



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103184162 A

(43) 申请公布日 2013. 07. 03

(21) 申请号 201310144073. 3

A01P 3/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 04. 24

C12R 1/885 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 7503 2013. 04. 22

(71) 申请人 牛贍光

地址 250014 山东省济南市历下区文化东路
42 号

申请人 李鹏

(72) 发明人 王清海 李鹏 刘幸红 李泉涌

李红梅 牛贍光

(74) 专利代理机构 济南诚智商标专利事务所有

限公司 37105

代理人 韩百翠

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006. 01)

A01N 63/04 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

序列表1页

(54) 发明名称

一株棘孢木霉及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株棘孢木霉及其应用,属于生物防治植物病害领域。该菌株为棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*) WStr03,保藏编号为CGMCC No. 7503。本发明还公开了含有上述菌株的生物防治制剂及其制备方法。本发明的棘孢木霉菌株具有生长速度快、产孢量大、作用谱广、抗逆性强,在植物根际能够快速大量定殖等特点,因此具有良好的应用前景。由该棘孢木霉制备的生物防治制剂,不仅能够高效的防治植物土传病害,还能有效提高作物产量,是一种极具应用前景的生物防治制剂。该微生物制剂可以作为生物农药或生物肥料,防治多种土传植物病害,包括棉花枯萎病等。

1. 棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)菌株 WS Tr03,所述菌株的保藏编号为 CGMCC No. 7503。

2. 权利要求 1 所述的棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)菌株 WS Tr03 在防治植物土传病害中的用途。

3. 如权利要求 2 所述的用途,其特征是,所述植物土传病害为棉花枯萎病、板栗枝枯病、石榴干腐病、黄瓜炭疽病、苹果炭疽病、葡萄炭疽病、葡萄白腐病、西瓜炭疽病、冬枣黑斑病中的一种或几种。

4. 一种生物防治制剂,包括权利要求 1 所述的棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)菌株 WS Tr03。

5. 一种制备权利要求 4 所述的生物防治制剂的方法,其特征是,包括以下步骤:

(1) 制备棘孢木霉菌株 WS Tr03 的种子液;

(2) 将步骤(1)制备的种子液接种到固体培养基中,28-30℃下恒温培养;

(3)将步骤(2)培养的培养物加入无菌水混合,过滤,将滤液接种至大量发酵培养基,在室温 28-30℃、相对湿度 85% 以上的发酵室中进行发酵培养。

6. 如权利要求 5 所述的制备方法,其特征是,

(1) 将棘孢木霉菌株 WS Tr03 的孢子移植到 PDB 液体培养基中,28-30℃摇床振荡培养 3~5 天得到种子液;

(2) 将步骤(1)制备的种子液按质量比 10% 的比例接种到固体培养基中,28-30℃下振荡培养 3~5 天;

(3) 将步骤(2)培养的培养物加入其质量 15 倍的无菌水混合,过滤,将滤液按体积比 1:6 的比例接种至大量发酵培养基,恒温 28-30℃、相对湿度 85% 以上的发酵室中发酵培养 8~9 天;

所述步骤(1)中的 PDB 液体培养基为:马铃薯 200g,葡萄糖 20g,蒸馏水 1000mL;

所述步骤(2)中的固体培养基由固料和无机盐溶液组成,所述固料和无机盐溶液的比例为质量比 1:1.8;所述固料由质量比为 50:40:10 的玉米芯、麸皮和稻壳组成;按质量百分比计,所述无机盐溶液包含 3.5% 磷酸二氢钾,0.04% 硫酸镁,4% 硫酸铵,剩余为水;

所述步骤(3)中的大量发酵培养基同步骤(2)中的固体培养基。

7. 权利要求 4 所述的生物防治制剂在防治植物土传病害中的用途。

8. 如权利要求 7 所述的用途,其特征是,所述植物土传病害为棉花枯萎病、板栗枝枯病、石榴干腐病、黄瓜炭疽病、苹果炭疽病、葡萄炭疽病、葡萄白腐病、西瓜炭疽病、冬枣黑斑病中的一种或几种。

