



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108294049 B

(45)授权公告日 2019.07.19

(21)申请号 201810053675.0

(22)申请日 2018.01.19

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 108294049 A

(43)申请公布日 2018.07.20

(73)专利权人 江西省科学院微生物研究所  
地址 330000 江西省南昌市青山湖区上坊路108号

专利权人 江西绿悦生物工程股份有限公司

(72)发明人 熊大维 金丹凤 黄国昌 顾斌涛  
李鹏 黄筱萍 刘兰

(74)专利代理机构 南昌智旭知识产权代理事务所(普通合伙) 36138  
代理人 周超

(51)Int.Cl.

A01N 63/02(2006.01)

A01P 1/00(2006.01)

C12N 1/20(2006.01)

C12R 1/12(2006.01)

审查员 曹艳

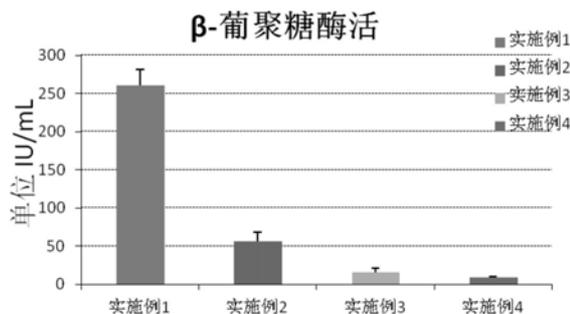
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

## (54)发明名称

一种治疗柑橘黄龙病的多粘类芽孢杆菌培养液复合药物及其制备方法

## (57)摘要

本发明涉及一种以多粘类芽孢杆菌培养液为主要成分的柑橘黄龙病治疗药物,其组成为多粘类芽孢杆菌培养液10%、苯乳酸0.02%、MS培养基50%、水39.98%、pH为6.0。多粘类芽孢杆菌培养液配方为豆粕10克/升、微晶纤维素5克/升、硫酸镁0.1克/升、硫酸锰0.1克/升、pH=7.0,培养条件为28℃、摇床转速220转/分钟、培养48小时。本发明采用微晶纤维素作为唯一培养碳源,诱导了β-葡聚糖酶的生物合成,培养液中其酶活达到了261IU/mL,以该培养液为主,苯乳酸和MS为辅的药物对柑橘进行治疗,荧光定量PCR检测结果表明显著减少柑橘黄龙病病菌在病株中的含量以及黄龙病的康复。



1. 一种柑橘黄龙病治疗药物,其特征在于:制备方法为:首先制备多粘类芽孢杆菌培养液,其培养基成分为豆粕10克/升、微晶纤维素5克/升、硫酸镁0.1克/升、硫酸锰0.1克/升、pH=7.0,接种1毫升美国标准生物品收藏中心ATCC7070多粘类芽孢杆菌菌种至200毫升上述培养基,培养条件为28℃、摇床转速220转/分钟、培养48小时;培养48小时后,采用20000g的离心力对培养液离心,取离心上清100克、加入0.2克苯乳酸、加入500毫升MS培养基、用去离子水调配至1000mL并调节pH为 6.0,混匀,即可。

2. 如权利要求1所述的一种柑橘黄龙病治疗药物,其特征在于:所述柑橘黄龙病治疗药物采用树干输液的方法施药。

## 一种治疗柑橘黄龙病的多粘类芽孢杆菌培养液复合药物及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种以多粘类芽孢杆菌培养液为主要成分的柑橘黄龙病治疗药物，属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 柑橘黄龙病是一种柑橘类植物的毁灭性病害，目前还没有有效的抑制药剂。该病害的致病菌是一种迄今尚不能人工培养的韧皮部杆菌属细菌（*Candidatus Liberibacter*）。

[0003] 该病害防治的难点在于，致病菌无法获得人工培养，因为缺少该病害的目标菌，故无法筛选出针对性的杀菌药剂。

[0004] 目前对该病害的防治均使用一种或几种复配的抗生素类的杀菌药剂，此类药剂具有广谱杀菌性，对植物和环境生态破坏严重，目前实际使用中效果不理想。

[0005] 植物内生菌在高等植物中普遍存在。由于植物内生菌和植物存在着共生关系，因此有关植物内生菌的研究正成为国内外环境、生物防治等领域的热点。虽然柑橘黄龙病菌无法培养，但是可以找到其伴生菌，以黄龙病菌的伴生菌为筛选抑菌药物的指示菌，此种方法可以有目的性的筛选出有效的抑菌药剂。

