



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106119136 B

(45)授权公告日 2019.04.26

(21)申请号 201610850477.8

A01P 3/00(2006.01)

(22)申请日 2016.09.26

A01P 21/00(2006.01)

C12R 1/645(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106119136 A

(43)申请公布日 2016.11.16

(83)生物保藏信息

CGMCC NO.12872 2016.08.15

(73)专利权人 中国农业科学院特产研究所

地址 130117 吉林省长春市净月经济开发区聚业大街4899号

(72)发明人 关一鸣 邓进超 吴连举 张亚玉

潘晓曦

(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 赵青朵

(56)对比文件

CN 104630071 A, 2015.05.20,

CN 102409411 A, 2012.04.11,

CN 102329738 A, 2012.01.25,

肖春萍等.人参主要病原菌生防真菌的筛选及鉴定.《西北农林科技大学学报(自然科学版)》.2016,第44卷(第7期),摘要.

肖春萍等.人参主要病原菌生防真菌的筛选及鉴定.《西北农林科技大学学报(自然科学版)》.2016,第44卷(第7期),摘要.

李扬等.黑附球菌在植物病害生物防治中的研究与应用进展.《安徽农业科学》.2010,第38卷(第6期),摘要,第1段,第3节1段,第4节1段.

审查员 李有朝

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

A01N 63/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

序列表1页 附图6页

(54)发明名称

黑附球菌及其应用

(57)摘要

本发明涉及微生物技术领域,尤其涉及黑附球菌及其应用。本发明提供了黑附球菌在抑制毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)中的应用,并提供了黑附球菌防治植物锈腐病、立枯病、灰霉病的作用。优选黑附球菌的保藏编号为CGMCC NO.12872。实验表明,黑附球菌对人参病原菌生长抑制率达55%以上,在土壤中的定置能力较强,且黑附球菌SFF-1对人参具有促进生长作用,无毒无致病性,对人畜安全,不污染环境。

1. 保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌。
2. 保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌在抑制毁灭柱孢菌、立枯丝核菌和/或灰葡萄孢菌中的应用。
3. 保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌在防治植物真菌病害中的应用;所述真菌病害为锈腐病、立枯病和/或灰霉病。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述植物为人参。
5. 保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌在促进植物生长中的应用。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述植物为人参。
7. 一种微生物菌剂,其特征在于,由保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌发酵获得孢子后,重悬获得孢子,制得。
8. 一种微生物菌剂,其特征在于,由保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌发酵获得培养液,经离心获得上清液,经过滤制得微生物菌剂。
9. 一种微生物菌剂,其特征在于,由保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌发酵获得培养液制得微生物菌剂。
10. 一种防治植物真菌病害的方法,其特征在于,给予权利要7~9任一项所述的微生物菌剂。
11. 一种促进植物生长的方法,其特征在于,给予权利要求9所述的微生物菌剂。

## 黑附球菌及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,尤其涉及黑附球菌及其应用。

### 背景技术

[0002] 植物病害(plant disease)植物正常的生理机能受到破坏或干扰所造成的后果称为植物病害。植物病害的发生和流行是寄主植物和病原物相互作用的结果。由病原真菌引起的侵染性病害称为植物真菌病害。真菌病害是植物病害中数量最大的一类,约占病害总数的70%~80%,大部分真菌病害是局部性侵染病害,表现为坏死、腐烂、畸形等症状。真菌病害通过气流、雨水、虫媒等传播,真菌孢子萌发直接侵入寄主表皮细胞,或通过气孔等自然孔口及伤口侵入植物。例如,灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)能够引起200多种已知植物(如水果、蔬菜及花卉)灰霉病;立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)能引起多种植物的立枯病;毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)主要为害人参,引起人参的锈腐病。

[0003] 长期以来通过使用化学农药等化学防治措施防治人参病害并未达到预期效果,而且化学农药使用过量不仅破坏土壤微生态环境,加重环境污染,也使土壤中病菌产生抗药性,同时有毒物质在人参根中积累,降低人参的使用安全性和商品价值,因此,人参土传病害防治重点逐步转向农业防治和生物防治措施上。

[0004] 生物防治利用生物物种间的相互作用,以一种或一类生物抑制另一种或另一类生物。生物防治最大的优点是不会污染环境,利用生防微生物防治病原微生物是生物防治技术的重要组成部分。它避免了大量使用化学农药带来的一系列环境、植保和能源方面的问题,避免了农药残留对人畜的危害,更重要的是促进了农业可持续发展。

[0005] 人参(*Panax ginseng* C.A.May)为五加科多年生宿根植物,是名贵的药用植物,人参在中国的栽培面积居世界首位,占全球栽培的面积一半以上。中国报道的人参病害有30余种,目前已报道的人参主要病害包括人参锈腐病(人参根部病害),人参根腐病(人参根及根茎部病害),人参菌核病(人参根部病害),人参灰霉病(人参叶部和根部病害),人参疫病(人参根部及茎叶部病害),人参立枯病(人参苗期茎基部病害),人参黑斑病(人参叶部病害)。其中,由毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)导致的人参锈腐病严重时发病率达70%以上,该病发生于人参根的各部位,病斑呈铁锈色,由点至面扩散至全根,土壤湿度大、透气不好、腐殖质层厚,发病重;由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)引起的人参灰霉病发病初期,叶片和叶柄上产生水浸状腐烂,后干枯,表面生灰霉。严重时扩展到幼茎,产生灰黑色病斑后腐烂,产生黑色霉而折断,造成大量死苗;由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)导致的人参立枯病是人参苗期主要病害之一,在低温湿度大的条件下,发展蔓延极为迅速,一般发病率为8%~30%,严重时可达40%左右,病菌使幼苗在地面3cm~5cm干湿土交界面的茎部缢缩、腐烂,切断输导组织,致使幼苗倒伏。

[0006] 目前,对于植物的真菌病害仍大量采用化学农药进行防治,进一步开发有效的生物防治方法,尤其是针对人参锈腐病、立枯病、灰霉病的生物防治方法具有重要的意义。

## 发明内容

[0007] 有鉴于此,本发明要解决的技术问题在于提供黑附球菌及其应用,黑附球菌能够抑制毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*),从而起到防治锈腐病、立枯病、灰霉病的作用。

