



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102286383 A

(43) 申请公布日 2011.12.21

(21) 申请号 201110262789.4

(22) 申请日 2011.09.06

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 5067 2011.07.22

(71) 申请人 青岛农业大学

地址 266109 山东省青岛市城阳区长城路
700号

申请人 青岛瀚普生物科技有限公司

(72) 发明人 咸洪泉 颜艳伟 崔德杰 王大伟
柳新伟

(74) 专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有
限公司 37101

代理人 崔滨生

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C05F 11/08 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

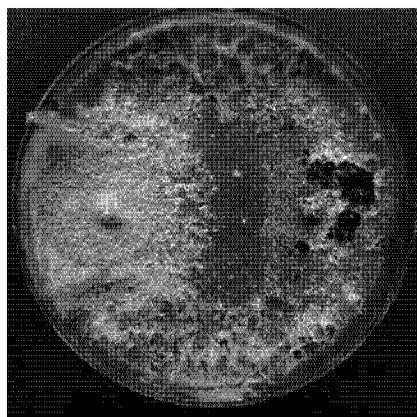
权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 5 页

(54) 发明名称

一种黄色篮状菌及其在防治植物病原菌中的应用

(57) 摘要

一种黄色篮状菌及其在防治植物病原菌中的应用。本发明提供了一种黄色篮状菌,还涉及它在抑制多种病原菌方面的应用。所述黄色篮状菌 qw12 的保藏编号是 CGMCC5067,所述黄色篮状菌菌落圆形,质地絮状兼绒状或絮状,菌落正面黄色;分生孢子梗帚状枝,孢子球形;原基近圆柱状,大而弯曲;裸囊壳、球形或近球形,子囊球形,子囊孢子球形或近球形,单细胞。本发明提供的拮抗菌能有效抑制杨树腐烂病菌、立枯丝核菌、玉米纹枯病菌、玉米弯孢叶斑病菌、苹果炭疽病菌、小麦赤霉病菌、烟草赤星病菌、板栗疫病菌和烟草炭疽病菌等植物病原菌的生长,可以有效防治植物病害,并且可减少化学农药的用量及其土壤中的累积,也有利于我国经济作物的质量和产量的提高,经济效益和社会效益十分显著。



1. 一种黄色篮状菌 qw12,其保藏编号是 :CGMCC 5067。
2. 根据权利要求 1 所述的一种黄色篮状菌,其特征在于,所述黄色篮状菌菌落圆形,边缘整齐,质地絮状兼绒状或絮状,菌落正面黄色,背面中心橙黄色,周围黄色,分生孢子梗发生于气生菌丝,帚状枝,孢子球形;裸囊壳,球形或近球形;原基近圆柱状,大而弯曲;子囊球形,内含 8 个子囊孢子;子囊孢子球形或近球形,透明至黄色,单细胞。
3. 根据权利要求 1 所述的黄色篮状菌制备的生物肥料。
4. 根据权利要求 1 所述的黄色篮状菌在防治植物病原菌中的应用。
5. 根据权利要求 4 所述的黄色篮状菌在防治植物病原菌中的应用,其特征在于,所述植物为花生、番茄、杨树、玉米、苹果、小麦、烟草和板栗。
6. 根据权利要求 4 所述的黄色篮状菌在防治植物病原菌中的应用,其特征在于,所述病原菌包括:花生网斑病菌、番茄早疫病菌、杨树腐烂病菌、立枯丝核菌、玉米纹枯病菌、玉米弯孢叶斑病菌、苹果炭疽病菌、苹果腐烂病菌、苹果轮纹病菌、小麦赤霉病菌、烟草赤星病菌、板栗疫病菌和烟草炭疽病原菌。
7. 根据权利要求 4 所述的黄色篮状菌在防治植物病原菌中的应用,其特征在于,所述黄色篮状菌对病原菌的抑制率在 43%-94%。
8. 根据权利要求 4 所述的黄色篮状菌在防治植物病原菌中的应用,其特征在于,黄色篮状菌有效活菌数为 $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ cfu/ 克。

一种黄色篮状菌及其在防治植物病原菌中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物和生物防治领域,尤其涉及一种黄色篮状菌及其在防治植物病原菌的应用。

背景技术

[0002] 目前,控制植物病害的一般方法是使用化学农药,然而,长期使用化学农药会导致病原菌产生抗药性而降低化学药剂的防病效果,同时长期使用化学药剂会造成农药残留超标和环境污染。生物防治是控制植物病害的一种新途径,它主要是利用生防菌与植物病原微生物之间的拮抗作用,抑制植物病原菌的生长。花生是我国主要的经济作物,其产量及质量关系着国计民生。近年来由于对花生的需求增加,耕地面积不足导致花生连作的现象普遍发生,花生又是不耐连作的作物之一。花生连作后病害加重、产量下降。目前,生产中急需一种有效、安全、环保的控制花生等植物病害的新技术。

