



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108203703 B

(45) 授权公告日 2021.04.09

(21) 申请号 201810249695.5	A01N 63/32 (2020.01)
(22) 申请日 2018.03.26	A01N 63/38 (2020.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A01N 63/27 (2020.01)
申请公布号 CN 108203703 A	A01P 3/00 (2006.01)
(43) 申请公布日 2018.06.26	C12R 1/645 (2006.01)
(73) 专利权人 南宁汉和生物科技股份有限公司	C12R 1/885 (2006.01)
地址 530000 广西壮族自治区南宁市创业	C12R 1/38 (2006.01)
路17号	(56) 对比文件
(72) 发明人 叶志坚 齐晔 周竞夫 朱锡杭	CN 104928221 A, 2015.09.23
朱增湖	CN 107189965 A, 2017.09.22
(74) 专利代理机构 东莞市神州众达专利商标事	CN 105274029 A, 2016.01.27
务所(普通合伙) 44251	CN 106396863 A, 2017.02.15
代理人 周松强	仇艳肖. “黄瓜灰霉病高效拮抗菌的筛选鉴定及其作用研究”. 《中国优秀硕士学位论文全文数据库(电子期刊)农业科技辑》. 2013, (第3(2013)期), D046-97.
(51) Int. Cl.	审查员 王琳
C12N 1/20 (2006.01)	权利要求书1页 说明书5页
C12N 1/16 (2006.01)	
C12N 1/14 (2006.01)	

(54) 发明名称
一种生防菌剂及其在防治灰霉病中的应用

(57) 摘要
本发明属于微生物技术领域,公开了一种生防菌剂,其包括丝孢酵母、康氏木霉以及施氏假单胞菌。本发明生防菌剂可有效抑制番茄灰霉病病原菌的生长,环保无污染,不会产生抗性,有利于作物的无公害生产。

1. 一种生防菌剂,其特征在于,所述生防菌剂按照如下工艺制备而得:

1) 将丝孢酵母划线接种在YPD培养基上培养,得到单菌落;挑取单菌落接种到YPD液体培养基上培养,30℃培养24h,得到丝孢酵母种子液,待用;

2) 将康氏木霉划线接种在PDA培养基上培养,得到单菌落;挑取单菌落接种到PDA液体培养基上培养,30℃、200rpm摇床培养36h,得到康氏木霉种子液,待用;

3) 先将康氏木霉种子液按照10-15%的接种量接入到发酵培养基中,30℃培养6小时,然后将丝孢酵母种子液按照5-7%的接种量接入到发酵培养基,继续以30℃培养18小时,得到康氏木霉-丝孢酵母混合发酵液;

4) 将施氏假单胞菌在LB平板上划线培养,得到单菌落;挑取单菌落分别接入LB液体培养基上培养,28℃,200r/min的摇床培养24h,制成种子液;然后按照10%的接种量接入到扩大培养基中,28℃培养24h,得到施氏假单胞菌培养液;

5) 将康氏木霉-丝孢酵母混合发酵液和施氏假单胞菌培养液按照2-3:1-2的体积比混合均匀,然后真空冷冻干燥制得菌粉,即得;

所述发酵培养基的配方为:玉米秸秆粉16g/L、豆粕10g/L、氯化铵5g/L、磷酸氢二钾2g/L、磷酸二氢钾1g/L、氯化钠0.5g/L、硫酸镁0.1g/L、硫酸亚铁0.01g/L;

所述扩大培养基的配方为:玉米淀粉12g/L、酵母提取物10g/L、氯化钠5g/L、尿素2g/L、磷酸二氢钾0.1g/L、磷酸氢二钾0.1g/L、硫酸亚铁0.01g/L、硫酸锰0.01g/L;

所述施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)为ATCC17588;所述康氏木霉(*Trichoderma koningii*)为ATCC66766;所述丝孢酵母(*Trichosporium* sp.)为ATCC201110。

