



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104630071 B

(45)授权公告日 2017.12.01

(21)申请号 201410797356.2

(22)申请日 2014.12.22

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104630071 A

(43)申请公布日 2015.05.20

(83)生物保藏信息
CGMCC No.9691 2014.09.19

(73)专利权人 吉林农业大学
地址 130118 吉林省长春市南关区新城大街2888号

(72)发明人 杨利民 肖春萍 韩梅

(74)专利代理机构 北京知元同创知识产权代理
事务所(普通合伙) 11535
代理人 刘元霞

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

A01N 63/04(2006.01)

A01P 3/00(2006.01)

A01P 21/00(2006.01)

C12R 1/645(2006.01)

(56)对比文件

CN 103826454 A,2014.05.28,

WO 2008088771 A2,2008.07.24,

惠有为等.木霉在植物真菌病害防治上的作用.《西北农业学报》.2003,第12卷(第03期),96-99.

审查员 奚静

权利要求书1页 说明书11页
序列表1页 附图10页

(54)发明名称

一株多孢木霉及其应用

(57)摘要

本发明公布一株多孢木霉(*Hypocrea pachybasioides*)FSR-97菌株,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,保藏日:2014年9月19日,其保藏号为CGMCC No.9691。所述菌株在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上25℃培养生长较快,单孢子萌发形成白色菌落,菌落背面从无色过渡到黄色。多孢木霉(*Hypocrea pachybasioides*)FSR-97对引起人参根腐病、疫病、菌核病、锈腐病、黑斑病、立枯病和灰霉病的主要病原菌具有高效广谱抑菌作用。本发明还提供多孢木霉(*Hypocrea pachybasioides*)FSR-97在防治植物真菌病害中的多种生防作用机制和应用,以及在制备防治植物真菌病害的微生物制剂中的应用。

1. 一株多孢木霉 (*Hypocrea pachybasioides*) FSR-97, 其特征在于, 其保藏编号为 CGMCC No.9691。

2. 如权利要求1所述的多孢木霉FSR-97, 其特征在于, 该菌株在马铃薯葡萄糖琼脂培养基平板上25℃培养生长较快, 单孢子萌发形成白色菌落, 菌落背面从无色过渡到黄色, 孢子簇形成紧密的簇状, 白色到黄绿色, FSR-97分生孢子梗常聚集成簇状, 分枝密集, 较粗, 瓶梗短粗较拥挤, 分生孢子淡绿色, 壁光滑, 椭圆形或近球形, 直径为2.3~3.6 μm ; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基配方为: 土豆200g/L, 葡萄糖10g/L, 琼脂15g/L, 蒸馏水1000mL, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 青霉素, pH为6.8~7.2, 121℃湿热灭菌30min。

3. 如权利要求1或2所述的多孢木霉FSR-97在防治植物真菌病害中的应用, 其特征在于, 所述植物为人参。

4. 如权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述真菌为腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*)、毁灭柱孢菌 (*Cylindrocarpon destructans*)、人参链格孢菌 (*Alternaria panax*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、恶疫霉菌 (*Phytophthora cactorum*)、灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea* Pers.) 和人参核盘菌 (*Sclerotinia schinseng*) 7种病原菌中的一种或多种。

5. 如权利要求3或4所述的应用, 其特征在于, 多孢木霉FSR-97通过竞争、重寄生及产生抑菌物质达到抑菌目的。

6. 一种微生物制剂, 其特征在于, 含有权利要求1或2所述的多孢木霉FSR-97孢子的全培养液和培养物, 孢子含量为 $3 \times 10^5 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

7. 如权利要求6所述的微生物制剂, 其特征在于, 其是通过以下制备方法制备得到的:

(1) 将多孢木霉FSR-97试管斜面种活化, 取2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中, 在170r/min, 25℃下培养48h, 获得种子液;

(2) 将多孢木霉FSR-97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;

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

(4) 将多孢木霉FSR-97培养液在8000r/min离心20min, 过滤, 获得发酵液。

8. 如权利要求7所述的微生物制剂, 其特征在于, 所述马铃薯葡萄糖液体培养基的配方为: 土豆200g/L, 葡萄糖10g/L, 蒸馏水1000mL, pH为6.8~7.2, 121℃湿热灭菌30min, 冷却后备用。

9. 如权利要求7或8所述的微生物制剂, 其特征在于, 所述马铃薯葡萄糖液体培养基是这样配制的: 称取200g土豆切块后放入1000mL水中, 煮沸至土豆块变软, 过滤得滤液, 滤液中加入10g葡萄糖充分混匀, 定容, 1000mL三角瓶中装量为300mL培养液, 用双层封口膜封好三角瓶口, 121℃湿热灭菌30min, 冷却后用于接种。

10. 如权利要求6-9中任一项所述的微生物制剂在防治人参真菌病害中的应用。

11. 如权利要求10所述的应用, 其特征在于, 所述真菌为毁灭柱孢菌 (*Cylindrocarpon destructans*) 和人参链格孢菌 (*Alternaria panax*) 中的一种或多种。

12. 如权利要求11所述的应用, 其特征在于, 在人参真菌病害发病初期, 将所述微生物制剂的稀释液均匀地施加到土壤中或喷洒于植物茎叶部, 所述稀释液中微生物制剂含孢量为 $3 \times 10^5 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

一株多孢木霉及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株多孢木霉及其应用。

背景技术

[0002] 人参(*Panax ginseng* C.A. Mey)为五加科人参属多年生宿根阴性双子叶药用植物,是我国名贵药材,有“百草之王”的美誉。人参在中国、韩国、朝鲜、俄罗斯等国家有大面积种植,其中,中国东北特别吉林省是人参的主产区,已成为当地的重要支柱产业之一。人参的长期人工种植和品种选育难度大导致人参种质退化、病害严重、质量差、产量低。化学农药的大量使用,导致农药残留和环境污染,降低了人参药材的安全性和商品价值。病害防控问题已成为制约人参产业可持续发展的重大问题之一。

[0003] 人参病害约有20~40种,其中,以下7类病原菌是导致人参常见病害并限制人参产业发展的主要病原菌:由腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)导致的人参根腐病一般发病率在30%左右,严重时六年生人参根腐病造成死亡率可达50%~80%,主要危害春季幼苗根部和根茎部(地表以下茎部),腐烂的参根呈黑褐色湿腐状,后期糟朽状,仅存中空的根皮;恶疫霉菌(*Phytophthora cactorum*)导致的人参疫病严重时发病率可达70%,其症状为发病轻时叶片上产生不规则的暗绿色斑,重者茎叶枯萎,根部腐烂,植株成片枯死,减产严重;人参核盘菌(*Sclerotinia schinseng*)导致的人参菌核病主要危害3年生以上参根,发病部位为芽苞、根和根茎,参根被害后,初期在表面生少许白色绒状菌丝体,以后,内部迅速腐败、软化,细胞全部被消解殆尽,只留下坏死的外表皮,表皮内外形成许多鼠粪状的菌核;人参链格孢菌(*Alternaria panax*)导致人参黑斑病一般发病率20%~30%,严重时达到100%,造成早期落叶,植株枯萎,不结实,参根和参籽减产;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%,严重者可达到40%左右,病菌使幼苗在地面3~5厘米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;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;灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)引起的人参灰霉病发病初期在参根的芽胞上出现褐色斑点,从参根主根的外表上看不出异常现象,但用手掐时,参根内部的组织已变软。发病后期上述两者都表现为软腐症状,并在病部产生灰色的绒毛状霉层,有时可在病根上形成黑色的菌核。

[0004] 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,而且化学农药过量使用不仅会破坏土壤微生态环境,加重环境污染,也使有毒物质在参根内大量积累,降低人参的使用安全性和商品价值。因此,病害防治重点逐步转向生物防治和农业防治措施上。在农作物植物保护领域,利用作物的健株根际土壤筛选对病原菌具有显著生防效果的土壤微生物,并制成微生物菌剂是生物防控研究的重要手段之一,也是有益微生物资源开发利用的重要途径。