发明内容

[0003] 针对现有技术中化学农药防治所存在的环境污染和病害发生严重等问题,本发明的目的是提供一种可有效防治多种作物病原菌的黄色篮状菌,还涉及它在抑制多种病原菌方面的应用。本发明所述黄色篮状菌分离自连作4年花生根际土壤。使用本发明所述生防菌防治作物病害,可以减少化学农药的用量及其在土壤中的累积,防止环境污染,有利于提高作物的质量和产量,经济效益和社会效益十分显著。

[0004] 为实现上述发明目的,本发明采用下述技术方案予以实现:

[0005] 本发明提供了一种黄色篮状菌 qw12,其保藏编号是:CGMCC 5067。

[0006] 所述黄色篮状菌菌落圆形,边缘整齐,质地絮状兼绒状或絮状,菌落正面黄色,背面中心橙黄色,周围黄色,分生孢子梗发生于气生菌丝,帚状枝,孢子球形。所述黄色篮状菌子囊果是裸囊壳,其包被由不同程度疏松的菌丝交织而组成,球形或近球形;原基近圆柱状、大而弯曲;子囊球形,内含8个子囊孢子;子囊孢子球形或近球形,透明至黄色,单细胞。

[0007] 本发明还提供了所述黄色篮状菌制备的生物肥料。

[0008] 还提供了所述黄色篮状菌在防治植物病原菌中的应用。

[0009] 对技术方案的进一步改进:所述植物为花生、番茄、杨树、玉米、苹果、小麦、烟草和板栗。

[0010] 对技术方案的进一步改进:花生网斑病菌、番茄早疫病菌、杨树腐烂病菌、立枯丝核菌、玉米纹枯病菌、玉米弯孢叶斑病菌、苹果炭疽病菌、苹果腐烂病菌、苹果轮纹病菌、小麦赤霉病菌、烟草赤星病菌、板栗疫病菌和烟草炭疽病原菌。

[0011] 对技术方案的进一步改进:所述黄色篮状菌对病原菌的抑制率在43% -94%。

[0012] 对技术方案的进一步改进:黄色篮状菌有效活菌数为 $1 \times 10^8 - 1 \times 10^9$ cfu/克。

[0013] 与现有技术相比,本发明的优点和积极效果是:本发明提供的拮抗菌能有效抑制杨树腐烂病菌、立枯丝核菌、玉米纹枯病菌、玉米弯孢叶斑病菌、苹果炭疽病菌、小麦赤霉病

菌、烟草赤星病菌、板栗疫病菌和烟草炭疽病菌的生长,使用拮抗菌为有效成分的菌剂可以有效防治植物病害,并且可以减少化学农药的用量和其在土壤中的累积,对于防止环境污染极为重要,同时,也有利于提高我国花生等作物的质量和产量,经济效益和社会效益十分显著。

附图说明

- [0014] 图 1 表明本发明中黄色篮状菌对杨树腐烂病菌的抑制作用。
[0015] 图 2 表明本发明中黄色篮状菌对立枯丝核菌的抑制作用。
[0016] 图 3 表明本发明中黄色篮状菌对玉米纹枯病菌的抑制作用。
[0017] 图 4 表明本发明中黄色篮状菌对玉米弯孢叶斑病菌的抑制作用。
[0018] 图 5 表明本发明中黄色篮状菌对苹果炭疽病菌的抑制作用。
[0019] 图 6 表明本发明中黄色篮状菌对小麦赤霉病菌的抑制作用。
[0020] 图 7 表明本发明中黄色篮状菌对烟草赤星病菌的抑制作用。
[0021] 图 8 表明本发明中黄色篮状菌对板栗疫病菌的抑制作用。
[0022] 图 9 表明本发明中黄色篮状菌对烟草炭疽病菌的抑制作用。
[0023] 图 10 表明本发明中黄色篮状菌缠绕于立枯丝核菌丝。
[0024] 图 11 表明本发明中黄色篮状菌使烟草炭疽病菌菌丝细胞原生质浓缩,细胞空胞化。
[0025] 图 12 表明本发明中黄色篮状菌使小麦赤霉病菌菌丝细胞空胞化。
[0026] 图 13 表明本发明中黄色篮状菌使烟草赤星病菌菌丝变形,细胞空胞化。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图和具体实施方式对本发明的技术方案作进一步详细的说明。

[0028] 实施例 1:拮抗菌的分离

[0029] 研究发现山东省莱西市连作 4 年后花生根际土壤与连作 2 年和 7 年花生根际土壤相比,植物病原菌种类和数量显著减少,花生连作障碍明显减轻,产量和质量提高,采用土壤稀释分离法对山东省莱西市连作 4 年花生根际土壤进行分离。本发明所述黄蓝状菌即是从连作 4 年花生根际土壤中分离得到,通过将分离物单孢纯化,分别与常见植物病原菌在 PDA 平板上两点对峙接种,进行平板拮抗试验,最终筛选得到。

[0030] 实施例 2、拮抗菌的鉴定

[0031] 1、拮抗菌的形态学鉴定

[0032] 实验所用培养基如下:

[0033] (1) 查氏琼脂 (CA):硝酸钠 3.0g、磷酸氢二钾 1.0g、氯化钾 0.5g、七水硫酸镁 0.5g、七水硫酸亚铁 0.01g、蔗糖 30g、琼脂 15g、蒸馏水 1000mL,加热使其溶解,最后定容到 1000mL,121℃灭菌 15min。