[0006] 通过该方法筛选出的抑菌剂存在专有性，通过杀灭黄龙病菌的伴生菌改变了植物微生态环境，而植物微生态环境的改变可以抑制黄龙病菌的生长、繁殖，从而达到杀灭该病菌的目的。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种以多粘类芽孢杆菌培养液为主要成分的柑橘黄龙病治疗药物，通过杀灭黄龙病菌的伴生菌来抑制黄龙病菌的生长、繁殖。

[0008] 本发明采用的技术方案为：

[0009] 一种柑橘黄龙病治疗药物，其制备方法为：首先制备多粘类芽孢杆菌培养液，其培养基成分为豆粕10克/升、微晶纤维素5克/升、硫酸镁0.1克/升、硫酸锰0.1克/升、pH=7.0，接种1毫升多粘类芽孢杆菌菌种至200毫升上述培养基，培养条件为28℃、摇床转速220转/分钟、培养48小时。培养48小时后，采用20000g的离心力对培养液离心，取离心上清100克、加入0.2克苯乳酸、加入500毫升MS培养基、用去离子水调配至1000mL并调节pH为6.0，混匀，即可。所述柑橘黄龙病治疗药物采用树干输液的方法施药。

[0010] 本发明以黄龙病菌的伴生菌为指示菌筛选出以富含β-葡聚糖酶的多粘类芽孢杆菌培养液为主的药剂，苯乳酸和MS培养基为辅助成分，在无法获得人工培养致病菌的情况下，这是柑橘黄龙病防治的一条有效途径。

[0011] 苯乳酸作为一种发酵有机酸，存在于天然蜂蜜中，是一种新型的小分子抗菌物质，对抑制霉菌、腐败菌上有相关的研究，主要用在食物保鲜。对于果树内生菌的抑菌研究未见报导，对本专利中涉及的细杆菌属（*Microbacterium*）、代尔夫特菌属（*Delftia*），不动

杆菌属(Acinetobacter)、假单胞菌属(Pseudomonas)、伯克霍尔德菌属(Burkholderia),5个菌株未见相关的抑菌研究和应用。

[0012] 本发明的优点在于:

[0013] 多粘类芽孢杆菌培养液中富含 $\beta$ -葡聚糖酶, $\beta$ -葡聚糖酶参与植物的免疫反应,可以和几丁质酶协同抑制真菌和某些细菌的生长。微生物细胞壁主要由葡聚糖结构的高分子组成,在 $\beta$ -葡聚糖酶的作用下降解微生物细胞壁,造成细胞质流失,最终抑制微生物的生长。

[0014] 苯乳酸是通过发酵获得的天然有机酸,存在于天然蜂蜜中,所以有良好的亲自然性,对环境无不良影响。苯乳酸是一种小分子抗菌物质,对多种革兰氏阳性、阴性细菌均有很好的抗菌活性。由于抗生素类药物易导致病原菌产生抗药性,而有机酸则不会。

[0015] MS培养基富含植物所需的各种大量元素以及微量成分,可以为植物提供充足的能量、代谢所需的辅助成分。

[0016] 所述柑橘黄龙病治疗药物制备工艺简单、成本低,可显著抑制柑橘病树中的黄龙病菌,对柑橘黄龙病的防治效果显著。同时具有有良好的亲自然性,对环境无不良影响。

#### 附图说明

[0017] 图1为实施例1-4制得的多粘类芽孢杆菌培养液中 $\beta$ -葡聚糖酶活。

#### 具体实施方式

[0018] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的说明。

[0019] 实施例1:一种多粘类芽孢杆菌培养液制备方法为:培养基成分为豆粕10克/升、微晶纤维素5克/升、硫酸镁0.1克/升、硫酸锰0.1克/升、pH=7.0,接种1毫升多粘类芽孢杆菌菌种(美国标准生物品收藏中心ATCC7070)至200毫升上述培养基,培养条件为28℃、摇床转速220转/分钟、培养48小时。培养48小时后,采用20000g的离心力对培养液离心,取离心上清100克、加入0.2克苯乳酸、加入500毫升MS培养基、用去离子水调配至1000mL并调节pH为6.0,混匀,即可(药剂1)。

[0020] 所述柑橘黄龙病抑菌剂采用树干输液的方法施药。

[0021] 实施例2:一种多粘类芽孢杆菌培养液制备方法为:培养基成分为豆粕10克/升、蔗糖5克/升、硫酸镁0.1克/升、硫酸锰0.1克/升、pH=7.0,接种1毫升多粘类芽孢杆菌菌种(美国标准生物品收藏中心ATCC7070)至200毫升上述培养基,培养条件为28℃、摇床转速220转/分钟、培养48小时。培养48小时后,采用20000g的离心力对培养液离心,取离心上清100克、加入0.2克苯乳酸、加入500毫升MS培养基、用去离子水调配至1000mL并调节pH为6.0,混匀,即可(药剂2)。

