

棘孢木霉挥发性次级代谢产物检测及抑菌活性分析

陶玲芸¹, 张怡雯¹, 李雅乾^{1,2}, 罗来鹏¹, 张曾鲁¹, 陈捷^{1,2}

1 上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240

2 上海交通大学 农业部都市农业 (南方) 重点实验室, 上海 200240

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. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1181–1189.

Tao LY, Zhang YW, Li YQ, et al. Antagonistic activity of volatile metabolites from *Trichoderma asperellum*. Chin J Biotech, 2020, 36(6): 1181–1189.

摘要: 木霉是一类具有重要生防价值的丝状真菌。文中首先对分离自浙江省绍兴市和广东省佛山市共 12 株棘孢木霉 *Trichoderma asperellum* 进行平板拮抗评价, 然后采用顶空固相微萃取气质联用法 (HS-SPME-GC-MS) 检测拮抗性较好的两株菌的挥发性次级代谢产物。结果表明, 棘孢木霉 ZJSX5003 和 GDFS1009 菌丝生长迅速, 对尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 抑制率分别达 73% 和 74%。挥发性次级代谢产物主要是醇类和酮类, 其中包含异丁醇、异戊醇、3-甲基-3-丁烯-1-醇、3-羟基-2-丁酮、2,3-丁二醇和 6-正戊基-2H-吡喃-2-酮 (6-PAP)。进一步通过体外抑菌试验, 证实 6-PAP 具有较好的抑制尖孢镰孢菌的效果, 为开发以木霉菌代谢产物如 6-PAP 为主要成分的生防制剂提供指导。

关键词: 棘孢木霉, 挥发性代谢产物, 尖孢镰孢菌, 拮抗性, 顶空固相微萃取, 气质联用

Antagonistic activity of volatile metabolites from *Trichoderma asperellum*

Lingyun Tao¹, Yiwen Zhang¹, Yaqian Li^{1,2}, Laipeng Luo¹, Zenglu Zhang¹, and Jie Chen^{1,2}

1 School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 Key Laboratory of Urban Agriculture (South), Ministry of Agriculture, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

Abstract: *Trichoderma* spp. is a kind of filamentous fungi with important biocontrol value. Twelve strains of *Trichoderma* spp. were isolated from the soils of different types of crops in Shaoxing, Zhejiang and Foshan, Guangdong. The antagonistic resistance to *Fusarium oxysporum* was compared by plate confrontation test. The further analysis of volatile secondary metabolites for two strains were carried out using HS-SPME-GC-MS analysis. The results showed that *T. asperellum* ZJSX5003 and GDFS1009 had fast growth ability, and the inhibition effects on *F. oxysporum* were 73% and 74% respectively. Six identical volatile metabolites were detected as follows 2-Methyl-1-propanol, 3-Methyl-1-butanol, 3-Methyl-3-buten-1-ol,

Received: September 28, 2019; **Accepted:** March 20, 2020

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0200901), National Natural Science Foundation of China (No. 31772211), The 19th Innovation Practice Project of Shanghai Jiaotong University (No. IPP19110).

Corresponding author: Yaqian Li. Tel: +86-21-34206620; E-mail: yaqianli2008@163.com

国家重点研发计划 (No. 2017YFD0200901), 国家自然科学基金 (No. 31772211), 上海交通大学第十九期创新实践计划 (No. IPP19110) 资助。

网络出版时间: 2020-04-17

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20200416.1347.005.html>

Acetyl methyl carbinol, Butane-2,3-diol and 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP). Among them, 6-PAP was validated to have a higher inhibitory effect on *F. oxysporum* *in vitro*. This study will provide basis for the development of biocontrol agents with metabolites of *Trichoderma*, such as 6-PAP.

Keywords: *Trichoderma asperellum*, volatile secondary metabolites, *Fusarium oxysporum*, antagonistic, headspace solid phase microextraction (HS-SPME), gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS)

木霉 (*Trichoderma* spp.) 是一类具有重要的生防价值的丝状真菌, 其抗逆性强, 至少对 18 个属 20 余种病原真菌和多种病原细菌有拮抗作用, 已有数种木霉 (深绿木霉 *Trichoderma atroviride*、哈茨木霉 *Trichoderma harzianum*、绿色木霉 *Trichoderma viride* 等) 商业化用于防控根腐病、枯萎病、菌核病和纹枯病等植物病害, 均取得了显著的防效^[1-2]。

研究表明, 木霉菌在重寄生过程中, 分泌多种细胞壁降解酶如几丁质酶、葡聚糖酶、纤维素酶和蛋白酶等, 并产生丰富多样具有抗菌活性的次级代谢产物, 如聚酮类和抗菌肽类物质, 通过酶与抗菌物质协同增效防治植物病害^[3-4]。基因组测序证实了木霉包含近 40 个次级代谢产物生物合成基因簇, 其中聚酮合酶 (PKS) 和非核糖体肽合成酶 (NRPS) 分别负责合成聚酮类化合物如吡喃酮以及非核糖体肽类物质如 Trichorzianines A 和 B、Atroviridin_A、Trichotoxin_A-40 等^[5-6]。这些挥发性和非挥发性代谢产物在病害防治中发挥重要作用。

