

甘肃河西马铃薯根际生防木霉菌对接骨木镰刀菌的拮抗筛选及鉴定

张茹^{1,2}, 李金花^{1,3}, 柴兆祥³, 王蒂^{1,2*}

(1. 甘肃省作物遗传与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 3. 甘肃农业大学草业学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:从甘肃省西部地区农牧交错区的马铃薯根际土壤中共分离到 108 株木霉菌株, 通过平板对峙法筛选出 10 株对马铃薯干腐病主要病菌接骨木镰刀菌拮抗效果较好的木霉菌株, 抗性系数均在 0.826 以上, 其中天祝 3 株、永登 4 株、山丹 3 株。根据形态学特征、培养性状和 ITS 序列分析, 将这 10 株生防木霉菌鉴定为哈茨木霉、长枝木霉、深绿木霉和粘绿木霉 4 个种。研究结果还表明, 马铃薯根际土壤中的优势生防木霉菌种为哈茨木霉和长枝木霉, 长枝木霉与深绿木霉对病原菌接骨木镰刀菌的拮抗作用最强。长枝木霉菌对接骨木镰刀菌有较好的拮抗效果, 在国内系首次报道。

关键词:马铃薯; 根围土壤; 木霉菌; 干腐病; 拮抗作用

中图分类号: S435.121; S532.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2009)02-0138-08

* 农业生产中, 各种植物病害产生的适应性、抗药性与病原菌生理小种的快速变异的现象, 以及出现的对环境对人类健康危害的事实, 农药、化学试剂的过度使用已引起人类的重视, 因此使用合理、有效的方法控制植物病害的发生势在必行, 生物防治便成为了国内外研究的热点。从植物病害防治的角度来讲, 生物防治就是利用生物及其代谢产物防治植物病害, 控制病原物的方法。它的实质就是利用生物种间关系、种内关系, 调节有害生物种群密度, 即利用生物群防治生物群^[1~4]。植物病害的生物防治是在农业生态系统中调节寄主植物的微生物环境, 使其利于寄主而不利于病原物或者使其对寄主与病原物的相互作用发生有利于寄主而不利于病原物的影响, 从而达到防治病害的目的。生物防治可以通过生物及其代谢产物防治作物病害, 控制病原, 达到抑制病害、保护环境、保护人畜健康的目的。

根际微生物是土壤和植物生命系统的重要组成成分, 是根际微环境与土壤有机物质循环和转换的枢纽, 对植物的生长发育起着重要作用^[1]。根际微生物主要包括根际细菌、根际放线菌、根际真菌和根际原生动物等, 而木霉菌正是一种重要的具有生防作用的根际真菌。

木霉(*Trichoderma*)广泛存在于土壤、空气和植物体表面等生态环境中, 有些菌株对植物病原真菌具有寄生或拮抗作用^[2], 可用于防治由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、镰刀菌(*Fusarium* spp.)、齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)等引起的植物病害, 是一种重要的生防菌^[3~5]。

20 世纪 70 年代以来, 对木霉菌的拮抗作用及其机制作了深入研究, 国外已有商品化的木霉制剂问世^[6,7]。目前, 具有生防潜力的木霉菌种主要是哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、绿色木霉(*T. virid*)、康氏木霉(*T. koningii*)、钩状木霉(*T. hamatum*)和长枝木霉(*T. longibrachiatum*)^[8]。

马铃薯(*Solanum tuberosum*)是世界第 4 大重要的粮食作物, 中国是世界上最大的马铃薯生产国。虽然马铃薯是重要的粮菜兼用型作物, 但也是优良的饲料作物。据报道, 全世界种植的马铃薯大约有 1/3 左右作为饲料^[9,10], 在马铃薯加工过程中的薯皮、薯渣也大量用作饲料^[10~12]。可见马铃薯在饲料作物中占有相当重要的地

* 收稿日期: 2008-10-06; 改回日期: 2008-11-18

基金项目: 转基因抗逆耐盐及抗病马铃薯新品系培育研究(GNSW-2006-01), 马铃薯优质高效配套生产技术与示范(2006BAD21B053)和马铃薯镰刀菌干腐病病原学及抗病种质资源筛选研究(GKLAU0603)资助。

作者简介: 张茹(1978-), 女, 甘肃兰州人, 在读博士。E-mail: chouruer@163.com

* 通讯作者。E-mail: jiangze@public.lz.gs.cn

位。甘肃西部农牧交错区是种植马铃薯的主要区域之一,据报道,在甘肃由接骨木镰刀菌(*Fusarium sambucinum*)等病原引起的干腐病是马铃薯种植和贮藏过程中发生的重要病害之一^[13]。为掌握甘肃省西部地区的生防木霉菌资源,发现生防能力强、抑菌范围广谱的优质木霉菌,寻找对环境对人类健康友好的植物病害防治方法,安全、有效控制该病,从甘肃省西部地区马铃薯根围土壤中分离木霉菌,通过拮抗试验筛选生防潜力大的木霉菌株,为深入开发和利用木霉菌提供理论和实践依据。