[0022] 所述柑橘黄龙病抑菌剂采用树干输液的方法施药。

[0023] 实施例3:一种多粘类芽孢杆菌培养液制备方法为:培养基成分为豆粕10克/升、蔗糖5克/升、硫酸镁0.1克/升、硫酸锰0.1克/升、pH=7.0,接种1毫升多粘类芽孢杆菌菌种(美国标准生物品收藏中心ATCC7070)至200毫升上述培养基,培养条件为28℃、摇床转速220转/分钟、培养48小时。培养48小时后,采用20000g的离心力对培养液离心,取离心上清100克、加入500毫升MS培养基、用去离子水调配至1000mL并调节pH为6.0,混匀,即可(药剂

3)。

[0024] 所述柑橘黄龙病抑菌剂采用树干输液的方法施药。

[0025] 实施例4:一种多粘类芽孢杆菌培养液制备方法为:培养基成分为胰蛋白10克/升、蔗糖5克/升、硫酸镁0.1克/升、硫酸锰0.1克/升、pH=7.0,接种1毫升多粘类芽孢杆菌菌种(美国标准生物制品收藏中心ATCC7070)至200毫升上述培养基,培养条件为28℃、摇床转速220转/分钟、培养48小时。培养48小时后,采用20000g的离心力对培养液离心,取离心上清100克、加入500毫升MS培养基、用去离子水调配至1000mL并调节pH为6.0,混匀,即可(药剂4)。

[0026] 所述柑橘黄龙病抑菌剂采用树干输液的方法施药。

[0027] 实施例5:脐橙果树内生菌抑菌实验

[0028] 试验用果树均来自江西赣州赣县果园(E115°12'N26°04'),随机采取病植株和健康植株的果树枝叶,将果树枝叶处理后,用NB、LB和果树汁液的混合培养基分别进行培养,经过多次摇瓶、涂布、划线培养后,获得7株果树内生菌,进行菌种鉴定,其中edft1#菌株是代尔夫特菌属(Delftia),edft2#、edft3#菌株是不动杆菌属(Acinetobacter),edft4#、edft5#菌株是细杆菌属(Microbacterium),edft6#菌株假单胞菌(Pseudomonas),edft7#伯克霍尔德菌属(Burkholderia)。用实施例1-4制得的柑橘黄龙病抑菌剂(以下描述为:药剂1、药剂2、药剂3、药剂4)和盐酸四环素分别对7种内生菌做抑菌实验。通过对健康、患病果树内生菌高通量测序,比对现有数据发现,代尔夫特菌属(Delftia)和伯克霍尔德菌属(Burkholderia)只在患病植株上发现为黄龙病菌特有的伴生菌。

[0029] 表1药剂1、药剂2、药剂3对比盐酸四环素对内生菌的抑菌效果

[0030]

菌株	edft1# Delftia 菌属	edft2#、edft3# Acinetobacter 菌属	edft4#、edft5# Microbacterium 菌属	edft6# Pseudomonas 菌属	edft7# Burkholderia 菌属
药剂1	++++	+	+++	++	++++
药剂2	+++	+	++	++	+++
药剂3	++	+	++	+	++
药剂4	++	+	++	+	++
盐酸四环素 (0.7g/L)	++++	++++	++++	++++	++++

[0031] 注:“+”表示抑菌圈直径为0.8cm~1.6cm;“++”表示抑菌圈直径为1.6~2.4cm;“+++”表示抑菌圈直径2.4~3cm;“++++”表示抑菌圈直径>3cm。

[0032] 结果表明:盐酸四环素(0.7g/L)对上面所有的菌均有较大的抑菌圈,而药剂1、药剂2对上面所有菌均具有选择性的抑菌作用,且对代尔夫特菌属(Delftia)和伯克霍尔德菌属(Burkholderia)这两株黄龙病特有的伴生菌具有更加良好的抑菌效果,对不动杆菌属(Acinetobacter),假单胞菌(Pseudomonas),细杆菌属(Microbacterium)的抑菌效果一般或无效果,这表明药剂1、药剂2对黄龙病的内生菌具有其专有抑菌性,但药剂2抑菌效果

小于药剂1,而药剂3、药剂 4对筛选出的内生菌基本无效果。

[0033] 实施例6:在患病果园内选取100棵病症明显果树,分为4组,分别用药剂 1、药剂2、药剂3、药剂4树干输液,从8月5日开始施药,每月施药一次, 每次施药1000mL,共计输液4次,果实成熟期停止施药。

