



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112680382 A

(43) 申请公布日 2021.04.20

(21) 申请号 202110093588.X *C12P 9/00* (2006.01)
(22) 申请日 2021.01.22 *C05G 3/00* (2020.01)
(83) 生物保藏信息 *C05G 3/60* (2020.01)
CGMCC No.21318 2020.12.07 *A01N 63/25* (2020.01)
(71) 申请人 西北农林科技大学 *A01P 3/00* (2006.01)
地址 712100 陕西省西安市杨凌示范区邠
城路3号 *A01P 21/00* (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
(72) 发明人 王永红 他永全 闫志强 韩云飞
吴华 冯俊涛 马志卿
(74) 专利代理机构 西安恒泰知识产权代理事务
所 61216
代理人 孙雅静
(51) Int.Cl.
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 17/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一株贝莱斯芽孢杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 及其应用,该菌株已于2020年12月07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,保藏编号为CGMCC No.21318,保藏名称为贝莱斯芽孢杆菌*Bacillus velezensis* TYGF10-2F9。将其应用于农业生物防治领域,可形成生物膜在植物根际稳定定殖,可对12种植物病原真菌和卵菌产生较强且广谱的抑制作用,可产生IAA、铁载体等物质来促进植物生长。该贝莱斯芽孢杆菌发酵液对油菜菌核病盆栽防效高达80.99%;该贝莱斯芽孢杆菌菌悬液和发酵液对黄瓜枯萎盆栽防效均高达66.67%,且对黄瓜具有一定的促生作用,是一株性能优良的生防菌株,具有良好的开发应用前景。

1. 一株贝莱斯芽孢杆菌,其特征在于,贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 的保藏编号为CGMCC No.21318。

2. 权利要求1所述的贝莱斯芽孢杆菌用于制备植物抑菌剂的应用,或用于制备防治植物病原菌引起的植物病害药物的应用。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在於,所述的植物病原菌选自油菜菌核 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 病菌、水稻纹枯 (*Rhizoctonia solani*) 病菌、小麦赤霉 (*Fusarium graminearum*) 病菌、苹果轮纹 (*Botryospuaeria berengeriana*) 病菌、烟草赤星 (*Alterariaalternata*) 病菌、辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 病菌、西瓜枯萎 (*Fusarium oxysporum f.sp.niveum*) 病菌、黄瓜枯萎 (*Fusarium oxysporum.sp.cucumebrium Owen*) 病菌、草莓枯萎 (*Fusarium oxysporum f.sp.fragariae*) 病菌、番茄灰霉 (*Botrytis cinerea*) 病菌、苹果腐烂 (*Valsa mali Miyabe et Yamada*) 病菌和小麦全蚀 (*Gaeu-mannomyces graminsis (sacc.) Arx&Olivier Var tritici J.walker*) 病菌。

4. 权利要求1所述的贝莱斯芽孢杆菌用于制备植物定殖剂、植物生防剂、生物有机肥或植物促生剂的应用。

5. 一种制剂,其特征在於,所述的制剂为权利要求1所述的贝莱斯芽孢杆菌的菌悬液、发酵液、发酵产物或次生代谢产物。

6. 权利要求5所述的制剂用于制备植物抑菌剂的应用,或用于制备防治植物病原菌引起的植物病害药物的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在於,所述的植物病原菌选自油菜菌核 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 病菌、水稻纹枯 (*Rhizoctonia solani*) 病菌、小麦赤霉 (*Fusarium graminearum*) 病菌、苹果轮纹 (*Botryospuaeria berengeriana*) 病菌、烟草赤星 (*Alterariaalternata*) 病菌、辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 病菌、西瓜枯萎 (*Fusarium oxysporum f.sp.niveum*) 病菌、黄瓜枯萎 (*Fusarium oxysporum.sp.cucumebrium Owen*) 病菌、草莓枯萎 (*Fusarium oxysporum f.sp.fragariae*) 病菌、番茄灰霉 (*Botrytis cinerea*) 病菌、苹果腐烂 (*Valsa mali Miyabe et Yamada*) 病菌和小麦全蚀 (*Gaeu-mannomyces graminsis (sacc.) Arx&Olivier Var tritici J.walker*) 病菌。

8. 一种IAA的制备方法,其特征在於,采用权利要求1所述的贝莱斯芽孢杆菌制备IAA。

9. 一种铁载体的制备方法,其特征在於,采用权利要求1所述的贝莱斯芽孢杆菌制备铁载体。

一株贝莱斯芽孢杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于农业生物防治技术领域,具体涉及一株贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 及其应用。

背景技术

[0002] 植物病害对世界粮食生产及安全造成了严重的威胁。长期以来,化学农药和肥料的使用,使得环境污染、菌株抗药性以及土壤微生态失衡等问题日益加重。亟待挖掘可替代化学农药和肥料的微生物产品。尽管已有大量微生物产品的存在,但由于其在田间定殖力低、持效期短等现象,使得从根际、根内生等植物相关微生物群落中挖掘广谱、高效的微生物成为国内外学者的研究热点。

