



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112899201 B

(45) 授权公告日 2021.12.07

(21) 申请号 202110281761.9

(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 112899201 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(83) 生物保藏信息
CGMCC No.21872 2021.03.05

(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 徐胜涛 曾莉 李舒
郑泗军 何平 白亭亭 尹可锁
李迅东 刘立娜 郭志祥 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)
C12R 1/07 (2006.01)

审查员 姚进孝

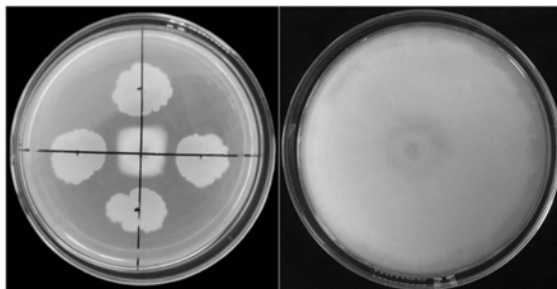
权利要求书1页 说明书13页
序列表3页 附图4页

(54) 发明名称

贝莱斯芽孢杆菌及其应用以及防治香蕉枯萎病的方法

(57) 摘要

本发明涉及生物防治领域,公开了一株贝莱斯芽孢杆菌及其应用以及预防和/或治疗香蕉枯萎病的方法。本发明提供的贝莱斯芽孢杆菌对尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型(Foc TR4)具有较强的抑制效果,能够很好地防治香蕉枯萎病。另外,该贝莱斯芽孢杆菌还对香蕉植株具有很好地促生作用,能够帮助香蕉植株更快更好地生长。而且,该贝莱斯芽孢杆菌为香蕉根际拮抗剂,使用时不会产生副作用或污染问题,更加安全环保。



1. 一株贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*), 其特征在于, 所述贝莱斯芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC NO.21872。

2. 权利要求1所述的贝莱斯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, 所述真菌能够导致香蕉枯萎病发生。

4. 根据权利要求3所述的应用, 其中, 所述真菌选自尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusariumoxysporum* f. sp. *cubense*)4号生理小种热带型。

5. 权利要求1所述的贝莱斯芽孢杆菌在促进植物生长中的应用。

6. 一种防治香蕉枯萎病的方法, 其特征在于, 所述方法包括: 将所述贝莱斯芽孢杆菌和/或所述贝莱斯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, 所述贝莱斯芽孢杆菌为保藏编号为CGMCC NO.21872。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中, 所述贝莱斯芽孢杆菌的发酵液中, 所述贝莱斯芽孢杆菌的含量为 $1 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ CFU/mL。

8. 根据权利要求6所述的方法, 其中, 所述贝莱斯芽孢杆菌的发酵液的制备方法包括: 将所述贝莱斯芽孢杆菌在发酵条件下进行培养, 获得含贝莱斯芽孢杆菌的代谢产物的发酵液。

9. 根据权利要求8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。

10. 根据权利要求8所述的方法, 其中, 所述发酵液中贝莱斯芽孢杆菌的代谢产物的浓度使得所述发酵液的OD₆₀₀值为2-2.5。

11. 根据权利要求10所述的方法, 其中, 所述发酵液中贝莱斯芽孢杆菌的代谢产物的浓度使得所述发酵液的OD₆₀₀值为2.3-2.5。

12. 根据权利要求6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。

13. 根据权利要求6或7所述的方法, 其中, 当所述贝莱斯芽孢杆菌和/或所述贝莱斯芽孢杆菌的发酵液施用于土壤时, 所述贝莱斯芽孢杆菌和/或所述贝莱斯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含贝莱斯芽孢杆菌的含量为 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ CFU/kg。

14. 根据权利要求6或7所述的方法, 其中, 当所述贝莱斯芽孢杆菌和/或所述贝莱斯芽孢杆菌的发酵液施用于香蕉植株根系时, 所述贝莱斯芽孢杆菌和/或所述贝莱斯芽孢杆菌发酵液的用量使得每株香蕉植株每次接触的所述贝莱斯芽孢杆菌的量为 $5 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ CFU。

贝莱斯芽孢杆菌及其应用以及防治香蕉枯萎病的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物防治领域,具体涉及一株贝莱斯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] 香蕉是多年生草本植物,是热带、亚热带地区重要的经济作物之一。我国香蕉种植主要分布在广东、海南、广西、福建、云南和台湾等地区,并且我国香蕉产量巨大,目前香蕉已经是我国继苹果、葡萄和柑橘之后的第四大宗水果。然而,香蕉种植业近年来常受到香蕉枯萎病(*Fusarium wilt of banana*)的困扰,该病的病原菌为尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*, FOC)热带型4号生理小种(TR4)。香蕉枯萎病在初期并不表现出明显症状,但是幼龄香蕉在感染后即携带病原菌,直到进入生长期,尤其是临近抽蕾期,染病植株迅速发病,最终坏死,导致香蕉产量下降,蕉农收益严重受损。而且香蕉种植园的香蕉枯萎病发生率若达到20%以上,该地区将不再适宜种植香蕉,这使得大规模的香蕉枯萎病爆发严重限制了香蕉生产,给香蕉种植业造成了不可估量的经济损失。

