

土壤中山核桃干腐病抑制菌的筛选和鉴定

田甜¹, 沈振明², 徐秋芳¹, 刘卜榕¹

(1. 浙江农林大学 环境与资源学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省临安市林业技术服务总站, 浙江 临安 311300)

摘要: 为了从土壤中筛选具有抑制山核桃 *Carya cathayensis* 干腐病菌的微生物, 运用平皿对峙法从土壤中初筛得到对山核桃干腐病菌葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 具有拮抗作用的菌株 5 株, 对峙培养发现菌株 QZ2 和 QZ8 抑菌效果显著, 对峙试验显示 QZ2, QZ8 与病原菌之间有明显的抑菌圈, 且 QZ2 孢子能完全覆盖在病原菌上生长而病原菌生长停止。通过形态特征观察及 ITS 序列分析, 菌株 QZ2 被鉴定为棘孢木霉 *Trichoderma asperellum*, 主要通过重寄生以达到控病的效果; 菌株 QZ8 为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*, 主要通过代谢产生的抗菌素起作用。QZ2 和 QZ8 是山核桃干腐病的潜在生防菌。图 7 参 13

关键词: 森林保护学; 山核桃干腐病; 抑制菌; 筛选鉴定; ITS 序列分析

中图分类号: S763 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2012)01-0058-07

Screening and identification of inhibiting strains for *Carya cathayensis* canker disease

TIAN Tian¹, SHEN Zhen-ming², XU Qiu-fang¹, LIU Bo-rong¹

(1. School of Environmental and Resource Sciences, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China;
2. Forest Technology Service General Station of Lin'an City, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: The objective of this paper was to get a few of available inhibiting strains against *Carya cathayensis* canker disease. Inhibition assay was used to preliminarily screen strains from soils that inhibited *Botryosphaeria dothidea*, the pathogen of *Carya cathayensis* canker disease. Then, phenotypic characteristics and analysis of internal transcribed spacer (ITS) fragments were used to identify the strains. Results of the preliminary screening revealed five strains. After being cultured against pathogen, two of five strains, QZ2 and QZ8, exhibited inhibiting capability with apparent inhibition zones between the pathogen and strains QZ2 and QZ8 being observed. Spores of strain QZ2 finally covered the pathogen completely with pathogen growth ceasing. QZ2, which controlled the canker disease by parasitizing the disease strain, was identified as *Trichoderma asperellum*. Strain QZ8, which inhibited disease pathogen growth by creating antibiotics, was identified as *Penicillium oxalicum*. It can be concluded that QZ2 and QZ8 are potential strains for development of bio-controller against *Carya cathayensis* canker disease. [Ch, 7 fig. 13 ref.]

Key words: forest protection; *Carya cathayensis* canker disease; inhibiting strain; screening and identification; internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis

山核桃 *Carya cathayensis* 是一种营养和经济价值极高的林业作物, 全国面积达 4.0 万 hm², 主要分布在浙江、安徽、湖北和湖南等省, 其中浙江省山核桃栽培面积为 3.1 万 hm², 而主产区临安市现有面积 2.7 万 hm², 年产值达数亿元, 是产区林农致富的支柱产业。近年来, 山核桃干腐病在浙江省临安、淳

收稿日期: 2011-04-22; 修回日期: 2011-05-20

基金项目: 浙江省研究生创新科研基金资助项目(YK2008074)

作者简介: 田甜, 硕士, 从事土壤生物学研究。E-mail: tiantian86915@126.com。通信作者: 徐秋芳, 教授, 博士, 从事土壤生物学及森林生态学等研究。E-mail: xuqiufang@zafu.edu.cn

安、桐庐等地山核桃栽培区普遍发生，个别地区受害严重，发病率达 80% 以上，病株上少则几个病斑，最严重的病斑可达数百个，造成枝枯和整株树木死亡^[1]。2007 年，淳安县发生有史以来最严重的干腐病，个别地区发病率达 80%~100%，严重影响山核桃的产量和经济持续发展。山核桃干腐病又叫溃疡病、墨汁病、黑水病，主要引起树皮溃疡，初期在树皮上出现黄褐色、水渍状、近圆形或不规则形病斑。随着病情的发展，病斑逐渐扩展呈黑色，树皮微突。目前主要通过喷淋乙蒜素乳油和 950 g·kg⁻¹ 硫酸铜晶体来防治该病^[2]，但实际效果不佳。由于药剂防治引起环境污染和农产品安全问题的日益突出，近年来，人们对生物防治方法的探索不断加强。目前，有很多优良的菌株已经应用于生产实践，例如由美国 Gustafson Ltd 公司和 Microbio CO., Ltd 公司开发的 GBO3 和 MB I600 菌株，用于根部施用或拌种可防 *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp. 和 *Rhizoctonia* spp. 引起的豆类、麦类、棉花 *Gossypium* spp. 和花生 *Arachis hypogaea* 根部病害^[3]。土壤是陆地上微生物资源最丰富的生态系统。本试验试图通过对不同土壤微生物的分离纯化与培养，筛选出对山核桃干腐病原菌具有较强抑制作用的抑制菌，并通过分子手段对菌株进行初步鉴定，为山核桃干腐病的生物防治提供理论依据和目标菌株。

