

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20140438

# 棘孢木霉可湿性粉剂研制及杀菌活性测定

孙丽丽<sup>1</sup> 曹传旺<sup>1</sup> 薛绪亭<sup>1</sup> 王志英<sup>1</sup> 杜春艳<sup>2</sup>

(1 东北林业大学林学院 2 黑龙江省牡丹江市林业局)

**摘要:**以棘孢木霉分生孢子粉、发酵液冻干粉为有效成分制备混配杀菌剂。在测定助剂对棘孢木霉生物活性的基础上,利用正交试验设计法测定助剂对制剂性能的影响,进一步确定助剂种类和含量;通过机械粉碎法将棘孢木霉分生孢子粉、发酵液冻干粉与助剂混合配比加工成可湿性粉剂。室内离体试验法测定棘孢木霉分生孢子粉和发酵液冻干粉不同配比的制剂对油菜菌核病菌抑菌活性,获得最佳比例,并将其加工成可湿性粉剂。结果表明:棘孢木霉孢子粉和发酵液冻干粉可湿性粉剂最佳配比(质量比)为1:1,润湿分散剂为1% Morwet EFW、5% TERWET 1010、5% Morwet D425、7% 木质素磺酸钙;紫外保护剂为0.3% 纳米氧化锌,以硅藻土为载体补足100%。该配方可湿性粉剂的孢子萌发率为88.57%,质量悬浮率达81.79%,孢子悬浮率80.12%,润湿时间<10 s,平均粒径27 μm,符合商品制剂的标准。室内生物测定结果表明,不同混配比例制剂均有一定的增效作用,但该配比可湿性粉剂增效作用最为显著,其中1 600倍液对油菜菌核病菌防治效果比孢子粉、发酵液冻干粉单剂分别高21.67%和12.09%,抑制率范围为64.17%~88.67%。该制剂属于环境友好型绿色农药,为农林植物病害的生物防治提供了一种新生防材料。

**关键词:**棘孢木霉; 助剂筛选; 毒力测定; 可湿性粉剂

中图分类号:S763.1 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2015)06-0045-08

SUN Li-li<sup>1</sup>; CAO Chuan-wang<sup>1</sup>; XUE Xu-ting<sup>1</sup>; WANG Zhi-ying<sup>1</sup>; DU Chun-yan<sup>2</sup>. **Preparation and fungicidal bioactivity of wettable powder formulations of *Trichoderma asperellum*.** *Journal of Beijing Forestry University* (2015)37(6) 45-52 [Ch, 44 ref.]

1 School of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang, 150040, P. R. China;

2 Forestry Bureau of Mudanjiang, Mudanjiang, Heilongjiang, 157011, P. R. China.

We prepared microbiological fungicide using conidial germination powder and freeze-dried fermentation broth powder of *Trichoderma asperellum* in this study. Based on measuring the bioactivity of primary adjuncts to *T. asperellum*, the effects of adjuncts on formulation properties were further tested according to orthogonal experimental design, and then the optimal species and contents of the adjuncts were finally determined. The wettable powder was formulated with a Muller mixer to blend conidial germination and freeze-dried fermentation broth powder of *T. asperellum* and adjuncts. The inhibitory activities of wettable powder formulation to *Sclerotinia sclerotiorum* with different ratios of conidial germination to freeze-dried fermentation broth powder of *T. asperellum* were evaluated. The results showed that the optimal mass ratio of conidial germination to freeze-dried fermentation broth power of *T. asperellum* in the wettable powder formulation was 1:1, and the wetting dispersant was composed of 1% Morwet EFW, 5% TERWET 1010, 5% Morwet D425 and 7% calcium lignosulfonate, using 0.3% nano zinc oxide as UV protectants and diatomite as carrier to make up 100%. The conidial germination was 88.57%, mass suspension percentage was 81.79%, conidial suspension percentage was 80.12% and

收稿日期:2014-12-01 修回日期:2015-01-13

**基金项目:**“十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAD37B014)、黑龙江省自然科学基金项目(C201409)、吉林省留学人员科技创新创业项目(2013-36)、中央高校基本科研业务费专项基金项目(2572014AA31)。

**第一作者:**孙丽丽,博士生。主要研究方向:森林病虫害生物防治。Email:253035020@qq.com 地址:150040 黑龙江省哈尔滨市和兴路26号东北林业大学林学院。

**责任作者:**王志英,教授,博士生导师。主要研究方向:森林病虫害生物防治。Email:zyw0451@sohu.com 地址:同上。曹传旺,博士,副教授。主要研究方向:昆虫毒理学。Email:chuanwangcao@126.com 地址:同上。

**本刊网址:**http://j.bjfu.edu.cn; http://journal.bjfu.edu.cn

average particle size was 27  $\mu\text{m}$ , and the wetting time for the formulation was  $< 10$  s, which accorded with the standard for commercial formulations, i. e., small particle size, high suspensibility and good shelf life. All different mixed formulations had different synergistic effects, but 1:1 ratio of formulation was significantly synergistic. The wettable power formulations (1 600  $\times$ ) containing both conidial germination and freeze-dried fermentation broth power had 21.67% and 12.09% higher control efficacy to *S. sclerotiorum* than that of wettable powder formulations containing only conidial or freeze-dried fermentation broth power. The inhibition of wettable power formulation to *S. sclerotiorum* ranged from 64.17% to 88.67%. Therefore, this formulation is an environment-friendly green pesticide, and our study provides a new bio-fungicide in biological control of plant diseases in agriculture and forestry.

