



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104498369 B

(45)授权公告日 2017.05.03

(21)申请号 201410739990.0

(22)申请日 2014.12.05

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 104498369 A

(43)申请公布日 2015.04.08

(83)生物保藏信息  
CGMCC No.9726 2014.09.25

(73)专利权人 中国农业科学院植物保护研究所  
地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号  
专利权人 延边朝鲜族自治州产品质量检验  
所

(72)发明人 李梅 陈书华 蒋细良 衣涛  
汪浩 张念洁

(74)专利代理机构 北京英创嘉友知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11447

代理人 王浩然 周建秋

(51)Int.Cl.  
*C12N 1/14*(2006.01)  
*A01N 63/04*(2006.01)  
*A01P 3/00*(2006.01)  
*C12R 1/885*(2006.01)

审查员 于淼

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种木霉菌及含有该菌的菌剂和它们在防治人参锈腐病中的应用

(57)摘要

本发明提供了一种木霉菌,该木霉菌(*Trichoderma koningii.*)的保藏编号为CGMCC No.9726。本发明还提供了一种复合微生物菌剂,所述的复合微生物菌剂的活性成分包含如上所述的木霉菌、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)和解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。本发明还提供了如上所述的木霉菌或如上所述的微生物菌剂在人参锈腐病防治中的应用。通过上述技术方案,本发明能够有效地防治人参锈腐病(*Cylindrocarpon destructans*)的发生。

1. 一种木霉菌,其特征在于:该木霉菌为康宁木霉(*Trichoderma koningii*),其保藏编号为CGMCC No.9726。

2. 一种复合微生物菌剂,其特征在于:活性成分包含权利要求1所述的木霉菌,商品号为ACCC 03221的枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)和商品号为ACCC 10166的解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

3. 根据权利要求2所述的复合微生物菌剂,其特征在于:相对于1g的微生物菌剂,所述木霉菌的含量为 $10^5$ - $10^9$ CFU。

4. 根据权利要求3所述的复合微生物菌剂,其特征在于:相对于1g的微生物菌剂,所述木霉菌的含量为 $10^6$ - $10^8$ CFU。

5. 根据权利要求2-4中任意一项所述的复合微生物菌剂,其特征在于:所述木霉菌、所述枯草芽胞杆菌和所述解淀粉芽胞杆菌的CFU比为1:(10-20):(10-20)。

6. 根据权利要求2-4中任意一项所述的复合微生物菌剂,其特征在于:该微生物菌剂通过包括如下步骤的制备方法制备得到:

(1) 将权利要求1所述的木霉菌、商品号为ACCC 03221的枯草芽胞杆菌和商品号为ACCC 10166的解淀粉芽胞杆菌菌种分别在活化培养基中接种并培养得到各自的活化菌种;

(2) 将木霉菌的活化菌种在木霉菌液体发酵培养基中培养,将枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌各自的活化菌种分别接种到液体培养基中并进行发酵,得到各自的发酵后的菌液;

(3) 将步骤(2)得到的三种菌液分别经惰性载体吸附、烘干和粉碎,得到各个菌种的菌粉;

(4) 将木霉菌、枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的菌粉混合,得到复合微生物菌剂。

7. 根据权利要求6所述的复合微生物菌剂,其特征在于:惰性载体的用量使得木霉菌菌粉中活菌含量达到 $(2-5) \times 10^8$ CFU/g,枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的菌粉中活菌含量分别达到 $(2-10) \times 10^9$ CFU/g,将木霉菌、枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的菌粉混合;使得所述木霉菌、所述枯草芽胞杆菌和所述解淀粉芽胞杆菌的CFU比为1:(10-20):(10-20)。

8. 根据权利要求6所述的复合微生物菌剂,其特征在于:所述惰性载体包括碳酸钙、黄土、硅藻土、膨润土、滑石粉、云母粉、高岭土和方解石粉中的至少一种。

9. 根据权利要求6所述的复合微生物菌剂,其特征在于:以所述木霉菌液体发酵培养基的总重量为基准,以重量计,所述木霉菌液体发酵培养基含有2.0-3.5%淀粉、1.0-2.0%酵母粉、4.0-8.0%玉米浆、0.1-0.5%的 $\text{CaCO}_3$ 、0.01-0.02%的 $\text{ZnSO}_4$ 和0.01-0.03%的 $\text{MgSO}_4$ 。

