

木霉制剂的生防应用研究及发展前景

唐永庆¹, 许艳丽², 张红骥^{1,2}, 高亚冰¹, 于德才¹

(1. 黑龙江省农业科学院, 哈尔滨 150086; 2. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150040)

摘要: 木霉菌是重要的植物病害防治菌, 广泛分布于自然界。由于生防技术的日趋成熟, 木霉在植物病害生物防治中的应用潜力正日益受到人们的重视。简述木霉生防制剂的种类、剂型、载体、货架期, 木霉菌的发酵工艺和受环境因素的影响及木霉制剂的开发前景。

关键词: 木霉菌; 生防制剂; 生物防治

中图分类号: S476.8 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)01-0111-03

Application Study and Development Prospect of Biocontrol Agents of *Trichoderma*

TANG Yong-qing¹, XU Yan-li², ZHANG Hong-ji^{1,2}, GAO Ya-bin¹, YU De-cai¹

(1. Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. China Academy of Sciences Northeast Geography and Agricultural Ecology, Harbin 150086)

Abstract: The species, type, carrier, shelf life of *Trichoderma* biocontrol agents were sketched, the fermentation technology of *Trichoderma* Strains and the influence of environmental parameters on *Trichoderma* agents were also introduced. At the same time, the development foreground was prospected.

Key words: *Trichoderma*; biocontrol agents; biological management

木霉属(*Trichoderma. spp*)隶属于半知菌亚门, 丝孢纲, 丛梗孢目, 粘孢菌类。目前已知的木霉菌至少有 18 种^[1], 具有寄生和拮抗作用的木霉属种类主要有哈茨木霉(*T. harizianum*)、绿色木霉(*T. viride*)、钩状木霉(*T. hamatum*)、长枝木霉(*T. longibrachiatum*)、康氏木霉(*T. koningli*)、绿粘帚霉(*Trichoderma virens*)^[2]。由于木霉菌具有广泛适应性、广谱性及多机制性, 木霉菌在植物病害生物防治上日益受到重视, 并不断有所突破, 目前已有 50 种以上的木霉制剂注册上市。

自从 1932 年 Weindling 发现木霉菌对植物病原真菌有拮抗作用, 70 多年来国外专家、学者对木霉菌生物药剂的开发做了许多尝试和深入的研究^[3]。美国的 Topshield(哈茨木霉 T22)、以色列的 Trichodex(哈茨木霉 T39)、新西兰的木霉制剂 Trichodry 和 Trichoflow、俄罗斯 Kolombet 博士研制的木霉制剂(Mycol)、韩国 Chung 教授研究开发的木霉制剂 YC458、西班牙 Monte 教授采用哈茨木霉

和绿色木霉混合开发的生防制剂 TUSAL, 这些制剂在植物病害防治中都取得很好的防治效果和明显的增产作用^[4-6]。近年来, 国内的科研人员也把生物防治的注意力转移到拮抗木霉菌上来, 并使其逐步在田间得到应用。丁万隆等用木霉制剂防治西洋参立枯病, 李良做了哈茨木霉 *T. harzianum* 防治茉莉白绢病, 邢云章等用绿色木霉 *T. viride* 防治人参根腐病都取得了一定的效果^[7-9]。浙江大学生物技术研究所以多年研究, 开发出以绿色木霉为主效的生防制剂已进入应用生产。本文主要针对木霉制剂的类型、载体、货架期, 木霉菌的发酵工艺、环境因素影响及木霉制剂的开发前景等方面做以简述。

1 木霉制剂的类型

1.1 木霉制剂繁殖体类型

木霉菌在其生长周期内可以产生三种繁殖体包括菌丝体、分生孢子和厚垣孢子。这三种类型的繁殖体在生防制剂中都有一定的应用。

1.1.1 菌丝体制剂 Lewis 和 Papavizas 基于菌丝比分生孢子更为活跃的有效假设, 发展了两种制剂与相应的加工技术, 来防治 *Sclerotium — rolfsii*, *Rhizoctonia solan*, *Pythium multi — mum* 和 *R. solani* 引起的植物病害^[10]。这种制剂的优点在于生防菌

收稿日期: 2007-07-04
基金项目: 黑龙江省十一五科技攻关重点项目(GB06B105)
第一作者简介: 唐永庆(1963-), 男, 安徽人, 学士, 助研, 从事微生物研究。Tel: 13796148953; E-mail: tang_yongqing@163.com.

