

丛枝菌根真菌领域专利情报分析

梁林洲, 陈 香, 董晓英, 沈仁芳*

(中国科学院南京土壤研究所/土壤与农业可持续发展国家重点实验室, 江苏南京 210008)

摘要: 丛枝菌根真菌 (AMF) 与植物共生在提高植物的抗逆性、抗病性和维护植物健康方面发挥着关键作用, 其在农业、林业和生态环境等方面的应用受到广泛关注。本研究基于 incoPat 科技创新情报平台, 检索了 2019 年前国内外丛枝菌根真菌的专利产出, 对专利申请数量、主要申请人、技术构成等方面进行了分析, 以揭示国内外丛枝菌根真菌领域的研发状况、技术发展趋势和产学研合作情况。近年来, 中国丛枝菌根真菌领域专利数量急剧增加, AMF 产品化不断加强, AMF 应用领域从农业领域向污染修复领域拓展, 结合现代生物、信息技术等新兴技术的 AMF 检测技术和研究方法正在快速发展, 新的研发充分考虑了 AMF 产品化和应用的结合; 我国在丛枝菌根真菌领域的专利申请人多隶属高校和科研院所, 企业参与度较低。AMF 菌种扩繁和污染修复领域的应用已成为焦点, 生物和信息新技术成果正引入 AMF 检测技术的开发; 中国在丛枝菌根真菌领域的产学研合作研发亟需加强。

关键词: 丛枝菌根真菌; 技术; 专利分析; 发展趋势

Analysis of patents on arbuscular mycorrhizal fungi

LIANG Lin-zhou, CHEN Xiang, DONG Xiao-ying, SHEN Ren-fang*

(State Key Laboratory of Soil & Sustainable Agriculture, Institute of Soil Science,
Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, China)

Abstract: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant symbiosis plays a key role in improving plant resistance and disease resistance, and maintaining plant health. Their applications in agriculture, forestry and ecological environment have received widespread attention. Based on the incoPat, a technology innovation information platform, retrievals were made of output of patents on AMF at home and abroad before 2019, for analysis of number of applications, technology composition, major applicants, etc. of the patents, in an attempt to reveal R&D status, technology development trends and industry-university-research cooperation in the field of AMF. In recent years, the number of patents has been increasing significantly in China. AMF propagation techniques have been continuously strengthened. Application fields of AMF have extended from agriculture to soil pollution remediation. Testing and research methods are being developed in combination with emerging technologies such as modern information technology, and integration of AMF commercialization and application is fully considered in the new R&D. At present, most of the patent applicants in this aspect in China are from universities and scientific research institutions, fewer from enterprises. AMF strain propagation and application in pollution remediation have become a focus. Novel technological achieved in the fields of biology and information science are being introduced into the development of AMF detection technology. In China, the industry-university-research cooperation in this field needs to be strengthened urgently.

Key words: arbuscular mycorrhizal fungi (AMF); technique; patent analysis; development trend

收稿日期: 2020-08-17 接受日期: 2020-11-16

基金项目: 国家重点研发计划专项 (2016YFD0200302, 2017YFF0108201); 国家自然科学基金项目 (41877021)。

联系方式: 梁林洲 E-mail: lzliang@issas.ac.cn; * 通信作者 沈仁芳 E-mail: rfshen@issas.ac.cn

丛枝菌根真菌 (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) 是广泛分布于各种类型土壤中的一类特殊微生物, 能与陆地上 80% 以上的植物形成共生关系, 包括大田作物、蔬菜、果树、中药材等植物^[1-4]。AMF 在提高植物的抗逆性和抗病性, 维护植物健康方面发挥着关键作用。

专利文献是科技信息的重要载体和表现形式, 专利信息包含了全球 90% 以上的研发产出, 它不仅能快速反映科学技术发展的最新前沿水平, 也能反映企业的自主知识产权战略布局和市场地位^[5-6]。对相关研发领域的专利信息进行计量分析, 有助于了解和掌握研发领域的发展态势和研究热点, 已经广泛应用于评估行业部门、企业研发能力及潜力的研究中^[7], 是当前信息情报研究的一种重要手段。

基于 AMF 领域的全球专利申请趋势、申请人、技术构成等要素分析, 揭示该领域的专利现状和发展态势, 提出未来研发建议与展望, 以期为我国 AMF 技术领域相关科研人员的研发和国家产业布局提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 数据来源

本次专利检索分析, 采用北京合享智慧科技有限公司开发的 incoPat 科技创新情报平台作为数据源 (<https://www.incopat.com/>)。为保证专利文献检索的全面性, 检索式为“TI=(菌根 or arbuscular mycorrhiza*, *代替任何单个或多个字母, 以防漏检)”, 检索了 2020 年 3 月 31 日之前的专利申请。对初步检索到的

结果进行人工去噪并标引, 最终获取 AMF 领域的相关专利 524 项, 其中中国的专利申请为 255 项。

1.2 分析方法

基于 incoPat 数据库的专利分析平台, 利用 Excel 2016 分析软件对 AMF 领域相关专利数据进行计量统计和可视化分析。分别以专利申请量、申请人、专利技术特征等为指标进行分析, 揭示丛枝菌根真菌领域的专利文献分布现状、竞争态势、主要的技术特征以及研究热点和研究发展趋势。

2 结果与分析

2.1 全球丛枝菌根真菌专利申请量的年度变化

通过对全球 AMF 专利申请量的统计分析 (图 1) 可以发现, 全球 AMF 专利的年度申请量整体呈现快速上升的趋势。2000—2004 年, 专利申请量较少, 专利申请人数量也较少, 每年的申请量不到 10 项; 2005—2017 年, 专利申请量呈现指数型增长, 专利申请量从 11 项上升至 62 项; 2017 和 2018 年的专利申请量处于高峰, 申请量超过 50 项。中国在 AMF 领域的专利变化趋势与国际的发展趋势保持一致。2009—2018 年, 中国的 AMF 专利数量得到快速、大幅增加, 自 2011 年开始, 中国的 AMF 专利申请量占全球一半以上, 2018 年的申请数量达到 49 项, 占全球该领域专利申请量的 90.7%。1999 年以前, 日本是丛枝菌根真菌主要的专利布局国家, 其专利申请占全球的 41.3%; 2000 年以来, 中国是主要的该领域专利布局国家, 其次是印度和世界知识产权组织。

