北京林业大学学报
JOURNAL OF BEIJING FORESTRY UNIVERSITY

马尾松枯梢病病原拮抗真菌的筛选与鉴定

刘端冲 李晓菲 王甜甜 王慧敏 刘会香 吕全

Screening and identification of antagonistic fungi to *Diplodia sapinea*, the pathogen of *Pinus massoniana* shoot blight

Liu Duanchong, Li Xiaofei, Wang Tiantian, Wang Huimin, Liu Huixiang, L ü Quan

引用本文:
刘端冲, 李晓菲, 王甜甜, 王慧敏, 刘会香, 吕全. 马尾松枯梢病病原拮抗真菌的筛选与鉴定[J]. 北京林业大学学报, 2026, 48(3):53–62. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250402
Liu Duanchong, Li Xiaofei, Wang Tiantian, Wang Huimin, Liu Huixiang, L ü Quan. Screening and identification of antagonistic fungi to *Diplodia sapinea*, the pathogen of *Pinus massoniana* shoot blight[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(3):53–62. doi: 10.12171/j.1000–1522.20250402

在线阅读 View online: https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250402

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

受枯梢病侵染的有症状和无症状樟子松的内生真菌群落结构

Community structure of endophytic fungi in asymptomatic and symptomatic *Pinus sylvestris* var. *mongolica* infected by diplodia tip blight

北京林业大学学报, 2024, 46(9): 119–131. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230350

致病性腐皮镰刀菌筛选鉴定及其对‘宁杞1号’和‘宁杞5号’枸杞的致病性差异

Screening and identification of pathogenic *Fusarium solani* and its differential pathogenicity on *Lycium barbarum* ‘Ningqi–1’ and ‘Ningqi–5’

北京林业大学学报, 2026, 48(1): 62–72. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20250298

加纳木霉ACCC30153对山新杨幼苗促生抗病功能分析

Growth promotion and disease resistance function of *Trichoderma ghanaiana* ACCC30153 on *Populus davidiana* × *P. bolleana* seedlings

北京林业大学学报, 2024, 46(12): 103–113. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230346

植物病原丝状真菌RGS的研究进展

Advances in research on RGS of phytopathogenic filamentous fungi

北京林业大学学报, 2021, 43(4): 150–157. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20200196

不同病斑等级的西伯利亚红松针叶内生真菌多样性和菌群结构

Diversity and community structure of endophytic fungi in *Pinus sibirica* needles with different lesion grades

北京林业大学学报, 2024, 46(11): 24–33. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20230299

马尾松无性系生长性状基因型与环境互作效应初步研究

Preliminary study on the interaction effect between genotypes and environment of growth traits in *Pinus massoniana* clones

北京林业大学学报, 2023, 45(5): 47–56. https://doi.org/10.12171/j.1000–1522.20210312

DOI:10.12171/j.1000−1522.20250402

马尾松枯梢病病原拮抗真菌的筛选与鉴定

刘端冲[1] 李晓菲[1,2] 王甜甜[1] 王慧敏[1] 刘会香[2] 吕 全[1]
（1. 中国林业科学研究院森林生态环境与自然保护研究所，国家林业和草原局森林保护学重点实验室，北京 100091；
2. 山东农业大学植物保护学院，山东 泰安 271018）

摘要:【目的】筛选获得对马尾松枯梢病菌松色二孢具有良好抑菌效果的拮抗真菌，并对其进行鉴定，为马尾松枯梢病的生物防治提供理论依据。**【方法】**以重庆马尾松枯梢病患病树干和树梢韧皮部样本上分离纯化的病原真菌松色二孢和 4 株拮抗真菌为材料，采用平板对峙培养法和菌丝生长速率法筛选病原真菌松色二孢的拮抗真菌，结合形态学和系统发育学分析对拮抗真菌进行鉴定，并通过显微观察松色二孢和拮抗真菌菌丝之间相互作用方式，初步探究其生防机制。**【结果】**初筛结果表明，4 株拮抗真菌对松色二孢均有抑菌效果，其中，抑菌效果最好的是菌株 CXY4103（毛色二孢属）和 CGMCC 41126（木霉属）。复筛结果表明，菌株 CGMCC 41126 对松色二孢抑制效果最好，其发酵滤液的抑菌率为 45.17%。通过形态学观察与 *tef*1 和 *rpb*2 基因序列分析，鉴定菌株 CGMCC 41126 为近渐绿木霉。显微形态观察发现，近渐绿木霉可与松色二孢的菌丝发生接触、缠绕。抑菌谱结果表明，近渐绿木霉对长喙壳类真菌双色长喙壳、拟双色长喙壳、富士长喙壳、*E. polonica*、栎叶斑病病原菌和板栗溃疡病病原菌均具有较好的拮抗效果。**【结论】**筛选获得 1 株对马尾松枯梢病菌松色二孢具有良好抑菌效果的拮抗真菌，经鉴定为近渐绿木霉，其抑菌谱广泛，为马尾松枯梢病的生物防治提供了潜在拮抗菌源和防控依据。

关键词：马尾松；枯梢病；松色二孢；拮抗真菌；筛选；鉴定；近渐绿木霉
中图分类号：S763.15 **文献标志码：**A **文章编号：**1000−1522(2026)03−0053−10
引文格式：刘端冲，李晓菲，王甜甜，等. 马尾松枯梢病病原拮抗真菌的筛选与鉴定［J］. 北京林业大学学报，2026，48(3)：53−62. Liu Duanchong, Li Xiaofei, Wang Tiantian, et al. Screening and identification of antagonistic fungi to *Diplodia sapinea*, the pathogen of *Pinus massoniana* shoot blight［J］. Journal of Beijing Forestry University, 2026, 48(3): 53−62.

Screening and identification of antagonistic fungi to *Diplodia sapinea*, the pathogen of *Pinus massoniana* shoot blight

Liu Duanchong[1] Li Xiaofei[1,2] Wang Tiantian[1] Wang Huimin[1] Liu Huixiang[2] Lü Quan[1]
(1. Ecology and Nature Conservation Institute, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Protection of National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100091, China;
2. College of Plant Protection of Shandong Agricultural University, Taian 271018, Shandong, China)

Abstract:［**Objective**］This study aimed to screen and identify the antagonistic fungi with strong inhibitory effects against *Diplodia sapinea*, the pathogen of *Pinus massoniana* shoot blight, to provide a theoretical basis for the biocontrol of *P. massoniana* shoot blight.［**Method**］Strains of *D. sapinea* isolated and purified from the phloem of diseased trunks and shoots of *P. massoniana* in Chongqing of southwestern China and the four fungal antagonistic strains were used as materials. The plate confrontation culture and mycelial growth rate methods were employed to screen for antagonistic fungi against *D. sapinea*. The antagonistic fungi were identified based on morphology and phylogenetic analysis, and the biocontrol mechanism was

