



## 研究报告

## 拮抗北细辛菌核病木霉菌的分离、鉴定及生防效果

王子晴<sup>1</sup> 卢宝慧<sup>2</sup> 田义新<sup>1</sup> 王玉珍<sup>1</sup> 张敏<sup>1</sup> 权兴周<sup>1</sup> 赵光远<sup>1</sup> 陈磊<sup>1</sup> 王志清<sup>\*1</sup><sup>1</sup> 吉林农业大学中药材学院 吉林 长春 130118<sup>2</sup> 吉林农业大学植物保护学院 吉林 长春 130118

**摘要:**【背景】菌核病是北细辛根部主要病害之一,木霉菌作为目前应用最广泛的生物防治真菌,利用木霉菌防治北细辛菌核病是目前研究的热点。【目的】通过稀释分离法对健康北细辛植株根际土壤进行菌株分离,以期筛选出有效拮抗北细辛菌核病的生防木霉菌。【方法】以北细辛菌核病菌为靶标菌,采用平板对峙培养、挥发性与非挥发性物质抑菌的方法对分离得到的木霉菌进行筛选,采用生长速率法对筛选出的木霉菌的发酵液进行抑菌效果测定,并采用硫代巴比妥酸法测定筛选出的木霉对北细辛菌核病菌的丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量、紫外吸收法测定过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性、氮蓝四唑法测定超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)活性、愈创木酚法测定过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性的影响。【结果】从土壤中分离出木霉菌共 14 株,通过形态学和 ITS-RPB2 双基因联合构建系统发育树,鉴定其为哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、钩状木霉(*Trichoderma hamatum*)、拟康氏木霉(*Trichoderma koningiopsis*)、深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)、短密木霉(*Trichoderma brevicompactum*)和装絮木霉(*Trichoderma tomentosum*)。对峙培养试验表明,钩状木霉 A26、拟康氏木霉 B30、钩状木霉 C6、哈茨木霉 A17 对北细辛菌核病菌抑制率均在 90%以上,挥发性物质抑制测定结果显示钩状木霉 C6 抑制率最高,为 53.73%±0.07%,木霉菌的非挥发性物质抑菌作用较强,哈茨木霉 A17、钩状木霉 A26、钩状木霉 C6 的非挥发性物质对细辛菌核病菌的抑制率均在 75%以上,而拟康氏木霉 B30 抑制率可达 100%。因此,筛选出的哈茨木霉 A17、钩状木霉 A26、拟康氏木霉 B30、钩状木霉 C6 为拮抗效果较强的生防木霉菌,这 4 株木霉菌的发酵液对北细辛菌核病菌的抑制率分别为 56.33%±0.12%、77.22%±0.06%、82.28%±0.03%、46.20%±0.04%。经这 4 株木霉菌的非挥发性物质处理 7 d 后,菌核病菌 MDA 含量显著增加,钩状木霉 A26 是对照组的 7.7 倍,最为显著;菌核病菌抗氧化酶活性均降低,与对照组相比, CAT、SOD、POD 活性分别下降了 19.67%–75.84%、4.71%–68.71%和 3.57%–67.86%。【结论】从北细辛健康植株根际土壤中分离的木霉菌株哈茨木霉 A17、钩状木霉 A26、拟康氏木霉 B30、钩状木霉 C6 对北细辛菌核病菌均有较好的抑制效果,可用于北细辛菌核病的生物防治。

**关键词:** 北细辛菌核病菌, 木霉菌, 分离鉴定, 抑菌, 生物防治

**Foundation items:** Science and Technology Project of Jilin Province Department (20190304017YY); National Key Research and Development Program of China (2019YFC1710700); Traditional Chinese Medicine Administration Project of Jilin Province (L202009)

**\*Corresponding author:** E-mail: wangzhiqing96@sohu.com

**Received:** 13-03-2021; **Accepted:** 21-04-2021; **Published online:** 03-06-2021

**基金项目:** 吉林省科技厅技术攻关项目(20190304017YY); 国家重点研发计划(2019YFC1710700); 吉林省中医药管理局项目(L202009)

**\*通信作者:** E-mail: wangzhiqing96@sohu.com

**收稿日期:** 2021-03-13; **接受日期:** 2021-04-21; **网络首发日期:** 2021-06-03

## Isolation, identification and biocontrol effect of *Trichoderma* antagonistic to *Sclerotinia* disease of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag.

WANG Ziqing<sup>1</sup> LU Baohui<sup>2</sup> TIAN Yixin<sup>1</sup> WANG Yuzhen<sup>1</sup> ZHANG Min<sup>1</sup>  
QUAN Xingzhou<sup>1</sup> ZHAO Guangyuan<sup>1</sup> CHEN Lei<sup>1</sup> WANG Zhiqing<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China

<sup>2</sup> College of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China

**Abstract:** [Background] *Sclerotinia* disease is one of the main root diseases of *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag. *Trichoderma* is extensively used for biocontrol owing to the fungistatic activity. Recently, the control of *Sclerotinia asari* by *Trichoderma* has attracted the interest of scholars. [Objective] *Trichoderma* strains were isolated from the rhizosphere soil of healthy *A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag. with the dilution-plate method and those antagonistic to *S. asari* were screened out. [Methods] The inhibition of the isolated strains (plate confrontation method), the volatile and non-volatile strain metabolites, and strain fermentation broth (growth rate method) on *S. asari* was respectively determined. The malondialdehyde (MDA) content (thiobarbituric acid method), catalase (CAT) activity (ultraviolet absorption method), superoxide dismutase (SOD) activity (nitroblue tetrazolium assay), and peroxidase (POD) activity (guaiacol method) of *S. asari* treated with the selected *Trichoderma* were determined. [Results] A total of 14 *Trichoderma* strains were isolated and identified based on morphological observation and ITS-RPB2 sequence alignment as *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. koningiopsis*, *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, and *T. tomentosum*, respectively. The inhibition rates of *T. hamatum* A26, *T. koningiopsis* B30, *T. hamatum* C6, and *T. harzianum* A17 on *S. asari* were all above 90%. The volatile metabolites of *T. hamatum* C6 demonstrated the highest inhibition rate (53.73%±0.07%), and the non-volatile metabolites showed stronger inhibitory effect, particularly those of A17 (inhibition rate: >75%), A26 (inhibition rate: >75%), C6 (inhibition rate: >75%), and B30 (inhibition rate: 100%). Thus, strains A17, A26, B30, and C6 had the strongest control effect and the inhibition rates of the fermentation broth of these 4 *Trichoderma* strains against *S. asari* were 56.33%±0.12%, 77.22%±0.06%, 82.28%±0.03%, and 46.20%±0.04%, respectively. After being treated with the non-volatile metabolites of the 4 strains for 7 days, *S. asari* saw significantly increased MDA content, particularly the *S. asari* strains treated with the non-volatile metabolites of A26 (MDA content was 7.7 times that of the control). Besides, the antioxidant enzyme activity of *S. asari* decreased. To be specific, the activity of CAT, SOD, and POD declined by 19.67%–75.84%, 4.71%–68.71%, and 3.57%–67.86%, respectively, as compared with that of the control. [Conclusion] *Trichoderma* A17, A26, B30, and C6 isolated from the rhizosphere soil of healthy plants of *A. heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag. can be used for the biocontrol of *S. asari*.