[0005] 生物防治是以生态学原理为基础,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污染环境,没有农药残留,这是农药等非生物方法防治病虫害所无法比拟的。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植保、环境和能源方面的问题,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。木霉菌*Trichoderma*是国际上应用非常普遍的生防真菌。目前国际上五大洲60多个国家使用100多种含有木霉菌成分的生物制剂产品。其中,美国Topshield(哈茨木霉T22菌株)和以色列Trichodex(哈茨木霉T39菌株)已被广泛应用于植物土传病害生物防治中,我国也有类似的产品登记,如特立克和灭菌灵。

[0006] 木霉菌(*Trichoderma* sp.)是植物病害生物防治研究中的重要微生物之一,其种类多分布广,是土壤和植物微生态的优势种群。该类微生物通过生长竞争,重寄生和分泌抗生物质,在防治植物病害方面发挥多种有益作用。目前研究的拮抗木霉种类较多,包括钩状木霉(*Trichoderma hamatum*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)、长枝木霉(*Trichoderma longibranchiatum*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)以及归为粘帚霉属的绿粘帚霉(*Gliocladium virens*)等,而利用多孢木霉(*Trichoderma polysporum*)防治植物真菌性病害未见报道。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于:针对人参生产中的主要真菌性病害,尤其是人参土传病害发生面积日益扩大,化学药剂防治除易造成环境污染和农药残留外,防效也不理想的实际情况,提出一株多孢木霉(*Trichoderma polysporum*) FSR-97及其在分别引起人参根腐病、锈腐病、黑斑病、立枯病、疫病、菌核病和灰霉病的腐皮镰孢菌(*F. solani*)、毁灭柱孢菌(*C. destructans*)、人参链格孢菌(*A. panax*)、立枯丝核菌(*R. solani*)、恶疫霉菌(*P. cactorum*)、人参核盘菌(*S. schinseng*)和灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)7种病原菌防控上的应用。

[0008] 本发明提供了一种对上述引起人参根腐病、锈腐病、黑斑病、立枯病、疫病、菌核病和灰霉病的7种病原真菌均具有良好防控作用的多孢木霉FSR-97,该菌株的保藏名称为多孢木霉FSR-97,分类命名为多孢木霉(*Hypocrea pachybasioides*),保藏单位为:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏日期:2014年9月19日,保藏编号:CGMCC No.9691,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。

[0009] 本发明提出的多孢木霉FSR-97菌株鉴定采用传统形态鉴定技术及现代rDNA-ITS序列分析技术。FSR-97在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上25℃培养生长较快,单孢子萌发形成白色菌落,菌落背面从无色过渡到黄色。孢子簇形成紧密的簇状,白色到黄绿色。FSR-97分生孢子梗常聚集成簇状,分枝密集,较粗。瓶梗短粗较拥挤。分生孢子淡绿色,壁光滑,椭圆形或近球形,直径为2.3~3.6 μm。所述的马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)配方为:土豆200 g/L,葡萄糖10 g/L,琼脂15 g/L,蒸馏水1000 mL,2 μg/mL青霉素,pH为6.8~7.2。

[0010] 本发明提出的多孢木霉FSR-97的rDNA-ITS序列长度为645 bp,具体如SEQ ID No:1所示。应用BLAST和DNAMAN等软件进行分析,将菌株FSR-97的ITS序列通过BLAST比对,能在GenBank中找到同源性非常高的相近菌株序列。与FSR-97菌株相似性最高的是*Hypocrea*

pachybasioides, 同源性达到99%。根据MEGA6.06软件以UPGMA 法构建系统发育树发现, FSR-97与*Hypocrea pachybasioides*同属一个遗传分枝, 亲缘关系十分接近, 亲源性达到100%。结合形态学分类和分子生物学鉴定结果, 可以确认本发明的菌株FSR-97为多孢木霉(*Hypocrea pachybasioides*)。

[0011] 本发明涉及多孢木霉FSR-97在防治植物真菌病害中的应用, 所述植物优选为人参, 所述真菌优选为引起人参根腐病的腐皮镰孢菌(*F. solani*)、引起人参锈腐病的毁灭柱孢菌(*C. destructans*)、引起人参黑斑病的人参链格孢菌(*A. panax*)、引起人参立枯病的立枯丝核菌(*R. solani*)、引起人参疫病的恶疫霉菌(*P. cactorum*)、引起人参菌核病的人参核盘菌(*S. schinseng*)和引起人参灰霉病的灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)这7种病原菌中的一种或多种。

[0012] 本发明还涉及多孢木霉FSR-97在防治植物真菌病害中的防病机理, 所述植物优选为人参, 所述真菌优选为引起人参根腐病的腐皮镰孢菌(*F. solani*)、引起人参锈腐病的毁灭柱孢菌(*C. destructans*)、引起人参黑斑病的人参链格孢菌(*A. panax*)、引起人参立枯病的立枯丝核菌(*R. solani*)、引起人参疫病的恶疫霉菌(*P. cactorum*)和引起人参灰霉病的灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)。多孢木霉FSR-97通过竞争作用抢占空间位置和营养物质有效抑制人参病原菌菌丝生长; 通过重寄生作用及分泌抑菌活性物质导致病原菌菌丝及其分生孢子畸形, 抑制病原菌生长及孢子萌发。

[0013] 本发明涉及一种多孢木霉FSR-97的微生物制剂, 其可通过以下方法制备得到: (1) 将多孢木霉FSR-97试管斜面种活化, 取2个5 mm菌饼接种于用250 mL三角瓶装的100 mL马铃薯葡萄糖(PDB)液体培养基中, 在170 r/min, 25 °C下培养48 h, 获得种子液; (2) 将多孢木霉FSR-97种子液以10%(体积比)接种于发酵培养液中培养, 在170 r/min, 25°C下培养96 h, 获得培养液; (3) 将培养液经2层无菌纱布过滤, 滤液经血球计数板计数, 将孢子悬浮液分散至6 g·L⁻¹羧甲基纤维素钠(CMC)溶液中, 得孢子悬浮液, 孢子含量为3×10⁵ cfu·mL⁻¹; (4) 将多孢木霉FSR-97培养液在8000 r/min离心20 min, 过滤, 上清即为发酵液。

[0014] 本发明的多孢木霉FSR-97及其发酵液对人参具有田间防病和促生长的作用。

[0015] 本发明的优点在于, 保藏编号为CGMCC No.9691的多孢木霉FSR-97对分别引起人参根腐病、锈腐病、黑斑病、立枯病、疫病、菌核病和灰霉病的腐皮镰孢菌(*F. solani*)、毁灭柱孢菌(*C. destructans*)、人参链格孢菌(*A. panax*)、立枯丝核菌(*R. solani*)、恶疫霉菌(*P. cactorum*)、人参核盘菌(*S. schinseng*)和灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)等7种病原菌具有不同程度的防治效果, 对峙培养时对人参病原菌生长抑制率达47.62%~67.48%, 发酵液培养时对人参病原菌生长抑制率达30.41%~71.85%, FSR-97的发酵液对人参具有促生长作用, 无毒无致病性, 对人畜安全, 不污染环境; 同时, 生防菌株FSR-97孢子悬浮液直接施加到土壤中对植物进行灌根或进行涂叶处理即可发挥其抑菌、杀菌作用, 能显著改善人参根际微生物群落结构, 形成一个生物多样化的人参根际土壤微生态环境, 从而有效持久地控制人参真菌性病害的发生。

附图说明

[0016] 图1: 本发明的多孢木霉FSR-97菌株对毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)菌丝的生长平板抑制作用。

[0017] 图2:本发明的多孢木霉FSR-97菌株对腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*) 菌丝的生长平板抑制作用。

[0018] 图3:本发明的多孢木霉FSR-97菌株对人参链格孢菌 (*Alternaria panax*) 菌丝的生长平板抑制作用。

[0019] 图4:本发明的多孢木霉FSR-97菌株对人参核盘菌 (*Sclerotinia schinseng*) 菌丝的生长平板抑制作用。

[0020] 图5:本发明的多孢木霉FSR-97菌株对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 菌丝的生长平板抑制作用。

