

# 沈阳地区土壤木霉菌分类鉴定

肖淑芹, 白戈, 姜晓颖, 薛春生

(沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘要:**利用土壤稀释分离法,采用孟加拉红培养基,对沈阳地区土壤分离得到的木霉菌进行了分类鉴定。结果表明:从沈阳的长白岛、新城子、棋盘山和苏家屯等地区 105 份不同植物根际土壤样品中共分离出木霉菌 41 株,分属 6 种,包括哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)18 株,绿色木霉(*T. viride*)13 株,长枝木霉(*T. longibrachiatum*)3 株,康宁木霉(*T. koningii*)3 株,深绿木霉(*T. atroviride*)3 株,侧沟木霉(*T. parceramosum*)1 株。

**关键词:**沈阳地区;木霉菌;鉴定

**中图分类号:**S 154.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)23-0129-04

木霉菌(*Trichoderma* spp.)是一类普遍存在于土壤中的重要微生物种群,该种群不仅在土壤中具有较强的生命力,而且对病原物具有竞争、重寄生和产生抑菌素等生防作用机制,因而备受关注<sup>[1]</sup>。目前,木霉菌已被用于防治多种作物的土传病害和叶部病害,取得了显著防效<sup>[2]</sup>。由于木霉菌株的形态特征复杂,又缺乏稳定性,

木霉菌的种类鉴定长期处于混乱状态<sup>[3]</sup>,自 1991 年 Bissett 建立了将木霉菌归为 5 组的分类体系后,木霉菌的分类体系才逐步系统化和稳定化<sup>[4-6]</sup>,2002 年 Kullnig 等<sup>[7]</sup>根据木霉菌核酸序列的分子数据进行了改进,但是形态学鉴定仍然是木霉菌分类最为方便、最为常用的方法。因此,现利用土壤稀释分离法对沈阳地区土壤分离到的木霉菌进行了分类鉴定,以期利用木霉菌防治植物病害奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 采集地点及取样方法

从辽宁省沈阳市长白岛、苏家屯区、于洪区、棋盘山和新城区等地取不同植物根际土壤样品。植物种类包括油菜、小白菜、莴苣、芸豆、黄瓜、辣椒、茄子、番茄、白

**第一作者简介:**肖淑芹(1971-),女,博士,助理研究员,现主要从事设施农业病害生物防治研究工作。E-mail: syxiaoshuqin@163.com.

**责任作者:**薛春生(1970-),男,博士,教授,现主要从事植物病理学研究工作。E-mail: cshxue@sina.com.

**基金项目:**辽宁省教育厅科学研究资助项目(20060781)。

**收稿日期:**2013-07-24

## Research on Water Suspension of 10% Fluorinated Anthranilamide and Avermectin

CHEN Wei-yan<sup>1,2</sup>, LIU Chun-feng<sup>1</sup>, XU Liang-zhong<sup>1</sup>

(1. Agrochemical Graduate School, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao, Shandong 266042; 2. College of Chemistry and Pharmacy, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract:** Wet grinding technology was used and the optimum formulation of 10% fluorinated anthranilamide and avermectin water suspension was determined by the selection of dispersion mediums, emulsifiers and thickeners, and the particle size, suspension rate, dispersion of the suspension were tested. The results showed that the optimum formulation of water suspension of 10% fluorine anthranilamide avermectin was fluorinated anthranilamide 8 g, avermectin 2 g, magnesium aluminumsilicate 2 g, ethylene glycol (antifreeze) 4 g, defoamers 1 g, phenol ether phosphate salts TXPK 4 g, agricultural emulsifier 500 # 2 g, pesticide emulsifier 1601 # 2 g, water 75 g. The formulation was not layered obviously with a white or milky appearance; it had a good dispersion property in water, and all indexes were in line with the criterion of suspension after the formulation was stored under cold ( $0 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$  and heating ( $54 \pm 2$ ) $^{\circ}\text{C}$  conditions respectively.

