

## 三个木霉菌株防病促生效应

华丽霞<sup>1</sup>, 何炼<sup>1</sup>, 蒋秋平<sup>1</sup>, 曾华兰<sup>\*1</sup>, 代顺冬<sup>1</sup>, 叶鹏盛<sup>1</sup>, 徐汉虹<sup>2</sup>, 林菲<sup>2</sup>, 孙小芳<sup>1</sup>, 赵馨怡<sup>1</sup>

1 四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所 农业农村部西南作物有害生物综合治理重点实验室, 四川 成都 610300

2 华南农业大学 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东 广州 510642

华丽霞, 何炼, 蒋秋平, 曾华兰, 代顺冬, 叶鹏盛, 徐汉虹, 林菲, 孙小芳, 赵馨怡. 三个木霉菌株防病促生效应[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1123-1135.

HUA Lixia, HE Lian, JIANG Qiuping, ZENG Hualan, DAI Shundong, YE Pengsheng, XU Hanhong, LIN Fei, SUN Xiaofang, ZHAO Xinyi. Diseases control and plant growth promotion effect of three *Trichoderma* strains[J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1123-1135.

**摘要:**【背景】木霉(*Trichoderma* sp.)是重要的生防微生物资源, 对不同的木霉菌株进行生物学特性比较, 可为获得功能较广的复配型生防菌剂提供参考信息。【目的】通过对绿木霉(*Trichoderma virens*) T23、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) T22、G30 的防病效果及对作物的促生潜力等生物学特性进行比较分析, 明确不同菌株的生物功能差异。【方法】用平板拮抗法比较分析菌株 T23、T22、G30 对植物病原真菌的拮抗效果; 用乙酸乙酯萃取法对菌株 T23、T22、G30 培养液中的胶毒素进行提取并通过高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)检测胶毒素; 用打孔法比较分析培养液萃取物对植物病原真菌的拮抗效果; 通过温室接种验证菌株 T23、T22、G30 的防病效果; 分别以磷酸钙、卵磷脂为唯一磷源检测菌株 T23、T22、G30 对难溶性磷的转化利用潜力, 用电感耦合等离子发射光谱法(inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry, ICP-AES)检测有效磷含量; 用透明圈法或显色法分析菌株 T23、T22、G30 主要生理生化特性。【结果】菌株 T23、T22、G30 对茄镰孢(*Fusarium solani*)的平板拮抗率分别为 77%、74%、48%; 对齐整小核菌(*Sclerotium*

资助项目: 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系(CARS-21); 四川省科技厅区域合作项目(2021YFQ0022); 国家自然科学基金(31701830); 现代农业产业技术体系(SCCXTD-2020-19); 四川省农业科学院领军人才研究基金(2019LJRC036); 四川省农业科学院拔尖人才研究基金(2020BJRC023); 四川省财政自主创新项目(2022ZZCX078); 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室开发课题(SKLCUSA-b202206); 四川省农业科学院中试熟化项目(2022ZSSFGH15)

This work was supported by the China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-21), the Sichuan Science and Technology Department Regional Innovation Cooperation Project (2021YFQ0022), the National Natural Science Foundation of China (31701830), the Innovation Team of Chinese National Modern Agriculture Industry Technology System (SCCXTD-2020-19), the Leading Talent Fund of Sichuan Academy of Agricultural Sciences (2019LJRC036), the Top Talent Fund of Sichuan Academy of Agricultural Sciences (2020BJRC023), the Independent Innovation Project Supported by Sichuan Financial Funds (2022ZZCX078), the Funding from State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources (SKLCUSA-b202206), and the Medium-Sized-Project of Sichuan Academy of Agricultural Sciences (2022ZSSFGH15).

\*Corresponding author. E-mail: zhl0529@126.com

Received: 2022-07-09; Accepted: 2022-11-03; Published online: 2022-12-14

*rolfsii*)的拮抗率分别为 80%、67%、24%;对灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)的拮抗率分别为 93%、62%、64%;菌株 T22、G30 基因组中均不携带胶毒素合成基因簇,培养液中均未检测到胶毒素;菌株 T23 培养液提取物对齐整小核菌、灰葡萄孢的抑菌率分别为 40%、65%;温室接种结果表明,在齐整小核菌胁迫下, T23 可显著提高花生苗率,达 68%;在灰葡萄孢胁迫下,菌株 T23 可使月季延迟 16 d 发病;菌株 T23、T22 可以产生  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶;菌株 T23、T22、G30 可对磷酸钙进行转化利用。【结论】通过比较分析,我们对菌株 T23 的防病促生效果及生理生化特性有了进一步了解。菌株 T23、T22、G30 在植物病原真菌拮抗、解磷效果方面各具特点及优势,菌株 T23 通过产生抑菌性天然产物来拮抗病原真菌,这为真菌源生物农药的开发提供了重要的来源。在促生方面,菌株 T23 的无机磷转化机制有待进一步研究。

关键词:木霉;胶毒素;植物病原真菌;生物学特性;解磷微生物

## Diseases control and plant growth promotion effect of three *Trichoderma* strains

HUA Lixia<sup>1</sup>, HE Lian<sup>1</sup>, JIANG Qiuping<sup>1</sup>, ZENG Hualan<sup>\*1</sup>, DAI Shundong<sup>1</sup>, YE Pengsheng<sup>1</sup>, XU Hanhong<sup>2</sup>, LIN Fei<sup>2</sup>, SUN Xiaofang<sup>1</sup>, ZHAO Xinyi<sup>1</sup>

1 Key Laboratory of Integrated Pest Management in Southwest Agriculture Crops of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Industrial Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610300, Sichuan, China

2 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

**Abstract:** [Background] *Trichoderma* sp. is an important biocontrol microorganism. Comparing the biological characteristics of different strains can provide information for multi-function biocontrol agent development. [Objective] To figure out the biological function differences among different strains by comparing and analyzing the preventive effects of *Trichoderma virens* T23 and the other two *Trichoderma harzianum* strains T22 and G30 and their biological characteristics. [Methods] Plate antagonism test was employed to compare the antagonistic effects of strains T23, T22, and G30 on plant pathogenic fungi. Gliotoxin was extracted from culture solution of strains T23, T22, and G30 by ethyl acetate extraction method and tested by high-performance liquid chromatography (HPLC). The antagonistic effects of the extracts on plant pathogenic fungi were compared by the hole drilling method, and the effects of strains T23, T22, and G30 on disease prevention were verified by plant inoculation in the greenhouse experiments. The conversion and utilization potential of strains T23, T22, and G30 to insoluble phosphorus was determined by using calcium phosphate and lecithin as the only phosphorus sources, respectively, and inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) was used for soluble phosphate detection. The main physiological and biochemical characteristics of strains T23, T22, and G30 were analyzed by the transparent ring method or chromogenic method. [Results] The plate antagonism rate of strains T23, T22, and G30 against

