菌 T2,经过形态学和分子生物学鉴定,明确该菌株为钩状木霉 (*Trichoderma hamatum*)。实验发现钩状木霉 T2 抑菌谱广,对多种植物病原菌有抑制作用;环境适应力强,能利用多种碳氮源,适应酸碱度广泛,致死温度较高。T2 的发现可以为落叶松枯梢病生物防治提供生防资源和理论依据,接下来还应探究其抑菌机制和田间防效,进行下一步的开发利用。

参考文献:

- [1] 赵经周,于文喜,王乃玉.落叶松枯梢病国内外研究的现状[J].林业科技,1995,20(5):23-25.
- [2] 吕全,张苏芳,林若竹,等.中国主要林业入侵生物的发生现状及其研究趋势[J].植物保护,2022,48(4):21-38.
- [3] 韩建勋,张国顺.华北落叶松枯梢病的发生规律与防治[J].中国林业,2011(4A):43.
- [4] 景耀,张永安.湿地松枯梢病的研究[J].林业科技通讯,1986(12):1-4.
- [5] 苏开君.松枯梢病的研究进展[J].林业科技通讯,1993(8):1-3.
- [6] 刘秀薇,刘雪峰,王鹏,等.利用三种梢栖真菌生物防治落叶松枯梢病的研究[J].林业科学研究,2012,25(6):685-690.
- [7] LECOMTE C, ALABOUVETTE C, EDEL-HERMANN V, et al. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review[J]. Biological Control, 2016, 101: 17-30.
- [8] 李可璇,王录红,李王胜,等.抗褐斑病甜菜种质资源和生防菌株的初步筛选[J].中国糖料,2023,45(2):68-74.
- [9] LAU E T, TANI A, KHEW C Y, et al. Plant growth-promoting bacteria as potential bio-inoculants and biocontrol agents to promote black pepper plant cultivation[J]. Microbiological Research, 2020, 240: 126549.
- [10] 杨忠岐,王小艺,张翌楠,等.以生物防治为主的综合控制我国重大林木病虫害研究进展[J].中国生物防治学报,2018,34(2):163-183.
- [11] 邵秋雨,董醇波,韩燕峰,等.植物根际微生物组的研究进展[J].植物营养与肥料学报,2021,27(1):144-152.
- [12] MENDES R, GARBEVA P, RAAIJMAKERS J M. The rhizosphere microbiome: Significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms[J]. Fems Microbiology Reviews, 2013, 37(5):634-663.
- [13] RYAN R P, GERMAINE K, FRANKS A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. Fems Microbiology Letters, 2008, 278(1):1-9.
- [14] 姚领爱,胡之璧,王莉莉,等.植物内生菌与宿主关系研究进展[J].生态环境学报,2010,19(7):1750-1754.
- [15] ZHAO H Z, ZHOU T, XIE J T, et al. Mycoparasitism illuminated by genome and transcriptome sequencing of *Coniothyrium minitans*, an important biocontrol fungus of the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Microbial genomics, 2020, 6(3):e000345.
- [16] 孟素玲,田彦梅,顾欣,等.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.
- [17] PANDEY A K, KUMAR A, SAMOTA M K, et al. *Trichoderma reesei* as an elicitor triggers defense responses in tea plant and delays gray blight symptoms[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2022, 188: 105279.
- [18] 蒋萍,叶建仁.松枯梢病拮抗细菌的分离和筛选[J].南京林业大学学报(自然科学版),2007,31(4):144-146.
- [19] 黄洁芳.新洋葱伯克霍尔德菌 NSM-05 对松枯梢病生防作用[D].南京:南京林业大学,2011.
- [20] DAI Y, WU X Q, WANG Y H, et al. Biocontrol potential of *Bacillus pumilus* HR10 against *Sphaeropsis* shoot blight disease of pine[J]. Biological Control, 2021, 152: 104458.
- [21] 张铭,谢宪,梁军,等.赤松枯梢病生防真菌 M75 的筛选和鉴定[J].东北林业大学学报,2022,50(4):78-82.
- [22] 殷辉,陈亚蕾,秦楠,等.藜麦灰霉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.
- [23] 陈志谊,王晓艳,罗楚平.空心莲子草病原真菌的分离筛选及其菌株 SF-193 种的鉴定[J].中国生物防治,2007(4):353-357.
- [24] 赫俊阳,宋小双,宋瑞清,等.樟子松根部深色有隔内生真菌的生防菌筛选[J].中南林业科技大学学报,2022,42(7):55-66.