6-正戊基-2H-吡喃-2-酮 (6-PAP) 是一种木霉产生的吡喃酮类挥发性代谢产物, 散发椰子香味, 具有广谱抗菌活性, 对尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 等多种植物病害表现出很强的拮抗活性^[7-9]。6-PAP 最早从绿色木霉中分离出来, 随后在多种木霉中被检测到^[10]。研究表明 6-PAP 来源于脂肪酸亚油酸的氧化, 尽管哈茨木霉中 6-PAP 主要合成步骤已经被阐明, 但其生物合成途径中关键酶仍待鉴定。6-PAP 除了能抑制真菌的生长, 还可以降低串珠镰孢菌中镰孢菌酸和禾谷镰孢菌中脱氧雪腐镰孢菌烯醇的产量

^[11-12]。此外, Vinale 等研究表明 6-PAP 对豌豆、番茄和油菜具有类似生长素的作用, 即在低浓度下促进植物生长而在较高浓度时会抑制植物生长^[13]。因此, 6-PAP 具有低毒性、环境相容性等特点, 成为开发新型生防杀菌剂的优选产品。

棘孢木霉的生长速度快和代谢产物多样性的优势引起研究者更多关注^[14-15]。本研究基于实验室前期分离鉴定获得的 12 株棘孢木霉, 通过比较不同棘孢木霉拮抗尖孢镰孢菌的特性, 确定 2 株木霉菌 ZJSX5003 和 GDFS1009 具有较好的拮抗性, 进一步利用顶空固相微萃取 (Headspace solid phase micro-extraction, HS-SPME) 和气质联用法 (GC-MS) 测定了其挥发性代谢产物, 从代谢角度阐明该棘孢木霉的优良拮抗特性, 为棘孢木霉菌剂在生防领域的研发提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株

木霉: 实验前期从浙江省绍兴市的不同农作物 (萝卜、四季豆、丝瓜、青菜、番薯) 黑垆土土壤中分离出了 6 株木霉, 通过形态和分子鉴定 (ITS 和 *tef1- α*) 确定 6 株棘孢木霉 *T. asperellum*, 分别为 ZJSX1003、ZJSX4002、ZJSX5001、ZJSX5002、ZJSX5003、ZJSX5008。从广东省佛山 (生菜、鸡毛菜、罗汉果、白菜、丝瓜) 等灌淤土壤中分离到的菌株, 通过形态和分子鉴定 (ITS 和 *tef1- α*) 确定 6 株棘孢木霉, 分别为 GDFS1009、GDFS1010、GDFS2001、GDFS2011、GDFS2012、GDFS5201。12 株棘孢木霉均保存在上海交通大学木霉保藏中心 (<http://www.china->

cctc.org/ClassificationKnow.aspx)。

病原菌: 尖孢镰孢菌 (*F. oxysporum*), 由上海交通大学植物病理学实验室提供。

1.1.2 培养基

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)。
配方: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 15–20 g, 蒸馏水 1 000 mL。自然 pH。液体培养基 (PD): 成分同 PDA, 去除琼脂。培养基 121 °C, 15 min 灭菌后备用。

菌株的活化及形态观察: 将尖孢镰孢菌和棘孢木霉分别接种在 PDA 新鲜培养基 28 °C 培养, 定期拍照记录菌落形态。

1.2 木霉拮抗尖孢镰孢菌平板对峙实验

活化后的 12 株棘孢木霉分别和尖孢镰孢菌在新鲜 PDA 培养基上对峙培养。对照组: 以单独培养的病原菌作为阴性对照, 单独培养的本霉菌做阳性对照, 28 °C 的恒温培养箱中进行无光培养, 培养期间观察、拍照并测量和记录尖孢镰孢菌落的半径, 计算抑制率。

抑制率的计算公式: $\text{抑制率} = (C - T) / C \times 100\%$ 。其中, C 为对照组尖孢镰孢菌的半径, T 为实验组尖孢镰孢菌的半径。

1.3 棘孢木霉抗生性次级代谢产物提取和鉴定

木霉菌分生孢子中抗生物质的提取: 木霉菌纯化后, 接种在 PDA 平板培养基, 28 °C 培养 6 d, 待分生孢子长满后, 用干净已灭菌的药匙小心地刮下平板表面的孢子, 常温下干燥孢子至恒重, 待用。代谢产物提取方法参考文献[16]。

GS-MS 分析: 采用 GS-MS 对提取物成分展开分析, 仪器型号为美国 Perkin Elmer 公司 AutoSystem XL GC/TurboMass MS, 色谱柱为 DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 参数设置为: 柱温 50 °C, 保持 4 min, 以 5 °C/min 升至 300 °C, 保持 10 min; 进样温度为 280 °C; 离子源为 EI, 电子能量为 70 eV; 离子源温度为 200 °C; 接口温度为 260 °C; 质量扫描范围为 33–500 amu; 光