10. 根据权利要求6所述的复合微生物菌剂,其特征在于,以枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌发酵所用的液体培养基的总重量为基准,以重量计,枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌发酵所用的液体培养基含有1-1.5%玉米淀粉、1-1.5%花生饼粉、0.2-0.5%硫酸铵、0.1-0.4%碳酸钙、0.02-0.05%硫酸镁和0.01-0.05%氯化钠。

11. 权利要求1所述的木霉菌或权利要求2-10中任意一项所述的微生物菌剂在人参锈腐病防治中的用途。

## 一种木霉菌及含有该菌的菌剂和它们在防治人参锈腐病中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物应用领域,具体地,涉及一种木霉菌(*Trichoderma koningii*),含有该木霉菌的微生物菌剂以及它们在人参锈腐病防治中的应用。

### 背景技术

[0002] 人参锈腐病是人参生产上发生最严重、最普遍的危害之一,是人参根部病害中的首要病害。种植人参的国家和地区都有锈腐病的发生。人参锈腐病属于典型的土传性根部病害,从苗期到收获期均有发生。人参生长年限越长病害越重,损失越大。据统计,目前我国年平均发病率20%-30%,在个别严重地块则高达70%-80%,平均损失率20%-30%,严重影响人参产量、加工质量和商品价值,造成巨大经济损失。

[0003] 目前,国外已报道的能引起参根锈腐病的病原菌有5种,分别为:锈腐柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans* Zinns)、人参生柱孢菌(*Cylindrocarpon panacicola* Zinns)、粗壮柱孢(*Cylindrocarpon robusta* Hild.)、拟参柱孢菌(*Cylindrocarpon morspanacis* Hild.)和人参柱孢菌(*Cylindrocarpon panacis* Matsuo et Miyazawa)。中国报道的锈腐病病原菌有4种,分别为:毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans* (Zinns.) Scholton)、人参生柱孢菌(*Cylindrocarpon panacicola* (Zinns) Zha et Zhu)、人参柱孢菌(*Cylindrocarpon panacis* Matuo et Miyazawa)和钝柱孢(*Cylindrocarpon obtusisporum* (Cooke&Harkness)。目前,各国学者普遍认为引起人参锈腐病的主要病原菌为毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)。毁灭柱孢病原菌以厚垣孢子在病残组织和土壤中越冬,可在土壤中长期存活,春季土壤化冻后,厚垣孢子发芽,入侵人参地下部分,极易从参根伤口处侵入,扩展腐烂。

[0004] 国内外对人参锈腐病至今没有很好的防治措施。目前,人参锈腐病的防治主要采用农业防治、化学防治和生物防治等。传统的农业防治方法可以降低和防治该病害的发生。如与其它作物进行轮作可以降低人参病害的发生率;整地、深翻土地可以减少在土壤中越冬的病菌;整地可以预防参床积水,防治流水传播病害和诱发病害发生;中耕除草、肥水管理、控制光照、温度和湿度等也能降低病害的发生。但是传统的农业防治方法可以降低病害的发生,不能从根本上控制病害的发生。化学防治作为人参病害的重要防治手段之一,在人参锈腐病的防治中具有十分重要的地位。主要是使用包括托布津、代森锰锌、多菌灵、五氯硝基苯、敌克松、棉隆、乙磷铝、百菌清、禾穗胺等农药进行土壤处理、浸苗或浸根,防效与其它防治方法相比,化学防治具有操作简单、规模大、起效快、效果明显等特点,但是长期使用化学农药也存在污染环境、易产生抗药性、农药残留影响人参品质等问题。

[0005] 生物防治是防治人参锈腐病的一条极具潜力的防治途径。生物防治具有无污染、无残留、难以产生抗药性等特点,对于人参病害的防治具有极大的潜力。利用对人参锈腐病原真菌的拮抗作用筛选生防微生物,是人参锈腐病防治的有效途径。

[0006] 但是,目前防治人参锈腐病所用的微生物对人参锈腐病的防效不够理想,需发掘

新的微生物资源。

### 发明内容

[0007] 本发明的发明人分离了一株木霉菌,发现其能够显著的抑制人参锈腐病菌的生长,有效防治人参锈腐病的发生,由此得到了本发明。

[0008] 本发明提供了一种木霉菌,该木霉菌为康宁木霉(*Trichoderma koningii*),其保藏编号为CGMCC No.9726。

[0009] 本发明还提供了一种复合微生物菌剂,所述的复合微生物菌剂活性成分包含如上所述的木霉菌、商品号为ACCC 03221的枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)和商品号为ACCC 10166的解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

