

研究报告

防治平贝母菌核病的木霉菌筛选及室内防效

王琪¹, 卢宝慧², 王志清¹, 田义新^{*1}¹ 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118² 吉林农业大学植物保护学院, 吉林 长春 130118

王琪, 卢宝慧, 王志清, 田义新. 防治平贝母菌核病的木霉菌筛选及室内防效[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2497-2507.

WANG Qi, LU Baohui, WANG Zhiqing, TIAN Yixin. Screening of *Trichoderma* spp. to control *Sclerotinia sclerotiorum*-induced sclerotiniase in *Fritilla ussuriensis* Maxim. and the laboratory control effect [J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2497-2507.

摘要:【背景】由病原菌 *Sclerotium denigrans* 侵染引起的平贝母菌核病是其主要的鳞茎病害之一, 给平贝母种植产业带来了巨大的损失。【目的】筛选出对平贝母菌核病具有拮抗效果的木霉菌株。【方法】以平贝母菌核病作为靶标菌, 采用平板对峙试验、平板对扣法、圆盘滤膜法与发酵液抑菌试验筛选对平贝母菌核病具有拮抗效果的木霉菌株。采用顶空固相微萃取的方法检测拮抗效果较好的木霉菌挥发性成分; 二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS)比色法测定木霉菌的 β -1,3 葡聚糖酶的活性; 室内防效试验验证其对平贝母菌核病的防治效果。【结果】平板对峙试验发现木霉菌 F1、F2 和 D6 对平贝母菌核病菌的生长具有较强的抑制作用, 其抑菌率分别为 91.06%、87.00% 和 86.12%; 平板对扣法发现木霉菌 E17 和 A26 对菌核病菌的抑制效果最为明显, 抑菌率分别为 74.96% 和 75.86%; 圆盘滤膜法发现菌核病菌在 F2、C6、D3、F4、A26、B30、D4 和 D6 的琼脂培养基上均不生长, 抑菌率达 100%; 发酵液抑菌试验表明木霉菌 D3 抑制效果最强, 可完全抑制菌核病菌的生长, 抑菌率为 100%; 对 A26、D4、E8、E17 和 D3 这 5 株木霉进行 GC/MS 挥发性产物分析, 在 E17 发现了具有抗真菌活性的 6-戊基-2H-吡喃-2-酮等活性物质; DNS 比色法发现 β -1,3 葡聚糖酶活性最高的木霉菌为 F1; 室内防效试验测定发现 D3 能明显抑制平贝母鳞茎菌核病的病变, 对平贝母菌核病具有潜在的生防活性。【结论】木霉菌 D3 在防治平贝母菌核病中是极具开发价值的菌种。

关键词: 平贝母; 菌核病; 木霉菌; 生物防治; 挥发性产物

资助项目: 吉林省科技厅重点研发项目(20200404014YY)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Science and Technology Department of Jilin Province (20200404014YY).

*Corresponding author. E-mail: tianyixin@jlau.edu.cn

Received: 2022-09-01; Accepted: 2022-10-10; Published online: 2022-11-19

Screening of *Trichoderma* spp. to control *Sclerotinia sclerotiorum*-induced sclerotiniase in *Fritilla ussuriensis* Maxim. and the laboratory control effect

WANG Qi¹, LU Baohui², WANG Zhiqing¹, TIAN Yixin^{*1}

1 College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

2 College of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

Abstract: [Background] *Sclerotinia sclerotiorum*-induced sclerotiniase in *Fritilla ussuriensis* is one of the main bulb diseases, which causes huge loss to the industry of *F. ussuriensis*. [Objective] To screen *Trichoderma* strains against *S. sclerotiorum*. [Methods] Eligible strains were identified based on plate confrontation assay, two-sealed-base-plates method, disc filter membrane method, and the test of the inhibitory effect of fermentation broth. Headspace solid-phase microextraction was used to detect the composition of volatile components of *Trichoderma* strains with better antagonistic effect. The β -1,3 glucanase activity of strains was assayed with the DNS method. Experiment on *in vitro* bulbs was carried out to verify the effect on *S. denigrans*. [Results] Strains F1, F2, and D6 had strong inhibitory effect on the growth of *S. denigrans* and the inhibition rates were 91.06%, 87.00%, and 86.12%, respectively. According to the disc filter membrane test, *S. denigrans* did not grow on the agar with F2, C6, D3, F4, A26, B30, D4, and D6 and the inhibition rate was up to 100%. The two-sealed-base-plates test indicated that E12 and A26 had the most obvious inhibitory effect, with the inhibition rates of 74.96% and 75.86%, separately. The test on the fermentation broth showed that D3 had the strongest inhibitory effect, which could completely inhibit the growth of *S. denigrans* (inhibition rate: 100%). The volatile products of A26, D4, E8, E17, and D3 were analyzed by GC/MC, and the antifungal active substances of E17 such as 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one were found. F1 was found to have the highest β -1,3 glucanase activity. According to the laboratory test, D3 can significantly inhibit the pathological changes of sclerotiniase in bulbs of *F. ussuriensis* and has potential biocontrol activity. [Conclusion] *Trichoderma* D3 has great potential for the control of *S. denigrans*.

