



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114854599 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 05

(21) 申请号 202210281575.X

C09K 17/14 (2006.01)

(22) 申请日 2022.03.21

C05F 11/08 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

C05G 3/80 (2020.01)

CGMCC No. 23828 2021.11.30

C09K 101/00 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

(71) 申请人 中国科学院南京土壤研究所

地址 210008 江苏省南京市玄武区北京东路71号

(72) 发明人 陈林 张佳宝 李含放 赵炳梓

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

专利代理师 唐循文

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/38 (2020.01)

A01P 21/00 (2006.01)

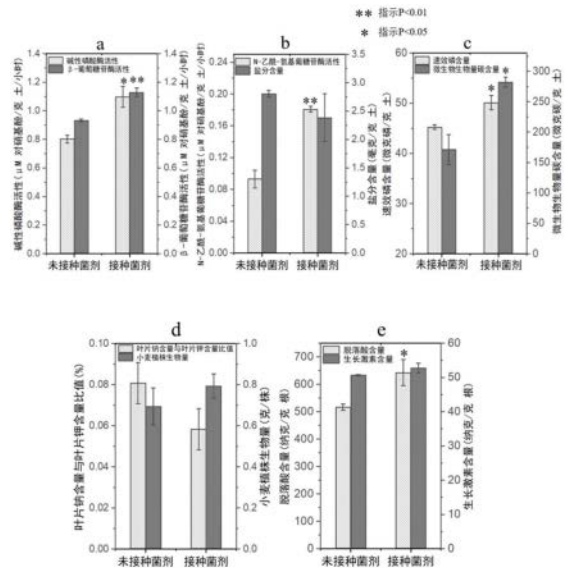
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一株哈茨木霉及其应用

(57) 摘要

一株哈茨木霉及其应用,该菌株已在国家知识产权局指定的保藏单位保藏,保藏日期为2021年11月30日,保藏单位名称:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为:CGMCC No.23828.该株哈茨木霉菌剂在进行生物防治时,环保安全有效,可进行长期施用,同时制作过程简便,可进行大范围推广.该株哈茨木霉可以在土壤中稳定繁殖,且能与土著微生物形成稳定的协同关系.该株哈茨木霉来源于典型盐渍土壤,具有绿色环保,安全优质性.该株哈茨木霉培养过程简单,菌剂制作成本低廉,利于推广.



1. 一株哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum* HSJ003), 该菌株已在国家知识产权局指定的保藏单位保藏, 保藏日期为2021年11月30日, 保藏单位名称: 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为: CGMCC No. 23828。

2. 权利要求1所述哈茨木霉的培养方法, 其特征在于, 步骤为: 挑取哈茨木霉菌丝接种至PD液体培养基中, 置于恒温摇床28 °C、200 rpm培养7天得菌丝球; 无菌条件下过滤, 取5 g菌丝球加入50 g麦麸-豆饼粉-面粉培养基中, 立即摇匀; 置于28 °C静置培养; 待到菌丝把麦麸-豆饼粉-面粉培养基凝固成块后, 使得菌饼两面可接触到空气; 之后置于28 °C培养箱, 直到菌丝完全覆盖麦麸-豆饼粉-面粉培养基后, 捣散制得。

3. 根据权利要求2所述哈茨木霉的培养方法, 其特征在于, 所述PD培养基的组成为: 去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、水1000 mL; 麸皮-豆饼粉-面粉培养基的组成为: 麦麸15 g、豆饼粉20 g、面粉15 g、水50 mL, 水先加入豆饼粉湿润30 min后, 再加入麦麸、面粉拌匀, 121 °C灭菌20 min后摇匀。

4. 权利要求1所述哈茨木霉在植物根系合成脱落酸中的应用。

5. 权利要求1所述哈茨木霉在提高土壤碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酶和N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性中的应用。

6. 权利要求1所述哈茨木霉在提高土壤磷素活化中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用, 其特征在于, 提高土壤磷素活化的无机磷培养基的组分为: 葡萄糖10 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g、NaCl 0.3 g、KCl 0.3 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0 g。

一株哈茨木霉及其应用

[0001]

技术领域

[0002] 本发明属于微生物中哈茨木霉领域,具体涉及一株哈茨木霉及其应用。

[0003]