**Key words** *Trichoderma asperellum*; adjunct screen; toxicity assay; wettable powder formulation

木霉 (*Trichoderma* spp.) 属子囊菌门 (Ascomycota), 粪壳菌纲 (Sordariomycetes), 肉座菌目 (Hypocreales), 肉座菌科 (Hypocreaceae) 真菌<sup>[1-2]</sup>, 自 1932 年 Weindling<sup>[3]</sup> 发现木霉菌具有拮抗作用以来, 以木霉为主要成分的商品制剂国际上已经有 100 余种, 已广泛应用于防治农林植物生长期病害<sup>[4-11]</sup>, 木霉可通过拮抗、重寄生、分泌抗生素等多种机制控制病原菌的侵染和病害的发生<sup>[12]</sup>。目前商业化的木霉属菌株多为哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、深绿木霉 (*Trichoderma atroviride*)<sup>[13-16]</sup>, 制剂类型多为可湿性粉剂<sup>[17]</sup>、颗粒剂、微胶囊剂<sup>[18]</sup>、油悬浮剂<sup>[19]</sup>。这些制剂成功应用于植物病害的防治, 并取得了良好防治效果。但木霉单独作为控制因子防治农林植物病害时, 易受自然环境因素干扰, 造成田间防治效果不理想、不稳定<sup>[5,20-21]</sup>。为了解决木霉菌在实际生产应用中所面临的问题, 研究者采用化学农药与生防菌剂复合使用<sup>[22-23]</sup>, 虽在一定程度上减少了化学农药的使用量, 缓解植物病原菌耐药性的形成, 但化学农药本身对木霉有一定的抑制作用。张艳丽<sup>[24]</sup> 研究发现 13 种常见杀菌剂中, 仅有 2 种与棘孢木霉 Thz01 和深绿木霉 TZ1105 联用产生增效作用, 这表明木霉菌和化学农药混用不仅存在一定的局限性, 而且也未改善化学农药残留、污染、病原菌抗药性等问题<sup>[25]</sup>。国外报道将木霉与其他生防菌混配制剂用以防治甜菜和园艺作物的真菌病害, 取得了明显的增产效果。Monte 等<sup>[25]</sup> 成功将绿色木霉和哈茨木霉混合开发出生防制剂 TUSAL。Krauss 等<sup>[26]</sup> 将木霉和粉红粘帚菌 (*Clonostachys rosea*) 混配成功防治可可荚腐病 (*Theobroma cacao*), 混配生物制剂不仅扩大了宿主范围, 而且还提高了对环境的适应能力。

目前, 国内外在生物农药防治植物病害方面做了大量的研究, 但与化学农药相比, 仍然存在生物农药的速效性低、杀菌谱窄等问题<sup>[27]</sup>。本文以棘孢木

霉发酵液冻干粉和孢子粉为材料进行可湿性粉剂研制, 旨在克服单一菌体制剂生防潜力易受环境 (温度、湿度、pH 值) 影响、速效性差<sup>[24]</sup>、药效不稳定等缺陷, 在延缓农用抗生素耐药性的同时, 有利于棘孢木霉在植物根叶周围定殖、分泌抗生素、诱导植物产生抗病性。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

菌株: 棘孢木霉分生孢子粉 (*T. asperellum*, 质量分生孢子粉  $7 \times 10^9$  个/g; 含水量 2.73%, 萌发率为 95.41%)。

植物病原菌: 油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)。

载体: 凹凸棒土、高岭土、硅藻土、膨润土、白炭黑 (江苏省盱眙华丰油田钻井液用材料厂提供)。

润湿分散剂: Morwet D425、Morwet EFW (阿克苏·诺贝尔公司); 拉开粉、MF-5、SDS、TERWET 1010、WLNO、木质素磺酸钠、木质素磺酸钙、TERSERSE 2020 (亨斯迈公司); NNO (由南开大学国家农药工程中心提供)。

紫外保护剂: 糊精、黄原胶、荧光素钠、VC、纳米氧化锌 (河北博奥纳米材料有限公司)。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 生物相容性测定

木霉分生孢子萌发测定<sup>[28-30]</sup>: 将供试载体 (1 000 mg/mL)、润湿分散剂 (润湿剂 120  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、分散剂 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 分别加入到融化的 PDA 中, 灭菌制成平板。取 0.05 mL 的孢子悬浮液 ( $10^4$  个孢子/mL) 均匀涂布于混合培养基平板上, 以 PDA 作为对照, 每个处理 3 个重复, 放置于 ( $28 \pm 1$ )  $^{\circ}\text{C}$  黑暗培养, 于 48 h 计算木霉菌落数。

