



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1934241 B

(45) 授权公告日 2010.05.26

(21) 申请号 200580009256.8

(22) 申请日 2005.03.23

(30) 优先权数据

10-2004-0020074 2004.03.24 KR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.09.22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2005/000842 2005.03.23

(87) PCT申请的公布数据

W02005/090553 EN 2005.09.29

(73) 专利权人 韩国化学研究院

地址 韩国大田广域市

(72) 发明人 赵匡衍 金镇铁 崔京子 李善雨

崔溶镐 张庆秀 林熙敬

(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 顾晋伟 刘继富

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A01G 13/00(2006.01)

(56) 对比文件

WO 9850422 A1, 1998.11.12, 全文.

WO 029426 A1, 2000.05.25, 全文.

CN 1473472 A, 2004.02.11, 全文.

KR 20020072813 A, 2002.09.18, 全文.

EP 1241247 A1, 2002.09.18, 全文.

审查员 辜学英

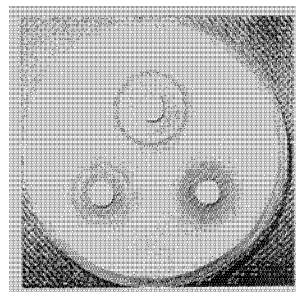
权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 3 页

(54) 发明名称

具有防治植物病害的拮抗活性的枯草芽孢杆菌菌株

(57) 摘要

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的新菌株 EB120 显示防治各种植物病害的高拮抗活性, 植物病害包括大麦白粉病、黄瓜白粉病、辣椒炭疽病、稻瘟病、番茄灰霉病、番茄晚疫病和小麦叶锈病, 所述菌株可以有效地用作杀微生物剂 (microbicide) 用于生物防治植物病害。



1. 保藏号为 KCTC10578BP 的微生物枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)EB120 的生物纯培养物,其具有防治植物病害的拮抗活性。

2. 防治植物病害的微生物剂,包含保藏号为 KCTC 10578BP 的微生物枯草芽孢杆菌 EB120 或从其来源的拮抗活性物质作为有效成分。

3. 权利要求 2 的微生物剂,其中所述物质选自微生物枯草芽孢杆菌 EB120 的全培养液培养物、所述全培养液培养物的上清液、所述全培养液培养物的丁醇提取物和微生物枯草芽孢杆菌 EB120 的孢子。

4. 权利要求 2 的微生物剂,其中植物病害选自大麦白粉病、黄瓜白粉病、辣椒炭疽病、稻瘟病、番茄灰霉病、番茄晚疫病和小麦叶锈病。

5. 防治植物病害的方法,包括向植物施用有效量的权利要求 1 的微生物枯草芽孢杆菌 EB120 或权利要求 2 的微生物剂的步骤。

6. 权利要求 5 的方法,其中植物病害选自大麦白粉病、黄瓜白粉病、辣椒炭疽病、稻瘟病、番茄灰霉病、番茄晚疫病和小麦叶锈病。

具有防治植物病害的拮抗活性的枯草芽孢杆菌菌株

技术领域

[0001] 本发明涉及具有抗植物病害拮抗活性的新枯草芽孢杆菌菌株；包括前述菌株的用来防治植物病害的微生物剂；和使用其来生物防治植物病害的方法。

背景技术

[0002] 因为在没有杀虫剂栽培农作物的情况下，农作物产量减少大概 30% -100%，所以为了改善农作物产量使用杀虫剂是必要的。然而，在农作物生产中不适当的使用合成化学杀虫剂造成很多问题，比如非选择性毒性、毒性化合物的累积和对杀虫剂有抗性的病原体爆发。处理这些问题的一个方式是使用拮抗微生物开发生物杀虫剂。生物杀虫剂被粗略的分成植物提取物、微生物、天敌、天然生物活性物质和转基因生物 (GMO)。与合成化学杀虫剂相比，生物杀虫剂可能更安全、更具生物可降解性和开发成本更便宜。

[0003] 对生物杀虫剂特别是微生物杀真菌剂开发的研究在植物病理领域已经是一个主要的关注点，在过去的 70 年中已经被积极的实施，导致在过去的 10 年获得超过 40 种微生物杀真菌剂产品。

[0004] 同时，芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) 是土壤中丰富的革兰氏阳性菌，几乎与假单胞菌属 (*Pseudomonas* Genus.) 一样被广泛的研究和商业化。芽孢杆菌产生生物活性次生代谢物并形成耐受恶劣条件的耐热内生孢子。Gustafson Inc. 开发了一种利用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 处理犁田与棉花和花生种子的微生物杀真菌剂，它已经在市场上销售，商品名为 Kodiak (Backman et al., *Improving Plant Productivity with Rhizosphere Bacteria* 3-8, 1994)。进一步，使用枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 混合物的微生物杀真菌剂已经在 2001 年被推向市场，商品名为 Bio Yield。在中国，许多芽孢杆菌属菌株已经被用来增加农作物产量。另外，Bayer Inc. 开发了用来防治土壤传播病的药剂，其含有芽孢杆菌 FZB 24, Taensa Inc. 也生产了一种使用相同菌株的微生物杀真菌剂。