背景技术

[0004] 木霉菌是广泛分布于土壤中的一类真菌,是一种典型且重要的根际微生物。目前,已知木霉菌发挥生物防治功能的“经典机制”包括与病原菌营养竞争、抗生作用和分泌胞壁降解酶等(Harman G E.Overview of mechanisms and uses of Trichoderma spp. [J].Phytopathology,2006,96(2):190-194. Lorito M.Harman GE,Hayes C Ket al.Chtinolytic enzymes produced by Trichoderma-harzianum antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase[J].Phytopathology,1993,83(3):302-307.)。木霉菌株广泛作为生物杀真菌剂的生物防治应用基础就是这些强大的拮抗功能。除此之外,最近的一些报道表明木霉还可以增强植物生长过程中对非生物胁迫的耐受性(Mastouri F,Bjorkman T,Harman G E.Seed treatment with Trichoderma harzianum alleviates biotic,abiotic,and physiological stresses in germinating seeds and seedlings[J].Phytopathology,2010,100:1213-1221.),部分原因是使植物根系生长改善,持水能力提高;对于生物胁迫则能够通过调节植物根内活性氧(reactive nitrogen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)代谢、氧化还原平衡和能量流提高植物对病原菌的防御能力(Chen S,Ren J,Zhao H,et a Trichoderma harzianum improves defense against Fusarium oxysporum by regulating ROS and RNS metabolism,redox balance,and energy glow in cucumber roots.[J].Phytopathology,2019,109(6):972-982.)。这些研究均显示了木霉作为生防菌应用的强大潜力(扈进冬,隋丽娜,吴远征,魏艳丽,李纪顺.木霉菌拌种对小麦生长和根际真菌群落的影响.2021.)。

[0005] 土壤盐渍化会对植株产生毒害作用,严重危害植株生长,破坏植物正常水分代谢,导致土壤物理性状恶化,影响植物营养状况,小麦主要生长在旱季,雨水少,受盐分危害大。有研究表明,木霉可以在土壤中快速生长,长期强势定殖存活于植物根际周围,并分泌多种化合物,诱导植物产生局部或系统性抗性,减少植物病害并提高产量(陈建爱,郭峰,杨武汉,万书波,陈为京.盐胁迫下黄绿木霉T1010对花生耐盐生理的影响[J].西南农业学报,2014,27(02):587-590.)。

[0006]

发明内容

[0007] 解决的技术问题:本发明提供一株哈茨木霉及其应用。该株哈茨木霉来自于中国科学院遗传与发育生物学研究所山东基地(东营市垦利区)种植小麦的盐渍土壤(小麦根际

土壤)中,生长速度快,易于培养,成本低。该菌株可以通过促进植物分泌脱落酸促进植物生长,同时能够提高土壤碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酶和N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性,在土壤碳氮磷养分活化中发挥作用。

[0008] 技术方案:一株哈茨木霉(*Trichoderma harzianum* HSJ003),该菌株已在国家知识产权局指定的保藏单位保藏,保藏日期为2021年11月30日,保藏单位名称:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为:CGMCC No.23828。

[0009] 哈茨木霉的培养方法,步骤为:挑取哈茨木霉菌丝接种至PD液体培养基中,置于恒温摇床28 °C、200 rpm培养7天得菌丝球;无菌条件下过滤,取5 g菌丝球加入50 g麦麸-豆饼粉-面粉培养基中,立即摇匀;置于28 °C静置培养;待到菌丝把麦麸-豆饼粉-面粉培养基凝固成块后,使得菌饼两面可接触到空气;之后置于28 °C培养箱,直到菌丝完全覆盖麦麸-豆饼粉-面粉培养基后,捣散制得。

[0010] 上述PD培养基的组成为:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、水1000 mL;

麸皮-豆饼粉-面粉培养基的组成为:麦麸15 g、豆饼粉20 g、面粉15 g、水50 mL,水先加入豆饼粉湿润30 min后,再加入麦麸、面粉拌匀,121 °C灭菌20 min后摇匀。

[0011] 上述哈茨木霉在植物根系合成脱落酸中的应用。

[0012] 上述哈茨木霉在提高土壤碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酶和N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性中的应用。