1 材料与方 法

1.1 供试培养基

菌株分离和培养用的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基、马丁氏培养基、高氏 2 号培养基均按照文献[4]中提供方法配制。

1.2 菌株筛选和分离

1.2.1 病原菌菌株的分离培养和致病性检测 将病枝用自来水冲洗，剥下带病斑的皮层。将剥下的皮层放于倒有乙醇的小烧杯内消毒 1 次。再将带病斑皮层放于 1.0 g·kg⁻¹ 升汞作表面消毒 1 min。倾出消毒液，用无菌水冲洗 2~3 次。将树皮剪成 2~3 mm 大的方块，挑取树皮 4~5 块，置于 PDA 培养基(病斑组织接触培养基)后于 28 ℃ 条件下培养。3~4 d 后挑选典型无杂菌的单菌落，用接种环挑取部分菌落在 PDA 培养基平板上划线然后培养，得纯化的菌株。纯化培养后的菌株进行致病试验。将分离到的纯化菌株分别涂到健康的山核桃树干上，出现黑色病斑的菌株确定为山核桃干腐病的病原菌，将此单菌落斜面 4 ℃ 保存，用于抑制菌筛选实验和分子鉴定。

1.2.2 抑制菌菌株的初筛和纯化 从土壤中分离筛选抑制菌。采集了天目山国家级自然保护区不同林区、临安高虹雷竹 *Phyllostachys praecox* 林土样共 12 个，衢州退化红壤植被恢复试验区马尾松 *Pinus massoniana*，湿地松 *Pinus elliottii*，杉木 *Cunninghamia lanceolata*，茶叶 *Camellia sinensis* 等不同植被下的表层土样 30 个。对每个土样采用稀释平板法进行真菌和放线菌的分离培养，将获得的不同形态的菌株编号后分别转接至涂布有病原菌菌液的 PDA 平板上进行生长对峙试验，各个平板上放 4~5 个不同菌株，28 ℃ 培养 2~3 d 后，初筛出单菌落周围有抑菌圈的菌株，纯化、保存后用于进一步的抑制效果试验。

1.2.3 抑制菌菌株的复筛试验 处理 1：将病原菌和纯化的初筛菌株分别于 PDA 平板上培养 3 d 后打圆饼(直径为 1 cm)，将 1 个病原菌菌饼和 2 个目标抑制菌菌饼同时放入 PDA 培养基上，病原菌菌饼置于皿中央，2 个抑制菌菌饼分别置于距病原菌 2 cm 的左右两侧，28 ℃ 培养。观察其对峙生长和抑制情况。处理 2：将病原菌打圆饼状先接种于 PDA 培养基，菌饼置于皿一侧，28 ℃ 培养 2 d 后，接入 1 个(置于距病原菌 2.5 cm 的位置)或 2 个抑制菌菌饼(此时 3 个菌饼在培养皿内呈三角放置)，28 ℃ 培养。观察记录其对峙生长和抑制情况。

1.3 病原菌及抑制菌的分子鉴定

1.3.1 DNA 的提取 将纯化好的供试菌株在 PDA 培养基上培养 4~6 d，用接种铲取部分菌体放入研钵中，加液氮进行研磨，研磨好的菌体置于 1.5 mL 离心管，采用杭州浩基生物科技有限公司的真菌提取试剂盒来提取真菌总 DNA。

1.3.2 目标序列的扩增(PCR) 利用真菌的通用引物 ITS1(internal transcribed spacer-1)和 ITS2 对基因组 DNA 的 ITS1 区(18 S 和 5.8 S rRNA 之间的转录间隔区)进行聚合酶链反应(PCR)扩增。真菌核糖体基因的通用引物 ITS1 和 ITS2 由上海生工生物工程技术有限公司合成。ITS1 和 ITS2 的序列分别为：ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')；ITS 2 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')。PCR 反应体系(50 μL)