[0008] 本发明提供了黑附球菌在抑制毁灭柱孢菌、立枯丝核菌和/或灰葡萄孢菌中的应用。

[0009] 本发明实验表明,黑附球菌对毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*) 3种病原菌均具有明显的抑制作用,其抑制率皆达50%以上。其中,对灰葡萄孢菌抑菌率达到59.19%,对毁灭柱孢菌和立枯丝核菌抑菌率皆达55%以上,说明黑附球菌对病原真菌的防治作用具有高效性。本发明实验采用的黑附球菌的保藏编号为CGMCC NO.12872。

[0010] 黑附球菌(*Epicoccum nigrum*),属半知菌亚门附球菌属。本发明研究表明,黑附球菌能够抑制毁灭柱孢菌、立枯丝核菌和/或灰葡萄孢菌;其中,毁灭柱孢菌是导致锈腐病的病原菌;立枯丝核菌是导致立枯病的病原菌;灰葡萄孢菌是导致灰霉病的病原菌。故而,黑附球菌能够用于防治植物病害。

[0011] 本发明还提供了黑附球菌在防治植物真菌病害中的应用。

[0012] 本发明实施例中,植物真菌病害为锈腐病、立枯病和/或灰霉病。

[0013] 本发明实施例中,植物为人参。

[0014] 即本发明实验表明,黑附球菌能够防治人参锈腐病、人参立枯病和/或人参灰霉病。

[0015] 本发明实验采用的黑附球菌的保藏编号为CGMCC NO.12872。

[0016] 即本发明提供了,保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌。并提供了该菌株用于防治人参锈腐病、人参立枯病和/或人参灰霉病。

[0017] 本发明还提供了黑附球菌在促进植物生长中的应用。

[0018] 本发明实施例中,所述植物为人参。

[0019] 本发明实验表明,在接种黑附球菌的土壤中种植人参,其植株株高、整株鲜重、根鲜重、根长、整株干重及根干重较对照组均有不同程度的增加,其中黑附球菌处理后人参地上茎叶部分干重增加2.69%,鲜重较对照增加10.21%,人参根的干重较对照增加4.23%,鲜重较对照处理增加13.50%,证明黑附球菌对人参根生长具有显著的促生作用。同时也说明黑附球菌对人参是安全的。本发明实验采用的黑附球菌的保藏编号为CGMCC NO.12872。

[0020] 即本发明提供了,保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌。并提供了该菌株用于促进人参的生长。

[0021] 本发明提供的黑附球菌自吉林省抚松县多年生人参健株根际土壤分离得到。

[0022] 分离方法为:采集多年生人参健株根际土壤样品,去除表面枯落物后过2mm筛。称取新鲜土壤样品10g,放入装有玻璃珠和90ml无菌水的三角瓶中,充分振荡30min,使样品与无菌水混合均匀,制得土壤悬浮液。在无菌条件下,取1ml振荡液,加入9ml无菌水,按梯度依次制成 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 的稀释液。分别吸取100 $\mu$ l各稀释液加入到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上,采用平板稀释法均涂布,每处理3次重复,25 $^{\circ}$ C培养箱培养5d。挑选单菌落转接到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上培养长出菌落后,采用单胞分离法进行分离纯

化,纯化菌株于4℃保存。

[0023] 本发明还提供了一种微生物菌剂,其由黑附球菌发酵获得孢子后,重悬获得孢子,制得。

[0024] 发酵的培养液为马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)。

[0025] PDB培养基中包括:马铃薯200g/L,葡萄糖10g/L,蒸馏水1000ml,pH为6.8~7.2。

[0026] 发酵的温度为25℃,时间为96h,条件为170r/min。

[0027] 发酵后经过滤获得孢子。所述过滤采用无菌纱布。无菌纱布的层数为2层。

[0028] 重悬孢子采用羧甲基纤维素钠(CMC)水溶液。

[0029] 所述羧甲基纤维素钠(CMC)水溶液中CMC的浓度为 $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

[0030] 重悬孢子至密度为 $3\times 10^5$ 个 $\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

[0031] 以该方法制得的微生物菌剂(记为孢子悬液)能够用于防治人参锈腐病、人参立枯病和/或人参灰霉病。

[0032] 该微生物菌剂用于防治人参锈腐病、人参立枯病和/或人参灰霉病的剂量为100mL/2kg土壤。

[0033] 本发明提供的另一种微生物菌剂,由黑附球菌发酵获得培养液,经离心获得上清液,经过滤制得微生物菌剂。

[0034] 发酵的培养液为马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)。

[0035] PDB培养基中包括:马铃薯200g/L,葡萄糖10g/L,蒸馏水1000ml,pH为6.8~7.2。

[0036] 发酵的温度为25℃,时间为96h,条件为170r/min。

[0037] 培养液滤去孢子后,再离心。

[0038] 所述离心的转速为8000r/min,时间为20min。

[0039] 所述过滤的孔径为 $0.2\mu\text{m}$ 。

[0040] 以该方法制得的微生物菌剂(记为无菌发酵液)能够用于抑制毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)。

[0041] 实验以杯碟对峙法和滤纸片扩散法证明,以经过滤的培养上清(无菌发酵液)处理,能够显著抑制3种致病菌的生长,抑制作用超过55%。

[0042] 本发明还提供了另一种微生物菌剂,由黑附球菌发酵获得培养液制得微生物菌剂。

[0043] 发酵的培养液为马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)。

[0044] PDB培养基中包括:马铃薯200g/L,葡萄糖10g/L,蒸馏水1000ml,pH为6.8~7.2。

[0045] 发酵的温度为25℃,时间为96h,条件为170r/min。

[0046] 以该方法制得的微生物菌剂(记为发酵液)能够用于防治植物的真菌病害,特别是人参的锈腐病、人参立枯病和/或人参灰霉病。实验以滤纸片扩散法证明,培养液能够抑制毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*),抑制作用可达55%。

[0047] 另外,实验表明,发酵液能够促进人参植株的生长,特别是对人参根部的生长具有显著的促进作用,相对于未经处理的人参而言,经处理的人参根长能提高10.43%,根鲜重提高13.50%。

[0048] 本发明中,三种微生物菌剂发酵所采用的种子皆为黑附球菌。优选为保藏编号为CGMCC NO.12872的黑附球菌。

[0049] 该种子的制备包括:黑附球菌经试管斜面种活化,取两块5mm菌株接种于用250ml三角瓶装的150ml马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中,在170r/min,25℃下培养72h,获得种子液。