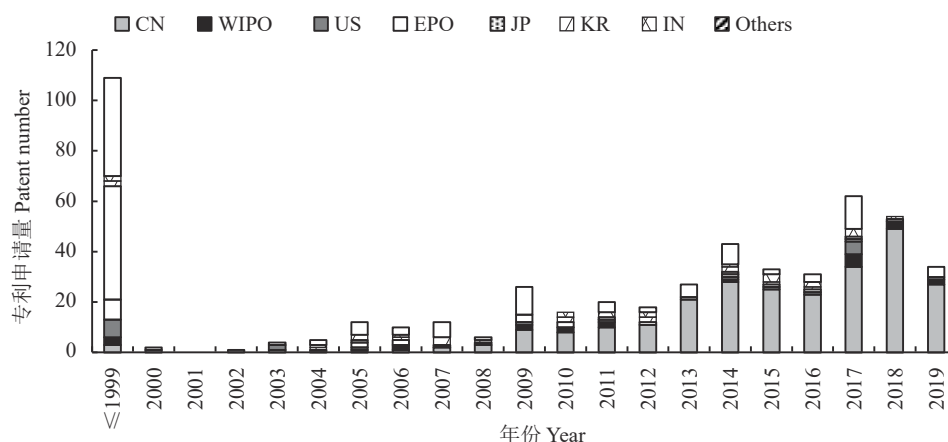


图 1 丛枝菌根真菌专利申请数量的年度变化趋势

Fig. 1 Annual variation trend of the number of patent applications on arbuscular mycorrhizal fungi

[注 (Note): CN—中国 China; WIPO—世界知识产权组织 World Intellectual Property Organization; US—美国 The United States; EPO—欧洲专利局 European Patent Office; JP—日本 Japan; KR—韩国 South Korea; IN—印度 India.]

2.2 丛枝菌根真菌专利的主要申请人

丛枝菌根真菌领域的专利申请人排名可以反映该领域主要的研发机构及其竞争态势。2019 年之前全球 AMF 领域专利申请总量前 10 的申请机构年度申请情况见图 2, 前 3 申请机构均为企业, 前 4 至前 10 的申请机构属于研究所或高校, 中国有 3 家高校进入前 10。前 10 申请机构的专利申请量占总申请量的 25.2%, 其中 1999 年之前占比达到 37.6%, 2000—2019 年间的占比为 21.9%。前 10 申请人的专利申请主要集中在 2009 年之后。专利申请量最多的是 Idemitsu Kosan Co Ltd, 专利申请量为 22 项, 申请国别为日本, 其申请时间在 1991—1995 年, 目前这些专利都已失效。专利申请量排第二的 Valent Biosciences LLC, 专利申请量为 19 项, 申请时间集中在 2017 和 2019 年, 专利在全球多个国家布局。法国国家科学研究中心 (French National Centre for Scientific Research) 最早专利申请是 1984 年, 近年仍然有专利申请。Symplanta GmbH & Co KG 的专利申请在 2013—2016 年间, 在全球多个国家布局。University of Michigan State 的专利申请在 1989—1997 年间, 其专利在多国布局, 之后未见申请。中国的南京农业大学、中国矿业大学 (北京) 和河南科技大学三家高校进入前 10, 他们的专利申请量分别是 11、9 和 8 项, 专利申请国别为中国, 申请时间在 2009—2018 年间, 专利申请较为活跃。

2.3 丛枝菌根真菌的专利技术领域

通过分析全球专利的技术构成 (图 3), 丛枝菌根真菌的技术主要集中在 A01G (水稻、蔬菜、果树、花卉等农林植物的栽培; 灌溉) 领域。中国在 A01G 技术领域的专利高达 90 项, 占全球申请量的 55.2%, 其次日本在该技术领域的专利为 25 项。排在第二位的技术构成是 C12N (微生物或酶; 促进微生物生长的组合物; 繁殖、保藏或维持微生物; 变异或遗传工程; 培养基), 中国在这个领域的专利 40 项, 占 42.1%。C05G (分属于 C05 大类下各小类中肥料的混合物; 由一种或多种肥料与无特殊肥效的物质例如农药、土壤调理剂、润湿剂所组成的混合物; 固体肥料)、A01N (人体、动植物体或其局部的保存; 杀生剂, 例如作为消毒剂、作为农药或作为除草剂; 害虫驱避剂或引诱剂; 植物生长调节剂) 和 C05F (不包含在 C05B、C05C 小类中的有机肥料, 如用废弃物或垃圾制成的肥料) 技术领域的专利申请量分别列在第三、第四和第五位。国外专利集中在以上 5 个技术领域, 中国专利有超过 20 项分布在 A01H (新植物或获得新植物的方法, 通过组织培养技术的植物再生) 和 B09C (污染土壤的再生) 技术领域。

