

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T xxxx.1—2013

真菌微生物农药 木霉菌

第 1 部分:木霉菌母药

Fungal Pesticides – *Trichoderma* spp

Part 1: *Trichoderma* spp Technical Concentrates (TK)

(征求意见稿)

2014-XX-XX发布

2014-XX-XX实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

NY/T XXXX《真菌微生物农药 木霉菌》为系列标准，分为两部分：

第1部分：木霉菌母药

第2部分：木霉菌可湿性粉剂

本部分为NY/T XXXX的第1部分。

本部分按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：农业部农药检定所、上海交通大学。

本标准主要起草人：

真菌微生物农药 木霉菌

第 1 部分：木霉菌母药

1 范围

本部分规定了真菌微生物农药木霉菌母药的要求、试验方法、标志、标签、包装、贮运及验收。

本部分适用以棘孢木霉 *Trichoderma asperellum*、哈茨木霉 *Trichoderma harzianum*、深绿木霉 *Trichoderma atroviride* 等木霉菌种为活性成分的粉状木霉菌母药。

注：三个菌种有效成分描述见附录 A。

2 规范性引用文件

下列文件对于本部分的应用是必不可少的。凡是标注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本部分。凡是标不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本部分。

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/T 1601 农药pH值的测定方法

GB/T 1604 商品农药验收规则

GB/T 1605 商品农药采样方法

GB 3796 农药包装通则

GB/T 8170-2008 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 30361-2013 农药干燥减量的测定方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

木霉菌母药 *Trichoderma spp technical concentrate (TK)*

由木霉菌纯菌种经生物发酵生产而获得的高含量分生孢子或厚垣孢子粉，通常情况下还会包含伴随发酵过程的少量生物组分和化学杂质。

3.2

含孢量 *Conidia content*

每克木霉菌母药中所含的孢子数量，所含孢子数量包括分生孢子和厚垣孢子；

注：单位为孢子/克或CFU/克。

3.3

菌落形成单位 colony forming units （CFU）

将木霉菌母药用无菌水稀释后得到的菌液通过涂布的方法，让其单个孢子分散在琼脂平板上，待培养后每个孢子形成一个特定菌落，即一个菌落形成单位（CFU），通过肉眼观察菌落的数量来推算单位微生物农药样品中的含孢量。

3.4

杂菌率 microbial contaminant

木霉菌母药中除了木霉菌外，其它微生物（如真菌和细菌等）量占总菌量的百分率。

4 要求

4.1 外观

经生物发酵生产而获得的高含量分生或厚垣孢子粉，一般为绿色粉状物，由于菌种或发酵基质的不同颜色偶有差异，通常情况下还会包含伴随发酵过程的少量生物组分和化学杂质，但应为均匀疏松的粉末，不可有团块。

4.2 指标

木霉菌母药质量控制项目指标应符合表 1 要求。

表1 木霉菌母药控制项目及指标

项 目	指 标
含孢量，CFU/g	$\geq 20 \times 10^8$
杂菌率，%	≤ 1.0
干燥减量，%	8.0-12.0
pH	6.0~8.0

5 试验方法

5.1 抽样

按照 GB/T 1605 规定进行样品的采集，用随机数表法确定抽样的包装件，最终抽样量不少于 100g。采样时应特别注意样品的代表性和避免污染，采样容器和采样工具应经过消毒

灭菌，样品采集后应立即进行检验，若不能立即检验，应于 4℃ 条件下贮存。

5.2 菌种鉴别

采用 DNA 条形码的标准基因进行检测，并可辅助形态学特征进行菌种鉴别，鉴别方法见附录 B。

5.3 含孢量测定

采用平板菌落计数法，单位分别为 CFU/g。

5.3.1 试剂和溶液

- 脱氧胆酸钠（化学纯）；
- 马铃薯葡萄糖琼脂（PDA）培养基；
- 蛋白胨营养琼脂（NA）培养基；
- 无菌水： 121℃蒸汽灭菌 30 分钟，冷却后备用。

5.3.2 主要仪器、设备

- 培养皿：直径 90mm，高 16-17mm，底部应完全平底的双碟；
- 分析天平：精度为 0.001g；
- 移液器；
- 高压蒸汽灭菌器；
- 超净工作台；
- 恒温振荡器；
- 恒温培养箱（控温范围（0℃~50℃），控温误差±2℃；）；
- 恒温水浴锅；
- 生物显微镜：×1000 倍。

5.3.3 实验步骤

5.3.3.1 样品的准备

在无菌操作条件下，将样品搅拌均匀，准确称取 1.00g 样品，溶入 100mL 的无菌水中浸泡 30min 后，振荡 30min，得到稀释 100 倍的样品溶液，标记为 1 号。然后参照表 2（以稀释 6 次为例）进行梯度稀释：