可在土壤中迅速生长, 制剂储存和活化过程不必保持无菌条件; 缺点是使用不方便, 储存期短。

1.1.2 分生孢子制剂 目前已经商品化的木霉制剂大多为分生孢子制剂, 木霉菌分生孢子的产生条件相对不严格, 条件适宜时各种固体或液体培养基都能够产生^[11]。本研究采用木霉分生孢子制剂来防治大豆根腐病取得了很好的防治效果, 田间增产可达 20%。

1.1.3 厚垣孢子制剂 厚垣孢子是木霉菌在抵抗逆境条件下产生的, 它的优点是耐干燥、耐低温、对土壤抑菌作用不敏感、存活长、易加工贮存并利于在土壤中存活。但有关厚垣孢子制剂的开发研究不多, 主要是因为其人工培养条件比较苛刻, 仅 Lewis J A 和 Papavizas 等研究过^[12-13]。目前通过分子生物学手段构建新型产厚垣孢子的工程菌株, 已得到高度重视。

1.2 木霉制剂的剂型

木霉商品化制剂种类繁多, 主要分为四种类型: (1)悬乳剂: 分生孢子悬浮在由矿物油或植物油与乳化剂等助剂组成的乳液中而配制的制剂。(2)可湿性粉剂: 分生孢子粉与粉状载体及湿润剂混合而成。以色列的 Makhteshim Agan 公司开发的以哈茨木霉 T39 菌株为发酵液的生防制剂 Trichodex 剂型为 25%的可湿性粉剂。(3)颗粒剂: 分生孢子与载体混合搅拌而成。(4)混配剂: 孢子粉与化学杀菌剂在适宜的载体上按一定比例混合。本试验研究开发的是复配木霉生防颗粒剂, 由于大豆根腐病是一种土传病害, 颗粒剂在田间适用较为方便, 但要考虑颗粒剂在土壤中的裂解速度选择适宜的载体。

2 木霉菌培养基质及发酵类型

自从木霉菌的生防效果得到广泛认可以来, 关于木霉菌培养基质和发酵生产等方面有大量报道。总起来看, 木霉菌的制剂与加工技术研究较少, 木霉菌的大量培养技术尚处于模仿阶段, 一般采用液体或半固体生产方法, 以得到大量的菌丝、厚垣孢子或分生孢子。

2.1 固体发酵

目前国内外应用的固体发酵基质原料主要包括营养基质米糠、玉米秸秆、玉米芯、小麦秸秆、水稻秸秆、酒糟、甘蔗渣、谷物等, 也包括不含营养的蛭石、海绵等^[14]。由于固体发酵是一种投资少, 操作简便, 原料价格低廉, 能耗低的环保节约型发酵工艺, 因此本研究结合特定区域资源条件, 对多种固体培养基质进行筛选, 结果表明, 木霉在稻壳和麦麸皮(7:3)培养基中培养 7 d, 产孢量可达 1.1×10^9 个 $\cdot g^{-1}$, 有效降低成本。

2.2 液体培养

木霉菌液体培养可利用成本较低的糖浆、酵母膏和其它农用肥料进行液体发酵。Jackson 和 Whips 发现利用丙氨酸—葡萄糖培养产生的菌丝干

重高^[14]。陈碧云等利用 13 种培养液培养绿色木霉, 过滤液对油菜菌核病生物测定, 结果表明 OTF 液效果最好(葡萄糖 20 g, 酒石酸 2 g, 微量无机盐类)^[15]。国内在木霉液体培养以获得高的生物量方面目前文献比较少。液体发酵生产的孢子或菌丝在收获中损失较大, 得率较低, 孢子壁薄, 抗逆性较差, 明显不如气生分生孢子适用。

2.3 固液双相发酵

固液双相发酵是利用液体发酵快速产生大量的菌丝体或芽生孢子, 再转到固体营养或惰性基质上使其产生大量分生孢子, 该工艺结合了液体发酵营养生长快和固体发酵产生分生孢子的双重优点, 克服了单纯液体发酵生产的孢子稳定性差等缺点, 最大限度地利用了固体表面产生分生孢子的优点。双相发酵在目前真菌杀菌剂产品研发中得到广泛应用。

