



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107760639 A

(43)申请公布日 2018.03.06

(21)申请号 201711266953.2

(22)申请日 2017.12.05

(83)生物保藏信息

CGMCC NO. 14450 2017.07.21

(71)申请人 中国热带农业科学院香料饮料研究所

地址 571533 海南省万宁市兴隆热带植物园中国热带农业科学院香料饮料研究所

(72)发明人 高圣风 桑利伟 刘爱勤 苟亚峰
孙世伟 王政 孟倩倩

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 张柳 赵青朵

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A01N 63/00(2006.01)

A01N 63/02(2006.01)

A01P 3/00(2006.01)

C12R 1/125(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54)发明名称

菌株及其应用

(57)摘要

本发明涉及微生物领域,特别涉及菌株及其应用。提供了预防和/或治疗胡椒瘟病的菌株。平板拮抗试验结果显示,枯草芽孢杆菌VR19对胡椒瘟病菌(*Phytophthora capsici*)的菌丝生长具有良好的抑制效果。温室盆栽试验结果显示,枯草芽孢杆菌VR19灌根处理后,处理植株的胡椒瘟病发病率及平均病斑面积均有显著降低,防效达68%。遗传转化试验结果显示,枯草芽孢杆菌VR19使用配套的遗传转化方法后,能够被稳定高效的遗传转化,转化效率可达200-300CFU/ μ g。

1. 菌株,其特征在于,其保藏编号为CGMCC NO.14450。
2. 根据权利要求1所述的菌株在预防和/或治疗胡椒瘟病的制剂中的应用。
3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述菌株的有效浓度为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ CFU/ml,每株根部浇灌3-5L,每亩浇灌300~500L。
4. 如权利要求1所述菌株的发酵方法,其特征在于,将如权利要求1所述的菌株接种于LB培养基,于35~39℃、180~200rpm条件下震荡培养12~16h,制备种子菌;将所述种子菌以3%比例接种于Landy培养基,于28~32℃、150~180rpm条件下发酵培养36~40h。
5. 如权利要求4所述的发酵方法获得的发酵液。
6. 根据权利要求5所述的发酵液在预防和/或治疗胡椒瘟病的制剂中的应用。
7. 一种预防和/或治疗胡椒瘟病的制剂,其特征在于,包括如权利要求1所述的菌株或如权利要求4所述的发酵液及可接受的辅料。
8. 一种预防和/或治疗胡椒瘟病的方法,其特征在于,将如权利要求1所述的菌株或如权利要求4所述的发酵液浇灌于胡椒根基部,活菌浓度为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ CFU/ml;每株根部浇灌3-5L,每亩浇灌300~500L,每3个月浇灌1次。
9. 一种如权利要求1所述菌株的遗传转化方法,其特征在于,将如权利要求1所述菌株依次接种于LB培养基、SPI培养基、SPII培养基培养,收集培养液依次与EGTA、转化用DNA混合培养,离心,收集上清液重悬菌体,涂选择平板。
10. 根据权利要求9所述的遗传转化方法,其特征在于,包括如下步骤:
 - 步骤1、将如权利要求1所述菌株接种于LB培养基,200rpm37℃震荡培养10~12h;
 - 步骤2、取250μl步骤1获得的培养液转接至SPI培养基中,200rpm37℃摇床培养5.5~6.0h;
 - 步骤3、取2.8ml步骤2获得的培养液转接至SPII培养基中,于100rpm37℃震荡培养1.5h;
 - 步骤4、取步骤3获得的培养液与250μl100×EGTA混合,于100rpm37℃震荡培养10min;
 - 步骤5、取步骤4获得的培养液0.5ml与转化用DNA按1μg混合,于37℃100rpm震荡培养1~2h;
 - 步骤6、50000~10000g离心1~2min,弃除2/3的上清液后重悬菌体,涂选择平板,37℃过夜培养12~16h。

菌株及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物领域,特别涉及菌株及其应用。

背景技术

[0002] 胡椒瘟病是胡椒上的首要病害。由辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 引起,主要为害胡椒主蔓基部造成植株迅速萎蔫死亡,传播迅速,是一种毁灭性很强的病害。该病害在我国胡椒种植区普遍发生,可造成50%以上的经济损失,严重时可以导致整块胡椒园毁灭。目前,防治胡椒瘟病主要依赖化学农药。但是,化学药剂的大量施用则存在抗药性产生、农药残留和环境破坏等隐患,不符合当前的绿色生态发展的战略。