9. 一种植物土传病害的生物防治方法,其特征是,向具有土传病害的植物施用权利要求 1 的棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)菌株 WS Tr03 或者权利要求 4 的生物防治制剂。

一株棘孢木霉及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物防治植物病害领域。具体而言,本发明涉及一种能够高效防治植物病害的棘孢木霉菌及其用途,以及采用该棘孢木霉菌制备的生物防治制剂。

背景技术

[0002] 木霉(*Trichoderma* spp.)属于半知菌类的丝孢纲、丛梗孢目、丛梗孢科,是一类广泛分布于土壤、空气、枯枝落叶及各种发酵物上的真菌,从植物根圈、叶片及种子、球茎表面均可以分离到。木霉是自然界普遍存在并有丰富资源的拮抗微生物。木霉菌生长繁殖速度快,能够迅速占领营养空间,可分泌产生抗生素抑制其他病原菌生长,还可以通过营养竞争、重寄生、细胞壁降解酶以及诱导植物产生抗性等作用机制,达到抑制病害的目的,是生防菌株中研究最为广泛的菌株之一。目前已经发现的木霉菌 30 多个种中的许多具有生防潜力,如哈茨木霉、绿木霉、康氏木霉、钩木霉和长枝木霉等,对 18 个属 29 种植物病原菌表现出拮抗活性。木霉对植物病原菌的生物防治机制是多样而复杂的,常常是多种机制共同作用的结果,不同的菌株生防机制的侧重点不同,其生防作用效果与菌株类型、病原真菌的类型、作物类型和环境条件密切相关。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种用于高效防治多种植物病害的新的木霉菌株——棘孢木霉 WSTr03。本发明的棘孢木霉菌株具有生长速度快、产孢量大、作用谱广、抗逆性强,在植物根际能够快速大量定殖等特点,因此具有良好的应用前景。

[0004] 本发明所提供的菌株为棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*) WS Tr03,是从山东省潍坊市潍北地区沿海滩涂地块的土壤中分离获得的,已于 2013 年 4 月 22 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号,中国科学院微生物研究所),保藏号为 CGMCC No. 7503。其具有以下生物学特性:在 PDA 培养基上,25℃ 黑暗条件下培养 7 天,菌落直径扩展 80mm,初期白色稀疏,后变为灰绿色,絮状。反面无色。菌丝具隔,分枝。分生孢子梗便形成松柏式的分枝轮廓,分枝末端的小梗束生、对生、互生或单生,瓶形,6-10×3-4.5 μm。分生孢子椭圆形、单个、近无色,聚集时呈淡黄绿色,壁光滑或稍粗糙,4-5.5×3-4 μm。

[0005] 本发明棘孢木霉菌株 WS Tr03 的培养方法或繁殖方法包括:

[0006] (1) 普通培养保存采用 PDA 培养基,配方为马铃薯 200g,葡萄糖 20g,琼脂 12g,蒸馏水 1000mL;

[0007] (2) 实验室液体培养采用 PDB 培养基,配方为马铃薯 200g,葡萄糖 20g,蒸馏水 1000mL。

[0008] (3) 固体培养基配方:固料和无机盐溶液,按质量比 1:1.8 的比例配制。其中所述固料由质量比为 50:40:10 的玉米芯、麸皮和稻壳组成;按质量百分比计,所述无机盐溶液包括 3.5% 磷酸二氢钾,0.04% 硫酸镁,4% 硫酸铵,剩余为水。

