哈茨木霉重组株 L-15 与野生株 LTR-2 贮存稳定性及生防活性研究

陈 凯， 李纪顺*， 王贻莲， 魏艳丽， 扈进冬， 杨合同

（齐鲁工业大学（山东省科学院），山东省科学院生态研究所，山东省应用微生物重点实验室，济南 250103）

摘要 为比较哈茨木霉重组株 L-15 与野生株 LTR-2 在贮存稳定性及生防活性方面的差异，采用平板菌落计数法检测木霉可湿性粉剂中分生孢子的存活率，测定菌株的生物学特性，并在温室条件下评价制剂对番茄立枯病的防治效果。结果表明，分生孢子存活率达 80.0%时，在 5℃和室温（2℃～36℃）下，L-15 可湿性粉剂的货架期分别为 24 个月和 9 个月，显著高于 LTR-2 可湿性粉剂的 12 个月和 6 个月。L-15 的潮霉素抗性在贮存后稳定遗传，其 β-1，4-葡聚糖酶水解活性、几丁质酶水解活性及平板拮抗活性较 LTR-2 明显提高。5℃贮存 60 月后，L-15 可湿性粉剂 10×和 100×稀释处理对番茄立枯病的温室防治效果分别达 89.27%和 86.52%，与 LTR-2 处理间存在极显著性差异（$P<0.01$）。重组株 L-15 的货架期和生防活性较野生株 LTR-2 明显提高，在生物防治领域具有潜在应用价值。

关键词 哈茨木霉重组株 L-15； 哈茨木霉野生株 LTR-2； 可湿性粉剂； 货架期； 番茄立枯病； 防治效果

中图分类号： S 476 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2019223

Storage stability and biocontrol efficiency of *Trichoderma harzianum* recombinant strain L-15 and wild strain LTR-2

CHEN Kai， LI Jishun*， WANG Yilian， WEI Yanli， HU Jindong， YANG Hetong

（*Institute of Ecology*，*Qilu University of Technology*（*Shandong Academy of Sciences*），*Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology*，*Jinan* 250103，*China*）

Abstract To compare storage stability and biocontrol efficiency between *Trichoderma harzianum* recombinant strain L-15 and wild strain LTR-2，the conidiospore survival rate of wettable powder during storage period was determined by using plate colony counting method；biological characteristics of both strains were investigated，and the biocontrol efficiency of wettable powder against tomato *Rizoctonia* rot was evaluated under greenhouse conditions. The results demonstrated that，when the survival rate of conidiospores was maintained at 80.0%，the shelf life of L-15 wettable powder reached 24 and 9 months at 5℃ or room temperature（2℃－36℃），respectively，which were significantly higher than those of LTR-2 wettable powder（12 and 6 months，respectively）. The hydrolytic activity of β-1，4-glucanase and chitinase in L-15 and its antagonistic activity on plate were obviously enhanced compared to LTR-2，and the introduced hygromycin resistance of L-15 was also stably inherited over storage period. Under greenhouse conditions，the biocontrol efficiencies against tomato *Rizoctonia* rot of 10 and 100-times dilution of L-15 wettable powder after 60 months at 5℃ were 89.27% and 86.52%，respectively，which were significantly different from LTR-2 wettable powder（$P<0.01$）. In summary，*T. harzianum* recombinant strain L-15 had an improved storage stability and biocontrol efficiency compared with wild strain LTR-2 and thus has a potential for biocontrol application.

Key words *Trichoderma harzianum* recombinant strain L-15； *Trichoderma harzianum* wild strain LTR-2；

收稿日期： 2019－04－29 **修订日期：** 2019－09－03

基金项目： “十三五”国家重点研发计划（2017YFD0201102，2017YFD0201706）；2019 年度山东省重点研发计划（重大科技创新工程竞争择优类）（2019JZZY010718）；山东省科学院国际科技合作项目（2019GHZD11）；山东省 2018 年度农业重大应用技术创新；齐鲁工业大学（山东省科学院）青年博士合作基金（2017BSHZ022）；山东省重点研发计划（2019GSF107066）

* 通信作者 E-mail：yewu2@sdas.org

wettable powder; shelf life; tomato *Rizoctonia* rot; biocontrol efficiency

木霉 *Trichoderma* spp. 是自然界广泛分布的生防真菌，自 1932 年 Weindling[1] 发现木霉的拮抗作用后，国内外专家、学者在木霉生防和应用方面做了大量工作，表明木霉具有多种生防机制：可在多种逆境下生存和定殖、有效利用环境中的营养物质、抑制植物病害发生、促进植物生长和诱导植物产生系统抗性[2-4]。木霉至少对 18 个属 20 余种病原真菌和多种病原细菌有拮抗作用，目前国际上有 60 多个国家使用 100 多种含有木霉成分的生物制剂产品[5]。

