绿色木霉 L24 菌株分生孢子可湿性粉剂的研制*

杨春平¹,张晋康²,陈华保¹,陈刚¹,杨继芝¹,王学贵¹,张敏¹

(1. 四川农业大学 农学院,四川雅安 625014;2. 雅安市农业局,四川雅安 625014)

摘要:以绿色木霉 L24 菌株分生孢子(孢子数量为 4.03×10^{11} 个/g)为有效成分,利用正交设计筛选木霉分生孢子可湿性粉剂配方,并对其生物活性进行田间验证。通过助剂种类和含量的筛选,得到 30% 木霉分生孢子可湿性粉剂,其组成成分及各自质量分数为:木霉分生孢子粉 30%、萘磺酸钠甲醛缩合物 7%、十二烷基硫酸钠 3%、木质素磺酸钠 5%、拉开粉 2%、硅藻土 53%。植物生长试验表明,该制剂 800 倍稀释液对 2 种白菜品种有很好的促生作用;田间药效试验表明,绿色木霉 L24 菌株制剂对玉米纹枯病和玉米褐斑病有较好的防治效果,300 倍稀释液防治效果分别为 52.88% 和 56.28%。

关键词:绿色木霉;分生孢子;配制;田间试验

中图分类号:S482.28

文献标识码:A

文章编号:1004-1389(2010)09-0043-05

Preparation of *Trichoderma viride* L24 Conidia Wettable Powder

YANG Chunping¹, ZHANG Jinkang², CHEN Huabao¹, CHEN Gang¹,
YANG Jizhi¹, WANG Xuegui¹ and ZHANG Min¹

(1. Agronomy College, Sichuan Agriculture University, Yaan Sichuan 625014, China;

2. Yaan Agriculture Bureau, Yaan Sichuan 625014, China)

Abstract: The formula of the *Trichoderma viride* L24 conidia (4.03×10^{11} spores/g) wettable powder (WP) and its biological activity in the field experiment were studied. A reasonable formula was determined by screening on the type and content of auxiliaries. The formula was as follows: 30% *Trichoderma* L24 conidia, 7% condensates of sodium naphthalene sulfonate and formaldehyde, 3% sodium lauryl sulfate, 5% sodium ligninsulfonate, 2% nekal and 53% diatomaceous earth. Growth test of the cabbage showed that it had a good growth promoting effect on two varieties of Chinese cabbage. The field experiment showed that the control efficacy of the *Trichoderma* L24 conidia WP diluted 300 times against corn sheath blight and corn brown spot were 52.88% and 56.28% respectively.

Key words: *Trichoderma viride*; Conidia; Preparation; Field experiment

木霉菌属于半知菌类丝孢纲丛梗孢目丛梗孢科,广泛存在于土壤、植物残体、植物根围、植物叶片及种子、球茎表面及动物粪便上^[1]。该类真菌因能产生拮抗物质和寄生有害植物病原菌,而被人们广泛研究。目前普遍认为木霉真菌抑制病原菌的作用机制主要包括竞争、寄生、抗生、溶菌和诱导抗性,并具有促进植物生长等辅助机制^[2]。近年来,国内外已有许多公司将木霉开发成了产

品,其中哈茨木霉和绿色木霉应用最为广泛^[3]。

四川农业大学植保系无公害农药研究实验室从四川地区筛选得到的绿色木霉 L24 菌株,对多种植物病原菌有一定的抑制作用并可明显促进植物生长^[4]。为了更好地开发利用该菌株,本试验通过正交设计筛选 L24 菌株分生孢子可湿性粉剂(WP)的最优配方,并研究该制剂对植物生长的影响及防治玉米纹枯病和玉米褐斑病效果。

* 收稿日期:2010-03-11 修回日期:2010-03-23

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费项目(nyhyzx3-15)。

第一作者:杨春平,女,博士,主要从事农药学教学及天然产物研究。E-mail:chunping79@163.com

通讯作者:张敏。E-mail:yalanmin@126.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株 绿色木霉 L24 菌株由四川农业大学无公害农药研究实验室提供。

1.1.2 供试作物 白菜,品种为“黄金”和“金凤”,市购。玉米,品种为“长玉 13”,市购。

1.2 方 法

1.2.1 木霉的浅层发酵 采用浅层发酵^[4],发酵底物为麦麸,将麦麸分装于塑料袋中,于 121℃ 下灭菌 20~30 min 后待用。对接种室用甲醛和高锰酸钾混合液[V(甲醛):V(高锰酸钾)=1:2]密闭熏蒸灭菌 24 h。然后将麦麸(已灭菌)和木霉液体发酵母液充分混合,均匀铺展在簸箕表面(厚度约 1 cm),恒温(27℃)保湿(RH≥85%)培养 5 d。