[0009] (4) 大量发酵培养配方 :同(3) 中固体培养基配方。

[0010] 本发明还提供一种用于防治植物土传病害的生物防治制剂,所述生物防治制剂包括所述的棘孢木霉菌株 WS Tr03。

[0011] 并且,本发明还提供了一种用于防治植物土传病害的生物防治方法,所述生物防治方法包括向具有土传病害的植物施用上述棘孢木霉菌株 WS Tr03 或者上述生物防治制剂。

[0012] 本发明也提供了上述棘孢木霉菌株 WS Tr03 或者上述生物防治制剂在防治植物土传病害中的用途。

[0013] 就上述生物防治制剂、生物防治方法以及用途而言,所述植物病害可以选自棉花枯萎病、板栗枝枯病、石榴干腐病、黄瓜炭疽病、苹果炭疽病、葡萄炭疽病、葡萄白腐病、西瓜炭疽病、冬枣黑斑病等一种或几种。

[0014] 本发明所述的生物防治制剂的制备方法,包括以下步骤:

[0015] (1) 制备棘孢木霉菌株 WS Tr03 的种子液;

[0016] (2) 将步骤(1) 制备的种子液接种到固体培养基中,28-30℃ 下恒温培养;

[0017] (3) 将步骤(2) 培养的培养物用无菌水按质量比 1 :15 的比例混合,过滤,将滤液接种至大量发酵培养基,在室温 28-30℃、相对湿度 85% 以上的发酵室中进行发酵培养。

[0018] 其中,步骤(2) 中的固体培养基由固料和无机盐溶液组成,所述固料和无机盐溶液的比例为质量比 1 :1.8 ;所述固料由质量比为 50 :40 :10 的玉米芯、麸皮和稻壳组成 ;按质量百分比计,所述无机盐溶液包含 3.5% 磷酸二氢钾,0.04% 硫酸镁,4% 硫酸铵,剩余为水。

[0019] 并且,步骤(3) 中的大量发酵培养基同固体培养基

[0020] 在本发明的一个具体实施方案中,所述制备方法包括以下步骤:

[0021] (1) 将棘孢木霉菌株 WS Tr03 的孢子移植到 PDB 液体培养基中,28-30℃ 摇床振荡培养 3 ~ 5 天得到种子液;

[0022] (2) 将步骤(1) 制备的种子液按质量比 10% 的比例接种到固体培养基中,28-30℃ 下振荡培养 3 ~ 5 天;

[0023] (3) 将步骤(2) 培养的培养物用无菌水按质量比 1 :15 的比例混合,过滤,将滤液按体积比 1 :6 的比例接种至大量发酵培养基,室温 28-30℃、相对湿度 85% 以上的发酵室中发酵培养 8 ~ 9 天。

[0024] 其中,步骤(1) 中的所述 PDB 液体培养基同上;

[0025] 步骤(2) 中的固体培养基由固料和无机盐溶液组成,所述固料和无机盐溶液的比例为质量比 1 :1.8 ;所述固料由质量比为 50 :40 :10 的玉米芯、麸皮和稻壳组成 ;按质量百分比计,所述无机盐溶液包含 3.5% 磷酸二氢钾,0.04% 硫酸镁,4% 硫酸铵,剩余为水;

[0026] 步骤(3) 中的大量发酵培养基同步骤(2) 的固体培养基。

[0027] 实验表明,本发明的棘孢木霉菌株具有生长速度快、产孢量大、作用谱广、抗逆性强,在植物根际能够快速大量定殖等特点,因此具有良好的应用前景。由该棘孢木霉菌株制备的生物防治制剂,不仅能够高效的防治植物土传病害,还能有效提高作物产量,是一种极具应用前景的生物防治制剂。该微生物制剂可以作为生物农药或生物肥料,防治多种土传植物病害,包括棉花枯萎病、板栗枝枯病、石榴干腐病、黄瓜炭疽病、苹果炭疽病、葡萄炭疽病、葡萄白腐病、西瓜炭疽病、冬枣黑斑病等一种或几种。

