

曾祥难,刘新源,彭 博,等.烟草疫霉拮抗菌的分离鉴定及其生防和发酵特性[J].江苏农业科学,2024,52(16):161-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.16.021

烟草疫霉拮抗菌的分离鉴定及其生防和发酵特性

曾祥难¹,刘新源²,彭 博¹,谢冰悦¹,杨英杰³,尤祥伟³,李义强³,韦建玉¹

(1.广西中烟工业有限责任公司,广西南宁 530001;2.河南省烟草公司三门峡市公司,河南三门峡 472000;

3.中国农业科学院烟草研究所海洋农业研究中心,山东青岛 266071)

摘要:以湖南郴州广西中烟基地单元黑胫病发病区域采集的健康烟田土壤为样本,采用土壤原位平板培养法,从卵菌类群中的烟草疫霉生长的平板上筛选出 1 株对烟草疫霉有抑制作用的真菌 LYQ01。经过 18S-ITS 序列扩增测序比对,发现该菌与拜赖青霉(*Penicillium bilaiae*)序列的匹配率为 99.65%,因此初步鉴定为拜赖青霉。随后参照土壤磷循环有关的拜赖青霉菌株 ATCC 20851 的全基因组测序数据,设计 4 对引物,随机扩增得到次级代谢产物合成有关基因簇的 4 个片段,总长度约 6 kb,测序后比对发现该菌的 4 个片段序列与拜赖青霉 ATCC 20851 的相似性达到了 99.9%。利用该青霉菌进行烟草疫霉菌平板对峙试验,以及青霉菌发酵原液、提取液进行烟草疫霉和根结线虫的生防试验,论证其分泌的酶与代谢产物对植物根结线虫、烟草黑胫病菌具有抑杀作用。由于菌剂生产过程中调低 pH 值可以防止杂菌污染,因此确定青霉菌生长的酸性阈值为 pH 值 2.5。利用几种单糖等有机碳源,初步分析该菌对碳源的利用情况,结果显示,木糖与燕麦片最适合作为青霉菌生长的碳源,其次是葡萄糖与果糖,最佳浓度为 0.5 g/100 mL。为了后续对该菌株进行遗传操作,确定潮霉素 B 可以用于构建菌株遗传操作体系,其应用时的浓度范围为 125~250 $\mu\text{g/L}$ 。

关键词:生物防治;烟草疫霉;烟草黑胫病;根结线虫;拜赖青霉

中图分类号:S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)16-0161-09

植物病虫害防治为农业治理中的主要问题之一。目前,我国农业土壤植物病虫害治理主要依靠化学防治,但是农药残留超标对食品安全构成严重威胁。随着人们生活水平的提高,食品安全问题备受关注,为了降低农产品中农药残留的风险,生物防治技术逐渐受到重视。在植物保护领域和食品安全领域,利用生物防治降低植物病虫害发生已成为重要课题。生物防治是指利用生物及其代谢产物防治植物病害控制病原体的方法,通过生物种间关系、种内关系降低有害病菌在入侵部位的密度,使得病原生物变少,从而减少植物病虫害的暴发,达到用生物防治生物的目的。从自然界寻找既能缓解植物病害又对环境生态影响较小的生物新技术,利用生物之间的相互作用对植物病虫害达到无公害化处理和持续性防治的目的,逐渐成为备受关

注和具有发展前景的新兴领域。生防菌是一种具有生物防治作用的微生物群,具有繁殖力高、所产生的代谢产物及活性酶种类繁多、对病原物的抑制机理多种多样、易于快速大规模培养等特点,其自身往往与植物是互利共生的生物关系,主要包括细菌、放线菌、真菌等,目前运用较多的生防细菌有芽孢杆菌(*Bacillus*)^[1-6]、假单胞杆菌(*Pseudomonas*)^[7-9],生防真菌有木霉菌(*Trichoderma*)^[10-13]等。因此,以生防菌为主体的杀菌剂在农业生产中被广泛使用。

黑胫病是一种由烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae*)侵染所致的、极其严重的土传卵菌病害,是烟草种植中不可忽视的严重病害^[14-15]。黑胫病菌在侵染烟草植株的过程中释放毒素,瓦解植株细胞,其分泌物含半乳糖苷酶,可分解宿主细胞的神经胶质层和导管壁,产生果胶产物片段,然后形成凝胶团块^[16-17]。该病在全国乃至世界范围内的烟草种植过程中均会发生,植株患病后会造矮化、萎蔫、叶枯萎凋落以及根茎部分功能受损致使养分与水分运输受阻甚至坏死等现象。烟草种植面积的扩大、种植周期的延长以及自然环境由于多方面污染变得脆弱敏感,使得烟草黑胫病加重,不仅造

收稿日期:2023-09-03

基金项目:广西中烟工业有限责任公司科技计划(编号:2022450000340066)。

作者简介:曾祥难(1978—),男,广西来宾人,硕士,高级农艺师,主要从事烟草栽培及质量管理研究。E-mail:513655538@qq.com。

通信作者:韦建玉,博士,研究员,主要从事烟草栽培技术、烟叶质量研究。E-mail:jtx_wjy@163.com。

成了严重的经济损失,还破坏了生态环境的稳定性。

烟草根结线虫病也是烟草种植过程中常见土传病害之一,严重时不仅会导致烟株整株黄化萎蔫,还会导致青枯病、黑胫病、病毒病等多种其他病害联合发生。一些研究团队也分离鉴定了生防菌,用其防治根结线虫,其中就有淡紫拟青霉等青霉菌^[18-22]。青霉菌是一种常见的霉菌,通常与土壤、腐烂的有机物以及水果和蔬菜的储存腐烂物或病原体有关,它因生物降解有机物、生产青霉素和灰黄霉素等抗生素而闻名。草酸青霉(*P. oxalicum*)、灰黄青霉(*P. griseofulvum*)和绳状青霉(*P. funiculosum*)、微紫青霉(*P. janthinellum*)等青霉菌均对作物土传病害具有防治潜力,且生防青霉菌常具备广谱抑菌活性^[23-27]。一些青霉属物种还可以在土壤中释放固定磷,供植物利用^[28]。与其他营养素相比,在大多数土壤中磷的流动性和对植物的可利用性最小。溶磷真菌在磷循环中发挥着重要作用,以环境友好和可持续的方式向植物提供磷。拜赖青霉被用作种子接种剂,以提高各种作物的磷利用效率。拜赖青霉生长在植物根部周围,能溶解磷酸钙、磷酸铁和磷酸铝中的磷。拜赖青霉基因组的测序,为揭示磷的溶解机制和真菌对磷循环作出了贡献,它是最早被证明有效的真菌溶磷商业产品之一。张文芳等利用基因组测序、基因注释以及 qRT-PCR 检测方法,探明来自深海的拜赖青霉 F-28 真菌具有产生倍半萜的潜力。从大规模发酵真菌中分离出 20 个倍半萜,共鉴定出 18 个新的倍半萜类化合物,并表明化合物 18 是一种很有发展前景的抗神经炎症药物^[29]。孟令红等将海洋来源的拜赖青霉 MA-267 和樱桃青霉 EN-480 共培养,产生 2 种新的亚萜类衍生物,它们可以拮抗细菌病原菌^[30]。Nakahara 等从 1 株拜赖青霉菌株的发酵液中鉴定出 3 种化合物,验证其杀根结线虫的活性,在 300 mg/L 的浓度下致死率为 52%~98%,其中吡啶二羧酸效果最好^[31]。