3 木霉制剂的助剂类型

助剂的选择会影响孢子制剂的贮存稳定性、田间持效性和田间作用速度。因此, 在生防制剂的研究上, 更多的人开始考虑助剂的剂型来改善制剂的理化性质便于生产上应用。助剂的类型有载体、乳化剂、稳定剂、紫外保护剂。真菌杀菌剂负载孢子的载体既可呈液状(如悬乳剂), 也可呈粉状(如可湿性粉剂), 常见的液状载体主要是矿物油和植物油^[16]。为降低其表面张力或增加其在水中的分散性, 在制剂中必须加入表面活性剂。常用的乳化剂是 OP 乳化剂和吐温—80。羟甲基纤维素钠是较为理想的悬浮稳定剂。紫外光对孢子的杀伤作用是影响孢子制剂在田间施用后稳定性的重要因素。抗坏血酸是用于孢子悬乳剂的紫外保护剂, 微量添加即可。

4 木霉制剂的货架期

商业化生产的生防制剂应便于运输与贮藏、具备大量有活力的繁殖体和较稳定的货架期^[17]。培养参数 pH、碳氮比、碳浓度和孢子收获期都会影响生防制剂的活力、货架期和超微结构。E. Agosin, D. Volpe 等人利用哈茨木霉进行试验得出: pH 是影响菌体生长和产孢的关键参数, 碳氮比、碳浓度影响产孢时间, 适宜的 pH 和碳氮比对产孢量的影响是有限的, 而是影响货架期的关键参数^[18]。通过试验筛选出孢子寿命最长的适宜培养基碳氮比为 14、pH 为 7, 利用该培养基培养产生的孢子在相对湿度较广的范围内贮存 45 d 后仍有很强的活力, 而筛选的适宜木霉制剂在低温避光条件下贮存 180 d 存活率可为 85.7%, 因此该制剂在田间应用上更具忍耐性。

5 环境因素对木霉制剂影响

当利用木霉制剂防治病原菌时, 必须要考虑土

壤中的环境因素对木霉制剂的影响。环境因素包括温度、水势、pH、杀菌剂、金属离子和抑制性细菌, 这些因素都会影响木霉制剂的防效^[19-20]。

土壤温度和水势情况可以直接影响孢子的萌发、芽管伸长、菌丝生长、腐生能力及非挥发性代谢物质的分泌, 从而影响其防治效果^[21]。大多数木霉可以在 pH2.0~6.0 范围内生长, 最适 pH 为 4.0, 有些木霉菌株生长最适 pH 偏碱性, 并且 pH 也会影响木霉产生胞外酶的种类。在综合防治体系下, 木霉要与化学药剂混合使用, 有些杀菌剂对木霉的抑制较弱可以在综合防治体系中应用, 而木霉对苯并咪唑类化学药剂反应敏感, 不宜混合使用。通过紫外线诱变育种等方法可以筛选耐化学药剂的突变木霉菌株。由于化学农药的使用和环境污染加剧, 有些重金属离子(如铜、锌、镍、钴)浓度增加, 对真菌产生毒害作用, 因此可通过筛选具有交互抗性的耐金属元素的菌株来提高抗性。土壤中存在许多细菌能够抑制木霉, 如果想使木霉能够真正在实际生产中应用, 就必须克服这种拮抗作用。Manczinger 已筛选出可以降解细菌细胞的木霉菌株。

利用木霉制剂进行综合防治时, 必须对生态环境中影响木霉发挥生防作用的各种因子加以研究, 通过突变体育种、原生质融合、转基因等技术筛选出耐胁迫木霉菌, 培育出耐低温、耐化学药剂、耐水分胁迫、耐细菌抑制、耐重金属元素的木霉菌, 使木霉能够更好的适应环境条件的变化, 扩大木霉在实际生产中的应用范围。