具体实施方式

[0028] 下面结合具体实施例来进一步描述本发明,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是示例性的,并不对本发明的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是,在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换,但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

[0029] 实施例 1

[0030] 1、棘孢木霉菌株 WS Tr03 的分离与纯化

[0031] 本发明的棘孢木霉菌株 WS Tr03 的分离方法为:

[0032] (1) 本发明的棘孢木霉菌株 WS Tr03 是从土壤中采用稀释平板法和平板划线法分离获得的,分离方法为:

[0033] (1) 分离:土样的采集,山东省潍坊市潍北地区沿海滩涂土壤(表层以下 10 ~ 15cm)。采集样品均保存在无菌瓶中,标明采集地点、时间和采集人。称取 1g 土样于 100mL 无菌水中,置于 30℃ 摇床中 150rpm 震荡 10min,然后置于 60℃ 水浴锅中孵育 30min,取 100 μ L 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释液涂布于孟加拉红培养基平板上,每个梯度涂布三个平行,在 30℃ 培养 3 天后挑取孟加拉红培养基上的不同形态的微生物菌落于孟加拉红培养基平板上进行划线,定时观察菌落生长情况。然后采用平板划线法,纯化木霉菌株,分别编号保存。

[0034] (2) 棉花枯萎病高效拮抗木霉菌株的筛选

[0035] ①初筛:采用对峙培养法,制备 PDA 平板,用打孔器在木霉菌、棉花枯萎病菌边缘打取直径为 5mm 的菌饼,分别移植在平板相对的两侧中央,25℃ 恒温培养,逐日观察木霉菌对病原菌的抑制作用。

[0036] ②复筛:将筛选到的具有高效拮抗活性的木霉菌株进行复筛,主要是经过耐温性、耐酸碱性、耐药性试验,筛选到耐性较好的木霉菌株,进行盆栽防治试验和田间试验。

[0037] 本发明人通过大量筛选工作得到一株能够高效防治多种植物病害的棘孢木霉菌(*T. asperellum*) 菌株 WS Tr03。实验证明,该棘孢木霉原粉在防治棉花枯萎病都显示出非常高效的防治效果,使得农作物显著增产。因而,本发明的棘孢木霉是具有广泛应用前景的棘孢木霉新菌株,可以用于制备防治多种植物病害的生物防治制剂。

[0038] 2、菌株鉴定

[0039] (1) 微生物学特性:在 PDA 培养基上,25℃ 黑暗条件下培养 7 天,菌落直径扩展 80mm,初期白色稀疏,后变为灰绿色,絮状。反面无色。菌丝具隔,分枝。分生孢子梗便形成松柏式的分枝轮廓,分枝末端的小梗束生、对生、互生或单生,瓶形,6-10 \times 3-4.5 μ m。分生孢子椭圆形、单个、近无色,聚集时呈淡黄绿色,壁光滑或稍粗糙,4-5.5 \times 3-4 μ m。

[0040] (2) 分子生物学特性

[0041] 该菌株的 rRNA 基因序列测定结果(ITS-5.8S-ITS2 区)如下(SEQ-1):CATCGGGCTTCTACTGATCCGAGGTCACATTTTCAGAAAGTTGGGTGTTTTACGGACGT GGACGCGCCGCTCCGGTGCGGAGTTGCGCAAATACTGCGCAGGAGAGGCTGCG GCGAGACCGCCACTGTATTTTCGGGGCCGGCACCCGTGTGAGGGGTCCC GATCCCCAA CGCCGATCCCCGGAGGGGTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCCCGC CAGAATACTGGCGGGCGGAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCA ATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCC GTTGTGAAAGTTTTGATTCATTTTGAATTTTGTCTCAGAGCTG

TAAGAAATACGTCCG CGAGGGGATACAGAAAGAGTTTGGTTGGTTCCTCCGGCGGGCGCCTGGTTCGGGGC TGC
GACGCACCCGGGGCGTGACCCCGCCGAGGCAACAGTTTGGTAACGTTACATT GGGTTTGGGAGTTGTAAACTCGG
TAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCT TGTTACGACTTTTTACTTCCC