Keywords: *Fritillaria ussuriensis* Maxim.; *Sclerotium denigrans*; *Trichoderma*; biological control; volatile products

平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)是百合科贝母属多年生草本植物,是中国东北特产药材之一。其鳞茎入药,性味辛、苦、平,有止咳化痰、润肺、散结的功效^[1]。近年来,平贝母的药用价值不断提高,种植面积也在逐步扩大,但土传病害菌核病的发生严重损害了种植平贝母农户们的经济效益^[2-3]。农药的使用可

以在一定范围内减轻病害,但随着药剂的使用,病原菌会逐渐出现耐药性,且残留农药也会对人们的健康造成危害,因此筛选出有效的生物药剂对平贝母菌核病的防治极为重要。

木霉菌具有生长速度快、分布广泛、对环境适应力强等优点^[4],主要用于预防和控制土壤传播的疾病^[5]。木霉菌对防治药用植物的鳞

茎病害已有较多报道,如哈茨木霉 T23、桔绿木霉 T56 对丹参的根腐病害具有较强的防治效果,且与多菌灵药剂的防治效果相当^[6]。康氏木霉、绿色木霉和哈茨木霉这 3 种木霉的非挥发和挥发性代谢产物具有较强的热稳定性,通过抑制病原菌菌丝干物质的积累,对肉苁蓉茎腐病具有明显的拮抗作用^[7]。然而,拮抗平贝母菌核病的木霉菌株鲜有报道,因此,本研究筛选对平贝母菌核病有较强拮抗作用的木霉菌株并进行室内防效测定,对其次生代谢产物和相关酶的酶活进行分析,以期防治平贝母菌核病的生物农药开发提供候选的菌株资源。

1 材料与方法

1.1 材料

平贝母菌核病菌(*Sclerotium denigrans*)由本实验分离、鉴定、保存;13 株木霉菌由吉林农业大学中药材院王志清老师提供,分别为哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) A17、D4、D6、E8,拟康氏木霉(*Trichoderma koningiopsis*) B30、F1、F2,钩状木霉(*Trichoderma hamatum*) A26、C6、F4,深绿木霉(*Trichoderma atroviride*) E17,短密木霉(*Trichoderma brevicompactum*) D3,装絮木霉(*Trichoderma tomentosum*) F3。用于室内防效检测的平贝母品种为“吉贝 1 号”。PDA 培养基^[8]用于菌丝培养;察氏培养基^[8]用于制备菌丝发酵液;种子培养基(g/L):马铃薯 200.0,硫酸铵 0.5,磷酸二氢钾 3.0,硫酸镁 0.5,硝酸铵 1.0,氯化钙 0.5,用于培养菌株孢子;产酶培养基(g/L):磷酸二氢钾 3.0,硫酸镁 1.0,氯化钙 0.5,氯化钠 0.5,用于生产 β -1,3 葡聚糖酶。

1.2 平板对峙试验

采用平板对峙法进行试验,先将平贝母菌核病菌的菌饼接种于 PDA 培养基中央进行,23 °C 培养 48 h 后,在培养基一侧接种已活化

好的平贝母菌核病菌菌饼,23 °C 培养 24 h 后,在培养基的另一侧接种木霉菌饼^[8],空白对照不接种木霉菌。每次实验 3 次重复,5 d 后采用十字交叉法测量平贝母菌核病菌的直径并按照公式计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%。$$

1.3 木霉菌的挥发性物质对平贝母菌核病菌的抑制作用测定

采用平板对扣法将平贝母菌核病菌的菌饼接种于 PDA 平板中央,25 °C 培养 1 d 后,用另一个中间接种木霉菌饼的 PDA 平板扣在病菌平板的顶部,以不接种木霉菌为对照。每个处理 3 次重复,23 °C 培养 7 d 后采用十字交叉法测量平贝母菌核病菌的直径并计算抑菌率。

1.4 木霉菌的非挥发性物质对平贝母菌核病菌的抑制作用测定

参照赵兴丽等^[9]的圆盘滤膜法,在 PDA 培养基中铺上双层玻璃纸,玻璃纸需浸泡在无菌水中进行灭菌。将木霉菌菌饼接种在 PDA 平板中央,待菌丝生长至满盘时,使用无菌镊子揭下玻璃纸,然后在平板中央接种菌核病菌菌饼,以不接种木霉菌为对照,每个处理设置 3 次重复,23 °C 培养 7 d 后采用十字交叉法测量平贝母菌核病菌的直径并计算抑菌率。

1.5 木霉菌发酵液对平贝母菌核病菌的抑制作用测定

在 100 mL 的三角瓶中装入 20 mL 液体察氏培养基,然后放入 3 个木霉菌株的菌饼,28 °C、180 r/min 培养 5 d,将菌液 10 000 r/min 离心 10 min,最后用 0.22 μm 的针孔微孔滤膜过滤上清液后,每 20 mL 的 PDA 培养基滴加 40 μL 的 25% 乳酸混合均匀,按照 1:9 的比例将发酵液与培养基混匀,制成含有发酵液的固体平板。将病原菌的菌饼接种于培养基中央,以含等体积无菌水的培养基为对照。每个处理重

复3次, 23 °C 培养5 d后测量病原菌直径并计算抑菌率。

1.6 木霉菌挥发性成分的 GC-MS 分析

选取挥发性物质抑菌率大于55%的木霉菌 A26、D3、D4、E8 和 E17, 打取活化好的菌饼接种在底部有5 mL PDA 的20 mL 顶空瓶中, 瓶口使用特氟龙螺旋盖封闭并加金属盖, 放置于28 °C 培养7 d, 以不接种木霉菌的顶空瓶为对照。采用顶空固相微萃取-气质联用的方法进行挥发性次级代谢产物的分析^[10-11]。

实验结果采用气相色谱-质谱联用仪进行定性分析, 使用 NIST2014 谱库和计算机检索技术, 对木霉菌的挥发性化学成分进行分离鉴定, 并应用气相色谱峰面积归一化法测定各成分的相对含量。