本研究针对烟草黑胫病菌的防治,分离并鉴定了 1 株青霉。该青霉不仅能够抑制烟草疫霉的生长,还可以诱杀根结线虫,是 1 株具有农业生产应用价值的潜力菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 供试菌株主要包括烟草疫霉

(*Phytophthora nicotianae*)、根结线虫(*Meloidogyne incognita*),均由中国农业科学院烟草研究所提供。

1.1.2 培养基与抗生素 供试培养基主要包括燕麦培养基、海博 PDA 培养基(仅含有马铃薯提取物和葡萄糖)、索莱宝 PDA 培养基(含有马铃薯淀粉、葡萄糖和蛋白胨);供试抗生素主要包括放线菌酮、制霉菌素、氯霉素、潮霉素 B。

1.1.3 引物 供试引物由北京擎科生物科技股份有限公司青岛分公司合成,序列如下:ITS1,TCCGTAGGTGAACCTGCGG;ITS4,TCCTCCGCTTATTGATATGC。P450-1 721F,CGTAACCCGACAGCCAAGAG;P450-3 134R,TACAGAGTGAGTGAGCGTGA。P450-1 556F,TGTAATAGAAGCCGAAGTGC;P450-4 931R,TTTCAGGTGCGGTGCTATG。P450-1 843F,TATTGGGAGTCGGCTTACAC;P450-5 284R,TAAGTCACCCACCGCACAAT。GH62-72F,CAGGTAGGGAGGGCTTCACA;GH62-2 085R,GGAGACGACGGAGACCCTGA。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种分离方法 2023 年 7 月于湖南郴州采集烟草黑胫病发病较重的烟地中的土壤样品。其中,健康烟株周围土壤样品 5 份,将样品 0.5 g 转入 1.5 mL 无菌 PBS 缓冲液中打散;随后用无菌 PBS 缓冲液稀释至 10^{-4} ~ 10^{-7} 倍,分别取 50 μ L 并涂于添加了抗生素的燕麦片平板(取市售燕麦片 30 g,加入适当水煮沸 20~30 min,纱布过滤取汁,加入琼脂 20 g,定容至 1 000 mL,pH 值自然),28 $^{\circ}$ C 条件下培养;挑取霉菌单菌落,利用平板对峙生长方法将单菌落和烟草疫霉接种于燕麦片抗生素平板,28 $^{\circ}$ C 条件下培养;观察霉菌对植物病原菌的菌丝生长抑制情况,筛选出对烟草疫霉菌丝生长均具有很强抑制效果的菌株。

1.2.2 形态学及分子鉴定方法 参照青霉属的特征,测试菌株在 PDA 平板上的菌落形态和分生孢子形态,利用通用引物 ITS1/ITS4(ITS1,3'-TCCGTAAGGTGAACCTGCGG-5';ITS4,3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5')进行 PCR 测序。PCR 反应体系如下:2 \times PCR Master Mix 25 μ L,10 μ mol/L ITS1 引物 1 μ L,10 μ mol/L ITS4 引物 1 μ L,模板 DNA 1 μ L,ddH₂O 22 μ L;PCR 反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 复性。胶回收 PCR 产物送青岛擎科梓熙生物技术有限公司测序。

1.2.3 青霉菌碳源利用试验

1.2.3.1 初始培养基 初始培养基由微量元素液体培养基和大量元素液体培养基混合而成。(1)微量元素液体培养基的配制。称取 10 g 乙二胺四乙酸(EDTA)、4.4 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.01 g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.32 g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.315 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.22 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1.47 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.0 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 蒸馏水补足至 200 mL, pH 值调节至 7 左右^[32-33];分装至 50 mL 移液管中,放入冷冻冰柜。(2)大量元素液体培养基的配制。称取 6.0 g NaNO_3 、1.5 g KH_2PO_4 、0.5 g KCl 、0.5 g MgSO_4 , 蒸馏水补足至 1 000 mL, pH 值调节至 7 左右。

1.2.3.2 含碳源培养基 取配制好的微量元素液体培养基 200 μL ,并置于含 1 L 大量元素液体培养基的锥形瓶中,混合,分成 10 等分,分别加入到 10 个容量为 300 mL 的三角瓶中,即 100 mL/个;再分别加入碳源(木糖 1 g、普鲁兰 1 g、葡萄糖 1 g、果糖 1 g、海藻酸钠 0.5 g、柠檬酸 1 g、羧甲基纤维素钠 0.5 g、葡萄糖 0.5 g、燕麦片 0.5 g),调节各份培养基的 pH 值至 7 左右。将 30 个含有不同碳源的培养基(10 个碳源液体培养基,3 次重复)的三角瓶进行 120 $^{\circ}\text{C}$ 高温灭菌 20 min,待冷却至室温后加入 200 μL 青霉菌孢子刮取液,摇匀后封口;放入 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中培养,72 h 后记录菌球生长情况。

1.2.4 黑胫病生防试验方法 将 LYQ01 菌株和病原菌分别在燕麦片平板上 28 $^{\circ}\text{C}$ 活化培养 3~5 d,备用;然后用打孔器在活化好的菌株菌丝边缘打取圆形菌饼(直径 0.50 cm),再用接种针分别将 LYQ01 菌株和测试疫霉的菌饼挑至新的平板两端,然后将培养皿倒置于培养箱中于 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养。将挑取的 LYQ01 菌株接种到燕麦片液体培养基(不加琼脂的燕麦片培养基)上,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下振荡培养 14 d,然后于 12 000 r/min 条件下离心 10 min,过滤,获得含有 LYQ01 菌株的发酵液上清(发酵液上清中仅为 LYQ01 菌株的发酵产物)。对该发酵液上清进行不同浓度的稀释(1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%),添加到燕麦片固体培养基中,接种烟草疫霉菌丝饼,观察烟草疫霉的生长情况。烟草疫霉菌于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下进行培养,测定其在 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30% 等不同浓度发酵液处理中菌丝的长度。

用 1 L 的三角瓶装 200 mL 蛋白胨 PDA 液体培

养基,接种 1 mL 的 10^8 CFU/mL 孢子悬液,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 7 d;合并 3 瓶 600 mL 未过滤的、含有菌丝的液体发酵液,直接加入等量(600 mL)的乙酸乙酯,抽提 3 次后旋蒸,最后溶解在 3 mL 甲醇或者乙酸乙酯中,通过 0.22 μm 微孔滤膜过滤青霉菌提取液,以去除可能残留的青霉菌孢子和其他杂菌,用作提取物的抑菌试验。青霉菌提取液各取 50、100、500 μL ,分别加入到配制好的燕麦固体培养基中;设置对照组,只添加 500 μL 的甲醇溶液,接种到燕麦固体培养基中。将上述培养基制备成固体培养皿,接种菌饼放至培养皿中心,放入培养箱中 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 72 h,观察菌落生长情况,然后测量并记录菌落半径。