电倍增管电压 450 V; 汽化室温度为 300 °C; 载气为氦气 (99.999%); 分流比为无分流; 进样量为 1 μL。

1.4 顶空固相微萃取-气质联用测定挥发性代谢产物

将菌株 ZJSX5003 和 GDFS1009 接种在 PD 液体培养基上, 在 28 °C、170 r/min 摇床上培养 7 d, 取发酵液, 首先将固相微萃取 (SPME) 针头插入气相色谱仪的进样口, 推出萃取头, 在氦气流中 260 °C 老化 20 min, 然后将萃取头缩回保护针管, 立即将 SPME 针头插入顶空瓶中, 推出萃取头, 萃取挥发性物质 30 min, 再将 SPME 针头插入气相色谱仪的进样口, 推出萃取头, 解吸附 30 s, 随后取出 SPME 进样手柄和萃取头^[17]。

固相微萃取 (SPME) 实验条件, 用 DB-wax 型毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm) 分离挥发性物质, 载气为氮气, 流速为 1 mL/min, 不分流模式。升温程序: 40 °C 保持 5 min, 以 5 °C/min 升至 220 °C, 以 20 °C/min 升至 250 °C, 保持 2.5 min; 接口温度 260 °C; 离子源温度 230 °C; 四级杆温度 150 °C; 电离方式: EI+, 70 eV; 扫描方式: 全扫描; 质谱范围: 20–400 amu; NIST 2014 谱库。

GC-MS 结果分析: 采用气相色谱-质谱联用仪进行定性分析, 利用 NIST2014 谱库并结合计算机检索技术, 对化学成分进行分离鉴定, 应用气相色谱峰面积归一化法测定各成分的相对含量。

1.5 6-PAP 平板抑菌试验

分别将 6-PAP 配成 3 个不同浓度 (20、50 和 100 mg/L) 的溶液, 用乙酸乙酯作为溶剂, 比较 3 个浓度下, 6-PAP 在 PDA 平板对尖孢镰孢菌生长的抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 棘孢木霉形态差异比较

12 株棘孢木霉分别接种 PDA 平板, 28 °C 培

养 7 d, 观察菌株表型差异。由图 1A 看出 6 株棘孢木霉生长各异, ZJSX5001、ZJSX5002 和 ZJSX5003 生长相对较快, 菌丝致密, 产生黄色或绿色色素, 而 ZJSX4002 长得最慢。其中 ZJSX5001 形成的孢子数量显著多, 并产生绿色色素, 而 ZJSX5008 的菌丝发达, 但孢子数量少, 产生的绿色或者黄色色素极少。图 1B 中的 6 株棘孢木霉菌落生长迅速, 其中 GDFS2012、GDFS1009 生长较快, 孢子数量较多, 有绿色色素产生, GDFS1009、GDFS2001、GDFS2011、GDFS2012 的菌丝成羊绒状的气生菌丝, GDFS1010、GDFS5201 的菌丝成毡状的气生菌丝, 产孢量较低。

2.2 棘孢木霉对尖孢镰孢菌的抑菌效果

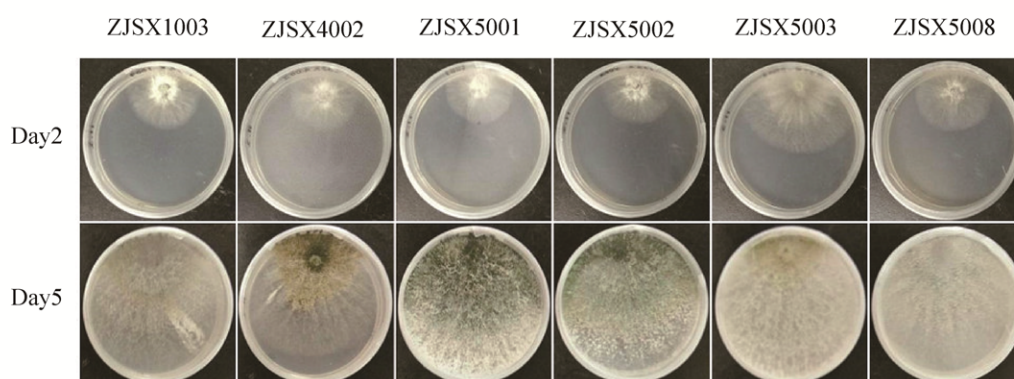
按照经典的平板对峙培养方法, 12 株棘孢木

霉分别与尖孢镰孢菌在 PDA 平板对峙培养, 图 2A 结果表明, 与生长速度接近的 ZJSX5001、ZJSX5002 菌株相比, ZJSX5003 具有更好的抑制病原菌生长能力, 抑菌效果最差的是 ZJSX5008, 该菌株属于产丝型棘孢木霉。图 2B 的平板对峙中显示菌株 GDFS2012 和 GDFS1009 生长速度快, 产孢量多, 具有较好的拮抗效果。进一步测定抑菌率, 如图 3 所示, ZJSX5003 的抑菌率达到 72.58%, GDFS1009 抑菌率高达 74.19%。