表 2 梯度稀释示例

编号	1	2	3	4	5	6	7
灭菌水体积（mL）	100.0	99.0	99.0	9.0	9.0	9.0	9.0

加入上一稀释浓度溶液的体积（mL）	-	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
累计稀释倍数	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}

5.3.3.2 试验方法

平板计数法

在无菌条件下,将上述各梯度稀释液分别吸取 100 μ L 于 0.5%脱氧胆酸钠 PDA 平板上,用曲玻棒均匀涂布在整个平板表面,每个稀释度做 3 次重复,然后置于 25℃ 下培养 24h~48h 后,选择适宜的稀释度,取菌落数在 30~150 个之间的平板进行计数。

5.3.3.3 计算

a) 若只有一个稀释度平板上的菌落数在适宜计数范围内,则计算该稀释度 3 个重复平板菌落数的平均值,再将平均值乘以相应的稀释倍数,作为每 g 母药中的菌落数。如第 6 号稀释度 3 个平板的菌落数 (CFU) 分别为 79、80、81,则该母药的含孢量为:

$$N=[(79+80+81)/3]\times 10^8\times 10=8.0\times 10^{10}\text{ CFU/g}$$

b) 如有两个连续稀释度的平板菌落数均在适宜计数范围之内,则按式 (1) 计算:

$$N=\sum C / [(1\times n_1+0.1\times n_2) \times 0.1\times d] \dots\dots\dots (1)$$

式中:

N —单位样品(g) 中的菌落数 (CFU/g)

$\sum C$ —平板 (含适宜范围菌落数的平板) 菌落数之和

n_1 —第 1 个适宜稀释度的调查平板数

n_2 —第 2 个适宜稀释度的调查平板数

d —第 1 稀释度的稀释因子

示例: 如果第一稀释度 (10^{-7}) 的菌落数 (CFU) 为 140、148、142,第二稀释度 (10^{-8}) 的菌落数 (CFU) 为 20、21、23,则根据式 (1) 计算:

$$N=(140+148+142+20+21+23)/[(1\times 3+0.1\times 3) \times 0.1\times 10^{-7}]=1.50\times 10^{10}\text{ CFU/g}$$

5.4 杂菌率的测定

5.4.1 试验方法

按 5.3 方法进行测定,选择 NA 培养基检测样品中的细菌杂菌;选择 PDA 培养基检测样品中的真菌和卵菌杂菌。然后统计总的可见杂菌菌落数量,杂菌率按式 (2) 计算。

$$X=\frac{N_1+N_2}{N_1+N_2+N_3} \times 100\dots\dots\dots (2)$$

式中：

X —杂菌率，单位为 %；

N_1 —细菌杂菌菌落数的总和，单位为 CFU；

N_2 —真菌和卵菌杂菌菌落数的总和，单位为 CFU；

N_3 —木霉菌菌落数总和，单位为 CFU。

5.4.2 允许差

两次平行测定结果相对差，应不大于 5.0%。

5.5 pH 的测定

按 GB/T 1601 中，pH 值计法进行测定。

5.6 干燥减量的测定

按GB/T 30361-2013 中规定的农药干燥减量法进行测定。

6 产品检验与验收

应符合GB/T 1604规定。极限值的处理应按GB/T 8170-2008中4.3.3进行。

7 标志、标签、包装、贮运

7.1 标志、标签

产品的标志、标签应符合 GB 3796 规定，同时注明贮运条件。

7.2 包装

包装应符合 GB 3796 和 GB /T191 的规定。

7.3 贮运

木霉菌原药包装应贮存在通风、干燥的库房中，贮运时严防日晒及 45℃以上高温，置于阴凉干燥处，否则木霉菌活孢子活性降低。运输时，注意轻放，防止破损。不得与杀菌类以及其他有毒有害物质混装、混运。

7.4 安全

在使用说明书或包装标签上应注明毒性、防护措施等。

7.5 验收期

验收期为 1 个月。从交货之日起，在一个月内完成产品的质量验收，其各项指标均应符合标准要求。

附录 A

(资料性附录)

有效成分描述

中文通用名称：木霉属种名、亚种、变种或专化型+菌株编号

拉丁学名：*Trichoderma*+....