[0003] 利用生防芽孢杆菌防治胡椒瘟病,具有广谱性好、药效持久、对环境友好等特点,是极佳的绿色防控胡椒瘟病方法之一。目前国内利用生防芽孢杆菌防治植物病害的应用已经十分普遍。在我国目前已登记的135个微生物杀菌剂产品中芽孢杆菌类产品数量的高达83个,但是尚未有防治胡椒瘟病的微生物杀菌剂产品。

[0004] 遗传操作是构建高效基因工程菌株和研究其防病机理的必须手段,对生防菌的开发利用极为重要。但是,天然的野生型芽孢杆菌普遍存在着遗传操作难题,大大限制了人们对生防芽孢杆菌的机理研究和改造利用。目前国内外通常以“*Bacillus subtilis* 168”菌株为对象进行遗传操作及机理研究;但是该菌株于1835年被德国科学家埃伦伯格发现,已经在近200年的人工培养过程中被逐步驯化,一些野生性状出现缺陷突变。近年来,一些野生型芽孢杆菌陆续被报道可以进行遗传操作,例如,“*B. subtilis* 69”、“*B. amyloliquefaciens* FZB42”、“*B. amyloliquefaciens* C06”等。但是这些菌株的依然遗传操作困难,其遗传转化效率均远低于“*B. subtilis* 168”。容易遗传操作的野生型生防芽孢杆菌极为欠缺。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提供一种菌株及其应用。本发明的目的共有2点:1) 生物防治胡椒产业上危害最大的胡椒瘟病,通过平板拮抗试验和盆栽生防试验,筛选得到对胡椒瘟病防治效果良好的枯草芽孢杆菌VR19,防治效果大于70%;2) 建立枯草芽孢杆菌VR19高效遗传操作方法,针对该菌株特性建立了专门的遗传操作方法,遗传转化效率大于200CFU/ μ g。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了菌株,其保藏编号为CGMCC NO.14450。

[0008] 本发明还提供了上述菌株在预防和/或治疗胡椒瘟病的制剂中的应用。

[0009] 在本发明的一些具体实施方案中,所述菌株的有效浓度为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ CFU/ml,每株胡椒根部浇灌3-5L,每亩浇灌300~500L。

[0010] 本发明还提供了上述菌株的发酵方法,其特征在于,将如权利要求1所述的菌株接种于LB培养基,于35~39℃、180~200rpm条件下震荡培养12~16h,制备种子菌;将所述种子菌以3%比例接种于Landy培养基,于28~32℃、150~180rpm条件下发酵培养36~40h。