**Key words:** fluorine anthranilamide; avermectin; aqueous suspensions; formulation

菜、红薯、草莓、杨树、水杉、南果梨树、梨树、李子树、苹果树、榔榆、柳树、杏树、桃树、葡萄、合欢、玉米、大豆、草坪、非洲菊和禾本科杂草等 29 种。参见肖性龙等<sup>[8]</sup>取样方法,略有改动。

## 1.2 试验方法

1.2.1 土壤中木霉菌的分离 分离土壤中木霉菌所用的培养基为孟加拉红培养基( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g; 葡萄糖 10 g; 琼脂 18~20 g; 蛋白胨 5 g; 蒸馏水 1 000 mL; 孟加拉红 0.033 g)。将土样配制成  $1 \times 10^3$  mL 悬浮液,采用平板稀释法进行木霉菌的分离。

1.2.2 木霉菌的形态观察及鉴定 将纯化木霉菌株转移至 PDA 平板培养基,观察菌丝层厚薄,疏密,颜色变化并计算菌丝生长速度。于超净工作台上挑取在 PDA 上培养了 4 d 的木霉菌菌丝,在灭菌的载玻片均匀的加

1 薄层 PDA 培养基,转菌,置于培养皿中保湿。28℃ 培养 2 d 后,在  $10 \times 40$  倍显微镜下观察分生孢子梗分枝、瓶梗形态特征以及分生孢子形态并测量孢子大小,利用 Moticam 3000 显微成像系统拍照。按 Bissett<sup>[4-6]</sup> 方法进行鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 木霉菌分离与鉴定结果

通过对从辽宁省沈阳市及其周边采集的 105 份土壤样品进行分离和培养,由表 1 可知,共获得木霉菌属真菌 41 株,根据形态学特征鉴定出 6 个种。哈茨木霉和绿色木霉出现频率最高,分别占测定菌株的 43.9% 和 31.7%,长枝木霉、深绿木霉、康宁木霉和侧沟木霉分离得很少,分别获得 3、3、3、1 个菌株。

表 1

41 株木霉菌的鉴定

Table 1

Identification of *Trichoderma* species of 41 isolates

木霉菌 <i>Trichoderma</i>	菌株数 No. of isolates/个	分离频率 Isolation frequency/%	分布地点 Distribution	地上植物或真菌 Plants or fungi
哈茨木霉 <i>T. harzianum</i>	18	43.9	长白岛、于洪区、棋盘山、新城子区	小白菜、芸豆、黄瓜、玉米、柳树、草坪、非洲菊、草莓、苹果树、菠菜
绿色木霉 <i>T. viride</i>	13	31.7	长白岛、于洪区、苏家屯区、棋盘山	油菜、莴苣、辣椒、玉米、草坪、蘑菇、苹果树、黄瓜
长枝木霉 <i>T. longibrachiatum</i>	3	7.3	于洪区	葡萄、玉米
康宁木霉 <i>T. koningii</i>	3	7.3	于洪区、新城子区	茄子、番茄
深绿木霉 <i>T. atroviride</i>	3	7.3	长白岛、于洪区、新城子区	玉米、黄瓜
侧沟木霉 <i>T. parceramosum</i>	1	2.4	于洪区	番茄

### 2.2 木霉菌形态学鉴定

2.2.1 哈茨木霉 菌落在 PDA 平板上初期为白色,2~3 d 产孢后呈绿色,菌落老熟时暗绿色,反面同色(图 1A)。孢子梗丛束疏松,环状排列。主分枝呈树状,其上很多次级分枝,常常 2~3 个 1 组,直角伸出(图 1B)。整个分枝系统呈金字塔状,瓶梗短,基部变细,中间膨大,

大角度伸出(图 1C),终极瓶梗长而细,5 个以内的瓶梗近似轮状排列。分生孢子球形,短的倒卵形,基部平截,孢子小。Th-1、Th-2、Th-3、Th-4、Th-5、Th-6、Th-7、Th-8、Th-9、Th-10、Th-11、Th-12、Th-13、Th-14、Th-15、Th-16、Th-17 和 Th-18 为哈茨木霉。

