

田连生,陈 菲. 木霉菌可湿性粉剂药效的提高技术[J]. 江苏农业科学,2017,45(10):97-99.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.027

木霉菌可湿性粉剂药效的提高技术

田连生,陈 菲

(扬州工业职业技术学院/江苏省环境生物工程技术研究开发中心,江苏扬州 225127)

摘要:为提高木霉菌可湿性粉剂防效和药效速度,对影响木霉分生孢子萌发的不同因子进行研究。结果表明,蛋白胨、酵母粉和乳糖、蔗糖等对木霉孢子萌发均有显著的促进作用,温度 25~30℃、pH 值 4~6 和饱和湿度环境是孢子萌发的适宜条件。木霉孢子在水中萌发率很低,光照对孢子萌发无显著影响;孢子萌发率和萌发速率是影响木霉可湿性粉剂生防效果和药效速度的主要原因。室内离体防效试验结果也证明,添加 0.4% 蛋白胨和乳糖,调节 pH 值至 5,3 d 时对黄瓜灰霉病防效可达 85.6%,而未作处理的药液 7 d 防效才达 84.2%。本研究结果也对该产品的生产和田间应用提出了改进建议。

关键词:木霉菌;分生孢子;萌发条件;萌发率;可湿性粉剂;影响因子;生防效果;室内离体防效

中图分类号:S476 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)10-0097-03

生物农药特别是活体生物农药对农作物病害的防治作用,除与其代谢产物有关外,还与活体微生物的生物学特性有更加密切的关系。一般生物农药具有药效缓慢、易受环境因素制约、防效不稳定等缺点,这些都不利于活体微生物农药的使用和推广。木霉菌(*Trichoderma* spp.)由于具有多重的生防机制和良好的防治效果越来越受到人们的重视。目前,已有商业化产品——木霉菌可湿性粉剂出售。木霉分生孢子为木霉可湿性粉剂的有效成分,其孢子生物学特性及孢子萌发条件是影响木霉菌发挥其生防作用的首要条件。因为木霉菌对植物病原菌的生防机制主要是竞争、重寄生和抗生素作用^[1-5]。而前 2 个影响因子均与木霉分生孢子萌发有着密切关系。因此,研究木霉分生孢子萌发相关影响因子^[6-8],提高其孢子萌发率和萌发速度,就可提高木霉菌可湿性粉剂的防治效果和药效速度。本研究结果无论是对厂家生产产品,还是农民在田间应用该生物农药防治农作物病害均具有重要的指导意义。

收稿日期:2015-12-29

基金项目:江苏省高等学校大学生实践创新项目(编号:2012JSSPITP4029)。

作者简介:田连生(1962—),男,河北保定人,教授,从事生物农药及生物降解研究。Tel:(0514)85433018;E-mail:lianshengt@163.com。

1 材料与方法

1.1 供试材料

木霉菌可湿性粉剂(2 亿个/g),山东泰诺药业有限公司;50% 多菌灵可湿性粉剂,日本住友化学株式会社;灰葡萄孢菌(*Botrytis cinera*),由笔者所在实验室从感染灰霉病的黄瓜上分离、纯化得到。

1.2 不同氮源对孢子萌发的影响

将一定量的木霉菌可湿性粉剂加入 0.4% 蛋白胨、酵母浸出粉、牛肉浸膏等有机氮源溶液中,制成 100 万个/mL 孢子悬浮液;以同样方法配制 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 等无机氮源的孢子悬浮液。分别取上述悬浮液 0.05 mL 滴于载玻片上,置于 28℃ 恒温箱中保湿培养 12、24 h,观察分生孢子萌发情况,每处理重复 3 次,计算孢子萌发率,同时用无菌水制成相同浓度的孢子悬浮液作空白对照。孢子萌发率 = 萌发孢子平均数 / (萌发孢子平均数 + 未萌发孢子平均数) × 100%。

1.3 不同碳源对孢子萌发的影响

将木霉可湿性粉剂分别用 0.4% 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和可溶性淀粉溶液稀释成 100 万个/mL 孢子悬浮液。按“1.2”节方法进行处理,计算孢子萌发率。

1.4 温度对孢子萌发的影响

取一定量木霉可湿性粉剂,分别用 0.4% 蛋白胨溶液和

[5] 邹凤莲,汪志平,卢 钢. 番红花链格孢菌的分离及其生物学特性研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2006,32(2):162-167.