*Fusarium solani* was 77%, 74%, and 48%, respectively, against *Sclerotium rolfsii* was 80%, 67%, and 24%, respectively, and against *Botrytis cinerea* was 93%, 62%, and 64% respectively. Neither strain T22 nor strain G30 carried gene clusters participating in gliotoxin biosynthesis, and no gliotoxin was detected in the culture solution of strains T22 and G30. The antibacterial rate of strain T23 extracts against *S. rolfsii* and *B. cinerea* was 40% and 65%, respectively. In the greenhouse experiment, strain T23 improved the emergence percentage (68%) of peanut seedlings under *S. rolfsii* stress and delayed the onset of disease in *Rosa chinensis* Jacq. for 16 days under *B. cinerea* stress. Strains T23 and T22 produced  $\beta$ -1,3-glucanase. Strains T23, T22, and G30 all possessed the ability to transform and utilize calcium phosphate. **[Conclusion]** Through comparative analysis, we have a further understanding of the disease prevention and growth-promoting effect of strain T23 and its physiological and biochemical characteristics. Strains T23, T22, and G30 have their characteristics and advantages in fungi antagonism and phosphorus solubilization. Strain T23 antagonizes pathogenic fungi by producing bacteriostatic natural products, which provides an important source for the development of fungus-derived biopesticides. In terms of growth promotion, the inorganic phosphorus solution mechanism of strain T23 needs to be further studied.

**Keywords:** *Trichoderma* sp.; gliotoxin; plant pathogenic fungi; biological characteristics; P-solubilizing microbes

木霉(*Trichoderma* sp.)是一种广泛存在于土壤环境中的丝状真菌,也是目前应用最广的生防真菌,大部分菌株对植物病原真菌和细菌具有拮抗效果,对植物健康生长及产量提高具有积极的促进作用,在农业病害生物防治方面发挥着重要作用<sup>[1-3]</sup>。已有研究表明,生防木霉不仅具有防病、控病效果,还兼具重金属污染处理、农药降解、难溶性磷转化利用等环境治理的生态功能<sup>[4]</sup>。由于生态环境的复杂多变,功能单一的生防菌很难适应环境及市场的需求,深入挖掘生防木霉的控病、促生、营养元素利用等生物学功能及特性,对生防木霉的合理利用及复合菌剂的开发具有重要的意义,也为实现化肥农药减施增效、减少农业面源污染风险提供微生物资源及技术保障。同一木霉属的不同菌株对植物病原菌的拮抗及生物学功能差异显著<sup>[5-6]</sup>。李作森等<sup>[7]</sup>对5个木霉菌株进行了抑菌谱分析,这为木霉制剂的生产提供数据支撑。

国外学者比较了12个木霉菌株对齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)的拮抗效果,抑制率差异显著<sup>[8]</sup>。木霉可产生丰富的天然产物<sup>[9-10]</sup>,如对作物病原真菌具有抑制作用的胶毒素,对病原真菌细胞壁具有降解作用的 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶等,这些天然产物在木霉生防功能中发挥着重要作用<sup>[11-13]</sup>。在促进植物生长及营养元素利用等生态功能研究方面,部分生防微生物可以通过分泌吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)等植物生长激素促进植物生长,通过对土壤中的难溶性元素进行转化利用,为植物生长提供必要的营养元素<sup>[14-16]</sup>。菌株T23是本团队从四川土壤环境中分离得到的对植物土传病害具有显著防控效果的生防木霉菌株<sup>[17]</sup>,为进一步明确菌株T23的开发潜力及产业化价值,本文比较T23、T22、G30这3个木霉菌菌株的防病促生效果,以期为菌株T23的开发及应用推广、木霉复合菌剂的研发提供必要的支撑及必要的理论基础。

# 1 材料与方 法

## 1.1 材 料

### 1.1.1 菌 株

实验所用的绿木霉(*Trichoderma virens*) T23 为本研究室从川产道地中药材根际土样中分离得到。哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) T22 从拜沃股份有限公司购买的商品菌剂中分离得到;哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) G30 分离自生防菌剂产品。

齐整小核菌(*Sclerotium rolfii*)分离自成都市青白江区花生田块中的发病植株;灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)分离自月季花瓣;茄镰孢(*Fusarium solani*)分离自牡丹田块中的发病植株。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

胶毒素标准品,青岛普瑞邦生物工程有限公司;真菌 DNA 提取试剂盒, Omega Biotek 公司;碱性磷酸酶检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;高效液相色谱配紫外检测器,安捷伦科技有限公司;C18 反相色谱柱 4.6 mm×250 mm×5 μm,青岛普瑞邦生物工程有限公司;电感耦合等离子发射光谱仪,岛津公司。

### 1.1.3 培养基

无机磷培养基(g/L):葡萄糖 10.00,硫酸铵 0.50,氯化钠 0.30,氯化钾 0.30,硫酸镁 0.03,硫酸亚铁 0.03,硫酸锰 0.03,磷酸钙 5.00,固体培养基需加琼脂粉 15.00。121 °C高温灭菌 20 min 后待用。

有机磷培养基(g/L):葡萄糖 10.00,硫酸铵 0.50,氯化钠 0.30,氯化钾 0.30,硫酸镁 0.03,硫酸亚铁 0.03,硫酸锰 0.03,碳酸钙 1.00,酵母粉 0.50,卵磷脂 0.20,固体培养基需加琼脂粉 15.00。121 °C高温灭菌 20 min 后待用。

β-1,3-葡聚糖酶检测培养基、嗜铁素检测培养基、纤维素酶检测培养基、淀粉酶检测培养基、酸性脲酶检测培养基、中性脲酶检测培养

基等其他生物学特性检测培养基制备方法参照文献[18]。

## 1.2 平板拮抗试验

将供试菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)平板培养基上,其中 *B. cinerea* 置于 21 °C 恒温箱中培养,其余供试菌株置于 28 °C 恒温箱中培养。培养 4–5 d 后用打孔器取直径为 0.5 cm 的菌块,将木霉菌块与植物病原真菌菌块对峙接种于同一个 PDA 平板培养基中,菌块间距 6 cm;与 *S. rolfii*、*F. solani* 对峙培养的平板置于 28 °C 恒温箱中培养;与 *B. cinerea* 对峙培养的平板置于 21 °C 恒温箱中培养。以单独接一种菌的平板作空白对照。每天定期测定菌株生长半径。每个实验重复 3 次。拮抗率(%)=[(空白对照中病原真菌生长半径–对峙培养中病原真菌生长半径)/空白对照中病原真菌生长半径]×100。用 DPS 统计软件进行统计分析(Tukey 法)。

## 1.3 木霉菌胶毒素合成基因的分子检测

将菌株 T23、T22、G30 接种于 PDA 平板培养基上,28 °C 培养 2 d,用接种环挑取新鲜菌丝接种到马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB)中,28 °C、120 r/min 振荡培养 2 d,用真空抽滤装置过滤收集菌丝体,分别置于灭菌研钵中,加入液氮研磨至粉末状,用真菌 DNA 提取试剂盒提取木霉菌全基因组 DNA,具体操作依照说明书进行。以提取的 DNA 作为模板,对木霉菌胶毒素合成基因簇内的 8 个基因进行 PCR 扩增,相关引物信息详见表 1,PCR 反应条件和体系参照实验室前期研究结果<sup>[19]</sup>。以菌株 T23 扩增产物作为阳性对照。