如下: 5.0 μL 的 $10 \times \text{Taq}$ 缓冲溶液(预混 Mg^{2+}), 4.0 μL 的 dNTP 混合物($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$), ITS1($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和 ITS2($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1 μL , 0.25 μL Taq DNA 聚合酶($5 \times 16.67 \text{ mkat} \cdot \text{L}^{-1}$), 2 μL 的模板 DNA, 36.752 μL 灭菌去离子水。PCR 程序设置: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 总共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物在含有 gold view 染色剂(100 mL 琼脂糖凝胶中加 5 μL)的 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳(电压 90 V, 时间 30 min)分离后, 通过凝胶成像仪(BIO-RAD)显示记录电泳结果。

1.3.3 PCR 产物的回收与克隆 采用 MO BIO 公司的 Ultra Clean GelSpin DNA purification Kit 回收试剂盒进行割胶回收, 采用 Takara 生物技术有限公司的 pMDTM18-T Vector 试剂盒进行连接。连接反应物采用热激法转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 利用含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的羧苄青霉素 LB 固体培养基筛选阳性克隆, 通过琼脂糖凝胶电泳检测目的片段是否被插入对阳性克隆进行鉴定。

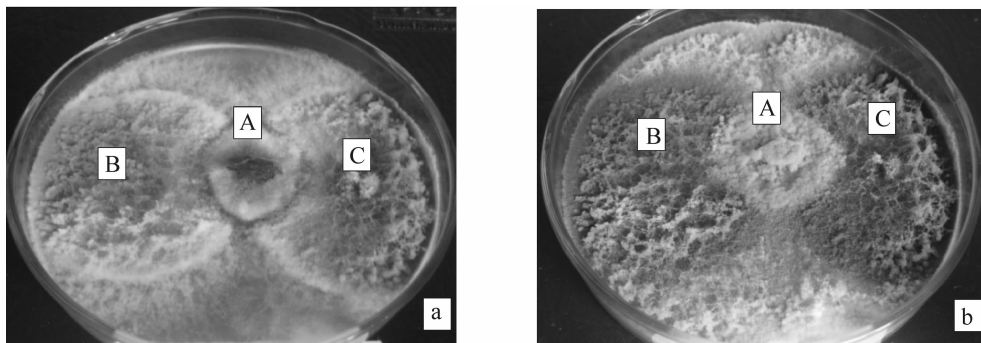
1.3.4 内转录(ITS)序列测定以及序列同源性分析 将上述筛选获得的阳性菌株菌液用作测序。序列测定由上海生工生物工程技术有限公司完成。利用 BLAST 进行序列比对, 筛选出碱基序列相似度高及菌株性状相近的菌种, 进行株系之间遗传距离聚类分析。

2 结果与分析

2.1 土样抑制菌的分离筛选

从供试土样中共得到具有抑制作用的菌株 5 个, 其中 3 个为来自衢州红壤的马尾杉林样地的真菌菌株, 编号分别为 QZ2, QZ8 和 QZ15; 2 个为来自天目山国家级自然保护区杉木林土样的放线菌, 编号为: TMS3 和 TMS7。对初筛的 5 个菌株进行进一步的抑制试验。结果发现: QZ2 和 QZ8 的抑制效果显著, 而其余 3 个菌株抑制效果不明显。

2.1.1 抑制菌株 QZ2 的抑制效果 处理 1 抑制试验结果见图 1。将纯化后的抑制菌与病原菌打饼同时接入 PDA 培养基。图 1 显示 QZ2 对病原菌生长具有明显的抑制作用, 且 QZ2 的生长速度快于病原菌。图 1b 为培养 4 d 的结果, 此时病原菌已被抑制菌的孢子完全覆盖。处理 2 抑制试验结果见图 2。病原菌先接入培养 2 d 后再接入抑制菌 QZ2, 病原菌和抑制菌对峙生长。第 6 天时抑制菌的孢子已扩散到病原菌上, 并长出白色菌丝, 较早扩散到病原菌区(其左侧)的抑制菌已形成绿色孢子。第 8 天时, 几乎所有的病原菌区已被绿色孢子覆盖。处理 2 试验很好地重现了处理 1 的结果, 进一步表明 QZ2 对病原菌生长的抑制作用。为了检验 QZ2 抑制效果, 确定病原菌是否被抑制菌杀死, 轻轻地将覆盖在病原菌区的绿色孢子刮去, 然后收集 1 g 左右的病原菌的菌丝和孢子, 用无菌水溶解, 稀释 10 , 10^2 , 和 10^3 倍后, 涂板及划线培养 3 d。结果表明: 不同稀释倍数均只有抑制菌生长而没有病原菌生长, 说明病原菌已被抑制菌杀死。