1.2.2 木霉分生孢子收集和含孢量测定 风干浅层发酵产物,粉碎后过 200 目筛,收集木霉分生孢子粉。含孢量测定采用血球计数板计数法^[5]:将所收集的木霉分生孢子粉稀释 50 倍,配成孢子悬浮液。按对角线方位,取左上、左下、右上、右下和中央 5 个格的孢子计数。重复 3 次,取其平均值,用下式计算含孢量。

每毫升分生孢子数量 = 每小格孢子数 × 4 000 × 1 000 × 稀释倍数

1.2.3 载体、润湿剂和分散剂对木霉分生孢子萌发的影响 采用孢子萌发法^[6]。称取一定量的载体和各种润湿剂、分散剂,将载体、润湿剂和分散剂配制成为 50、100、200、400 和 800 μg/mL 的质量浓度,将孢子粉加入到所配制的溶液中,在显微镜下调整到每视野分生孢子数 50~100。然后将混合悬浮液滴于凹玻片上,30℃ 恒温保湿培养 24 h,测定孢子萌发率。通过测定萌发率来判断各载体、润湿剂和分散剂对木霉 L24 菌株分生孢子萌发的影响。

1.2.4 载体、润湿剂和分散剂的选择 润湿剂和分散剂种类的选择方法:木霉孢子粉的质量分数为 30%,润湿分散剂质量分数各为 10%,其余以硅藻土补足,分别配制成为可湿性粉剂样品,测定样品的润湿时间和悬浮率并进行比较。润湿效果好、悬浮率高的样品所选择的润湿分散剂即为较好的润湿分散剂种类。

润湿剂和分散剂的最优配比筛选:以 1 g 为基数,木霉孢子粉质量分数为 30%,按筛选的助

剂种类和比例进行正交设计^[7],确定木霉分生孢子的最佳配方。

1.2.5 木霉 L24 菌株分生孢子可湿性粉剂品质检测 制剂样品品质检测方法:润湿时间按 GB/T 5451-2001 测定;悬浮率按 GB/T 12853-2006 测定;水分按 GB/T 1600-2001,共沸法测定;pH 按 GB/T 19600-1993 测定。

1.2.6 木霉制剂对白菜生长影响的田间试验 选用 2 个白菜品种,共设置 8 个处理,每处理 3 次重复,小区面积为 20 m²,随机区组排列各小区。在小白菜种植 7 d 后,开始施用木霉可湿性粉剂,每 7 d 施用 1 次,共施药 3 次,施药处理为木霉可湿性粉剂 400、800、1 600 倍稀释液,以清水处理为对照。在第 3 次施药后 7 d 测量和记录株高、主根长、叶面积和鲜质量。

1.2.7 木霉制剂防治玉米纹枯病田间药效试验 共设置 10 个处理,3 次重复,于玉米拔节后期玉米纹枯病和褐斑病未发病时第 1 次施药,后每隔 7 d 喷药 1 次,使用木霉可湿性粉剂 300、500、800 倍稀释液连续喷施 3 次,在第 3 次施药后 7 d 调查玉米纹枯病(参照 GB/T 17980.20-2000)和玉米褐斑病(参照 GB/T 17980.86-2004)发病情况,计算防治效果。

2 结果与分析

2.1 木霉 L24 菌株分生孢子粉含孢量测定结果

采用血球计数板计数法测得每克木霉孢子粉中分生孢子数量为 4.03×10^{11} 。

2.2 载体、润湿剂和分散剂对木霉分生孢子萌发的影响

由表 1 可以看出,硅藻土对木霉分生孢子的萌发影响不明显,各润湿剂和分散剂对木霉 L24 菌株分生孢子的萌发随质量浓度增加影响明显。当萘磺酸钠甲醛缩合物、木质素磺酸钠、拉开粉和十二烷基硫酸钠大于 50 μg/mL 时,孢子萌发率显著降低,因此在木霉 L24 菌株可湿性粉剂助剂筛选时,为避免助剂对木霉 L24 菌株孢子萌发的影响,萘磺酸钠甲醛缩合物、十二烷基苯磺酸钠、木质素磺酸钠、十二烷基硫酸钠和拉开粉的质量浓度不高于 50 μg/mL。

