

一株防治香蕉枯萎病的短密木霉筛选及代谢物木霉素作用评价

姚遐俊^{1#}, 谢津^{2#}, 祁艳华², 汪斌², 房文霞², 陶刚^{1*}, 蒋细良³

1 贵州民族大学生态环境工程学院, 贵州 贵阳 550025

2 广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室, 广西 南宁 530007

3 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193

姚遐俊, 谢津, 祁艳华, 汪斌, 房文霞, 陶刚, 蒋细良. 一株防治香蕉枯萎病的短密木霉筛选及代谢物木霉素作用评价[J]. 生物工程学报, 2024, 40(1): 211-225.

YAO Xiajun, XIE Jin, QI Yanhua, WANG Bin, FANG Wenxia, TAO Gang, JIANG Xiliang. Screening and evaluation of the biocontrol efficacy of a *Trichoderma brevicompactum* strain and its metabolite trichodermin against banana *Fusarium* wilt[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(1): 211-225.

摘要: 由尖孢镰刀菌古巴专化型热带四号小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race4, *FocTR4*)引起的香蕉枯萎病(banana *Fusarium* wilt, BFW)是全世界范围内难以防治的真菌病害, 给香蕉产业造成巨大的经济损失。本研究旨在筛选高效拮抗 *FocTR4* 的木霉生防菌株, 并对其发酵代谢产物进行分离、提纯和鉴定, 为香蕉枯萎病的高效生物防治提供重要生防菌株和活性化合物资源。从作物根际土壤中分离出木霉菌株, 通过平板对峙培养、发酵液对病原菌孢子萌发及菌丝生长抑制, 测试筛选出高效抑制 *FocTR4* 的生防木霉菌株; 通过构建系统发育树明确生防菌株的分类地位; 通过柱色谱法分离纯化菌株发酵液中活性成分, 通过核磁共振波谱法(nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR)解析活性成分的结构; 通过香蕉苗感病盆栽实验检测生防木霉菌株对香蕉枯萎病的防治效果。结果表明, 本研究筛选到了1株拮抗 *FocTR4* 的菌株 JSHA-CD-1003, 平板对峙抑制率为 60.6%; 发酵液在 24 h 内能完全抑制 *FocTR4* 孢子萌发, 7 d 内对 *FocTR4* 菌丝生长的抑制率为 52.6%; 基于内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)和 *tef1-a* 基因串联序列构建系统发育树, 该菌株鉴定为短密木霉(*Trichoderma brevicompactum*), 通过柱色谱法分离提纯和 NMR 鉴定单一活性化合物为木霉素(trichodermin), 最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 盆栽生防实验表明, 菌株 JSHA-CD-1003 发酵液对香蕉枯萎病的叶片黄化防治率为

资助项目: 国家重点研发计划(2019YFD1002003); 广西壮族自治区重点研发计划(AB21220030); 广西科学院基本科研业务费(2021YBJ704); 国家自然科学基金(31860520)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2019YFD1002003), the Guangxi Zhuang Autonomous Region Key Research and Development Program (AB21220030), the Fundamental Research Funding of Guangxi Academy of Sciences (2021YBJ704), and the National Natural Science Foundation of China (31860520).

[#]These authors contributed equally to this study.

*Corresponding author. E-mail: ttg729@sina.com

Received: 2023-03-06; Accepted: 2023-05-22; Published online: 2023-05-30

47.4%，球茎褐化防治率为 52.0%。因此，JSHA-CD-1003 通过产生木霉素有效抑制 *FocTR4* 孢子萌发和菌丝生长，对 *FocTR4* 引起的香蕉枯萎病具有良好的生物防治效果，是一株具有生防潜力的菌株。

关键词：香蕉枯萎病；生物防治；短密木霉；柱色谱法；木霉素

Screening and evaluation of the biocontrol efficacy of a *Trichoderma brevicompactum* strain and its metabolite trichodermin against banana *Fusarium* wilt

YAO Xiajun^{1#}, XIE Jin^{2#}, QI Yanhua², WANG Bin², FANG Wenxia², TAO Gang^{1*}, JIANG Xiliang³

1 College of Eco-Environmental Engineering, Guizhou Minzu University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

3 Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract: The banana *Fusarium* wilt (BFW) caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race4 (*FocTR4*) is difficult to control worldwide, which causes a huge economic loss to banana industry. The purpose of this study was to screen *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *FocTR4*, to isolate and purify the active compound from the fermentation broth, so as to provide important biocontrol strains and active compound resources. In this work, *Trichoderma* strains were isolated and screened from the rhizosphere soil of crops, and the strains capable of efficiently inhibiting *FocTR4* were screened by plate confrontation, and further confirmed by testing inhibition for the conidial germination and mycelial growth of *FocTR4*. The phylogenetic tree clarified the taxonomic status of the biocontrol strains. Moreover, the active components in the fermentation broth of the strains were separated and purified by column chromatography, the structure of the most active component was analyzed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), the BFW control effect was tested by pot experiments. We obtained a strain JSHA-CD-1003 with antagonistic activity against *FocTR4*, and the inhibition rate from plate confrontation was 60.6%. The fermentation broth of JSHA-CD-1003 completely inhibited the germination of *FocTR4* conidia within 24 hours. The inhibition rate of *FocTR4* hyphae growth was 52.6% within 7 d. A phylogenetic tree was constructed based on the ITS and *tefl-α* gene tandem sequences, and JSHA-CD-1003 was identified as *Trichoderma brevicompactum*. Purification and NMR identification showed that the single active compound was trichodermin, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was 25 μg/mL. Pot experiments showed that the fermentation broth of strain JSHA-CD-1003 was effective against BFW. The control rate of leaf yellowing was 47.4%, and the rate of bulb browning was 52.0%. Therefore, JSHA-CD-1003 effectively inhibited *FocTR4* conidial germination and mycelium growth through producing trichodermin, and showed biocontrol effect on banana wilt caused by *FocTR4*, thus is a potential biocontrol

strain.

Keywords: banana *Fusarium* wilt; biological control; *Trichoderma brevicompactum*; column chromatography; trichodermin

香蕉是热带、亚热带地区最受欢迎的水果之一,是我国台湾、福建、广东、广西和海南等省区重要的经济作物。香蕉枯萎病(banana *Fusarium* wilt, BFW)作为一种由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)引起的土传真菌病害,具有传播速度快、分布广、存活时间长和难根治等特点^[1],在我国香蕉产区大面积发生,严重威胁着香蕉产业的发展^[2]。根据宿主的特异性,尖孢镰刀菌古巴专化型主要分为4个生理小种(*Foc1*–*Foc4*),特别是古巴专化型热带4号小种(*FocTR4*)几乎可以感染现有的所有香蕉品种^[3]。现行最常见种植品种Cavendish (AAA)型香蕉对*Foc1*号生理小种具有抗性,但面对*FocTR4*侵染发病率居高不下^[4]。

近年来,针对*FocTR4*的防治手段主要有4种:施用化学农药^[5]、作物轮作^[6]、香蕉抗病品种选育^[7-8]和生物防治等。其中,生物防治具有安全及生态可持续等特点,是目前香蕉枯萎病防治的研究热点^[9]。现已报道并用于防治作物病害生防菌主要包括链霉菌(*Streptomyces* spp.)^[10]、芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)^[11]、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)^[12]和木霉菌(*Trichoderma* spp.)^[13]等。这些生防菌在香蕉枯萎病防控中发挥了一定的作用,但在针对*FocTR4*引起的香蕉枯萎病的防治上仍达不到预期。因此,筛选广谱、高效的生防菌菌株是目前香蕉枯萎病生物防治中最基础和最重要的工作^[14]。

木霉在自然界中分布广泛且具有重要的生防应用价值^[15],其很多种类不仅能拮抗多种土传性真菌病原菌,还能促进植物生长^[16]。由于其生防机制复杂多样,包括竞争、重寄生、抗生和诱导植物抗性等,使得木霉在植物病害可持续