[0010] 本发明还提供了如上所述的木霉菌或如上所述的复合微生物菌剂在人参锈腐病防治中的用途。

[0011] 通过上述技术方案,本发明提供的木霉菌或复合微生物菌剂对于人参锈腐病具有较高的防效,并且具有绿色环保的优点。

[0012] 本发明的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

[0013] 生物材料保藏

[0014] 本发明的木霉菌(*Trichoderma koningii*)是本发明的发明人从吉林省延边州延吉市野山参林地土壤中采集获得,其保藏编号为CGMCC NO.9726,保藏日期为2014年9月25日,保藏单位为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址位于北京市朝阳区北辰西路1号院3号,分类命名为康宁木霉(*Trichoderma koningii*)。

### 具体实施方式

[0015] 以下对本发明的具体实施方式进行详细说明。应当理解的是,此处所描述的具体实施方式仅用于说明和解释本发明,并不用于限制本发明。

[0016] 本发明提供了一种木霉菌,该木霉菌为康宁木霉(*Trichoderma koningii*),其保藏编号为CGMCC No.9726。

[0017] 本发明还提供了一种复合微生物菌剂,所述的复合微生物菌剂活性成分包含如上所述的木霉菌、商品号为ACCC 03221的枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)和商品号为ACCC 10166的解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

[0018] 其中,相对于1g的微生物菌剂,所述木霉菌的含量可以为 $10^5-10^9$ CFU,优选为 $10^6-10^8$ CFU。

[0019] 其中,所述木霉菌、所述枯草芽胞杆菌和所述解淀粉芽胞杆菌的CFU比优选为1:(10-20):(10-20)。

[0020] 其中,该微生物菌剂可以通过包括如下步骤的制备方法制备得到:

[0021] (1) 将如上所述的木霉菌、商品号为ACCC 03221的枯草芽胞杆菌和商品号为ACCC 10166的解淀粉芽胞杆菌菌种分别在活化培养基中接种并培养得到各自的活化菌种;

[0022] (2) 将木霉菌的活化菌种在木霉菌液体发酵培养基中培养,将枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌各自的活化菌种分别接种到液体培养基中并进行发酵,得到各自的发酵后的菌液;

[0023] (3) 将步骤(2)得到的三种菌液分别经惰性载体吸附、烘干和粉碎,得到各个菌种的菌粉;

[0024] (4) 将木霉菌、枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的菌粉混合,得到复合微生物菌剂。

[0025] 其中,步骤(1)中,菌种的活化培养条件及培养后菌种状态没有特别的限制,可以为木霉菌、枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌培养过程中常用条件,例如培养温度可以为28-37℃,培养时间可以为1-3天。在培养的过程中,可以通过常规的方法,例如显微镜观察确定活化菌种的状态。

[0026] 其中,步骤(2)中,发酵的条件和发酵后的物料中的活菌浓度没有特别的要求,可以为木霉菌、枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌发酵过程中常用的条件和浓度,作为本发明优选的一种实施方式,步骤(2)中,发酵的条件使得发酵后的物料中的活菌浓度为 $(5-500) \times 10^8$ CFU/mL,在该优选实施方式中的活菌浓度下,获得的发酵后的菌液作为微生物菌剂制备的原料使用。例如发酵的时间可以为20-200小时,温度可以为28-36℃。

[0027] 其中,所述活化培养基可以为常规的各种能够培养木霉菌、枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌的培养基,例如包括但不限于PDA培养基、牛肉膏蛋白胨培养基、肉汤培养基和LB培养基中的至少一种。

[0028] 其中,所述木霉菌液体发酵培养基可以为常规的各种能够发酵扩大木霉菌数目的液体培养基,例如所述液体培养基可以含有淀粉,酵母粉,玉米浆的至少一种;且所述液体培养基还可以含有0.01-0.02%的 $ZnSO_4$ 和0.01-0.03%的 $MgSO_4$ ,以补充木霉菌快速生长时所需的无机盐。

[0029] 其中,所述枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌液体发酵培养基可以为常规的各种能够发酵扩大枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌数目的液体培养基,例如所述液体培养基可以含有玉米淀粉、花生饼粉的至少一种;且所述液体培养基还可以含有0.2-0.5%硫酸铵、0.02-0.05%硫酸镁、0.01-0.05%氯化钠,以补充枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌快速生长时所需的无机盐。