2.3 润湿剂和分散剂种类及最优配比选择

2.3.1 润湿剂和分散剂选择结果 由表 2 可见,不同的润湿剂和分散剂与载体和孢子粉混合后,其润湿时间和悬浮率差异较大。其中,当萘磺酸

钠甲醛缩合物和十二烷基硫酸钠配伍及拉开粉和木质素磺酸钠配伍,其悬浮率较高(分别为 69.44%和 69.13%),润湿时间较短(分别为 75 和 98 s),与其他处理相比,差异显著。因此选取

萘磺酸钠甲醛缩合物和木质素磺酸钠为正交设计的分散剂,选择十二烷基硫酸钠和拉开粉为正交设计的润湿剂。

表 1 载体、润湿剂和分散剂对木霉 L24 菌株分生孢子萌发的影响

Table 1 Effects of the auxiliaries on the spore germinations of the *Trichoderma* L24 conidia

载体、润湿剂和分散剂 Auxiliary	孢子萌发率 Spore germination rate					对照 CK
	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	400 $\mu\text{g}/\text{mL}$	800 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
硅藻土 Diatomaceous earth	81.23aA	80.69aA	80.97aA	79.23abA	76.36bB	80.64aA
萘磺酸钠甲醛缩合物 Condensates of sodium naphthalene sulfonate and formaldehyde	79.85aA	76.31bA	60.37cB	57.32dB	38.36cC	80.12aA
十二烷基硫酸钠 Sodium lauryl sulfate	76.31aA	58.25bB	42.36cC	35.69dD	22.14eE	79.33aA
木质素磺酸钠 Sodium ligninsulfonate	78.64aA	70.29bA	58.31cB	48.20dC	30.33eD	78.48aA
拉开粉 Nekal	78.29aA	73.60bAB	71.28bB	52.39cC	48.67cC	80.36aA
十二烷基苯磺酸钠 Sodium dodecylbenzene sulfonate	77.65aA	72.31bB	63.55cC	51.20dD	42.18eE	79.11aA

注:同行数据后小写字母不同者表示 5%水平上差异显著,大写字母不同者表示 1%水平上差异显著,同栏中有相同字母者表示差异不显著。下同。

Note: Analyzed with Duncan's multiple tests between treatments, significant differences of 5% and 1% are marked by the small and capital letters respectively. If any letters marked in one treatment isn't the same to another, it implies difference between them. The same as below.

表 2 不同润湿剂和分散剂配制的可湿性粉剂的润湿时间和悬浮率

Table 2 Wetting time and suspensibility of the various surfactants

配方编号 No.	萘磺酸钠甲醛缩合物 Condensates of sodium naphthalene sulfonate and formaldehyde	十二烷基硫酸钠 Sodium lauryl sulfate	拉开粉 Nekal	木质素磺酸钠 Sodium Ligninsulfonate	十二烷基苯磺酸钠 Sodium dodecylbenzene sulfonate	润湿时间/s Wetting time	悬浮率/% Suspensibility
1	有	有	无	无	无	75fF	69.44aA
2	有	无	有	无	无	142dD	68.13 cC
3	有	无	无	无	有	177bB	66.64eE
4	无	有	无	有	无	152cC	67.73dD
5	无	无	有	有	无	98eE	69.13bB
6	无	无	无	有	有	195aA	68.98bB

2.3.2 润湿剂和分散剂的最优配比筛选结果

根据润湿剂和分散剂选择结果,选择润湿时间较短、悬浮率较高者作为正交因素,并选择不同因素助剂按常用质量分数用量设计 3 个水平,结果见表 3。通过正交设计,所得试验结果见表 4,对表 4 数据进行方差分析结果见表 5。由表 4 和表 5 可知,木霉 L24 菌株分生孢子可湿性粉剂的较优

配方为 $A_3B_3C_1D_1$,即木霉分生孢子粉 30%、萘磺酸钠甲醛缩合物 7%、十二烷基硫酸钠 3%、木质素磺酸钠 5%、拉开粉 2%、硅藻土加齐至 100%。经方差分析,影响因素依次为 $A>B>C>D$ 。其中萘磺酸钠甲醛缩合物和十二烷基硫酸钠对制剂悬浮率有显著影响。

表 3 润湿剂和分散剂配方因素与水平

Table 3 Factors and levels on the formula of the various surfactants

水平 Level	因素 Factor			
	萘磺酸钠甲醛缩合物(A) Condensates of sodium naphthalene sulfonate and formaldehyde	十二烷基硫酸钠(B) Sodium lauryl sulfate	木质素磺酸钠(C) Sodium ligninsulfonate	拉开粉(D) Nekal
1	3	1	5	2
2	5	2	7	3
3	7	3	9	4

注:数据为 4 个因素的质量分数。

Note: Data is the mass fraction of 4 factors.