技术功效矩阵分析有助于寻找技术空白点、热点和突破点, 从丛枝菌根真菌领域专利的技术功效矩阵分布图 (图 4) 可以看出, 菌种扩繁、菌种刺激

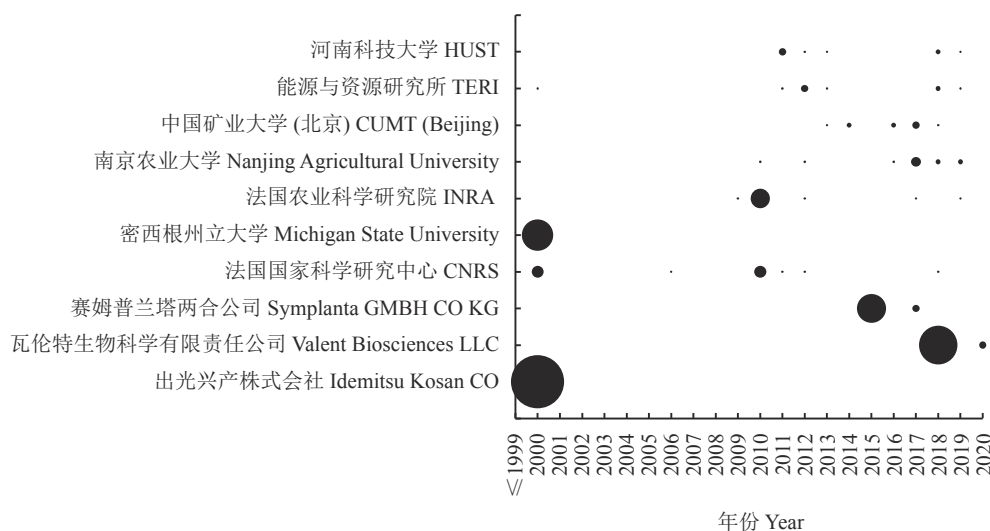


图 2 主要研发机构专利申请量的年变化趋势

Fig. 2 Annual variation trend of the number of patent applications from major research and development institutions

[注 (Note): HUST—Henan University of Science and Technology; TERI—The Energy and Resources Institute; CUMT—China University of Mining and Technology; INRA—Institut National De La Recherche Agronomique; CNRS—French National Centre for Scientific Research. 气泡大小表示研究机构的专利申请量 Bubble size indicates the number of patent applications from research institutions.]

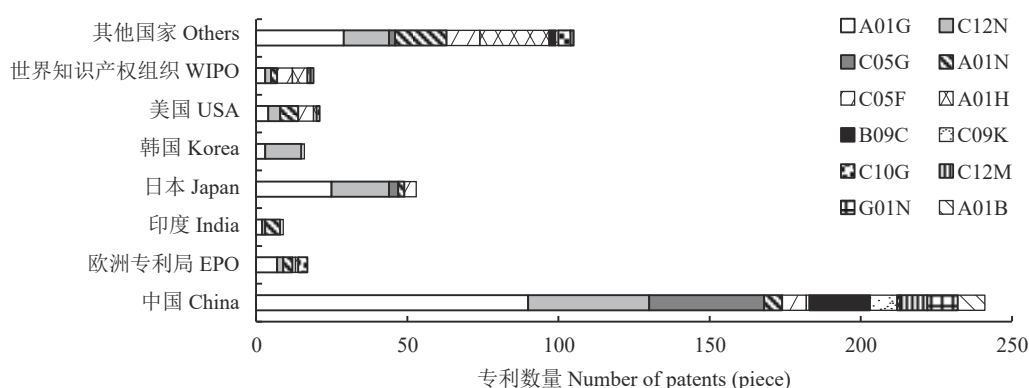


图3 全球丛枝菌根真菌领域专利的技术分布

Fig. 3 Distribution of the technologies patented on arbuscular mycorrhizal fungi in the world

[注 (Note): A01G—水稻、蔬菜、果树、花卉等农林植物的栽培; 灌溉 Cultivation of agricultural and forestry plants, such as rice, vegetable, fruit, flower; irrigation; C12N—微生物或酶; 促进微生物生长的组合物; 繁殖、保藏或维持微生物; 变异或遗传工程; 培养基 Micro-organisms or enzymes; composition promoting the growth of microorganisms; propagating, preserving, or maintaining micro-organisms; mutation or genetic engineering; culture media; C05G—分属于 C05 大类下各小类中肥料的混合物; 由一种或多种肥料与无特殊肥效的物质, 例如农药、土壤调理剂、润湿剂所组成的混合物; 固体肥料 Mixtures of fertilizers covered individually by different subclasses of class, -see cross reference IPCC05; mixtures of one or more fertilizers with materials not having a specific fertilizing activity, e.g. pesticides, soil-conditioners, wetting agents; solid fertilizers; A01N—人体、动植物体或其局部的保存; 杀生剂, 例如作为消毒剂, 作为农药或作为除草剂; 害虫驱避剂或引诱剂; 植物生长调节剂 Preservation of bodies of humans or animals or plants or parts thereof; biocides, e.g. as disinfectants, as pesticides, as herbicides; pest repellants or attractants; plant growth regulators; C05F—不包含在 C05B、C05C 小类中的有机肥料, 如用废弃物或垃圾制成的肥料 Organic fertilisers not covered by subclasses-see cross reference IPC C05B,-see cross reference IPC C05C, e.g. fertilizers from waste or refuse; A01H—新植物或获得新植物的方法; 通过组织培养技术的植物再生 New plants or processes for obtaining them; plant reproduction by tissue culture techniques; B09C—污染土壤的再生 Reclamation of contaminated soil; C09K—不包含在其他类目中的各种应用材料; 不包含在其他类目中的材料的各种应用 Materials for miscellaneous applications, not provided for elsewhere; C10G—烃油裂化; 液态烃混合物的制备, 例如用破坏性加氢反应、低聚反应、聚合反应; 从油页岩、油矿或油气中回收烃油; 含烃类为主的混合物的精制; 石脑油的重整; 地蜡 Cracking hydrocarbon oils; production of liquid hydrocarbon mixtures, e.g. by destructive hydrogenation, oligomerisation, polymerisation; recovery of hydrocarbon oils from oil-shale, oil-sand, or gases; refining mixtures mainly consisting of hydrocarbons; reforming of naphtha; mineral waxes; C12M—酶学或微生物学装置 Apparatus for enzymology or microbiology; G01N—借助于测定材料的化学或物理性质来测试或分析材料 Investigating or analysing materials by determining their chemical or physical properties; A01B—农业或林业的整地, 一般农业机械或农具的部件、零件或附件 Soil working in agriculture or forestry; parts, details, or accessories of agricultural machines or implements, in general.]