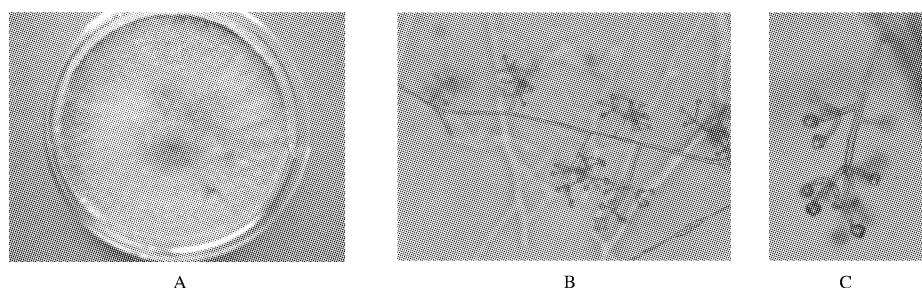


图 1 哈茨木霉 *T. harzianum* 的菌落形态、分生孢子梗及分生孢子

注: A: 菌落形态; B: 分生孢子梗; C: 分生孢子。

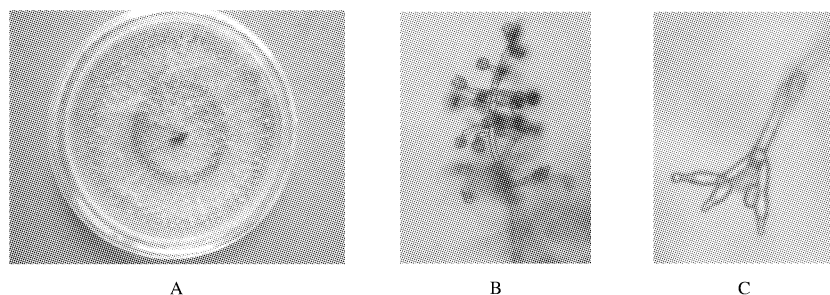
Fig. 1 Colony, conidiophores and conidia of *T. harzianum*

Note: A: Colony; B: Conidiophores; C: Conidia.

2.2.2 绿色木霉 菌落在 PDA 平板上生长快,菌丝层较厚,致密丛束状,初期为白色,平坦,后期因产生分生孢子而呈深绿色,产孢区常排列成同心轮纹状。菌落背面无色,有时呈浅黄色,菌丝透明,有隔,细胞壁光滑(图 2A)。分生孢子梗由菌丝直立生出,无色,分枝多,对

生或互生 2~3 级分枝,整体像树枝(图 2B);分枝与分生孢子梗近似直角,末端为小梗。小梗瓶形,分生孢子球形或长椭圆形,表面粗糙,布满小刺(图 2C)。Tv-1、Tv-2、Tv-3、Tv-4、Tv-5、Tv-6、Tv-6、Tv-8、Tv-9、Tv-10、Tv-11、Tv-12 和 Tv-13 为绿色木霉。



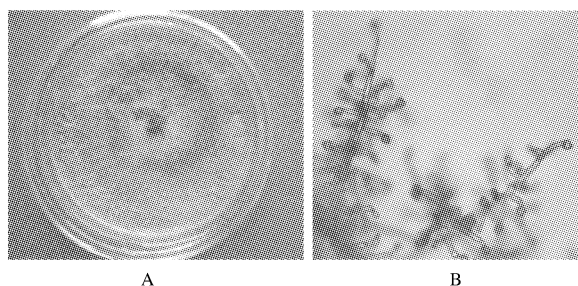
图2 绿色木霉 *T. viride* 的菌落形态、分生孢子梗及分生孢子

注: A: 菌落形态; B: 分生孢子梗; C: 分生孢子。

Fig. 2 Colony, conidiophores and conidia of *T. viride*

Note: A: Colony; B: Conidiophores; C: Conidia.

2.2.3 长枝木霉 菌落生长迅速。产孢区域初期缩聚在一起,后期合并形成硬壳。深绿色反面通常浅黄绿色(图3A),分生孢子梗典型特征为瓶梗葫芦形,单生,对生或3个轮状分枝,(5.3~11.6) $\mu\text{m}$ ×(2.0~3.2) $\mu\text{m}$ ,或瓶梗末端劈锥曲面形,并且长至14 $\mu\text{m}$ ,中游的瓶梗经常比末端的短(图3B)。孢子浅绿或中绿色,倒卵球形至椭圆形,(3.4~6.6) $\mu\text{m}$ ×(2.3~3.5) $\mu\text{m}$ 。Tl-1、Tl-2和Tl-3为长枝木霉。