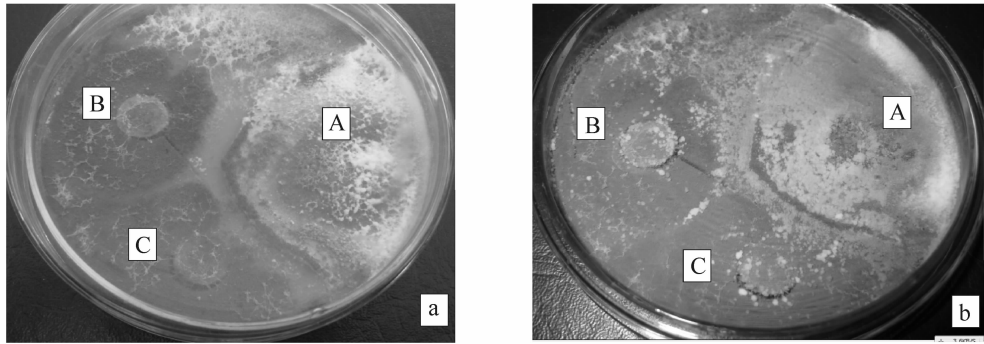


A为原病菌, B和C为抑制菌QZ2

图 1 抑制菌 QZ2 与病原菌对峙培养 3 d(a)和 4 d(b)的照片

Figure 1 Results of co-culture of inhibiting strains QZ2 and pathogen fungi for 3 d (a) and 4 d (b)

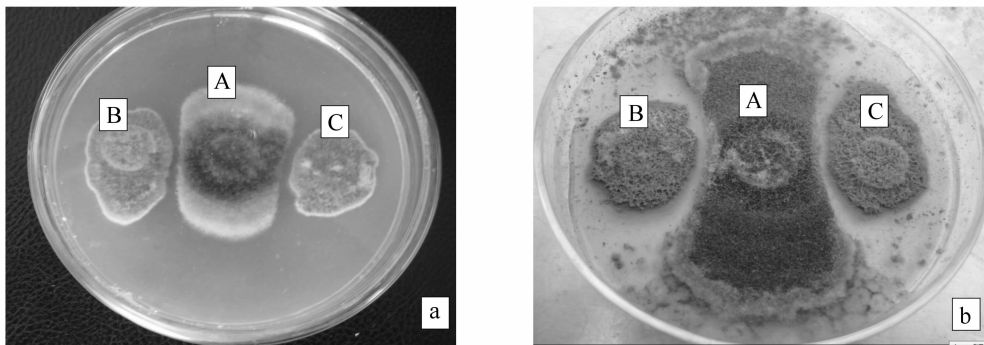
2.1.2 抑制菌株 QZ8 的抑制效果 处理 1 抑制试验结果见图 3, 将纯化后的抑制菌和病原菌同时接入 PDA 培养基。QZ8 生长速度较慢, 对峙培养 4 d 和 6 d 结果表明(图 3): QZ8 具有抑制病原菌生长的作用。



A为原病菌，B和C为抑制菌QZ2

图 2 病原菌先接入 2 d 后与抑制菌 QZ2 对峙培养 6 d(a)和 8 d(b)的照片

Figure 2 Results of co-culture of inhibiting strains QZ2 and pathogen fungi which was cultivated 2 d beforehand for 6 d (a) and 8 d (b)

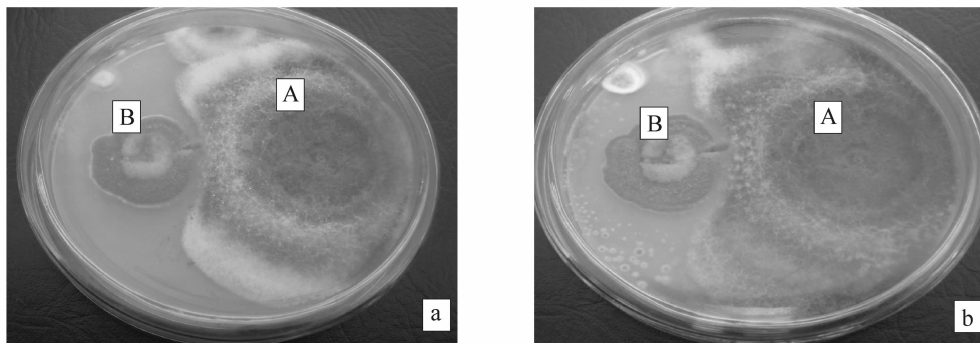


A为原病菌，B和C为抑制菌QZ8

图 3 抑制菌 QZ8 与病原菌对峙培养 4 d(a)和 6 d(b)的照片

Figure 3 Results of co-culture of inhibiting strains QZ8 and pathogen fungi for 4 d (a) and 6 d (b)

