

张轶敏,王 东,王 煜,等. 棘孢木霉 PT-29 代谢产物抑制镰刀菌毒素的产生[J]. 江苏农业科学,2023,51(21):126-132.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.21.020

# 棘孢木霉 PT-29 代谢产物抑制镰刀菌毒素的产生

张轶敏,王 东,王 煜,郝建秀,周洪友

[内蒙古农业大学园艺与植物保护学院/生物农药创制与资源利用自治区高等学校重点实验室(培育),内蒙古呼和浩特 010018]

**摘要:** 为了解棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*) PT-29 的抑菌机制及其代谢产物对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*) ZY-3-1 的生防作用,采用双培养试验、对峙试验、培养滤液试验,测定棘孢木霉 PT-29 及其代谢产物对尖孢镰刀菌 ZY-3-1 的拮抗作用,并使用荧光定量 PCR 和高效液相色谱技术,定量分析了棘孢木霉代谢产物对尖孢镰刀菌 ZY-3-1 中镰刀菌酸的抑制作用。结果表明,棘孢木霉 PT-29 对尖孢镰刀菌 ZY-3-1 的抑菌率达 63.64%,同时增强了马铃薯植株对尖孢镰刀菌的抗性;木霉代谢液、挥发性物质对尖孢镰刀菌 ZY-3-1 的抑菌率分别达 52.22%、42.86%。木霉代谢产物处理抑制镰刀菌酸相关合成基因的表达;木霉代谢液处理后,尖孢镰刀菌中镰刀菌素含量为 0.003 3  $\mu\text{g/mL}$ ,木霉挥发性代谢产物处理后,尖孢镰刀菌中镰刀菌素的含量为 0.031 8  $\mu\text{g/mL}$ ,均显著低于对照组菌株镰刀菌素的含量(0.086 0  $\mu\text{g/mL}$ )。本研究初步解释了棘孢木霉对尖孢镰刀菌的生防机制,棘孢木霉 PT-29 的代谢产物在防治马铃薯枯萎病中展现出巨大潜力,可为马铃薯枯萎病的防治提供新的思路和见解。

**关键词:** 棘孢木霉;生物防治;尖孢镰刀菌;镰刀菌酸;次级代谢物

**中图分类号:** S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2023)21-0126-07

马铃薯(*Solanum tuberosum*)是我国重要的粮食作物之一,由于其自身独特的营养和适应性,在提供碳水化合物、蛋白质、纤维、多种维生素、矿物质方面发挥着举足轻重的作用<sup>[1]</sup>。近年来,随着对马铃薯种植和生产的愈发重视,我国马铃薯的种植范围不断扩大。然而,马铃薯植株易受土传真菌的侵染,造成马铃薯的产量和品质下降,导致严重的经济损失。其中,马铃薯枯萎病的发生较为严重<sup>[2]</sup>。病原尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)通过菌丝侵入宿主维管系统,损害宿主植物,分泌水解酶和真菌毒素,造成马铃薯的根、茎坏死,细胞凋亡,叶片萎蔫,植株在几周内死亡,最终导致马铃薯产量受损<sup>[3-5]</sup>。马铃薯枯萎病的防治一直是农业生产中的难题,传统的防治措施包括加强田间管理、使用化学杀菌剂、利用抗性品种等<sup>[6]</sup>。对于许多病原真

菌,应用化学杀菌剂是一种高效的管理措施。但过度使用合成农药,会导致空气污染、土壤肥力下降、食物中农药残留超标等负面影响;而过度使用化学杀菌剂,极有可能产生新的病原菌或抗药性菌株<sup>[7-8]</sup>。

大量研究表明,生物防治是一种绿色可持续的农业管理措施,能够有效控制病原菌的生长和繁殖<sup>[9]</sup>。近年来,来自微生物的次生代谢产物(secondary metabolites, SMs)在植物病害防治中发挥了重要作用<sup>[10]</sup>。2021 年, Yue 等从海葵共生真菌 *Emericella* sp. SMA01 中分离出吩嗪类物质吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid),能有效抑制辣椒疫霉<sup>[11]</sup>。棘孢木霉是当今使用最广泛的生防制剂,其生防机制与其次生代谢产物(SMs)密切相关,木霉属物种能够产生多种次级代谢物,不同次级代谢物可抵抗不同的病原体<sup>[12]</sup>。例如,棘孢木霉(CBS 433.97)产生的次级代谢产物——苯乙醇,对禾谷镰刀菌和尖孢镰刀菌均具有明显的抑制作用<sup>[13]</sup>。Tomah 等研究发现,绿色木霉(*T. virens*)产生的胶霉毒素(gliotoxin)能显著降低辣椒疫病的发病率和严重程度<sup>[13]</sup>。尖孢镰刀菌是一种丝状真菌,可产生 44 种具有多种生物活性的次级代谢产物<sup>[14]</sup>。镰刀菌酸(fusaric acid, FA)(5-丁基吡啶羧酸)是尖孢镰刀菌分泌的常见毒素之一,也是主要

收稿日期:2023-02-07

基金项目:内蒙古自治区重点研发项目(编号:2022YFHH0036);中央引导地方科技发展资金(编号:2021ZY0005);内蒙古自治区科技重大专项(编号:2021ZD0005)。