**Keywords:** *Sclerotium asari*, *Trichoderma*, isolation and identification, fungistasis, biological control

北细辛[*Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag.]为马兜铃科多年生草本植物<sup>[1]</sup>, 是中国传统中药, 以根和根茎入药, 味辛性温, 归心、肺、肾经, 具有祛风散寒、通窍止痛、温肺化饮之功效, 临床上用于风

寒感冒、风湿痹痛、痰饮喘咳等疾病的治疗<sup>[2-3]</sup>。北细辛是东北道地大宗中药材, 在吉林和辽宁两省种植面积约 6 500 hm<sup>2</sup><sup>[4]</sup>, 随着市场需求量的增加, 种植规模不断扩大, 细辛病害发生与发展也日趋严重<sup>[5]</sup>。菌核病是北细辛的主要病害之

一, 其病原菌细辛核盘菌(*Sclerotinia asari*)是一种能导致全株腐烂的真菌。核盘菌侵染北细辛后迅速蔓延, 严重时可能造成绝产绝收, 给北细辛种植业造成严重经济损失, 菌核病在生产上被称为“细辛癌症”。目前, 细辛菌核病的防治以化学杀菌剂为主, 由于病原菌的抗药性、农药残留等缺陷日渐凸显, 寻找安全、有效的生物防治措施成为目前解决北细辛菌核病问题的关键。

木霉菌(*Trichoderma* spp.)属于真菌门半知菌亚门丝孢纲丝孢目丛梗孢科木霉属<sup>[6]</sup>, 是世界上公认的植物真菌性病害生物防治菌, 其优势在于对多种植物病原真菌具有广谱的抗性<sup>[7]</sup>, 目前已有木霉菌对桑葚<sup>[8]</sup>、大豆<sup>[9]</sup>、油菜<sup>[10]</sup>菌核病的生物防治的报道。木霉菌种类繁多, 生防机制复杂, 主要包括竞争作用、重寄生作用、抗生作用和诱导植物产生抗性等, 而且不同菌株的作用机制也存在差异<sup>[11]</sup>。本研究筛选高效拮抗北细辛菌核病的木霉菌, 以期开发木霉菌生防菌剂防治北细辛菌核病奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试病原菌

细辛菌核病菌——细辛核盘菌(*Sclerotinia asari*), 由本实验室分离、鉴定并保存。

#### 1.1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖肉汤(Potato Dextrose Broth, PDB)培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0。马铃薯葡萄糖琼脂(Potato Dextrose Agar, PDA)培养基, 马铃薯葡萄糖肉汤培养基中添加琼脂 18.0 g/L。

燕麦琼脂(Oatmeal Agar, OA)培养基(g/L): 燕麦片 30.0, 琼脂粉 20.0。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

引物ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')、ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')、fRPB2-5f (5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3')、fRPB2-7cR

(5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3'), 生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 真菌 DNA 提取试剂盒, 杭州博日科技有限公司。正置荧光电动显微镜, Leica 公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司。

### 1.2 菌株的分离与鉴定

#### 1.2.1 土壤根系木霉菌的分离

采集吉林省通化县、柳河县细辛根际土壤各 10 份样品, 采用稀释分离法分离木霉菌, 具体方法参照文献<sup>[12]</sup>。

#### 1.2.2 菌株的形态学观察

选取 1.2.1 中的木霉菌接种至 PDA 培养基和 OA 培养基上, 28 °C 培养 7 d 后观察菌落颜色和形状, 并在显微镜下观察分生孢子梗和分生孢子的形态特征。

#### 1.2.3 菌株的分子学鉴定

参照真菌 DNA 提取试剂盒说明书, 提取木霉菌株基因组 DNA, -20 °C 保存备用。

真菌鉴定通用引物 ITS1 和 ITS4 用于 rDNA ITS 序列区域扩增。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 48 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。引物 fRPB2-5f 和 fRPB2-7cR 用于 RPB2 序列区域扩增<sup>[13]</sup>, PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 90 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 7 min。扩增产物在 4 °C 条件下短暂保存后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将所测得的基因序列上传至国家微生物科学数据中心 NMDC (<http://nmcd.cn/>)并取得序列号, 利用 NCBI 网站的 BLAST 功能进行比对, 下载相似度大于 95% 的序列, 应用 MEGA X 软件<sup>[14]</sup>, 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

### 1.3 木霉菌对细辛菌核病菌的抑菌率测定

采用平板对峙法, 具体方法参照文献<sup>[12]</sup>, 以不接种木霉菌为对照, 每个处理设 3 次重复, 在 25 °C 培养 7 d 后采用十字交叉法测量直径并计算抑菌率。

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

#### 1.4 木霉菌挥发性代谢产物抑菌活性测定

采用平板对扣法<sup>[15]</sup>,以不接种木霉菌作为对照,每处理设3次重复,在25℃培养5 d后采用十字交叉法测量直径,计算抑菌率。

#### 1.5 木霉菌非挥发性代谢产物抑菌活性测定

参照赵兴丽等的方法<sup>[16]</sup>并加以改进,在PDA培养基上铺上无菌双层玻璃纸,于平板中央接种木霉菌饼,待菌丝长至玻璃纸边缘时用无菌镊子移去玻璃纸。然后在平板中央接种病原菌菌丝块,以只接种菌核病菌菌饼的PDA培养基为对照,每处理设3次重复,在25℃培养5 d后测量病原菌的生长直径。

#### 1.6 木霉菌发酵液对细辛菌核病菌的抑制效果

分别将筛选出的木霉菌菌株接种于PDB培养基中,28℃、120 r/min振荡培养7 d,滤去木霉菌丝体及孢子,即得发酵液。将发酵液与PDA培养基按1:6(体积比)混匀,制成含有发酵液的固体培养基。将活化后的菌核病菌菌饼接种至含发酵液的培养基中央,以含等体积无菌水的培养基为对照,每处理重复3次,25℃培养5 d后采用十字交叉法测量直径,计算抑菌率。