## 1.4 胶毒素的提取及检测

将供试菌株接种到 200 mL PDB 中,28 °C、120 r/min 振荡培养 48 h 后 10 000 r/min 离心 5 min,取上清并用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤

表 1 本研究所需引物相关信息

Table 1 Primers sequences used in this study

引物名称	引物序列	退火温度	预期片段大小
Primer name	Sequences (5'→3')	Annealing temperature (°C)	Expected product size (bp)
gliP-T23-F	AGACCCACCGACCCTTACG	60	828
gliP-T23-R	GCCCAACAGCTCCTTCTTC		
gliC-T23-F	CTTGGAGCTGAAAGTCCTTG	60	1 695
gliC-T23-R	ATCGGCTCGTCCATGTACC		
gliN-T23-F	CCGACCGTATCGACCTCTAC	58	1 005
gliN-T23-R	ATGGCCGACGCAACTCC		
gliK-T23-F	ATGGTCTGGTACTTTGCAT	60	806
gliK-T23-R	TTATCTCCCGTCTCCGCGAC		
gliI-T23-F	ATGCCCAACGACGCAGCC	60	1 509
gliI-T23-R	CTAGGCCTCCGCCCGGT		
gliG-T23-F	TTACTCGTGACCCAACTTGG	61	924
gliG-T23-R	ATGGAGCGTCCGGAAAACGT		
gliF-T23-F	CTGGTCAAGCTGGACAGC	60	301
gliF-T23-R	CATCTCATTGCCTGGCTGCG		
gliM-T23-F	TTAAGCCGGCCGAAGCTCAA	60	1 362
gliM-T23-R	ATGGCAGCATCTTCCACCGG		

F: 正向引物; R: 反向引物

F: Forward primers; R: Reverse primers.

培养液。加入等体积的乙酸乙酯萃取,将萃取液置于通风橱中挥干,用 2 mL 甲醇溶液复溶待测。取胶毒素对照品 1 mg,加入 2 mL 甲醇溶液,得到浓度为 0.5 mg/mL 的胶毒素对照品母液。取标准品母液用甲醇稀释至 0.2 mg/mL 待用。

对培养液中的胶毒素进行高效液相色谱检测的色谱条件:以水为流动相 A,甲醇为流动相 C,按照 60%水-40%甲醇进行等度洗脱;流速:1 mL/min;柱温:30 °C;进样量:20 µL;检测波长:254 nm。

### 1.5 温室接种试验

菌株 T23、T22、G30 分别与 *S. rolfisii* 菌块等量加入基质中充分混匀,花生种子进行消毒后播种于制备好的带菌基质中,每盆播种 30 粒种子,每个处理重复 3 次。以成苗率作为指标比较菌株 T23、T22、G30 对 *S. rolfisii* 的控病效果。用 DPS 统计软件进行统计分析(Tukey 法)。

分别配制菌株 T23、T22、G30、*B. cinerea*

分生孢子悬浮液,调节浓度至 10<sup>6</sup> 个/mL,取菌株 T23、T22、G30 分生孢子悬浮液分别与 *B. cinerea* 分生孢子悬浮液等体积混合,取 10 µL 混合液接种于月季花瓣中,25 °C 保温保湿培养,每 2 天观察发病情况。

### 1.6 解磷效果分析

将菌株 T23、T22、G30 分别接种于 250 mL 磷酸钙液体培养基中,26 °C、120 r/min 振荡培养,在培养 2、3、4、5、10 d 时分别取 20 mL 液体在室温条件下 8 000 r/min 离心 10 min,取上清并用孔径为 0.22 µm 的滤膜过滤,获得有效磷提取液。随后用电感耦合等离子发射光谱仪进行磷元素检测。以不接菌的空白磷酸钙培养液中的有效磷含量作为各菌株培养液中有效磷含量的初始值。用 DPS 统计软件进行统计分析(Tukey 法)。

### 1.7 其他生理生化特性分析

生物酶活性检测:分别将 T23、T22、G30 菌块接种于 β-1,3-葡聚糖酶、中性脲酶、酸性脲

酶、淀粉酶、嗜铁素、纤维素酶检测培养基中, 26 °C培养 6 d, 培养基出现水解圈, 说明菌株可以分泌相应的酶。

IAA 检测: 采用 Salkowski 比色法<sup>[20]</sup>测定各菌株产 IAA 能力。分别将 T23、T22、G30 菌株接种于液体培养基中, 26 °C、120 r/min 振荡培养 4 d, 取 20 mL 培养液加入等量的乙酸乙酯进行萃取, 置于通风橱中挥干得到待测样品, 用 2 mL 甲醇溶液溶解。取待测样品并加入等量的 S2 比色液混匀后避光静置 15–30 min 进行显色反应, 颜色变红说明菌株可以产生 IAA。以含 IAA 的培养液和空白培养液分别作为阳性对照和阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 T23、T22、G30 对不同植物病原真菌拮抗效果比较

平板拮抗实验结果如图 1 所示, 菌株 T23、T22、G30 对 *F. solani* 的拮抗率分别为 77%、74%、47%, 菌株 T23 与 T22 拮抗率无显著差

异, 均显著高于菌株 G30 的拮抗率; 菌株 T23、T22、G30 对 *S. rolfsii* 的拮抗率分别为 80%、67%、23%, 菌株 T23 对 *S. rolfsii* 的拮抗效果显著高于菌株 T22 及 G30; 菌株 T23 对 *B. cinerea* 的拮抗率为 93%, 显著高于菌株 T22、G30 对 *B. cinerea* 的拮抗率(分别为 61%、63%)。

### 2.2 菌株 T23、T22、G30 抗菌性天然产物检测及效果评价

胶毒素是部分木霉所产生的抑菌性天然产物。在前期研究中, 作者已经明确 T23 具有产生胶毒素的能力<sup>[21]</sup>。为了进一步明确菌株 T22、G30 是否也能产生胶毒素, 本研究对菌株 T22、G30 基因组中胶毒素合成基因簇中的 8 个基因进行了分子检测。结果发现, 在菌株 T22、G30 基因组中并不存在胶毒素合成调控相关的基因簇(图 2A)。利用高效液相色谱仪对这 3 株木霉菌株 48 h 培养液进行了胶毒素检测, 检测结果与分子检测结果相吻合, 菌株 T22、G30 培养液中均未检测到胶毒素(图 2B)。

