



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102925367 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 13

(21) 申请号 201210411827. 2

(22) 申请日 2012. 10. 24

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6673 2012. 10. 12

(73) 专利权人 山东省林业科学研究院

地址 250014 山东省济南市历下区文化东路  
42 号

(72) 发明人 牛瞻光 王清海 刘幸红 段春华  
戴宝

(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)

*A01P 3/00* (2006. 01)

*C12R 1/885* (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101485336 A, 2009. 07. 22, 说明书全文.

CN 102604842 A, 2012. 07. 25, 说明书全文.

CN 102071145 A, 2011. 05. 25, 权利要求  
1-8.

审查员 谢德

权利要求书1页 说明书8页  
序列表2页

(54) 发明名称

一株绿色木霉及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株绿色木霉及其应用。该绿色木霉(*Trichoderma viride*)菌株为 WLTR35, 保藏编号为 CGMCC No. 6673。本发明还公开了该菌株或者包括该菌株的生物防治制剂在防治植物土传病害中的用途。实验表明, 绿色木霉菌株 WLTR35 具有生长速度快、产孢量大、作用谱广及在能够快速大量定殖等特点, 因此具有良好的应用前景。由绿色木霉 WLTR35 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。

1. 一种绿色木霉(*Trichoderma viride*)菌株 WLTR35, 所述菌株的保藏编号为 CGMCC No. 6673。

2. 权利要求 1 所述的绿色木霉菌株 WLTR35 在防治植物土传病害中的用途; 所述植物土传病害为黄瓜炭疽病或者核桃炭疽病。

3. 一种生物防治制剂, 包括权利要求 1 所述的绿色木霉菌株 WLTR35。

4. 一种制备权利要求 3 所述的生物防治制剂的方法, 其特征是, 包括以下步骤:

(1) 制备绿色木霉菌株 WLTR35 的种子液;

(2) 将步骤(1) 制备的种子液接种到固体培养基中恒温培养;

(3) 将步骤(2) 培养的培养物用无菌水稀释, 过滤, 将滤液接种至大量发酵培养基中进行发酵培养。

5. 如权利要求 4 所述的制备方法, 其特征是,

(1) 将绿色木霉菌株 WLTR35 的孢子移植到 PDB 液体培养基中, 28℃ 摇床振荡培养 3~5 d 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℃ 下振荡培养 3~5 d;

(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℃、相对湿度 85% 以上的发酵室中发酵培养 8~9 d;

所述 PDB 培养基为: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 蒸馏水 1000mL; 所述固体培养基为: 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 60:40 的玉米芯和麸皮组成; 所述无机盐溶液按质量百分比计, 包括 3.5% 磷酸二氢钾, 0.04% 硫酸镁, 4% 硫酸铵, 剩余为水; 所述大量发酵培养基同固体培养基。

6. 权利要求 3 所述的生物防治制剂在防治植物土传病害中的用途, 所述植物土传病害为黄瓜炭疽病或者核桃炭疽病。

7. 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 的绿色木霉菌株 WLTR35 或者权利要求 3 的生物防治制剂; 所述植物土传病害为黄瓜炭疽病或者核桃炭疽病。

## 一株绿色木霉及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物防治植物病害领域。具体而言,本发明涉及一株绿色木霉及其应用,以及采用该绿色木霉菌株制备的生物防治制剂。

### 背景技术

[0002] 植物病害严重影响农林作物生长,甚至引起作物死亡,造成重大的经济损失。对于植物病害的防治,常规采用的方法包括传统的化学防治、培育抗病品种以及生物防治。抗病品种周期长,抗性单一。化学防治使用药剂时间长、使用量大,造成农药残留,环境污染;同时,化学农药的长期使用,使得病原菌对其产生抗药性,导致防效下降甚至失败。利用有益微生物防治植物病害具有广阔的前景。

[0003] 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。木霉通过产生抗生素、营养竞争、重寄生、细胞壁降解酶以及诱导植物产生抗性等机制,对于多种植物病原菌具有拮抗作用,可抑制多种植物病害,是目前生防菌株中研究最为广泛的菌株之一。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

[0004] 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——绿色木霉(*Trichoderma viride*)WLTR35。本发明的绿色木霉菌株具有生长速度快、产孢量大、作用谱广及在能够快速大量定殖等特点,因此具有良好的应用前景。