#### 1.7 丙二醛含量和3种氧化物酶活性测定

取0.1 g经木霉处理过的菌核病菌,加入9 mL冰冷磷酸缓冲液研磨成匀浆,4℃、12 000 r/min离心30 min,上清液即为酶液。丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸测定法<sup>[17]</sup>,超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)活性测定采用氮蓝四唑法<sup>[18]</sup>,过氧化物酶(Peroxidase, POD)活性测定采用愈创木酚法<sup>[19]</sup>,过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性测定采用紫外吸收法<sup>[20]</sup>。

#### 1.8 统计分析

采用Microsoft Office Excel 2016进行数据统计

和作图,用SPSS 23进行单因素方差分析( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的鉴定

试验共分离得到14株木霉菌,将木霉菌分别接种至PDA培养基和OA培养基,发现菌落可在2种培养基上生长,而且形态上无明显变异。分离所得木霉菌分生孢子梗、孢子形态具有明显差异。A17、C4、D4、D6、E8孢子梗分枝呈直角,或向顶部弯曲,分生孢子近球状;D3孢子梗分枝多为对生,夹角小于90°,瓶梗多为安瓿形,孢子近球形;A26、C6、F4分生孢子梗呈钩状,顶部逐渐变细,瓶梗亚球形或椭圆形,顶端变细,分生孢子呈椭圆形;B30、F1、F2分生孢子梗主轴明显且分枝较长,分枝间距离较大,分生孢子呈椭圆形;F3分枝发达,与主轴夹角接近90°,主轴略弯,分生孢子椭圆形;E17分生孢子梗为单侧分枝,夹角近似直角,孢子球形(图1)。

将测序得到的rDNA ITS序列与RPB2序列首尾相连构建系统进化树(图2),形成6个分支。结合形态学和分子生物学特征,14株菌鉴定为6个种:A17、C4、D4、D6、E8属于哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*);B30、F1、F2为拟康氏木霉(*T. koningiopsis*),A26、C6、F4属于钩状木霉(*T. hamatum*);E17为深绿木霉(*T. atroviride*);D3为短密木霉(*T. brevicompactum*);F3为装絮木霉(*T. tomentosum*)。

### 2.2 木霉菌对细辛菌核病菌的拮抗作用

对峙培养试验结果表明,从土壤中分离出的14株木霉菌均对细辛菌核病菌有不同程度的抑制作用,抑菌率见表1。3 d时,2菌菌丝开始接触,细辛菌核病菌开始停止向前生长,木霉菌菌丝则沿着菌核病菌落周围蔓延。7 d时,菌株D3与菌核病菌交界处产生明显褐变;菌株A17、C4、E8与菌核病菌有明显隔离带;菌株D4、D6、E17、F4覆盖菌核病菌边缘且E17、F4在与菌核菌丝交

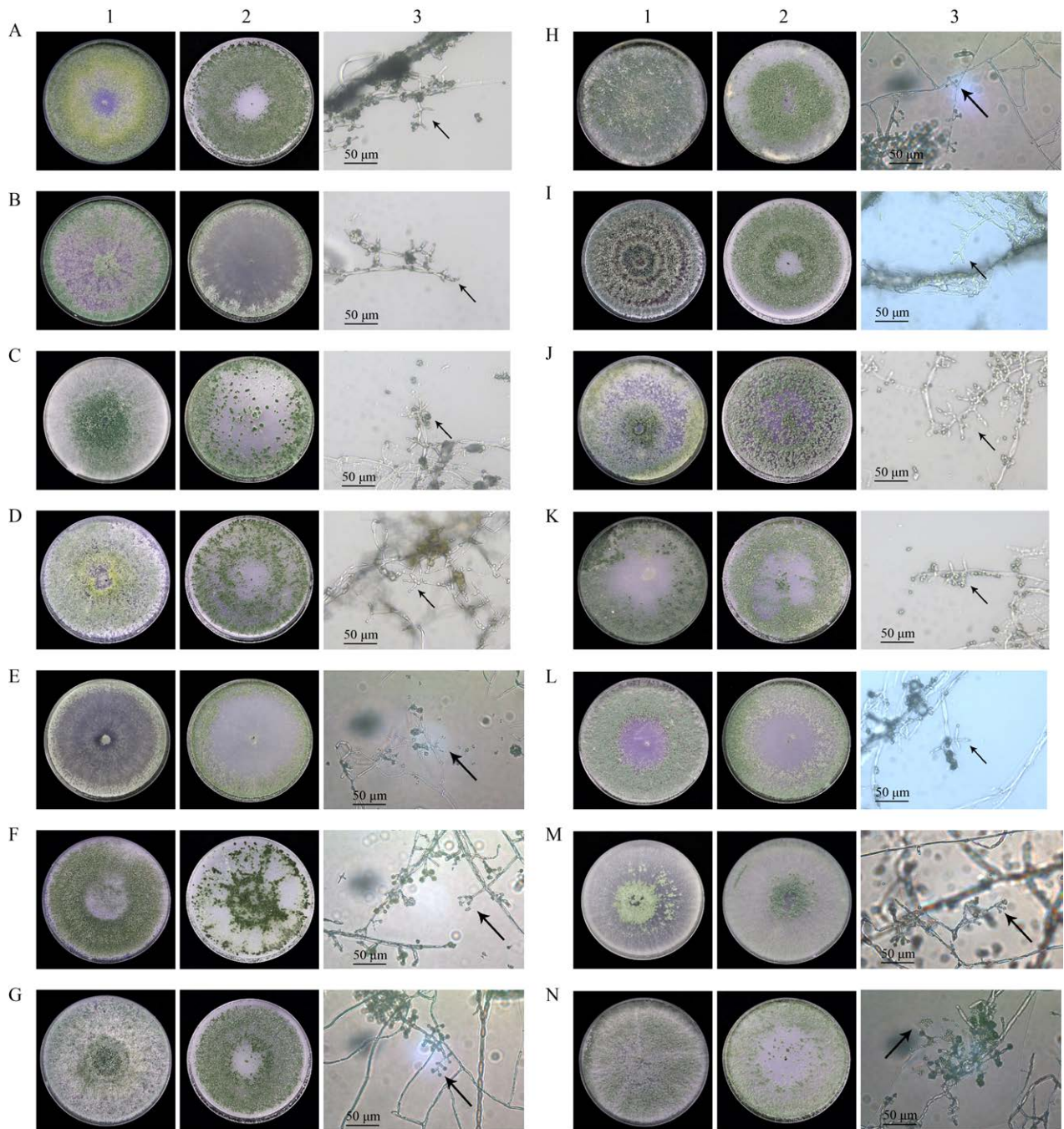


图1 不同木霉菌株的形态特征

**Figure 1 Morphological characteristics of different *Trichoderma* strains**

注: A: 菌株 A17; B: 菌株 A26; C: 菌株 B30; D: 菌株 C4; E: 菌株 C6; F: 菌株 D3; G: 菌株 D4; H: 菌株 D6; I: 菌株 E8; J: 菌株 E17; K: 菌株 F1; L: 菌株 F2; M: 菌株 F3; N: 菌株 F4。1: PDA 培养基 7 d 形态; 2: OA 培养基 7 d 形态; 3: 40×显微镜下形态, 箭头所指为分生孢子梗, 标尺=50 μm

