

研究快报

有效霉素 A 对棘孢木霉的影响及协同防治玉米纹枯病作用

夏海 吴琼 陆志翔 刘志诚 李雅乾 陈捷*

(上海交通大学农业与生物学院 微生物代谢国家重点实验室

农业部都市农业(南方)重点实验室 上海 200240)

摘要:【背景】玉米纹枯病逐渐发展为制约我国玉米持续增产的主要病害,有效霉素 A 与生防菌木霉均对纹枯病菌具有抗性,但二者各有优缺点。【目的】研究有效霉素 A 与木霉菌协同作用的可行性,提高对玉米纹枯病的防治水平,实现抗生素类化学农药的减量使用,提高生态环境安全性。【方法】测定有效霉素 A 处理后的棘孢木霉 GDSF1009 的细胞壁降解酶及防御反应相关酶活性,烟草叶片验证活性氧及过敏性反应。利用转录组及气相色谱-飞行时间质谱联用分析有效霉素 A 对 GDSF1009 基因表达差异及生长代谢的影响,并进行叶片及平皿协同抑菌实验。【结果】有效霉素 A 对棘孢木霉 GDSF1009 的几丁质酶、纤维素酶及木聚糖酶的活性无影响,有效霉素 A 未进入到棘孢木霉菌细胞内。在转录组水平,有效霉素 A 处理木霉 24 h 和 48 h 后,与对照相比,差异基因所占比例分别为 8.932% 和 6.779%,有效霉素 A 对 GDSF1009 相关的糖类及脂类代谢没有显著影响,仅对氨基酸代谢相关的基因有一些影响,这些基因并不会造成氨基酸代谢的大量变化。同时验证了在二者联合使用时,可以显著地提高玉米纹枯病的防治效果。【结论】有效霉素 A 对棘孢木霉菌的初生代谢系统是比较安全的,二者协同作用的抗病效果显著高于单因子作用。

关键词: 有效霉素 A, 棘孢木霉, 协同防治, 玉米纹枯病, 转录组

Effect of Validamycin A on *Trichoderma asperellum* for synergistic control of maize sheath blight

XIA Hai WU Qiong LU Zhi-Xiang LIU Zhi-Cheng LI Ya-Qian CHEN Jie*

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Key Laboratory of Urban Agriculture (South), School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract: [Background] Maize sheath blight has grown into the main disease that restricted the increase in maize production in China. Validamycin A and biocontrol microbe *Trichoderma* sp. both have resistance to sheath blight but each of which provides benefits and drawbacks. [Objective] To study the synergy of Validamycin A and *Trichoderma* for the control of sheath blight of maize.

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD02011080); Shanghai Agricultural Applied Technology Development Program of China (2017-1-6)

*Corresponding author: Tel: 86-21-34206141; E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn

Received: August 25, 2017; Accepted: August 29, 2017; Published online (www.cnki.net): September 26, 2017

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD02011080); 上海市科技兴农推广项目沪农科推字(2017 第 1-6 号)

*通信作者: Tel: 86-21-34206141; E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2017-08-25; 接受日期: 2017-08-29; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-09-26

[Methods] We determined the effect of Validamycin A on cell wall degradation enzymes and related enzyme in defense reaction of *Trichoderma asperellum* GDSF1009. We used tobacco leaves to validate reactive oxygen and its allergic reactions. We also used the transcriptome and gas chromatography-time of flight-mass spectrometry to analyze Validamycin A's effect on the expression difference of genes, the growth and the metabolism of GDSF1009 and carried out the experiment on the synergistic inhibition of leaf and plate. **[Results]** Validamycin A had no effect on the activities of chitinase, cellulase and xylanase of GDSF1009 and did not get into the cell. At the level of transcriptome, compared with the controls, the proportions of different genes in *Trichoderma asperellum* were 8.932% and 6.779% respectively after 24 h and 48 h treated by Validamycin A. Validamycin A had no significant influence on carbohydrate and lipid and only had some influences on genes related to amino acid metabolism. These genes would not change amino acid metabolism much. Furthermore, the combination of the Validamycin A and *Trichoderma asperellum* can significantly improve the effect of prevention of maize sheath blight. **[Conclusion]** Validamycin A is safe for the primary metabolic system of *Trichoderma asperellum*. The resistance of the synergy is significantly higher than that of the single factor.

Keywords: Validamycin A, *Trichoderma asperellum*, Synergistic control, Maize sheath blight, Transcriptome

作为一种严重的土传病害,纹枯病(Sheath blight)广泛地发生在多种作物上,如玉米、水稻和小麦等。玉米纹枯病可由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、玉蜀黍丝核菌(*Rhizoctonia zeae*)和双核丝核菌(Binucleate *Rhizoctonia*)引起,主要种群是立枯丝核菌中的融合群 AGI-1A^[1-2]。玉米纹枯病逐渐发展为制约我国玉米持续增产的主要病害^[3]。

有效霉素由 A、B、C、D、E、F、G、H 共 8 个组分组成,在各种组分中,以有效霉素 A 组分的活性和含量最高^[4]。有效霉素在我国已得到广泛应用,每年产量达 3 000–4 000 t,可供 5 000 亿 m² 土地使用,最初的主要防治对象仅为水稻纹枯病,后来扩大到小麦、玉米等作物的纹枯病^[5]。使用有效霉素 0.3 g/m² 拌无菌细土,成熟时调查结果,防治玉米纹枯病菌的效果为 81.1%,且平均每平方米减少发病损失 0.072 kg 以上^[6]。作为一种内吸作用很强的农用抗菌素,有效霉素 A 可以被纹枯病菌中的 β -D-糖苷酶(β -D-glycosidase)降解成并冈亚基胺(Validoxylamine),后者与海藻糖(Trehalose)结构极为相似,可以干扰海藻糖酶(Trehalase)对海藻糖的识别作用,从而降低能量物质葡萄糖的产量,抑制菌丝体的生长和发育^[7]。海藻糖代谢途径是纹枯病菌体内高度依赖的能量来源^[8]。