[6] 周舒扬,汪春蕾,乔志新,等. 玉米链格孢叶枯病原菌的分子鉴定[J]. 中国农学通报,2010,26(11):261-263.

[7] 严 进,施宗伟,宋 福,等. 河北和山东鸭梨果实上链格孢菌鉴定[J]. 植物保护学报,2009,36(1):37-43.

[8] 崔进龙,郭吉刚,范 黎. 远志内生真菌分离鉴定及活性筛选[J]. 微生物通报,2007,34(5):839-842.

[9] 周维凡,黄 伟,谢 津,等. 链格孢菌抗植物病原真菌活性筛选[J]. 生物灾害科学,2013,36(3):265-268.

[10] 付娟妮,刘兴华,蔡福带. 石榴采后腐烂病原菌的分子鉴定

[J]. 园艺学报,2005,22(5):483-487.

[11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[12] 周银丽,白建波,胡先奇,等. 芒果叶斑病原菌的鉴定及其生物学特性[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):108-109.

[13] 罗志文,李向宏. 一种菠萝果病病原初步鉴定及生物学特性研究[J]. 西南农业学报,2014,27(3):1124-1129.

[14] Winton P W, Bates D H. Saturated solutions for the control of humidity in biological research[J]. Ecology,1960,41(1):232-237.

[15] Di P P, Cappelli C, Katan T. Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* from saffron [J]. European Journal of Plant Pathology,2002,108(9):869-875.

无菌水稀释为含孢子浓度 100 万个/mL 的悬浮液,各取 0.05 mL 滴于萌发载玻片上,分别置于 10、20、25、28、30、40 ℃ 不同温度培养箱中培养 24 h,镜检孢子萌发情况,每处理重复 3 次,计算孢子萌发率。

1.5 相对湿度对孢子萌发的影响

将木霉可湿性粉剂用 0.4% 蛋白胨溶液配制成为孢子浓度为 100 万个/mL 悬浮液,取 0.05 mL 滴于载玻片上快速风干,置于人工气候箱中,分别在 80%、90%、95%、100% 相对湿度下作孢子萌发试验,每处理重复 3 次,培养 24 h 后镜检孢子萌发情况,计算孢子萌发率。

1.6 pH 值对孢子萌发的影响

取木霉菌可湿性粉剂,用 0.4% 蛋白胨溶液稀释为 100 万个/mL 悬浮液,用 0.1 mol/L NaOH 或 0.1 mol/L HCl 溶液调节溶液 pH 值分别为 2、3、4、5、6、7、8、9,各取 0.05 mL 溶液滴于载玻片上,置于 28 ℃ 培养箱中保湿培养,24 h 后镜检孢子萌发情况,每处理重复 3 次,计算孢子萌发率。

1.7 光照对孢子萌发的影响

用 0.4% 蛋白胨作营养液制成 100 万个/mL 木霉孢子悬浮液,取 0.05 mL 滴于载玻片上,在光照和黑暗条件下于 28 ℃ 恒温培养 24 h,镜检孢子萌发情况,每处理重复 3 次。

