

源自3种茄科蔬菜土壤木霉菌的分离与鉴定

唐琳¹, 张焕丽²

(1. 洛阳师范学院, 河南 洛阳 471934; 2. 洛阳农林科学院, 河南 洛阳 471000)

摘要:为了明确不同茄科蔬菜土壤中木霉菌的种类,本研究从源自辣椒、茄子和番茄栽培土壤中,共分离出木霉菌97株,采用形态学和分子生物学鉴定方法对菌株进行鉴定。共鉴定出4种木霉,分别是哈茨木霉、绿色木霉、拟康宁木霉和黄绿木霉。4种木霉在3种蔬菜土壤中的分布存在差异。哈茨木霉和绿色木霉在3种蔬菜土壤中均有分布,哈茨木霉菌株的数量最多,其分离频率为46.39%。本研究结果为探明特定蔬菜土壤木霉菌的分布和生防木霉的开发提供理论依据。

关键词:茄科蔬菜土壤;木霉菌;分离;鉴定

中图分类号:S476;Q93

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2020)05-0052-05

Isolation and Identification of *Trichoderma* spp. from Three *Solanaceae* Vegetables Soils

TANG Lin¹, ZHANG Huanli²

(1. Luoyang Normal University, Luoyang 471934; 2. Luoyang Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Luoyang 471000, China)

Abstract: In order to identify the species of *Trichoderma* spp. in different *Solanaceae* vegetables soils, 97 strains of *Trichoderma* spp. were isolated from the soil of pepper, eggplant and tomato. Morphological and molecular identification methods were used to identify the strains. The results showed that four *Trichoderma* spp. species were identified, including *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningiopsis* and *Trichoderma aureoviride*. The distribution of strains in the three soils was different. *T. harzianum* and *T. viride* were distributed in the three vegetable soils. The number of *T. harzianum* strains was the most, with 46.39% of separation frequency. The results of this study provide a theoretical basis for the identification of the distribution of *Trichoderma* spp. in specific vegetables soils and the exploitation of biocontrol agent.

Key words: *Solanaceae* vegetables soil; *Trichoderma* spp.; Isolation; Identification

茄科蔬菜可在全球广泛种植,深受人们喜爱。随着栽培条件、品种抗性和气象因素的变化,茄科蔬菜罹患枯萎病等各类土传病害的情况频发,特别是辣椒、茄子、番茄的发病严重,严重影响了茄科蔬菜的品质和产量。目前,对茄科蔬菜土传病害的防治仍是以化学防治为主,然而,长期使用化学药剂,会导致人类健康受到威胁、土壤环境污染加剧,土壤有益微生物和根系微生态系统紊乱等问题^[1-2]。生物制剂(BCAs)已经被用作一种环保的替代方法替代杀菌剂进行防治^[3]。木霉(*Trichoderma* spp.)广泛存在于土壤、植物根

际、种子表面等生态环境中,是一类具有重要生防价值的真菌,其生防价值已经得到证实^[4-7]。并且在蔬菜生产上广泛应用,如拟康宁木霉对番茄灰叶斑病和番茄灰霉病具有较好的防效^[8-9],哈茨木霉可有效提高茄子幼苗根系的寄主防御酶活性^[10]。因此,以不同蔬菜种植土壤为试材,分离获得不同生防微生物,丰富生防微生物资源,既响应了国家号召的“两减一增”政策,也为生防微生物资源的探明和生物农药的开发奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集及保存

2018年7月,采集自洛阳市区及县区等11个茄科蔬菜种植区域的土壤,共计95份土壤样品,于4℃保存,具体信息见表1。

收稿日期:2019-04-27

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(17A210025);洛阳师范学院应用科学与技术研究基金(180131213033)

作者简介:唐琳(1981-),女,讲师,博士,从事植物病害生物防治研究工作。

表1 土样信息

植物	土样编号	采集地	植物	土样编号	采集地
辣椒	1-8	洛阳农林科学院试验地(NK)	茄子	14-15	涧西东马沟(DMG)
	9-11	洛龙安乐(AL)		16-17	孟津会盟(HM)
	12-14	洛龙佃庄(DZ)		18-20	嵩县库区(KQ)
	15-17	洛龙白马寺(BMS)		21-22	伊川城关(YC)
	18-20	伊滨李楼(LL)		23-24	偃师城关(YS)
	21-22	老城邙山(MS)	番茄	1-4	洛阳农林科学院试验地(NK)
	23-24	涧西东马沟(DMG)		5-6	洛龙安乐(AL)
	25-29	孟津会盟(HM)		7-10	洛龙佃庄(DZ)
	30-33	偃师城关(YS)		11-13	洛龙白马寺(BMS)
	34-36	嵩县库区(KQ)		14-17	伊滨李楼(LL)
	37-38	伊川城关(YC)		18-22	涧西东马沟(DMG)
茄子	1-4	洛阳农林科学院试验地(NK)		23-26	孟津会盟(HM)
	5-7	洛龙安乐(AL)		27-29	嵩县库区(KQ)
	8-9	洛龙佃庄(DZ)		30-31	伊川城关(YC)
	10-11	洛龙白马寺(BMS)		32-33	偃师城关(YS)
	12-13	伊滨李楼(LL)			