防控管理中占有无可替代的地位^[17-18]。木霉的次生代谢产物种类丰富,主要包括聚酮、肽类、萜类和其他类型化合物等,这些次生代谢产物具有抑菌和抗病毒等多种活性,在抗微生物活性方面受到人们关注,有较强的潜在应用价值和资源价值^[19]。Zhao等^[20]从中国海南岛红树林分离的哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) D13分离出聚酮类物质(nafuredin C),对稻瘟病的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)值为8.63 $\mu\text{mol/L}$ 。Shi等^[21]从*T. brevicompactum* A-DL-9-2中分离出2种新的酮烯(cuparene)衍生物和14种单端孢霉(trichothecene)衍生物,其中单端孢霉衍生物木霉素(trichodermin)对5种病原真菌具有较强的抗真菌活性,对黄瓜专化尖孢镰刀菌的MIC值为4 $\mu\text{g/mL}$ 。这些化合物对农业致病病原真菌展现出良好的生物活性,具备广泛应用前景。因此,加强木霉菌次生代谢产物研究,对活性化合物生物农药的开发和应用具有十分重要的意义。

本文旨在筛选具有高效拮抗香蕉枯萎病专化类型古巴专化型热带四号小种(*FocTR4*)的木霉菌株,研究其次生代谢产物中抑制病原菌生长的活性化合物,以期该类专化型香蕉枯萎病生物防治提供重要的生防菌株资源,为生物农药活性化合物筛选提供潜在高效活性化合物。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 根际土壤样品

土壤样品采集自江苏省淮安市金湖县(33.04°N, 118.99°E)蚕豆和香菜作物根际土壤,

密封于自封袋, 于 4 °C 保存备用。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB) (g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 蒸馏水 1 000 mL; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA) (g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂粉 15–20, 蒸馏水 1 000 mL。

木霉选择培养基^[22]使用丙酸钠培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂粉 15–20, 丙酸钠 0.05, 庆大霉素 0.05, 蒸馏水 1 000 mL; 虎红钠盐培养基: 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂粉 15–20, 虎红钠盐 0.02, 氯霉素 0.3, 蒸馏水 1 000 mL。

RPMI1640 培养基(g/L)^[23]: RPMI 1640 粉末(北京诺为生物技术有限公司) 20.8、MOPS 缓冲液 69.08, 葡萄糖 36。实际操作时取 800 mL 蒸馏水, 搅拌至完全溶解, 常温下调节 pH 至 7.0, 定容至 1 000 mL, 并用 0.22 μm 滤膜无菌过滤至 50 mL 离心管内, 4 °C 备用。用于培养病原真菌孢子。

1.1.3 供试菌株和香蕉苗品种

尖孢镰刀菌古巴专化型热带四号小种(*FocTR4*)由广西农业科学院植物保护所惠赠。

核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、山茶刺盘孢菌(*Colletotrichum camelliae*)和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)均由中国农业科学院植物保护研究所李世东实验室提供。

香蕉苗购自南宁组培苗公司, 品种为威廉斯 B6 (*Musa AAA Cavendish subgroup*)。

1.2 方法

1.2.1 木霉菌株的分离和筛选

采用浓度梯度稀释法, 称取 5 g 土样放于装有 45 mL 灭菌水的锥形瓶中, 28 °C、150 r/min 摇床振荡 30 min 制备土壤悬浮液。并采用平板涂布法, 分离纯化单一木霉菌株^[22]。

1.2.2 木霉菌株发酵液制备

采用摇瓶发酵法, 无菌条件挑取 6 个直径为

5 mm 的木霉菌菌饼, 接入 120 mL PDB 培养基中, 28 °C、200 r/min 摇瓶培养 7 d。用 4 层灭菌纱布过滤发酵液, 7 800 r/min 室温离心 10 min, 并用 0.22 μm 滤膜过滤上清液, 即得无菌发酵液放于 4 °C 保存备用。

1.2.3 *FocTR4* 病原菌孢子制备

采用摇瓶发酵法, 无菌条件挑取 6 个直径为 5 mm 菌饼, 接入 120 mL PDB 培养基中, 25 °C、150 r/min 摇瓶培养 3 d, 4 层纱布过滤发酵液, 7 800 r/min 离心 10 min, 去除上清液并用无菌水清洗底部孢子, 血球板计数, 最终得到 10⁹ CFU/mL 病原菌孢子液, 4 °C 保存备用^[24]。

1.2.4 木霉菌抑菌活性测定

采用平板对峙法, 用打孔器分别取直径为 5 mm 的病原菌与待测木霉菌菌饼, 两菌相距 5 cm, 接种于同一 PDA 培养基平板上, 每组 3 个重复, 以单接病原菌为对照。平板置于 28 °C 黑暗培养 7 d, 测量病原菌的菌落半径(朝向木霉菌菌面), 计算木霉菌的抑制率。公式如下: 生长抑制率=[(C-T)/C]×100%。其中 C 和 T 分别代表对照组(control)和处理组(treatment)中被测病原菌的平均生长半径^[25]。

采用抑制菌丝生长速率法, 取无菌过滤木霉发酵液按 V_{木霉发酵液}:V_{PDA}=1:9 充分混匀倒板, 将 *FocTR4* 病原菌菌饼接种于培养皿中央, 28 °C 黑暗培养 7 d, 十字交叉法测量病原菌菌落半径, 计算其抑菌效果。公式如下: 生长抑制率=[(C-T)/C]×100%。其中 C 和 T 分别代表对照组(control)和处理组(treatment)中被测病原菌的平均生长直径^[22]。

采用孢子萌发法, 将无菌木霉发酵液过滤与病原菌孢子液按 V_{木霉发酵液}:V_{*FocTR4*}=1:1 均匀混合加入到 96 微孔板中, 每个小孔 200 μL, 在 28 °C 黑暗条件下, 培养 24 h。对照为添加同体积 PDB 溶液, *FocTR4* 病原菌孢子液最终浓度为

1×10^5 CFU/mL。

基于前期筛选,将木霉菌株 JSHA-CD-1003 (下文简称 1003)作为进一步研究材料。

1.2.5 菌株 1003 系统发育树构建及鉴定

采用 TIANGEN 试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取菌株 1003 基因组 DNA,进行 rDNA 内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列扩增和翻译延伸因子 1- α (translation elongation factor 1- α , *tefl- α*)序列扩增。

ITS 序列扩增通用引物为:ITS₁ (5'-TCCGTA GGTGAACCTGCGG-3')和 ITS₄ (5'-TCCTCCGC TTATTGATATGC-3'),根据 White 等方法的反应体系和扩增程序进行 PCR 反应^[26]。

tefl- α 基因扩增引物为:EF1-728F (5'-CAT CGAGAAGTTCGAGAAGG-3')和 TEF1LLerev (5'-AACTTGCAGGCAATGTGG-3'),根据 Jaklitsch 等方法的反应体系和扩增程序进行 PCR 反应^[27]。

将测序序列与 NCBI 中 GenBank 的基因序列进行比对,选取与克隆序列同源性较高的序列作为参考,用 BioEdit 软件(version 7.0.9)进行序列比对并手动校正,使用 DNAMAN 软件进行正反向序列拼接,处理好的数据通过 MEGA 7.0 软件进行碱基对校正,同时进行 ITS 与 *tefl- α* 序列联合拼接,最后采用邻接法(neighbor-joining method,自展数为 1 000)构建物种系统发育树。

1.2.6 菌株 1003 生理生化特性测试

实验参照 Bric 等^[28]、Glickmann 等^[29]、Schwyn 等^[30]和 Dey 等^[31]进行菌株产吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)、产氨、产铁载体和溶磷能力等对植株促生具有影响的生理生化特性测定;同时参照 Singh 等^[12]方法进行菌株耐盐测定和最适温度测定。

1.2.7 菌株 1003 活性化合物分离纯化及鉴定

将菌株 1003 接种于 10 个锥形瓶中,每瓶 200 mL PDB 培养基,共 2 L。于 28 °C、200 r/min 条件下发酵 7 d,然后用 4 层纱布滤去菌丝,并

在 50 °C 下用旋转蒸发仪将发酵液浓缩至 500 mL。随后用等体积的乙酸乙酯连续萃取 3 次,并用旋转蒸发仪,控制温度在 45 °C 下减压浓缩得到浸膏产物。

将浸膏(767.0 mg)用适量二氯甲烷甲醇溶液($V_C:V_M=1:1$)溶解,用氯甲凝胶柱对样品进行分离,经薄层层析(thin layer chromatography, TLC)检测将含有相同 Rf 值和显色情况的组分合并,共分为 Fr.1.1–Fr.1.4 的 4 个组分。活性追踪(孢子萌发法)后,组分 Fr.1.3 (232.8 mg)表现出活性。