收稿日期: 2025−10−16 **修回日期:** 2025−12−03
基金项目: 国家重点研发计划（2022YFD1401005），中国林业科学研究院基本科研业务费专项（CAFYBB2023XA001）。
第一作者: 刘端冲，博士生。主要研究方向：森林病理学。Email: ldc8200@163.com 地址：100091 北京市海淀区青龙桥街道东小府 2 号中国林业科学研究院森林生态环境与自然保护研究所。
责任作者: 王慧敏，副研究员。主要研究方向：森林病理学。Email: wanghuimin@caf.ac.cn 地址：同上。
本刊网址: https://j.bjfu.edu.cn; https://journal.bjfu.edu.cn

preliminarily explored by microscopic observation of hyphal interactions between *D. sapinea* and the antagonistic fungi. [**Result**] The results of preliminary screening showed that all four fungal antagonistic strains inhibited the growth of *D. sapinea*, among which strains CXY4103 (*Lasiodiplodia* sp.) and CGMCC 41126 (*Trichoderma* sp.) were the most effective one. The results of re-screening revealed that the strain CGMCC 41126 had the best inhibitory effect on *D. sapinea*, with its fermentation filtrate achieving an inhibition rate of 45.17% against the pathogen. Through morphological observation and phylogenetic analysis of *tef*1 and *rpb*2 gene sequences, the strain CGMCC 41126 was identified as *Trichoderma paraviridescens*. According to the microscopic observation, *T. paraviridescens* could contact and coil around the mycelia of *D. spinea*. The antifungal spectrum result indicated that *T. paraviridescens* had antagonistic effect on *Ophiostoma bicolo*r, *O. pseudobicolor*, *Endoconidiophora fujiensis*, *E. polonica*, *Gnomoniopsis daii* and *G. chinensis*. [**Conclusion**] A strain of antagonistic fungus with strong inhibitory effect against *D. sapinea*, the pathogen of *P. massoniana* shoot blight was screened and identified as *T. paraviridescens*. Its antifungal spectrum is extensive. This study provides a potential antagonistic fungal resource and a theoretical basis for the biocontrol of *P. massoniana* shoot blight.

Key words: *Pinus massoniana*; shoot blight; *Diplodia sapinea*; antagonistic fungi; screening; identification; *Trichoderma paraviridescens*

马尾松(*Pinus massoniana*)是一种不可或缺的工业木材和树脂林的基石树种，原产于中国，广泛分布于中国亚热带地区，其适应性强、生长快、产量高[1−2]。马尾松具有极高的生态和经济价值，常用于造林、木材、脂质、松香和松节油的生产[2−3]。松枯梢病是世界性重大林木病害之一，寄主范围很广，包括冷杉(*Abies* spp.)、落叶松(*Larix* spp.)和云杉(*Picea* spp.)等 60 多种针叶树，其中松属占绝大部分，给许多国家和地区的针叶树造成了严重的经济损失[4−6]。松枯梢病菌—松色二孢(*Diplodia sapinea*)于 1823 年首次被发现，Fries 将其命名为 *Sphaeria sapinea*，在后续的分类学研究当中，该真菌曾被赋予多个不同学名，2013 年，Phillips 等基于多基因片段分析和形态学研究，明确了松枯梢病菌学名为松色二孢[7−9]。第九次森林资源清查显示，中国受枯梢病影响的森林年面积达到 65 万 hm^2，其中马尾松是主要受害树种[10]，病害已对马尾松产业发展形成严重制约。

目前，马尾松枯梢病的防治主要以化学防治、森林培育和生物防治为主。森林培育是一个相对较长的过程，培育时间长，操作难度大。化学防治见效快，但松枯梢病是一种寄主主导性病害，化学防治能够发挥的作用有限。当前，生物防治已成为病虫害防控的最佳策略之一，尤其利用拮抗微生物防治植物病害更是极具潜力的防治方案[11−14]。在许多已鉴定的生防微生物中，对于生防真菌木霉属(*Trichoderma*)的研究和应用较多[14−15]。木霉菌作为生防真菌，在对松枯梢病的生物防治方面已取得一系列研究进展。李宝年等[16]在对樟子松(*Pinus sylvestris* var. *mongolica*)枯梢病拮抗真菌筛选时，发现绿木霉(*T. viride*)对松枯梢病菌的抑菌效果最好[16]；张铭等[14]利用从土壤中分离出的森吉木霉(*T. songyi*)防治赤松(*Pinus densiflora*)枯梢病；钱莹莹等[17]发现钩状木霉(*T. hamatum*)对落叶松枯梢病菌(*Neofusicoccum laricinum*)具有较强抑制效果。然而，关于马尾松枯梢病生物防治的相关研究鲜有报道。因此，对于马尾松枯梢病拮抗微生物的挖掘具有重要的现实意义。

为挖掘松色二孢的拮抗真菌资源、获取对马尾松枯梢病具有良好抑菌效果的拮抗真菌，本研究以分离自患病重庆马尾松的病原菌菌株和前期筛选的拮抗菌株为材料，利用平板对峙培养法和菌丝生长速率法筛选拮抗真菌，并对其进行鉴定，为马尾松枯梢病的生物防控提供科学依据和材料支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试病样

2019 年，于重庆市万盛经开区和开州区采集患有枯梢病的马尾松树梢和树干作为供试材料。

1.1.2 供试菌株

供试病原菌为分离自重庆马尾松枯梢病患病树干和树梢韧皮部样本的松色二孢菌株(CXY4100)、4 株供试拮抗真菌分别为 1 株为木霉属 *Trichoderma* sp.菌株(NCBI 提交号：CXY4102；中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 CGMCC 41126)，由马尾松枯梢病木中分离纯化获得；1 株为枝孢属 *Cladosporium* sp.菌株(CXY4101)，由山东烟台昆嵛山的赤松(*Pinus densiflora*)上分离纯化获得；1 株为毛色二孢属 *Lasiodiplodia* sp.菌株(CXY4103)，由湖

南长沙香樟树（*Cinnamomum camphora*）上分离纯化获得；1 株为粉红粘帚霉（*Clonostachys rosea*）菌株（CXY4104），由山东农业大学林木病原与寄主分子互作实验室提供，分离纯化自山东潍坊患有轮纹病的苹果树（*Malus pumila*）枝干。6 种引起森林病害的真菌用于拮抗真菌抑菌谱的测定：拟双色长喙壳（*Ophiostoma pseudobicolor*）（CFCC 52683）和富士长喙壳（*Endoconidiophora fujiensis*）（CFCC 53580）分离自落叶松八齿小蠹（*Ips subelongatus*）入侵坑道；双色长喙壳（*O. bicolor*）（CFCC 57789）和 *E. polonica*（CFCC 53552）分离自云杉八齿小蠹入侵坑道；*Gnomoniopsis daii* 菌株（CFCC 55517）由中国林业微生物保藏中心（CFCC）提供，分离纯化自槲栎（*Quercus aliena*）叶部（贵州贵阳）；*G. chinensis* 菌株（CFCC 52286）分离自河北秦皇岛的板栗树（*Castanea mollissima*）。