[0050] 斜面培养基为:PDA培养基;其中包括:马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂粉15g,蒸馏水1000ml,pH为6.8~7.2。

[0051] 相应的,本发明还提供了一种防治植物真菌病害的方法,该方法为给予本发明提供的微生物菌剂。

[0052] 所述微生物菌剂为孢子悬液、发酵液或无菌发酵液。

[0053] 本发明中,所述防治植物真菌病害为防治人参的真菌病害,具体为人参锈腐病、人参立枯病和/或人参灰霉病。

[0054] 一个具体的实施例中,防治人参真菌病害的方法为:灌根或拌土给予孢子悬液。

[0055] 灌根的剂量为15ml/株~25mL/株或100mL/2kg土壤。

[0056] 一个具体的实施例中,防治人参真菌病害的方法为:以发酵液处理土壤。

[0057] 处理的剂量为15ml/株~25mL/株或100mL/2kg土壤。

[0058] 处理的方法为:将土壤与蛭石混合后,与孢子悬液混合,室温培养35d。

[0059] 所述土壤优选为林地土。所述土壤与蛭石的体积比为2:1。

[0060] 一个具体的实施例中,防治人参真菌病害的方法为给予无菌发酵液。

[0061] 本发明还提供了一种促进植物生长的方法,该方法为给予本发明所述的微生物菌剂。

[0062] 所述植物为人参。所述微生物菌剂为发酵液。

[0063] 一个具体的实施例中,所述给予的方式为灌根。

[0064] 灌根前,发酵液以水稀释。水为无菌水。稀释的倍数为50倍。灌根的剂量为30ml/株。

[0065] 实验表明,给予本发明微生物菌剂后,人参地上茎叶部分干重增加2.69%,鲜重较对照增加10.21%,人参根的干重较对照增加4.23%,鲜重较对照处理增加13.50%,证明黑附球菌SFF-1对人参根生长具有显著的促生作用。同时也说明黑附球菌SFF-1对人参是安全的。

[0066] 本发明提供了黑附球菌在抑制毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)中的应用,并提供了黑附球菌防治植物锈腐病、立枯病、灰霉病的作用。优选黑附球菌的保藏编号为CGMCC NO.12872。实验表明,黑附球菌对人参病原菌生长抑制率达55%以上,在土壤中的定置能力较强,且黑附球菌SFF-1对人参具有促进生长作用,无毒无致病性,对人畜安全,不污染环境。

[0067] 生物保藏说明

[0068] 黑附球菌SFF-1:分类命名:黑附球菌*Epicoccum nigrum*,于2016年08月15日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGICC),保藏中心地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,保藏编号为CGMCC NO.12872。

## 附图说明

- [0069] 图1黑附球菌菌盘对峙人参灰霉病菌生长图；  
[0070] 图2黑附球菌菌盘对峙人参立枯病菌生长图；  
[0071] 图3黑附球菌菌盘对峙人参锈腐病菌生长图；  
[0072] 图4黑附球菌发酵液对峙人参灰霉病菌生长图；  
[0073] 图5黑附球菌发酵液对峙人参立枯病菌生长图；  
[0074] 图6黑附球菌发酵液对峙人参锈腐病菌生长图。

## 具体实施方式

[0075] 本发明提供了黑附球菌及其应用,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。

[0076] 本发明采用的仪器皆为普通市售品,皆可于市场购得。

[0077] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0078] 实施例1黑附球菌 (*Epicoccum nigrum*) SFF-1菌株的分离、鉴定与保藏

[0079] 该菌株自吉林省抚松县多年生人参健株根际土壤分离得到。采集上述土壤样品,去除表面枯落物后过2mm筛。称取新鲜土壤样品10g,放入装有玻璃珠和90ml无菌水的三角瓶中,充分振荡30min,使样品与无菌水混合均匀,制得土壤悬浮液。在无菌条件下,取1ml振荡液,加入9ml无菌水,按梯度依次制成 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 的稀释液。分别吸取100 $\mu$ L各稀释液加入到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上,采用平板稀释法均涂布,每处理3次重复,25 $^{\circ}$ C培养箱培养5d。挑选单菌落转接到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上培养长出菌落后,采用单胞分离法进行分离纯化,纯化菌株于4 $^{\circ}$ C保存。

[0080] 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)配方为:马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂15g,蒸馏水1000ml,pH为6.8~7.2。该菌株在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上25 $^{\circ}$ C时生长较慢,菌落初期为粉白色,后期伴有橙黄色渗出物,分泌褐色物质,成熟后形成黑色点状结构,内含孢子,菌丝质地柔软,菌丝呈轮纹状生长。SFF-1菌株孢子沿菌丝生长,分生孢子梗暗色,短而粗,有横隔,长(5.1-15.2)  $\times$  (3.0-6.1)  $\mu$ m,生孢子球形或半球形,暗色,有横隔,单生于分生孢子梗上,直径20.1 $\mu$ m~25.3 $\mu$ m。

[0081] 对菌株进行分子生物学鉴定,具体方法为:采用Biospin Fungus Genomic DNA Extraction Kit试剂盒进行人参生防真菌基因组的提取。利用真菌rDNA的ITS通用引物ITS4和ITS5,进行rDNA-ITS-PCR扩增。反应体系(50 $\mu$ L)如下:Premix Taq25 $\mu$ L,ddH<sub>2</sub>O 22 $\mu$ L,DNA Template 1 $\mu$ L,ITS4 1 $\mu$ L,ITS5 1 $\mu$ L。PCR扩增程序:94 $^{\circ}$ C变性5min,94 $^{\circ}$ C变性30s,55 $^{\circ}$ C复性45s,72 $^{\circ}$ C延伸90s,35个循环,72 $^{\circ}$ C延伸10min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,并由上海生工生物工程技术有限公司纯化并测序,结果表明,SFF-1菌株的DNA为545bp,具体如SEQ ID NO:1所示。将测得的ITS序列应用BLAST软件和DNAMAN软件进行分析,发现SFF-1与*Epicoccum nigrum*同源性达到99%。结合传统形态学分类和现代分子生物学鉴定结果,可以确认本发明的菌株SFF-1为黑附球菌(*Epicoccum nigrum*)。

[0082] 该菌株保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为CGMCC NO.12872,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。

