

棘孢木霉菌与枯草芽胞杆菌共培养的最适碳源及其促进机理

郭富强¹ 彭治鑫¹ 李清钰¹ 张成省^{1,2} 郭亚利³ 朱迪³ 张维³
苟剑渝⁴ 赵福彬⁵ 高贵^{3*} 赵栋霖^{1,2*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 山东 青岛 266101; 2. 国家盐碱地综合利用技术创新中心, 山东 东营 257300;
3. 贵州省烟草公司黔西南州公司, 兴义 562400; 4. 贵州省烟草公司遵义市公司, 遵义 563000;
5. 山东青岛烟草有限公司, 青岛 266000)

摘要: 为有效防治烟草疫霉病, 筛选棘孢木霉菌 *Trichoderma asperellum* HG1 和枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* Tpb55 单独培养的碳源及两者共培养的碳源, 测定不同碳源下 2 种菌共培养发酵液和发酵液提取物对烟草疫霉菌 *Phytophthora nicotianae* 的抑制效果及最适碳源条件下共培养发酵液的盆栽防效, 分离鉴定了 2 种菌共培养提取物中的抑菌活性物质, 通过转录组学方法分析添加 3.75 g/L 糊精和未添加糊精条件下棘孢木霉菌 HG1 的基因表达差异, 并采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术对转录组测序结果进行验证。结果表明: 棘孢木霉菌 HG1 单独偏好的碳源有 4 种, 枯草芽胞杆菌 Tpb55 单独偏好的碳源有 3 种, 2 种菌共同偏好的碳源有 6 种; 以糊精为碳源时, 棘孢木霉菌 HG1 和枯草芽胞杆菌 Tpb55 共培养提取物对烟草疫霉菌的抑制率最高可达 76.45%, 其发酵液对烟草疫霉病的室内盆栽防效为 100.0%, 且对烟株的生长发育无负作用; 以糊精作为碳源的 2 种菌共培养提取物中分离鉴定出的 (*E*)-7,9-二烯-11-羧基十八酸甲酯化合物对烟草疫霉菌的抑制率为 72.93%; 添加糊精能激发棘孢木霉菌 HG1 中谷胱甘肽代谢系统, 降低其氧化应激的程度, 从而有利于生命活动的正常进行。

关键词: 棘孢木霉菌; 枯草芽胞杆菌; 碳源; 共培养; 发酵; 优化; 转录组分析

Optimal carbon source for co-culture of *Trichoderma asperellum* HG1 and *Bacillus subtilis* Tpb55 and its promoting mechanisms

Guo Fuqiang¹ Peng Zhixin¹ Li Qingyu¹ Zhang Chengsheng^{1,2} Guo Yali³ Zhu Di³
Zhang Wei³ Gou Jianyu⁴ Zhao Fubin⁵ Gao Gui^{3*} Zhao Donglin^{1,2*}

(1. Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong Province, China;
2. National Center of Technology Innovation for Comprehensive Utilization of Saline-Alkali Land, Dongying 257300, Shandong Province, China; 3. Qianxinan Prefecture Branch, Guizhou Tobacco Company, Xingyi 562400, Guizhou Province, China; 4. Zunyi Branch of Guizhou Provincial Tobacco Company, Zunyi 563000, Guizhou Province, China; 5. Shandong Qingdao Tobacco Co. Ltd., Qingdao 266000, Shandong Province, China)

Abstract: To control the severe tobacco disease caused by *Phytophthora nicotianae*, the preferred carbon sources of *Trichoderma asperellum* HG1 and *Bacillus subtilis* Tpb55 individually, as well as those preferred by two strains in combination were screened in this study. The antimicrobial effects of the ster-

ile filtrates and co-culture extracts from the two strains under different carbon sources and combinations on *P. nicotianae* were determined. The efficacy of control of potted plant disease with the co-cultivation fermentation broth under the optimal conditions was also explored. The antimicrobial substance in the co-culture extracts were separated and identified. The gene expressions of *T. asperellum* HG1 with 3.75 g/L or without the optimal carbon source dextrin were analyzed by transcriptomics. Furthermore, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) technology was employed to validate the results of the transcriptome sequencing. The results indicated that *T. asperellum* HG1 individually preferred four carbon sources, *B. subtilis* Tpb55 individually preferred three carbon sources, and both microbes jointly preferred six carbon sources. When dextrin was used as the carbon source, the antimicrobial rate of the co-culture extract reached a maximum of 76.45%, and its fermentation broth effectively prevented the infection of *P. nicotianae*, with a prevention effect of 100.0%, and without any negative impact on the growth and development of tobacco. (*E*)-7,9-diene-11-carbonyl-octadecanoic acid methyl ester, isolated and identified from the co-cultured extract with dextrin as the carbon source, exhibited an antimicrobial rate of 72.93% against *P. nicotianae* at a concentration of 0.3 mg/mL. The addition of dextrin stimulated the glutathione metabolic system in *T. asperellum* HG1, and reduced the level of oxidative stress, thus facilitated the normal progress of life activities.

Key words: *Trichoderma asperellum*; *Bacillus subtilis*; carbon source; co-culture; fermentation; optimization; transcriptome analysis

卵菌能引起多种植物病害,具有传播速度快、危害面积广等特点(徐建平,2022)。卵菌是丝状真核微生物,在形态上与真菌类似,而进化上则与藻类极为相近(Burki et al.,2020)。这种进化上的差别使得卵菌与真菌在基因组结构、细胞结构、生理与代谢调节过程、生长发育和致病机制等方面存在很多差异,这些差异性导致许多常见的真菌杀菌剂对卵菌无效。在卵菌中最有代表性的是疫霉 *Phytophthora*, 其是典型的土传病害病原菌,也是世界上最具破坏性的植物病原体之一(Kamoun et al.,2015)。目前对于疫霉引起的植物病害依然以化学防治为主,长期施用农药引发了病原菌的抗药性、农药残留和环境污染等一系列问题(彭丽娟等,2014)。与传统化学农药相比,微生物防治具有环境友好和可持续等优点(任璐等,2023),因此,开发用于防治疫霉病害的生物防治产品迫在眉睫。

单一微生物因对环境较敏感、抗病机制相对单一等原因在生物防治中具有较大局限性(朱晓琴等,2023;于涛涛等,2024),无法满足对病害防治的要求,因此综合利用不同来源和不同作用机制的微生物来防治植物病害是微生物农药发展的一个重要方向(Mazzola & Freilich,2017)。微生物共培养模拟了自然界中复杂的生物群状态,促使微生物通过协同和竞争等相互作用激活菌株中的沉默基因簇以刺激产生防御性、保护性和营养性代谢物(Maglangit

et al.,2020)。微生物共培养不仅可以提高对病原菌的抑制作用和生物转化效率(Bader et al.,2010),还可以通过多种复杂的互作机制增加这些可用代谢产物的产量和多样性(Niu et al.,2020)。Akone et al.(2016)研究发现,与单一纯培养相比,内生真菌毛壳菌 *Chaetomium* sp. 与枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* 共培养可将抗菌次生代谢物的产量提高 8.3 倍。Wang et al.(2015)研究结果显示,在最佳条件下萎缩木霉菌 *Trichoderma atrophaeus* SG3403 和枯草芽胞杆菌共培养的发酵滤液中的抗真菌和植物生长促进代谢物较单一纯培养显著增加,对禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum* 的抑制率为 54.22%。微生物共培养的成功率受微生物之间的相互作用、培养条件以及培养环境等多种因素的影响(Hitit et al.,2017)。碳源主要为微生物提供细胞和合成产物的碳架及细胞生命活动所需的能量等。微生物对碳源的利用具有选择性,不同碳源会对微生物的代谢产生很大的影响,因此可通过优化接种条件和营养成分来调整微生物共培养的代谢产物。如 Ye et al.(2022)研究证实调节共培养条件中碳源成分可以控制发酵方向,进而影响物质代谢。微生物次级代谢物是微生物在生长后期产生的低分子量物质,这些代谢物可用于开发生物农药(Singh et al.,2017)。

