

广西林区木霉菌多样性调查

于浩龙, 赵樟, 刘云, 卢立华*

(中国林业科学研究院 热带林业实验中心, 广西 凭祥 532600)

摘要:通过对广西林区6种林分类型的林地木霉菌多样性进行调查,采用形态学方法进行分类鉴定,共分离鉴定出木霉菌11种。研究表明,混交林中木霉菌的分离率最高,松树林木霉菌分离率最低;海拔高度对木霉菌的丰富度影响不大。在所分离的木霉菌中,哈茨木霉(*Trichoderma harzianum* Rifai)出现频率高,是广西林区木霉菌资源的优势种类。

关键词:林分类型;木霉菌;物种多样性

中图分类号:S718.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2012)02-0109-05

Investigation of *Trichoderma* Diversity in Guangxi Forest Regions

YU Hao-long, ZHAO Zhang, LIU Yun, LU Li-hua*

(Experimental Center of Tropical Forestry, CAF, Pingxiang, Guangxi 532600, China)

Abstract: *Trichoderma* diversity in 6 types of forest stands were investigated in Guangxi China. Eleven species of *Trichoderma* were identified according to the morphological method. The result showed that *Trichoderma* isolation rate in mixed forest was the highest, and the lowest in the pine stand. There was not obvious effect on *Trichoderma* abundance occurring at different altitudes. *T. harzianum* Rifai was dominant species with higher isolation rate.

Key words: stand types; *Trichoderma*; species diversity

木霉(*Trichoderma* Pers.)在自然界的分布十分广泛,是土壤微生物的重要组成群落之一^[1],有些木霉可产生活性很强的纤维素酶、几丁质酶、木聚酶等水解酶类,被广泛地应用于生产微生物源的酶类、糖蛋白以及用于植物病害的生物防治、食品、卫生、饲料、制浆、纺织、造纸、生物基因工程和环保等领域^[2]。此外,木霉属个别种也可引起蘑菇的病害,导致蘑菇生产污染,造成减产^[3-4]。有些木霉菌还能通过与植物形成共生关系,来促进植物生长发育,诱导并激发植物自身免疫功能,有些木霉菌甚至还能引起人的病害^[5-7]。由于木霉菌对人类的生产和生活如此重要,作为基础研究的木霉菌分类学研究一直受到人们的重视,许多学者对此做了深入的研究和总结。我国对木霉属真菌的研究主要侧重在木霉菌

的应用开发方面,在分类研究方面相对较少。1986年起福建三明真菌研究所木霉研究组收集木霉菌株20余个,并对它们的形态及培养性状进行了系统研究^[8]。1998年云南农业大学王家和等从云南省大围山自然保护区土壤样品中分离到69株木霉,按Rifai-Bissett对木霉属种群分类系统,鉴定出6个集合种^[9]。1999年陈建爱等利用可溶性蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳对26个木霉菌株进行特征性图谱分析,结果表明,木霉可溶性蛋白质电泳图谱种内基本一致,种间差异显著,但仍有个别菌株不能很好地归类^[10]。早期戴芳澜^[11]记载我国木霉属真菌4个种,分别是白色木霉[*T. album*(*T. polysporum*)]、粉绿木霉[*T. glaucum*(*T. aureoviride*)]、木素木霉[*T. lignorum*(*T. viride* Pers.)]和亚木霉(康氏木

收稿日期:2011-04-06 修回日期:2011-06-29

基金项目:“十一五”广西林业科技项目“广西主要人工林生态功能研究”(桂林科字[2009]第1212号);中国林科院热带林业实验中心主任基金项目“热带南亚热带人工林土壤微生物种群多样性及微生物量碳、氮研究”。

作者简介:于浩龙,男,硕士,主要从事森林生态学研究。

* 通讯作者:卢立华,男,高级工程师,主要从事森林生态学研究。

霉);文成敬^[12]等对中国西南地区的木霉属进行了分类研究,鉴定并描述了9个集合种;章初龙^[13-14]等简要报道了我国木霉菌16个种,并提出了2个可能为新种的菌株;ZHAO Z. H.^[15]等简要报道了东北保护地土壤中木霉菌11个种,但没有种的具体描述。广西地处热带亚热带,地域辽阔,水热条件优越,地形地貌复杂,植被类型多样,林区枯枝落叶层深厚、湿度大,十分适宜木霉等真菌生长发育,菌类资源极为丰富^[16]。作为一种重要的自然资源,目前广西对木霉菌资源的调查和分类研究比较少。为此,本研究以广西不同林分类型的林区木霉菌资源调查为切入点,旨在了解该区域林分类型对木霉菌的种类及分布特征的影响,为探索广西林区木霉菌资源的多样性及开发利用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 土样采集