1.2 木霉菌株的分离纯化

采用土壤稀释分离法^[11],将10⁻²、10⁻³浓度的稀释液1 mL与PDA培养基混匀,于26℃培养3~5 d,然后挑取单菌落,26℃培养7 d,观察菌落特征,初步筛选木霉菌株。采用梯度稀释单孢纯化法^[8],用无菌水冲洗PDA上的孢子,依次制备成10倍梯度稀释液,分别与PDA培养基混匀,直至出现单菌落,则视为菌株已纯化。

1.3 形态学鉴定

参考魏景超^[12],杨合同^[13]和张广志等^[14]的分类方法,对PDA平皿上的菌落形态和木霉菌株的微观形态进行拍照、比对和鉴定。

1.4 分子生物学鉴定

1.4.1 菌株DNA提取

采用CTAB法^[12]。

1.4.2 PCR扩增

采用ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')真菌通用引物进行鉴定^[15]。

反应体系(50μL)为:DNA模板(100μmolL)

1μL; ITS1 1μL; ITS4 1μL; 2×Taq Mix 25μL; ddH₂O 22μL。

PCR反应程序^[16]:首先94℃预变性3 min;然后30个循环94℃变性30 s;58℃退火30 s,72℃延伸40 s;再次72℃终延伸7 min;最后4℃保存。

1.4.3 PCR产物检测及系统发育树建立

使用1.5%琼脂糖凝胶电泳,将合格的PCR产物送至北京中科西林生物科技有限公司测序,得到PCR产物序列。与NCBI数据库比对,利用MEGA 7.0软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌株分离鉴定结果

分离获得的木霉经鉴定为4个种,它们分别是哈茨木霉、拟康宁木霉、绿色木霉及黄绿木霉。其中哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)45株,绿色木霉(*Trichoderma viride*)32株,拟康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*)13株,黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride*)7株,共计97株(表2)。

表2 菌株分离鉴定情况

菌株	编号	数量	植物	菌株	编号	数量	植物
哈茨木霉	Th-NK001~004、007、009	6	辣椒	绿色木霉	Tv-NK001~003、006、007、009	6	辣椒
	Th-NK005、008、011	3	茄子		Tv-DZ011、014、016	3	茄子

续表 2

菌株	编号	数量	植物	菌株	编号	数量	植物	
哈茨木霉	Th-NK006、010、012、013	4	番茄	绿色木霉	Tv-DZ012、013、015	3	辣椒	
	Th-AL014、006	2	番茄		Tv-BMS017、022	2	辣椒	
	Th-AL015	1	辣椒		Tv-BMS018、020、021	3	番茄	
	Th-AL017	1	茄子		Tv-BMS019	1	辣椒	
	Th-DZ018、022	2	茄子		Tv-LL025、026	2	茄子	
	Th-DZ019	1	辣椒		Tv-LL024	1	番茄	
	Th-DZ020、021	2	番茄		Tv-MS027、028	2	辣椒	
	Th-BMS023、024	2	番茄		Tv-HM029	1	辣椒	
	Th-BMS025	1	茄子		Tv-YS030、031	2	辣椒	
	Th-LL026、029	2	辣椒		Tv-YS032	1	辣椒	
	Th-LL027、028	2	茄子	拟康宁木霉	Tk-DZ001、003	2	番茄	
	Th-MS030	1	番茄		Tk-DZ002、004	2	辣椒	
	Th-MS031	1	茄子		Tk-LL005、006	2	番茄	
	Th-DMG032、033	2	茄子		Tk-BMS007、008	2	辣椒	
	Th-HM034	1	辣椒		Tk-YC009、010	2	番茄	
	Th-HM035	1	番茄		Tk-YS011	1	番茄	
	Th-YS036、037	2	辣椒		Tk-YS012	1	辣椒	
	Th-KQ038、041	2	番茄		Tk-KQ013	1	番茄	
	Th-KQ039	1	番茄		黄绿木霉	Ta-DZ001、003	2	番茄
	Th-KQ040、042	2	辣椒			Ta-DZ002	1	茄子
	Th-YC043~045	3	番茄	Ta-LL004、005		2	番茄	
绿色木霉	Tv-NK004、007、010	3	茄子	Ta-MS006		1	茄子	
	Tv-NK005、008	2	辣椒	Ta-KQ007		1	茄子	
合计						97		