2. 根据权利要求1所述的生防菌剂,其特征在于,所述YPD培养基的配方为:葡萄糖20g,蛋白胨20g,酵母提取浸粉10g,补充蒸馏水至1000mL。

3. 根据权利要求1所述的生防菌剂,其特征在于,所述YPD培养基的配方为:葡萄糖20g,蛋白胨20g,酵母提取浸粉10g,琼脂20g,补充蒸馏水至1000mL。

一种生防菌剂及其在防治灰霉病中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及一种生防菌剂及其在防治灰霉病中的应用。

背景技术

[0002] 灰霉病是露地、保护地作物常见且比较难防治的一种真菌性病害,属低温高湿型病害,病原菌生长温度为20~30℃,温度20~25℃、湿度持续90%以上时为病害高发期。灰霉病由灰葡萄孢菌侵染所致,属真菌病害,花、果、叶、茎均可发病。果实染病,青果受害重,残留的柱头或花瓣多先被侵染,后向果实扩展,致使果皮呈灰白色,并生有厚厚的灰色霉层,呈水腐状,叶片发病从叶尖开始,沿叶脉间成“V”形向内扩展,灰褐色,边有深浅相间的纹状线,病键交界分明。该病害是一种典型的气传病害,可随空气、水流以及农事作业传播。在实际病害防治过程中,难以采取有效措施彻底切断传染源;在病原菌侵入的情况下,也难以彻底消灭病原菌,如药剂喷施,难以解决空气及露水中的病原菌;而单独熏棚,不能重点解决病叶、病果等病残体上或内部的病原菌。灰霉病病苗色浅,叶片、叶柄发病呈灰白色,水渍状,组织软化至腐烂,高湿时表面生有灰霉。幼茎多在叶柄基部出现不规则水浸斑,很快变软腐烂,缢缩或折倒,最后病苗腐烂枯萎病死。

[0003] 防治方法可分为农业防治、化学防治和生物防治。农药防治包括对种子进行灭菌处理、合理种植密度、控制合适湿度以及通风等;化学防治目前应用比较广泛,对灰霉病的主要防治措施是喷洒化学药剂等手段,但是由于长期的使用化学药使得灰霉病菌对多种杀菌剂产生了抗药性。我国多地区的田间和保护地栽培设施中的多种蔬菜上的灰霉病菌都产生了较为严重的抗药性,甚至有些地区的灰霉病对多菌灵等杀菌剂的抗性达到80%以上。寻求新的防治措施成为灰霉病防治的重中之重。生物防治措施作为一种新兴的防治措施,与其他方法相比,具有安全、有效、持久的特点,特别是避免了化学防治带来的一系列问题。生物防治方法是采用微生物对灰霉进行杀灭,目前已经开始在农业上推广使用,比较常见的是于发病前或初期使用3亿CFU/克哈茨木霉菌300喷雾,兑水喷雾,每隔5-7天喷施一次,可在一定程度上防治灰霉病的发生。生物防治对病害防治效果好,对人畜无毒,不污染环境,无残留;对病虫害的杀伤特异性强,不伤害天敌,有益生物,能保持生态平衡;生产原料和有效成分为天然产物易降解,可回归大自然,保证可持续发展。因此生物防治灰霉病方法逐渐成为研究的热点,大量的拮抗微生物被筛选出来加以利用来对灰霉病进行防治。单一菌株往往存在防治效果低下、药效慢等缺陷,目前已经有多个生物农药公司开始研究复合微生物制剂。复合微生物制剂一般是指包括两种以上的微生物的制剂,选择复合微生物制剂中的菌株较为关键,也是难点;如果选择不慎,菌株之间反而会起到相互拮抗的反作用。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术复合微生物制剂种类少,菌株配伍难等缺陷,本发明提供了一