[0083] 实施例2黑附球菌SFF-1菌株对人参真菌病害病原菌生长的抑制作用和机理

[0084] 采用杯碟对峙法,生长速率测定法测定菌株SFF-1对人参3种真菌病害病原菌的抑制作用:用直径5mm的打孔器将活化好的人参病原菌菌落制成相应尺寸的菌饼,无菌接种至马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上的一侧,在距离病原菌1.5cm处接入SFF-1菌株菌饼,以单接种人参病原菌菌饼的培养皿为空白对照,每个处理重复3次。25℃培养。在对峙过程中,当人参病原菌菌丝前端出现抑制现象时,切取拮抗带上的菌丝,在显微镜下观察菌丝形态及相互影响情况。7d后测量处理组病原菌菌落直径(单位:mm)并按照如下公式计算抑菌率。

[0085] 抑菌率=(对照病原菌菌落直径-与生防真菌对峙培养的病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径×100%

[0086] 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)配方为:马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂15g,蒸馏水1000ml,pH为6.8~7.2。

[0087] 结果表明,黑附球菌SFF-1对人参病原菌菌丝生长具有一定抑制作用。在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)培养基上,黑附球菌SFF-1与毁灭柱孢菌生长速度相当;对峙培养时,黑附球菌SFF-1紧贴病原菌生长,且在菌落相接处形成明显抑菌带,靠近黑附球菌SFF-1边缘的病原菌菌丝稀薄并有纠结现象,菌丝体颜色变深而距离黑附球菌SFF-1较远的菌落颜色较浅,表明菌株对抗生长,互相影响;黑附球菌SFF-1比立枯丝核菌、灰葡萄孢菌生长缓慢,随对峙培养时间延长,靠近黑附球菌SFF-1边缘的菌丝变粗,颜色变深,对峙培养后期,几乎不产生气生菌丝,且与黑附球菌SFF-1之间产生明显的拮抗带。黑附球菌SFF-1可与人参病原菌营养物质,使病原菌得不到正常的营养供用从而抑制病原菌的生长(图1-3)。

[0088] 显微观察发现,人参病原真菌的正常菌丝体生长速度较快粗细均匀,菌丝层后而密集,在黑附球菌SFF-1作用下,拮抗带周围的人参病原菌菌丝体分枝增多,菌丝顶端和分枝处膨大畸形,生长受阻,原生质凝聚,出现菌丝扭曲、断裂现象。另外,挑去对峙培养菌落交接处镜检发现,黑附球菌SFF-1可穿透、卷曲缠绕、贴附和侵入等多种寄生方式侵入人参病原菌菌丝,通过酶的作用消解病原真菌细胞壁,最终导致病原真菌死亡。

[0089] 抑制作用如表1:

[0090] 表1黑附球菌SFF-1对人参病原真菌的抑制作用(%)

[0091] 菌株	毁灭柱孢菌	立枯丝核菌	灰葡萄孢菌
	<i>C. destructans</i>	<i>R. solani</i>	<i>B. cinerea</i>
抑菌率	55.17	55.17	59.19

[0092] 结果如表1所示,菌株SFF-1对分别引起人参锈腐病、立枯病、灰霉病的毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、等3种病原菌均具有明显的抑制作用。特别是对引起人参灰霉病的灰葡萄孢菌抑菌率达到59.19%,对引起人参锈腐病和人参立枯病的毁灭住孢菌和立枯丝核菌抑菌率达到55%以上,反应出菌株SFF-1对人参3种病原真菌的防治作用具有高效性(表

1)。

[0093] 实施例3黑附球菌SFF-1无菌培养液

[0094] 将黑附球菌SFF-1表面活化,取3个5mm菌饼接种于用250ml三角瓶装的100ml马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中,在170r/min,25℃下培养48h,获得种子液;

[0095] 将黑附球菌SFF-1种子液以10% (体积比) 接种于发酵培养液中培养,在170r/min,25℃下培养96h获得培养液。将黑附球菌SFF-1菌株培养液在8000r/min离心20min,上清液即为发酵液;发酵液在8000r/min离心20min,上清液经0.22μm微孔滤膜,获得黑附球菌SFF-1无菌发酵液。

[0096] 马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)配方:马铃薯200g/L,葡萄糖10g/L,蒸馏水1000ml,pH为6.8~7.2。

[0097] 实施例4黑附球菌SFF-1孢子悬浮液

[0098] 将黑附球菌SFF-1表面活化,取3个5mm菌饼接种于用250ml三角瓶装的100ml马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中,在170r/min,25℃下培养48h,获得种子液;

[0099] 将黑附球菌SFF-1种子液以10% (体积比) 接种于发酵培养液中培养,在170r/min,25℃下培养96h获得培养液。

[0100] 培养液经2层无菌纱布过滤,滤液中孢子经血球计数板计数,将孢子悬浮液分散至 $6\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 羧甲基纤维素钠(CMC)溶液中,获得孢子悬浮液,孢子含量为 $3\times 10^5$ 个 $\cdot\text{ml}^{-1}$ ;

[0101] 马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)配方:马铃薯200g/L,葡萄糖10g/L,蒸馏水1000ml,pH为6.8~7.2。

[0102] 实施例5黑附球菌SFF-1发酵液(或称培养液)

[0103] 将黑附球菌SFF-1表面活化,取3个5mm菌饼接种于用250ml三角瓶装的100ml马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中,在170r/min,25℃下培养48h,获得种子液;

[0104] 将黑附球菌SFF-1种子液以10% (体积比) 接种于发酵培养液中培养,在170r/min,25℃下培养96h获得发酵液(或称培养液)。

[0105] 马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)配方:马铃薯200g/L,葡萄糖10g/L,蒸馏水1000ml,pH为6.8~7.2。

[0106] 实施例6黑附球菌SFF-1无菌发酵液对人参病原菌的抑制作用

[0107] 采用滤纸片扩散法,用直径5mm的打孔器将活化好的人参病原菌菌落制成相应尺寸的菌饼,无菌接种至马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上的一侧,将滤纸片(直径=5mm)事先高温高压灭菌,放入距病原菌菌饼2cm处的同一个PDA平板培养基中,用移液枪吸取10μL黑附球菌SFF-1无菌发酵液(实施例3制得)滴入滤纸片上,滤纸片和病原菌的菌丝块处在同一直线的两点上。并使提取液充分吸收,用微风吹干,标记平板并封口,3次重复。设置将只滴有10μL无菌水并吹干的滤纸片为阴性对照,28℃恒温培养7天,后测量处理组病原菌菌落直径(单位:mm)并按照如下公式计算抑菌率。