图 3b 显示随着培养时间延长，QZ8 孢子会逐渐布满平皿，但是却未能完全覆盖病原菌，显示了其与 QZ2 的不同抑菌方式。处理 2 抑制试验结果见图 4。病原菌先接入培养 2 d 后再接入抑制菌 QZ8，病原菌和抑制菌对峙生长。第 6 天时，除病原菌和抑制菌 2 个菌斑外，其他位置无菌斑生长，第 8 天时抑制菌的孢子在其左下侧生长，且有的已形成青绿色孢子，而在病原菌上没有长出抑制菌的菌丝和孢子，继续培养观察(3 d)还是没有抑制菌生长的迹象，说明 QZ8 不能在病原菌上生长。



A为原病菌，B为抑制菌QZ8

图 4 病原菌先接入 2 d 后与抑制菌 QZ8 对峙培养 6 d(a)和 8 d(b)的照片

Figure 4 Results of co-culture of inhibiting strains QZ8 and pathogen fungi which was cultivated 2 d beforehand for 6 d (a) and 8 d (b)

2.2 病原菌的鉴定

通过多次消毒处理后培养得到的单菌落种类不多，其中一种为优势菌，不同单菌落纯化培养后涂抹

到健康山核桃树干, 结果仅优势菌使健康的树干发病, 出现典型干腐病的症状, 说明优势菌为病原菌, 编号为 LCTD。

形态观察: LCTD 菌丝初为白色, 培养 2 d 后菌丝体增加, 菌落逐渐变为深灰色甚至黑色, 背面墨绿色, 在 PDA 培养基上产生色素。菌丝有分支, 有横隔。子囊倒棒状, 顶端具乳头状突起。

分子鉴定: 提取病原菌的 DNA, 通过克隆测序得知, LCTD 的目的条带的长度为 583 bp。于 GenBank 数据库中进行同源性搜索, 菌株 LCTD 的 ITS 序列与登录号为 GU138155, FJ493245 和 FJ792585 的葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* 的 ITS 序列的最大相似度达 99%, 与 GenBank 库中相关序列间的系统进化树见图 5。

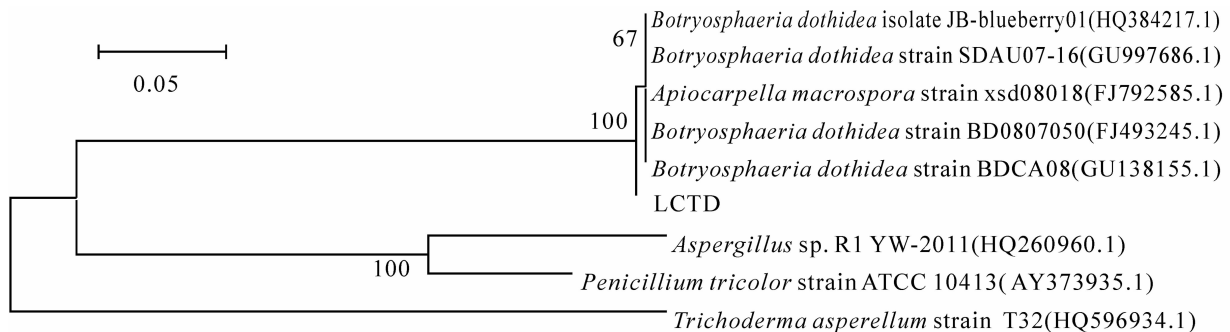


图 5 病原菌的 ITS 序列与 GenBank 库中相关序列间的系统进化树

Figure 5 Phylogenetic tree of pathogen fungi ITS sequences and correlative sequences in GenBank

2.3 抑制菌的鉴定

2.3.1 QZ2 菌株的鉴定 形态观察: QZ2 菌丝体在 PDA 培养基上初为纯白色, 培养 72 h 后开始产生大量翠绿色孢子, 无色素渗出到琼脂培养基上, 无气味。菌丝体生长速度迅速, 菌落背面为白色。菌丝显微形态为具有分枝的丝状体, 孢子梗有 2~3 个分枝, 孢子聚生。分子鉴定: 抑制菌 QZ2 的基因组 DNA 经 PCR 扩增得到单一的目的条带。通过克隆测序得知, QZ2 的目的条带的长度为 603 bp。将测序结果在美国 NCBI 上进行 Blast 比对, 于 GenBank 数据库中进行同源性搜索, 菌株 QZ2 的 ITS 序列与登录号为 HQ596980, HQ596934, HM545083 的棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 的 ITS 序列的最大相似度达 99%, 与 GenBank 库中相关序列间的系统进化树见图 6。结合菌株 QZ2 的 ITS 序列分析结果、培养性状及形态特征, 将菌株 QZ2 鉴定为棘孢木霉 *Trichoderma asperellum*。