表 4 润湿剂和分散剂配方正交试验结果

Table 4 Results of orthogonal experiment of the various surfactants

试验编号 No. of experiment	因素 Factor				悬浮率/% Suspensibility
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	58.64
2	1	2	2	2	61.20
3	1	3	3	3	60.24
4	2	1	2	3	62.44
5	2	2	3	1	64.71
6	2	3	1	2	68.62
7	3	1	3	2	61.18
8	3	2	1	3	69.00
9	3	3	2	1	71.62
K ₁	180.08	182.26	196.26	194.97	
K ₂	195.77	194.91	195.26	191.00	
K ₃	201.80	200.48	186.13	191.68	
k ₁	60.03	60.75	65.42	64.99	
k ₂	65.27	64.97	65.09	63.67	
k ₃	67.27	66.83	62.04	63.90	
极差 R	7.24	6.07	3.38	1.32	

注:K_i表示任一列上水平号为*i*时,所对应的试验结果之和。k_i=K_i/*s*,其中*s*为任一列上各水平出现的次数(文中为3次)。

Note:K_i is the sum of suspensibility values when the level of the corresponding factor is coded by *i*. k_i=K_i/*s*. *s* means the replication number of each level in each column (here is 3).

2.4 木霉制剂品质检测结果

木霉分生孢子可湿性粉剂的润湿时间为 58 s,质量悬浮率为 68.94%,孢子悬浮率达到 83.44%,pH 为 7.7,含水量 0.98%,98.23%通过 200 目筛。

表 5 方差分析

Table 5 Analysis of variance

来源 Source	SS	DF	MS	F	P
A	83.810 6	2	41.905 3	27.887 9	<0.05
B	58.112 9	2	29.056 4	19.337	<0.05
C	20.774 9	2	10.387 4	6.912 8	
D(误差 Error)	3.605 3	2	1.502 6		

注 Note: F_{0.01}(2,2)=90; F_{0.05}(2,2)=19.

2.5 木霉制剂对白菜生长的影响

从表 6 可以看出,木霉制剂 3 种处理都对 2 种白菜有明显的促生作用。且增长程度与木霉制剂用量有明显关系,在木霉制剂稀释 800 倍处理下,2 种白菜的株高、根长、叶面积、鲜质量指标均明显高于对照和其他处理,除“黄金”品种鲜质量指标与木霉制剂稀释 400 倍处理差异不显著外,其他指标差异均达到显著水平。表明木霉制剂稀释 800 倍是促进植物生长的最佳处理。

表 6 木霉制剂对白菜生长的影响

Table 6 Effects of the *Trichoderma* L24 on growth of cabbages

处理 Treatment	“黄金”Huangjin cabbage				“金凤”Jinfeng cabbage			
	株高/cm Crop height	根长/cm Root length	叶面积/cm ² Leaf area	鲜质量/g Mass	株高/cm Crop height	根长/cm Root length	叶面积/cm ² Leaf area	鲜质量/g Mass
木霉 400 <i>Trichoderma</i> 400	22.37bB	11.30bA	30.25cC	17.63aA	16.30bB	12.30bB	27.42bB	16.10bB
木霉 800 <i>Trichoderma</i> 800	26.31aA	13.20aA	38.59aA	18.19aA	18.60aA	16.20aA	33.13aA	20.20aA
木霉 1 600 <i>Trichoderma</i> 1 600	21.03cC	8.80cB	32.11bB	13.21bB	15.00cBC	9.20cC	25.69cBC	11.10cC
CK	16.60dD	7.70cB	28.36dD	10.13cC	14.4cC	7.30dD	24.15dC	8.05dD

注:木霉 400、木霉 800、木霉 1 600 分别表示木霉制剂 400 倍、800 倍和 1 600 倍稀释液,CK 为空白水剂。表 7 各处理含义同此。

Note: *Trichoderma* 400 times, *Trichoderma* 800 times, *Trichoderma* 1 600 times implies *Trichoderma* formulation diluted 400, 800, 1 600 times. The CK was the blank control without the samples. The same as below.