分类地位：真菌（Fungi）； 真菌门（Eumycota）； 半知菌亚门（Deuteromycotina）； 丝孢纲（Hyphomycetes）； 丝孢目（Hyphomycetales）； 丛梗孢科（Moniliaceae）； 木霉属（*Trichoderma*）； 种、亚种、变种或专化型。

形态学特征：本标准中以最常见的3种木霉属种的形态学特征为例，介绍不同种之间木霉菌菌丝、孢子等的不同，并作为菌种鉴别的依据。

A.1 棘孢木霉 *Trichoderma asperellum*

分生孢子：

孢子球形或亚球形或卵圆形，仅在中部稍稍加粗，大小为 $(11.7-6.0) \times (3.0-5.0) \mu\text{m}$ ；分生孢子簇棉絮状，长宽比：1.0-1.4；分生孢子聚合体为深绿色。厚垣孢子顶生，偶尔间生，亚球形至卵圆形，光滑，淡绿色，直径 $6.2-11.5 \mu\text{m}$ 。如图1。

分生孢子梗：

在CMD培养基上分生孢子梗多产生于分生孢子簇内。在分生孢子簇内，有可见的单个分生孢子梗分枝，分生孢子梗上的瓶梗呈现对称分布，顶端具有两个或者多个瓶梗，主轴顶端下面生出的初次分枝常对生，与主轴夹角近 90° 。随着离顶端距离的增加，初次分枝的长度也增加，每对分枝的长度几乎相等，能够产生二级和三级分枝，三级分枝不再进一步分枝。宽 $(1.7-2.8-4.0(-7.0) \mu\text{m}$ 。如图2。

瓶梗：

瓶梗典型地产生于初次、二次、三次分枝的顶端，2-3个瓶梗呈旋涡状排列。瓶梗直、安瓿形，仅在中部稍微加粗。长 $(4.6-6.5-11.5(27.5) \mu\text{m}$ ，宽度为 $2.8-5.4 \mu\text{m}$ ，中间宽 $(2.0-2.7-4.2(-6.8) \mu\text{m}$ ，基部宽 $(1.3-1.8-2.8(-4.7) \mu\text{m}$ ，长宽比：1.6-3.6，基部稍微有缢缩。如图3。

培养性状：

在PDA培养基上的最适生长温度为 30°C ， 30°C 生长 48h 菌落半径为 $31-47\text{mm}$ 。其分生孢子簇呈垫状至半球状，直径为 $0.5-2\text{mm}$ ，离散分布或者汇合，散布于整个菌落或排列为2-2个同心轮纹。菌落形态形成的培养条件为 25°C 黑暗7d。图4为PDA培养基培养后菌落形态，

图5为CMD培养基培养后菌落形态。

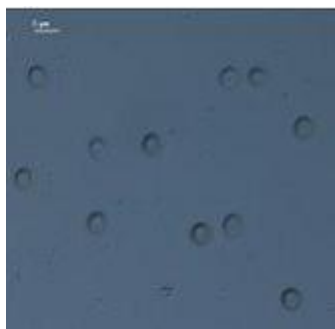


图1 分生孢子

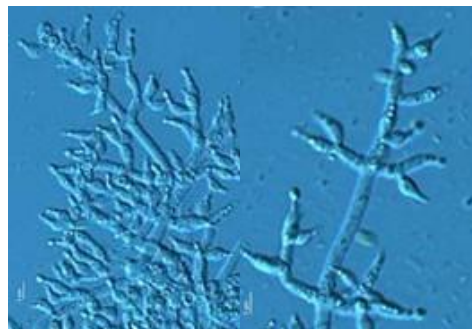


图2 分生孢子梗



图3 瓶梗

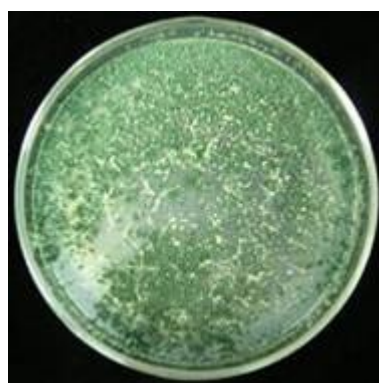


图4 PDA 培养基培养后菌落形态

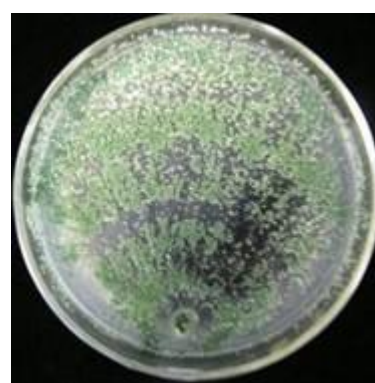


图5 CMD 培养基培养后菌落形态

A.2 哈茨木霉 *Trichoderma harzianum*

菌丝透明，壁光滑，多数直径为2-7 μm ，基内菌丝直径可达12 μm ，厚垣孢子较丰富，间生或端生于短的分枝上，单生，老龄时内容物为半透明至浅黄色或浅棕色，亚球形至椭球形或梨形，多数直径为4-12 μm ，壁透明，1 μm 厚。

分生孢子：

分生孢子亚球形至卵圆形或短的椭球形，多数为1.7-3.2 \times 1.3-2.5 μm ，平均为2.4 \times 1.9 μm ，尖端阔圆形，基部细圆或稍微有尖突；壁光滑很少粗糙，半透明至浅绿色。厚垣孢子较丰富，间生或端生于短的分枝上，单生，老龄时内容物为半透明至浅黄色或浅棕色，亚球形至椭球形或梨形，多数直径为4-12 μm ，壁透明，1 μm 厚。如图6。

