



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113025522 B

(45) 授权公告日 2022.03.22

(21) 申请号 202110281749.8  
 (22) 申请日 2021.03.16  
 (65) 同一申请的已公布的文献号  
 申请公布号 CN 113025522 A  
 (43) 申请公布日 2021.06.25  
 (83) 生物保藏信息  
 CGMCC No.21189 2020.11.16  
 (73) 专利权人 云南省农业科学院农业环境资源  
 研究所  
 地址 650205 云南省昆明市盘龙区北京路  
 延长线2238号  
 (72) 发明人 番华彩 曾莉 李舒 徐胜涛  
 郑泗军 何平 白亭亭 尹可锁  
 郭志祥 李迅东 刘立娜 尚慧  
 (74) 专利代理机构 北京润平知识产权代理有限  
 公司 11283  
 代理人 刘依云 王崇

(51) Int.Cl.  
 C12N 1/20 (2006.01)  
 A01N 63/22 (2020.01)  
 A01P 3/00 (2006.01)  
 A01P 21/00 (2006.01)  
 C05G 3/60 (2020.01)  
 C05G 3/80 (2020.01)  
 C05F 11/08 (2006.01)  
 A01G 13/00 (2006.01)  
 A01G 7/06 (2006.01)  
 C12R 1/07 (2006.01)

(56) 对比文件  
 CN 111909863 A, 2020.11.10  
 CN 104152382 A, 2014.11.19  
 CN 104726383 A, 2015.06.24  
 US 2016058016 A1, 2016.03.03

审查员 习洋

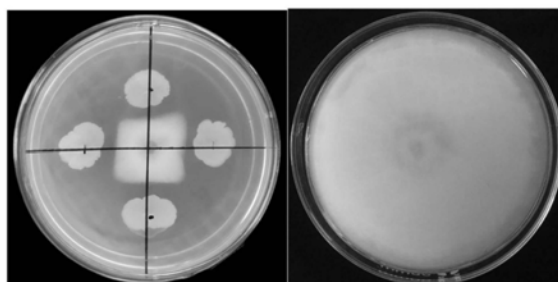
权利要求书1页 说明书13页  
 序列表3页 附图4页

(54) 发明名称

解淀粉芽孢杆菌及其应用以及预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法

(57) 摘要

本发明涉及生物防治领域,公开了一株解淀粉芽孢杆菌及其应用以及预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法。本发明提供的解淀粉芽孢杆菌对香蕉枯萎病病原菌——尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型(Foc TR4)的抑制效果好,并且在盆栽实验中表现出优异的香蕉枯萎病防治效果。同时,该菌株还具有良好的解磷、解钾性能,而且对于香蕉植株具有良好的促生作用。该菌株不仅能够用于香蕉枯萎病防治,还能够解决香蕉种植过程中磷、钾元素匮乏导致的减产问题,提高香蕉种植生产的经济效益。



1. 一株解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 其特征在于, 所述解淀粉芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC NO.21189。
2. 权利要求1所述的解淀粉芽孢杆菌在抑制真菌中的应用。
3. 根据权利要求2所述的应用, 其中, 所述真菌选自尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)4号生理小种热带型。
4. 权利要求1所述的解淀粉芽孢杆菌在解钾和/或解磷中的应用。
5. 一种预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 将解淀粉芽孢杆菌和/或所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液施用于受到香蕉枯萎病病原菌感染的土壤和/或香蕉植株根系;  
其中, 所述解淀粉芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC NO.21189。
6. 根据权利要求5所述的方法, 其中, 所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液中, 所述解淀粉芽孢杆菌的含量为 $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$  CFU/mL。
7. 根据权利要求5所述的方法, 其中, 所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液的制备方法包括: 将所述解淀粉芽孢杆菌在发酵条件下进行培养, 获得含解淀粉芽孢杆菌的代谢产物的发酵液。
8. 根据权利要求7所述的方法, 其中, 所述发酵条件包括: 温度35-40℃, 时间40-60h, 180-220rpm振荡培养。
9. 根据权利要求7所述的方法, 其中, 所述发酵液中解淀粉芽孢杆菌的代谢产物的浓度使得所述发酵液的OD<sub>600</sub>值为2-2.5。
10. 根据权利要求9所述的方法, 其中, 所述发酵液中解淀粉芽孢杆菌的代谢产物的浓度使得所述发酵液的OD<sub>600</sub>值为2.3-2.5。
11. 根据权利要求5所述的方法, 其中, 所述香蕉枯萎病病原菌选自尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型。
12. 根据权利要求5或6所述的方法, 其中, 当所述解淀粉芽孢杆菌和/或所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液施用于土壤时, 所述解淀粉芽孢杆菌和/或所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液的用量使得所述受到香蕉枯萎病病原菌感染的土壤中所说解淀粉芽孢杆菌的含量为 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$  CFU/kg。
13. 根据权利要求5所述的方法, 其中, 当所述解淀粉芽孢杆菌和/或所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液施用于香蕉植株根系时, 所述解淀粉芽孢杆菌的用量使得每次每株香蕉植株接触的所述解淀粉芽孢杆菌的量为 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$  CFU。

## 解淀粉芽孢杆菌及其应用以及预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物防治领域,具体涉及一株解淀粉芽孢杆菌及其应用以及预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法。

### 背景技术

[0002] 香蕉枯萎病(*Fusarium wilt of banana*)又称为巴拿马病、黄叶病等,是一种典型的毁灭性土传真菌病害,严重影响香蕉等农作物的种植和生产。导致香蕉枯萎病的病原菌为尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum f.sp.cubense*),4号生理小种热带型(Foc TR4)。

[0003] 目前常用的香蕉枯萎病防治方法包括化学防治、抗病育种、采取适当农业措施(例如调整耕作方式等)等,但是这些方法的防治效果十分有限,并且具有非常明显的局限性。例如,化学防治法主要是在种植过程中施用化学药剂,以达到防治目的,但是化学药剂不仅可能带来环境和土壤污染、产生食品安全问题,长期大量施用化学药剂还会使得病原菌的抗药性增强,使得化学防治法的效果并不理想。虽然培育香蕉抗病株和调整耕作方式能够避免化学药剂大量施用带来的问题,但是抗病株育种时间长,前期科研投入大,并且不确定性高,而调整耕作方式则可能导致农民种植成本提高等诸多问题。

[0004] 生物防治是目前公认比较安全有效的农业病害防治措施,其主要利用生防菌等生物资源进行农业病害防治,而生防菌能够产生抗菌物质,具有诱导系统抗性 etc 特性,能够有效的抑制病原菌的入侵,提高植物的抗性。而且有些生防菌还具有促生作用,在防治作物病害的同时提高了农业生产效率和产量,提高了农业经济效益。然而,目前针对香蕉枯萎病开发的生防菌品种防治效果有待提高,而且对于植株的促生效果弱,不能满足现代化规模农业生产以及农业经济发展的需要。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了克服现有技术存在的针对香蕉枯萎病防治的生防菌防治效果不佳且促生效果弱的问题,提供一株解淀粉芽孢杆菌,该菌株具有对香蕉枯萎病防治效果好,并且具有良好的解钾、解磷(尤其是有机磷)的作用,能够在防治香蕉枯萎病的同时表现出优异的促生效果。