种生防菌剂及其在防治灰霉病中的应用。

[0005] 本发明是通过如下技术方案来实现的：

[0006] 一种生防菌剂，其包括丝孢酵母、康氏木霉以及施氏假单胞菌。

[0007] 具体地，

[0008] 所述生防菌剂按照如下工艺制备而得：

[0009] 1) 将丝孢酵母划线接种在YPDA培养基上培养，得到单菌落；挑取单菌落接种到YPD液体培养基上培养，30℃培养24h，得到丝孢酵母种子液，待用；

[0010] 2) 将康氏木霉划线接种在PDA培养基上培养，得到单菌落；挑取单菌落接种到PDA液体培养基上培养，30℃、200rpm摇床培养36h，得到康氏木霉种子液，待用；

[0011] 3) 先将康氏木霉种子液按照10-15%的接种量接入到发酵培养基中，30℃培养6小时，然后将丝孢酵母种子液按照5-7%的接种量接入到发酵培养基，继续以30℃培养18小时，得到康氏木霉-丝孢酵母混合发酵液；

[0012] 4) 将施氏假单胞菌在LB平板上划线培养，得到单菌落；挑取单菌落分别接入LB液体培养基上培养，28℃，200r/min的摇床培养24h，制成种子液；然后按照10%的接种量接入到扩大培养基中，28℃培养24h，得到施氏假单胞菌培养液；

[0013] 5) 将康氏木霉-丝孢酵母混合发酵液和施氏假单胞菌培养液按照2-3:1-2的体积比混合均匀，然后真空冷冻干燥制得菌粉，即得。

[0014] 进一步地，

[0015] 所述施氏假单胞菌优选ATCC 17588；所述康氏木霉优选ATCC 66766；所述丝孢酵母优选ATCC 201110。

[0016] 优选地，

[0017] 所述YPD培养基的配方为：葡萄糖20g，蛋白胨20g，酵母提取浸粉10g，补充蒸馏水至1000mL。

[0018] 优选地，

[0019] 所述YPDA培养基的配方为：葡萄糖20g，蛋白胨20g，酵母提取浸粉10g，琼脂20g，补充蒸馏水至1000mL。

[0020] 优选地，

[0021] 所述发酵培养基的配方为：玉米秸秆粉16g/L、豆粕10g/L、氯化铵5g/L、磷酸氢二钾2g/L、磷酸二氢钾1g/L、氯化钠0.5g/L、硫酸镁0.1g/L、硫酸亚铁0.01g/L。

[0022] 优选地，

[0023] 所述扩大培养基的配方为：玉米淀粉12g/L、酵母提取物10g/L、氯化钠5g/L、尿素2g/L、磷酸二氢钾0.1g/L、磷酸氢二钾0.1g/L、硫酸亚铁0.01g/L、硫酸锰0.01g/L。

[0024] 与现有技术相比，本发明取得的有益效果主要包括但是并不限于以下几个方面：

[0025] 丝孢酵母和康氏木霉之间无拮抗作用，可以相互共生，木霉菌能够分泌纤维素酶，将秸秆纤维素分解为丝孢酵母可利用的碳源，从而使得丝孢酵母能够利用农业废弃物作为碳源进行生长，所以采用先接入康氏木霉的方式，6小时后接入酵母菌；酵母菌反过来还能促进康氏木霉的生长，并且使得木霉的产酶量也大大提高，从而提高拮抗灰霉菌的能力；

[0026] 施氏假单胞菌能够分泌抗菌物质能够分泌多种活性酶和植物刺激素，促进植株根系以及植株生长，增强抗逆性，使得植物对灰霉病产生拮抗作用，还能够通过营养与空间的

竞争来抑制灰霉病；发明人在试验中发现，施氏假单胞菌与丝孢酵母菌-康氏木霉具备较好的协同作用，能够大大提高杀灭灰霉病的能力，可能原因在于它们之间具有类似于共生的关系，施氏假单胞菌的代谢物为丝孢酵母菌的繁殖提供了一些必要的促生长因子，从而促进快速繁殖并产生大量拮抗物质，然后通过这类物质的作用而导致灰霉菌不能正常生长；具体的作用机理，发明人会在后续的试验中做进一步的深入研究。此外，本试验只是针对灰霉菌的拮抗进行了研究，至于对其它土传致病菌病害的防治效果也有待于进一步研究。