[0013] 上述哈茨木霉在提高土壤磷素活化中的应用。

[0014] 有益效果:(1)该株哈茨木霉接入使作物根系脱落酸的含量提高了24.59%(图1:e),说明该菌株在作物抵抗盐胁迫促生中发挥了作用。(2)该株哈茨木霉使土壤碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酶和N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性分别提高了36.84%、21.16%和94.59%(图1:a,图1:b),表明该菌株在土壤碳氮磷活化中发挥重要作用,特别是在土壤碳氮活化中作用显著。(3)该株哈茨木霉在一定程度上也降低了土壤17.76%的含盐量(图1:b),减轻了高盐离子对植株的毒害作用。(4)该株哈茨木霉也在一定程度上使小麦植株生物量提高了11.74%,植株叶片钠含量与叶片钾含量比值下降了38.59%(图1:d)。(5)该株哈茨木霉也显著提高了植株根际土壤64.93%的微生物生物量碳(图1:c),在一定程度上促进养分有效化,同时通过差异丰富分析表明,哈茨木霉的接入改变植物根际微生物群落结构,富集一些有益真菌(假金孢子菌)产生赤霉素,促进作物生长(Hamayun M, Khan SA, Iqbal I, et al. *Chrysosporium pseudomerderium* produces gibberellins and promotes plant growth. *J Microbiol.* 2009;47(4):425-30.),减少一些有害菌(白粉病菌),利于作物生长(图3)。

[0015]

附图说明

[0016] 图1为接种哈茨木霉对土壤碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酶和N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性、土壤盐分含量、土壤微生物生物量碳含量、速效磷含量和对小麦植株生物量、根系脱落酸含量以及植株叶片钠含量与叶片钾含量比值的影响。其中a为哈茨木霉对土壤碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酶活性的影响,b为哈茨木霉对N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性和土壤盐分含量的影响,c为哈茨木霉对土壤速效磷含量以及土壤微生物生物量碳含量的影响,d为哈茨木

霉对小麦植株叶片钠含量与叶片钾含量比值和植株生物量的影响,e为哈茨木霉对小麦植株脱落酸含量和生长激素含量的影响。

[0017] 图2为哈茨木霉在马铃薯葡萄糖琼脂培养基上的生长状况。

[0018] 图3为接种哈茨木霉对土壤根际真菌群落的差异丰度分析。

[0019]

具体实施方式

[0020] 以下实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所做的等效变换或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。本发明从中国科学院遗传与发育生物学研究所山东基地典型盐渍土壤中分离培养出一株哈茨木霉(*Trichoderma harzianum* HSJ003),显微镜下发现该菌株菌丝纤细无色,具分隔,多分枝。分生孢子梗从菌丝的侧枝上生出,对生或互生,一般有2-3次分枝,着生分生孢子的小梗瓶形或锥形。该木霉菌剂能够有效提高盐渍土壤碳氮磷相关酶活性,并在一定程度上提高土壤速效磷含量,促进植株对养分的吸收;同时哈茨木霉具有较强抑制病原菌的作用,可降低植株病害的发生率;哈茨木霉菌剂的接入使植株根系脱落酸的含量显著上升,提高了植株应对非生物胁迫的能力。该株哈茨木霉菌剂在进行生物防治时,环保安全有效,可进行长期施用,同时制作过程简便,可进行大范围推广。该株哈茨木霉可以在土壤中稳定繁殖,且能与土著微生物形成稳定的协同关系。该株哈茨木霉来源于典型盐渍土壤,具有绿色环保,安全优质性。该株哈茨木霉培养过程简单,菌剂制作成本低廉,利于推广。

[0021] 实施例1

从中国科学院遗传与发育生物学研究所山东基地的典型盐渍土壤(小麦根际土壤)中分离培养出一株哈茨木霉(*Trichoderma harzianum* HSJ003)。该菌株已在国家知识产权局指定的保藏单位保藏,保藏日期为2021年11月30日,保藏单位名称:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,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,保藏编号:CGMCC No. 23828。该表层土壤养分指标为:pH 8.59、电导率4.66 ds/m,土壤碳氮比为12.32,氮磷比为0.75,碳磷比为9.20。