[0021] 图6:本发明的多孢木霉FSR-97菌株对恶疫霉菌 (*Phytophthora cactorum*) 菌丝的生长平板抑制作用。

[0022] 图7:本发明的多孢木霉FSR-97菌株对灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 菌丝的生长平板抑制作用。

[0023] 图8:本发明的多孢木霉FSR-97菌株抑制腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*) 菌丝生长的显微观察。

[0024] 图9:本发明的多孢木霉FSR-97菌株抑制恶疫霉菌 (*Phytophthora cactorum*) 菌丝生长的显微观察。

[0025] 图10:本发明的多孢木霉FSR-97菌株抑制立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 菌丝生长的显微观察。

[0026] 图11:本发明的多孢木霉FSR-97菌株抑制毁灭柱孢菌 (*Cylindrocarpon destructans*) 菌丝生长的显微观察。

[0027] 图12:本发明的多孢木霉FSR-97菌株抑制人参链格孢菌 (*Alternaria panax*) 菌丝生长的显微观察。

[0028] 图13:本发明的多孢木霉FSR-97菌株抑制灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 菌丝生长的显微观察。

[0029] 图14:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液对毁灭柱孢菌 (*Cylindrocarpon destructans*) 菌丝生长的抑制作用。

[0030] 图15:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液对腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*) 菌丝生长的抑制作用。

[0031] 图16:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液对人参链格孢菌 (*Alternaria panax*) 菌丝生长的抑制作用。

[0032] 图17:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 菌丝生长的抑制作用。

[0033] 图18:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液对恶疫霉菌 (*Phytophthora cactorum*) 菌丝生长的抑制作用。

[0034] 图19:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液对灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 菌丝生长的抑制作用。

[0035] 图20:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液抑制腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*) 菌丝生长的显微观察。

[0036] 图21:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液抑制恶疫霉菌 (*Phytophthora*

cactorum) 菌丝生长的显微观察。

[0037] 图22:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液抑制人参链格孢菌 (*Alternaria panax*) 菌丝生长的显微观察。

[0038] 图23:本发明的多孢木霉FSR-97菌株发酵液抑制腐皮镰孢菌 (*Fusarium solani*) 孢子萌发的显微观察。

[0039] 图24:本发明的多孢木霉FSR-97菌株对人参的促生长作用(A:空白液体培养基,B:浇注多孢木霉FSR-97发酵液)。

[0040] 图25:本发明的多孢木霉FSR-97菌株对毁灭柱孢菌引起的人参锈腐病的防治效果(A:无菌水灌根,B:多孢木霉FSR-97孢子悬浮液灌根)。

[0041] 图26:本发明的多孢木霉FSR-97菌株对人参链格孢菌引起的人参黑斑病的防治效果(A:无菌水涂抹叶片,B:多孢木霉FSR-97孢子悬浮液涂抹叶片)。

具体实施方式

[0042] 实施例1 多孢木霉 (*Hypocrea pachybasioides*)FSR-97菌株的分离和保藏

[0043] 该菌株自吉林省抚松县榆树人参栽培地多年生人参健株的根际土壤分离得到。采集上述土壤样品,去除表面枯落物后过2 mm筛。称取新鲜土壤样品10 g,放入装有玻璃珠和90 mL无菌生理盐水的三角瓶中,充分振荡30 min,使样品与无菌水混合均匀,制得土壤悬浊液。在无菌条件下取1 mL振荡液,加入9 mL 无菌生理盐水,按梯度依次制成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的稀释液。分别吸取100 μ L各稀释液加入到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上,采用平板稀释法均匀涂布,每处理3次重复,25 $^{\circ}$ C培养箱培养7 d。挑选单菌落转接到马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板培养长出菌落后,采用单孢分离法进行分离纯化,纯化菌株于4 $^{\circ}$ C保存。

[0044] 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)配方为:土豆200 g/L,葡萄糖10 g/L,琼脂15 g/L,蒸馏水1000 mL,2 μ g/mL青霉素,pH为6.8~7.2。

[0045] 该菌株在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板上25 $^{\circ}$ C培养生长较快,单孢子萌发形成白色菌落,菌落背面从无色过渡到黄色。孢子簇形成紧密的簇状,白色到黄绿色。FSR-97分生孢子梗常聚集成簇状,分枝密集,较粗。瓶梗短粗较拥挤。分生孢子淡绿色,壁光滑,椭圆形或近球形,直径为2.3~3.6 μ m。

[0046] 该菌株于2014年9月19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,保藏编号为CGMCC No.9691。该菌株我们命名为FSR-97,分类命名为*Hypocrea pachybasioides*,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。

[0047] 实施例2 多孢木霉FSR-97菌株对引起人参真菌病害的7种病原菌的抑制作用

[0048] 采用3点杯碟对峙,生长速率法测定菌株FSR-97对人参7种病原菌的抑制作用:用直径5 mm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(直径90 mm)的正中央,在距病原菌2.5 cm处的3方各接入一个待测菌(FSR-97)的菌饼,另1方为空白,作为处理组,每个处理重复3次;另在一块PDA平板只接种人参病原菌,作为对照组,均置于25 $^{\circ}$ C培养箱培养7 d,待对照组病原菌菌落长满平板,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。每种病原菌重复3次,结果取平均值。抑菌率(%) = (对照病原菌菌落扩展半径 - 与生防真菌对峙培养的病原菌菌落扩展半径) / 对照病原菌菌落扩展半径 \times 100%

原菌菌落扩展半径)/对照病原菌菌落扩展半径×100%

[0049] 结果如表1所示,菌株FSR-97对分别引起人参根腐病、锈腐病、黑斑病、立枯病、疫病、菌核病和灰霉病的腐皮镰孢菌(*F. solani*)、毁灭柱孢菌(*C. destructans*)、人参链格孢菌(*A. panax*)、立枯丝核菌(*R. solani*)、恶疫霉菌(*P. cactorum*)、人参核盘菌(*S. schinseng*)和灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)7种病原菌均具有抑制作用。特别是对引起人参立枯病的立枯丝核菌、引起人参疫病的恶疫霉菌和引起人参菌核病的人参核盘菌的抑菌率为66.67%~73.33%,对引起人参锈腐病的毁灭柱孢菌的抑菌率达到59.09%,对引起黑斑病的人参链格孢菌、引起人参根腐病的腐皮镰孢菌和引起人参灰霉病的灰葡萄孢菌的抑菌率达到47.62%~57.89%,反映出菌株FSR-97对人参7种主要病原菌的防治作用具有广谱性(表1)。

[0050] 表1 多孢木霉FSR-97对人参病原真菌的抑制作用

生防菌株	人参链格孢菌	立枯丝核菌	毁灭柱孢菌	腐皮镰孢菌	恶疫霉菌	人参核盘菌	灰葡萄孢菌
	<i>A. panax</i>	<i>R. solani</i>	<i>C. destructans</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>S. schinseng</i>	<i>B. cinerea</i>
FSR-97	52.38±5.59 ^a	68.15±1.48 ^{ab}	59.09±2.65 ^{bc}	47.62±2.52 ^c	73.33±1.67 ^b	66.67±2.75 ^{bc}	57.89±3.84 ^c

[0052] 实施例3 多孢木霉FSR-97培养液,孢子悬浮液及发酵液的制备

[0053] 将多孢木霉FSR-97试管斜面种活化,取2个5 mm菌饼接种于用250 mL三角瓶装的100 mL马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)中,在170 r/min,25 °C下培养48 h,获得种子液;将多孢木霉FSR-97种子液以10%(体积比)接种于发酵培养液中培养,在170 r/min,25 °C下培养96 h,获得培养液;将多孢木霉FSR-97培养液经2层无菌纱布过滤,滤液经血球计数板计数,将孢子悬浮液分散至6 g·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3×10⁵ cfu·mL⁻¹;将多孢木霉FSR-97培养液在8000 r/min离心20 min,上清即为发酵液;发酵液经0.45 μm微孔滤膜过滤,获得FSR-97菌株无菌发酵液。马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)的制备方法:土豆200 g/L,葡萄糖10 g/L,蒸馏水1000 mL,pH为6.8~7.2。1000 mL三角瓶中装量为300 mL培养液,用双层封口膜封好三角瓶口,121 °C湿热灭菌30 min,冷却后备用。