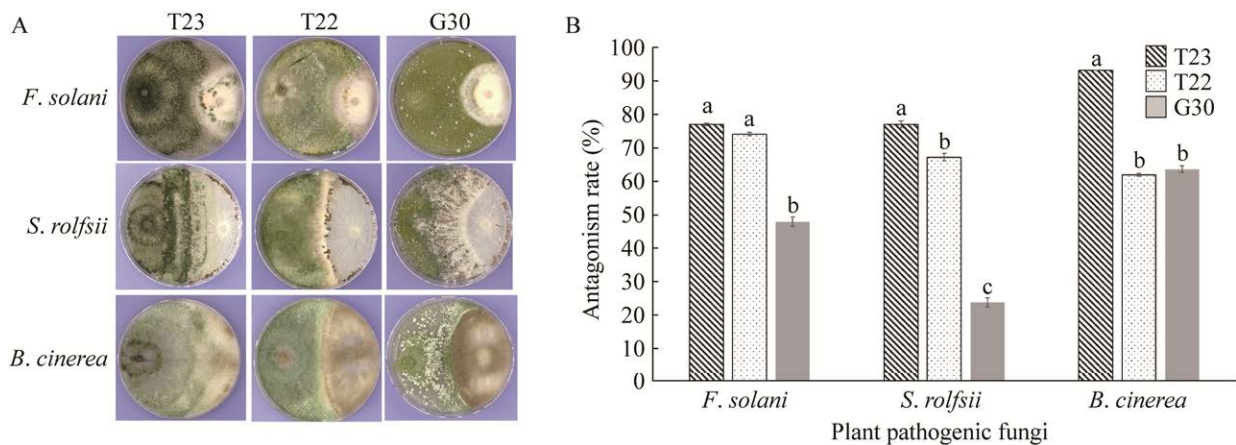


图 1 菌株 T23、T22 和 G30 对不同植物病原真菌的拮抗效果比较 A: 木霉菌 T23、T22 和 G30 对不同植物病原真菌的平板拮抗实验效果。B: 木霉菌 T23、T22 和 G30 对不同植物病原真菌的防效统计。不同小写字母代表差异显著( $P < 0.05$ )。下同

Figure 1 Antagonism effect of strains T23, T22 and G30 to different fungi. A: Antagonism effect of strains T23, T22 and G30 on different fungi. B: Control effect analysis of strains T23, T22 and G30 against different fungi. Different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). The same below.

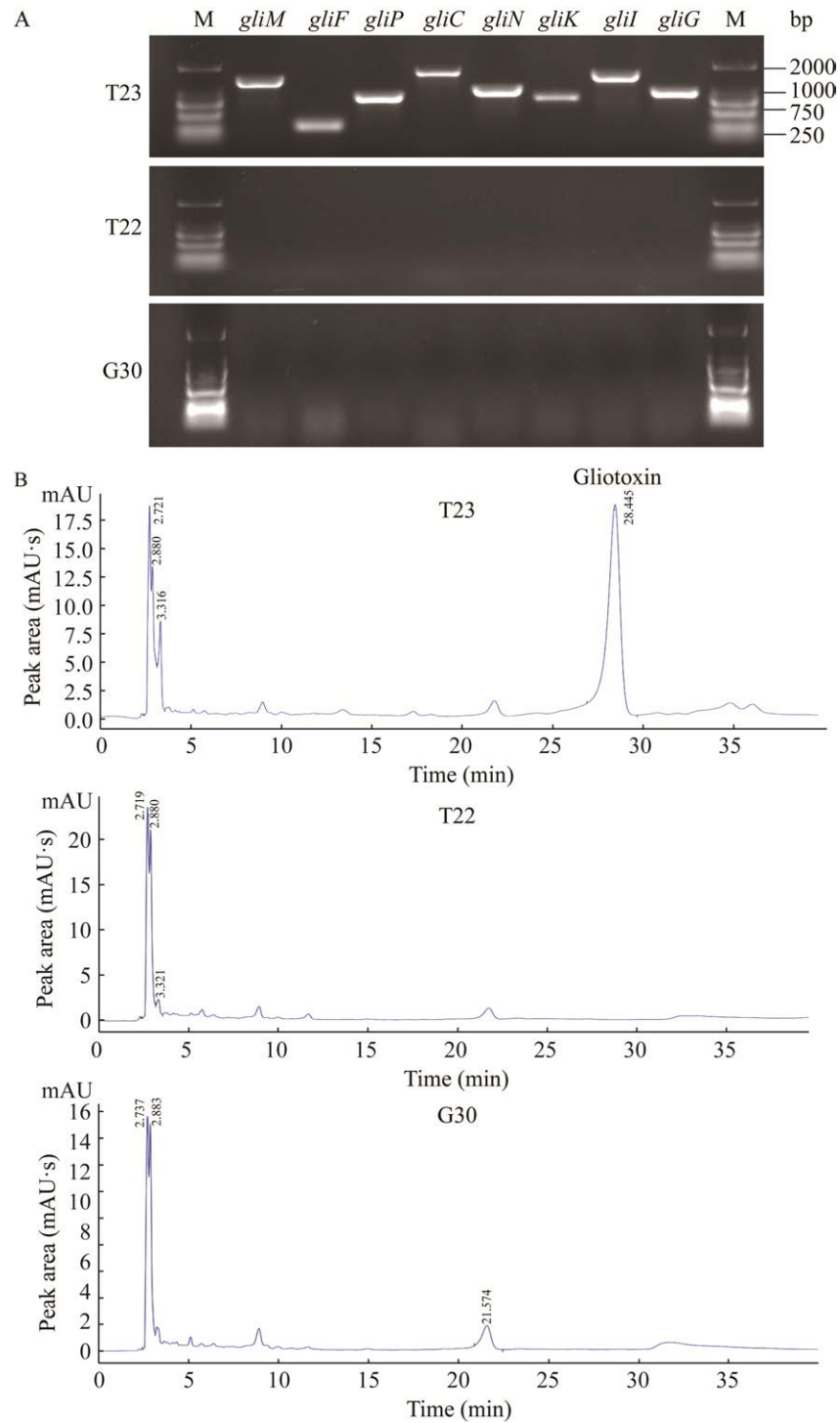


图 2 菌株 T23、T22 和 G30 胶毒素检测 A: 胶毒素合成调控基因分子检测. M: DNA Ladder DL2000; *gliM*、*gliF*、*gliP*、*gliC*、*gliN*、*gliK*、*gliI* 和 *gliG* 为胶毒素合成基因簇中的 8 个基因. B: 菌株 T23、T22 和 G30 培养液中的胶毒素检测

Figure 2 Gliotoxin detection of strains T23, T22 and G30. A: Molecular characterization of gliotoxin biosynthesistic gene cluster. M: DNA Ladder DL2000; *gliM*, *gliF*, *gliP*, *gliC*, *gliN*, *gliK*, *gliI*, *gliG* are genes including in gliotoxin biosynthesistic gene cluster. B: Gliotoxin detection of culture solutions from strains T23, T22 and G30.