然而,关于有效霉素的使用目前还存在一些问题,尤其是农产品的出口受到很多限制,主要是我国至今未出台有效霉素残留检测方法的国家标准,其对人畜的危害和对环境影响等研究还不够深入。

木霉菌是土壤微生物的重要组成部分,对纹枯病的防治效果比较显著^[9]。将哈茨木霉菌(*T. harzianum*)、绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)等发酵粒剂加入到土壤中,可以减少丝核菌的生长及存活^[10]。以哈茨木霉菌(*T. harzianum*)、黄绿木霉菌(*T. aureoviride*)等培养物用于田间防治的效果显著,可以提高玉米产量^[11]。研究发现木霉菌可以产生几丁质酶、纤维素酶等细胞壁降解酶^[12-14],通过重寄生作用抑制丝核菌生长,最终将其降解^[15-16]。此外,该菌株分泌的木聚糖酶可能有诱导植物抗性、增加植物免疫力的功能^[17-18]。

棘孢木霉菌对纹枯病菌的抗性远比有效霉素 A 明显,但其周期长,见效相对略迟缓^[19];有效霉素 A 见效快,但防治周期短。若二者可以协同作用,彼此没有明显干扰,预计生防效果会显著提高。目前,尚不清楚棘孢木霉菌与有效霉素 A 的相互关系,二者之间是否存在相互干扰,是其能否协同作用的重要基础。但目前国内外对有效霉素 A 和木霉菌亲和互作

的分子基础研究尚属空白^[20]。同时,以玉米立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)为靶标,检测有效霉素 A 与棘孢木霉菌协同作用的生防效果。棘孢木霉菌的全基因组测序已完成^[21],为转录组分析提供了序列依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器

有效霉素 A 分析标准品(HPLC 级)购自上海科兴生物科技有限公司;0.22 μm 的微孔滤器购自美国 Millipore 公司;3,5-二硝基水杨酸(DNS)及羧甲基纤维素钠(CMC-Na, 800–1 200 MPa)购自国药集团化学试剂有限公司;木聚糖购自德国 Serva 公司。气相色谱-飞行时间质谱联用使用 Agilent 7890 气相色谱-飞行时间质谱联用仪。

1.1.2 主要菌种

棘孢木霉菌 GDFS1009 及病原菌玉米立枯丝核菌,保存于上海交通大学农业与生物学院农业环境微生物工程实验室。

1.1.3 培养基和溶液

PDA 培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0,琼脂 15.0, 1×10^5 Pa 灭菌 15 min。木聚糖酶和纤维素酶诱导培养基:2.0%玉米芯粉(80 目),0.4% NH_4NO_3 , 0.05% K_2HPO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05% KCl , 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

有效霉素 A 母液:将 300 mg 有效霉素 A 溶于 30 mL 无菌水中,0.22 μm 微孔滤器过滤。HAc (醋酸)-NaAc (醋酸钠)缓冲液:0.1 mol/L,调节 pH 至 4.8。木聚糖溶液:称取木聚糖于烧杯中,用 NaOH 润湿成糊状,加入 HAc-NaAc 缓冲液,于 60–70 °C 水浴中加热溶解,冷却后 pH 调至 5.0。CMC-Na:称取 CMC-Na 缓缓加入 HAc-NaAc 缓冲液加热至 80–90 °C,直至 CMC-Na 全部溶解,冷却后用 HAc-NaAc 缓冲液稀释,调节溶液 pH 至 4.8。

1.2 方法

1.2.1 几丁质酶、纤维素酶及木聚糖酶活力测定

称取若干份 1 g 种子菌,分别转接至几丁质酶、纤维素酶及木聚糖酶诱导培养基中,并加入 5 mL

有效霉素 A 母液,28 °C、180 r/min 恒温振荡培养 4 d,以空白诱导培养基为对照。每天分别取样 1 mL,4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 取上清,与底物溶液混匀水浴,加入 DNS 溶液,沸水浴 10 min,稀释后测定吸光值。每个实验重复 3 次,利用 *t*-test 检测差异显著性。

1.2.2 植物过敏性反应及 ROS (Reactive oxygen species)反应测定

将本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)于 25 °C 人工气候室中种植 30 d,每天 10 h 光照,14 h 黑暗。将微孔滤器过滤后的木聚糖酶诱导培养液滤液及有效霉素 A 注射入烟草叶片,以过滤后的未接种的诱导培养基及无菌水为对照。注射后的烟草于同等条件下黑暗静置 24 h,观察过敏反应。将烟草叶片剪下,浸泡于 DAB (pH 3.8)溶液中,黑暗保存 8 h。将叶片转移至乙醇:甘油:冰乙酸为 1:1:1 (体积比)的溶液中,沸水浴 10–15 min,用 60%乙醇漂洗后,观察活性暴发情况^[22]。

1.2.3 抑制玉米立枯丝核菌的平皿及离体叶片实验

将玉米种子(B73)种植于 10 cm 口径的花盆中,于 25 °C 人工气候室中培养,每天 10 h 光照,14 h 黑暗。剪取健康的 7 叶期玉米的第 4 位叶片,放在含有 6-苄氨基腺嘌呤 (40 mg/mL)的平皿中。用直径 0.4 cm 的打孔器打取玉米立枯丝核菌的菌饼,放置在倒好的 PDA 平皿及叶片中央,加入 40 μL 有效霉素 A 或 GDFS1009 孢悬液,不放置菌饼的叶片为对照。

1.2.4 有效霉素 A 胁迫下棘孢木霉转录组测序

将棘孢木霉 GDFS1009 于 PDA 平皿上转接 2 次,培养 5 d,待孢子繁盛用无菌水洗下,制成 10^6 CFU/mL 孢子悬液。终浓度为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的有效霉素 A 通过微孔滤器过滤,加入 95 mL PD 培养液中,等量无菌水加入 95 mL PD 培养液为对照。取 1 mL 孢悬液,转接到 PD 中,28 °C、180 r/min 培养 24 h 及 48 h,真空抽滤去除培养液,清水洗涤后收集菌丝体,液氮速冻,Solexa 测序。