将组分 Fr.1.3 (232.8 mg)用硅胶(100–200 目,400 mg)拌样,放于装有 GF254 硅胶洗脱柱中,经石油醚:丙酮(P:A)=(10:1、8:2、7:3、6:4)系统梯度洗脱,得到 Fr.1.3.1 至 Fr.1.3.14 共 14 个组分。组分 Fr.1.3.3 (116.5 mg)表现出活性,用硅胶(100–200 目,200 mg)拌样,洗脱柱装填 GF254 硅胶,经石油醚:丙酮(P:A)=(9.5:0.5、9:1、8:2)系统梯度洗脱,最终得到化合物 1 (99.1 mg)^[32]。

活性化合物分离过程中均采用孢子萌发法验证活性,所得纯品活性化合物将作为后续木霉素 MIC 实验测定和盆栽实验对照处理。

活性化合物鉴定:对化合物 1 进行 NMR 测定以及质谱鉴定,并通过化合物 1 的 ¹H、DEPT 135、DEPT 90、¹³C NMR 谱图及其异核单量子关系(heteronuclear singular quantum correlation, HSQC)谱图进行数据整理及相关文献查阅,以此进行化合物结构解析并最终确定化合物结构。

1.2.8 活性化合物抑菌活性测试

采用二倍稀释法和孢子萌发法,测试活性化合物对 *Foc*TR4 孢子萌发的 MIC 值^[33]。用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解活性化合物得到母液 100 μ g/mL,并进行 6 次二倍稀释,与浓度为 2×10^5 CFU/mL 的 *Foc*TR4 病原菌孢子按比例混匀,即 $V_{\text{活性化合物}}:V_{\text{RPMI}}:V_{\text{FocTR4}}=10 \mu\text{L}:90 \mu\text{L}:100 \mu\text{L}$,28 °C、黑暗培养 24 h,显微镜

下观察。以加 10 μL DMSO 和加 10 μL RPMI1640 为 2 个对照, 3 次重复处理。DMSO 具有毒性, 浓度最好控制在 5% 以内, 以减少其对活性测试影响。

采用二倍稀释法, 在 PDA 平板上测试 2、1、0.5 mg/mL 的 3 个浓度梯度活性化合物对 1×10^6 CFU/mL 病原菌孢子萌发及菌丝生长影响^[34]。打孔器打取 4 个 5 mm 直径孔洞, 每孔添加 50 μL 各浓度试剂溶液, 对照为 50 μL 的 DMSO 溶剂, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、黑暗培养 72 h, 3 次重复处理。

1.2.9 菌株 1003 防治 *FocTR4* 盆栽实验

选用 3-4 叶期及株高约 10 cm 的威廉斯 B6 香蕉苗进行盆栽实验。清水冲洗掉根部营养土, 并对主根根须进行 3 处约 3 mm 深的均匀分布伤根处理。然后将处理蕉苗移栽至口径为 11.5 cm、装有灭菌营养土(基质土:大田土=3:1)的苗盆中, *FocTR4* 孢子液(1×10^6 CFU/g)提前一天接种于营养土中。实验组设置有阴性 CK (Water)对照: 土壤未经 *FocTR4* 孢子液处理, 添加无菌水; 阳性 CK (*FocTR4*)对照: 土壤经过 *FocTR4* 孢子液处理, 添加无菌水; 处理组 T1: 土壤经过 *FocTR4*

孢子液处理, 且添加稀释 10 倍的菌株 1003 发酵液进行处理; 处理组 T2: 土壤经过 *FocTR4* 孢子液处理, 且添加浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木霉菌素(trichodermin)进行处理。处理组每盆添加 50 mL 处理液, CK 组添加同等体积无菌水。每 7 天补加一次, 所有处理 6 个重复, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、12 h 光照/12 h 黑暗条件生长^[35]。

香蕉苗进行上述处理盆栽培养 30 d 后, 观察记录香蕉植株株高、香蕉植株鲜重、叶片发病情况和球茎发病情况。病情分级标准(表 1)、病情指数和防治效果分别为^[36]: 病情指数(%)= $\sum(\text{各级别病株数} \times \text{发病等级})/(\text{总株数} \times \text{最高等级}) \times 100$ 。防治效果(%)=(*FocTR4* 病情指数-处理组病情指数)/(*FocTR4* 病情指数) $\times 100$ 。

1.3 数据处理

采用 Excel 2007、DPS 数据处理系统和 GraphPad Prism 7.00 进行数据统计分析, 通过单因素方法分析(analysis of variance, ANOVA)进行数据比较, 最小显著差异法(least significant difference, LSD)检验进行多重比较($P < 0.05$)。

表 1 香蕉植株病情分级标准

Table 1 Grading standard of banana plant disease

Evaluation items	Items evaluation degree	Evaluation content description
Leaf yellowing degree: leaf symptoms	0	The leaves did not undergo yellowing and the plant grew well
	1	The lower leaves turned yellow
	2	The upper 1-2 functional leaves turned yellow
	3	All leaves turned yellow
	4	Plant dead
Bulb browning degree: bulb symptoms, about bulb longitudinal section area	0	No symptoms were found in the bulb, and the plant grew well
	1	The browning area of the bulb was less than 10%
	2	The browning area of the bulb ranged from 10% to 25%
	3	The browning area of the bulb ranged from 26% to 50%
	4	The browning area of the bulb ranged from 51% to 75%
5	The browning area of the bulb was over 76%	

2 结果与分析

2.1 菌株 1003 对 *FocTR4* 拮抗结果

通过对 2 份作物根际土样进行浓度梯度稀释, 分离纯化后得到单一木霉菌落。经平板对峙培养筛选获得 5 株拮抗效果较好的木霉菌株, 其中菌株 1003 和菌株 1005 效果最好, 其抑制率分别为 $60.6\% \pm 1.7\%$ 和 $59.6\% \pm 1\%$ (表 2, 图 1A)。

菌株 1003 发酵液对 *FocTR4* 孢子萌发抑制测试表明, 在 24 h、28 °C 黑暗条件下, 经 1003 发酵液处理的 *FocTR4* 孢子萌发率为 0%, 抑制效果明显(图 1B)。经抑制菌丝生长速率法检测, 发现菌株 1003 的 10% 发酵液对 4 种供试植物病原菌均有强烈的抑制效果(图 1C)。其中, 对核盘菌的抑制率为 56.8%, 明显高于 *FocTR4*

(52.6%) 和另外 2 种病原菌(山茶刺盘孢菌和灰葡萄孢菌), 表明菌株 1003 发酵液对 *FocTR4* 和其他 3 种植物病原真菌均有很强的抑制作用, 并且具有抗植物病原真菌广谱特性。

表 2 五株木霉对 *FocTR4* 平板对峙抑制率

Table 2 Inhibition rates of five *Trichoderma* strains against *FocTR4*

Target strain	<i>FocTR4</i> colony radius (mm)	Inhibition rate (%)
1001	14.7±0.7bc	55.6±2.0ab
1002	14.7±0.4bc	55.6±1.3ab
1003	13.0±0.6c	60.6±1.8a
1004	16.0±0.3b	51.5±0.9b
1005	13.3±0.3c	59.6±1.0a
CK	33.0±0a	—

同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Different lowercase letters in the same column represented significant difference ($P < 0.05$).