1.2.5 青霉菌生长的 pH 值最低阈值的测定 培养基选用 PDA(马铃薯、葡萄糖)液体培养基,称取 17.5 g PDA 在 500 mL 烧杯中溶解,补足蒸馏水至 500 mL,将其平均分装至 5 个 300 mL 三角瓶中,再置于 121 $^{\circ}\text{C}$ 下高温灭菌 20 min。用 1 mol/L 盐酸溶液和 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 PDA 液体培养基的 pH 值,测得 PDA 液体培养基初始 pH 值为 6.3,再利用 1 mol/L 盐酸溶液调节其 pH 值至 1.5、2、3、4、5,利用 1 mol/L NaOH 溶液调节 pH 值至 7、8、9、10、11。将配制好的培养基接种 50 μL 青霉菌原液,于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 下振荡培养 72 h。

1.2.6 根结线虫灭活试验方法 用 35 mg/mL 海博 PDA 液体培养基、2.5 mg/mL 索莱宝含蛋白胨 PDA 液体培养基(在 PDA 的基础上添加蛋白胨)等 2 种 PDA 液体培养基培养青霉菌,得到 2 种不同的原液。同时,将青霉菌新鲜原液以乙酸乙酯为萃取剂,经 20 min 静置萃取后取上清液,通过旋转蒸发仪以 70 r/min 的转速进行蒸馏提取,其提取物用甲醇溶液溶解;运用类似方法将萃取液更改为甲醇溶液,其余步骤不变,得到乙酸乙酯提取液和甲醇提取液,这 2 种提取液中主要提取的物质为青霉菌的代谢产物,去除了绝大多数的酶,原液中则保留降解酶。为比较青霉菌与传统化学制剂各自对根结线虫的致死程度,选用对根结线虫具有明显抑杀作用的 3 mg/mL 吡啶二羧酸溶液作对照。将这 5 种试剂分别进行梯度稀释,即 2 种 PDA 溶解的青霉菌原液、吡啶二羧酸溶液原液及其 2、4、8、16、32、64 倍液,由于 2 种青霉菌提取液中青霉菌的浓度远高于原液,因此取乙酸乙酯 50、100 倍液。将上述原液与稀释液各取 1 mL 置于 24 孔细胞培养板中,对照组

为不接种青霉菌的 2 种 PDA 溶液、蒸馏水、乙酸乙酯及甲醇溶液,将上述溶液接种 50 头新孵化的南方根结线虫 2 龄幼虫,进行 24、48 h 的死亡率观察并记录。1 mL 无菌水和 50 头新孵化的 J2 作为对照,3 次重复,置于 15 ℃ 下培养,分别于培养后 6、12、24、30 h、2、3、4、5、6、7、8、9、10 d 记录 J2 死亡数,计算 J2 死亡率与 J2 校正死亡率:校正死亡率 = (试验组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率) × 100%。

在体视显微镜下观察处理过的 J2 活动状态和体态。结果显示,存活的 J2 虫体一般是弯曲的且可以不断地移动;死亡的 J2 虫体一般是僵直的,将僵直的 J2 虫体再次分离,置于盛有 2% 生理盐水的培养皿中,在体视显微镜下用 1 mL 注射器针尖轻轻拨动 J2,静止不动的即为死亡虫体。

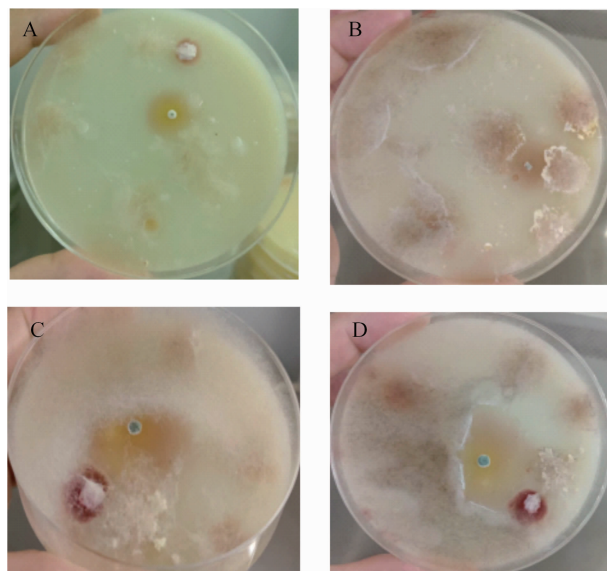
1.2.7 谷子培养基共培养试验 带壳谷子加适量自来水,100 ℃ 煮沸至约 2/3 爆花为止(约 40 min),利用纱布沥干水分,分装,高压灭菌。在 100 mL 的三角瓶中,灭菌谷子装量 1/3 并铺满底部,厚约 1 cm,设置 4 组试验,每组 3 个重复。其中,第 1 组为空白对照组(未接种灭菌谷子),第 2 组为接种 5 个直径为 0.5 cm 的 LYQ01 菌饼,第 3 组为同时接种 5 个直径为 0.5 cm 的疫霉和拜赖青霉菌 LYQ01 菌饼,第 4 组为只接种 5 个直径为 0.5 cm 的疫霉菌饼,分别置于 28 ℃ 恒温培养箱中静置培养 6 d。

1.2.8 青霉菌的抗生素抗性检测 真菌中的抗性基因标记比较少,首先选用经常使用的潮霉素 B 进行抗性检测。由于拜赖青霉在含有蛋白胨的 PDA 培养基上生长迅速,并且在不同的培养基上生长时抗性不同。为了较好地控制拜赖青霉的生长速度,所以选用仅有马铃薯淀粉和葡萄糖的海博 PDA 培养基,在这个寡营养的培养基上拜赖青霉生长较慢。潮霉素 B 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。潮霉素 B 浓度定为 10、125、250、375、500 μg/mL 等 5 个浓度梯度。利用孢子进行抗性试验,将 5 mL 的 0.01% 吐温 - 80 喷于成熟的青霉 PDA 平板上,用 1 mL 枪尖吹洗后制成约 10^{10} CFU/mL 孢子悬液;之后利用 0.01% 吐温 - 80 溶液梯度稀释制成 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 孢子悬液,各取 10 μL 分别涂布于含有抗生素的 PDA 平板上,置于 25 ℃ 进行真菌恒温培养,每隔 24 h 观察 1 次,连续观察 7 d。

