



孙振华, 师杨杰, 龙玉娇, 靳红梅, 朱宁. 秸秆源木霉黄腐酸的生物活性成分及其对白菜的促生效果[J]. 中国农业大学学报, 2025, 30(05): 72-82.
SUN Zhenhua, SHI Yangjie, LONG Yujiao, JIN Hongmei, ZHU Ning. Analysis of the bioactive components of straw-derived *Trichoderma fulvic* acid and its growth-promoting effect on Chinese cabbage[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2025, 30(05): 72-82.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2025.05.06

秸秆源木霉黄腐酸的生物活性成分及其对白菜的促生效果

孙振华^{1,2} 师杨杰³ 龙玉娇^{2,4} 靳红梅^{2,4} 朱宁^{2,4*}

(1. 江苏大学 环境与安全工程学院, 江苏 镇江 212013;

2. 江苏省农业科学院 农业资源与环境研究所/农业农村部长江下游平原农业环境重点实验室, 南京 210014;

3. 南京信息工程大学 环境科学与工程学院, 南京 210044;

4. 江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心, 南京 210095)

摘要 为明确秸秆源木霉黄腐酸中主要生物活性物质及其对白菜促生效果, 利用液相色谱-串联质谱技术对木霉黄腐酸进行非靶向代谢组学研究, 解析发酵前后木霉黄腐酸中的主要代谢物组分及其代谢途径, 并采用随机区组试验设计, 开展田间试验, 设置木霉黄腐酸施用量 0(CK)、180(T₁)、720 mg/m²(T₂) 3 个处理, 测定施用后白菜产量、单株鲜重、叶绿素含量 (SPAD) 及维生素 C、可溶性蛋白、硝酸盐含量等指标。结果表明: 发酵前后木霉黄腐酸中共鉴定到 903 种差异显著的代谢物, 其中显著上调的 58 种差异代谢物主要是脂质和有机酸, 如本胆烷醇酮葡萄糖醛酸苷、吡啶-3-乙酸-O-葡萄糖醛酸苷、7-酮基石胆酸、1-甲基组氨酸、精氨酸色氨酸、L-谷氨酰胺。KEGG 通路富集分析表明, 差异显著的代谢物分布在 55 个代谢途径, 高表达量差异代谢物在精氨酸和脯氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢、亚油酸代谢等代谢通路中显著富集。田间试验结果显示, T₂ 的白菜单株鲜重、SPAD、Vc 含量、可溶性蛋白含量比 CK 分别升高 29.0%、743.5%、99.7%、37.1%, 硝酸盐含量降低 23.4%。综上, 脂质和有机酸是木霉黄腐酸中具有潜在植物促生活性的关键代谢物, 木霉黄腐酸根施对白菜产量和品质均有显著提升效果, 且 T₂ 的施用效果优于 T₁。

关键词 黄腐酸; 代谢组学; 木霉; 白菜; 促生

中图分类号 S147.2

文章编号 1007-4333(2025)05-0072-11

文献标志码 A

Analysis of the bioactive components of straw-derived *Trichoderma fulvic* acid and its growth-promoting effect on Chinese cabbage

SUN Zhenhua^{1,2}, SHI Yangjie³, LONG Yujiao^{2,4}, JIN Hongmei^{2,4}, ZHU Ning^{2,4*}

(1. School of Environment and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China;

2. Institute of Agricultural Resources and Environment/Key Laboratory of Agro-Environment in Downstream of Yangtze Plain of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

3. School of Environmental Science and Engineering, Nanjing University of Information Science and Technology, Nanjing 210044, China;

4. Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Nanjing 210095, China)

Abstract To identify the main bioactive substances in straw-derived *Trichoderma fulvic* acid (TFA) and their growth-promoting effects on Chinese cabbage, the non-targeted metabolomics analysis of TFA was

收稿日期: 2024-11-20

基金项目: 江苏省重点研发计划 (BE2022788); 江苏省自然科学基金 (BK20242006)

第一作者: 孙振华 (ORCID: 0009-0004-5118-4054), 硕士研究生, E-mail: 1074373666@qq.com

通讯作者: 朱宁 (ORCID: 0009-0009-6791-1216), 副研究员, 主要从事农业废弃物资源化利用研究, E-mail: ning.zhu@jaas.ac.cn

conducted using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS). The main metabolite components and metabolic pathways in TFA before and after fermentation were analyzed. A randomized block design was employed for a field experiment with three treatments including TFA application rates of 0 (CK), 180 (T_1), and 720 mg/m² (T_2), respectively. After application of TFA, indicators such as yield, fresh weight per plant, chlorophyll content (SPAD), Vc content, soluble protein and nitrate content were measured to evaluate the effects. The results showed that: A total of 903 significantly different metabolites were identified in TFA before and after fermentation. Among them, the expression levels of 58 metabolites, primarily lipids and organic acids, such as etiocholanolone glucuronide, indole-3-acetic-acid-O-glucuronide, 7-ketolithocholic acid, 1-methylhistidine, arginyl-tryptophan, L-glutamine, were significantly increased. The results of KEGG pathway enrichment revealed that these metabolites were distributed across 55 pathways. High-expression metabolites significantly enriched in arginine and proline metabolism, niacin and nicotinamide metabolism, and linoleic acid metabolism. The results of the field experiment showed that compared to CK, SPAD, Vc content, soluble protein content and the fresh weight per plant of Chinese cabbage in T_2 increased by 43.5%, 99.7%, 37.1% and 29.0%, respectively, while nitrate content decreased by 23.4%. In summary, lipids and organic acids are the key metabolites in TFA with potential plant growth-promoting activity. Application of TFA as a basal fertilizer significantly improved both the yield and quality of Chinese cabbage, and the effect of T_2 is better than that of T_1 .

Keywords fulvic acid; metabolomics; *Trichoderma*; Chinese cabbage; growth promotion

随着农业绿色可持续发展的要求不断提高,腐植酸等生物刺激剂被广泛应用于农业生产中,不仅有助于减少化学肥料和农药的使用,还能提升作物的抗逆性和营养品质^[1]。腐植酸是一种具有芳香族结构的有机高分子聚合物,广泛存在于土壤、水体、泥炭和煤炭中^[2]。黄腐酸(Fulvic acid, FA)是腐植酸中分子量小、芳香性低、生物活性高的组分,平均分子量为600~1 500 U,在水、酸和碱溶液中均具有良好的溶解性^[3],易被植物吸收利用^[4]。在农业生产中黄腐酸被广泛用作植物生长刺激素^[5],不仅能增强作物根系活力和叶片光合作用^[6],而且能提高植物对干旱、低温等胁迫的抗逆性^[7],还具有提高作物养分利用效率和改善营养品质的作用^[8]。然而黄腐酸作为一种重要的农业助剂^[5],虽然已被广泛应用于促进植物生长和提高作物抗逆性,但其中的生物活性成分及机制仍未得到明确。特别是木霉菌发酵黄腐酸,作为一种新型生物刺激剂,其在蔬菜种植中的潜在作用及优化施用方案尚缺乏系统的探讨。因此,探索木霉黄腐酸的生物活性成分及其对蔬菜生长、营养吸收和品质提升的影响,对于黄腐酸在农业生产中的应用具有重要意义。

根据原料来源和制备方式的不同,黄腐酸可分为两类:1)矿源黄腐酸是利用化学方法从泥炭、褐煤以及风化煤等低阶煤中直接提取;2)生化黄腐酸是以有机废弃物(农作物秸秆、甘蔗渣、果渣、食用菌菌渣)为固体基质,在人工控制条件下经微生物