- [0011] 本发明还提供了上述发酵方法获得的发酵液。
- [0012] 本发明还提供了上述发酵液在预防和/或治疗胡椒瘟病的制剂中的应用。
- [0013] 本发明还提供了一种预防和/或治疗胡椒瘟病的制剂,包括上述菌株或上述发酵液及可接受的辅料。
- [0014] 本发明还提供了一种预防和/或治疗胡椒瘟病的方法,将上述菌株或上述发酵液浇灌于胡椒根基部,活菌浓度为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ CFU/ml;每株胡椒根部浇灌3-5L,每亩浇灌300~500L,每3个月浇灌1次。
- [0015] 本发明还提供了一种上述菌株的遗传转化方法,将上述菌株依次接种于LB培养基、SPI培养基、SPII培养基培养,收集培养液依次与EGTA、转化用DNA混合培养,离心,收集上清液重悬菌体,涂选择平板。
- [0016] 在本发明的一些具体实施方案中,所述遗传转化方法包括如下步骤:
- [0017] 步骤1、将所述菌株接种于LB培养基,200rpm37℃震荡培养10~12h;
- [0018] 步骤2、取250 μ l步骤1获得的培养液转接至SPI培养基中,200rpm37℃摇床培养5.5~6.0h;
- [0019] 步骤3、取2.8ml步骤2获得的培养液转接至SPII培养基中,于100rpm37℃震荡培养1.5h;
- [0020] 步骤4、取步骤3获得的培养液与250 μ l100 \times EGTA混合,于100rpm37℃震荡培养10min;
- [0021] 步骤5、取步骤4获得的培养液0.5ml与转化用DNA1 μ g混合,于37℃100rpm震荡培养1~2h;
- [0022] 步骤6、50000~10000g离心1~2min,弃除2/3的上清液后重悬菌体,涂选择平板,37℃过夜培养12~16h。
- [0023] 本发明提供了菌株,其保藏编号为CGMCC NO.14450。生物材料:VR19;分类命名:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),已于2017年7月21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。
- [0024] 本发明的优点和积极效果表现在:提供了胡椒瘟病筛选的生防菌株。
- [0025] 平板拮抗试验结果显示,枯草芽孢杆菌VR19对胡椒瘟病菌(*Phytophthora capsici*)的菌丝生长具有良好的抑制效果(图1)。
- [0026] 温室盆栽试验结果显示,枯草芽孢杆菌VR19灌根处理后,处理植株的胡椒瘟病发病率及平均病斑面积均有显著降低,防效达68%(图2、表1)。
- [0027] 遗传转化试验结果显示,枯草芽孢杆菌VR19使用配套的遗传转化方法后,能够被稳定高效的遗传转化,转化效率可达200-300CFU/ μ g(图3、表2)。
- [0028] 该生防菌株分离自热带植物香草兰根系,具有高效抑制胡椒瘟病菌的能力,使用后不会产生化学农药残留等一系列问题,椒农可以少用甚至不用化学农药,有利于胡椒绿色有机产品打造,有助于胡椒产业的健康发展及生态环境保护;同时,针对该菌株建立了高效遗传转化操作方法,有助于人们对天然生防枯草芽孢杆菌分子机理研究及高效基因工程菌株构建利用。
- [0029] 生物保藏说明
- [0030] 生物材料:VR19;分类命名:枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),已于2017年7月

21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,保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,菌种保藏号为CGMCC NO.14450。

附图说明

[0031] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0032] 图1示胡椒瘟病菌在不接种(A)和接种生防菌VR19(B)情况下菌落生长情况;

[0033] 图2示清水对照组叶片(A)和生防菌处理组叶片(B)上平均病斑大小;

[0034] 图3示生防菌VR19转入绿色荧光蛋白编码基因(gfp)后在显微镜下被激发明亮的绿色荧光。

具体实施方式

[0035] 本发明公开了一种菌株及其应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0036] 生防菌发酵方法:菌种接种于LB培养基中,在35~39℃、180~200rpm条件下震荡培养12~16h制备出种子菌。种子菌以3%比例接种于Landy培养基中,在28~32℃、150~180rpm条件下发酵培养36~40h形成发酵液。

[0037] 生防菌发酵液使用方法:将发酵液稀释10倍形成活菌浓度为 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ CFU/ml的生防菌处理液,,灌根于胡椒根基部及其周围土壤上。每3个月灌根处理1次。

[0038] 生防菌遗传转化方法:

[0039] 1、将待转化菌株接种于LB培养基中,200rpm37℃震荡培养10~12h。

[0040] 2、取步骤1获得的培养液250 μ l转接至SPI培养基中,200rpm37℃摇床培养5.5~6.0h。

[0041] 3、取步骤2获得的培养液2.8ml转接至SPII培养基中,于100rpm37℃震荡培养1.5h。

[0042] 4、取步骤3获得的培养液加250 μ l100 \times EGTA,于100rpm37℃震荡培养10min。

[0043] 5、取步骤4获得的培养液分装于1.5ml离心管,500 μ l/管,并向离心管中加入1 μ g的转化用DNA,轻轻混匀后于37℃100rpm震荡培养1~2h。

[0044] 6、取步骤5获得的培养液经50000~10000g离心1~2min,弃除大部分上清液,仅保留150~200 μ l上清液重悬菌体,涂选择平板,37℃过夜培养12~16h后观察转化子生长情况。

[0045] 培养基及其配制方法:

[0046] 1.LB培养基:5g酵母粉,10g胰蛋白胨,10g氯化钠,15g琼脂粉(仅做固体培养基时添加),加去离子水定容1000ml,融化混匀后分装于三角瓶中(20ml/瓶),121℃灭菌20min。

[0047] 2.Landy培养基:10g葡萄糖,5g L-谷氨酸,1g磷酸二氢钾,0.5g七水合硫酸镁,0.5g氯化钾,2 μ g L-苯丙氨酸,5 μ g硫酸锰,0.16 μ g五水合硫酸铜,0.15 μ g七水合硫酸亚铁,加去离子水定容至1000ml,用NaOH调节pH值至7.0,121℃灭菌20min。