虽然自 1960 年木霉的生物防治功能被世界关注，但其商品化进程仍存在诸多问题：主要是缺乏合适的剂型，田间应用效果不理想以及制剂保质期短[6]。据报道，以滑石粉、草炭、褐煤以及高岭土为载体，木霉制剂的保质期只有 3～8 个月[7-9]。以液体石蜡为载体，15～35℃保存 6 个月，木霉孢子存活率为 22.4%；4℃保存 11 个月，木霉孢子存活率仅为 8.8%[10]。在去离子水中保存 1 年，木霉孢子存活率为 75%；2 年则为 60%[11]。微胶囊是目前保存效果较好的木霉剂型，但 12～14 个月后，微胶囊中孢子含量也只有 10^6 cfu/g[6, 12]，且微胶囊制备工艺较复杂，应用效果不理想，生产成本较高。

2016 年公布的中华人民共和国农业行业标准 NY/T 2888.1-2016 和 NY/T 2888.2-2016 规定：木霉制剂 5℃保存 12 个月或 20～25℃保存 6 个月，贮存稳定性不低于 80%[13-14]，现有木霉制剂很难达到标准要求。为解决上述问题，应加大木霉研发力度，构建具有抗逆、拮抗能力和诱导抗性强的广谱生防工程菌株；建立高密度、低成本、无污染的规模化发酵生产工艺；并重点解决活菌制剂的贮存问题[15-16]。

凹凸棒土(attapulgite)是一种具链层状结构的含水富镁铝硅酸盐黏土矿物，利用凹凸棒土为载体制备的微生物制剂保质期长，在土壤中释放缓慢，从而延长药效，降低生产成本[17-18]。本文以前期得到的广谱高效木霉重组株 L-15 为研究对象，以凹凸棒土为载体制备木霉的可湿性粉剂，探索基因重组后对木霉制剂贮存稳定性的影响，并评价其贮存后的生防效果，为进一步推广应用及商品化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

哈茨木霉 *T. harzianum* 野生株 LTR-2，本实验室分离保存，具有多种生防活性，无潮霉素 hygromycin 抗性[19]。哈茨木霉重组株 L-15，系以 LTR-2 为出发菌株，利用限制性内切酶介导法构建而成，包含外源 β-1,4-葡聚糖酶基因 *glu*14 和几丁质酶基因 *chi*42，具有潮霉素抗性(Hyg 200 μg/mL)[20]。

指示菌为本室保存的 13 种植物病原真菌：致病疫霉 *Phytophthora infestans*、瓜果腐霉 *Pythium aphanidermatum*、灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*、大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*、平脐蠕孢 *Helminthosporium sativum*、白腐盾壳霉 *Coniothyrium diplodiella*、尖镰孢萎蔫专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、串珠镰孢 *F. moniliforme*、木贼镰孢 *F. equiseti*、葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*、小葡萄座腔菌 *B. parva*、禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis*、立枯丝核菌 *R. solani*。

1.2 试剂与培养基

潮霉素 B(上海生物工程技术服务有限公司)，50%多菌灵可湿性粉剂(江苏宝灵化工股份有限公司)，番茄品种为‘粉番茄’(济南大江种子有限公司)。

1 mg/mL 刚果红：1 g 刚果红溶于 1 L 蒸馏水中，现配现用。

1 mol/L NaCl：58.5 g NaCl 溶于 1 L 蒸馏水中，现配现用。

PDA 培养基：马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL。

PDAT 培养基：PDA 培养基中添加 Triton X-100 0.5 mL/L。

PDAH 培养基：PDA 培养基中添加 Hyg 200 μg/mL。

PDAHT 培养基：PDAH 培养基中添加 Triton X-100 0.5 mL/L。

小麦培养基：小麦种子用自来水室温浸泡 24 h，除去石子杂草等，沥干水分，分装 250 mL 组培瓶，121℃灭菌 1 h 备用。

几丁质培养基：葡萄糖 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g、$(NH_4)_2SO_4$ 1 g、K_2HPO_4 1.36 g、胶体几丁

质 10 g、琼脂 15 g、Triton X-100 0.5 mL、蒸馏水1 000 mL。

CMCNa 培养基:葡萄糖 0.5 g、KH_2PO_4 15 g、$(NH_4)_2SO_4$ 5 g、$CaCl_2$ 0.6 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.005 g、$MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.001 6 g、$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001 4 g、$CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.003 7 g、CMCNa(羧甲基纤维素钠)5 g、琼脂 15 g、Triton X-100 0.5 mL、蒸馏水 1 000 mL。