发酵转化获得^[9]。与矿源黄腐酸相比,生化黄腐酸通常具有较多的酚羟基、羧基、甲氧基、羰基、酰胺基等活性基团,并且含有酶、氨基酸、有机酸、糖类等多种活性物质,对植物体内生长激素合成和碳氮代谢相关基因的表达具有重要的调控作用^[10]。赵波^[9]在比较矿源黄腐酸(MFA)和生化黄腐酸(BFA)对马铃薯生长影响的研究中发现,在相同施加比例下BFA在提高叶面积、增强根系活力和植株长势、提高产量和品质等方面效果更好。梁媛媛等^[11]通过研究不同分子量生化黄腐酸对冬小麦生长和养分吸收利用的影响发现,较低分子量(<3 U)的黄腐酸含氧官能团多、亲水性高,对冬小麦生长和养分吸收利用的促进效果优于中高分子量的黄腐酸。尽管目前关于生化黄腐酸的作用效果已有诸多研究,但生化黄腐酸的生物活性物质组成仍不明确。已有研究表明,生化黄腐酸的植物促生作用与其生物活性成分密切相关^[12]。因此,对生化腐植酸生物活性成分进行深入解析有助于揭示其对植物的促生机制,并可提升其在作物栽培中的施用效果。

木霉属真菌是一类重要的农业有益微生物,具有改善土壤微生物区系、防治土传病害、促进植物养分吸收等作用^[13]。木霉可通过分泌植物生长激素(生长素、细胞分裂素、赤霉素、脱落酸等)^[14]和有机酸(柠檬酸、草酸、酒石酸等)^[15]等天然代谢活性产物调控植物根系发育和活化根际养分^[16],从而促

进植物生长。陈勇强等^[17]研究发现木霉及其他微生物产生的有机酸在化学性质和功能上与传统黄腐酸相似。目前报道的生化黄腐酸发酵菌株以细菌为主,包括枯草芽孢杆菌^[17]、地衣芽孢杆菌^[18]、贝莱斯芽孢杆菌^[19]、巨大芽孢杆菌^[20]等。张一帆等^[21]研究发现,利用里氏木霉发酵玉米秸秆可产生类腐殖质,具有与土壤腐殖质相似的结构特征,但未对其活性成分和植物促生效果进行探究。

师杨杰等^[22]构建了以木霉属真菌为主的复合菌剂,优化了木霉菌剂固体发酵农作物秸秆制取黄腐酸的工艺条件,并通过元素分析和红外光谱技术表征了木霉黄腐酸的元素组成和红外结构特征。然而,目前关于木霉黄腐酸中与植物促生功能相关的生物活性成分及其在设施蔬菜上施用效果的研究鲜见报道。本研究基于非靶向代谢组学技术,结合主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等多元统计分析方法,系统解析了发酵前后木霉黄腐酸中差异代谢物的组成特征;此外,通过田间试验分析木霉黄腐酸不同施用量对白菜产量及品质的影响,旨在揭示秸秆源木霉黄腐酸中主要生物活性物质及其对白菜的促生效果,以期为木霉黄腐酸的高效制备和科学施用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

所用木霉黄腐酸是利用木霉菌剂固体发酵小麦秸秆获得,木霉菌剂由哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)、拟康宁木霉(*Trichoderma koningiopsis*)和绒毛木霉(*Trichoderma tomentosum*)4株木霉按照相同孢子浓度等量混合复配,菌剂孢子数不低于 1×10^8 个/mL。

1.2 木霉黄腐酸的制备

发酵原料主要为小麦秸秆,添加30%(质量分数)的麦麸混合均匀,调节混合料含水率为70%、pH 6。采用固体浅盘发酵,木霉菌剂接种孢子数为 1×10^7 个/g干基,发酵物料厚度约2 cm,于28℃发酵15 d^[21]。发酵结束后,按照质量(m)与体积(V)比为1:10向发酵物料中加入浸提液。浸提液是由浓度均为0.1 mol/L的NaOH和 $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 按体积比(V)1:1混合而成,室温下震荡2 h,4 000 r/min离心10 min,收集上清液。加入6 mol/L HCl调节上清液pH至2.0,充分搅拌,室温下静置过夜,

4 000 r/min离心10 min,收集上清液即为木霉黄腐酸(*Trichoderma fulvic acid*, TFA),TFA含量为233 mg/g,4℃保存备用。通过相同浸提步骤获得发酵原料的提取液即为黄腐酸(*Fulvic acid*)作为对照(CFA)。

1.3 木霉黄腐酸中代谢物的提取

将制备的木霉黄腐酸(TFA)和原料提取液(CFA)送至上海美吉生物医药科技有限公司进行冷冻干燥,分别称取0.20 g冻干样品于2 mL离心管中,加入含L-2-氯苯丙氨酸内标的提取液(甲醇与乙醇按体积比1:1混合)400 μL ,用冷冻组织研磨仪研磨6 min(-10°C ,50 Hz)后,5℃、40 kHz超声提取30 min。将样品于 -20°C 静置30 min,于4℃13 000 g离心15 min,移取上清液,并用氮气吹至微干,再加入120 μL 复溶液(乙腈和水按体积比1:1混合)溶解残渣,涡旋混匀30 s,在5℃、40 kHz下再次超声提取5 min,于4℃13 000 r/min离心15 min,移取上清液至进样小瓶中进行上机分析。每个样本分别移取上清液20 μL ,混合后作为质控样本(Quality control, QC),每5~15个分析样本中插入1个QC样本,以考察LC-MS检测过程的稳定性。

1.4 代谢物的LC-MS检测

待测样品由上海美吉生物医药科技有限公司进行代谢物的LC-MS检测,使用美国Waters公司的LC-MS Vanquish Horizon UHPLC-Q Exactive HF-X(Thermo Fisher Scientific USA)对样品进行检测分析。色谱条件为:ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(100.0 mm $\times$ 2.1 mm,1.8 μm),流动相A为95%(体积百分数,下同)水+5%乙腈(含0.1%甲酸),流动相B为47.5%乙腈+47.5%异丙醇+5%水(含0.1%甲酸)。梯度洗脱条件为0 min时,A 100%+B 0%;3.0 min时,A 80%+B 20%;4.5 min时,A 65%+B 35%;5.0 min时,A 0%+B 100%;6.3 min时,A 0%+B 100%;6.4 min时,A 100%+B 0%;8.0 min时,A 100%+B 0%,流速0.4 mL/min,柱温40℃,进样量3 μL 。质谱条件为:电喷雾电离源,正/负离子扫描模式,扫描范围70~1 050 m/z ,鞘气流速50 psi,辅助气流速13 psi,加热温度425℃,喷雾电压3 500 V(正离子模式)/-3 500 V(负离子模式),毛细管温度325℃,S-lens电压50 V,碰撞能20~60 eV^[23]。

质谱数据处理与生物信息学分析采用 Progenesis QI 软件(Waters Corporation, Milford, USA),依次对原始质谱数据进行基线过滤、峰识别、峰对齐等预处理,最终得到的数据矩阵中包括保留时间、质荷比和峰强度等信息。将 MS 和 MS/MS 质谱信息在公共代谢数据库 HMDB(<http://www.hmdb.ca/>)、Metlin(<https://metlin.scripps.edu/>)中进行比对,根据二级质谱匹配得分对代谢物进行鉴定。

通过主成分分析(PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)等多元统计分析方法研究组间差异情况和筛选差异代谢物;以 OPLS-DA 分析中 $VIP \geq 1.0$ 、单变量分析中 $P < 0.05$ 且差异倍数 FC (Fold Change, 倍数变化) ≥ 2.0 或 ≤ 0.5 为标准筛选具有显著差异的代谢物。