在广西(河池市的罗城和金城江、桂林市的永福和兴安、柳州市三江和融水、百色市的田林和乐业、南宁市和凭祥市)林区选取不同林分类型的林地,包括杉木林、马尾松林、竹林、桉树林、阔叶林(主要树种为米老排)和混交林(主要为常绿阔叶树种混交)6种林分类型。每种林分分不同海拔,不同的土层深度取样(先去掉0~5 cm 表层土,按机械分层分为5~10 cm、10~20 cm、20~50 cm 3个层次取样)。将采集的土样置于4℃冰箱中保存备用。

1.2 木霉菌分离

木霉菌的分离采用稀释涂抹平板法^[14],将采集土样过2 mm 筛后制成一系列土壤悬浮液,用PDA培养基(加入链霉素)进行培养分离。

1.3 木霉菌株鉴定

采用直接从PDA培养基上挑取孢梗丛制片法鉴定。经初步筛选,将待鉴定菌株置于PDA培养基上纯化,并放入25℃恒温箱中培养。待菌落产生孢子梗丛束而又未变为深绿前,挑取分生孢子梗丛束制片,观察分生孢子梗形态;大约培养10~14 d后,挑取分生孢子制片,观察孢子大小和形态。按GAMS W.^[17]等分类系统和C. M. Kullnig-Gradinger^[18]等研究成果进行分类鉴定。

1.4 不同林分木霉菌资源调查数据分析

数据处理通过Excel软件和SPSS18.0统计软件完成。采用One-way ANOVA进行方差检验,LSD检验进行多重比较分析。分离率=(分离出木霉菌平板数/涂抹平板数)×100%

2 结果与分析

从广西林区6种林分中共分离鉴定出木霉菌11个种,分别是深绿木霉、绒状木霉、长枝木霉、棘孢木霉、桔绿木霉、康氏木霉、哈茨木霉、黄绿木霉、绿色木霉、螺旋木霉、钩状木霉。

2.1 木霉菌11个种的主要形态特征对比

长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum* Rifai)孢子较大,3.8~5.1(4.3) μm×2.3~2.8(2.6) μm,近椭圆形,新分离的孢子往往要大些。*T. longibrachiatum*的分生孢子梗分枝比较稳定和明确。它的分枝要比这一组的*T. citrinoviride* Bissett 和*T. pseudokoningii* Rifai简单,分枝更稀少,但比木霉组的深绿木霉(*T. atroviride* P. Karsten)复杂。*T. longibrachiatum* Rifai的瓶梗在分生孢子梗上大多单生。

与其他种相比,桔绿木霉(*T. citrinoviride* Bissett)分生孢子较小,通常不大于3.5 μm×2.4 μm,瓶梗短小,基部缢缩。桔绿木霉的分生孢子梗结构与拟康氏木霉相似,和长枝木霉相比,桔绿木霉的分枝要复杂些。

绿色木霉(*Trichoderma viride* Pers.)的典型特征是分生孢子壁具有很明显的疣状突起,分生孢子近球形,4.0~4.8 μm×3.5~4.2 μm;不规则分枝的分生孢子梗;钩状至弯曲的、常常单生的瓶梗。而与*T. viride* Pers. 同组的木霉菌(*T. asperellum* Samuels)的分生孢子壁具有细微的棘状突起,近球形至倒卵形,分枝一致,瓶梗直。绿色木霉主要分布在温带地区,其适宜温度较低20~25℃,30℃以上不生长。