[0027] 本发明属于生防微生物制剂，完全没有化学防治所带来的一系列问题，因而有利于作物的无公害生产，农民可以不用或减少其他防治灰霉病以及提高抗逆性和促生的措施，这不仅可为农民种植减轻负担，而且有利于作物的出口，提高产品品质，增加产品附加值。同时，生防制剂还具有对作物增产功效，可为农民增加收入。

具体实施方式

[0028] 为了使本技术领域的人员更好地理解本申请中的技术方案，下面将结合本申请具体实施例，对本申请的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本申请中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都应当属于本发明保护的范围。

[0029] 实施例1

[0030] 一种生防菌剂，其包括丝孢酵母、康氏木霉以及施氏假单胞菌。

[0031] 具体地，所述生防菌剂按照如下工艺制备而得：

[0032] 将丝孢酵母划线接种在YPDA培养基上培养，得到单菌落；挑取单菌落接种到YPD液体培养基上培养，30℃培养24h，得到种子液，待用；

[0033] YPD培养基的配方：葡萄糖20g，蛋白胨20g，酵母提取浸粉10g，补充蒸馏水至1000mL；

[0034] YPDA培养基的配方：葡萄糖20g，蛋白胨20g，酵母提取浸粉10g，琼脂20g，补充蒸馏水至1000mL；

[0035] 将康氏木霉划线接种在PDA培养基上培养，得到单菌落；挑取单菌落接种到PDA液体培养基上培养，30℃、200rpm摇床培养36h，得到种子液，待用；

[0036] 先将康氏木霉种子液按照10%的接种量（接种密度为 1×10^7 CFU/ml）接入到发酵培养基中，30℃培养6小时，然后将丝孢酵母种子液按照5%的接种量（接种密度为 0.5×10^7 CFU/ml）接入到发酵培养基，继续以30℃培养18小时，得到康氏木霉-丝孢酵母混合发酵液；所述发酵培养基的组分为：玉米秸秆粉16g/L、豆粕10g/L、氯化铵5g/L、磷酸氢二钾2g/L、磷酸二氢钾1g/L、氯化钠0.5g/L、硫酸镁0.1g/L、硫酸亚铁0.01g/L；

[0037] 将施氏假单胞菌在LB平板上划线培养，得到单菌落；挑取单菌落分别接入LB液体培养基上培养，28℃，200r/min的摇床培养24h，制成种子液；然后按照10%的接种量（接种密度为 3×10^7 CFU/ml）接入到扩大培养基中，28℃培养24h，得到施氏假单胞菌培养液；所述扩大培养基的配方为：玉米淀粉12g/L、酵母提取物10g/L、氯化钠5g/L、尿素2g/L、磷酸二氢钾0.1g/L、磷酸氢二钾0.1g/L、硫酸亚铁0.01g/L、硫酸锰0.01g/L。

[0038] 将康氏木霉-丝孢酵母混合发酵液和施氏假单胞菌培养液按照2:1的体积比混合均匀，然后真空冷冻干燥制得菌粉，即得。

[0039] 所述施氏假单胞菌为ATCC 17588;所述康氏木霉为ATCC 66766;所述丝孢酵母为ATCC 201110。

[0040] 实施例2

[0041] 一种生防菌剂,其包括丝孢酵母、康氏木霉以及施氏假单胞菌。

[0042] 具体地,所述生防菌剂按照如下工艺制备而得:

[0043] 将丝孢酵母划线接种在YPD培养基上培养,得到单菌落;挑取单菌落接种到YPD液体培养基上培养,30℃培养24h,得到种子液,待用;

[0044] YPD培养基的配方:葡萄糖20g,蛋白胨20g,酵母提取浸粉10g,补充蒸馏水至1000mL;

[0045] YPD培养基的配方:葡萄糖20g,蛋白胨20g,酵母提取浸粉10g,琼脂20g,补充蒸馏水至1000mL;