物和菌种保存的研究是丛枝菌根真菌领域的重点和热点, 农林应用和污染修复也得到关注。在技术效果上, 菌种扩繁技术主要关注的是提高菌种产量, 其次是提高菌种稳定性; 菌种刺激物技术重点关注提高菌种活力; 菌种保存的研发主要关注提高作物产量、作物抗逆性和保持菌种稳定性方面; 农林应用关注的是提高作物产量、作物抗逆性和作物抗病性; 污染修复的技术研发基本集中在修复效率的提升方面; 检测技术重点是提高精度; 研究方法则侧重提高效率方面。

2.4 丛枝菌根领域专利的发展趋势

由图5可以看出, 2000年以前, AMF 技术的研发侧重在菌种扩繁、菌种刺激物和菌种保存方面, 菌种的农林应用也有涉及, 污染修复和生态恢复涉及不多。AMF 领域在 2000—2019 年的演变趋势分为 2000—2004 年、2005—2013 年、2014—2019 年

3 个阶段。2000—2004 年间, 专利申请量较少, 研究主题分散在菌种扩繁、菌种刺激物、菌种保存和农林应用; 2005—2013 年, 菌种扩繁、菌种刺激物、菌种保存和农林应用仍然是主要方向, 一些研发团队开始涉足污染修复、生态应用、检测技术和研究方法; 2014—2019 年, AMF 领域的专利申请量有较大的增加, 菌种扩繁、菌种刺激物、菌种保存和农林应用依然是主要方向, 污染修复、检测技术和研究方法也有加强。

3 讨论

3.1 全球丛枝菌根真菌领域专利现状与趋势

专利申请数量是技术产出的直接反映, AMF 专利在全球地域分布显示, 日本、欧洲和美国是较早申请该领域专利的国家, 具有较高影响力; 2000 年以来, 中国是该领域专利申请数量最多的国家, 中

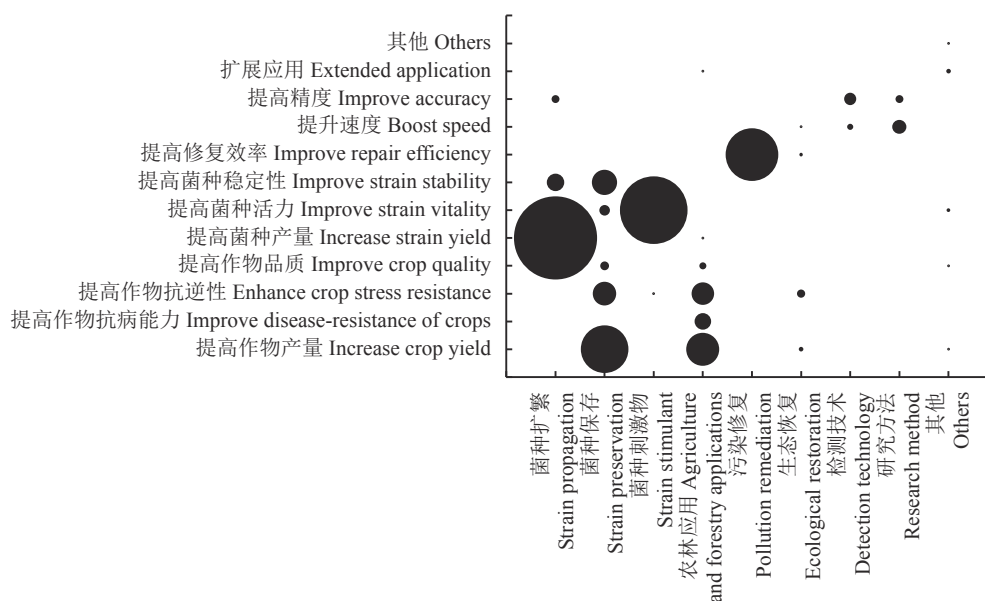


图 4 丛枝菌根真菌技术功效矩阵

Fig. 4 Technical effect diagram of arbuscular mycorrhizal fungi technology

[注 (Note): 气泡大小表示采用某一技术手段实现某一技术效果的专利申请量的大小 Bubble size indicates the number of applications for patents on the use of a certain technical means to achieve a certain technical effect.]

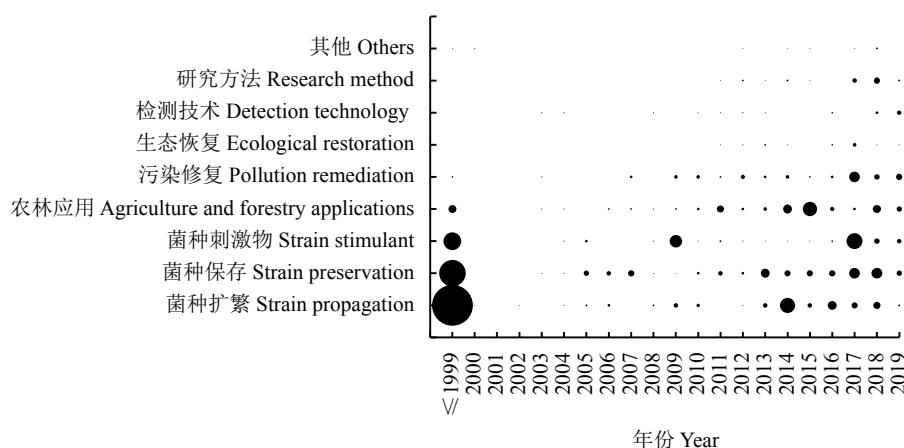


图 5 中国不同技术类别专利申请的年度发展趋势

Fig. 5 Annual development trend of patent applications in different technology categories in China

[注 (Note): 气泡大小代表技术主题的年度专利申请量的大小 Bubble size indicates the number of applications for patents on the technical subject.]