[0034] (2) 查氏酵母膏琼脂 (CYA):查氏浓储液 10mL、磷酸氢二钾 1.0g、酵母膏 5g、蔗糖 30g、琼脂 15g、蒸馏水 1000mL,加热使其溶解,最后定容到 1000mL,121℃灭菌 15min。

[0035] 查氏浓储液:硝酸钠 30g、氯化钾 5g、七水硫酸镁 5g、七水硫酸亚铁 0.1g、水 100mL,加热使其溶解,最后定容到 100mL。

[0036] (3) 啤酒麦芽汁琼脂 (WA) : 啤酒麦芽汁加水调至 10 波美度后再加 2% 的琼脂, 121℃ 灭菌 15min。

[0037] (4) 马铃薯 - 葡萄糖琼脂 (PDA) : 取去皮马铃薯 200g, 切成小块, 加水 1000mL, 煮沸 10min, 纱布过滤, 加 20g 琼脂、20g 葡萄糖, 再加热使其融化, 最后定容到 1000mL, 121℃ 灭菌 20min。

[0038] 将筛选到的菌株接种到 PDA 平板上, 置于 28℃ 恒温恒湿培养箱中倒置培养, 观察菌株生长情况。菌落圆形, 质地絮状兼绒状或絮状, 分生孢子梗发生于气生菌丝, 帚状枝, 孢子球形。子囊果是裸囊壳, 其包被由不同程度疏松的菌丝交织而组成, 球形或近球形; 原基近圆柱状、大而弯曲, 子囊球形, 内含 8 个子囊孢子; 子囊孢子球形或近球形, 透明至黄色, 单细胞。

[0039] 将筛选到的黄色蓝状菌菌株 qw12 进行菌种保藏, 保藏单位: 中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC); 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; 保藏日期: 2011 年 7 月 22 日; 黄色蓝状菌菌株 qw12 保藏编号为: CGMCC No. 5067; 黄色蓝状菌菌株的分类命名为: 黄色蓝状菌 *Talaromyces flavus*。

[0040] 2、拮抗菌的分子鉴定

[0041] 本实例根据拮抗菌的 ITS 序列来对其进行分子鉴定。采用 CTAB 法提取菌株的 DNA。以菌株的 DNA 为模板, ITS1 为: 5' -TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (SEQ ID No :2) 和 ITS4 为: 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (SEQ ID No :3) 为引物扩增菌株的 ITS 序列。扩增产物用胶回收试剂盒回收纯化后, 连接转化, 选取阳性克隆送往北京诺赛基因公司进行测序。通过与 GenBank 中已有的 ITS 序列进行 Blast 相似性比较确定菌株的种类。结合菌株的形态学特征和 ITS 比对结果, 最终将菌株确定为黄色篮状菌。

[0042] GenBank 登陆号: JN602366, 序列如下 (SEQ ID No :1) :

| | | | | | |
|--------|------------|------------|------------|------------|------------|
| [0043] | TCCGTAGGTG | AACCTGCGGA | AGGATCATTA | CCGAGTGCGG | GCCCTCGCGG |
| [0044] | CCCAACCTCC | CACCCTTGTC | TCCTATACAC | CTGTTGCTTT | GGCGGGCCCA |
| [0045] | CCGGGGCCAC | CTGGTCGCCG | GGGGACGCAC | GTCCCCGGGC | CCGCGCCCCG |
| [0046] | CGAAGCGCGC | TGTGAACCCT | GATGAAGATG | GGCTGTCTGA | GTACTATGAA |
| [0047] | AATTGTCAAA | ACTTTCAACA | ATGGATCTCT | TGGTTCCGGC | ATCGATGAAG |
| [0048] | AACGCAGCGA | AATGCGATAA | GTAATGTGAA | TTGCAGAATT | CCGTGAATCA |
| [0049] | TCGAATCTTT | GAACGCACAT | TGCGCCCCCT | GGCATTCCGG | GGGGCATGCC |
| [0050] | TGTCCGAGCG | TCATTTCTGC | CCTCAAGCAC | GGCTTGTGTG | TTGGGTGTGG |
| [0051] | TCCCCCGGG | GACCTGCCCC | AAAGGCAGCG | GCGACGTCCG | TCTGGTCCTC |
| [0052] | GAGCGTATGG | GGCTCTGTCA | CTCGCTCGGG | AAGGACCTGC | GGGGTTGGT |
| [0053] | CACCACCACA | TTTTACCACG | GTTGACCTCG | GATCAGGTAG | GAGTTACCCG |
| [0054] | CTGAACTTAA | GCATATCAAT | AAGCGGAGGA | | |

[0055] 实施例 3、黄篮状菌的抑菌作用。

[0056] 将黄色篮状菌分别与板栗疫病菌、玉米弯孢叶斑病菌、小麦赤霉病菌、烟草赤星病菌、杨树腐烂病菌和立枯丝核菌等植物病原真菌采用两点对峙的方法接种到 PDA 平板上, 同时以单独接种各病原菌的 PDA 平板为对照。置于 28℃ 恒温恒湿培养箱中培养, 接种 3 天后测量菌落直径, 直到对照长满平板为止。计算抑菌率, 结果如表 1 所示。