1.2.5 棘孢木霉菌转录组的全局分析及特异分析

对样本的转录组测序数据进行分析,包括数据预处理、基因组 Mapping、基因表达分析、转录本表达分析、可变剪切分析、差异基因和非差异基因

分析^[23-24]。将两组转录组测序的原始数据统一软件和参数进行全局性分析及特异分析。参考基因组来自于 <http://genome.jgi.doe.gov/Trias1/Trias1.download.html>。

1.2.6 气相色谱-飞行时间质谱联用(GC-TOF-MS)测定木霉中有效霉素 A 含量

真空抽滤收集 GDFS1009 菌丝体沉淀, 4 °C 无菌超纯水洗涤 2 次, 萃取胞内物质并衍生, 有效霉素 A 标准品为阳性对照。GC-TOF-MS 检测条件: 前进样口吹扫流速: 3 mL/min; 柱流速: 1 mL/min; 柱温: 60 °C 保持 1 min, 以 10 °C 每分钟的速率上升至 330 °C, 保持 10 min; 前进样口温度: 280 °C; 传输线温度: 280 °C; 离子源温度: 220 °C; 电离电压: -70 eV; 扫描方式: 85-600 m/z; 扫描速率: 20 spectra/s; 溶剂延迟: 366 s。

2 结果与分析

2.1 有效霉素 A 对棘孢木霉菌抗性相关酶的影响

从溶菌酶活性来看, 棘孢木霉菌发酵 3-4 d 后几丁质酶产量达到平台期。有效霉素 A 发酵 4 d 时的木霉几丁质酶活力为 121.481 ± 9.114 U/mL, 对照为 119.837 ± 6.230 U/mL。由此可见, 有效霉素 A 对木霉菌产几丁质酶没有明显影响(图 1)。在发酵 4 d 的条件下, 有效霉素 A 对棘孢木霉菌纤维素酶的产量也未见明显影响。发酵 3 d 酶活力达到最大值, 有效霉素 A 处理后的酶活力为 1.717 ± 0.212 U/mL, 对照为 1.723 ± 0.112 U/mL (图 2)。

从有效霉素 A 对棘孢木霉菌诱导植物防御反应酶的影响来看, 在发酵 4 d 的过程中, 有效霉

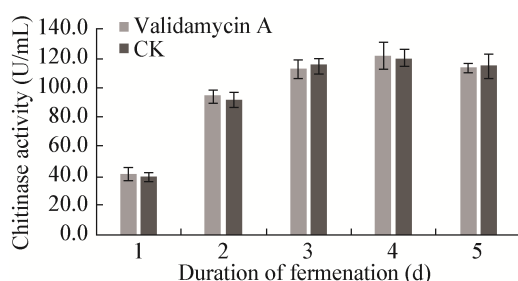


图 1 有效霉素 A 对棘孢木霉菌 GDFS1009 几丁质酶活力的影响

Figure 1 Effect of validamycin A on the chitinase activity of *T. asperellum* GDFS1009

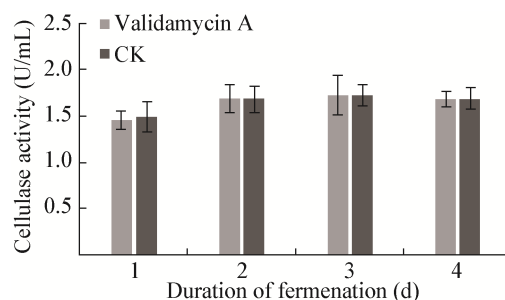


图 2 有效霉素 A 对棘孢木霉菌 GDFS1009 纤维素酶活力的影响

Figure 2 Effect of validamycin A on the cellulase activity of *T. asperellum* GDFS1009

素 A 对棘孢木霉菌木聚糖酶产量未见明显影响。发酵 3 d 酶活力达到最大值, 有效霉素 A 处理后的酶活力为 11.662 ± 0.395 U/mL, 对照为 11.477 ± 0.613 U/mL (图 3)。

2.2 诱导烟草过敏性反应

注射木霉菌木聚糖酶发酵液滤液 30 μ L, 24 h 后烟草叶片出现了明显的过敏性坏死斑, 而注射有效霉素 A 不会产生任何过敏性坏死现象, 且有效霉素 A 对棘孢木霉菌酶液所诱导的过敏性反应没有明显影响(图 4)。

2.3 有效霉素 A 与木霉菌的抑菌实验

接种玉蜀黍丝核菌 12 h 后, 对照组(CK1)丝核菌生长旺盛且大面积侵染到玉米叶片上。木霉菌单因子作用下, 丝核菌菌丝体密度及旺盛程度明显降低, 与对照组(CK1)相比, 以较小的面积侵染到

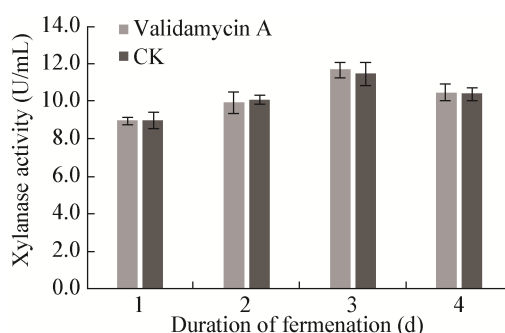


图 3 有效霉素 A 对棘孢木霉菌 GDFS1009 木聚糖酶活力的影响

Figure 3 Effect of validamycin A on the xylanase activity of *T. asperellum* GDFS1009