作者简介:张轶敏(1996—),女,内蒙古鄂尔多斯人,硕士研究生,主要研究方向为有害生物综合防治。E-mail:1305070717@qq.com。

通信作者:周洪友,博士,教授,研究方向为植物病害防治及植物病理学。E-mail:hongyouzhou2002@aliyun.com。

致病因子,其合成基因和调控途径已被广泛研究。Smith 等研究表明,镰刀菌酸的合成与 FUB 基因簇相关<sup>[15-16]</sup>。聚酮合酶(PKS, FUB1)、未知蛋白(FUB2)、天冬氨酸激酶(FUB3)、丝氨酸水解酶(FUB4)共同作用产生镰刀菌酸毒素,通过 qPCR 方法检测其基因表达水平,可推断镰刀菌酸的合成是否受到影响<sup>[17]</sup>。

越来越多的研究更加关注利用木霉衍生的抗真菌化合物探索防治病害的机制<sup>[18-19]</sup>。鉴于木霉菌次级代谢产物的广泛应用及其显著的抗真菌活性,有必要对以棘孢木霉(*T. asperellum*) PT-29 的次级代谢产物作为防治马铃薯枯萎病的潜在生物农药进行评价<sup>[20]</sup>。本试验在温室条件下评价尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) ZY-3-1 对马铃薯的致病性,分析棘孢木霉 PT-29 代谢产物对菌株 ZY-3-1 的抑制作用,同时结合液质联用技术,初步探究棘孢木霉 PT-29 代谢产物对菌株的抑制机制,以期对马铃薯枯萎病的防治提供新的思路和方法<sup>[21]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株材料与培养条件

棘孢木霉(*T. asperellum*) PT-29 与尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) ZY-3-1 由内蒙古农业大学生物农药实验室菌种保藏库提供。培养条件:培养基为马铃薯葡萄糖琼脂(PDA;200 g 马铃薯切碎煮沸的滤液,20 g 葡萄糖,17 g 琼脂,1 000 mL 蒸馏水);将用甘油保存的尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) ZY-3-1 菌饼放入 PDA 中,黑暗条件(28 ℃)下培养 7 d;长出新菌丝后将 5 个菌饼放入马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)中,180 r/min(28 ℃)离心培养 7 d。用无菌水将孢子悬液的浓度调节至  $1 \times 10^6$  CFU/mL,使用普通光学显微镜观察计数。供试马铃薯品种为 Favorite,种薯和组培苗均购自武川县塞丰马铃薯种业有限公司。

### 1.2 棘孢木霉 PT-29 代谢液的制备

将 5 个棘孢木霉 PT-29 菌饼放入含有 250 mL 马铃薯葡萄糖肉汤(PDB)中,180 r/min(28 ℃)离心培养 7 d。7 d 后用双层纱布过滤,除去菌丝体,离心 10 min(9 000 r/min),收集上清液并使用 0.22 μm 水系过滤器除菌,获得的代谢物保存于 4 ℃ 条件下备用<sup>[22]</sup>。

### 1.3 致病性分析

试验于 2022 年 7 月在内蒙古农业大学园艺与

植物保护学院日光温室内进行。马铃薯脱毒微型薯置于 2% NaClO 溶液中灭菌 10 min,后置于 75% 乙醇中 1 min,最后用无菌水冲洗 3 次<sup>[23]</sup>。将基质与土壤按 1:4 的体积比例混匀,用于培养马铃薯幼苗。马铃薯播种 25 d 后,对马铃薯幼苗进行伤根处理。空白对照:只接种 20 mL 无菌水;阳性对照:只接种 20 mL  $1 \times 10^6$  CFU/mL ZY-3-1 菌悬液至根系周围土壤中;处理:将 20 mL  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的棘孢木霉 PT-29 菌悬液加入至根系周围土壤中,接菌处理 2 d 后,将 20 mL  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的尖孢镰刀菌 ZY-3-1 菌悬液加入至上述处理后的盆栽中。每组处理重复 3 次。接种尖孢镰刀菌 ZY-3-1 20 d 后,观察植株叶片发病情况。按病害严重程度分级,标准如下:1 为无明显损伤;2 为病斑直径 < 1.0 cm;3 为病斑直径为 1.0 ~ 1.5 cm;4 为病斑直径为 1.5 ~ 2.0 cm;5 为病斑直径 > 2.0 cm,病斑相连呈不规则大斑块;6 为整片叶片侵染发病。计算病情指数,病情指数 =  $\sum(\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值}) \times 100$ 。

取 3 片大小一致且完全展开的马铃薯叶片,放入装有滤纸的保湿盒中。将真菌接种在马铃薯叶片背面,每组重复 3 次。空白对照(CK):只接种 20 μL 清水;阳性对照(B):只接种 20 μL  $1 \times 10^6$  CFU/mL ZY-3-1;处理(A):先接种 20 μL  $1 \times 10^6$  CFU/mL 棘孢木霉 PT-29 悬浮液,2 d 后接种 20 μL  $1 \times 10^6$  CFU/mL ZY-3-1。在保湿盒中加入少量水,保证叶片足够湿润,每天拍照观察叶片的发病情况<sup>[24]</sup>。