[0006] 为了实现上述目的,本发明一方面提供一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),所述解淀粉芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC NO.21189。

[0007] 本发明第二方面提供如上所述的菌株在抑制真菌中的应用。

[0008] 本发明第三方面提供如上所述的菌株在解钾和/或解磷中的应用。

[0009] 本发明第四方面提供一种预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法,所述方法包括:将含有解淀粉芽孢杆菌的菌剂施用于受到香蕉枯萎病病原菌感染的土壤和/或香蕉植株;

[0010] 或者,将解淀粉芽孢杆菌的代谢产物施用于受到香蕉枯萎病病原菌感染的土壤

和/或香蕉植株；

[0011] 其中,所述解淀粉芽孢杆菌为保藏编号为CGMCC NO.21189。

[0012] 通过上述技术方案,本发明具有如下有益效果:

[0013] (1) 本发明提供的解淀粉芽孢杆菌能够有效抑制尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型,对香蕉枯萎病的防治效果好,并且具有良好的解钾、解有机磷的作用,对香蕉植株具有良好的促生效果,是一株具有防治效果和促生效果双重功能的优质生防菌株;

[0014] (2) 本发明提供的解淀粉芽孢杆菌分离自粉蕉植株,属于香蕉内生菌,其施用不会对香蕉植株产生不利影响,也不会香蕉种植园土壤产生污染。而且其独特的良好的解钾、解有机磷的作用还能够改善化肥滥用残留造成的一些土壤问题,解决香蕉种植过程中磷、钾元素匮乏导致的减产问题,提高香蕉的抗逆性和产量;

[0015] (3) 本发明提供的方法简单易行,成本低,防治效果好,适合大规模推广使用。

## 附图说明

[0016] 图1是本发明实施例1中分离获得的菌株YN0904的菌落形态;

[0017] 图2是本发明实施例1中分离获得的菌株YN0904扫描电镜下的形态;

[0018] 图3是本发明实施例1中绘制的菌株YN0904的16S rDNA系统进化树;

[0019] 图4是本发明实施例2中,菌株YN0904对于尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型的抑制效果;

[0020] 图5是本发明实施例2中,菌株YN0904对尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型的菌丝体抑制效果;

[0021] 图6是本发明实施例2中,YN0904菌株基因组DNA为模板,扩增6种拮抗基因和1中促生基因的PCR产物凝胶电泳图;

[0022] 图7是本发明实施例3中,菌株YN0904的解磷(左侧)和解钾(右侧)效果;

[0023] 图8是本发明实施例4中,菌株YN0904对盆栽香蕉植株的香蕉枯萎病防治效果(叶片);

[0024] 图9是本发明实施例4中,菌株YN0904对盆栽香蕉植株的香蕉枯萎病防治效果(球茎);

[0025] 图10是本发明实施例4中,菌株YN0904对香蕉盆栽植株的促生效果。

[0026] 生物保藏

[0027] 本发明的发明人于云南省西双版纳州勐腊县勐捧镇一粉蕉植株上分离得到菌株YN0904,经鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。于2020年3月26日保藏于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏编号为CGMCC NO.21189。

## 具体实施方式

[0028] 在本文中披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0029] 本发明的发明人在研究的过程中于云南省西双版纳州勐腊县勐捧镇一香蕉枯萎病与细菌性软腐病混合发生的粉蕉植株上分离得到菌株YN0904,经鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。于2020年3月26日保藏于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏编号为CGMCC NO.21189。经过进一步研究发现,解淀粉芽孢杆菌CGMCC NO.21189对尖孢镰刀菌等真菌具有良好的抑制效果,能够防治香蕉枯萎病,并且具有优异的解钾、解磷(尤其是有机磷)的能力,是一株既有抑菌性能,又有促生性能的双功能菌株。

[0030] 本发明第一方面提供一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),所述解淀粉芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC NO.21189。

[0031] 本发明第二方面提供如上所述的解淀粉芽孢杆菌在抑制真菌中的应用。

[0032] 根据本发明的优选实施方式,其中,所述真菌选自所述真菌选自尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp.cubense)4号生理小种热带型(Foc TR4)。

[0033] 本发明第三方面提供如上所述的解淀粉芽孢杆菌在解钾和/或解磷中的应用。

[0034] 本发明中所述的“解钾”、“解磷”意指采用所述解淀粉芽孢杆菌对培养环境中,例如土壤中的钾、磷(尤其是有机磷)进行降解释放,使其更易被植物(例如香蕉等)吸收利用。

[0035] 本发明的发明人在研究的过程中发现,本发明提供的解淀粉芽孢杆菌CGMCC NO.21189及其代谢产物(例如所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液)均具有抑制尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型的作用,并且将其施用于香蕉植株(例如施用于香蕉植株根系)时,能够具有防治香蕉枯萎病的效果。

[0036] 本发明第四方面提供一种预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法,所述方法包括:将所述解淀粉芽孢杆菌和/或所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液施用于受到香蕉枯萎病病原菌感染的土壤和/或香蕉植株根系;

[0037] 其中,所述解淀粉芽孢杆菌为保藏编号为CGMCC NO.21189。

[0038] 本发明中,所述“预防和/或治疗香蕉枯萎病”意指采用本发明提供的方法,能够对可能产生香蕉枯萎病的种植区的作物产生预防效果,使得作物不易感染香蕉枯萎病。或者,能够使得已经感染香蕉枯萎病的作物植株受到病害的影响降低,减少病害损失。

[0039] 根据本发明的优选实施方式,其中,所述香蕉枯萎病病原菌选自尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型。

[0040] 根据本发明的优选实施方式,其中,所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液中,所述解淀粉芽孢杆菌的含量为 $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ CFU/mL。

[0041] 根据本发明的优选实施方式,其中,当所述解淀粉芽孢杆菌和/或所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液施用于土壤时,所述解淀粉芽孢杆菌和/或所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液的用量使得所述受到香蕉枯萎病病原菌感染的土壤所述解淀粉芽孢杆菌的含量为 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ CFU/kg,即每千克土壤施用 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ CFU的上述解淀粉芽孢杆菌(或含有 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ CFU上述解淀粉芽孢杆菌的所述解淀粉芽孢杆菌发酵液)。

[0042] 根据本发明的优选实施方式,其中,当所述解淀粉芽孢杆菌和/或所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液施用于香蕉植株时,所述解淀粉芽孢杆菌和/或所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液的用量使得每次每株香蕉植株接触的所述解淀粉芽孢杆菌的量为 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ CFU,即每株香蕉植株可施用 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ CFU的上述解淀粉芽孢杆菌(或含有 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ CFU

上述解淀粉芽孢杆菌的所述解淀粉芽孢杆菌发酵液)。

[0043] 根据本发明的优选实施方式,其中,所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液的制备方法包括:将所述解淀粉芽孢杆菌在发酵条件下进行培养,获得含解淀粉芽孢杆菌的代谢产物的发酵液。