[0054] 实施例4 多孢木霉FSR-97菌株发酵液对引起人参真菌病害的6种病原菌的抑制作用

[0055] 采用含毒介质培养,生长速率法测定多孢木霉FSR-97发酵液对引起人参真菌病害病菌的抑制作用:按实施例3制备FSR-97菌株无菌发酵液,将多孢木霉FSR-97无菌发酵液与马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)按1:4比例混合均匀,配制成含药培养基,然后将人参病原菌菌饼置于含药培养基中央,以混合无菌水作空白对照,每个处理5次重复,25 °C下恒温培养,6 d后测量菌落半径并计算抑菌率。计算方法同实施例2。

[0056] 结果如表2所示,多孢木霉FSR-97发酵液对分别引起人参根腐病、锈腐病、黑斑病、立枯病、疫病和灰霉病的腐皮镰孢菌(*F. solani*)、毁灭柱孢菌(*C. destructans*)、人参链格孢菌(*A. panax*)、立枯丝核菌(*R. solani*)、恶疫霉菌(*P. cactorum*)和灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)6种病原菌产生不同程度的抑制作用。其中,对引起人参立枯病的立枯丝核菌抑菌率达到71.58%,对引起人参疫病的恶疫霉菌抑菌率达到70.43%,对毁灭柱孢菌和灰葡萄孢菌的抑菌率为42%~45%,对人参链格孢菌和腐皮镰孢菌的抑菌率也可达30%~34%。说明多孢木霉FSR-97发酵液对引起人参立枯病和疫病防治效果最好,且对另外4种人参病原菌的防治也具有一定广谱性(表2)。

[0057] 表2多孢木霉FSR-97发酵液对人参病原真菌的抑菌作用

菌株	人参链格孢菌	立枯丝核菌	毁灭柱孢菌	腐皮镰孢菌	恶疫霉菌	灰葡萄孢菌
	<i>A. panax</i>	<i>R. solani</i>	<i>C. destructans</i>	<i>F. solani</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>B. cinerea</i>
FSR-97	38.41±1.09 ^a	71.85±0.74 ^a	42.75±1.19 ^a	33.83±1.89 ^a	78.43±1.39 ^a	44.54±1.34 ^a

[0059] 实施例5 多孢木霉FSR-97菌株抑制人参真菌病害病原菌生长的生防机制

[0060] 采用对峙培养法研究多孢木霉FSR-97防治人参真菌性病害病原菌的生防机制:分别在直径9 cm 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板相对位置各接入1个5 mm多孢木霉FSR-97菌株及人参病原菌菌饼,两接种点相距3 cm,以人参病原菌或生防真菌单独接种于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)作对照,每个处理5次重复,25 °C下恒温培养,在对峙培养过程中,当人参病原菌菌丝前端出现抑制现象时,切取拮抗带上菌丝,采用基恩士超景深三维立体显微镜(VHX-600)观察菌丝形态及相互影响情况。

[0061] 结果表明,多孢木霉FSR-97对人参病原菌菌丝生长具有抑制作用。在马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)培养基上,多孢木霉FSR-97生长速度较立枯丝核菌(*R. solani*)缓慢,但对其抑制作用明显,对峙培养后期多孢木霉FSR-97占据了绝大多数培养基表面,并能在长有立枯丝核菌(*R. solani*)菌落上继续生长,从而导致立枯丝核菌(*R. solani*)不能形成菌核,菌落被包围,甚至被完全覆盖。多孢木霉FSR-97生长速度明显快于人参链格孢菌(*A. panax*)、毁灭柱孢菌(*C. destructans*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)、恶疫霉菌(*P. cactorum*)及灰葡萄孢菌(*B. cinerea*),多孢木霉FSR-97与人参链格孢菌(*A. panax*)、毁灭柱孢菌(*C. destructans*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)、恶疫霉菌(*P. cactorum*)及灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)对峙培养4 d后接触、包围并覆盖病原菌菌落,利用生长繁殖快这一优势迅速利用营养并占据空间,导致人参链格孢菌、毁灭柱孢菌、腐皮镰孢菌、恶疫霉菌及灰葡萄孢菌生长空间受到抑制,菌落不能继续扩展并开始逐渐萎缩,多孢木霉FSR-97菌丝体同样也能在人参链格孢菌(*A. panax*)和灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)菌落上继续生长,这说明FSR-97具有较高竞争力(图1-7)。

[0062] 显微观察发现,人参病原真菌的正常菌丝体表面光滑饱满,粗细均匀。在多孢木霉FSR-97作用下,拮抗带周围的人参病原菌菌丝体节间缩短变粗,分枝增多,形态发生异变,生长受限制而停止生长。其中,立枯丝核菌(*R. solani*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)及灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)菌丝生长混乱,菌丝体扭曲、断裂。毁灭柱孢菌(*C. destructans*)及恶疫霉菌(*P. cactorum*)菌丝顶端畸形,菌丝体膨大成串珠状,人参链格孢菌(*A. panax*)及恶疫霉菌(*P. cactorum*)菌丝细胞质积聚浓缩,细胞壁部分发生溃解,内容物溢出形成空腔,有的甚至成为空壳菌丝。另外,挑取拮抗带处菌丝镜检发现,FSR-97菌丝可以沿人参病原真菌菌丝平行生长,还可以缠绕病原菌菌丝,抑制人参病原菌菌丝生长并使其逐渐解体(图8-13)。

[0063] 实施例6 多孢木霉FSR-97菌株发酵液抑制人参真菌病害病原菌生长的生防机制

[0064] 采用含毒介质培养,生长速率法测定多孢木霉FSR-97无菌发酵液对人参真菌性病害病原菌生长的影响:按实施例3方法获得多孢木霉FSR-97发酵液,发酵液经0.45 μm微孔滤膜过滤,获得FSR-97菌株无菌发酵液。将多孢木霉FSR-97菌株无菌发酵液与马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)按1:4比例混合均匀,配制成含药培养基,按实施例4方法培养人参病原菌,6 d后采用基恩士超景深三维立体显微镜(VHX-600)观察菌丝形态。

[0065] 结果表明,人参病原真菌菌丝体在含药培养基上的生长速度显著低于马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)培养基,菌丝层稀薄,菌丝体粗细不均匀伴有纠结现象,病原菌生长受到抑制,人参链格孢菌及灰葡萄孢菌在生长过程中释放褐色对抗物质。多孢木霉FSR-97发酵液中存在抑菌活性物质,对人参病原菌菌丝形态产生强烈影响(图14-19)。

[0066] 在显微镜下观察,多孢木霉FSR-97发酵液中的抑菌活性物质可以导致人参病原真菌菌丝膨大成串珠状,短而粗,分枝增多,菌丝中原生质浓缩,有些菌丝顶端或局部畸形,形成膨胀泡后破裂,同时通过破坏菌丝细胞壁,胞内物质向外泄漏,引起菌丝断裂(图20-22)。

[0067] 实施例7 多孢木霉FSR-97菌株发酵液对人参病原菌分生孢子萌发的影响

[0068] 采用载体萌发法测定多孢木霉FSR-97发酵液对人参真菌病害病原菌孢子的影响:将人参链格孢菌(*A. panax*)、毁灭柱孢菌(*C. destructans*)、腐皮镰孢菌(*F. solani*)、灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)的孢子制备孢子悬浮液(显微镜100倍下100个孢子/视野)0.1 mL于清洁无菌的1.5 mL离心管中,用二倍稀释法加入多孢木霉FSR-97菌株无菌发酵液,以滴加0.1 mL马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)为对照,25 °C培养,以芽管长度超过分生孢子直径的一半作为萌发的标准,在处理6 h、12 h、24 h和48 h在载玻片上镜检孢子萌发情况及萌发孢子芽管的畸形情况,并计算萌发抑制率。