1.7 β -1,3 葡聚糖酶的酶活性测定

通过二硝基水杨酸(dinitrosalicylic acid, DNS)比色法测定木霉菌株的 β -1,3-葡聚糖酶^[12]活性。打取4个6 mm 经PDA 培养基平板活化的木霉菌饼, 接种于产酶培养基中30 °C、180 r/min 培养48 h后检测酶活性。取配制好的1 mg/mL 的昆布多糖溶液(40 °C 预热5 min) 500 μ L, 加入200 μ L 粗酶液, 40 °C 反应1 h后加入500 μ L DNS 溶液摇匀, 立即放入沸水浴中, 10 min 后

流水冷却至室温, 8 000 r/min 离心5 min 取上清液, 采用紫外可见分光光度计测定其 OD_{550} 值^[13], 以灭活酶液作为空白对照。酶活力定义: 在上述反应条件下每分钟生成1 μ mol 还原糖所需的酶量为1个活力单位(U)。

1.8 室内防效试验

制备木霉孢子悬浮液^[14] (1×10^7 个孢子/mL), 将平贝母鳞茎洗净擦干后, 在木霉菌的孢子悬浮液中浸泡12 h, 以无菌水浸泡为对照。取出平贝母待晾干后, 用灭菌后的牙签均匀地在鳞茎上插孔, 取活化3 d 的菌核病菌菌饼附在平贝母鳞茎的伤口上, 用无菌水浸湿无菌滤纸放在培养皿中, 将处理好的平贝母放在滤纸周围, 封口膜封好, 23 °C 培养20 d。

1.9 数据分析

数据分析采用 Microsoft Office Excel 2019 软件, 使用 SPSS 20 进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 平板对峙试验结果

平板对峙试验结果表明, 13 株木霉菌株均对平贝母病菌有不同程度的抑制作用(图1), 其中 F1 菌株对平贝母病菌的抑制率为91.06%, 拮抗效果明显高于其他菌株(表1)。5 d 时, 菌

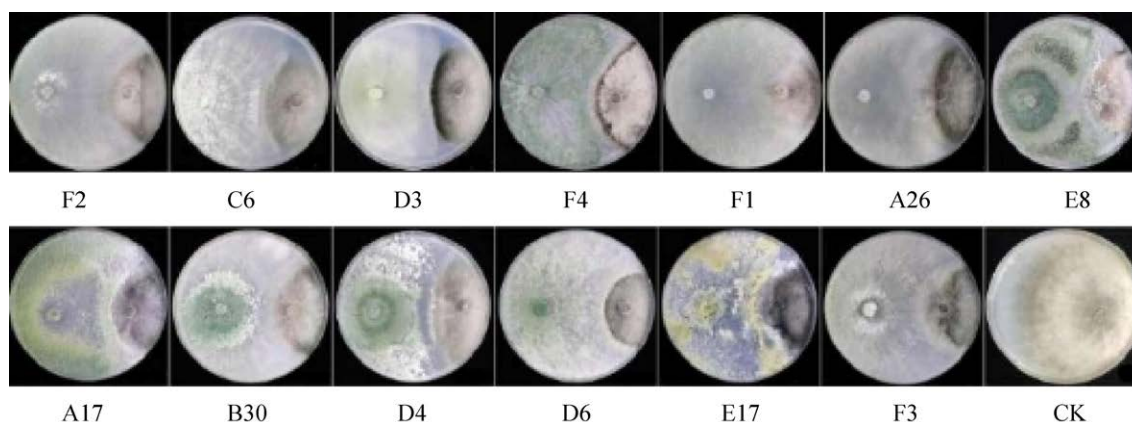


图1 不同木霉菌与平贝母菌核病菌的对峙培养

Figure 1 Confrontation culture of different *Trichoderma* strainst against *Sclerotium denigrans*.

表 1 木霉菌对平贝母菌核病菌的抑制作用

Table 1 Inhibitory of *Trichoderma* strains against *Sclerotium denigrans* (%)

拮抗菌株	平板对峙	挥发性物质	非挥发性物质	发酵液
Antagonistic strains	Flat confrontation	Volatile substances	Non-volatile substances	Fermentation broth
F2	87.00±1.14b	36.92±0.95a	100.00±0.00a	11.15±4.43f
C6	77.24±0.95g	44.27±2.28ab	100.00±0.00a	66.36±8.83b
D3	81.36±0.68cde	64.87±4.04e	100.00±0.00a	99.69±0.52a
F4	79.15±2.97efg	45.98±4.56abc	100.00±0.00a	24.84±3.74e
F1	91.06±1.33 a	51.00±1.44bc	14.59±0.80d	38.30±2.63d
A26	80.10±1.63def	75.86±3.72f	100.00±0.00a	18.06±5.98ef
E8	82.12±1.83cd	61.14±1.46de	0.49±0.01e	25.09±2.85e
A17	82.88±0.68cd	55.45±2.64cd	51.16±1.59b	70.39±6.75b
B30	83.33±0.79c	46.02±5.13abc	100.00±0.00a	54.54±4.70c
D4	80.54±0.61cde	55.45±0.69cd	100.00±0.00a	95.09±4.94a
D6	86.12±2.38b	53.47±3.31bcd	100.00±0.00a	100.00±0.00a
E17	82.50±1.817cd	74.96±2.57f	54.53±16.16c	45.45±9.86dc
F3	77.50±1.14fg	48.99±1.55bc	14.12±1.36d	26.42±7.36e

同一列不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Different lowercase letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

株 D3、F4、D6、A26 和 E17 与菌核病菌交界处产生褐变; 而且 F1 可沿菌核病菌继续生长, 直至将菌核病菌全部被覆盖。

2.2 木霉菌的挥发性物质对平贝母菌核病菌的拮抗效果

平板对扣法结果表明, 13 株木霉菌的挥发性物质对病原菌均有不同程度的抑制(图 2), 其中木霉菌株 E17 和 A26 的抑制效果最为明显, 抑菌率分别为 74.96%和 75.86%, 显著高于其他