1.3　木霉可湿性粉剂制备

分别在 PDA 和 PDAH 培养基平板上活化木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2,培养完毕后刮取分生孢子制备孢子悬浮液 10^7 cfu/mL,按 1%接种量接种灭菌的小麦培养基,25℃培养 4 d 至分生孢子布满整个培养基,用无菌生理盐水洗脱分生孢子,7 000 r/min 离心 10 min 后收集分生孢子备用。

凹凸棒土提前于 180℃烘干 2 h,以其为载体制备 L-15 和 LTR-2 的可湿性粉剂:凹凸棒土 95%、葡萄糖 0.5%、黄原胶 0.25%、十二烷基苯磺酸钠 0.25%、羧甲基纤维素钠 0.5%,几丁质 0.5%,分生孢子 3%。可湿性粉剂初始活分生孢子含量不低于 10 亿/g,制剂含水量控制在 5%左右。

1.4　木霉可湿性粉剂贮存稳定性检测

将混合均匀的上述可湿性粉剂分装在小型铝箔袋中,每袋 10 g,用塑料薄膜封口机封口,分别置于 5℃和室温(2～36℃)贮存,间隔 3 个月取样 1 次,每种制剂 3 袋重复,采用稀释涂布平板法检测可湿性粉剂中的活分生孢子含量,计算存活率,L-15 检测培养基为 PDAHT,LTR-2 检测培养基为 PDAT。

孢子存活率%$=c/c_0\times100\%$;

其中 c 为不同贮存期可湿性粉剂的活孢子数,c_0 为可湿性粉剂的初始活孢子数。

1.5　木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2 的生物学特性

1.5.1　木霉菌株潮霉素抗性及培养特性检测

生物学特性测定用木霉重组株 L-15 来自 5℃下贮存 60 个月的 L-15 可湿性粉剂,野生株 LTR-2 来自－80℃超低温冰柜保存菌种。分别在 PDAH 和 PDA 培养基平板上培养 L-15 和 LTR-2,观察其生长速率及产孢性能,检测贮存 60 个月后 L-15 中潮霉素基因的遗传稳定性。

1.5.2　基因重组对 L-15 水解酶活性的影响

在几丁质培养基和 CMCNa 培养基上接种 1.5.1 中分离到的 L-15 和 LTR-2,25℃培养 6 d 后,CMCNa平板先用 1 mg/mL 刚果红染色 20 min,再用1 mol/L NaCl 冲洗 2 次,观察水解圈大小;几丁质平板直接观察水解圈大小。

1.5.3　基因重组对 L-15 抑菌活性的影响

利用对峙培养法测定 1.5.1 中 L-15 和 LTR-2 对供试植物病原真菌的抑菌活性,用直径 5 mm 打孔器打取木霉与病原真菌菌落边缘的菌丝块,然后对接在 PDA 平板两端,两个菌块相距 70 mm,以只接种病原真菌为对照,25℃对峙培养 6 d,观察两者之间的拮抗情况,计算抑制率。

抑制率$=(r_0{}^2-r^2)/r_0{}^2\times100\%$;

其中 r_0 为对照病菌生长半径,r 为与木霉对峙培养的病菌生长半径。

1.6　木霉可湿性粉剂对番茄立枯病的温室防治效果

生防菌剂为 5℃贮存 60 个月的 L-15 可湿性粉剂(分生孢子含量为 2.0 亿/g);对照菌剂为新配制的 LTR-2 可湿性粉剂,分生孢子含量调整为 2.0 亿/g。每种菌剂设 3 个稀释梯度:10×、100×及1 000×稀释,试验设 8 个处理:L-15/10×、L-15/100×、L-15/1 000×、LTR-2/10×、LTR-2/100×、LTR-2/1 000×、多菌灵/800×、清水对照。每处理 3 个重复。

利用小麦培养基培养病原真菌 *R. solani*,待菌丝布满麦粒后,按 1 g/kg 的剂量均匀混入健康大田土中,制成带病盆栽土,分装干净花盆。番茄在育苗钵中提前育苗,选取生长健壮、大小适中的幼苗进行移栽,每盆 10 株,每处理 3 盆,分别用上述不同浓度处理菌剂及多菌灵灌根 500 mL/盆。

在人工气候室内于光周期为 L∥D＝10 h∥14 h,昼夜温度为 25/18℃,空气相对湿度为 50%～70%的条件下,对盆栽样品进行栽培管理。28 d 后进行番茄立枯病病害调查,统计防治效果。