[0005] 本发明的另一个目的是提供一种采用绿色木霉 WLTR35 制备的能够高效防治植物病害的生物防治制剂。

[0006] 本发明的上述目的是通过以下技术方案实现的:

[0007] 本发明提供一种绿色木霉(*Trichoderma viride*)菌株WLTR35,所述菌株的保藏编号为CGMCC No. 6673。

[0008] 本发明所提供的菌株为绿色木霉 WLTR35,是从五莲县蘑菇上分离获得的,已于2012年10月12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:北京市朝阳区大屯路,中国科学院微生物研究所),保藏号为CGMCC No. 6673。其具有以下生物学特性:在PDA琼脂培养基上生长快,30℃黑暗条件下培养3d,菌落直径70mm。菌落初期白色稀疏,后期形成黄绿色产孢区。反面无色。菌丝聚隔,分枝。分生孢子梗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,4.5-10×2.5-3.5 μm。分生孢子椭圆形、单个,近无色,聚集时呈淡绿色,壁稍粗糙,3.5-5×3-4 μm。该菌株的rRNA基因序列测定结果(ITS-5.8S-ITS2区)如SEQ-1所示。

[0009] 本发明绿色木霉菌 WLTR35 的培养方法或繁殖方法包括:

[0010] (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;

[0011] (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。

[0012] (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 60:40 的玉米芯和麸皮组成;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。

[0013] (4)大量发酵培养配方:同(3)中固体培养基配方

[0014] 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绿色木霉 WLTR35。

[0015] 本发明所述的生物防治制剂的制备方法包括以下步骤:

[0016] (1)制备绿色木霉 WLTR35 的种子液;

[0017] (2)将步骤(1)制备的种子液接种到固体培养基中恒温培养;

[0018] (3)将步骤(2)培养的培养物用无菌水稀释,过滤,将滤液接种至大量发酵培养基中进行发酵培养。

[0019] 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:

[0020] (1)将绿色木霉 WLTR35 的孢子移植到 PDB 液体培养基中,28℃摇床振荡培养 3~5d 得到种子液;

[0021] (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℃下振荡培养 3~5d;

[0022] (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℃、相对湿度 85% 以上的发酵室中发酵培养 8~9d。

[0023] 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绿色木霉 WLTR35 或者上述生物防治制剂。

[0024] 本发明也提供了上述绿色木霉菌 WLTR35 或者上述生物防治制剂在防治植物土传病害中的用途。

[0025] 就上述生物防治制剂、生物防治方法以及用途而言,所述植物土传病害可以选自黄瓜炭疽病、核桃炭疽病、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、板栗枝枯病、石榴干腐病等一种或几种。

[0026] 实验表明,本发明的绿色木霉菌株 WLTR35 具有生长速度快、产孢量大、作用谱广及在能够快速大量定殖等特点,因此具有良好的应用前景。由该绿色木霉 WLTR35 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。该生物防治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,包括黄瓜炭疽病、核桃炭疽病、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、板栗枝枯病、石榴干腐病等一种或几种。

## 具体实施方式

[0027] 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。

#### [0028] 实施例 1

[0029] 1、绿色木霉菌(*T. viride*) WLTR35 (CGMCC No. 6673) 的分离与纯化

[0030] 本发明的绿色木霉菌(*T. viride*) WLTR35 (CGMCC No. 6673) 是从五莲县蘑菇上采用平板划线法分离获得的,分离方法为:

[0031] (1)木霉菌株的分离:取受害严重的蘑菇菌包,先用 75% 的酒精局部处理 1min,再在超净工作台上用紫外灯处理 20min 后,用灭菌刀片切开处理部位,用接种针挑取少量木霉菌孢子,在 PDA 平板上划线,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,转至 PDA 试管斜面保存备用。

[0032] (2)黄瓜炭疽病高效拮抗木霉菌株的筛选

[0033] ①初筛:采用对峙培养法,制备 PDA 平板,用打孔器在木霉菌、黄瓜炭疽病菌、核桃炭疽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。

[0034] 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。

[0035] 其中,PDA 培养基配方:马铃薯 200g(去皮),葡萄糖 20g,琼脂 12g,蒸馏水 1000mL。

[0036] 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绿色木霉菌(*T. viride*)WLTR35 (CGMCC No. 6673)。实验证明,该绿色木霉原粉在防治黄瓜炭疽病、核桃炭疽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,本发明的绿色木霉是具有广泛应用前景的绿色木霉新菌株,可以用于制备防治多种植物病害的生物防治制剂。