$\beta$ -1,3-葡聚糖酶能降解真菌细胞壁中的 $\beta$ -1,3-葡聚糖,具有重要的生防价值。分别将T23、T22、G30菌块接种于 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶检测培养基中,培养6 d后在接种T23及T22的培养基中出现明显的水解圈,而接种菌株G30的培养基则无水解圈(图3),表明菌株T23与T22具有分泌 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的特性,而菌株G30则不产生 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶。

用打孔法检测菌株T23、T22和G30的48 h培养液萃取物对3种植物病原真菌的抑制

效果。结果显示,菌株T23培养液提取物对*S. rolfisii*、*B. cinerea*的抑菌率分别为40%、65%,显著高于菌株T22和G30提取物的抑菌率(图4)。

### 2.3 温室接种结果分析

温室接种试验结果发现,在接种*S. rolfisii*的病土中同时接种菌株T23后可显著提高花生在*S. rolfisii*胁迫下的成苗率,达68%;经菌株T22、G30处理后的花生,成苗率分别为26%、21%,显著低于菌株T23的处理效果(图5)。

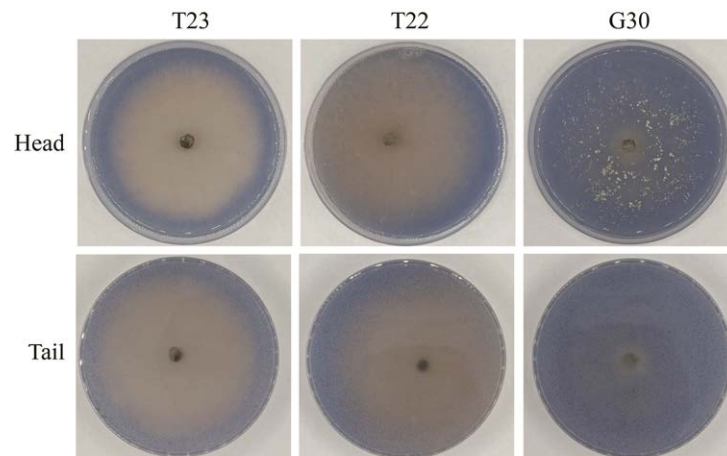


图3 菌株T23、T22和G30的 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶检测

Figure 3 Detection of  $\beta$ -1,3-glucanase of strains T23, T22 and G30.

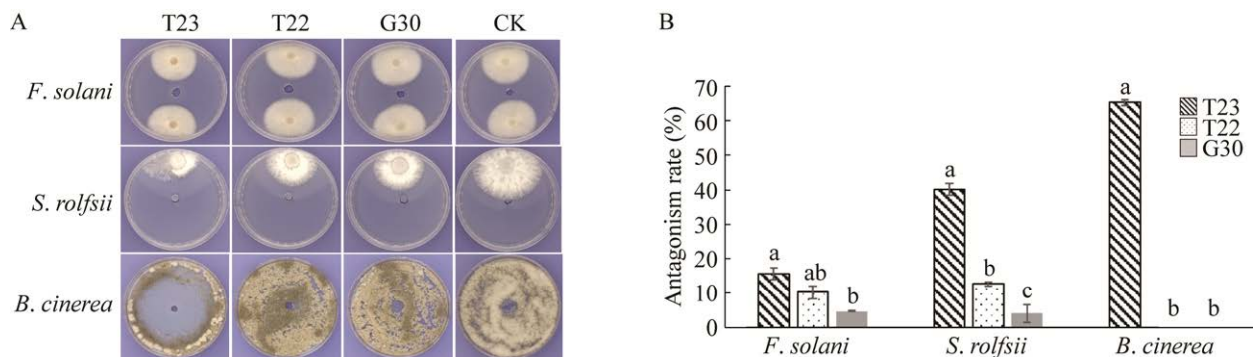


图4 菌株T23、T22和G30提取物对不同植物病原真菌的拮抗效果比较 A: 菌株T23、T22和G30提取物对不同植物病原真菌的平板拮抗实验效果. B: 菌株T23、T22和G30提取物对不同植物病原真菌的抑菌率统计

Figure 4 Antagonism effect of strains T23, T22 and G30 to different fungi. A: Antagonism effect of strains T23, T22 and G30 on different fungi. B: Inhibition rates of extracts from strains T23, T22 and G30 against different fungi.



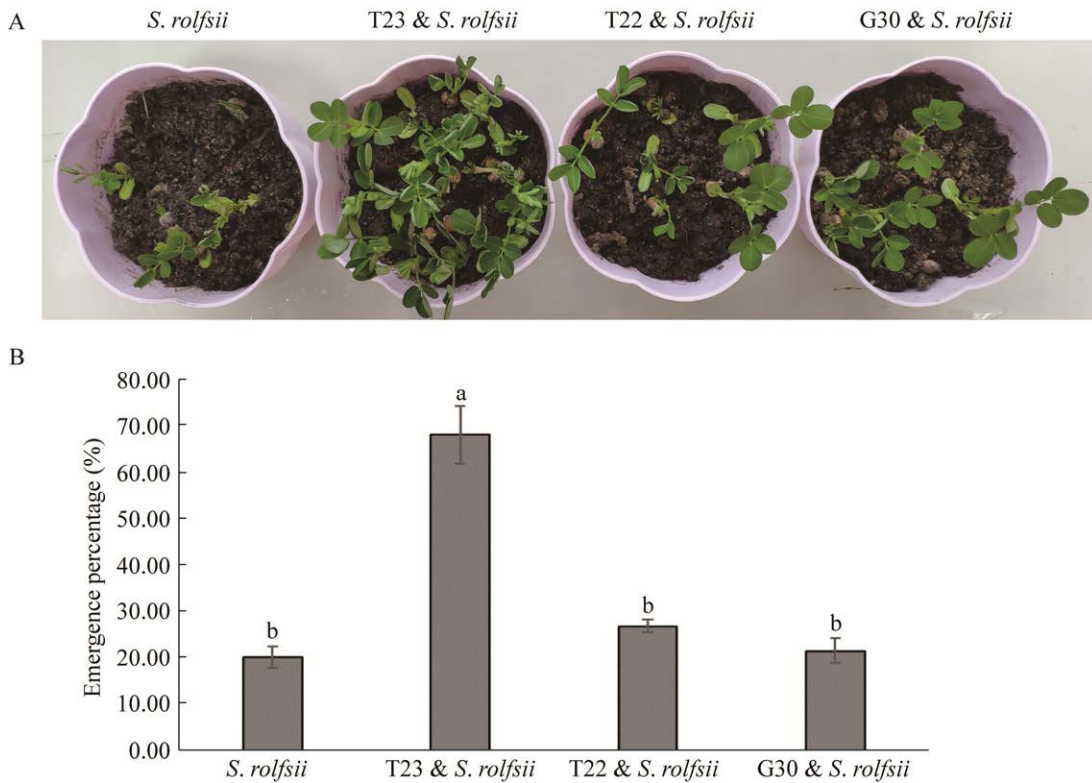


图 5 菌株 T23、T22 和 G30 对 *Sclerotium rolfsii* 防控效果比较 A: 菌株 T23、T22 和 G30 防控 *Sclerotium rolfsii* 盆栽实验. B: 与 A 相对应的不同处理的花生成苗率统计

Figure 5 Comparison of *Sclerotium rolfsii* control effect of strains T23, T22 and G30 on peanut. A: Pot experiment of control effect against *Sclerotium. rolfsii* treat with strains T23, T22 and G30. B: Emergence percentage analysis of different treatment corresponding to A.