1 材料与方法

1.1 土样采集

2007 年 4—10 月从甘肃省西部农牧交错的张掖、山丹、天祝和永登等地的马铃薯种植田块按照常规土壤取样方法(5 点法)采集马铃薯根围土壤。每个采样区选有代表性的地块作为取样单位,每个取样单位用土壤取样器按照 5 点取样法取 0~20 cm 耕作层的土样,每点取 1 次,5 点的土样充分混匀后装入牛皮纸袋供分离用,每取样单位取样 1 份,共采集 38 份土壤样品。

1.2 土壤溶液的制备

将采集到的土样敲碎、风干后过筛。取充分混匀的土样 0.5 g 于 150 mL 三角瓶中,加 100 mL 灭菌蒸馏水,振动 1 min 后静置 1 min,分别吸取 1 mL 悬浮液,用浓度梯度法稀释成 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 三个浓度梯度的土壤溶液,充分摇匀后用于分离。

1.3 木霉菌的分离、纯化与保存

以下操作均在无菌条件下进行。木霉菌的分离采用平板稀释法进行。移取上述配置好的不同浓度梯度的土壤溶液 1 mL 注入马铃薯葡萄糖培养基(potato dextrose agar, PDA)平板(含马铃薯 200 g,葡萄糖 15 g,琼脂 15 g,氯霉素 0.01%,丙酸钠 10 mmol/L,蒸馏水 1 000 mL)上,迅速用无菌推铲推开,置于 28℃ 恒温培养,每个浓度重复 5 次。待 PDA 平板上长出菌落后,挑取菌落边缘幼嫩菌丝到 PDA 平板上反复纯化。将纯化后的菌种,根据培养特性挑取菌体显微镜检,选出木霉菌单孢分离,15% 甘油中 -70℃ 下保存待用。

1.4 拮抗木霉菌的筛选

用于筛选拮抗木霉菌的竞争病原菌为接骨木镰刀菌,从马铃薯干腐病病薯上分离到^[13],由甘肃农业大学植物病理学实验室提供。

将 PDA 上平板上培养 5 d 左右的木霉菌与接骨木镰刀菌分别用打孔器打成大小为 6 mm 的菌饼,分别接种于 PDA 平板上,2 个菌饼相距 4 cm,于 28℃ 培养,逐日观察记录木霉和镰刀菌的菌落相向半径。以只接接骨木镰刀菌不接木霉菌为对照。每处理重复 3 次。待对照菌落长满平板时(10 d),计算拮抗系数。

$$\text{拮抗系数的计算公式: } N = (LC - LP) / LC$$

式中, N :拮抗系数; LC :对照菌落半径; LP :被抑制病原菌半径^[14,15]。

1.5 拮抗木霉菌的鉴定方法

按拮抗系数从大到小选取 10 株对接骨木镰刀菌拮抗效果较好的木霉菌菌株,根据形态学分类方法及 rDNA-ITS 序列同源性分析进行木霉菌株的鉴定。

1.5.1 形态学鉴定 将筛选出的木霉菌在 PDA 和水琼脂(water agar, WA)(琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL)上培养^[16],依据菌落形态、分生孢子的大小、形状、颜色,分生孢子梗的形态和产孢细胞的形态特征等进行鉴定。

1.5.2 ITS-PCR 扩增和测序分析 基因组 DNA 的提取:分别将 10 株木霉菌待测菌株接种在马铃薯葡萄糖培养液中(potato dextrose broth, PDB)(马铃薯 200 g,葡萄糖 15 g,1 000 mL 蒸馏水),28℃、140 r/min,振荡培养 48~72 h,收集菌丝,提取 DNA^[17]。通过电泳方法检查 DNA 纯度和定量(与 DNA maker I 比较)。根据木霉菌 rDNA 中的转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)区间特有的保守序列^[18],进行引物合成(由上海生工合成)。引物对为:EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3') 和 EF1-986R (5'-TACTTGAAG-GAACCTTACC-3')。

PCR 反应包括 10× Taq buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 10 μmol/L 的引物 1 μL,模板 DNA 1 μL, 5 U/μL Taq 酶 0.25 μL,超纯水将反应体系补至 25 μL。

PCR 反应热循环参数设置为:预变性 94℃ 4 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 进行 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

PCR 产物采用北京天为时代科技有限公司的离心柱型 PCR 产物纯化试剂盒(普通型)进行纯化, 取 6~8 μL 扩增产物于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳, 利用成像系统成像, 并将 PCR 产物送上海生工公司测序。

序列同源性比较和聚类分析: 将待测菌株的 rDNA-ITS 序列与 Genbank 核苷酸数据库中的 ITS 序列进行同源性比较, 采用 DNASTar 软件对所测 10 个菌株的 ITS 序列与 Genbank 中的同源性最高的部分木霉种的 ITS 序列进行聚类分析, 构建同源性树。