1.8 室内离体防效测定

采用离体叶片法^[9]测定防效。选取健康无病的黄瓜叶片,剪下后用无菌水反复冲洗,先喷浓度为 0.1 亿个/mL 的灰霉菌孢子悬浮液,保温培养 1 d 后再喷 A(用 0.4% 蛋白胨和乳糖溶液把木霉可湿性粉剂稀释成 500 倍液,并用 0.1 mol/L HCl 溶液调节 pH 值到 5)、B(用无菌水把木霉可湿性粉剂稀释成 500 倍液)、C(用等量无菌水作空白对照)3 个处理药液;叶柄用脱脂棉缠绕,滴加 0.5% 葡萄糖无菌液,置于培养皿内,于 25 ℃ 下保温保湿培养;每个处理 10 张叶片,重复 3 次,分别在培养后 3、7 d 调查叶片病情指数,并计算防治效果。其中病情指数分级标准:0 级,无病斑;1 级,病斑面积占整个叶面积的 5% 以下;2 级,病斑面积占整个叶面积的 6%~10%;3 级,病斑面积占整个叶面积的 11%~25%;4 级,病斑面积占整个叶面积的 26%~50%;5 级,病斑面积占整个叶面积的 50% 以上。病情指数 = 100 × Σ(各级病叶数 × 相应级数)/(调查总叶数 × 最高级级数);防治效果 = (对照病情指数 - 用药病情指数)/对照病情指数 × 100%。

2 结果与分析

2.1 不同氮源对孢子萌发的影响

由图 1 可见,有机氮源对木霉分生孢子萌发促进作用明显,在蛋白胨溶液中培养后 12 h,萌发率即可达到 87.56%;培养后 24 h,达 88.62%,在牛肉膏和酵母粉溶液中培养也达到 75.2% 和 79.1%。而无机氮源促进作用较弱,只有 (NH₄)₂SO₄ 溶液达到 46.6%,NH₄NO₃ 达到 30.5%。说明有机氮源对孢子萌发有明显的促进作用。木霉分生孢子在水中培养 12 h 没有萌发,培养 24 h 也只有 15.3%,培养后 152 h 萌发率仅达到 80%。由此可见,木霉孢子在纯水中萌发率低,萌发速度慢,这也是导致其药效缓慢的主要原因。

2.2 不同碳源对孢子萌发的影响

碳源对木霉孢子萌发促进的作用不如氮源明显。由图 2

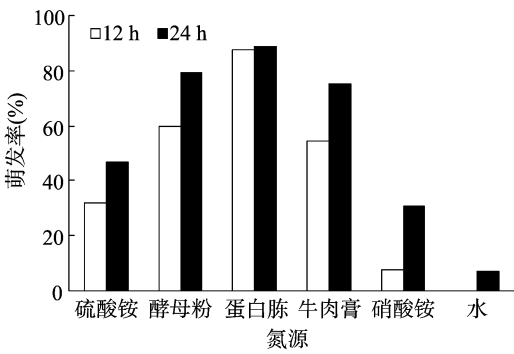


图1 不同氮源对孢子萌发的影响

可知,乳糖对孢子萌发促进作用较大,培养后 24 h,萌发率达到 32.8%;蔗糖次之,为 27.9%;麦芽糖和葡萄糖对孢子萌发促进作用较小,萌发率分别为 19.6% 和 16.7%;可溶性淀粉则对孢子萌发基本无促进作用。木霉孢子在无菌水中培养 12 h 未萌发,培养 24 h 萌发率只有 15.5%。

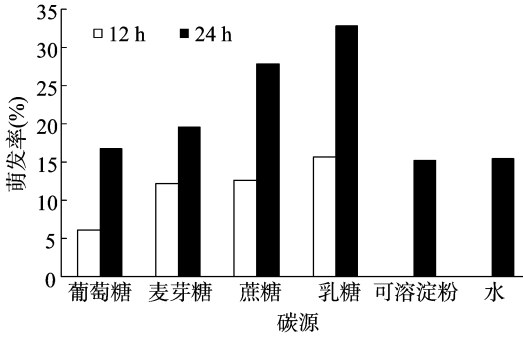


图2 不同碳源对孢子萌发的影响

2.3 温度对孢子萌发的影响

温度对木霉孢子萌发作用明显。由表 1 可以看出,木霉孢子在 10~40 ℃ 均可萌发。开始时,随着温度升高,孢子萌发率逐渐升高;但 28 ℃ 后,孢子萌发率呈下降趋势。可见孢子萌发适宜温度为 25~30 ℃,在此温度条件下孢子萌发率较高,且芽管生长旺盛。而在无菌水中的孢子萌发率均较低。