[0108] 抑菌率=(对照病原菌菌落直径-与生防真菌对峙培养的病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径 $\times 100\%$ 。

[0109] 表2黑附球菌SFF-1发酵液对人参病原真菌的抑制作用(%)

[0110]	菌株	毁灭柱孢菌	立枯丝核菌	灰葡萄孢菌
		<i>C. destructans</i>	<i>R. solani</i>	<i>B. cinerea</i>
	抑菌率	44.19	44.17	49.57

[0111] 结果如表2所示,黑附球菌SFF-1发酵液对分别引起人参锈腐病、立枯病、灰霉病的毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)等3种病原菌均具有明显的抑制作用。反应出菌株SFF-1对人参3种病原真菌的防治作用具有高效性(表2)(图4-6)。

[0112] 实施例7黑附球菌SFF-1定殖试验

[0113] (1) 黑附球菌SFF-1在土壤中的定殖

[0114] 采用伴土接种法测定黑附球菌SFF-1在土壤中的定殖量,将多菌灵抗性黑附球菌菌株SFF-1接种于马铃薯葡萄糖(PDB)培养液,25℃,170r/min,摇床振荡6d,获得黑附球菌SFF-1菌株培养液,按实施例4获得黑附球菌SFF-1菌株孢子悬浮液,并稀释至 $3 \times 10^5$ 个 $\cdot$ ml<sup>-1</sup>,4℃冰箱保存备用。将自然土(未栽参的新林地土壤,使用前去除枯枝落叶等杂质,按照体积比新林地土与蛭石按2:1比例混合均匀)装入直径为20cm花盆,每盆装土2kg,向土壤中注入100ml标记过的黑附球菌SFF-1菌株孢子悬浮液拌土。室温下条件下,每隔7d分离一次土中的真菌(土壤先经梯度稀释后,取 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 的土壤稀释液进行平板涂布),计算含菌量。

[0115] 结果表明,35d后自然土中黑附球菌SFF-1定殖量达到每克土 $2.64 \times 10^3$ cfu/g以上,说明黑附球菌SFF-1在土壤中具有较强的定殖能力。

[0116] (2) 黑附球菌SFF-1在人参根茎叶的定殖

[0117] 采用灌根接种法,黑附球菌SFF-1菌株的孢子悬浮液制备同实施例4。将自然土(未栽参的新林地土壤,使用前去除枯枝落叶等杂质,按照体积比新林地土与蛭石按2:1比例混合均匀)装入直径为20cm花盆,每盆装土2kg,选择大小一致且生长良好的一年生人参幼苗进行移栽,每盆4株,每个处理重复6盆。移栽30d后沿着人参苗的茎基部向其根部土壤灌入菌株的孢子悬浮液(每株25ml),管理同常规生产。接种7d后采集整株人参,将人参的根、茎、叶置于75%的乙醇溶液中进行表面消毒3min,再放入1%的次氯酸钠溶液中浸泡2min,然后用无菌水冲洗3次(将最后一次冲洗材料的无菌水100 $\mu$ L涂于PDA平板上检测表明消毒是否彻底);无菌材料经无菌吸水纸吸干后,取1g无菌材料置于无菌研钵中,加10mL无菌水进行研磨;研磨成匀浆后静至30min,上清液作为浸出液备用,其浓度为0.1g/mL。取100 $\mu$ L上清液涂布于含300 $\mu$ g/mL多菌灵的PDA平板上,每次处理重复3次;平板倒置于25℃恒温箱中培养7d,检测是否含有待测菌的生长。结果表明,30d时,在人参根部可回收黑附球菌SFF-1。这说明黑附球菌SFF-1能在人参体内较长时间存在,具有一定内生性,应用潜力较好。

[0118] 实施例8黑附球菌SFF-1对人参的促生作用

[0119] 采用盆栽试验法测定黑附球菌SFF-1菌株对人参的促生作用:按实施例5方法获得黑附球菌SFF-1培养液。将自然土(未栽参的新林地土壤,使用前去除枯枝落叶等杂质,按照体积比新林地土与蛭石按2:1比例混合均匀)装入直径为20cm花盆,每盆装土2kg。选择大小一致且生长良好的一年生人参幼苗进行移栽,每盆4株,每处理6盆。

[0120] 试验组用黑附球菌SFF-1发酵液(含菌量约为 $3 \times 10^5 \text{cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$ )的50倍无菌水稀释液30ml灌根,每盆4株,每处理6盆,随机排列。

[0121] 对照组给予新鲜的PDB液体培养基。

[0122] 待人参苗长到90d后,分别随机选取处理组和对照组人参苗各5株,小心将完整植株挖出,洗去根部泥土,测量其株高、根长、整株鲜重和根鲜重指标。然后105℃烘干至恒温,测整株干重和根干重。

[0123] 表3黑附球菌SFF-1对人参的促生作用

[0124]

处理	株高 (cm)	根长 (cm)	地上茎叶部分 鲜重(g)	地上茎叶部分 干重(g)	根鲜重 (g)	根干重 (g)
PDB 培养基	25.83	13.33	6.27	1.86	3.11	0.71
黑附球菌 SFF-1	28.24	14.72	6.91	1.91	3.53	0.74
增长率(%)	9.33	10.43	10.21	2.69	13.50	4.23

[0125] 盆栽试验结果表明(表3),接种黑附球菌SFF-1后种植人参,其植株株高、整株鲜重、根鲜重、根长、整株干重及根干重较对照组均有不同程度的增加,其中黑附球菌SFF-1处理后人参地上茎叶部分干重增加2.69%,鲜重较对照增加10.21%,人参根的干重较对照增加4.23%,鲜重较对照处理增加13.50%,证明黑附球菌SFF-1对人参根生长具有显著的促生作用( $p < 0.05$ )。同时也说明黑附球菌SFF-1对人参是安全的。