2 结果与分析

2.1 木霉菌的分离结果

经统计, 从甘肃省西部地区马铃薯根围土壤中共分离到 108 株木霉菌株, 其中从天祝分离到 40 株, 山丹 30 株, 永登 32 株, 张掖 6 株(表 1)。

2.2 拮抗木霉菌的筛选结果

通过木霉菌对接骨木镰刀菌拮抗作用的研究, 筛选出 10 株对接骨木镰刀菌拮抗效果较好的菌株, 抗性系数均在 0.826 以上(表 1)。其中天祝 3 株(菌株号为 T-B-2, T-B-3, T-B-4)、永登 4 株(菌株号为 Y-B-2, Y-B-4, Y-B-10, Y-C-8)、山丹 3 株(菌株号为 S-E-1, S-D-3, S-D-1)(表 1, 图 1)。

2.3 拮抗木霉菌的鉴定结果

通过形态学特征和分子生物学鉴定, 将 10 个对接骨木镰刀菌拮抗效果较好的木霉菌菌株鉴定为 4 个种, 分别为哈茨木霉 4 株, 长枝木霉 3 株, 深绿木霉(*T. atroviride*) 1 株, 粘绿木霉(*T. vires*) 1 株。

2.3.1 拮抗木霉菌种的形态学特征描述 哈茨木霉: 在 PDA 平板上, 菌落生长迅速, 棉絮状, 老熟时为暗绿色, 孢子梗束束疏松, 环状排列, 主分枝呈树状, 其上众多次级分枝, 整个分枝系统像金字塔状, 瓶梗初短, 终级瓶梗变细而长, 中间膨大, 以大角度伸出, 分生孢子球形或近球形, 短倒卵形, 壁光滑, 孢子小(图 2A)。菌株: T-B-2, Y-B-4, Y-B-10, S-D-1。分布: 天祝、永登、山丹。

深绿木霉: 在 PDA 平板上, 菌落生长迅速, 老熟时呈暗黄色, 常有芳香气味。分生孢子梗主轴上初级分枝常位于基部, 且多不规则, 瓶梗细长, 窄安甌形, 常向分枝顶端呈弧形弯曲, 分生孢子成熟时表面光滑(图 2B)。菌株: T-B-4。分布: 天祝。

长枝木霉: 在 PDA 平板上, 菌落生长迅速, 棉絮状, 浅绿色至深绿色, 分生孢子梗主轴上初级分枝常位于基部, 且多不规则, 孢子梗主轴次级分枝分布结构复杂, 通常具有 2~3 回分枝, 瓶梗基部收缩不明显, 分生孢子椭圆形或卵圆形, 表面光滑(图 2C)。菌株: T-B-3, Y-B-2, S-D-3。分布: 天祝、永登、山丹。

粘绿木霉: 在 PDA 平板上, 菌落生长迅速, 背面无色, 老时逐渐变成暗黄色。分生孢子梗主轴上分枝分布较均匀, 单生、对生或 3~4 个轮生, 分生孢子梗主轴无延长结构, 瓶梗中茎轴着生, 分生孢子多而密, 孢子表面粗糙(图 2D)。菌株: Y-C-8。分布: 永登。

2.3.2 rDNA-ITS 序列分析 经测序分析, PCR 扩增后有 9 个木霉菌菌株得到了大小为 300 bp 的条带(图 3), 将大小一致的条带回收测序后在 Genbank 上比对, 与形态学鉴定结果一致, 分别为哈茨木霉, 长枝木霉, 深绿木霉和粘绿木霉。利用 DNASTar 软件绘制测序菌株的系统发育树状图。菌株 Y-B-4 号与 Genbank 上登记的菌株 AY605779 哈茨木霉的亲缘关系最近(图 4), 同源性达 98%; 菌株 T-B-4 号与 Genbank 上登记的菌株 AF456882 的亲缘关系最近, 同源性达 96%(图 5)。而其他的菌株同源性都在 96% 以上。

3 讨论

木霉属真菌广泛存在于土壤等多种基质中, 因其许多种类对植物病原真菌具有拮抗和重寄生作用及能够产生纤维素酶等多种酶类而倍受关注。甘肃西部地区的张掖、山丹、天祝和永登等地地理、气候类型多样, 资源丰富。但对在国民经济和自然生态系统中有重要价值的木霉菌的分类鉴定少见报道。

甘肃是马铃薯生产大省, 由接骨木镰刀菌等病原引起的干腐病(potato dry rot)是马铃薯种植和贮藏过程中发生广泛的重要病害之一^[13], 有效防治该病对马铃薯种植与产业发展具有重要意义。本研究广泛调查和筛选甘