[0048] 3. PDA培养基: 200g马铃薯切成边长约1cm的小块, 放入800ml去离子水中煮沸15min, 用双层纱布过滤后留取滤液, 20g葡萄糖, 20g琼脂粉, 加去离子水定容至1000ml, 121℃灭菌20min。

[0049] 3. SP基础培养基: 2g硫酸铵, 14g三水合磷酸氢二钾, 6g磷酸二氢钾, 1g柠檬酸三钠, 加去离子水定容至1000ml, 用NaOH调节pH值至7.2, 分装于三角瓶中(24ml/瓶), 121℃灭菌20min。

[0050] 4. SPI培养基: 在SP基础培养基添加5%MgSO₄·7H₂O、100×CAYE、50%葡萄糖等3种附加试剂各250μl/瓶。

[0051] 5. SPII培养基: 在SPI培养基中添加50mMCaCl₂、250mMMgCl₂等2种附加试剂各250μl/瓶。

[0052] 6. 附加试剂及其配制方法

[0053] i. 5%MgSO₄·7H₂O: 5g七水合硫酸镁, 加去离子水定容至100ml, 121℃灭菌20min。

[0054] ii. 100×CAYE: 2g酪蛋白水解物, 10g酵母粉, 加去离子水定容至100ml, 121℃灭菌20min。

[0055] iii. 50%葡萄糖: 50g葡萄糖, 加去离子水定容至100ml, 115℃灭菌20min。

[0056] iv. 50mMCaCl₂: 0.74g二水合氯化钙, 加去离子定容到100ml, 121℃灭菌20min。

[0057] v. 250mMMgCl₂: 5.08g六水合氯化镁, 加去离子定容到100ml, 121℃灭菌20min。

[0058] vi. 10mMEGTA: 0.38g乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸, 加去离子定容到100ml, 用NaOH调节pH值至8.0, 121℃灭菌20min。

[0059] 本发明提供的菌株及其应用中所用原料及试剂均可由市场购得。

[0060] 下面结合实施例, 进一步阐述本发明:

[0061] 实施例1

[0062] 一株防治胡椒瘟病的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) VR19, 分离自海南省琼海市香草兰根系。

[0063] 生防菌分离方法: 采集新鲜的香草兰根, 冲洗掉土壤后用无菌研钵磨碎, 加无菌水稀释10000倍, 取100μl涂布PDA平板, 在30℃环境中培养12h, 挑取单菌落在新PDA平板上划线纯化, 再次挑取单菌落接种在PDA培养基上备用。

[0064] 生防菌筛选方法: 菌株先后通过“室内平板拮抗试验”和“温室盆栽苗生防试验”(分别见实施例2和3), 最终筛选出对胡椒瘟病均有良好防治效果的生防菌株。

[0065] 生防菌处理液制备:

[0066] 将菌种接种于LB培养基中, 在37℃ 200rpm条件下震荡培养12小时制备种子菌。种子菌以3%比例接种于Landy培养基中, 在30℃ 180rpm条件下发酵36h形成发酵液。发酵液的活菌浓度约为10⁸CFU/ml, 使用前用无菌水稀释10倍配置成浓度约为1×10⁷~5×10⁷CFU/ml的生防菌处理液。

[0067] 实施例2 试验室平板拮抗试验

[0068] 胡椒瘟病菌(*Phytophthora capsici*, 桑利伟等, 2011, 海南省胡椒瘟病病原鉴定及发生规律)接种在PDA培养基上在26℃条件下培养5d, 用灭过菌的打孔器将菌落打成直径为0.5cm的圆形菌丝块, 将VR19菌丝块接种到PDA平板中央, 接种点周围放置4个直径为0.5cm的无菌滤纸片, 每个滤纸片上接种生防菌处理液5μl, 将平板放入26℃恒温箱中培养

7d后观察结果。对照组平板的所有条件均相同,仅将生防菌处理液替换为无菌水。

[0069] 结果发现,对照组在PDA平板上胡椒瘟病菌生长迅速,菌丝布满整个平板,菌丝密集、菌落厚实;而生防菌接种的平板上胡椒瘟病菌的菌落被生防菌限定在中央区域无法向外扩展,菌落小、菌丝稀疏、菌落单薄,说明生防菌VR19对胡椒瘟病菌具有良好的抑制生长效果。