[0126] 实施例9黑附球菌SFF-1对人参真菌病害的田间防治试验

[0127] 对引起人参锈腐病的毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)进行盆栽试验。将自然土(未栽参的新林地土壤,使用前去除枯枝落叶等杂质,按照体积比新林地土与蛭石按2:1比例混合均匀,120℃灭菌2小时待用)装入直径为20cm花盆,每盆装土2kg。选择大小一致且生长良好的一年生人参幼苗进行移栽,每盆4株,每处理6盆。移栽30d后,采用伤根灌注法同时接种毁灭柱孢菌和黑附球菌SFF-1孢子悬浮液(实施例4制得),浓度为 $1 \times 10^6 \text{个} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,各菌株每盆各株接种量为15ml。以50%多菌灵可湿性粉剂的1000倍无菌水稀释液为药剂对照,以无菌水为空白对照。每盆4株,每处理6盆,随机排列。接种35d后统计发病程度,调查病情指数,调查结果如表4。

[0128] 对引起人参立枯病的立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)进行盆栽试验。将自然土(未栽参的新林地土壤,使用前去除枯枝落叶等杂质,按照体积比新林地土与蛭石按2:1比例混合均匀,120℃灭菌2小时待用)装入直径为20cm花盆,每盆装土2kg。选择大小一致且生长良好的一年生人参幼苗进行移栽,每盆4株,每处理6盆。移栽30d后,采用针刺涂抹法同时接种立枯丝核菌和黑附球菌SFF-1孢子悬浮液(实施例4制得)于人参的茎,浓度为 $1 \times 10^6 \text{个} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,各菌株每盆各株接种量为15ml。以50%多菌灵可湿性粉剂的1000倍无菌水稀释液为药剂对照,以无菌水为空白对照。每盆4株,每处理6盆,随机排列。接种35d后统计发病程

度,调查病情指数,调查结果如表4。

[0129] 对引起人参灰霉病的灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)进行盆栽试验。将自然土(未栽参的新林地土壤,使用前去除枯枝落叶等杂质,按照体积比新林地土与蛭石按2:1比例混合均匀,120℃灭菌2小时待用)装入直径为20cm花盆,每盆装土2kg。选择大小一致且生长良好的一年生人参幼苗进行移栽,每盆4株,每处理6盆。移栽30d后,采用喷雾法同时接种灰葡萄孢菌和黑附球菌SFF-1孢子悬浮液(实施例4制得)于人参地上部,浓度为 $1 \times 10^6$ 个 $\cdot$  $\text{mL}^{-1}$ ,各菌株每盆各株接种量为15ml。以50%多菌灵可湿性粉剂的1000倍无菌水稀释液为药剂对照,以无菌水为空白对照。每盆4株,每处理6盆,随机排列。接种35d后统计发病程度,调查病情指数,调查结果如表4。

[0130] 表4黑附球菌SFF-1对上述人参真菌性病害的盆栽防效试验

处理	毁灭柱孢菌		立枯丝核菌		灰葡萄孢菌	
	病情指数	相对防效 (%)	病情指数	相对防效 (%)	病情指数	相对防效 (%)
[0131] 无菌水+病原菌	62.33	-	67.88	-	90.33	-
多菌灵+病原菌	23.88	61.69	28.33	58.26	35.45	60.76
SFF-1+病原菌	21.34*	65.76*	26.56*	60.87*	32.33*	64.21*

[0132] 注:\*示于多菌灵对照组和无菌水对照组皆存在显著性差异, $p < 0.05$

[0133] 防效试验计算方法:病情指数= $[\sum(\text{各级病株数} \times \text{代表值}) / (\text{总株数} \times \text{最高病级代表值})] \times 100$ ,防治效果= $(\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}) / \text{对照区病情指数} \times 100$

[0134] 如表4所示,黑附球菌SFF-1对由毁灭柱孢菌引起的人参锈腐病、立枯丝核菌引起的人参立枯病和灰葡萄孢菌引起的人参灰霉病有显著( $p < 0.05$ )的防效,防效结果与上述病害使用对照药剂相当或略优。

[0135] 以上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。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 中国农业科学院特产研究所

&lt;120&gt; 黑附球菌及其应用

&lt;130&gt; MP1612033

&lt;160&gt; 1

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 545

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

cgtaacaagg ttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tacctagagt ttgtagactt	60
cggtctgcta cctettacc atgtcttttg agtacctteg ttctcteggc gggtccegcc	120
gccgattgga caacattcaa accctttgca gttgcaatca gcgtctgaaa aaacataata	180
gttacaactt tcaacaacgg atctcttggg tctggcatcg atgaagaacg cagcgaaatg	240
cgataagtag tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac gcacattgcg	300
ccccttggtg ttccatgggg catgcctgtt cgagcgtcat ttgtaccttc aagctctgct	360
tggtgttggg tgttgtctc gcctctgctg gtagactcgc cttaaaacaa ttggcagccg	420
gcgtattgat ttcggagcgc agtacatctc gcgctttgca ctcataacga cgacgtccaa	480
aagcacattt ttacactctt gacctcggat caggtaggga taccgctga acttaagcat	540
atcaa	545