表 1 不同温度对孢子萌发的影响

培养温度 (℃)	萌发率 (%)	
	无菌水	蛋白胨
10	1.2	10.5f
20	10.6	30.8e
25	15.4	80.3c
28	30.2	88.0a
30	29.4	84.6b
40	20.6	53.7d

2.4 相对湿度对孢子萌发的影响

木霉孢子萌发需要高湿环境。由图 3 可见,木霉孢子在相对湿度为 80% 的条件下培养 24 h 不萌发;相对湿度为 90% 时,孢子萌发率达到 13%;相对湿度为 95% 时,萌发率为 55.2%;而在液滴中孢子萌发率高达 88.8%。表明木霉分生孢子萌发率与相对湿度呈正相关性。

2.5 pH 值对孢子萌发的影响

pH 值对孢子萌发作用明显(图 4),pH 值为 2~9 范围内,木霉孢子均能萌发,其中以 pH 值为 5 时萌发率最高,24 h

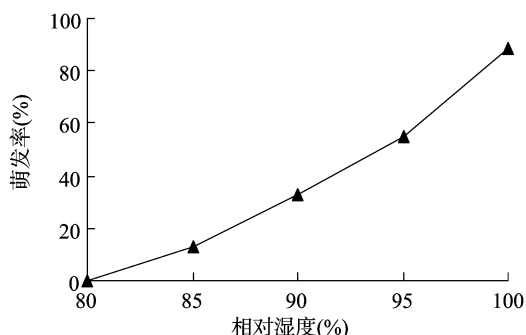


图3 相对湿度对孢子萌发的影响

达到 87.8%；适宜 pH 值为 4~6，萌发率均达到 80% 以上。而当 pH 值 <3 或 >7 时，萌发率则明显下降。说明木霉孢子在弱酸性条件下萌发较好，而碱性或强酸性时均不适于孢子萌发。

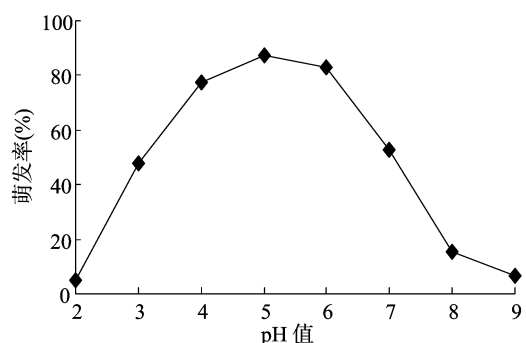


图4 pH 值对孢子萌发的影响

2.6 光照对孢子萌发的影响

连续光照 24 h 后，木霉孢子萌发率为 87.1%；避光黑暗处理 24 h 后，萌发率为 86.7%，2 个处理无明显区别，说明光照对木霉孢子萌发没有明显作用。

2.7 室内离体防效试验

由室内防治效果（表 2）可以看出，碳源、氮源的加入与适宜的 pH 值确实可以提高木霉可湿性粉剂的防治效果和药效速度。培养 3 d 时，A 处理的防治效果已达到 85.6%，与培养 7 d 的防效比较接近；而 B 处理在培养 3 d 时的防效只有 67.7%，培养 7 d 时也只达到 84.2%。进一步验证了添加少量的氮源、碳源和调整药液适宜 pH 值，可提高木霉可湿性粉剂的防治效果和药效速度。

表 2 木霉菌可湿性粉剂不同处理对黄瓜灰霉病的离体防效

处理	培养 3 d		培养 7 d	
	病情指数	防效 (%)	病情指数	防效 (%)
A	4.7	85.6aA	10.7	86.7aA
B	10.5	67.7bB	12.8	84.2bB
C	32.6		81.0	