2 结果与分析

2.1 病原菌拮抗菌的分离

利用含有烟草黑胥病疫霉属病原菌的土壤,稀释液涂布在 PDA 抗生素固体培养基,疫霉菌丝延伸到平板顶部。利用燕麦培养基双抗平板分离,经过 4~5 批次的分离培养,发现 1 株疑似放线菌或者真菌的绿色拮抗菌(图 1),菌株编号为 LYQ01,菌落与培养基结合紧密,分泌黄褐色色素,一般色素水平与抗生物质水平相当,分泌色素扩散范围远远大于菌落生长直径。由于烟草疫霉等卵菌的菌株生长较快,类似于蘑菇云状,脱离培养基生长至平板顶部,所以经过火烧去掉表面菌丝后可明显看到抑菌圈(图 1 - D)。转移到燕麦培养基后,进一步确认拮抗效果,在普通 PDA 固体培养基和高氏一号培养基上的生长状态如图 2 所示,2 种培养基上生长都不快,但是在 PDA 培养基上黄色色素圈明显更大。



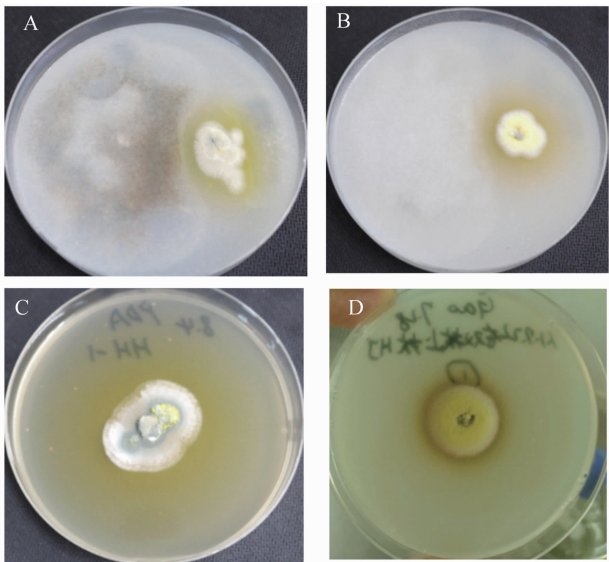
A、B、C—病原土壤中疫霉菌丝的原始平板;

D—疫霉菌丝火烧后的图片

图1 青霉菌株平板原位培养

2.2 LYQ01 菌株的鉴定分析

LYQ01 菌株菌落的菌丝发达,但长度较短,呈毡状;分生孢子头呈扫帚状,分生孢子链状着生,这些特征符合青霉属的典型特征,因此确定 LYQ01 菌株为青霉属菌株。经测序,LYQ01 菌株的 ITS 序列片段经过 NCBI 数据库比对,待测菌株 LYQ01 与拜赖青霉(*P. bilaiae*) MH1214 菌株(GenBank 登录号为 LN901118.1)、NRRL 3391 菌株(GenBank 登录号为 AF033402.1)的序列匹配率为 99.65%(表 1)。



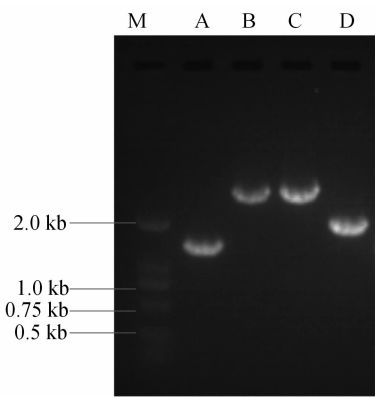
A—燕麦培养基中的拮抗试验, 左为烟草疫霉(火烧后), 右为拜赖青霉 LYQ01; B—燕麦培养基中的拮抗试验, 左为烟草疫霉(火烧前), 右为拜赖青霉 LYQ01; C—PDA 培养基上的拜赖青霉菌落形态; D—高氏一号固体培养基上的拜赖青霉菌落形态

图2 拜赖青霉 LYQ01 菌株在燕麦培养基平板上与烟草疫霉菌落对峙试验结果

| 表 1 拜赖青霉菌株 LYQ01 的 ITS 比对检索匹配率 | | | |
|--------------------------------|-------------|---------|-----------|
| 菌株编号 | GenBank 登录号 | 覆盖率 (%) | 序列匹配率 (%) |
| MH1214 | LN901118.1 | 100 | 99.65 |
| 47M-1 | MN316664.1 | 100 | 99.65 |
| CBS330.95 | KC773834.1 | 98 | 99.65 |
| NRRL3391 | AF033402.1 | 98 | 99.65 |

通过综合分析,最终确定所筛选到的 LYQ01 菌株为拜赖青霉。该菌株能够分泌大量的黄色色素,可以作为拮抗菌株继续研究并应用于农业生产。

随后参照与土壤磷循环有关的拜赖青霉菌株 ATCC 20851 全基因组测序数据(该菌株保存于美国模式培养物菌种库),选定 1 个 GH62 家族的糖苷水解酶基因和 1 个次级代谢基因簇中 P450 家族的酶基因并分别设计 1、3 对引物,用以扩增这个长度为 5 kb 的基因。设计的这 4 对引物的扩增长度理论上分别是 1 413、3 378、3 441、2 013 bp,随机扩增得到次级代谢产物合成有关基因簇的 4 个片段。PCR 产物的琼脂糖电泳结果如图 3 所示,4 个片段长度分别是 1.4、3.4、3.4、2.0 kb,与理论值相等。测序发现其总长度约 6 kb,经过这几个片段的拼装(有些片段是重叠在一起的)后检索,序列比对发现该菌的 4 个片段序列与拜赖青霉菌株 ATCC 20851 的相似性达到了 99.9%。



M—DNA 分子量 marker; A、B、C、D—对应扩增的 4 个片段

图3 PCR 扩增片段长度检测结果

2.3 LYQ01 菌株对疫霉菌菌丝生长的抑制作用

将菌饼接种到不同浓度的培养基上培养 6 d 后发现,随着发酵液浓度的升高,烟草疫霉菌菌丝生长受到的抑制也逐渐明显,使得菌落逐渐减小(表 2)。1% 发酵液的抑菌效果与未接种发酵液相比几乎没有差别,但当发酵液浓度达到 5% 时,抑菌效果就十分明显。随着 LYQ01 菌株发酵液浓度的增加,烟草疫霉菌的菌落直径越来越小,当其浓度为 15% 时,抑菌率超过 66%。说明 LYQ01 菌株的发酵产物对烟草疫霉菌菌丝伸长具有很强的抑制作用。

| 表 2 不同浓度发酵液对燕麦平板中疫霉菌生长的抑制效果 | | |
|-----------------------------|------------|---------|
| 发酵液浓度 (%) | 菌落直径 (cm) | 抑菌率 (%) |
| 0 | 12.3 ± 0.6 | 0.0 |
| 1 | 12.2 ± 0.5 | 0.8 |
| 5 | 6.8 ± 0.6 | 44.7 |
| 10 | 5.1 ± 0.8 | 58.5 |
| 15 | 4.1 ± 0.7 | 66.7 |
| 20 | 3.5 ± 0.7 | 71.5 |
| 25 | 2.1 ± 0.8 | 82.9 |
| 30 | 0.9 ± 0.9 | 92.7 |