1.5 田间试验

试验于江苏省南京市江宁区志清农产品专业合作社的农田($31^{\circ}42'N$, $118^{\circ}55'E$, 海拔 20 m)进行。试验地土壤类型为潮土,基本理化性质为: pH 5.90、土壤电导率 $EC\ 98.51\ \mu S/cm$ 、有机质含量 $29.41\ g/kg$ 、总氮含量 $1.93\ g/kg$ 、碱解氮含量 $130\ mg/kg$ 、有效磷含量 $9.74\ mg/kg$ 、速效钾含量 $367.71\ mg/kg$ 。白菜(*Brassica rapa* var. *glabra* Regel)品种为‘雪玉寒丰’,从定植到收获共计 74 d。试验共设置木霉黄腐酸 0(CK)、180(T_1)和 720 mg/m^2 (T_2)3 个处理。采用随机区组试验设计,每个处理 3 个重复,小区面积 $15\ m^2$ ($10.0\ m \times 1.5\ m$),每个小区移栽 72 株健壮幼苗。在白菜苗移栽当天和移栽后分别施用 1 个月木霉黄腐酸 1 次,施用方式为根施,量取 105 g 的木霉黄腐酸原液,稀释后将稀释液施入到根系表层土壤,CK 同时施用等量清水。基肥施用量:鸡粪有机肥 $10\ kg/m^2$,钙镁磷肥 $0.5\ kg/m^2$,复合肥 $0.5\ kg/m^2$,硼肥 $0.01\ kg/m^2$ 。定植后,施用内生菌根菌剂 $0.01\ kg/m^2$ 。白菜种植过程中基肥施用和日常管理相同。

1.6 白菜样品测定指标及方法

白菜收获期,在每个小区随机选择长势良好的 10 株白菜,利用便携式叶绿素测定仪(日本柯尼卡美能达 SPAD-502 Plus),选择健康且无病害的叶片,具体的测定位置通常选择叶片的中部区域,距离叶片基部约 $1/3 \sim 1/2$ 的位置,测定白菜叶片中叶绿素相对含量(SPAD)。采集植株地上部分,现场测定其生物量。将采集的白菜样品放入保温箱

中,立即运送至实验室,取叶片在冰浴中充分研磨获得匀浆样品,保存于 $4\ ^{\circ}C$ 待测。采用 2,6-二氯酚靛酚法(DCPIP 法)测定维生素 C 含量^[24];采用南京建成生物工程科技有限公司生产的试剂盒测定可溶性蛋白含量(考马斯亮蓝法^[25]),采用紫外分光光度法测定硝酸盐含量^[26]。

1.7 数据处理及分析

使用软件 SPSS Statistics 26.0 进行数据统计分析采用单因素方差分析(ANOVA),多重比较 Duncan 法($\alpha=0.05$),作图所用软件为 Origin 2025。

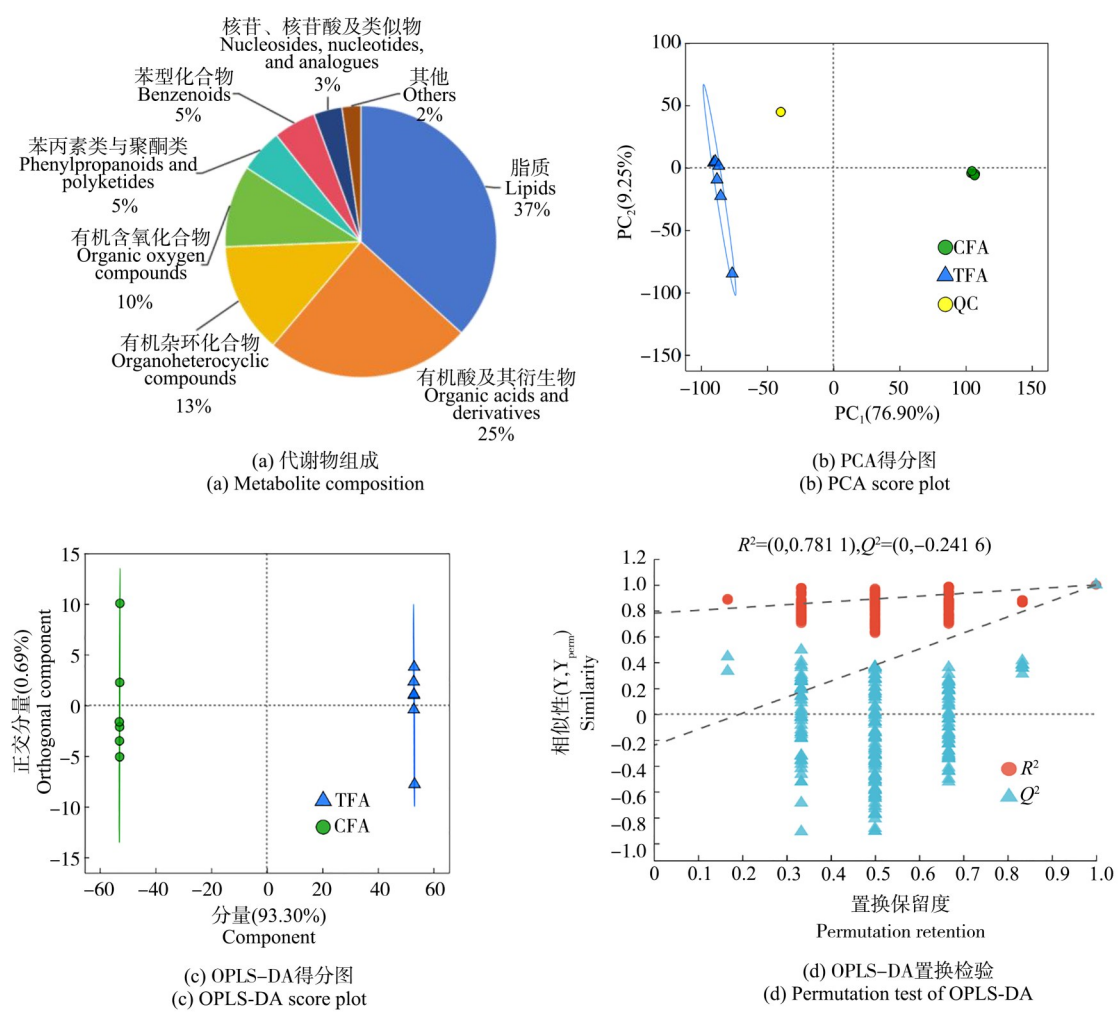
2 结果与分析

2.1 木霉黄腐酸的代谢谱解析

由图 1 可知,在木霉黄腐酸(TFA)和原料提取液(CFA)中共鉴定到 1 601 种代谢物。这些代谢物主要包括脂质和类脂分子(588 种)、有机酸(392 种)、有机杂环化合物(211 种)、有机氧化合物(156 种)、苯丙烷类和多酮类化合物(83 种)、苯类化合物(81 种)、核苷、核苷酸及其类似物(54 种)、有机氮化合物(17 种)、生物碱及其衍生物(13 种)、木质素、类木质素及相关化合物(3 种)、烃类衍生物(1 种)、有机硫化合物(1 种)以及其他成分(1 种)。CFA、TFA 以及质控样品(QC)的 PCA 分析结果显示,第一主成分(PC_1)和第二主成分(PC_2)分别占总方差的 76.90% 和 9.25%,表明这 2 个主成分能反映 CFA 和 TFA 代谢物组分的主要特征(图 1(b))。OPLS-DA 分析发现,TFA 与 CFA 样品分离明显(图 1(c)),该结果与 PCA 分析相一致,说明 TFA 与 CFA 的代谢物组成存在显著差异。经过 OPLS-DA 置换检验,累积解释率 $R_x^2=0.933$, $R_y^2=1.000$,模型预测能力参数 $Q^2=1.000$ (图 1(d)),这 3 个指标越接近于 1 时表示模型越稳定可靠,模型最右边的 R^2 、 Q^2 均 > 0.900 , Q^2 回归线的截距为 -0.02 ,说明 OPLS-DA 模型稳定性良好、预测能力强。