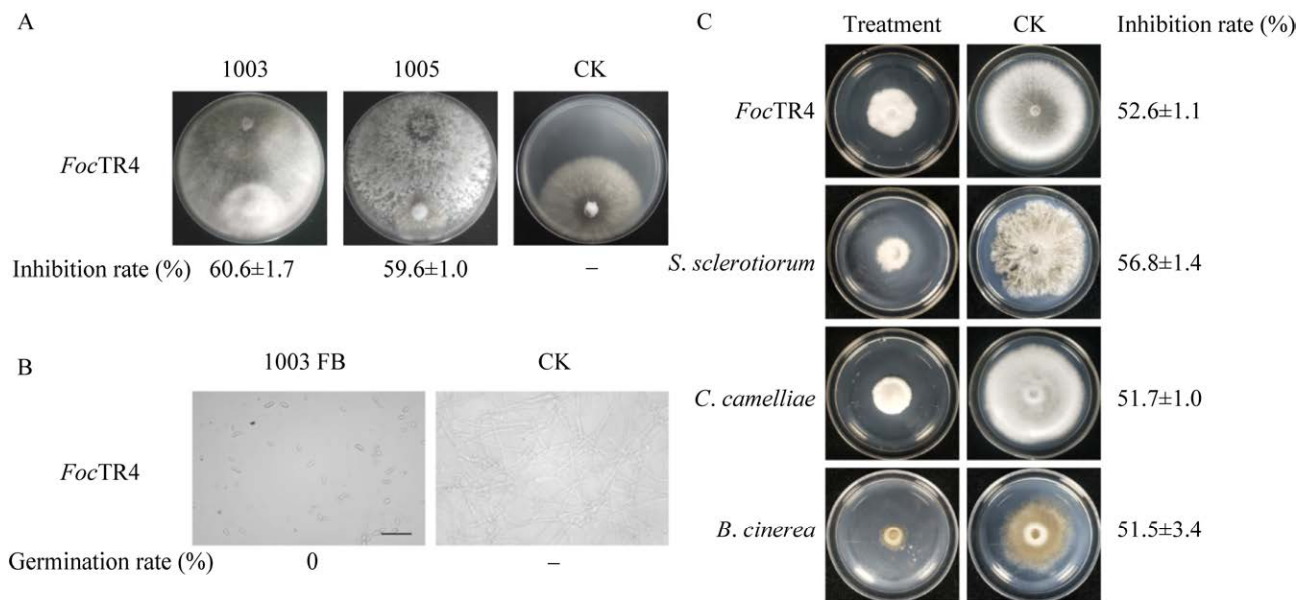


图 1 菌株 1003 对 *FocTR4* 拮抗活性 A: 菌株 1003 对 *FocTR4* 平板对峙抑制效果. B: 菌株 1003 发酵液对 *FocTR4* 孢子萌发抑制效果. C: 10% 浓度的菌株 1003 发酵液对 4 种植物真菌病原菌的抑菌活性. *FocTR4* 表示尖孢镰刀菌古巴专化型热带 4 号小种、*S. sclerotiorum* 为核盘菌、*C. camelliae* 为山茶刺盘孢菌、*B. cinerea* 为灰葡萄孢菌. 比例尺=40 μm

Figure 1 Antifungal activity of 1003 against *FocTR4*. A: Inhibitory effect of 1003 on *FocTR4*. B: Inhibition of *FocTR4* conidial germination by fermentation broth (FB) 1003. C: Antagonistic activity of 10% concentration of strain 1003 fermentation broth against 4 fungal pathogens. Scale bar=40 μm .

2.2 菌株 1003 的 ITS 与 *tef1- α* 联合序列位点测序及系统发育树构建

将菌株 1003 的 ITS 和 *tef1- α* 基因测序结果递交 GenBank (ITS Accession No. OQ520280, *tef1- α* Accession No. OQ559936), 并在 NCBI 数据库比对选取 15 个与菌株 1003 近源种类菌株序列, 构建基于邻接法(neighbor-joining, NJ) ITS-*tef1- α* 串联序列的物种系统发育树(图 2)。表明菌株 1003 与短密木霉(*T. brevicompactum* HZA12)处于同一分支, 其自举支持率(bootstrap 值 1 000 次)为 100%,

将该菌鉴定为 *T. brevicompactum* (短密木霉)。

2.3 菌株 1003 生理生化特性

菌株溶磷解磷、产 IAA、产氨及产铁载体能力是评价菌株促进宿主植株生长、提高植株抗生物及非生物胁迫能力重要指标。生理生化测试结果表明, 菌株 1003 孢子在 30 °C 萌发率最高(图 3A, 表 3), 在 NaCl 浓度为 5% 时仍能萌发, 具有一定耐盐胁迫能力(图 3B, 表 3), 且产氨测试呈阳性(图 3C, 表 3)。解磷溶磷能力测试、产 IAA 测试、产铁载体测试与 CK (OD) 无差异, 均呈阴性(表 3)。

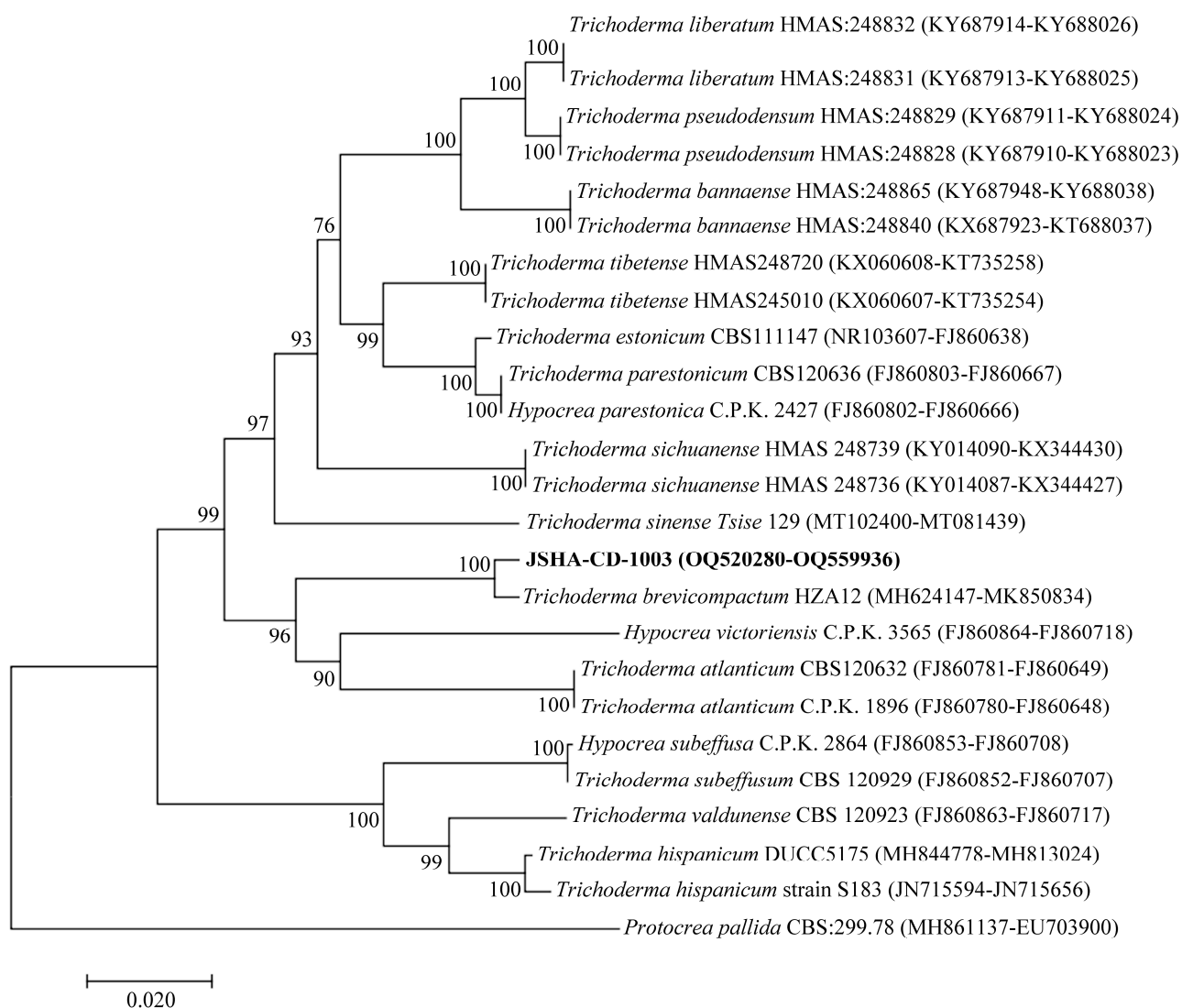


图 2 菌株 1003 的 ITS 与 *tef1- α* 基因联合序列木霉物种系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of *Trichoderma* species of strain 1003 based on concatenated ITS and *tef1- α* .

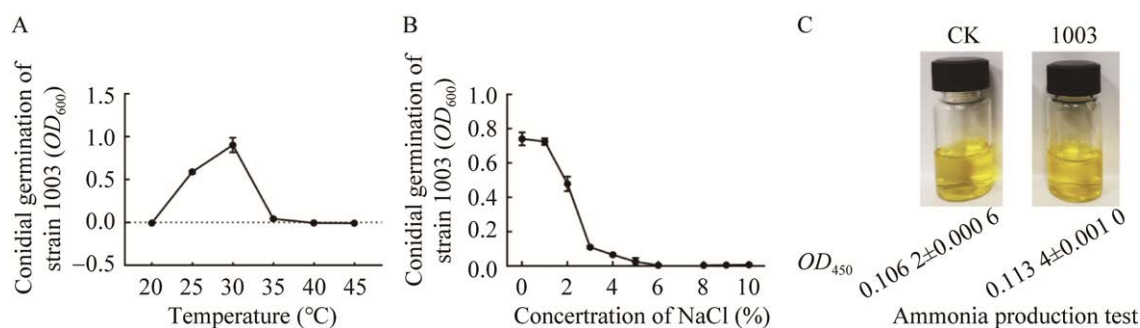


图3 菌株 1003 生理生化检测 A: 温度对菌株 1003 孢子萌发影响. B: NaCl 含量对菌株 1003 孢子萌发影响. C: 菌株 1003 产氨能力测试

Figure 3 Physiological and biochemical tests of strain 1003. A: Effect of temperature on conidial germination of strain 1003. B: Effect of NaCl concentration on conidial germination of strain 1003. C: The ammonia production test of strain 1003.