木霉菌属 *Trichoderma* 和芽胞杆菌属 *Bacillus* 是生物防治中应用极为广泛的 2 类微生物。课题组前

期研究筛选获得了具有显著抗疫霉活性的棘孢木霉菌 HG1 和枯草芽胞杆菌 Tpb55, 构建了两者的共培养体系, 并发现这 2 株菌株的共培养发酵提取物对烟草疫霉菌 *P. nicotianae* 的抑制效果优于单菌株, 且棘孢木霉菌 HG1 是主导菌株。为开发有效防治疫霉菌的生物药剂, 筛选棘孢木霉菌 HG1 和枯草芽胞杆菌 Tpb55 单独培养的碳源及两者共培养的碳源, 测试不同碳源下 2 种菌共培养发酵液和发酵液提取物对烟草疫霉菌的抑制效果, 探究最适碳源及碳源组合条件下 2 种菌共培养发酵液的盆栽防效, 分离鉴定 2 种菌共培养提取物中的抑菌活性物质, 通过转录组学方法对棘孢木霉菌 HG1 在添加和未添加最适碳源糊精条件下的基因表达进行分析, 并采用实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术对转录组测序结果进行验证, 以期烟草疫霉菌生物药剂的研发提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试菌株、病原菌和植物: 自海南省红树根分离、纯化获得棘孢木霉菌 HG1 菌株, 28 °C 下于马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基上培养; 自烟草叶片分离、纯化获得枯草芽胞杆菌 Tpb55 菌株, 28 °C 下于营养琼脂 (nutrient agar, NA) 培养基上培养。自青岛市即墨区烟田感染黑胫病的烟草植株上分离获得烟草疫霉菌菌株 JM01, 28 °C 于燕麦琼脂 (oat agar, OA) 培养基上培养。供试烟草品种为黑胫病感病品种小黄金 1025, 在温度 28 °C、相对湿度 60% 条件下培养至长出 5 片真叶时供试。谷子品种为东北黄小米。以上供试材料均由国家农业环境微生物种质资源库 (山东) 保存并提供。

培养基: PDA 培养基成分为马铃薯浸粉 6 g/L、葡萄糖 20 g/L、琼脂 20 g/L; NA 培养基成分为蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L、牛肉膏粉 3 g/L、琼脂 15 g/L; 琼脂肉汤 (nutrient broth, NB) 培养基成分为蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L、牛肉膏粉 3 g/L; OA 培养基成分为燕麦 30 g/L、琼脂 16 g/L; 酵母玉米碳源 (yeast maize carbon source, YMCS) 培养基成分为酵母粉 20 g/L、玉米粉 10 g/L、碳源 10 g/L; 酵母玉米 (yeast maize, YM) 培养基成分为为酵母粉 20 g/L、玉米粉 10 g/L; 以上培养基均由蒸馏水定容至 1 L。

试剂和仪器: Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶, 美国 GE 公司; Evo M-MLV RT Mix Kit with gDNA Clean 和 SYBR® Green Premix Pro Taq HS qPCR 试剂盒,

湖南艾科瑞生物工程有限公司; 总 RNA 提取试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。反向硅胶, 德国 EMD Millipore 公司; 20 cm×20 cm HSGF254 硅胶板, 烟台江友硅胶开发有限公司; Biolog FF 微孔板、Biolog GEN III 微孔板和 ELX808BLG 自动微生物鉴定分析仪, 美国 BIOLOG 公司; GeneAmp 9700 PCR 仪, 美国 ABI 公司; Hei-VAP Value 旋转蒸发仪, 德国 Heidoph 公司; FA25 破碎机, 上海弗鲁克公司; JY 99-11DN 细胞破碎仪, 宁波新芝生物公司; Quantus™ 荧光计, 美国 Promega 公司; Agilent DD2 500 MHz 型核磁共振波谱仪, 美国安捷伦公司; Micromass Q-TOF 液质联用仪, 美国 Waters 公司。

1.2 方 法

1.2.1 2 种菌单独培养碳源的筛选

采用 Biolog FF 微孔板测定棘孢木霉菌 HG1 对 94 种碳源的利用率 (Wang & Zhuang, 2020)。用棉签蘸取于 PDA 培养基上 28 °C、黑暗培养 5 d 的棘孢木霉菌 HG1 接入到接种液中, 采用浊度仪测量接种液浊度, 配制细胞浓度为 75% 的菌悬液; 取菌悬液分别滴入到 Biolog FF 微孔板的孔中, 每孔装有 1 种碳源, 每孔 100 μL, 于 28 °C 条件下培养 72 h, 利用自动微生物鉴定分析仪于 750 nm 波长下检测每孔的色度和浊度, 并自动计算平均颜色变化率, 平均颜色变化率越高, 表明棘孢木霉菌 HG 的生长越好, 试验重复 3 次。

采用 Biolog Gen III 微孔板测定枯草芽胞杆菌 Tpb55 对 71 种碳源的利用率 (Van Assche et al., 2017)。用棉签蘸取于 NA 培养基上 28 °C、黑暗培养 2 d 的枯草芽胞杆菌 Tpb55 接入到接种液中, 采用浊度仪测量接种液浊度, 配制细胞浓度为 90%~98% 的菌悬液; 取菌悬液分别加入至 Biolog Gen III 微孔板的孔中, 每孔装有 1 种碳源, 每孔 100 μL, 于 28 °C 下培养 48 h, 用自动微生物鉴定分析仪于 590 nm 波长下检测每孔的色度和浊度, 自动计算平均颜色变化率, 平均颜色变化率越高, 表明枯草芽胞杆菌 Tpb55 的生长越好, 试验重复 3 次。

1.2.2 2 种菌共培养碳源的筛选

2 种菌孢子悬浮液的制备: 将棘孢木霉菌 HG1 置于 PDA 平板上 28 °C、黑暗培养 10 d 后, 无菌水冲洗, 用纱布过滤菌丝, 吸取上清液, 用血细胞计数板计数棘孢木霉菌孢子数, 用无菌水将棘孢木霉菌孢子悬浮液浓度调至 1×10^6 CFU/mL, 备用。将枯草芽胞杆菌 Tpb55 在 NA 平板上划线, 于 28 °C、黑暗培养

12 h,挑取单菌落置于NB培养基中,于28 ℃、180 r/min条件下培养12 h,测其吸光度值 $OD_{600\text{nm}}$,用无菌水将其稀释,获得浓度为 1×10^6 CFU/mL的菌悬液,备用。

2种菌共培养提取物的制备:选择1.2.1结果中棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共同偏好的6种碳源(α -D-葡萄糖、蔗糖、D-果糖、D-山梨醇、D-甘露醇和糊精)及2株菌株各自偏好碳源的12种组合作为YMC培养基中的碳源(D-半乳糖+L-苹果酸、D-半乳糖+L-乳酸、D-半乳糖+L-丙氨酸、乳糖+L-苹果酸、乳糖+L-乳酸、乳糖+L-丙氨酸、 γ -氨基丁酸+L-苹果酸、 γ -氨基丁酸+L-乳酸、 γ -氨基丁酸+L-丙氨酸、木糖+L-苹果酸、木糖+L-乳酸、木糖+L-丙氨酸)对棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55进行共培养发酵,所有碳源总量相同,2种碳源的质量比均为1:1。在含不同碳源或碳源组合的250 mL YMCS培养基中,先接入2.5 mL浓度为 1×10^6 CFU/mL的棘孢木霉菌HG1孢子悬浮液,24 h后接入0.25 mL相同浓度的枯草芽胞杆菌Tpb55孢子悬浮液,于28 ℃、180 r/min条件下发酵14 d后用纱布过滤发酵液获得菌丝,将菌丝置于二氯甲烷和甲醇的体积比为1:1的混合物中浸泡,依次用破碎机及细胞破碎仪打碎菌丝并过滤,重复2次,获得有机相。取有机相于42 ℃、80 r/min旋蒸蒸干,将沉淀溶于100 mL蒸馏水中,用200 mL乙酸乙酯萃取2次,将乙酸乙酯相于42 ℃、80 r/min旋蒸蒸干得到菌丝提取物;过滤后的发酵液用乙酸乙酯萃取2次,取有机相于42 ℃、80 r/min旋蒸蒸干得到菌液提取物(张希芬等,2022),将菌丝提取物和菌液提取物合并即得到不同碳源下棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共培养提取物。每个处理重复3次。