分生孢子梗：

分生孢子梗透明，壁光滑，直或者波曲，进基部宽度为8 μm ；分生孢子梗复杂分枝，初级分枝几乎呈直角，或稍微向顶方向弯曲，常2-3个旋涡状排列，向基部逐渐变长，二次分

枝复杂，2-4个呈旋涡状排列，整个结构类似金字塔形状；产孢从分生孢子梗最下部的分枝开始，此时尖端仍在生长，可以形成一个长的不育顶端延长物。如图7。

瓶梗：

瓶梗安瓿形至亚球形或坛形，多数为 $3.5-7.5 \times 2.5-3.8 \mu\text{m}$ ，或顶端瓶梗长达 $10 \mu\text{m}$ ，在基部明显缢缩，中间显著膨大，突然变细成为分生孢子的着生丝， $0.7 \times 1.5 \mu\text{m}$ ，多数为致密的分散式分枝排列；在分生孢子梗尖端有2-4个涡状排列与主轴夹角 90° 或单生，顶端的瓶梗多为柱形或中部略微膨大；非顶部瓶梗为安瓿形至亚球形或坛形多数 $3.5-7.5 \times 2.5-3.8 \mu\text{m}$ ，基部明显缢缩，中部显著膨大。如图8。

培养性状：

在PDA培养基上的最适生长温度为 28°C 。菌落生长快速，3d后菌落半径可达8cm，气生菌丝呈卷毛状，白色至灰色。图9为PDA培养基培养后菌落形态，图10为CMD培养基培养后菌落形态。

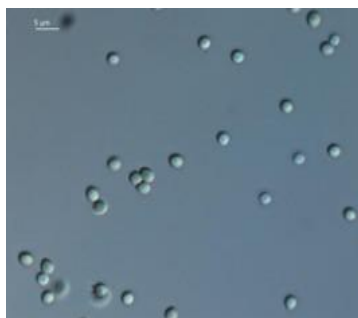


图6 分生孢子



图7 分生孢子梗



图8 瓶梗



图9 PDA 培养基培养后菌落形态

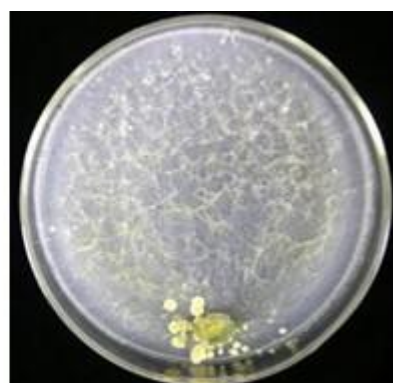


图10 CMD 培养基培养后菌落形态

A.3 深绿木霉 *Trichoderma atroviride*

分生孢子：

绿色，亚球形至卵圆形，没有明显的基部脱落痕迹，光滑。大小为(2.7-) 3.0-3.8 (-5.0) \times (2.3-) 2.8-3.5 (-4.0) μm ，长宽比例为(0.8-) 1.0-1.3 (-1.6)。如图11。

分生孢子梗：

呈锯齿状有规则的分枝。虽然成对着生的分枝比较常见，但是分生孢子梗的典型分枝方式为单侧分枝；分枝角度近似 90° 。如图 12。

瓶梗：

瓶梗长度为(4.2-) 6.0-9.7 (-15.0) μm ，长宽比例为(1.1-) 1.8-3.5 (-6.3)，直或弯曲，有时候为钩状；2-4个呈旋涡状排列，常为单生；最宽处为(1.8-) 2.3-3.5 (-4.8) μm ，基部宽度为(1.2-) 1.7-2.5 (-3.5) μm ，支持细胞宽度为(1.7-) 2.3-3.3 (-4.2) μm 。如图13。

培养性状：

在PDA 培养基上的最适生长温度为25-30 $^\circ\text{C}$ ，25 $^\circ\text{C}$ 生长 72h 菌落半径为(21.7-) 42.8-60.5 (-61.3) mm，有椰子气味或甜味。图14为PDA培养基培养后菌落形态，图15为CMD培养基培养后菌落形态。