1.2　试验方法

1.2.1　病原真菌分离

采用组织分离法对患病马尾松的树梢和树干样本进行真菌分离。将患病组织样本剪成 5 mm × 5 mm 大小的组织块，用 1.5% 的 NaClO 溶液进行表面消毒处理 1 min，无菌水冲洗 3 次，再用无菌滤纸吸干组织块上的水分，在 2% 的水琼脂培养基上进行真菌的分离。每日观察组织块菌丝的生长情况并及时分离真菌菌株，采用菌丝尖端纯化法纯化已获得真菌，纯化后的菌株于 2% MEA 培养基、25 ℃ 恒温培养箱中黑暗培养，已获得菌株于 4 ℃ 冰箱中冷藏保存用于后续实验。

1.2.2　拮抗真菌初筛

采用平板对峙培养法初步筛选拮抗真菌。供试病原菌松色二孢提前 5 d 活化待用，共有 4 种真菌用于拮抗真菌的筛选（详见 1.1.2）。

从 PDA 培养基上生长旺盛的菌落边缘打孔，取直径 6 mm 大小的病原菌和拮抗真菌菌饼，分别接种在 PDA 培养基左右两侧（D = 9 cm），2 个菌饼经过培养皿中心相距 5 cm。以单独培养松色二孢菌株作为对照，每个处理 5 个重复。接种后的 PDA 平板于 25 ℃ 培养箱中恒温倒置培养，观察拮抗真菌是否抑制病原菌的生长，并每天测量病原菌菌落指向拮抗真菌的生长半径，以培养 4 d 后测得的数据用于计算抑菌率。抑制率（%）等于对照菌落半径减去处理菌落半径，所得差值除以对照菌落半径，再乘以 100%。数值越高，说明抑制效果越强。

1.2.3　拮抗真菌复筛

将初筛中对松色二孢抑菌效果最好的 2 个菌株制备成发酵滤液，通过测定拮抗真菌发酵滤液对松色二孢的抑制效果进行复筛。将菌株 CGMCC 41126 和 CXY4103 在 PDA 培养基上活化 5 d，用 6 mm 打孔器打取菌饼置于盛有 100 mL PDB 培养基的 250 mL 三角瓶中，在恒温摇床（26 ℃，180 r/min）上震荡培养 7 d，获得真菌发酵培养液。随后，将发酵培养液以 8 000 r/min 离心 15 min，收集上清液并使用 0.22 μm 微孔过滤器除菌，将过滤后的发酵滤液于 4 ℃ 冰箱保存备用。

取发酵滤液添加到冷却至 50 ~ 55 ℃ 的 PDA（1∶10）培养基中，混匀倒板，待平板冷却凝固后，用于拮抗真菌发酵滤液的抑菌效果测定。以添加同体积无菌水的 PDA 培养基为对照，在平板中央接种直径 6 mm 的松色二孢菌饼，每个处理 5 个重复。接种后的 PDA 平板于 25 ℃ 培养箱中恒温倒置培养，每天定时观察菌落生长情况，直至对照组真菌菌落在培养基长到 3/4 时，采用十字交叉法测量菌落半径，抑菌率计算同 1.2.2。

1.2.4　拮抗真菌形态学鉴定

将纯化好的拮抗真菌用直径为 6 mm 的灭菌打孔器打孔，得到菌饼，接种在 PDA 培养基上，于 25 ℃ 恒温培养箱倒置培养。每天观察菌丝的形态、颜色变化，边缘整齐程度，并在显微镜下观察孢子形态。

1.2.5　拮抗真菌分子鉴定

刮取 25 ℃ 黑暗条件下生长 5 ~ 7 d 菌落边缘生长旺盛的菌丝，置于 2 mL 离心管中用于 DNA 提取。用北京天根生化有限公司的植物基因组提取试剂盒提取 DNA，方法参照说明书。利用引物 EF-1F 和 EF-1R 扩增基因 *tef*1，利用引物 fRPB-5f 和 fRPB-7cR 扩增基因 *rpb*2[18−19]，扩增产物送至擎科生物（北京）股份有限公司测序，根据测序结果在 NCBI 进行同源性比较分析，利用软件 RAxML-HPC v.7.0.3 构建 *tef*1 与 *rpb*2 基因序列联合的 ML 树，选用 general time reversible（GTR）GAMMA 模型，重复自展次数设置为 1 000 次计算迭代支持率，确定拮抗菌株的系统发育学地位。

1.2.6　拮抗真菌对松色二孢抑菌作用的显微观察

在无菌条件下，用移液器吸取 2 mL 冷却至 50 ℃ ~ 55 ℃ 的灭菌 PDA 培养基置于载玻片上，并轻轻晃动制成培养基薄膜。培养基凝固后，分别接种直径为 6 mm 的松色二孢和菌株 CGMCC 41126 菌饼，2 个菌饼相距 3 cm，25 ℃ 黑暗条件下培养 5 d 后，取出载玻片放在光学显微镜下，观察 2 个菌株交界处菌丝变化。

1.2.7　拮抗真菌抑菌谱测定

采用平板对峙培养法测定优选的拮抗真菌对 6 种常见引起林木病害的病原真菌（双色长喙壳、拟

双色长喙壳、富士长喙壳、*E. polonica*、*G. daii*、*G. chinensis*)的抑菌效果，具体方法同 1.2.2。

1.2.8 拮抗真菌对寄主植物安全性测试

采用有伤接种法，将优选的拮抗真菌接种到 3 年生马尾松苗木上进行拮抗真菌对寄主植物的安全性测试。选取 6 棵长势一致的马尾松苗木，用直径 6 mm 的打孔器在苗木茎干中下部水平打孔至木质部，随后将活化 5 d 生长旺盛直径 6 mm 的拮抗真菌菌饼用一次性灭菌牙签迅速挑入马尾松接种孔中，盖上树皮，用封口膜缠绕固定。以只接种病原菌松色二孢的苗木作为阳性对照，每棵马尾松苗木设置 1 个接种点，每个处理 3 次重复。接种 10 d 后，观察马尾松苗木接种部位是否产生明显变化。

1.3 数据统计与分析

使用 Excel 2010 软件对数据进行整理，利用 SPSS 27.0(IBM，USA)软件对数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 松色二孢拮抗真菌初筛