[0057]

| 病原菌 | 半径(cm) | | 抑制率 (%) |
|----------|--------|------|---------|
| | 对峙培养 | 对照 | |
| 板栗疫病菌 | 0.03 | 0.4 | 92.5 |
| 烟草赤星病菌 | 0.1 | 1.6 | 93.8 |
| 玉米弯孢叶斑病菌 | 0.3 | 0.85 | 64.8 |
| 小麦赤霉病菌 | 0.9 | 2.25 | 60.0 |
| 立枯丝核菌 | 0.47 | 0.95 | 50.5 |
| 杨树腐烂病菌 | 0.57 | 1 | 43.0 |

[0058]

[0059] 实施例 4、菌丝抑制病理学观察

[0060] 于 26℃ 在 PDA 平板上对峙培养黄色篮状菌与各病原菌,各病原菌包括:杨树腐烂病菌、立枯丝核菌、玉米纹枯病菌、玉米弯孢叶斑病菌、苹果炭疽病菌、小麦赤霉病菌、烟草赤星病菌、板栗疫病菌和烟草炭疽病菌等植物病原真菌,参见附图 1-9。当黄色篮状菌与各病原菌相交后,挑取交界处病原菌菌丝在光学显微镜下观察两种菌丝的相互作用,参见附图 10-13。

[0061] 黄色篮状菌对上述 9 种病原菌的拮抗机制主要是重寄生作用、竞争作用和抗生素作用。黄色篮状菌缠绕在病原菌的菌丝上或平行波浪式生长;使病菌菌丝断裂,原生质浓缩;使菌丝细胞中空变形。在研究黄蓝状菌对 9 种病原真菌的相互作用过程中,发现菌丝间有被缠绕、菌丝断裂、原生质浓缩、菌丝变形等现象,从图片上可以清晰的观察到黄色篮状菌与 9 种病原菌相互作用的现象。

[0062] 实施例 5、黄色篮状菌发酵液对病原菌的作用

[0063] 在 PDA 斜面上接种黄色篮状菌,28℃ 条件下培养 5 天,制备孢子悬浮液。用移液枪取 1mL 孢子悬浮液接入装有 50mL PD 液体培养基三角瓶中,28℃ 振荡培养 4 天做为种子液。取种子液 5mL 接入装有 100mL PD 液体培养基的三角瓶中,28℃ 条件下振荡培养 7 天,发酵液用 8 层纱布过滤后滤液 10000r/min 离心 15 分钟,上清液用 0.22um 的细菌过滤器过滤除菌,获得无菌发酵液。

[0064] 在固体 PDA 平板中心接种病原菌,28℃ 培养至菌落直径 2cm,在距菌落边缘约 1.5cm 处分别加入无菌发酵液 0uL、300uL、400uL、500uL,继续培养。每天观察并记录菌落的长势,并测量和记录菌落中心到每个边缘的距离,直至对照菌落长满平板,3 次重复,结果如表 2 所示。

[0065] 表 2:不同剂量黄蓝状菌发酵液对病原菌的抑制作用

[0066]

| 病原菌 | 菌落平均半径(cm) | | | | 抑制率 (%) | | |
|----------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | 0 μ L | 300 μ L | 400 μ L | 500 μ L | 300 μ L | 400 μ L | 500 μ L |
| 花生网斑病菌 | 3.4 | 3 | 2.7 | 2.1 | 11.8 | 20.6 | 38.2 |
| 杨树腐烂病菌 | 3.5 | 3.3 | 2.9 | 2.6 | 5.7 | 17.1 | 25.7 |
| 苹果腐烂病菌 | 3.5 | 3.2 | 3 | 2.5 | 8.6 | 14.3 | 28.6 |
| 烟草赤星病菌 | 3.5 | 3 | 2.7 | 2.4 | 14.3 | 22.9 | 31.4 |
| 板栗疫病菌 | 3.4 | 3.3 | 3.1 | 2.8 | 2.9 | 8.8 | 17.6 |
| 玉米弯孢叶斑病菌 | 3.4 | 3.2 | 3 | 2.7 | 5.9 | 11.8 | 20.6 |
| 小麦赤霉病菌 | 3.4 | 3.1 | 3 | 2.9 | 8.8 | 11.8 | 14.7 |
| 立枯丝核菌 | 3.5 | 3 | 2.8 | 2.2 | 14.3 | 20.0 | 37.1 |
| 番茄早疫病菌 | 3.6 | 3.3 | 3.1 | 2.7 | 8.3 | 13.9 | 25.0 |
| 苹果轮纹病菌 | 3.4 | 3.2 | 3 | 2.6 | 5.9 | 11.8 | 23.5 |

