



三株海洋木霉的应用潜力

李闯^{1,2}, 张道敬², 罗远婵², 张久明^{1*}, 田黎^{1,2*}

¹ 青岛科技大学生物系, 山东 青岛 266042

² 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237

摘要:【目的】探索 3 株海洋生境木霉的应用潜力。【方法】经过筛选和诱变, 获得高抑菌活性及产孢量的木霉突变株; 通过优化培养基、温度、初始 pH 考察其产孢量及最适培养条件; 综合抑菌谱、重寄生及抑菌相关基因考察其抑菌活性; 采用特殊培养基法考察其产纤维素酶、植酸酶、铁载体以及降解磷钾的能力, 高效液相色谱法测定其产吡啶乙酸能力。【结果】3 株木霉菌的产孢量分别为 3.45×10^8 、 3.10×10^8 和 2.55×10^8 CFU/cm², 与野生型相比分别提高了 88.52%、63.16% 和 180.22%; 且均可产生厚垣孢子, 其中 XG20-1 厚垣孢子产量最高, 达到 3.56×10^8 CFU/mL。3 株木霉菌具有较广抑菌谱及对番茄早疫病菌的重寄生作用, 同时扩增得到 *Tex1*、*Nag1*、*Egl* 基因, 生物学测试显示其均具有产纤维素酶、几丁质酶以及铁载体的能力, 证明其抑菌活性是多种机制共同作用的结果; 菌株可以降解磷钾, 且吡啶乙酸产量分别为 2.61、1.57 和 1.92 mg/L, 具有促进植物生长的潜力。【结论】本文中 3 株木霉菌在开发为生防菌与生物肥料方面展现出良好的应用潜力。

关键词: 海洋生境木霉, 抑菌与基因, 多种酶活, 降解磷钾

陆地生境木霉菌因其丰富的酶类、作用及环境安全, 成为最受关注的益生菌, 尤其在植物生物防治领域。木霉生境的不同对其在植物体上的功能有直接影响, 相对陆地生境木霉, 海洋生境木霉研究较少, 由于海洋生境较陆地恶劣, 生活在此特殊生境的木霉抑菌活性强, 对营养要求较低, 即相对人工培养成本较低, 显示出良好的开

发应用前景。木霉菌分生孢子和厚垣孢子是商品化制剂的主要成分, 孢子的产量成为是否能应用的主要指标, 后者因其抗逆性强、货架期长等特性在近年受到重视^[1]。

木霉菌除了具有其他拮抗菌也有的营养与空间竞争、分泌抗菌物质和诱导植物抗性等特性外, 还有较明显的重寄生作用, 即以附着胞状分枝吸

基金项目: 国家自然科学基金(31501693); 国家海洋局重点实验室开放基金(MBSMAT-2014-03); 国家高技术“863”研究发展计划(2011AA10A202-2)

*通信作者。Tel: +86-21-64252104; E-mail: 张久明, zjm1042005@163.com; 田黎, tianli@fio.org.cn

收稿日期: 2016-09-28; 修回日期: 2016-12-07; 网络出版日期: 2016-12-30

附在病原菌丝上, 吸取营养导致其裂解死亡, 因此菌株是否具有重寄生作用也是人们选择木霉的重要标准。在木霉菌产生的众多抗生物质中, Peptaibols 是一类由非核糖体肽合成酶(NRPSs)合成的富含 α -氨基异丁酸(Aib)的特殊抗菌肽, 可直接抑制病原真菌的生长^[2], 同时具有抗病毒、诱导肿瘤细胞凋亡等生物学活性^[3], *Tex1* 是其控制合成的主要基因。木霉菌产生的酶类具有较高的经济价值, 几丁质酶能降解真菌细胞壁的主要成分几丁质(N-乙酰-D-葡萄糖胺, 以 β -1,4-乙酰葡萄糖胺糖苷键连接而成的多聚糖), 破坏病原菌菌丝尖端几丁质, 使菌丝停止生长、缢缩畸形甚至消解等^[4], 根据酶切方式分为外切和内切几丁质酶两种, 外切几丁质酶作用于线性末端 β -1,4-乙酰葡萄糖胺糖苷键, 基因 *Nag1* 是其生物合成的关键基因; 纤维素是地球上分布最广, 但高等生物包括植物无法直接利用的资源, 我国仅农作物废弃物每年就高达 0.7×10^9 t, 这些原料大部分被焚烧, 不但利用率低(仅 10%左右), 而且给环境保护带来巨大压力。利用有益微生物纤维素酶来降解纤维素效率高、无污染, 具有双重的经济和生态价值。纤维素酶是由内切葡聚糖酶(Endoglucanase)、纤维二糖水解酶(Cellobiohydrolase)和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)等组成的复合酶系^[5], *Egl* 基因是内切葡聚糖酶合成的关键基因。基因的敏感和准确性使得 *Nag1* 和 *Egl* 基因成为人们选择菌株是否产几丁质酶和纤维素酶的指标。

磷钾是植物生长必需的大量元素, 土壤存在有大量无机磷和硅酸盐矿物形式的钾, 由于其溶解性差, 难以被植物吸收, 一些微生物可借助生命活动过程产生的物质将难溶的磷、钾元素转变为可溶态供植物利用^[6]。此外, 植酸酶(Phytases)可以将植物不能利用的植酸(Phytic acid, 又称肌