共培养发酵菌液和无菌滤液的制备:按照上述接种条件和方法将棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55接种到含不同碳源或碳源组合的YMCS培养基中进行发酵,14 d后获得共培养发酵液,用于盆栽试验,将共培养发酵菌液过孔径为0.22 μm 的滤膜,得到共培养无菌滤液,用于平板抑菌试验。

2种菌共培养提取物和无菌滤液对烟草疫霉菌抑制作用的测定:采用菌丝生长速率法(Mei et al., 2019)分别测定不同碳源或碳源组合下棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共培养提取物和共培养无菌滤液对烟草疫霉菌的抑制率。取30 mg不同碳源或碳源组合下2种菌共培养提取物加入到150 μL 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液中,配制浓度为200 mg/mL的2种菌共培养提取物溶液,取

50 μL 加入到10 mL OA培养基中配成终浓度为1 mg/mL的含药培养基,倒入直径为6 cm的培养皿中,制成含药平板,以加入DMSO的OA培养基作为空白对照;从OA平板上活化7 d的烟草疫霉菌菌落边缘打取直径为5 mm的菌碟,倒置于上述各含药平板中央,28 ℃培养36 h,每个处理重复3次;采用十字交叉法测量菌落直径,计算抑制率,抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-0.5) $\times 100\%$ 。取共培养无菌滤液,按照体积比1:10加入到OA培养基中,以加无菌水的OA培养基为空白对照,接入烟草疫霉菌,测量菌落直径,计算抑制率,方法同上。

1.2.3 不同碳源下2种菌共培养发酵液的防效试验

取100 g健康谷子,用蒸馏水煮至2/3谷子开花,过滤水分后置于500 mL锥形瓶中于115 ℃高压灭菌30 min,晾至室温;取烟草疫霉菌置于OA培养基上于28 ℃下培养5 d,用直径5 mm的打孔器在菌落边缘打取菌饼,接入到上述锥形瓶中,每瓶接入3个烟草疫霉菌菌饼,于25 ℃培养14 d获得菌谷。取烟草疫霉菌谷,按照质量比1:100加入到自中国农业科学院烟草研究所即墨试验基地采集的大田土壤中(王耀晨,2020),混匀,将其装入上口口径12 cm、下口径9.5 cm、高10 cm的花盆中,每盆200 g,将生长一致的5片真叶烟苗移栽到花盆中,每盆1株。选择1.2.2结果中对烟草疫霉菌抑制率较高的4种碳源或碳源组合下棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共培养发酵液进行盆栽试验。将4种碳源或碳源组合下2种菌的共培养发酵液稀释10倍,分别对移栽到病土中的烟苗进行灌根处理,每株20 mL,置于温度28 ℃、相对湿度70%、光周期12 L:12 D的人工气候室中培养,以灌施等量无菌水为对照,每个处理15株,重复3次。分别于烟苗灌根处理后第9天和15天,按照《烟草病害分级及调查方法(GB/T 23222—2008)》调查各处理烟草植株的发病情况,确定发病等级,计算病情指数。同时在灌根处理第15天,测量烟苗的株高、最大叶长、最大叶宽和有效叶数,每个处理测量15株,重复3次。

1.2.4 2种菌共培养发酵化合物主成分分离和鉴定

根据1.2.2结果,选择对烟草疫霉菌抑制率最高的碳源作为棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共培养放大发酵的碳源。按照1.2.2接种条件和方法将棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55接种到含上述碳源的YMCS培养基中进行发酵,发酵条件及发酵提取物制备方法同1.2.2。采用减压柱层

析法分离共培养发酵化合物,共获得46管提取物。将提取物点于硅胶板上进行分段,最终合并为8个组分,分别对这8个组分进行反向硅胶柱层析分离,以甲醇与水体积比为3:7~9:1的混合物进行梯度洗脱,用纯甲醇进行完全洗脱,再利用凝胶柱色谱使用甲醇与二氯甲烷体积比为1:1的混合物进行洗脱,最后通过高效液相色谱以甲醇与水体积比为3:2的混合物进行分离纯化,第3个组分得到化合物1(7.8 mg)、化合物2(2.0 mg)、化合物3(21.5 mg),第5个组分得到化合物4(8.4 mg)、化合物5(3.1 mg),第6个组分得到化合物6(4.1 mg)、化合物7(21.1 mg),第7个组分得到化合物8(74.3 mg)。采用核磁共振波谱仪测定这8种化合物的¹H、¹³C-NMR,采用液质联用仪测定化合物的ESI质谱,通过比对确定这8种化合物的类型。

1.2.5 2种菌共培养发酵化合物主成分的抑菌活性测定

在8种化合物中,化合物2的含量较少未测定其活性。采用菌丝生长速率法测定其他7种化合物对烟草疫霉菌的抑制率。每种化合物各取3 mg,分别加入到150 μL DMSO溶液中,配制成浓度均为20 mg/mL的溶液,各取50 μL溶液加入到10 mL OA培养基中,配成终浓度为0.1 mg/mL的含药培养基,以添加0.5% DMSO的OA培养基作为对照,每个处理重复3次,按照1.2.2方法接种烟草疫霉菌,测量菌落直径,计算抑制率。选取抑菌效果较好的化合物,按照上述方法配制浓度为0.3 mg/mL的含药培养基并测定其对烟草疫霉菌的抑制率。

1.2.6 糊精添加量对2种菌共培养液抑菌效果的影响

根据1.2.2结果,糊精作为碳源时棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共培养提取物及共培养无菌滤液对烟草疫霉菌的抑制率均较高,因此,采用菌丝生长速率法测定添加不同糊精后2种菌共培养发酵无菌滤液对烟草疫霉菌的抑制效果。取YM培养基,分别添加0、1.5、2.5、3.75和5.0 g/L糊精,制成糊精含量不同的YM培养基。按照1.2.2方法测定棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共培养无菌滤液对烟草疫霉菌的抑制率,每个处理重复3次。

1.2.7 不同糊精添加量下的转录组测序分析

由1.2.6结果可知,糊精添加量显著影响棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共培养发酵液对烟草疫霉菌的抑制作用,因此采用转录组测序进一步分析其促进机理。在棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55的共培养体系中,棘孢木霉菌HG1是主导菌株,因此测定糊精添加量对棘孢木霉菌HG1

基因表达的影响。将浓度为 1×10^6 CFU/mL的棘孢木霉菌HG1孢子悬浮液分别接种到YM培养基和添加3.75 g/L糊精的YM培养基中,培养7 d后,过滤后收集菌丝,用PBS洗涤3次,于液氮中冷冻,取出后按照总RNA提取试剂盒说明书提取菌丝RNA,并使用Quantus™荧光计进行定量检测,取合格的RNA送至上海美吉生物医药科技有限公司进行转录组测序分析。采用R软件工具包DESeq2对获得的转录组序列进行基因差异表达分析,当 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| \geq 1$ 时(FC 为差异倍数),该基因的表达存在显著差异。使用Goatools和R软件对差异表达基因进行GO富集和KEGG富集分析。

1.2.8 不同糊精添加量下基因表达的RT-qPCR验证

为验证转录组测序分析结果的可靠性,随机选择棘孢木霉菌HG1的6个差异基因进行RT-qPCR验证。采用Primer Premier 5软件设计A3151、A2347、A5776、A1958、A7424和A1717六个基因的引物(表1),引物均由北京擎科生物科技股份有限公司合成。取1.2.7中提取的样本RNA,按照Evo M-MLV RT Mix Kit with gDNA Clean说明书反转录合成cDNA。以棘孢木霉菌HG1的Actin基因(Ji et al., 2019)为内参基因进行RT-qPCR。10 μL RT-qPCR反应体系:2×SYBR Green PCR Mix 5 μL、上下游引物各0.2 μL、200 ng/μL的cDNA模板1.0 μL、ddH₂O 3.6 μL。RT-qPCR反应条件:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,60 °C退火20 s,40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算样本目的基因的相对表达量。