木霉菌丝生长速率测定: 在上述混合培养基中, 用打孔器 ( $d = 4$  mm) 取生长旺盛、菌龄相同的木霉菌丝块, 接种于混合培养基的平板中心, 以 PDA 培

培养基平板作为对照,每个处理3个重复,间隔6 h测1次菌落直径。菌落直径日增长量(mm/d) = (最后菌落直径 - 最初菌落直径)/菌落生长天数。

### 1.2.2 助剂筛选

**载体筛选:**考虑各种载体与棘孢木霉生物相容性的同时,兼顾载体本身的吸附量、流动性、经济性等角度综合考虑。以润湿分散剂对棘孢木霉分生孢子的生物相容性试验为依据(发酵液冻干粉为水溶性物质,对制剂性能无影响)进行初筛,然后通过其对制剂性能的影响进行复筛<sup>[30]</sup>。以润湿时间 < 1 min 的润湿剂、质量悬浮率和孢子悬浮率较高的分散剂作为所选润湿分散剂。以所选润湿分散剂种类和比例进行正交试验设计<sup>[31]</sup>,然后分别加入质量分数为20%棘孢木霉孢子粉、5%润湿剂、10%分散剂和65%载体,经万能粉碎机粉碎制成可湿性粉剂,测定润湿时间和悬浮率,最终确定二者的最佳配比比例。

**紫外保护剂筛选:**将供试紫外保护剂添加到棘孢木霉孢子悬浮液中,以不加紫外保护剂、不经紫外灯照射的为对照1,以不加紫外保护剂、经紫外灯照射的为对照2,100 μL 10<sup>3</sup>个/mL棘孢木霉孢子涂布到PDA平板上,每个处理重复3次,用紫外灯(30 W,光强120 lx)照射2 min后置于(28 ± 1) °C培养箱中黑暗培养48 h计算菌落数。

### 1.3 剂型的制备

采用木霉分生孢子粉和发酵液冻干粉以1:3、1:1和3:1进行复配,分别记作I、II、III。将经试验筛选的各种助剂分别过325目标准筛,按比例加入到载体中搅拌均匀,然后将干燥过的孢子粉和发酵液冻干粉加到混合物中混合均匀即制得可湿性粉剂。分别将木霉分生孢子粉和发酵液冻干粉加入相同助剂制成各自单剂。

### 1.4 产品性能测定

**孢子萌发率测定:**将混配制剂的孢子悬浮液接

种到PD营养液中,于(28 ± 1) °C和180 r/min转速下培养16 h后,显微镜检统计活孢子数,计算活孢子率;润湿时间按GB/T 5451—2001<sup>[32]</sup>测定(≤1 min);悬浮率按GB/T 14825—2006<sup>[33]</sup>测定(≥75%);pH值按GB/T 1600—1993<sup>[34]</sup>测定,细度通过激光粒径分布仪(BT-9300H,辽宁丹东百斯特)测定。

### 1.5 药效试验

**离体试验<sup>[35]</sup>:**将木霉可湿性粉剂(或混配菌粉制剂)分别稀释成相应倍数悬浮液,分别吸取各悬浮液1 mL注入灭菌培养皿中,再加入9 mL冷却至45 °C左右的PDA培养基,轻轻摇动使之混匀制成平板,然后分别挑取病原菌菌块移植到平板中央,每处理重复3次,以无菌水代替菌株孢子悬浮液(或菌粉悬浮液)作为对照,经恒温培养3 d后,测量病原菌菌落直径,计算各处理抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{空白对照直径} - \text{处理直径}}{\text{空白对照直径} - 4} \times 100\%$$

式中:4为接入菌饼的直径(mm)。

### 1.6 数据统计分析

试验数据采用SPSS 17.0统计软件进行方差分析。采用Duncan's新复极差法比较处理间的差异显著性( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 载体的筛选

表1显示5种载体对棘孢木霉活力的影响。除硅藻土对分生孢子萌发与对照差异不显著外,其余4种载体与对照差异显著( $P < 0.05$ )。对菌丝生长影响显示,白炭黑促进菌丝生长,与对照差异显著( $P < 0.05$ );硅藻土、膨润土与对照差异不显著( $P > 0.05$ );因分生孢子作为其主要的侵染体,应主要从孢子萌发的角度来考虑载体,可供选择作为木霉可湿性粉剂载体的为硅藻土。

表1 载体对棘孢木霉孢子萌发和生长速率的影响

Tab. 1 Effects of carriers on conidial germination and growth rate of *T. asperellum*

载体 Carrier	使用浓度 Concentration/ (mg·mL <sup>-1</sup> )	菌落数 Colony individual per petri dish	菌落直径日增长量 Daily increase of colony diameter/mm
凹凸棒土 Attapulgitic clay	1 000	41 c	20.08 cd
白炭黑 Fumed silica	1 000	43 c	24.25 a
高岭土 Kaoline	1 000	38 c	18.92 d
硅藻土 Celatom	1 000	54 ab	21.33 bc
膨润土 Bentonite	1 000	51 b	21.75 b
对照 Control	1 000	58 a	22.50 b

注:表中大小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著,下同。Notes: Small letters after data mean significant difference at  $P < 0.05$  level, and the same as below.