Note: A: Strain A17; B: Strain A26; C: Strain B30; D: Strain C4; E: Strain C6; F: Strain D3; G: Strain D4; H: Strain D6; I: Strain E8; J: Strain E17; K: Strain F1; L: Strain F2; M: Strain F3; N: Strain F4. 1: Colony morphology being cultured in PDA medium for 7 d; 2: Colony morphology being cultured in OA medium for 7 d; 3: Morphology under a 40× microscope, the arrow pointing to the conidiophore, scale=50 μm

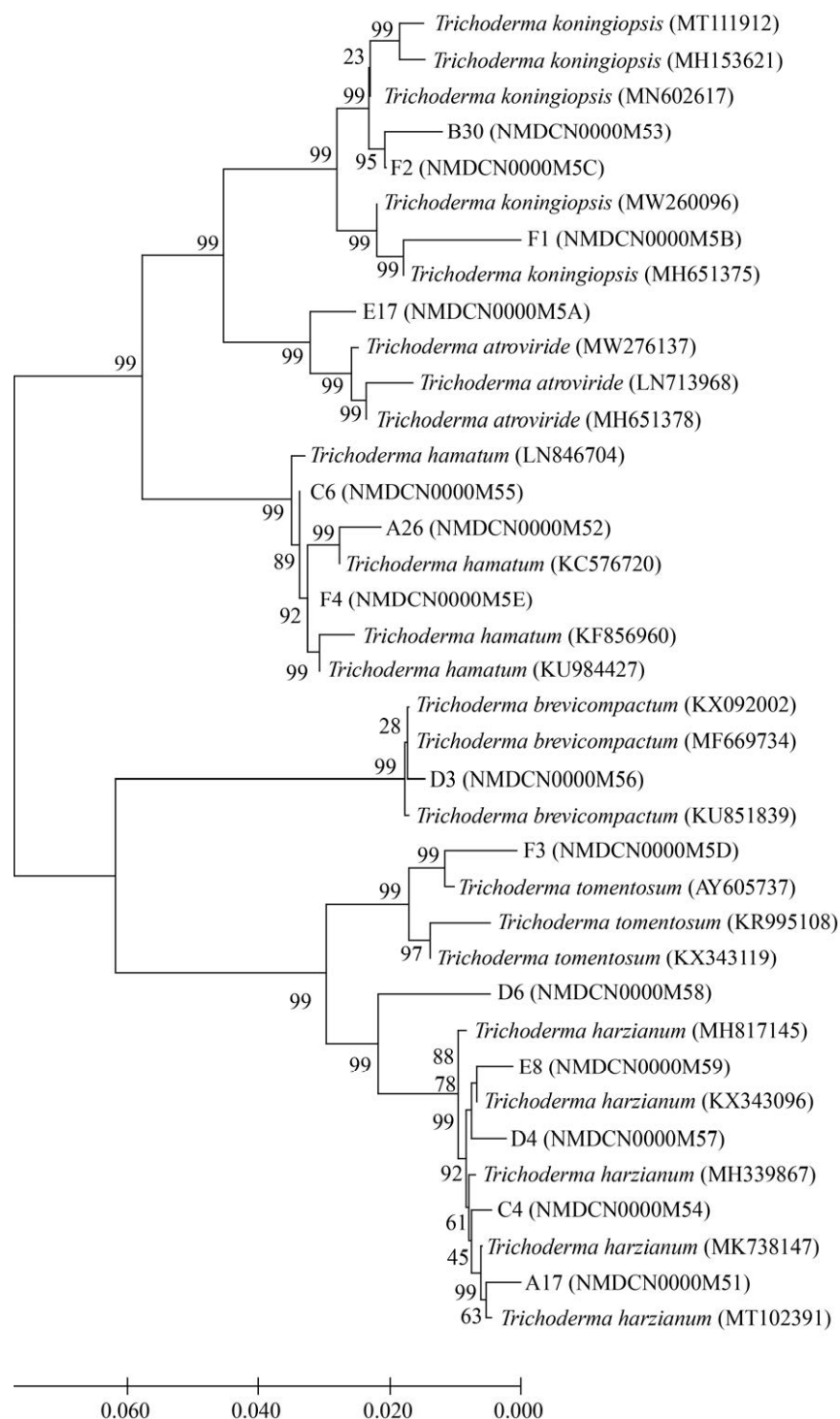


图 2 木霉菌基于 rDNA ITS-RPB2 双序列构建的系统进化树

Figure 2 Phylogenetic tree of *Trichoderma* constructed based on the rDNA ITS-RPB2 double sequence alignment

注: 文中筛选的菌株序列 NMDC 登录号、参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中; 分支处标注有自展值; 标尺所示长度为 0.020 核苷酸置换率

Note: The NMDC accession numbers of the strains selected in this paper, the GenBank accession numbers of aligned sequences being shown in the brackets. The bootstrap values being shown at the node. Bar 0.020 meant the nucleotide substitution rate of 0.020



表 1 不同木霉菌株对北细辛菌核病抑制率( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )  
Table 1 Inhibition rate of different *Trichoderma* strains against *Sclerotinia asari* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

菌株编号 Strain No.	抑制率 Inhibition rate (%)
A17	90.16±0.02a
A26	92.77±0.00a
B30	91.32±0.01a
C4	73.63±0.01bc
C6	90.83±0.01a
D3	57.84±0.02f
D4	64.46±0.05e
D6	79.34±0.04b
E8	89.26±0.01a
E17	88.06±0.01a
F1	72.48±0.01cd
F2	76.86±0.01bc
F3	71.32±0.00cd
F4	67.35±0.02de

注：不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )  
Note: Different lowercase letters indicate significant differences ( $P<0.05$ )

界处产生大量孢子；菌株 A26 和菌核病菌相接触部分有明显消解；菌核菌被 B30、F1 菌丝全部覆盖(图 3)。

2.3 木霉菌代谢产物对北细辛菌核病菌的拮抗作用

挥发性代谢产物抑菌率见表 2。菌株 C6、B30 产生的挥发性物质对细辛菌核病菌的抑制率较高，抑菌率分别为 53.73%±0.07%、45.77%±0.06%，显著高于其他菌株( $P<0.05$ )。其余菌株挥发性物质抑菌率均在 40%以下。