表1 棘孢木霉菌HG1实时荧光定量PCR检测的引物
Table 1 Primers for real-time quantitative PCR detection of *Trichoderma asperellum* HG1

基因 ID Gene ID	引物序列 Primer sequence
A3151	F: 5'-AGAGGCAGCTCAGGAGTTCGT-3' R: 5'-CCGGTAAGGACTTCAGCCAGTG-3'
A2347	F: 5'-TATGCAGGGACAGGCAAACCAT-3' R: 5'-CATGACGGAGTAGAGACGACGG-3'
A5776	F: 5'-TGTCCAGATGCAGCGACTAGG-3' R: 5'-CTGAGCTCCAGTGTCTCCTACA-3'
A1958	F: 5'-GATCCTGTGGGCAAGGTCTCA-3' R: 5'-TGATCGCCAAACTGGCAATGT-3'
A7424	F: 5'-CCACGTCCAGGAAGCTAAGGT-3' R: 5'-CCAGATGAGGGTTGCGTCTCT-3'
A1717	F: 5'-AGGGTAACGAAAGCACCCCTTCA-3' R: 5'-TGTCCCTTCTTGTCAGCTTCA-3'
Actin	F: 5'-GCTGAGCGAGAAATCGTTTCGT-3' R: 5'-AGCAGTCTGGATCTCCTGCTC-3'

1.3 数据分析

使用SPSS 18.0软件对试验数据进行方差分析和多重比较。两者之间采用 t 检验法进行差异显著性检验,三者及以上采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 2种菌单独培养碳源的筛选

棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共同偏好的碳源有6种,分别为 α -D-葡萄糖、蔗糖、D-果糖、D-山梨醇、D-甘露醇和糊精;棘孢木霉菌HG1单独偏好的碳源有4种,分别是D-半乳糖、 α -D-乳糖、 γ -氨基丁酸和木糖;枯草芽胞杆菌Tpb55单独偏好

的碳源有3种,分别为L-苹果酸、L-乳酸和L-丙氨酸(图1)。将2株菌株单独偏好的碳源组合,共得到12种碳源组合。

2.2 2种菌共培养碳源的筛选

仅在10种碳源下,棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养无菌滤液对烟草疫霉菌有抑制效果,其中以D-半乳糖+L-丙氨酸为碳源时对烟草疫霉菌的抑制率最高,为58.55%,显著高于其他碳源处理($P<0.05$),其次以糊精、 γ -氨基丁酸+L-丙氨酸和 α -D-葡萄糖为碳源时对烟草疫霉菌的抑制率较高,分别为45.00%、41.51%和39.40%,显著高于其他碳源处理($P<0.05$,表2),因此选择这4种碳源下的共培养发酵液进行盆栽试验。

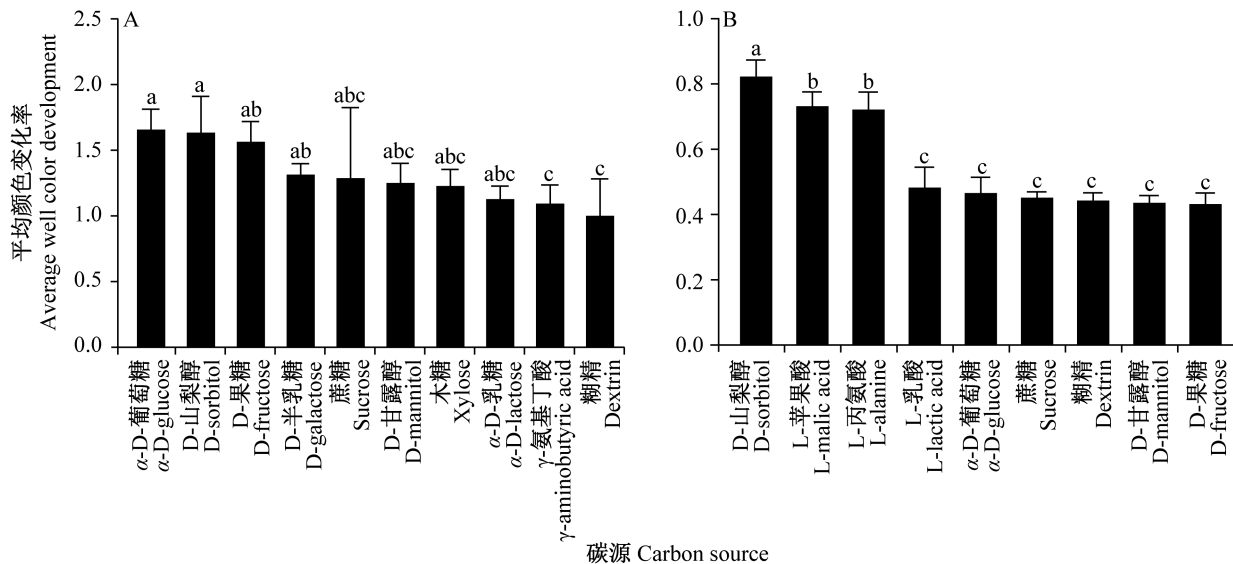


图1 不同碳源下棘孢木霉菌HG1(A)和枯草芽胞杆菌Tpb55(B)的平均颜色变化率

Fig. 1 Average well color development of *Trichoderma asperellum* HG1 (A) and *Bacillus subtilis* Tpb55 (B) under different carbon sources

图中数据为平均数 \pm 标准差。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean \pm SD. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

在17种碳源及碳源组合下,棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养提取物均对烟草疫霉菌有抑制效果,其中以糊精为碳源时共培养提取物对烟草疫霉菌的抑制率最高,为76.45%(表3),因此选定糊精作为棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养放大发酵的碳源。

2.3 不同碳源下2种菌共培养发酵液的盆栽防效

以D-半乳糖+L-丙氨酸和糊精为碳源的棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养发酵液处理第9天和第15天后,烟苗的病情指数均为0,显著低于对照($P<0.05$),即防效为100.0%;且株高、最大叶长、最大叶宽和有效叶数与对照差异不显著,表明

以D-半乳糖+L-丙氨酸和糊精为碳源的2种菌共培养发酵液不仅对烟草疫霉菌病的防效较好,而且对烟草植株生长无负作用(表4)。

2.4 2种菌共培养发酵化合物主成分的分离及鉴定

通过反向相层析、凝胶柱色谱和高效液相色谱从8个组分中分离纯化获得8种化合物。通过核磁共振谱和质谱鉴定确定这8种化合物分别为(E)-7,9-二烯-11-羰基十八酸甲酯、(9 Z ,11 E)-13-氧代-9,11-卡特二烯酸、(E)-7,9-二烯-1-羰基硬脂酸、(2 S)-3,3-二(1 H -吡啶-3-基)丙烷-1,2-二醇、 N -乙酰基色胺、3-(2,3-二羟丙基)吡啶、黄豆苷元和异樱黄素。

表2 不同碳源下棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养无菌滤液对烟草疫霉菌的抑制率
Table 2 Inhibition rates of sterile filtrate co-cultured with *Trichoderma asperellum* HG1 and *Bacillus subtilis* Tpb55 on *Phytophthora nicotianae* under different carbon sources

碳源 Carbon source	抑制率 Inhibition rate/%	碳源 Carbon source	抑制率 Inhibition rate/%
α -D-葡萄糖 α -D-glucose	39.40±0.81 b	木糖+L-苹果酸 Xylose+L-malic acid	—
糊精 Dextrin	45.00±0.58 b	木糖+L-乳酸 Xylose+L-lactic acid	—
γ -氨基丁酸+L-丙氨酸 γ -aminobutyric acid+L-alanine	41.51±1.09 b	乳糖+L-乳酸 Lactose+L-lactic acid	—
D-半乳糖+L-丙氨酸 D-galactose+L-alanine	58.55±3.16 a	γ -氨基丁酸+L-苹果酸 γ -aminobutyric acid+L-malic acid	—
乳糖+L-丙氨酸 Lactose+L-alanine	30.23±0.97 c	γ -氨基丁酸+L-乳酸 γ -aminobutyric acid+L-lactic acid	—
蔗糖 Sucrose	29.98±3.42 c	D-半乳糖+L-苹果酸 D-galactose+L-malic acid	—
D-果糖 D-fructose	25.93±1.38 cd	D-半乳糖+L-乳酸 D-galactose+L-lactic acid	—
D-甘露醇 D-mannitol	20.59±0.82 rde	木糖+L-丙氨酸 Xylose+L-alanine	16.49±1.59 ef
D-山梨醇 D-sorbitol	11.13±1.81 f	乳糖+L-苹果酸 Lactose+L-malic acid	—