[0069] 结果如表3所示,多孢木霉FSR-97无菌发酵液对人参链格孢菌,毁灭柱孢菌,腐皮镰孢菌及灰葡萄孢菌的孢子萌发均具有不同程度抑制作用。25 °C培养6 h人参病原真菌孢子萌发率低,腐皮镰孢菌孢子萌发率仅有18%,其他病原菌孢子萌发率接近于0。随处理时间延长,孢子萌发率逐渐增加,48 h时多孢木霉FSR-97发酵液对灰葡萄孢菌孢子萌发抑制率达63.37%,对腐皮镰孢菌孢子萌发抑制率最小(41.58%)。由附图23可知,多孢木霉FSR-97发酵液可导致人参病原真菌孢子萌发受阻,孢子畸形,芽管前端膨大出现畸形泡状物,芽管上长出的菌丝不能向前伸展,从而使孢子失去了侵袭能力,多孢木霉FSR-97发酵液中可能含有抑菌活性物质。

[0070] 表3 FSR-97发酵液对常见人参病原菌孢子萌发的影响

菌株	Strains	6h	12h	24h	48h	48h 萌发抑制率(%)
人参链格孢菌	<i>A. panax</i>	1	5	14	49	51.43
毁灭柱孢菌	<i>C. destructans</i>	5	18	31	49	51.49
腐皮镰孢菌	<i>F. solani</i>	18	38	52	59	41.58
灰葡萄孢菌	<i>B. cinerea</i>	1	3	13	37	63.37

[0072] 实施例8 多孢木霉FSR-97定殖试验

[0073] (1) 多孢木霉FSR-97在土壤中的定殖

[0074] 采用拌土接种法测定多孢木霉FSR-97在土壤中的定殖量,将用利福平(300 μg/mL)标记过的多孢木霉FSR-97接种于马铃薯葡萄糖(PDB)培养液,25 °C,170 r/min,摇床振荡6 d,获得多孢木霉FSR-97突变菌株培养液,按实施例3获得多孢木霉FSR-97突变菌株孢子悬浮液,并稀释至 1×10^5 cfu/mL,4 °C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,按照体积比将新林地土与蛭石按2:1比例混匀)装入直径为20 cm花盆,每盆装土1 kg,向土壤中注入100 mL标记过的多孢木霉FSR-97突变菌株孢子悬浮液拌土。室温下放置,每隔7 d分离1次土壤内的真菌(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。

[0075] 结果表明,35 d后自然土中多孢木霉FSR-97的定殖量能达到每克土 1.99×10^4

cfu/g以上。这说明多孢木霉FSR-97在土壤中具有较强的定殖能力。

[0076] (2) 多孢木霉FSR-97在人参根茎叶的定殖

[0077] 采用灌根接种法,多孢木霉FSR-97突变菌株的孢子悬浮液制备同实施例3。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,按照体积比将新林地土与蛭石按2:1比例混匀)装入直径为20 cm花盆,每盆装土1 kg,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30 d后,沿人参苗的茎基部向其根部土壤注入突变菌株的孢子悬浮液(每株25 mL),田间管理同常规生产。接种7d后采集整株人参,将人参的根、茎、叶进行表面消毒(用50%乙醇浸泡处理 5 min),之后置于75%的乙醇溶液中10 min,再放入1%的次氯酸钠溶液中浸泡5 min,然后用无菌水冲洗5次(将最后1次冲洗材料的无菌水100 μ L涂于PDA平板上检测表面消毒是否彻底);无菌材料经无菌吸水纸吸干后取1 g无菌材料置于无菌研钵中,加10 mL无菌水进行研磨;研磨成匀浆后静置 30 min,上清液作为浸出液备用,其浓度为0.1 g/mL。取100 μ L上清液涂布于含300 μ g/mL利福平的PDA平板上,每处理重复3次;平板倒置于25 $^{\circ}$ C恒温箱中培养7 d,检测是否有待测菌的生长。

[0078] 结果表明,28 d时在人参根部及茎部均能回收到多孢木霉FSR-97。这说明多孢木霉FSR-97能在人参体内较长时间存在,具有内生性,应用潜力较好。

[0079] 实施例9 多孢木霉FSR-97对人参的促生作用

[0080] 采用盆栽试验法测定多孢木霉FSR-97菌株对人参的促生作用:按实施例3方法获得多孢木霉FSR-97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,按照体积比将新林地土与蛭石按2:1比例混匀)装入直径为20 cm花盆,每盆装土1 kg。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。试验组用多孢木霉FSR-97发酵液(含菌量约为 3×10^5 cfu/mL)的50倍无菌水稀释液30 mL灌根,对照组用无菌马铃薯葡萄糖(PDB)培养液的50倍无菌水稀释液30 mL灌根,每处理6盆,随机排列,田间管理同常规生产。待人参苗长至30 d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108 $^{\circ}$ C烘干至恒重,测整株干重和根干重。

[0081] 盆栽试验结果表明(表4所示),接种多孢木霉FSR-97后种植人参,其植株株高、根长、地上茎叶部分鲜重、根鲜重、地上茎叶部分整株干重及根干重较对照组均有不同程度的增加,其中,多孢木霉FSR-97处理后人参地上茎叶部分干鲜重较对照增加11%~22%,人参根的干鲜重较对照处理显著增长44%~56%,证明多孢木霉FSR-97对人参根的生长具有显著促进作用(图24)。同时,也说明多孢木霉FSR-97对人参是安全的。

[0082] 表4 多孢木霉FSR-97对人参生长的促进作用

处理	株高	根长	地上茎叶部 鲜重	地上茎叶部 干重	根鲜重	根干重
	(cm)	(cm)	(g)	(g)	(g)	(g)
无菌培养液	36.00 \pm 2.52	14.83 \pm 2.17	6.10 \pm 0.91	1.96 \pm 0.23	2.41 \pm 0.22	0.76 \pm 0.08
FSR-97 发酵液	37.20 \pm 2.45	24.10 \pm 1.00	7.91 \pm 0.41	2.20 \pm 0.17	4.36 \pm 0.39	1.72 \pm 0.02
增长率(%)	30.41 \pm 0.21	38.98 \pm 0.18	22.86 \pm 3.22	11.39 \pm 2.85	44.33 \pm 3.94	55.51 \pm 2.33

[0084] 实施例10 多孢木霉FSR-97菌株对人参真菌病害的田间防治试验

[0085] 对引起人参锈腐病的毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)的防治试验于

2014年安排在吉林农业大学药用植物园人参实验田进行盆栽试验。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,按照体积比将新林地土与蛭石按2:1比例混匀)装入直径为20 cm花盆,每盆装土1 kg。人参于4月17日移栽,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。移栽30 d后,采用伤根灌注法同时接种毁灭柱孢菌和多孢木霉FSR-97孢子悬浮液,含孢子量为 3×10^5 cfu \cdot mL⁻¹,孢子悬浮液制备方法同实施例3,各菌株每盆各株接种量均为15 mL。以50%多菌灵可湿性粉剂的500倍无菌水稀释液为药剂对照,以无菌水为空白对照。每处理6盆,随机排列,水肥措施管理同常规生产。接种35 d后统计发病程度,调查病情指数,调查结果如表5。

[0086] 对引起人参黑斑病的人参链格孢菌(*Alternaria panax*)的防治试验于2014年安排在吉林农业大学药用植物园人参实验田进行。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,按照体积比将新林地土与蛭石按2:1比例混匀)装入直径为20 cm花盆,每盆装土1 kg。人参于4月17日移栽,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。移栽30 d后,采用针刺涂抹法同时接种人参链格孢菌和多孢木霉FSR-97孢子悬浮液,含孢子量为 3×10^5 cfu \cdot mL⁻¹,孢子悬浮液制备方法同实施例3,各菌株每盆各株接种量均为15 mL。以50%多菌灵可湿性粉剂的500倍无菌水稀释液为药剂对照,以无菌水为空白对照。每处理6盆,随机排列,水肥措施管理同常规生产。接种35 d后统计发病程度,调查病情指数,调查结果如表5。