[0003] 芽孢杆菌是一类产芽孢的革兰氏阳性细菌,大部分芽孢杆菌具有抗菌谱广、生长迅速、易分离培养、抗逆性强和生物安全性高等优点,从而作为益生菌在农业、食品、工业、医学、冶金、林业、环保以及军事等方面被广泛研究。贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 作为芽孢杆菌中新发现的一个种,在自然界中广泛分布,可从海洋和河流沉积物、土壤、植株根际、植物组织中分离得到,其对人畜无害,对环境无污染,并且能产生对多种病原微生物有拮抗作用的次生代谢物。近年来,关于贝莱斯芽孢杆菌的研究主要集中在饲料、医药、纺织、水产、污水处理、植物保护等领域。作为一种新型生防微生物因子,贝莱斯芽孢杆菌在植物病害防控、促进植物生长等方面备受关注。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一株贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) TYGF10-2F9 及其应用。本发明提供的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) TYGF10-2F9,已于2020年12月07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,地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号),CGMCC No.21318

[0005] 一株贝莱斯芽孢杆菌,贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 的保藏编号为 CGMCC No.21318。

[0006] 本发明所述的贝莱斯芽孢杆菌用于制备植物抑菌剂的应用,或用于制备防治植物病原菌引起的植物病害药物的应用。

[0007] 可选的,所述的植物病原菌选自油菜菌核 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 病菌、水稻纹枯 (*Rhizoctonia solani*) 病菌、小麦赤霉 (*Fusarium graminearum*) 病菌、苹果轮纹 (*Botryosphaeria berengeriana*) 病菌、烟草赤星 (*Alteraria alternata*) 病菌、辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 病菌、西瓜枯萎 (*Fusarium oxysporum* f.sp.niveum) 病菌、黄瓜枯萎 (*Fusarium oxysporum*.sp.cucumebrium Owen) 病菌、草莓枯萎 (*Fusarium oxysporum* f.sp.fragariae) 病菌、番茄灰霉 (*Botrytis cinerea*) 病菌、苹果腐烂 (*Valsa mali* Miyabe etYamada) 病菌和小麦全蚀 (*Gaeumannomyces graminis* (sacc.) Arx&Olivier Var tritici J.walker) 病菌。

[0008] 本发明所述的贝莱斯芽孢杆菌用于制备植物定殖剂、植物生防剂、生物有机肥或植物促生剂的应用。

[0009] 一种制剂,其特征在于,所述的制剂为发明所述的贝莱斯芽孢杆菌的菌悬液、发酵液、发酵产物或次生代谢产物。

[0010] 本发明所述的制剂用于制备植物抑菌剂的应用,或用于制备防治植物病原菌引起的植物病害药物的应用。

[0011] 可选的,所述的植物病原菌选自油菜菌核 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 病菌、水稻纹枯 (*Rhizoctonia solani*) 病菌、小麦赤霉 (*Fusarium graminearum*) 病菌、苹果轮纹 (*Botryosphaeria berengeriana*) 病菌、烟草赤星 (*Alteraria alternata*) 病菌、辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 病菌、西瓜枯萎 (*Fusarium oxysporum f.sp.niveum*) 病菌、黄瓜枯萎 (*Fusarium oxysporum.sp.cucumebrium* Owen) 病菌、草莓枯萎 (*Fusarium oxysporum f.sp.fragariae*) 病菌、番茄灰霉 (*Botrytis cinerea*) 病菌、苹果腐烂 (*Valsa mali Miyabe et Yamada*) 病菌和小麦全蚀 (*Gaeumannomyces graminis (sacc.) Arx & Olivier var tritici J.walker*) 病菌。

[0012] 一种IAA的制备方法,采用本发明所述的贝莱斯芽孢杆菌制备IAA。

[0013] 一种铁载体的制备方法,采用本发明所述的贝莱斯芽孢杆菌制备铁载体。

[0014] 本发明的贝莱斯芽孢杆菌应用于农业生物防治领域,可形成生物膜在植物根际稳定定殖,可对12种植物病原真菌和卵菌产生较强且广谱的抑制作用,可产生IAA、铁载体等物质来促进植物生长。该贝莱斯芽孢杆菌发酵液对油菜菌核病盆栽防效高达80.99%;该贝莱斯芽孢杆菌菌悬液和发酵液对黄瓜枯萎盆栽防效均高达66.67%,且对黄瓜具有一定的促生作用,是一株性能优良的生防菌株,具有良好的开发应用前景。

附图说明

[0015] 附图是用来提供对本公开的进一步理解,并且构成说明书的一部分,与下面的具体实施方式一起用于解释本公开,但并不构成对本公开的限制。在附图中:

[0016] 图1是本发明实施例1提供的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) TYGF10-2F9 发育树;

[0017] 图2是本发明实施例2提供的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) TYGF10-2F9 对12株病原真菌的抑菌活性;A,G表示水稻纹枯;B,H表示小麦赤霉;C,I表示油菜菌核;D,J表示苹果轮纹;E,K表示烟草赤星;F,L表示辣椒疫霉;M,S表示西瓜枯萎;N,T表示黄瓜枯萎;O,U表示草莓枯萎;P,V表示番茄灰霉;W表示苹果腐烂;R,X表示小麦全蚀;

[0018] 图3是本发明实施例3提供的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) TYGF10-2F9 产IAA的标准曲线;

[0019] 图4是本发明实施例4提供的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) TYGF10-2F9 在不同培养基中生物膜的形成;A,B,C,D分别表示菌株TYGF10-2F9在培养基LBG、LBM、LBGM和LB中的生物膜;

[0020] 图5是本发明实施例5提供的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) TYGF10-2F9 对油菜菌核病的盆栽防效;