取制备好的菌株 T23、T22、G30 与 *B. cinerea* 分生孢子混合悬浮液 10 μL 接种于月季花瓣中, 25 °C 保温保湿培养, 结果发现, 含菌株 G30 的分生孢子混合悬浮液接种后 48 h 开始发病, 发病时间仅比单独接种 *B. cinerea* 分生孢子悬浮液的对照处理晚 1 d; 含菌株 T23、T22 的分生孢子混合悬浮液接种的月季花瓣, 分别于接种后 16、14 d 发病(图 6)。

#### 2.4 解磷效果比较

将菌株 T23、T22、G30 分别接种于无机磷培养基、有机磷培养基中, 结果发现, 菌株 T23、T22、G30 在有机磷培养基中菌丝生长均显著受到抑制, 在无机磷培养基中的生长及产孢情

况与阳性对照组无显著差异(图 7A)。暗示着菌株 T23、T22、G30 均能利用难溶性无机磷进行生长。

定期检测菌株 T23、T22、G30 不同时间段培养液中有效磷含量, 结果显示, 菌株 T23 有效磷含量最高值(157 mg/L)出现在接种后 2 d, 随后急剧下降; 菌株 T22 接种后有效磷含量出现先下降后上升的趋势, 在接种后第 3-5 天有效磷含量保持在一个相对平稳的状态(分别为 88、90、82 mg/L); 菌株 G30 接种后有效磷含量最大值出现在接种后 5 d, 达到 207 mg/L, 随后下降。各菌株在接种后第 10 天培养液中的有效磷含量均低于初始值(图 7B)。

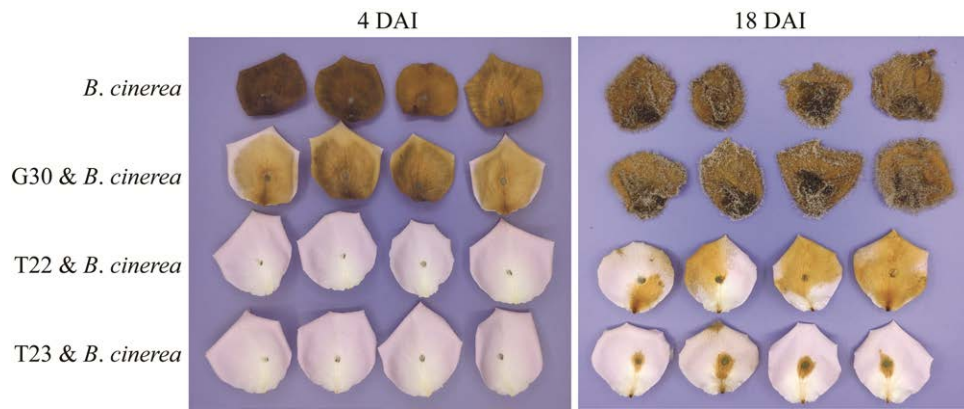


图 6 菌株 T23、T22 和 G30 对 *Botrytis cinerea* 防控效果比较 DAI: 接种后天数

Figure 6 Comparison of *Botrytis cinerea* control effect of strains T23, T22 and G30 on Chinese rose. DAI: Days after inoculation.

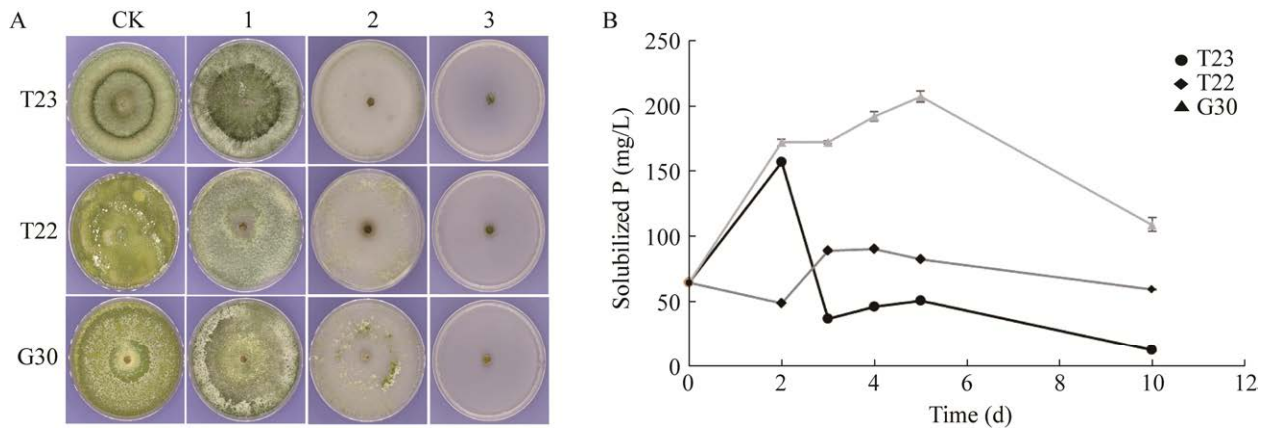


图 7 菌株 T23、T22 和 G30 对难溶性磷利用效果分析 A: 菌株 T23、T22 和 G30 在 PDA (CK)、磷酸钙(1)、卵磷脂(2)及无磷培养基(3)中的生长情况. B: 菌株 T23、T22 和 G30 培养液中有效磷含量检测 Figure 7 Insoluble phosphate utilization effect analysis of strains T23, T22 and G30. A: Morphology of strains T23, T22 and G30 on PDA (CK), tricalcium phosphate (1), phosphatidylcholine (2) and phosphorus free medium (3). B: Solubilized phosphorus detection of culture filtrate from strains T23, T22 and G30, respectively.

## 2.5 其他生理生化特性分析结果

对菌株 T23、T22 和 G30 其他生理生化特性进行了比较分析, 结果如表 2 所示, 除纤维素酶之外, 菌株 T23、T22 和 G30 在其他生理生化特性方面相似。

## 3 讨论与结论

不同的木霉菌功能差异显著<sup>[22-23]</sup>。绿木霉

(*T. virens*)和哈茨木霉(*T. harzianum*)因其对多种植物病原物具有拮抗功能而被广泛应用于生物防治中<sup>[24]</sup>。据报道, 菌株 T22 可诱导作物产生系统抗性<sup>[4,25]</sup>。菌株 T23 在多年的生产应用示范试验中防病增产效果稳定<sup>[26-28]</sup>。本研究对菌株 T23、T22、G30 的拮抗功能、部分代谢产物等生理生化特性进行了比较分析, 明确了菌株 T23、T22 和 G30 在生防、促生方面的特点及差异。

表 2 菌株 T23、T22 和 G30 其他生理生化特性鉴定

Table 2 Other physiological and biochemical features identification for strains T23, T22 and G30

菌株 Strains	吲哚乙酸 IAA	嗜铁素 Siderophore	纤维素酶 Cellulase	淀粉酶 Amylase	碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase	酸性脲酶 Acid urease	碱性脲酶 Alkaline urease
T23	+	-	+	+	+	-	-
T22	+	-	+	+	+	-	-
G30	+	-	-	+	+	-	-

+: Positive; -: Negative.