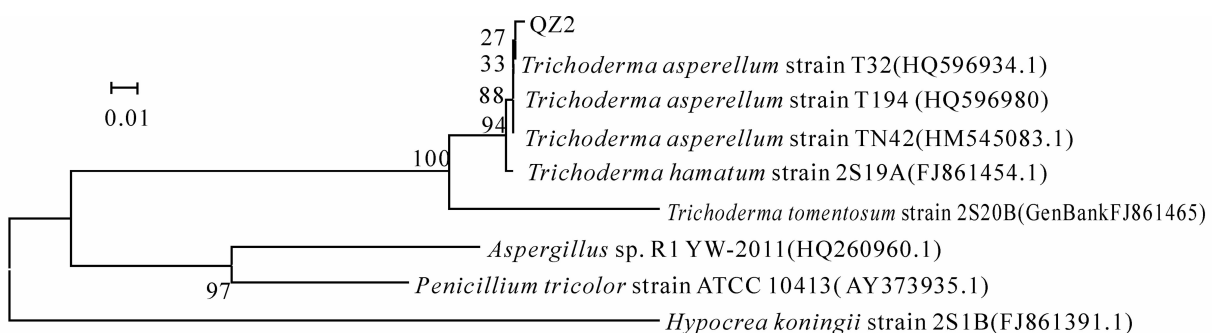


图 6 抑制菌 QZ2 的 ITS 序列与 GenBank 库中相关序列间的系统进化树

Figure 6 Phylogenetic tree of inhibiting strains QZ2 ITS sequences and correlative sequences in GenBank

2.3.2 QZ8 菌株的鉴定 形态观察: QZ8 菌丝体在 PDA 培养基上开始为白色菌丝, 培养 72 h 后开始产生大量青绿色孢子, 无色素渗出到琼脂培养基上, 无气味。菌落背面乳白色。菌丝显微形态为具分枝的丝状体, 为有隔菌丝, 菌丝多次分枝后在孢梗顶端形成典型的帚状分支小梗, 小梗上着生成串分生孢子。分子鉴定: 抑制菌 QZ8 的基因组 DNA 经 PCR 扩增得到单一的目的条带。通过克隆测序得知, QZ8 的目的条带的长度为 591 bp。测序结果在 NCBI 上进行 Blast 比对并进行同源性搜索, 得知菌株 QZ8 的 ITS 序列与登录号为 HM053477 和 FJ977097 的青霉属 *Penicillium* 的 ITS 序列最大相似度达 100% (图 7)。结

合培养性状及形态特征，将菌株 QZ8 鉴定为草酸青霉 *Penicillium oxalicum*。

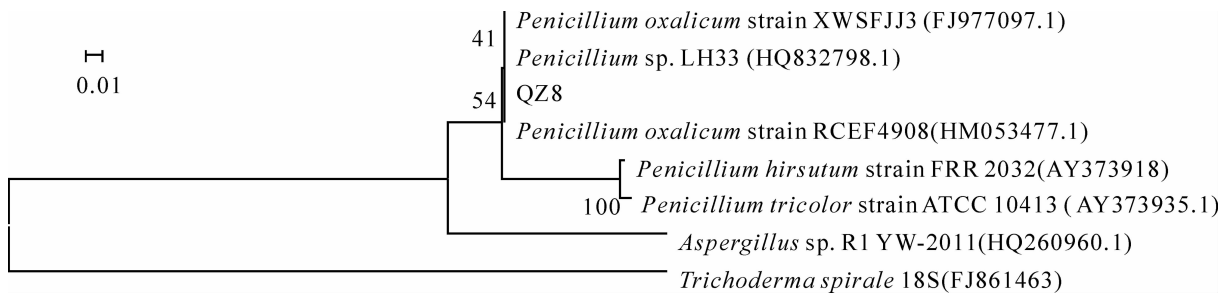


图 7 抑制菌 QZ8 的 ITS 序列与 GenBank 库中相关序列间的系统进化树

Figure 7 Phylogenetic tree of inhibiting strains QZ8 ITS sequences and correlative sequences in GenBank