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

表3 不同碳源下棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养提取物对烟草疫霉菌的抑制率
Table 3 Inhibition rates of *Trichoderma asperellum* HG1 and *Bacillus subtilis* Tpb55 co-culture extracts on *Phytophthora nicotianae* under different carbon sources

碳源 Carbon source	抑制率 Inhibition rate/%	碳源 Carbon source	抑制率 Inhibition rate/%
乳糖+L-丙氨酸 Lactose+L-alanine	33.06±0.00 l	木糖+L-苹果酸 Xylose+L-malic acid	64.88±0.41 d
糊精 Dextrin	76.45±0.00 a	木糖+L-乳酸 Xylose+L-lactic acid	56.61±0.72 e
α -D-葡萄糖 α -D-glucose	50.41±0.00 g	乳糖+L-乳酸 Lactose+L-lactic acid	44.21±0.72 h
γ -氨基丁酸+L-丙氨酸 γ -aminobutyric acid+L-alanine	43.80±0.83 h	γ -氨基丁酸+L-苹果酸 γ -aminobutyric acid+L-malic acid	40.50±0.00 i
D-半乳糖+L-丙氨酸 D-Galactose+L-alanine	53.72±0.83 f	γ -氨基丁酸+L-乳酸 γ -aminobutyric acid+L-lactic acid	40.09±0.41 i
蔗糖 Sucrose	35.13±0.41 k	D-半乳糖+L-苹果酸 D-galactose+L-malic acid	38.02±0.00 j
D-果糖 D-fructose	75.21±0.00 a	D-半乳糖+L-乳酸 D-galactose+L-lactic acid	31.41±0.83 m
D-甘露醇 D-mannitol	73.56±0.83 b	木糖+L-丙氨酸 Xylose+L-alanine	68.18±0.41 c
D-山梨醇 D-sorbitol	24.38±0.00 n	乳糖+L-苹果酸 Lactose+L-malic acid	—

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

表4 不同碳源下棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养发酵液处理后烟草的病情指数和农艺性状
Table 4 Disease index and agronomic traits of tobacco treated with co-culture fermentation broth of *Trichoderma asperellum* HG1 and *Bacillus subtilis* Tpb55 under different carbon sources

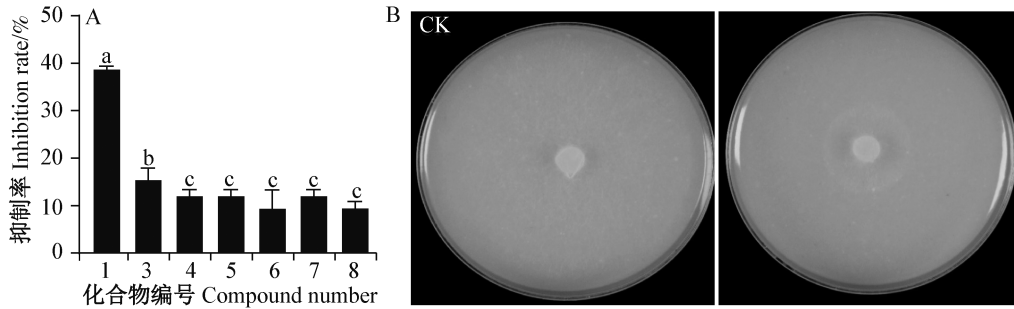
处理 Treatment	病情指数 Disease index		株高 Plant height/cm	最大叶长 Maximum leaf length/cm	最大叶宽 Maximum leaf width/cm	有效叶数 Effective leaf count
	处理后第9天 9 d after treatment	处理后第15天 15 d after treatment				
对照 CK	18.79±0.00 a	30.00±0.00 a	4.98±0.87 ab	12.80±0.8 a	6.62±0.43 a	7.17±0.48 a
D-半乳糖+L-丙氨酸 D-galactose+L-alanine	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	5.10±0.24 ab	13.25±0.3 a	6.88±0.14 a	6.50±0.56 a
糊精 Dextrin	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	4.42±0.55 ab	13.58±0.2 a	7.00±0.18 a	7.00±0.26 a
γ -氨基丁酸+L-丙氨酸 γ -aminobutyric acid+L-alanine	15.19±2.89 b	30.00±0.00 a	3.38±0.31 b	12.42±0.51 a	3.38±0.3 b	6.50±0.22 a
α -D-葡萄糖 α -D-glucose	3.70±1.85 c	10.37±0.37 b	5.67±0.80 a	14.08±0.64 a	5.67±0.8 a	7.17±0.31 a

表中数据为平均数±标准差。同列不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著 ($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.5 2种菌共培养发酵化合物主成分的抑菌活性

当7种化合物浓度均为0.1 mg/mL时,(*E*)-7,9-二烯-11-羧基十八酸甲酯对烟草疫霉菌的抑制率最高,

为38.80%,显著高于其他化合物($P<0.05$,图2-A)。当(*E*)-7,9-二烯-11-羧基十八酸甲酯浓度为0.3 mg/mL时对烟草疫霉菌的抑制率可达72.93%(图2-B)。



A: 浓度均为0.1 mg/mL的7种化合物的抑制率; B: 0.3 mg/mL(*E*)-7,9-二烯-11-羧基十八酸甲酯的抑制作用。1: (*E*)-7,9-二烯-11-羧基十八酸甲酯; 2: (*E*)-7,9-二烯-1-羧基硬脂酸; 3: (2*S*)-3,3-二(1*H*-吲哚-3-基)丙烷-1,2-二醇; 4: *N*-乙酰基色胺; 5: 3-(2,3-二羟丙基)吲哚; 6: 黄豆苷元; 7: 异樱黄素。A: Inhibition rates of seven compounds at the concentration of 0.1 mg/mL; B: inhibitory effect of 0.3 mg/mL (*E*)-7,9-diene-11-carbonyl-octadecanoic acid methyl ester. 1: (*E*)-7,9-diene-11-carbonyl-octadecanoic acid methyl ester; 2: (*E*)-7,9-diene-1-carbonyl stearic acid; 3: (2*S*)-3,3-bis(1*H*-indol-3-yl) propane-1,2-diol; 4: *N*-acetyltryptamine; 5: 3-(2,3-dihydroxypropyl) indole; 6: daidzein; 7: 5-*O*-methylgenistein.

图2 棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养发酵化合物主成分对烟草疫霉菌的抑制作用

Fig. 2 Inhibitory effects of co-culture fermentation compounds of *Trichoderma asperellum* HG1 and *Bacillus subtilis* Tpb55 on *Phytophthora nicotianae*

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.6 糊精添加量对2种菌共培养滤液抑菌效果的影响

添加3.75 g/L糊精时,棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养无菌滤液对烟草疫霉菌的抑制率最高,为79.52%,显著高于对照($P<0.05$,图3)。

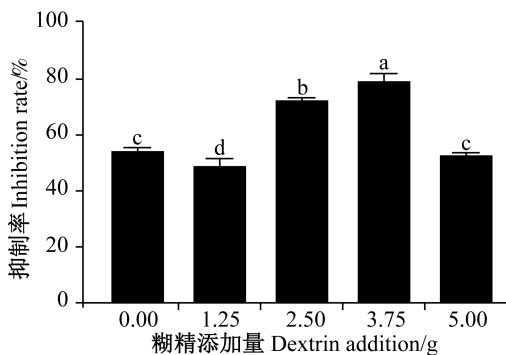


图3 不同糊精添加量下棘孢木霉菌HG1和枯草芽胞杆菌Tpb55共培养无菌滤液对烟草疫霉菌的抑制率

Fig. 3 Inhibition rates of *Trichoderma acanthospora* HG1 and *Bacillus subtilis* Tpb55 co-cultured aseptic fermentation broth with different dextrin supplemental levels on *Phytophthora nicotianae*