[0034] 药剂1组:效果明显,果树黄化病叶明显转绿,果树生长旺盛,果实均正常 成熟,采摘。

[0035] 药剂2组:效果明显,果树黄化病叶明显转绿,果树生长旺盛,果实均正常 成熟,采摘。

[0036] 药剂3组:效果较弱,果树黄化病叶部分转绿,果树生长有所好转,果实大 部分正常成熟。

[0037] 药剂4组:效果较弱,果树黄化病叶部分转绿,果树生长有所好转,果实大 部分正常成熟。。

[0038] 实施例7:选取100棵10年发病柑橘树,并随机分成5组,分别为药剂1、 药剂2、药剂 3、药剂4、对照组(该组为生理盐水)。施药前后分别按照时间 采集植株枝叶样本,采集的样 本提取DNA后,进行实时荧光定量PCR方法测 定植株的黄龙病菌Ct值。

[0039] 表2脐橙中黄龙病菌Ct值随时间的变化(药剂1、2组)

[0040]

分组	0天	30天	60天	90天
药剂1	20.81±0.22 <sup>a</sup>	28.97±0.23 <sup>b</sup>	35.54±0.31 <sup>c</sup>	NA
药剂2	20.74±0.31 <sup>a</sup>	22.92±0.36 <sup>a</sup>	23.82±0.32 <sup>d</sup>	25.52±0.37 <sup>e</sup>
药剂3	20.60±0.21 <sup>a</sup>	22.08±0.24 <sup>a</sup>	22.68±0.28 <sup>a</sup>	22.62±0.33 <sup>a</sup>
药剂4	20.64±0.23 <sup>a</sup>	21.91±0.36 <sup>a</sup>	22.82±0.26 <sup>a</sup>	22.91±0.34 <sup>a</sup>
对照	20.7±0.22 <sup>a</sup>	21.1±0.33 <sup>a</sup>	21.1±0.23 <sup>a</sup>	21.8±0.32 <sup>a</sup>

[0041] 注:不同字母表示有显著差异,NA表示样本在该条件下不能检测出目的基 因

[0042] 结果:施药后的黄龙病菌Ct值与施药前黄龙病菌Ct值在处理前后均有差异, 其中 药剂1、2组对比药剂3、4组的Ct值变化尤为明显。表明输液处理后柑橘 病树中的黄龙病菌 均下降,药剂1、2组的黄龙病菌浓度下降更为明显,尤其药 剂1组治疗90天后植株痊愈,不 能从样本中检测到黄龙病菌目的基因。

[0043] 实施例8:分别对实施例1、实施例2、实施例3和实施例4中多粘类芽孢 杆菌培养液 主要成分进行检测, $\beta$ -葡聚糖酶活采用还原糖比色法测定、参照国 家标准NY/T 911-2004 检测。结果见图1,实施例1制得的多粘类芽孢杆菌培养 液中 $\beta$ -葡聚糖酶活显著高于实施例 2-4,说明本发明所述的培养基配方对多粘类 芽孢杆菌培养液中 $\beta$ -葡聚糖酶酶活有较好的 促进作用。

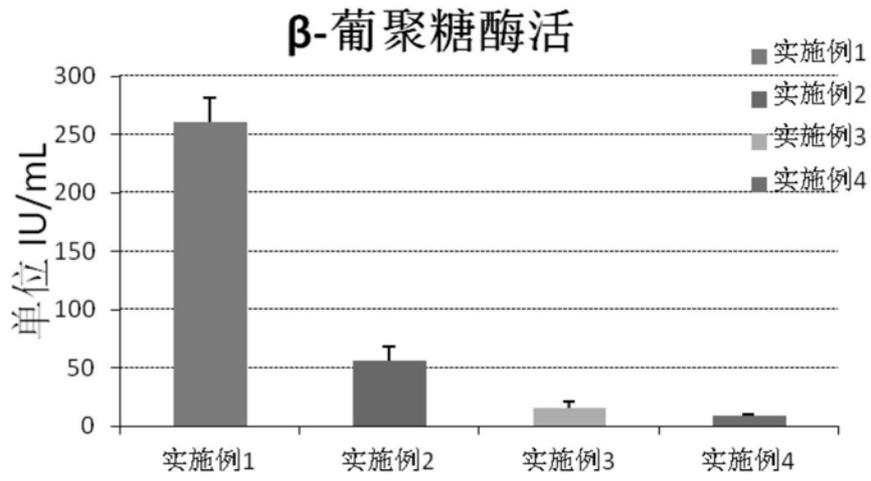


图1