表3 菌株 1003 的生理生化检测结果

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain 1003

Item tested	Reaction
The optimum temperature for conidial germination	30 °C
The highest NaCl tolerance concentration of conidial germination	5%
Phosphate solubilizing ability test	—
IAA production test	—
Ammonia production test	+
Siderophore production test	—

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

2.4 菌株 1003 活性化合物鉴定

采用抑制孢子萌发法进行活性追踪, 对 1003 发酵液中活性化合物进行分离纯化(图 4A, 详见 1.2.7), 最终分离出活性最强组分 Fr.1.3.3, 并得到 99.1 mg 化合物 **1**, 该化合物为无色油状物。由质谱 ESI-MS (m/z $[M+Na]^+$, 292)结合 1H NMR、 ^{13}C NMR 和 DEPT 谱, 确定其分子式为 $C_{17}H_{24}O_4$ (图 4B)。 1H NMR ($CDCl_3$, 800 MHz): δ 5.50 (1H, dd, $J=7.8, 3.6$ Hz, H-4), 5.33 (1H, d, $J=4.4$ Hz, H-10), 3.75 (1H, d, $J=5.2$ Hz, H-2), 3.53 (1H, d, $J=5.4$ Hz, H-11), 3.05 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-13a), 2.76 (1H, d, $J=4.0$ Hz, H-13b), 2.48 (1H, dd, $J=15.4, 7.9$ Hz, H-3b), 1.84–1.93 (4H, m, H-3a, H-7a, H-8a, H-8b), 1.64 (3H, s, H-16), 1.35 (1H, m, H-7b), 0.86 (3H, s, H-15), 0.64 (3H, s, H-14); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 800 MHz): δ 170.9 (s,

C-1'), 140.2 (s, C-9), 118.5 (d, C-10), 79.1 (d, C-2), 75.0 (d, C-4), 70.4 (d, C-11), 65.5 (s, C-12), 48.9 (s, C-5), 47.8 (t, C-13), 40.4 (s, C-6), 36.6 (t, C-3), 27.9 (t, C-8), 24.4 (t, C-7), 23.2 (q, C-16), 21.1 (q, C-2'), 15.9 (q, C-15), 5.8 (q, C-14)。以上参数与 Yang 等所测定的木霉素一致^[37], 最终将化合物 **1** 鉴定为木霉素。

2.5 活性化合物木霉素的 MIC 及活性梯度测试

通过二倍稀释法, 在 96 微孔板中测试木霉素抑制 1×10^5 CFU/mL 的 *FocTR4* 孢子萌发效果(图 5A)。处理时间 24 h, 木霉素浓度为 12.5 μ g/mL, 病原菌孢子膨大率 18.8%, 孢子不萌发; 浓度为 25 μ g/mL, *FocTR4* 孢子膨大率为 0%, 孢子不萌发。因此, 木霉素的 MIC 值为 25 μ g/mL, 即 85.5 μ mol/L。

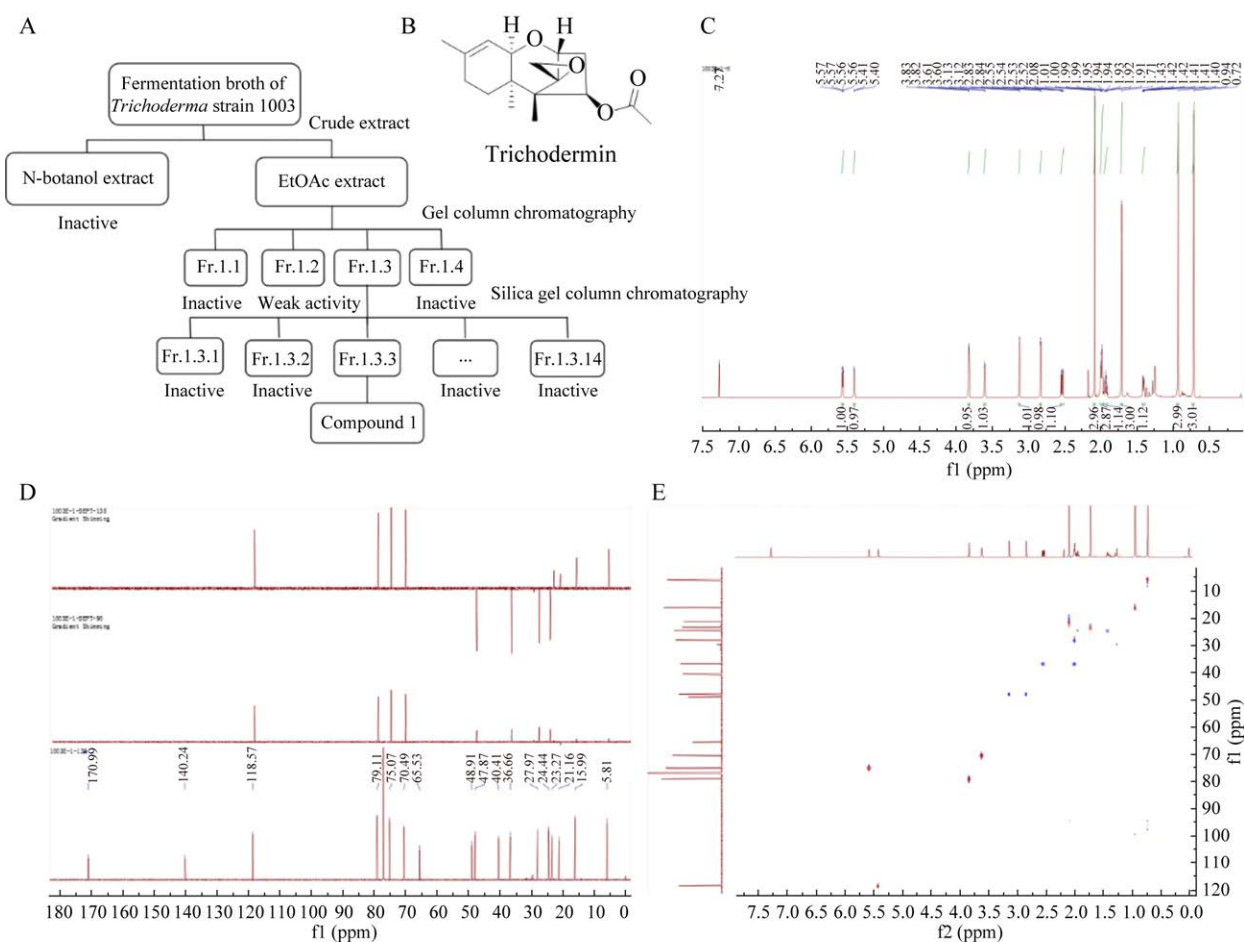


图4 菌株1003活性化合物分离纯化与鉴定 A:活性化合物1分离纯化流程. B:木霉素化学结构式. C:化合物1的 ^1H NMR谱图. D:化合物1的DEPT135、DEPT90和 ^{13}C NMR谱图. E:化合物1的HSQC谱图

Figure 4 Isolation, purification and identification of active compounds of strain 1003. A: Isolation and purification of active compound 1. B: Chemical structure of trichodermin. C: The ^1H NMR of compound 1. D: The DEPT135, DEPT90 and ^{13}C NMR of compound 1. E: The HSQC of compound 1.