[0044] 优选地,所述发酵条件包括:温度35-40℃,时间40-60h,180-220rpm振荡培养。

[0045] 优选地,所述发酵液中解淀粉芽孢杆菌的代谢产物的浓度使得所述发酵液的OD<sub>600</sub>值为2-2.5,优选为2.3-2.5。

[0046] 本发明提供的方法中,所述发酵液可以直接施用于有需要的植株(例如施用于所述植株根系)或土壤中,也可以将其制成相关的微生物制剂(例如可以为液体制剂,也可以为固体制剂),再将所述微生物制剂施用于需要的植株(例如只用于所述植株根系)或土壤中。

[0047] 本发明提供的方法中,当将所述解淀粉芽孢杆菌代谢产物制成相关制剂施用时,本领域技术人员可以根据上述发酵液的用量,以及所述制剂中解淀粉芽孢杆菌代谢产物的具体含量进行换算,以获得所述解淀粉芽孢杆菌代谢产物相关制剂的具体用量。

[0048] 任意本领域现有的微生物制剂制备方法均可适用于本发明。根据本发明的一种特别优选的实施方式,其中,所述微生物制剂的制备方法可以为:将所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液与有机溶剂混合。充分混匀后,再将所得混合物中的有机溶剂去除,获得所述微生物制剂。其中,所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液即为如前所述的解淀粉芽孢杆菌的发酵液,对于其制备方法和特征在此不再赘述。

[0049] 优选地,所述有机溶剂选自丙酮,更优选为95-100重量%的丙酮水溶液。

[0050] 优选地,所述解淀粉芽孢杆菌的发酵液与所述有机溶剂的体积比为1:1-1.2。

[0051] 优选地,所述混合的条件包括:温度18-25℃,时间10-12h。

[0052] 优选地,去除所得液相中的有机溶剂的方法可以选择旋转蒸发。优选条件包括:温度35-40℃,旋转蒸干至有机溶剂完全去除为止。

[0053] 优选地,所述方法还可以包括将去除有机溶剂后所得的溶液进行稀释。优选采用去离子水、无菌水等进行稀释。本领域技术人员可以根据实际需要对稀释后的微生物制剂浓度进行控制,例如可以将其稀释至与原发酵液体积相同的程度。

[0054] 本发明提供的上述微生物制剂在使用时可以根据实际情况,例如所述微生物制剂的浓度,施用所述微生物制剂的植株和/或土壤中香蕉枯萎病病原菌含量等,按照需要进行调整。例如,当采用如上所述的方法制备并将所述微生物制剂稀释至原发酵液体积的情况下,根据本发明的优选实施方式,其中,当所述微生物制剂施用于土壤时,所述解淀粉芽孢杆菌的代谢产物的用量为0.075-0.1L/kg,即每千克土壤中施用0.075-0.1L所述微生物制剂。

[0055] 由于本发明提供的解淀粉芽孢杆菌CGMCC NO.21189还具有优异的解钾、解磷功能,因此,本发明另一方面还提供一种解钾和/或解磷的方法。所述方法与上述预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法基本相同。对于具体的解淀粉芽孢杆菌和/或其代谢产物的用量,本领域技术人员可以根据实际情况进行调整,在此不再赘述。

[0056] 以下将通过实施例对本发明进行详细描述,应当能够理解的是,以下具体实施方式仅用于进一步解释和说明本发明的内容和效果,而不用用于限制本发明。

[0057] 实施例1

[0058] 本实施例用于说明本发明提供的解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 的分离、鉴定和保藏。

[0059] 液体NA培养基配方 (1L): 蛋白胨10g, 牛肉膏3g, 氯化钠5g, 加水1L, 调节pH为7。

[0060] 固体NA培养基为液体培养基中加入15重量%琼脂配制而成。

[0061] (1) 菌种分离和纯化

[0062] 取采集自云南省西双版纳州勐腊县勐捧镇一株香蕉枯萎病与细菌性软腐病混合发生的粉蕉植株的健康叶鞘为样品, 将采集的植株叶鞘用灭菌水冲洗干净, 室内晾干后, 无菌条件下, 用75%的乙醇进行表面消毒, 用无菌刀片切取2-3cm叶鞘中部组织, 用75%的乙醇浸泡30s-1min, 再用0.1%升汞浸泡30s-1min, 无菌水冲洗3次, 研磨成匀浆。将所述匀浆划线至固体NA平板上, 分离培养香蕉植株叶鞘内生细菌。

[0063] 将划线后的固体NA平板置于30℃恒温培养箱中, 倒置培养1-2天, 待形成单菌落后, 挑取单菌落采用固体NA平板划线法纯化3次。纯化后的菌株置于50重量%无菌甘油中于-80℃保存。

[0064] 采用上述方法分离获得的菌株YN0904在NA固体培养基表面形成圆形不透明菌落, 表面干燥粗糙, 有隆起, 中间褶皱, 边缘规则呈波浪状 (图1中示出了菌株YN0904的菌落形态)。经检测, 该菌呈革兰氏阳性染色, 扫描电子显微镜 (蔡司sigma300, 德国) 下观察该菌呈杆状, 可形成呈椭圆形, 两端钝圆的内生芽孢 (图2中示出了菌株YN0904的扫描电镜图)。最适生长pH为7, 最适生长温度为37℃。

[0065] (2) 菌种鉴定

[0066] 采用16S rDNA扩增及序列分析的方法对上述纯化后的菌株 (菌株YN0904) 进行鉴定。具体方法为: 采用细菌基因组DNA提取试剂盒 (购自TaKaRa) 对纯化后菌株进行基因组DNA提取, 采用以下通用引物 (委托上海派森诺生物科技股份有限公司合成) 对该菌株的16S rDNA进行扩增:

[0067] 27F (上游引物, 序列为5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', SEQ ID NO:1)

[0068] 1492R (下游引物, 序列为5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3', SEQ ID NO:2)

[0069] 扩增体系和条件详见以下表1和表2。扩增产物送至上海派森诺生物科技股份有限公司测序。

[0070] 表1 16S rDNA扩增体系

试剂	用量/ $\mu$ L
模板DNA	2
上游引物	2
下游引物	2
酶 (TaKa Ra LA-Taq)	0.5
dd H <sub>2</sub> O	30.5
dNTP Mixture	8
PCR Buffer (10 $\times$ )	5
总体积	50

[0072] 表2 16S rDNA扩增条件

温度/°C	时间/s	循环数
94	300	1
94	30	30
54	30	
72	60	
72	420	1

[0074] 通过上述方法扩增获得约1.5kb的PCR产物,将其测序结果在NCBI网站进行BLAST比对,并使用MEGA7.0软件,采用邻接法构建系统进化树(详见图3),确定所分离获得的内生拮抗细菌(菌株YN0904)的分类地位。分类检索参照以下参考文献[1]和[2]。

[0075] [1]车秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:43-65.

[0076] [2]李阜棣,喻子牛,何绍江.农业微生物学实验技术[M].北京:中国农业出版社,1996.