## 2.2 润湿剂和分散剂的筛选

通过测定6种润湿剂(TERWET 1010、WLNO、Morwet EFW、SDS、MF-5、拉开粉)和5种分散剂(TERSPERSE 2020、NNO、木质素磺酸钠、Morwet D425、木质素磺酸钙)对木霉菌分生孢子萌发的影响,筛选出润湿剂(Morwet EFW、TERWET 1010)和分散剂(木质素磺酸钙、Morwet D425、TERSPERSE 2020、木质素磺酸钠),进行最佳含量配比分析。为进一步确定初选的润湿分散剂种类,将所选润湿剂、分散剂分别按照5%、10%的比例加入木霉分生孢子粉中,载体补足至100%后加工成可湿性粉剂,并

测其润湿时间和悬浮率,研究结果表明,润湿剂(Morwet EFW、TERWET 1010)和分散剂(木质素磺酸钙、Morwet D425)进行混配时,棘孢木霉菌分生孢子粉可湿性粉剂的润湿时间 $< 10$  s,且质量悬浮率高,悬浮状况优良,将4种润湿分散剂作为正交因素,进行如下的复筛(表2)。4种助剂分别按常用质量分数用量设计3个水平(表3)。通过正交实验设计所得试验结果如表4和5。木霉可湿性粉剂的较优配方为 $A_1B_2C_2D_3$ ,即Morwet EFW 1%、TERWET 1010 5%、Morwet D425 5%、木质素磺酸钙 7%,方差分析结果确定影响因素依次为 $D > B > C > A$ 。

表2 不同润湿剂和分散剂配制的可湿性粉剂润湿时间和悬浮率

Tab.2 Effects of different wettable agent and dispersing agent on wetting time and suspension percentage of wettable powder

可润湿性粉剂 Wettable powder	分散剂 Dispersant	使用量 Amount/%	润湿时间 Wetting time/s	悬浮状况 Suspension status	质量悬浮率 Suspension percentage/%
TERWET 1010	Morwet D425	10	6	优 Excellent	65.36b
	TERSPERSE 2020	10	9	良 Good	58.99c
	木质素磺酸钠 Sodium lignosulfonate	10	12	差 Bad	50.51e
	木质素磺酸钙 Calcium lignosulfonate	10	6	良 Good	69.88a
Morwet EFW	Morwet D425	10	5	优 Excellent	69.53a
	TERSPERSE 2020	10	6	良 Good	51.48e
	木质素磺酸钠 Sodium lignosulfonate	10	7	良 Good	55.21d
	木质素磺酸钙 Calcium lignosulfonate	10	5	优 Excellent	66.61b

注:优为水中呈云雾状自动分散,无可见颗粒下沉;良为水中自动分散,有颗粒下沉,下沉颗粒可慢慢分散或轻摇后分散;差为水中不能自动分散,呈颗粒状下沉或絮状下沉,经剧烈摇动后才能分散<sup>[36]</sup>。Notes:“Excellent” refers to automatically and cloudily dispersed in the water without obvious particles precipitated; “Good” refers to automatically dispersed in the water with some particles precipitated, and precipitated particles can be dispersed slowly after light shaking; “Bad” refers to not automatically dispersed in the water, precipitated in particles or floccus, and dispersed after intensive shaking<sup>[36]</sup>.

表3 润湿剂和分散剂筛选的因素和水平

Tab.3 Factors and levels of different wetting agent and dispersant

水平 Level	因素 Factor			
	Morwet EFW (A)	TERWET1010 (B)	Morwet D425 (C)	木质素磺酸钙 Calcium lignosulfonate(D)
1	1%	3%	3%	3%
2	3%	5%	5%	5%
3	5%	8%	7%	7%

注:数据为4个因素的质量分数。Note: Data is the mass fraction of 4 factors.

## 2.3 紫外保护剂的筛选

选择4种紫外保护剂对木霉分生孢子萌发影响的结果表明,除荧光素钠对木霉分生孢子的保护作用不显著外,VC、黄原胶和纳米氧化锌与不添加紫外保护剂、不经紫外照射对照1相比,显著抑制分生孢子萌发;与不添加紫外保护剂、经紫外照射对照2相比,显著促进分生孢子萌发。纳米氧化锌对分生孢子保护作用的效果最佳,其次为VC、黄原胶(表6)。因此选择纳米氧化锌作为木霉可湿性粉剂的

紫外保护剂。与对照1相比,不同浓度纳米氧化锌均显著抑制木霉分生孢子萌发,其中0.3%纳米氧化锌抑制作用最小;与对照2相比,保护作用最大,从经济和保护效果角度,最佳选择浓度为0.3%(表7)。

## 2.4 产品性能检测

根据上述研究结果,对配制的木霉制剂进行了各项指标的测定。木霉分生孢子的萌发率 $\geq 88.57\%$ (室温 $10 \sim 30$  °C,贮存时间180 d);润湿时