通过二倍稀释法,在PDA平板测试木霉素抑制 1×10^6 CFU/mL的*FocTR4*孢子萌发及菌丝生长活性(图5B)。48 h后,各浓度均有微弱抑菌圈。72 h后,浓度为2 mg/mL有直径大小约为20 mm的明显抑制区域,1 mg/mL抑制区域不均匀且相对较小,而0.5 mg/mL基本无抑制作用。

96孔板测定结果表明,24 h内、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$

木霉素能完全抑制 1×10^5 CFU/mL浓度*FocTR4*孢子萌发;PDA板测定结果表明,48–72 h,对 1×10^6 CFU/mL的*FocTR4*孢子萌发及菌丝生长抑制,需高于0.5 mg/mL浓度才能起到效果。

2.6 菌株1003防治*FocTR4*盆栽实验

30 d盆栽结果表明,T1处理组正常生长香蕉植株生物量[株高(16.4 \pm 0.3) cm,鲜重(37.4 \pm 2.3) g]与阴性CK(Water)对照处理组香蕉植株生物量

[株高(17.1±0.3) cm, 鲜重(37.6±0.8) g]无显著差异, 与阳性 CK (*FocTR4*)对照组比较生物量[株高(11.5±0.4) cm, 鲜重(14.6±2.2) g]差异显著(图 6B、6C)。阳性 CK (*FocTR4*)对照组香蕉植株叶片黄化明显(图 6A), 黄化指数为 79.2, 球茎褐化指数为 83.3, T1 处理组香蕉植株, 叶片黄化指数为 41.7, 球茎褐化指数为 40.0。T1 处理组相对 CK (*FocTR4*)处理组香蕉植株叶片黄化防治效果 47.4%, 球茎褐化防治效果 52.0% (图 6D)。需要指出的是, T2 处理组, 土壤被 *FocTR4*

孢子处理过, 在添加 2 次 25.0 μg/mL trichodermin 13 d 后, 比其他处理组的香蕉植株叶片黄化提前且球茎病灶呈干枯状(与香蕉枯萎病特征不一致)。该组处理实验将不再继续进行, 生物量及感病程度数据不再计入。

上述结果表明, 菌株 1003 发酵液在一定程度上能够有效防治香蕉枯萎病。根据 1003 发酵液活性化合物纯化鉴定所得木霉素, 2 L 共提取出 99.1 mg, 1003 的 10 倍稀释发酵液中所含木霉素的浓度约为 5.0 μg/mL。

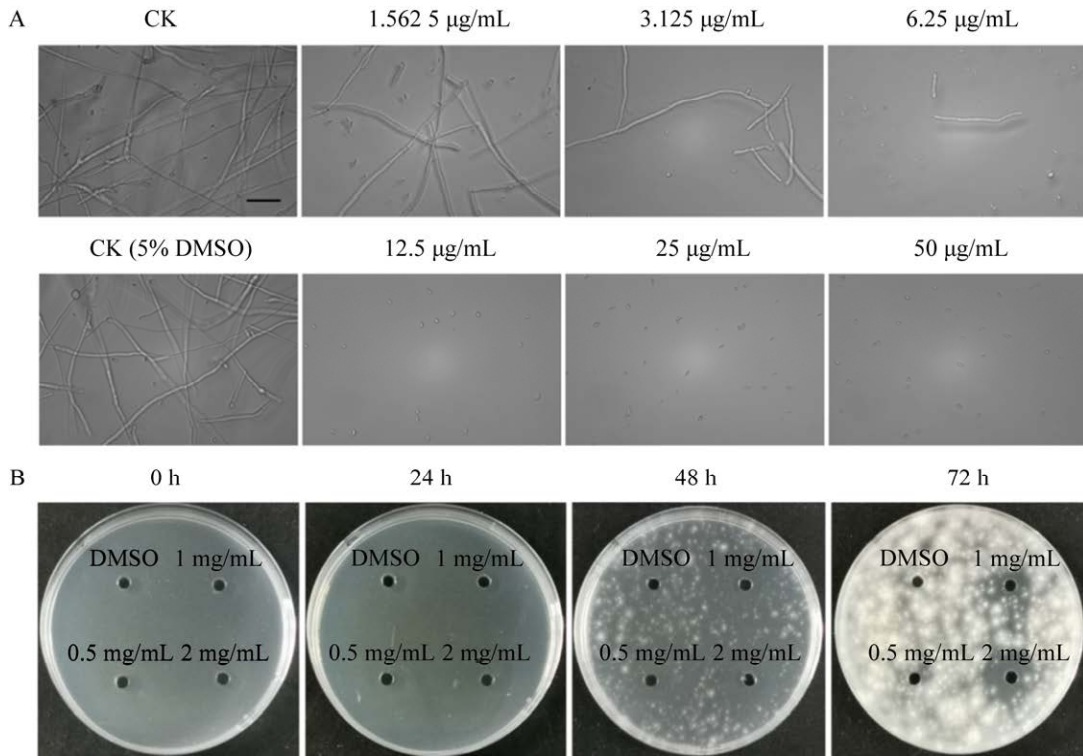


图 5 活性化合物木霉素对 *FocTR4* 抑制效果 A: 96 孔板中木霉素对 1×10^5 CFU/mL 的 *FocTR4* 孢子萌发的抑制效果. B: PDA 上木霉素对 1×10^6 CFU/mL 的 *FocTR4* 孢子萌发及菌丝生长的抑制效果. 比例尺=40 μm. 活性化合物需用 DMSO 溶解, CK (5% DMSO): 200 μL 实验体系中添加 10 μL DMSO

Figure 5 The inhibitory effect of active compound of trichodermin against *FocTR4*. A: The inhibitory effect of trichodermin on *FocTR4* conidial germination of 1×10^5 CFU/mL in 96-microwell-plate. B: The inhibitory effect of trichodermin against 1×10^6 CFU/mL *FocTR4* conidial germination and mycelia growth on PDA. Scale bar=40 μm. The active compound needs to be dissolved in DMSO, CK (5% DMSO): Add 10 μL DMSO to the 200 μL experimental system.

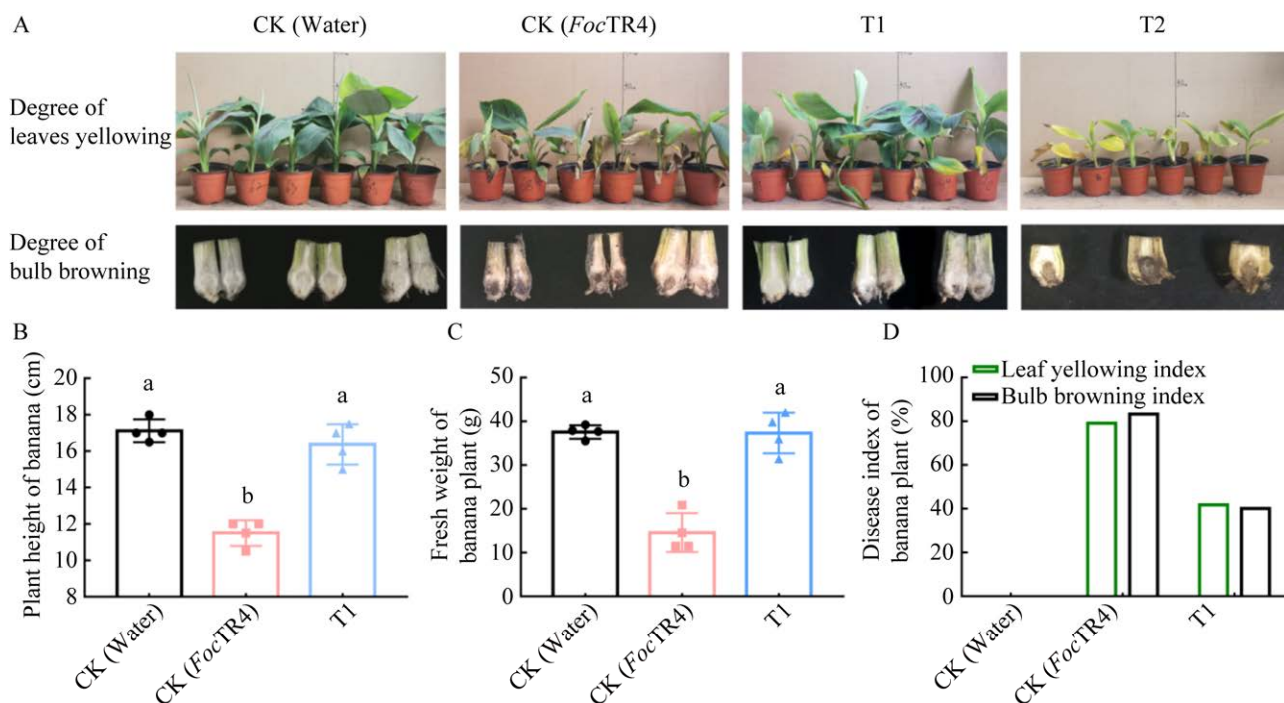


图 6 菌株 1003 在香蕉植株盆栽实验中对 *FocTR4* 生防效果 A: 盆栽实验香蕉植株叶片黄化、球茎褐化程度. B: 各处理生防效果及香蕉植株株高. C: 各处理生防效果及香蕉植株鲜重. D: 各处理香蕉植株叶片黄化、球茎褐化病情指数. 图 B 和图 C 中不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$). 其中: CK (Water): 不接菌处理; CK (*FocTR4*): 土壤经 *FocTR4* 孢子液处理; T1 处理组: 土壤经 *FocTR4* 孢子液处理, 且添加 10 倍稀释的 1003 菌株发酵液进行处理; 处理组 T2: 土壤经 *FocTR4* 孢子液处理, 且添加 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木霉菌素进行处理. 图 A 中 T2 处理组香蕉植株为 13 d 生长状况, 该组植株因比同时期其他组植株提前发病, 植株提前处理, 不进行后续数据统计