[0077] 结果表明,菌株YN0904与菌株*Bacillus amyloliquefaciens*的序列相似性为99%,据系统进化树(图3)的分类结果,该菌株与解淀粉芽孢杆菌(MT613661)亲缘关系最近,聚类为一支。根据GeneBank中的信息可以获知,菌株MT613661的来源为土壤,是根际土壤菌(土壤拮抗菌)。而菌株YN0904分离自香蕉植株,属于植物拮抗内生菌,其与土壤拮抗菌相比,更易在种植环境(例如土壤)和植株(尤其是植株中)定植,从而使得菌株YN0904作为生防菌使用时能够更好地发挥作用(例如香蕉枯萎病防治、促生、解磷、解钾等作用)。

[0078] 根据菌株YN0904的培养特征、形态特征、生理生化特征以及16S rDNA序列分析结果,确定该菌株为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。该菌株2020年3月26日保藏于中国微生物菌种保藏委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏编号为CGMCC NO.21189。

[0079] 实施例2

[0080] 本实施例用于说明本发明提供的解淀粉芽孢杆菌CGMCC NO.21189对香蕉枯萎病病原菌的抑制效果。

[0081] 本实施例中,采用尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型(Foc TR4)作为病原菌,具体采用的菌株为Foc 15-1(获取方法详见文献[3]Lei,Z.,et al.,Identification and evaluation of resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp.cubense tropical race 4in *Musa acuminata* Pahang.Euphytica,2018.214(7):106.)。

[0082] 本实施例中,采用PDA固体培养基进行病原菌培养。所述PDA固体培养基的配制方法为:将马铃薯200g和葡萄糖20g加入1L水中,煮沸并混合均匀后加入琼脂15g混合均匀,调节pH至7,待冷却至60℃左右(即不烫手同时琼脂未凝固时),采用9cm的培养皿,按照约20mL/皿的用量倒平板。

[0083] (1) 抑菌效果(抑菌率)检测

[0084] 采用平板对峙法进行抑菌率测定,具体方法为:将Foc 15-1接种于PDA平板,28℃培养7天后,用灭菌后的打孔器沿菌落边缘打孔,获取直径为5mm的菌饼,将获得的菌饼接种



于新的PDA平板中央。处理组用接种环蘸取解淀粉芽孢杆菌YN0904,采用点接种的方式,接种于刚刚接种了Foc 15-1菌饼的PDA平板上,具体位置在平板边缘距中心25mm处,每皿接种4个点。以仅接种Foc 15-1菌饼的PDA平板为对照组。设置3组平行试验。将上述PDA平板置于28℃静置培养7天后取出平板进行观察,用十字交叉法测量Foc 15-1的直径并采用如下公式计算抑菌率。

[0085] 抑菌率(%) = (对照病原菌菌落直径 - 处理病原菌菌落直径) / 对照直径 × 100%

[0086] 实验结果:处理组的Foc 15-1菌落经测量为:1.8cm、1.85cm、1.85cm,对照组的Foc 15-1菌落经测量为:8.9cm、9cm、9cm。经计算,每组试验的抑菌率为:79.77%、79.44%、79.44%,平均抑菌率为79.55%。

[0087] 图4中示出了其中一组试验的菌落生长情况,左侧为处理组,右侧为对照组。由图中可以看出,处理组中Foc 15-1的生长受到明显抑制,其菌落大小明显小于对照组,说明菌株YN0904具有较强的尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型抑制效果。

[0088] (2) YN0904对Foc 15-1菌丝体的影响

[0089] 选取实验(1)中菌株YN0904与Foc 15-1对峙培养7天的对峙平板(处理组),用灭菌牙签挑取靠近生防菌(YN0904菌落)部分的Foc 15-1新生菌丝制作临时玻片,体式显微镜40倍下(光学显微镜)观察菌株YN0904对Foc 15-1菌丝体生长的影响,以PDA正常培养7天(对照组的菌落边缘新生菌丝为对照)。

[0090] 图5中示出了一组观察结果。图5左侧(YN0904+TR4)为处理组Foc 15-1的菌丝,从图中可以看出菌丝肿胀变形,端部膨大为圆形,隔膜之间菌丝节间缩短;右侧(CK-TR4)为对照组Foc 15-1的菌丝,从图中可以看出菌丝较为光滑,均匀,自然伸直,菌丝内无大量色素积累现象,原生质正常。该实验结果说明YN0904能够有效抑制尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型菌株的生长。

[0091] (3) 生防/促生基因检测

[0092] 对菌株YN0904进行生防/促生基因检测,通过PCR检测6个拮抗基因srfAB、fenD、ituC、ituD、bamC、yndJ和1个促生基因ysnE在菌株YN0904中是否存在,从而鉴别其生防和促生潜力。具体方法为:将解淀粉芽孢杆菌YN0904进行活化:划线法采用NA固体培养基在37℃培养24h。用灭菌的牙签挑取活化后的单菌落于50μl的Lysis Buffer中混匀,然后置于80℃水浴裂解15min,8000rpm离心1min,取上清液(作为DNA模板即YN0904基因组基因作为DNA模板)。具体基因对应的引物及引物的序列详见表3,扩增体系详见表4,扩增程序详见表5。

[0093] 表3检测基因对应的物质种类及引物

物质种类	合成酶基因	引物	序列 (5'-3')	序列编号	扩增片段长度 (bp)
表面活性肽 (surfactin)	<i>srfAB</i>	110F	GTTCTCGCAGTCCAGCAGAAG	SEQ ID NO:3	308
		110R	GCCGAGCGTATCCGTACCGAG	SEQ ID NO:4	
丰原素 (fengycin)	<i>fenD</i>	FNDF1	CCTGCAGAAGGAGAAGTGAAG	SEQ ID NO:5	293
		FNDR1	TGCTCATCGTCTTCCGTTTC	SEQ ID NO:6	
伊枯草菌素 (iturin)	<i>ituC</i>	ITUCF1	TTCACITTTTGATCTGGCGAT	SEQ ID NO:7	575
		ITUCR3	CGT CCG GTA CAT TTT CAC	SEQ ID NO:8	
YndJ	<i>yndJ</i>	147F	CAGAGCGACAGCAATCACAT	SEQ ID NO:9	212
		147R	TGAATTTCCGGTCCGCTTATC	SEQ ID NO:10	
BamC	<i>bamC</i>	bamC2F	CTGGAAGAGATGCCGCTTAC	SEQ ID NO:11	850
		bamC2R	AAGAGTGCCTTTTCTTCGGA	SEQ ID NO:12	
伊枯草菌素 (iturin)	<i>ituD</i>	ituD2F	GATGCGATCTCCTTGGATGT	SEQ ID NO:13	647
		ituD2R	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	SEQ ID NO:14	
植物生长素 Auxin	<i>ysnE</i>	ysnEF	TCGGTTTGTAAACTTCAACTGC	SEQ ID NO:15	455
		ysnER	GTCCACTAGACAAGCGGCTC	SEQ ID NO:16	

[0095] 注:表3中引物最后一个字母“F”代表上游引物,“R”代表下游引物。

[0096] 其中,用于检测的基因及其引物参考以下参考文献[4]-[6]获得。

[0097] [4]Joshi,R.and M.S.Gardener,Identification and Characterization of Novel Genetic Markers Associated with Biological Control Activities in *Bacillus subtilis*.Phytopathology,2006.96 (2):p.145.