棘孢木霉(*Trichoderma asperellum* Samuels)最明显的特征是分生孢子壁具有细微的棘状突起,大小3.4~6.3 μm×3.0~5.2 μm,近球形至倒卵形,分枝一致,瓶梗直,而同组与其相似的绿色木霉的分生孢子壁有明显的疣状突起,近球形,有不规则分枝的分生孢子梗及钩状至弯曲的、常常单生的瓶梗。绿色木霉分布在温带,其适温较低,20~25℃,30℃以上不生长。棘孢木霉的最适温度为30℃。

深绿木霉(*Trichoderma atroviride* P. Karsten)分生孢子梗简单,孢子较大,4.2~6.6 μm×2.7~3.9 μm,颜色深绿。深绿木霉的分生孢子梗分枝方式、瓶梗形状大小与同组的真菌(*T. viride* Pers.)、*T. asperellum* Samuels相似,但*T. atroviride* Rifai分生孢子光滑,而*T. viride* Pers. 、*T. asperellum* Samuels的分生孢子有纹饰。但与

T. harzianum Rifai 的分生孢子相似,两者的区别在于分生孢子梗,并且 *T. harzianum* Rifai 的生长适温较高。深绿木霉的有性型生长在腐朽的硬木上,而无性型则常见于土壤。已知的有性型只从美国、中美洲和欧洲分离到,无性型则是世界性分布。

钩状木霉(*Trichoderma hamatum* Bon.)培养物具有明显的瘤状突起,由于其孢子梗主轴具有不育的延伸丝,次级分枝粗短瓶梗粗短而拥有典型特征,容易识别;分生孢子绿色,光滑,椭圆形, $3.1\sim4.3\text{ }\mu\text{m}\times2.2\sim3.3\text{ }\mu\text{m}$ 。该种木霉具有较强的重寄生作用。*T. hamatum* Bon. 与同具不育延伸丝的 *T. pubescens* 相比,后者分生孢子堆无色或白色,而 *T. hamatum* Bon. 为绿色,与刺状木霉(*T. erinaceum*)相比,后者在 35°C 时生长大于 30 mm ,而 *T. hamatum* Bon. 在 35°C 时不生长。

康氏木霉(*Trichoderma koningii* Oud.)常见于土壤和腐烂的有机物,与 *T. harzianum* Rifai、*T. atroviride* P. Karsten、*T. viride* Pers.、*T. asperellum* Samuels 等近似种比较,*T. koningii* 的显著特征是形成长方形至窄椭圆形的分生孢子,大小约 $3.5\sim5.4(4.6)\text{ }\mu\text{m}\times2.4\sim3.3(2.6)\text{ }\mu\text{m}$ 。在分枝繁多、分枝系统似金字塔的 3 个木霉种中,*T. koningii* Oud. 以较大而椭圆、甚至长方形的分生孢子容易与 *T. harzianum* Rifai、*T. aureoviride* Rifai 区别。

黄绿木霉(*Trichoderma aureoviride* Rifai)与 *T. harzianum* Rifai 和 *T. koningii* Oud. 一样具有复杂的分枝系统,但黄绿木霉的分生孢子倒卵形,且菌落反面变成污黄色或黄褐色。分生孢子壁光滑,倒卵形,基部平截,淡黄绿色, $2.4\sim3.4\text{ }\mu\text{m}\times1.9\sim2.4(2.3)\text{ }\mu\text{m}$ 。*T. harzianum* Rifai 和 *T. koningii* Oud. 由于不产生色素,菌落反面不改颜色,这 2 个种的分生孢子形状也与 *T. aureoviride* Rifai 不同。

哈茨木霉(*Trichoderma harzianum* Rifai)是木霉属内最常见的一种,广泛分布于土壤中^[19]。哈茨木霉对许多病原真菌具有较强的拮抗作用,对其用于植物病理生物防治的可能性已进行了大量的研究,它在生物防治中的地位不容忽视。与绿色木霉、棘孢木霉相比,哈茨木霉的分生孢子壁光滑, $2.8\sim3.2\text{ }\mu\text{m}\times2.5\sim2.8\text{ }\mu\text{m}$,而绿色木霉、棘孢木霉的分生孢子壁粗糙。与深绿木霉(*T. atroviride* P. Karsten)相比,*T. harzianum* Rifai 生长适温较宽,生长速度快,在 35°C 能生长良好。而 *T. atroviride* P. Karsten 在 35°C 生长受抑制,且生长速度较慢。