图3 长枝木霉 *T. longibrachiatum* 的菌落形态、分生孢子梗及分生孢子

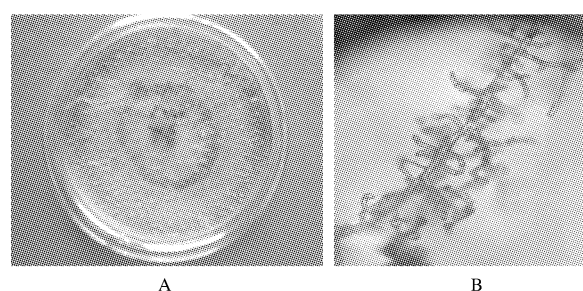
注: A: 菌落形态; B: 分生孢子梗、分生孢子。

Fig. 3 Colony, conidiophores and conidia of *T. longibrachiatum*

Note: A: Colony; B: Conidiophores and conidia.

2.2.4 侧沟木霉 菌落生长迅速。产孢区域多数平整的散布,密集表面有疣泡直径达2 mm。后期经常聚集在一起,迅速的转为暗绿色,培养皿反面通常是浅黄绿色(图4A)。气味不清楚。瓶梗大多单生,(5.2~10.0) $\mu\text{m}$ ×(2.1~3.3) $\mu\text{m}$ ,基部有些小或收缩,后期瓶梗大多变长,能长至14 $\mu\text{m}$ (图4B)。分生孢子大多暗绿色,或多或少呈椭圆形,大多(4.3~6.0) $\mu\text{m}$ ×(2.0~2.7~3.7) $\mu\text{m}$ ,但是经常和窄的、浅色的孢子混合在一起,(5.0~6.0) $\mu\text{m}$ ×(2.0~2.5) $\mu\text{m}$ 。Tp-1为侧沟木霉。

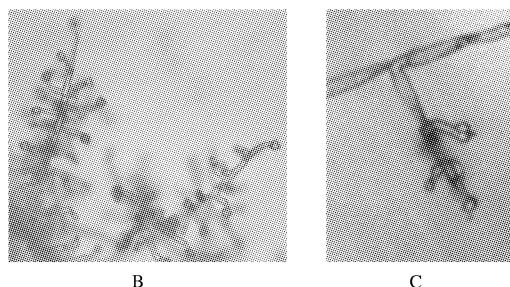
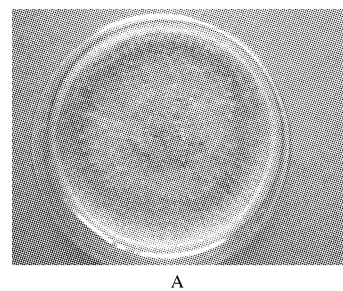
2.2.5 康宁木霉 菌落生长的快(7~9 cm),产孢区域经常是紧密的簇状或甚至愈合在一起,形成硬壳,暗绿色至蓝绿色(图5A),反面通常无色,少数是淡黄色。分生孢子梗多样,在有的系群里窄并且弯曲成对出现,或

图4 侧沟木霉 *T. parceramosum* 的菌落形态、分生孢子梗及分生孢子

注: A: 菌落形态; B: 分生孢子梗、分生孢子。

Fig. 4 Colony, conidiophores and conidia of *T. parceramosum*

Note: A: Colony; B: Conidiophores and conidia.

图5 康宁木霉 *T. koningii* 的菌落形态、分生孢子梗及分生孢子

注: A: 菌落形态; B: 分生孢子梗; C: 分生孢子。

Fig. 5 Colony conidiophores and conidia of *T. koningii*

Note: A: Colony; B: Conidiophores; C: Conidia.

在另一些系群里宽呈轮状分支。瓶梗坛型或葫芦型通常成对或不规则出现,或3~5轮生(图5B),一些系群中有相对宽的分生孢子梗,大约 $(7.5\sim 12)\mu\text{m}\times(2.5\sim 3.5)\mu\text{m}$ ,或者后期瓶梗长成长型。分生孢子近圆柱型或窄椭圆型,绿色, $(3.0\sim 5.5)\mu\text{m}\times(1.9\sim 3.2)\mu\text{m}$ (图5C)。Tk-1、Tk-2和Tk-3为康宁木霉。