2.3 棘孢木霉的挥发性代谢产物组成

采用 GC-MS 分析棘孢木霉 ZJSX5003 和 GDFS1009 中的挥发性代谢产物种类, 结果如表 1 所示。菌株 ZJSX5003 孢子提取物内共检测到 70 多种化学成分: 其中烷烃类 (Alkanes) 数量最多为 31 种, 其他成分为萜烯类 (Terpenes)、羧酸

A. Strains isolated from Shaoxing, Zhejiang



B. Strains isolated from Foshan, Guangdong Province

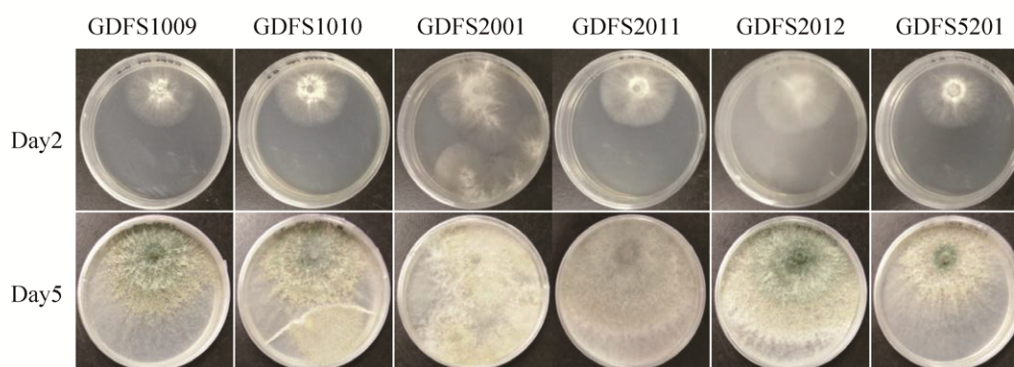


图 1 棘孢木霉在 PDA 平板上菌落表型差异比较

Fig. 1 Comparison of colony phenotypes of different *T. asperellum* on PDA plates. Strains isolated from Shaoxing, Zhejiang Province (A) and Foshan, Guangdong Province (B) inoculated on PDA at 2 d and 5 d culture were shown.

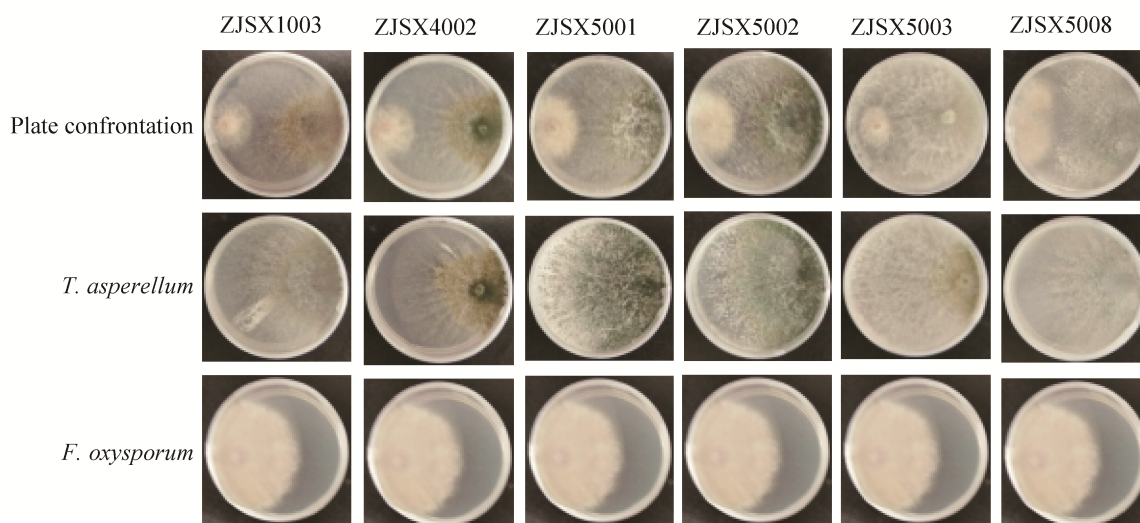
及其衍生物类 (Carboxylic acids and derivatives)、聚酮类 (Polyketides)、含氮及杂环化合物 (Nitrogen heterocyclic compounds) 等, 其中萜烯类的总相对含量较高, 为 22.18%, 其次是烷烃类化合物 (21.18%)、羧酸及其衍生物 (18.42%)、聚酮类 (3.84%), 与之相比, GDFS1009 菌株中含羧酸及其衍生物含量 45.09%, 含氮及杂环化合物含量 14.4%, 明显高于菌株 ZJSX5003, 但是烷烃类