### 1.4 棘孢木霉 PT-29 对尖孢镰刀菌 ZY-3-1 的生物测定

将直径为 5 mm 的棘孢木霉 PT-29、尖孢镰刀菌 ZY-3-1 菌饼置于 PDA 培养基上,彼此相距 5 cm,距离平板两边 2 cm。对照组中,ZY-3-1 被单独放置在含有 PDA 的培养皿(9 cm)中。28 ℃ 下培养 7 d,处理和对照平板同时重复 3 次。每天观察生长情况并记录菌落直径,当对照组中的菌落直径达到最大值时停止记录<sup>[25]</sup>。菌丝生长抑制率 =  $(C - T) / C \times 100\%$ ,其中,T、C 分别是处理、对照平板中尖孢镰刀菌的菌落直径。

### 1.5 棘孢木霉 PT-29 代谢产物抗真菌的生物测定

通过密封平板法测试棘孢木霉 PT-29 的挥发性代谢产物对尖孢镰孢菌 ZY-3-1 生长的影

响<sup>[26]</sup>。棘孢木霉 PT-29、尖孢镰刀菌 ZY-3-1 在含有 PDA 的培养皿中分别生长 3、7 d。从培养皿上切下菌饼(直径 5 mm),分别放入培养基的中心,移除培养皿盖,然后将 2 个培养皿底部对扣并用密封膜密封。以仅含有 ZY-3-1 菌饼的 PDA 作为对照,在 28 ℃下培养 5 d<sup>[27]</sup>。采用“1.4”节中的方法测定挥发性代谢产物对尖孢镰刀菌 ZY-3-1 的菌丝生长抑制率,每个处理重复 3 次。

配制 PDA 培养基,将制备好的棘孢木霉 PT-29 代谢液以 25% 的体积比加入到 PDA 中,无菌蒸馏水以 25% 的体积比加入 PDA 作为对照,分别制作平板。将菌株 ZY-3-1 的菌饼(直径 5 mm)接种到含有棘孢木霉 PT-29 代谢液和对照的 PDA 平板中。28 ℃下培养 7 d,每个处理重复 3 次。用交叉法测定 ZY-3-1 的菌落直径,计算菌丝生长抑制率,计算方法同“1.4”节。

1.6 镰刀菌酸相关致病基因的相对表达水平

收集“1.5”节中挥发性代谢产物和代谢液处理菌株 ZY-3-1 的菌丝,用 qRT-PCR 方法检测镰刀菌酸相关基因(*FUB1*、*FUB2*、*FUB3*、*FUB4*)的表达。*actin* 作为内参基因。qRT-PCR 中使用的基因引物为 *FUB1* F: ACTTCGCCCTCGTCATCTC, R: GAACCCAGCATCAAATTAT; *FUB2* F:GCCAACTGCTGCTCACTAT,R:TTCCGAGGTGGAGATTAG;*FUB3* F:CCCGATACACCATACCCT,R:CCAACTTCTTGCCGTGAG;*FUB4* F:CACCCTTGCTCATCACAG,R:CGTAAAAATATCCTTCCGAATAATC;*actin* F:GAGGGACCGCTCTCGTCGT,R:GGAGATCCAGACTGCCGCTCAG。使用 Primer Script RT Master Mix (TaKaRa 公司,中国)合成第一链 cDNA,qRT-PCR 程序为 95 ℃ 1 min;95 ℃ 5 s,60 ℃ 15 s,40 个循环。每次处理进行 3 次独立的定量 PCR 检测,根据  $C_T$  值法计算目标基因的相对表达水平<sup>[28-29]</sup>。

1.7 液相色谱定量镰刀菌酸

尖孢镰刀菌 ZY-3-1 及经木霉 PT-29 代谢产物处理后的尖孢镰刀菌 ZY-3-1 经过 4 ℃解冻混匀后,准确移取 2 g 菌丝,混于 15 mL 离心管中,然后加入 5 mL 乙酸乙酯,振荡混匀 10 min,低温超声 15 min,5 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移至另一个 15 mL 离心管中,重复提取 3 次,合并样品,低温冻干,然后用 0.5 mL 色谱级甲醇定容,振荡混匀 5 min,过 0.22 μm 滤膜,待测。

通过连接到检测器(Prostar DAD 330,variable,

德国)的 HPLC(Jasco 公司,日本)进行分析,波长为 270 nm,色谱柱为 250 nm × 4.6 nm,填料直径为 0.5 μm,柱温为 25 ℃<sup>[30]</sup>。流动相为 10% 甲酸水和甲醇的梯度,体积比为 1:9。流速为 0.1 mL/min,采用外标法定量分析,镰刀菌酸标准品浓度≥98%。

1.8 统计分析

使用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA)和数据处理;并使用 Graphpad 9.0 软件进行数据统计分析并作图<sup>[31]</sup>。