[0067] 结果表明,所述无菌发酵液对花生网斑病菌、杨树腐烂病菌、板栗疫病菌、苹果轮纹病菌、苹果腐烂病菌、番茄早疫病菌、烟草赤星病菌、玉米弯孢叶斑病菌、小麦赤霉病菌和立枯丝核病菌等植物病原真菌有显著的抑制作用,并且随着发酵液用量的增加,对病原菌的抑制作用增强。

[0068] 综上所述,本发明提供的黄蓝状菌,对多种病原菌有很强的抑制作用,并通过寄生和竞争作用抑制病原菌丝的生长,同时其代谢产物也能有效的抑制病原菌的生长。可用于防治多种植物病害。

[0069] 以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其进行限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的普通技术人员来说,依然可以对前述实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明所要求保护的技术方案的精神和范围。

[0070] SEQUENCE LISTING

[0071] <110> 青岛农业大学

[0072] <120> 一种黄色篮状菌及其在防治植物病原菌中的应用

[0073] <160>3

[0074] <170>PatentIn version 3.3

[0075] <210>1

[0076] <211>580

[0077] <212>DNA

[0078] <213>Talaromyces flavus

[0079] <400>1

[0080] tccgtaggtg aacctgcgga aggatcatta ccgagtgcgg gcctcgcgg cccaacctcc 60

[0081] cacccttgte tectatacac ctgttgcttt ggcgggceca ccggggccac ctggtcgceg 120

| | | |
|--------|---|-----|
| [0082] | ggggacgcac gtccccgggc ccgcgcccgc cgaagcgcgc tgtgaaccct gatgaagatg | 180 |
| [0083] | ggctgtctga gtactatgaa aattgtcaaa actttcaaca atggatctct tggttccggc | 240 |
| [0084] | atcgatgaag aacgcagcga aatgcgataa gtaatgtgaa ttgcagaatt ccgtgaatca | 300 |
| [0085] | tcgaatcttt gaacgcacat tgcgccccct ggcattccgg ggggcatgcc tgtccgagcg | 360 |
| [0086] | tcatttctgc cctcaagcac ggcttgtgtg ttgggtgtgg tccccccggg gacctgcccg | 420 |
| [0087] | aaaggcagcg gcgacgtccg tctggctctc gacgctatgg ggctctgtca ctcgctcggg | 480 |
| [0088] | aaggacctgc gggggttggc caccaccaca ttttaccacg gttgacctcg gatcaggtag | 540 |
| [0089] | gagttaccgg ctgaacttaa gcatatcaat aagcggagga | 580 |
| [0090] | <210>2 | |
| [0091] | <211>19 | |
| [0092] | <212>DNA | |
| [0093] | <213> 人工序列 | |
| [0094] | <400>2 | |
| [0095] | tccgtaggtg aacctgcgg | 19 |
| [0096] | <210>3 | |
| [0097] | <211>20 | |
| [0098] | <212>DNA | |
| [0099] | <213> 人工序列 | |
| [0100] | <400>3 | |
| [0101] | Tcctccgctt attgatatgc | 20 |