3 结论与讨论

本研究中山核桃干腐病的病原菌经分子测序后鉴定为葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*。通过从衢州红壤马尾松林土壤中筛选得到 2 株对病原菌具较强抑制作用的真菌：QZ2 和 QZ8，分别鉴定为棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 和草酸青霉 *Penicillium oxalicum*。对峙试验表明：QZ2 可能是通过产生抗菌素和重寄生 2 种方式抑制病原菌生长，QZ8 可能仅是通过分泌抗生物质抑制病原菌生长。

本研究中对山核桃干腐病病原菌的分子鉴定结果与前人报道有所不同，尽管来源与本研究相同，均来自临安的太湖源镇。杨淑贞等^[2]根据病原菌的形态特点将山核桃干腐病菌的有性态鉴定为 *Botryosphaeria fusisporae*，无性态鉴定为 *Macrophoma caryae*。两者的有性态均为葡萄座腔属，但种名不同，这可能是由于形态鉴定与分子鉴定的差异所致。郑宏兵^[5]描述的安徽宁国的山核桃溃疡病的症状与本研究的一致，但其病原菌为 *Dothiorella gregaria*，属于聚生小穴壳菌，可能是不同的病原菌。葡萄座腔菌属 *Botryosphaeria* 真菌是世界范围内存在的病原真菌，由它引起的植物病害在 20 多个国家流行危害，在中国引起多种林木溃疡病的发生，如杨树 *Populus* sp.，核桃 *Juglandis* sp.，柳树 *Salix* sp.，梧桐 *Firmiana simplex*，刺槐 *Robinia pseudoacacia*，苹果 *Malus pumila*，石榴 *Punica granatum*，桃树 *Prunus persica* 以及雪松 *Cedrus* sp.，分布区域十分广泛，病原菌因较大的寄主范围和地理分布区域表现出明显的分子遗传分化^[6]，临安山核桃干腐病是其中之一。

抑制菌 QZ2——棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 在与山核桃干腐病病原菌对峙培养过程中，前期两者互不干涉，形成明显的隔离带(图 1)；后期通过孢子扩散生长覆盖并杀死病原菌(图 2b)。木霉菌抑制机制包括抗生、重寄生、溶菌和竞争等多种作用。对本试验结果进行分析，菌 QZ2 的抑制作用机制可能有 2 种：开始时，可能是产生抗菌素抑制病原菌扩展；后来，扩散到病原菌上的 QZ2 孢子生长，可能是通过重寄生而杀死病原菌。关于木霉菌通过寄生而达到生防效果的报道较多，盾壳霉、木霉等生防菌主要通过寄生核盘菌的菌核使土壤中存活的病原菌菌核数目减少以达到防治菌核病的目的^[7]。哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* T88 菌株和深绿木霉 *T. atroviride* T95 菌株产生的非挥发性代谢物质可以强烈抑制杨树烂皮病菌 *Cytospora chrysosperma* 和杨树水泡溃疡病菌 *Dothiorella gregaria* 的生长：明显降低其菌丝干质量，并具有热稳定性^[8]。关于棘孢木霉的抑制机制研究较少，夏伟等^[9]研究发现：棘孢木霉覆盖立枯丝核菌后，立枯丝核菌不能形成菌核，病原菌菌落逐渐被分解，并发现棘孢木霉发酵液含有某些活性抑菌物质。本研究发现抑制菌 QZ2(棘孢木霉)可以通过寄生来杀死病原菌，因此，具有直接用菌剂作为生防用药的潜力。

抑制菌 QZ8——草酸青霉 *Penicillium oxalicum* 初筛时在病原菌平板上形成明显的抑制菌圈，在与病原菌平板对峙生长过程中，发现 QZ8 和病原菌生长速度相当，两者之间有明显的隔离带，但不像 QZ2 那样覆盖病原菌而生长。据华中农业大学微生物种质及遗传资源保藏和利用中心描述，草酸青霉菌可以分泌能抑制多种真菌生长的抗生物质，至少含有 2 种活性成分。草酸青霉菌可以作为一种生防菌控制几种植物病害，可诱导番茄对萎蔫病产生抗性^[10-11]，利用草酸青霉菌固体发酵物果胶酶可诱发黄瓜对黑星病产生抗性^[12]。杨丽萍^[7]通过 PDA 平板测定实验表明，草酸青霉 PY1 菌株对核盘菌的菌丝有很好的抑制

作用,主要通过产生抑制物质抑制或杀死核盘菌,但是对核盘菌的菌核没有寄生作用。王勇等^[13]通过室内及田间药效试验证明,20%草酸青霉水剂对玉米小斑病有良好的防治效果。结合其他研究者的报道与本实验的结果可知,QZ8的抑制机制可能是产生某种抗菌素。因此,可能通过生物工程方式,发酵制造较高浓度的抗生素,以达到防治山核桃干腐病的目的。