前期研究共筛选获得 4 株拮抗真菌。在培养 4 d 后，对照组的松色二孢菌落正常生长(图 1A)，平板对峙培养结果显示菌株 CXY4103 对松色二孢抑制效果最好，在对峙培养 2 d 时，已经对松色二孢产生明显的拮抗效果(图 1B)，培养 4 d 时抑菌率达 70.25%(表 1、图 1C)，其次是菌株 CGMCC 41126，在对峙培养 4 d 时，对松色二孢产生明显的拮抗效果，抑菌率达 63.33%(表 1、图 1D)。菌株 CXY4101 与松色二孢对峙培养 4 d 时，抑菌率为 47.50%(表 1、图 1E)。菌株 CXY4104 与病原菌对峙培养 4 d 时，抑菌率最低，为 33.50%(表 1、图 1F)，随着时间增加，菌株 CXY4104 的菌落逐步入侵到松色二孢菌落中(图 1G ~ H)，且松色二孢的长势减弱，抑菌效果不断增强，对峙培养 8 d 时，CXY4104 对松色二孢的抑菌率为 56.5%(图 1G)，10 d 时，抑菌率达 65.00%(图 1H)。

2.2 拮抗真菌复筛

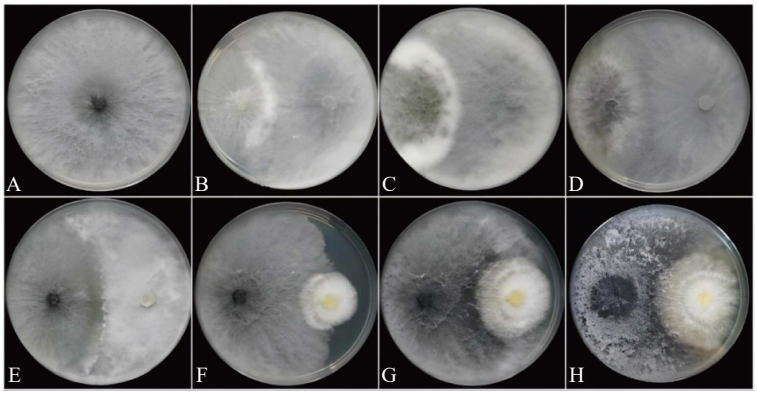
挑选初筛中，对松色二孢抑菌效果最好的 2 个菌株 CGMCC 41126 和 CXY4103 进行拮抗真菌的复筛，复筛结果如表 2、图 2 所示。菌株 CGMCC 41126 的发酵滤液对松色二孢抑菌效果最好，抑菌率为 45.17%(表 2、图 2C)。菌株 CXY4103 对松色二孢的抑菌率仅为 13.14%(表 2、图 2B)。另外，菌株 CGMCC 41126 发酵滤液抑制松色二孢在培养基上生长的同时，还抑制了其气生菌丝的生长，生长于添加菌株 CGMCC 41126 发酵滤液的培养基上的松色二孢气生菌丝密度明显小于对照处理(图 2A、2C)。因此选用菌株 CGMCC 41126 用于后续研究。

2.3 拮抗真菌 CGMCC 41126 形态学鉴定

将菌株 CGMCC 41126 接种到 PDA 培养基上，4 d 后，菌落覆盖培养皿表面(图 3A)。该菌株菌丝呈辐射状生长，菌丝颜色在初始阶段为白色，随着时间的延长逐渐变为浅黄色(图 3B)，有椰子味的香气散出。分生孢子梗短小，多为成对的小分支(图 3C)，具有圆形或近圆形的分生孢子，分生孢子为绿色，分散或密集，成簇聚集在分生孢子梗的顶端，大小为(2.56 ~ 4.29)μm × (1.64 ~ 2.07)μm(图 3D)。根据以上菌落形态生长特征，参照《真菌鉴定手册》，将其初步鉴定为近渐绿木霉(*Trichoderma paraviridescens*)。

2.4 拮抗真菌 CGMCC 41126 分子鉴定

菌株 CGMCC 41126 经测序所获得的 *tef*1 和 *rpb*2 DNA 序列长度分别为 1 284、1 037 bp。将获得



A. 松色二孢 CXY4100（培养4 d）；B. 左侧为松色二孢 CXY4100，右侧为 CXY4103（对峙培养2 d）；C. 左侧为松色二孢 CXY4100，右侧为 CXY4103（对峙培养4 d）；D. 左侧为松色二孢 CXY4100，右侧为 CGMCC 41126（对峙培养4 d）；E. 左侧为松色二孢 CXY4100，右侧为 CXY4101（对峙培养4 d）；F. 左侧为松色二孢 CXY4100，右侧为 CXY4104（对峙培养4 d）；G. 左侧为松色二孢 CXY4100，右侧为 CXY4104（对峙培养8 d）；H. 左侧为松色二孢 CXY4100，右侧为 CXY4104（对峙培养10 d）。

图 1 4 株拮抗真菌与松色二孢对峙培养效果图

Fig. 1 Effect diagram of 4 antagonistic strains cultured in confrontation with *D. sapinea*

表 1　对峙培养 4 d 后拮抗真菌对松色二孢的抑菌率

Tab. 1　Inhibition rates of antagonistic fungi against to *Diplodia sapinea* for 4 d

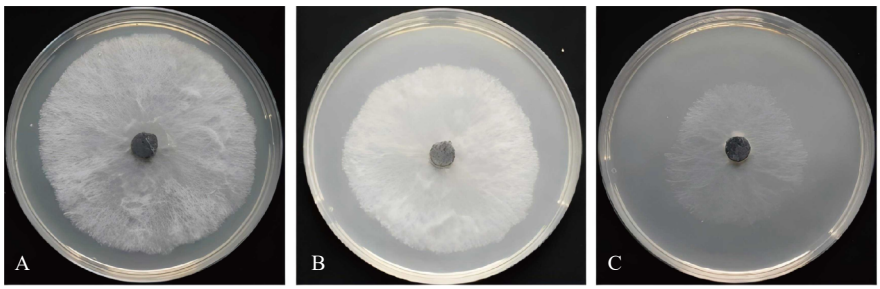
菌种	菌株编号	对照菌落半径/cm	处理菌落半径/cm	抑菌率/%
枝孢属 *Cladosporium* sp.	CXY4101	4.50 ± 0.25	2.32 ± 0.05b	47.50
木霉属 *Trichoderma* sp.	CGMCC 41126	4.50 ± 0.25	1.63 ± 0.43c	63.33
毛色二孢属 *Lasiodiplodia* sp.	CXY4103	4.50 ± 0.25	1.32 ± 0.12d	70.25
粉红粘帚霉 *Clonostachys rosea*	CXY4104	4.50 ± 0.25	2.97 ± 0.09a	33.50