Figure 6 Biological effect of strain 1003 against *FocTR4* in pot experiment of banana plant. A: The degree of leaf yellowing and bulb browning of banana plant in pot experiment. B: The plant height of banana under different treatments. C: The fresh weight of banana plant under different treatments. D: Disease index of leaf yellowing and bulb browning of banana plant under different treatments. Different lowercase letters indicated a significant difference ($P < 0.05$) in Figures B and C. CK (Water): Water treatment; CK (*FocTR4*): Soil treated with *FocTR4* spore solution; Treatment group T1: The soil was treated with *FocTR4* spore solution, and added with 10×diluted 1003 strain fermentation broth for treatment; Treatment group T2: Soil treated with *FocTR4* spore solution and added with 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ trichodermin for treatment. In Figure A, the growth status of the banana plants in T2 treatment group was 13 days. Because T2 group had earlier pathopoiesis than other groups in this experiment, the plants were treated in advance, and no subsequent data statistics were performed together.

3 讨论

香蕉枯萎病作为一种严重危害香蕉产业的土传真菌病害, 对其采用生物防治手段是近年

来的研究热点之一。本研究筛选出一株能有效防治香蕉枯萎病的短密木霉菌株, 其次生代谢产物表现出很强的广谱性。非生物抗逆实验测试发现菌株有一定耐高温及盐胁迫能力, 在亚

热带地区的香蕉种植区有潜在的应用前景。同时, 该菌株具有产氨能力, 但产 IAA 能力、产铁载体能力及溶磷能力较低, 致使其在促进宿主植物生长方面能力较弱, 一定程度上会限制其在绿色农业实践中的应用。

本研究从 2 L 发酵液中分离纯化得到 99.1 mg 的木霉素, 为一种有效抑制 *FocTR4* 孢子萌发的油状活性化合物, 其对 *FocTR4* 孢子萌发的 MIC 值为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 具有较强抑制能力。Shentu 等^[38]从植物内生 *T. brevicompactum* 菌株 0248 次生代谢产物中分离出木霉素, 对梨立枯丝核菌果腐病菌(*Rhizoctonia solani*) EC_{50} 为 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对灰霉病(*B. cinerea*) EC_{50} 为 2.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 对菜豆炭疽菌(*C. lindemuthianum*) EC_{50} 为 25.60 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 展现出较高的抗植物病原真菌活性。Wei 等^[34]用甲醇从链霉菌 YYS-7 发酵液中提取粗提物, 对 *FocTR4* 的 MIC 值为 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。这表明木霉素对抑制植物病原真菌生长具广谱性, 对 *FocTR4* 萌发抑制虽较链霉菌粗提物活性低, 但仍展现了较强的抗真菌活性。

本研究发现菌株 1003 的 10 倍稀释发酵液对香蕉植株叶片黄化防治率达 47.4%, 球茎褐化防治率达 52.0%, 对香蕉枯萎病有一定防效作用。在用浓度 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木霉素处理时, 发现香蕉植株加速枯萎, 蕉苗叶片黄化提前, 球茎病灶处解剖发现呈干枯状, 未达到预期效果。Tijerino 等^[39]通过番茄幼苗实验表明, *T. brevicompactum* 影响番茄幼苗植株及根生长; *tri5* 基因的过表达能提高木霉素的合成量, 会进一步负面影响番茄幼苗植株大小和根长。Tijerino 等采用的模式植物为 3 cm 左右大小的生长 3 d 的番茄发芽幼苗, 接种的孢子量为 1×10^6 CFU/mL, 且并未针对木霉素浓度进行下一步论证, 可能存在目标木霉孢子接种量或木霉素浓度远超模式植物承受范围等相关问题^[39]。本研究植物材料为初始状况在

3-4 叶期及株高 10 cm 长势一致的香蕉苗植株, 耐受能力相对较强。实验也证明, 经过含木霉素浓度在 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右的菌株 1003 的 10 倍稀释发酵液处理后的感病香蕉苗, 植株香蕉枯萎病感病程度得到控制, 同时植株能健康生长。对比表明, 木霉素对植物病原菌的孢子萌发有很强的抑制作用, 对植物生长有一定的负面作用, 同时菌株 1003 次生代谢产物中可能存在一种或多种其他产物与木霉素产生了协同作用, 加强了对 *FocTR4* 病害的防治。

4 结论

本研究分离木霉菌株 1003 对 *FocTR4* 表现出较强的拮抗活性, 其次生代谢产物木霉素能有效抑制 *FocTR4* 孢子萌发以及菌丝生长, 生防盆栽实验使用 10 倍稀释发酵液(约 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)能有效降低香蕉枯萎病病情指数。因此, 木霉菌株 1003 可以作为防治香蕉枯萎病的重要生防微生物资源, 木霉素可作为潜在的高效生物农药活性化合物。

REFERENCES

- [1] 王振中. 香蕉枯萎病及其防治研究进展[J]. 植物检疫, 2006, 20(3): 198-200, F0004.
WANG ZZ. Research progress on banana *Fusarium* wilt and its control[J]. Plant Quarantine, 2006, 20(3): 198-200, F0004 (in Chinese).
- [2] 苏琴, 谢玲, 陈艳露, 廖仕同, 张艳, 农倩. 香蕉枯萎病生防菌绿头枝孢菌 LS1 的筛选鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3248-3256.
SU Q, XIE L, CHEN YL, LIAO ST, ZHANG Y, NONG Q. Screen and identification of biocontrol strain *Cladosporium chlorocephalum* LS1 against banana *Fusarium* wilt[J]. Microbiology China, 2019, 46(12): 3248-3256 (in Chinese).
- [3] PLOETZ RC. *Fusarium* wilt of banana[J]. Phytopathology, 2015, 105(12): 1512-1521.
- [4] 杨静. 香蕉枯萎病菌进化研究和 *FocTR4* 致病相关效应蛋白的鉴定及功能分析[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2016.
YANG J. Studies on the evolution of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* strains and identification and