[0003] 目前,针对香蕉枯萎病的防治方法主要分为四种:化学防治法、抗病育种、耕作模式调整和生物防治法。其中,生物防治法作为防治效果最好、对环境和植株副作用最小、成本低、操作便利的防治方法近年来受到广泛关注。生物防治法的核心是开发和利用生防菌,通过生防菌对致病菌产生抑制作用,从而达到防治植物病害的目的。而且,有的生防菌还能够对作物具有促生作用,在防治病害的同时提高产量。然而,目前针对香蕉枯萎病的生防菌开发工作尚未深入,可供选用的生防菌防治效果有限,而且促生效果不明显,无法充分发挥生物防治的优势。因此,亟待开发一种新型的具有良好防治效果,并且对作物促生作用好的用于香蕉枯萎病防治的生防菌,满足香蕉枯萎病生物防治的需要。

发明内容

[0004] 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理想,而且不具有促生效果,或者促生效果不明显等问题,提供一株贝莱斯芽孢杆菌,该菌株具有对香蕉枯萎病防治效果好,同时对香蕉植株的促生效果明显的特点。

[0005] 为了实现上述目的,本发明一方面提供一株贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),其特征在于,所述贝莱斯芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC NO.21872。

[0006] 本发明第二方面提供如上所述的贝莱斯芽孢杆菌在抑制真菌中的应用。

[0007] 本发明第三方面提供如上所述的贝莱斯芽孢杆菌在促进植物生长中的应用。

[0008] 本发明第四方面提供一种防治香蕉枯萎病的方法,其特征在于,将所述贝莱斯芽孢杆菌和/或所述贝莱斯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;

[0009] 其中,所述贝莱斯芽孢杆菌为保藏编号为CGMCC NO.21872。

[0010] 通过上述技术方案,本发明具有如下有益效果:

- [0011] (1) 本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌对尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型(Foc TR4)抑制效果强,具有良好的香蕉枯萎病防治效果;
- [0012] (2) 本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌具有良好的促生效果;
- [0013] (3) 本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌分离自香蕉植株的根际土壤,其使用不会破坏香蕉种植环境中的微生物环境,对于土壤没有污染,并且成本低廉,使用方法简单。

附图说明

- [0014] 图1是实施例1中菌株YN1910的菌落形态;
- [0015] 图2是实施例1中菌株YN1910的扫描电镜图;
- [0016] 图3是实施例1中根据菌株YN1910的16S rDNA测序结果绘制的系统发育树;
- [0017] 图4是实施例2中,本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌对尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型的抑制效果;
- [0018] 图5是本发明实施例2中,菌株YN1910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;
- [0019] 图6是本发明实施例2中,YN1910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;
- [0020] 图7是本发明实施例4中,菌株YN1910对盆栽香蕉植株的香蕉枯萎病防治效果(叶片);
- [0021] 图8是本发明实施例4中,菌株YN1910对盆栽香蕉植株的香蕉枯萎病防治效果(球茎);
- [0022] 图9是本发明实施例4中,菌株YN1910对香蕉盆栽植株的促生效果。
- [0023] 生物保藏
- [0024] 本本发明的发明人2019年10月于云南省玉溪市元江县香蕉枯萎病地块健康香蕉植株根际土壤分离得到的根际土壤细菌YN1910,经鉴定为贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)。于2021年3月5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:中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号),保藏编号为CGMCC NO.21872。

具体实施方式

- [0025] 在本文中所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。
- [0026] 本本发明的发明人在研究的过程中于云南省玉溪市元江县香蕉枯萎病地块健康香蕉植株根际土壤分离得到的根际土壤细菌YN1910,经鉴定为贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)。于2021年3月5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.21872。经过进一步研究发现,贝莱斯芽胞杆菌CGMCC NO.21872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,并且具有优异的促进香蕉植株生长的能力,是一株既有抑菌性能,又有促生性能的双功能菌株。

[0027] 本发明第一方面提供一株贝莱斯芽胞杆菌 (*Bacillus velezensis*), 所述贝莱斯芽胞杆菌的保藏编号为CGMCC NO.21872。

[0028] 本发明第二方面提供如上所述的贝莱斯芽胞杆菌在抑制真菌中的应用。

[0029] 根据本发明的优选实施方式, 其中, 所述真菌选自能够导致香蕉枯萎病发生的真菌。

[0030] 优选地, 所述真菌选自尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型 (*Foc TR4*)。