螺旋木霉(*Trichoderma spirale* Bissett)在培养皿边缘形成紧密的瘤状突起,并在体视显微镜下

可见明显的螺旋状不育延伸丝是其区别于其他木霉的最大特征。

绒状木霉(*Trichoderma velutinum* Bissett)与哈茨木霉相似,都能产生致密的瘤状突起,两者的区别在于孢子的大小,绒状木霉孢子约 $2.1\sim2.7\text{ }\mu\text{m}\times1.4\sim2.4\text{ }\mu\text{m}$,而哈茨木霉的分生孢子较大。

2.2 不同林分类型木霉菌的分布情况

从表 1 中看出,哈茨木霉出现频率最高,在各种林分都存在,说明哈茨木霉是优势种;出现频率最低的是螺旋木霉和绒状木霉,出现频率均为 16.7% 。在杉木林、米老排、马尾松林 3 种林分里存在的木霉种类相差不大,竹林林分中培养出的木霉种类最少,仅为 4 种;出现种类最多的是混交林。从表 1 中还可以看出,大部分的木霉可以普遍的培养出来,适应环境力比较强;而有一部分种类的木霉很少出现,其原因有待于进一步的研究。6 种林分中,混交林有机质丰富,土壤中有机质、纤维素等含量高,木霉出现频率均高于其他林分。

表 1 不同林分中木霉种类的分布

Table 1 The distribution of *Trichoderma* in different forest types

木霉种类	杉木林	米老排	马尾松林	竹林	混交林	桉树林	出现频率/%
长枝木霉	+	+	+	+	+	-	83.3
桔绿木霉	-	+	+	-	+	+	66.7
绿色木霉	+	+	-	-	+	-	50.0
棘孢木霉	-	+	+	-	+	+	66.7
深绿木霉	+	+	+	-	+	-	66.7
钩状木霉	-	-	+	+	+	-	50.0
康氏木霉	+	+		+	+	-	66.7
黄绿木霉	+	+	+	-	+	+	83.3
哈茨木霉	+	+	+	+	+	+	100.0
螺旋木霉	-	-	-	-	-	+	16.7
绒状木霉	-	-	-	-	-	+	16.7
合计/种	6	8	7	4	9	6	

注:表中“+”代表有,“-”代表无。

2.3 不同林分类型木霉菌的分离情况

从图 1 中看出,不同林分类型的木霉的分离率有以下特点:方差分析 6 种林分木霉菌分离率差异极显著($P<0.01$),混交林的木霉分离率最高,达到 41.3% ;其次为米老排和杉木林;桉树林的木霉分离率最低,只有 14.0% 。

LSD 多重比较表明,杉木林与混交林之间存在显著性差异;米老排与马尾松林、竹林之间存在显著性差异,与桉树林之间存在极显著性差异;马尾松林与米老排之间存在显著性差异,与混交林之间存在极显著性差异;竹林与米老排之间存在显著性差异,与混交林之间存在极显著性差异;混交林与杉木林之间存在显著性差异,与马尾松林、桉树林、竹林之

间存在极显著差异;桉树林与米老排、混交林之间存在极显著性差异。

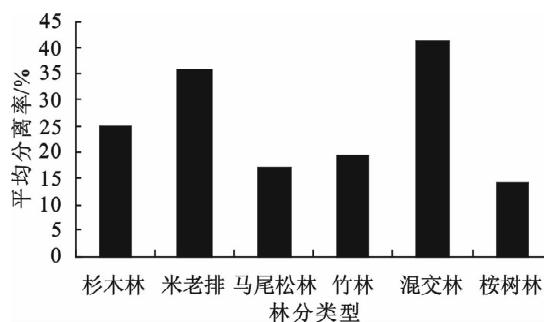


图 1 不同林分类型下木霉菌平均分离率

Fig. 1 Average isololation rates of *Trichoderma* in different forest types

2.4 海拔高度对木霉菌种群分布的影响

从图 2 可以看出,广西林区海拔 100~2 100 m 范围内,不同海拔之间的林地木霉菌的分离率有以下特点:木霉菌平均分离率随着海拔的升高几乎没有变化,方差分析海拔对木霉菌的影响差异不显著 ($P>0.05$)。总的来说林地木霉菌分离率在各个海拔都比较高。说明海拔对木霉的丰富度影响不大。