醇六磷酸)转化成植物可以利用的有效磷元素。吲哚乙酸(Indole-3-acetic acid, IAA)是一种植物体内的内源生长素, 参与细胞生长、形成层分裂和维管组织分化等多种生理生化过程的调节与控制, 据报道, 具有分泌 IAA 活性的微生物能够促进植物种子萌发和生长^[7]。自然界中铁元素大多数以不溶解状态存在, 生命体难以利用^[8], 铁载体(Siderophores)是一类具有很强特异螯合 Fe^{3+} 的小分子化合物, 许多植物根际益生微生物可通过合成这类物质来摄取环境中的铁, 与病原菌争夺铁并将多余的铁提供给植物利用^[9]。铁载体还可螯合锰、铅、汞、铬、镉等金属离子^[10-11], 对环境修复、食品安全^[12]等领域具有重要意义。铁载体的检测原理可表示为 $\text{FeDye}^{3-\lambda} + \text{L}^{x-} = \text{FeL}^{3-x} + \text{Dye}^{\lambda-}$, 当对 Fe^{3+} 具有更强亲和力的螯合物(L)如铁载体加入到含有 $\text{FeDye}^{3-\lambda}$ 复合物(即 CAS-Fe-HDTMA)的溶液中后, 复合物中 Fe^{3+} 便会被螯合物(L)络合, 颜色也就从蓝色变为橙红色、紫红色等, 根据颜色变化的有无及程度即可定性或定量地测定出供试材料中的铁载体。本文通过生物学及分子生物学方法对 3 株分离自海洋生境的木霉的应用潜力进行研究。

1 材料和方法

1.1 供试菌株及培养基

供试木霉菌: 由渤海海域(118–121°E, 37–38°N)、黄海海域(118–120°E, 35–36°N)海洋动植物及沉积物分离获得, 共 109 株; 通过抑菌筛选及分类鉴定, 选出 3 株木霉菌。

筛选靶标: 番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora*

infestans)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、多种植物菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)，来自本实验室保存的植物病原真菌。

基础培养基：PDA 培养基(马铃薯 200.0 g，葡萄糖 20.0 g，琼脂 18.0 g，蒸馏水 1000 mL)，用于抑菌谱的测定等。

分离培养基：TSB 改良培养基(葡萄糖 3.0 g， NH_4NO_3 1.0 g， KH_2PO_4 0.9 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g，KCl 0.15 g，甲霜灵 0.08 g)、RBA 培养基(马铃薯 200.0 g，葡萄糖 20.0 g，孟加拉红 33 mg)、MPDA 培养基(马铃薯 200.0 g，葡萄糖 18.0 g， KH_2PO_4 1.0 g， MgSO_4 0.5 g)，均加链霉素 0.1 g，氯霉素 0.3 g，琼脂 18.0 g，人工海水 10%，蒸馏水 1000 mL。

产孢测试培养基：PDA 培养基、酵母粉蔗糖(ESA)培养基(酵母粉 5.0 g，蔗糖 15.0 g)、理查德(Richard)培养基(KNO_3 10.0 g， KH_2PO_4 5.0 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.5 g，蔗糖 5.0 g， FeCl_3 0.02 g，KCl 0.03 g， MgCl_2 0.23 g)、PDB 培养基(马铃薯 200.0 g，葡萄糖 20.0 g)，人工海水 10%，固体加琼脂 18.0 g，蒸馏水 1000 mL。

刚果红培养基：NaCl 6.0 g，CMC-Na 2.0 g， Na_2HPO_4 2.5 g， KH_2PO_4 1.5 g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g，琼脂 18.0 g，蒸馏水 1000 mL。

溶磷培养基：葡萄糖 10.0 g， $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g，NaCl 0.3 g，KCl 0.3 g，琼脂 18.0 g，蒸馏水 1000 mL。

解钾培养基：葡萄糖 5.0 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g， FeCl_3 0.005 g， CaCO_3 0.1 g，钾长石粉 1.0 g，琼脂 18.0 g，蒸馏水 1000 mL。

植酸钙测定培养基：葡萄糖 20.0 g，植酸钙 10.0 g， NH_4NO_3 5.0 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g，KCl

0.5 g， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g， MnSO_4 0.01 g，琼脂 18.0 g，蒸馏水 1000 mL。

IAA 测定培养基： K_2HPO_4 1.15 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g，蛋白胨 20.0 g，丙三醇 15.0 mL，L-色氨酸 0.1 g，蒸馏水 1000 mL。

1.2 菌株筛选及鉴定

采用平板对峙培养法对分离得到的木霉进行抑菌活性筛选，即以 *A. solani* 为靶标菌，分别打取直径 10 mm、活化 3–4 d 的供试木霉菌与靶标菌菌片，将其呈直线接种在 PDA 平板两侧，相距 4 cm，仅接种靶标菌为对照，每处理 3 次重复，28 °C 恒温培养，第 5 天测量处理组靶标菌落直径、木霉菌落直径和对照组靶标菌落直径，计算抑菌率：抑菌率(%)=(对照组靶标菌落直径–处理组靶标菌落直径)/对照组靶标菌落直径×100%；18S rRNA 基因扩增利用真菌 18S rRNA 基因的通用引物 NS-F (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')和 NS-R (5'-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3')，PCR 反应条件：94 °C 5 min；94 °C 40 s，50 °C 30 s，72 °C 2 min，32 个循环；72 °C 15 min。扩增产物送至华大基因科技有限公司测序并通过 NCBI 的 BLAST 程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行对比及序列同源性分析；采用 PDA 培养基，28 °C 恒温培养，连续观察记录菌落形态、颜色等变化，挑取培养 2–3 d 的菌丝于光学显微镜下观察其产孢结构，参考 Samuels 等^[13]的木霉菌分类方法，进行分类鉴定；对选出的 3 株木霉菌进行紫外-微波复合诱变，并考察突变菌株的稳定性。