由表 3 可知，B30 菌株的非挥发性物质抑菌率可达 100%，显著高于其他菌株。A26、C6、A17、D3 菌株的非挥发性物质的抑菌率高于 75%。

2.4 木霉菌发酵液对北细辛菌核病菌的拮抗作用

哈茨木霉(*T. harzianum*) A17、钩状木霉(*T. hamatum*) A26、拟康氏木霉(*T. koningiopsis*) B30、钩状木霉(*T. hamatum*) C6 发酵液抑菌效果

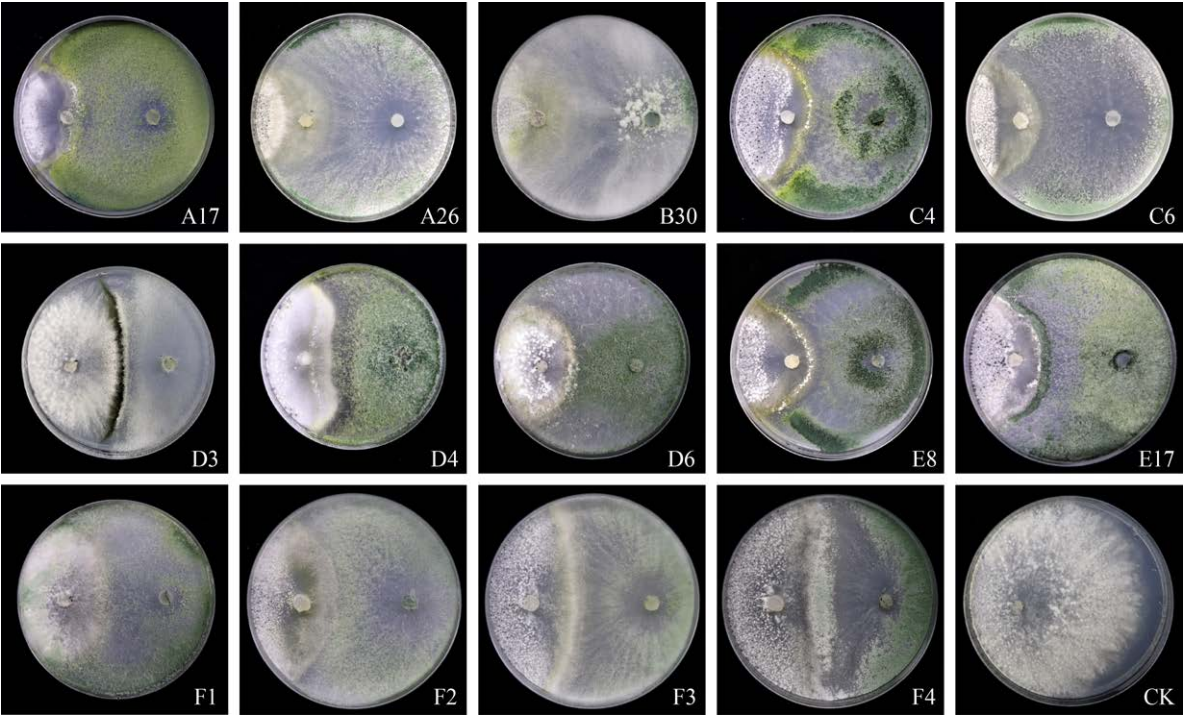


图 3 不同木霉菌与细辛菌核病对峙效果  
Figure 3 The confrontation effect of different *Trichoderma* and *Sclerotinia asari*

表 2 木霉菌挥发性代谢产物对细辛菌核病的抑制率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 2 Inhibition rate of volatile metabolites of *Trichoderma* against *Sclerotinia asari* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

拮抗菌株 Antagonistic strains	抑制率 Inhibition rate (%)
A17	25.07±0.03efg
A26	35.52±0.01cd
B30	45.77±0.06b
C4	14.93±0.03h
C6	53.73±0.07a
D3	37.61±0.05c
D4	31.64±0.02cde
D6	28.16±0.02ef
E8	35.12±0.04cd
E17	29.35±0.00def
F1	22.99±0.00fg
F2	15.32±0.02h
F3	19.80±0.05gh
F4	30.85±0.02de

注: 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )  
Note: Different lowercase letters indicate significant differences ( $P<0.05$ )

表 3 木霉菌非挥发性代谢产物对细辛菌核病的抑制率 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Table 3 Inhibition rate of non-volatile metabolites of *Trichoderma* against *Sclerotinia asari* ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

拮抗菌株 Antagonistic strains	抑制率 Inhibition rate (%)
A17	78.67±0.01bc
A26	86.67±0.01b
B30	100.00±0.00a
C4	45.78±0.08e
C6	84.44±0.04bc
D3	76.00±0.01c
D4	37.33±0.04ef
D6	34.22±0.03f
E8	42.67±0.11ef
E17	40.44±0.01ef
F1	74.67±0.04c
F2	64.44±0.03d
F3	58.22±0.03d
F4	63.11±0.03d

注: 不同小写字母表示差异显著( $P<0.05$ )  
Note: Different lowercase letters indicate significant differences ( $P<0.05$ )

最好的是菌株 B30, 抑制率为  $82.28\% \pm 0.03\%$ , 显著高于其他菌株( $P<0.05$ )。菌株 A17、A26、C6 的发酵液对菌核病菌的抑制率分别为  $56.33\% \pm 0.12\%$ 、 $77.22\% \pm 0.06\%$ 、 $46.20\% \pm 0.04\%$ 。

2.5 丙二醛含量和抗氧化酶活性测定

经钩状木霉 A26 处理后的北细辛菌核病菌中 MDA 含量为  $(1.13 \pm 0.02) \mu\text{mol/g}$ , 拟康氏木霉 B30 处理组中北细辛菌核病菌的 MDA 含量为  $(0.57 \pm 0.10) \mu\text{mol/g}$ , A17 和 C6 处理后的菌核菌中的 MDA 含量分别为  $(0.31 \pm 0.30) \mu\text{mol/g}$  和  $(0.22 \pm 0.01) \mu\text{mol/g}$ , 而对照组仅为  $(0.15 \pm 0.02) \mu\text{mol/g}$ , A26 处理后菌核病菌 MDA 含量是对照组的 7.7 倍, 显著高于对照组( $P<0.05$ ), 其他处理组的 MDA 含量均有不同程度的增加(图 4A)。