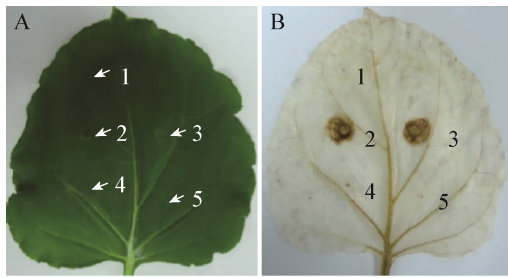


图 4 有效霉素 A 及棘孢木霉菌引发烟草过敏反应及 ROS 反应的影响

Figure 4 HR and ROS analyses in tobacco

注: A: 烟草过敏反应; B: ROS 反应; 1: 100 µg/mL 有效霉素 A 处理; 2: GDFS1009 木聚糖酶发酵液滤液处理; 3: 100 µg/mL 有效霉素 A 及 GDFS1009 木聚糖酶发酵液滤液处理; 4: 空白发滤培养液处理; 5: 无菌去离子水处理。

Note: A: Photographs of HR in tobacco; B: Photographs of ROS; 1: Treated with 100 µg/mL validamycin A; 2: Treated with xylanase solution of GDFS1009; 3: Treated with 100 µg/mL validamycin A and xylanase solution of GDFS1009; 4: Treated with blank broth; 5: Treated with ddH₂O.

叶片上。有效霉素 A 单因子作用下, 丝核菌菌丝体形态出现了明显变化, 而且生长受到明显抑制, 速度极为缓慢。有效霉素 A 与木霉菌协同作用下, 丝核菌的生长完全结束。没有接种的玉米叶片(CK2)则没有损伤(图 5)。

培养 4 d 后, 有效霉素 A 与木霉菌几丁质酶协同处理的病菌菌落直径为 3.0 ± 0.2 cm; 有效霉素 A 与木霉菌单因子处理的病菌菌落直径分别为 3.4 ± 0.2 cm 和 6.2 ± 0.3 cm; 对照中病菌菌落直径为

9.0 ± 0.1 cm。协同作用的抗病效果显著高于单因子作用(图 6A)。培养 4 d 后, 有效霉素 A 与木霉菌纤维素酶协同处理的病菌菌落直径为 3.5 ± 0.2 cm; 有效霉素 A 与木霉菌单因子处理的病菌菌落直径分别为 3.8 ± 0.3 cm 和 6.9 ± 0.2 cm; 对照中病菌菌落直径为 9.0 ± 0.1 cm。协同作用的抗病效果显著高于单因子作用(图 6B)。

2.4 转录组测序非差异和差异表达基因分析

在有效霉素 A 处理 24 h 时的棘孢木霉菌样品与对照样品的表达相关性结果, 差异基因(Fold change>2.0 为显著上调, Fold change<0.5 为显著下调)和非差异基因($0.5 \leq \text{Fold change} \leq 2.0$ 为差异不显著)的统计分析结果如图 7 所示。该结果显示, 在 RNA 水平上共检测到 11 845 个基因的表达, 其中: 非表达差异的基因为 10 787 个, 占 91.068%; 差异表达的基因为 1 058 个, 占 8.932%。在差异表达基因中, 739 个为上调表达, 319 个为下调表达(图 7A)。有效霉素 A 处理 48 h 时的棘孢木霉菌样品与对照样品的表达相关性统计分析表明, 在 RNA 水平上共有 11 801 个基因表达, 其中: 非差异表达的基因为 10 001 个, 占 93.237%; 差异表达的基因为 798 个, 占 6.762%。在差异表达基因中, 436 个为上调表达, 362 个为下调表达(图 7B)。由于有效霉素 A 引起的差异基因占总基因数的比例很低, 可能不足以对棘孢木霉菌整体生长繁殖、基础代谢和生防功能构成影响。

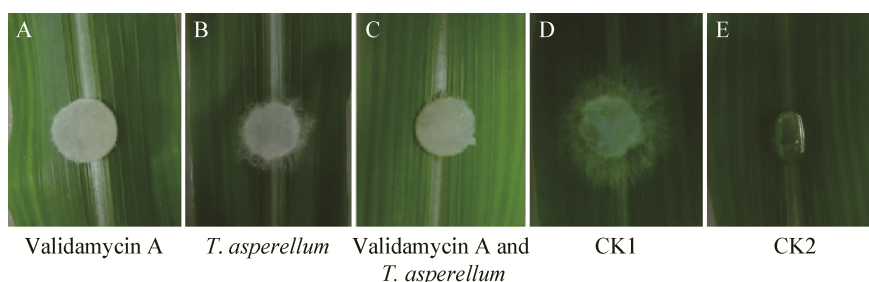


图 5 有效霉素 A 与棘孢木霉菌 GDFS1009 孢悬液抑制玉蜀黍丝核菌的离体叶片实验

Figure 5 Synergistic effect of validamycin A and *T. asperellum* GDFS1009 spores on *R. zeae* on detached maize leaves

注: A、B 及 C 分别为菌饼加 100 µg/mL 有效霉素 A 40 µL, 10^6 CFU/mL 棘孢木霉菌孢悬液 40 µL, 100 µg/mL 有效霉素 A 与 10^6 CFU/mL 孢悬液混合液 40 µL; D: 菌饼加无菌水 40 µL; E: 无菌水 40 µL。

Note: A: The treatments are *R. zeae* with 40 µL of 100 µg/mL validamycin A; B: 40 µL of 10^6 CFU/mL GDFS1009 spores; C: 100 µg/mL validamycin A and 10^6 CFU/mL GDFS1009 spores; D: *R. zeae* with sterilized water; E: Sterilized water.