立枯病病害调查分级标准:0 级,全株无病;1 级,茎基部有小病斑,占茎围的 25%以下;2 级,茎基部病斑较大,约占茎围的 25%～50%;3 级,茎基部病斑较大,约占茎围的 50%以上,但尚未破坏整个茎围;4 级,茎基部病斑占据全部茎围,植株死亡。

病情指数＝Σ(各级病株数×相对病级数值)/(调查总株数×4)×100;

防治效果＝(对照病情指数－处理病情指数)/对照病情指数×100%。

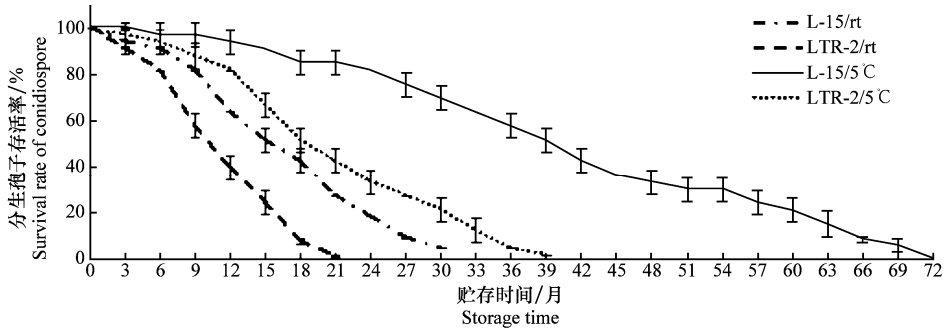
1.7 数据统计与分析

数据采用 Excel 2013 和 SPSS 21.0 统计软件进行 Duncan 氏多重比较。

2 结果与分析

2.1 木霉可湿性粉剂的贮存结果

木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2 可湿性粉剂中初始活分生孢子含量均为 10.0 亿/g，制剂含水量 5.5%，在 10^{-6} 数量级上未检出杂菌，制剂贮存结果见图 1。在室温(2～36℃)和 5℃两种贮存条件下，可湿性粉剂中分生孢子存活率均随时间的延长呈降低趋势，5℃贮存效果好于室温。室温下，LTR-2 贮存 21 个月基本检测不到分生孢子(孢子存活率<5.0%)，L-15 贮存 30 个月基本检测不到分生孢子。5℃下，LTR-2 贮存 39 个月基本检测不到分生孢子，L-15 贮存结果较好，至 72 个月才基本检测不到分生孢子。重组株 L-15 可湿性粉剂在两种条件下的贮存稳定性均好于野生株 LTR-2。



L-15/5℃: L-15可湿性粉剂5℃贮存; L-15/rt: L-15可湿性粉剂室温贮存; LTR-2/5℃: LTR-2可湿性粉剂5℃贮存; LTR-2/rt: LTR-2可湿性粉剂室温贮存。贮存期间的室温范围为2℃~36℃, 数据为3次重复的平均值±标准差

L-15/5℃: L-15 wettable powder at 5℃; L-15/rt: L-15 wettable powder at room temperature; LTR-2/5℃: LTR-2 wettable powder at 5℃; LTR-2/rt: LTR-2 wettable powder at room temperature. The average maximum and minimum room temperatures were 2℃ and 36℃ during the experimental period; data are the means of three repetitions with standard deviation

图 1 木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2 可湿性粉剂的贮存稳定性

Fig. 1 The storage stability of *Trichoderma* recombinant strain L-15 and wild strain LTR-2 wettable powder

以分生孢子存活率 80.0%、50.0%和 20.0%为检测指标，发现不同处理可湿性粉剂对应的贮存期不同。在 5℃条件下：L-15 的贮存期分别为 24、39 和 60 个月；LTR-2 的贮存期分别为 12、18 和 30 个月。在室温条件(2～36℃)下：L-15 的贮存期分别为 9、15 和 21 个月；LTR-2 的贮存期分别为 6、9 和 15 个月。另外，5℃下 L-15 贮存 3 月内分生孢子存活率达 100.0%，结果见表 1。按中华人民共和国农业行业标准 NY/T 2888.2－2016 贮存稳定性的要求，LTR-2 可湿性粉剂基本达到标准要求，L-15 可湿性粉剂明显高于标准，5℃下货架期可达 24 个月。

表 1 木霉可湿性粉剂中不同分生孢子存活率所对应的贮存期[1)]

Table 1 The shelf life of *Trichoderma* wettable power with different conidiospore survival rates

可湿性粉剂 Wettable powder	贮存条件 Storage condition	不同孢子存活率下的贮存期/月 Shelf life with different conidiospore survival rates			
		100.0%	80.0%	50.0%	20.0%
L-15	5℃	3	24	39	60
	室温	0	9	15	21
LTR-2	5℃	0	12	18	30
	室温	0	6	9	15

1) 贮存期间的室温范围为 2℃～36℃。
The average maximum and minimum room temperatures are 2℃ and 36℃ during the experimental period.