由图 4B、4C、4D 可知, 经不同木霉菌株处理后的菌核病菌抗氧化酶活性均有不同程度的降低。钩状木霉 C6 处理组菌核病菌的 CAT 活性为  $(28.60 \pm 1.83) \text{ U/(g} \cdot \text{min)}$ , 哈茨木霉 A17 处理后菌核病菌的 CAT 活性为  $(24.40 \pm 0.69) \text{ U/(g} \cdot \text{min)}$ , 钩状木霉 A26 处理组菌核病菌的 CAT 活性为  $(16.2 \pm 0.6) \text{ U/(g} \cdot \text{min)}$ , 与对照组相比, 菌株 B30 处理后菌核病菌的 CAT 活性下降了 75.84%, 显著低于其他处理组( $P<0.05$ )。钩状木霉 C6 处理后的菌核病菌的 SOD 活性为  $(25.92 \pm 0.45) \text{ U/(g} \cdot \text{min)}$ , 下降了 68.71%, POD 活性为  $8.33 \text{ U/(g} \cdot \text{min)}$ , 下降了 67.86%, 而对照组的 SOD 活性和 POD 活性分别为  $(82.28 \pm 3.16) \text{ U/(g} \cdot \text{min)}$  和  $(25.92 \pm 3.20) \text{ U/(g} \cdot \text{min)}$ , 钩状木霉 C6 处理后菌核病菌的 SOD 活性和 POD 活性变化均为最显著( $P<0.05$ )。

3 讨论

近年来, 中医药越来越受到人们的重视, 其中药材质量的把控就显得尤为重要。北细辛作为我国传统常用中药, 实现栽培生产中的病害绿色防控, 才能保证临床用药的安全。木霉菌是目前最具有潜力的生防菌株之一, 但木霉菌作用机制复杂, 通常为多种作用相结合。本文采用了平板



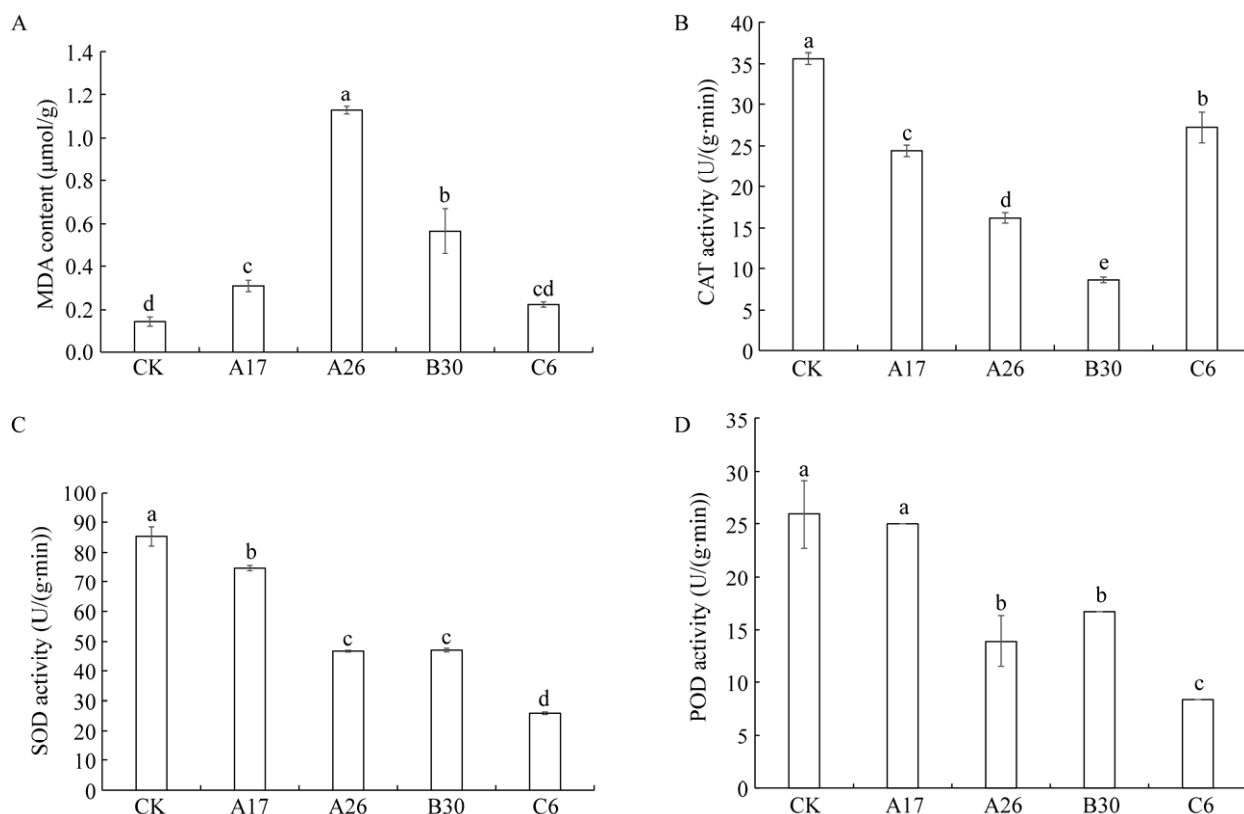


图4 经木霉菌株处理后细辛菌核病菌的MDA含量及抗氧化酶活性变化

Figure 4 Changes of MDA content and antioxidant enzyme activity of *Sclerotinia asari* after treatment with *Trichoderma* strains

Note: A: MDA content; B: CAT activity; C: SOD activity; D: POD activity

对峙法、平板对峙法、圆盘滤膜法、发酵液抑菌的方法拮抗效果进行测定。平板对峙试验可直观地观察到木霉菌对病原菌的抑菌效果。张健等<sup>[8]</sup>采用平板对峙法筛选得到9株棘孢木霉,对桑基菌核病菌的抑菌率达到80%以上。常媛等<sup>[21]</sup>利用从土壤中分离并鉴定的长枝木霉与核盘菌对峙培养,通过观察对比,病原菌菌落占据空间有所缩减,可以证明长枝木霉对核盘菌生长有抑制作用。康彦平等<sup>[22]</sup>通过拟康氏木霉和花生菌核病对峙培养观察,发现木霉菌菌丝可以覆盖花生菌核病菌菌落,并降解其菌丝,使其无法形成菌核。本文中筛选出的木霉菌与细辛菌核病平板对峙后观察发现,哈茨木霉(*T. harzianum*) A17、钩状木霉(*T. hamatum*) A26、拟康氏木霉(*T. koningiopsis*)

B30、钩状木霉(*T. hamatum*) C6的生长速率远远大于细辛菌核病菌,可快速占领空间和营养,而且这4株菌株对北细辛菌核病菌的抑制率均在90%以上,其中A26的抑制率最高。拟康氏木霉(*T. koningiopsis*) B30与细辛菌核病接触后,菌核被木霉菌感染甚至被消解,可见其抑菌作用显著。