注：数据为平均值 ± 标准误差。同组内不同字母代表具有显著差异（$P < 0.05$）。下同。

表 2　拮抗真菌发酵滤液对松色二孢的抑菌率

Tab. 2　Inhibition rates of fermentation filtrates of antagonistic fungi against to *D. sapinea*

菌种	菌株编号	对照菌落直径/cm	处理菌落直径/cm	抑菌率/%
木霉属 *Trichoderma* sp.	CGMCC 41126	7.15 ± 0.24	3.92 ± 0.30b	45.17
毛色二孢属 *Lasiodiplodia* sp.	CXY4103	7.15 ± 0.24	6.21 ± 0.26a	13.14



A. 在添加无菌水的 PDA 培养基上培养松色二孢；B. 在添加菌株 CXY4103 发酵滤液的 PDA 培养基上培养松色二孢；C. 在添加菌株 CGMCC 41126 发酵滤液的 PDA 培养基上培养松色二孢。

图 2　菌株 CGMCC 41126 和 CXY4103 的发酵滤液对松色二孢的拮抗作用（培养 3 d 后）

Fig. 2　Inhibitory effects of fermentation filtrates of strains CGMCC 41126 and CXY4103 on *D. sapinea* (after 3 d of incubation)

的基因序列进行同源序列比对分析后，发现菌株 CGMCC 41126 与近渐绿木霉亲缘关系最近，同源性均高达 99% 以上。且在基于 *tef*1和 *rpb*2 基因片段构建的联合系统发育树中，菌株 CGMCC 41126 与近渐绿木霉聚为同一分支（图 4）。结合形态学特征，将菌株 CGMCC 41126 鉴定为近渐绿木霉。

2.5　拮抗真菌 CGMCC 41126 对松色二孢抑菌效果的显微观察

通过观察载玻片上菌株 CGMCC 41126 与松色二孢菌丝交界处发现，菌株 CGMCC 41126 的菌丝生长速度过快，与松色二孢菌丝发生接触，紧紧缠绕在松色二孢的菌丝上，从而抑制松色二孢的生长扩散（图 5）。

2.6　拮抗真菌 CGMCC 41126 抑菌谱测定

采用平板对峙培养法测定拮抗真菌 CGMCC 41126 对 6 种常见引起林木病害的病原菌（双色长喙壳、拟双色长喙壳、富士长喙壳、*E. polonica*、*G. daii*、*G. chinensis*）的抑菌效果。结果表明，菌株 CGMCC 41126 对 6 种林木病原菌均有良好的抑制效果，抑菌率均在 55% 以上（表 3、图 6），其中，对长喙壳菌类真菌双色长喙壳、拟双色长喙壳、富士长喙壳和 *E. polonica* 的抑菌效果较高，抑菌率都在 70% 以上；对板栗溃疡病病原菌（*G. chinensis*）的抑菌率相对较低，但也达 56.62%。总体来看，CGMCC 41126 菌株具有较好的抑菌广谱性。

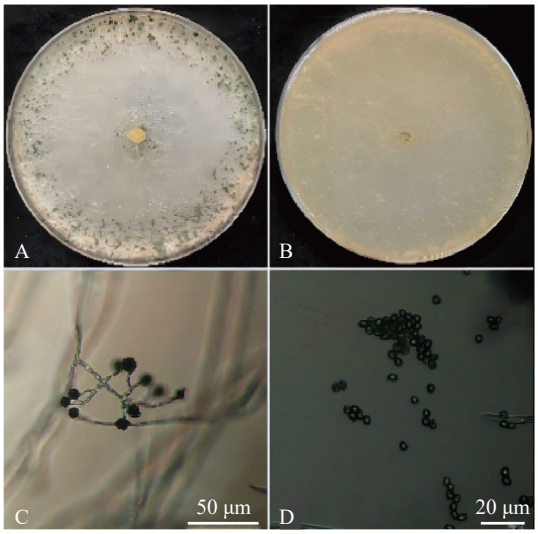
2.7　拮抗真菌 CGMCC 41126 对寄主植物安全性测试

有伤接种 10 d 后，观察马尾松苗木接种部位发现，接种菌株 CGMCC 41126 的马尾松未产生明显病斑（图 7A），而对照组接种病原菌松色二孢的马尾松接种部位产生明显病斑（图 7B）。结果表明，菌株 CGMCC 41126 对马尾松苗木不具有致病性，作为拮抗真菌具有一定安全性。

3　讨　　论

3.1　马尾松枯梢病菌松色二孢拮抗真菌的筛选

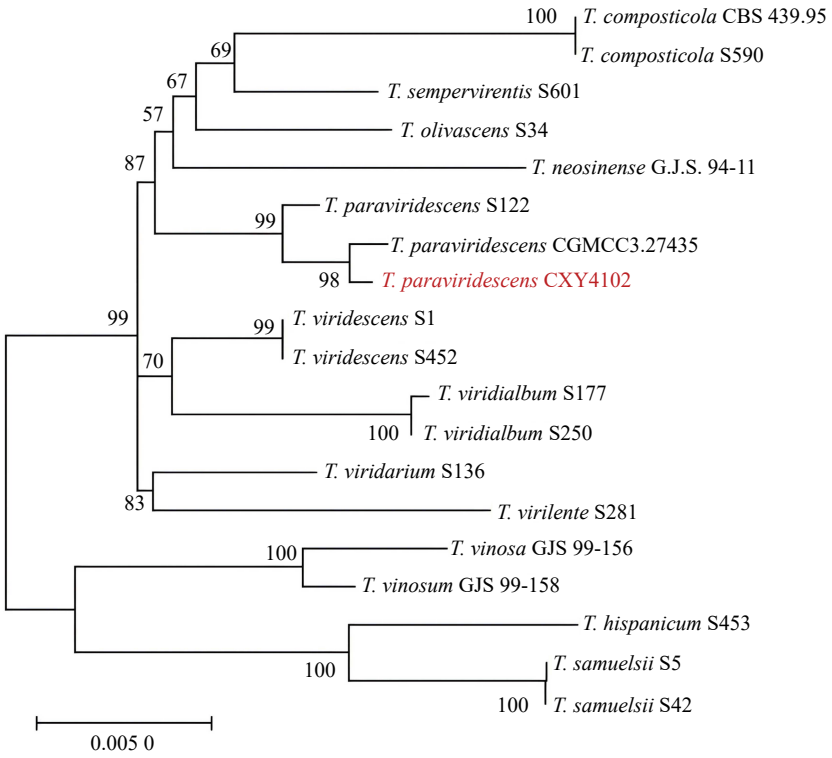
本研究分离筛选出 1 株对马尾松枯梢病菌松色二孢具有良好拮抗效果的真菌菌株（CGMCC 41126），经鉴定为近渐绿木霉。近渐绿木霉是近年来在中国