[0030] 其中,作为本发明特别优选的一种实施方式,以所述木霉菌液体发酵培养基的总重量为基准,以重量比计算,所述木霉菌液体发酵培养基含有2.0-3.5%淀粉,1.0-2.0%酵母粉,4.0-8.0%玉米浆,0.1-0.5%的 $CaCO_3$ ,0.01-0.02%的 $ZnSO_4$ 和0.01-0.03%的 $MgSO_4$ 。其中,该培养基还可以含有余量的水和/或其它成分。在该优选方式中,一方面能够让木霉菌在发酵过程中快速生长,产生足够数量的厚垣孢子,另一方面获得的发酵后的物料作为微生物菌剂使用,能够更好地在人参锈腐病防治中应用。

[0031] 其中,作为本发明特别优选的一种实施方式,所述枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌液体发酵培养基含有1-1.5%玉米淀粉、1-1.5%花生饼粉、0.2-0.5%硫酸铵、0.1-0.4%碳酸钙、0.02-0.05%硫酸镁和0.01-0.05%氯化钠。其中,该培养基还可以含有余量的水和/或其它成分。在该优选方式中,一方面能够让枯草芽胞杆菌或解淀粉芽胞杆菌在发酵过程中快速生长,产生足够数量的芽胞,另一方面获得的发酵后的物料作为微生物菌剂使用,能够更好地在人参锈腐病防治中应用。

[0032] 其中,发酵后的菌液可以直接作为微生物菌剂使用,也可以通过包括载体吸附、烘干、粉碎和/或造粒等步骤进一步加工为更方便贮藏的剂型的微生物菌剂使用。惰性载体的

用量可以使得木霉菌菌粉中活菌含量达到  $(2-5) \times 10^8$  CFU/g, 枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的菌粉中活菌含量分别达到  $(2-10) \times 10^9$  CFU/g。将木霉菌、枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌的菌粉混合;使得所述木霉菌、所述枯草芽胞杆菌和所述解淀粉芽胞杆菌的CFU比为 1: (10-20): (10-20)。该复合微生物菌剂制备中三种菌剂的配制并不限于上述比例,可以为其它比例的混合。

[0033] 其中,所述惰性载体可以包括碳酸钙、黄土、硅藻土、膨润土、滑石粉、云母粉、高岭土和方解石粉中的至少一种。

[0034] 本发明还提供了如上所述的木霉菌或如上所述的复合微生物菌剂在人参病害防治中的用途。

[0035] 其中,在本发明的一种优选的实施方式中,将如上所述的木霉菌或如上所述的复合微生物菌剂在人参锈腐病防治中应用。

[0036] 其中,在本发明特别优选的一种实施方式中,在栽种人参的农田施用木霉菌或如上所述的复合微生物菌剂;其中,栽种人参前将木霉菌或如上所述的复合微生物菌剂与细土混匀,施入参床;所述人参的拉丁学名为 *Panax ginseng* C.A.Mey.。

[0037] 以下通过实施例进一步详细说明本发明:

[0038] 实施例1

[0039] 本实施例用于说明本发明的木霉菌的培养及微生物菌剂的制备。

[0040] 将保藏编号为CGMCC No.9726的木霉菌 (*Trichoderma koningii*) 接种到活化培养基PDA培养基(取削皮后的马铃薯20g煮沸20分钟取汁,将汁与2g葡萄糖、1.5g琼脂和水配成100ml, pH6.8-7.0,装入2个茄子瓶,每个50ml,灭菌后制斜面)上,在28℃培养6天。将活化好的斜面木霉菌菌种接种至灭菌的液体发酵培养基(以重量计,含有2.5%淀粉,1.5%酵母粉,5.0%玉米浆,0.4%的CaCO<sub>3</sub>,0.01%的ZnSO<sub>4</sub>、0.03%的MgSO<sub>4</sub>),28℃培养144小时,至90%菌丝都形成厚垣孢子,得到木霉菌液。

[0041] 将5000mL上述木霉菌液进行离心,收集湿菌体,与适量载体硅藻土充分混合。将混合均匀的物料置于50℃烘箱中,烘烤4-7个小时,使其含水量小于5%。利用平板培养计数法检测菌粉中活菌数量,然后使用硅藻土调节直至每克菌剂中含有的木霉活菌数为5亿,所得到的物料即为本实施例的木霉菌微生物菌剂。

[0042] 实施例2

[0043] 本实施例用于说明本发明的复合微生物菌剂的制备。

[0044] 将商品号为ACCC 03221的枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 接种到LB培养基(含10g/L的胰蛋白胨、5g/L的酵母提取物、10g/L的NaCl和15g/L琼脂)斜面上,在37℃培养18小时,得到活化的菌种。将活化好的菌种接种至灭菌的液体发酵培养基(以重量计,含有1%玉米淀粉、1.5%花生饼粉、0.5%硫酸铵、0.4%碳酸钙、0.03%硫酸镁、0.02%氯化钠)中,于35℃培养至活菌浓度为 $5-10 \times 10^9$  CFU/mL,得到枯草芽胞杆菌菌液。