2.1.1 哈茨木霉

如图 1 的 A 和 B 所示,哈茨木霉的菌落生长迅速,气生菌丝呈卷毛状,白色至灰白色。产孢区平展疏松,呈放射同心轮纹状。分生孢子近球形到短椭圆形,成熟的分生孢子为浅绿色,后期颜色变深,2.4~3.6×2.0~3.1 μm ,菌丝有隔,透明,直径约为 2.1~7.1 μm 。分生孢子梗透明,竖直或者弯曲,分枝几乎呈直角,有的稍微向顶方向弯曲,瓶梗呈烧瓶状,5.3~9 μm ,3~7 个分枝为一簇。

2.1.2 绿色木霉

如图 1 的 C 和 D 所示,绿色木霉的菌落生长较快,产孢区舒展均一,前期大多呈绿色,后期熟透变为深绿色,菌落表面有些粗糙,呈羊毛毡状。成熟的分生孢子绿色,卵圆形,簇生,3.5~4.2×4.0~4.7 μm 。菌丝有隔,直径约为 2.8~6.8 μm 。分生孢子梗是菌丝的短侧枝,侧枝上对生分枝,分枝角度为锐角或近于直角,在分枝末端形成毛笔状瓶

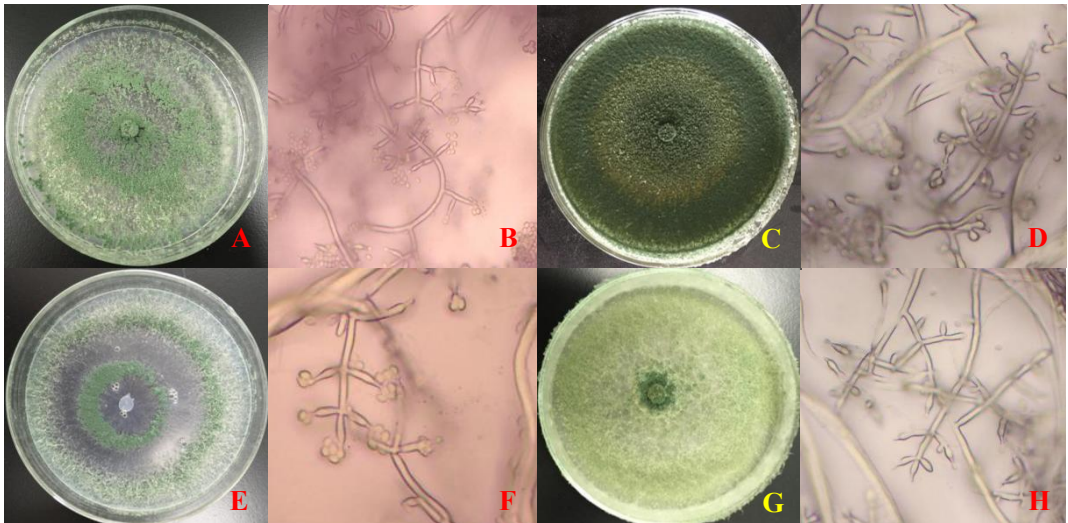
梗,5.1~8.1 μm ,3~5 个分枝为一簇。

2.1.3 拟康宁木霉

如图 1 的 E 和 F 所示,拟康宁木霉的菌落生长较快,气生菌丝排列紧密,边缘有白色孢子簇,呈放射同心轮纹状。分生孢子椭圆形,成熟的分生孢子为深绿色,2.2~3.3×2.1~3.3 μm 。菌丝有隔,透明,直径约为 2.3~6.9 μm 。分生孢子梗透明,直接产生锐角对生分枝,瓶梗呈烧瓶状,5.0~9.0 μm ,2~5 个分枝为一簇。

2.1.4 黄绿木霉

如图 1 的 G 和 H 所示,黄绿木霉的菌落产孢区疏松,前期大多呈浅绿色,后期熟透变为黄绿色,菌丝呈不定型棉絮状。成熟的分生孢子黄绿色,倒卵形,基部平截,3.1~4.9×2.3~3.7 μm 。菌丝有隔,直径约 3.0~6.8 μm 。分生孢子梗是对生分枝,分枝角度为锐角或近于直角,在分枝末端形成细长烧瓶状瓶梗,5.5~8.3 μm ,3~7 个分枝为一簇。