[0031] 本发明第三方面提供如上所述的贝莱斯芽胞杆菌在促进植物生长中的应用。

[0032] 优选地, 所述植物选自香蕉。

[0033] 本发明中所述的“促进植物生长”意指采用所述贝莱斯芽胞杆菌对香蕉生长的促进作用, 即使得香蕉植株的生长状态更好; 对香蕉生长过程的促进作用, 即使得香蕉生长更加迅速; 对香蕉产量的促进作用, 即使得香蕉产量更多、果实更大等作用等。

[0034] 本发明的发明人在研究的过程中发现, 本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌 CGMCC NO.21872及其代谢产物 (例如其发酵液) 均具有抑制尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种热带型 (*Foc TR4*) 等真菌的作用, 并且将其施用于香蕉植株时, 能够有效防治香蕉枯萎病的发生和发展。

[0035] 本发明第四方面提供一种防治香蕉枯萎病的方法, 所述方法包括: 将所述贝莱斯芽胞杆菌和/或所述贝莱斯芽胞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;

[0036] 其中, 所述贝莱斯芽胞杆菌为保藏编号为CGMCC NO.21872。

[0037] 本发明中, 所述“防治香蕉枯萎病”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。

[0038] 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 (*Foc TR4*)。

[0039] 根据本发明的优选实施方式, 其中, 所述贝莱斯芽胞杆菌的发酵液中, 所述贝莱斯芽胞杆菌的含量为 1×10^7 - 1×10^8 CFU/mL。

[0040] 根据本发明的优选实施方式, 其中, 所述贝莱斯芽胞杆菌的发酵液的制备方法包括: 将所述贝莱斯芽胞杆菌在发酵条件下进行培养, 获得含贝莱斯芽胞杆菌的代谢产物的发酵液。

[0041] 优选地, 所述发酵条件包括: 温度35-40°C, 时间40-60h, 180-220rpm 振荡培养。

[0042] 优选地, 所述发酵液中贝莱斯芽胞杆菌的代谢产物的浓度使得所述发酵液的OD₆₀₀值为2-2.5, 优选为2.3-2.5。

[0043] 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或土壤中, 也可以根据现有技术的方法, 将其中的贝莱斯芽胞杆菌代谢产物提取出来, 制成相关微生物制剂 (例如液体制剂或固体制剂等) 再进行使用。任意本法领域现有提取发酵液中活性成分的方法均可适用于本发明。

[0044] 本发明提供的方法中, 当将所述贝莱斯芽胞杆菌代谢产物制成相关微生物制剂施用时, 本领域技术人员可以根据上述发酵液的用量, 以及所述制剂中贝莱斯芽胞杆菌代谢产物的具体含量进行换算, 以获得所述贝莱斯芽胞杆菌代谢产物相关制剂的具体用量。

[0045] 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:将所述贝莱斯芽胞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,所述贝莱斯芽胞杆菌的发酵液即为如前所述的贝莱斯芽胞杆菌的发酵液,对于其制备方法和特征在此不再赘述。

[0046] 优选地,所述有机溶剂选自丙酮,更优选为95-100重量%的丙酮。

[0047] 优选地,所述贝莱斯芽胞杆菌的发酵液与所述有机溶剂的体积比为 1:1-1.2。

[0048] 优选地,所述混合的条件包括:温度18-25℃,时间10-12h。

[0049] 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全部去除为止。

[0050] 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。

[0051] 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,所述贝莱斯芽胞杆菌的代谢产物的用量为 0.075-0.1L/kg/次,即每千克土壤中每次施用0.075-0.1L所述微生物制剂。

[0052] 根据本发明的优选实施方式,其中,当所述贝莱斯芽胞杆菌和/或所述贝莱斯芽胞杆菌的发酵液施用于土壤时,所述贝莱斯芽胞杆菌和/或所述贝莱斯芽胞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述贝莱斯芽胞杆菌的含量为 5×10^7 - 5×10^8 CFU/kg,即每千克土壤施用 5×10^7 - 5×10^8 CFU的上述贝莱斯芽胞杆菌(或含有 5×10^7 - 5×10^8 CFU上述贝莱斯芽胞杆菌的所述贝莱斯芽胞杆菌发酵液)。

[0053] 根据本发明的优选实施方式,其中,当所述贝莱斯芽胞杆菌和/或所述贝莱斯芽胞杆菌的发酵液施用于香蕉植株时,所述贝莱斯芽胞杆菌和/或所述贝莱斯芽胞杆菌的发酵液的用量使得每次每株香蕉植株接触的所述贝莱斯芽胞杆菌的量为 5×10^7 - 5×10^8 CFU,即每株香蕉植株可施用 5×10^7 - 5×10^8 CFU的上述贝莱斯芽胞杆菌(或含有 5×10^7 - 5×10^8 CFU上述贝莱斯芽胞杆菌的所述贝莱斯芽胞杆菌发酵液)。