[0045] 将商品号为ACCC 10166的解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 接种到LB培养基(含10g/L的胰蛋白胨、5g/L的酵母提取物、10g/L的NaCl和15/L琼脂)斜面上,在37℃培养16小时,得到活化的菌种。将活化好的菌种接种至灭菌的液体发酵培养基(1.2%玉米淀粉、1.5%花生饼粉、0.4%硫酸铵、0.5%碳酸钙、0.03%硫酸镁、0.02%氯化钠)中,于37℃培养至活菌浓度为 $5-10 \times 10^9$  CFU/mL,得到解淀粉芽胞杆菌菌液。

[0046] 分别将5000mL上述枯草芽胞杆菌或解淀粉芽胞杆菌菌液进行离心或抽滤,收集湿菌体,然后与适量载体硅藻土混合。将充分混合均匀的物料置于60℃烘箱中,烘烤4-7个小时,使其含水量低于5%。利用平板培养计数法检测菌粉中菌体数量,然后使用硅藻土调节直至每克菌剂中含有的枯草芽胞杆菌或解淀粉芽胞杆菌活菌数为20亿。

[0047] 将实施例1得到的木霉菌菌粉、以及本实施例得到枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌菌粉按重量比1:3:3混合,所得到的物料即为本实施例的复合微生物菌剂。

[0048] 对比例1

[0049] 按照实施例2的方法制备复合微生物菌剂,不同的是,木霉菌使用的是文献(傅俊范等,人参锈腐病生防细菌的分离筛选与鉴定,《吉林农业大学学报》2010年02期)中的Tri41哈茨木霉。

[0050] 对比例2

[0051] 按照实施例2的方法制备复合微生物菌剂,不同的是,用商品号为ACCC 11109的蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)和商品号为ACCC 01174的摩加夫芽胞杆菌(*Bacillus mojavensis*)分别替换商品号为ACCC 03221的枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)和商品号为ACCC 10166的解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

[0052] 测试实施例1

[0053] 本测试实施例在田间试验中测定本发明的微生物菌剂在防治人参锈腐病中的效果。

[0054] 试验田位于吉林省集安市花甸镇柞树村,两年生人参苗由北方药材有限公司提供。设置实施例1制备得到的木霉菌剂、实施例2制备得到的复合微生物菌剂、对比例1制备得到的木霉菌剂、对比例2制备得到的木霉菌剂以及空白对照五个处理,各设3次重复,试验小区面积3m<sup>2</sup>,共15个小区,随机排列。将人参锈腐病的病情指数大于30的参床中的土壤以每平方米10kg的量掺入每个小区中,每小区栽人参苗120株。栽种参苗前分别将实施例1制备得到的木霉菌剂、实施例2和对比例1制备得到的复合菌剂与灭菌细土充分混合,使细土中活菌数含量达到2×10<sup>6</sup>CFU/g,同处理,每小区300g细土均匀施入参床,以同等重量硅藻土进行相同掺土处理作为对照。田间管理常规。秋季收获时调查人参锈腐病发病情况。人参锈腐病病情分为5个级别,0级:参根无病斑;1级:参根病斑占表面积25%以下;2级:参根病斑占表面积26%-50%;3级:参根病斑占表面积51%-75%,外观受严重影响;4级:参根病斑占表面积76%以上或完全腐烂。病情指数=Σ(发病级别代表值×该级的株数)/(发病最重级别代表值×总株数)×100;防治效果=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100%。结果如表1所示。

[0055] 表1

[0056]

处理	病情指数	防治效果
对照	55.24±5.32	-
实施例1木霉菌剂	15.38±4.58	72.16%
实施例2复合微生物菌剂	10.69±3.67	80.65%
对比例1复合微生物菌剂	35.67±3.11	35.43%
对比例2复合微生物菌剂	30.05±3.35	45.60%

[0057] 通过表1的数据可见,本发明的木霉菌菌剂、复合微生物菌剂都对人参锈腐病具有显著的防治效果,并且本发明的复合微生物菌剂比木霉菌菌剂的防效更高。

[0058] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于上述实施方式中的具体细节,在本发明的技术构思范围内,可以对本发明的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本发明的保护范围。

[0059] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本发明对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0060] 此外,本发明的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本发明的思想,其同样应当视为本发明所公开的内容。