表 1 拮抗木霉菌株的分离来源和拮抗系数比较

Table 1 Sources and antagonistic index of *Trichoderma* isolated from different potato terra

菌号	采集地	拮抗系数	菌号	采集地	拮抗系数	菌号	采集地	拮抗系数
Isolate code	Sources	Antagonistic index	Isolate code	Sources	Antagonistic index	Isolate code	Sources	Antagonistic index
Z-A-1	张掖	0.768	T-A-1	天祝	0.805	T-E-7	天祝	0.798
Z-A-2	张掖	0.763	T-A-2	天祝	0.822	T-E-8	天祝	0.778
Z-A-3	张掖	0.780	T-B-1	天祝	0.754	T-E-9	天祝	0.728
Z-A-4	张掖	0.729	T-B-2*	天祝	0.856	T-E-10	天祝	0.754
Z-A-5	张掖	0.712	T-B-3*	天祝	0.826	Y-A-1	永登	0.818
Z-A-6	张掖	0.707	T-B-4*	天祝	0.847	Y-A-2	永登	0.808
S-A-1	山丹	0.809	T-B-5	天祝	0.738	Y-A-3	永登	0.818
S-A-2	山丹	0.805	T-B-6	天祝	0.818	Y-B-1	永登	0.763
S-A-3	山丹	0.732	T-B-7	天祝	0.784	Y-B-2*	永登	0.830
S-A-4	山丹	0.805	T-B-8	天祝	0.802	Y-B-3	永登	0.818
S-A-5	山丹	0.814	T-C-1	天祝	0.746	Y-B-4*	永登	0.843
S-A-6	山丹	0.814	T-C-2	天祝	0.591	Y-B-5	永登	0.732
S-A-7	山丹	0.732	T-C-3	天祝	0.758	Y-B-6	永登	0.809
S-A-8	山丹	0.818	T-C-4	天祝	0.802	Y-B-7	永登	0.821
S-A-9	山丹	0.818	T-C-5	天祝	0.818	Y-B-8	永登	0.805
S-A-10	山丹	0.774	T-C-6	天祝	0.807	Y-B-9	永登	0.732
S-B-1	山丹	0.753	T-C-7	天祝	0.746	Y-B-10*	永登	0.838
S-B-2	山丹	0.816	T-C-8	天祝	0.789	Y-B-11	永登	0.733
S-B-3	山丹	0.737	T-D-1	天祝	0.802	Y-B-12	永登	0.733
S-C-1	山丹	0.822	T-D-2	天祝	0.818	Y-B-13	永登	0.801
S-C-2	山丹	0.822	T-D-3	天祝	0.807	Y-C-1	永登	0.818
S-C-3	山丹	0.814	T-D-4	天祝	0.794	Y-C-2	永登	0.818
S-D-1*	山丹	0.826	T-D-5	天祝	0.807	Y-C-3	永登	0.818
S-D-2	山丹	0.769	T-D-6	天祝	0.784	Y-C-4	永登	0.801
S-D-3*	山丹	0.834	T-D-7	天祝	0.818	Y-C-5	永登	0.738
S-D-4	山丹	0.809	T-D-8	天祝	0.811	Y-C-6	永登	0.830
S-D-5	山丹	0.777	T-D-9	天祝	0.756	Y-C-7	永登	0.812
S-D-6	山丹	0.738	T-D-10	天祝	0.764	Y-C-8*	永登	0.842
S-D-7	山丹	0.820	T-D-11	天祝	0.818	Y-D-1	永登	0.758
S-E-1*	山丹	0.830	T-D-12	天祝	0.804	Y-D-2	永登	0.763
S-E-2	山丹	0.771	T-E-1	天祝	0.764	Y-D-3	永登	0.771
S-E-3	山丹	0.763	T-E-2	天祝	0.789	Y-D-4	永登	0.758
S-E-4	山丹	0.821	T-E-3	天祝	0.811	Y-D-5	永登	0.741
S-F-1	山丹	0.787	T-E-4	天祝	0.821	Y-D-6	永登	0.754
S-F-2	山丹	0.738	T-E-5	天祝	0.814	Y-D-7	永登	0.734
S-F-3	山丹	0.737	T-E-6	天祝	0.821	Y-D-8	永登	0.771

* 为筛选到的抗性较好的木霉菌株 The *Trichoderma* isolates with better antagonistic effect. 张掖 Zhangye; 山丹 Shandan; 天祝 Tianzhu; 永登 Yongdeng.