表4 润湿剂和分散剂正交试验结果

Tab.4 Results of orthogonal projects for wetting agent and dispersant

试验编号 Experiment number	因素 Factor				悬浮率 Suspension percentage/%
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	47.27
2	1	2	2	2	62.82
3	1	3	3	3	69.84
4	2	1	2	3	71.04
5	2	2	3	1	47.93
6	2	3	1	2	44.91
7	3	1	3	2	45.27
8	3	2	1	3	74.35
9	3	3	2	1	50.45
$k_1$	59.97	54.53	55.51	48.55	
$k_2$	54.63	61.70	61.44	51.00	
$k_3$	56.69	55.07	54.35	71.75	
极差 Range(R)	5.34	7.17	7.09	23.20	

表5 方差分析

Tab.5 Variance analysis

来源 Source	SS	dF	MS	F	P
A	43.60	2	21.80		
B	95.76	2	47.88	2.20	
C	86.66	2	43.33	1.99	
D	974.52	2	487.26	22.35	<0.05

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

表6 紫外保护剂对棘孢木霉孢子萌发的影响

Tab.6 Effects of different UV protectants on conidial germination of *T. asperellum*

保护剂 Protectant	菌落数 Colony individual per petri dish
VC	125 ± 7.00 b
黄原胶 Xanthan	119 ± 4.04 b
纳米氧化锌 Nano zinc oxide	126 ± 8.89 b
荧光素钠 Obiturin	88 ± 9.00 c
对照1 Control 1	144 ± 8.62 a
对照2 Control 2	79 ± 5.51 c

注: 使用浓度为 0.2%。Note: Concentration is 0.2%.

间为 6 s; 质量悬浮率 81.79%; 孢子悬浮率 80.12%; 水分 3.52%; 细度(过 325 目标筛, 平均粒度为 27.00 μm) ≥ 98%; pH 值为 6.7。所配制可湿性粉剂的性能指标符合商品制剂要求。

2.5 药效试验

选择油菜菌核病菌 (*S. sclerotiorum*) 对混配制剂防治效果进行测定(表 8)。结果显示, 孢子粉和

表7 不同质量分数的纳米氧化锌对棘孢木霉分生孢子的保护作用

Tab.7 Protective effects of different concentration nano zinc oxide on conidia of *T. asperellum*

保护剂 Protectant	使用浓度 Concentration/%	菌落数 Colony individual per petri dish
纳米氧化锌 Nano zinc oxide	0.1	105.67 ± 5.51bc
	0.3	114.67 ± 5.51 b
	0.6	110 ± 7.21 b
	0.9	96.33 ± 7.02 c
对照1 Control 1		126.67 ± 8.02 a
对照2 Control 2		75 ± 6.56 d

发酵液粉混配后有明显的增效作用, 其抑制效果依次为: 混配制剂 II (88.67%) > 混配制剂 I (83.33%) > 混配制剂 III (82.92%), 同时各混配制剂的防治效果均显著优于各自单剂。混配制剂 I 对油菜菌核病菌的抑菌率在 62.50% ~ 83.33%, 且处理浓度间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 发酵液粉单剂的抑制率显著高于孢子粉单剂; 混配制剂 II 抑菌率最高, 除 400、800 倍液外, 其余各处理组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 发酵液粉单剂的效果好于孢子粉单剂; 在混配制剂 III 中, 孢子粉单剂防效优于发酵液粉单剂, 同浓度较发酵液粉单剂高 22.83% ~ 33.33%, 且 2 单剂间差异性显著 ( $P < 0.05$ )。

3 结论与讨论

目前, 有关化学农药与木霉混用防治病害已有报道, 李敏等<sup>[37]</sup>报道了哈茨木霉与多菌灵复合防治水稻苗期立枯病菌 (*Fusarium oxysporum*) 的效果达 82.25%, 单剂效果仅为 37.79% 和 70.59%; 田连生等<sup>[38]</sup>将木霉与速克灵以 8:2 混配防治草莓灰霉病 (*Botrytis cinerea*), 防治效果达 81.00%, 均高于单独使用的木霉剂和速克灵; 牛芳胜等<sup>[39]</sup>将哈茨木霉 T-S-2 菌株与 5 种杀菌剂(啮酰菌胺、嘧菌酯、咯菌腈、氟啶胺和啮菌噁唑) 混配联合防治灰霉病 (*Botrytis cinerea*) 时有显著的增效作用。尽管木霉菌与农药混用既提高了木霉的防效、稳定了药效, 又减少了化学药剂的使用量, 但仍无法避免农药的“3R”问题。

棘孢木霉分生孢子发酵液冻干粉属农用抗生素类, 并非单一物质, 是复杂成分的混合物, 易被土壤微生物分解而不污染环境, 对人畜安全, 选择性高, 符合现代农业对农作物病、虫、草害防治的技术要求, 尤其是在发展无公害果蔬、绿色食品中, 农用抗生素更是作为首选的安全药剂, 且发酵液冻干粉属木霉自身的次级代谢产物, 与化学农药相比不存在对菌体自身生长抑制的问题。本文根据棘孢木霉分