菌株($P<0.05$); 木霉菌株 D3、D4、D6、A17、E8 和 F1 的抑制效果也较好, 抑菌率在 50%–65%范围内; 剩余其他木霉菌株的挥发性物质的抑菌率均在 50%以下(表 1)。

2.3 木霉菌的非挥发性物质对平贝母菌核病菌的拮抗效果

通过圆盘滤膜法筛选出 8 株对平贝母菌核病菌抑制作用较强的木霉菌株, 分别为菌株 F2、C6、D3、F4、A26、B30、D4 和 D6。菌

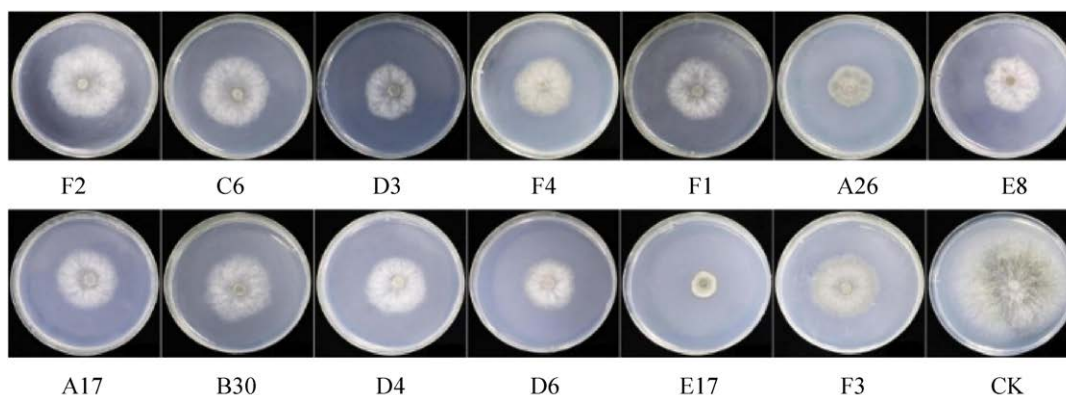


图 2 木霉菌株的挥发性代谢产物对病原菌的抑制作用

Figure 2 Inhibitory of volatile substances of *Trichoderma* stains against *Sclerotium denigrans*.

核病菌在以上 8 株木霉菌株的非挥发物质作用下均不产生菌丝。木霉菌株 A17、F1、E8、E17 和 F3 的非挥发性物质对平贝母菌核病菌的抑制效果较差(图 3 和表 1)。

2.4 发酵液对平贝母菌核病菌的拮抗效果

通过发酵液抑菌试验发现, 13 株木霉菌中 D3、D4 和 D6 的抑制效果最强, 可明显抑制病原菌的生长, 抑菌率均在 95% 以上。其次是 A17 和 C6, 抑菌率分别为 70.39% 和 66.36%, 且 C6 可使病菌菌落呈现不规则形状(图 4 和表 1)。

2.5 木霉的挥发性代谢产物组成

运用顶空固相微萃取-气质联用的方法检测了 A26、D3、E8、E17 和 D4 这 5 株木霉的挥发性代谢产物种类(表 2)。通过对 NIST14 谱

库搜索和解析, 从 5 株木霉中共鉴定出 45 种挥发性物质, 就种类多样性而言, 木霉产生的挥发性物质主要是醛类、酮类, 然后是烯类、醇类酯类和烷类。其中, A26 的特异性产物有 6 种, D3 的特异性产物有 2 种, D4 的特异性产物有 4 种, E8 的特异性产物有 3 种, E17 的特异性产物共有 11 种。

2.6 木霉菌酶活性分析

由图 5 可知, β -1,3 葡聚糖酶活性最高的是木霉菌株 F1, 其活性为 0.90 U/mL; 木霉菌株 D4 和 D3 的 β -1,3 葡聚糖酶活性也相对较高, 其活性分别为 0.88 U/mL 和 0.68 U/mL; 而其他木霉菌株 F2、B30、C6、F4、D6、A17 和 A26 的酶活性比前 3 个木霉菌株相对较低。

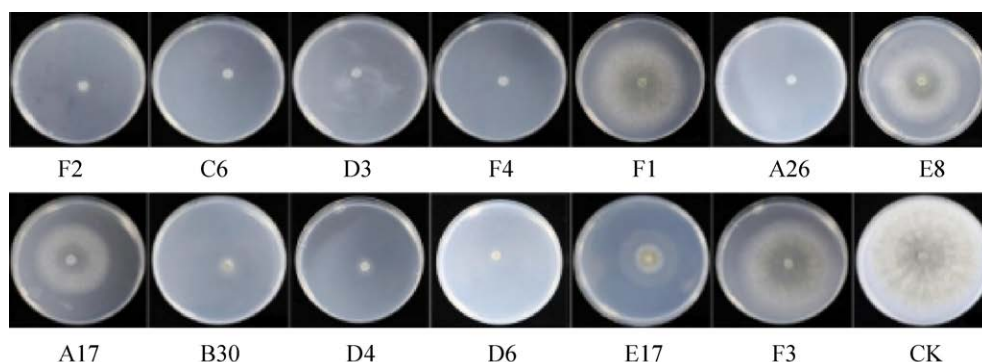


图 3 木霉菌的非挥发性代谢成分对病原菌的抑制作用

Figure 3 Inhibitory of non-volatile substances of *Trichoderma* strains against *Sclerotium denigrans*.