[0005] 此外，AgraQuest Inc. 开发了 Serenade，使用枯草芽孢杆菌 QST713 的微生物杀真菌剂。不像使用上述芽孢杆菌属菌株的其它药剂，这种微生物杀真菌剂可以有效防治超过 40 种植物病害，包括灰霉病、猝倒病 (damping) 和白粉病。已经有报导这种拮抗微生物通过几种机制比如竞争、寄生、抗生作用和诱导抗性有效防治多种植物病害，并产生超过 30 种作为抗生化合物的脂肽，包括伊枯草菌素、制磷脂菌素 (plipastin) 和枯草菌素表面活性剂 (surfactin) 三类 (Ritter, *Chemical & Engineering News* 81 :30-35, 2003)。

[0006] 在韩国，对生物防治人参采后根腐病的研究开始于 1970 年代早期，接着进行了生物防治辣椒枯萎病、黄瓜和草莓镰刀菌枯萎病、芝麻猝倒病和灰霉病的研究。然而，由于结果的不稳定性、配制的困难、低下的生产率等原因，研究仍没有成功。国内第一个芽孢杆菌属菌株的微生物杀真菌剂是 Topseed，其由 Greenbiotech Co., Ltd. 开发。然而，因为它仅对防治白粉病有效，所以它的应用非常有限。

[0007] 本发明人已经努力开发了一种可广泛抗植物病害的、具有强抗真菌活性的新微生物

物杀真菌剂,并已经发现从辣椒分离到的植物内生细菌枯草芽孢杆菌 EB120 显示出防治几种植物病害的拮抗活性,所述植物病害包括大麦和黄瓜白粉病、辣椒炭疽病、稻瘟病、番茄灰霉病、番茄晚疫病和小麦叶锈病。

发明内容

[0008] 因此,本发明的一个目的是提供具有防治植物病害的拮抗活性的枯草芽孢杆菌新菌株。

[0009] 本发明的另一个目的是提供用来防治植物病害的含有所述菌株的微生物剂。

[0010] 本发明进一步的目的是提供使用所述微生物剂防治植物病害的方法。

[0011] 依照本发明的一个方面,提供了具有防治植物病害的拮抗活性的枯草芽孢杆菌新菌株,EB120(KCTC 10578BP)。

[0012] 依照本发明的另一个方面,提供了包括所述菌株或由其衍生的拮抗活性物质作为活性成分的微生物剂,其用来防治植物病害。

[0013] 依照本发明进一步的一个方面,提供了用来防治植物病害的方法,其包括向植物应用有效量的所述微生物剂的步骤。

附图说明

[0014] 当结合附图的时候,从以下对本发明的描述,本发明上述和其它的目的和特征将变得显而易见,附图分别显示:

[0015] 图 1:枯草芽孢杆菌 EB120 在胰酶解大豆琼脂培养基中培养的照片;

[0016] 图 2:显示枯草芽孢杆菌 EB120 抗黄瓜白粉病的体内抗真菌活性的照片;

[0017] 图 3:显示枯草芽孢杆菌 EB120 培养物上清液对稻瘟病病原体生长的抑制活性的照片;

[0018] 图 4:显示枯草芽孢杆菌 EB120 培养物上清液的耐热性的图片;

[0019] 图 5:显示从枯草芽孢杆菌 EB120 培养物上清液获得的丁醇提取物的耐热性的图片。

具体实施方式

[0020] 本发明提供枯草芽孢杆菌 EB120(KCTC 10578BP) 新菌株,其展现出抗植物病害的广谱拮抗活性。

[0021] 本发明的新菌株分离自辣椒叶。形态和生化研究与 16S rDNA 核苷酸测序分析证明这个菌株属于枯草芽孢杆菌。这种新菌株被定名为枯草芽孢杆菌 EB120,并依照国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约的条款,在 2004 年 1 月 6 日保藏在韩国典型培养物保藏中心(KCTC)(地址:Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB), #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejeon, 305-333, Republic of Korea) 登记号 KCTC 10578BP。

[0022] 本发明的枯草芽孢杆菌 EB120 显示出以下形态和生化特征:它在胰酶解大豆琼脂培养基上稀疏的铺展生长,它的单个菌落是小雪花状(见图 1)。进一步,枯草芽孢杆菌 EB120 属于芽孢杆菌属,其在革兰氏染色、KOH 检验、过氧化氢酶和氧化酶检验中显示阳性

反应;形成耐热内生孢子;并能够水解淀粉和酪蛋白。此外,除了麦芽三糖,枯草芽孢杆菌 EB120 和 ATCC 6051 展现对糖的相同偏好。

[0023] 进一步,16S rDNA 核苷酸测序分析显示枯草芽孢杆菌 EB 120 具有 SEQ ID No :1 的核苷酸序列,其与枯草芽孢杆菌有 99% 的序列同源性。

[0024] 如此表征的枯草芽孢杆菌 EB120 显示防治植物病害的广泛和高拮抗活性,所述植物病害包括大麦白粉病、黄瓜白粉病、辣椒炭疽病、稻瘟病、番茄灰霉病、番茄晚疫病和小麦叶锈病。

[0025] 因此,本发明的枯草芽孢杆菌 EB120 可以用作防治植物病害的微生物剂。该菌株可以单独用作这种微生物剂。或者可以如下制备微生物剂:将适合的载体与该菌株的全培养物、从其获得的溶剂提取物或单内生孢子混合,然后混合物被配制成粉末、丸、颗粒或溶液。可用在本发明中的载体包括但不限于水、白炭墨和高岭土。