1.3 抑菌谱、重寄生及相关抑菌基因检测

利用对峙培养法测定 3 株木霉对 6 种植物病原菌的抑菌率，光学显微镜下观察 3 株木霉菌的

重寄生现象。根据从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 上检索获得木霉属的 β -1,4-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因 *NagI* 与 Peptaibols 合成酶基因 *TexI* 序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计对应的引物 JDZ-F/JDZ-R 和 KJT-F/KJT-R, 对 3 株木霉菌 PCR 扩增。文中所用引物序列及 PCR 反应条件: (1) JDZ-F (5'-CAGAACCGAATCCAGAGC-3')/JDZ-R (5'-GAAGGAGTGTAGACGAGC-3'), PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 1 min, 50 °C 45 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 10 min; (2) KJT-F (5'-CCTTACACCTACCGTTGC-3')/KJT-R (5'-ATTGTTACCAGGCTCCAC-3'), PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 40 s, 50 °C 40 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 10 min; (3) XWS-F (5'-TGGAACCTACCGCTGGATG-3')/XWS-R (5'-ATGGTGAAGGGCTTGAG-3'), PCR 反应条件: 94 °C 2 min; 94 °C 45 s, 50 °C 40 s, 72 °C 1 min, 32 个循环; 72 °C 15 min。

1.4 不同条件对产孢的影响

考察 PDA、ESA 及 Richard 培养基对木霉菌产孢的影响^[14], 然后以合适的 PDA 为基础培养基分别设定 20、25、28、30、35 °C 及 4.0、6.0、7.0、8.0、10.0 共 5 个温度和初始 pH 处理, 测试不同温度及初始 pH 对木霉菌产孢的影响。

1.5 对植物的促生长功能考察

参照杨合同等^[15]和叶姜瑜^[16]的特殊培养基方法, 即根据水解圈的大小检测 3 株木霉菌降解纤维素和产植酸酶的能力, 同时参照方法 1.3, 利用引物 XWS-F/XWS-R 对其是否具有降解内切葡聚糖酶 *Egl* 基因进行验证, 并对获得的 *Egl* 基因进行序列比对分析。

依据史法超^[17]的方法, 分别检测 3 株木霉菌溶磷解钾能力; 采用 HPLC 法^[18]测定产吡啶乙酸能力; 通过“半 PDA 培养基, 半 CAS 检测培养基”方法^[19]对 3 株木霉菌的产铁载体能力进行测试。

2 结果和分析

2.1 选出的菌株与诱变结果

综合抑菌活性及菌株鉴定结果(表 1), 选出里氏木霉(*Trichoderma reesei*) M3-2、康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*) Y5-1、猬木霉(*Trichoderma erinaceum*) XG20-1 开展后续研究。

3 株木霉菌经过微波-紫外复合诱变, 选出生长快、产孢多的突变菌株, 传代 5 次遗传性状稳定, 菌落形态、产孢时间及产孢量基本不变。其抑菌情况、产孢量与原始菌株比较见图 1, 突变株

表 1. 部分菌株抑菌活性及鉴定结果

Table 1. Antimicrobial rate and identification of some strains

Strains	Antimicrobial rate	Results of identification	Strains	Antimicrobial rate	Results of identification
M3-2	++++	<i>T. reesei</i>	Y5-1	++++	<i>T. koningiopsis</i>
M4-1	+++	<i>T. koningiopsis</i>	Ym	+++	<i>T. asperellum</i>
M8-2	+++	<i>T. asperellum</i>	W-2	+++	<i>T. harzianum</i>
M8-5	++++	<i>T. harzianum</i>	MYZ8-3	+++	<i>T. reesei</i>
M16-1	+++	<i>T. aggressivum</i>	XG20-1	+++	<i>T. erinaceum</i>

+++ : antimicrobial rate between 30% and 50%; ++++ : antimicrobial rate above 50%.

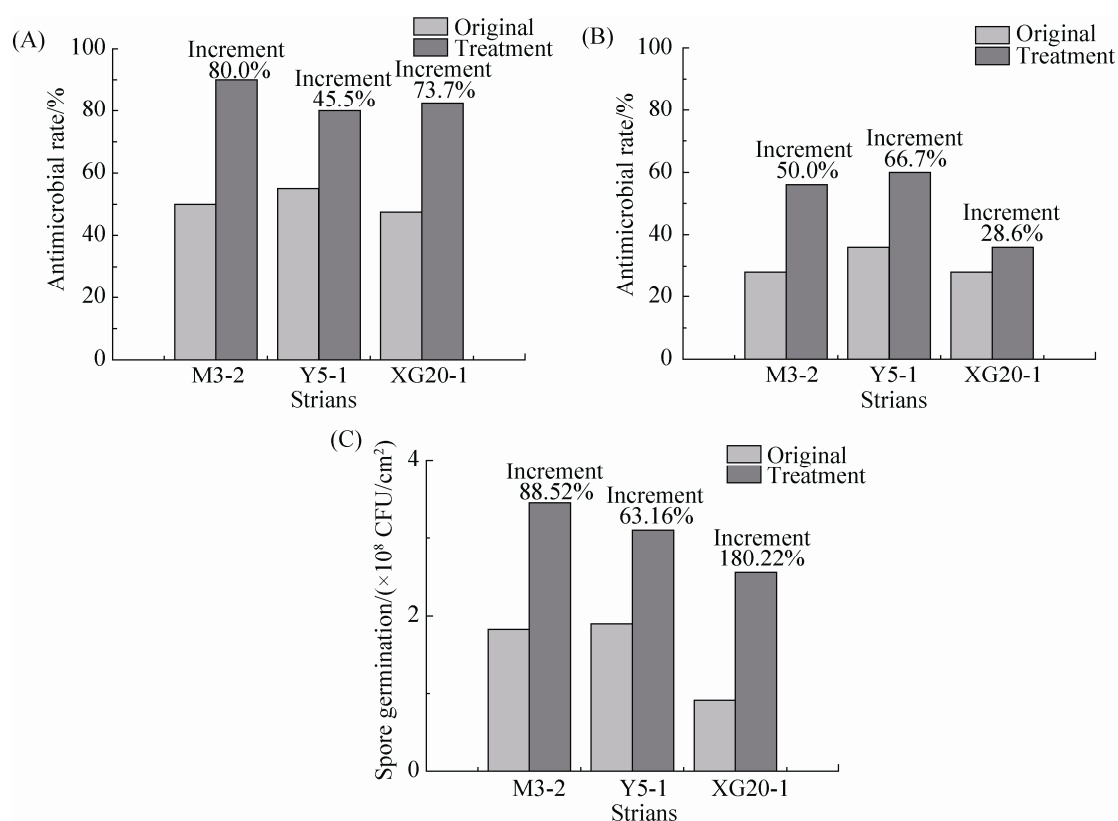


图 1. 原始菌株与突变菌株对 *A. solani* (A) 和 *B. cinerea* (B) 的抑菌率及其最大产孢量(C)