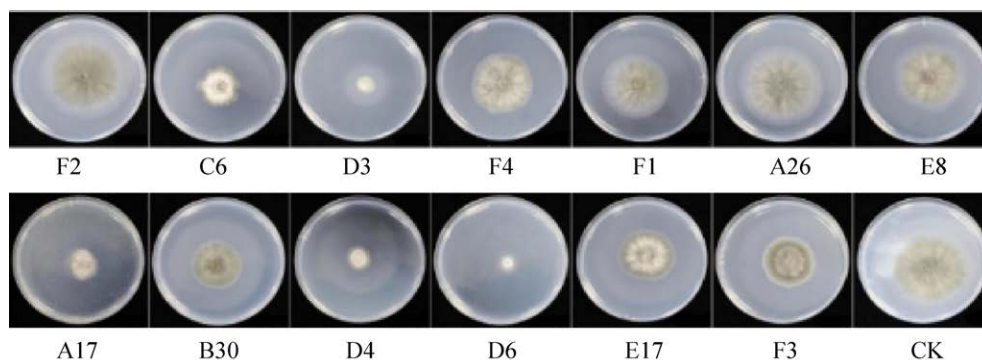


图 4 木霉菌发酵液对病原菌的抑制作用

Figure 4 Inhibitory of metabolites of *Trichoderma* strains against *Sclerotium denigrans*.

表 2 木霉菌株的挥发性产物名称、分子式和相对峰面积占比

Table 2 Names, chemical formulas, and relative content of volatile products of *Trichoderma* strains

名称 Name	分子式 Molecular formula	相对峰面积 Relative content (%)				
		A26	D3	D4	E8	E17
丙醇 1-propanol	C ₃ H ₈ O	0.21	0.3	0.20	0.41	0.41
乙酸乙酯 Ethyl acetate	C ₄ H ₈ O ₂	0.18	0.97	0.31	0.65	0.28
异丁醇 Isobutanol	C ₄ H ₁₀ O	0.47	0.39	0.20	0.53	0.44
异戊醛 Isovaleraldehyde	C ₅ H ₁₀ O	0.03	0.46	0.02	0.02	0.06
2-甲基丁醛 2-methylbutanal	C ₅ H ₁₀ O	—	0.24	0.03	0.03	0.09
3-辛酮 3-octanone	C ₈ H ₁₆ O	0.02	0.05	0.08	0.01	—
异戊醇 3-methyl-1-butanol	C ₅ H ₁₂ O	—	0.03	0.05	0.19	0.19
苯乙醛 Phenylacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	—	0.03	—	0.02	0.01
2-庚烯醛 Trans-2-heptenal	C ₇ H ₁₂ O	0.01	—	—	—	0.02
甲基丙酸乙酯 Ethyl isobutyrate	C ₆ H ₁₂ O ₂	—	0.01	—	0.02	—
丙酸乙酯 n-ethyl propanoate	C ₅ H ₁₀ O ₂	—	—	—	0.01	0.01
草氨酸乙酯 Ethyl oxamate	C ₄ H ₇ NO ₃	—	0.16	0.05	0.05	—
己醛 Hexanal	C ₆ H ₁₂ O	0.02	—	—	—	0.11
天然壬醛 Nonyl aldehyde	C ₉ H ₁₈ O	0.01	—	—	—	0.01
乙醛酸 Glyoxylic acid	C ₂ H ₂ O ₃	—	—	0.05	—	0.09
正戊醛 Valeraldehyde	C ₅ H ₁₀ O	0.42	—	—	—	0.04
3-甲基戊烷 3-methylpentane	C ₆ H ₁₄	—	—	0.09	—	—
2,2,3-三甲基丁烷 2,2,3-trimethylbutane	C ₇ H ₁₆	—	—	0.07	—	—
乙酸 Acetic acid	C ₂ H ₄ O ₂	—	—	0.03	—	0.06
3-辛醇 3-octanol	C ₈ H ₁₈ O	—	—	0.01	—	—
辛醛 Octyl aldehyde	C ₈ H ₁₆ O	0.01	—	—	—	—
反式-2-辛烯醛 Trans-2-octen-1-al	C ₈ H ₁₄ O	0.01	—	—	—	0.02
新植二烯 Neophytadiene	C ₂₀ H ₃₈	0.11	—	—	—	—
5-甲基-2-庚胺 5-methyl-2-heptanamine	C ₈ H ₁₉ N	1.38	—	—	—	—
2,3-二甲基-1-戊醇 1-pentanol,2,3-dimethyl	C ₇ H ₁₆ O	0.13	—	—	—	—
1,3-辛二烯 1,3-octadene	C ₈ H ₁₄	0.19	—	—	—	—
3-亚甲基-6-(1-甲基乙基)环己烯 3-methylene-6-(1-methylethyl)-cyclohexene	C ₁₀ H ₁₆	0.15	—	—	—	—
二甲胺 Dimethylamine	C ₂ H ₇ N	—	0.04	—	—	—
1,3-二羟基丙酮 1,3-dihydroxyacetone	C ₃ H ₆ O ₃	—	1.28	—	—	—
2,3-丁二酮 Butane-2,3-dione	C ₄ H ₆ O ₂	—	—	—	0.12	—
3-甲基-2-戊酮 3-methyl-2-pentanone	C ₆ H ₁₂ O	—	—	—	0.02	—
3-羟基-2-丁酮 3-hydroxy-2-butanone	C ₄ H ₈ O ₂	—	—	—	0.10	—
1-戊烯-3-酮 1-penten-3-one	C ₅ H ₈ O	—	—	—	—	0.04
5,5-二甲基-(Z)-2-己烯 5,5-dimethyl-(Z)-2-hexene	C ₈ H ₁₆	—	—	—	—	0.02
2-甲基戊醛 2-methylvaleraldehyde	C ₆ H ₁₂ O	—	—	—	—	0.03
反式-2-戊烯醇 (E)-2-pentenal	C ₅ H ₈ O	—	—	—	—	0.02
2-异丙基丁醛 2-isopropylbutanal	C ₇ H ₁₄ O	—	—	—	—	0.09
S(-)-2-甲基-1-丁醇 S(-)-2-methylbutanol	C ₅ H ₁₂ O	—	—	—	—	0.04
丁酸乙酯 Ethyl butanoate	C ₆ H ₁₂ O ₂	—	—	—	—	0.15
3,4,5-三甲基庚烷 3,4,5-trimethylheptane	C ₁₀ H ₂₂	—	—	—	—	0.01
2-庚酮 2-heptanone	C ₇ H ₁₄ O	—	—	—	—	0.03