2 结果与分析

2.1 马铃薯盆栽试验病情指数的统计及离体叶片的发病症状表现

由图 1 的盆栽试验可知,生长 25 d 的马铃薯苗,接种菌株 ZY-3-1 20 d 后,植物表现出叶片变黄、萎蔫及维管束变褐的症状,病情指数为 65.91;而棘孢木霉 PT-29 灌根处理 18 d 后,马铃薯叶片变黄和萎蔫程度显著降低,病情指数为 25.81,显著低于阳性对照( $P<0.05$ )(表 1)。利用离体叶片接种法接种,接种 3 d 后,接种部位出现病斑;接种 5 d 后,病斑明显扩大且叶片开始发黄,接种 7 d 后马铃薯离叶片产生明显的坏死症状,接种部位腐烂明显,大部分叶片变黄,病斑面积较大,而用棘孢木霉 PT-29 处理过的叶片症状较轻(图 2)。

表 1 棘孢木霉 PT-29 对马铃薯枯萎病的防治效果

处理	病情指数	防治效果
ZY-3-1 (CK)	65.91a	
PT-29 + ZY-3-1	25.81b	58.32%

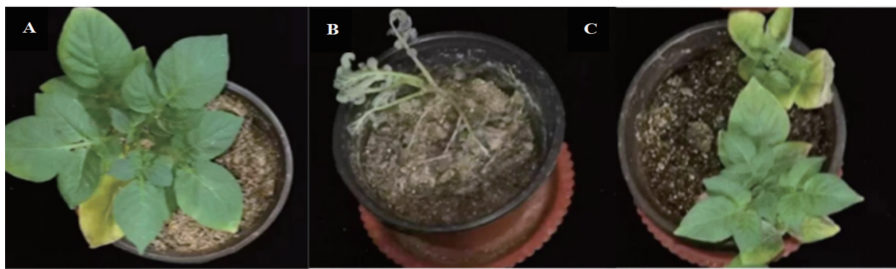
注:同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )。

2.2 棘孢木霉 PT-29 菌株对病原体拮抗作用的影响

通过双培养生物测定试验发现,棘孢木霉 PT-29 对菌株 ZY-3-1 的生长速率和颜色产生影响(图 3),菌株 ZY-3-1 培养 5 d 后,菌落的直径为 7.7 cm,呈深红色,菌丝致密且生长较快;而与棘孢木霉 PT-29 共培养 5 d 后,菌株 ZY-3-1 菌落的直径为 2.8 cm,呈红色,靠近棘孢木霉 PT-29 菌株方向的病原菌生长缓慢,菌丝稀疏;棘孢木霉 PT-29 对菌株 ZY-3-1 的抑制率达到 63.64%。

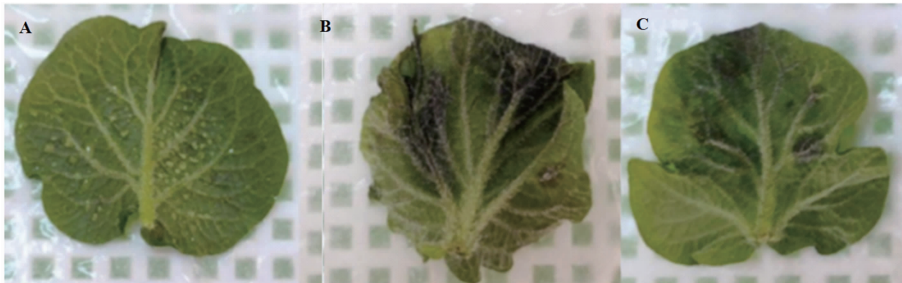
2.3 棘孢木霉 PT-29 代谢产物对生物量和菌落生长的影响

用双平板法测定棘孢木霉 PT-29 释放的挥发性有机化合物对菌株 ZY-3-1 菌丝生长的抑制活



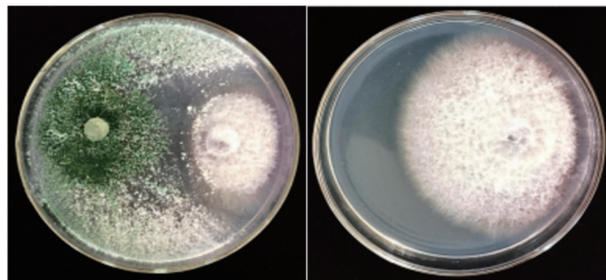
A. 棘孢木霉 PT-29 菌悬液处理; B. ZY-3-1 菌悬液处理液; C. 清水对照

图1 盆栽试验棘孢木霉 PT-29 对马铃薯枯萎病的防效



A—棘孢木霉 PT-29 菌悬液处理; B—ZY-3-1 菌悬液处理液; C—清水对照

图2 离体叶片接种棘孢木霉 PT-29 对马铃薯枯萎病的防效



PT-29

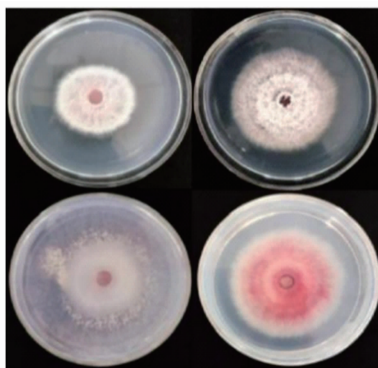
CK

图3 棘孢木霉 PT-29 对菌株 ZY-3-1 的拮抗作用

性,ZY-3-1 与棘孢木霉 PT-29 菌落没有物理接触。挥发性有机化合物抑制了菌株 ZY-3-1 菌落的直径,未经处理的菌株 ZY-3-1 菌丝体在培养

5 d 后,直径为 3.5 cm;相比之下,用挥发性有机化合物处理的菌丝体生长直径为 2.0 cm,抑菌率为 42.86%;菌株 ZY-3-1 菌落产生深红色素,经处理的菌株 ZY-3-1 菌落为浅红色(图 4-A)。