Figure 1. Antimicrobial rate to *A. solani* (A), *B. cinerea* (B) and Max spore germination (C) of original strains and mutant strains.

的抑菌活性均有显著提高, 其中 M3-2 对 *A. solani* 的抑菌率提高了 80%, Y5-1 对 *B. cinerea* 的抑菌率提高 66.7%; 突变菌株最大产孢量分别为 3.45×10^8 、 3.10×10^8 和 2.55×10^8 CFU/cm², 较原始菌株分别提高了 88.52%、63.16% 和 180.22%。

2.2 抑菌谱结果及抑菌机理

3 株木霉菌对供试 6 种植物病原菌的抑菌谱

由表 2 可知, 3 株木霉菌对 *S. sclerotiorum* 的抑菌率最高, 分别为 93.3%、91.7% 和 83.3%; 对 *B. cinerea* 的抑菌率最低, 分别为 56.0%、60.0% 和 36.0%。

通过显微镜分别观察 3 株木霉菌与 *A. solani* 菌丝生长重合处, 如图 2 所示, 可以看出 *A. solani* 菌丝较粗, 木霉菌菌丝相对较细, 并且可以看到 2 种菌丝相互缠绕、穿刺等现象。

表 2. M3-2、Y5-1 及 XG20-1 的抑菌谱

Table 2. Antimicrobial spectrum of M3-2, Y5-1 and XG20-1

Strains	Radius of pathogen/mm				Average antimicrobial rate		
	CK	M3-2	Y5-1	XG20-1	M3-2	Y5-1	XG20-1
<i>A. solani</i>	42.0±0.7	4.1±0.5	8.2±0.4	7.0±0.5	90.2%	80.5%	83.3%
<i>B. cinerea</i>	25.5±0.4	11.0±0.2	10.2±0.3	16.1±0.1	56.9%	60.0%	36.9%
<i>P. oryzae</i>	24.5±0.5	10.5±0.4	7.3±0.6	6.4±0.2	57.1%	70.2%	73.9%
<i>S. sclerotiorum</i>	60.5±0.3	4.5±0.2	5.6±0.2	10.5±0.4	92.6%	90.7%	82.6%
<i>P. infestans</i>	18.0±0.5	4.3±0.9	5.8±0.4	6.6±0.5	76.1%	67.8%	63.3%
<i>F. graminearum</i>	44.5±0.6	16.4±0.5	16.2±0.6	20.0±0.4	63.1%	63.6%	55.1%

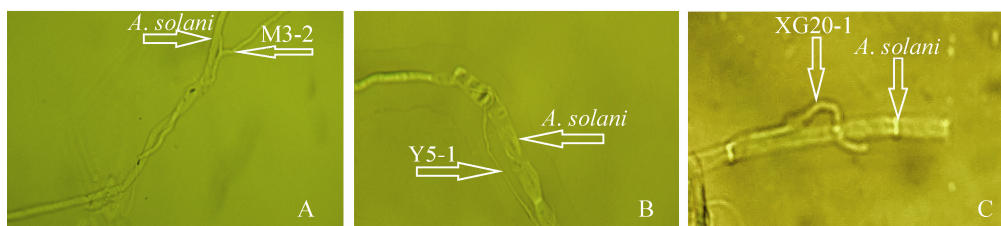


图 2. M3-2(A)、Y5-1(B)及 XG20-1(C)的重寄生光学显微照片

Figure 2. Light micrograph of superparasitism of M3-2(A), Y5-1(B) and XG20-1(C).

3 株木霉菌的 *NagI* 基因、*TexI* 基因 PCR 扩增结果见图 3, 特征条带分别约为 800 和 250 bp, 说明 3 株木霉菌含有几丁质酶和抗菌肽合成的关键基因, 即可通过产生抗菌肽和几丁质酶抑制病原菌。

2.3 产孢结果与适宜的条件

2.3.1 产孢曲线: 如图 4 所示, 木霉 M3-2、Y5-1

和 XG20-1 分别从第 2–3 天开始产分生孢子, 产孢量随培养时间而增加, M3-2 和 Y5-1 均在接种后 8 d 达到最大, 分别为 6.08×10^8 和 5.83×10^8 CFU/mL, 第 4 天开始产厚垣孢子, 第 9 天时达到最大; XG20-1 分生孢子产生时间晚而且量少, 但在第 3 天开始产厚垣孢子, 产孢量均高于其他 2 株木霉菌, 在第 9 天时达到最大产孢量 3.56×10^8 CFU/mL。

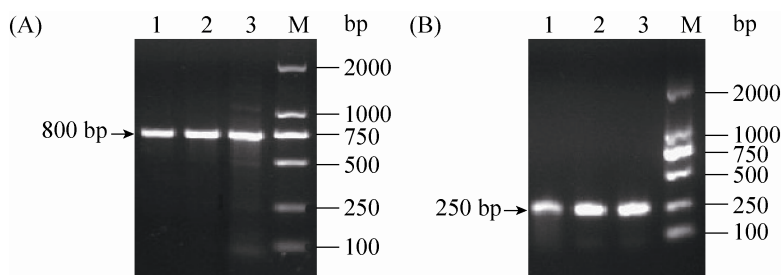


图 3. β -1,4-乙酰葡萄糖胺糖苷酶基因 *NagI*(A)及 Peptaibols 合成酶基因 *TexI*(B)的 PCR 扩增结果

Figure 3. PCR results of *NagI*(A) and *TexI*(B). M: marker; lane 1–3: M3-2, Y5-1 and XG20-1.