2.2 木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2 的生物学特性

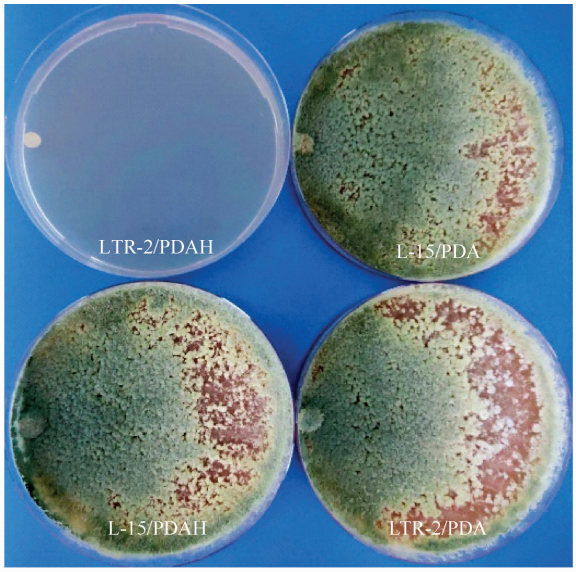
2.2.1 木霉菌株的潮霉素抗性及培养特性

野生株 LTR-2 对潮霉素敏感，在 PDAH 培养基上 25℃培养 5 d 不生长，在 PDA 培养基上生长速率为 21 mm/d，培养 5 d 后 75%的平板上布满分生孢子。

从 5℃下贮存 60 个月的木霉重组株 L-15 可湿性粉剂中分离得到的 L-15，接种 PDA 和 PDAH 培养基后，25℃下生长速率分别为 23 mm/d 和 22 mm/d，培养 5 d 后分生孢子产量略高于 LTR-2，L-15 在两种培养基上的生长速率和产孢情况差别不大，在 PDA 上的产孢量相对稍多，结果见图 2，说明贮存后 L-15 仍具有潮霉素抗性及遗传稳定性。

2.2.2 基因重组对 L-15 水解酶活性的影响

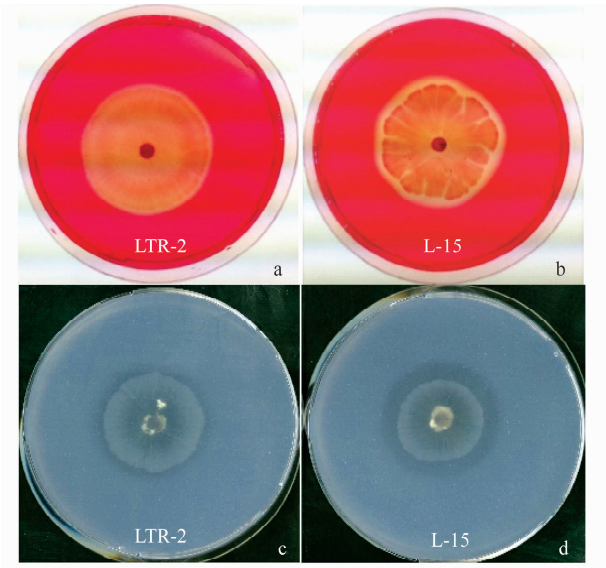
野生株 LTR-2 本身有一定的 β-1，4-葡聚糖酶和几丁质酶水解活性，但水解圈不明显，而木霉重组株 L-15 的两种水解酶活性较 LTR-2 明显提高，水解圈较大，结果见图 3。



L-15/PDAH: L-15在PDAH平板上25℃培养5 d; L-15/PDA: L-15在PDA平板上25℃培养5 d; LTR-2/PDAH: LTR-2在PDAH平板上25℃培养5 d; LTR-2/PDA: LTR-2在PDA平板上25℃培养5 d
L-15/PDAH: L-15 on PDAH plate at 25℃ after 5 days; L-15/PDA: L-15 on PDA plate at 25℃ after 5 days; LTR-2/PDAH: LTR-2 on PDAH plate at 25℃ after 5 days; LTR-2/PDA: LTR-2 on PDA plate at 25℃ after 5 days

图 2　木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2 的菌落培养特征

Fig. 2　Colonial morphology of *Trichoderma* recombinant strain L-15 and wild strain LTR-2