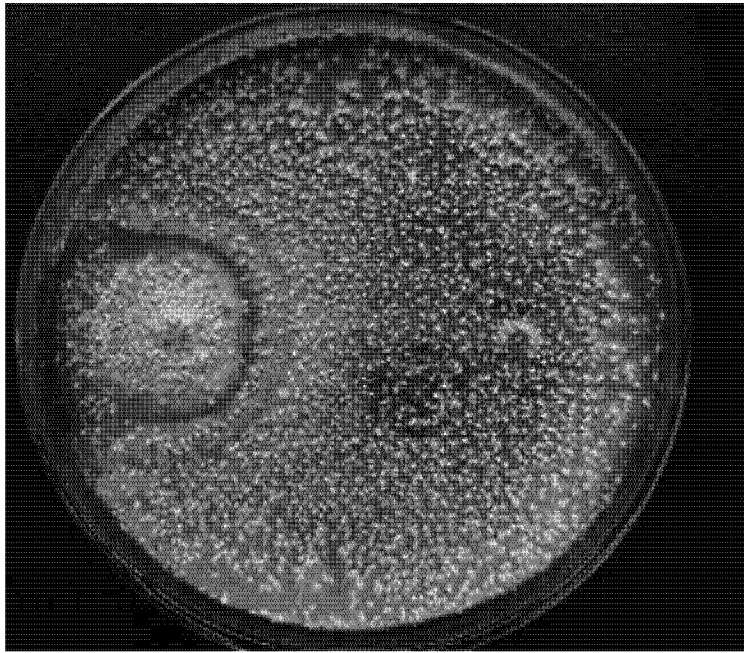


图 1

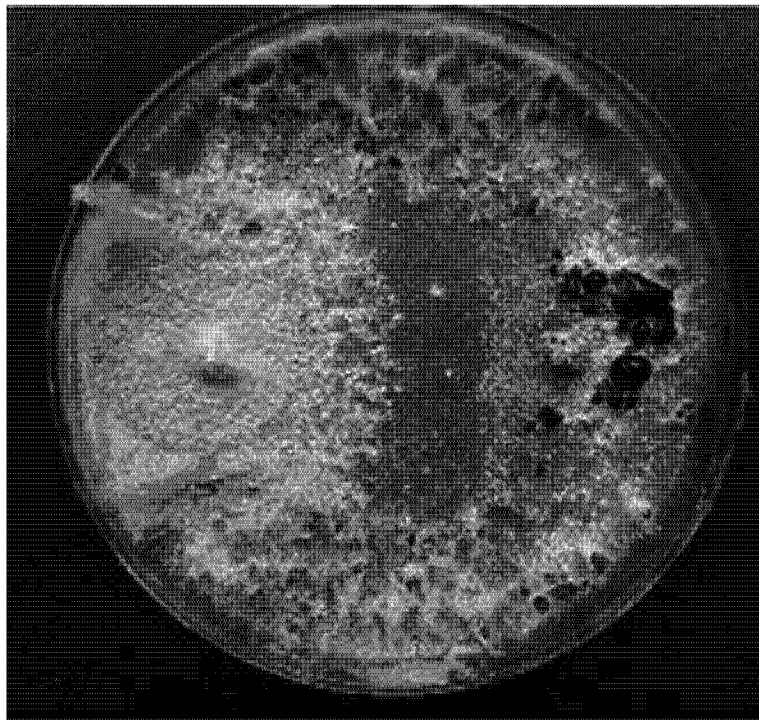


图 2

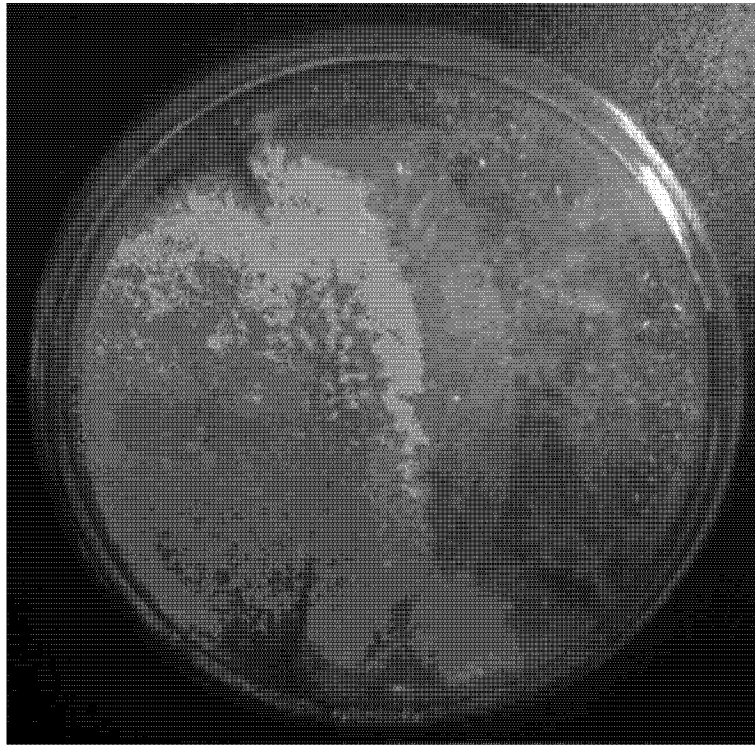


图 3

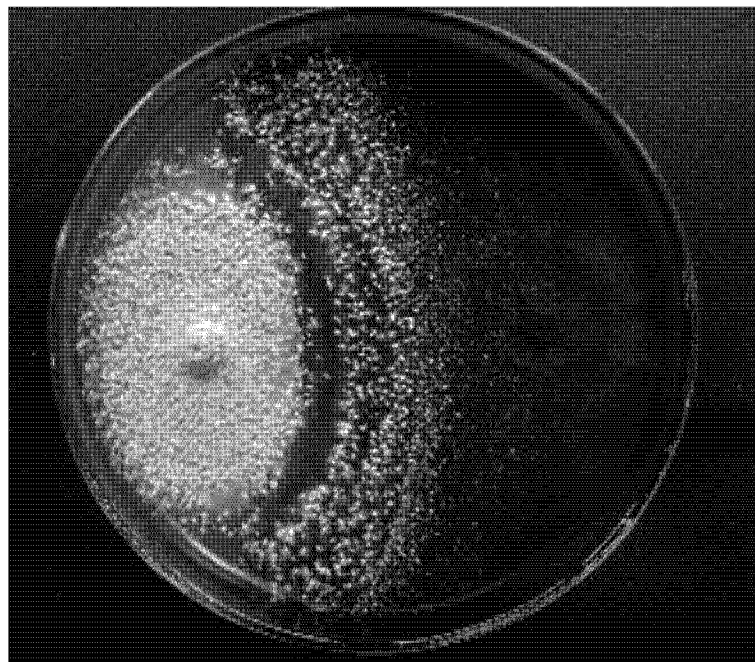


图 4