木霉通过产生多种天然产物来拮抗病原微生物, 其中由部分木霉产生的胶毒素是继青霉素后第 2 个在真菌中发现的具有抑制效果的天然产物<sup>[29]</sup>。在前期研究中, 作者团队对收集的木霉资源进行了胶毒素检测, 结果发现仅菌株 T23 能产生胶毒素, 同时在 T23 基因组中挖掘到调控胶毒素合成的基因簇, 明确了胶毒素对菌株 T23 生防作用的重要性<sup>[19,21,30]</sup>, 本文对 3 个木霉菌株培养液提取物进行了抑菌效果比较, 结果进一步验证了抑菌性天然产物的产生是菌株 T23 发挥其防病功能的重要因素。虽然已报道的生防木霉很多, 但是能产生胶毒素的木霉数量较少, 胶毒素合成基因簇如何进化而来, 以及胶毒素的产生是否是菌株适应环境的一种代价(fitness cost), 这些问题有待进一步探索。葡聚糖是真菌细胞壁的主要组成部分, 且大部分属于  $\beta$ -1,3-葡聚糖。有研究报道部分真菌可分泌  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶降解真菌细胞壁, 具有重要的医药价值<sup>[13,31]</sup>。本研究发现, 拮抗效果较显著的菌株 T23、T22 均可分泌  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶, 防病效果均优于不产  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的菌株 G30, 这可能是这类木霉的生防机制之一。

已有文献报道木霉对促进作物生长起着积极的作用, 对作物的促生机制包括活化土壤营养元素, 促进作物对养分的吸收与利用, 产生植物激素或挥发性物质, 以及促进作物生长<sup>[32-34]</sup>, 其中, 将土壤中的无效态磷转化成作物可吸收利用的有效磷是木霉的一个重要促生机制<sup>[35]</sup>。本

研究比较分析了菌株 T23、T22、G30 对难溶性磷酸钙的转化利用效果, 结果发现菌株 T23 的解磷效果与菌株 T22、G30 的具有较大差异, 在生长后期可溶性磷含量急剧下降, 菌株 T23 可能在磷胁迫条件下, 首先将溶解的磷满足自身的生长, 是否具备磷存储的功能有待进一步探索。对菌株 T23 解磷机制的深入研究可为其功能的进一步挖掘奠定基础。据报道, 菌株 T22 可侵染植物根部, 但不能侵染幼苗, 菌株 T22 通过与植物根系的共生互作促进根系及幼苗生长<sup>[36]</sup>, 菌株 T23 是否存在同样的机制有待系统深入研究。然而, 单一的研究无法全面揭示菌株 T23 控病促生机理, 有必要建立木霉-病原物-植物之间三者的互作系统, 较为全面地剖析菌株 T23 的控病促生机理。

通过比较分析, 我们对菌株 T23 的控病促生效果及生理生化特性有了进一步了解。与诱导作物产生抗性的菌株 T22 不同, 菌株 T23 通过产生抑菌性天然产物来拮抗病原真菌, 这为真菌源生物农药的开发提供了重要的来源。在促生方面, 菌株 T23 具有解磷、分泌 IAA 等促生潜力, 其无机磷转化机制有待进一步研究。结合多组学分析木霉-病原物-植物之间三者的互作机制, 可更好地开发利用 T23、实现 T23 多功能化提供信息。

REFERENCES

[1] HOWELL CR. Understanding the mechanisms employed by *Trichoderma virens* to effect biological control of cotton diseases[J]. *Phytopathology*, 2006, 96(2): 178-180.

- [2] TOMAH AA, ALAMER ISA, LI B, ZHANG JZ. A new species of *Trichoderma* and gliotoxin role: a new observation in enhancing biocontrol potential of *T. virens* against *Phytophthora capsici* on chili pepper[J]. *Biological Control*, 2020, 145: 104261.
- [3] 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.
- [4] ESCUDERO-LEYVA E, ALFARO-VARGAS P, MUÑOZ-ARRIETA R, CHARPENTIER-ALFARO C, GRANADOS-MONTERO MDM, VALVERDE-MADRIGAL KS, PÉREZ-VILLANUEVA M, MÉNDEZ-RIVERA M, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ CE, CHAVERRI P, MORA-VILLALOBOS JA. Tolerance and biological removal of fungicides by *Trichoderma* species isolated from the endosphere of wild *Rubiaceae* plants[J]. *Frontiers in Agronomy*, 2022, 3: 772170.
- [5] VITTI A, PELLEGRINI E, NALI C, LOVELLI S, SOFO A, VALERIO M, SCOPA A, NUZZACI M. *Trichoderma harzianum* T-22 induces systemic resistance in tomato infected by *Cucumber mosaic virus*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1520.
- [6] MUKHOPADHYAY R KUMAR D. *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential[J]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 2020, 30: 133.
- [7] 李作森, 何月秋, 夏贤仁. 5 个木霉菌株的抑菌谱及部分生物学特性[J]. *云南农业大学学报*, 2004, 19(3): 267-271.  
LI ZS, HE YQ, XIA XR. Inhibitory spectrum and partial biological traits of five *Trichoderma* isolates[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2004, 19(3): 267-271 (in Chinese).
- [8] HIRPARA DG, GAJERA HP, HIRPARA HZ, GOLAKIYA BA. Antipathy of *Trichoderma* against *Sclerotium rolfsii* sacc.: evaluation of cell wall-degrading enzymatic activities and molecular diversity analysis of antagonists[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(1): 22-28.
- [9] EZIASHI EI, UMA NU, ADEKUNLE AA, AIREDE CE. Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(9): 703-706.
- [10] MUKHERJEE PK, HORWITZ BA, KENERLEY CM. Secondary metabolism in *Trichoderma*: a genomic perspective[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2012, 158(Pt 1): 35-45.
- [11] BRIAN PW. The use of antibiotics for control of plant diseases caused by bacteria and fungi[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1954, 17(1): 142-151.
- [12] VINALE F, SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI EL, MARRA R, BARBETTI MJ, LI H, WOO SL, LORITO M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2008, 72: 80-86.
- [13] 陈秀玲, 李景富, 王傲雪.  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶及其在蔬菜抗真菌病害基因工程中的应用[J]. *东北农业大学学报*, 2008, 39(12): 118-124.  
CHEN XL, LI JF, WANG AX.  $\beta$ -1,3-glucanase and its application to genetic engineering of vegetables resistant to fungal pathogens[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2008, 39(12): 118-124 (in Chinese).
- [14] HARMAN GE, LORITO M, LYNCH JM. Uses of *Trichoderma* spp. to alleviate or remediate soil and water pollution[J]. *Advances in Applied Microbiology*, 2004, 56: 313-330.
- [15] TRIPATHI P, SINGH PC, MISHRA A, CHAUHAN PS, DWIVEDI S, BAIS RT, TRIPATHI RD. *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up[J]. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 2013, 15: 541-550.
- [16] KUMAR V, DWIVEDI SK. Bioremediation mechanism and potential of copper by actively growing fungus *Trichoderma lixii* CR700 isolated from electroplating wastewater[J]. *Journal of Environmental Management*, 2021, 277: 111370.
- [17] 李琼芳, 曾华兰, 叶鹏盛, 何炼, 谭永久. 哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) T23 生防菌筛选及防治中药材根腐病的研究[J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2007, 29(11): 119-122.  
LI QF, ZENG HL, YE PS, HE L, TAN YJ. Selection of *Trichoderma harzianum* T23 as a biocontrol agent and its application in root rot control in medicinal herbs[J]. *Journal of Southwest University: Natural Science Edition*, 2007, 29(11): 119-122 (in Chinese).
- [18] 陈丹梅. 产酶溶杆菌新株 *Lysobacter enzymogenes* LE16 的促生防病作用及机理[D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2020.  
CHEN DM. Growth-promoting and disease-preventing effects and mechanism of a new strain of *Lysobacter enzymogenes* LE16[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [19] 华丽霞, 何炼, 蒋秋平, 曾华兰, 叶鹏盛, 张敏, 刘朝辉, 韦树谷. 木霉菌 T23 胶毒素合成基因的生物信息学分析与克隆[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019,