[0021] 图6是本发明实施例5提供的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) TYGF10-2F9

对油菜菌核的防效；

[0022] 图7是本发明实施例6提供的贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) TYGF10-2F9 对黄瓜枯萎病的盆栽防效。

具体实施方式

[0023] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0024] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径中得到。

[0025] 本发明中提到的植物定殖剂、植物生防剂、生物有机肥、植物促生剂等均为农业中常用的肥料或营养液等常用剂型。本发明的贝莱斯芽孢杆菌应用于农业生物防治领域,可形成生物膜在植物根际稳定定殖,可对12种植物病原真菌和卵菌产生较强且广谱的抑制作用,可产生IAA、铁载体等物质来促进植物生长。该贝莱斯芽孢杆菌发酵液对油菜菌核病盆栽防效高达80.99%;该贝莱斯芽孢杆菌菌悬液和发酵液对黄瓜枯萎盆栽防效均高达66.67%,且对黄瓜具有一定的促生作用,是一株性能优良的生防菌株,具有良好的开发应用前景。

[0026] 实施例1菌株TYGF10-2F9分离纯化及分子生物学鉴定

[0027] 称取10g小麦根际土壤加入200mL 0.01M无菌PBS缓冲液,在室温、180r/min条件下震荡30min得到根际土悬浮液,用无菌水梯度稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} ,用涂布棒均匀涂布在TYG培养基(Tryptone Yeast extract Glucose Medium, TYG)上,其组成为:胰蛋白胨1g、酵母提取物1g、葡萄糖0.5g、KCl 6.34g、NaCl 1.2g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25g、 K_2HPO_4 0.13g、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.22g、 K_2SO_4 0.17g、 Na_2SO_4 2.4g、 $NaHCO_3$ 0.5g、 Na_2CO_3 0.09g、FeEDTA 0.07g、琼脂15g、蒸馏水1000mL、PH=7.2-7.4;于28℃下恒温培养2d后挑取单菌落进行纯化培养。

[0028] DNA提取按照上海生工生物工程(上海)股份有限公司的柱式细菌DNA提取试剂盒的程序操作。选用细菌通用引物对:F27 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG-3', P1541 5'-AAG GAG GTG GTG ATC CAG CCG CA-3'。反应条件为:94℃变性45s,50℃退火45s,72℃延伸75s,50μL反应体系30个循环。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测,经克隆测序得到序列结果。所得到的16S rDNA全序列与从Genbank等数据库中获得的16S rDNA序列进行比对,通过Mega 6.0软件包进行系统发育树的构建。

[0029] 采用分子生物学方法对菌株TYGF10-2F9进行鉴定。菌株TYGF10-2F9的16S rDNA碱基序列测定结果如序列表所示,共测定菌株TYGF10-2F9的16S rDNA有1444个碱基。

	1	GGGGGGGCGTGCTATAATGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGC
	61	GGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA
	121	CCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCG
	181	GCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCA
[0030]	241	AGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
	301	CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGA
	361	GCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
	421	AAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT
	481	ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTA

541 AAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG
 601 TCATTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGT
 661 GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTG
 721 ACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG
 781 TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATT
 841 AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
 901 CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT
 [0031] 961 TGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGGCGAGGTGACAGGTGG
 1021 TGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAGCGCAA
 1081 CCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAC
 1141 CGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
 1201 GCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCACAAATCT
 1261 GTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATC
 1321 GCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACC
 1381 ACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTAGGAGCCAGCCCGCGAAGGG
 1441 TACC

[0032] 自菌株的基因组DNA中扩增获得片段大小为所得到的16S rDNA全序列与从Genbank数据库中获得16S rDNA序列进行比对后获取登录号为:TYGF10-2F9(MW314755)。系统发育树的构建:选取10株模式菌株,采用MEGA 6软件中的Neighbor-Joining方法进行系统发育分析,构建的系统发育树见图1所示。

[0033] 实施例2菌株TYGF10-2F9抑菌作用测定

[0034] 采用平板对峙法,对油菜菌核(*Sclerotinia sclerotiorum*)、水稻纹枯(*Rhizoctonia solani*)、小麦赤霉(*Fusarium graminearum*)、苹果轮纹(*Botryospuaeria berengeriana*)、烟草赤星(*Alteraria alternata*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)、西瓜枯萎(*Fusarium oxysporum f.sp.niveum*)、黄瓜枯萎(*Fusarium oxysporum.sp.cucumebrium Owen*)、草莓枯萎(*Fusarium oxysporum f.sp.fragariae*)、番茄灰霉(*Botrytis cinerea*)、苹果腐烂(*Valsa mali Miyabe et Yamada*)和小麦全蚀(*Gaeu-mannomyces graminis(sacc.)Arx&Olivier Var tritici J.walker*)共12株植物病原真菌的抑制作用进行测定。首先,以培养皿中心为中心点,在培养皿底部十字交叉划线,距离中心点2.5cm处接种已经在LB培养基上活化的菌株;然后,用5mm打孔器将已活化的植物病原真菌打孔后接种于PDA培养基平板中央,对培养皿进行封口、于28℃条件下培养至病原菌对照长到培养皿三分之二的时候进行病原菌半径及所形成透明圈宽度的统计。