[0042] 其中,PDA 培养基配方:马铃薯 200g(去皮),葡萄糖 20g,琼脂 14g,蒸馏水 1000mL。
孟加拉红培养基配方:马铃薯 200g(去皮),葡萄糖 20g,1% 孟加拉红溶液 3.3mL,丙酸钠
3.5g,链霉素 0.03g,水 1000mL,pH 自然。

[0043] 实施例 2

[0044] 1、棘孢木霉菌株 WS Tr03 发酵过程

[0045] PDB 培养基配方:马铃薯 200g(去皮),葡萄糖 20g,蒸馏水 1000mL。

[0046] 大量固体发酵培养基配方(质量百分含量):

[0047] 固料:玉米芯 50%,麸皮 40%,稻壳 10%

[0048] 无机盐溶液:磷酸二氢钾 3.5%,硫酸镁 0.04%,硫酸铵 4%,剩余为水。

[0049] 固液比为 1:1.8(质量比)

[0050] 棘孢木霉菌株 WS Tr03 大量固体发酵过程:

[0051] ①菌种种子液培养:将棘孢木霉菌株 WS Tr03 从试管斜面中挑取少量孢子,移至
PDB 液体培养基中,28℃摇床振荡培养 3~5 天,此为种子液。

[0052] ②固体生产菌种的培养:将种子液按质量比 10%的比例接种到固体培养基(500mL
三角瓶)中,28℃恒温培养 3~5 天,中间多次振荡。

[0053] ③大量固体发酵:将②中固体培养的培养物用无菌水按 1:15 比例稀释,并用灭
菌纱布过滤,出去粗渣,即为生产菌液,将过滤后的菌液按体积比 1:6 接种于大量发酵培养
基。将接种的原料置于发酵室(28℃和相对湿度 85%以上)中发酵培养 8~9 天,即可得到
木霉菌原粉。活性菌达到 25 亿/克。

[0054] 实施例 3

[0055] 本实施例提供了棘孢木霉 WS Tr03 可湿性粉剂对棉花枯萎病防治效果的相关实
验。

[0056] 1) 供试药剂

[0057] 棘孢木霉 WS Tr03 可湿性粉剂;50% 多菌灵可湿性粉剂(市售)。

[0058] 棘孢木霉 WS Tr03 可湿性粉剂的配方(重量比):实施例 2 的原菌粉 20%,CMC0.5%,
拉开粉 3%,十二烷基磺酸钠 8%,葡萄糖 2%,白炭黑 1%,其余为凹凸棒土。该可湿性粉剂的菌
活为 5 亿/克。

[0059] 2) 供试作物与防治对象:

[0060] 供试作物为棉花;品种为中棉 1 号

[0061] 防治对象:枯萎病。

[0062] 3) 试验地情况、试验设计及安排

[0063] 试验地设在山东省东营市棉花地,土壤为砂土地,往年枯萎病发生较重。试验地栽
培条件均匀一致。

[0064] 本试验设棘孢木霉菌 WS TR03 可湿性粉剂药种比为 1:150、1:300、1:450;50% 多菌
灵可湿性粉剂 1:450;清水作对照共 5 个处理,重复 4 次。各小区随机区组排列。施药采用
湿拌种,每个小区安排营养钵 300 个,每钵点 2 粒棉籽。

[0065] 4) 试验调查及计算方法

[0066] (1) 气象条件

[0067] 施药当日晴,微风,最高气温为 30℃,最低气温为 26℃,相对湿度为 65%

[0068] (2) 药效及安全性调查

[0069] 药效调查:调查总共 1 次,在出苗 30 天进行,记载 300 个营养钵种棉花枯萎病发病数,计算病株率及防治效果。

[0070] (3) 药效计算方法

[0071] 药效按式(1)、(2)计算:

[0072]

$$\text{病株率 (\%)} = \frac{\text{病株数}}{\text{总株数}} \times 100$$

[0073]

$$\text{防治效果 (\%)} = \frac{\text{对照病株率} - \text{处理病株率}}{\text{对照病株率}} \times 100$$

[0074] 5) 结果

[0075] (1) 供试药剂对棉花枯萎病的防治效果

[0076] 施药后 30 天调查病株数,表 1 结果显示,清水对照的病株率高达 32.01%,各个处理的病株率均低于清水对照。棘孢木霉菌 WS Tr03 可湿性粉剂 1:150、1:300、1:450 处理后的病株率分别为 7.85%、9.88%、12.19%,均低于对照药剂 12.39% 的病株率;棘孢木霉菌 WS Tr03 可湿性粉剂各个处理的防治效果分别为 75.48%、69.14%、61.94%,其中 1:150 的防治效果最好,与其他处理在 $P < 0.05$ 水平上具有显著性差异,50% 多菌灵可湿性粉剂对棉花枯萎病的防治效果为 61.31%。棘孢木霉菌 WS TR03 可湿性粉剂可有效控制棉花枯萎病的危害。

[0077] 表 1 各个处理后棉花枯萎病的发病率及防治效果

[0078]

| 处理 | 病株率 (%) | 防治效果 (%) | 差异显著性 |
|---------------------------|---------|----------|-------|
| 棘孢木霉菌 WS TR03 可湿性粉剂 1:150 | 7.85 | 75.48 | a |
| 棘孢木霉菌 WS TR03 可湿性粉剂 1:300 | 9.88 | 69.14 | b |
| 棘孢木霉菌 WS TR03 可湿性粉剂 1:450 | 12.19 | 61.94 | c |
| 50%多菌灵 1:450 | 12.39 | 61.31 | c |
| CK | 32.01 | - | - |

[0079] 注:同一行数据后有相同字母表示经 Duncan 多重比较后差异不显著 ($P < 0.05$)。

[0080] (2) 棉花安全性调查:经观察,各药剂处理区与对照区相比,棉花生长正常,无药害产生,说明棘孢木霉菌 WS Tr03 可湿性粉剂在供试浓度对棉花安全。

[0081] 因此,从发病率和防治效果来看,棘孢木霉菌 WS Tr03 可湿性粉剂对棉花枯萎病具有较好的防治效果,施药后防治效果可达 75% 以上,明显好于对照药剂,差异显著。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 牛贍光; 李鹏

<120> 一株棘孢木霉及其应用

<130> 0

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 596

<212> DNA

<213> 棘孢木霉菌株 WS Tr03 的 rRNA 基因序列

<400> 1

catcgggctt ctactgatcc gaggtcacat ttcagaaagt tgggtgtttt acggacgtgg 60

acgcgccgcg ctccggtgcg gagttgcgca aactactgcg caggagaggc tgcggcgaga 120

ccgccactgt atttcggggc cggcaccctg gtgaggggtc cccgatccca acgcegatcc 180

cccggagggg ttcgaggggt gaaatgacgc tcggacaggc atgcccgcca gaactactgg 240

gggcggaatg tgcgttcaaa gattcgatga ttcactgaat tctgcaattc acattactta 300

tcgcatttcg ctgcgttctt catcgatgcc agaaccaaga gatccgttgt tgaaagtttt 360

gattcatttt gaattttgc tcagagctgt aagaaafacg tccgcgaggg gatacagaaa 420

gagtttggtt ggttcctccg gcgggcgcct ggttccgggg ctgcgacgca cccggggcgt 480

gaccccgccg aggcaacagt ttgtaactg tcacattggg tftgggagtt gtaaactcgg 540

taatgatccc tccgctggtt caccaacgga gacctgtta cgactttta ctccc 596