[0070] 实施例3 温室盆栽苗生防试验

[0071] 在胡椒苗1月龄和4月龄时期分别用 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ CFU/ml生防菌VR19处理液灌根处理,每盆50ml,分别以清水处理和25%甲霜灵500倍液的胡椒苗作为对照。胡椒瘟病菌在PDA培养基上26℃条件下培养5d,用打孔器打成直径约0.5cm的菌丝块备用。在第2次生防菌处理24h后用大头针将胡椒苗第3和第4片真叶中央刺透,在伤口上面接种菌丝块并用脱脂棉保湿。病害接种后,每天监测植株发病情况,在接种7d后统计胡椒苗发病率并利用植物图像分析仪统计病斑面积。病情严重度分级标准:0级,病斑面积 $< 0.5 \text{ cm}^2$;1级, $0.5 \text{ cm}^2 \leq$ 病斑面积 $< 1.0 \text{ cm}^2$;2级, $1.0 \text{ cm}^2 \leq$ 病斑面积 $< 1.5 \text{ cm}^2$;以此类推,每增加 0.5 cm^2 上升1级。病情指数 $= \Sigma$ (各级病叶数 \times 该病级级值)/(调查叶总数 \times 最高病级值) $\times 100$ 。防治效果(%) $=$ (对照病指-处理病指)/对照病指 $\times 100\%$ 。

[0072] 结果显示,以清水处理作对照,甲霜灵处理组和生防菌处理组对胡椒瘟病的防效为60.3%和68%,(图2,表1)。生防菌对胡椒瘟病的防效好于常用药剂甲霜灵,说明VR19处理对胡椒瘟病具有良好的防治效果。

[0073] 表1 生防菌VR19处理对胡椒瘟病的防治效果

[0074]

处理	平均病斑大小(cm^2)	发病率(%)	病情指数	防效(%)
灌根	1.07	37.15	20	68
甲霜灵	1.32	40.67	24.81	60.3
清水	3.09	89.12	62.5	-

[0075] 实施例4 利用配套转化技术进行遗传转化试验

[0076] 将质粒pAD43-25宿主菌ECE166(*Escherichia coli*,购买自美国枯草芽孢杆菌保藏库)接种在含氨苄青霉素 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的LB培养基中,在200rpm 37°C 条件下培养12h,采用“OMEGA质粒小提试剂盒”按照说明书步骤提取质粒,质粒浓度经NanoDrop2000超微量分光光度计检测浓度 $\geq 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ 后保藏于 4°C 冰箱备用。

[0077] 根据生防菌VR19特性设计了该菌株遗传转化操作方法,具体如下:将待生防菌接种于LB中,200rpm 37°C 震荡培养10~12h;取 $250 \mu\text{l}$ 转接至至SPI培养基中,200rpm 37°C 摇床培养5.5~6.0h;取2.8ml转接至SPII培养基中,于100rpm 37°C 震荡培养1.5h;加 $250 \mu\text{l}$ $100 \times$ EGTA,于100rpm 37°C 震荡培养10min;分装与1.5ml离心管, $500 \mu\text{l}/\text{管}$,并向管中加入约 $1 \mu\text{g}$ 的pAD43-25质粒,轻轻混匀后于 37°C 100rpm摇床培养1~2h; $50000 \sim 10000 \text{ g}$ 离心1~2min,弃除大部分上清液,仅保留 $150 \sim 200 \mu\text{l}$ 上清液重悬菌体,涂含氯霉素 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ LB平板, 37°C 过夜培养12~16h后挑取转化子。

[0078] 按照该方法分别对本专利菌株VR19、VX1R02、Z、69和168等5株枯草芽孢杆菌(菌株特征及来源见表2)进行遗传转化试验,转化子接种到含氯霉素 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ LB培养基中, 37°C 200r/min条件下震荡培养12h,在荧光显微镜下进行绿色荧光检测,并统计成功的转化子个

数。该试验重复3次。

[0079] 表2 生防菌转化效率表

[0080]