[0035] 采用“平板对峙”法,以12种病原真菌为靶标,对菌株TYGF10-2F9抑菌谱进行评价。结果表明,菌株TYGF10-2F9对12种病原真菌具有广谱的抑制活性(图2)。其中,菌株TYGF10-2F9对苹果腐烂病原菌的抑制活性最高,抑制率为94.06%;对油菜菌核病原菌、番茄灰霉和小麦全蚀病原菌的抑制活性较为明显,抑制率分别为88.18%、85.24%和82.03%;水稻纹枯、苹果轮纹、烟草赤星、辣椒疫霉、西瓜枯萎、黄瓜枯萎和草莓枯萎病原菌的抑制率介于60.00%-70.00%之间;对小麦赤霉病原菌的抑制活性最小,抑制率为58.31%(表1及图2)。

[0036] 表1菌株TYGF10-2F9对12株病原真菌的抑制作用

病原真菌	CK	TYGF10-2F9		
		真菌半径(cm)	抑制率(%)	透明圈宽度(cm)
水稻纹枯	4.50±0.00	1.51±0.04	66.39±0.79	0.35±0.05
小麦赤霉	3.15±0.19	1.32±0.11	58.13±3.49	0.34±0.24
油菜菌核	4.13±0.21	0.49±0.23	88.18±5.53	1.33±0.63
苹果轮纹	3.88±0.32	1.30±0.08	66.55±2.04	0.66±0.17
烟草赤星	3.40±0.22	1.09±0.15	68.01±4.45	0.57±0.18
辣椒疫霉	1.83±2.11	1.27±0.06	65.17±1.77	0.59±0.06
西瓜枯萎	1.98±2.28	1.48±0.12	62.66±2.95	0.30±0.10
黄瓜枯萎	3.78±0.17	1.36±0.15	64.07±3.84	0.35±0.20
草莓枯萎	3.30±0.28	1.14±0.14	65.00±4.00	0.57±0.16
番茄灰霉	3.60±0.29	0.53±0.10	85.24±2.87	1.08±0.35
苹果腐烂	4.00±0.58	0.24±0.13	94.06±3.26	1.64±0.41
小麦全蚀	3.83±0.15	0.69±0.15	82.03±4.00	0.77±0.22

[0038] 实施例3菌株TYGF10-2F9促生指标测定

[0039] 首先将-80℃保存的菌株于LB培养基上进行划线,于28℃恒温箱中培养24h活化。然后将活化后的菌株接种一菌针于盛装有100mL LB液体培养基的250mL的锥形瓶中,同时在锥形瓶中添加1mL L-色氨酸,使其终浓度为100μg/mL,于28℃、180r/min条件下培养5d,每株菌进行2次生物学重复。取8mL菌株发酵液,于8000r/min、4℃条件下进行离心,吸取上清进行菌株IAA含量的定量测定。对于IAA含量的定量测定而言,吸取60μL上清于2mL离心管中,然后加入120μL Salkowski试剂于黑暗条件下进行显色,用紫外分光光度计测定530nm条件下各个处理的吸光度。同时,用梯度稀释的IAA溶液(50、10、5、2.5、1.25、0.625和0μg/mL)制作IAA含量与吸光度值的标准曲线,根据标准曲线对菌株产IAA能力进行评价。

[0040] 采用点接种法,将活化后的菌株于无机磷培养基((NH₄)₂SO₄ 0.5g,NaCl 0.3g,KCl 0.3g,MgSO₄·7H₂O 0.3g,Ca₃(PO₄)₂ 25g,FeSO₄·7H₂O 0.03g,MnSO₄·H₂O 0.03g,葡萄糖10g,PH 7.4-7.6)上,于28℃条件下恒温培养5d,根据菌株周围是否有透明圈产生及透明圈的大小来对菌株解无机磷能力进行评价。

[0041] 采用点接种法,将活化后的菌株接种到以3mM ACC为唯一氮源的DF培养基(葡萄糖2.0g,葡萄糖酸2.0g,柠檬酸2.0g,微量元素溶液(CaCl₂ 200mg、FeSO₄·7H₂O 200mg、H₃BO₃ 15mg、ZnSO₄·7H₂O 20mg、Na₂MoO₄ 10mg、KI 10mg、NaBr 10mg、MnCl₂ 10mg、COCl₂ 5mg、CuCl₂ 5mg、AlCl₃ 2mg、NiSO₄ 2mg、去离子水1,000mL)10mL、去离子水990mL)上,以0.2% (w/v) (NH₄)₂SO₄为唯一氮源的DF培养为阳性对照,以DF培养基为阴性对照。将接种后的平板于28℃条件下恒温培养5d,根据三种培养基上菌株的生长状况对菌株产ACC能力进行综合评价。

[0042] 采用点接种法,将活化菌株接种于铬天青培养基(CAS)上,接种后的平板置于28℃条件下培养7d后,根据菌落周围黄色晕圈的出现与否以及大小来对菌株产铁载体的能力进行评价。

[0043] 对分离得到的菌株TYGF10-2F9产IAA能力、解磷能力、产ACC能力和产铁载体能力等促生指标的测定。通过构建IAA标准曲线(图3),测定菌株TYGF10-2F9在100μg/mL条件下可产生5.97μg/mL的IAA;具有产铁载体的能力(表2),但不具有解磷、解钾、固氮和产ACC的能力(表2)。