国和印度是该领域专利的主要申请国家 (图 1)。通过对 AMF 专利技术生命周期的分析, 2009—2018 年处于专利申请快速增长期, 说明全球正处于 AMF 技术的发展期。同时, 自 2011 年以来, 中国的 AMF 专利申请量占全球一半以上, 表明该领域相关企业或战略投资者加大研发投入并在中国进行战略布局。全球排名前 3 的 AMF 专利申请机构均为企业, 中国有 3 家高校进入前 10 (图 2)。中国企业的专利申请量明显低于高校和科研机构, 表明我国在该技

术领域仍处于基础研究阶段, 产业化程度低, 研发与产业化存在较为明显的脱节。

丛枝菌根真菌专利所涉及的技术分类主要包括菌种扩繁、菌种保存、菌种刺激物、农林应用、污染修复、生态恢复、检测技术、研究方法 (图 3、图 4、图 5)。2000 年以前, AMF 技术的研发侧重在菌种扩繁、菌种刺激物和菌种保存方面; 2005—2013 年, 菌种扩繁、菌种刺激物、菌种保存和农林应用是研发的主要方向, 一些研发团队开始涉足污染修复、

生态应用、检测技术和研究方法；2014 以来，AMF 的污染修复应用、AMF 检测技术和研究方法的专利数量有明显增加。

3.2 丛枝菌根真菌的产品化技术

丛枝菌根真菌产品化包括菌种扩繁、菌种保存和菌种刺激物的生产过程，也是 AMF 技术应用的前提。AMF 扩繁方法有活体培养(盆钵培养法、培养基培养法、静止营养液培养法、流动营养液培养法、雾化培养法、玻璃珠分室培养法、大田培养法)、离体纯培养和离体双重培养。静止营养液和流动营养液培养法产生孢子量较少，双重无菌培养法和玻璃珠培养法操作和技术难度大且产孢子数量少，大田培养法是菌剂易受到污染，这些方法均不适用于商业化生产。盆钵培养法和雾化培养法是目前商业化生产的主要方法。AMF 的离体纯培养还处于探索阶段，没有突破性的进展，从而限制了其研究的深入及其在生产实践中的大规模应用^[8-11]。AMF 菌种扩繁的专利申请包括生产 AMF 的培养方法、培养基质、装备、工艺等技术及改进，发明主要关注提高菌种产量、缩短生产时间和提高菌种稳定性等方面。最早的 AMF 菌种扩繁的专利是 National Research Development Corporation 于 1980 年在德国、欧洲专利局、奥地利和英国提出的菌根真菌生产工艺的保护申请(DE3067307, EP80300367, AT30036780, GB8004133)，该申请公开了一种基于营养膜培养生产 AMF 菌剂的方法，同年该研发团队又在日本、西班牙、美国、以色列、南非、澳大利亚申请了专利保护。French National Centre for Scientific Research 于 1984 年在法国公开了水培条件下连续大规模扩繁 AMF 的方法(FR84011725)，1985 年该研发团队在德国、欧洲专利局、奥地利、加拿大申请了专利保护。2008 年开始，中国的高校、研究机构、企业和个人开始申请菌种扩繁的专利保护。中国最早关于 AMF 菌种扩繁的专利是 2008 年公开的一种培养丛枝菌根真菌接种菌的方法及装置(CN200810067947.9)，该专利利用气栽法培养 AMF 接种菌，提高了 AMF 菌种的纯度，便于贮藏和运输。2009 年开始，浙江师范大学、贵州省烟草科学研究所、上海弘升科技发展有限公司、中国矿业大学(北京)、兰州大学、南京农业大学等陆续申请了 AMF 扩繁的技术保护；2016 年开始，菌种扩繁的中国专利申请超过全球申请的一半。

丛枝菌根真菌的繁殖体通常包括孢子、菌丝、

侵染的植物根段，或三者的混合物^[4]。AMF 菌种保存的吸附载体通常分为固体和液体两大类。固体菌剂是以土壤-沙子及一定比例的添加物如泥炭、蛭石、珍珠岩等混合物作为 AMF 繁殖体载体制成的菌剂，一般为粉状或颗粒状，是目前农业和生态上使用最广泛的菌剂类型^[12]。胶囊菌剂以聚丙烯酰胺或海藻酸盐为载体，将目的 AMF 菌种繁殖体及生物添加剂(如营养元素、植物激素、黄酮类物质等)包埋其中，制成胶囊^[13]。液体菌剂一般以液体如植物油、水及合成有机聚合物等作为 AMF 繁殖体载体，其成分明确、可控^[14]。AMF 菌种保存的专利申请内容包括吸附剂、填充剂等辅助材料的选择及制作，使得菌种在应用中充分发挥提高植物表现(产量)、作物品质、植物抗逆性、菌种稳定性等功效。最早的 AMF 菌种保存的专利申请是 Huels Chemische Werke AG 于 1984 年的申请(接种植物 AMF 吸附剂的生产和使用，DE3416315)，该发明采用膨胀黏土作为吸附剂保存 AMF 孢子，并首次在德国公开。1985 年，Huels Chemische Werke AG、Int Biotech Lab、Ruhr Stikstoff AG 就该技术在多国申请了专利保护(JP60093940、AU4190585、DE3566944、AT10389885、CA480511、ZA8503276、BRPI8502098)。Weritz Juergen Dipl Agr ING 于 1989 年在德国申请了以辉绿岩棉作为 AMF 菌种保存载体的发明专利，该载体的多孔结构较膨胀粘土具有许多优点。2000 年以前，AMF 菌种保存的专利在中国布局较少，仅西贝尔农业研究有限公司于 1994 年在中国申请了包含营养元素和使磷酸盐增溶的真菌肥料(CN94194264.3)的专利。2006 年开始，连续有 AMF 菌种保存的专利在中国布局。2006 年，天津市植物保护研究所申请了一种克服蔬菜连作障碍的生物土壤添加剂配方(CN200610130054.5)专利，AMF 作为土壤改良剂的重要成分之一，用以解决设施蔬菜栽培的连作障碍。2007 年，云南神宇新能源有限公司申请了一项 AMF 菌种保存专利(CN200710195056.7)；2008 和 2009 年，新疆农业科学院微生物应用研究所分别各申请了一项 AMF 菌种保存专利(CN200810072945.9、CN200910113461.9)；2012 年开始，AMF 菌种保存的中国专利申请占据全球该领域专利申请的主要位置，尤其在 2017 和 2018 年中国专利申请均超过 10 项，中国在菌种保存技术领域具有巨大的应用潜力。