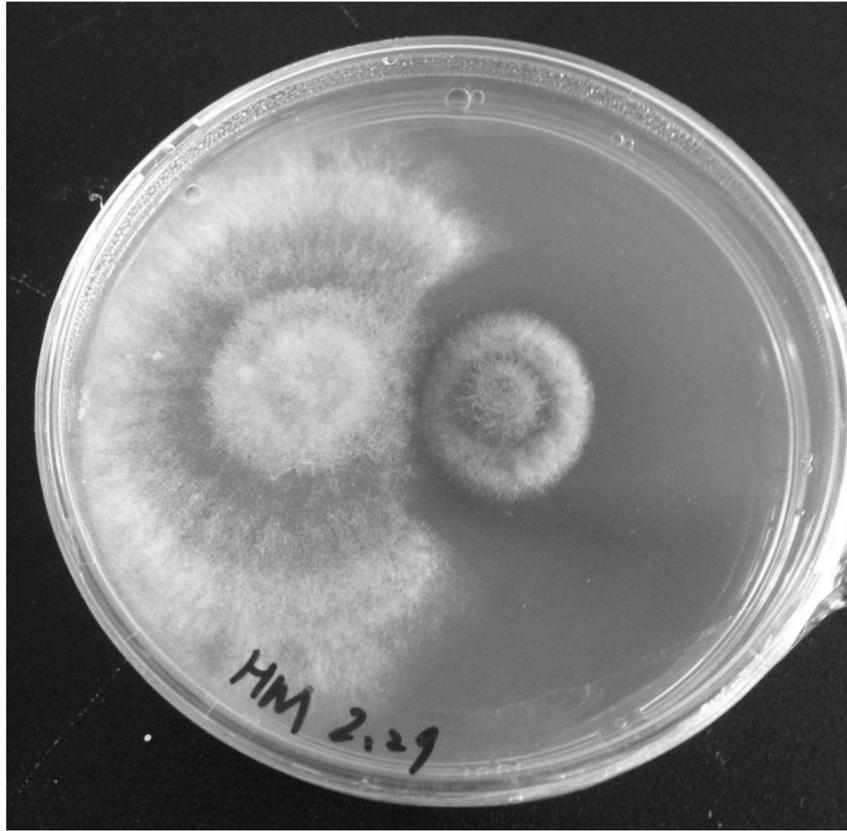


图1

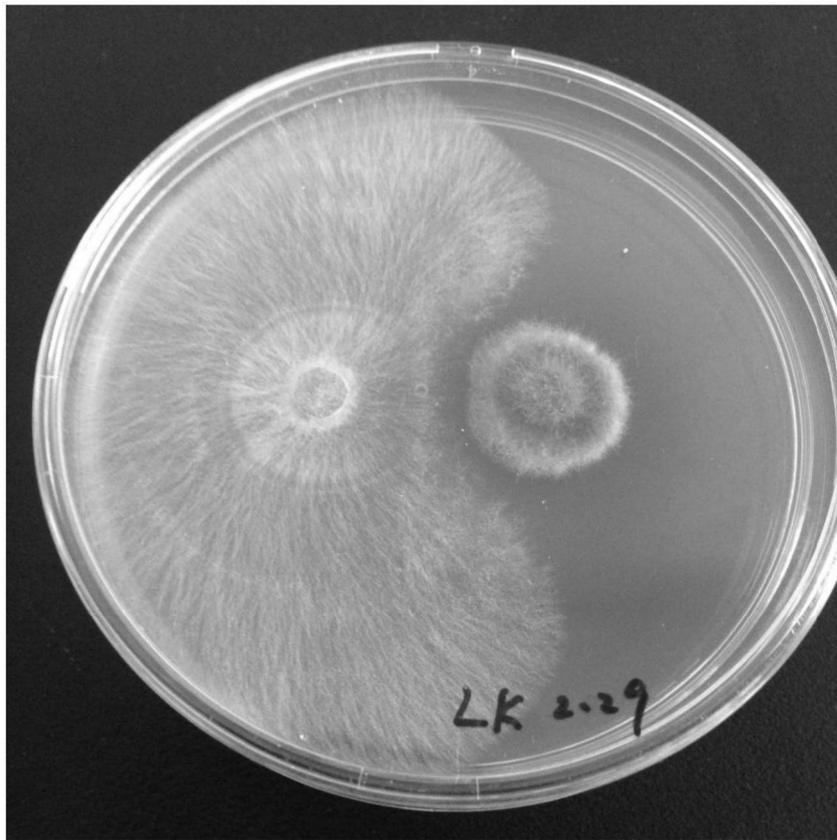


图2

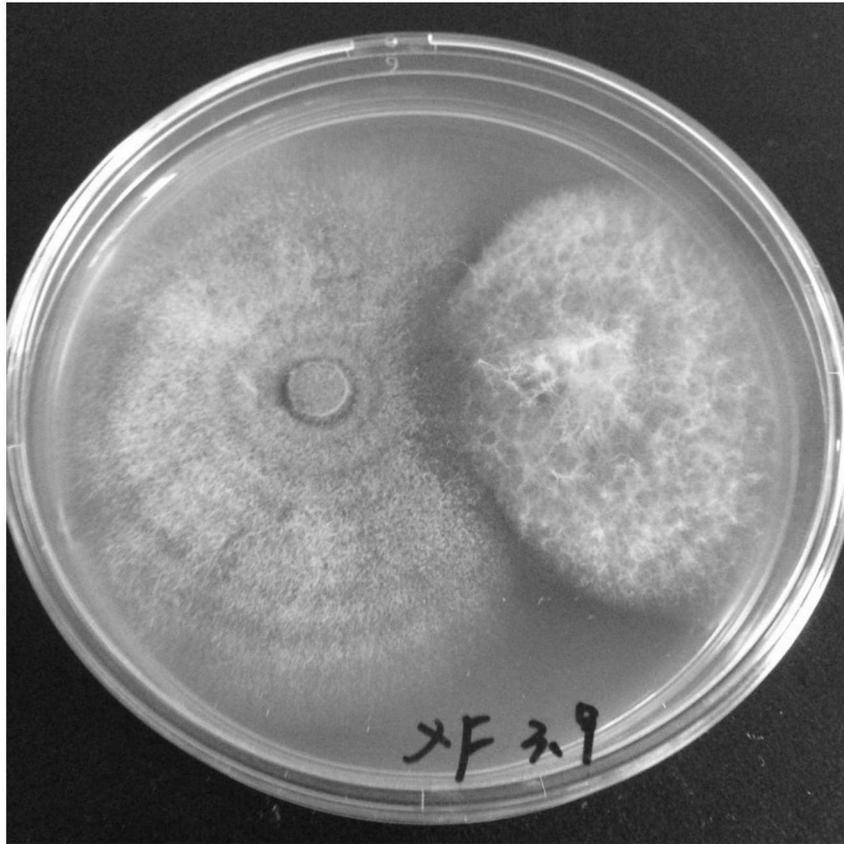


图3