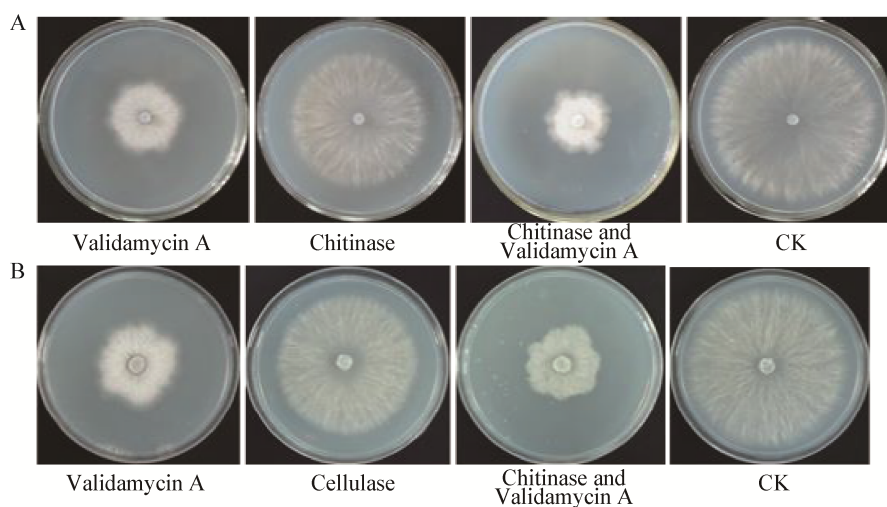


图 6 有效霉素 A 与棘孢木霉菌 GDFS1009 拮抗因子协同抑制玉蜀黍丝核菌的实验

Figure 6 Synergistic effect of Validamycin A and related biocontrol factors of *T. asperellum* GDFS1009 on *R. zeae*

注: A: 100 $\mu\text{g/mL}$ 有效霉素 A 与 20% 几丁质酶发酵液; B: 100 $\mu\text{g/mL}$ 有效霉素 A 与 20% 纤维素酶发酵液.

Note: A: 100 $\mu\text{g/mL}$ Validamycin A and 20% chitinase solution; B: 100 $\mu\text{g/mL}$ Validamycin A and 20% cellulase solution.

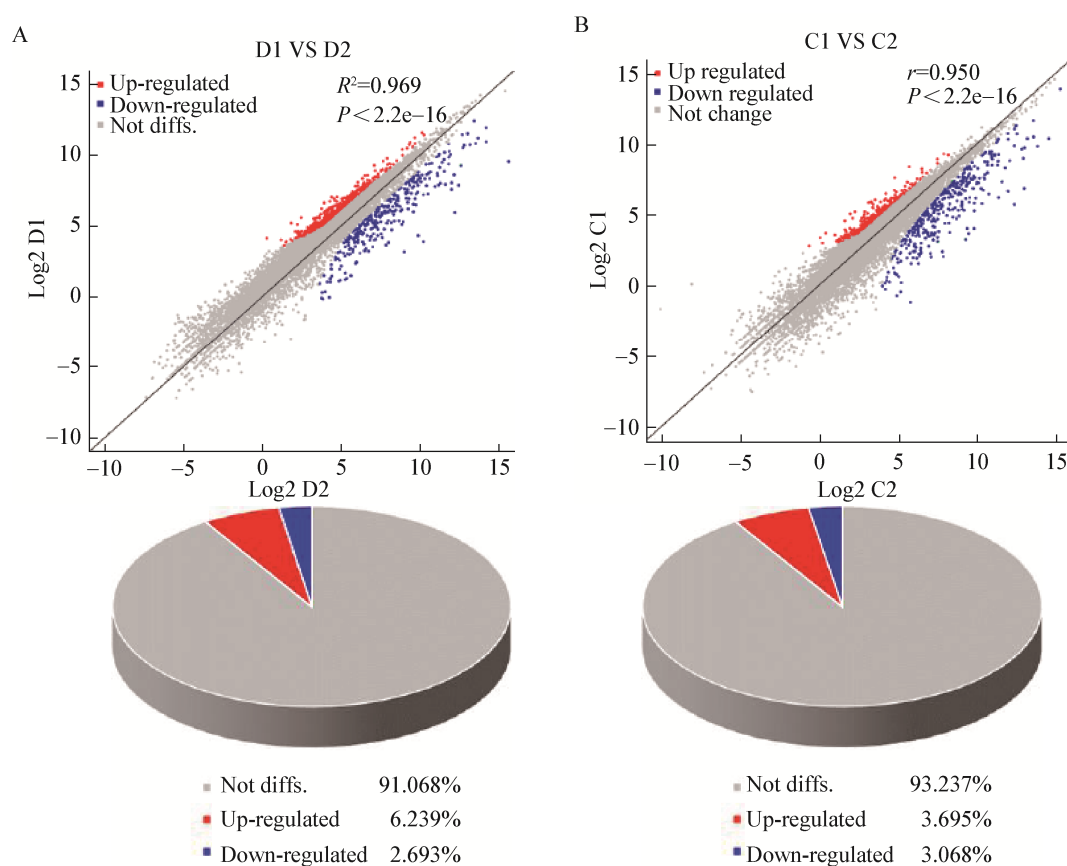


图 7 棘孢木霉菌 GDFS1009 表达相关性图

Figure 7 Express correlation diagram of *T. asperellum* GDFS1009

Note: A: 24 h; B: 48 h.

24 h 和 48 h 差异表达基因的综合分析结果显示: 48 h 上调基因与 24 h 相比, 数目显著减少, 24 h 为 739 个, 48 h 仅为 436 个, 其中有 193 个基因相同(图 8A); 24 h 和 48 h 下调的基因数目基本一致, 分别为 319 个和 362 个, 其中有 216 个基因相同(图 8B)。

在糖酵解、脂肪酸代谢及氨基酸代谢 3 个途径中, 有效霉素 A 处理木霉菌 24 h 后, 糖酵解途径中有 4 个基因显著上调表达, 3 个基因的显著下调表达; 处理 48 h 后, 2 个基因显著上调表达, 3 个基因的显著下调表达。有效霉素 A 处理木霉菌 24 h 后, 脂肪酸代谢中有 5 个基因显著上调表达和 1 个基因显著下调表达; 处理 48 h 后, 只有 3 个基因显著下调表达。处理 24 h 后, 13 个氨基酸代谢途径中有 72 个基因显著上调表达, 11 个基因显著下调表达; 处理 48 h 后, 12 个氨基酸代谢途径中有