[0044] 表2菌株TYGF10-2F9促生特性评价

Strain	IAA(μg/mL)	OP	IOP	K	N	ACC	Siderophores
TYGF10-2F9	5.97±1.75	-	-	-	-		+

[0046] 实施例4菌株TYGF10-2F9生物膜形成测定

[0047] 挑取单菌落接种于盛装有100mL LB液体培养基的250mL锥形瓶中,于160rpm/min、30℃条件下过夜培养。在16孔板中分别加入200μL LB、LBG(含有1%甘油(v/v))、LBM(含有0.1mM MnSO₄)和LBGM(含有1%甘油(v/v)和0.1mM MnSO₄)培养基,取2μL过夜培养的菌液轻轻滴加于不同培养基的液面上,16孔板于30℃条件下静置培养3d,观察生物膜形成情况,并记录。

[0048] 菌株TYGF10-2F9的生物膜测定结果表明:该菌株在LBGM培养基中可形成明显的生物膜,培养基LBG次之,LBG和LB培养基中无明显生物膜的形成(图4)。

[0049] 实施例5菌株TYGF10-2F9对油菜菌核病的盆栽防效测定

[0050] 首先将-80℃保存的菌株于LB固体培养基(胰蛋白胨10g、酵母浸粉5g、NaCl 10g、琼脂20g、蒸馏水1000mL、PH=7.2-7.4)上进行划线,于28℃恒温箱中培养24h活化。然后将活化后的菌株接种一菌针于盛装有100mL LB液体培养基(胰蛋白胨10g、酵母浸粉5g、NaCl 10g、蒸馏水1000mL、PH=7.2-7.4)的250mL的锥形瓶中。于160rpm/min、28℃条件下振荡培养48h,将发酵液在10000g条件下离心5min,上清液即为去菌体发酵液,菌体用等量无菌水重悬得到菌悬液。菌悬液和发酵液保存于4℃冰箱备用。

[0051] 分别用小喷壶将菌株发酵液和菌悬液(10⁸CFU/mL)均匀喷洒在油菜幼苗叶片表面,稍干后接种直径为3mm的油菜菌核病菌的菌丝块,以喷洒500μg/mL多菌灵的处理为药剂对照。每处理重复2盆,每盆1株幼苗,每株幼苗选择大小相近的2个叶片,每个叶片中央用灭菌后的注射器针头刺伤后再进行接种。接种后,20℃保湿培养3d后测定病斑直径,计算抑制率。

[0052] 抑制率=(对照病斑直径-处理病斑直径)/对照病斑直径×100%

[0053] 对具有广谱活性的菌株TYGF10-2F9进行油菜菌核病的盆栽防效评价。结果表明,菌株TYGF10-2F9菌体对油菜菌核无显著活性(IR=2.69%),发酵液对油菜菌核防效(IR=80.99%)显著高于药剂对照多菌灵的防效(IR=64.91%)(图5和图6)。

[0054] 实施例6菌株TYGF10-2F9对黄瓜枯萎病的盆栽防效测定

[0055] 首先将-80℃保存的菌株于LB固体培养基(胰蛋白胨10g、酵母浸粉5g、NaCl 10g、琼脂20g、蒸馏水1000mL、PH=7.2-7.4)上进行划线,于28℃恒温箱中培养24h活化。然后将活化后的菌株接种一菌针于盛装有100mL LB液体培养基(胰蛋白胨10g、酵母浸粉5g、NaCl 10g、蒸馏水1000mL、PH=7.2-7.4)的250mL的锥形瓶中。于160rpm/min、28℃条件下振荡培养48h,将发酵液在10000g条件下离心5min,上清液即为去菌体发酵液,菌体用等量无菌水重悬得到菌悬液。菌悬液和发酵液保存于4℃冰箱备用。

[0056] 将黄瓜种子播种在育苗盘中进行育苗,育苗一周后,移栽到苗盆中,每盆一株幼苗。移栽后,待黄瓜生长至2叶一心期,采用灌根法进行防效测定试验。试验处理包括:1)只接种25mL黄瓜枯萎和等量无菌水(F0C);2)同时接种25mL黄瓜枯萎和等量的菌悬液(10⁸CFU/mL)(F9-C-F0C);3)同时接种25mL黄瓜枯萎和等量的无菌体发酵液(F9-F-F0C);4)只接种菌悬液(10⁸CFU/mL)(F9-C);5)只接种无菌体发酵液(F9-F);6)同时接种25mL黄瓜枯萎和等量的多菌灵药剂(500μg/mL)(Car.)和7)接种25mL无菌水(CK)。每个处理重复4次。接种一个月后进行病情指数、株高、鲜重的统计,并根据病情指数计算防效。

[0057] 黄瓜枯萎病情指数:

- [0058] 0级:无病症;
- [0059] 1级:植株1/4以下的叶面表现出萎焉症状,茎基部无症状,植株正常生长;
- [0060] 2级:植株1/4-1/2叶面表现出萎焉症状,茎基部1/2以下出现褐变,植株矮化;
- [0061] 3级:植株1/2以上叶面表现出萎焉症状,茎基部1/2以上出现褐变,植株明显矮化;
- [0062] 4级:全株萎焉死亡。

$$[0063] \text{防效(IR)\%} = \frac{\sum(\text{病情指数} \times \text{发病株数})}{\text{最高病情指数} \times \text{总株数}} \times 100$$