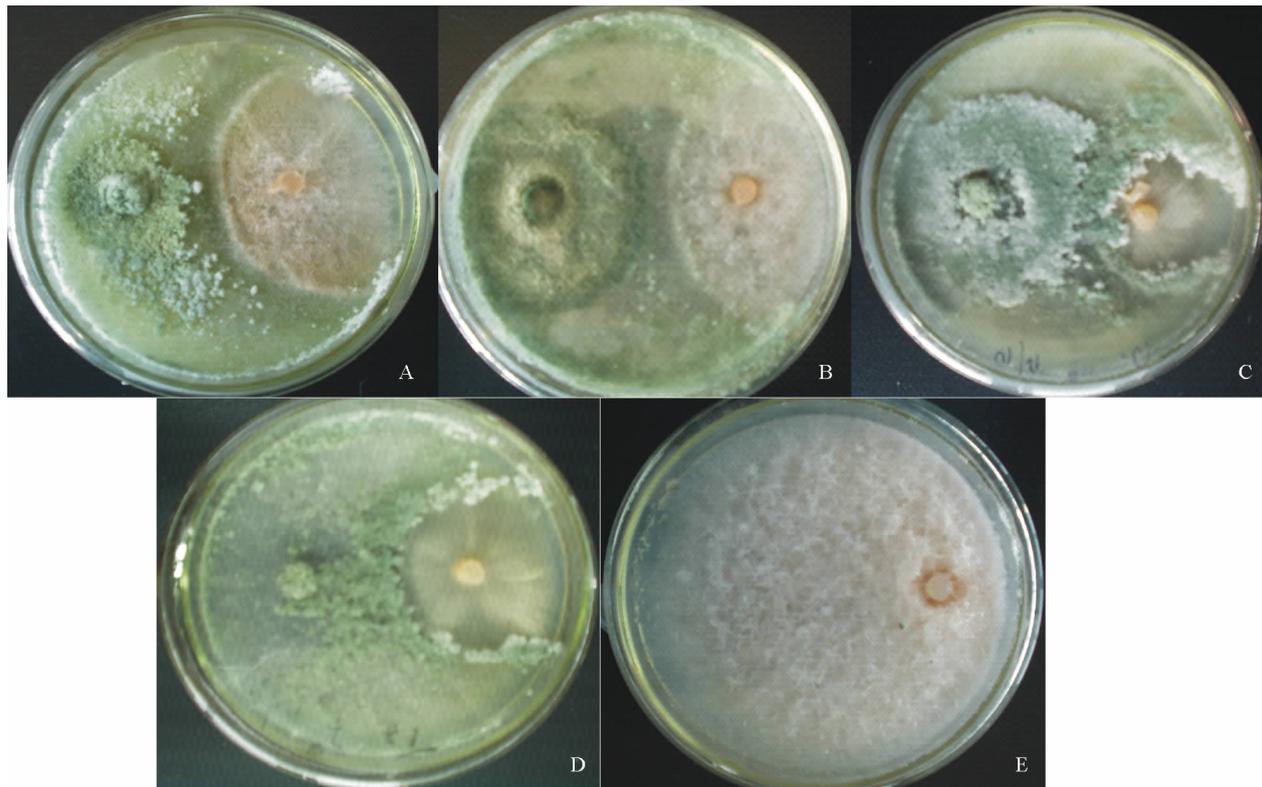


图 1 木霉菌株对接骨木镰刀菌的拮抗效果

Fig. 1 Inhibition effect of *Trichoderma* to *F. sambucinum*

A: 深绿木霉对接骨木镰刀菌 *T. atroviride* to *F. sambucinum*; B: 哈茨木霉对接骨木镰刀菌 *T. harzianum* to *F. sambucinum*; C: 粘绿木霉对接骨木镰刀菌 *T. virens* to *F. sambucinum*; D: 长枝木霉对接骨木镰刀菌 *T. longibrachiatum* to *F. sambucinum*; E: 对照 CK