28 个基因显著上调表达, 2 个基因显著下调表达(表 1)。由此可以推测, 若有效霉素 A 对木霉菌产生一定影响, 可能会在菌丝体生长、代谢延伸早期表现比较明显。

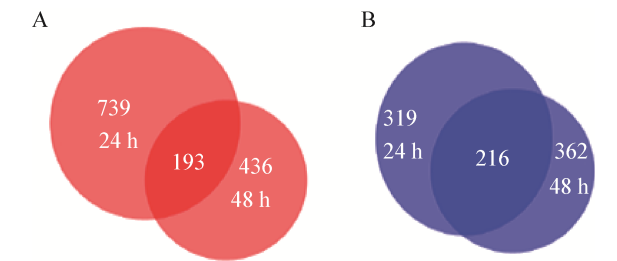


图 8 24 h 和 48 h 差异基因的关联性分析
Figure 8 Correlation analysis of differential genes in 24 h and 48 h
注: A: 上调基因; B: 下调基因。
Note: A: Up-regulated genes; B: Down-regulated genes.

表 1 有效霉素 A 对棘孢木霉菌 GDFS1009 糖类、脂类和氨基酸代谢相关基因的影响

Table 1 Impact of validamycin A on carbohydrate, fatty acid and amino acid metabolism of *T. asperellum* GDFS1009

代谢通路 Metabolic pathway	24 h		48 h	
	上调	下调	上调	下调
	Up-regulation	Down-regulation	Up-regulation	Down-regulation
糖酵解 Glycolysis	4	3	2	3
脂肪酸降解 Fatty acid degradation	3	1	0	1
脂肪酸延伸 Fatty acid elongation	1	0	0	0
脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism	1	0	0	1
不饱和脂肪酸合成 Biosynthesis of unsaturated fatty acids	0	0	0	1
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酰胺代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	6	2	1	0
精氨酸和脯氨酸代谢 Arginine and proline metabolism	9	1	4	0
β-丙氨酸代谢 β-Alanine metabolism	5	0	1	0
半胱氨酸和甲硫氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	1	1	5	0
谷胱甘肽代谢 Glutathione metabolism	3	1	3	1
甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢 Glycine, serine and threonine metabolism	4	0	0	0
组氨酸代谢 Histidine metabolism	2	0	1	0
赖氨酸合成 Lysine biosynthesis	5	1	1	0
苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism	7	1	3	0
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	5	2	1	0
色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	5	0	3	0
酪氨酸代谢 Tyrosine metabolism	7	2	4	1
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation	13	0	1	0

2.5 有效霉素 A 对棘孢木霉菌海藻糖能量代谢途径的影响

分析实验结果后发现, 棘孢木霉菌中 2 个 β -D-糖苷酶和 1 个海藻糖酶, 在 24 h 受到有效霉素 A 诱导显著上调表达, 但 48 h 发生回落(表 2)。说明有效霉素 A 可以瞬时刺激海藻糖代谢途径, 随后恢复常态, 木霉菌海藻糖代谢系统没有受到显著影响。同时由于有效霉素 A 对木霉菌的生长繁殖无明显影响, 说明有效霉素 A 对木霉菌的能量供给没有明显干扰。由此可推测两种成因, 即木霉菌的海藻

糖途径不受有效霉素 A 的影响或干扰; 木霉菌中除海藻糖途径外, 还有其它重要的能量补给途径(图 9)。

外界有毒物质的侵入可以刺激真菌过表达大量氧化酶, 如单加氧酶、过氧化物酶, 它们形成大量的活性氧, 使有毒物质被氧化, 还可以刺激真菌过表达谷胱甘肽转移酶, 形成有毒物质——谷胱甘肽复合物, 进而被排除体外^[25-27]。通过 GC-TOF-MS 检测, 可以直观反映有效霉素 A 是否进入到棘孢木霉菌细胞内, 结果表明并未在胞内发现有效霉素 A (图 10)。

表 2 有效霉素 A 对棘孢木霉菌 GDFS1009 海藻糖途径相关基因的影响

Table 2 Impact of validamycin A on aldolase pathway gene of *T. asperellum* GDFS1009

JGI 基因登录号 JGI gene accession number	基因英文名称 Gene name	变化倍数 Variation multiple	
		24 h	48 h
e_gwl.18.422.1	β -D-葡萄糖苷酶 β -D-glucosidase	2.65	1.59
e_gwl.4.2187.1	β -D-糖苷酶 β -D-glycosidase	2.24	0.99
fgeneshl_kg.7_#_352_#_Locus6367v1rpkm10.24	β -D-糖苷酶 β -D-glycosidase	1.00	0.88
gm1.9162_g	海藻糖酶 Trehalase	3.82	0.68
CE7902_17110	海藻糖酶 Trehalase	1.93	1.58