表8 棘孢木霉分生孢子粉和发酵液冻干粉可湿性粉剂对油菜菌核病菌的抑制率

Tab. 8 Inhibition percentage of wettable powder formulation from conidial germination and freeze-dried fermentation broth powder of *T. asperellum* to *S. sclerotiorum*

稀释倍数 Dilution multiple	药剂 Chemical								
	混配制剂 I Mixed formulation I	I-1	I-2	混配制剂 II Mixed formulation II	II-1	II-2	混配制剂 III Mixed formulation III	III-1	III-2
3 200	62.50 ± 4.51e	42.50 ± 4.39d	58.33 ± 2.60c*	64.17 ± 1.25d	47.50 ± 3.82d	57.50 ± 3.82d*	61.67 ± 1.91c	49.58 ± 1.71d*	25.42 ± 5.91e
1 600	70.00 ± 2.5d	51.67 ± 2.60c	64.50 ± 3.82b*	74.17 ± 2.60c	52.50 ± 2.17c	62.08 ± 1.91cd*	69.58 ± 7.20b	60.67 ± 2.60c*	28.08 ± 0.72de
800	75.00 ± 4.51c	59.17 ± 4.33b	66.58 ± 2.60b*	79.50 ± 3.82b	63.75 ± 4.39b	64.58 ± 1.25c	72.92 ± 0.72b	65.83 ± 1.44b*	32.50 ± 2.17c
400	80.83 ± 1.91b	61.67 ± 1.44ab	74.25 ± 1.25a*	81.75 ± 0.00b	70.83 ± 0.66a	72.08 ± 1.91b	81.25 ± 1.44a	67.42 ± 0.72b*	40.08 ± 1.91b
200	83.33 ± 1.91a	65.25 ± 3.75a	79.58 ± 0.72a*	88.67 ± 1.44a	73.83 ± 2.60a	77.50 ± 3.82a*	82.92 ± 1.25a	74.08 ± 0.72a*	51.25 ± 1.25a

注: I-1、II-1、III-1 为棘孢木霉分生孢子粉单剂; I-2、II-2、III-2 为棘孢木霉发酵液冻干粉单剂; \* 表示棘孢木霉发酵液粉与孢子粉单剂组间差异显著。

Notes: I-1, II-1 and III-1 refer to single conidia of *T. asperellum*; I-2, II-2, III-2 refer to single freeze-dried fermentation broth powder of *T. asperellum*;

\* indicates the significant difference of groups between single conidia and single freeze-dried fermentation broth powder of *T. asperellum*.

生孢子粉和发酵液冻干粉的杀菌机制不同而进行混配。结果表明,混配剂不仅缩短了润湿时间、提高了质量悬浮率<sup>[40]</sup>,而且对油菜菌核病菌防治效果高于2种单剂。可湿性粉剂中棘孢木霉孢子粉和发酵液冻干粉质量比为1:1,润湿分散剂为1% Morwet EFW、5% TERWET 1010、5% Morwet D425、7% 木质素磺酸钙;紫外保护剂为0.3% 纳米氧化锌,载体膨润土补足100%。该制剂的润湿时间为6 s,质量悬浮率为81.79%,孢子悬浮率为80.12%。对油菜菌核病菌的抑制率为64.17%~88.67%,3种混配剂400倍稀释液的抑菌率比相应单剂高6.58%~41.17%,混配剂均有一定的增效作用。采用分生孢子和发酵液冻干粉混配的方式,达到优势互补、协同增效的目的。真菌的分生孢子萌发和侵染受外界环境因素的影响较大,对病害的控制速效性差,但由于在自然界进行大量增殖因而对病害起到长期控制的作用。而以棘孢木霉次级代谢产物为主要成分的发酵液冻干粉对病原菌有抑制作用迅速的特点,但长期使用也会造成病原菌的抗药性<sup>[41]</sup>,混配后不仅可使两者对病害的迅速抑制和持续控制特性有机结合,提高防治效果和延缓病原的抗药性,还可减少施药次数、降低成本和保护生态环境。而有关两者的增效机理可能是棘孢木霉次级代谢产物中存在水解病原菌细胞壁的酶类(如:几丁质酶、外切 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶等<sup>[42-43]</sup>)或者抗生素类物质(如6-戊基- $\alpha$ 吡喃酮类)<sup>[43]</sup>,这些均能抑制病原菌的生长,弱化生存能力,进而有利于木霉的定殖和繁殖,加快了对病原菌的抑制速率<sup>[44]</sup>。但有关棘孢木霉发酵液中的抑菌成分和杀菌机制有待进一步深入、系统研究。