[0022] 实施步骤

步骤1:将生长良好的哈茨木霉菌种接种至PD液体培养基中,28 °C、200 rpm摇床培养7天,直到液体培养基浑浊并长满大量菌丝体。

[0023] 步骤2:将液体培养的哈茨木霉菌丝体在无菌条件下过滤,过滤后的菌丝体用无菌去离子水冲洗干净。

[0024] 步骤3:将干净的菌丝体接种到灭过菌的麦麸-豆饼粉-面粉培养基中,28 °C静置黑暗培养,直到菌丝完全覆盖培养基。

[0025] 步骤4:将不同三角瓶中接入菌丝体的麦麸-豆饼粉-面粉培养基捣散取出,混匀后即成为菌剂。

[0026] 步骤5:准确称取3 g菌剂,加入1.5 kg土壤中,充分混匀后装盆。

[0027] 步骤6:充分浇水后进行作物种植。

[0028] 对比例1

实施步骤

步骤1:准确称取灭菌处理的未加入菌丝体的麦麸-豆饼粉-面粉培养基3 g,加入1.5 kg土壤中,充分混匀后装盆。

[0029] 步骤2:充分浇水后进行作物种植。

[0030] 供试土壤为山东东营农田盐渍土,该表层土壤养分指标为:土壤含盐量3.50 g/kg、土壤有机碳11.46 g/kg、土壤全氮1.15 g/kg、土壤全磷1.07 g/kg、土壤速效磷32.07 mg/kg。种植作物为小麦(济南177),于三叶期定苗,每盆留三株。小麦于温室环境中进行培养,培养期间含水量保持为60%。期间按需进行浇水除草。培养至开花期进行采样,测定土壤酶活性、小麦生物量以及小麦根系激素含量等。

[0031] 测定结果如图所示,接种哈茨木霉处理小麦生物量提高了11.74%,根系脱落酸的含量提高了24.59%,植株叶片钠含量与叶片钾含量比值降低了38.59%;土壤碱性磷酸酶、 β -葡萄糖苷酶和N-乙酰-氨基葡萄糖苷酶活性分别提高了36.84%、21.16%和94.59%,同时土壤盐度也降低了17.76%。结果表明,该株哈茨木霉能提高作物脱落酸的分泌,从而提高作物的抗盐性。接种哈茨木霉处理的土壤碳氮磷相关酶活活性、速效磷含量的增加表明该菌剂能够在盐渍土壤养分氮磷活化中有促进作用,提高速效养分含量,进而提高了作物对养分的获取,进一步促进了作物的生长。