(待续)

(续表 2)

名称 Name	分子式 Molecular formula	相对峰面积 Relative content (%)				
		A26	D3	D4	E8	E17
6-戊基-2H-吡喃-2-酮 6-pentyl-2H-pyran-2-one	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	—	—	—	—	0.14
2-甲基戊醛 2-methylbutanal	C ₅ H ₁₀ O	—	—	—	—	0.03
2-正戊基呋喃 2-pentylfuran	C ₉ H ₁₄ O	0.11	—	—	—	0.12
乙酸 3-辛酯 3-octyl acetate	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	—	0.01	0.06	—	—

—: 未含此成分
—: It does not contain this ingredient.

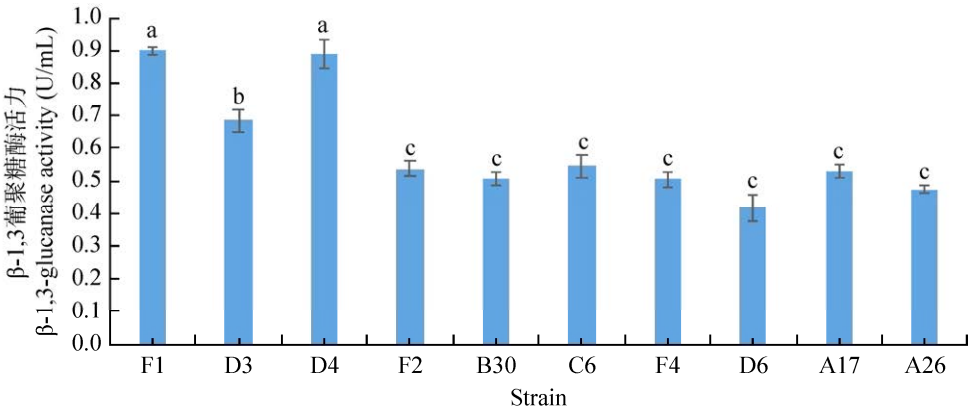


图 5 不同木霉菌的 β -1,3 葡聚糖酶活性
Figure 5 β -1,3-glucanase activity of different *Trichoderma*.

2.7 木霉菌室内防效测定结果

对 13 株木霉进行室内防效试验(图 6), 经过 20 d 的保湿培养发现, D3 对平贝母菌核病菌的抑制作用最强; F1 木霉孢子悬浮液浸泡过的平贝母表面变黑并附着少量菌丝; F2、C6、F4、A26、E8、A17、B30、E17 和 F3 处理后的

平贝母的平均病变面积均在 50%以上; D4、和 D6 木霉孢子悬浮液浸泡过的平贝母开裂, 鳞茎变软腐烂变黑; 而浸泡在 D3 的木霉孢子悬浮液的鳞茎表面微变黄, 并无病变和菌丝生长。因此, 菌株 D3 可以作为平贝母菌核病生物防治的候选菌株。

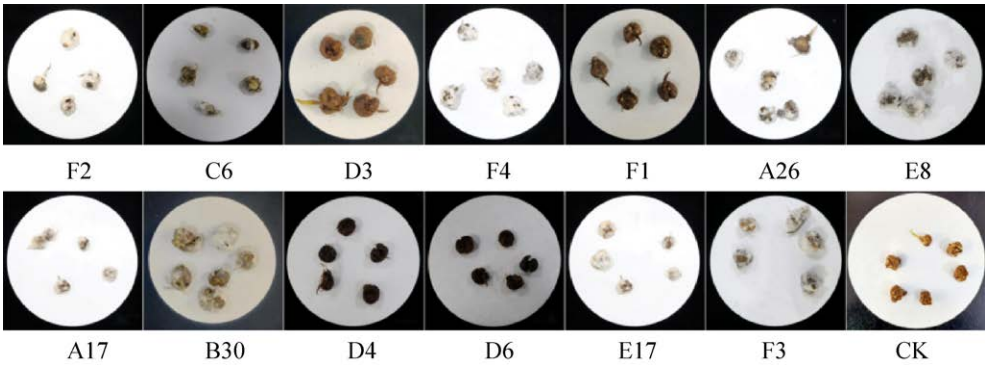


图 6 不同木霉菌株对平贝母菌核病菌的防治效果
Figure 6 The control effect of different *Trichoderma* strains on *Sclerotium denigrans*.