## 参 考 文 献

- [1] 朱兆香,庄文颖. 木霉属研究概况[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1136-1153.  
ZHU Z X, ZHUANG W Y. Current understanding of the genus *Trichoderma* (Hypocreales, Ascomycota) [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(6): 1136-1153.
- [2] 张广志,杨合同,张新建,等. 木霉现有种类名录[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1210-1230.  
ZHANG G Z, YANG H T, ZHANG X J, et al. A checklist of known species of *Trichoderma* [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(6): 1210-1230.
- [3] WEINDLING R. *Trichoderma Ignorum* as a parasite of other soil fungi[J]. *Phytopathology*, 1932, 22: 837-845.
- [4] HOWELL C R. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts[J]. *Plant Disease*, 2003, 87(1): 4-10.
- [5] HARMAN G E, HOWELL C R, VITERBO A, et al. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(1): 43-56.
- [6] 张广志,杨合同,张新建,等. 毒死蜱降解木霉菌对几种重要植物病原真菌的生防活性[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1292-1301.  
ZHANG G Z, YANG H T, ZHANG X J, et al. The biocontrol test of chlorpyrifos-degrading *Trichoderma* strains on soil born pathogenic fungi [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(6): 1292-1301.
- [7] 曲远航,王琦,姚彦坡,等. 马铃薯晚疫病生防木霉菌的筛选及鉴定[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1231-1241.  
QU Y H, WANG Q, YAO Y B, et al. Antagonistic *Trichoderma* isolates against potato late blight caused by *Phytophthora infestans* [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(6): 1231-1241.
- [8] 陈捷,窦恺,高永东,等. 木霉菌在玉米病害生物防治中的作用机制及应用[J]. 菌物学报, 2014, 33(6): 1154-1167.

- CHEN J, DOU K, GAO Y D, et al. Mechanism and application of *Trichoderma* spp. in biological control of corn diseases [J]. *Mycosystema*, 2014, 33(6): 1154–1167.
- [9] SAMUELS G J, DODD S L, LU B S, et al. The *Trichoderma koningii* aggregate species [J]. *Studies in Mycology*, 2006, 56: 67–133.
- [10] HARMAN G E. Myth and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22 [J]. *Plant Disease*, 2000, 84(4): 377–393.
- [11] 陈云芳, 高渊. 木霉在植物病害生物防治中的应用 [J]. *江苏农业科学*, 2008(5): 123–125.
- CHEN Y F, GAO Y. The application of *Trichoderma* spp. in biological control of plant diseases [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2008(5): 123–125.
- [12] PONMURUGAN P, BABY U I. Evaluation of fungicides and biocontrol agents against *Phomopsis canker* of tea under field condition [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2007, 36(1): 68–72.
- [13] ALMEIDA F B, CERQUEIRA F M, SILVA RDO N, et al. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(8): 1189–1193.
- [14] BENITEZ T, RINCON A M, LIMON M C, et al. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains [J]. *International Microbiology*, 2004, 7(4): 249–260.
- [15] HERMOSA R, RUBIO M B, CARDOZA R E, et al. The contribution of *Trichoderma* to balancing the costs of plant growth and defense [J]. *International Microbiology*, 2013, 16(2): 69–80.
- [16] KAEWCHAI S, SOYTONG K, HYDE K D. Mycofungicides and fungal biofertilizers [J]. *Fungal Diversity*, 2009, 38(11): 25–50.
- [17] SANTIAGO DE A, GARCIA-LOPEZ A M, QUINTERO J M, et al. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils [J]. *Soil Biology and Biochemistry*. 2013, 57: 598–605.
- [18] ADZMI F, MEON S, MUSA M H, et al. Preparation, characterization and viability of encapsulated *Trichoderma harzianum* UPM40 in alginate-montmorillonite clay [J]. *Journal of Microencapsulation*, 2012, 29(3): 205–210.
- [19] MBARGA J B, BEGOUDE B A D, AMBANG Z, et al. A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya* [J]. *Biological Control*, 2014, 77: 15–22.
- [20] ZIMAND G, ELAD Y, CHET I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity [J]. *Phytopathology*, 1996, 86(5): 945–956.
- [21] KREDICS L, ANTAL Z, MANCZINGER L, et al. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2003, 41(1): 37–42.
- [22] BILJANA G, JUGOSLAV Z. The influence of *Trichoderma harzianum* on reducing root rot disease in tobacco seedlings caused by *Rhizoctonia solani* [J]. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 2011, 2(2): 1–11.
- [23] SADYKOVA V S, GROMOVYKH T I. Resistance of barley root rot pathogens to chemical and biological fungicides [J]. *Russian Agricultural Sciences*, 2011, 37(2): 126–129.
- [24] 张艳丽. 木霉制剂和杀菌剂协同控制辣椒疫病的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 20–25.
- ZHANG Y L. Control of pepper blight using combination of *Trichoderma* spp. and fungicides [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013: 20–25.
- [25] MONTE E, RODRIGUEZ A, REY M, et al. Applications of *Trichoderma* formulations in crop protection [J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science*, 2004, 37(4): 410.
- [26] KRAUSS U, HOOPEN M, REES R, et al. Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents [J]. *Biological Control*, 2013, 67(3): 317–327.
- [27] 周睿霞, 董开军. 谈农药污染与环境保护 [J]. *新疆环境保护*, 1999(1): 31–32.
- ZHOU R X, DONG K J. Expounding on pesticide pollution and environmental protection [J]. *Environmental Protection of Xinjiang*, 1999(1): 31–32.
- [28] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1977: 173–175.
- FANG Z D. Study method of plant pathology [M]. Beijing: Agricultural Press, 1977: 173–175.
- [29] 张敏, 彭化贤, 邓新平, 等. 5亿活孢子/克木霉可湿性粉剂的研制 [J]. *西南农业学报*, 2008, 21(3): 675–679.
- ZHANG M, PENG H X, DENG X P, et al. Research on the wettable powder of *Trichoderma* spp. with each gram 500 million living conidia [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2008, 21(3): 675–679.
- [30] 王志英, 孙丽丽, 张健, 等. 苏云金杆菌和白僵菌可湿性粉剂研制及杀虫毒力测定 [J]. *北京林业大学学报*, 2014, 36(3): 34–40.
- WANG Z Y, SUN L L, ZHANG J, et al. Preparation and insecticidal efficacy of wettable powder formulations of *Bacillus thuringiensis* and *Beauveria bassiana* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2014, 36(3): 34–40.
- [31] 盖钧镒. 试验统计方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 294–295.
- GAI J Y. Experimental statistical methods [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2005: 294–295.
- [32] GB/T 5451—2001 农药可湿性粉剂润湿性测定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- GB/T 5451—2001 Method for determination of wettability of pesticide wettable powder formulation [S]. Beijing: China Standard Press, 2001.
- [33] GB/T 14825—2006 农药悬浮率测定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- GB/T 14825—2006 Method for determination of suspension percentage of pesticide [S]. Beijing: China Standard Press, 2006.
- [34] GB/T 1600—3 pH 值测定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社,