2.2.6 深绿木霉 该菌落生长迅速,后期呈颗粒状并有硬壳,在初期为灰绿色,迅速转变为黑绿色。背面通常无色或在后期呈深黄色或土黄色。通常具有椰子的芳香味。分生孢子梗瓶梗单生或2~4轮生,弯曲呈葫芦状, $(6\sim 12)\mu\text{m}\times(2.4\sim 3.0)\mu\text{m}$ 。分生孢子深绿色,光滑,成熟时呈球形, $2.6\sim 3.8(4.2)\mu\text{m}\times 2.2\sim 3.4(3.8)\mu\text{m}$ 。Ta-1为深绿木霉。

### 3 结论与讨论

该试验从辽宁省沈阳市周边地区共分离出木霉菌41株,包括哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)18株,绿色木霉(*T. viride*)13株,长枝木霉(*T. longibrachiatum*)3株,康宁木霉(*T. koningii*)3株,深绿木霉(*T. atroviride*)3株和侧沟木霉(*T. parceramosum*)1株,其中分离到的木霉菌大多数为常见种哈茨木霉和绿色木霉,占分离总数的75.6%,这与肖性龙等<sup>[8]</sup>和孙军等<sup>[9]</sup>研究结果相同。另外还分离到3株长枝木霉,所占的比例也较高。地上植物源分析结果表明,玉米、黄瓜和蘑菇等植物源根际土壤分离到的木霉菌数量较多,而哈茨木霉在蔬菜和玉米根际土壤中分布较多,占分离到哈茨木霉的61%。采集地点分析表明,沈阳的长白岛和于洪地区木霉菌的分布广泛,但种类主要是哈茨木霉和绿色木霉等常见种。

该试验根据GenBank数据库木霉菌的ITS序列设计引物,利用尿素提取法提取经形态学鉴定的哈茨木

霉、绿色木霉、康宁木霉及长枝木霉菌的总DNA,PCR扩增分别获得了160、250、400 bp和500 bp左右的目的片段,验证了形态学鉴定的结果,为木霉菌的分子鉴定奠定了基础。

试验鉴定出的木霉菌,分别与辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)、茄子黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、大豆根腐病菌(*Fusarium oxysporum*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、大豆菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)进行对峙培养,发现木霉菌对上述病原菌均有抑制作用,主要表现为重寄生和竞争作用,有生防作用的木霉菌主要为哈茨木霉和绿色木霉。

### 参考文献

- [1] Benítez T, Ana M R, Limón M C, et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains[J]. International Microbiology, 2004(7): 249-260.
- [2] 郭润芳,史宝胜,高宝嘉,等. 木霉菌在植病生物防治中的应用[J]. 河北林果研究, 2001, 16(3): 294-298.
- [3] 文成敬,陶家凤,文瑞. 中国西南地区木霉属分类研究[J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 118-130.
- [4] Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification[J]. Can J Bot, 1991a, 69: 2357-2372.
- [5] Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium* [J]. Can J Bot, 1991b, 69: 2373-2417.
- [6] Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum* [J]. Can J Bot, 1991c, 69: 2418-2420.
- [7] Kullnig-Gmdinger C M, Szakacs G, Kubicek C P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach[J]. Mycol Res, 2002, 106: 757-767.
- [8] 肖性龙,杨合同,夏贤志,等. 木霉菌的形态学和可溶性蛋白质电泳鉴定与分类[J]. 山东科学, 2002, 15(1): 5-12.
- [9] 孙军,段玉玺,吕国忠. 辽宁木霉属(*Trichoderma*)真菌的形态分类研究[J]. 菌物研究, 2006, 4(2): 38-44.

## Identification and Classification of *Trichoderma* spp. in Shenyang Area

XIAO Shu-qin, BAI Ge, JIANG Xiao-ying, XUE Chun-sheng

(Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110866)

**Abstract:** *Trichoderma* spp. separated from soil samples collected from Shenyang area were identified and classified by soil dilution method using rose bengal medium. The results showed that 41 *Trichoderma* spp. strains were separated from 105 different plant rhizosphere of Shenyang. They belonged to six species, including *Trichoderma harzianum* 18, *T. viride* 13, *T. longibrachiatum* 3, *T. koningii* 3, *T. atroviride* 3 and *T. parceramosum* 1 respectively.

**Key words:** Shenyang area; *Trichoderma* spp.; identification