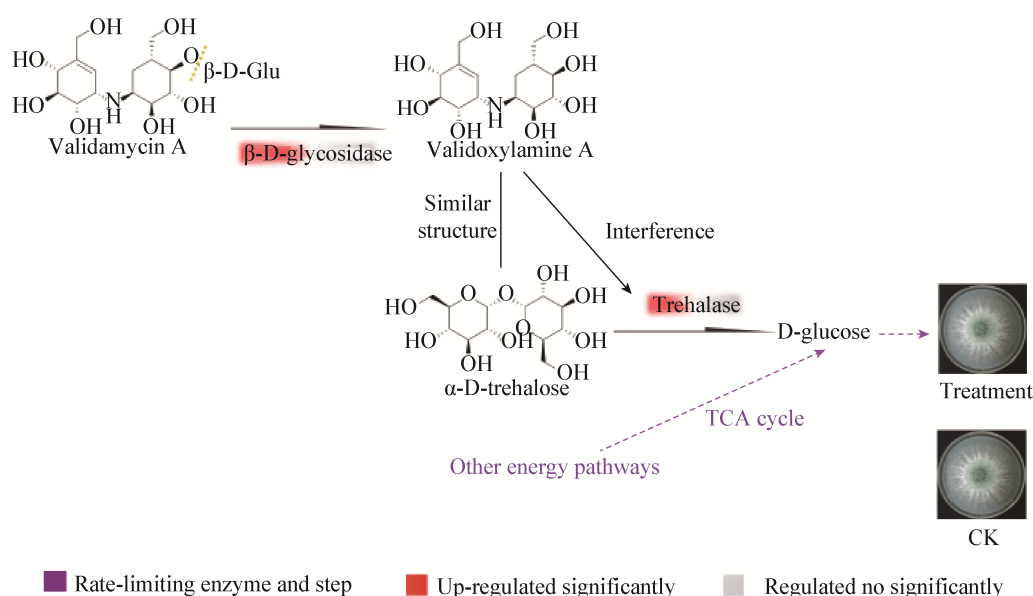


图 9 有效霉素 A 对棘孢木霉菌 GDFS1009 海藻糖能量代谢途径的影响

Figure 9 Impact of validamycin A on aldolase pathway of *T. asperellum* GDFS1009

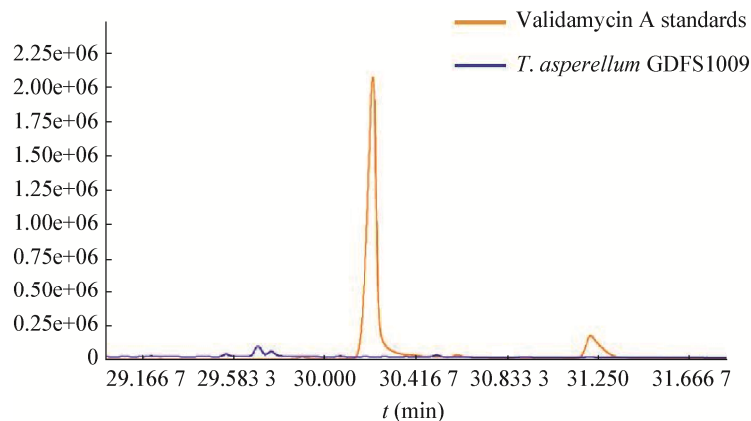


图 10 有效霉素 A 在棘孢木霉菌 GDFS1009 中的含量检测

Figure 10 Content analysis of validamycin A in *T. asperellum* GDFS1009

3 结论

本研究首次对棘孢木霉菌 GDFS1009 与有效霉素 A 组合应用机理进行科学的探讨, 在培养 24 h 和 48 h 的棘孢木霉菌样品中, 分别检测到 11 845 和 11 801 个有 RNA 表达的基因, 大量木霉菌转录本的获得为后续深入研究其抗病机理及代谢组等提供了充分的数据依据。结果表明, 高浓度的有效霉素 A 对棘孢木霉菌的生长发育和生防功能等均无明显影响, 对其主要功能也不存在干扰或抑制作用。可能棘孢木霉菌具有保护其不受有效霉素 A 胁迫的耐受机制, 使之免受严重伤害并最终适应。木霉菌单因子作用下, 丝核菌菌丝体密度及旺盛程度明显降低, 与对照组(CK-1)相比, 以较小的面积侵染到叶片上。有效霉素 A 单因子作用下, 丝核菌菌丝体形态出现了明显变化, 且生长受到明显抑制, 速度极为缓慢。有效霉素 A 与木霉菌协同作用下, 丝核菌的生长完全结束。

本研究为棘孢木霉菌与有效霉素 A 的协同使用奠定了一定的理论基础, 说明二者的组合具有生防优势互补的特征。有效霉素 A 和木霉菌协同使用所产生的叠加抗性效应, 可强化玉米对纹枯病菌的抗性反应, 也有利于实现对抗生素类化学农药的减量化使用, 提高环境安全性^[28]。同时, 填补了国内外对有效霉素 A 和木霉菌亲和互作的分子基础研

究的空白, 为开发棘孢木霉菌 GDFS1009 与有效霉素 A 的最佳组合新型木霉菌生防制剂, 如木霉菌与有效霉素水剂制备的颗粒剂等提供了理论基础。

REFERENCES

- [1] Yan JM, Ye HZ, Zheng D, et al. Studies on pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG1-1A and *R. zeae* on maize in Sichuan[J]. Journal of Maize Sciences, 2005, 13(3): 114-116 (in Chinese)
严吉明, 叶华智, 郑达, 等. 四川玉米纹枯病菌致病性研究[J]. 玉米科学, 2005, 13(3): 114-116
- [2] Kong TT, Zhou XK, Gao ZG, et al. Identification of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on maize and the pathogenicities in northeastern of China[J]. Journal of Maize Sciences, 2013, 21(4): 132-137 (in Chinese)
孔婷婷, 周晓锟, 高增贵, 等. 东北地区玉米纹枯病菌菌丝融合群鉴定及其致病力研究[J]. 玉米科学, 2013, 21(4): 132-137
- [3] Xue T, Fu JF, Zhou RJ, et al. The epidemiology of corn sheath blight and its preventive treatment[J]. Journal of Maize Sciences, 2008, 16(1): 126-128 (in Chinese)
薛腾, 傅俊范, 周如军, 等. 辽宁省玉米纹枯病发生规律及防治技术[J]. 玉米科学, 2008, 16(1): 126-128
- [4] Zhang XF, Zheng YG, Shen YC. Preparation of validoxylamine A by microbial transformation of validamycins[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2004, 29(4): 206-208, 243 (in Chinese)
张宪锋, 郑裕国, 沈寅初. 微生物转化法裂解井冈霉素生产井冈霉素基胺 A[J]. 中国抗生素杂志, 2004, 29(4): 206-208, 243
- [5] Zhang S, Guo YX, Tang WH, et al. Studies on the toxicity and mechanism of Jinggangmycin A on *Rhizoctonia solani* AG-1 IA [in vitro (on PDA) and in vivo (in rice plant)] [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2001, 3(4): 31-37 (in Chinese)
张穗, 郭永霞, 唐文华, 等. 井冈霉素 A 对水稻纹枯病菌的毒