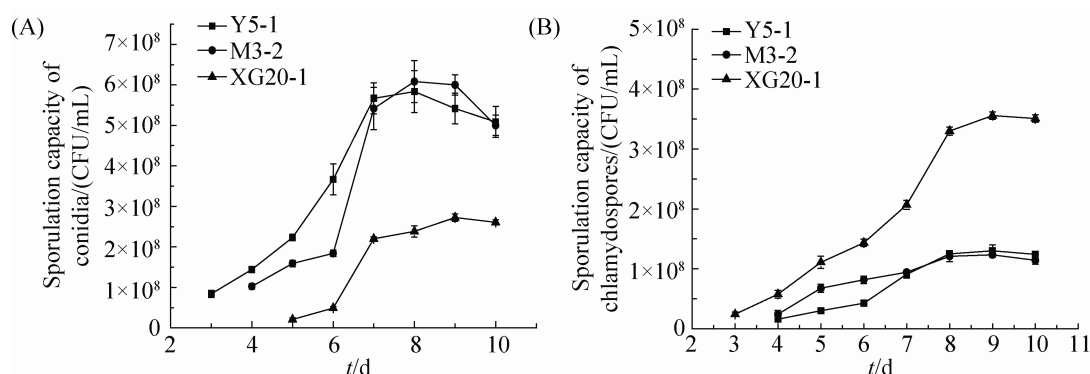


图 4. 液体培养基产分生孢子(A)及厚垣孢子(B)曲线

Figure 4. Curve of producing conidia (A) and chlamydospores (B) in liquid medium. Data in figure are the mean \pm S.D. of triplicate samples.

2.3.2 不同培养基、温度及初始 pH 对产孢的影响 :表 3 显示,3 株木霉在 PDA 和 ESA 培养基上的产孢量没有显著性差异,但大于 Richard 培养基上的产孢量。

如图 5 所示,3 株木霉菌产孢规律对温度反应基本一致,当温度低于 25 °C 或高于 30 °C 时,产孢受到抑制,最适温度范围 25–28 °C。在测定范围内,木霉 Y5-1、M3-2 及 XG20-1 均在 28 °C 达到最大产孢量,分别为 3.07×10^8 、 3.51×10^8 和 2.45×10^8 CFU/cm²。

由图 6 可知,最适 pH 范围 6.0–7.0, Y5-1 在 pH 6.0 时达到最大,为 3.15×10^8 CFU/cm²; M3-2 和

表 3. 不同培养基对 3 株木霉产孢的影响

Table 3. Effects of different culture media on sporulation

Culture medium	Sporulation capacity ($\times 10^8$ CFU/cm ²)		
	M3-2	Y5-1	XG20-1
Richard	2.60b	2.10b	1.84b
PAD	3.45a	3.06a	2.56a
ESA	3.54a	3.07a	2.51a

Lowercase letters in the table represent the results from multiple comparisons. Different letters indicate significant difference, $P < 0.05$.

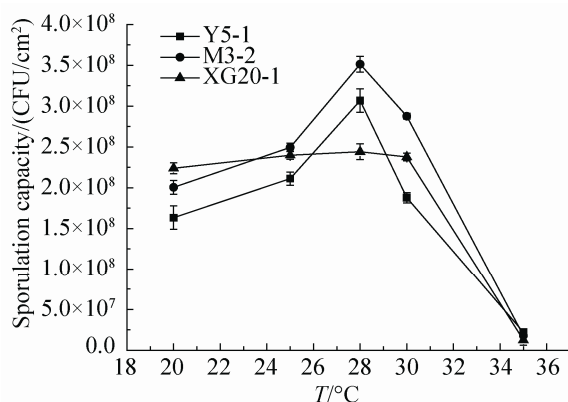


图 5. 不同温度对木霉菌产孢的影响

Figure 5. Effects of different temperature on sporulation. Data in figure are the mean \pm S.D. of triplicate samples.

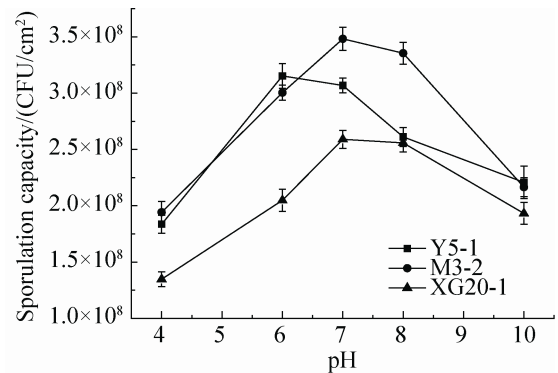


图 6. 不同初始 pH 对木霉菌产孢的影响

Figure 6. Effects of different pH on sporulation. Data in figure are the mean \pm s.d. of triplicate samples.