#### [0037] 2、菌株鉴定

[0038] (1)微生物学特性:在 PDA 琼脂培养基上生长快,30℃ 黑暗条件下培养 3d,菌落直径 70mm。菌落初期白色稀疏,后期形成黄绿色产孢区。反面无色。菌丝聚隔,分枝。分生孢子梗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,4.5-10×2.5-3.5 μm。分生孢子椭圆形、单个,近无色,聚集时呈淡绿色,壁稍粗糙,3.5-5×3-4 μm。

[0039] (2)分子生物学特性

[0040] 该菌株的 rRNA 基因序列测定结果(ITS-5.8S-ITS2 区)如下(SEQ-1):

[0041] CTTTCTTGGCACAATCGTGTCCGACAATCCTGTTCTCAGTCTTGCCAATTT

[0042] TTCTCGCGTCGTACACCCCGCTCTACCTGTCTACCCCTCCTTTGGCACA

[0043] GCAGAAATTTTCTGGCTGCCTTGTGGCTTTTGTAGTGGGGTGCCAATTTTT

[0044] TTTTGGCAACAACCCCGCTATCGCCGTTGTCCCTCATCCATCGTCCCAAC

[0045] AATTTGATCTCACTCAATCACATCGTCTTCTGGTTCATTGTGTCAAAGATT

[0046] CGATGATTCATGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCG

[0047] TTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAATGGGTTCTTGA

[0048] CAAGCTCAAGGCCGGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTCTG

[0049] GAAGTTCCGAGACTCCCAAGTACTATGTCACCGTCATTGGTATGTTTTGTG

[0050] TTTCTCATTGACCCCGGAATCCTTATTCTAACGTGCCGCTCTACAGACG  
[0051] CTCCCGGTACACGTGATTTTCATCAAGAACATGATCACTGGTACTTCCCAGG  
[0052] CTGACTGCGTATCCTGATTATCGCTGCCGGTACTGGTGAGTTCGAGGCTG  
[0053] GTATCTCCAAGGATGGCCAGACCCGTGAGCACGCTCTGCTCGCCTACACC  
[0054] CTGGGTGTCAAGCAGCTCATCGTTGCCATCAACAAGATGGACACTGCCA  
[0055] ACTGGGCCGAGGCTCGTTACCTTGAGATCATCAAGGAGACTCCAACCTTCA  
[0056] TCAAGAAGGTCCGCTTCAACCCCAAGTCCGTCGCCGCGCTCCCGGTGCG  
[0057] AGTGTGCAACTACTGCGCAGGAGAGGCTGCGGCGAGACCAACCCCTGG  
[0058] AAGGGCT GGGAGAAGGAGACCAAGGCT GGCAAGAGCA GCG

#### [0059] 实施例 2

##### [0060] 1、绿色木霉菌发酵过程

[0061] PDB 培养基配方：马铃薯 200g（去皮），葡萄糖 20g，蒸馏水 1000mL。

[0062] 大量固体发酵培养基配方（质量百分含量）：

[0063] 固料：玉米芯 60%，麸皮 40%

[0064] 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。

[0065] 固液比为 1:1.8（质量比）

[0066] 绿色木霉(*T. viride*) WLTR35 (CGMCC No. 6673) 大量固体发酵过程：

[0067] ①菌种种子液培养：将绿色木霉菌(*T. viride*) WLTR35CGMCC No. 6673 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 3～5d，此为种子液。

[0068] ②固体生产菌种的培养：将种子液按 10% 的质量比接种到固体培养基（500mL 三角瓶）中，28℃恒温培养 3～5d，中间多次振荡。

[0069] 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，接种比例按 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 8～9d，即可得到木霉菌原粉。

#### [0070] 实施例 3

[0071] 本实施例提供了绿色木霉(*T. viride*) WLTR35 (CGMCC No. 6673) 原粉对黄瓜炭疽病防病增产的相关实验。

##### [0072] 1、供试药剂

[0073] 绿色木霉 WLTR35 原粉（实施例 2 中制备）、70% 代森锰锌可湿性粉剂（市售）。

##### [0074] 2、供试作物与防治对象

[0075] 供试作物为黄瓜，品种为长春密刺；

[0076] 防治对象为炭疽病。

##### [0077] 3、试验地情况

[0078] 试验地设在山东省寿光黄瓜大棚种植基地，该基地大棚黄瓜炭疽病近几年发生严重，且防治困难，试验在 600 平方米（0.9 亩）黄瓜大棚内，土质为轻壤土，有机质含量为 1.09%，pH 值为 6.7，所有试验小区栽培条件及管理措施一致，施药时黄瓜炭疽病处于发病初期。