图 11 分生孢子

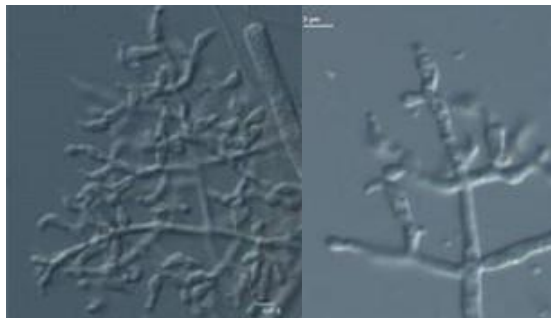


图 12 分生孢子梗



图 13 瓶梗



图 14 PDA 培养基培养后菌落形态

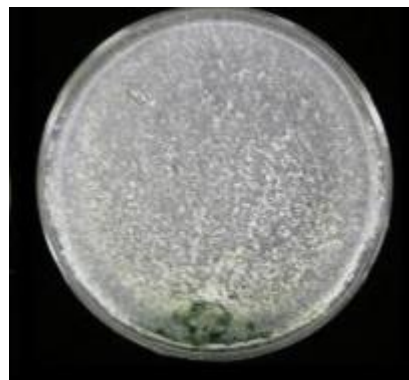


图 15 CMD 培养基培养后菌落形态

有效成分主要存在形式：分生孢子

主要生物活性：抑菌（防病）

培养保存条件：最适生长温度为 $25^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ；适合培养基为PDA或CMD培养基；适宜贮存温度为 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 。

附录 B

(规范性附录)

菌种鉴别方法

B.1 主要仪器设备和材料

除常规微生物试验操作所需要的设备和培养条件外,其他还包括:天平(感量 0.0001g);生物显微镜(10×100 倍);高压灭菌锅;恒温培养箱;移液器;移液管;试管(15mL)及试管架;菌落计数仪(可选);匀质器;L-玻璃棒;培养皿(Φ9cm);载玻片;盖玻片;基因扩增仪;水平电泳仪;超净工作台;通风厨;高速冷冻离心机;蛋白垂直电泳仪;脱色摇床;水浴锅等。

B.2 主要培养基和试剂

试剂:脱氧胆酸钠、Tween80、SDS、EDTA、Tris-HCl、氯化钠、Tris 饱和酚、氯仿、异戊醇、异丙醇、乙醇、Tris-base、TEMED、过硫酸铵、尿素、硫脲、CHAPS、考马斯亮蓝、Tris、丙烯酰胺(Acry)、亚甲双丙烯酰胺(bis)、甘氨酸、硝酸银、醋酸、碳酸钙、甲醛、溴酚兰、β-巯基乙醇、冰乙酸、硫代硫酸钠、醋酸钠等。

培养基:PDA(pH 7.0)培养基,CMD(自然 pH)培养基,制备方法参见附录 C。

B.3 形态学特征鉴别

B.3.1 菌体观察:用生物显微镜观察菌体形态、分生孢子形态等。

B.3.2 菌落形态观察:在 PDA 培养基或 CMD 培养基上生长,25℃~30℃培养 2d~7d 后,观察菌落的形态等。

根据菌落和菌体性状鉴别具体方法如下:

在 PDA 培养基平板上点接木霉菌原粉,27℃培养 24-48 小时应出现白色菌落,72-96 小时后菌落明显扩展。菌丝呈白色,菌丝层较薄,致密丛束状;产孢区有时排成同心轮纹状;菌落背面无色或呈微黄色。镜检,菌丝透明,有隔膜,细胞壁光滑;分生孢子梗由菌丝生出,直立、无色,分枝较多,对生或互生二至三级分枝,形成树枝状;分枝与分生孢子梗近似直角,末端分枝为瓶形小梗;分生孢子呈长球形,单孢,绿色或淡绿色,在小梗上聚集成球状的分生孢子头或单个生长。

B.4 分子生物学特征鉴别

采用PCR扩增法和DNA条形码的标准基因。通过提取木霉菌基因组DNA,采用通用引物扩增木霉菌的ITS序列,目的基因经克隆和序列分析,与已知菌种进行同源性比较分析。。

B.4.1 PCR 扩增

B.4.1.1 采用改良的 SDS 法提取 DNA。具体方法如下：

- 1) 取 20mL PD 培养基于 50mL 离心管，打取一培养 3d 的菌饼接到离心管于 28℃摇床 180rpm 摇菌 48h，取适量菌丝于 1.5mL 离心管。
- 2) 加入提取液（Solution I）600μL 和适量石英砂于离心管，研磨至石英砂成粉末状后置 于 65℃水浴 60 min。
- 3) 13000 rpm 离心 3 min。
- 4) 取上清于 1.5 mL 离心管并加入等体积的酚：氯仿：异戊醇（25:24:1）后 13000 rpm 离 心 3 min。
- 5) 取上清并加入氯仿：异戊醇（24:1）后 13000 rpm 离心 3 min。
- 6) 取上清并加入等体积异丙醇沉淀 DNA（-20℃放置 1h），13000 rpm 离心 3min。
- 7) 70%乙醇洗涤 2 次，干燥，13000 rpm 离心 3 min。

B.4.1.2 分别以木霉菌基因组 DNA 为模板,参照 White 等的方法选用 ITS4 和 ITS5 两种通用引物扩增 ITS-5.8S-ITS2 区序列 ITS-rDNA，利用引物 Ef728 和 Tef1αR 扩增 ITS1-18S-ITS2 区序列 *Tef1-α*。反应体系如表 1。