(15.30%) 和聚酮类 (1.15%) 明显低于 ZJSX5003 菌株, 且没有检测到萜烯类物质。因此不同地域来源木霉, 尽管都属于棘孢木霉, 其代谢产物的种类和数量存在明显差异。

2.4 顶空固相微萃取气质联用法测定代谢产物

利用顶空固相微萃取-气质联用法分别检测其挥发性代谢产物 (表 2), 通过对 GC-MS 谱图的 NIST14 谱库搜索和人工解析结果发现, ZJSX5003

(A) Strains isolated from Shaoxing, Zhejiang Province



(B) Strains isolated from Foshan, Guangdong Province

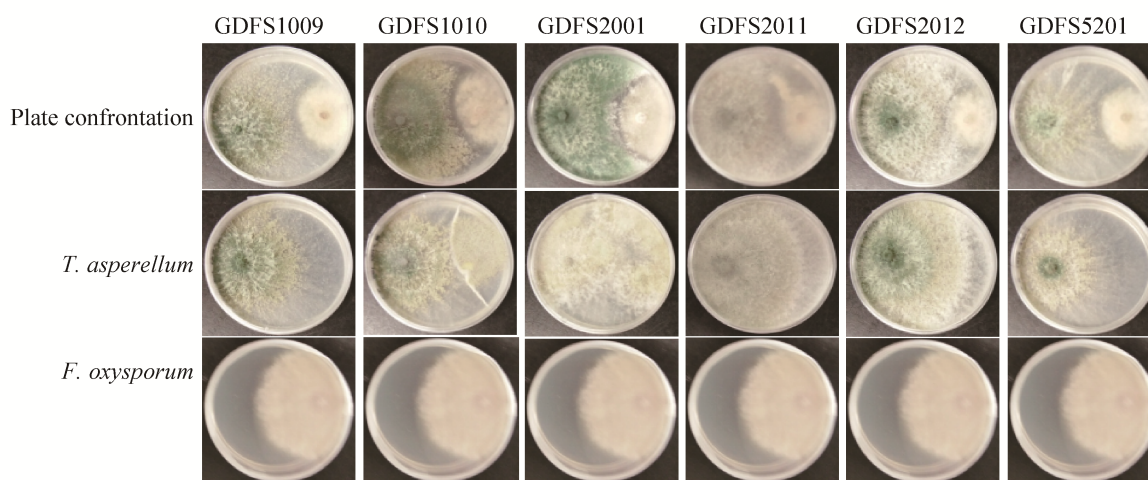


图 2 棘孢木霉与尖孢镰孢菌的平板对峙

Fig. 2 Plate confrontation test of different *T. asperellum* and *F. oxysporum*. Strains isolated from Shaoxing, Zhejiang Province (A) and Foshan, Guangdong Province (B) antagonism against *F. oxysporum*. Both *T. asperellum* and *F. oxysporum* are as positive and negative control.

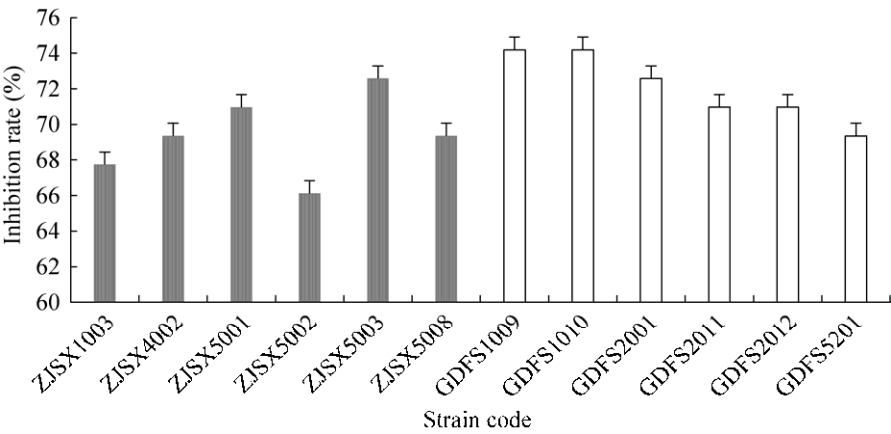


图 3 不同棘孢木霉对尖孢镰孢菌抑制率
Fig. 3 Inhibition rate of different *T. asperellum* to *F. oxysporum*.