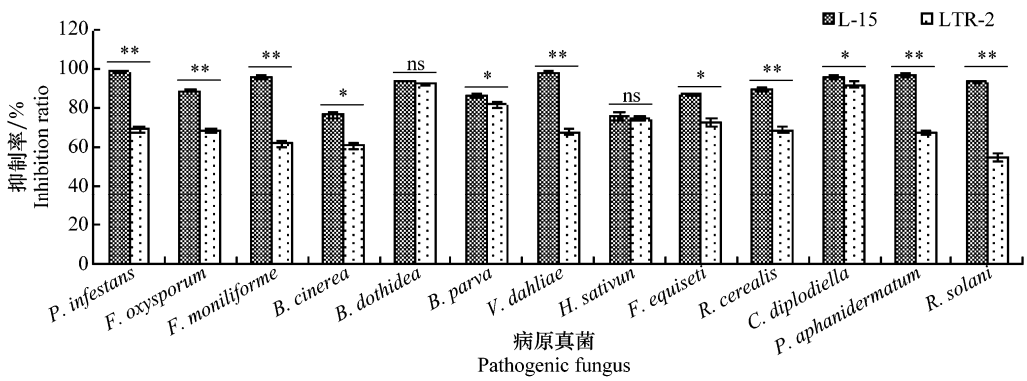
a: LTR-2的β-1, 4-葡聚糖酶水解活性; b: L-15的β-1, 4-葡聚糖酶水解活性; c: LTR-2的几丁质酶水解活性; d: L-15的几丁质酶水解活性
a: Hydrolytic activity of β-1, 4-glucanase in LTR-2; b: Hydrolytic activity of β-1, 4-glucanase in L-15; c: Hydrolytic activity of chitinase in LTR-2; d: Hydrolytic activity of chitinase in L-15

图 3　木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2 的水解酶活性

Fig. 3　The hydrolytic activity of *Trichoderma* recombinant strain L-15 and wild strain LTR-2

2.2.3　基因重组对 L-15 抑菌活性的影响

木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2 在 PDA 平板上对供试的 13 种植物病原真菌均有拮抗作用,L-15 的拮抗效果较好,对同一种病原真菌的抑制率较 LTR-2 均有所提高。L-15 对 *P. infestans*、*F. oxysporum*、*F. moniliforme*、*V. dahliae*、*R. cerealis*、*P. aphanidermatum* 及 *R. solani* 的抑制率与 LTR-2 存在极显著性差异($P<0.01$),L-15 对 *B. cinerea*、*B. parva*、*F. equiseti* 及 *C. diplodiella* 的抑制率与 LTR-2 存在显著性差异($P<0.05$),结果见图 4。说明通过基因重组,增强了 L-15 的抗菌活性。



ns表示处理间无显著差异, *表示处理间存在显著差异($P<0.05$), **表示处理间存在极显著差异($P<0.01$), 数据为3次重复的平均值±标准差
ns indicates insignificant difference. * and ** indicate significant difference ($P<0.05$ or $P<0.01$); data are the means of three repetitions with standard deviation

图 4　木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2 对植物病原真菌的平板拮抗作用

Fig. 4　The inhibition ratios of *Trichoderma* recombinant strain L-15 and wild strain LTR-2 against plant pathogenic fungus on PDA plate

2.3 木霉可湿性粉剂对番茄立枯病的温室防治效果

木霉重组株 L-15 可湿性粉剂 5℃下贮存 60 个月，制剂中活分生孢子含量为 2.0 亿/g，贮存后 L-15 制剂对番茄立枯病的温室防治效果见表 2，不同处理间病情指数差异较大，各处理组的病情指数与清水对照间存在极显著性差异（$P<0.01$），其中 L-15/10×和 L-15/100×两组处理的病情指数与其他处理间也存在极显著性差异（$P<0.01$），对番茄立枯病的防治效果分别达到了 89.27%和 86.52%，但两者间无显著性差异。

木霉重组株 L-15 可湿性粉剂为 5℃贮存 60 个月，野生株 LTR-2 可湿性粉剂为新配制，同一稀释度的 L-15 与 LTR-2 处理间均存在极显著性差异（$P<0.01$），说明在有效活孢子数相同的情况下，重组菌株 L-15 的生防效果明显好于野生株 LTR-2，贮存后不影响重组株的活性。

表 2 木霉重组株 L-15 和野生株 LTR-2 可湿性粉剂对番茄立枯病的温室防治效果1)

Table 2 The biocontrol efficiency of *Trichoderma* recombinant strain L-15 and wild strain LTR-2 wettable powder against tomato *Rhizoctonia* rot in greenhouse experiments