3 讨论与结论

目前, 平贝母菌核病的防治主要采用化学防治, 国内对于木霉防治平贝母菌核病少见报道, 但是利用木霉菌防治其他作物的菌核病已有较多的报道。例如, 利用拟康木霉防治花生菌核病, 发现拟康木霉 TM 通过重寄生过程中产生抗菌类代谢产物协同消解花生菌核病菌菌丝, 从而抑制菌核形成^[15]; 木霉菌株 T76-12/2 的非挥发性成分可有效抑制菹菹菌核病菌 (*Sclerotium* sp.) 菌丝的生长, 其发酵液也可使病原菌丝表面皱缩, 抑制菌丝生长^[16]。

木霉菌对病原菌的防治有多种作用机制, 通常是几种生防机制的协同作用^[17], 且其产生的挥发性产物和非挥发性产物极为丰富。6-戊基-2H-吡喃-2-酮(6-pentyl-2H-pyran-2-one)为甜椰子状香味的聚酮化合物, 最早在绿色木霉的挥发性产物中发现, 已被证实具有抗真菌活性作用^[10]。在本研究中, 通过平板对扣法筛选出 5 株挥发性物质抑菌作用较强的木霉菌株 E8、D4、D3、A26 和 E17, 对其挥发性产物进行分析发现, E17 的挥发性产物中含有 6-戊基-2H-吡喃-2-酮、与抗真菌活性有关的物质 2-正戊基呋喃和作为杀虫剂中间体的 2-甲基戊醛^[18]; 在 A26 的挥发性产物中发现含有 2-正戊基呋喃和具有抗炎和抗氧化作用的新植二烯^[19]。Johan 等^[20]通过对深绿木霉 P1 菌株的挥发性物质进行分析, 发现 P1 菌株除合成吡喃酮外还产生烷烃类、醇类、酮类等化合物, 其中 3-辛醇、3-辛酮为脂肪酸代谢的终产物, 被认为可能与调控真菌发育和菌落间的通讯有关。在本实验中, E8、D4、D3 和 A26 的挥发性产物中均含有 3-辛酮, 其中 D4 还含有 3-辛醇, D3 中含有作为农药重要中间体的二甲胺。

李小杰等^[21]使用平板对扣法和圆盘滤膜法分别测定了拟康宁木霉菌和绿木霉菌对烟草疫

霉菌的抑制作用, 发现 2 株木霉菌的挥发性产物抑制率为 12.86%和 22.98%, 而非挥发性产物的抑制率为 50.00%和 67.95%。本研究中 8 株木霉 F2、C6、D3、F4、A26、B30、D4 和 D6 的非挥发性产物的抑菌率均为 100%, 抑制效果均大于其挥发性产物, 研究结果与李小杰等^[21]、张丽荣等^[22]一致。木霉菌会产生非常复杂的葡聚糖酶, 而 β -1,3 葡聚糖酶是一类作用于 β -1,3 糖苷键的水解酶, 可破坏植物病原真菌的细胞壁^[12]。本实验筛选的木霉中均检测到 β -1,3 葡聚糖酶的活性, 且活性最高的为菌株 F1。

各类拮抗试验以及对葡聚糖酶测定的实验结果综合表明木霉菌防病机制复杂多样, 因此, 筛选评价一个木霉菌菌株时应当考虑各方面相互的协同作用及外界因素影响。本实验发现木霉菌 D3 的综合拮抗能力最强, 并且其孢子悬浮液能明显抑制菌核病在平贝母鳞茎上的病变。因此, 木霉菌株 D3 在防治平贝母菌核病方面具有良好的生防潜力和应用前景。

REFERENCES

- [1] 陈虞超, 郭生虎, 关雅静, 李明, 安钰, 刘华. 贝母属药用植物研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(18): 6198-6206.
CHEN YC, GUO SH, GUAN YJ, LI M, AN Y, LIU H. The research progress of medicinal plants *Fritillaria*[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(18): 6198-6206 (in Chinese).
- [2] 由士江, 于洪君, 李双福. 平贝母菌核病的防治研究[J]. 吉林林业科技, 2005, 34(3): 27-29.
YOU SJ, YU HJ, LI SF. Research on controlling sclerotium disease of *Fritillaria ussuriensis*[J]. Forestry Science and Technology, 2005, 34(3): 27-29 (in Chinese).
- [3] 宋小双, 遇文婧, 尹大川, 周琦, 邓勋. 平贝黑腐病病原菌分离鉴定和生物学特性的初步研究[J]. 中国森林病虫, 2016, 35(3): 7-11.
SONG XS, YU WJ, YIN DC, ZHOU Q, DENG X. Pathogen identification and bionomics of the black rot of *Fritillaria ussuriensis*[J]. Forest Pest and Disease, 2016,