##### [0079] 4、试验设计及安排

[0080] 本试验设绿色木霉菌 WLTR35 原粉 200 倍、400 倍、600 倍、70% 代森锰锌可湿性粉

剂 800 倍液及不施药清水作对照共 5 个处理,重复 4 次,共 20 个小区,各小区随机排列,小区面积为 20m<sup>2</sup>。于 2012 年 6 月 9 日和 6 月 16 日各喷药一次,将植株叶片上下喷洒均匀、周到,喷药时用塑料布遮挡,亩用药液 60kg,喷药器械为工农-16 型喷雾器。

[0081] 5、试验调查及计算方法

[0082] (1) 气象条件

[0083] 第 1 次施药(2012 年 6 月 9 日)当日晴,风力 2 级,最高气温为 29℃,最低气温为 15℃,相对湿度为 65%。第 2 次施药(2012 年 6 月 16 日),当日晴,风力 3 级,最高气温为 25℃,最低气温为 18℃,相对湿度为 75%;因塑料大棚环境条件相对稳定,所以该气候对药效没有影响。

[0084] (2) 药效及安全性调查

[0085] 药效调查:第 1 次施药前和最后一次施药后 14d 进行调查。每小区采用 4 点取样法,每点查 2 株,调查全部叶片,调查发病率,记录病情级数并计算病情指数。

[0086] 安全性调查:于第一次施药后 7d 和 14d 观察黄瓜的安全性,如有药害发生,详细描述药害症状并按药害程度分级标准确定药害程度。

[0087] 分级方法(以叶片为单位):

[0088] 0 级:无病斑

[0089] 1 级:病斑面积占整个叶面积的 5% 以下;

[0090] 3 级:病斑面积占整个叶面积的 6%-10%;

[0091] 5 级:病斑面积占整个叶面积的 11%-25%;

[0092] 7 级:病斑面积占整个叶面积的 26%-30%;

[0093] 9 级:病斑面积占整个叶面积的 50% 以上;

[0094] (3) 调查时间和次数

[0095] 施药前调查病情基数,下次施药前及末次施药后 14d 调查防治结果。

[0096] (4) 药效计算方法

[0097] 药效按式(1)、(2)计算:

[0098]

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总叶数} \times 9} \times 100$$

[0099]

$$\text{病情指数增长率}(\%) = \frac{\text{防治后病情指数} - \text{防治前病情指数}}{\text{防治前病情指数}} \times 100$$

[0100]

$$\text{校正防效}(\%) = \frac{\text{对照区病指增长率} - \text{防治区病指增长率}}{\text{对照区病指增长率}} \times 100$$

[0101] (5) 对作物的直接影响

[0102] 观察药剂对作物有无药害,记录药害的类型和程度。

[0103] 6、结果

[0104] (1) 供试药剂对黄瓜炭疽病的防治效果

[0105] 表 1 结果显示,绿色木霉菌 WLTR35 原粉 200 倍、400 倍、600 倍处理后病情指数增长率分比为 188.68%、229.50%、278.71%,对照药剂的病情指数增长率为 306.56%,均低于对照

的病情指数增长率 1155.05%。绿色木霉菌 WLTR35 原粉 200 倍、400 倍的校正防治效果分别为 83.66%、80.13%，在  $P < 0.05$  水平上无显著性差异，均高于其它处理的校正防治效果。绿色木霉菌 WLTR35 原粉 600 倍与 70%代森锰锌可湿性粉剂对黄瓜炭疽病的防治效果在  $P < 0.05$  水平上无显著性差异，分别为 75.87%、73.46%。由此可见绿色木霉菌 WLTR35 原粉可有效控制黄瓜炭疽病的危害。

[0106] 表 1 各个处理后黄瓜炭疽病的病情指数及防治效果

[0107]

处理	药前病情 指数	第 2 次施药后 14d		
		病情指数	病指增长率(%)	校正防治效果 (%)
绿色木霉菌 WLTR35 原 粉 200 倍	1.06	3.06	188.68	83.66a
绿色木霉菌 WLTR35 原 粉 400 倍	1.39	4.58	229.50	80.13a
绿色木霉菌 WLTR35 原 粉 600 倍	1.55	5.87	278.71	75.87b
70%代森锰锌可湿性粉 剂 800 倍	1.22	4.96	306.56	73.46b
CK (清水对照)	1.09	13.68	1155.05	