[0087] 防效试验计算方法:病情指数= $[\sum(\text{病级株数} \times \text{代表值}) / (\text{总株数} \times \text{最高病级代表值})] \times 100$,相对防效(%)=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数 $\times 100$

[0088] 如表5所示,多孢木霉FSR-97对由毁灭柱孢菌引起的人参锈腐病和由人参链格孢菌引起的人参黑斑病有较好的防效,防治效果与上述病害主用对照药剂相当或略优(图25, 26)。

[0089] 表5 多孢木霉FSR-97对上述人参真菌性病害的盆栽防治试验

处理	毁灭柱孢菌		人参链格孢菌	
	病情指数	相对防效(%)	病情指数	相对防效(%)
无菌水 CK	37.50 \pm 1.88	---	42.59 \pm 1.87	---
对照菌	60.42 \pm 1.88	---	72.69 \pm 1.82	---
本药-对照菌	22.92 \pm 3.76	61.83 \pm 4.23	28.78 \pm 2.12	68.42 \pm 2.73
FSR-97-对照菌	25.00 \pm 3.13	55.32 \pm 8.59	19.44 \pm 1.39	73.66 \pm 3.74

[0091] 实施例11 FSR-97菌株的分子鉴定

[0092] 应用TaKaRa Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司, TaKaRa Code:DV811A)进行人参生防真菌基因组DNA的提取。自行合成真菌 rDNA的ITS 通用引物序列为 ITS4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', ITS5:5'-GGAAGTAAAAGTCGTA ACAAGG-3',以多孢木霉FSR-97菌体基因组DNA为模板,进行rDNA-ITS-PCR扩增。反应体系(20 μ L)如下:2 \times PCR Mix 10 μ L, ddH₂O 7.8 μ L, DNA Template 1 μ L, ITS4 0.6 μ L, ITS5 0.6 μ L。PCR扩增程序:94 $^{\circ}$ C变性3 min, 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 56 $^{\circ}$ C复性30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸30 s, 30个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸10 min。PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测,得到一条750 bp左右的特异性片段,测定该片段序列(采用TIANGEN凝胶回收试剂盒于生工生物工程(上海)股份有限公司测序),结果表明,FSR-97菌株的DNA为645 bp,具体如SEQ ID No:1所示。将测得的ITS序列应用BLAST软件和DNAMAN软件以及Clustal-X拼接软件

进行分析,发现与FSR-97菌株相似性最高的是*Hypocrea pachybasioides*,同源性达到99%。利用MEGA5.10Beta2 软件以 UPGMA 法构建系统发育树1000 次随机抽样,计算自引导值(Bootstrap),根据MEGA5.10Beta2软件以UPGMA 法构建系统发育树发现,FSR-97与*Hypocrea pachybasioides*同属一个遗传分枝,亲缘关系十分接近,亲源性达到了100%。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FSR-97为多孢木霉(*Hypocrea pachybasioides*)。

[0093] 以上各实施案例不是对本发明的具体限制,只要根据权利要求限定的范围,在本专利的启示下,结合本领域的基本常识,将所述菌株用于植物真菌性病害的防治中,都属于本发明的保护范围。

[0001] SEQ ID No:1

[0002] GGATGTCAAAGCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTC
CCAAACCCCTATGTGAACGTTACCAAAATGTTGCCTCGGCGGGGAATTTATTCATTGCCCCGGGCGCGTCGCAGCCC
CGGACCAAGGCGCCCGCGGAGGACCAACCAAACTCTTTTGTATGTCCCCTCGCGGACTTTTATAATTCTGAACCA
TCTCGGCGCCCTTTCGGGCGTTTCGAAAATGAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGA
AGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTCAACCCTCGAACCCTCCGGGGGTACGGCGTTGGGG
ATCGGCCCTTTACGGGGCCGGCCCCGAAATACAGTGGCGGTCTCGCCGCAGCCTCTCCTGCGCAGTAGTTTGCACAC
TCGCATCGGGAGCGGGCGGTCCACGTCCGTAAAACACCCAACCTTCTGAAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAAT
ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAAAGCCCGGAGGAA

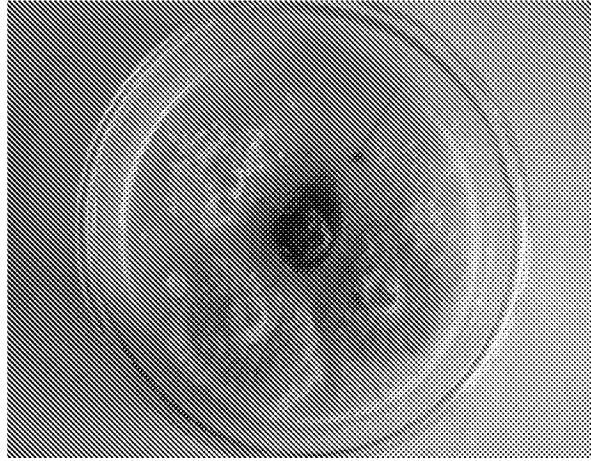


图1

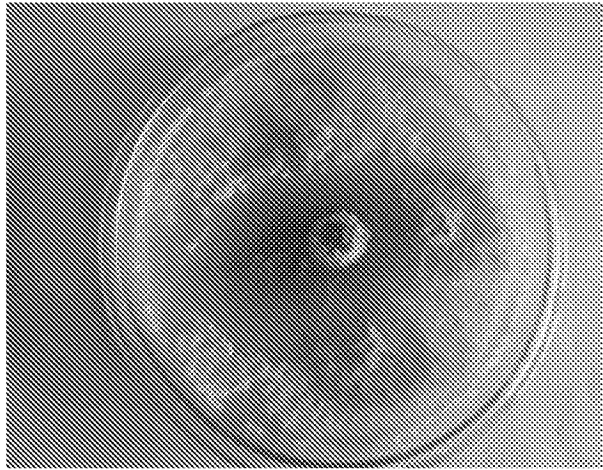


图2

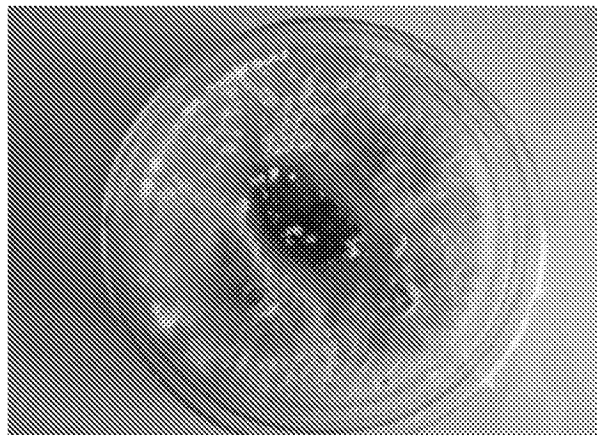


图3

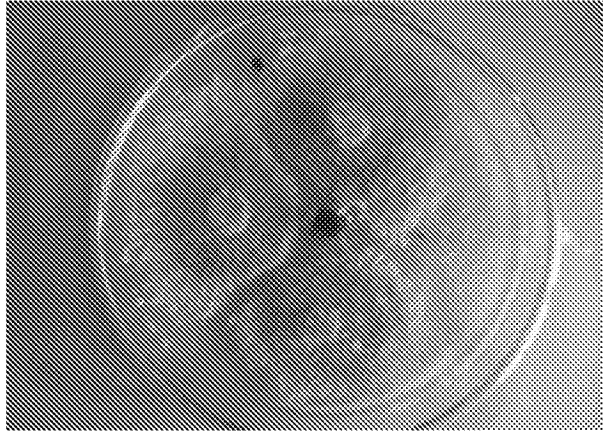


图4



图5

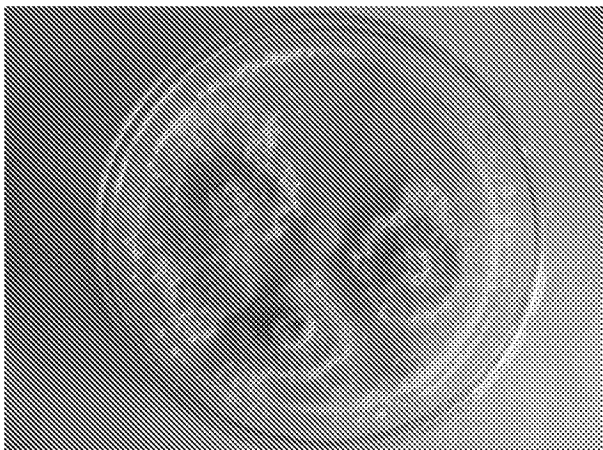


图6

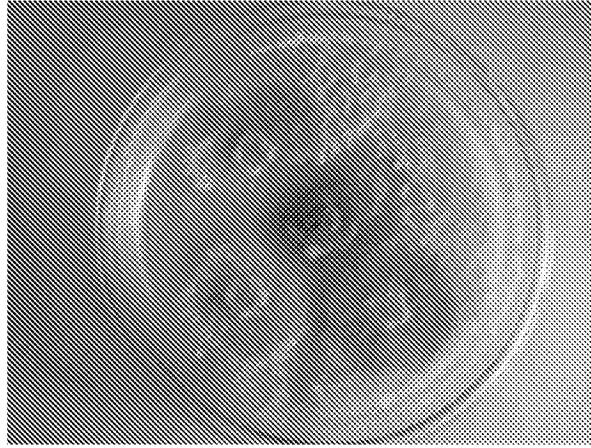


图7



图8

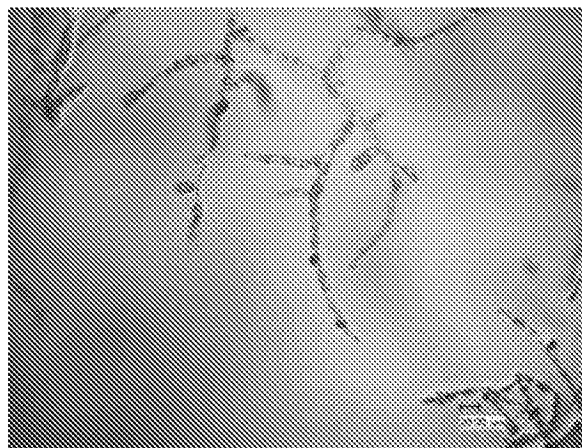


图9

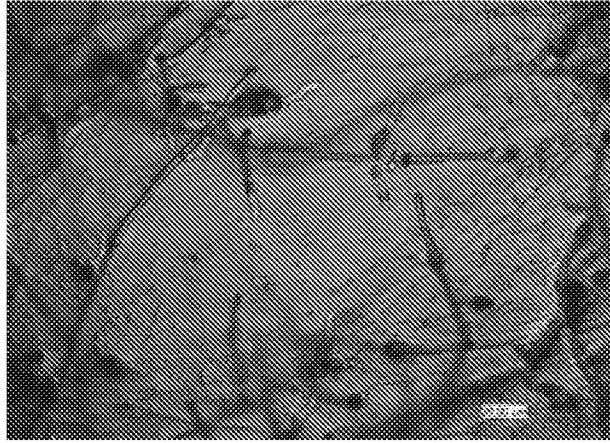


图10

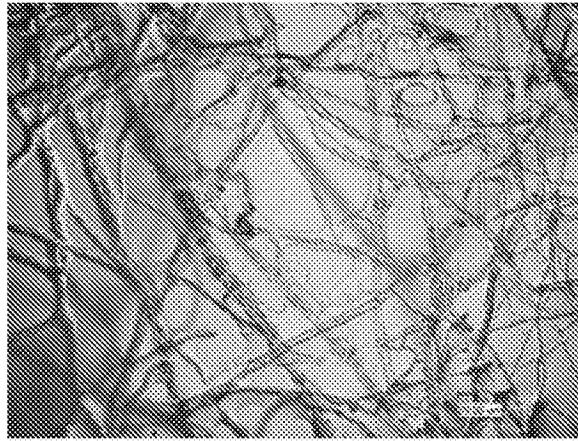


图11

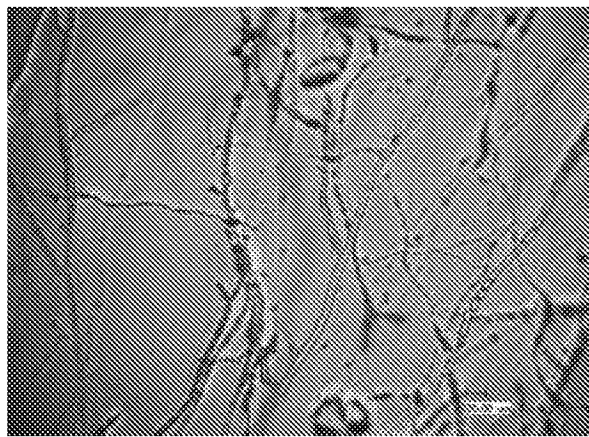


图12

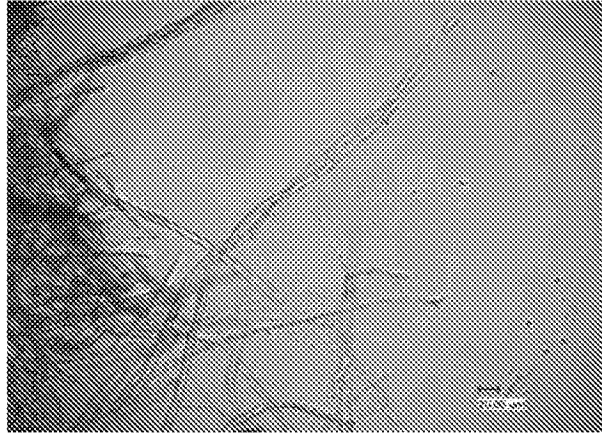