上述研究为木霉菌和青霉菌防治山核桃干腐病的初步报道,有必要对菌株的抑菌机理进行详细研究,开展田间生物防治效果试验。

参考文献:

- [1] 戴胜利. 山核桃枝枯原因及防治[J]. 安徽林业, 2004 (2): 23.
DAI Shengli. Causes of branch blight and its control in hickory [J]. *Anhui For*, 2004 (2): 23.
- [2] 杨淑贞, 丁立忠, 楼君芳, 等. 山核桃干腐病发生发展规律及防治技术[J]. 浙江林学院学报, 2009, 26 (2): 22 - 232.
YANG Shuzhen, DING Lizhong, LOU Junfang, *et al.* Occurrence regularity of *Carya cathayensis* canker disease and its control [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2009, 26 (2): 228 - 232.
- [3] 于淑池. 植物真菌病害生防芽孢杆菌的研究进展[J]. 通化师范学院学报, 2007, 28 (8): 52 - 54.
YU Shuchi. Research review of biocontrol bacillus for plant fungous diseases [J]. *J Tonghua Teach Coll*, 2007, 28 (8): 52 - 54.
- [4] 沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 214 - 215.
- [5] 郑宏兵. 山核桃抗溃疡病机理及其相关因素的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2006.
ZHENG Hongbing. *Studies on the Resistance Mechanism of Dothiorella Canker of Carya Tree and Some Factors* [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2006.
- [6] 张星耀, 赵仕光, 吕全, 等. 树木溃疡病病原真菌类群分子遗传多样性研究(II) *Botryosphaeria* 属 28S rDNA-PCR-RFLP 和 RAPD 解析[J]. 林业科学, 2000, 36 (2): 75 - 81.
ZHANG Xingyao, ZHAO Shiguang, LÜ Quan, *et al.* Molecular genetic diversity of pathogenic fungal group causing tree canker (II) 28S rDNA PCR RFLP and RAPD analysis of *Botryosphaeria* spp. [J]. *Sci Silv Sin*, 2000, 36 (2): 75 - 81.
- [7] 杨丽萍. 拮抗菌 PY-1 菌株的鉴定及对油菜菌核病防治潜能的评估[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
YANG Liping. *Identification of Antagonistic Fungus Strain PY-1 and Evaluation of Suppression of Sclerotinia sclerotiorum* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.
- [8] 高克祥, 刘晓光, 郭润芳, 等. 木霉菌对杨树树皮溃疡病菌拮抗作用的研究[J]. 林业科学, 2001, 37 (5): 82 - 86.
GAO Kexiang, LIU Xiaoguang, GUO Runfang, *et al.* Study on the antagonism of *Trichoderma* species on canker pathogen fungi of poplar [J]. *Sci Silv Sin*, 2001, 37 (5): 82 - 86.
- [9] 夏伟, 张红, 颜艳伟, 等. 棘孢木霉 L4 对立枯丝核菌的拮抗机制[J]. 植物保护学报, 2010, 37 (5): 477 - 478.
XIA Wei, ZHANG Hong, YAN yanwei, *et al.* Rivalry mechanisms of *Trichoderma asperelluma* L4 to *Rhizoctonia solani* [J]. *Acta Phytophylacica Sin*, 2010, 37 (5): 477 - 478.
- [10] CAL A D, PASCUAL S, URENA I, *et al.* Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lyopersici* [J]. *Plant Pathol*, 1995, 44 (5): 909 - 917.
- [11] CAL A D, PASCUAL S, MEIGAREJO P. Involvement of resistance induction by *Fusarium oxysporum* in the bio-control of tomato wilt [J]. *Plant Pathol*, 1997, 46 (3): 72 - 79.
- [12] 彭霞薇, 谢响明, 白志辉, 等. 草酸青霉 BZH-2002 果胶酶系的纯化及其诱导抗病作用[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12 (6): 750 - 753.
PENG Xiawei, XIE Xiangming, BAI Zhihui, *et al.* Purification and induced resistance of pectinases from *Penicillium oxalicum* BZH-2002 [J]. *Chin J Appl & Environ Biol*, 2006, 12 (6): 750 - 753.
- [13] 王勇, 张文革, 何璐, 等. 生物农药草酸青霉水剂对玉米小斑病的防治效果[J]. 安徽农业科学, 2007, 35 (7): 1965 - 1966.
WANG Yong, ZHANG Wenge, HE Lu, *et al.* Preparation of biologic pesticide *Penicillium oxalicum* Currie et Thom Aqua. and its efficacy in controlling *Helminokosporicum turcicum* Pass. [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2007, 35 (7): 1965 - 1966.