[0098] [5]Mora I,Cabrefiga J,Montesinos E.Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments[J].International Microbiology,2011, 14 (4):213-223.

[0099] [6]周小江.2株海洋生境芽孢杆菌的抑菌促生长作用及有关控制基因[D].青岛:青岛科技大学,2015.

[0100] 表4生防/促生基因扩增体系

试剂	用量/ $\mu$ L
模板DNA	1
上游引物	1
下游引物	1
PCR SuperMix*	22
总体积	25

[0102] \*购自TsingKE公司,其中含有酶、dNTPs、水、PCR Buffer。

[0103] 表5生防/促生基因扩增程序

[0104]

引物	147F/147R、FEDF1/ FNDR1、bamC2F/bamC2R		
程序	温度/°C	时间/s	循环数
	98	120	1
	98	10	35
	54	15	
	72	10	
72	300	1	
引物	110F/110R		
程序	温度/度	时间/s	循环数
	98	120	1
	98	10	35
	57	15	
	72	10	
72	300	1	
引物	ITUCF1/ ITUCR3		
程序	温度/度	时间/s	循环数
	98	120	1

[0105]

	98	10	35
	51	15	
	72	10	
	72	300	1
引物	ituD2F/ituD2R		
程序	温度/度	时间/s	循环数
	98	120	1
	98	10	35
	56	15	
	72	10	
72	300	1	
引物	ysnEF/ ysnER		
程序	温度/度	时间/s	循环数
	98	120	1
	98	10	35
	55	15	
	72	10	
72	300	1	

[0106] 采用1重量%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。结果如图6所示。其中,M泳道为Marker,泳道1和2为扩增产物,泳道3为阴性对照。从图6中可以看出,6个拮抗基因srfAB、fenD、ituC、ituD、bamC、yndJ和1个促生基因ysnE均可在YN0906基因组中扩增获得,说明YN0906菌株中含有上述基因,具有良好的生防潜力。

[0107] 实施例3

[0108] 本实施例用于说明本发明提供的解淀粉芽孢杆菌CGMCC NO.21189的解钾、解磷效果。

[0109] 本实施例中采用有机磷固体培养基对解淀粉芽孢杆菌YN0904的解磷能力进行测试,采用解钾固体培养基对解淀粉芽孢杆菌YN0904的解钾能力进行测试。具体配方和配制方法如下:

[0110] 有机磷固体培养基:葡萄糖10g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5g、NaCl 0.3g、KCl 0.3g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.03g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  0.3g、琼脂18g,加蒸馏水定容至1000ml,调节pH  $7.2 \pm 0.3$ 。

[0111] 解钾固体培养基:蔗糖10g、 $\text{Na}_2\text{H}_2\text{P}_2\text{O}_7$  1g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1g、酵母膏0.2g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.03g、 $\text{CaCO}_3$  2.5g、钾长石粉10g、琼脂粉15g,加蒸馏水定容至1000mL,调节pH  $7.2 \pm 0.3$ 。

[0112] 配制方法为:将除琼脂外的试剂加入蒸馏水中,定容至1000mL,而后加入琼脂,加热溶解后冷却至 $60^\circ\text{C}$ 左右,采用9cm培养皿按照每皿约20-25mL的用量倒平板。

[0113] 试验方法:将解淀粉芽孢杆菌YN0904进行活化:划线法采用NA固体培养基在 $37^\circ\text{C}$ 培养24h。用高压灭菌过的牙签挑取活化后的解淀粉芽孢杆菌YN0904单菌落接种于有机磷平板和解钾培养基平板上,每个平板接种1个菌落,设置3组平行试验。接种后的平板置于 $30^\circ\text{C}$ 培养7天,用十字交叉法检测测量透明圈的大小。

[0114] 实验结果:

[0115] 解磷能力检测:选择有解磷圈出现的菌落测量该菌落直径d和解磷圈直径D,计算D/d比值,确定解磷能力强度。经测量,3组平行试验中,解磷圈直径(cm)分别为:2.55、2.75、2.55,其中的菌落直径(cm)分别为:1.85、2.0、1.95。经计算,D/d比值分别为:1.38、1.38、1.31。

[0116] 解钾能力检测:选择有解钾圈出现的菌落测量该菌落直径d和解钾圈直径D,计算D/d比值,确定解钾能力强度。经测量,3组平行试验中,解钾圈直径(cm)分别为:3.45、3.75、3.8,其中的菌落直径(cm)分别为:2.05、1.95、1.9。经计算,D/d比值分别为:1.68、1.92、2。

[0117] 图7分别示出了解磷(左侧)和解钾(右侧)测试中的一个平板的结果。

[0118] 实施例4

[0119] 本实施例用于说明本发明提供的解淀粉芽孢杆菌CGMCC NO.21189对于香蕉枯萎病盆栽植株的防治效果和促生作用。

[0120] 取组培的巴西香蕉苗,洗净根部培养基后,移栽至育苗袋中,待香蕉苗长出3-4片叶后(约一个月),将其移栽至以蛭石为基质的直径11cm、高12cm塑料盆中。移栽后经常淋水保湿,每周施肥一次。具体施肥方式为:按照每株香蕉苗2g/次的用量将复合肥溶于水中施用,该复合肥中,N的含量为15重量%, $\text{P}_2\text{O}_5$ 的含量为15重量%, $\text{K}_2\text{O}$ 的含量为15重量%。待香蕉苗长出5-6片叶(约一个月)后作为香蕉盆栽苗进行香蕉枯萎病防治和促生实验。

[0121] 解淀粉芽孢杆菌发酵液制备:将解淀粉芽孢杆菌YN0904进行活化:划线法采用NA固体培养基在30℃培养24h。而后将单菌落用无菌接种环挑取后接种于NA液体培养基(200mL)中,37℃,220rpm震荡培养2天,获得菌株发酵液。采用无菌水将菌株发酵液配制成 $1 \times 10^8$ CFU/mL的解淀粉芽孢杆菌发酵液备用。

[0122] 采用香蕉枯萎病孢子液处理香蕉盆栽苗,模拟香蕉枯萎病发生。香蕉枯萎病孢子液制备方法为:将分离纯化后的香蕉枯萎病菌4号小种(Foc 15-1)菌饼接种到液体PDA培养基中,28℃、220rpm摇床振荡培养2天,用4层无菌纱布过滤培养液,得到病原菌孢子悬浮液。用无菌水配制为浓度 $1 \times 10^6$ CFU/mL的香蕉枯萎病孢子液备用。