[0026] 当向植物生长的土壤或植物自身施用有效量的本发明微生物剂时,本发明的微生物剂可以用于预防由植物病原体引起的植物生长抑制和枯萎。

[0027] 向靶植物施用枯草芽孢杆菌 EB120 的细胞浓度为 1.0×10^4 细胞 /ml- 1.0×10^{10} 细胞 /ml,优选 1.0×10^6 细胞 /ml- 1.0×10^9 细胞 /ml。

[0028] 以下实施例的目的是进一步举例说明本发明,但不是限制它的范围。

[0029] 实施例 1:枯草芽孢杆菌 EB120 的分离

[0030] 5g 的新鲜辣椒叶浸在加有 0.1% Tween 20 的 2% NaOCl 中 10 秒消毒它们的表面。然后消过毒的叶和 45ml 无菌蒸馏水在研钵中混合,混合物用研杵研磨,从研磨混合物取出 1ml 等分试样,分别以 1:10、1:100 和 1:1000 的比例用无菌蒸馏水稀释。每种稀释液 200 μ l 被涂布在补充有 40 μ g/ml 环己酰胺的胰酶解大豆琼脂培养基上,在 30°C 培育直到形成细菌菌落。从培养基中取出菌落,接种在新鲜营养琼脂培养基中,进行 3-4 次传代培养,以分离细菌菌株纯培养物。

[0031] 实施例 2:枯草芽孢杆菌 EB120 的表征

[0032] 在实施例 1 中分离到的细菌菌株基于形态和生化特征的表征以及 16S rDNA 核苷酸测序进行鉴定。

[0033] (1) 形态和生化特征

[0034] 分离到的菌株在胰酶解大豆琼脂培养基上稀疏铺展生长,它的单个菌落形成小雪花状(图 1)。它在革兰氏染色和 KOH 检验中显示阳性反应,这提示它属于芽孢杆菌属;过氧化氢酶和氧化酶检验中显示阳性反应;形成耐热内生孢子;并能够水解淀粉和酪蛋白。进一步,使用 GN2 微板(Biolog, Inc.) 评估它的碳利用活性,结果显示在表 1 中。在此,使用枯草芽孢杆菌枯草亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*) ATCC6051 菌株(韩国典型培养物保藏中心,韩国生物科学和生物技术研究所以(KoreaResearch Institute of Bioscience and Biotechnology)) 作为对照菌株。

[0035] <表 1>

[0036]

糖	EB120 菌株	ATCC6051 菌株
L- 阿拉伯糖	-	-
阿拉伯糖醇	-	-
Albutin	+	+
纤维二糖	+	+
D- 果糖	+	+
L- 果糖	-	-
D- 半乳糖醛酸	-	-
α -D- 葡萄糖	+	+
A-D- 乳糖	-	-
麦芽三糖	-	+
D- 甘露醇	+	+
D- 甘露糖	+	+
D- 松三糖	-	-
D- 蜜二糖	-	-
α - 甲基 -D- 半乳糖苷	-	-
β - 甲基 -D- 半乳糖苷	-	-
α - 甲基 -D- 甘露糖苷	-	-
D- 阿洛酮糖	+	+
L- 鼠李糖	-	-

糖	EB120 菌株	ATCC6051 菌株
景天庚酮聚糖	-	-
水苏糖	-	-
蔗糖	+	+
D- 塔格糖	-	-
D- 海藻糖	+	+
木糖醇	-	-
D- 木糖	-	-

[0037] 正如在表 1 中所见的,除了麦芽三糖,枯草芽孢杆菌 EB120 和 ATCC 6051 表现出对糖同样的偏好。也就是说,两种菌株都利用 albutin、纤维二糖、D- 果糖、 α -D- 葡萄糖、D- 甘露醇、D- 甘露糖、D- 阿洛酮糖、蔗糖和 D- 海藻糖。然而,尽管枯草芽孢杆菌枯草亚种 ATCC 6051 利用麦芽三糖,但是本发明分离到的菌株不可以。

[0038] (2) 16S rDNA 核苷酸测序

[0039] 16S rDNA 核苷酸测序分析揭示分离到的菌株具有 SEQ ID No :1 的核苷酸序列,其与枯草芽孢杆菌有 99% 的序列同源性。

[0040] 这些结果证明分离到的菌株是枯草芽孢杆菌的新菌株。这种新菌株被定名为枯草芽孢杆菌 EB120,并依照国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约的条款,在 2004 年 1 月 6 日保藏在韩国典型培养物保藏中心 (KCTC) (地址:韩国生物科学和生物技术研究所以 (KRIBB), #52, Oun-dong, Yusong-ku, Taejon, 305-333, Republic of Korea), 登记号 KCTC 10578BP。

[0041] 实施例 3: 检验枯草芽孢杆菌 EB120 防治植物病害的杀虫剂活性

[0042] 为了检验枯草芽孢杆菌 EB120 (此后称为“EB120”) 防治番茄灰霉病、番茄晚疫病、黄瓜炭疽病和大麦白粉病的体内抗真菌活性,用 EB120 处理靶植物并在 24 小时后接种植物病原体。