表 1 棘孢木霉 ZJSX5003 和 GDFS1009 在 PDA 平板培养 6 d 孢子中次级代谢物含量
Table 1 Antibiotic secondary metabolites in *Trichoderma asperellum* ZJSX5003 and GDFS1009

Strain code	The percentage content of antibiosis secondary metabolites (%)						
	Polyketides	Terpenes	Carboxylic acids and derivatives	Nitrogen heterocyclic compounds	Alkanes	Alcohols	Aldehydes
ZJSX5003	3.84	22.18	18.42	2.97	21.18	0.05	0.18
GDFS1009	1.15	0.00	45.09	14.40	15.30	0.21	0.23

表 2 ZJSX5003 和 GDFS1009 的挥发性次级代谢产物成分分析
Table 2 Analysis of volatile secondary metabolite compositions of ZJSX5003 and GDFS1009

No.	Name	t _R /min	Molecular formula	Molecular weight	Relative content (%)	
					ZJSX5003	GDFS1009
1	Furan,3-methyl-	3.099	C ₅ H ₆ O	82	—	0.74
2	Furan,2,5-dimethyl-	4.448	C ₆ H ₈ O	96	—	0.31
3	Trichloromethane	6.226	CHCl ₃	118	0.28	—
4	2-Butenal	6.712	C ₄ H ₆ O	70	0.64	—
5	1-Propanol,2-methyl-	8.987	C ₄ H ₁₀ O	74	7.25	1.84
6	1-Butanol,3-methyl-	12.562	C ₅ H ₁₂ O	88	14.61	6.87
7	5-Hepten-2-one	13.387	C ₇ H ₁₂ O	112	0.33	—
8	3-Buten-1-ol,3-methyl-	13.695	C ₅ H ₁₀ O	86	0.40	0.54
9	Acetoin	14.640	C ₄ H ₈ O ₂	88	0.62	0.20
10	3-Ethylcyclopentanone	15.791	C ₇ H ₁₂ O	112	—	0.60
11	trans,trans-3,5-Heptadien-2-one	19.863	C ₇ H ₁₀ O	110	1.01	—
12	2,4-Hexadienoic acid, ethyl ester	20.668	C ₈ H ₁₂ O ₂	140	0.13	—
13	2,3-Butanediol	22.526	C ₄ H ₁₀ O ₂	90	2.09	2.63
14	2-Cyclopenten-1-one,3-ethyl-	23.643	C ₇ H ₁₀ O	110	—	0.27
15	3-Buten-2-ol, 4-phenyl-, (E)-	24.579	C ₁₀ H ₁₂ O	148	0.37	—
16	Cyclohexene, 3-(1,5-dimethyl-4-hexenyl)-6-methylene-, [S-(R*,S*)]-	26.933	C ₁₅ H ₂₄	204	0.09	—
17	Phenylethyl Alcohol	29.925	C ₈ H ₁₀ O	122	0.19	—
18	Spiro[4.5]dec-8-en-7-ol,4,8-dimethyl-1-(1-methyl-ethyl)-	37.226	C ₁₅ H ₂₆ O	222	0.28	—
19	2H-Pyran-2-one,6-pentyl-	35.109	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	0.37	1.00

和 GDFS1009 有 6 种相同的挥发性代谢物, 分别是异丁醇、异戊醇、3-甲基-3-丁烯-1-醇、3-羟基-2-丁酮、2,3-丁二醇和 6-正戊基-2H-吡喃-2-酮 (6-PAP)。其中, 异丁醇、异戊醇、3-羟基-2-丁酮在 ZJSX5003 中的相对含量较高, 异戊醇的含量高达 14.61%。3-甲基-3-丁烯-1-醇、2,3-丁二醇和 6-正戊基-2H-吡喃-2-酮 (6-PAP) 在 GDFS1009 中相对含量较高。异丁醇、异戊醇、2,3-丁二醇这 3 种醇类物质在两株菌中的含量都比较高。ZJSX5003 特有的挥发性代谢产物有 9 种, 分别是三氯甲烷、2-丁烯醛、5-庚烯-2-酮、(3E,5E)-3,5-庚二烯-2-酮、2,4-己二烯酸乙酯、5-甲基-2-异丙

烯基-苯酚、 β -倍半水芹烯、苯乙醇、4,8-二甲基-1-(1-甲基乙基)-螺[4.5]癸-8-烯-7-醇。GDFS1009 特有的挥发性代谢产物有 4 种, 分别是 3-甲基呋喃、2,5-二甲基呋喃、3-乙基环戊酮、3-乙基-2-环戊烯-1-酮。因此, 两株菌中共同检测到的挥发性代谢产物主要是醇类和酮类。

2.5 6-PAP 抑菌试验

为了验证吡喃酮 6-PAP 对尖孢镰孢菌的抑菌效果, 配置 3 种不同浓度 (20、50、100 mg/L) 的 6-PAP 平板, 28 °C 培养 5 d 和 7 d 观察抑菌效果 (图 4), 结果表明, 100 mg/L 几乎能全部抑制尖孢镰孢菌的生长。而 20 mg/L 抑制该菌的生长