- 35(3): 7-11 (in Chinese).
- [4] 邹佳迅, 范晓旭, 宋福强. 木霉(*Trichoderma* spp.)对植物土传病害生防机制的研究进展[J]. 大豆科学, 2017, 36(6): 970-977.
- ZOU JX, FAN XX, SONG FQ. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* spp. against soilborn plant disease[J]. Soybean Science, 2017, 36(6): 970-977 (in Chinese).
- [5] 李冠霖, 徐洋, 邢鹏杰, 高婷婷, 冀瑞卿. 木霉对不同香菇菌丝体生长阶段的致病性及生防制剂对其的抑制效果[J]. 分子植物育种, 2019, 17(19): 6530-6534.
- LI GL, XU Y, XING PJ, GAO TT, JI RQ. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. to *Lentinula edodes* and the inhibitory effects of biocontrol agents[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(19): 6530-6534 (in Chinese).
- [6] 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).
- [7] 程齐来, 陈君, 于晶. 木霉菌对荒漠肉苁蓉茎腐病菌的拮抗作用[J]. 中药研究与信息, 2005, 7(8): 16-18.
- CHENG QL, CHEN J, YU J. Primary study on the antagonism of *Trichoderma* species on pathogen of *Cistanche deserticola* stem rot[J]. Research & Information of Traditional Chinese Medicine, 2005, 7(8): 16-18 (in Chinese).
- [8] 王子晴, 卢宝慧, 田义新, 王玉珍, 张敏, 权兴周, 赵光远, 陈磊, 王志清. 拮抗北细辛菌核病木霉菌的分离、鉴定及生防效果[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4624-4635.
- WANG ZQ, LU BH, TIAN YX, WANG YZ, ZHANG M, QUAN XZ, ZHAO GY, CHEN L, WANG ZQ. isolation, identification and biocontrol effect of *Trichoderma* antagonistic to *Sclerotinia* disease of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4624-4635 (in Chinese).
- [9] 赵兴丽, 陶刚, 姜璇, 顾金刚. 钩状木霉在辣椒根际定殖动态及其对辣椒疫病的生物防治[J]. 中国农业科技导报, 2020, 22(5): 106-114.
- ZHAO XL, TAO G, LOU X, GU JG. Colonization dynamics of *Trichoderma hamatum* in pepper rhizosphere and its biological control against pepper *Phytophthora* blight[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2020, 22(5): 106-114 (in Chinese).
- [10] 陶玲芸, 张怡雯, 李雅乾, 罗来鹏, 张曾鲁, 陈捷. 棘孢木霉挥发性次级代谢产物检测及抑菌活性分析[J]. 生物工程学报, 2020, 36(6): 1181-1189.
- TAO LY, ZHANG YW, LI YQ, LUO LP, ZHANG ZL, CHEN J. Antagonistic activity of volatile metabolites from *Trichoderma asperellum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2020, 36(6): 1181-1189 (in Chinese).
- [11] 扈进冬, 隋丽娜, 李玲, 陈凯, 李纪顺. 深绿木霉 HB20111 产挥发性物质及其功能分析[J]. 植物保护, 2021, 47(5): 58-63.
- HU JD, SUI LN, LI L, CHEN K, LI JS. Identification and functional an analysis of volatile organic compounds from *Trichoderma atroviride* HE20111[J]. Plant Protection, 2021, 47(5): 58-63 (in Chinese).
- [12] 杨合同, 肖性龙, 徐砚珂. 木霉菌平板抗菌、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性与病害防治效果[J]. 山东科学, 2003, 16(2): 1-6.
- YANG HT, XIAO XL, XU YK. *In vitro* inhibition, chitinase and β -1,3-glucanase production of *Trichoderma* spp. and their biocontrol activity[J]. Shandong Science, 2003, 16(2): 1-6 (in Chinese).
- [13] 唐治玉, 王淮, 熊善柏, 王琳. β -1,3-葡聚糖酶产生菌的筛选及其产酶条件[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(5): 552-556.
- TANG ZY, WANG H, XIONG SB, WANG L. Studies on the screening of β -1,3-glucanase producing strain sand enzyme producing condition[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2006, 32(5): 552-556 (in Chinese).
- [14] 张静雅, 李欣雨, 张成, 王伟伟, 张鹏, 侯巨梅, 刘铜. 木薯炭疽病拮抗木霉菌筛选与室内防效研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 115-124.
- ZHANG JY, LI XY, ZHANG C, WANG WW, ZHANG P, HOU JM, LIU T. Screening of antagonistic *Trichoderma* against cassava anthracnose and investigation on its control effect in laboratory[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 115-124 (in Chinese).
- [15] 康彦平, 晏立英, 雷永, 万丽云, 淮东欣, 王志慧, 廖伯寿. 拟康宁木霉对花生菌核病的生防机制[J]. 中国油料作物学报, 2017, 39(6): 842-847.
- KANG YP, YAN LY, LEI Y, WAN LY, HUAI DX, WANG ZH, LIAO BS. Biocontrol mechanism of *Trichoderma koningiopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum* in peanut[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2017, 39(6): 842-847 (in Chinese).
- [16] WONGLOM P, DAENG SUWAN W, ITO SI, SUNPAPAO A. Biological control of *Sclerotium* fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp.

- T76-12/2 and the mechanisms involved[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2019, 107: 1-7.
- [17] 徐文, 黄媛媛, 黄亚丽, 贾振华, 宋水山. 木霉-植物相互作用机制的研究进展[J]. *中国生物防治学报*, 2017, 33(3): 408-414.
- XU W, HUANG YY, HUANG YL, JIA ZH, SONG SS. Advances on mechanism of *Trichoderma*-plant interaction[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2017, 33(3): 408-414 (in Chinese).
- [18] BAIYEE B, PORNSURIYA C, ITO SI, SUNPAPAO A. *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aerea*[J]. *Biological Control*, 2019, 129: 195-200.
- [19] BHARDWAJ M, SALI VK, MANI S, VASANTHI HR. Neophytadiene from *Turbinaria ornata* suppresses LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages and sprague dawley rats[J]. *Inflammation*, 2020, 43(3): 937-950.
- [20] JOHAN S, JOHAN O, THOMAS B. Fungal volatiles as indicators of food and feeds spoilage[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 1999, 27(2/3): 209-217.
- [21] 李小杰, 李成军, 姚晨斌, 宋瑞芳, 刘畅, 邱睿, 陈玉国, 白静科, 李淑君. 拮抗烟草疫霉菌的木霉菌株筛选鉴定及防病促生作用研究[J]. *中国烟草科学*, 2020, 41(3): 65-70.
- LI XJ, LI CJ, YAO CX, SONG RF, LIU C, QIU R, CHEN YG, BAI JK, LI SJ. Screening, identification of antagonistic *Trichoderma* spp. against tobacco black shank and its growth promotion effect on tobacco[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2020, 41(3): 65-70 (in Chinese).
- [22] 张丽荣, 李鹏, 康萍芝, 杜玉宁, 陈杭. 压砂西瓜枯萎病生防木霉菌筛选及其拮抗机制研究[J]. *河南农业科学*, 2018, 47(5): 75-78, 84.
- ZHANG LR, LI P, KANG PZ, DU YN, CHEN H. Screening and antagonistic mechanism analysis of *Trichoderma* spp. against *Fusarium* wilt of watermelon in gravel-mulched land[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2018, 47(5): 75-78, 84 (in Chinese).