[0054] 由于本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌CGMCC NO.21872还具有对植物优异的促生作用,因此,本发明另一方面还提供一种促进植物生长的方法。所述方法与上述防治香蕉枯萎病的方法基本相同。对于具体的贝莱斯芽胞杆菌和/或所述贝莱斯芽胞杆菌的发酵液的用量,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。

[0055] 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。

[0056] 实施例1

[0057] 本实施例用于说明本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*) CGMCC NO.21872的分离、鉴定和保藏。

[0058] 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。

[0059] 固体NA培养基为液体培养基中加入15重量%琼脂配制而成。配制方法为将除琼脂外的成分溶于水中,加热煮沸,加入琼脂后溶解混匀并采用高温蒸汽灭菌,待取出后冷却至60℃左右(不烫手且其中的琼脂也未凝固即可)倒平板。采用9m的培养皿,每皿倒入约20mL所述固体NA培养基,冷却凝固后即为NA平板。

[0060] (1) 菌种分离和纯化

[0061] 取采集自云南省玉溪市元江县香蕉枯萎病地块健康香蕉植株根际土壤为样品。具体采样方法为:采用五点取样法于所述地块随机选取采样点,用土壤采集器采集0-10cm土壤,每个处理重复3次。收集附着在香蕉根系的土壤作为根际土壤样品,去除其中的根须、石子等杂质,将采集的土壤样品混匀后用聚乙烯无菌袋密封,置于冰盒中带回实验室,在-20℃保存备用。

[0062] 称取2g混匀的土壤样品,加入装有18mL无菌水的离心管中,涡旋振荡器震荡混匀,制成土壤悬浮液,10倍梯度依次稀释至稀释倍数 10^{-7} 。用微量移液器分别从稀释倍数 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的土壤悬浮液中吸取100 μ L,并分别涂布于NA平板上,28℃倒置培养24h。挑取不同形态的单菌落,置于50重量%无菌甘油中于-80℃保存备用。

[0063] 采用上述方法获取的土壤根际菌中,菌株YN1910在NA固体培养基表面形成圆形乳白色不透明菌落,表面不光滑,中间稍凸起且光亮,有菌膜,边缘规则(图1中示出了菌株YN1910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)下光学显微镜下观察该菌呈杆状,两端钝圆(图2中示出了菌株YN1910的扫描电镜图)。最适生长pH为7,最适生长温度为37℃。

[0064] (2) 菌种鉴定

[0065] 采用16S rDNA扩增及序列分析的方法对纯化后的上述菌株(菌株 YN1910)进行鉴定。具体方法为:采用细菌基因组DNA提取试剂盒(TaKaRa)对纯化后菌株YN1910进行基因组DNA提取,采用以下通用引物(委托伤害派森诺生物科技股份有限公司合成)对该菌株的16S RNA进行扩增:27F(上游引物,序列为5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',SEQ ID NO:1)和1492R(下游引物,序列为5'-GGTACCTGTTACGACTT-3',SEQ ID NO:2)。扩增体系和条件详见以下表1-2。扩增产物送至上海派森诺生物科技股份有限公司测序。

[0066] 表1 16S rDNA扩增体系

[0067]

试剂	用量/ μ L
模板DNA(菌株1910基因组DNA)	2
上游引物	2
下游引物	2
酶(TaKa Ra LA-Taq)	0.5
dd H ₂ O	30.5
dNTP Mixture	8
PCR Buffer(10 \times)	5
总体积	50

[0068] 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

[0070] 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,确定所分离获得的菌株YN1910的分类地位。分类检索参照以下参考文献[1]和[2]。

[0071] [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.

[0072] [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.

[0073] 结果表明,菌株YN1910与菌株*Bacillus velezensis*的序列相似性为99%。根据系统进化树(详见图3)的分类结果,该菌株与贝莱斯芽胞杆菌亲缘关系最近,聚类为一支。

[0074] 根据菌株YN1910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,确定该菌株为贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)。该菌株2021年3月5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.21872。

[0075] 实施例2

[0076] 本实施例用于说明本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌CGMCC NO.21872对香蕉枯萎病原菌的抑制效果。

[0077] 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 4 in *Musa acuminata* Pahang. *Euphytica*,2018.214(7):106.)。

[0078] 本实施例中,采用PDA固体培养基进行病原菌培养。所述PDA固体培养基的配制及PDA平板的制备方法为: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,高压蒸汽灭菌后待冷却至60°C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,获得PDA平板。

[0079] (1) 抑菌效果(抑菌率)检测

[0080] 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°C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贝莱斯芽胞杆菌YN1910,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。

[0081] 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%

[0082] 实验结果:处理组的Foc 15-1菌落经测量为:1.65cm、1.6cm、1.65cm,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:81.46%、82.22%、81.67%,平均抑菌率为81.78%。