2.2 木霉黄腐酸的差异代谢物分析

由图 2 可知,TFA 和 CFA 之间共有 903 种代谢物存在显著差异,其中 58 种代谢物上调倍数(FC) ≥ 2 ,包括脂质 28 种、有机酸 12 种、有机杂环化合物 3 种、生物碱及其衍生物 1 种、有机氮化合物 1 种、苯丙素类和聚酮类各 1 种、有机氧化合物、其他类化合物 11 种中共包含 9 种不同的氨基酸。上调差异倍数排名前 5 的代谢物由高到低为本胆烷醇酮葡萄糖醛苷(5.2 倍) > 7 -酮基石胆酸(4.0 倍) $> 白三烯 B_4$ 乙醇酰胺(3.4 倍) > 15 -脱氧- $\Delta^2,14$ -前列腺素 J2-2-甘油酯(3.0 倍) $> 谷$



TFA, 木霉黄腐酸; CFA, 对照组黄腐酸; QC 质控样本。
TFA, *Trichoderma* fulvic acid; CFA, fulvic acid in the control group; QC, Quality control samples.

图1 木霉黄腐酸的代谢谱分析

Fig. 1 Metabolic profiling analysis of TFA

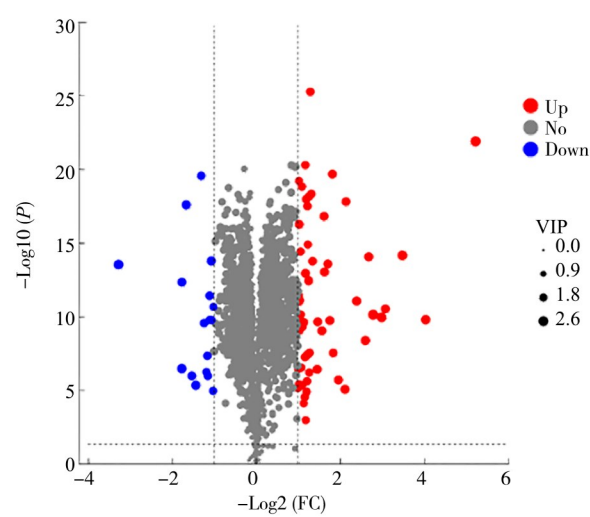


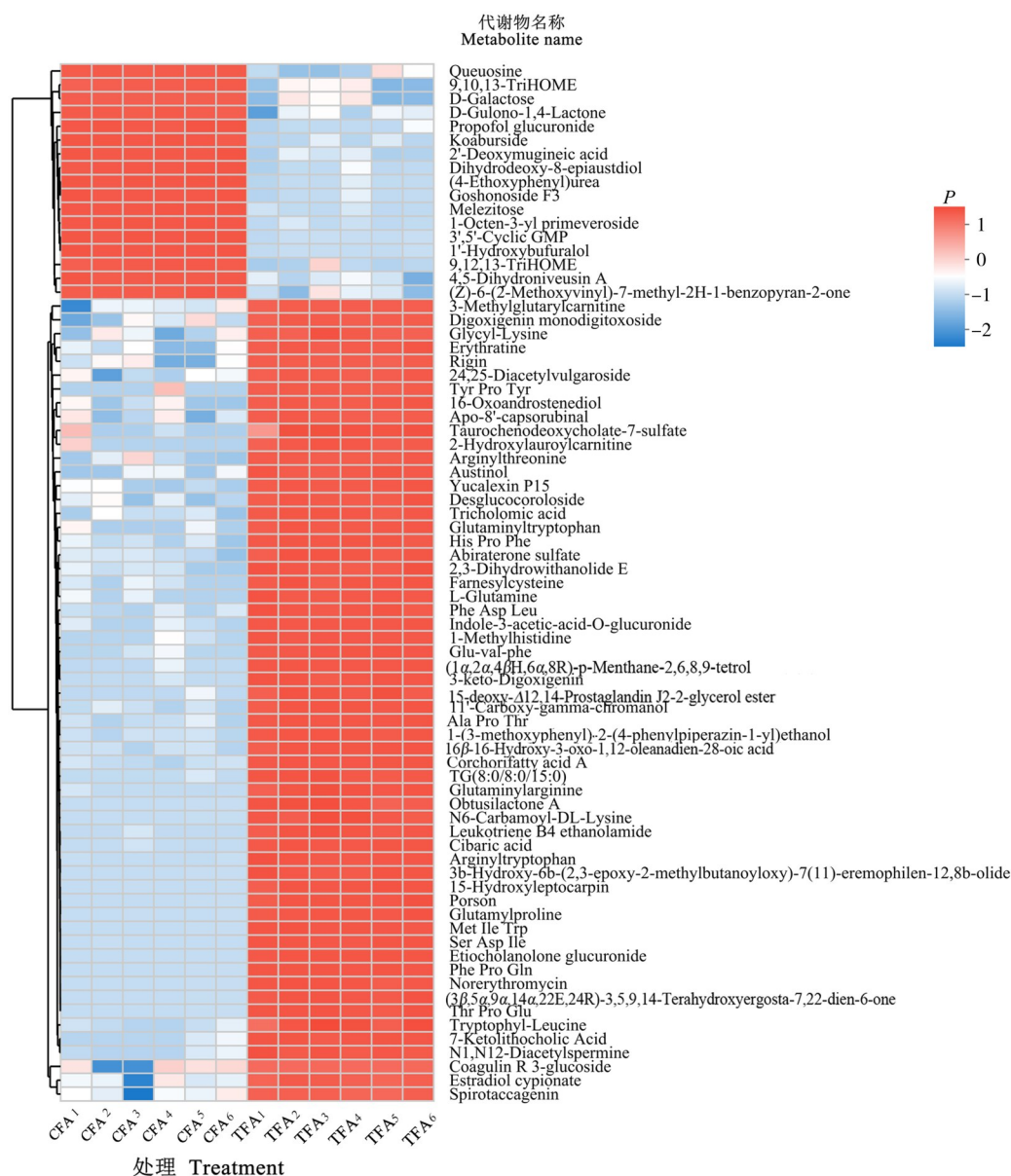
图2 差异代谢物的火山图

Fig. 2 Volcano plot analysis of differential metabolites

氨酰-L-缬氨酰-L-苯丙氨酸(2.9倍);17种代谢物下调的 $FC \leq 0.5$,包括脂质5种、有机杂环化合物3种、有机氧化合物3种、核苷、核苷酸及其类似物2种、有机酸1种、苯丙素类和聚酮类1种、苯类化合物1种、其他类化合物1种,其中下调差异幅度较大的5种代谢物分别是1-辛烯-3-基黄药甙(3.2倍)、蒽酸(1.8倍)、(4-乙氧基苯基)脲(1.7倍)、3',5'-环鸟苷酸(1.6倍)、D-古洛诺-1,4-内酯(1.5倍)。差异显著的5种代谢物分别为苯丙氨酸-脯氨酸-谷氨酰胺($P < 0.001$)、本胆

烷醇酮葡萄糖醛酸苷($P < 0.001$)、丝氨酸-天冬氨酸-异亮氨酸($P < 0.001$)、2-(2-甲氧基乙氧基)-N-[(7-氧代氮杂环戊烷-2-基)甲基]乙酰胺($P < 0.001$)、丙氨酸羧脯氨酸($P < 0.001$)。

由图3可知,代谢物差异显著的前5种物质为本胆烷醇酮葡萄糖醛酸苷、吡啶-3-乙酸-O-葡萄糖醛苷、白三烯B₄乙醇酰胺、1-辛烯-3-基黄药甙、谷氨酰-L-缬氨酰-L-苯丙氨酸,其中除1-辛烯-3-基黄药甙外,其他4种代谢物的表达量均显著上调($P < 0.05$),VIP在



*代表 $P < 0.05$, **代表 $P < 0.01$, ***代表 $P < 0.001$ 。

* indicates $P < 0.05$, ** indicates $P < 0.01$, and *** indicates $P < 0.001$.