[0064] 表3菌株TYGF10-2F9对黄瓜枯萎病的防病促生效果

菌株名称	病情指数	防效(%)	叶绿素含量	株高(cm)	茎粗(cm)	鲜重(g)	干重(g)
FOC	0.6	-	28.77±6.33	23.82±10.85	4.57±0.32	8.14±4.38	0.95
Car.	0.3	50.00	23.06±3.15	44.00±12.47	4.96±0.36	14.46±5.43	1.81
[0065] F9-C-FOC	0.2	66.67	19.58±2.59	51.45±7.32	5.01±0.33	16.57±1.48	1.98
F9-F-FOC	0.2	66.67	23.18±2.89	54.5±17.84	5.28±0.39	19.76±6.89	2.34
F9-J	-	-	24.29±2.92	64.13±10.6	4.94±0.21	21.67±3.57	2.49
F9-F	-	-	28.68±2.06	67.25±3.48	4.63±0.47	21.27±1.87	2.37
空白	-	-	26.60±4.39	64.45±7.36	4.35±0.35	17.62±2.17	2.12

[0066] 菌株TYGF10-2F9菌体和发酵液对黄瓜枯萎病具有显著的防效,防效分别为66.67%和66.67%,均高于药剂对照多菌灵的防效(50.00%) (表3,图7)。此外,与空白对照相比,菌株TYGF10-2F9发酵液处理叶绿素含量(28.68),显著高于对照叶绿素含量(26.60),而菌体处理较对照低;菌株TYGF10-2F9发酵液处理黄瓜植株株高(67.25cm)显著高于对照株高(64.45cm),而菌体处理与对照无显著差异(64.13cm);菌株TYGF10-2F9菌体和发酵液处理黄瓜植株茎粗均高于空白对照黄瓜植株茎粗(4.35cm),分别为4.94cm和4.63cm;菌株TYGF10-2F9菌体和发酵液处理黄瓜植株鲜重显著高于空白对照黄瓜植株鲜重(17.62g),分别为21.67g和21.27g;菌株TYGF10-2F9菌体和发酵液处理黄瓜植株干重均高于空白对照黄瓜植株的干重(2.12g),分别为2.49g和2.37g。可见菌株TYGF10-2F9菌体和发酵液对黄瓜植株具有一定的促生作用(表3)。

[0067] 以上结合附图详细描述了本公开的优选实施方式,但是,本公开并不限于上述实施方式中的具体细节,在本公开的技术构思范围内,可以对本公开的技术方案进行多种简单变型,这些简单变型均属于本公开的保护范围。

[0068] 另外需要说明的是,在上述具体实施方式中所描述的各个具体技术特征,在不矛盾的情况下,可以通过任何合适的方式进行组合,为了避免不必要的重复,本公开对各种可能的组合方式不再另行说明。