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防治效果/% Biocontrol efficiency
L-15/10×	(4.48±0.48)eD	89.27
L-15/100×	(5.63±0.94)eD	86.52
L-15/1 000×	(15.32±1.74)dC	63.32
LTR-2/10×	(14.79±2.51)dC	64.59
LTR-2/100×	(15.84±1.30)dC	62.08
LTR-2/1 000×	(23.85±1.30)bB	42.90
多菌灵 carbendazim	(20.63±2.26)cB	50.61
对照 Control	(41.77±1.91)aA	—

1) L-15/10×、L-15/100×、L-15/1 000×处理为 L-15 可湿性粉剂分别稀释至 10×、100×、1 000×；LTR-2/10×、LTR-2/100×、LTR-2/1 000×处理为 LTR-2 可湿性粉剂分别稀释至 10×、100×、1 000×。数据采用 SPSS 21.0 统计软件中的 Duncan 氏进行分析，结果为 3 次重复的平均值±标准差，不同小写字母表示各处理间在 0.05 水平上存在显著性差异，不同大写字母表示各处理间在 0.01 水平上存在极显著性差异。

L-15/10×, L-15/100× and L-15/1 000× indicate dilution of L-15 wettable powder by 10, 100 and 1 000 times, respectively. LTR-2/10×, LTR-2/100× and LTR-2/1 000× indicate dilution of LTR-2 wettable powder by 10, 100 and 1 000 times, respectively. Duncan analysis of the data is performed on SPSS 21.0 for Windows; data are the means of three repetitions with standard deviation. Different lowercase and capital letters indicate significant difference ($P<0.05$ or $P<0.01$) between the treatments.

3 讨论

木霉是一类重要的生防菌，产品货架期短和防治效果不稳定是制约木霉推广应用的技术瓶颈。为了研发货架期长、生防性能高的木霉制剂，本文利用木霉重组株 L-15 制备可湿性粉剂，贮存结果表明，制剂中分生孢子存活率不低于 80.0%时，室温贮存期为 9 个月，5℃下为 24 个月；而野生株 LTR-2 可湿性粉剂分生孢子存活率不低于 80.0%时，室温贮存期为 6 个月，5℃下为 12 个月。L-15 可湿性粉剂在 5℃下延长贮存期至 60 个月，分生孢子存活率不低于 20.0%。木霉重组株 L-15 可湿性粉剂的贮存结果明显好于野生株 LTR-2，高于前人报道的分生孢子制剂的保质期限[7-9, 21-22]，也好于张晶晶和 Mishra 等研制的厚垣孢子制剂[23-24]。室温下贮存期短的原因可能是温度范围变化较大（2～36℃），且高温期较长，在高于 25℃的高温下孢子自身消耗严重。木霉重组株 L-15 的贮存稳定性较野生株 LTR-2 明显提高，推测原因可能是外源基因的随机插入，导致了某些基因位点发生突变，分生孢子壁结构与组成更稳固，进而较野生株 LTR-2 更耐贮存，具体原因有待进一步探讨。

木霉重组株 L-15 具有外源 β-1，4-葡聚糖酶基因 *glu*14 和几丁质酶基因 *chi*42，可有效降解病原真菌的细胞壁，抑菌活性测定结果表明，L-15 对供试病原真菌的抑制率均高于 LTR-2。温室条件下，在有效活孢子数相同的情况下，L-15 制剂对番茄立枯病的生防效果明显好于 LTR-2，贮存后不影响重组菌株的活性。两组处理 L-15/10×和 L-15/100×对番茄立枯病的防治效果较好，与其他处理间存在极显著性差异（$P<0.01$），但两者间无差异，综合成本和防效考虑，L-15 可湿性粉剂的分生孢子含量为 2.0 亿/g 时，灌根时以稀释 100×为最优选使用剂量。

截至 2018 年 4 月，我国已登记注册的微生物农药产品 509 个，其中木霉 15 个，占比只有 2.9%[25]，与欧美发达国家相比差距较大。原因除政策因素和企业因素外，与生物农药产品自身的特点有很大的关系，主要缺点是产品见效慢、防治谱窄、抗逆性（如高温、干燥、紫外辐射等）和耐贮性（常温 1 年以上）

差[3]。故应加大研发力度,选育广谱高效木霉菌株,研制适合商品化生产的木霉制剂。本文从基因重组的角度对木霉的货架期和防效进行研究,为制剂研制提供了科学依据。下一步将对木霉重组株 L-15 进行安全性评价,争取高效重组菌株的进一步应用推广。

参考文献

[1] WEINDLING R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi [J]. Phytopathology, 1932, 22(8): 837 - 845.

[2] KUMAR G, MAHARSHI A, PATEL J, et al. *Trichoderma*: a potential fungal antagonist to control plant diseases [J]. SATSA Mukhapatra-Annual Technical Issue, 2017, 21: 206 - 218.