图3 差异代谢物的聚类热图分析

Fig. 3 Cluster heat map analysis of differential metabolites

2.41~2.61。其中本胆烷醇酮葡萄糖醛酸苷、吡啶-3-乙酸-O-葡萄糖醛酸苷、白三烯B₄乙醇酰胺、谷氨酰-L-缬氨酰-L-苯丙氨酸为显著上调代谢物($P<0.05$),1-辛烯-3-基黄药甙为显著下调代谢物($P<0.05$)。相较于CFA,TFA中具有潜在生物活性的代谢物种类和含量更丰富,主要包括有机酸类(如1-甲基组氨酸、精氨酸色氨酸、口蘑酸、L-谷氨酰胺、谷氨酰色氨酸、谷氨酰脯氨酸、谷氨酰-L-缬氨酰-L-苯丙氨酸等)、脂质类(如吡啶-3-乙酸-O-葡萄糖醛酸苷、7-酮基石胆酸、牛磺鹅去氧胆酸酯-7-硫酸盐、16 β -16-羟基-3-氧代-1,12-油酸二烯-28-油酸等)。

2.3 木霉黄腐酸差异代谢物的KEGG通路富集分析

由图4可知,903种显著差异代谢物被注释到55个KEGG代谢通路上,其中前10个通路共富集到65个差异代谢物,涉及的差异代谢物以有机氧化物、有机酸、脂质、核苷、核苷酸及类似物为主。在上述代谢通路中富集代谢物的前5个通路分别是ABC转运蛋白(11个)、嘌呤代谢(11个)、半乳糖代谢(8个)、精氨酸和脯氨酸代谢(7个)、烟酸和烟酰胺代谢(6个)、亚油酸代谢(5个),并且这些代谢通路具有显著差异($P<0.01$),表明其可能是木霉菌剂发酵秸秆的主要代谢途径。

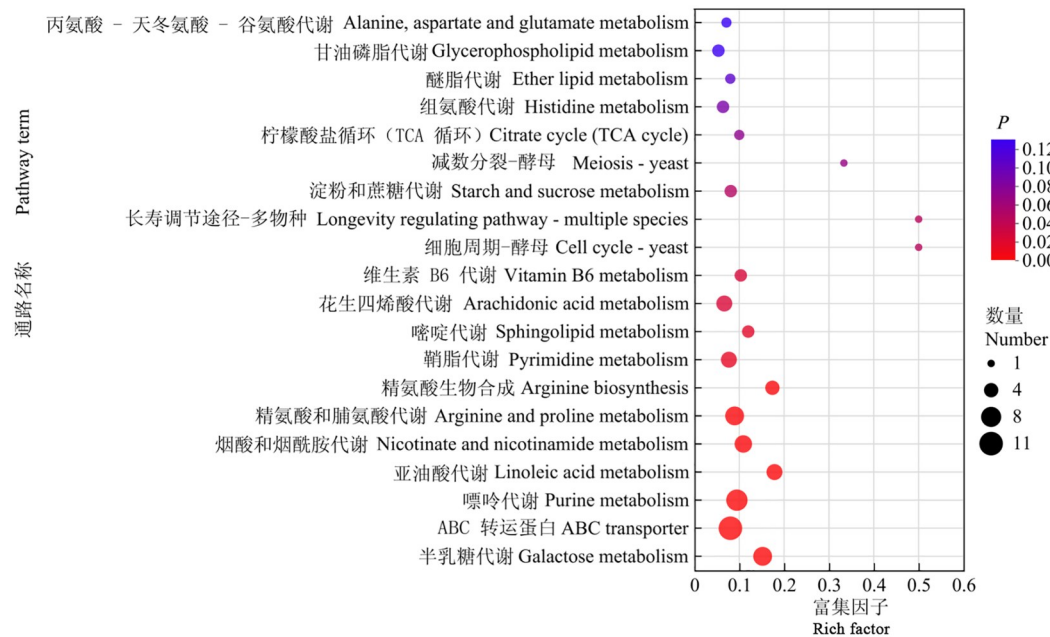


图4 差异代谢物的KEGG通路富集图
Fig. 4 KEGG pathway enrichment diagram of differential metabolites

2.4 木霉黄腐酸施用对白菜产量及品质的影响

由表1可知,与CK相比,木霉黄腐酸的不同施用

水平(T₁、T₂)均能够提高白菜产量。T₁和T₂的白菜单株鲜重分别增加28.07%、28.95%($P<0.05$),白菜单

表1 木霉黄腐酸不同施用水平的白菜产量
Table 1 Yield of Chinese cabbage under different application levels of TFA

处理 Treatment	单株重/(kg/株) Individual plant weight	单位面积产量/(kg/m ²) Yield per unit area
CK	1.14±0.36 ^b	5.45±1.71 ^b
T ₁	1.46±0.31 ^a	7.02±1.49 ^a
T ₂	1.47±0.32 ^a	6.86±1.64 ^a

注:平均值±标准差($n=8$);不同字母表示各处理之间的差异显著($P<0.05$)。CK,清水对照;T₁,根施木霉黄腐酸0.15 g/m²;T₂,根施木霉黄腐酸0.60 g/m²;T₁和T₂处理分别在白菜定植当天和定植后1个月施用2次木霉黄腐酸,每次腐植酸用量相同。下同。
Note: Mean ± standard deviation ($n=8$); different letters indicate significant differences among treatments ($P<0.05$). CK, water control; T₁, root application of bio-humic acid at 0.15 g/m²; T₂, root application of bio-humic acid at 0.60 g/m². The T₁ and T₂ treatments involved two applications of TFA, applied at transplanting and one month after transplanting, with the same amount of humic acid used each time. The same below.

位面积产量分别增加28.81%、25.87% ($P < 0.05$)。T₁的单位面积产量略高于T₂。这表明,较低施用量的木霉黄腐酸(T₁)可以获得增产的效果。

由图5可知,与CK相比,T₁、T₂的白菜叶片叶绿素含量(SPAD)分别升高33.68%、43.47% ($P < 0.05$),这有利于白菜产量和干物质积累;Vc含量分别增加45.18%、99.69% ($P < 0.05$),其中T₂的白菜Vc含量

达到124.15 $\mu\text{g/g}$;蛋白质含量分别增加29.93%、37.12% ($P < 0.05$)。施用木霉黄腐酸使白菜的硝酸盐含量降低,尤其是T₂的白菜硝酸盐含量降低23.39% ($P < 0.05$),因此,木霉黄腐酸能促进白菜生长发育、提高白菜主要营养品质,并且木霉黄腐酸高施用量为720 mg/m^2 (T₂)对白菜品质的提升效果优于180 mg/m^2 (T₁)施用处理。