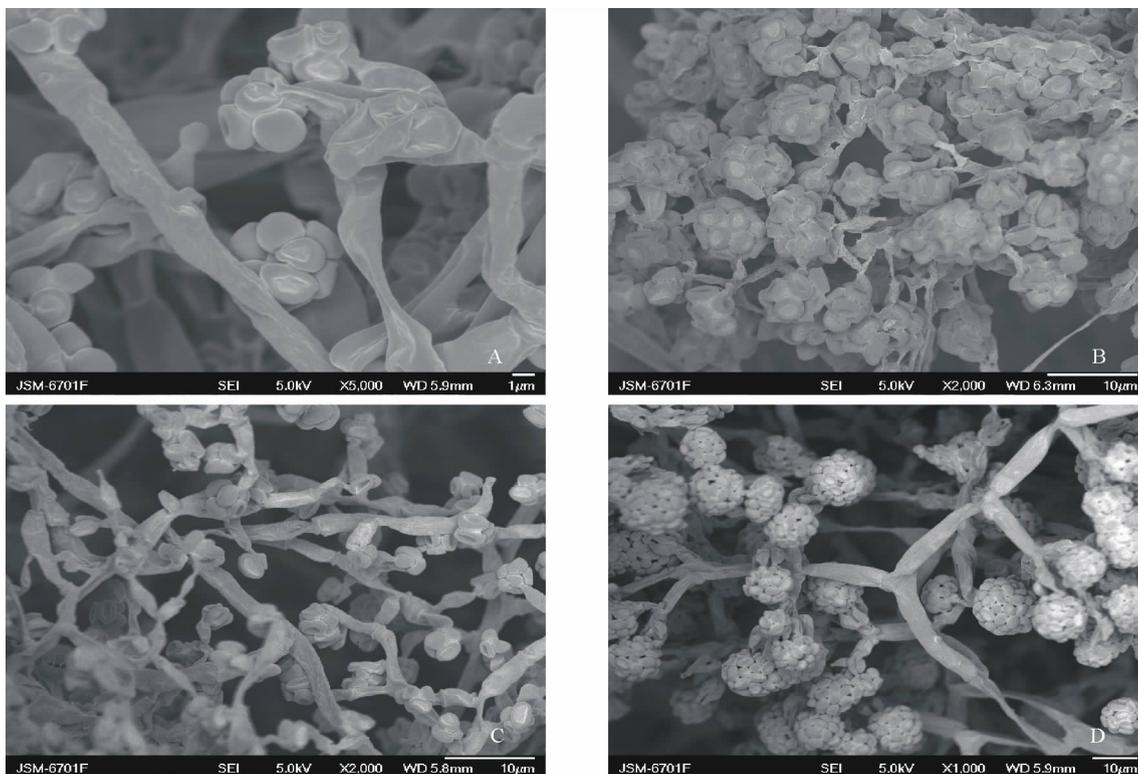


图 2 木霉菌产孢梗和分生孢子

Fig. 2 Conidiophores and conidiospore of *Trichoderma*

A: 哈茨木霉 *T. harzianum*; B: 深绿木霉 *T. atroviride*; C: 长枝木霉 *T. longibrachiatum*; D: 粘绿木霉 *T. virens*

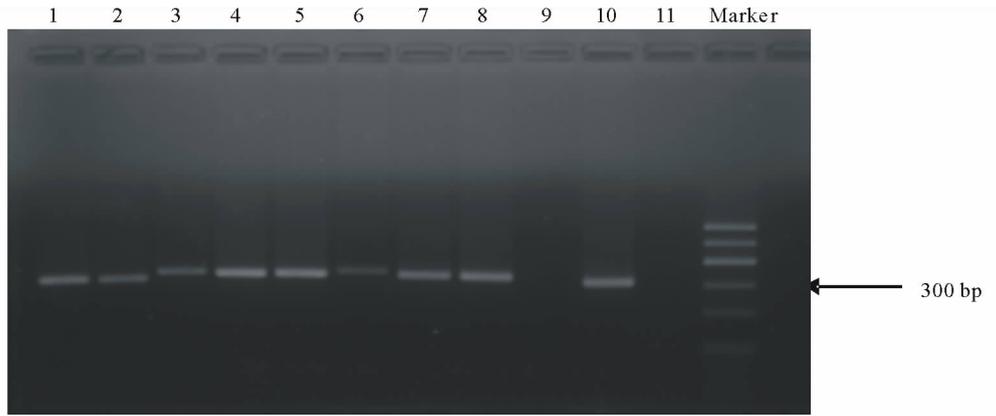


图 3 10 株木霉菌株的引物 EF1 的 PCR 产物电泳图

Fig. 3 The bands of PCR products of 10 isolates of *Trichoderma* at primer EF1

泳道 1~11 依次为 T-B-2, T-B-3, T-B-4, Y-B-2, Y-B-4, Y-B-10, Y-C-8, S-D-1, S-D-3, S-E-1, 阴性对照
Band 1-11: T-B-2, T-B-3, T-B-4, Y-B-2, Y-B-4, Y-B-10, Y-C-8, S-D-1, S-D-3, S-E-1, negative control