之后,利用乙酸乙酯提取液进行黑胫病菌菌丝生长抑制试验,结果见表 3。随着青霉菌提取液添加量的增加,烟草黑胫病菌的生长受到抑制,但是效果并不是特别明显,虽然利用添加提取液可证实青霉菌对烟草黑胫病菌具有抑制作用,但是效果不如直接添加发酵液明显(表 3)。

2.4 青霉菌对根结线虫的抑杀效果

根据文献[31]可知,青霉菌发酵液中可产生一些抑杀根结线虫的小分子化合物,所以使用该菌的

表 3 添加乙酸乙酯提取液后烟草黑胫病菌生长抑制效果

| 提取液添加量 ($\mu\text{L/mL}$) | 菌落直径 (cm) | 抑菌率 (%) |
|--------------------------------|-------------------------|------------|
| 0 | 6.2 ± 0.9 | 0.0 |
| 0.50 | 5.2 ± 1.5 | 16.1 |
| 1.00 | 4.8 ± 1.6 | 22.7 |
| 5.00 | 4.2 ± 1.8 | 32.2 |

发酵液及乙酸乙酯提取液统计了根结线虫的死亡率,结果见表 4。

由表 4 可知,不含蛋白胨 PDA 发酵液原液在 24 h 时的校正死亡率仅有 $(3.91 \pm 4.74)\%$,在 48 h 时的校正死亡率仅有 $(44.01 \pm 15.55)\%$ 。而含有蛋白胨的 PDA 发酵液原液在 24、48 h 时的校正死

亡率分别是 $(90.90 \pm 3.88)\%$ 、 $(93.50 \pm 1.48)\%$,都在 90% 以上。这说明培养基中的蛋白能促进青霉菌株致死活性物质的产生。后续利用这种培养基培养发酵真菌,检测提取液对根结线虫的抑杀效果。文献[31]报道了吡啶二羧酸具有抑杀根结线虫的能力,因此本试验以 3 mg/mL 吡啶二羧酸溶液作为参照。吡啶二羧酸在经过 4 倍稀释后对根结线虫的抑杀率为 $(77.89 \pm 8.62)\%$,但是进一步稀释为 8 倍即浓度为 375 mg/L 时,抑杀率仅为 $(7.19 \pm 7.75)\%$,这达不到一般农药的致死浓度的要求。发酵液经过乙酸乙酯抽提后,去除了发酵液中各种酶的影响,经过 50 倍稀释后抑杀率仅为 $(6.65 \pm 2.44)\%$,经过 100 倍稀释后抑杀率为 $(2.15 \pm 1.38)\%$,没有达到理想的抑杀浓度。

表 4 不同试剂组根结线虫死亡率及校正死亡率

| 组别 | 稀释倍数 | 24 h | | 48 h | |
|---------------|-------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | 死亡率 (%) | 校正死亡率 (%) | 死亡率 (%) | 校正死亡率 (%) |
| 不含蛋白胨 PDA 发酵液 | 0(原液) | 5.42 ± 4.68 | 3.91 ± 4.74 | 45.35 ± 15.17 | 44.01 ± 15.55 |
| | 2 | 3.86 ± 2.07 | 2.30 ± 2.11 | 47.91 ± 4.60 | 46.00 ± 5.46 |
| | 4 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 37.96 ± 5.78 | 35.82 ± 4.90 |
| | 8 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 22.95 ± 9.77 | 21.06 ± 10.01 |
| | 16 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 28.49 ± 3.69 | 26.74 ± 3.78 |
| | 32 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 8.12 ± 3.83 | 5.86 ± 3.93 |
| | 64 | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 | 1.35 ± 1.17 | 1.07 ± 0.19 |
| 含蛋白胨 PDA 发酵液 | 0(原液) | 91.32 ± 3.70 | 90.90 ± 3.88 | 93.86 ± 1.40 | 93.50 ± 1.48 |
| | 2 | 84.97 ± 2.83 | 84.24 ± 2.97 | 98.75 ± 4.19 | 87.04 ± 4.44 |
| | 4 | 81.36 ± 0.86 | 80.46 ± 0.91 | 79.47 ± 7.05 | 78.27 ± 7.46 |
| | 8 | 52.78 ± 2.31 | 50.50 ± 4.12 | 63.89 ± 5.46 | 62.02 ± 8.92 |
| | 16 | 38.13 ± 5.18 | 35.16 ± 8.67 | 47.22 ± 4.28 | 44.15 ± 3.21 |
| | 32 | 23.75 ± 7.07 | 20.08 ± 7.41 | 49.56 ± 9.47 | 46.62 ± 10.02 |
| | 64 | 8.11 ± 5.36 | 3.69 ± 5.61 | 20.69 ± 15.17 | 16.08 ± 1.61 |
| 吡啶二羧酸 | 0(原液) | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 |
| | 2 | 90.71 ± 4.59 | 90.46 ± 4.71 | 100.00 ± 0.00 | 100.00 ± 0.00 |
| | 4 | 44.66 ± 14.91 | 43.21 ± 15.30 | 78.74 ± 8.29 | 77.89 ± 8.62 |
| | 8 | 8.67 ± 4.31 | 6.12 ± 4.17 | 10.76 ± 7.45 | 7.19 ± 7.75 |
| | 16 | 7.75 ± 0.53 | 5.38 ± 0.54 | 7.75 ± 0.53 | 4.06 ± 0.55 |
| | 32 | 4.91 ± 2.08 | 2.47 ± 2.13 | 4.28 ± 1.14 | 0.45 ± 1.19 |
| | 64 | 4.52 ± 1.30 | 2.08 ± 1.34 | 4.52 ± 1.30 | 0.70 ± 1.35 |
| 乙酸乙酯 | 50 | 4.25 ± 2.10 | 3.32 ± 2.12 | 8.46 ± 2.39 | 6.65 ± 2.44 |
| | 100 | 3.28 ± 1.49 | 2.33 ± 1.51 | 4.05 ± 1.35 | 2.15 ± 1.38 |

2.5 几种单糖等对青霉菌生长的影响

青霉菌能降解各种复杂的有机质,同时分泌各种降解有机质的酶类,这些酶类可能对病原菌或者根结线虫具有抑杀作用。所以,为了后续鉴定可能的酶类在拮抗或者抑杀病原物的作用,笔者利用几

种单糖和复杂有机质分析该青霉菌对碳源的利用情况。培养后 72 h,观察含不同碳源培养基内青霉菌的生长情况,记录并比对各菌球体积、密度、培养基透明度等数据。

1 g/100 mL 木糖与 0.5 g/100 mL 燕麦片试验

组中的青霉菌在所选碳源中长势最好,木糖培养基中的菌球体积是所测试验组中最大的,生长密度中等;燕麦片培养基中的青霉菌生长密度最大,菌球体积中等。综上,青霉菌在木糖培养基中的综合生长情况最佳。