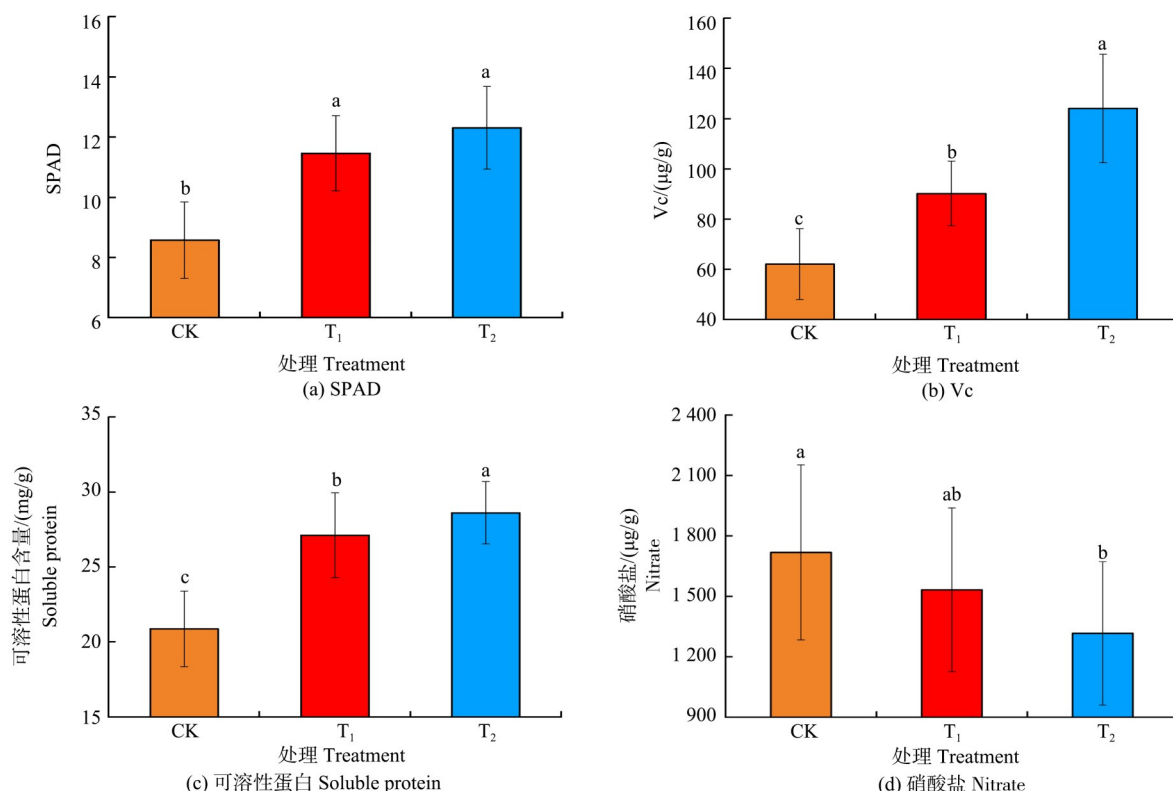


图5 不同木霉黄腐酸施用水平下的白菜品质指标

Fig. 5 Quality indicators of Chinese cabbage under different application levels of TFA

3 讨论

3.1 木霉黄腐酸对白菜的促生作用

目前,关于生化黄腐酸的研究主要集中在其制备工艺和结构特性^[9],而对其中小分子代谢物的研究较少。本研究采用非靶向代谢组学方法分析了木霉菌剂发酵秸秆前后黄腐酸中的差异代谢物,旨在揭示木霉黄腐酸植物促生作用机制。本研究发现,施用木霉黄腐酸可能通过提高土壤中钾和磷元素的有效性,增强了白菜根系对这些养分的吸收,进而促进了白菜生物量的积累,显著提高产量^[27]。白菜中维生素C(Vc)含量的增加,可能是与木霉黄腐酸720 mg/m^2 (T₂)处理的较高施用量相关,较高

的施用量可能增强磷酸酶、蔗糖酶、过氧化氢酶等关键酶的活性,从而显著提高了白菜中Vc含量^[28]。此外,白菜根系对木霉黄腐酸中氨态氮和硝态氮的吸收可能促进了氮源相关含氮化合物的合成,增强了氨基酸的合成与转化过程,进而促进了白菜中可溶性蛋白的积累^[29]。白菜中硝酸盐含量的降低可能源于有机酸通过与硝酸根离子在根细胞膜上的载体蛋白上竞争结合,从而减少硝酸盐的吸收,以及调节土壤pH、促进根际富集反硝化微生物等方式降低植物体内硝酸盐含量^[30]。发酵后,木霉黄腐酸中的代谢物组分发生明显变化,尤其是脂质和有机酸等代谢物的种类和含量均显著上调。具体而言,本胆烷醇酮葡萄糖醛酸苷、吲哚-3-乙酸-O-葡萄糖

醛酸苷、7-酮基石胆酸、1-甲基组氨酸、精氨酰色氨酸、L-谷氨酰胺等高表达代谢物,在精氨酸和脯氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢和亚油酸代谢途径中显著富集,成为影响木霉黄腐酸中差异代谢物组成的关键物质。

3.2 脂质代谢物

在本研究中,木霉黄腐酸中本胆烷醇酮葡萄糖醛酸苷、7-酮基石胆酸、牛磺鹅去氧胆酸酯-7-硫酸盐、16 β -16-羟基-3-氧代-1,12-油酸二烯-28-油酸、吡啶-3-乙酸-O-葡萄糖醛酸苷等脂质代谢物含量均显著上调($FC>2$)(图2和图3)。脂质代谢在植物生长过程中起到提供能量和碳源、构成细胞膜和细胞器膜、参与逆境响应、调控生长发育等作用^[31]。Zhu等^[32]研究发现,牛磺鹅去氧胆酸酯-7-硫酸盐、16 β -16-羟基-3-氧代-1,12-油酸二烯-28-油酸通过参与磷脂水解和糖脂合成,激活脂质信号传导以提高植物对磷酸盐的吸收。Hernández等^[33]研究发现,本胆烷醇酮葡萄糖醛酸苷、7-酮基石胆酸等脂质代谢物通过合成叶绿体脂肪酸和甘油酯影响植物叶绿体形成和光合功能。Chakraborty等^[34]研究发现,吡啶-3-乙酸-O-葡萄糖醛酸苷通过改变细胞膜的流动性,提高植物根际吸收能力,促进植物生长。可见,木霉黄腐酸中的脂质代谢物可以作为活性前体,参与植物信号传导、叶绿体合成、根际养分吸收等重要的生理过程。

3.3 有机酸代谢物

本研究共鉴定到392种有机酸,占差异代谢物总数的24.5%,其中1-甲基组氨酸、精氨酰色氨酸、口蘑酸、L-谷氨酰胺、谷氨酰色氨酸、谷氨酰脯氨酸等有机酸在木霉黄腐酸中表达量较高($FC>2$)(图3)。本研究中,木霉黄腐酸中氨基酸的种类和含量较发酵前更加丰富,这可能是因为接种的木霉菌剂产生胞外蛋白酶分解原料中的蛋白质底物形成氨基酸和肽^[35]。Lee等^[36]研究发现,精氨酰色氨酸、谷氨酰色氨酸与植物激素的合成有关,通过影响细胞分裂素、赤霉素等植物激素的代谢和信号传导,影响植物的分化和发育过程。Li等^[37]最新研究发现,氨基酸等根系分泌物在调节植物根际微生物群落、促进植物生长方面发挥着至关重要的作用。本研究中显著上调的1-甲基组氨酸、谷氨酰脯氨酸等有机酸可以促进植物根际富集 *Sphingomonas*、*Brevundimonas*、*Nocardioides* 等有益菌群^[38],提高

植物根系养分吸收能力、促进植物生长^[39]。此外,L-谷氨酰胺在半乳糖代谢、ABC转运蛋白、嘌呤代谢等多种代谢通路被显著富集。L-谷氨酰胺在植物中参与三羧酸循环和氧化磷酸化过程,产生大量的ATP,用于植物根系吸收、物质运输、细胞分裂生长等各种生理活动^[40]。因此,木霉黄腐酸中的有机酸组分可以通过参与植物激素合成、促进植物根际富集益生菌和充当能量来源,促进植物生长发育和吸收营养物质。