注：同列数据后不同小写、大写字母表示在 0.05、0.01 水平差异显著。

3 讨论与结论

本试验就氮源、碳源、温度、pH 值、相对湿度和光照 6 个因素对木霉分生孢子萌发的影响进行研究，结果表明，有机氮

源蛋白胨、牛肉膏和酵母粉等对孢子萌发有较好的促进作用，而无机氮源作用不大；碳源及光照对木霉孢子萌发促进作用不明显；适宜温度为 25~30℃、pH 值为 4~6，这与木霉属的菌落生长特性相一致。试验结果与高克祥等的研究结论^[6-7]基本一致。为了进一步验证试验结果，本研究还通过室内离体防效试验，在配制木霉可湿性粉剂药液时添加 0.4% 蛋白胨和乳糖，并调 pH 值至 5，对黄瓜灰霉病的防效和作用速度明显优于纯水配制的药效。为了增加活体生物农药的药效速度、提高防治效果，生产厂家在配制产品以及农民在使用木霉菌剂时应注意以下几点。

3.1 合理添加碳氮元素

根据“2.1”“2.2”“2.5”节试验结果，厂家在配制产品时可添加少量蛋白胨粉或酵母粉和蔗糖等物质，在不影响农药质量前提下，尽量选择酸性助剂；农民在喷施木霉可湿性粉剂时，也可在水中添加少量硫酸铵、蔗糖等，还可加少量食醋降低药液 pH 值。

3.2 选择施药时间

根据“2.3”“2.4”“2.6”节试验结果，在春秋季节喷施农药时应选择在气温较高的中午进行，这样夜里相对湿度大，从而有利于孢子萌发；但夏季中午温度较高，药液很容易被蒸发而减少相对湿度，所以应在 16:00 后或阴天时进行喷施；在冬季温室大棚中使用，中午施药不但棚内温度高，相对湿度也大，更利于木霉孢子萌发。总之，应根据季节和天气情况选择适宜的时间施药，才能提高药效，减少环境因素对活体生物农药的药效影响。

木霉菌可湿性粉剂是活体生防菌剂，研究其分生孢子萌发的影响因子，对生产厂家配制药剂和农民田间应用都具有重要的指导意义。有关木霉可湿性粉剂在植物病害防治的微生物生态环境及其分生孢子萌发和在植物叶面上的定殖条件等影响因子，都有待进一步深入研究。

参考文献：

- [1] 易茜茜, 丁万隆, 李 勇. 木霉菌及其对植物病原真菌病害的防治机制[J]. 中国农学通报, 2009, 25(20): 228-231.
- [2] Ahmed S A, Sanchez C P, Candela M E. Evaluation of induction of systemic resistance in pepper plants to *Phytophthora capsici* using *Trichoderma harzianum* and its relation with capsidiol accumulation[J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106: 817-824.
- [3] Papavizas G C, Lumsden R D. Biological control of soilborne fungal propagules[J]. Ann Rev Phytopathology, 1980, 18: 389-413.
- [4] 陈立华, 金 秋, 牛 明, 等. 棘孢木霉对水稻纹枯病原菌立枯丝核菌生物防治的研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(5): 115-117.
- [5] 孙 勇, 蒋继宏, 张海燕. 植物内生木霉的鉴定及其抑菌活性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 332-333.
- [6] 高克祥, 刘小光, 陈晋江, 等. 木霉菌株 T95 生物学特性的研究[J]. 河北林果研究, 1998, 13(4): 359-365.
- [7] 纪明山, 李博强, 许 远, 等. 绿色木霉 TR-8 菌株的生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2004, 35(3): 195-199.
- [8] 王 芊. 木霉菌株 BTW41 分生孢子萌发条件研究[J]. 黑龙江农业科学, 2002(5): 5-6.
- [9] 方中达. 植物研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1979.