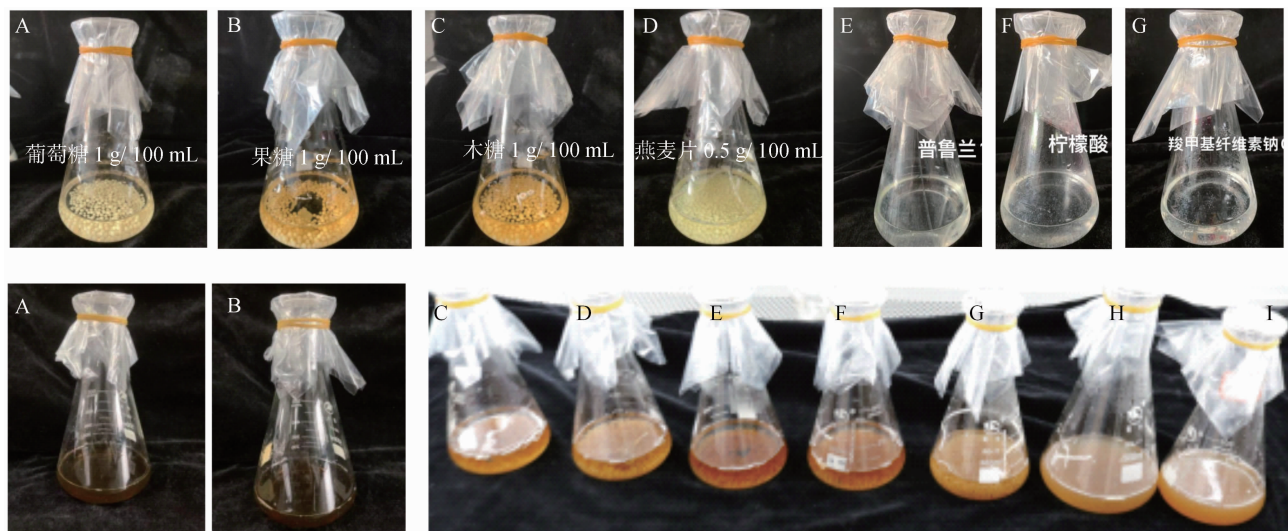
0.5、1 g/100 mL 葡萄糖和 1 g/100 mL 果糖试验组中的青霉菌长势较好,总体生长情况次于木糖培养基与燕麦片培养基,葡萄糖培养基中的菌株生长状态优于果糖培养基,而浓度为 1 g/100 mL 的葡萄糖培养基中的青霉菌长势又优于浓度为 0.5 g/100 mL 的葡萄糖培养基。1 g/100 mL 普鲁兰培养基、0.5 g/100 mL 海藻酸培养基、1 g/100 mL 柠檬酸培养基及 0.5 g/100 mL 羧甲基纤维素钠培养基内青霉菌的生长状况较差,海藻酸培养基内有少量絮状菌丝,其余 3 种碳源培养基内无明显生长,说明在短期培养中,这 4 种物质被青霉菌吸收、分解、利用的效率低、速度慢,不适合作为青霉菌培养的碳源。后续又对柠檬酸、普鲁兰、海藻酸钠以及羧甲基培养基再次进行 72 h 培养,经培养后柠檬酸培养基内青霉菌生长良好,菌球体积小,培养基无色透明,菌落密度较大;海藻酸钠培养基内有少量

絮状菌漂浮,溶液无色透明;羧甲基纤维素钠培养基内菌球密度与体积较小,培养基无色透明;普鲁兰培养基内仍无明显的菌落生长(图 4 上)。

通过培养比对,判定木糖与燕麦片最适合作为青霉菌生长的碳源,其次是葡萄糖与果糖,其中 1 g/100 mL 葡萄糖比 0.5 g/100 mL 葡萄糖更有利于青霉菌的繁殖,海藻酸、普鲁兰、羧甲基纤维素钠及柠檬酸培养基在 72 h 内未见明显的菌落生长,说明青霉菌对此类碳源降解速率慢,因此不适合作为培养青霉菌的碳源。

2.6 青霉菌生长的 pH 值最低阈值

经培养后观察各培养基中青霉菌的生长状态并记录,再过滤网过滤,用分析天平称取各组青霉菌湿重并进行具体比较,判断适宜青霉菌能够生长的 pH 值最低阈值。将后 3 组培养基(pH 值为 1、1.5、2)再次进行 28 ℃ 恒温培养 72 h,同时连续观测 6 d,结果显示,3 组培养基内仍无明显菌落生长,因此可验证青霉菌的最低生长 pH 值约为 2.5(图 4 下)。由于青霉菌的生物菌剂在实际处理中更多地应用于酸性环境,因此测定其最高承酸阈值更有实际参考价值。



上图 A~G 分别为葡萄糖、果糖、木糖、燕麦片、普鲁兰糖、柠檬酸钠、羧甲基纤维素钠;

下图 A~I 分别为 pH 值 1、2、2.5、3、5、7、8、9、10

图4 拜赖青霉 LYQ01 在不同碳源、pH 值 PDA 培养基内的生长情况

2.7 青霉菌遗传操作所用抗生素及其浓度筛选

目前,真菌中可用的抗生素遗传标记比较少,使用最多的就是潮霉素 B,所以直接选择潮霉素 B 来检测该菌对于潮霉素的抗性并且筛选浓度范围。在海博 PDA 固体培养基上培养后 48 h,观察到在

125 $\mu\text{g/mL}$ 平板 10^{-4} 稀释度区域还有菌落长出,但是在 250 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度下已经没有菌落长出了(图 5-a)。培养 5 d 后,不管哪个浓度还是会长出青霉菌的菌落,说明长时间培养,青霉菌对潮霉素抗性反而失效了(图 5-b)。