XG20-1 均在 pH 7.0 时达到最大,分别为 3.48×10^8 和 2.59×10^8 CFU/cm²。

2.4 降解纤维素能力

在纤维素刚果红培养基上,3 株木霉菌均能生长且产生水解圈,表明其可以降解纤维素,由 D/d 值可以初步判断 3 株木霉降解纤维素能力相当;3 株木霉菌的 *Egl* 基因 PCR 扩增产特异性条带约为 750 bp (图 7),经对比分析,与木霉属(EU935217) *Egl* 基因同源性较高,分别达到 95%、92%和 96%,进一步证明了 3 株木霉菌具有产纤维素酶的能力,详见图 8 和表 4。

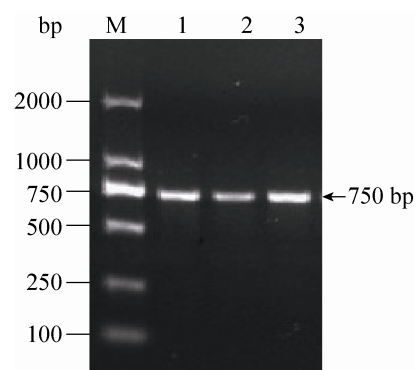


图 7. 内切葡聚糖酶基因 *Egl* 的 PCR 扩增结果

Figure 7. PCR results of *Egl*. M: marker; lane 1–3: M3-2, Y5-1 and XG20-1.

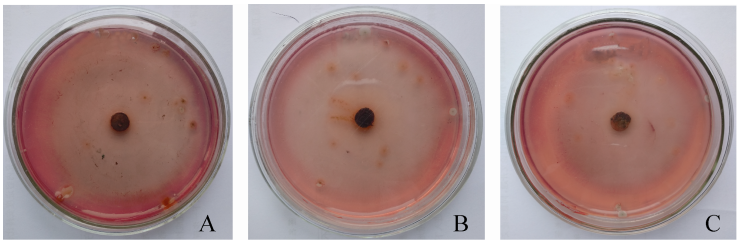


图 8. 降解纤维素能力测定结果

Figure 8. Degradation of cellulase. A: M3-2; B: Y5-1; C: XG20-1.

表 4. 溶磷解钾、产植酸酶及纤维素酶测试结果

Table 4. Phosphorus and potassium release, phytases and cellulase production

Treatment	Diameter of hydrolytic circle (D)/mm			Diameter of colony (d)/mm			D/d		
	M3-2	Y5-1	XG20-1	M3-2	Y5-1	XG20-1	M3-2	Y5-1	XG20-1
Phosphorus-releasing	36.0±0.6	37.4±0.3	30.5±0.5	22.4±0.3	24.8±0.4	23.5±0.2	1.61	1.51	1.30
Potassium-releasing	36.2±0.5	40.0±0.4	38.4±0.2	25.5±0.3	28.2±0.3	23.4±0.1	1.42	1.42	1.64
Degradation calcium phytate	40.0±0.2	32.5±0.1	24.2±0.4	15.0±0.3	16.2±0.5	14.0±0.5	2.67	2.10	1.71
Degradation cellulase	64.0±0.2	72.0±0.5	62.0±0.1	50.0±0.3	55.0±0.4	54.0±0.2	1.28	1.26	1.14

2.5 对植物的促生长功能

3 株木霉菌菌落周围均有水解圈,说明均具有一定的溶磷解钾能力。由表 4 可知,根据 D/d 值可以初步判断, M3-2 的溶磷能力最大,其次为 Y5-1, XG20-1 最小,但降解钾能力最大;产植酸酶能力由大到小依次为 M3-2、Y5-1、XG20-1。

如图 9 所示, IAA 标准样品在第 18 分钟位

置出现吸收峰, 微积分计算峰面积, 结合吲哚乙酸标准曲线, 通过内标法得出木霉菌 M3-2、Y5-1 和 XG20-1 的 IAA 产量分别为 2.61、1.57 和 1.92 mg/L。

产铁载体能力测定结果如图 10 所示, 3 株木霉菌株均可使 CAS 检测培养基变紫红色, 表明均具有产铁载体能力。

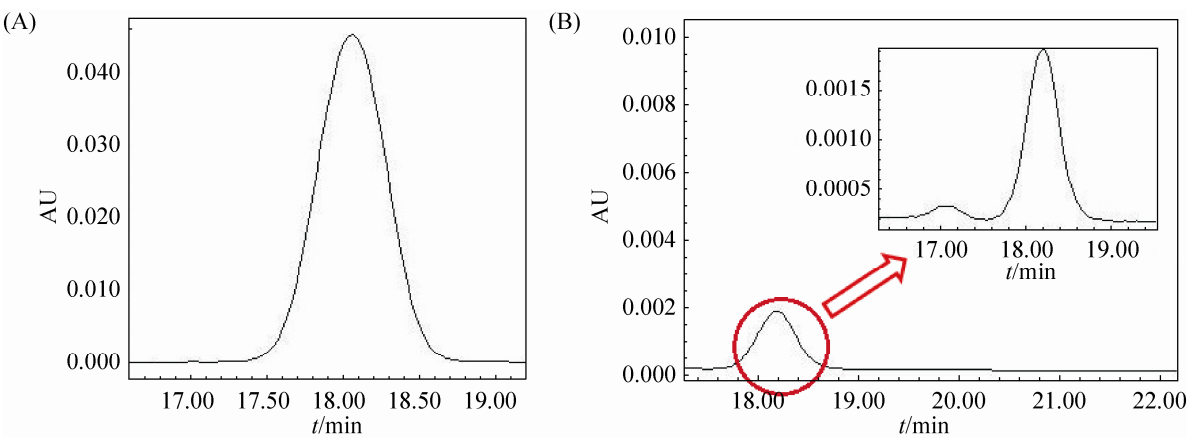


图 9. 标准品(A)及发酵样品(B)的 IAA 色谱图

Figure 9. IAA chromatogram of standard sample (A) and fermentation sample (B).