- functional analyses of pathogenicity related effectors from *FocTR4*[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [5] EMMERT ABE, HANDELSMAN J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 172: 1-9.
- [6] HUANG YH, WANG RC, LI CH, ZUO CW, WEI YR, ZHANG L, YI GJ. Control of *Fusarium* wilt in banana with Chinese leek[J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 134(1): 87-95.
- [7] 吴元立, 杨乔松, 李春雨, 黄秉智, 董涛, 盛鸥, 毕方铖, 邓贵明, 胡春华, 高慧君, 窦同心, 何维弟, 刘思文, 易干军. 香蕉-尖孢镰刀菌互作机理及抗病育种研究进展[J]. 广东农业科学, 2020, 47(11): 32-41.
WU YL, YANG QS, LI CY, HUANG BZ, DONG T, SHENG O, BI FC, DENG GM, HU CH, GAO HJ, DOU TX, HE WD, LIU SW, YI GJ. Research progress in the mechanisms of banana-*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* interaction and genetic improvement for resistance to *Fusarium* wilt[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2020, 47(11): 32-41 (in Chinese).
- [8] MAXMEN A. CRISPR might be the banana's only hope against a deadly fungus[J]. Nature, 2019, 574(7776): 15.
- [9] 王海希, 郝志鹏, 张莘, 谢伟, 陈保冬. 丛枝菌根真菌防治尖孢镰孢枯萎病的效应、机制及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2819-2837.
WANG HX, HAO ZP, ZHANG X, XIE W, CHEN BD. Effect, mechanisms and application of arbuscular mycorrhizal fungi for biological control of *Fusarium oxysporum*-caused wilt: a review[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2819-2837 (in Chinese).
- [10] CHEN YF, ZHOU DB, QI DF, GAO ZF, XIE JH, LUO YP. Growth promotion and disease suppression ability of a *Streptomyces* sp. CB-75 from banana rhizosphere soil[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 8: 2704.
- [11] ZHANG L, ZHANG HX, HUANG YT, PENG J, XIE JH, WANG W. Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrolling *Fusarium* wilt of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 763038.
- [12] SINGH P, XIE J, QI YH, QIN QJ, JIN C, WANG B, FANG WX. A thermotolerant marine *Bacillus amyloliquefaciens* S185 producing iturin A5 for antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. Marine Drugs, 2021, 19(9): 516.
- [13] 叶乃玮, 吴紫燕, 干华磊, 王承芳, 毛玮力. 组合木霉菌制剂防治香蕉枯萎病的研究[J]. 中国果树, 2019(2): 64-67.
YE NW, WU ZY, GAN HL, WANG CF, MAO WL. Study on the control of banana *Fusarium* wilt with combined *Trichoderma* preparation[J]. China Fruits, 2019(2): 64-67 (in Chinese).
- [14] AYYADURAI N, RAVINDRA NAIK P, SREEHARI RAO M, SUNISH KUMAR R, SAMRAT SK, MANOHAR M, SAKTHIVEL N. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(5): 926-937.
- [15] HARMAN G, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I, LORITO M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2: 43-56.
- [16] HERMOSA R, CARDOZA RE, NICOLÁS C, MONTE E, GUTIÉRREZ S. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense[J]. International Microbiology: the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, 2013, 16(2): 69-80.
- [17] MUKHERJEE PK, HORWITZ BA, HERRERA-ESTRELLA A, SCHMOLL M, KENERLEY CM. *Trichoderma* research in the genome era[J]. Annual Review of Phytopathology, 2013, 51: 105-129.
- [18] CHEMELTORIT PP, MUTAQIN KH, WIDODO W. Combining *Trichoderma hamatum* THSW13 and *Pseudomonas aeruginosa* BJ10-86: a synergistic chili pepper seed treatment for *Phytophthora capsici* infested soil[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 147(1): 157-166.
- [19] 杨曦亮, 任梦瑶, 刘倩, 汪超, 王强. 近十年海洋来源木霉属真菌次生代谢产物研究进展[J]. 广西科学, 2021, 28(5): 440-450.
YANG XL, REN MY, LIU Q, WANG C, WANG Q. Research progress on secondary metabolites from marine-derived *Trichoderma* sp. in the past decade[J]. Guangxi Sciences, 2021, 28(5): 440-450 (in Chinese).
- [20] ZHAO DL, ZHANG XF, HUANG RH, WANG D, WANG XQ, LI YQ, ZHENG CJ, ZHANG P, ZHANG CS. Antifungal nafuredin and epithiodiketopiperazine derivatives from the mangrove-derived fungus *Trichoderma harzianum* D13[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 26(11): 1495.
- [21] SHI ZZ, LIU XH, LI XN, JI NY. Antifungal and antimicrobial trichothecene sesquiterpenes from the marine algicolous fungus *Trichoderma brevicompactum* A-DL-9-2[J]. Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(52): 15440-15448.
- [22] 赵兴丽, 张金峰, 周玉锋, 赵玳琳, 张莉, 周罗娜, 陶刚. 一株拮抗茶炭疽病菌的木霉菌的分离、筛选及鉴定[J]. 茶叶科学, 2019, 39(4): 431-439.
ZHAO XL, ZHANG JF, ZHOU YF, ZHAO DL, ZHANG L, ZHOU LN, TAO G. Isolation, screening and identification of a strain of *Trichoderma*

- antagonizing tea anthracnose[J]. Journal of Tea Science, 2019, 39(4): 431-439 (in Chinese).
- [23] 侯捷, 唐春萍, 沈志滨, 陈艳芬, 丁慎, 张祉思, 李小英, 江涛. 异黄酮马酸 PB 对红色毛癣菌生物被膜黏附及甾醇代谢相关酶基因表达的影响[J]. 中国药房, 2021, 32(5): 584-589.
HOU J, TANG CP, SHEN ZB, CHEN YF, DING S, ZHANG ZS, LI XY, JIANG T. Effects of isoflavaspodic acid PB on the biofilm adhesion and gene expression of ergosterol metabolism related enzymes in *Trichophyton rubrum*[J]. China Pharmacy, 2021, 32(5): 584-589 (in Chinese).
- [24] TAN DG, FU LL, HAN BY, SUN XP, ZHENG P, ZHANG JM. Identification of an endophytic antifungal bacterial strain isolated from the rubber tree and its application in the biological control of banana *Fusarium wilt*[J]. PLoS One, 2015, 10(7): e0131974.
- [25] 陈书华, 李梅, 蒋细良, 衣涛, 张念洁, 汪浩, 白龙律. 防治人参锈腐病木霉菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 265-269.
CHEN SH, LI M, JIANG XL, YI T, ZHANG NJ, WANG H, BAI LL. Selection of *Trichoderma* spp. antagonistic to *Cylindrocarpon destructans*, pathogen of ginseng root rot disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 265-269 (in Chinese).
- [26] WHITE TJ, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics[M]. PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.
- [27] JAKLITSCH WM, SAMUELS GJ, ISMAIEL A, VOGLMAYR H. Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex[J]. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 2013, 31(1): 112-146.
- [28] BRIC JM, BOSTOCK RM, SILVERSTONE SE. Rapid *in situ* assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(2): 535-538.
- [29] GLICKMANN E, DESSAUX Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(2): 793-796.
- [30] SCHWYN B, NEILANDS JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56.
- [31] DEY R, PAL KK, Bhatt DM, Chauhan SM. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria[J]. Microbiological Research. 2004, 159: 371-394.
- [32] 谢津. 黑老虎轮斑病的病原鉴定和毒素成分分析及病害防治研究[D]. 南宁: 广西大学博士学位论文, 2020.
XIE J. Pathogen identification, toxin composition analysis and disease control of black tiger ring spot disease[D]. Nanning: Doctoral Dissertation of Guangxi University, 2020 (in Chinese).
- [33] J. L. Rodriguez Tudela. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2008, 14(10): 982-984.
- [34] WEI YY, ZHAO YK, ZHOU DB, QI DF, LI K, TANG W, CHEN YF, JING T, ZANG X, XIE JH, WANG W. A newly isolated *Streptomyces* sp. YYS-7 with a broad-spectrum antifungal activity improves the banana plant resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1712.
- [35] FAN H, LI S, ZENG L, HE P, XU ST, BAI TT, HUANG YL, GUO ZX, ZHENG SJ. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 using natively isolated *Bacillus* spp. YN0904 and YN1419[J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2021, 7(10): 795.
- [36] 左存武, 李斌, 李春雨, 魏岳荣, 胡春华, 邓贵明, 邝瑞彬, 杨乔松, 易干军. 香蕉对尖孢镰刀菌热带 4 号小种的抗性评价方法的建立[J]. 园艺学报, 2016, 43(5): 876-884.
ZUO CW, LI B, LI CY, WEI YR, HU CH, DENG GM, KUANG RB, YANG QS, YI GJ. Establishment of resistance evaluation system of banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2016, 43(5): 876-884 (in Chinese).
- [37] YANG ZS, LI GH, ZHAO PJ, ZHENG X, LUO SL, LI L, NIU XM, ZHANG KQ. Nematicidal activity of *Trichoderma* spp. and isolation of an active compound[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26: 2297-2302.
- [38] SHENTU X, ZHAN X, MA Z, YU XP, ZHANG CX. Antifungal activity of metabolites of the endophytic fungus *Trichoderma brevicompactum* from garlic[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2014, 45(1): 248-54.
- [39] TIJERINO A, HERMOSA R, CARDOZA RE, MORAGA J, MALMIERCA MG, ALEU J, COLLADO IG, MONTE E, GUTIERREZ S. Overexpression of the *Trichoderma brevicompactum tri5* gene: effect on the expression of the trichodermin biosynthetic genes and on tomato seedlings[J]. Toxins (Basel). 2011, 3(9): 1220-1232.

(本文责编 郝丽芳)