A. CGMCC 41126 菌株正面；B. CGMCC 41126 菌株反面；C. CGMCC 41126 菌株分生孢子梗；D. CGMCC 41126 菌株分生孢子

图 3　CGMCC 41126 菌株的形态特征

Fig. 3　Morphological characteristics of strain CGMCC 41126



标尺代表遗传变异系数；分支上的数字表示置信度；序号表示该菌在 GenBank 数据库中的登录号。

图 4　基于 CGMCC 41126 菌株 *tef*1 和 *rpb*2 基因序列构建的联合系统发育树

Fig. 4　Phylogenetic tree constructed based on *tef*1 and *rpb*2 gene sequences of strain CGMCC 41126

发现并广泛分布的木霉新记录种[19−20]。研究发现，近渐绿木霉对滇牡丹（*Paeonia delavayi*）3 种病害病原和樟疫霉（*Phytophthora cinnamomi*）有较强的抑制作用[21−22]，其产生的挥发性和非挥发性物质对烟草疫霉菌（*P. nicotianae*）的抑菌率分别达到 61.71% 和 100%，并且有促进烟草种子萌发和根系生长的作用[23]。本研究中，近渐绿木霉与松色二孢的平板对峙培养时的抑菌率为 63.33%，其发酵液对松色二孢的抑菌率为 45.17%，具有强烈的抑制作用，我们推测可能是在其液体培养的过程中产生了有抑菌效果的次生代谢物质。木霉分泌次生代谢物质是其作为生防菌的关键机制之一，主要包括两大类，即低分子量、挥发性的物质和有活性的高分子量物质，比如萜烯类、聚酮类、肽类和生物碱等[24−26]。本研究中，近渐绿木霉产生的抑菌代谢产物并不明确，还需要进一步鉴定。

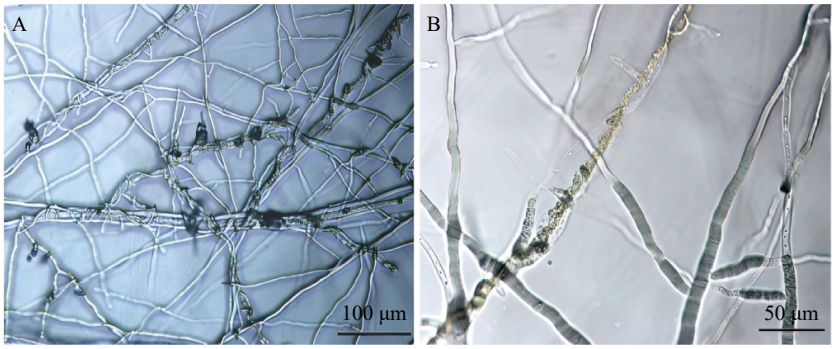


图 5　菌株 CGMCC 41126 对松色二孢抑菌效果的显微观察

Fig. 5　Microscopic observation of strain CGMCC 41126 against *D. sapinea*

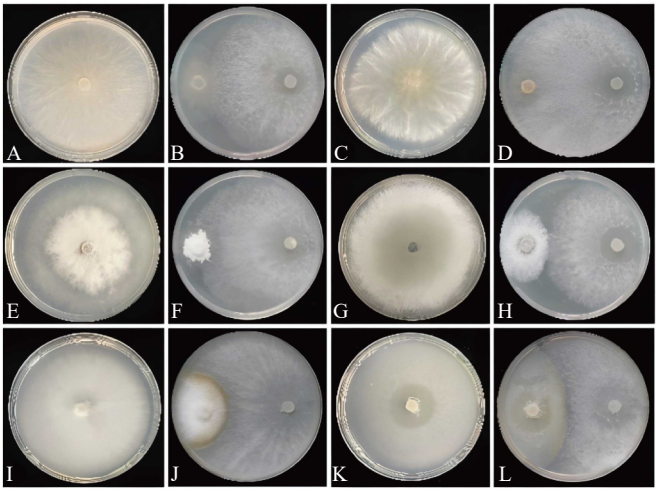
表 3　菌株 CGMCC 41126 对 6 种林木病原菌的抑菌率

Tab. 3　Inhibitory rates of strain CGMCC 41126 against 6 forest pathogens

病原菌	菌株编号	CGMCC 41126	
		菌落半径/cm	抑菌率/ %
O. bicolor	CFCC 57789	0.94 ± 0.33 c	78.88
O. pseudobicolor	CFCC 52683	0.61 ± 0.10 d	86.24
E. fujiensis	CFCC 53580	0.59 ± 0.09 d	86.75
E. polonica	CFCC 53552	1.10 ± 0.10 c	75.40
G. daii	CFCC 55517	1.50 ± 0.08 b	66.66
G. chinensis	CFCC 52286	1.87 ± 0.10 a	56.62

3.2　近渐绿木霉对松色二孢生防机制初探

木霉是自然界中广泛分布的重要生防菌，通过多种机制协同作用发挥良好的拮抗效果，其生物防治机制主要包括与病原体竞争营养物质和生活空间、重寄生、产生具有抗真菌活性的代谢物以及诱导植物抗性等[27−29]。从藜麦（*Chenopodium quinoa*）种子获得的非洲哈茨木霉（*T. afroharzianum*）可通过接触或缠绕的方式重寄生多种病原菌，如灰葡萄孢菌（*Botrytis cinerea*）、链格孢菌（*Alternaria alternata*）、柑橘镰刀菌（*Fusarium citri*）[30]。赵玳琳等[31]报道了棘孢木霉（*T. asperellum*）GYSW−6m1 对草莓炭疽菌（*Colletotrichum fragariae*）LC0220 具有较强的竞争、抗生和重寄生作用。本研究通过显微观察发现，近渐绿木霉的菌丝可与病原菌松色二孢的菌丝接触、缠绕，从而抑制松色二孢的生长。这与田桢等[32]和梁晓洁报道拟康宁木霉（*T. koningiopsis*）、深绿木霉（*T. atroviride*）和棘孢木霉（*T. asperellum*）能够通过缠绕的方式抑制尖孢镰孢菌（*F. oxysporum*）和苹果炭疽病菌（*C. gloeosporioides*）的作用相一致[28, 32]。大多数的重寄生作用都是通过接触缠绕病原菌的菌丝，使其发生皱缩消解[20, 33−37]。本研究未发现松色二孢有菌丝消解现象，推测可能与菌丝接触时间不够长有关，还有待进一步探究。



A. 双色长喙壳 CFCC 57789；B. 左侧为双色长喙壳 CFCC 57789；C. 拟双色长喙壳 CFCC 52683；D. 左侧为拟双色长喙壳 CFCC 52683；E. 富士长喙壳 *E. fujiensis* CFCC 53580；F. 左侧为富士长喙壳 CFCC 53580；G. *E. polonica* CFCC 53552；H. 左侧为 CFCC 53552；I. *G. daii* CFCC 55517；J. 左侧为 CFCC 55517；K. *G. chinensis* CFCC 52286；L. 左侧为 CFCC 52286；B, D, F, H, J , L. 右侧均为近渐绿木霉 CGMCC 41126。