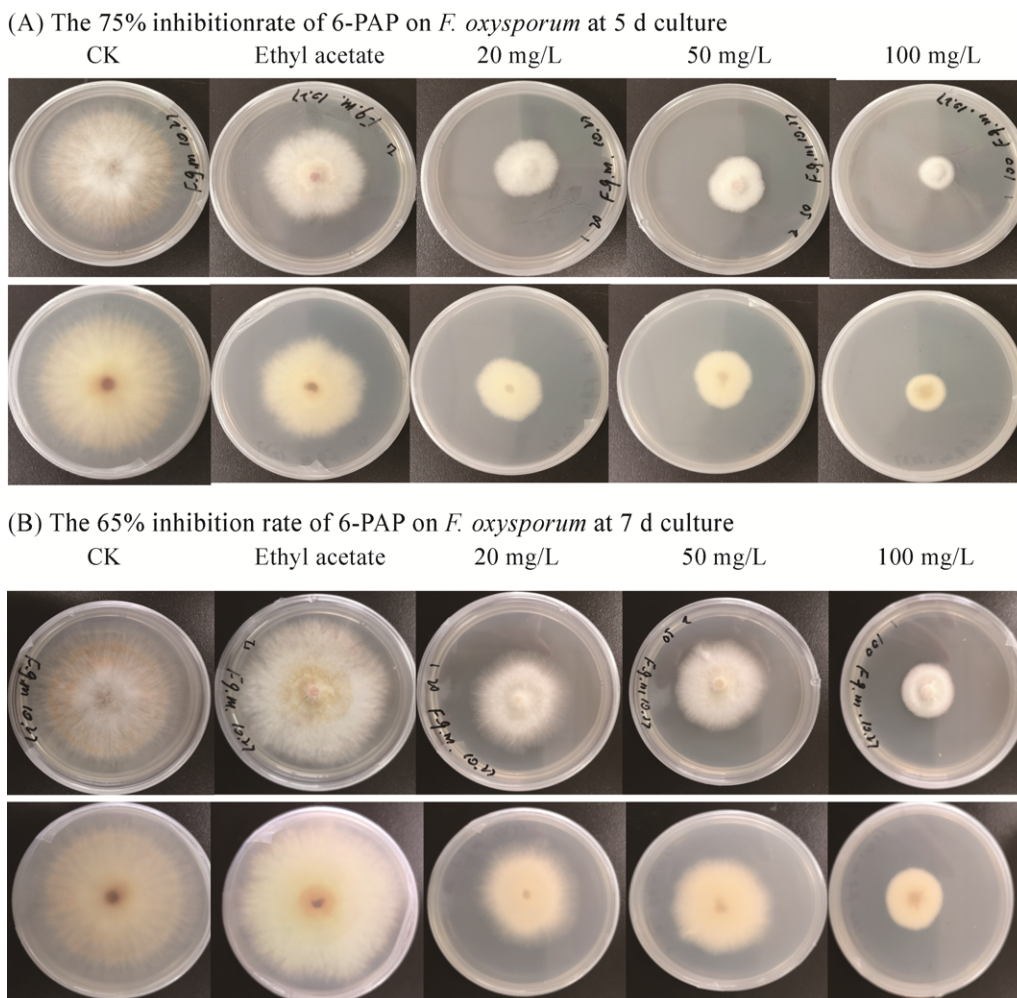


图 4 三个不同浓度 (20、50 和 100 mg/L) 6-PAP 对尖孢镰孢菌的抑制

Fig. 4 The inhibition effects of 6-PAP with different concentration (20、50 and 100 mg/L) on *F. oxysporum* at 5 d culture (A) and at 7 d culture (B) *in vitro*.

达到 75%,说明 6-PAP 对尖孢镰孢菌具有较强的抑制效果,同时我们检测了 6-PAP 对番茄灰霉病和水稻纹枯病菌,20 mg/L 抑制 70%以上,而 100 mg/L 几乎全部抑制其生长。

3 讨论

本研究比较了 12 株棘孢木霉对尖孢镰孢菌的抑制作用,结果表明,广东省佛山市分离的棘孢木霉总体拮抗活性优于浙江省绍兴市分离的棘孢木霉,其中菌株 ZJSX5003 和 GDFS1009 均具有较好的拮抗活性,抑菌率分别达 73%和 74%。表型和代谢产物分析结果表明,ZJSX5003 和 GDFS1009 二者生长速度较快、菌丝丰富致密、产孢量大,其代谢产物种类丰富,其中 ZJSX5003 分泌更多的是萜烯类、聚酮类、醇类等抑菌活性物质,而 GDFS1009 分泌的代谢产物主要是羧酸及其衍生物、含氮杂环类化合物和烷烃类化合物。