- [25] 张广志, 杨合同, 文成敬. 木霉菌形态学分类检索与分子生物学鉴定[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2011, 42(2): 309-316.
- [26] SIRIKAMONSATHIEN T, KENJI M, DETHOUP T. Potential of endophytic *Trichoderma* in controlling Phytophthora leaf fall disease in rubber (*Hevea brasiliensis*)[J]. *Biological Control*, 2023, 179: 105175.
- [27] 韩长志. 植物病原拮抗菌木霉属真菌的研究进展[J]. *江苏农业学报*, 2016, 32(4): 946-952.
- [28] KARUPPIAH V, LU Z X, WANG X H, *et al.* *Trichoderma asperellum* GDFS1009 - mediated maize resistance against *Fusarium graminearum* stalk rot and mycotoxin degradation[J]. *Biological Control*, 2022, 174: 105026.
- [29] 张 量, 张敬泽. 渐绿木霉抑菌物质的分离纯化及其对植物病原菌的抑制作用[J]. *中国农业科学*, 2015, 48(5): 882-888.
- [30] 谭娇娇, 王喜刚, 郭成瑾, 等. 哈茨木霉 M-17 固体发酵及发酵产物浸提液对镰刀菌的抑制作用[J]. *西北农业学报*, 2021, 30(11): 1741-1747.
- [31] POVEDA J, EUGUI D. Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture[J]. *Biological Control*, 2022, 176: 105100.
- [32] 邹佳迅, 范晓旭, 宋福强. 木霉 (*Trichoderma* spp.) 对植物土传病害生防机制的研究进展[J]. *大豆科学*, 2017, 36(6): 970-977.
- [33] VELUSAMY P, IMMANUEL J E, GNANAMANICKAM S S. Rhizosphere bacteria for biocontrol of bacterial blight and growth promotion of rice[J]. *Rice Science*, 2013, 20(5): 356-362.
- [34] BEDINE M A B, IACOMI B, TCHAMENI S N, *et al.* Harnessing the phosphate-solubilizing ability of *Trichoderma* strains to improve plant growth, phosphorus uptake and photosynthetic pigment contents in common bean (*Phaseolus vulgaris*)[J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2022, 45: 102510.
- [35] 董斯琳, 姚桐桐, 谢琳森, 等. 哈茨木霉对镉胁迫下草地早熟禾的促生和增抗效应及其生理机制[J]. *浙江农业科学*, 2022, 63(9): 2046-2053.
- [36] 郝大志, 王咏坤, 陈 捷, 等. 海藻渣复配微生物菌剂防治黄瓜苗期枯萎病的协同增效作用[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(1): 97-107.
- [37] 李纪顺, 陈 凯, 杨合同. 木霉抗生性代谢产物研究进展[J]. *农药*, 2010, 49(10): 713-716 + 719.
- [38] ASAD S A. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review[J]. *Ecological Complexity*, 2022, 49: 100978.
- [39] REINO J L, GUERRERO R F, HERNÁNDEZ-GALÁN R, *et al.* Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2008(7): 89-123.
- [40] 程 鹏. 钩状木霉抑菌作用的比较基因组学和蛋白质组学研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2015.
- [41] 胡 娴, 陈宸彤, 谢杨璠, 等. 钩状木霉菌的生物学特性及对腐皮镰刀菌的抑菌机理研究[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(1): 81-87.
- [42] 赵兴丽, 陶 刚, 娄 璇, 等. 钩状木霉在辣椒根际定殖动态及其对辣椒疫病的生物防治[J]. *中国农业科技导报*, 2020, 22(5): 106-114.
- [43] 康萍芝, 张丽荣, 沈瑞清. 木霉菌对灰葡萄孢菌的拮抗作用[J]. *内蒙古农业科技*, 2008, 6: 49-51.
- [44] 韩长志, 霍 超. 核桃炭疽病生物防治菌株 YB-4-15 的筛选和鉴定[J]. *经济林研究*, 2016, 34(1): 83-89.
- [45] 王子晴, 卢宝慧, 田义新, 等. 拮抗北细辛菌核病木霉菌的分离、鉴定及生防效果[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(12): 4624-4635.
- [46] HARMA G E, HOWELL C R, VITERBO A, *et al.* *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. *Nature Reviews Microbiol*, 2004, 2(1): 43-56.

Screening, Identification and Biological Characteristics of Biocontrol Fungi against Larch Shoot Blight

QIAN Ying-ying^{1,2,3}, DENG Xun^{3,4}, WANG Zheng¹, SONG Xiao-shuang^{3,4}, LIANG Jun¹

(1. Ecology and Nature Conservation Institute, Chinese Academy of Forestry, Beijing 10091, China; 2. Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China; 3. Heilongjiang Forest Protection Research Institute, Harbin 150081, Heilongjiang, China; 4. Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Forest and Grassland Fire and Pest Control, Harbin 150081, Heilongjiang, China)

Abstract: [Objective] The aim of the experiment is to obtain the biological control strain of larch shoot blight. [Method] Strains with strong inhibitory effect on *Neofusicoccum laricinum* was screened through plate antagonism screening experiments and re-screening with fermentation broth. The screened strains were identified and their biological characteristics were studied. [Result] A soil fungi T2 was screened that had a significant antagonistic effect on *Neofusicoccum laricinum*, which was identified as *Trichoderma hamatum* by morphology and molecular biology. Its Inhibition rate of plate experiments reached 74.16%, and fermentation broth experiments reached 91.29%. The fermentation broth had strong inhibition effect on a variety of plant pathogenic fungi, and showed strong inhibition effect on *Sphaeropsis sapinea*, *Cytospora chrysosperma*, *Phyllosticta populea* and *Rhizoctonia solani* with 92.00% inhibition rate and had better inhibition effect on *Fusarium sporotrichioides* and *Marssonina brunnea* with 79.67% and 62.67% inhibition rate, too. T2 can utilize a variety of carbon and nitrogen sources, has a wide adaptability to PH and a high lethal temperature. [Conclusion] The antagonistic effect of T2 (*Trichoderma hamatum*) on *Neofusicoccum laricinum* is significant, with a wide spectrum of pathogenic inhibition and strong environmental adaptability. This study can provide theoretical research and foundation for the control of larch shoot blight.

Keywords: larch *Larix gmelinii*; *Neofusicoccum laricinum*; biological control; *Trichoderma hamatum*

(责任编辑：崔 贝)