表 1 扩增木霉菌序列特异性扩增反应体系

试剂	用量（μL）
模板	2
Premix	25
引物 ITS4	2
引物 ITS5	2
ddH ₂ O	19
总量	50

ITS-rDNA 上游引物：ITS4：5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

ITS-rDNA 下游引物：ITS5：5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

ITS-rDNA 反应程序扩增参数参考 Bisset^[225]有所变动，如下：

94℃预变性	1 min
94℃变性	1 min

50℃退火	50 s
72℃延伸	1 min
共 33 个循环	
72℃延伸	10 min

每一引物重复试验 3 次。

Tef1-α 上游引物: Ef728:5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'

Tef1-α 下游引物: Tef1αR:5'-GCCATCCTTGGGAGATACCAGC-3

Tef1-α 反应程序扩增参数参考 Chelkowski^[195]有所变动，如下：

94℃预变性	5 min
94℃变性	30s
55℃退火	1min
72℃延伸	1 min
共 35 个循环	
72℃延伸	7 min

每一引物重复试验 3 次。

PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，以 DNA Marker (λHindIII digest) 指示谱带的大小及相对位置，稳压 125V 电泳 35min 检测。凝胶成像系统观察，置图像处理仪中处理并保存。

B.4.1.3 目的基因序列测定

1) PCR 产物连接 T 载体

所需试剂来自宝生物公司 Takara T 载体试剂盒（可根据实际需要适当调整）。

表 2 连接 T 载体反应体系

试剂	用量（μL）
Solution I	5
Ptg19-T vector	0.5
PCR 产物	4.5

2) 转化大肠杆菌

- a. 加 10 μL 连接产物于 100 μL 感受态细胞中，冰浴 30 min;

- b. 42℃ 热激 90s;
- c. 冰浴 5 min;
- d. 加 500 μL LB 液体培养基, 37℃ 150 rpm 摇床 30 min;
- e. 100 mL LB 固体培养基加 1% 青霉素 0.1 mL 后倒平板, 取 50 μL 菌液涂平板培养过夜 (24h)。

3) 菌落 PCR

- a. 每板挑取转化后涂板的单克隆菌落 5 个, 转接至装有 500 μL LB 液体培养基的 1.5 mL 离心管中, 200rpm 37℃ 摇床 3~4h;
- b. 参照 ITS 扩增条件, 取 1μL 菌液作为 DNA 模板进行 PCR 反应;
- c. 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 反应产物;
- d. 选择阳性菌落测序。

4) DNA 序列分析

测序结果经 BioEdit 等软件分析和手工校正后, 登陆 NCBI 进行 BLAST (2.2.12 version) 序列比对, 程序将测序的基因序列分别与 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) 中已知菌种的 ITS 序列(见图 1)进行同源性比较分析。

哈茨木霉 (*T. harzianum*) ITS 序列^[4]

internal-transcribed spacer 1 and 2: ^[4]

```
TTAAGTTCAGCGGGTATTCTACCTGATCCGAGGTCAACATTTTCAGAAGTTGGGTGT TTAACGGCTGTGGACGCGCGCGCTCCCGATGCGA
GTGTGCAAACTACTGCGCAGGAGAGGCTGGGCGGAGACCGCCACTGTATTTTCGGAGACGGCCAGCCGCCAAGGCAGGCGCGATCCCAACGCC
GACCCCGCGAGGGGTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGCCAGAATACTGCGGGCGCAA TGTGCGTTCAAAGATTGCA
TGATTCACTGAATTCGCAATTCACATTACTTATGCGCATTTCCGTGCGTCTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTT
TGATTCAATTTTCGAAACGCCCTACGAGAGGCGCCGAGAAGGCTCAGATATAAAAAAACCACGAGGGGGTATACAATAAGAGTTTGGTTG
GTCTCTCCGGCGGGCGGCTGTGTCGGGGCTGCGACGCGCCGGGCGAGAGATCCCGCGAGGCCAACAGTTTGGTAAAGTTCACATTGGGTTT
GGGAGTTGTAACCTCGGTAAATGATCCCTCCGCTGGTTCAACCAACGGAGA.
```

translation elongation factor 1 alpha (tef1a)^[4]

```
1  aacacttgtg ctaaccacca tcttctaggg gtgcgtattc catcaatcat ctggaatgag
61  atcgatcgaa cacagtactg acttggtaca acagccagct cgactccgga aagtcgacca
121 ccgtgagttg caccctcttc tctgtctcgg atatcaaagc tcgtttgata cgggacatct
181 acccttgaac acagggctaa ccatttatca tacagaccgg tcacttgatc taccagtgcg
241 gtggtatcga ccgtcgtacc atcgagaagt tgcagaaggt aagcttcaac tcattttcgc
301 ctcgattctc cctccacatt caattgtgcc cgacaattct gcagagaatt ttctgtgtcga
361 caatttttca tcaccccgct ttccattacc cctcctttgc agcgacgcaa attttttttt
421 ttgtgtcgtt ttggttttag tgggttttct tgcacccac tagctcacta ctttttttct
481 acttggctct cacttccag ccattattca acatgttcta tctctcgtca ctttcaacga
541 tgctaaccac aatttccatc aataggaagc cggcgaactc ggcaagggtt ctttcaagta
601 cgcttgggtt cttgacaagc tcaaggccga gcgtgagcgt ggtatcacca tcgacattgc
```