菌株 (<i>B. subtilis</i>)	转化效率 (CFU/ μ g)				菌株特征及来源
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	
VR19	237	263	315	271.67	野生型, 本专利菌株
VX1R02	0	0	0	0	野生型, (高圣凤等, 2016, 香草兰生防细菌的筛选、分子鉴定及其抑菌机制的初步研究)
Z	0	0	0	0	野生型, (桑利伟等, 2017, 防治胡椒瘟病生物农药筛选及其盆栽药效试验)
69	1	16	0	5.67	可遗传操作, 野生型, (朱文静等, 2011, 芽孢杆菌对大豆根腐病防治效果研究)
168	189	272	224	228.33	遗传操作研究最多的菌株, 驯化型, 1835年由艾伦伯格分离鉴定, 因长期人工培养

[0081]

					存在一些基因缺陷 (Belda et al. 2013, An updated metabolic view of the <i>Bacillus subtilis</i> 168 genome)
--	--	--	--	--	--

[0082] 结果显示,5株枯草芽孢杆菌中生防菌VR19转化效率最高,每微克DNA获得的转化子数可达271.67个;国内外遗传操作研究最多的菌株168的转化效率次之,为228.33CFU/ μ g;被报道可遗传操作的菌株69转化效率仅为5.67CFU/ μ g;从本单位菌种库中随机挑选的VR02和Z菌株均未能成功转化(图3、表2)。说明,使用该遗传转化方法,生防菌VR19能够被稳定高效的遗传转化。