[0069] 此外,本公开的各种不同的实施方式之间也可以进行任意组合,只要其不违背本公开的思想,其同样应当视为本公开所公开的内容。

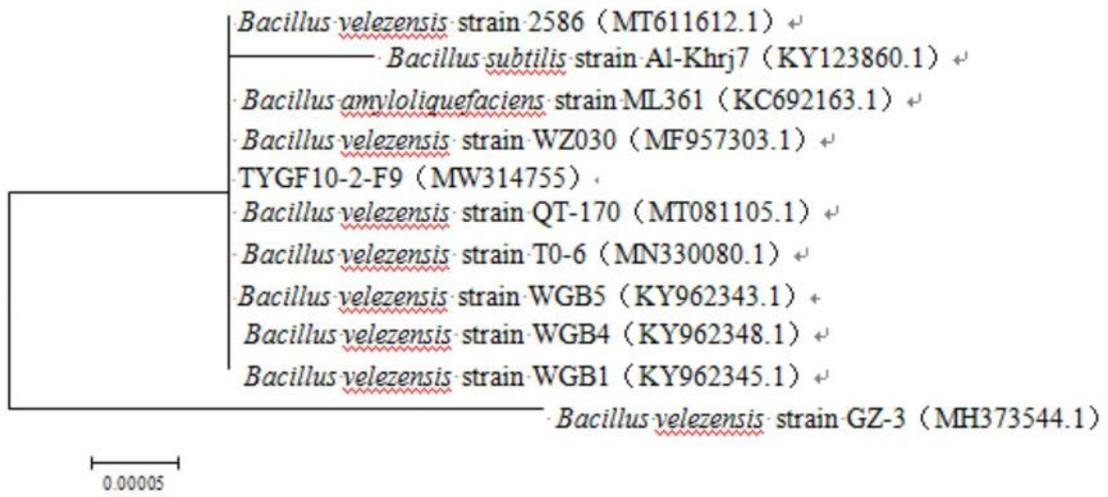


图1

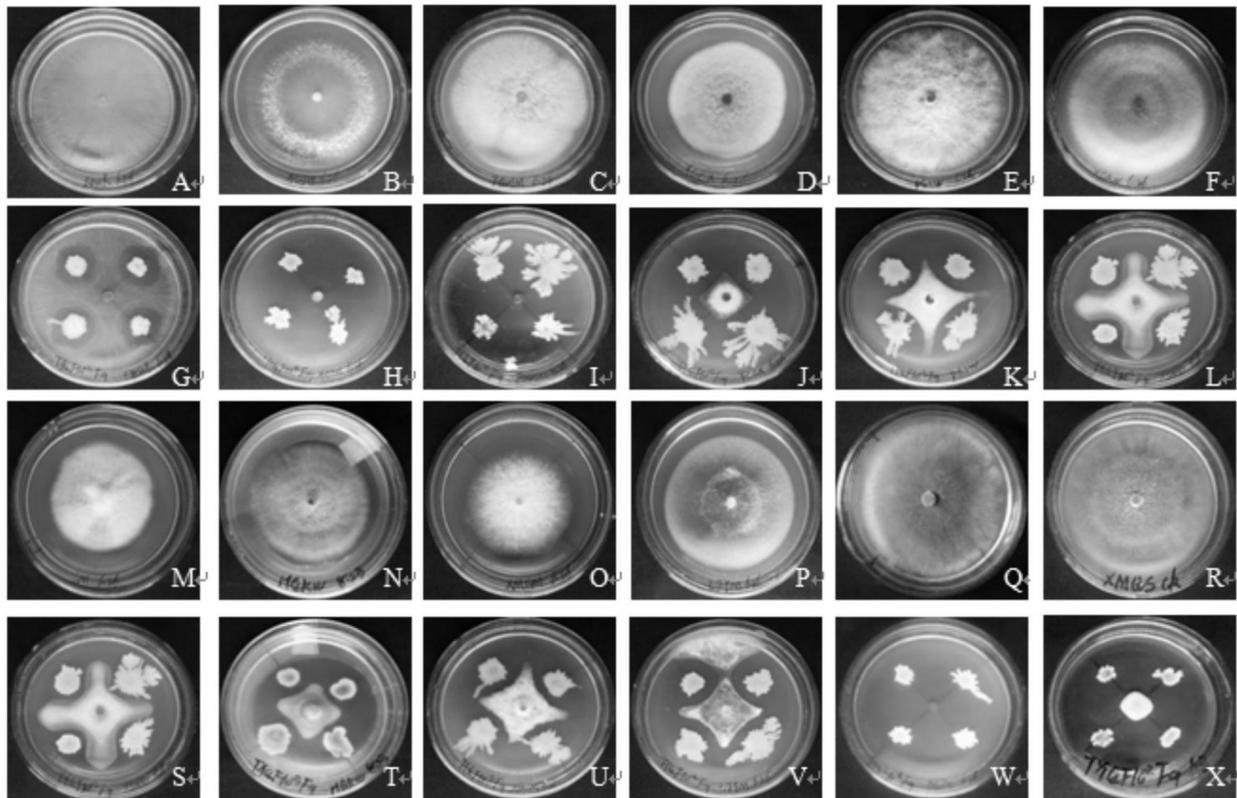


图2

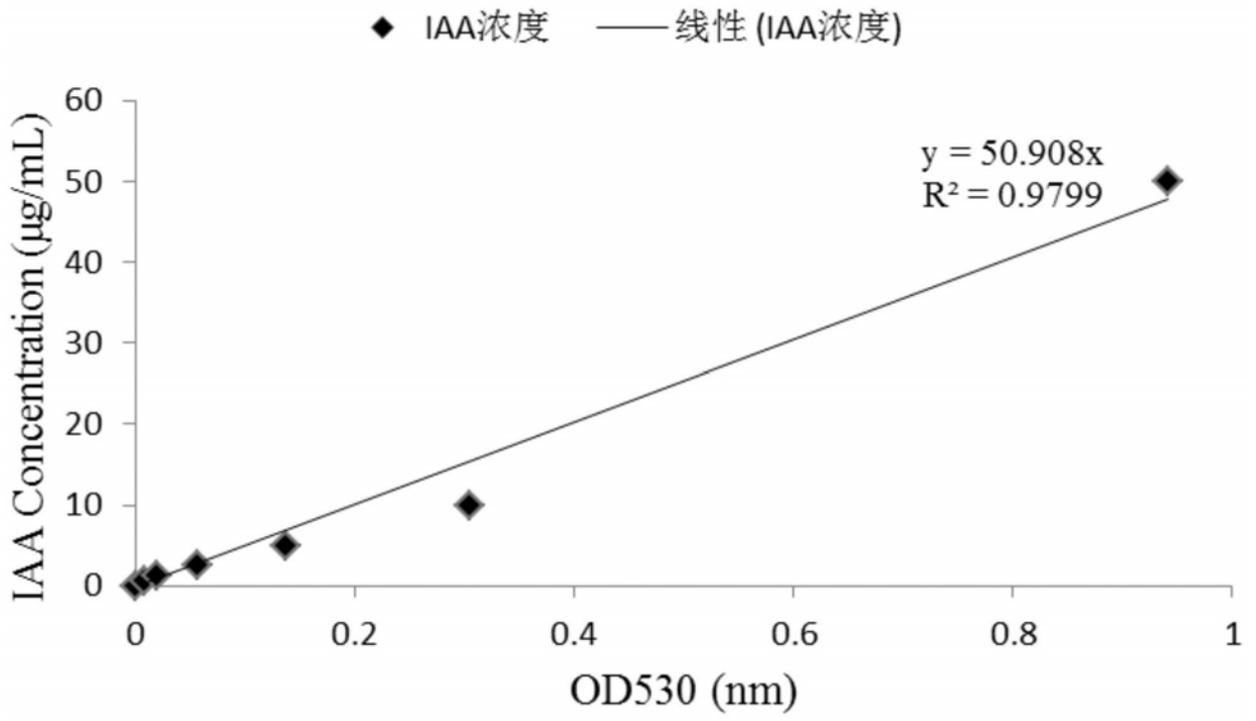