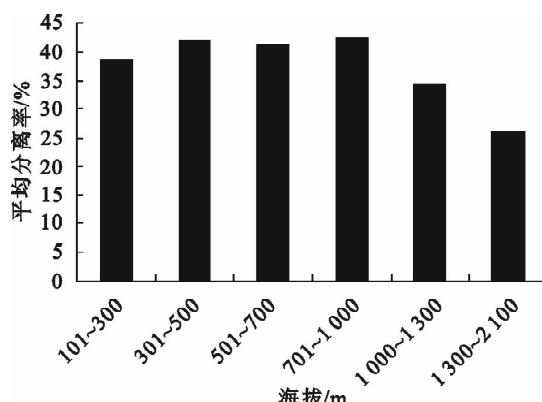


图 2 不同海拔木霉菌分离率

Fig. 2 Isolate rates of *Trichoderma* in different altitudes

3 结论与讨论

对广西林区 6 种林分类型林地木霉菌资源调查结果可知,广西林区木霉菌资源极其丰富,在各种林分中都能够分离到。在所鉴定出的 11 种木霉中,哈茨木霉是出现频率及分离率最高的种,有研究表明,哈茨木霉是木霉属内最常见的一个种,广泛分布于土壤中^[19]。而螺旋木霉和绒状木霉的出现频率最低,原因可能是这 2 种木霉对环境条件要求比较苛刻,但具体原因有待于进一步的研究。6 种林分中,混交林下枯枝落叶多,有机质丰富,水肥充足,为木霉菌的生存提供了有利的环境条件,所以混交林木霉种类及分离率都是最高,说明了混交林对保护木霉菌的生物多样性有很好的作用。分离率最低的为

马尾松林和桉树林。在松树林下,林下植被少,枯枝落叶多为松针及松枝、含有松油等难于分解的物质,并且其分解物中可能分泌了某种物质抑制了木霉菌的生长,从而造成了木霉丰富度低。桉树林一直是争议比较大的一个树种^[20],其原因仍有待于深入的研究。从海拔对木霉的影响来看,木霉对海拔高度要求不是很严格,在所研究的海拔高度范围内,木霉基本没有太大的差别。

从形态学上对木霉菌进行分类鉴定,是鉴定木霉菌株的一种有效方法,一些常见菌株完全可以通过形态学加以识别。但有的菌株存在很大的变异性,有的菌株在人工培养基中很难被培养,所以单靠形态学方法很难全部鉴定,且准确度不是很高,这就需要借助于分子系统学的手段和方法对木霉进行更加全面的分析,从而筛选出更多有利的木霉菌株^[21-24]。

本研究仅仅从木霉菌资源的物种多样性去探索了广西林区木霉菌的存在情况,从 6 种林分类型中共分离出 11 种木霉,与国内已报道的种相同^[8-15]。木霉菌的更深入研究应结合于其生物学及其生物防治机制等方面,从而为该真菌的开发利用提供更可靠的依据。

参考文献:

- [1] DOMSCH K H, GAMS W, ANDERSON T H. Compendium of soil fungi [M]. London: Academic press, 1980: 794-809.
- [2] KUBICEK C P, EVELEIGH D E, ESTERBAUER H, et al. *Trichoderma reesei* Cellulases: Biochemistry genetics physiology and application [C]//SENIOR D J. Production and application of xylanases from *Trichoderma harzianum*. Vienna: Royal Society of Chemistry, 1990: 47-60.
- [3] SEABY D A. Infection of mushroom compost by *Trichoderma* species [J]. Mushroom Journal, 1987, 179: 355-361.
- [4] SEABY D A. Differentiation of *Trichoderma* taxa associated with mushroom production [J]. Plant Pathology, 1996, 45(5): 905-912.
- [5] YEDIDIA I, BENHAMOU N, KAPULNIK Y, et al. Induction and accumulation of PR proteins activity during early stages of root colonization by the mycoparasite *Trichoderma harzianum* strain T-203 [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2000, 38(11): 863-873.
- [6] YEDIDIA I, SHORESH M, KERERN Z, et al. Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) accumulation of phytoalexins [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(12): 7343-7353.
- [7] KUHLS K, LIECKFELDT E, BORNER T, et al. Molecular reidentification of human pathogenic *Trichoderma* isolates as *Trichoderma longibrachiatum* and *Trichoderma citrinoviride* [J]. Med. Mycol., 1999, 37(1): 25-33.