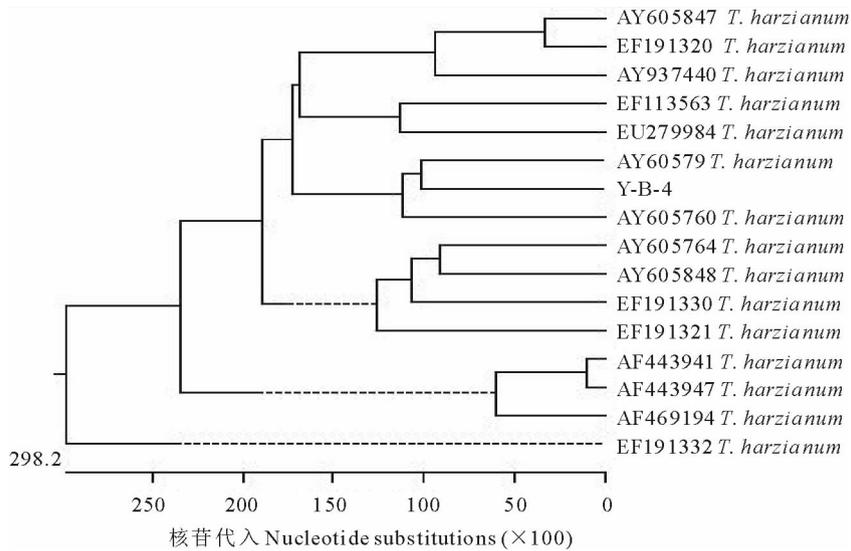


图 4 菌株 Y-B-4(哈茨木霉 *T. harzianum*) 的遗传聚类分析图谱

Fig. 4 Phylogenetic tree of the isolate Y-B-4

肃省西部地区马铃薯根际土壤中对马铃薯干腐病主要病菌接骨木镰刀菌具有生防作用的木霉真菌,明确其种类和分布特性。根据 Rifia 的分类系统^[19,20]与分子生物学试验相结合,将 10 株拮抗效果较好的木霉菌菌株鉴定为哈茨木霉,长枝木霉,深绿木霉和粘绿木霉,其中哈茨木霉和长枝木霉是甘肃省西部农牧交错区马铃薯根际土壤中分布较为广泛的 2 种木霉,并且对接骨木镰刀菌的抑制效果最好。国内外研究拮抗作用较好的木霉菌通常为哈茨木霉和绿色木霉^[21],本研究表明,长枝木霉对接骨木镰刀菌具有较好的拮抗性状,这在中国属于首次报道。

木霉菌的鉴定一般通过形态学来进行^[22],但有些木霉菌株是介于已确定的种与种之间的中间类型,部分种之间在形态上又存在相似性,这给木霉的鉴定和分类带来困难和争议^[23]。而核糖体 DNA(rDNA)内转录间隔区(ITS)的序列分析是鉴定种,尤其是形态相似种的有力工具。本研究中,用木霉菌中的 ITS 序列作为种间比对,虽然 ITS1 和 ITS2 序列差异较种内大,而 5.8S rDNA 无论在种内还是在种间变异均较小,可见 ITS 序列不仅适用于较高分类等级的系统学研究,也能反映种内变异及多态性^[24]。通过分子生物学技术与形态学鉴定相结合,使木霉菌的分类鉴定更准确,对开发和利用甘肃省木霉菌的资源具有重要的理论研究和实际应用意义。

木霉作为有效的生防菌之一,具有多种多样的应用形式。利用木霉菌可以直接对土壤和种子进行处理,达到防治效果,亦可直接喷施作物的表面而产生抑菌作用,木霉菌和杀菌剂的组合应用可以明显增强生防效果,同时