6 木霉制剂的开发前景

木霉菌是一种重要的生防菌, 木霉制剂的开发研究受到各国科学家、企业家和政府的重视, 广泛用于种子处理、土壤处理、叶面喷施等。目前木霉制剂的开发研究方向为(1)利用现代遗传工程技术如 DNA 重组技术、原生质融合技术等创造具有耐环境因素胁迫、拮抗能力和诱导抗性强的生防工程菌株。(2)寻找木霉厚垣孢子产生机制及基因表达系统, 以期构建新型产厚垣孢子的工程菌株, 研发出耐性强、易贮存的木霉生防制剂^[22]。(3)变单一菌剂的使用为多菌混合使用, 利用不同微生物的抗病机制, 延长有效期并提高防治病害的广谱性。(4)解决活菌制剂的保藏和生防菌种的复壮两大难题。(5)木霉制剂生产上应选择适宜的载体和剂型, 来防治不同病原菌引起的不同植物病害, 以获得良好的防治效果。(6)筛选木霉菌株的适宜发酵培养条件, 以期建立产量高、成本低、无污染的规模化发酵生产工艺。

参考文献:

[1] Wen C J. Studies on the taxonomy of the genus *Trichoderma* in southwestern China [J]. *Acta Mycologica Sinica*, 1993, 12(2): 118-130.

[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] 薛宝娣, 李娟, 陈永萱. 木霉(*TR25*)对病原真菌的拮抗机制和防病效果研究[J]. *南京农业大学学报*, 1995, 18(1): 31-35.

[4] Harman G E. Myths and Dogmas of Biocontrol — changes in perceptions berived from Reserch on *Trichoderma harzianum* T — 22[J]. *Plant Disease*, 2000, 84(4): 377-393.

[5] Zimand G, Elad Y. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Boll-rylis cinerea* pathogenicity [J]. *Phytopathology*, 1996, 86: 945-956.

[6] 李增智. 菌物在害虫、植病和杂草治理中的现状和未来[J]. *中国生物防治*, 1999, 15(1): 35-40.

[7] 丁万隆, 高秋义, 张国珍. 木霉防治西洋参立枯病研究[J]. *中草药*, 1994, 25(2): 91.

[8] 李良, 申功进, 邵志和. 哈茨木霉对茉莉白绢病的生物防治的研究[J]. *浙江农业大学学报*, 1983, 9(3): 221-225.

[9] 邢云章, 马凤茹. 绿色木霉防治人参根腐病的研究[J]. *特产研究*, 1983(4): 16.

[10] Lew is J A, Papavizas G C. Biocontrol of plant disease: The approach for tomorrow [J]. *Crop production*, 1991, 10: 95-105.

[11] Harman G E, Jin X, Stasz T E. Production of conidial biomass of *Trichoderma harzianum* for biological contro[J]. *Biol. Contr*, 1991, 1: 23-28.

[12] Lew is J A, Papavizas G C. Production of chlamydospores and conidia by *Trichoderma* spp. in liquid and solid growth media [J]. *Soil Biol. Biochem*, 1983, 15: 351-357.

[13] Lew is J A, Papavizas G C. Chlamydospore formation by *Trichoderma* spp. innatural substrates[J]. *Can J. Microbiol*, 1984, 30: 1-7.

[14] Jackson A M, Whipps J M, Lynch J M. Effects of ternperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential [J]. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 1991, 7: 494-501.

[15] 陈碧云, 周乐聪, 陆致平. 绿色木霉发酵配方与防治油菜菌核病的研究[J]. *中国生物防治*, 2001, 17(2): 67-70.

[16] Jones R W, Pettit R E, Taber R A. Lignite and stillage: carrier and substrate for application of fungal biocontrol agents to soil [J]. *Phytopathology*, 1984, 74 : 1167-1170.

[17] Lew is J A, Papavizas G C. Biocontrol of plant disease the approach for tomorrow [J]. *Crop Protection*, 1991, 10: 95-105.

[18] Agosin E. Effect of culture conditions on spore shelf life of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1997, 13: 225-232.

[19] Jackson A M, Whipps J M, Llynch J M. Nutritional studies of four fungi with disease biocontrol potential[J]. *Enzyme Microb. Technol*, 1991, 13: 456-461.

[20] Kredics L. Influence of Environmental Parameters on *Trichoderma* Strains with biocontrol Potential[J]. *Food Technol. Biotechnol*, 2003, 41 (1): 37-42.

[21] Hutchinson S A, Cowan M E. Identification and biological effects of volatile meTab. olities from cultures of *Trichoderma harzianum* [J]. *Trans. Br. Mycol. Soc*, 1972, 59: 71-77.

[22] Bissett J. A revision of the genus *Trichoderma* III: *Pachybasium* [J]. *Can. J. Bo.*, 1991, 69: 237-241.