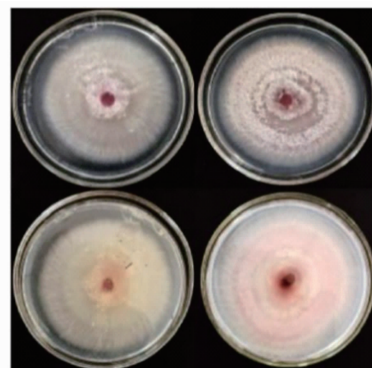
在含有棘孢木霉 PT-29 代谢产物的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)平板上,检测棘孢木霉 PT-29 代谢物对菌株 ZY-3-1 的影响。结果如图 4-B 显示,在含有棘孢木霉 PT-29 代谢液的平板中,菌株的菌丝体生长被明显抑制,抑制率为 52.22%,菌丝体质地稀疏且无色素产生;而对照组的菌丝体质地致密且产生浅红色素。



PT-29 挥发性化合物

CK

A. 棘孢木霉 PT-29 挥发性物质对菌株 ZY-3-1 的影响



PT-29 代谢液

CK

B. 棘孢木霉 PT-29 代谢液对菌株 ZY-3-1 的影响

上、下排分别为菌丝正、背面图;CK 为无菌水处理

图4 棘孢木霉 PT-29 代谢产物对菌株 ZY-3-1 的影响



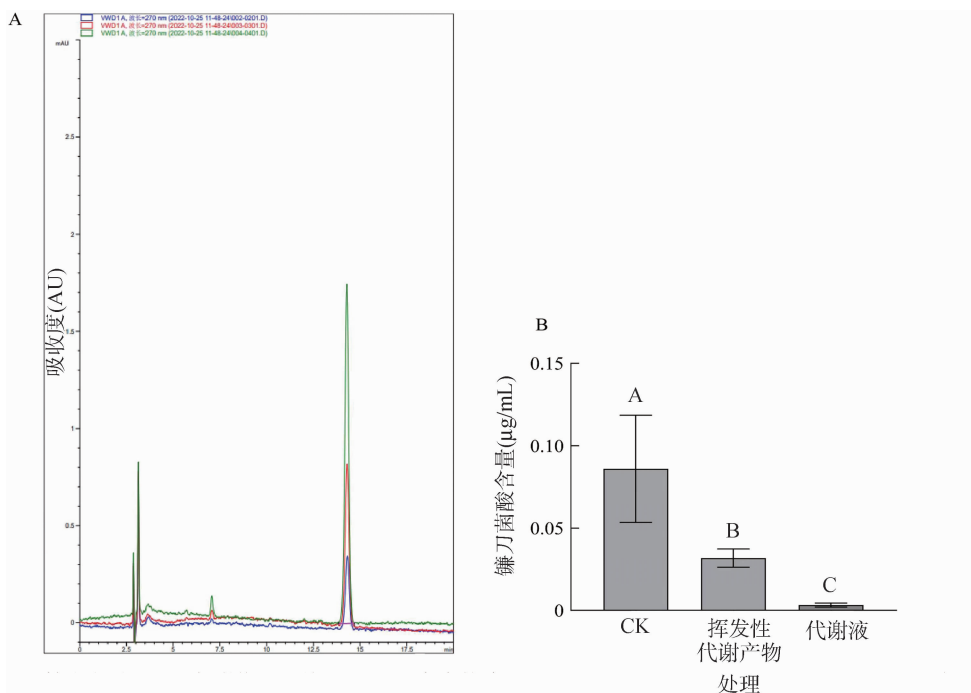
## 2.4 棘孢木霉 PT-29 代谢产物对镰刀菌酸含量的影响

通过液相色谱检测镰刀菌酸的含量,结果(图 5-A)表明,菌株 ZY-3-1、棘孢木霉 PT-29 挥发性代谢产物处理的菌株 ZY-3-1、棘孢木霉 PT-29 代谢液处理菌株 ZY-3-1 产生的镰刀菌酸的峰面积分别为 5.963、1.831、0.120。由此推断,处理前后菌株中的镰刀菌酸含量发生了改变。通过镰刀菌酸标准品构建基于峰面积和镰刀菌酸质量浓度的标准曲线( $y = 49.178x - 72.565, r^2 = 0.9988$ )发现,棘孢木霉代谢液处理组中镰刀菌酸含量为  $0.0033 \mu\text{g/mL}$ ,棘孢木霉 PT-29 挥发性物质处理组的镰刀菌酸含量为  $0.0318 \mu\text{g/mL}$ ,而对照组中镰刀菌酸含量高达  $0.0860 \mu\text{g/mL}$ (图 5-B),处理