(A和B:哈茨木霉;C和D:绿色木霉;E和F:拟康宁木霉;G和H:黄绿木霉)

图1 四种木霉的菌落形态和微观形态

2.2 分子生物学鉴定

从与NCBI数据库比对过的菌株序列中,分别选取每种木霉的2个代表性菌株序列,与供试菌株序列进行系统发育进化树的构建。如图2所示,进化树将供试菌株分成了4个进化树,分别是

黄绿木霉、哈茨木霉、绿色木霉和拟康宁木霉。分子鉴定的菌株种类和形态学鉴定的菌株完全一致。此外,供试菌株分别分离自不同的蔬菜土壤,证明菌株的种类与土壤来源和植物种类没有相关性。

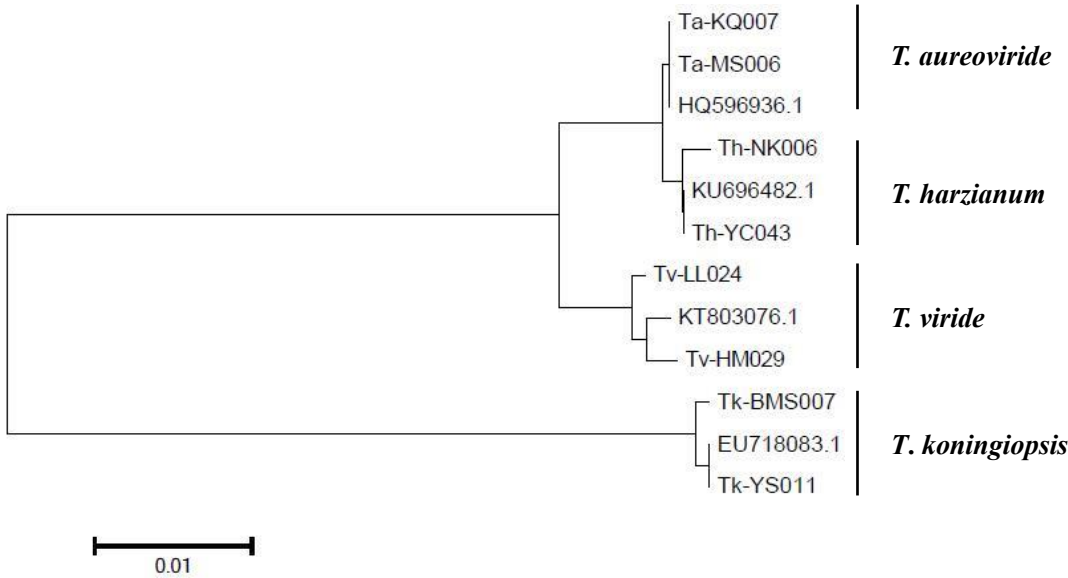


图2 代表性菌株的系统发育进化树

2.3 分离频率

如表3所示,哈茨木霉和绿色木霉在三种蔬

菜土壤中均被分离出,拟康宁木霉在辣椒和番茄土壤中被分离出,黄绿木霉在茄子和番茄土壤中

表3 3种蔬菜土壤中木霉菌的分离频率

植物	哈茨木霉		绿色木霉		拟康宁木霉		黄绿木霉	
	数量	分离频率(%)	数量	分离频率(%)	数量	分离频率(%)	数量	分离频率(%)
辣椒	15	15.46	20	20.62	5	5.16	0	0
茄子	12	12.37	8	8.25	0	0	3	3.09
番茄	18	18.56	4	4.12	8	8.25	4	4.12
合计	45	46.39	32	32.99	13	13.41	7	7.21

被分离出。哈茨木霉的总分离频率最高,为46.39%。哈茨木霉在番茄土壤中的分离频率最高,为18.56%。绿色木霉在辣椒土壤中的分离频率最高,为20.62%。拟康宁木霉在番茄土壤中的分离频率最高,为8.25%。黄绿木霉在番茄土壤中的分离频率最高,为4.12%。由此可见,三种茄科蔬菜土壤中的木霉菌分布存在差异。