[0083] 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YN1910具有较强的尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种抑制效果。

[0084] (2) YN1910对Foc 15-1菌丝体的影响

[0085] 选取实验(1)中菌株YN1910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(YN1910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YN1910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。

[0086] 图5中示出了一组观察结果。图5左侧(YN1910+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,内原生质浓缩聚集;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YN1910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。

[0087] (3) 生防/促生基因检测

[0088] 对菌株YN1910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YN1910中是否存在,从而鉴别其生防和促生潜力。具体方法为:将贝莱斯芽胞杆菌 YN1910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℃匀水浴裂解15min,8000rpm离心1min,取上清液作为DNA模板(即菌株 YN1910的基因组DNA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。

[0089] 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	TTCACITTTGATCTGGCGAT	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	TGAATTCGGTCCGCTTATC	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	TCGGTTTGAAACTTCAACTGC	SEQ ID NO:15	455
		ysnER	GTCCACTAGACAAGCGGCTC	SEQ ID NO:16	

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] [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.

[0093] [5]Mora I,Cabrefiga J,Montesinos E.Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments[J].International Microbiology,2011, 14 (4):213-223.

[0094] [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.

[0095] 表4生防/促生基因扩增体系

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

[0096] *购自TsingKE公司,其中含有酶、dNTPs、水、PCR Buffer。

[0097] 表5生防/促生基因扩增程序

[0100]

引物	147F/147R、FEDF1/ FNDRI、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
	98	10	35
	51	15	
	72	10	
	72	300	1

[0101]

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

[0102] 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1-2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YN1910基因组中扩增获得，说明YN1910菌株中含有上述基因，具有良好的生防潜力。

[0103] 实施例3

[0104] 本实施例用于说明本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌CGMCC NO.21872对于香蕉枯萎病盆栽植株的防治效果和促生作用。

[0105] 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%， P_2O_5 的含量为15重量%， K_2O 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。

[0106] 贝莱斯芽胞杆菌发酵液制备：将超低温(-80℃)甘油保存的贝莱斯芽胞杆菌YN1910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 1×10^8 CFU/mL的贝莱斯芽胞杆菌发酵液备用。

[0107] 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 1×10^6 cfu/mL的香蕉枯萎病孢子液备用。

[0108] 将香蕉盆栽苗分为四组：(1)单独浇灌NA液体培养基；(2)单独浇灌贝莱斯芽胞杆菌发酵液；(3)浇灌NA液体培养基和香蕉枯萎病孢子液；(4)浇灌贝莱斯芽胞杆菌发酵液和香蕉枯萎病孢子液。其中，(1)组和(3)组为对照组，(2)组和(4)组为实验组(处理组)。每组采用4株香蕉盆栽苗进行实验，共设置3组平行试验。具体浇灌方法为：试验期间浇灌1次，每次浇灌量为40mL。其中(1)组和(2)组在第0天于盆栽香蕉植株根部分别浇灌NA液体培养基和贝莱斯芽胞杆菌发酵液，而后盆栽培养40天；(3)组和(4)组在第0天于盆栽香蕉植株根部分别浇灌NA液体培养基和贝莱斯芽胞杆菌发酵液，盆栽培养至第7天接种香蕉枯萎病菌(即分别于香蕉植株根部浇灌香蕉枯萎病孢子液40mL/株)。

[0109] 处理当天(第0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。调查各处理组发病情况，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。

[0110] 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。

[0111] 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
[0112] 1	球茎褐变面积≤茎褐变	植株下部 1-2 片叶发黄萎蔫
2	25%<球茎褐变面积≤球茎褐	植株 2-3 片叶发黄萎蔫
3	50%<球茎褐变面积≤球茎褐	植株底部 3-4 片叶发黄萎蔫
4	球茎褐变面积>75%	全株萎焉，植株死亡

[0113] 测量方法

[0114] 株高:测量从地面到顶部两叶叶柄交叉点的距离

[0115] 假茎直径:用游标卡尺测量离地面约1cm假茎基部的直径

[0116] 防效的计算采用下列两公式:

[0117]
$$\text{病情指数} = \frac{\Sigma(\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总数} \times 4} \times 100$$

[0118] 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] × 100%

[0119] 生长速率 = (测量结束时间 - 测量开始时间) / 天数

[0120] 表7病情指数 (叶片) 对比

组别	病情指数	平均病情指数	防治效果/%
[0121] (3)	75	70.83	/

[0122]	68.75	6.25	83.33
	68.75		
	12.5		
	(4) 6.25		
	0		
	100		

[0123] 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)	10.42 ± 2.08	6.25 ± 3.61
防治效果/%	81.76 ± 2.94	91.41 ± 4.82

[0125] 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^a	30.58 ± 1.81^b	0.24
(2)	21.21 ± 2.07^a	37.15 ± 2.86^a	0.4
(3)	21.65 ± 1.44^a	22.6 ± 1.48^d	0.02
(4)	20.28 ± 1.27^a	28.88 ± 1.65^c	0.22