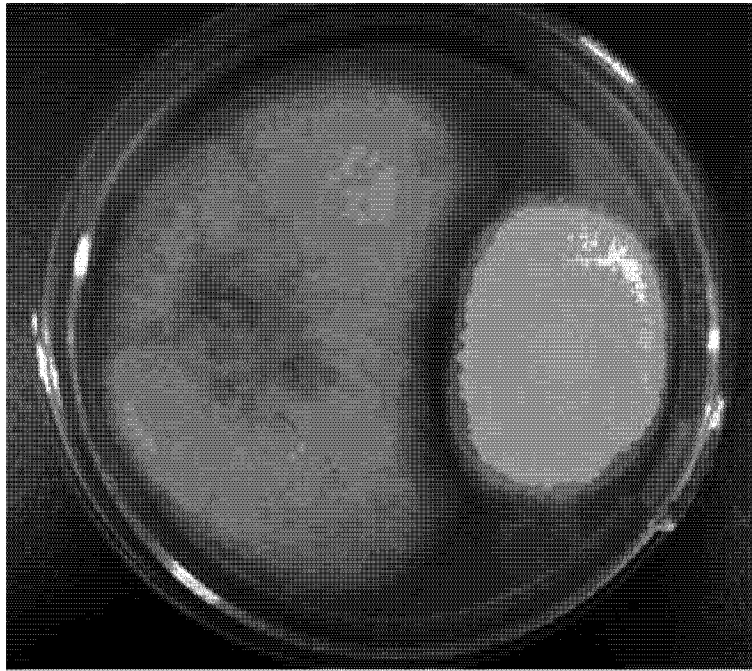


图 5

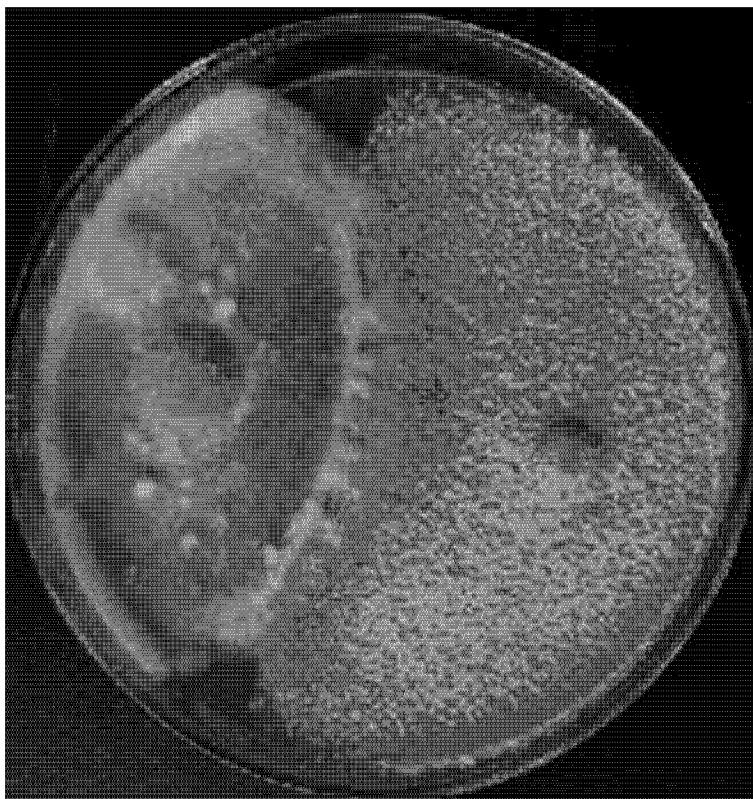


图 6

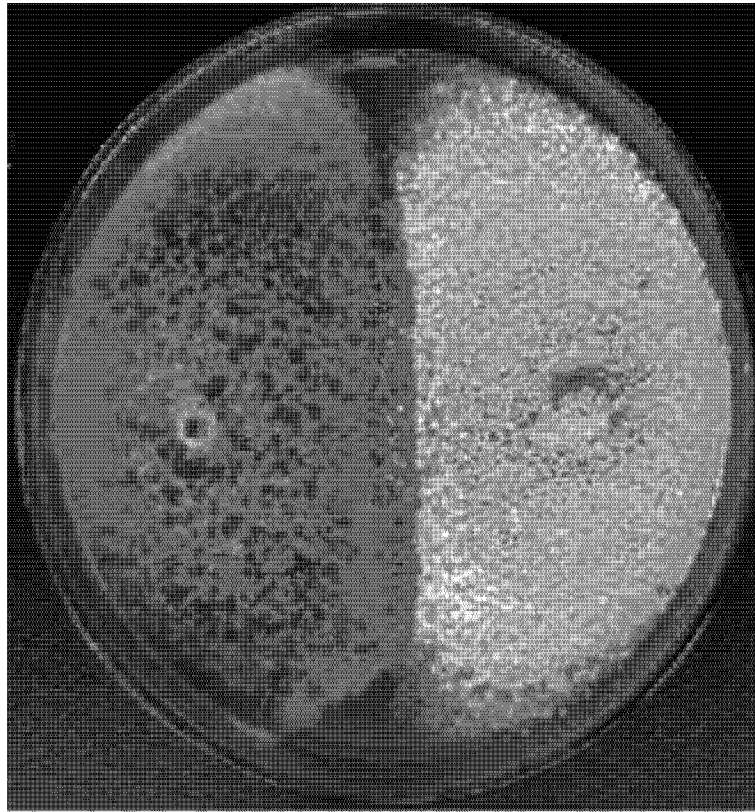


图 7

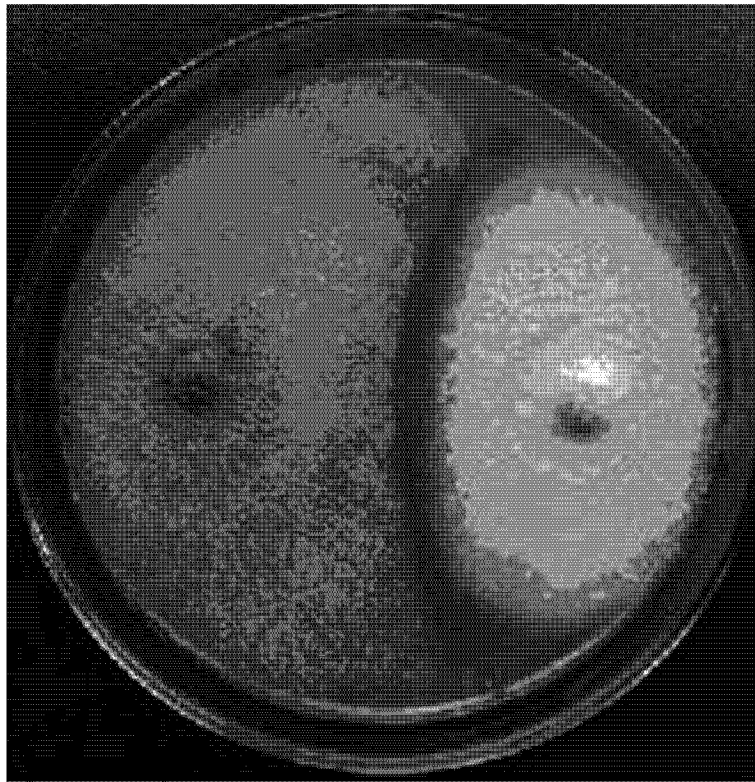


图 8