图3

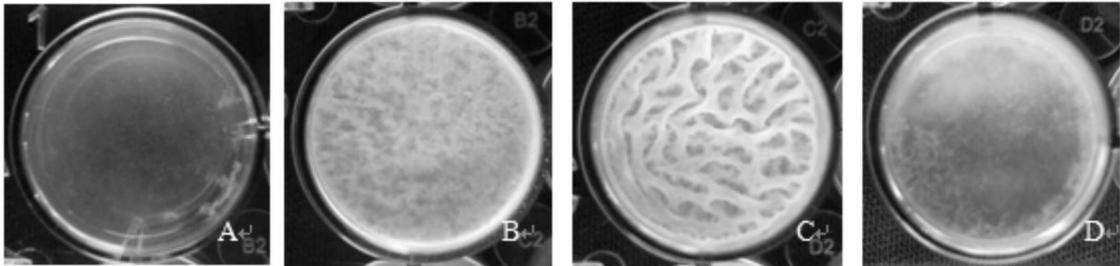


图4

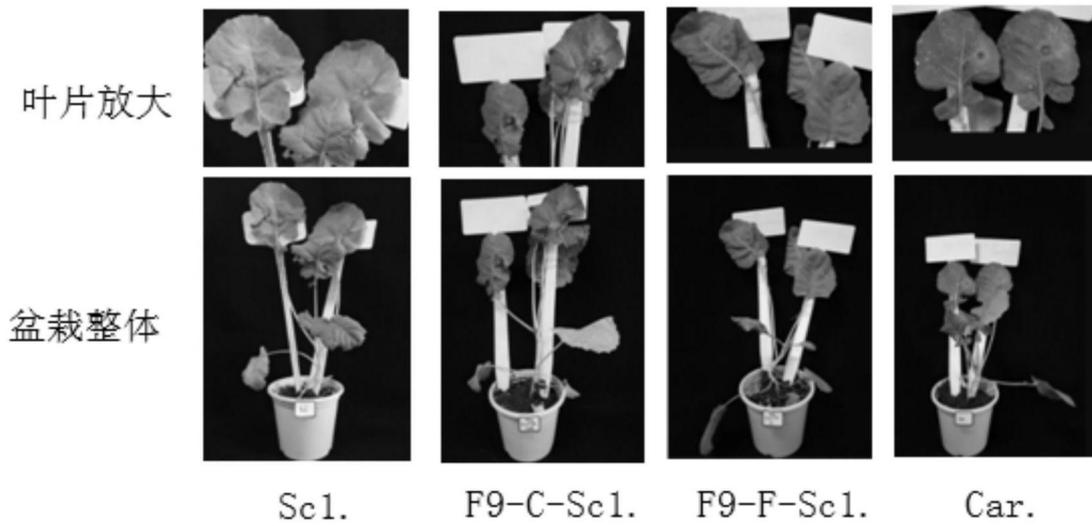


图5

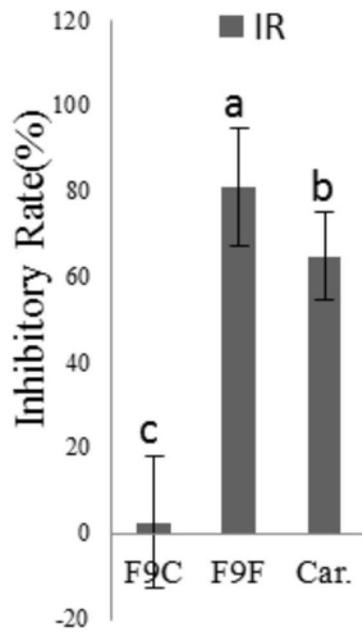


图6

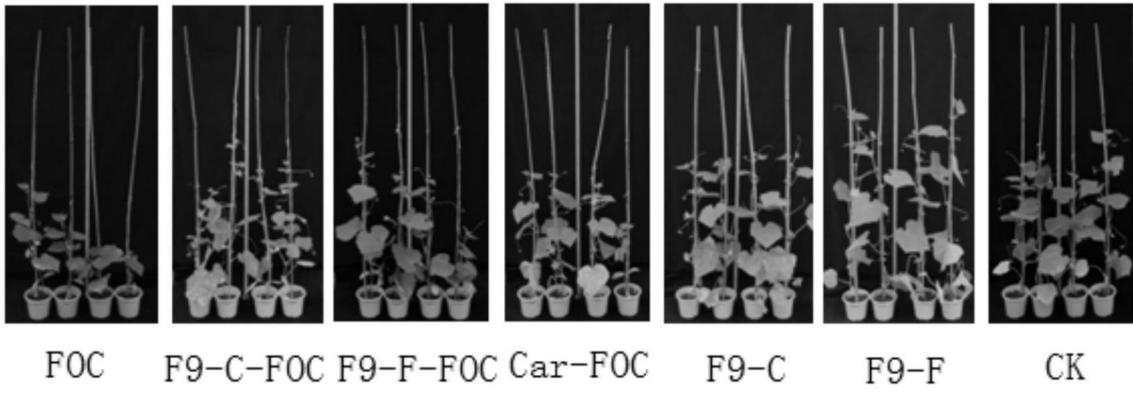


图7