图中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.7 添加糊精后棘孢木霉菌HG1的转录组分析

2.7.1 棘孢木霉菌HG1的差异表达基因

经对转录组测序数据分析共检测到8 428个表达基因,均为已知基因。添加糊精和未添加糊精的差异表达基因共154个,其中129个基因上调,25个基因下调(图4)。

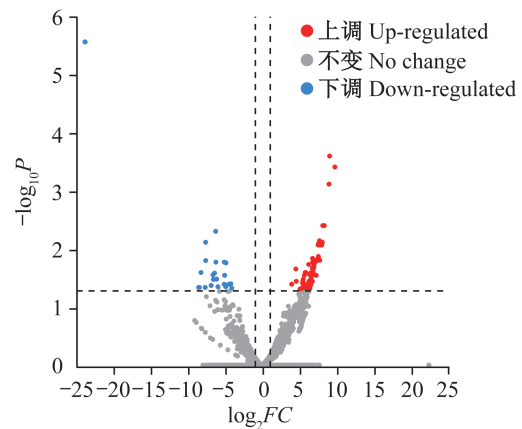


图4 添加糊精和未添加糊精YM培养基中棘孢木霉菌HG1差异表达基因

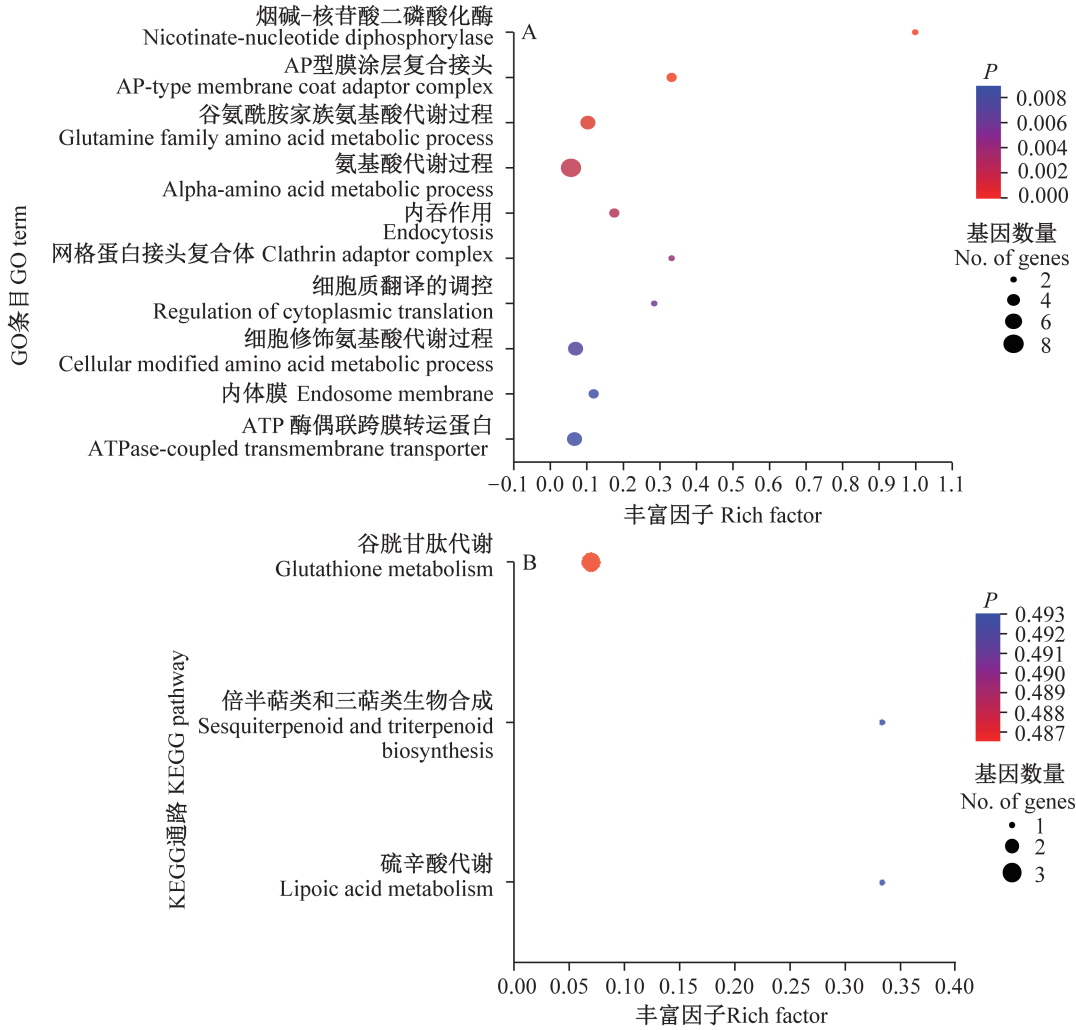
Fig. 4 Differential expression genes of *Trichoderma asperellum* HG1 on YM medium with and without dextrin addition

2.7.2 GO富集分析结果

添加糊精和未添加糊精的差异基因富集在烟

碱-核苷酸二磷酸化酶(羧化)活性、AP型膜涂层复合接头、谷氨酰胺家族氨基酸代谢过程、氨基酸代谢过程和内吞作用(图 5-A),其中与谷氨酰胺代谢相

关的谷氨酰胺转移酶基因 *DUG3* 上调;与氨基酸代谢相关的 γ -谷氨酰磷酸还原酶基因 *pro1* 和脯氨酸脱氢酶基因 *SPCC70.03c* 上调(表 5)。



A: GO 富集分析; B: KEGG 富集分析。A: Analysis of GO enrichment; B: analysis of KEGG enrichment.

图 5 添加糊精和未添加糊精 YM 培养基培养下棘孢木霉菌 HG1 差异基因富集分析

Fig. 5 Enrichment analysis of differential genes of *Trichoderma asperellum* HG1 on YM medium with and without dextrin addition

表 5 添加糊精和未添加糊精 YM 培养基培养下棘孢木霉菌 HG1 差异表达基因

Table 5 Differential expression genes of *Trichoderma asperellum* HG1 on YM medium with and without dextrin addition

基因名称 Gene name	基因变化 Change of gene	P	基因表达量 Expression of gene	
			在未添加糊精的 YM 培养中 On YM medium without dextrin addition	在添加糊精的 YM 培养基中 On YM medium with dextrin addition
<i>DUG3</i>	上调 Up-regulated	<0.001	0.00	41.96
<i>pro1</i>	上调 Up-regulated	<0.001	0.00	50.73
<i>SPCC70.03c</i>	上调 Up-regulated	<0.001	313.48	3 731.76
<i>gedE</i>	上调 Up-regulated	<0.001	0.00	61.56
<i>gtr-1</i>	下调 Down-regulated	<0.001	719.43	32.23

2.7.3 KEGG富集分析结果

添加糊精和未添加糊精 YM 培养基培养的棘孢

木霉菌 HG1 差异基因富集在谷胱甘肽代谢、倍半萜类和三萜类生物合成以及硫辛酸代谢通路中(图 5-

B),其中谷胱甘肽还原酶基因 *gtr-1* 在添加糊精的培养基培养下显著下调,可能脯氨酸脱氢酶基因 *SPCC70.03c* 和谷胱甘肽 *S* 转移酶样蛋白基因 *gedE* 在添加糊精的培养基培养下显著上调(表5)。