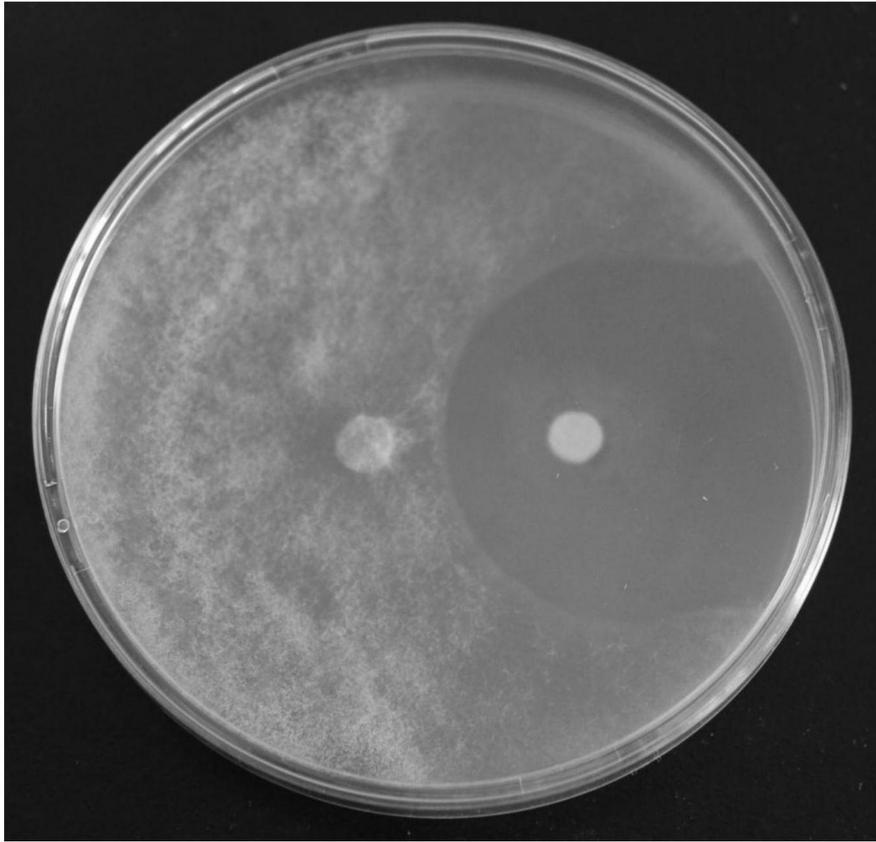


图4

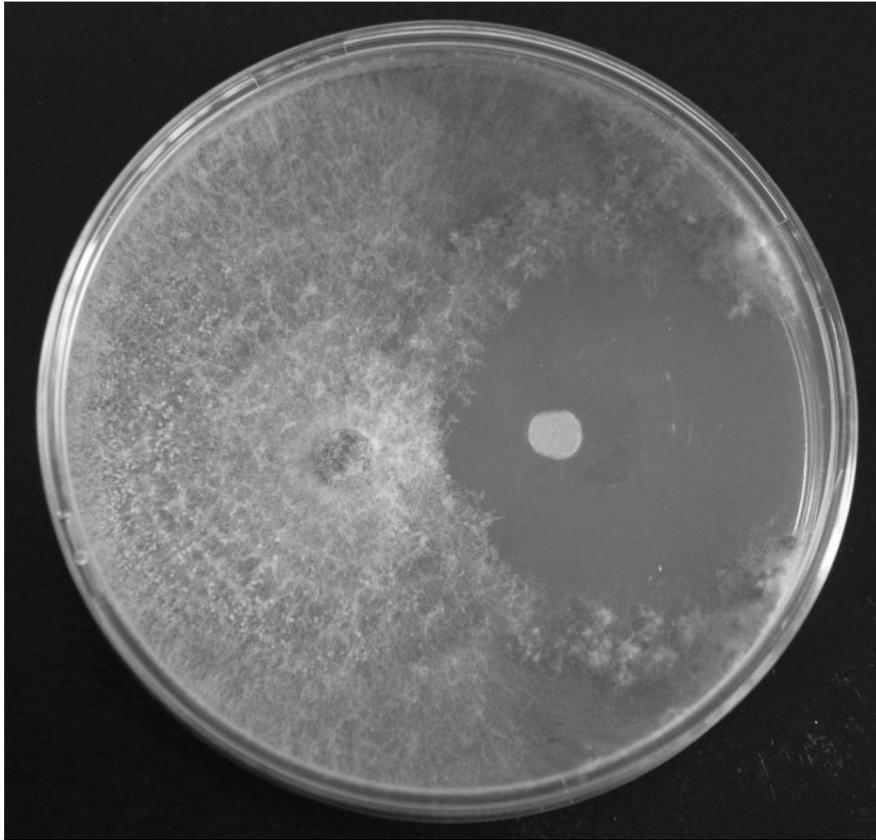


图5

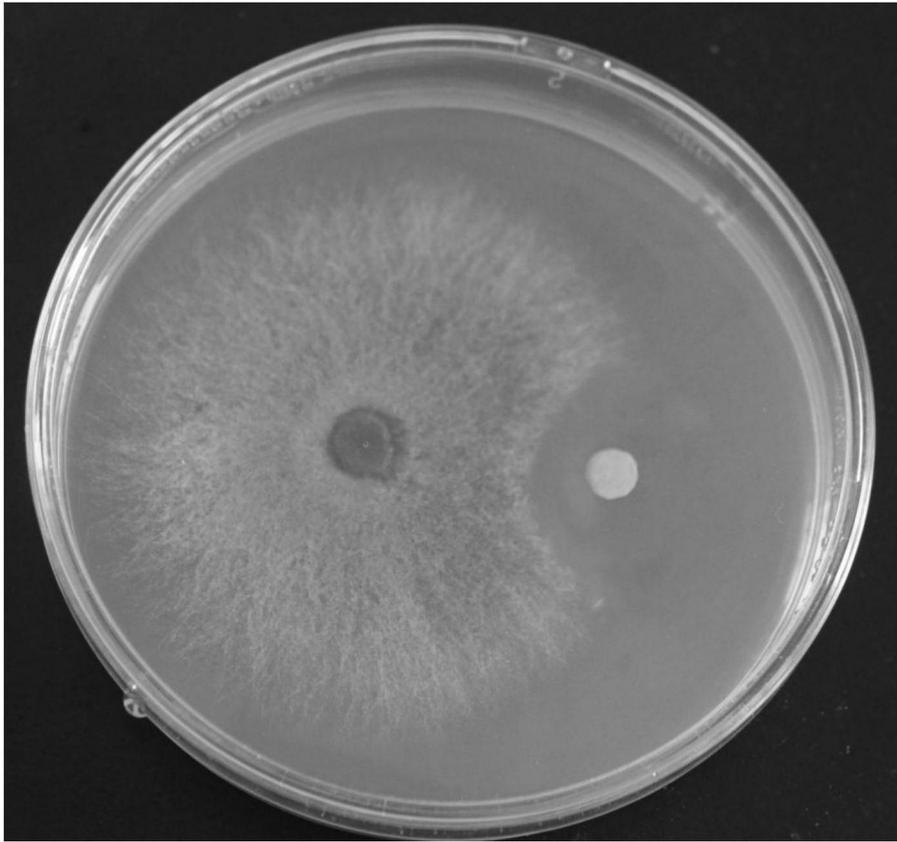


图6