[0123] 将香蕉盆栽苗分为四组:(1)单独浇灌NA液体培养基;(2)单独浇灌解淀粉芽孢杆菌发酵液;(3)浇灌NA液体培养基和香蕉枯萎病孢子液;(4)浇灌解淀粉芽孢杆菌发酵液和香蕉枯萎病孢子液。每组采用4株香蕉盆栽苗进行实验,共设置三组平行试验。具体浇灌方法为:试验中浇灌一次,浇灌的溶液(发酵液、培养基)的总用量为40mL/株。浇灌解淀粉芽孢杆菌发酵液7天后,接种香蕉枯萎病菌(每株浇灌40mL香蕉枯萎病孢子液)。

[0124] 处理当天测量每个处理香蕉植株的株高、假茎直径等生物学指标,而后置于相同条件下进行盆栽培养,40天后,再次进行测量。调查各处理发病情况,统计各处理病情指数(根据表6中的病害分级标准按照公式计算获得),并计算防治效果。实验结果详见表7-表12。

[0125] 表9-表11中,上标字母表示第0天和第40天测量结果之间的差异性,若同一行中的数据上标为不同字母,则代表其差异显著,若为相同字母,则代表差异不显著。

[0126] 表6香蕉枯萎病病害分级标准

病害级别	香蕉病害症状	
	内部症状	外部症状
0	球茎无褐变	无症状, 植株健康
1	球茎褐变面积 $\leq$ 茎褐变	植株下部 1-2 片叶发黄萎焉
2	25% $<$ 球茎褐变面积 $\leq$ 球茎褐	植株 2-3 片叶发黄萎焉
3	50% $<$ 球茎褐变面积 $\leq$ 球茎褐	植株底部 3-4 片叶发黄萎焉
4	球茎褐变面积 $>$ 75%	全株萎焉, 植株死亡

[0127] 测量方法

[0128] 株高:测量从地面到顶部两叶叶柄交叉点的距离

[0129] 假茎直径:用游标卡尺测量离地面约1cm假茎基部的直径

[0130] 防效的计算采用下列公式:

$$[0131] \text{病情指数} = \frac{\Sigma(\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总数} \times 4} \times 100$$

[0132] 防治效果(%) = [(对照组病情指数 - 处理组病情指数) / 对照组病情指数]  $\times$  100%

[0133] 生长速率 = (测量结束时间 - 测量开始时间) / 天数

[0135] 表7病情指数对比

组别	病情指数	平均病情指数	防治效果/%
[0136] (3)	75	70.83	/
	68.75		
	68.75		
(4)	18.75	12.5	75
	12.5		90.91
	6.25		81.82

[0137] 表8叶片和球茎(平均)病情指数对比

组别	球茎	叶片
(3)	56.25±3.61	70.83±2.08
(4)	14.58±2.08	12.5±3.61
防治效果/%	74.26±2.27	82.58±4.61

[0139] 表9株高促生效果对比

组别	0天株高/cm	40天株高/cm	生长速率
(1)	21.06±1.69 <sup>a</sup>	30.58±1.81 <sup>b</sup>	0.24
(2)	21.74±2.07 <sup>a</sup>	36.17±2.86 <sup>a</sup>	0.36
(3)	21.65±1.44 <sup>a</sup>	22.6±1.48 <sup>c</sup>	0.02
(4)	20.10±1.27 <sup>a</sup>	29.55±1.65 <sup>b</sup>	0.22

[0141] 表10假茎直径促生效果对比

组别	0天假茎直径/mm	40天假茎直径/mm
(1)	7.18±0.29 <sup>a</sup>	9.88±0.51 <sup>ab</sup>
(2)	7.26±0.48 <sup>a</sup>	11.64±0.71 <sup>a</sup>
(3)	7.21±0.18 <sup>a</sup>	8.69±0.44 <sup>c</sup>
(4)	7.20±0.47 <sup>a</sup>	10.93±0.38 <sup>b</sup>

[0143] 表11植株叶片数促生效果对比

组别	0天叶片数	40天叶片数
(1)	5.33±0.31 <sup>a</sup>	6.75±0.41 <sup>b</sup>
(2)	5.17±0.22 <sup>a</sup>	7.17±0.31 <sup>a</sup>
(3)	5±0.32 <sup>a</sup>	5.67±0.24 <sup>c</sup>
(4)	5.08±0.37 <sup>a</sup>	6.58±0.35 <sup>ab</sup>

[0145] 表12根系促生效果对比

组别	40天平均根系数
(1)	6.58

(2)	7.75
(3)	5.75
(4)	6.2

[0147] 另外,图8中示出了组(3)(左侧)和组(4)(右侧)香蕉盆栽植株40天后生长状况,由图中可以看出,未采用YN0904处理的香蕉植株在受到Foc 15-1感染后植株发育情况较差,叶片明显较小并且发黄。

[0148] 图9中示出了组(3)(左侧)和组(4)(右侧)香蕉盆栽植株40天后剖根结果,从图中可以看出,采用YN0904处理后的香蕉盆植株的球茎颜色正常,而未经YN0904处理的香蕉盆栽植株球茎颜色呈红色至黑褐色,表现出明显的香蕉枯萎病症状。

[0149] 图8和图9的结果说明YN0904对于香蕉枯萎病具有良好的防治效果。

[0150] 图10中示出了组(1)(左侧)和组(2)(右侧)香蕉盆栽植株40天后生长状况,从图中可以看出,采用YN0904处理的香蕉植株生长状态更好,叶片明显更大。说明YN0904对香蕉植株具有促生作用。

[0151] 以上详细描述了本发明的优选实施方式,但是,本发明并不限于此。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,包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合,这些简单变型和组合同样应当视为本发明所公开的内容,均属于本发明的保护范围。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 云南省农业科学院农业环境资源研究所
- [0003] <120> 解淀粉芽孢杆菌及其应用以及预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法
- [0004] <130> I68282YNN
- [0005] <160> 16
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 27F
- [0011] <400> 1
- [0012] agagtttgat cctggctcag 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 19
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 1492R
- [0017] <400> 2
- [0018] ggttaccttg ttacgactt 19
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 21
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 110F
- [0023] <400> 3
- [0024] gttctcgcag tccagcagaa g 21
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 21
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 110R
- [0029] <400> 4
- [0030] gccgagcgta tccgtaccga g 21
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 21
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> FNDF1
- [0035] <400> 5
- [0036] cctgcagaag gagaagtga g 21
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 20



[0039] <212> DNA  
[0040] <213> FNDR1  
[0041] <400> 6  
[0042] tgctcatcgt cttccgtttc 20  
[0043] <210> 7  
[0044] <211> 20  
[0045] <212> DNA  
[0046] <213> ITUCF1  
[0047] <400> 7  
[0048] ttcacttttg atctggcgat 20  
[0049] <210> 8  
[0050] <211> 18  
[0051] <212> DNA  
[0052] <213> ITUCR3  
[0053] <400> 8  
[0054] cgtccggtac attttcac 18  
[0055] <210> 9  
[0056] <211> 20  
[0057] <212> DNA  
[0058] <213> 147F  
[0059] <400> 9  
[0060] cagagcgaca gcaatcacat 20  
[0061] <210> 10  
[0062] <211> 20  
[0063] <212> DNA  
[0064] <213> 147R  
[0065] <400> 10  
[0066] tgaatttcgg tccgcttata 20  
[0067] <210> 11  
[0068] <211> 20  
[0069] <212> DNA  
[0070] <213> bamC2F  
[0071] <400> 11  
[0072] ctggaagaga tgccgcttac 20  
[0073] <210> 12  
[0074] <211> 20  
[0075] <212> DNA  
[0076] <213> bamC2R  
[0077] <400> 12