- 力和作用机理研究[J]. 农药学学报, 2001, 3(4): 31-37
- [6] Li SD, Huang LY. A new technique for the control of maize sheath blight of validoxylamine A[J]. Agrochemicals, 1999(1): 37 (in Chinese)
李顺德, 黄兰英. 井冈霉素防治玉米纹枯病的一种施药新技术[J]. 农药, 1999(1): 37
- [7] Asano N, Yamaguchi T, Kameda Y, et al. Effect of validamycins on glycohydrolases of *Rhizoctonia solani*[J]. The Journal of Antibiotics, 1987, 40(4): 526-532
- [8] Fan YX, Yu Y, Jia XQ, et al. Cloning, expression and medium optimization of validamycin glycosyltransferase from *Streptomyces hygroscopicus* var. *jinggangensis* for the biotransformation of validoxylamine A to produce validamycin A using free resting cells[J]. Bioresource Technology, 2013, 131: 13-20
- [9] Xue BD, Li J, Chen YX. Studies on antagonism of *Trichoderma* sp. against six pathogenic funga and biological control[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 1995, 18(1): 31-36 (in Chinese)
薛宝娣, 李娟, 陈永莹. 木霉(TR-5)对病原真菌的拮抗机制和防病效果研究[J]. 南京农业大学学报, 1995, 18(1): 31-36
- [10] Wang YD. Study on solid fermentation technology and application of *Trichoderma harzianum* strain H-13[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2006 (in Chinese)
王永东. 哈茨木霉 H-13 固体发酵工艺及其应用效果的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2006
- [11] Zhang GZ, Wen CJ. Biocontrol of maize sheath blight with *Trichoderma* spp.[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2005, 32(4): 353-356 (in Chinese)
张广志, 文成敬. 木霉对玉米纹枯病的生物防治[J]. 植物保护学报, 2005, 32(4): 353-356
- [12] Hu CH, Wei YR, Liu K, et al. Cloning of chitinase gene and its genetic transformation of wild banana (*Musa itinerans* Cheesm.)[J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(4): 719-724 (in Chinese)
胡春华, 魏岳荣, 刘凯, 等. 几丁质酶基因克隆及其野生蕉转化[J]. 分子植物育种, 2010, 8(4): 719-724
- [13] Qiao HP, Zong ZF. Biological control of plant pathogens with *Hyperparasites*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2002, 18(4): 176-179 (in Chinese)
乔宏萍, 宗兆锋. 用重寄生菌防治植物病害[J]. 中国生物防治, 2002, 18(4): 176-179
- [14] Huang YQ, Zhuang JH, Gao ZG, et al. Defensive enzyme in melon induced by *Trichoderma* against wilt[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2005, 36(5): 546-549 (in Chinese)
黄艳青, 庄敬华, 高增贵, 等. 木霉菌诱导甜瓜抗枯萎病相关防御反应酶系的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2005, 36(5): 546-549
- [15] Weindling R. Studies on lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma hamatum* on *Rhizoctonia solani* and other soil fungi[J]. Phytopathology, 1932, 22: 837-845
- [16] Elad Y, Chet I, Boyle P, et al. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*-scanning electron microscopy and fluorescence microscopy[J]. Phytopathology, 1983, 73(1): 85-88
- [17] Dean JFD, Anderson JD. Ethylene biosynthesis-inducing xylanase: II. Purification and physical characterization of the enzyme produced by *Trichoderma viride*[J]. Plant Physiology, 1991, 95(1): 316-323
- [18] Enkerli J, Felix G, Boller T. The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity[J]. Plant Physiology, 1999, 121(2): 391-398
- [19] Chen J, Zhu JW, Zhang T, et al. Progress on mechanism and applications of *Trichoderma* as a biocontrol microbe[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(2): 145-151 (in Chinese)
陈捷, 朱洁伟, 张婷, 等. 木霉菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(2): 145-151
- [20] Djonović S, Pozo MJ, Dangott LJ, et al. Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic resistance[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(8): 838-853
- [21] Lorito M, Woo SL, Harman GE, et al. Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field[J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 48(1): 395-417
- [22] Thordal-Christensen H, Zhang ZG, Wei YD, et al. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction[J]. The Plant Journal, 1997, 11(6): 1187-1194
- [23] Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq[J]. Bioinformatics, 2009, 25(9): 1105-1111
- [24] Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. Nature Biotechnology, 2010, 28(5): 511-515
- [25] Bae W, Chen X. Proteomic study for the cellular responses to Cd²⁺ in *Schizosaccharomyces pombe* through amino acid-coded mass tagging and liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Molecular & Cellular Proteomics, 2004, 3(6): 596-607
- [26] Rudraiah S, Rohrer PR, Gurevich I, et al. Tolerance to acetaminophen hepatotoxicity in the mouse model of autoprotection is associated with induction of flavin-containing monooxygenase-3 (FMO3) in hepatocytes[J]. Toxicological Sciences, 2014, 141(1): 263-277
- [27] Volkens G, Palm GJ, Weiss MS, et al. Structural basis for a new tetracycline resistance mechanism relying on the TetX monooxygenase[J]. FEBS Letters, 2011, 585(7): 1061-1066
- [28] Zhu CX, Bai XS, Zhang M. The *Status quo* of development and perspective of bio-pesticides[J]. Shanghai Environmental Sciences, 2002, 21(11): 654-657, 661 (in Chinese)
朱昌雄, 白新盛, 张木. 生物农药的发展现状及前景展望[J]. 上海环境科学, 2002, 21(11): 654-657, 661