抗生素作用是木霉菌生物防治的主要机制之一。木霉产生的抗生素次级代谢产物种类繁多,包括挥发性和非挥发性物质。目前只有挥发性物质吡喃酮-6-戊基-2H-吡喃-2-酮(简称6PP)得到了广泛的研究。Vos等<sup>[23]</sup>报道了木霉菌挥发性物质6PP对立枯丝核菌、尖孢镰刀菌和灰葡萄孢菌具有抑制作用。本研究中分离出的4株木霉菌株,只有钩状木霉(*T. hamatum*) C6产生的挥

发性物质对菌核病菌的抑制率超过 50%，所以 4 株木霉菌的挥发性物质抑制率较低。哈茨木霉(*T. harzianum*) A17、钩状木霉(*T. hamatum*) A26、钩状木霉(*T. hamatum*) C6 分泌的非挥发性物质对菌核病菌的抑制率均在 75%以上，特别是拟康氏木霉(*T. koningiopsis*) B30 的抑制率甚至高达 100%，表明这 4 株菌株均能产生具有拮抗效果的代谢物质，拟康氏木霉(*T. koningiopsis*) B30 抑菌效果尤为突出。战鑫等<sup>[24]</sup>采用平板对扣法测定哈茨木霉和短密木霉的挥发性物质对禾谷镰孢菌的抑制作用，发现抑制率只有 31.2%和 6.17%，而用圆盘滤膜法测定了这 2 株木霉菌的非挥发物质对禾谷镰孢菌的抑制率却为 66.78%和 70.12%，表明木霉的抑菌物质主要来源于非挥发性物质。本研究木霉非挥发性代谢产物比挥发性代谢产物对病原菌的抑制作用更强，研究结果与赵玳琳等<sup>[25]</sup>、Khaledi 等<sup>[26]</sup>和 Tapwal 等<sup>[27]</sup>的研究结果相似。因此，本文分离出的 4 株木霉菌可能是以竞争作用和抗生作用相结合的方式抑制细辛菌核病菌生长。下一步将以木霉菌分泌的挥发性、非挥发性等次生代谢产物的主要有效成分为研究重点，以期开发出绿色高效的细辛菌核病生防制剂。

MDA 是细胞膜脂质过氧化的产物，含量增加表示细胞膜受到破坏。抗氧化系统是生物体抵御逆境胁迫的第一道屏障，在活性氧的清除及机体保护性防御反应中发挥着重要作用。SOD 是最重要的清除氧自由基的酶之一，主要功能是清除生物体内的  $O_2^{2-}$ ，产生  $H_2O_2$ ，而 POD、CAT 则可以有效地清除生物体内的  $H_2O_2$ ，维持体内的活性氧代谢平衡，保护膜结构，从而使生物能在一定程度上抵抗逆境胁迫，忍耐或减缓由逆境胁迫带来的伤害。杨立宾等<sup>[28]</sup>研究发现哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物可降低致病疫霉菌体可溶性蛋白含量，降低菌体保护酶(SOD、CAT、POD)活性，提高菌体 MDA 含量。邓勋等<sup>[29]</sup>研究发现木霉菌株 T-43 的乙酸乙酯提取物能显著降低樟子松枯梢

病菌的保护酶(SOD、CAT 和 POD)活性，这与本试验结果一致。刘淑宇等<sup>[30]</sup>发现绿色木霉的发酵液能够降低芒果炭疽菌中的 POD、CAT、SOD 的活性。魏丽梅等<sup>[31]</sup>为探究链霉菌株中的活性物质农抗 211 对水稻纹枯病菌的细胞膜和抗氧化酶活性的影响，发现经处理后水稻纹枯病菌 SOD、POD、CAT 等防御酶的活性均较对照显著降低，而 MDA 含量不断上升，这与本试验结果一致。本研究中筛选的 4 株高效拮抗木霉菌株对细辛菌核病菌作用后，菌核病菌的 MDA 含量明显增加，表示菌核病菌的细胞膜严重受损。然而处理后菌核病菌的 CAT、SOD、POD 活性均有不同程度下降，表明病原菌氧自由基增加，抗氧化系统破坏，最终菌体死亡。综上，本文筛选出的木霉菌可以使菌核病菌的细胞膜及抗氧化系统受到破坏，抑菌作用较强。

## 4 结论

本研究从健康北细辛植株根际土壤中获得生防木霉菌，利用木霉菌菌株、挥发性和非挥发性物质、发酵液对细辛菌核病菌进行抑菌率测定，并进行抑菌生理特性评估，筛选出 4 株对北细辛菌核病具有生防潜力的菌株，分别为哈茨木霉(*T. harzianum*) A17、钩状木霉(*T. hamatum*) A26、拟康氏木霉(*T. koningiopsis*) B30、钩状木霉(*T. hamatum*) C6。

## REFERENCES

- [1] National Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia (I)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 230 (in Chinese)  
国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 230
- [2] Wang ZQ, Xiao SY, Wang YF, Liu JY, Ma HQ, Wang YP, Tian YX, Hou W. Effects of light irradiation on essential oil biosynthesis in the medicinal plant *Asarum heterotropoides* Fr. Schmidt var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag.[J]. PLoS One, 2020, 15(9): e0237952
- [3] Haque ASMT, Moon JN, Saravana PS, Tilahun A, Chun BS. Composition of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* Radix oil from different extraction methods and activities