丛枝菌根真菌孢子萌发、侵染植物根系和菌根植物共生的发展涉及复杂的分子对话，获得调控

AMF 共生行为的物质/植物激素 (菌种刺激物) 是实现 AMF 离体纯培养和高效应用的基础, 一直是本领域科研人员关注的焦点^[15-17]。菌种刺激物的发明是出于提高菌种应用时的活力, 通过添加外源物质、改变使用环境、调整菌种组合等方法实现 AMF 高效侵染植物并发挥作用的目的。最早的关于 AMF 刺激物的专利是 University of Michigan State 于 1989 年在美国公开的一项创造 (刺激泡囊丛枝菌根真菌方法和组合物, US07444838), 也是一类异黄酮物质提高 AMF 孢子活力促进 AMF 侵染植物以提高植物的表现。1990 年, University of Michigan State 以该技术为基础, 在澳洲、加拿大、日本、英国、匈牙利和巴西申请了专利保护。2004 年, University Paul Sabatier Toulouse III 和 French National Centre for Scientific Research 在法国公开了菌种刺激物独脚金内酯 (Strigolactones, SLs), 2006 年在美国也申请了相关专利。Agronomique Inst Nat Rech、Centre National De La Recherche Scientifique (C.N.R.S.) 和 University Paul Sabatier Toulouse III 于 2009 年在中国、欧洲专利局、世界知识产权组织、巴西等公开了脂壳寡糖 (Lipochito-oligosaccharides) 促进 AMF 活力的技术。Valent Bioscience LLC 于 2017 年公布了聚乙二醇 (Polyethylene glycol)、乳糖和木质素磺酸钠等激发 AMF 活力的物质, 并在 16 个国家布局, 2019 年又在其他 3 个国家申请专利保护。2017 年以来, 菌种刺激物的发明明显增加, 中国的企业和高校也逐渐进入该领域。清华大学于 2018 年公开了独脚金内酯促进 AMF 侵染植物根系的方法, 在中国和 WIPO 申请专利; 浙江世佳科技有限公司于 2018 年分别公开了芸苔素内酯和植物生长调节剂右旋脱落酸 (S-Abscisic Acid) 促进菌种活力的 2 项申请; 2019 年济南大学和浙江海洋大学各有 1 项申请, 分别公开了植物源烟水和菌糠提取物促进 AMF 菌种活力的方法。一些发明采用多胺 (亚精胺)、芸苔素内酯、植物源烟水等作为 AMF 菌种刺激物, 以激发 AMF 的孢子活力, 增强 AMF 侵染植物根系的效率。

3.3 丛枝菌根真菌的应用

丛枝菌根真菌的应用主要包括农业、林业、药材种植、污染修复、生态恢复等。AMF 能够促进植物吸收水分、养分、改良土壤理化性质以及提高植物抵抗逆境胁迫的能力^[2,18]。在农林领域, AMF 技术主要应用在大田作物、蔬菜、果树、花卉、中药

材、草坪等方面, 侧重于提高植物表现 (产量)、抗病性、抗逆性和品质等效果。最早的专利申请是 Idemitsu Kosan Co Ltd 于 1991 年在日本提出的培育植物的方法 (JP03099840), 该专利公开了接种 AMF 以改善植物生长的方法。2000 年以前的 9 项关于 AMF 农林应用的专利都是在 1995 年之前申请的, 且申请国别均为日本, 其中 Idemitsu Kosan Co Ltd 的申请 7 项, Osaka Gas Co Ltd 和 Central Glass Co Ltd 申请各 1 项。1996—2002 年, 全球没有 AMF 农林应用方面的专利申请。2003 和 2004 年, Parvatam Giridhar 等和 Dongbu Hannong Chemicals Co Ltd 分别在美国 (US10402241) 和韩国 (KR1020040098318) 各有一项申请。中国最早的 AMF 农林应用专利是北京市农林科学院于 2009 年公开的丛枝菌根真菌菌株及其在抗根结线虫中的应用 (CN200910242394.0), 该发明接种 AMF 能够明显抑制根结线虫对黄瓜根系的危害。2011 年开始, 中国科学院新疆生态与地理研究所、云南省烟草农业科学研究院、西南大学、南京农业大学、中国中医科学院中药研究所等高校或研究所陆续申请 AMF 农林应用的中国专利, 2016—2019 年间 AMF 农林应用专利均是中国申请。

植物修复是一种有前途的污染修复技术, 该技术利用绿色植物去除污染物或将其对受污染生态系统的有害影响降至最低。前人^[19-22]研究发现, AMF-植物共生体不仅能够修复重金属污染土壤, 而且具有降解化学农药、多环芳烃等复杂有机污染物的能力, 可明显提高植物耐性和修复效率。与传统的物理化学修复方法相比, 该方法具有成本低且无二次污染的优点, 公众的高度认可使其正逐渐被采用。因此, AMF 技术正逐渐在污染修复中发挥重要作用。AMF 污染修复的专利申请主要包括 AMF 在农田、场地和矿区土壤修复等领域的应用, 技术的重点是利用 AMF 侵染修复植物, 实现修复植物在逆境中生长以达到修复目标。2000 年前, 仅有两项专利申请涉及污染修复。最早的专利申请是 Green Tec KK、Osaka Gas Co Ltd 和 Hitachi Shipbuilding Eng Co 于 1996 年在日本提出的空气清洁器 (JP08243483), 该发明将菌根植物种在空气清洁器中, 通过植物健康生长, 能够有效净化空气。Bothe Hermann 于 1998 年在欧洲专利局公开了重金属、放射性核素、除草剂或盐分污染土壤的修复技术 (EP98119803), 该发明采用 AMF 与植物共生, 以实现修复的目的。2000—2002 年和 2004—2006 年间, 未见 AMF 污染