[0046] 将康氏木霉划线接种在PDA培养基上培养,得到单菌落;挑取单菌落接种到PDA液体培养基上培养,30℃、200rpm摇床培养36h,得到种子液,待用;

[0047] 先将康氏木霉种子液按照15%的接种量(接种密度为 3×10^7 CFU/ml)接入到发酵培养基中,30℃培养6小时,然后将丝孢酵母种子液按照7%的接种量(接种密度为 1×10^7 CFU/ml)接入到发酵培养基,继续以30℃培养18小时,得到康氏木霉-丝孢酵母混合发酵液;所述发酵培养基的组分为:玉米秸秆粉16g/L、豆粕10g/L、氯化铵5g/L、磷酸氢二钾2g/L、磷酸二氢钾1g/L、氯化钠0.5g/L、硫酸镁0.1g/L、硫酸亚铁0.01g/L;

[0048] 将施氏假单胞菌在LB平板上划线培养,得到单菌落;挑取单菌落分别接入LB液体培养基上培养,28℃,200r/min的摇床培养24h,制成种子液;然后按照10%的接种量(接种密度为 3×10^7 CFU/ml)接入到扩大培养基中,28℃培养24h,得到施氏假单胞菌培养液;所述扩大培养基的配方为:玉米淀粉12g/L、酵母提取物10g/L、氯化钠5g/L、尿素2g/L、磷酸二氢钾0.1g/L、磷酸氢二钾0.1g/L、硫酸亚铁0.01g/L、硫酸锰0.01g/L。

[0049] 将康氏木霉-丝孢酵母混合发酵液和施氏假单胞菌培养液按照3:2的体积比混合均匀,然后真空冷冻干燥制得菌粉,即得。

[0050] 实施例3

[0051] 番茄灰霉病拮抗实验:

[0052] 实验组别:实验组:实施例1;对照组1:采用康氏木霉-丝孢酵母混合发酵液,其余同实施例1;对照组2:采用施氏假单胞菌培养液,其余同实施例1;对照组3:将康氏木霉和丝孢酵母分开进行发酵,将康氏木霉发酵液、丝孢酵母发酵液以及施氏假单胞菌培养液混合制备菌粉,其余同实施例1。

[0053] 菌剂预处理:将上述生防菌剂接入到活化培养基进行活化2-3天,菌落边缘用打孔器打出菌饼,直径为6mm。制作PDA平板,然后在一侧接入生防菌剂,另一侧接入预先培养的番茄灰霉病菌饼(直径为6mm),置于25℃培养箱中,进行培养,每隔24h测量1次抑菌带距离,计算抑菌率和拮抗级数,并取生防菌株和病原菌菌落交界处的病原菌菌丝在光学显微镜下观察菌丝变化,测量菌丝长度(mm),3次重复。具体结果见表1-2。

[0054] 表1 生防菌剂对病原菌菌丝长度(mm)的影响

[0055]

组别	24h	48h	72h	96h
空白对照组	7.98	15.21	25.64	34.96

对照组1	5.39	8.79	10.22	11.17
对照组2	6.85	11.26	14.57	13.26
对照组3	4.32	7.35	9.84	8.41
实验组	3.17	6.34	7.79	5.36

[0056] 表2 生防菌剂对灰霉病病原菌的抑制作用

组别	抑菌率%	病原菌菌落	交界处病原菌菌丝
对照组1	68.05	僵持	断裂
对照组2	62.36	僵持	断裂
对照组3	75.94	萎缩	消解
实验组	84.67	萎缩	消解

[0058] 从表1、表2可以看出,4种生防菌剂均可抑制番茄灰霉病病原菌的生长,抑菌率均达到60%以上,其中,实验组最高,可达到84.67%,对照组1最低,对照组2次之,生防菌、病原菌菌丝交界处病原菌菌丝消解或断裂;对照组3和实验组对峙的病原菌菌落呈现萎缩现象,抑菌效果较好,但是实验组的抑菌效果更好,说明丝孢酵母、康氏木霉的接种顺序对抑菌性能产生一定的积极影响。

[0059] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的