图13

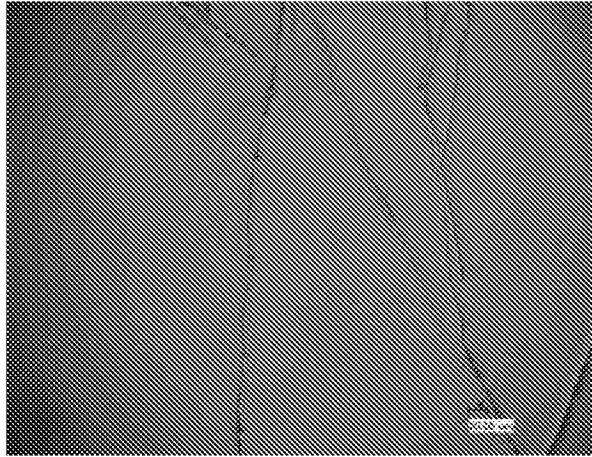


图14

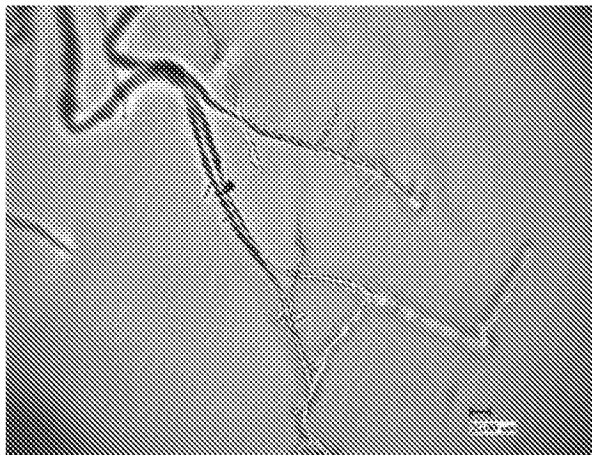


图15

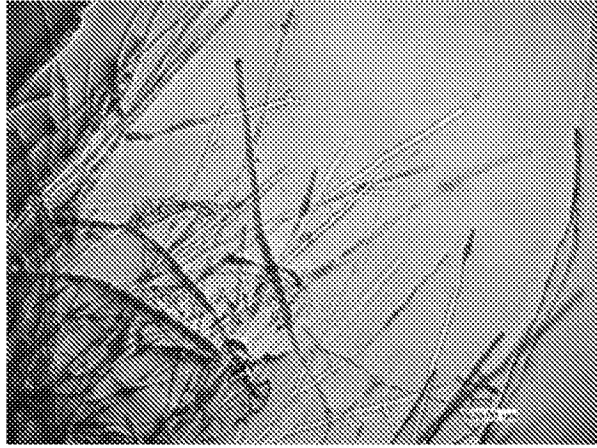


图16

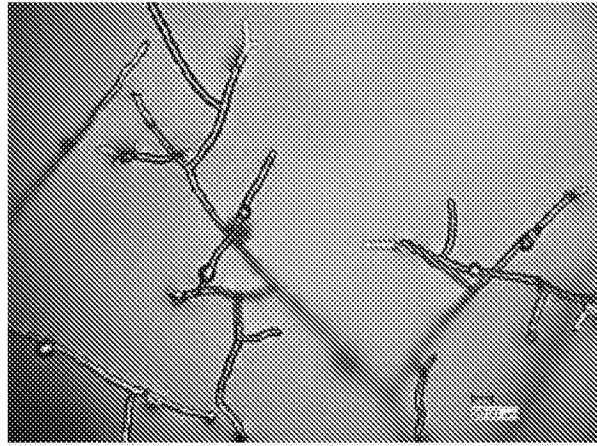


图17

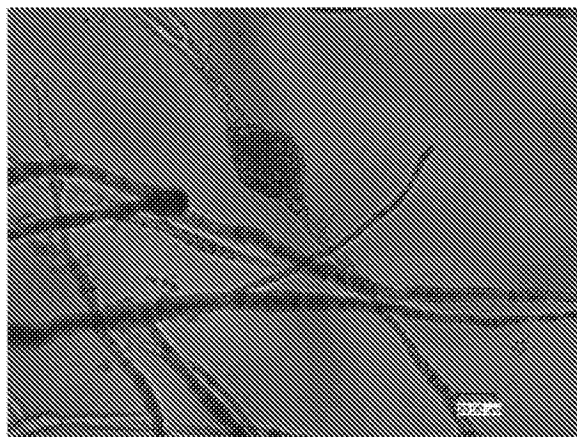


图18

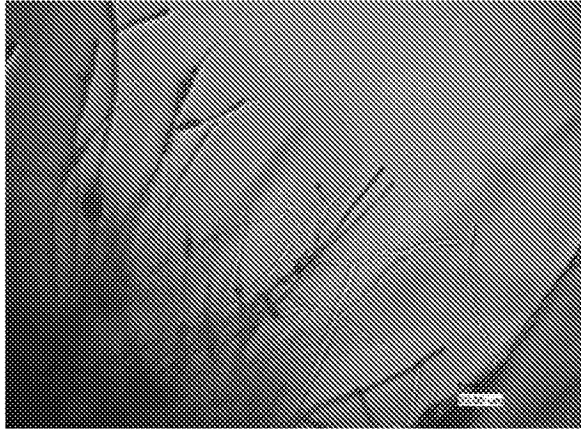


图19

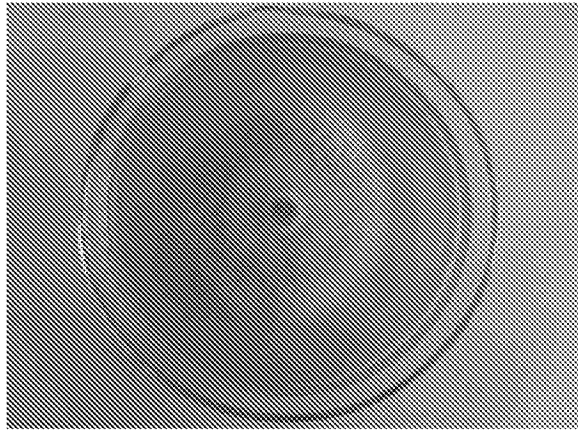


图20

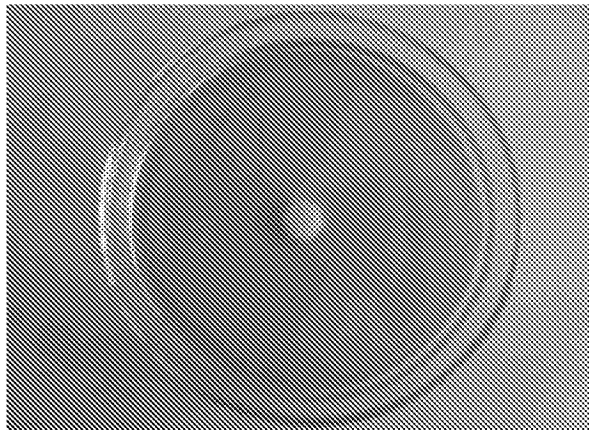


图21

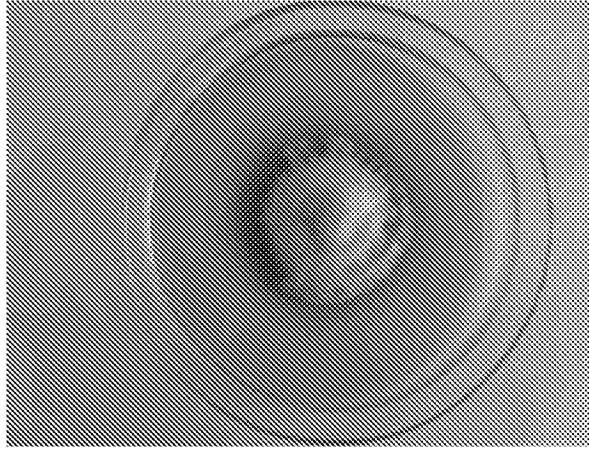


图22



图23

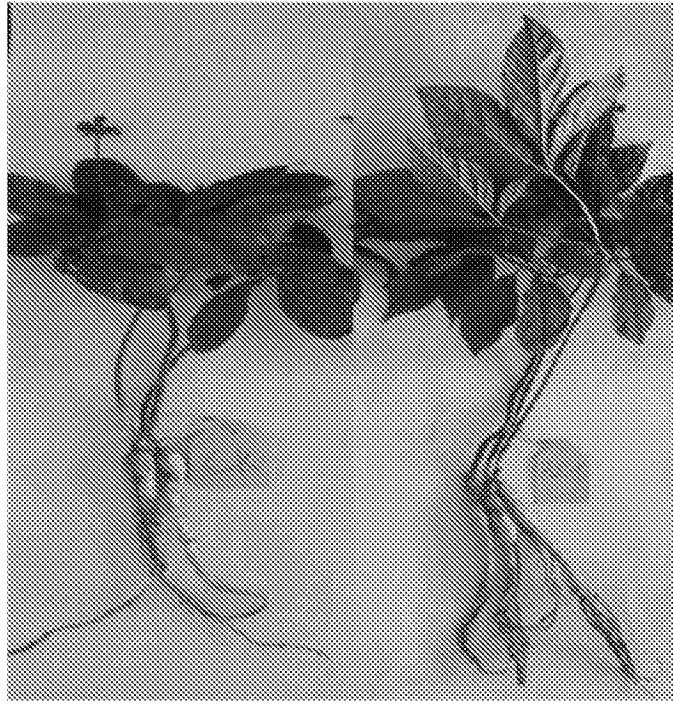


图24



图25



图26