[0078] aagagtgcgt tttcttcgga 20  
[0079] <210> 13  
[0080] <211> 20  
[0081] <212> DNA  
[0082] <213> ituD2F  
[0083] <400> 13  
[0084] gatgcatct ctttgatgt 20  
[0085] <210> 14  
[0086] <211> 20  
[0087] <212> DNA  
[0088] <213> ituD2R  
[0089] <400> 14  
[0090] atcgtcatgt gctgcttgag 20  
[0091] <210> 15  
[0092] <211> 22  
[0093] <212> DNA  
[0094] <213> ysnEF  
[0095] <400> 15  
[0096] tcggtttgta aacttcaact gc 22  
[0097] <210> 16  
[0098] <211> 20  
[0099] <212> DNA  
[0100] <213> ysnER  
[0101] <400> 16  
[0102] gtccactaga caagcggctc 20



图1

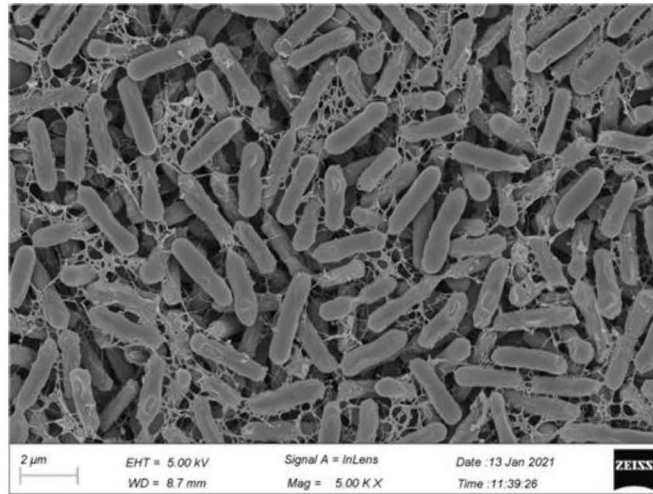


图2

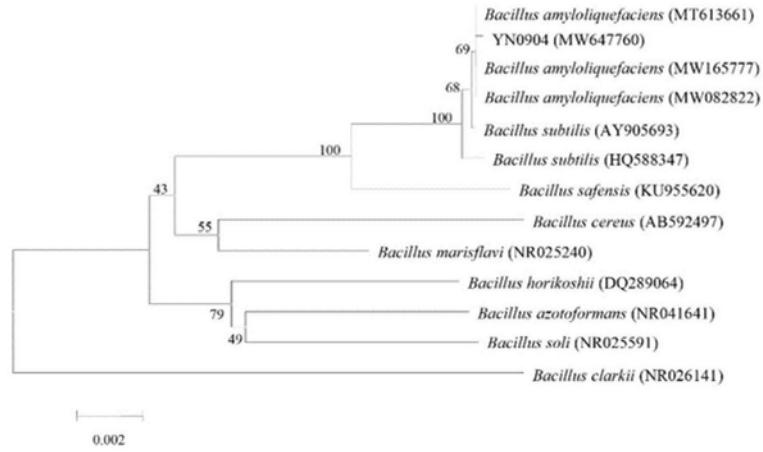


图3

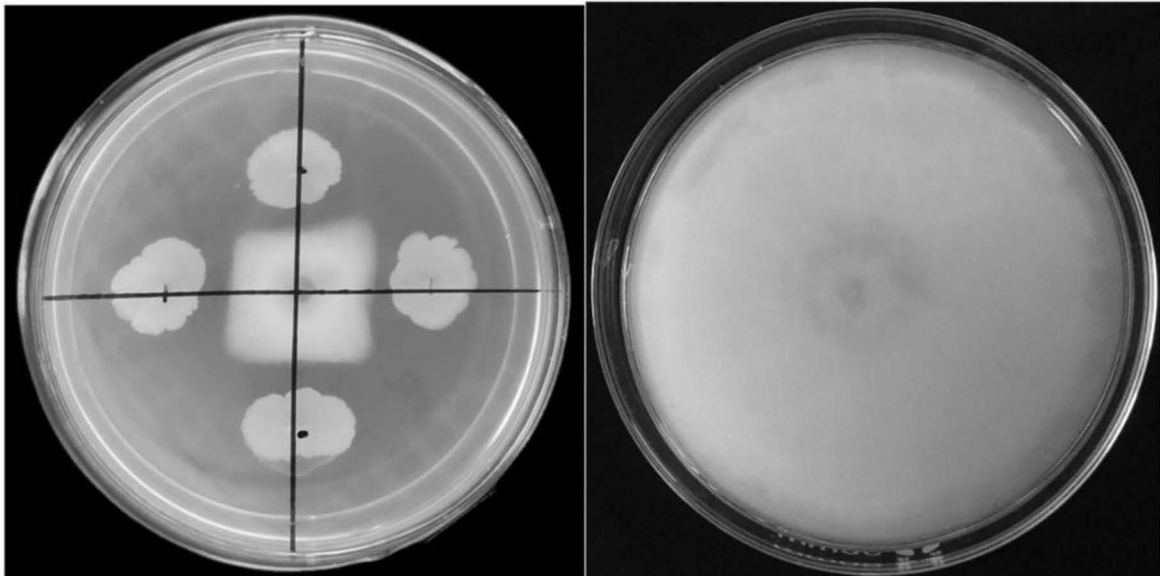


图4

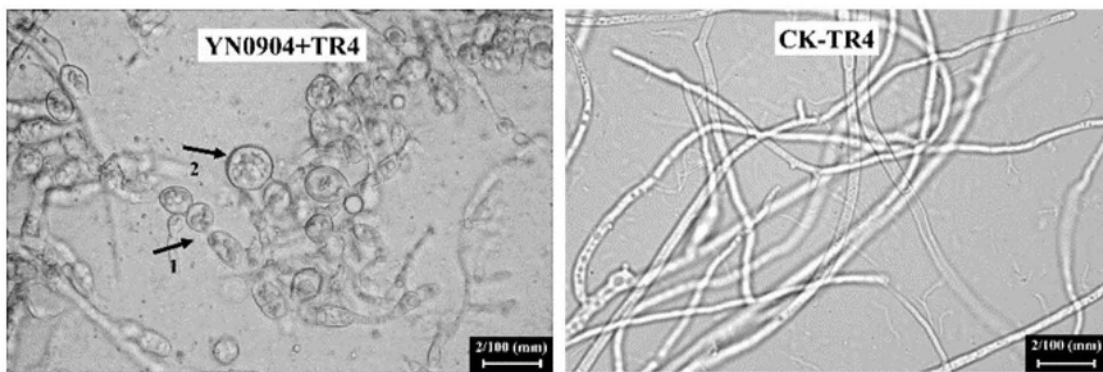


图5

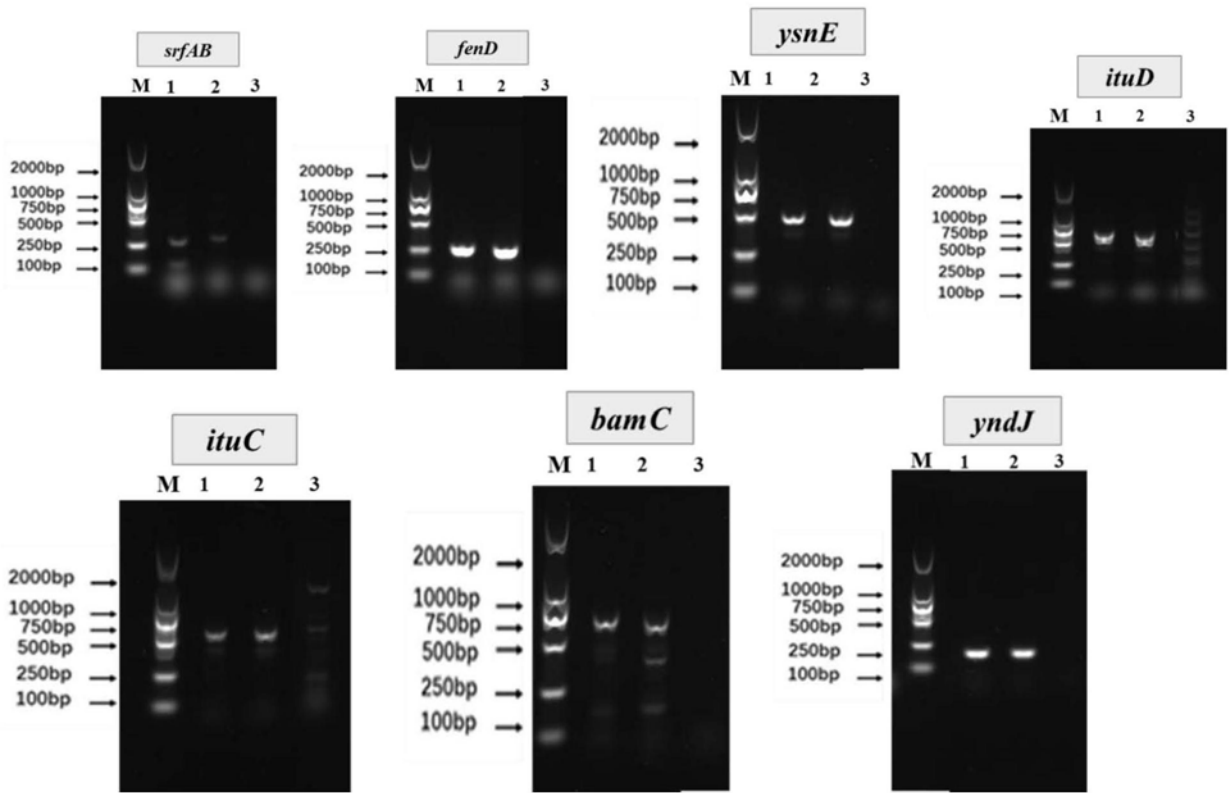


图6

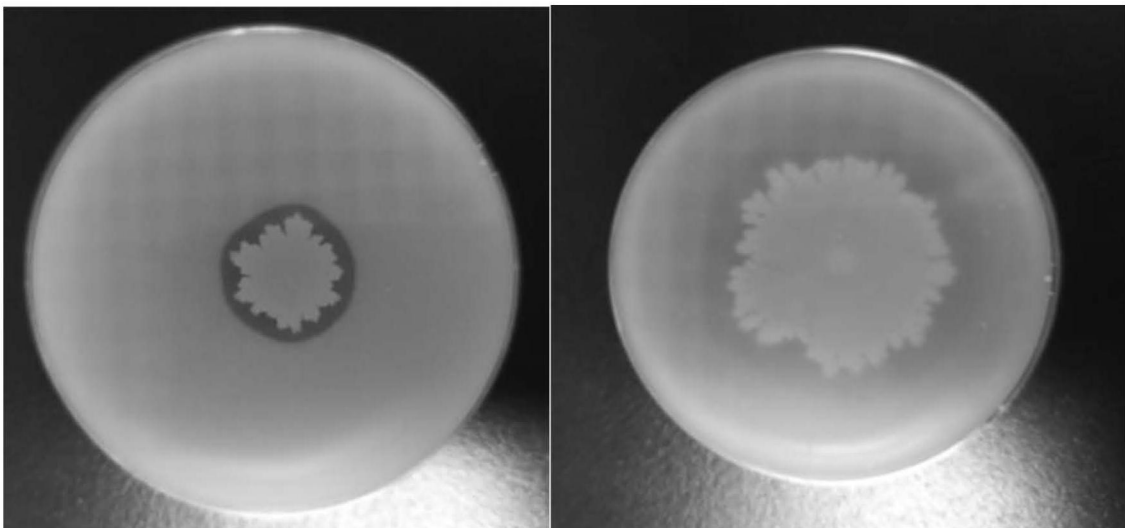


图7



图8

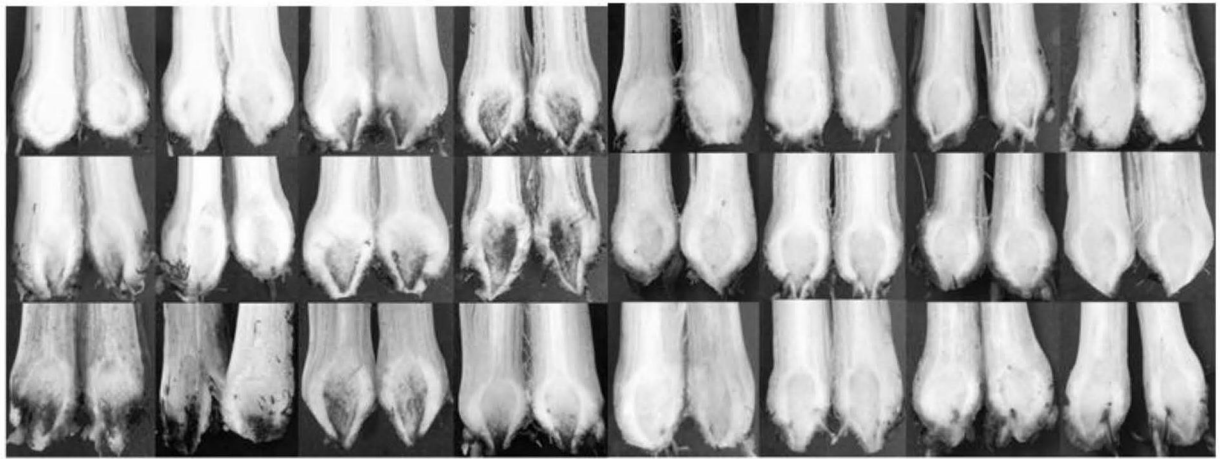


图9



图10