[0043] 具体地,EB120 被接种到 200ml 无菌胰酶解大豆培养液 (Becton and Dickinson) 中并以 150rpm、30°C 振荡培养 3 天。以 1 : 3 和 1 : 9 的比例用蒸馏水稀释培养溶液后,每种培养溶液和稀释剂 30ml 与 100 μ g/ml 的黄原胶混合。番茄、大麦和黄瓜被栽种在填充有 70% 体积园艺土的塑料瓶中,在温室条件下 (25 \pm 5°C) 持续 1-3 周,直至它们分别达到番茄第二叶阶段、大麦第一叶阶段和黄瓜第二叶阶段。它们分别用每种混合物处理,风干并保持在室温 24 小时。

[0044] 接下来,每种病原体按照以下各项对靶植物进行感染。通过分别向第二叶阶段番茄苗的叶子喷洒从晚疫病病原体致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) (Kangnung National

University) 的孢子囊释放的游动孢子悬液 (5×10^4 孢子囊 /ml) 和灰霉病病原体灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) (Korea Research Institute of Chemical Technology) 的孢子悬液 (5×10^5 孢子 /ml), 并在 20°C 湿润条件下培养植物, 来诱导番茄晚疫病和灰霉病。通过以下步骤用炭疽病病原体感染黄瓜, 向第二叶阶段的黄瓜苗叶喷洒圆刺盘孢 (*Colletotrichum orbiculare*) (National Institute of Agricultural Science and Technology) 孢子悬液 (1×10^6 孢子 /ml), 在湿润条件下保持 2 天后, 植物在恒定温度和湿度的箱中 25°C 生长 3 天。对大麦白粉病的感染, 从宿主植物传代培养的白粉病病原体, 禾布氏白粉菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*) (Korea Research Institute of Chemical Technology) 的孢子被接种在第一叶阶段的大麦苗叶, 植物在 20°C 生长箱中生长。

[0045] 仅用 30ml 没有接触过 EB120 培养物溶液的黄原胶溶液处理对照组, 并分别对于番茄晚疫病用 chlrothalonil (Sungbo Chemicals Co., Ltd.)、对于番茄灰霉病用 dithianon (Hankook Samgong Co., Ltd.)、对于黄瓜炭疽病用抑菌灵 (dichlofluanid) (Dongbu Hannong Chemical Co., Ltd.) 和对于大麦白粉病用 benomyl (Dongyang Chemical Industry Co., Ltd.) 处理比较组的相应植物。

[0046] 分别在病原体接种后的 7、5、3 和 4 天, 通过目测接种叶上孢子形成损害的面积百分率或萎黄和坏死症状的百分率来确定大麦白粉病、黄瓜炭疽病、番茄灰霉病和番茄晚疫病的病害严重度。按照公式 1 计算真菌防治百分率 (防治值), 结果显示在表 2 中。

[0047] <公式 1>

[0048] 防治值 (%) = $(ID_{UCG} - ID_{TEG}) \div ID_{UC} \times 100$

[0049] 其中, ID_{UCG} 表示未处理对照组的感染程度, ID_{TEG} 表示处理实验组的感染程度。

[0050] <表 2>

[0051]

样品	稀释比和浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	防治值 (%)			
		番茄晚疫病	黄瓜炭疽病	番茄灰霉病	大麦白粉病
枯草芽孢杆菌 EB120	未稀释	88	3	95	82
	1:3 稀释液	13	3	50	72
	1:9 稀释液	0	3	23	58
Chlrothalonil	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100			
	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	89			
Dithianon	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$		100		
	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$		80		
抑菌灵	80 $\mu\text{g}/\text{ml}$			97	
	40 $\mu\text{g}/\text{ml}$			86	
Benomyl	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$				100
	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$				52

[0052] 正如在表 2 中所显示的, 已经发现 EB120 具有防治番茄晚疫病、番茄灰霉病和大麦白粉病的高体内抗真菌活性。

[0053] 实施例 4: 选择可以使枯草芽孢杆菌 EB120 防治植物病害的拮抗活性最大化的最佳培养基

[0054] 为了选择从枯草芽孢杆菌E B120生产具有抗真菌活性代谢产物的最佳培养基,如下应用几种培养基实施培养试验。

[0055] EB120 被接种到在表 3 中所列的 6 种培养液中并 150rpm、30℃振荡培养 3 天。以 1 : 3 和 1 : 9 的比率用蒸馏水稀释培养物溶液。黄原胶以 100 μ g/ml 的浓度加入到每种稀释液中,按照在实施例 3 中描述的不同方法,用白粉病病原体感染大麦,确定对防治植物病害的作用。结果在表 3 中总结。

[0056] <表 3>

[0057]

培养基	防治值 (%)	
	1:3 稀释液	1:9 稀释液
营养培养液	10	10
胰酶解大豆 培养液	70	52
马铃薯葡萄糖培养液	46	0
胸蛋白胨葡萄糖蔗糖培养液	40	20
葡萄糖淀粉培养液	52	10
葡萄糖蛋白胨培养液	40	20
M523培养液	30	10