[0108] (2) 黄瓜安全性调查：经施药 7d 和 14d 观察，各药剂处理区与对照区相比，黄瓜生长正常，无药害产生，说明绿色木霉菌 WLTR35 原粉在供试浓度对黄瓜安全。

[0109] (3) 绿色木霉原粉对黄瓜增产效果

[0110] 表 2 绿色木霉菌 WLTR35 原粉对黄瓜增产效果分析表

[0111]

处理	小区产量				折亩产量 (kg)	比对照增产	
	重复 I	重复 II	重复 III	平均		kg/亩	%
1	230.12	253.96	251.65	245.24A	4895.10	1048.04	27.24
2	228.56	249.98	247.25	241.93A	4828.97	981.91	25.52
3	220.13	229.65	246.61	232.13B	4633.36	786.30	20.44
4	190.65	195.36	192.2	192.74C	3847.06		

[0112] 注：小区面积 33.4m<sup>2</sup>；处理 1 为绿色木霉菌 WLTR35 原粉 200 倍，处理 2 为绿色木霉菌 WLTR35 原粉 400 倍，处理 3 为绿色木霉菌 WLTR35 原粉 600 倍，处理 4 为对照组。表中数据后不同的字母表示经 Duncan 多重比较后差异显著 ( $P < 0.01$ )。

[0113] 由表 2 结果可知，在黄瓜上喷灌绿色木霉菌 WLTR35 原粉各处理对比对照区，增产率分别为 27.24%、25.52% 和 20.44%；效果十分明显。

[0114] 因此，从病情指数增长率和防治效果来看，绿色木霉菌 WLTR35 原粉对黄瓜炭疽病具有较好的防治效果，防治效果可达 75% 以上，明显好于对照药剂，差异显著。从黄瓜增产效果看，绿色木霉菌 WLTR35 原粉对黄瓜具有明显的促生增产效果，2 次施药后增产率达 20%



以上。

[0115] 实施例 4

[0116] 本实施例提供了绿色木霉菌 WLTR35 原粉对核桃炭疽病防治效果的相关实验。

[0117] 1) 供试药剂

[0118] 绿色木霉菌 WLTR35 原粉(实施例 2 中制备);70%代森锰锌可湿性粉剂(市售)。

[0119] 2) 供试作物与防治对象:

[0120] 供试作物为核桃,品种为香玲;

[0121] 防治对象:炭疽病。

[0122] 3) 试验地情况、试验设计及安排

[0123] 试验地设在山东省泰安市核桃种植园,土壤为砂土地。核桃树为 10 年生香玲,株距 3m×4m,树势中等偏弱,病害发生严重。

[0124] 本试验设绿色木霉菌 WLTR35 原粉 200 倍、400 倍、600 倍,70%代森锰锌可湿性粉剂 800 倍液及不施药清水作对照共 5 个处理,重复 4 次。核桃开花后 3 周用药,每隔 15d 施药 1 次,共计 7 次。采收前 5d 调查,每个处理随机调查 300 个果实,计算病果率、防治效果,整个试验调查 1 次。将植株叶片上下喷洒均匀、周到,喷药时用塑料布遮挡,亩用药液 60kg,喷药器械为工农-16 型喷雾器。

[0125] 5) 试验调查及计算方法

[0126] (1) 气象条件

[0127] 第 1 次施药(2012 年 4 月 19 日)当日晴,微风,最高气温为 23℃,最低气温为 12℃,相对湿度为 75%;第 2 次施药(2011 年 5 月 4 日),当日晴,风力 2 级,最高气温为 29℃,最低气温为 15℃,相对湿度为 70%;第 3 次施药(2011 年 5 月 19 日),当日晴,风力 2 级,最高气温为 30℃,最低气温为 17℃,相对湿度为 65%;第 4 次施药(2011 年 6 月 3 日),当日晴,风力 2 级,最高气温为 30℃,最低气温为 19℃,相对湿度为 60%;第 5 次施药(2011 年 6 月 18 日),当日晴转多云,风力 4 级,最高气温为 34℃,最低气温为 21℃,相对湿度为 75%;第 6 次施药(2012 年 7 月 3 日),当日晴,风力 2 级,最高气温为 34℃,最低气温为 24℃,相对湿度为 85%;第 7 次施药(2011 年 7 月 18 日),当日阴转多云,风力 4 级,最高气温为 33℃,最低气温为 24℃,相对湿度为 85%。