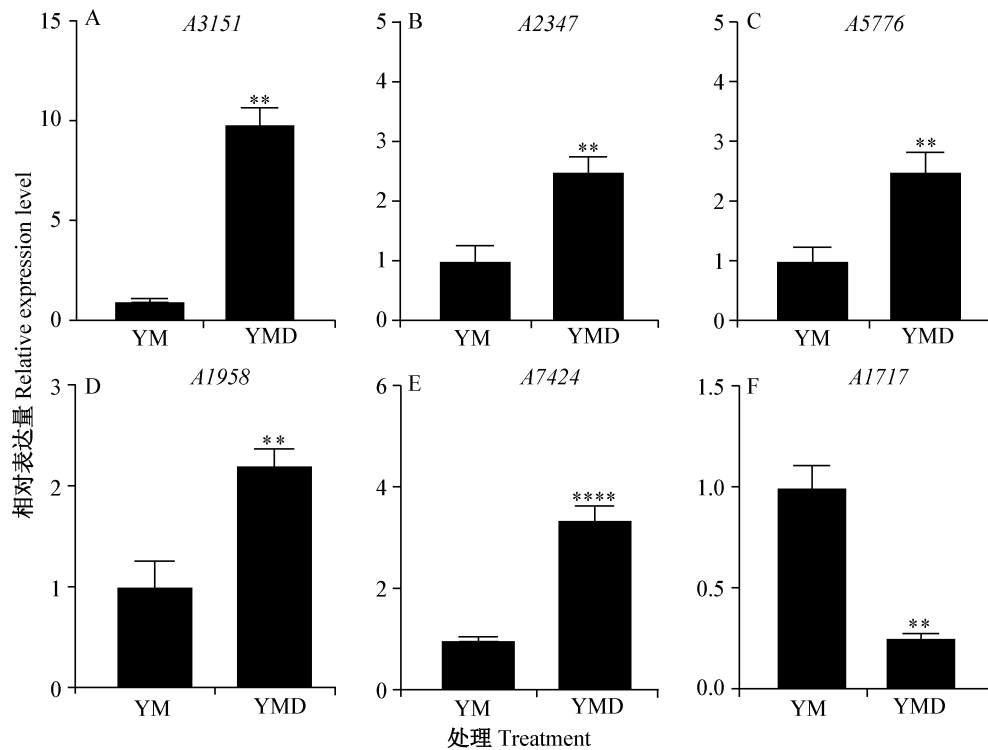
2.8 转录组测序结果的RT-qPCR验证

RT-qPCR 结果显示,在所选的棘孢木霉菌 HG1 6 个基因中,5 个基因的相对表达量上调,1 个基因的相对表达量下调,与转录组测序分析结果相同,证明转录组测序结果可靠(图6)。

3 讨论

在发酵过程中,培养基营养成分对生防菌株的生长状态及活性物质的种类和产量影响较大,适宜的营养成分可以促进菌株生长,增加其活性代谢产物的产量和种类,从而提高其生防活性。Duan et al. (2020)发现当蔗糖、乳糖、玉米粉、葡萄糖和可溶性

淀粉含量均为 2% 时,以蔗糖为碳源时,链霉菌 *Streptomyces malaysiensis* FS-4 发酵液对枯草芽胞杆菌的抑制圈直径最大,为 20.5 mm,产生的抑菌物质最多。曾蕙汝(2019)发现不同碳源下通过基因工程技术改造的小球藻生物量和油脂产率差异明显,其中葡萄糖碳源明显优于乙酸钠、麦芽糖、木糖、蔗糖和丁二酸钠等其他碳源。本研究分别测定棘孢木霉菌 HG1 和枯草芽胞杆菌 Tpb55 对 94 种和 71 种碳源的偏好性,其中棘孢木霉菌 HG1 和枯草芽胞杆菌 Tpb55 共同偏好的碳源有 6 种,棘孢木霉菌 HG1 单独偏好的碳源有 4 种,枯草芽胞杆菌 Tpb55 单独偏好的碳源有 3 种,当以糊精为碳源时棘孢木霉菌 HG1 和枯草芽胞杆菌 Tpb55 共培养无菌滤液及提取物对烟草疫霉菌的抑制率最高可达 76.45%,说明碳源对菌株的生长和活性物质的产生有重要影响。



YM: 不添加糊精; YMD: 添加糊精。YM: No dextrin added; YMD: add dextrin.

图6 采用实时荧光定量PCR技术检测棘孢木霉菌HG1中6个基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of six genes in *Trichoderma asperellum* HG1 based on RT-qPCR

图中数据为平均数±标准差。**和****表示2个处理经 *t* 检验法检验差异显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.0001$)。Data are mean±SD. ** or **** indicates significant difference by *t* test ($P < 0.01$ or $P < 0.0001$).

本研究以糊精作为碳源进行实验室规模化发酵,并从发酵液中分离出8种抑菌活性成分,其中长链脂肪酸(*E*)-7,9-二烯-11-羰基十八酸甲酯的抑菌活性较好,当浓度为0.3 mg/mL时对烟草疫霉菌的

抑制率为72.93%,本课题组前期试验从棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共培养体系中分离出一种具有抗卵菌活性的中链脂肪酸—癸二烯酸,因此推测脂肪酸类物质可能具有较好的抑菌活性。脂肪

酸是一类非常重要的天然产物,具有高效、安全和环境相容性好的特点(Bhattacharyya et al., 2020),其两亲性的化学结构可以破坏病原菌细胞膜的稳定性,使致病菌难以对其产生抗性(Kumar et al., 2020)。Adolph et al.(2004)发现共轭不饱和醛类化合物2E, 4E-癸二烯醛、2E, 4E-辛二烯醛、5E, 7E-9-Oxo-壬二烯酸和2E-癸烯醛对细菌和真菌均有较强的抑制活性。Zhao et al.(2022)从海洋真菌曲霉菌 *Aspergillus* sp. SCAU150中分离鉴定了D-泛酸、E-泛酸和F-泛酸,这3种新型脂肪酸均对茄腐镰孢 *Fusarium solani*有抑制作用。N-(1,2,3-噁二唑-4-羰基)氨基甲酸烷基酯的抗真菌活性取决于其碳链长度,最佳的碳链长度为6~11个(Li et al., 2005),因此推测脂肪酸类的抑菌效果可能也与其碳链长度有关。

细胞内谷胱甘肽是通过谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)来维持平衡的,GR能够将氧化谷胱甘肽二硫化物还原回还原型谷胱甘肽,进而维持细胞内氧化还原平衡(Wangsanut & Pongpom, 2022)。本研究结果显示,添加糊精后用于维持细胞质中高水平还原型谷胱甘肽的谷胱甘肽还原酶基因 *gtr-1* 显著下调,谷氨酰胺转移酶基因 *DUG3* 显著上调,表明添加糊精后棘孢木霉菌HG1的氧化应激程度较低。此外,与脯氨酸代谢相关的 γ -谷氨酰磷酸还原酶基因 *pro1* 和脯氨酸脱氢酶基因 *SPCC70.03c* 均上调,表明脯氨酸的合成加速,这可能也与谷氨酰胺代谢有关。脯氨酸合成的前体是谷氨酸,而谷氨酸又是谷胱甘肽的组成成分之一,随着谷胱甘肽的降解,脯氨酸的代谢也受到影响(Jensen & Wendisch, 2013)。因此,加入糊精后棘孢木霉菌HG1中谷胱甘肽代谢系统受到刺激,降低了其氧化应激的程度,并诱导了其他基因的表达,进而更好地维持其生命活动正常进行。

本研究以烟草疫霉菌为靶标病原菌优化了棘孢木霉菌HG1与枯草芽胞杆菌Tpb55共培养的培养基碳源,获得了抑菌活性成分,但与2种菌共培养发酵提取物相比,单体化合物的抑菌活性不是很强,可能还有其他抑菌活性微量组分未被发现,或单体化合物之间可能具有协同抑菌作用。下一步继续以糊精为碳源,以烟草疫霉菌为靶标病原菌,分离这2种共培养发酵体系中活性更强的微量抑菌物质;针对目标活性化合物,深入挖掘糊精对其合成和代谢通路相关基因的影响,并通过合成生物学手段挖掘该类分子的功能,进一步提高其产量,为共培养菌株的产业化应用奠定基础。

参 考 文 献 (References)