[0058] 正如在表 3 中所见的,枯草芽孢杆菌 EB120 防治大麦白粉病的抗真菌活性,在胰酶解大豆培养液中培养时是最高的。

[0059] 实施例 5:枯草芽孢杆菌 EB120 防治黄瓜白粉病的体内抗真菌活性

[0060] EB120 被接种到胰酶解大豆培养液中并 150rpm、30℃振荡培养 3 天。以 1 : 10、1 : 25、1 : 50、1 : 100 和 1 : 200 的比例用蒸馏水稀释培养物溶液。每种稀释液用 250 μ g/ml Tween 20 混合,喷洒第 7 叶阶段的黄瓜叶。

[0061] 已知作为防治白粉病的微生物杀真菌剂的 Topseed (Greenbiotech Co., Ltd.) 用蒸馏水以 1 : 10、1 : 25、1 : 50、1 : 100 和 1 : 200 的比例稀释,每种稀释液和作为阳性对照的 flusilazole (Dongbu Hannong Chemical Co., Ltd.) 被喷洒到黄瓜植株来制备比较组。只用 Tween 20 溶液处理的黄瓜被用作对照组。

[0062] 喷洒后一周,每种培养物溶液的稀释液和比较样品被第二次喷洒到靶黄瓜。再次喷洒后一周,通过实施例 3 中描述的不同方法评估防治白粉病的作用。让黄瓜在温室中经固有的白粉病病原体 *Sphaerotheca fuliginea* 自然感染。

[0063] 上述实验方法被重复两次,结果显示在表 4 中。

[0064] <表 4>

[0065]

样品	稀释比和浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	防治值(%)	
		第一次实验	第二次实验
枯草芽孢杆菌 EB120	1:10 稀释液	86 \pm 5.8	94 \pm 3.3
	1:25 稀释液	84 \pm 5.0	91 \pm 2.7
	1:50 稀释液	76 \pm 11	86 \pm 3.0
	1:100 稀释液	21 \pm 9.2	84 \pm 6.7
	1:200 稀释液	16 \pm 5.8	72 \pm 20
Topseed	1:10 稀释液	87 \pm 3.8	92 \pm 5.4
	1:25 稀释液	60 \pm 7.8	82 \pm 6.7
	1:50 稀释液	56 \pm 9.3	48 \pm 11
	1:100 稀释液	32 \pm 23	14 \pm 39
	1:200 稀释液	26 \pm 13	45 \pm 20
Flusilazole	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	97	97
	30 $\mu\text{g}/\text{ml}$	99	99

[0066] 正如在表 4 中举例说明的, 枯草芽孢杆菌 EB120 培养液培养物的所有稀释液显示出防治黄瓜白粉病的高体内抗真菌活性, 甚至在使用 1 : 200 稀释液时它的病害防治功效也是有意义的。进一步, 与 Topseed 比较, 用 1 : 50 或更低稀释液处理的实验组比 Topseed 处理组显示出相等或更高的体内抗真菌活性。图 2 显示枯草芽孢杆菌 EB120 防治黄瓜白粉病的体内抗真菌活性。只用 Tween 20 溶液处理的对照组显示了白粉病的典型损害, 而用枯草芽孢杆菌 EB120 培养液培养物稀释液处理的实验组的黄瓜叶损害很小。

[0067] 实施例 6 : 枯草芽孢杆菌 EB120 培养物溶液、其乙酸乙酯和丁醇提取物防治植物病害的体内抗真菌活性的检验

[0068] 为了评估枯草芽孢杆菌 EB120 产生物质的抗真菌活性, 按照以下方法, 对枯草芽孢杆菌 EB120 的全培养液培养物和其乙酸乙酯和丁醇提取物进行防治植物病害抗真菌活性的检验。

[0069] EB120 被接种到胰酶解大豆培养液中, 150rpm、30 $^{\circ}$ C 振荡培养 3 天, 9,000rpm 离心 12 分钟, 分离上清液。用相等体积的乙酸乙酯提取上清液两次, 获得乙酸乙酯提取物, 乙酸乙酯提取物在减压下浓缩。除了用丁醇作为溶剂之外, 按照上述相同的方法, 从上清液获得丁醇提取物。从每种提取物取相当于 40ml 培养物溶液的提取物样品后, 乙酸乙酯提取物样品被溶解在 4ml 丙酮中和丁醇提取物样品被溶解在 2ml 甲醇中。两种溶液用 Tween 20 溶液 (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 稀释, 每种终体积是 40ml。另一方面, Tween 20 以 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度加到 40ml 的 EB120 培养物上清液中。

[0070] 用每种溶液喷洒辣椒、稻、番茄、小麦和大麦植株。喷洒后一天, 分别向其接种引起辣椒炭疽病 (PAN)、稻瘟病 (RCB)、水稻纹枯病 (RSB)、番茄灰霉病 (TGM)、番茄晚疫病 (TLB)、小麦叶锈病 (WLR) 和大麦白粉病 (BPM) 的 7 种植物病原体, 并评估防治植物病害的作用。

[0071] 按照实施例 3 中描述的不同方法, 实施番茄灰霉病、番茄晚疫病和大麦白粉病的感染。

[0072] 同时, 在温室中, 经催芽处理的辣椒种子被播种在直径 7.0cm 的罐中并允许在温室中生长到第 8 叶阶段。炭疽病病原体, 球刺盘孢 (*Colletotrichum coccodes*) (KoreaUniversity) 的孢子悬液 (5×10^5 孢子 /ml) 被喷洒到第 8 叶阶段辣椒的叶上。处理