深绿木霉 (*T. atroviride*) ITS 序列⁴

internal-transcribed-spacer 1 and 2: ⁴

T T A A G T T C A G C G G G T A T T C T A C T G A T C G G A G G T C A A C A T T T C A G A A A G T T G G G T G T T T A C G G A C G T G A C G C G C C G G C T C C G G T G C G
A G T T G T G C A A A C T A C T G C G C A G G A G G C T G C G G G A G A C C G C A C T G T A T T T C G G G G C C G G A T C C C G T C T T A G G G G C T C C G A G T C C C C
A A C G C C G A C C C C C G G A G G G T T C G A G G T T G A A A T G A C G C T G G A C A G C A T G C C C G C A G A A T A C T G G C G G C G C A A T G T G C G T T C A A A G
A T T C G A T G A T T C A C T G A A T T C T G C A A T T C A C A T T A C T T A T C G C A T T T C G T G C G T T C T T C A T C G A T G C C A G A A C C A A G A G A T C C G T T G T T G A
A A G T T T T G A T T C A T T T G A A T T T T G C T C A G A C T G T A A G A A A T A A C G T C G C G A G G G A C T A C A G A A A G A G T T T G G T T G T C C T C C G G C
G G G C G C T G G T T C G G G G C T G G A C G C A C C C G G C G T G A C C C C C G A G G C A A C A G T T T G G T A T G G T T C A C A T T G G G T T T G G A G T T G T A A
A C T C G G T A A T G A T C C C T C G C T G G T T C A C C A C G G A G A ,

translation elongation factor 1 alpha (tef1a)⁴

1 - - - c a t c a t g c c c g a c a t t c i g t c c t c a g t c t t g t c a t t t t t t t t t c t c g c a g c a t c a c a c c ,
61 - - c c g c t t t a c c t g t c t a c c c c t c c t t t g c a c a g c a a a a t t t t c t g g c t g c c t t g c t t g g t t ,
121 - t t t a g g g g g t g c c a g t t t t t t c t g t t t g g c t g g a a c c c c g c t a t c c c c a c t g c c c t c c ,
181 - g t c c c a a c a a a t t g t c g t c g c i c a a t t g c a t g t c t c t c g c c t c c a t c t c t g t g t g t t c ,
241 - a t t g t g c t a a t c a t g c t t c a a t c a a t a g g a a g c c g c c a a a c t c g g c a a g g g t t c t t t c a a ,
301 - g t a t g c g t g g g t t c t t g a c a a g c t c a a g g c c g a g c g t a g c g t g g t a t c a c a t c g a c a t ,
361 - t g c c c t c t g g a a g t t c g a g a c t c c c a a g t a c t a t g t c a c c g t c a t t g g t a t g t t t c c a g t ,
421 - c t t c c t c a t t g a c a t t t c g a g c c a t c a t t c t a a c g t g c c a c t c t a c a a a c g c t c c c g g t ,
481 - c a c c g t g a t t t c a t c a a a a a c a t g a t c a c t g a t a c c t c c c a g g t g a c t g c g t a t c c t g ,
541 - a t t a t c g c t g c c g t a c t g g t g a g t t c a a g g t g t a t c t c c a a g g a t g g c c a a a c ,

棘孢木霉 (*T. asperellum*) ITS 序列⁴

internal-transcribed-spacer 1 and 2: ⁴

T C T C C G T T G G T G A A C C A G C G G A G G A T C A T T A C C G A G T T T A C A A C T C C C A A A C C C A A T G T G A A C G T T A C C A A A C T G T T G C C T G C G C G G G T C
A C G C C C C G G G T G C G T C G C A G C C C C G G A A C A G G C G C C G C C G G A G A A C C A A C C A A A C T C T T T C T G T A G T C C C T C G C G G A C G T A T T C T T T A
C A G C T C T G A C A A A A T T C A A A T G A A T C A A A C T T T C A A C A A C G G A T C T C T T G G T T C T G C A T C G A T G A A G A A C G C A G C G A A T G C G A T A A
G T A A T G T G A A T T C A G A A T T C A G T G A A T C A T C G A A T C T T T G G A C G C A C A T T G C G C C G C C A G T A T T C T G G C G G G C A T G C C T G T C G A G G G T C
A T T T C A A C C C T C G A A C C C T C C G G G G A T C G C G T T G G G A T C G G G A C C C C T C A C A C G G G T G C G G C C C G A A A T A C A G T G C G G T C T C G C C
G C A G C C T C T C T G C G C A G T A T T T G C A C A A C T C G C A C C G G A G C G C G C G C G T C C A C G T C C G T A A A A C A C C C A A C T T T C T G A A A T G T T G A C C
T C G G A T C A G G T A G G A A T A C C C G T G A A C T T A A ,