[0127] 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^a	9.88 ± 0.51^b
(2)	7.28 ± 0.48^a	11.36 ± 0.71^a
(3)	7.21 ± 0.18^a	8.69 ± 0.44^c
(4)	7.13 ± 0.47^a	10.74 ± 0.38^b

[0129] 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 ± 0.21^a	6.75 ± 0.31^{ab}
(2)	5.25 ± 0.32^a	7.67 ± 0.51^a
(3)	5 ± 0.22^a	5.67 ± 0.24^a
(4)	5.08 ± 0.27^a	7.17 ± 0.48^b

[0131] 表12根系促生效果对比

组别	40天平均根系数
(1)	6.58
(2)	8
(3)	5.75
(4)	6.5

[0133] 另外,图7中示出了组(1)(左侧)和组(2)(右侧)香蕉盆栽植株在培养40天后的植株生长情况对比,图中可看出,采用YN1910发酵液浇灌的香蕉盆栽植株叶片明显更大,生长情况更好,说明本发明提供的贝莱斯芽胞杆菌YN1910能够具有较好的促生效果。

[0134] 图8中示出了组(3)(左侧)和组(4)(右侧)香蕉盆栽植株在培养40天后的植株生长情况对比,图中可以看出,采用YN1910发酵液浇灌后,受到Foc 15-1感染的香蕉植株生长状态更好。左侧未经YN1910发酵液浇灌的香蕉植株由于受到香蕉枯萎病的影响,植株较为矮小,叶片较小且发黄,而右侧经过YN1910发酵液浇灌的香蕉植株生长状态良好,叶片较大,很少有黄叶,受到香蕉枯萎病影响较小。

[0135] 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YN1910处理后的香蕉盆栽植株的球茎颜色正常,而未经YN1910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。

[0136] 图8和图9的结果说明本发明体用的贝莱斯芽胞杆菌YN1910具有良好的香蕉枯萎病防治效果。

[0137] 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> 贝莱斯芽孢杆菌及其应用以及防治香蕉枯萎病的方法
- [0004] <130> I68283YNN
- [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 gagaagtgaa 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