前后镰刀菌酸含量差异极显著( $P < 0.001$ )。

## 2.5 棘孢木霉 PT-29 代谢产物对镰刀菌酸毒素合成基因表达的影响

为进一步确认镰刀菌酸的合成受到了抑制,通过 qRT-PCR 技术检测棘孢木霉 PT-29 代谢产物对镰刀菌酸毒素相关合成基因表达的影响。结果表明,经棘孢木霉挥发性物质处理过的菌株 ZY-3-1 中镰刀菌酸的 *FUB* 基因(*FUB1*、*FUB2*、*FUB3*、*FUB4*)表达均显著下降( $P < 0.05$ )(图 6-A);经棘孢木霉代谢液处理过的菌株 ZY-3-1 中的镰刀菌酸合成相关基因的表达水平均显著降低( $P < 0.05$ )(图 6-B)。以上结果表明,棘孢木霉代谢物能有效抑制镰刀菌酸毒素相关合成基因的表达,进而降低镰刀菌中镰刀菌酸毒素的含量。



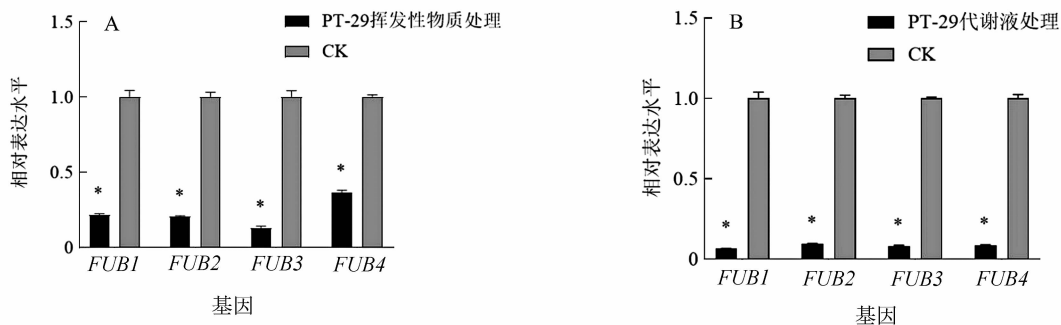
A—棘孢木霉 PT-29 代谢物处理前后 ZY-3-1 产生的镰刀菌酸的吸收度,绿色表示菌株 ZY-3-1,红色表示棘孢木霉挥发性物质处理的菌株 ZY-3-1,蓝色表示棘孢木霉 PT-29 代谢液处理的菌株 ZY-3-1;  
B—棘孢木霉代谢物处理前后 ZY-3-1 产生的镰刀菌酸的含量。柱上大写字母表示差异极显著( $P < 0.001$ )

图5 棘孢木霉 PT-29 代谢产物处理前后菌株 ZY-3-1 产生的镰刀菌酸的液相色谱及含量分析

## 3 结论与讨论

棘孢木霉具有良好的拮抗能力,常被用作有效生防真菌来抑制病原真菌的生长,对植物及病原菌具有高效的生防机制<sup>[32]</sup>。研究表明,海洋生境棘孢木霉 TCS007 对 16 种植物病原菌的抑制率为 56.65%~87.62%<sup>[33]</sup>。棘孢木霉 M2 对 8 种植物病原菌均有较好的抑制能力,并且可以促进植物生长<sup>[34]</sup>。本研究比较了棘孢木霉 PT-29 对尖孢镰孢

菌的抑制作用,结果表明,棘孢木霉 PT-29 对菌株 ZY-3-1 有较强的拮抗作用,其抑菌率可达 63.64%,防治效果较好。同时盆栽试验结果显示,加入棘孢木霉 PT-29 后对病原菌 ZY-3-1 有抑制效果,具有较高的应用价值。棘孢木霉能够通过多种生防机制对多种植物病原真菌起拮抗作用,如通过分泌代谢产物来抑制病原菌的生长。棘孢木霉分泌的 6-正戊基-2H-吡喃-2-酮(6-PAP)对尖孢镰刀菌具有较好的抑制效果<sup>[35]</sup>。前人研究



A. 棘孢木霉 PT-29 挥发性物质对镰刀菌酸基因表达水平的影响; B. 棘孢木霉 PT-29 代谢液对镰刀菌酸基因表达量的影响

\* 表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

图6 棘孢木霉 PT-29 代谢产物对镰刀菌酸基因表达的影响

表明,棘孢木霉菌株 GH-20 产生的挥发性代谢产物 (volatile gas, VOG)、非挥发性代谢产物 (non-VOG) 对病原菌的抑菌率分别为 59.95%、79.49%<sup>[36]</sup>。