- against human body odor-producing bacteria[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2016, 24(4): 813-821
- [4] Wang ZQ, Song J, Ma HQ, Pang SF, Ma L, Cui LL, Tian YX. Analysis and evaluation on main active ingredients of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* from different habitats[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(3): 748-756 (in Chinese)  
王志清, 宋佳, 马海琴, 逢世峰, 马琳, 崔丽丽, 田义新. 不同产地细辛中主要有效成分含量测定与比较[J]. 中草药, 2020, 51(3): 748-756
- [5] Li L, Sun WS, Zhang TJ, Shen BY, Liu Y. Identification and biological characteristics of antagonistic fungal strains against *Sclerotinia asari*[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2020, 38(5): 558-563, 579 (in Chinese)  
李玲, 孙文松, 张天静, 沈宝宇, 刘莹. 辽细辛菌核病拮抗菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 四川农业大学学报, 2020, 38(5): 558-563, 579
- [6] Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(1): 43-56
- [7] Kashyap PL, Rai P, Srivastava AK, Kumar S. *Trichoderma* for climate resilient agriculture[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2017, 33(8): 155
- [8] Zhang J, Ma JH, Han BB, Wang J, Wu F. Screening and biocontrol efficiency of *Trichoderma* spp. with antagonistic effect against mulberry fruit sclerotiniosis' pathogen[J]. Science of Sericulture, 2015, 41(5): 825-832 (in Chinese)  
张健, 马佳慧, 韩蓓蓓, 王俊, 吴福安. 对桑椹菌核病原菌有拮抗作用的木霉菌菌株筛选及生防效果试验[J]. 蚕业科学, 2015, 41(5): 825-832
- [9] Zhang JZ. Study on the biological characters and biocontrol of *Sclerotinia sclerotiniorum* in Heilongjiang China[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2009 (in Chinese)  
张军政. 黑龙江省大豆核盘菌生物学特性和生物防治的研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2009
- [10] He MJ. Endophytic fungi (*Trichoderma viride*) on biological control of *Sclerotinia* stem rot of oilseed rape[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2010 (in Chinese)  
何明静. 植物内生菌绿色木霉(*Trichoderma viride*)对油菜菌核病的生物防治[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2010
- [11] Adnan M, Islam W, Shabbir A, Khan KA, Ghramh HA, Huang ZQ, Chen HYH, Lu GD. Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 129: 7-18
- [12] Fang ZD. Research Methods of Plant Diseases[M]. 3rd ed. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1998: 195 (in Chinese)  
方中达. 植物研究方法[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 195
- [13] Hatvani L, Homa M, Chenthamara K, Cai F, Kocsubé S, Atanasova L, Mlinaric-Missoni E, Manikandan P, Revathi R, Dóczy I, et al. Agricultural systems as potential sources of emerging human mycoses caused by *Trichoderma*: a successful, common phylotype of *Trichoderma longibrachiatum* in the frontline[J]. FEMS Microbiology Letters, 2019, 366(21): fnz246
- [14] Li SY, Huang Z, Zhu WY, Lin Y. Biological characteristics and genomic analysis of a lytic *Proteus mirabilis* phage with C3 morphotype[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2021, 52(4): 1069-1078 (in Chinese)
- [15] Wang BL, Li GJ, Guo YR, Chen J. Comparison of antagonistic effects of four *Trichoderma* strains[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(1): 147-151 (in Chinese)  
王秉丽, 李广纪, 郭玉人, 陈捷. 不同野生木霉菌拮抗作用的比较[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(1): 147-151
- [16] 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)  
赵兴丽, 陶刚, 娄璇, 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
- [17] Hao ZB, Cang J, Xu Z. Plant Physiology Experiments[M]. Harbin: Harbin Institute of Technology Press, 2004: 110-115 (in Chinese)  
郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004: 110-115
- [18] Li HS, Sun Q, Zhao SJ. Principles and Techniques of Plant Physiological and Biochemical Experiments[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000: 135-136 (in Chinese)  
李合生, 孙群, 赵世杰. 植物生理生化试验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 135-136
- [19] Kochba J, Lavee S, Spiegel-Roy P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines[J]. Plant and Cell Physiology, 1977, 18(2): 463-467
- [20] Kato M, Shimizu S. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves; phenolic-dependent peroxidative degradation[J]. Canadian Journal of Botany, 1987, 65(4): 729-735
- [21] Chang Y, Yang XT, Jiang CY, Yao ZH, Jia R, Ren LH, Zhang RS. A *Trichoderma longibrachiatum* strain with antagonistic effects against three soil-borne pathogenic fungi[J]. Pratacultural Science, 2017, 34(2): 246-254 (in Chinese)

- 常媛, 杨兴堂, 姜传英, 姚志红, 贾让, 任龙辉, 张荣沐. 一株能拮抗 3 种土传病害病原真菌的长枝木霉[J]. 草业科学, 2017, 34(2): 246-254
- [22] 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)  
康彦平, 晏立英, 雷永, 万丽云, 淮东欣, 王志慧, 廖伯寿. 拟康氏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
- [23] Vos CMF, De Cremer K, Cammue BPA, De Coninck B. The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease[J]. Molecular Plant Pathology, 2015, 16(4): 400-412
- [24] Zhan X, Tai LM, Liu T, Zhang YL, Zheng W, Jin YZ. Antagonistic effects of two *Trichoderma* species on pathogen of rice seedling blight in cold region[J]. China Rice, 2020, 26(4): 96-99 (in Chinese)  
战鑫, 台莲梅, 刘铜, 张有利, 郑雯, 靳亚忠. 2 种木霉菌对寒地水稻立枯病病原菌的拮抗作用研究[J]. 中国稻米, 2020, 26(4): 96-99
- [25] Zhao DL, He HY, Wu SP, Chen XJ, Tan QQ, Yang XH. Biocontrol mechanisms and control effects of *Trichoderma asperellum* GYSW-6m1 on strawberry anthracnose and growth-promoting effects on strawberry[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(4): 587-595 (in Chinese)  
赵玳琳, 何海永, 吴石平, 陈小均, 谭清群, 杨学辉. 棘孢木霉 GYSW-6m1 对草莓炭疽病的生防机制及其防病促生作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(4): 587-595
- [26] Khaledi N, Taheri P. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*[J]. Journal of Plant Protection Research, 2016, 56(1): 21-31
- [27] Tapwal A, Nisha, Garg S, Gautam N, Kumar R. *In vitro* antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens[J]. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2011, 54(6): 1093-1098
- [28] Yang LB, Song RQ, Li CW. Effects of ethyl acetate extract of *Trichoderma harzianum* fermentation liquid on physiological index of *Phytophthora infestans*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2013, 35(2): 92-96 (in Chinese)  
杨立宾, 宋瑞清, 李冲伟. 哈茨木霉发酵液乙酸乙酯提取物对致病疫霉生理指标的影响[J]. 北京林业大学学报, 2013, 35(2): 92-96
- [29] Deng X, Song RQ, Song XS, Yin DC. High efficient *Trichoderma* strains and their bio-control effects on shoot blight of *Pinus sylvestris* var. *ongolica*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2012, 32(11): 21-27 (in Chinese)  
邓勋, 宋瑞清, 宋小双, 尹大川. 高效木霉菌株对樟子松枯梢病的抑菌机理[J]. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(11): 21-27
- [30] Liu SY, Chen FH, Yu X, Yang PB, Liu L. Inhibitory effects of postharvest treatment with *Trichoderma vridae* fermentation broth on anthracnose in mango fruit[J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2013, 41(4): 133-138, 146 (in Chinese)  
刘淑宇, 陈发河, 于新, 杨鹏斌, 刘丽. 绿色木霉菌发酵液对芒果采后炭疽病的抑制作用及保鲜效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(4): 133-138, 146
- [31] Wei LM, Zou XW, Xu TL, Yuan WT, Wei SJ. Effects of antifungal mycin 211 on cell membrane and antioxidant enzyme activity of *Rhizoctonia solani*[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2021, 35(5): 1084-1090 (in Chinese)  
魏丽梅, 邹小文, 徐婷璐, 袁文涛, 魏赛金. 农抗 211 对水稻纹枯病菌细胞膜和抗氧化酶活性的影响[J]. 核农学报, 2021, 35(5): 1084-1090