修复的专利申请。中国科学院生态环境研究中心和中国农业大学于 2003 年在中国公开了一种提高砷污染土壤植物修复效率的方法 (CN200310123407.5), 该发明对砷超富集植物-蜈蚣草接种 AMF, 菌根化的蜈蚣草适应砷污染特殊环境, 提高蜈蚣草对贫瘠土壤和复合污染的抗性以及获取必需矿质养分的能力, 促进蜈蚣草生长, 从而加速砷污染土壤植物修复过程。2007 年, 有 3 项 AMF 污染修复的专利申请, 包括 Gnu Nauchno Issledovatel' Skij Institute Agrarnkh Problem Khakasii So Raskhn、中国科学院生态环境研究中心和 Korea University Industrial Academic Collaboration Foundation 分别在俄罗斯、中国、韩国的申请 (RU2007117479、CN200710099333.4 和 KR1020070093827)。其中, 中国科学院生态环境研究中心公开了一种提高土壤中有机污染物降解效率的方法 (CN200710099333.4), 该发明通过在有机污染物阿特拉津、滴滴涕或多环芳烃菲的污染土壤中种植菌根化的玉米或苜蓿, 可以促进有机污染物在土壤中的降解。2009 年开始, 每年都有 AMF 污染修复的专利, 且以中国的专利申请为主; 2017 年, AMF 污染修复的专利申请达到高峰。值得一提的是, Tesch Rainer 于 2016 年在欧洲专利局公开了一种用于处理石油或天然气的方法 (EP16206423), 该发明通过在石油或天然气污染土壤上种植菌根化的甘草属植物的方法降解污染物。2017 年, Tesch Rainer 将该技术分别在中国、美国、墨西哥、欧洲专利局、加拿大、世界知识产权组织、欧亚专利组织进行了布局。

丛枝菌根真菌及其寄主植物之间形成菌丝体时, 寄主植物根部土壤接触面积会扩大, 从而改善植物的养分和水分吸收, 并提高抗逆性^[2,23]。AMF 技术的该特性越来越多地用于生态修复领域, 例如在耕地复垦、矿区生态恢复、水土保持、边坡地绿化、盐碱土治理等方面^[24-26]的应用。AMF 生态恢复的专利申请总共 13 项, 主要包括 AMF 在耕地复垦、水土保持和盐碱土治理等领域的应用, 发明侧重于提高植物表现 (产量) 和抗逆性以实现高效的生态修复。最早的专利申请是 Hokkaido University 和 Nittoc Constrution 于 2010 年在日本提出的边坡绿化方法 (JP2010125861), 该专利公开了接种 AMF 以提高边坡植物在强酸性土壤上生长的方法。2011 和 2015 年, 未见 AMF 生态恢复领域的专利申请; 2012—2013 年和 2016—2019 年间, 均有该领域专利申请, 其中 2016 和 2017 年分别是 2 项和 4 项专利申请,

其他年份仅 1 项, 以上专利都是中国申请。2012 年, 哈尔滨工业大学宜兴环保研究院公开了一种新型冷季型禾草早春高效建植的方法 (CN201210436586.7), 该技术通过建立高侵染率的菌根—冷季型禾草互利共生体, 显著提高共生体抗寒能力和生理功能, 从而更大限度的截留早春地表径流中所含有的氮、磷等面源污染物质, 减少对受纳河流的污染。中国矿业大学 (北京) 于 2013 年公开了一种提高沙地苗木成活的栽植方法 (CN201310240790.6), 该发明提出了沙地苗木接种 AMF 有利于沙地生态恢复的技术。贵州大学于 2014 年申请了应用 AMF 技术快速恢复喀斯特石漠化地区植被的方法 (CN201410385551.4), 该发明应用 AMF 技术, 采用乔灌木三结合的立体种植方式, 能够快速实现喀斯特石漠化地区植被恢复。

3.4 丛枝菌根真菌检测技术与研究方法

检测技术和研究方法的创新有助于 AMF 技术的突破。近些年来, 随着生物、材料、信息等学科的发展, AMF 的检测技术和研究方法也有了长足进步^[27-28]。AMF 检测技术的专利申请内容涵盖了检测 AMF 侵染植物根系能力、优良 AMF 菌株的筛选、分子检测 AMF 侵染植物的引物、利用 AMF 筛选特定植物等技术, 该技术多侧重于提高检测精度和速度。最早的关于 AMF 检测的专利申请是 The Regents of the University of California 于 2003 年的申请 (一种丛枝菌根真菌 ¹⁵N 同位素标记装置及制作方法, US10739736), 该专利可准确量化 AMF 菌丝对植物吸收氮的相对贡献, 易于操作, 制作简单, 便于试验设置。第 2 项关于 AMF 检测的专利申请人也是来自于 The Regents of the University of California, 是于 2004 年在世界知识产权组织提出的快速测定 AMF 侵染效率和菌根化的方法 (WOUS04033301), 该方法公开了快速检测植物与丛枝菌根真菌共生的参数。2005—2009、2014、2015 和 2017 年, 没有 AMF 检测技术的专利申请; 2010—2013 年间, 每年各有 1 项专利申请。2016、2018 和 2019 年, 分别有 2、3 和 5 项申请, 其中 2019 年 5 项专利包括世界知识产权组织申请 1 项和中国专利申请 4 项。AMF 研究方法的专利申请包括实验室或野外开展科学研究工作中所涉及的 AMF 培养、采集、观察、分析的装置或方法, 发明多侧重于提高 AMF 研究的深度、广度和速度。关于 AMF 研究方法的专利申请共 21 项, 均在中国申请, 大部分由中国的高校和研究所提

交。最早的申请是河南科技大学于 2011 年公开的一种丛枝菌根真菌整体孢子玻片标本的制作方法(CN201110054516.0), 该方法制成的标本可使大且壁不坚实的 AMF 孢子在标本中保持完整的外观形态, 不破裂。除了 2016 年未见 AMF 研究方法的专利申请外, 2012 年以来, 每年均有 AMF 研究方法的专利申请, 特别是 2017 年以来, AMF 研究方法的专利申请明显增加, 表明近年来 AMF 研究方法获得了中国学者的关注。

4 结论

近年来, 我国丛枝菌根真菌领域技术呈突破式发展, 该技术处于生命周期的发展期。AMF 的菌种扩繁、菌种保存和菌种刺激物等产品化技术研发不断加强, AMF 应用领域正从农林应用向污染修复领域拓展, 不仅用于重金属污染土壤修复, 也处理有机污染降解等复杂土壤问题。结合分子生物、材料和信息技术等新兴技术发展, AMF 检测技术和研究方法正在发展, 新的研发充分考虑了 AMF 产品化和应用的结合。全球排名前 10 的 3 家中国专利申请机构均为高校, 缺乏具有自主创新能力的企业, 企业参与度较低, 因此, 今后亟需加强产学研用联合攻关及合作研发。