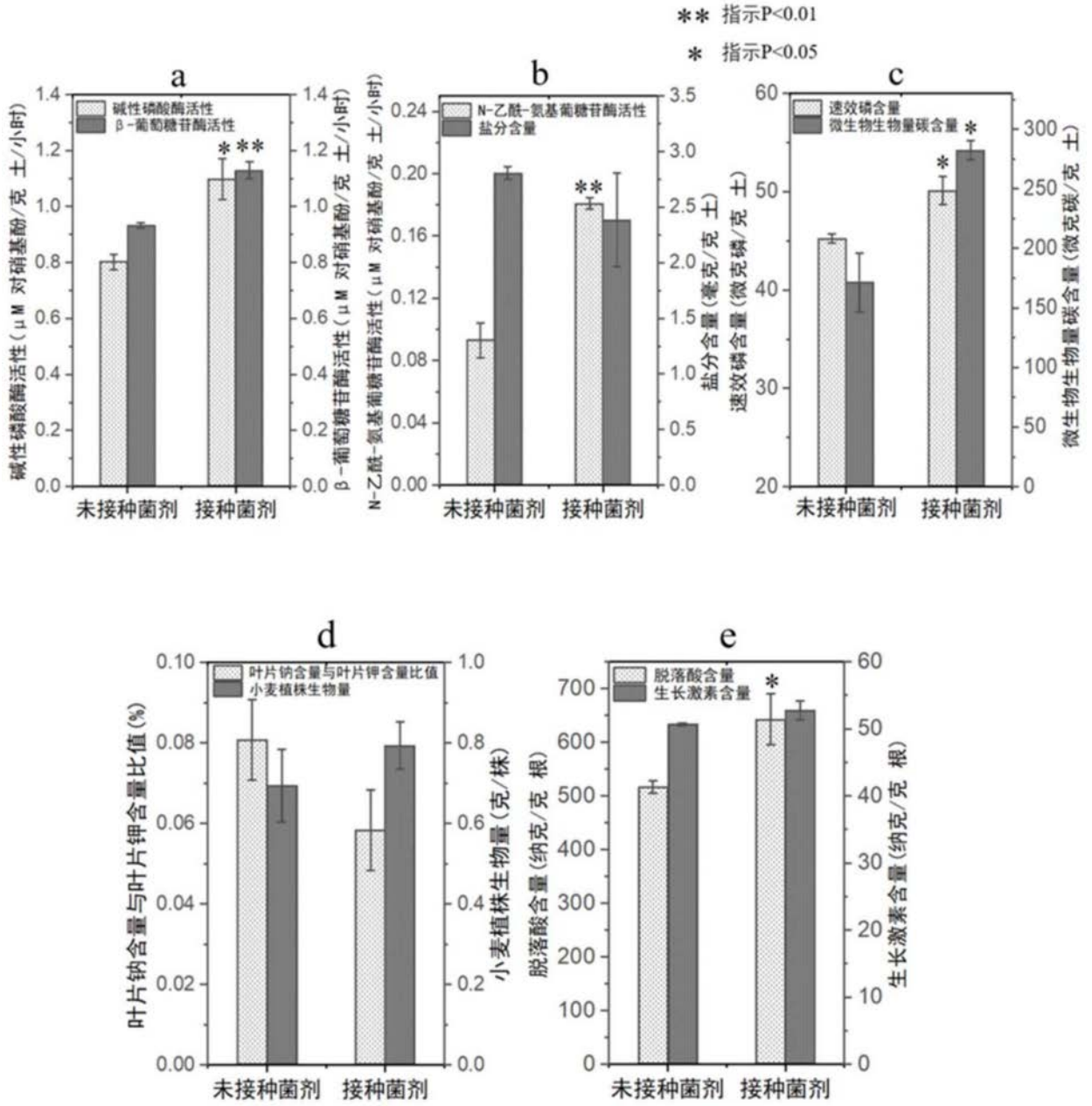


图1

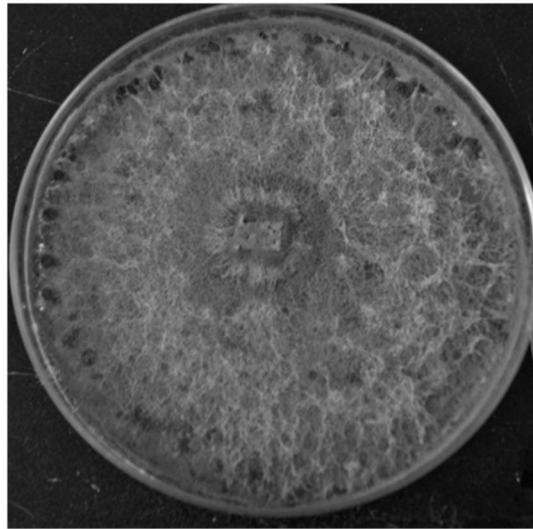


图2

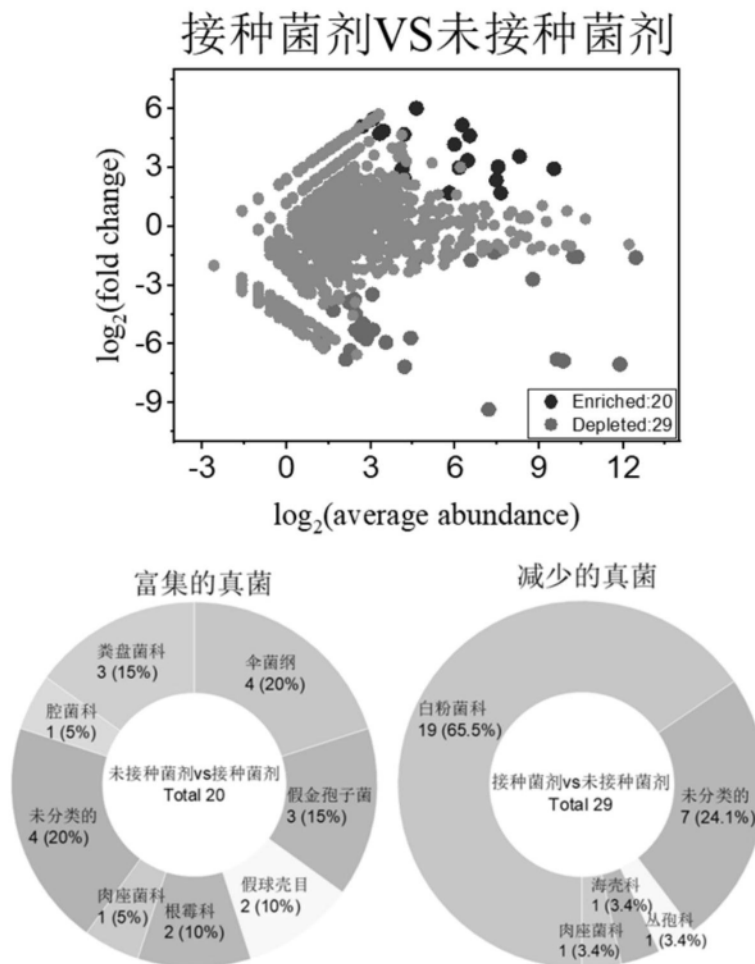


图3