- 38(3): 1079-1086.
- HUA LX, HE L, JIANG QP, ZENG HL, YE PS, ZHANG M, LIU ZH, WEI SG. Bioinformatics analysis and cloning of *Trichoderma* T23 toxin synthesis gene[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(3): 1079-1086 (in Chinese).
- [20] GANG S, SHARMA S, SARAF M, BUCK M, SCHUMACHER J. Analysis of indole-3-acetic acid (IAA) production in *Klebsiella* by LC-MS/MS and the salkowski method[J]. *Bio-protocol*, 2019, 9(9): e3230.
- [21] 华丽霞, 孙佩, 蒋秋平, 曾华兰, 叶鹏盛, 何炼, 曾静, 王明娟, 张敏, 罗飞, 杨晓丫, 何晓敏, 刘勇. 绿木霉(*Trichoderma virens*) T23 甲基转移酶基因 *gliN-T* 对胶毒素合成的调控研究[J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25(6): 75-81.
- HUA LX, SUN P, JIANG QP, ZENG HL, YE PS, HE L, ZENG J, WANG MJ, ZHANG M, LUO F, YANG XY, HE XM, LIU Y. Regulation effect of methyltransferase gene *gliN-T* on the gliotoxin synthesis regulation in *Trichoderma virens* T23[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(6): 75-81 (in Chinese).
- [22] SOOD M, KAPOOR D, KUMAR V, SHETIWIY MS, RAMAKRISHNAN M, LANDI M, ARANITI F, SHARMA A. *Trichoderma*: the “secrets” of a multitasking biocontrol agent[J]. *Plants*, 2020, 9(6): 762.
- [23] ZIN NA, BADALUDDIN NA. Biological function of *Trichoderma* spp. for agriculture applications[J]. *Annals of Agricultural Sciences*, 2020, 65(2): 168-178.
- [24] HARMAN GE. Overview of mechanisms and use of *Trichoderma* spp.[J]. *Phytopathology*, 2006, 96: 190-194.
- [25] ALINÇ T, CUSUMANO A, PERI E, TORTA L, COLAZZA S. *Trichoderma harzianum* strain T22 modulates direct defense of tomato plants in response to *Nezara viridula* feeding activity[J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2021, 47(4/5): 455-462.
- [26] 曾华兰, 叶鹏盛, 何炼, 李琼芳, 韦树谷. 木霉菌防治川芎根腐病的初步研究[J]. *西南农业学报*, 2005, 18(4): 427-430.
- ZENG HL, YE PS, HE L, LI QF, WEI SG. Preliminary study on the control effect of *Trichoderma* spp. to root rot disease in *Ligusticum Chuanxiong*[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2005, 18(4): 427-430 (in Chinese).
- [27] 曾华兰, 叶鹏盛, 李琼芳, 何炼, 岳福良. 哈茨木霉 T23 对花生的促生增产作用[J]. *云南农业大学学报*, 2005, 20(1): 145-146.
- ZENG HL, YE PS, LI QF, HE L, YUE FL. Effects of *Trichoderma harzianum* T23 on peanut yield[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2005, 20(1): 145-146 (in Chinese).
- [28] 曾华兰, 叶鹏盛, 李琼芳, 江怀仲. 利用木霉防治丹参根腐病的研究[J]. *四川农业大学学报*, 2003, 21(2): 142-144.
- ZENG HL, YE PS, LI QF, JIANG HZ. Study on Dan-Shen root rot disease and its control by *Trichoderma* spp.[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2003, 21(2): 142-144 (in Chinese).
- [29] SCHARF DH, BRAKHAGE AA, MUKHERJEE PK. Gliotoxin: bane or boon?[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(4): 1096-1109.
- [30] HUA L, ZENG H, HE L, JIANG Q, YE P, LIU Y, SUN X, ZHANG M. Gliotoxin is an important secondary metabolite involved in suppression of *Sclerotium rolfsii* of *Trichoderma virens* T23[J]. *Phytopathology*, 2021, 111(10): 1720-1725.
- [31] TAN YL, MA S, LEONHARD M, MOSER D, SCHNEIDER-STICKLER B.  $\beta$ -1,3-glucanase disrupts biofilm formation and increases antifungal susceptibility of *Candida albicans* DAY185[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 108: 942-946.
- [32] JOO JH, HUSSEIN KA. Biological control and plant growth promotion properties of volatile organic compound-producing antagonistic *Trichoderma* spp.[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 897668.
- [33] YOU JQ, LI GQ, LI CH, ZHU LH, YANG HJ, SONG RH, GU WH. Biological control and plant growth promotion by volatile organic compounds of *Trichoderma koningiopsis* T-51[J]. *Journal of Fungi* (Basel, Switzerland), 2022, 8(2): 131.
- [34] CONTRERAS-CORNEJO HA, MACÍAS-R ODRÍGUEZ 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*[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(3): 1579-1592.
- [35] SARAVANAKUMAR K, ARASU VS, KATHIRESAN K. Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*[J]. *Aquatic Botany*, 2013, 104: 101-105.
- [36] HARMAN GE, PETZOLDT R, COMIS A, CHEN J. Interactions between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*[J]. *Phytopathology*, 2004, 94(2): 147-153.