本试验结果表明,棘孢木霉 PT-29 代谢产物对尖孢镰刀菌 ZY-3-1 的生长均有抑制作用,棘孢木霉 PT-29 释放的挥发性化合物对尖孢镰刀菌 ZY-3-1 产生拮抗作用 (图 4-A) 且防治效果达 42.86%,棘孢木霉 PT-29 培养的代谢液能更好地抑制菌落生长 (图 4-B),防治效果达 52.22%。挥发性化合物和代谢液均导致菌丝生长异常、菌落密度稀疏和抑制色素形成。说明棘孢木霉释放的次生代谢产物可能与尖孢镰刀菌 ZY-3-1 的主要代谢产物相互作用。镰刀菌酸是尖孢镰刀菌的主要致病毒素之一,并以高浓度存在于菌丝之中<sup>[37]</sup>。本研究通过液相色谱检测了 FA 的含量,其含量在经过棘孢木霉 PT-29 代谢产物处理之后显著降低。作为尖孢镰刀菌的致病毒素,其含量减少意味毒力降低<sup>[38-39]</sup>。前人研究表明,哈茨木霉 T22 可使剑兰球茎中尖孢镰刀菌的镰刀菌酸含量降低<sup>[21]</sup>。西芹醇层物可使镰刀菌酸含量下降到 38.09%、59.54%、36.78%、36.65%<sup>[40]</sup>。本试验通过 qRT-PCR 检测,证明棘孢木霉 PT-29 代谢产物对镰刀菌酸合成相关基因 *FUB1*、*FUB2*、*FUB3*、*FUB4* 的表达具有显著抑制作用。与对照相比,棘孢木霉 PT-29 挥发性物质处理后 *FUB1*、*FUB2*、*FUB3* 基因的相对表达水平均在 0.12~0.21 之间,*FUB4* 基因相对表达水平为 0.36;代谢液处理后的 *FUB* 基因组相对表达水平均在 0.06~0.09 之间。通过 HPLC 试验,确定棘孢木霉 PT-29 挥发性物质处理后,菌株 ZY-3-1 中镰刀菌素含量降低 62.79%,代谢液处理后,菌株 ZY-3-1 中镰刀菌酸含量降低

96.16%;这种差异可能与棘孢木霉 PT-29 中的代谢物质差异有关。

本研究初步证实棘孢木霉 PT-29 能够有效抑制镰刀菌生长,其次级代谢产物可抑制镰刀菌酸合成,降低尖孢镰刀菌的致病性,从而对尖孢镰刀菌进行有效防控。未来将针对棘孢木霉 PT-29 代谢物中有效抑菌成分及尖孢镰刀菌防控措施进行深入研究,利用遗传和生物工程手段提高木霉生防菌剂含量,将其发展为主要有效成分,应用于植物病害防治的生产实践中。

#### 参考文献:

- [1] Cui L X, Yang C D, Yang L P, et al. First report of *Fusarium equiseti* causing *Fusarium* wilt on potato (*Solanum tuberosum*) in China[J]. Plant Disease, 2021, 18(7): 2018-148.
- [2] 汪 沛,熊兴耀,雷 艳,等. 马铃薯土传病害的研究进展[J]. 中国马铃薯, 2014, 28(2): 111-116.
- [3] Agrios G N. Plant pathology [M]. 5th ed. London: Elsevier Academic Press, 2005: 522-534.
- [4] Wu H S, Wang Y, Bao W, et al. Responses of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* to exogenously added sinapic acid *in vitro* [J]. Biology and Fertility of Soils, 2009, 45(4): 443-447.
- [5] Ajillogba C F, Babalola O O. Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt [J]. Biocontrol Science, 2013, 18(3): 117-127.
- [6] Pavlovkin J, Mistrík I, Prokop M. Some aspects of the phytotoxic action of fusaric acid on primary *Ricinus* roots [J]. Plant, Soil and Environment, 2004, 50(9): 397-401.
- [7] Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, et al. *Bacillus* - based biological control of plant diseases [M] // Stoytcheva M. Pesticides in the modern world—pesticides use and management. Croatia: InTech, 2011: 273-302.
- [8] Arya A, Perelló A E. Management of fungal plant pathogens [M]. Cambridge, MA, USA: CAB International, 2010.
- [9] 严聪文,苏代发,代庆忠,等. 草莓病害的生物防治研究进展