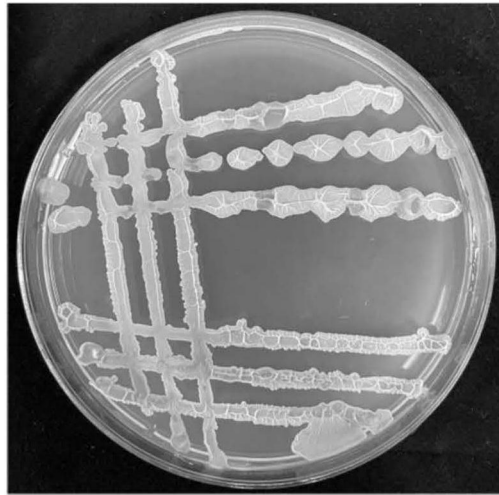


图1

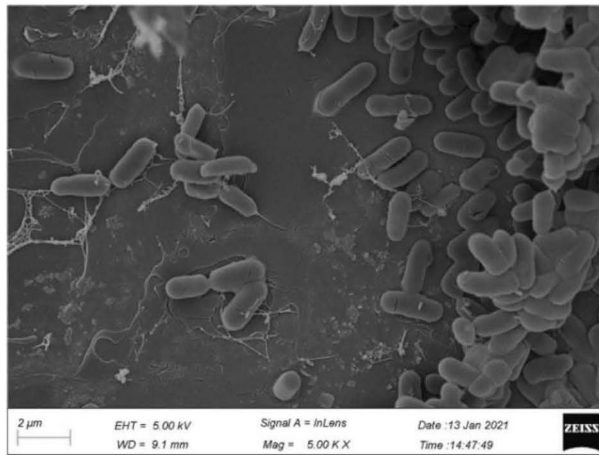


图2

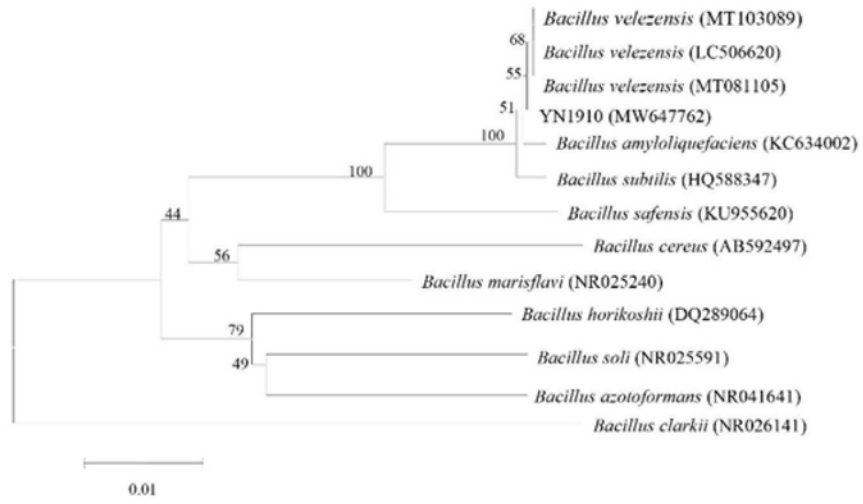


图3

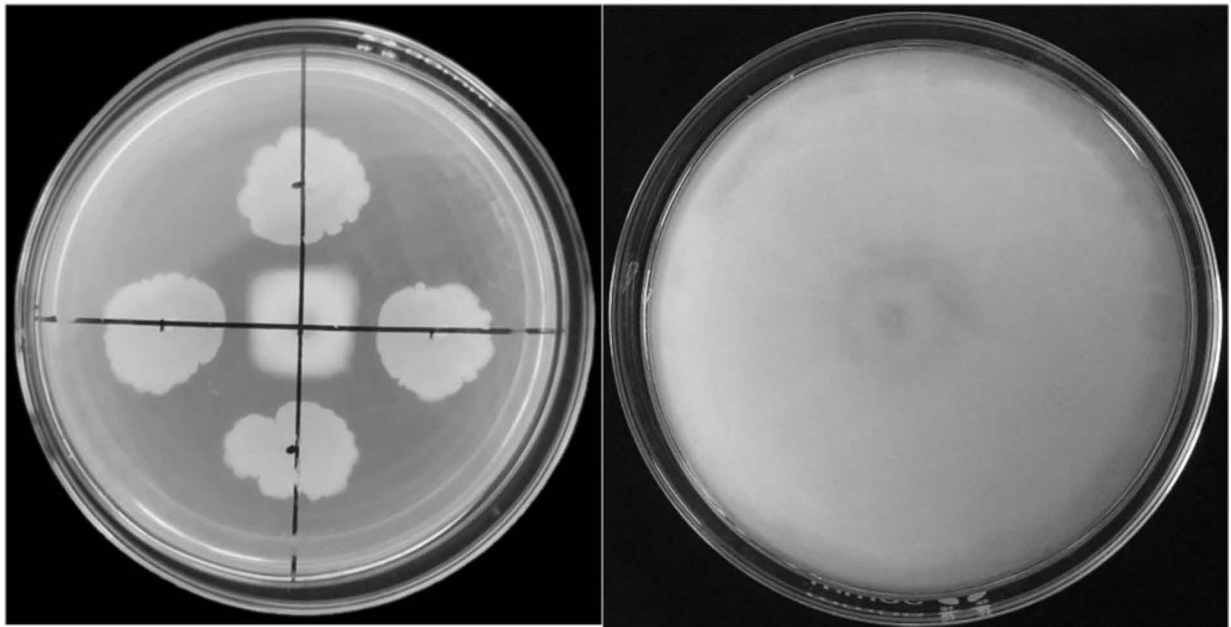