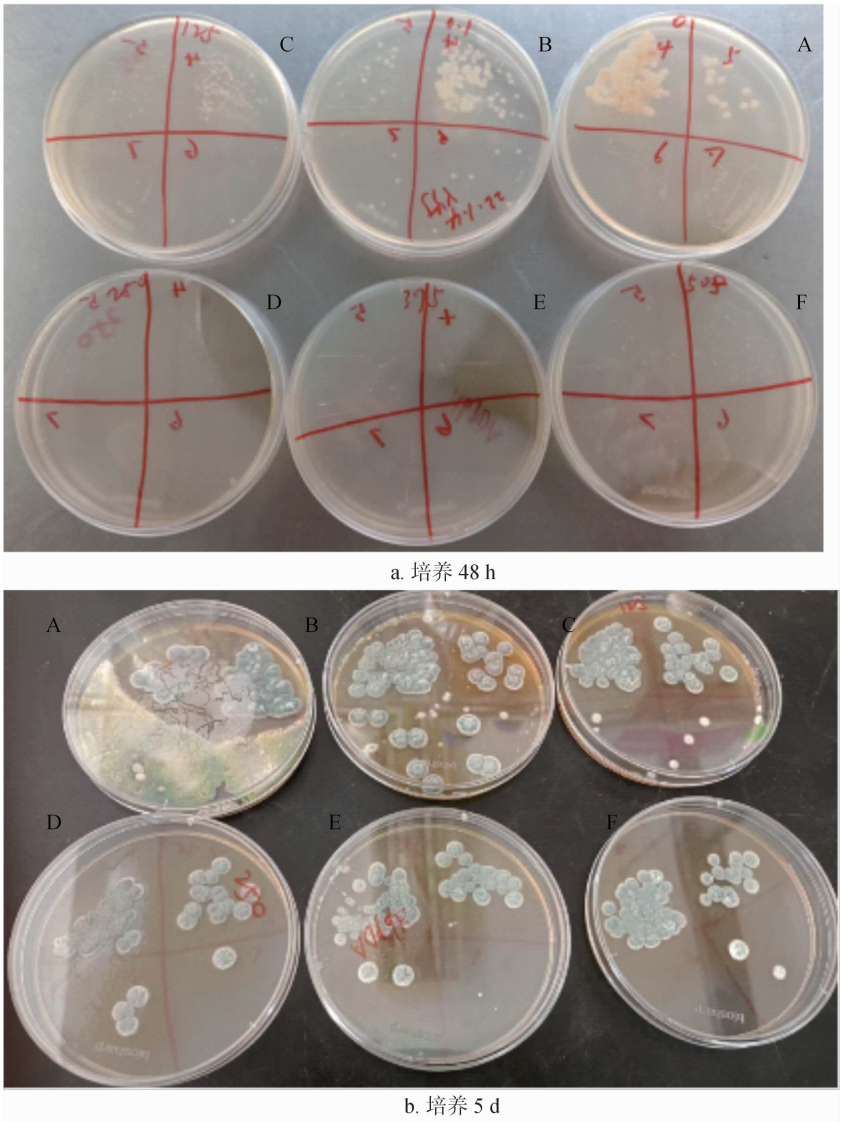


图5 不同浓度梯度的拜赖青霉 LYQ01 孢子在潮霉素 PDA 培养基上的生长情况

2.8 谷子培养基中的病原菌与拮抗菌共培养生长结果

为了解青霉菌的烟草疫霉拮抗机理,利用谷子培养基进行共培养试验,结果见图 6。共培养后 5 d,第 2 组 LYQ01 菌丝生长,但没有向四周扩散,不是很旺盛,没有从基质内向外伸展;第 4 组疫霉菌丝生长特别旺盛并向四周扩散,完全盖住了基质;同时接种了 2 种菌的第 3 组中没有看到白色的疫霉菌丝,而是长满了墨绿色的 LYQ01 菌丝和孢子。说明在有病原菌接种的前提下,可以激发拮抗菌的生长,阻止病原菌的增殖作用(图 6 - C)。

3 结论

本研究结果表明,从发病区域的健康烟草植株根际土中筛选出 1 株抑制病原菌的真菌,利用 18S

和 5.8S 之间的 ITS 序列引物扩增测序方法鉴定为拜赖青霉,与已测序的拜赖青霉比对,则进一步确定其即为拜赖青霉。筛选出的青霉菌对烟草黑胫病菌有明显的抑制作用,它对烟草黑胫病菌起抑杀作用的物质主要是挥发性与非挥发性代谢产物及几丁质水解酶,对根结线虫起抑杀作用的物质主要为多种可被乙酸乙酯或甲醇等有机试剂提取的代谢产物。通过改变单一变量,分析青霉菌对碳源的利用情况,结果显示利用效果最佳的碳源为木糖与燕麦片,其次为葡萄糖和果糖。拜赖青霉的酸性 pH 值阈值在 2.5 左右,为青霉菌在农业生产中的应用提供了便利,有效防止杂菌的污染,提高生产效率。最后,利用潮霉素 B 确定了该拜赖青霉的抗性浓度范围,为进一步进行遗传操作奠定了基础。



A—谷子固体培养基的空白对照；B—仅接种青霉 LYQ01 的谷子固体培养基；
C—接种青霉 LYQ01 和疫霉的谷子固体培养基；D—仅接种疫霉的谷子固体培养基

图6 拜赖青霉单独培养以及和烟草疫霉菌混合培养时的生长结果

参考文献:

- [1] 张莉, 张博源, 陈思乐, 等. 内生拮抗细菌对草莓 2 种病原真菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(4): 121–127.
- [2] 章乐乐, 王冠, 柳凤, 等. 芒果炭疽病拮抗菌分离、鉴定及生防机制研究[J]. 生物技术通报, 2023, 39(4): 277–287.
- [3] 秦旭, 冯艳娟, 羊国根, 等. 小麦全蚀病菌拮抗细菌的筛选及生防效果[J]. 植物保护学报, 2023, 50(3): 716–724.
- [4] 王文丽, 金涵, 从炳成, 等. 复合微生物菌剂对番茄青枯病的生防效应[J]. 南京农业大学学报, 2022, 45(6): 1174–1182.
- [5] 黄婉媛, 李彩斌, 彭宇, 等. 烟草根黑腐病拮抗菌的分离鉴定和生防作用特性研究[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(4): 873–883.
- [6] 张玉芹. 枯草芽孢杆菌 Bs-18 菌株分离与鉴定及对根结线虫的防治效果[J]. 北方园艺, 2012(1): 130–132.
- [7] 党柯柯, 彭俊伟, 孙阳, 等. 拮抗姜瘟病内生细菌的筛选及其生防效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(3): 585–593.
- [8] 李正鹏, 苏皖平, 杨威, 等. 小麦全蚀病拮抗细菌 Z0-j 的鉴定及其生防潜力评估[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(17): 121–125.
- [9] 李娜, 李晶, 付麟云, 等. 1 株优良生防细菌的筛选及其对甘肃温室黄瓜枯萎病的防治效果[J]. 中国瓜菜, 2022, 35(1): 86–90.
- [10] 刘烈花. 4 种生防菌对烟草黑胫病的防治作用[J]. 植物医生, 2018, 31(4): 42–44.
- [11] 彭可为, 李婵. 木霉菌的生物防治研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2): 780–782.
- [12] 宋桂经, 孙彩云, 宋小焱. 康氏木霉 BY-88 分生孢子的抑菌作用及其抑菌物质的分离[J]. 中国生物防治, 1998, 14(2): 21–24.
- [13] 杨凯, 陈凯, 李红梅, 等. 哈茨木霉 LTR-2 与产脲节杆菌 DnL1-1 协同对小麦茎基腐病的防治效果与机理[J]. 浙江农业学报, 2023, 35(6): 1385–1395.
- [14] 杨兵, 刘慧美, 龙章富. 微生物防治烟草黑胫病的研究进展[J]. 农药, 2015, 54(9): 629–634.
- [15] 何明川, 王志江, 谢永辉, 等. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2): 428–439.
- [16] 孙计平, 李雪君, 吴照辉, 等. 烟草黑胫病的研究进展[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(16): 3253–3256.
- [17] 谢永辉, 张永贵, 朱利全, 等. 烟草黑胫病综合防治研究进展[J]. 生物技术进展, 2015, 5(1): 41–46.
- [18] 魏利辉, 丁国春, 郭坚华, 等. 生防菌剂 GJ23 防治黄瓜根结线虫的田间试验效果[J]. 江苏农业科学, 2006, 34(5): 46–48.
- [19] 高学彪, 邓穗儿, 周慧娟, 等. 淡紫拟青霉 MCWA18 菌株对南方根结线虫的寄生和防治作用[J]. 中国生物防治, 1998, 14(4): 20–23.
- [20] 左梅, 谭军, 向必坤, 等. 根际土壤性状对烟田烟草根结线虫病发病等级的影响[J]. 土壤通报, 2020, 51(4): 885–890.
- [21] 黄阔, 武霖通, 丁伟, 等. 烟草根结线虫病发生规律及综合防治方法[J]. 植物医生, 2018, 31(3): 57–59.
- [22] 李星月, 余辉, 朱从桦, 等. 四川烟草根结线虫危害及其综合防控对策[J]. 四川农业科技, 2018(2): 31–32.
- [23] 方启航, 颜顾浙, 方伟, 等. 草酸青霉和棘孢木霉对青枯劳尔氏菌的生防效果[J]. 浙江农林大学学报, 2022, 39(4): 852–859.
- [24] 湛昕伟, 朱柏光, 陈点华, 等. 灰黄青霉 CF3 对木薯病原菌的拮抗性及其促生作用[J]. 分子植物育种, 2022, 20(24): 8231–8236.
- [25] 陈杰, 马永清, 郭振国, 等. 灰黄青霉对瓜列当的防效及对番茄根区土壤微生物的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2019, 27(5): 766–773.
- [26] 金贺, 夏诗宁, 王旭东, 等. 微紫青霉(*Penicillium janthinellum*) Snel1650 诱导大豆胞囊线虫防治效果及 GmCAD 应答响应[J]. 中国油料作物学报, 2023, 45(3): 583–591.
- [27] 姚凡, 王喜刚, 郭成瑾, 等. 绳状青霉 P-19 不同固体发酵浸提液对马铃薯镰刀菌根腐病原菌的抑制作用[J]. 植物保护, 2022, 48(6): 368–373.
- [28] 张建峰, 苗天瑶, 张嘉旭, 等. 1 株溶磷真菌的分离鉴定及溶磷特性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(12): 121–128.
- [29] Zhang W F, Meng Q Y, Wu J S, et al. Acorane sesquiterpenes from the deep-sea derived *Penicillium bilaiae* fungus with anti-neuroinflammatory effects[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10: 1036212.
- [30] Meng L H, Li X M, Li H L, et al. Chermobilanes A and B, new bioactive meroterpenoids from co-cultures of marine-derived