- [J]. 生物技术通报,2022,38(12):73–87.
- [10] Daoubi M, Pinedo – Rivilla C, Rubio M B, et al. Hemisynthesis and absolute configuration of novel 6 – pentyl – 2H – pyran – 2 – one derivatives from *Trichoderma* spp. [J]. Tetrahedron, 2009, 65 (25):4834–4840.
- [11] Yue Y, Yu H H, Li R F, et al. Isolation and identification of antimicrobial metabolites from sea anemone – derived fungus *Emericella* sp. SMA01 [J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2021, 39(3):1010–1019.
- [12] 刘 畅. 棘孢木霉 CBS 433. 97 次级代谢产物分离及其生物活性分析[D]. 宜昌:三峡大学,2021.
- [13] Tomah A A, Abd Alamer I S, Li B, et al. A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: a new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper[J]. Biological Control, 2020, 145:104261.
- [14] Liu S A, Dai H F, Orfali R S, et al. New fusaric acid derivatives from the endophytic fungus *Fusarium oxysporum* and their phytotoxicity to barley leaves[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(16):3127–3132.
- [15] Smith T K, Sousadias M G. Fusaric acid content of swine feedstuffs [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993, 41(12):2296–2298.
- [16] Brown D W, Lee S H, Kim L H, et al. Identification of a 12 – gene fusaric acid biosynthetic gene cluster in *Fusarium* species through comparative and functional genomics [J]. Molecular Plant – Microbe Interactions, 2015, 28(3):319–332.
- [17] Liu S W, Wu B, Lv S X, et al. Genetic diversity in FUB genes of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* suggests horizontal gene transfer [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10:1069.
- [18] Jin X X, Hayes C K, Harman G E. Principles in the development of biological control systems employing *Trichoderma* species against soil – borne plant pathogenic fungi[M]//Leatham G F. Frontiers in industrial mycology. Boston, MA:Springer, 1992:174–195.
- [19] Brotman Y, Kapuganti J G, Viterbo A. *Trichoderma* [J]. Current Biology, 2010, 20(9):R390–R391.
- [20] Sun Y, Wang Y, Han L, et al. Antifungal activity and action mode of cuminic acid from the seeds of *Cuminum cyminum* L. against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON) causing *Fusarium* wilt on watermelon[J]. Molecules, 2017, 22(12):2053.
- [21] Nosir W, McDonald J, Woodward S. Impact of biological control agents on fusaric acid secreted from *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen in *Gladiolus grandiflorus* corms [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(1):21–27.
- [22] Stracquandano C, Quiles J M, Meca G, et al. Antifungal activity of bioactive metabolites produced by *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma atroviride* in liquid medium[J]. Journal of Fungi, 2020, 6(4):263.
- [23] Carmona S L, Burbano – David D, Gómez M R, et al. Characterization of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates associated with commercial tomato crops in the Andean region of Colombia[J]. Pathogens, 2020, 9(1):70.
- [24] 张晶晶, 张 宁, 侯 微, 等. 人参根腐病离体抗性筛选方法初探[J]. 湖北农业科学, 2022, 61(11):76–79.
- [25] Chen J, Zhou L T, Din I U, et al. Antagonistic activity of *Trichoderma* spp. against *Fusarium oxysporum* in rhizosphere of *Radix pseudostellariae* triggers the expression of host defense genes and improves its growth under long – term monoculture system[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12:579920.
- [26] Dennis C, Webster J. Antagonistic properties of species – groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1971, 57(1):41–48, IN4.
- [27] 董纯辛, 崔 艺, 牛启尘, 等. 棘孢木霉特性及其对两种草坪病原菌的生防作用[J]. 草地学报, 2022, 30(5):1102–1109.
- [28] Intana W, Kheawleng S, Sunpapao A. *Trichoderma asperellum* T76 – 14 released volatile organic compounds against postharvest fruit rot in muskmelons (*Cucumis melo*) caused by *Fusarium incarnatum* [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(1):46.
- [29] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real – time RT – PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(9):e45.
- [30] Kuang Y, Scherlach K, Hertweck C, et al. Retraction Note: Fusaric acid detoxification: a strategy of *Gliocladium roseum* involved in its antagonism against *Fusarium verticillioides* [J]. Mycotoxin Research, 2023, 39(3):317.
- [31] 全 威, 郑成忠, 东保柱, 等. 油菜对 4 种杂草种子的化感抑制效应及田间应用[J]. 河南农业科学, 2022, 51(7):102–111.
- [32] 韩长志. 植物病原拮抗菌木霉属真菌的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(4):946–952.
- [33] 郑柯斌, 林 海, 周 沙, 等. 海洋生境棘孢木霉 TCS007 菌株的鉴定及抑菌活性[J]. 农药学学报, 2020, 22(5):801–807.
- [34] 张晓梦, 田永强, 潘晓梅, 等. 2 株木霉抑菌效果及其促植物生长机制[J]. 南方农业学报, 2020, 51(11):2713–2721.
- [35] 陶玲芸, 张怡雯, 李雅乾, 等. 棘孢木霉挥发性次级代谢产物检测及抑菌活性分析[J]. 生物工程学报, 2020, 36(6):1181–1189.
- [36] 李佳昕, 蔡晨亮, 王 琰, 等. 棘孢木霉菌鉴定及其对花生白绢病生防机制的研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(6):1534–1544.
- [37] Liu S W, Li J, Zhang Y, et al. Fusaric acid instigates the invasion of banana by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 [J]. The New Phytologist, 2020, 225(2):913–929.
- [38] Simonetti E, Roberts I N, Montecchia M S, et al. A novel Burkholderia ambifaria strain able to degrade the mycotoxin fusaric acid and to inhibit *Fusarium* spp. growth [J]. Microbiological Research, 2018, 206:50–59.
- [39] Amalfitano C, Pengue R, Andolfi A, et al. HPLC analysis of fusaric acid, 9, 10 – dehydrofusaric acid and their methyl esters, toxic metabolites from weed pathogenic *Fusarium* species [J]. Phytochemical Analysis, 2002, 13(5):277–282.
- [40] 高晓敏, 王琚钢, 云兴福, 等. 西芹醇层物对黄瓜枯萎病菌的化感作用及化感物质鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(2):281–288.