4 结 论

木霉黄腐酸发酵后木霉黄腐酸中脂质、有机酸的种类与含量均显著提升,其中在精氨酸和脯氨酸代谢、烟酸和烟酰胺代谢及亚油酸代谢等关键代谢通路中表现出显著富集。通过非靶向代谢组学分析表明,本胆烷醇酮葡萄糖醛酸苷、吡啶-3-乙酸-O-葡萄糖醛酸苷、7-酮基石胆酸、1-甲基组氨酸、精氨酰色氨酸及L-谷氨酰胺等代谢物为木霉黄腐酸中具有潜在生物活性的关键组分。田间试验表明,木霉黄腐酸可显著提高白菜产量、提高叶片光合作用效率,有效提高了白菜的品质,且施用量为720 mg/m² (T₂)的处理效果优于180 mg/m² (T₁)。

参考文献 References

- [1] 曾完成,李双.新业态:生物刺激素生发灿烂—浅议腐植酸生物刺激素的居间调节作用[J].腐植酸,2016(3):1-7
Zeng X C, Li S. New formats: Biostimulant industry becoming better and better: Discussion on the intermediary regulation of humic acid humic acid[J]. *Humic Acid*, 2016(3): 1-7 (in Chinese)
- [2] Schellekens J, Buurman P, Kalbitz K, van Zomeren A, Vidal-Torrado P, Cerli C, Comans R N J. Molecular features of humic acids and fulvic acids from contrasting environments [J]. *Environmental Science and Technology*, 2017, 51(3): 1330-1339
- [3] Chiou C T, Malcolm R L, Brinton T I, Kile D E. Water solubility enhancement of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids [J]. *Environmental Science and Technology*, 1986, 20(5): 502-508
- [4] Guo X X, Liu H T, Wu S B. Humic substances developed during organic waste composting: Formation mechanisms, structural properties, and agronomic functions [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 662: 501-510
- [5] 聂佩显,李明丽,刘霞,张德,王来平,薛晓敏.果实膨大期外源黄腐酸处理对苹果叶片光合产物合成与分配特性的影响[J].中国果树,2024(2): 12-17
Nie P X, Li M L, Liu X, Zhang D, Wang L P, Xue X M. Effects of exogenous fulvic acid treatments on synthesis and distribution of photoassimilates in apple leaves during fruit expanding period [J]. *China Fruits*, 2024(2): 12-17 (in Chinese)

- [6] Olaetxea M, De Hita D, Garcia C A, Fuentes M, Baigorri R, Mora V, Garnica M, Urrutia O, Erro J, Zamarreño A M, Berbara R L, Garcia-Mina J M. Hypothetical framework integrating the main mechanisms involved in the promoting action of rhizospheric humic substances on plant root-and shoot-growth [J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 123: 521-537
- [7] 刘彩娟, 吕春雨, 艾希珍, 毕焕改. 黄腐酸对干旱胁迫下黄瓜光合特性及产量和品质的影响[J]. *应用生态学报*, 2022, 33 (5): 1300-1310
Liu C J, Lv C Y, Ai X Z, Bi H G. Effects of fulvic acid on photosynthetic characteristics, yield and quality of cucumber under drought stress [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2022, 33 (5): 1300-1310 (in Chinese)
- [8] 孔繁荣, 李海平, 郭文忠, 武月胜, 郭建林, 周可杰. 干旱低温复合胁迫下黄腐酸钾对西葫芦幼苗生长和生理生化特性的影响[J]. *山东农业科学*, 2024, 56 (1): 74-80
Kong F R, Li H P, Guo W Z, Wu Y S, Guo J L, Zhou K J. Effects of potassium fulvic acid on growth and physiological and biochemical characteristics of zucchini seedlings under combined stress of drought and low temperature [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2024, 56 (1): 74-80 (in Chinese)
- [9] 赵波. 不同来源黄腐酸及其用量对马铃薯生长发育及产量品质的影响[D]. 泰安: 山东农业大学, 2023
Zhao B. Effects of different sources of fulvic acid and its dosage on potato growth, yield and quality [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2023 (in Chinese)
- [10] Souza A C, Olivares F L, Peres L E P, Piccolo A, Canellas L P. Plant hormone crosstalk mediated by humic acids [J/OL]. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, (2022-04-19). DOI: doi.org/10.1186/s40538-022-00295-2
- [11] 梁媛媛, 王泽平, 史秋哲, 姜瑛, 李培培, 韩燕来, 王伟. 不同分子量黄腐酸对冬小麦生长和养分吸收利用的影响[J]. *植物营养与肥料学报*, 2023, 29 (2): 308-322
Liang Y Y, Wang Z P, Shi Q Z, Jiang Y, Li P P, Han Y L, Wang Y. Effects of fulvic acid with different molecular weights on growth and nutrient utilization of winter wheat [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2023, 29 (2): 308-322 (in Chinese)
- [12] He X Y, Zhang H Q, Li J X, Yang F, Dai W X, Xiang C, Zhang M. The positive effects of humic/fulvic acid fertilizers on the quality of lemon fruits [J/OL]. *Agronomy*, (2022-08-15). DOI: doi.org/10.3390/agronomy12081919
- [13] Jaroszuk-Ścisł J, Tyśkiewicz R, Nowak A, Ozimek E, Majewska M, Hanaka A, Tyśkiewicz K, Pawlik A, Janusz G. Phytohormones (auxin, gibberellin) and ACC deaminase in vitro synthesized by the mycoparasitic *Trichoderma* DENTkZ3A0 strain and changes in the level of auxin and plant resistance markers in wheat seedlings inoculated with this strain conidia [J/OL]. *International Journal of Molecular Sciences*, (2019-10-04). DOI: doi.org/10.3390/ijms20194923
- [14] Bononi L, Chiramonte J B, Pansa C C, Moitinho M A, Melo I S. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma* spp from Amazon soils improve soybean plant growth [J/OL]. *Scientific Reports*, (2020-02-18). DOI: 10.1038/s41598-020-59793-8
- [15] 朱启明. 秸秆源黄腐酸调控根际氮素转化及其微生物机制[D]. 北京: 中国农业科学院, 2023
Zhu Q M. Regulation of rhizosphere nitrogen transformation by straw-derived fulvic acid and its microbial mechanism [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2023 (in Chinese)
- [16] Niu Y X, Guo S W, Han Y L, Si Y K, Li P P, Li F. Fulvic acid and fermentation agent optimize in situ composting by reducing antibiotic resistance genes abundances and altering succession of bacterial communities [J/OL]. *International Biodeterioration and Biodegradation*, (2024-03-18). DOI: doi.org/10.1016/j.ibiod.2024.105813
- [17] 陈勇强. 响应面法优化枯草芽孢杆菌发酵玉米秸秆产腐植酸条件[J]. *福建农业科技*, 2021, 52 (10): 47-51
Chen Y Q. Optimization of humic acid production from corn straw fermented by *Bacillus subtilis* based on response surface methodology [J]. *Fujian Agricultural Science and Technology*, 2021, 52 (10): 47-51 (in Chinese)
- [18] 贺小贤, 宋海涛, 雷化雨, 史懿乐, 杨婷, 夏飞, 刘欢. 产黄腐酸菌株的分离鉴定及培养基优化[J]. *陕西科技大学学报*, 2020, 38 (5): 39-45
He X X, Song H T, Lei H Y, Shi Y L, Yang T, Xia F, Liu H. Isolation and identification of fulvic acid producing strains and optimization of culture medium [J]. *Journal of Shaanxi University of Science and Technology*, 2020, 38 (5): 39-45 (in Chinese)
- [19] 陈胜. 利用木本泥炭固体发酵贝莱斯芽孢杆菌 SQR9 及其腐植酸生物肥料应用研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2021
Chen S. Study on solid state fermentation of *Bacillus Velez* sqr9 with woody peat and its application of humic acid bio-fertilizer [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021 (in Chinese)
- [20] 张林利, 王国文, 刘晔, 姜瑛, 汪强. 产生化黄腐酸菌株的筛选鉴定及应用效果[J]. *河南农业科学*, 2018, 47 (7): 71-76
Zhang L L, Wang G W, Liu Y, Jiang Y, Wang Q. Screening and identification of biochemical fulvic acid-producing bacteria and their application effect [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2018, 47 (7): 71-76 (in Chinese)
- [21] 张一枫, 窦森, 叶淑芬, 张丹丹. 里氏木霉利用玉米秸秆形成类胡敏酸 (HAL) 的特异性研究[J]. *农业环境科学学报*, 2019, 38 (9): 2184-2192
Zhang Y F, Dou S, Ye S F, Zhang D D. Specificity of humic acid-like (HAL) substance from *Trichoderma reesei*-inoculated corn straw [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38 (9): 2184-2192 (in Chinese)
- [22] 师杨杰, 靳红梅, 管益东, 龙玉娟, 朱燕云, 朱宁. 复合微生物菌剂发酵制备生物腐植酸的条件优化及其结构特性[J]. *农业环境科学学报*, 2023, 42 (9): 2120-2129
Shi Y J, Jin H M, Guan Y D, Long Y J, Zhu Y Y, Zhu N. Optimization of fermentation conditions and structural characteristics of biological humic substances prepared using compound microbial agents [J]. *Journal of Agro-environment Science*, 2023, 42 (9): 2120-2129 (in Chinese)
- [23] Wang R M, Wang L, Wu H B, Zhang L, Hu X P, Li C F, Liu S X. Noni (*Morinda citrifolia* L.) fruit phenolic extract supplementation ameliorates NAFLD by modulating insulin resistance, oxidative stress, inflammation, liver metabolism and gut microbiota [J/OL]. *Food Research International*, (2022-07-21). DOI: doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111732
- [24] 李泽鸿, 管玉兵, 练荣伟, 张帆, 张璐. 三种方法测定苍耳 VC 含量的研究[J]. *北方园艺*, 2011 (1): 200-202
Li Z H, Guan Y B, Lian R W, Zhang F, Zhang L. Analysis on the content of VC in *Xanthium* L by three methods [J]. *Northern Horticulture*, 2011 (1): 200-202 (in Chinese)
- [25] 王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究[J]. *天津化工*, 2009, 23 (3): 40-42
Wang X P, Xing S L. Determination of protein quantitation using the method of coomassie brilliant blue [J]. *Tianjin Chemical Industry*, 2009, 23 (3): 40-42 (in Chinese)
- [26] GB 5009.33—2016 食品安全国家标准食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定[S]. 北京: 标准出版社, 2016
GB 5009.33—2016 Determination of nitrite and nitrate in food with