- [8] REHNER S A, SAMUELS G. Molecular systematics of the Hypocreales: a teleomorph gene phylogeny and the status of their anamorphs[J]. *Canad. J. Bot.*, 1995, 73(Supp. 1): 816-823.
- [9] 唐嘉义,王家和,杨福惠,等.云南大围山自然保护区木霉菌多样性与RAPD分析[J].*微生物学杂志*,2002,22(4):9-19.
- [10] 陈建爱,王未名,陈为京,等.木霉可溶性蛋白电泳分析[J].*中国生物防治*,1999,15(2):77-80.
- CHEN J A, WANG W M, CHEN W J, et al. Preliminary analysis on gel electrophoresis of *Trichoderma*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 1999, 25(2): 77-80. (in Chinese)
- [11] 戴芳澜.中国真菌总汇[M].北京:科学出版社,1979.
- [12] 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.
- WEN C J, TAO J F, CHEN W R. Studies on the taxonomy of the genus trichoderma in southwestern China[J]. *Acta Mycologica Sinica*, 1993, 12(2): 118-130. (in Chinese)
- [13] 章初龙,徐同.我国河北、浙江、云南及西藏木霉种记述[J].*菌物学报*,2005,24(2):184-192.
- ZHANG C L, XU T. Records of *Trichoderma* species from hebei, Zhejiang, Yunan and Tibet of China [J]. *Mycosistema*, 2005, 24(2): 184-192. (in Chinese)
- [14] 章初龙,徐同.木霉属分类研究进展[J].*云南农业大学学报*,2000,15(3):269-273.
- ZHANG C L, XU T. Development of the research of classification of *Trichoderma* Pers. [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2000, 15(3): 269-273. (in Chinese)
- [15] ZHAO Z H, SUN X D, YANG R X, et al. Diversity of *Trichoderma* in greenhouse soil[J]. *Journal of Zhejiang University: Agric. & Life Sci.*, 2004, 30(4): 467.
- [16] 于浩龙,韦继光,苏小兰.广西北部林区木霉菌资源初探[J].*广西农业科学*,2010,41(7):703-706.
- [17] GAMS W, BISSETT J. Morphology and Identification of *Trichoderma* [C]// KUBICEK C P, HARMAN G E. *Trichoderma and Gliocladium*, volume 1 basic biology, taxonomy and genetics. London: Taylor & Francis Ltd., 1998:3-34.
- [18] KULLNIG-GRADINGER C M, SZAKACS G, KUBICEK C P. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multi gene approach[J]. *Mycol. Res.*, 2002, 106(7): 757-767.
- [19] RIFAI M A, WEBSTER J. A revision of the genus *Trichoderma*[J]. *Mycol Pap.*, 1969, 116: 1-56.
- [20] 温远光,刘世荣,陈放.连栽对桉树人工林下物种多样性的影响[J].*应用生态学报*,2005,16(9):1667-1671.
- WEN Y G, LIU S R, CHEN F. Effects of continuous cropping on understorey species diversity in *Eucalypt* plantations [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(9):1667-1671. (in Chinese)
- [21] MACH R L, ZEILINGER S, KRISTUFEK D, et al. Ca²⁺-calmodulin antagonists interfere with xylanase formation and secretion in *Trichoderma reesei*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, 1403: 281-289.
- [22] MACH R L, ZEILINGER S. Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*[J]. *Applied Microbiological Biotechnology*, 2003, 60: 515-522.
- [23] SEIBOTH B, HAKOLA S, MACH R L, et al. Role of four major cellulases in triggering of cellulose gene expression by cellulose in *Trichoderma reesei*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(17): 5318-5320.
- [24] MUKHERJEE P K, LATHA J, HAOAR R, et al. Role of two G-protein alpha subunits, TgaA and TgaB, in the antagonism of plant pathogens by *Trichoderma virens*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 542-549.