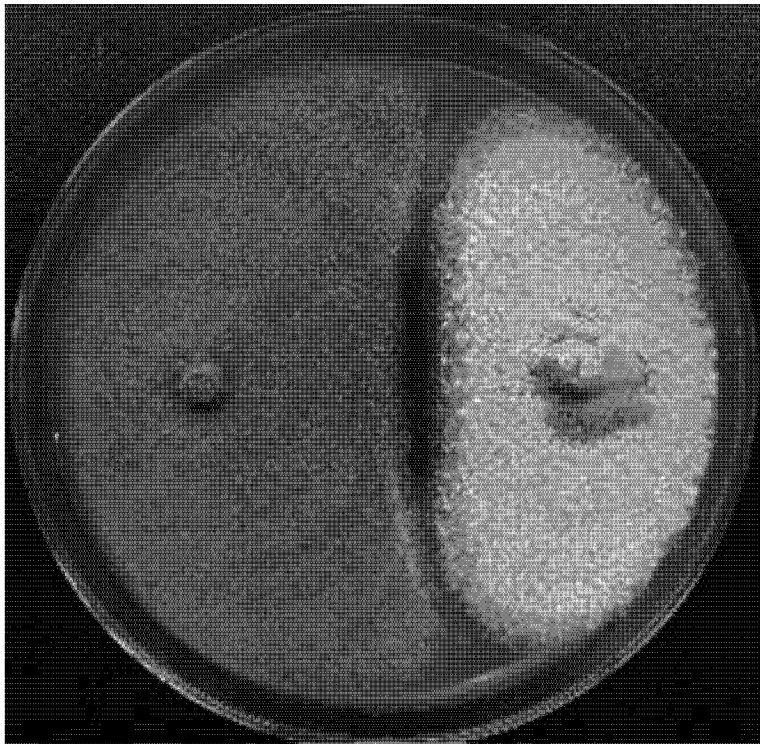


图 9

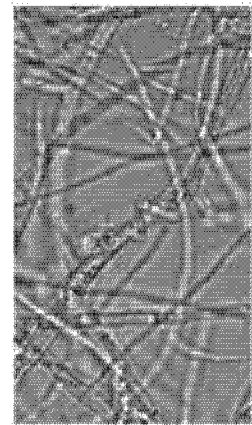


图 10

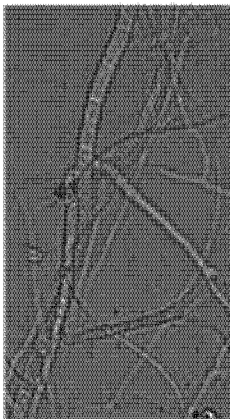


图 11



图 12

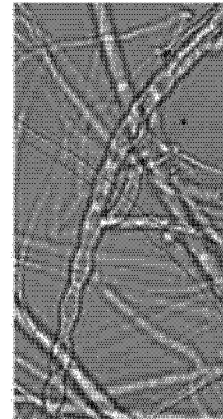


图 13