图4

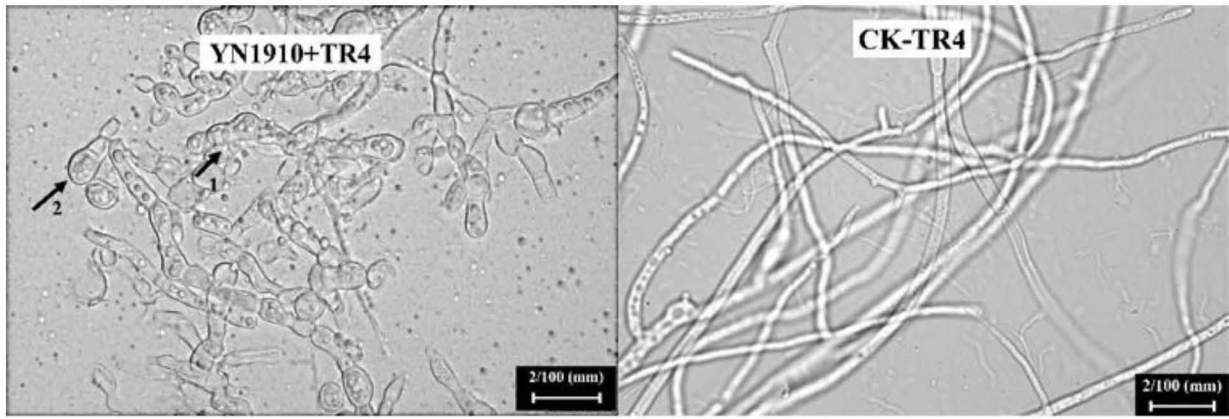


图5

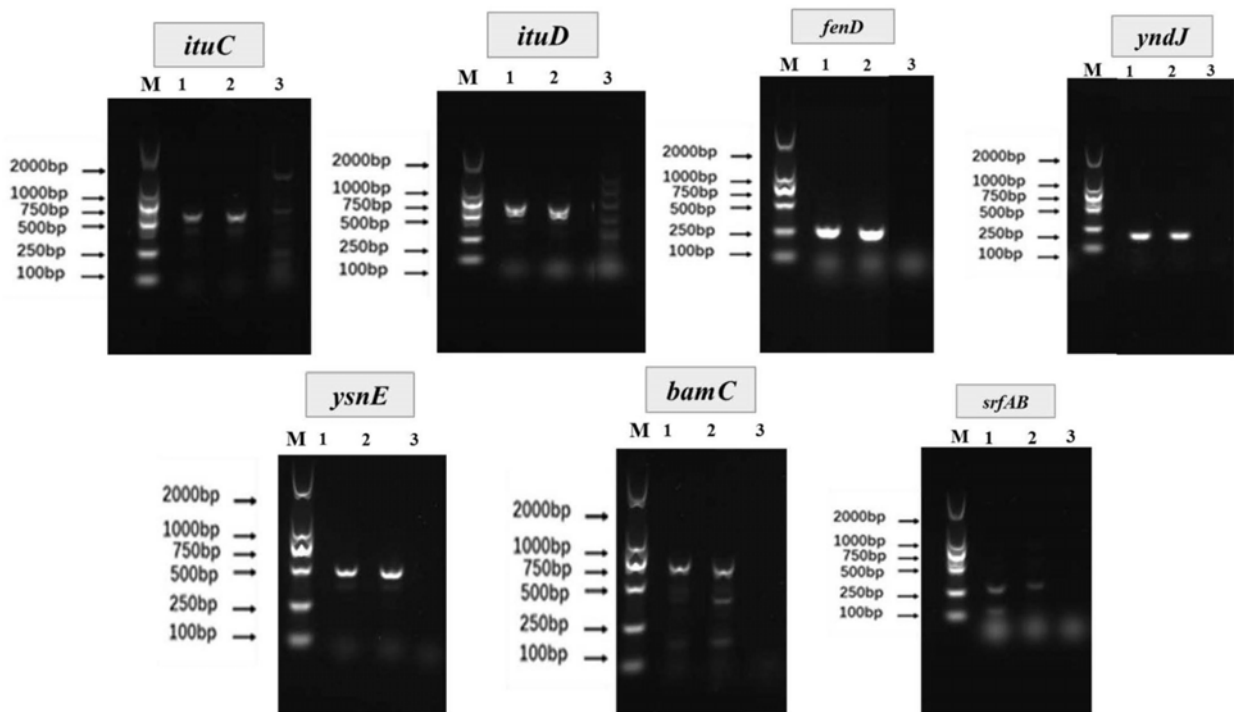


图6



图7



图8

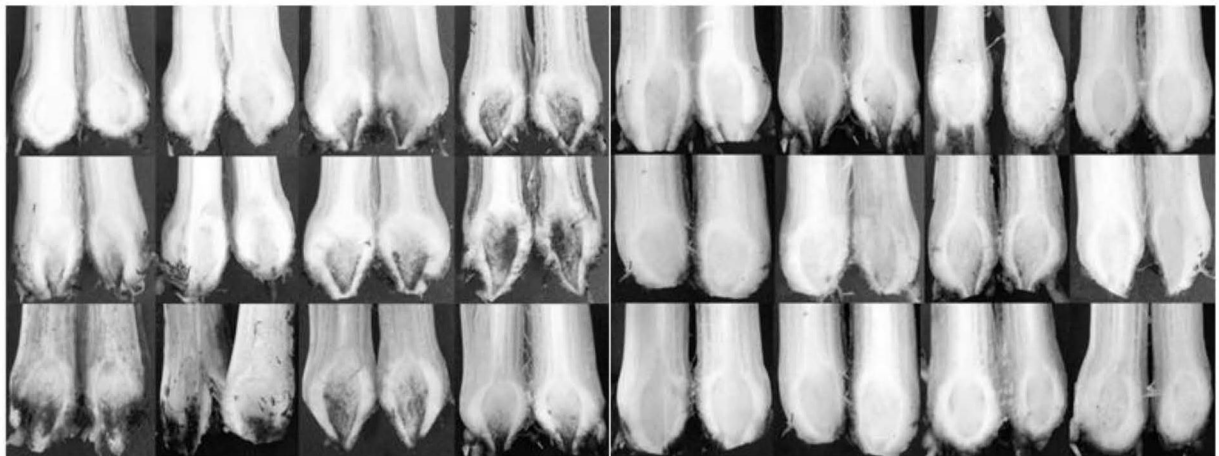


图9