[3] 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.

[4] 陈捷,朱洁伟,张婷,等. 木霉菌生物防治作用机理与应用研究进展[J]. 中国生物防治学报,2011,27(2):145 - 151.

[5] LORITO M, WOO S L, HARMAN G E, et al. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field [J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 48(1): 395 - 417.

[6] LOCATELLI G O, SANTOS G F D, BOTELHO P S, et al. Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life [J]. Biological Control, 2018, 117: 21 - 29.

[7] GUPTA M, DOHROO N P. Shelf life study of formulations of fungal and bacterial antagonists as bioinoculants [J]. Agricultural Science Digest, 2014, 34(4): 281 - 284.

[8] KHAN M R, MAJID S, MOHIDIN F A, et al. A new bioprocess to produce low cost powder formulations of biocontrol bacteria and fungi to control fusarial wilt and root-knot nematode of pulses [J]. Biological Control, 2011, 59(2): 130 - 140.

[9] WITKOWSKA D, KANCELISTA A, WILCZAK A, et al. Survivability and storage stability of *Trichoderma atroviride* TRS40 preserved by fluidised bed drying on various agriculture by-products [J]. Biocontrol Science and Technology, 2016, 26(12): 1591 - 1604.

[10] RAI D, TEWARI A K. Shelf life studies of different formulations based on *Trichoderma harzianum* (Th14) [J]. Annals of Biological Research, 2016, 7(7): 1 - 5.

[11] BHAI R S, ANANDARAJ M. Enhancing shelf life of *Trichoderma harzianum* by conidial storage in sterile deionized water [J]. Journal of Spices and Aromatic Crops, 2014, 23(2): 243 - 249.

[12] OANCEA F, RAUT I, EUGENIA T, et al. Dry flowable formulation of biostimulants *Trichoderma* strains [J]. Agriculture and Agricultural Science Procedia, 2016, 10: 494 - 502.

[13] 农业部农药检定所. 木霉菌母药:NY/T 2888.1 - 2016 [S]. 北京:中国农业出版社,2016.

[14] 农业部农药检定所. 木霉菌可湿性粉剂:NY/T 2888.2 - 2016 [S]. 北京:中国农业出版社,2016.

[15] 唐永庆,许艳丽,张红骥,等. 木霉制剂的生防应用研究及发展前景[J]. 黑龙江农业科学,2008(1):111 - 113.

[16] KUMAR S, THAKUR M, RANI A. *Trichoderma*: mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases [J]. African Journal of Agricultural Research, 2014, 53(9): 3838 - 3852.

[17] 景芳,徐秉良,梁巧兰,等. 长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum* T6 水分散粒剂的研制[J]. 农药学学报,2016,18(2):241 - 248.

[18] 景芳,徐秉良,古丽君,等. 利用马铃薯残渣等废弃物生产长枝木霉颗粒剂的研究[J]. 甘肃农业大学学报,2017,52(3):51 - 57.

[19] 陈凯,杨合同,李纪顺,等. 绿色木霉菌 LTR-2 孢子提取物的抑菌活性及化学成分分析[J]. 微生物学通报,2007,34(3):455 - 458.

[20] 李纪顺,陈凯,王贻莲,等. 哈茨木霉 LTR-2 双价基因重组菌株的构建及其防治效果[J]. 中国生物防治学报,2015,31(3):346 - 352.

[21] MEENA P D, CHATTOPADHYAY C, GOYAL P, et al. Shelf life and efficacy of talc-based bio-formulations of *Trichoderma harzianum* isolates in management of *Sclerotinia* rot of Indian mustard (*Brassica juncea*) [J]. Annals of Plant Protection Sciences, 2014, 22(1): 127 - 135.

[22] SRIRAM S, ROOPA K P, SAVITHA M J. Extended shelf-life of liquid fermentation derived talc formulations of *Trichoderma harzianum* with the addition of glycerol in the production medium [J]. Crop Protection, 2011, 30(10): 1334 - 1339.

[23] 张晶晶,徐文,黄亚丽,等. 木霉 Tr-92 厚垣孢子可湿性粉剂的储存性能及应用效果[J]. 植物保护学报,2017,44(3):495 - 500.

[24] MISHRA D S, PRAJAPATI C R, GUPTA A K, et al. Relative bio-efficacy and shelf-life of mycelial fragments, conidia and chlamydospores of *Trichoderma harzianum* [J]. India Journal of Society for Plant Research, 2012, 25(1): 225 - 232.

[25] 刘晓漫,曹坳程,王秋霞,等. 我国生物农药的登记及推广应用现状[J]. 植物保护,2018,44(5):101 - 107.

(责任编辑:田　喆)