过的辣椒被保持在湿润条件下 2 天,在具有稳定温度和湿度的箱中 25℃培养 2 天来诱导辣椒炭疽病。

[0073] 通过向第 2 叶阶段的稻苗喷洒稻瘟病病原体灰色大角间座壳 (*Magnaporthe grisea*) (Seoul National University) 的孢子悬液 (5×10^5 孢子/ml) 诱导稻瘟病,使植物在 25℃的湿润条件下保持 1 天,在生长箱中 25℃培育 5 天。

[0074] 通过以下步骤诱导水稻纹枯病,在培养基 (90g 麦麸, 15g 稻麸, 100ml 蒸馏水) 中培养瓜亡革菌 (*Thanatephorus cucumeris*) (Korea Research Institute of Chemical Technology), 接种培养物溶液到第 3 叶阶段的稻苗中,植物在 25℃湿润条件下保持 4 天,在生长箱中 25℃培育 4 天。

[0075] 对于小麦叶锈病的感染,叶锈病病原体隐匿柄锈菌 (*Puccinia recondite*) (Korea Research Institute of Chemical Technology) 孢子以 0.67g 孢子/l 的浓度悬浮在 Tween20 (250 μ /ml) 中,向第 1 叶阶段的小麦苗喷洒悬液。植物在 20℃湿润条件下保持 1 天,在生长箱中 20℃培育 6 天。

[0076] 辣椒炭疽病病原体接种后 4 天;稻瘟病病原体接种后 5 天;和小麦叶锈病和水稻纹枯病病原体接种后 7 天确定病害严重程度。按照实施例 3 中描述的相同方法评估真菌防治百分率 (防治值)。结果显示在表 5 中。

[0077] <表 5>

[0078]

样品	防治值 (%)						
	PAN	RCB	RSB	TGM	TLB	WLR	BPM
培养物上清液	93	83	0	94	94	90	92
醋酸乙酯提取物	0	70	0	0	0	53	0
丁醇提取物	96	98	60	94	95	83	93

[0079] 正如在表 5 中所见的,枯草芽孢杆菌 EB120 培养物上清液的乙酸乙酯提取物对防治包括辣椒炭疽病、水稻纹枯病、番茄灰霉病、番茄晚疫病和大麦白粉病的植物病害没有作用,但是其丁醇提取物比枯草芽孢杆菌 EB120 培养物上清液显示出相等或更高的防治所有被测植物病害的抗真菌活性。这些结果表明由枯草芽孢杆菌 EB120 产生的具有抗真菌活性的物质具有相对的高极性。

[0080] 实施例 7:检测枯草芽孢杆菌 EB120 产生的具有抗真菌活性的代谢物的耐热性

[0081] 为了检测枯草芽孢杆菌 EB120 产生的具有抗真菌活性的代谢物的耐热性,培养物上清液和其丁醇提取物被加热到不同温度条件,即 4℃、室温、30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、100℃和 121℃,然后处理植物病原体,来评估对植物病原体真菌菌丝体生长的抑制作用。

[0082] 更具体的,EB120 培养物上清液和在实施例 6 中获得的丁醇提取物通过分别在 4℃冷却 24 小时;在室温保持 24 小时;在 30℃、40℃、50℃、60℃和 70℃保持 5 小时;和在 100℃和 121℃保持 15 分钟,进行预处理。培养物上清液以 1 : 2 的比例用蒸馏水稀释,丁醇提取物以 200mg/ml 的浓度溶解在甲醇中。每种样品 50 μ l 被滴在直径 8mm 的纸盘上,其后被风干。稻瘟病病原体灰色大角间座壳 (Seoul National University) 依照倒板法被接种到葡

葡萄糖琼脂培养基中。处理过的纸盘被转移到接种有灰色大角间座壳的葡萄糖琼脂平板上，然后在 25℃ 培育 3 天。接下来，通过测量每个纸盘周围抑制圈的直径确定对菌丝生长的抑制作用。

[0083] 正如在图 3 中所见的，受枯草芽孢杆菌 EB120 影响的具有不同样式的三个区域如下所示：菌丝生长被完全抑制的区域（完全抑制区）；气生菌丝不生长，但是菌丝只渗入培养基内生长的区域（部分抑制区）；和气生菌丝的生长看上去好像粘附在培养基上的区域（气生菌丝影响区）。这些结果证明枯草芽孢杆菌 EB120 至少产生 3 种或更多种抗真菌活性代谢物。

[0084] 已经发现由枯草芽孢杆菌 EB120 产生的抗真菌代谢物显示与温度无关的对菌丝体生长的恒定抑制活性（图 4）。这些结果显示由枯草芽孢杆菌 EB120 产生的抗真菌代谢物有相对稳定的抗热性。在图 4 中，黑色柱代表完全抑制区；灰柱，部分抑制区；和白柱，气生菌丝影响区。

[0085] 同时，作为检测热处理的结果，和正如它表明的，丁醇提取物对灰色大角间座壳菌丝体生长的抑制作用不同于培养物上清液，丁醇提取物没有显示任何气生菌丝影响区。这个结果证明显示气生菌丝影响区的抗真菌活性代谢物比其它显示两种不同样式的抗真菌代谢物比较，具有更低的极性。进一步，图 5 表明丁醇提取物具有对病原体生长不受热处理影响的稳定抑制活性。