丁琳,梁海迪,赵辉,等. 湖南栽培油菜品种根肿病抗性鉴定及防控[J]. 江苏农业科学,2024,52(16):170-177.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2024.16.022

湖南栽培油菜品种根肿病抗性鉴定及防控

丁琳¹, 梁海迪¹, 赵辉¹, 丁佳丽¹, 凌丙英², 胡秋龙³, 王玉生¹, 任佐华¹, 谭琳¹

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 湖南长沙 410128; 2. 湖南省衡阳县农业农村局, 湖南衡阳 421200;

3. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410128)

摘要:油菜根肿病是由芸薹根肿菌引起的严重影响油菜生产的土传病害,为鉴定评价不同油菜品种对根肿病的抗性与寻找防控方法,进行温室盆栽试验与田间病圃试验综合评价。结果表明,供试的 105 个油菜品种对根肿病的抗性存在差异。温室盆栽试验中,37 个品种表现为感病,占供试品种总数的 35.24%;68 个品种表现为高感,占供试品种总数的 64.76%。大田试验中,4 个品种表现为抗病,占供试品种总数的 3.81%;47 个品种表现为感病,占供试品种总数的 44.76%;54 个品种表现为高感,占供试品种总数的 51.43%。在盆栽试验和大田试验中,100 g/L 氰霜唑悬浮剂稀释 1 000 倍的防治效果分别为 67.37% 和 78.79%,1 kg 土壤添加 1.2 g 生石灰的防治效果分别为 45.52% 和 49.75%。结果对于油菜栽培品种的选择与根肿病的防控具有一定参考价值。

关键词:油菜;根肿病;抗性鉴定;防控;芸薹根肿菌

中图分类号:S435.654 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2024)16-0170-08

芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) 是引起土传病害根肿病的病原菌,生长在寄主根系细胞内,使寄主根部形成独特的肿根,为根肿菌生长提供营养,并为休眠孢子的形成提供空间,常导致植株发育迟缓,严重感病的植株会因根部溃烂而死亡^[1-2]。目前约有 75 个国家报道了根肿病,它很可能分布在全世界任何种植十字花科作物或有十字花科植物的地方^[3]。近年来,我国越来越多地区的根肿病发生日益严重,主要分布在四川、安徽、湖北、云南、湖南等地^[4]。由芸薹根肿菌引起的根肿

病已经成为全球油菜生产的主要威胁,发病地区油菜产量损失通常在 5%~60% 之间,严重发病地区产量损失甚至达到 100%,造成油菜绝收^[5]。

芸薹根肿菌的休眠孢子在土壤中的存活时间可以长达 20 年,这给根肿病的防治增添了极大的难度,对根肿病进行有效的综合防治势在必行^[6]。种植抗根肿病的油菜品种与轮作结合是为数不多能有效防治根肿病的策略之一^[7]。因此发掘油菜抗病品种、避免在油菜生产中大面积种植感病品种,对于防治根肿病显得尤为重要。本研究通过温室盆栽试验与田间病圃试验综合鉴定评价 105 个供试油菜品种对根肿病的抗性,并测定氰霜唑和生石灰对油菜根肿病的防治效果,以期为油菜生产与油菜根肿病防控提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 供试材料

感染芸薹根肿菌的肿根采自湖南省衡阳市衡阳县,经鉴定为芸薹根肿菌 4 号生理小种,清洗干净

收稿日期:2023-09-22

基金项目:湖南省科技创新计划(编号:2023NK2024);国家自然科学基金青年项目(编号:32102286);湖南省教育厅优秀青年项目(编号:20B301)。

作者信息:丁琳(1999—),女,硕士,从事植物病理学研究。

E-mail:940561259@qq.com。

通信作者:谭琳,博士,副教授,硕士生导师,从事有害生物综合治理研究,E-mail:hqltanlin@163.com;任佐华,博士,副教授,硕士生导师,从事植物病理学研究,E-mail:819482969@qq.com。

isolates of *Penicillium bilaiae* MA-267 and *Penicillium chermesinum* EN-480[J]. Marine Drugs,2020,18(7):339.

[31] Nakahara S, Kusano M, Fujioka S, et al. Penipratynolene, a novel nematicide from *Penicillium bilaiae* chlabuda [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry,2004,68(1):257-259.

[32] de Vries R P, Burgers K, van de Vondervoort P J I, et al. A new

black *Aspergillus* species, *A. vadensis*, is a promising host for homologous and heterologous protein production [J]. Applied and Environmental Microbiology,2004,70(7):3954-3959.

[33] Dilokpimol A, Peng M, di Falco M, et al. *Penicillium subrubescens* adapts its enzyme production to the composition of plant biomass [J]. Bioresource Technology,2020,311:123477.