[0083] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

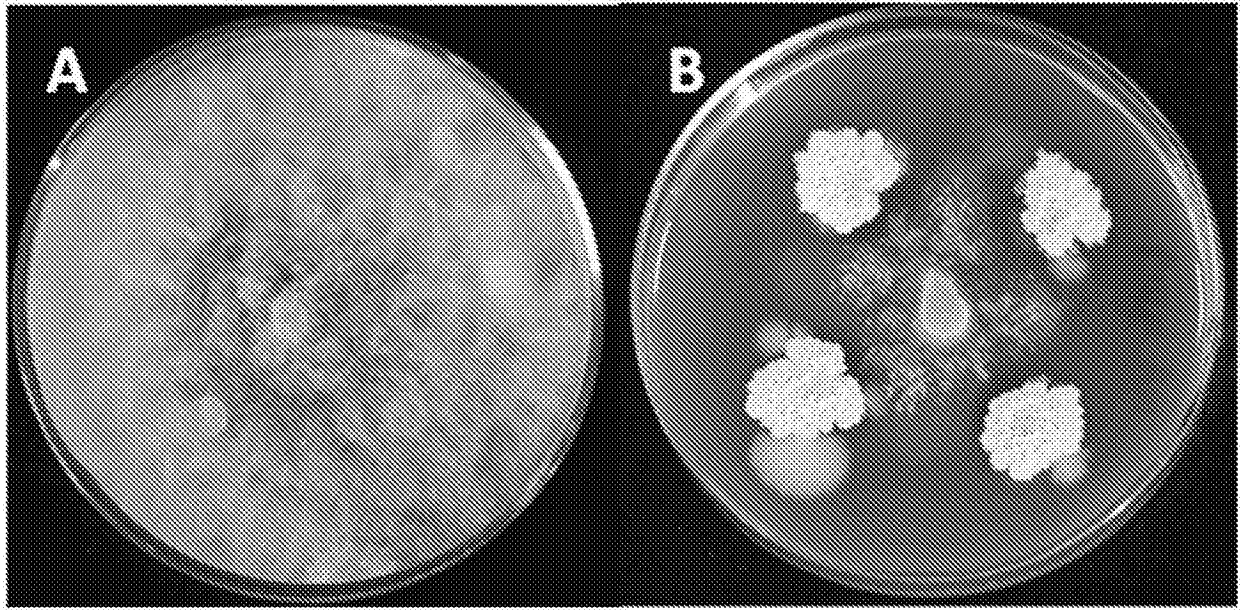


图1

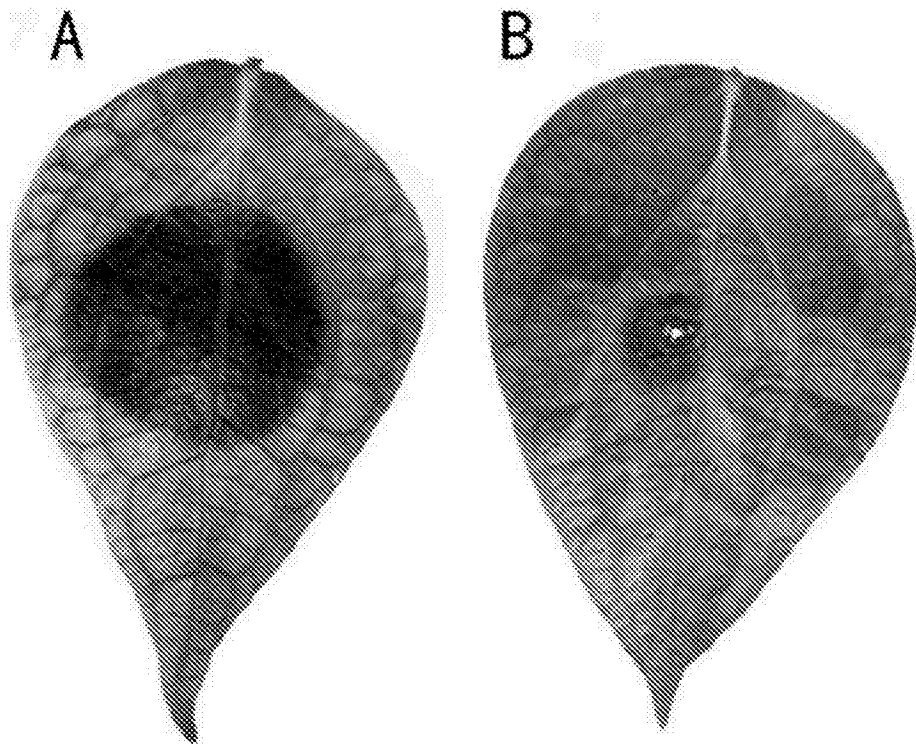


图2

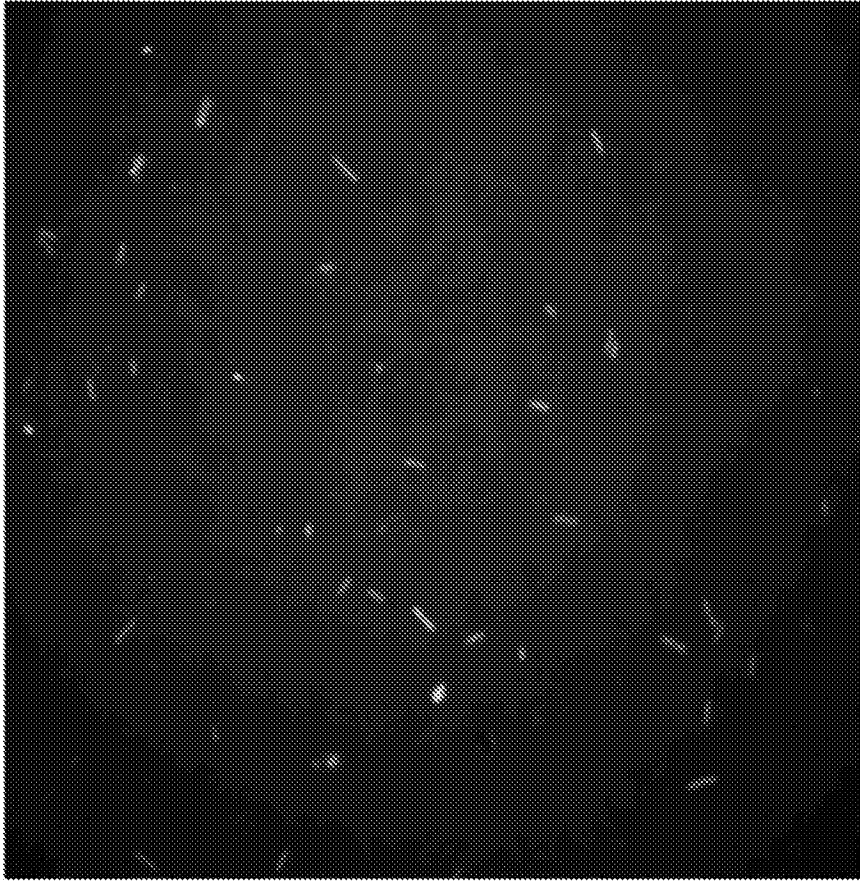


图3