- national food safety standard [S]. Beijing: Standard Press, 2016 (in Chinese)
- [27] Canellas L P, Olivares F L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter[J/OL]. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, (2014-03-13). DOI: doi.org/10.1186/2196-5641-1-3
- [28] 展文洁, 周鑫, 朱林星, 王敏, 朱长太, 沈其荣, 郭世伟. 木霉生物有机肥对盐渍化土壤肥力及杭白菜产量和品质的影响[J]. *中国农学通报*, 2024, 40 (7): 108-117
- Zhan W J, Zhou B, Zhu L X, Wang M, Zhu C T, Shen Q R, Guo S W. Effects of *Trichoderma* bio-organic fertilizer on salinized soil fertility and yield and quality of hang cabbage [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2024, 40 (7): 108-117 (in Chinese)
- [29] 陈倩, 李秉铎, 张鑫, 葛顺峰, 姜远茂. 腐植酸分次施用明显提高富士苹果产量、品质和氮素利用率[J]. *植物营养与肥料学报*, 2020, 26 (4): 757-764
- Chen Q, Li B Y, Zhang X, Ge S F, Jiang Y M. Split application of humic acid significantly improves the yield, quality and nitrogen utilization efficiency of 'Fuji' apple[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2020, 26 (4): 757-764 (in Chinese)
- [30] Rosa S D, Silva C A, Carletti P, Sawaya A C H F. Maize growth and root organic acid exudation in response to water extract of compost application [J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2021, 21 (4): 2770-2780
- [31] Harwood J, Moore T S Jr. Lipid metabolism in plants [J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 1989, 8(1): 1-43
- [32] Zhu S N, Liang C Y, Tian J, Xue Y B. Advances in plant lipid metabolism responses to phosphate scarcity [J/OL]. *Plants*, (2022-08-29). DOI: doi.org/10.3390/plants11172238
- [33] Luisa Hernández M, Cejudo F J. Chloroplast lipids metabolism and function. A redox perspective [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, (2021-08-05). DOI: doi: 10.3389/fpls.2021.712022.
- [34] Chakraborty N, Mitra R, Dasgupta D, Ganguly R, Acharya K, Minkina T, Popova V, Churyukina E, Keswani C. Unraveling lipid peroxidation-mediated regulation of redox homeostasis for sustaining plant health [J/OL]. *Plant Physiology and Biochemistry*, (2023-12-12). DOI: doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.108272
- [35] 陈蕾蕾, 王未名, 祝清俊, 刘孝永, 杜方岭. 木霉胞外蛋白酶的研究进展 [J]. *中国生物防治*, 2010, 26 (3): 359-364
- Chen L L, Wang W M, Zhu Q J, Liu X Y, Du F L. Research progress of extracellular proteases from *Trichoderma* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2010, 26 (3): 359-364 (in Chinese)
- [36] Lee K T, Liao H S, Hsieh M H. Glutamine metabolism, sensing and signaling in plants [J/OL]. *Plant and Cell Physiology*, 2023, 64(12): 1466-1481
- [37] Li Y, Zhang K W, Chen J, Zhang L G, Feng F Y, Cheng J J, Ma L Y, Li M, Wang Y, Jiang W, Yu X Y. Rhizosphere bacteria help to compensate for pesticide-induced stress in plants [J]. *Environmental Science and Technology*, 2024, 58(28): 12542-12553
- [38] Mathur P, Roy S. Insights into the plant responses to drought and decoding the potential of root associated microbiome for inducing drought tolerance [J]. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172(2): 1016-1029
- [39] Dai Z H, Guan D X, Bundschuh J, Ma L Q. Roles of phytohormones in mitigating abiotic stress in plants induced by metal (loid)s As, Cd, Cr, Hg, and Pb [J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2023, 53(13): 1310-1330
- [40] Ingargiola C, Jéhanno I, Forzani C, Marmagne A, Broutin J, Clément G, Leprince A S, Meyer C. The *Arabidopsis* target of rapamycin kinase regulates ammonium assimilation and glutamine metabolism [J]. *Plant Physiology*, 2023, 192(4): 2943-2957

责任编辑: 吕晓梅



第一作者简介: 孙振华, 2023年9月至今就读于江苏大学环境工程专业硕士研究生。2023年获得江苏大学二等学业奖学金。



通讯作者简介: 朱宁, 博士, 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所副研究员, 南京农业大学、江苏大学、南京信息工程大学硕士研究生导师。主要从事农业废弃物资源化利用研究, 主持国家自然科学基金、江苏省自然科学基金、江苏省农业科技自主创新资金等国家和省部级项目4项, 参加国家重点研发计划、国家自然科学基金、江苏省重点研发计划等项目5项, 以第一/通讯作者发表研究论文10篇, 其中SCI论文7篇, 申请发明专利3项, 授权发明专利1项。