[0086] 尽管已经参考以上具体实施方案说明本发明，但是应该承认本领域技术人员可以对本发明进行各种修饰和改变，这些修饰和改变也在所附权利要求定义的本发明范围内。

[0087] 序列表

[0088] <110> 韩国化学研究院

[0089] <120> 具有防治植物病害的拮抗活性的枯草芽孢杆菌菌株

[0090] <130> PCA50106/KIT/PCT

[0091] <150> KR2004-20074

[0092] <151> 2004-03-24

[0093] <160> 1

[0094] <170> KopatentIn 1. 71

[0095] <210> 1

[0096] <211> 1473

[0097] <212> DNA

[0098] <213> 枯草芽孢杆菌 EB120 菌株 16SrDNA

[0099] <400> 1

[0100]	gacgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc ggacagatgg gagcttgctc	60
[0101]	cctgatgtta gcgcgacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgcctgta agactgggat	120
[0102]	aactccggga aaccgggct aataccgat ggttgttga accgatgg tccagacataa	180
[0103]	aaggtggctt cggctaccac ttacagatgg acccgcgcg cattagctag ttggtgaggt	240
[0104]	aacggctcac caaggcgacg atgcgtagcc gacctgagag ggtgatcggc cacactggga	300
[0105]	ctgagacacg gccagactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttccg caatggacga	360
[0106]	aagtctgacg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaaggtttt cggatcgtaa agctctgttg	420

[0107]	ttagggaaga acaagtgccg ttcaaatagg gcggcacctt gacggtacct aaccagaaag	480
[0108]	ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa	540
[0109]	ttattgggcg taaagggctc gcagcgggtt tcttaagtct gatgtgaaag cccccggctc	600
[0110]	aaccggggag ggtcattgga aactggggaa cttgagtgca gaagaggaga gtggaattcc	660
[0111]	acgtttagcg gtgaaatgcg tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcgactctct	720
[0112]	ggtctgtaac tgacgtgag gagecgaagc gtggggagcg aacaggatta gataccctgg	780
[0113]	tagtccacgc cgtaaactgt gagtgctaag tgtagggggg tttccgcccc ttagtgctgc	840
[0114]	agctaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa	900
[0115]	ttgacggggg cccgcacaag cggtaggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac	960
[0116]	cttaccaggt cttgacatcc tctgacaatc ctagagatag gacgtcccct teggggcag	1020
[0117]	agtgacaggt ggtgcatggt tctcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg	1080
[0118]	caacgagcgc aaccttgat cttagttgcc agcattcagt tgggcactct aaggtgactg	1140
[0119]	ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatc atcatgcccc ttatgaacct	1200
[0120]	gggctacaca cgtgctacaa tggacagaac aaagggcagc gaaaccgcga ggttaagcca	1260
[0121]	atcccacaaa tctgttctca gtteggatcg cagtctgcaa ctcgactgcg tgaagctgga	1320
[0122]	atcgctagta atcgcggatc agcatgccgc ggtgaatag ttcccgggce ttgtacacac	1380
[0123]	cgcccgtcac accacgagag tttgtaacac ccgaagtcgg tgaggtaacc tttatggagc	1440
[0124]	cagccgccga aggtgggaca gatgattggg gtg	1473