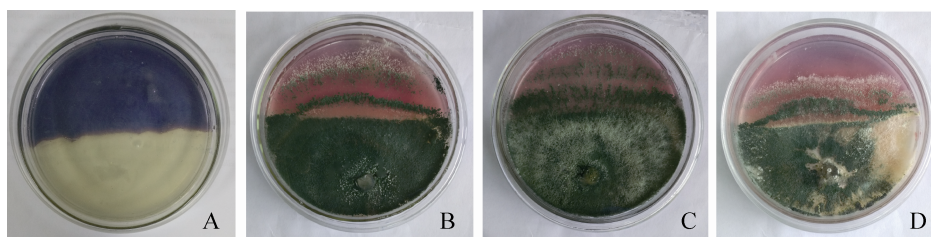


图 10. 产铁载体能力测试结果

Figure 10. Results of the capacity of siderophores test. A: CK; B: M3-2; C: Y5-1; D: XG20-1.

3 讨论

在众多的陆地益生菌中，木霉菌丰富的酶类和抑菌作用，使其在酶工业和农业领域应用广泛，而海洋生境木霉由于开发较晚，很少有报道。根据生物在自然界的适应原理，不同生境的微生物功能会有差别或差别很大。由于真菌的生长特性，海洋生境木霉大多需要生长在一些基质上，如动物、植物与沉积物等，生境的限制及开发的时间短，致使海洋生境木霉的数量与丰富度低于陆地，分离也会较困难，因此有关研究也很少。作者所在的课题组经过多年积累，获得一百余株来自海洋生境的木霉，欲对此类真菌的开发潜力做些初探，在选择代表菌株时，我们采用课题组建立多年的抑真菌靶标模式，但这种实验在选活性强菌株的同时，可能也将一些海洋生境的特色菌株淘汰，因此，如果研究的群体足够大，则会更好地反映海洋生境木霉的特色，课题组后续将继续进行其他方向研究报道，尽量展现这部分珍贵资源的生境特性。

为了客观显示来自海洋生境的木霉的功能，我们对选出的这 3 株抑菌活性强的木霉做了较全面的测试，通过测试并与陆地生境木霉相关报道做比较，发现其相应功能较全，部分功能作用更强。首先是抑菌作用，最高 91.7%–93.3% 的抑菌率高于报道的陆地生境木霉^[20–21]，其重寄生作用

也较明显，3 株菌株也同时具有合成抗菌肽 Peptaibols 的基因 *Tex1*；其次是降解几丁质的酶基因 *Nag1* 和降解纤维素的酶基因 *Egl*，并且通过生物学测试得到证实；也同时能降解磷钾以及产生植酸酶、IAA、铁载体，其中 3 株木霉菌在色氨酸诱导下 IAA 产量分别为 2.61、1.57 和 1.92 mg/L，与已报道^[22–23]的不同棘孢木霉 IAA 的产量(1.127–3.200 mg/L)相比，对植物促生长作用处于较高水平。益生菌应用的重要生物学指标分生孢子与厚垣孢子，陆生菌通常液体培养产生量较少，可能是海洋生境长期接触水，3 株木霉两类孢子的产孢时间、产孢量均显著优于已报道的陆生木霉菌^[24]，XG20-1 厚垣孢子产孢时间、产孢量较为突出，最大产孢量 3.56×10^8 CFU/mL，为文献^[25]报道的 3.36 倍，显示出良好的开发潜力，提示有关研究领域关注此生境的益生菌。

参考文献

- [1] Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma* III: section pachybasium. *Canadian Journal of Botany*, 1991, 69(11): 2373–2417.
- [2] Reino JL, Guerrero RF, Collado IG, Hernández-Galán R. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, 2008, 7(1): 89–123.
- [3] Daniel JF, Filho ER. Peptaibols of *Trichoderma*. *Natural Product Reports*, 2007, 24(5): 1128–1141.
- [4] Ye XB, Zeng QC, Jiang XL. Research advances on enzyme for mycoparasitism of *Trichoderma*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2009, 25(3): 276–280. (in Chinese)