- Adolph S, Bach S, Blondel M, Cueff A, Moreau M, Pohnert G, Poulet SA, Wichard T, Zuccaro A. 2004. Cytotoxicity of diatom-derived oxylipins in organisms belonging to different phyla. *Journal of Experimental Biology*, 207(Pt17): 2935–2946
- Akone SH, Mándi A, Kurtán T, Hartmann R, Lin WH, Daletos G, Proksch P. 2016. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium* sp. through fungal-bacterial co-culture and epigenetic modification. *Tetrahedron*, 72(41): 6340–6347
- Bader J, Mast-Gerlach E, Popović MK, Bajpai R, Stahl U. 2010. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2): 371–387
- Bhattacharyya A, Sinha M, Singh H, Patel RS, Ghosh S, Sardana K, Ghosh S, Sengupta S. 2020. Mechanistic insight into the antifungal effects of a fatty acid derivative against drug-resistant fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 11: 2116
- Burki F, Roger AJ, Brown MW, Simpson AGB. 2020. The new tree of eukaryotes. *Trends in Ecology & Evolution*, 35(1): 43–55
- Duan YJ, Chen J, He W, Chen JJ, Pang ZC, Hu HG, Xie JH. 2020. Fermentation optimization and disease suppression ability of a *Streptomyces* sp. FS-4 from banana rhizosphere soil. *BMC Microbiology*, 20(1): 24
- Hitit ZY, Lazaro CZ, Hallenbeck PC. 2017. Hydrogen production by co-cultures of *Clostridium butyricum* and *Rhodospseudomonas palustris*: optimization of yield using response surface methodology. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(10): 6578–6589
- Jensen JVK, Wendisch VF. 2013. Ornithine cyclodeaminase-based proline production by *Corynebacterium glutamicum*. *Microbial Cell Factories*, 12: 63
- Ji SD, Liu ZH, Liu B, Wang YC. 2019. Comparative analysis of biocontrol agent *Trichoderma asperellum* ACCC30536 transcriptome during its interaction with *Populus davidiana* × *P. alba* var. *pyramidalis*. *Microbiological Research*, 227: 126294
- Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, et al. 2015. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 16(4): 413–434
- Kumar P, Lee JH, Beyenal H, Lee J. 2020. Fatty acids as antibiofilm and antivirulence agents. *Trends in Microbiology*, 28(9): 753–768
- Lei YX, Zhang Y, Luo Y, Zhou QP, Yang RW. 2023. Genome-wide comparison of three types of plant pathogenic oomycete species. *Journal of Plant Protection*, 50(3): 696–704 (in Chinese) [雷映霞, 张艳, 罗颖, 周青平, 杨瑞武. 2023. 三类植物卵菌的全基因组比较. *植物保护学报*, 50(3): 696–704]
- Li ZF, Wu ZR, Luo FY. 2005. Synthesis and antifungal activities of alkyl N-(1, 2, 3-thiadiazole-4-carbonyl) carbamates and S-alkyl N-(1, 2, 3-thiadiazole-4-carbonyl) carbamothioates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10): 3872–3876

- Maglangit F, Fang Q, Kyeremeh K, Sternberg JM, Ebel R, Deng H. 2020. A co-culturing approach enables discovery and biosynthesis of a bioactive indole alkaloid metabolite. *Molecules*, 25(2): 256
- Mazzola M, Freilich S. 2017. Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes. *Phytopathology*, 107(3): 256–263
- Mei XY, Liu YX, Huang HC, Du F, Huang LL, Wu JQ, Li YW, Zhu SS, Yang M. 2019. Benzothiazole inhibits the growth of *Phytophthora capsici* through inducing apoptosis and suppressing stress responses and metabolic detoxification. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 154: 7–16
- Niu B, Wang WX, Yuan ZB, Sederoff RR, Sederoff H, Chiang VL, Borriss R. 2020. Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease. *Frontiers in Microbiology*, 11: 585404
- Peng LJ, Ding HX, Lu ZZ. 2014. Drug resistance of *Phytophthora nicotianae* against metalaxyl (WP) in Guizhou. *Guizhou Agricultural Sciences*, 42(8): 92–95 (in Chinese) [彭丽娟, 丁海霞, 陆铮铮. 2014. 贵州烟草黑胫病菌对甲霜灵的抗药性测定. *贵州农业科学*, 42(8): 92–95]
- Ren L, Tian SY, Lü H, Yin H, Qin N, Zhao XJ. 2023. Biocontrol efficacy of *Bacillus* seed coating agent against maize stalk rot and its growth-promoting effects on maize. *Journal of Plant Protection*, 50(5): 1358–1367 (in Chinese) [任璐, 田舒媛, 吕红, 殷辉, 秦楠, 赵晓军. 2023. 芽孢杆菌种衣剂对玉米茎基腐病的防治效果及对玉米的促生作用. *植物保护学报*, 50(5): 1358–1367]
- Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. 2017. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*, 7(1): 15
- Van Assche A, Álvarez-Pérez S, de Breij A, De Brabanter J, Willems KA, Dijkshoorn L, Lievens B. 2017. Phylogenetic signal in phenotypic traits related to carbon source assimilation and chemical sensitivity in *Acinetobacter* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1): 367–379
- Wang C, Zhuang WY. 2020. Carbon metabolic profiling of *Trichoderma* strains provides insight into potential ecological niches. *Mycologia*, 112(2): 213–223
- Wang M, Ma J, Fan LL, Fu KH, Yu CJ, Gao JX, Li YQ, Chen J. 2015. Biological control of southern corn leaf blight by *Trichoderma atroviride* SG3403. *Biocontrol Science and Technology*, 25(10): 1133–1146
- Wang YC. 2020. Study on control of tobacco black shank disease with biochar-based fertilizer of prickly ash seed. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [王耀晨. 2020. 花椒籽炭基有机肥防治烟草黑胫病研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Wangsanut T, Pongpom M. 2022. The role of the glutathione system in stress adaptation, morphogenesis and virulence of pathogenic fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18): 10645
- Xu JP. 2022. Origins and spread of plant fungal and oomycete disease outbreaks. *Journal of Plant Protection*, 49(1): 283–297 (in Chinese) [徐建平. 2022. 植物真菌和卵菌病暴发的起源和传播. *植物保护学报*, 49(1): 283–297]
- Ye ZM, Zhou XH, Jiang BT, Gao DN, Ping WX, Ge JP. 2022. An optimal carbon source can enhance the paracin 1.7 titer and reduce carbon source consumption in cocultures of *Lactocaseibacillus paracasei* HD1.7 and *Bacillus* spp. *LWT*, 161: 113336
- Yu ST, Zhang MY, Chen R, Li B, Cao KQ, Wang ST. 2024. The mechanism of compound microbial fertilizer KMM alleviating apple replant disease. *Journal of Plant Protection*, 51(2): 352–360 (in Chinese) [于松涛, 张铭一, 陈蕊, 李波, 曹克强, 王树桐. 2024. 复合微生物菌肥KMM减缓苹果再植病害机制. *植物保护学报*, 51(2): 352–360]
- Zeng HR. 2019. Optimization on culture conditions of genetically engineered energy microalgae under different carbon sources. Master thesis. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology (in Chinese) [曾蕙汝. 2019. 不同碳源条件下基因工程能源微藻的培养条件优化研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中科技大学]
- Zhang XF, Lin W, Li QY, Liu RX, Liu JY, Wang M, Ding YF, Zhao DL, Zhang CS. 2022. Construction and optimization of a coculture system of anti-*Phytophthora nicotianae* *Trichoderma asperellum* HG1 and *Bacillus subtilis* Tpb55. *Chinese Tobacco Science*, 43(1): 61–68 (in Chinese) [张希芬, 林伟, 李清钰, 刘荣欣, 刘建阳, 王美, 丁应福, 赵栋霖, 张成省. 2022. 抗烟草疫霉活性木霉与芽孢杆菌共培养体系的构建与优化. *中国烟草科学*, 43(1): 61–68]
- Zhao T, Zhang XY, Deng RS, Tan Z, Chen GY, Nong XH. 2022. Three new unsaturated fatty acids from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCAU150. *Natural Product Research*, 36(15): 3965–3971
- Zhu XQ, Fang SX, Liu DM, Zheng AZ, Zhang QC, Pei DL. 2023. Screening, identification and antifungal mechanism of bacterial biocontrol strains against hot pepper anthracnose. *Journal of Plant Protection*, 50(4): 913–922 (in Chinese) [朱晓琴, 方树贤, 刘冬梅, 郑爱珍, 张庆琛, 裴冬丽. 2023. 辣椒炭疽病生防菌株的筛选、鉴定及其抑菌机理. *植物保护学报*, 50(4): 913–922]

(责任编辑:张俊芳)