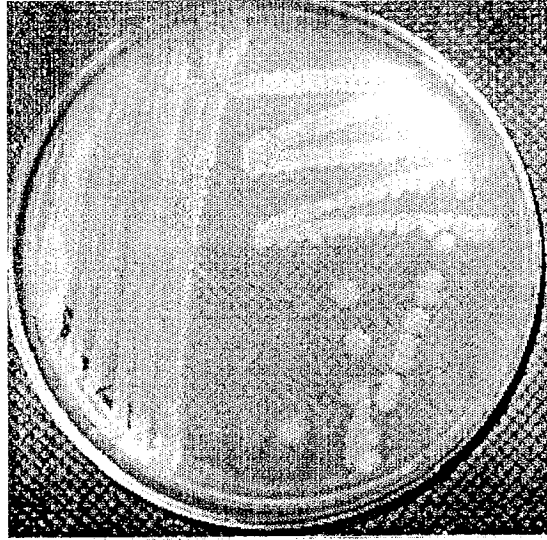


图 1

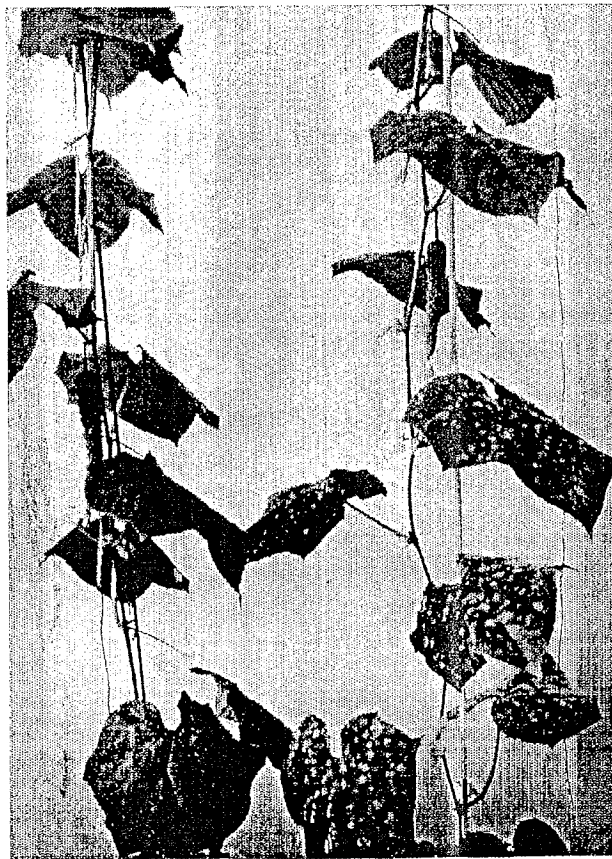


图 2

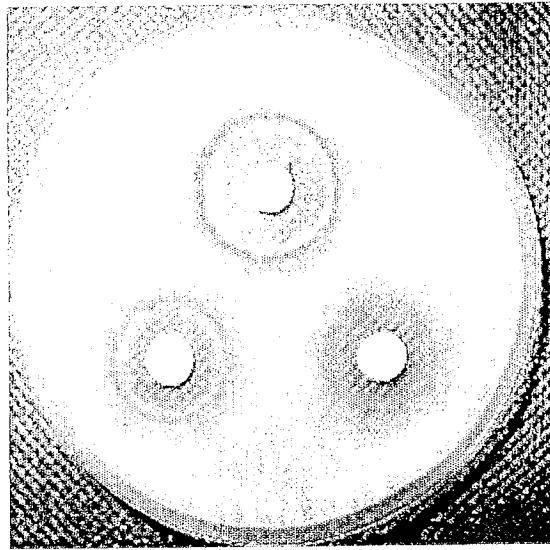


图 3

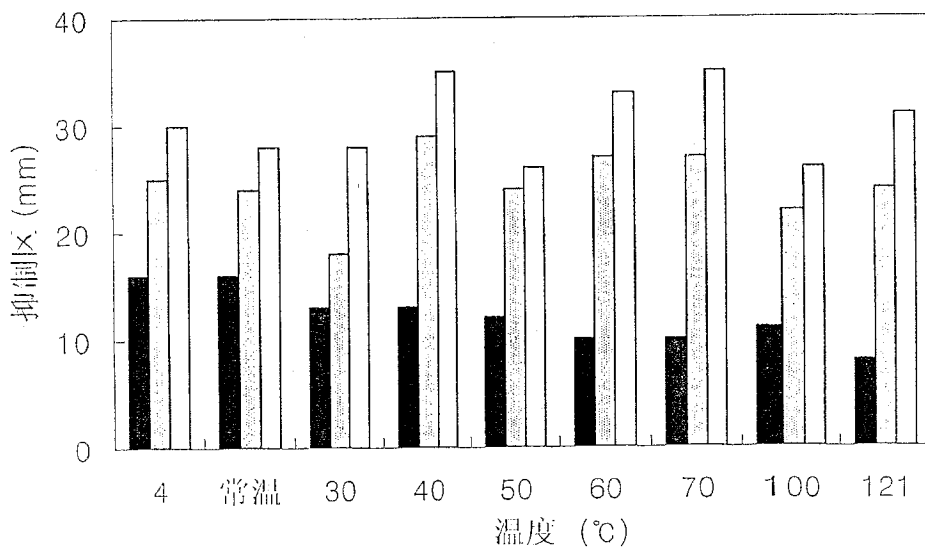


图 4

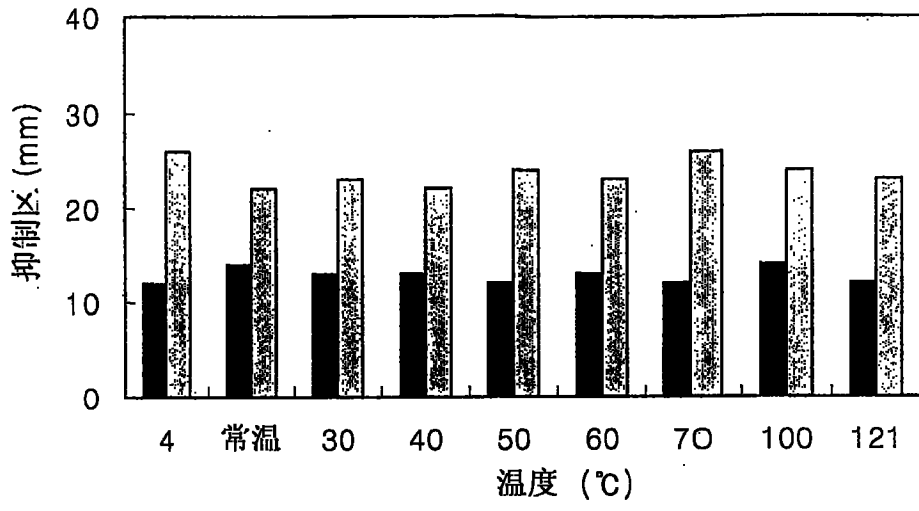


图 5