- 叶小波, 曾千春, 蒋细良. 木霉菌重寄生过程中的酶学研究进展. *中国生物防治学报*, 2009, 25(3): 276–280.
- [5] Gray KA, Zhao L, Emptage M. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2006, 10(2): 141–146.
- [6] 陈华癸. 土壤微生物学. 北京: 高等教育出版社, 1957.
- [7] Contreras-Cornejo HA, Macías-Rodríguez L, Cortés-Penagos C, López-Bucio J. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2009, 149(3): 1579–1592.
- [8] Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2000, 54: 881–941.
- [9] Haas H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(4): 316–330.
- [10] Szabó O, Farkas E. Characterization of Mn (II) and Mn (III) binding capability of natural siderophores desferrioxamine B and desferricoprogen as well as model hydroxamic acids. *Inorganica Chimica Acta*, 2011, 376(1): 500–508.
- [11] Braud A, Jézéquel K, Lebeau T. Impact of substrates and cell immobilization on siderophore activity by *Pseudomonads* in Fe and/or Cr, Hg, Pb containing-medium. *Journal of Hazardous Materials*, 2007, 144(1/2): 229–239.
- [12] Pócsi I, Jeney V, Kertai P, Pócsi I, Emri T, Gyémánt G, Fésüs L, Balla J, Balla G. Fungal siderophores function as protective agents of LDL oxidation and are promising anti-atherosclerotic metabolites in functional food. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2008, 52(12): 1434–1447.
- [13] Samuels GJ, Pardo-Schultheiss R, Hebbar KP, Lumsden RD, Bastos CN, Costa JC, Bezerra JL. *Trichoderma stromaticum* sp. nov., a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycological Research*, 2000, 104(6): 760–764.
- [14] Sun M, Ren QY, Guan GQ, Liu ZJ, Li YQ, Ma ML, Liu AH, Yang JF. Optimization of cultural conditions of *Beauveria bassiana* pathogenic for ticks. *Microbiology China*, 2011, 38(7): 1022–1030. (in Chinese)
- 孙明, 任巧云, 关贵全, 刘志杰, 李有全, 马米玲, 刘爱红, 杨吉飞. 对蜱致病性球孢白僵菌培养条件的优化. *微生物学通报*, 2011, 38(7): 1022–1030.
- [15] Yang HT, Yu XY, Wei YL, Zhou HZ, Song LL, Hu JD, Li JS. Isolation, screening and identification of multifunctional *Trichoderma* spp. with antipathogenic biocontrol capacity. *Shandong Science*, 2009, 22(5): 27–30. (in Chinese)
- 杨合同, 于雪云, 魏艳丽, 周红姿, 宋莉璐, 扈进冬, 李纪顺. 多功能植病生防木霉的分离筛选与鉴定. *山东科学*, 2009, 22(5): 27–30.
- [16] Ye JY. A new differential medium for cellulose decomposing microorganisms. *Microbiology China*. 1997, 24(4): 251–252. (in Chinese)
- 叶姜瑜. 一种纤维素分解菌鉴别培养基. *微生物通报*, 1997, 24(4): 251–252.
- [17] Shi FC, Yin ZW, Jiang HM, Fan BQ. Screening, identification of P-dissolving fungus P83 strain and its effects on phosphate solubilization and plant growth promotion. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(11): 1333–1343. (in Chinese)
- 史法超, 殷中伟, 江红梅, 范丙全. 一株溶磷真菌筛选鉴定及其溶磷促生效果. *微生物学报*, 2014, 54(11): 1333–1343.
- [18] Wang MY. Determination of indole acetic acid content in the fermentation broth using HPLC. *Tropical Agricultural Engineering*, 2009, 33(5): 1–3. (in Chinese)
- 王明月. 高效液相色谱法测定发酵液中的吲哚乙酸含量. *热带农业工程*, 2009, 33(5): 1–3.
- [19] Milagres AM, Machuca A, Napoleão D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *Journal of Microbiological Methods*, 1999, 37: 1–6.
- [20] Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2004, 2(2): 43–56.
- [21] Lang BY, Li J, Xie J, Ren MR, Liu XZ, Chen YH. Screening of *Trichoderma* activity inhibiting five kinds of pathogens. *Biological Disaster Science*, 2013(2): 142–147. (in Chinese)
- 郎八一, 李靖, 谢津, 任梅蓉, 刘小烛, 陈玉慧. 木霉对 5 种病原菌抑菌活性筛选. *生物灾害科学*, 2013(2): 142–147.
- [22] Zhao J, Zhao L. Identification of an antagonistic *Trichoderma* spp. strain with plant growth—promoting activity. *Shandong Agricultural Sciences*, 2013, 45(4): 86–89. (in Chinese)
- 赵娇, 赵蕾. 一株促生拮抗木霉的鉴定. *山东农业科学*, 2013, 45(4): 86–89.
- [23] 滕安娜. 木霉菌对植物的促生效果及其机理的研究. 山东师范大学硕士学位论文. 2010.
- [24] 邹勇. 木霉厚垣孢子的产生、萌发和保存条件研究. 四川农业大学硕士学位论文. 2006.
- [25] Zhuang JH, Gao ZG, Liu X, Chen J, Yang Y, Huang YQ. Effect of fermentation factors on spore types of *Trichoderma*. *Chinese Journal of Biological Control*, 2005, 21(1): 37–40. (in Chinese)
- 庄敬华, 高增贵, 刘限, 陈捷, 杨宇, 黄艳青. 不同发酵条件对木霉产孢类型的影响. *中国生物防治学报*, 2005, 21(1): 37–40.

Application potential of three marine *Trichoderma* spp.

Chuang Li^{1,2}, Daojing Zhang², Yuanchan Luo², Jiuming Zhang^{1*}, Li Tian^{1,2*}

¹ Biology Department, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, Shandong Province, China

² College of Bioengineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Abstract: [Objective] To explore the application potential of three marine *Trichoderma* spp. as biocontrol agents and bio-fertilizer. [Methods] Three *Trichoderma* spp. with high antimicrobial activity and spore germination were selected by isolating, screening and mutagenesis. Several indicators related with application potential of these strains were tested. Sporulation capacity was measured after optimizing culture medium, temperature and initial pH. Antimicrobial activity was evaluated based on inhibition spectrum, superparasitism and related antifungal genes. Special culture method was used to determine the secretion of cellulase, phytase and siderophore, and the ability to release phosphorus and potassium. High performance liquid chromatography was used to quantify indole-3-acetic acid production. [Results] We obtained three *Trichoderma* spp. with the spore germinations of 3.45×10^8 , 3.10×10^8 and 2.55×10^8 CFU/cm², respectively. Moreover, these mutants formed chlamydospores, and strain XG20-1 had the highest chlamydospore germination of 3.56×10^8 CFU/mL. All three strains showed a broad inhibition spectrum against 6 fungal phytopathogen and the superparasitism to *Alternaria solani*. Moreover, *Tex1*, *Nag1* and *Egl* genes were found in all strains, with cellulose, phytase and siderophore detected. Indole-3-acetic acid productions in three strains were 2.61, 1.57 and 1.92 mg/L, respectively, and all three strains had the capacity of releasing phosphorus and potassium. [Conclusion] Three *Trichoderma* spp. had high antimicrobial activities against plant pathogenic fungi through integrated mechanism, high spore-bearing yields and growth-promoting effects on plants, which showed their potential application as biocontrol agents and bio-fertilizer.

Keywords: marine *Trichoderma* spp., pathogen inhibition and related gene, a variety of enzyme activity, P-releasing and K-releasing

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31501693), by the Open Fund of State Oceanic Administration Key Laboratory (MBSMAT-2014-03) and by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA10A202-2)

*Corresponding author. Tel: +86-21-64252104; E-mail: Jiuming Zhang, zjm1042005@163.com; Li Tian, tianli@fio.org.cn

Received: 28 September 2016; Revised: 7 December 2016; Published online: 30 December 2016