图 6　菌株 CGMCC 41126 与其他 6 种林木病原菌对峙培养 4 d 后的效果图

Fig. 6　Effect diagram of strain CGMCC 41126 cultured in confrontation with other 6 forest pathogens for 4 d



A. 接种松色二孢的马尾松苗木；B. 接种菌株 CGMCC41126 的马尾松苗木。

图 7 菌株 CGMCC 41126 对寄主植物的安全性测试

Fig. 7 Safety testing of strain CGMCC 41126 on host plants

3.3 近渐绿木霉的抑菌广谱性和对寄主植物的安全性

本研究首次发现近渐绿木霉对松色二孢具有良好的防效，为马尾松枯梢病的防治提供了优良菌源。抑菌谱结果证实，近渐绿木霉对长喙壳类真菌（双色长喙、拟双色长喙壳、富士长喙壳、*E. polonica*）、栎叶斑病菌（*G. daii*），板栗溃疡病菌等 6 种林木病原真菌也具有抑菌能力，其中，对富士长喙壳的抑菌率高达 86.75%，且已有研究证实，人工接种富士长喙壳可致死日本落叶松（*Larix kaempferi*）[38]。研究表明，近渐绿木霉不但对马尾松枯梢病菌具有拮抗作用，对引起其他针叶树和阔叶树病害的病原菌同样具有拮抗效果，表现出广谱抑菌活性。对寄主植物安全性测试结果表明，近渐绿木霉对马尾松苗木不具有致病性，作为拮抗真菌具有一定安全性。综上所述，近渐绿木霉具有良好生防森林病害的作用，有值得进一步开发的潜力。

4 结 论

本研究通过平板对峙培养法和菌丝生长速率法，筛选获得 1 株对马尾松枯梢病菌松色二孢具有良好抑制效果的拮抗菌株 CGMCC 41126，通过形态学和分子生物学鉴定，明确该菌株为近渐绿木霉。实验发现，近渐绿木霉对松色二孢具有良好的抑菌效果，同时对 6 种林木病原菌包括长喙壳类真菌双色长喙壳、拟双色长喙壳、富士长喙壳、*E. polonica*、栎叶斑病病原和板栗溃疡病病原也具有较好拮抗效果，其抑菌谱广为马尾松枯梢病的生物防治提供了潜在拮抗菌源和防控依据。

参 考 文 献

[1] Peng Y, Tang Y, Li D, et al. The growth-promoting and colonization of the pine endophytic *Pseudomonas abietaniphila* for pine wilt disease control [J]. Microorganisms, 2024, 12(6): 1089.

[2] Xie Y, Liu B, Gao K, et al. Comprehensive analysis and functional verification of the *Pinus massoniana* NBS-LRR gene family involved in the resistance to *Bursaphelenchus xylophilus* [J]. Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 1812.

[3] 高祥, 丁贵杰, 翟帅帅, 等. 不同林分密度马尾松人工林根系生物量及空间分布研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2014, 34(6): 71−75.
Gao X, Ding G J, Zhai S S, et al. Spatial distribution of root biomass of *Pinus massoniana* plantations under different planting densities [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2014, 34(6): 71−75.

[4] 吴小芹. 全球松树枯梢病发生状况与防治策略 [J]. 世界林业研究, 1999, 12(1): 16−21.
Wu X Q. Occurence and control countermeasure of *Sphaeropsis sapinea* shoot blight on conifer in the world [J]. World Forestry Research, 1999, 12(1): 16−21.

[5] 程元, 梁军, 谢宪, 等. 昆嵛山赤松天然次生林群落植物物种与赤松枯梢病的关联性 [J]. 林业科学, 2021, 57(7): 111−120.
Cheng Y, Liang J, Xie X, et al. Correlation between plant species in the natural secondary forest community of Kunyu Mountains and shoot blight of *Pinus densiflora* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2021, 57(7): 111−120.

[6] 牛安琪, 周德明, 缪新宇, 等. 拮抗菌与中药提取物复配对松枯梢病的抑菌效果筛选 [J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(6): 1355−1365.
Niu A Q, Zhou D M, Miao X Y, et al. Screening of the inhibitory effect of antagonistic bacteria compounded with herbal extracts on *Sphaeropsis sapinea* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2024, 40(6): 1355−1365.

[7] Sutton B C, Dyko B J. Revision of *Hendersonula* [J]. Mycological Research, 1989, 93(4): 466−488.

[8] Phillips A J, Alves A, Abdollahzadeh J, et al. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture [J]. Studies in Mycology, 2013, 76(1): 51−167.

[9] 刘玉祥, 王磊, 任宁红, 等. 受枯梢病侵染的有症状和无症状樟子松的内生真菌群落结构 [J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(9): 119−131.
Liu Y X, Wang L, Ren N H, et al. Community structure of endophytic fungi in asymptomatic and symptomatic *Pinus sylvestris* var. *mongolica* infected by diplodia tip blight [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2024, 46(9): 119−131.

[10] 崔海鸥, 刘珉. 我国第九次森林资源清查中的资源动态研究 [J]. 西部林业科学, 2020, 49(5): 90−95.
Cui H O, Liu M. Analysis on the results of the 9th National Forest Inventory [J]. Journal of West China Forestry Science, 2020, 49(5): 90−95.

[11] Zheng Y, Xue Q Y, Xu L L, et al. A screening strategy of fungal biocontrol agents towards *Verticillium* wilt of cotton [J]. Biological Control, 2010, 56(3): 209−216.

[12] 张丽, 孙书娥. 利用微生物防治植物病害研究进展 [J]. 农药研究与应用, 2010, 14(6): 10−13.
Zhang L, Sun S E. Study on biological control of plant disease with microorganism [J]. Agrochemicals Research & Application, 2010, 14(6): 10−13.

[13] 杨忠岐, 王小艺, 张翌楠, 等. 以生物防治为主的综合控制我国重大林木病虫害研究进展 [J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(2): 163−183.
Yang Z Q, Wang X Y, Zhang Y N, et al. Research advances of chinese major forest pests by integrated management based on biological control [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(2): 163−183.

[14] 张铭, 谢宪, 梁军, 等. 赤松枯梢病生防真菌 M75 的筛选和鉴定 [J]. 东北林业大学学报, 2022, 50(4): 78−82.
Zhang M, Xie X, Liang J, et al. Screening and identification of biocontrol fungus M75 against shoot blight of *Pinus densiflora* [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2022, 50(4): 78−82.