表 7 木霉制剂防治玉米纹枯病和玉米褐斑病试验结果

Table 7 *Trichoderma* L24 conidia WP control corn sheath blight and corn brown spot

处理 Treatment	玉米纹枯病 Corn sheath blight		玉米褐斑病 Corn brown spot	
	病情指数/% Disease index	防治效果/% Control efficacy	病情指数/% Disease index	防治效果/% Control efficacy
木霉 300 <i>Trichoderma</i> 300	2.95	52.88bB	5.10	56.28aA
木霉 500 <i>Trichoderma</i> 500	3.51	43.93cB	6.53	44.06bB
木霉 800 <i>Trichoderma</i> 800	4.36	30.35dC	8.24	29.37cC
井冈霉素 800 Jinggangmycin 800	1.97	68.53aA	4.37	62.87aA
CK	6.26	—	11.76	—

2.6 木霉防治玉米纹枯病和玉米褐斑病试验结果

由表 7 可知,木霉制剂不同处理对玉米纹枯病和玉米褐斑病均有一定的防治效果,其中木霉制剂稀释 300 倍液对玉米纹枯病的防治效果为 52.88%,低于对照井冈霉素稀释 800 倍防治效果,差异显著;木霉制剂稀释 300 倍液对玉米褐斑病的防治效果为 56.28%,与井冈霉素稀释 800 倍防治效果相当,差异不显著。

3 讨论

以微生物活体作为农药开发利用是生物农药研究的热点之一,其大量开发利用可有效降低和消除目前化学农药普遍存在的残留、毒性和抗药性等诸多负面作用。在微生物活体农药开发研究中,其配套制剂研究是微生物活体农药实际开发和推广应用的重要基础。但微生物活体制剂加工与化学制剂相比,相对复杂,要考虑到菌株活体孢子的大量制备,润湿剂和分散剂对孢子萌发的影响及特殊的加工方法等因素^[8]。绿色木霉 L24 菌株具有广泛的杀菌生物活性^[4],实际推广应用价值较大,因此其制剂加工研究尤为重要。但目前木霉菌株制剂的加工研究相对较少,仅见张敏^[9]等的报道。本研究在测试供试润湿剂和分散剂对分生孢子影响的前提下,通过正交设计,对木霉 L24 菌株的分生孢子进行制剂加工,首次制备 30%木霉 L24 菌株分生孢子可湿性粉剂。该制剂各项指标均达到国家可湿性粉剂检测标准,为进一步推广应用该菌株奠定了基础。

拮抗木霉菌可有效防治多种作物常见病害^[3],但利用绿色木霉防治玉米纹枯病和玉米褐

斑病相关研究较少。本试验结果表明,绿色木霉 L24 菌株制剂对玉米纹枯病和玉米褐斑病有较好的防治效果。玉米纹枯病和玉米褐斑病是两种制约玉米丰产丰收的主要病害,目前防治该病害的主要手段为化学防治,但这两种病害发生严重时期多在玉米生长后期,此时玉米植株高大,给施药带来了较大困难。木霉制剂为活体制剂,玉米早期喷施后木霉孢子可在植株体内迅速繁殖并成为优势种群,从而抑制病菌的生长和蔓延,达到预防和治疗这两种病害的目的。以上研究结果为利用活体生物农药替代化学药剂防治玉米中后期病害提供了新的思路。

参考文献:

- [1] 陆宁海,徐瑞富,房振宏,等. 哈茨木霉对小麦和玉米幼苗生长的影响[J]. 江苏农业学报,2005,21(3): 238-240.
- [2] 徐同,钟静萍,李德葆. 木霉对土传病原真菌的拮抗作用[J]. 植物病理学报,1993,23(1):63-67.
- [3] 郭润芳,刘晓光,高克祥. 拮抗木霉菌在生物防治中的应用与研究进展[J]. 中国生物防治,2002,18(18):180-184.
- [4] 钟源,张敏,陈华保,等. 木霉 L24 菌株的农用生物活性初步研究[J]. 西南农业学报,2007,20(6): 1225-1228.
- [5] 沈萍,范秀容,李斌. 微生物学实验[M]. 北京:高等教育出版社,2002:90-92.
- [6] 慕立义. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1994:123-124.
- [7] 盖钧镒. 试验统计方法[M]. 北京:中国农业出版社,2005: 294-295.
- [8] 朱昌雄,丁振华,蒋细良,等. 微生物农药剂型研究发展趋势[J]. 现代化工,2003,23(3):4-8.
- [9] 张敏,彭化贤,邓新平,等. 5 亿活孢子/克木霉菌可湿性粉剂的研制[J]. 西南农业学报,2008,21(3):675-679.