1993.  
GB/T1600—3 Method for determination of pH value [S]. Beijing: China Standard Press, 1993.
- [35] GB/T 17980.35—2000 农药田间药效试验准则(一):杀菌剂防治油菜菌核病[S]. 北京:中国标准出版社, 2000.  
GB/T 17980.35—2000 Guidelines for the field efficacy trials of pesticide (I): fungicides against *Sclerotinia* stem rot of rape [S]. Beijing: China Standard Press, 2000.
- [36] 张建荣. 扑草净悬浮剂专用助剂的研究和应用[J]. 现代农药, 2003(4): 24-26.  
ZHANG J R. Study and application of special adjuncts of prometryn [J]. Modern Agrochemicals, 2003(4): 24-26.
- [37] 李敏, 杨谦, 王疏, 等. 哈茨木霉与多菌灵复合使用对水稻苗期立枯病的防治[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2009, 35(1): 65-70.  
LI M, YANG Q, WANG S, et al. *Trichoderma harzianum* combination with carbendazim for integrated control of rice seedling blight [J]. Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Science, 2009, 35(1): 65-70.
- [38] 田连生, 冯树波. 耐药性木霉株的筛选及其对灰霉病的防治[J]. 生物技术, 2005, 15(5): 26-28.  
TIAN L S, FENG S B. Screen on endurance strains of *Trichoderma* and control of *Botrytis cinerea* [J]. Biotechnology, 2005, 15(5): 26-28.
- [39] 牛芳胜, 马志强, 毕秋艳, 等. 哈茨木霉菌与5种杀菌剂对番茄灰霉病菌的协同作用[J]. 农药学学报, 2013, 15(2): 165-170.  
NIU F S, MA Z Q, BI Q Y, et al. Synergism of *Trichoderma harzianum* and five fungicides to *Botrytis cinerea* [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2013, 15(2): 165-170.
- [40] 曹传旺, 王超, 高彩球, 等. 棘孢木霉可湿性粉剂及其应用: 中国, 201210492682.3[P]. 2013-02-13.  
CAO C W, WANG C, GAO C Q, et al. Preparation and application of wettable powder formulations of *Trichoderma asperellum*: China, 201210492682.3[P]. 2013-02-13.
- [41] 陈小龙, 方夏, 沈寅初. 纹枯病菌对井冈霉素的作用机制、抗药性及安全性[J]. 农药, 2010, 49(7): 482-483.  
CHEN X L, FANG X, SHEN Y C. Mechanism, resistance and security of Jingtangmycin against *Rhizoctonia solani* [J]. Agrochemicals, 2010, 49(7): 482-483.
- [42] KUMAR D P, RAJESH K S, ANUPAMA P D, et al. Studies on exo-chitinase production from *Trichoderma asperellum* UTP-16 and its characterization [J]. Indian Journal of Microbiology, 2012, 52(3): 388-395.
- [43] 杨萍, 杨谦, 许倩. 棘孢木霉生物防治相关代谢产物研究[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版, 2014, 30(1): 37-40.  
YANG P, YANG Q, XU Q. Study on metabolites related to biocontrol from *Trichoderma asperellum* [J]. Journal of Harbin University of Commerce: Natural Sciences Edition, 2014, 30(1): 37-40.
- [44] KATAN J, GINZBURG C, ASSARAF M. Advances in biological control of plant diseases [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 1996: 320-326.

(责任编辑 李 契

责任编辑委 唐 明 戴玉成)