[0128] (2) 药效及安全性调查

[0129] 药效调查:采收前 5d 调查,每个处理随机调查 300 个果实,计算病果率、防治效果

[0130] 安全性调查:于每次施药后 7d 观察核桃的安全性。

[0131] (3) 药效计算方法

[0132] 药效按式(1)、(2)计算:

[0133]

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

[0134] (4) 对作物的直接影响

[0135] 观察药剂对作物有无药害,记录药害的类型和程度。并记录对作物的其他影响。

[0136] 6) 结果

[0137] (1) 供试药剂对核桃炭疽病的防治效果

[0138] 采收前 5d 调查病果率,表 3 结果显示,清水对照的病果率高达 5.366%,各个处理的病果率均低于清水对照。绿色木霉菌 WLTR35 原粉 200 倍、400 倍、600 倍处理后的病果率分别为 8.63%、9.98%、12.36%,均低于对照药剂 18.69%的病果率;绿色木霉菌 WLTR35 原粉各个浓度的防治效果分别为 83.92%、81.40%、76.97%,其中 200 倍和 400 倍的防治效果在  $P < 0.05$  水平上无显著性差异,70%代森锰锌可湿性粉剂对核桃炭疽病的防治效果为 65.17%。绿色木霉菌 WLTR35 原粉可有效控制核桃炭疽病的危害。

[0139] 表 3 各个处理后核桃炭疽病的发病率及防治效果

[0140]

处理	病果率 (%)	防治效果 (%)	差异显著性
绿色木霉菌 WLTR35 原粉 200 倍	8.63	83.92	a
绿色木霉菌 WLTR35 原粉 400 倍	9.98	81.40	a
绿色木霉菌 WLTR35 原粉 600 倍	12.36	76.97	b
70%代森锰锌可湿性粉剂 800 倍	18.69	65.17	c
清水对照(CK)	53.66	-	

[0141] 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 ( $P < 0.05$ )。

[0142] (2)核桃安全性调查:经观察,各药剂处理区与对照区相比,核桃生长正常,无药害产生,说明绿色木霉菌 WLTR35 原粉在供试浓度对核桃安全。

[0143] 因此,从发病率和防治效果来看,绿色木霉菌 WLTR35 对核桃炭疽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

&lt;110&gt; 山东省林业科学研究院

&lt;120&gt; 一株绿色木霉及其应用

&lt;130&gt; 0

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 891

&lt;212&gt; DNA

<213> 绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 菌株 WLTR35

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; rRNA

&lt;222&gt; (1)..(891)

&lt;223&gt; 该菌株的 rRNA 基因

&lt;400&gt; 1

```

ctttcttggc acaatcgtgt ccgacaatcc tgttctcagt cttgccaatt ttctcgcgt      60
cgtcacacc cgtctacet gtctaccct ctttggcac agcagaaatt tctggctgc      120
ctgtttggc ttttagtggg gtgccaattt tttttggca acaaccccg c tategcegt      180
gtccctcacc cctcgtccca acaattgat ctactcaat cacatcgfct tctggtfcat      240
tgtgtcaaag atcagatgat tcaactgaat ctgcaattca cactacttat cgcatttgc      300
tgcgttcttc atcagatgcca gaaccaagag atccggtgtt gaatgggttc ttgacaagct      360
caaggccggc gtgagcgtgg taccaccatc gacattgccc tctggaagtt cgagactccc      420
aagtaactatg tcaccgtcat tggatgttt tgtgttctt cattgacccc cggaatcctt      480
attctaactg gccgctctac agacgctccc ggtcacgtga ttcacaaag aacatgatca      540
ctggtacttc ccaggetgac tgcgtatcct gattategct gccggtactg gtgagttgca      600
ggctggtatc tccaaggatg gccagaccgg tgagcacgct ctgctcgcct acaccctggg      660

```

[0002]

---

tgcaagcag ctcacgttg ccatcaaaa gatggacct gccaaactggg ccgaggctcg	720
ttacctgag atcatcaagg agactccaac tcatcaaga aggtcggctt caaccceaag	780
tccgfcgccc egctcccgtt gcgagtgtc aactactgcg caggagagc tgcggcgaga	840
ccaaccctg gaagggctgg gagaaggaga ccaaggctgg caagagcagc g	891