translation elongation factor 1 alpha (tef1a)⁴

1 - - - a a c c c a t t c t g t t t t c c c a t c a a c t t t t a g a c a c a c t c a t a g t g c c c g a c a a t t g g g t ,
61 - - c t c a g t t t t t g t c t t t t t t t t c c a g c g t c a c c c g c t t t g c c a g t c t a c c t a c c c t c c t ,
121 - t t g g c a c a g c a a a a t t t t c t g g c t g c c t t g t t g g c t t t t a g t g g g t t g t c a a a t t t t t ,
181 - t g g c a g c a a c c c g c t a t c g c c a c t g c a c c t c t t c c a t c a c c c a c a c a t g c t a t t t g c t ,
241 - c a a t c g c g t c g t c t t t t t t t g t t c a t t a t g c t g a t c a t g c t t c a a t c a a t a g g a a g c c g c ,
301 - c g a a c t c g g c a a g g t t c c t t c a a g t a t g c g t g g t t c t t g a c a a g t c a a g c c g a g c g ,
361 - t g a g c g t g g t a t c a c c a t c g a c a t t g c c c t c t g g a a g t t c g a g a c t c c c a g t a c t a t g t ,
421 - c a c c g t c a t t g g t a t g t t t t g g a c t c t t c t c t c a g c t a t c a a c a t t c c a a g t c c g c c a t ,
481 - t c g a a c a t g c t c t t c c c a c a g a c g c t c c c g g t c a c c g t g a t t t c a t c a a g a a c a t g a t c a ,
541 - c t g g t a c c t c c a g g c t g a c t g c g c t a t c c t g a t t a t c g c t g c c g g t a c t g g t g a g t t c g ,
601 - a g g c t g g t a t c t c c c a a g g a t g g c ,

图 1 哈茨木霉 (*T. harzianum*)、深绿木霉 (*T. atroviride*)、棘孢木霉 (*T. asperellum*)

附录 C
(资料性附录)
稀释液和培养基制备

C.1 稀释液

C.1.1 PCR 扩增溶液

C.1.1.1 DNA 提取液 (Solution I)

20% SDS, 10 mL; 0.5M EDTA, 10 mL; 1M Tris-HCl, 10 mL ; NaCl, 0.5844g; 去离子水, 70 mL , 调节 pH8。

C.1.1.2 50×TAE 缓冲液

Tris, 242g; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 37.2g; 加入约 800mL 去离子水充分搅拌溶解; 加入 57.1mL 醋酸, 充分混匀后定容至 1L。

C.1.2 SDS-PAGE 溶液

C.1.2.1 40% Acry/bis (37.5:1) 储液

丙烯酰胺 30g; 亚甲双丙烯酰胺 0.8g; 去离子水溶解定容至 100mL。

C.1.2.2 10% (w/v, g/mL) 过硫酸铵 (APs) (1mL)

过硫酸铵 0.1g, 加入去离子水 1mL。

C.1.2.3 5×蛋白电泳缓冲液 (1L)

Tris 15.1g; 甘氨酸 94g; SDS 5.0g; 加入去离子水搅拌溶解后定容至 1L。

C.1.2.4 5×蛋白上样缓冲液 (5mL)

1M Tris- HCl (pH 6.8) 1.25mL; 甘油 2.5mL; SDS 0.5g, 溴酚蓝 25mg; 加入去离子水定容至 5mL。

C.2 培养基

C.2.1 成分

C.2.1.1 PDA 培养基 (pH 7.0)

马铃薯 200g; 葡萄糖 20 g; 琼脂 20g; 蒸馏水, 1000 mL 。

C.2.1.2 CMD 培养基

玉米粉 50g; 葡萄糖 10g; 琼脂 15g; 蒸馏水, 1000mL, 自然 pH。

C.2.1.3 NA 培养基 (pH 7.0~7.4)

牛肉膏, 3.0 g; 蛋白胨, 5.0 g ; 琼脂, 20.0 g; 蒸馏水, 1000 mL 。

C.2.1.4 SA 培养基

蔗糖 20g；琼脂 15g；蒸馏水，1000mL，自然 pH。

C.2.2 制法

将上述成分溶解，分装于三角瓶中，塞上棉塞或用灭菌用封口膜包扎好后于 $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌 20 min。