参 考 文 献:

- [1] 李晓林, 冯固. 丛枝菌根生态生理[M]. 北京: 华文出版社, 2001. 4-5.
- Li X L, Feng G. Arbuscular mycorrhiza ecophysiology[M]. Beijing: Sino-Culture Press, 2001. 4-5.
- [2] Smith S E, Read D. Mycorrhizal symbiosis (3rd Edition)[M]. New York: Academic Press, 2008. 11-32.
- [3] 王幼珊, 张淑彬, 张美庆. 中国丛枝菌根真菌资源与种质资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012.
- Wang Y S, Zhang S B, Zhang M Q. Resources and germplasm resources of arbuscular mycorrhizal fungi in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2012.
- [4] 陈保冬, 于萌, 郝志鹏, 等. 丛枝菌根真菌应用技术研究进展[J]. 应用生态学报, 2019, 30(3): 1035-1046.
- Chen B D, Yu M, Hao Z P, et al. Research progress in arbuscular mycorrhizal technology[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2019, 30(3): 1035-1046.
- [5] Sekar S, Paulraj P. Strategic mining of cyanobacterial patents from the USPTO patent database and analysis of their scope and implications[J]. Journal of Applied Phycology, 2007, 19(3): 277-292.
- [6] Liu C Y, Yang J C. Decoding patent information using patent maps[J]. Data Science Journal, 2008, 7: 14-22.
- [7] Fu B R, Hsu S W, Liu C H, et al. Statistical analysis of patent data relating to the organic Rankine cycle[J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2014, 39: 986-994.
- [8] Bi Y L, Li X L, Wang H G, et al. Establishment of dual culture between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Sclerocystis sinuosa* and transformed Ri T-DNA carrot roots in vitro[J]. Plant and Soil, 2004, 261: 239-243.
- [9] Harikumar V S. A new method of propagation of arbuscular mycorrhizal fungi in field cropped sesame (*Sesamum indicum* L.)[J]. Symbiosis, 2017, 73: 71-74.
- [10] Selvakumar G, Shagol C, Kang Y, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi spore propagation using single spore as starter inoculum and a plant host[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124: 1556-1565.
- [11] Kokkoris V, Hart M. In vitro propagation of arbuscular mycorrhizal fungi may drive fungal evolution[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2420.
- [12] Ijdo M, Cranenbrouck S, Declerck S. Methods for large-scale production of AM fungi: Past, present, and future[J]. Mycorrhiza, 2011, 21: 1-16.
- [13] Vosátka M, Látr A, Gianinazzi S, et al. Development of arbuscular mycorrhizal biotechnology and industry: Current achievements and bottlenecks[J]. Symbiosis, 2012, 58: 29-37.
- [14] Oliveira R S, Rocha I, Ma Y, et al. Seed coating with arbuscular mycorrhizal fungi as an ecotechnological approach for sustainable agricultural production of common wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Journal of Toxicology and Environmental Health, 2016, 79: 329-337.
- [15] Lopez-Raez J A, Charnikhova T, Fernandez I, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis decreases strigolactone production in tomato[J]. Journal of Plant Physiology, 2011, 168(3): 294-297.
- [16] Liao D H, Wang S S, Cui M M, et al. Phytohormones regulate the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19: 3146.
- [17] Bruijn F J D. The model legume *Medicago truncatula*[M]. John Wiley & Sons, 2019. 485-500.
- [18] 刘润进, 陈应龙. 菌根学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- Liu R J, Chen Y L. Mycorrhizology[M]. Beijing: Science Press, 2007.
- [19] Ali H, Khan E, Sajad M A. Phytoremediation of heavy metals—concepts and applications[J]. Chemosphere, 2013, 91(7): 869-881.
- [20] Sarwar N, Imran M, Shaheen M R, et al. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives[J]. Chemosphere, 2017, 171: 710-721.
- [21] Wang G, Wang L, Ma F, et al. Integration of earthworms and arbuscular mycorrhizal fungi into phytoremediation of cadmium-contaminated soil by *Solanum nigrum* L.[J]. Journal of Hazardous Materials, 2020, 389: 121873.
- [22] 周利承, 曹梦珂, 郑晨露, 等. 接种丛枝菌根真菌对紫花苜蓿修复石油污染土壤的潜在作用[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(5): 1129-1137.
- Zhou L C, Cao M K, Zheng C L, et al. The potential effect of *Medicago sativa* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi on remedying petroleum-contaminated soil[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2020, 26(5): 1129-1137.
- [23] 刘润进, 唐明, 陈应龙. 菌根真菌与植物抗逆性研究进展[J]. 菌物

- 研究, 2017, 15(1): 70–88.
- Liu R J, Tang M, Chen Y L. Recent advances in the study of mycorrhizal fungi and stress resistance of plants[J]. *Journal of Fungal Research*, 2017, 15(1): 70–88.
- [24] Li S P, Bi Y L, Kong W P, *et al.* Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on ecological restoration in coal mining areas[J]. *Russian Journal of Ecology*, 2015, 46(5): 431–437.
- [25] Chen M, Arato M, Borghi L, *et al.* Beneficial services of arbuscular mycorrhizal fungi – from ecology to application[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1270.
- [26] Yan Y J, Zhao B Q, Xu W N, *et al.* The future prospects of arbuscular mycorrhizal fungi in slope ecological restoration[J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2020, 29(3): 2031–2040.
- [27] 林先贵, 胡君利, 戴珏, 等. 丛枝菌根真菌群落结构与多样性研究方法概述及实例比较[J]. *应用与环境生物学报*, 2017, 23(2): 343–350.
- Lin X G, Hu J L, Dai J, *et al.* Overview and comparison of research methods for determining the community structure and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2017, 23(2): 343–350.
- [28] Yao Q Z, Yan W, Wei J. Establishment of a quality test for arbuscular mycorrhizal inoculum[J]. *International Journal of Agriculture and Biology*, 2018, 20(4): 926–932.