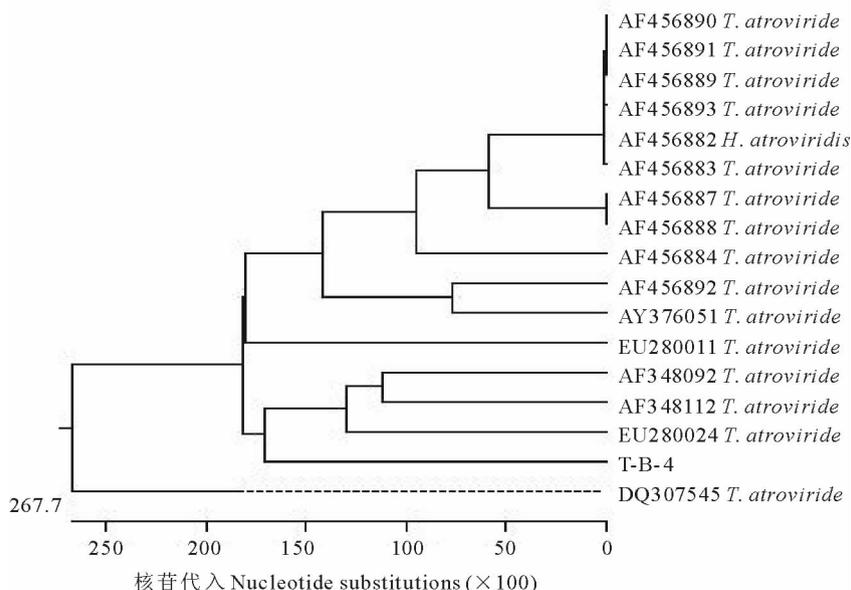


图5 菌株 T-B-4 号(深绿木霉 *T. atroviride*)的遗传聚类分析图谱

Fig. 5 Phylogenetic tree of isolate T-B-4

减少杀菌剂的用量,减少环境污染,降低农药残留量,减轻对环境有益微生物的破坏。随着基因工程的发展,克隆转化拮抗微生物的有益基因,优化拮抗微生物,构建高抗高控工程菌株,研制高效的生防制剂,已是生防工作的重点。木霉菌中产生的许多重要拮抗物质,如胞壁降解酶可以直接对病原菌产生抑制防治的作用,而利用这些胞壁降解酶的基因更是生防应用的重点。木霉菌中含有大量的几丁质酶与葡聚糖酶,利用它们的基因改造有益菌株或植株,可以对病原菌达到更强的抑制作用而对植物起到促生的作用。总之,对木霉菌株的研究,可以为生物防治提供更多的契机,为生防因子木霉菌展示更加广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 王树和,王晓娟,王茜,等. 丛枝菌根及其宿主植物对根际微生物作用的响应[J]. 草业学报,2007,16(3):108-113.
- [2] 程丽云,李梅婷,刘国坤,等. 从3种基质分离的木霉种类鉴定[J]. 福建农林大学学报,2006,35(6):652-656.
- [3] 袁佐清. 土壤中木霉的分离纯化以及对植物病原真菌的拮抗研究[J]. 西北农业学报,2006,15(5):132-135.
- [4] 杨合同,唐文华. 木霉菌与植物病害的生物防治[J]. 山东科学,1999,12(4):7-16.
- [5] 黄丽丹,陈玉惠. 生防菌及相关生物技术在植物病害防治中的应用[J]. 西南林学院学报,2006,26(1):85-89.
- [6] 鲁素云. 植物病害生物防治学[M]. 北京:北京农业大学出版社,1993.
- [7] 李梅云,王革,李天飞,等. 烟草主要真菌病类生防木霉的筛选[J]. 西南农业大学学报,2001,23(1):10-12.
- [8] 杨依军,王勇,杨秀荣,等. 拮抗木霉菌在生物防治中的作用[J]. 天津农业科学,2000,6(3):29-33.
- [9] 哈里斯 P M. 马铃薯改良的科学基础[M]. 北京:农业出版社,1981.
- [10] 于品华. 饲用型马铃薯新品系“杂3单选-5”选育研究[J]. 草业学报,2004,13(2):115-117.
- [11] 程天庆. 马铃薯栽培技术[M]. 北京:金盾出版社,1997.
- [12] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所. 中国马铃薯栽培学[M]. 北京:中国农业出版社,1994.
- [13] 李金花,柴兆祥,王蒂,等. 甘肃马铃薯贮藏期真菌性病害病原菌的分离鉴定[J]. 兰州大学学报(自然科学版),2007,43(2):39-42.
- [14] Bell D K, Well H D, Markham C R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against fungal pathogens[J]. Phytopath, 1982, 2(4): 279-382.
- [15] 王伟,赵谦,杨微. 木霉菌对土传病原尖孢镰刀菌拮抗作用[J]. 中国生物防治,1997,13(1):46-47.
- [16] 石仁才,商鸿生,张敬泽. 高尔夫果岭上草坪灰斑病病原菌的分离鉴定[J]. 草业学报,2008,17(1):52-57.
- [17] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [18] Irina S, Druzhinina, Alexei G, et al. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*[J]. Fungal Genetics and Biology,2005,42:813-828.
- [19] Rifia M A. A revision of the genus *Trichoderma*[J]. Mycological Papers,1969,116:1-56.

- [20] Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels G J, *et al.* Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences[J]. *Mycologia*, 1997, 89(3):442-460.
- [21] 惠有为, 孙勇, 潘亚妮, 等. 木霉菌在植物真菌病害防治上的作用[J]. *西北农业学报*, 2003, 12(3):96-99.
- [22] 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.
- [23] 文成敬. 中国西南地区木霉属分类研究[J]. *真菌学报*, 1993, 12(2):118-130.
- [24] 吴琦, 曾子贤, 邵继荣, 等. 金荞麦内转录间隔区(ITS)的扩增及序列分析[J]. *草业学报*, 2007, 16(5):127-132.

Screening of biocontrol *Trichoderma* from potato rhizosphere of Western Gansu against *Fusarium sambucinum* and their identification

ZHANG Ru^{1,2}, LI Jin-hua^{1,3}, CHAI Zhao-xiang³, WANG Di^{1,2}

(1. Gansu Key Lab of Crop improvement and Germplasm Enhancement, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 3. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The 108 isolates of *Trichoderma* were acquired from potato rhizosphere in farming-pasturing zone of Western Gansu, 10 isolates of them had been acquired via the method of face to face on PDA to the pathogen *Fusarium sambucinum* causing potato dry rot. Through the identification based on morphology and analysis of ITS sequencing, these 10 isolates were identified as 4 species including *Trichoderma harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. atroviride* and *T. virens*. *T. harzianum* and *T. longibrachiatum* are super *Trichoderma* species from potato rhizosphere in farming-pasturing zone of western Gansu, and these *Trichoderma* species had the best inhibition against *F. sambucinum* in this study. *T. longibrachiatum* showing superior inhibition effect against *F. sambucinum* is the first report in China.

Key words: potato; rhizosphere soil; *Trichoderma*; potato dry rot; inhibition