本研究利用顶空固相微萃取气质联用法在棘孢木霉 GDFS1009 和 ZJSX5003 中检测挥发性代谢产物包括 6-PAP,进而通过体外抑菌试验证明 6-PAP 在抑制尖孢镰孢菌的抑制中发挥重要作用。Stoppacher 等利用顶空固相微萃取气质联用法,鉴定深绿木霉含有的挥发性代谢产物主要分为醇类、酮类、烷烃类、呋喃类以及具有生物活性的 6-戊基- α -吡喃^[18]。Henryk 等研究表明几乎所有的深绿木霉都能检测到分泌 6-PAP,不同木霉产 6-PAP 具有菌株水平的差异性,而非种水平的差异。6-PAP 的浓度 2 $\mu\text{g}/\text{plug}$ 基本完全抑制培养 5 d 的镰孢菌的生长。40 $\mu\text{g}/\text{plug}$ 的 6-PAP 能够完全抑制镰孢菌从培养第 5–18 天的生长^[19]。Cooney 等研究证实木霉产生的 6-PAP 能够抑制镰孢菌菌丝生长和单端孢真菌毒素 (DON) 的形成^[12]。El-Hasan 等证实 6-戊基- α -吡喃酮抑制镰孢菌的镰孢菌酸合成^[21]。6-PAP 不仅具有抑菌活性,还能促进小麦种子萌发,增加番茄根系的长度^[22]。

本研究表明棘孢木霉挥发性次级代谢产物具有明显拮抗作用,其中 6-PAP 拮抗尖孢镰孢菌效果显著,未来可以作为新型生防菌剂的潜在候选者,通过遗传和生物工程手段提高棘孢木霉 6-PAP 的含量,发展以 6-PAP 代谢产物为主要成分的木霉生防菌剂,应用于植物病害防治的生产实践中。

REFERENCES

- [1] Lorito M, Peterbauer C, Hayes CK, et al. Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology*, 1994, 140(3): 623–629.
- [2] Harman GE, Howell CR, Viterbo A, et al. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(1): 43–56.
- [3] Harman GE. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 2006, 96(2): 190–194.
- [4] Zeilinger S, Gruber S, Bansal R, et al. Secondary metabolism in *Trichoderma*—Chemistry meets genomics. *Fungal Biol Rev*, 2016, 30(2): 74–90.
- [5] Mukherjee PK, Horwitz BA, Kenerley CM. Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. *Microbiology*, 2012, 158(1): 35–45.
- [6] Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biol*, 2011, 12(4): R40.
- [7] Pezet R, Pont V, Tabacchi R. Simple analysis of 6-pentyl- α -pyrone, a major antifungal metabolite of *Trichoderma* spp., useful for testing the antagonistic activity of these fungi. *Phytochem Anal*, 1999, 10(5): 285–288.
- [8] Sivan A, Chet I. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology*, 1989, 79(2): 198–203.
- [9] Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, et al.

- Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytol*, 2009, 184(3): 529–544.
- [10] Collins RP, Halim AF. Characterization of the major aroma constituent of the fungus *Trichoderma viride*. *J Agric Food Chem*, 1972, 20(2): 437–438.
- [11] Chen LH, Cui YQ, Yang XM, et al. An antifungal compound from *Trichoderma harzianum* SQR-T037 effectively controls *Fusarium* wilt of cucumber in continuously cropped soil. *Australas Plant Pathol*, 2012, 41(3): 239–245.
- [12] Buśko M, Chelkowski J, Popiel D, et al. Solid substrate bioassay to evaluate impact of *Trichoderma* on trichothecene mycotoxin production by *Fusarium* species. *J Sci Food Agric*, 2008, 87: 536–541.
- [13] Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2008, 72(1/3): 80–86.
- [14] Wonglom P, Ito SI, Sunpapao A. Volatile organic compounds emitted from endophytic fungus *Trichoderma asperellum* T1 mediate antifungal activity, defense response and promote plant growth in lettuce (*Lactuca sativa*). *Fungal Ecol*, 2020, 43: 100867.
- [15] Zapata-Sarmiento DH, Palacios-Pala EF, Rodríguez-Hernández AA, et al. *Trichoderma asperellum*, a potential biological control agent of *Stemphylium vesicarium*, on onion (*Allium cepa* L.). *Biologi Control*, 2020, 140: 104105.
- [16] Chen K, Yang HT, Li JS, et al. Analysis of chemical components and antifungal activity of extraction from conidia of *Trichoderma viride* LTR-2. *Microbiol China*, 2007, 34(3): 455–458 (in Chinese).
陈凯, 杨合同, 李纪顺, 等. 绿色木霉菌 LTR-2 孢子提取物的抑菌活性及化学成分分析. *微生物学通报*, 2007, 34(3): 455–458.
- [17] Jeleń HH. Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 36(5): 263–267.
- [18] Stoppacher N, Kluger B, Zeilinger S, et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *J Microbiol Methods*, 2010, 81(2): 187–193.
- [19] Jeleń H, Blaszczyk L, Chelkowski J, et al. Formation of 6-npentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species. *Mycol Prog*, 2014, 13(3): 589–600.
- [20] Cooney JM, Laurent DR, Di Menna ME. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusariumgraminearum*. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(1): 522–526.
- [21] El-Hasan A, Walker F, Buchenauer H. *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. *J Phytopathol*, 2008, 156(2): 79–87.
- [22] Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, et al. *Trichoderma* secondary metabolites active on plants and fungal pathogens. *Open Mycol J*, 2014, 8(8): 127–139.

(本文责编 郝丽芳)