[15] 胡燕梅, 杨龙. 利用微生物防治植物病害的研究进展 [J]. 中国生物防治, 2006(22): 190−193.
Hu Y M, Yang L. Biological control of plant pathogens with microorganism [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006 (22): 190−193.

[16] 李宝年, 徐树辉, 杨传波, 等. 樟子松枯梢病拮抗真菌的筛选 [J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(5): 97−99.
Li B N, Xu S H, Yang C B, et al. Screening of antagonistic fungus for *Pinus sylvestris* var. *mongolica* shoot blight [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2004, 32(5): 97−99.

[17] 钱莹莹, 邓勋, 王铮, 等. 落叶松枯梢病生防菌的筛选、鉴定及其生物学特性 [J]. 林业科学研究, 2024, 37(4): 182−192.
Qian Y Y, Deng X, Wang Z, et al. Screening, identification and biological characteristics of biocontrol fungi against larch shoot blight [J]. Forest Research, 2024, 37(4): 182−192.

[18] Chaverri P, Samuels G J. *Hypocrea*/*Trichoderma* (*Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae*): species with green ascospores [J]. Studies in Mycology, 2003, 48(48): 1−116.

[19] 张广志, 张新建, 李成云, 等. 木霉属 7 个中国新记录种 [J]. 菌物学报, 2016, 35(8): 984−993.
Zhang G Z, Zhang X J, Li C Y, et al. Seven Chinese new records of the genus *Trichoderma* [J]. Mycosystema, 2016, 35(8): 984−993.

[20] 秦文韬, 陈凯, 庄文颖. 木霉属 5 个中国新记录种及 2 种木霉在中国的新分布 [J]. 菌物学报, 2016, 35(8): 994−1007.
Qin W T, Chen K, Zhuang W Y. Five *Trichoderma* species new to China and notes on two other widespread species [J]. Mycosystema, 2016, 35(8): 994−1007.

[21] 张丽丽, 巫雨蓝, 钟秀玥, 等. 四株滇牡丹内生木霉的鉴定及促生抗病功能分析 [J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2140−2155.
Zhang L L, Wu Y L, Zhong X Y, et al. Identification and characterization of four endophytic *Trichoderma* strains capable of promoting plant growth and inhibiting plant pathogens from *Paeonia delavayi* [J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2140−2155.

[22] Ruiz F J, Miguel R C. Antagonistic potential of native *Trichoderma* spp. against *Phytophthora cinnamomi* in the control of holm oak decline in dehesas ecosystems [J]. Forests, 2021, 12(7): 945.

[23] 李小杰, 李成军, 姚晨虓, 等. 拮抗烟草疫霉菌的木霉菌株筛选鉴定及防病促生作用研究 [J]. 中国烟草科学, 2020, 41(3): 65−70.
Li X J, Li C J, Yao C X, et al. Screening, identification of antagonistic *Trichoderma* spp. against tobacco black shank and its growth promotion effect on tobacco [J]. Chinese Tobacco Science, 2020, 41(3): 65−70.

[24] Li M F, Li G H, Zhang K Q. Non-volatile metabolites from *Trichoderma* spp. [J]. Metabolites, 2019, 9(3): 58.

[25] Bai B, Liu C, Zhang C, et al. *Trichoderma* species from plant and soil: an excellent resource for biosynthesis of terpenoids with versatile bioactivities [J]. Advanced Research, 2023, 49: 81−102.

[26] Song Y P, Ji N Y. Chemistry and biology of marine-derived *Trichoderma* metabolites [J]. Natural Products and Bioprospecting, 2024, 14: 14.

[27] Benítez T, Rincón A M, Limón M C, et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains [J]. International Microbiology, 2004, 7(4): 249−260.

[28] 梁晓洁, 刘志华, 张平, 等. 抗油桐枯萎病木霉菌的分离鉴定及抑菌作用研究 [J]. 菌物学报, 2020, 39(5): 795−805.
Liang X J, Liu Z H, Zhang P, et al. *Trichoderma* spp. isolated from rhizosphere soil of wilt-resistant *Vernicia fordii* and their inhibition effects against *Fusarium oxysporum* [J]. Mycosystema, 2020, 39(5): 795−805.

[29] 尹大川, 杨立宾, 邓勋, 等. 绿木霉对樟子松苗木生长指标及生理生化指标的影响 [J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(1): 78−91.
Yin D C, Yang L B, Deng X, et al. How *Trichoderma virens* affects growth indicators, physiological and biochemical parameters of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* seedlings [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(1): 78−91.

[30] 田淼, 彭玉飞, 吕红, 等. 非洲哈茨木霉 LMNS-M9 的鉴定、生物学特性及其对藜麦的促生作用 [J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3848−3865.
Tian M, Peng Y F, Lü H, et al. *Trichoderma afroharzianum* LMNS-M9: identification, biological characteristics, and growth-promoting effect on quinoa[J]. 2023, 50(9): 3848−3865.

[31] 赵玳琳, 何海永, 吴石平, 等. 棘孢木霉 GYSW−6m1 对草莓炭疽病的生防机制及其防病促生作用研究 [J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(4): 587−595.

Zhao D L, He H Y, Wu S P, et al. Biocontrol mechanisms and control effects of *Trichoderma asperellum* GYSW-6m1 on strawberry anthracnose and growth-promoting effects on strawberry [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(4): 587−595.

[32] 田桢, 曹传旺, 季世达, 等. 新疆野果林木霉分离鉴定、抑菌作用及固态发酵配方优化 [J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4696−4709.
Tian Z, Cao C W, Ji S D, et al. Isolation and identification of *Trichoderma* strains, and antifungal effects and solid-state fermentation recipe optimization from Xinjiang wild fruit forest [J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4696−4709.

[33] Mukherjee M, Mukherjee P K, Horwitz B A, et al. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control [J]. Indian Journal of Microbiology, 2012, 52(4): 522−529.

[34] 杨萍, 杨谦. 木霉重寄生过程分子机制的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 163−166.
Yang P, Yang Q. Research progress on molecular mechanism of *Trichoderma* mycoparasitism [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 163−166.

[35] Sood M, Kapoor D, Kumar V, et al. *Trichoderma*: the “secrets” of a multitalented biocontrol agent [J]. Plants, 2020, 9(6): 762.

[36] Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, et al. *Trichoderma*: the current status of its application in agriculture for the biocontrol of fungal phytopathogens and stimulation of plant growth [J]. Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(4): 23−29.

[37] Yao X, Guo H L, Zhang K X, et al. *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease [J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1160551.

[38] Yamaoka Y, Wingfield M J, Ohsawa M, et al. Ophiostomatoid fungi associated with *Ips cembrae* in Japan and their pathogenicity of Japanese larch [J]. Mycoscience, 1998, 39: 367−378.

（责任编辑 范 娟 李 契
责任编委 张星耀）