3 结论与讨论

3.1 3种茄科蔬菜土壤中以哈茨木霉为优势群体

本研究从11个地区的辣椒、茄子和番茄土壤中共分离出97株4个种的木霉菌,分别是:哈茨木霉、绿色木霉、拟康宁木霉和黄绿木霉。其中哈茨木霉为优势种群,其分离频率为46.39%。3种茄科蔬菜土壤中的木霉菌分布存在差异。罗晓华^[17]报从雅安郊区的不同深度辣椒土壤中分离到8种木霉,包括哈茨木霉、拟康宁木霉、康宁木霉、黄绿木霉、桔绿木霉、钩状木霉、假康宁木霉和深绿木霉,其中哈茨木霉是优势种。刘庆华^[18]从雅安的发育期茄子土壤中分离到6种木霉,包括哈茨木霉、康宁木霉、绿色木霉、桔绿木霉、钩状木霉、长枝木霉,其中钩状木霉是优势种。杨合同等^[19]从山东的临沂、聊城、寿光、章丘的番茄土壤中分离出绿色木霉、哈茨木霉、长枝木霉和桔绿木霉,并认为长枝木霉和哈茨木霉为山东蔬菜土壤的优势种。本次实验分离出的木霉种类与报道的结论存在异同,但分离种类少于报道,推测可能是由于土壤理化性质和取样土层深度不同而造成木霉菌株分离的异同。

3.2 地域差异和植物差异并不是导致三种蔬菜土壤中木霉种群分布差异的原因

本研究中,哈茨木霉和绿色木霉分布范围比较广,在取样的大部分地区均有分布,而拟康宁木霉和黄绿木霉分布范围较小。推测地域差异和植物差异与3种蔬菜土壤中木霉种群分布差异没有直接相关的联系。据报道,同属不同种的真菌的种群分布与地域差异和植物差异没有直接联系^[20-21],这与本研究的结论一致。

参考文献:

[1] Harman G E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. [J]. Phytopathology, 2006, 96: 190-194.

- [2] Akrami M, Yousefi Z. Biological control of Fusarium wilt of tomato (*Solanum lycopersicum*) by *Trichoderma* spp. as Antagonist fungi [J]. Biology Forum, 2015, 7: 887-892.
- [3] Nashwa M A Sallam, Amal M I Eraky, Ahmed Sallam. Effect of *Trichoderma* spp. on Fusarium wilt disease of tomato[J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46: 4463-4470.
- [4] 杨合同,唐文华, Ryder M. 木霉菌与植物病害的生物防治[J]. 山东科学, 1999, 12(14): 7-15.
- [5] Bell D K, Wells H D, Markham C R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal pathogens[J]. Phytopathology, 1982, 72(4): 379-382.
- [6] Elad Y, Kapat A. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea* [J]. European Journal of Plant Pathology, 1999, 105: 177-189.
- [7] Verma V, Ravindran P, Kumar P P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses[J]. BMC Plant Biology, 2016, 16: 86.
- [8] 牛贞福,国淑梅,张鹤,等. 防控番茄灰霉病的化学药剂和生防菌株筛选研究[J]. 东北农业科学, 2016, 41(3): 41-45.
- [9] 国淑梅,牛贞福,王绍敏,等. 防控番茄灰叶斑病的化学药剂和生防菌株研究[J]. 东北农业科学, 2015, 40(5): 93-96, 101.
- [10] 唐琳,赵辉. 哈茨木霉菌T6对茄子幼苗根部防御酶系的研究[J]. 广东农业科学, 2011(14): 79-81.
- [11] 周德庆. 微生物学实验教程(第三版)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2013: 99-102.
- [12] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 492-493.
- [13] 杨合同. 木霉分类与鉴定[M]. 北京: 中国大地出版社, 2009: 321-337.
- [14] 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.
- [15] 吴发红,黄东益,黄小龙,等. 几种真菌DNA提取方法的比较[J]. 中国农学通报, 2009, 25(8): 62-64.
- [16] 张小春,田艳萍,陈昊,等. 我国西南地区主要谷物表面污染真菌的分离与分子鉴定[J]. 成都医学院学报, 2016, 11(2): 191-197.
- [17] 罗晓华. 雅安郊区辣椒生长期土壤中木霉种群分布及其对辣椒疫霉病的生防研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2003.
- [18] 刘庆华. 茄子发育期土壤中木霉种群结构及其对茄黄萎病菌生防机理的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2003.
- [19] 杨合同,于雪云,魏艳丽,等. 多功能植病生防木霉的分离筛选与鉴定[J]. 山东科学, 2009, 22(5): 27-30.
- [20] L Tang, Z G Gao, Y Yao, X Liu, Identification and Genetic Diversity of Formae Speciales of *Setosphaeria turcica* in China[J]. Plant Disease, 2015, 99(4): 482-487.
- [21] 文成敬,陶家风,陈文瑞. 中国西南地区木霉分类研究[J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 118-130.

(责任编辑:王 昱)