

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200810123738.1

[51] Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

A01N 63/04 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年12月30日

[11] 授权公告号 CN 100575476C

[22] 申请日 2008.6.2

[21] 申请号 200810123738.1

[73] 专利权人 南京农业大学

地址 210095 江苏省南京市卫岗1号南京
农业大学科技处钱宝英

[72] 发明人 郭坚华 徐莉莉 鲁莎

[56] 参考文献

CN100366728C 2008.2.6

球毛壳菌几丁质酶3基因的序列分析. 金
红星等. 东北林业大学学报, 第32卷第4期.
2004

用于棉花病害防治的生物资源. 李玉奎.
中国农学通报, 第7卷第3期. 1991

油菜内生球毛壳菌抑菌作用初步测定. 陈
利军等. 河南农业科学, 第7期. 2005

审查员 姚进孝

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公
司

代理人 张素卿

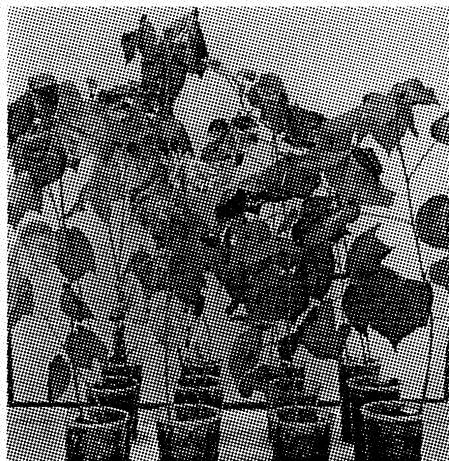
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

[54] 发明名称

防治棉花黄萎病的菌株 B221

[57] 摘要

本发明涉及防治棉花黄萎病的生防菌株 B221, 属于农作物防病治病技术领域。经鉴定为球毛壳属 (*Chaetomium globosum*)。菌种保藏号为 CGMCC NO.2493。菌种在 PDA 培养液 25℃ 200rpm 振荡培养 7d, 用 8 层灭菌纱布过滤后得到其孢子悬浮液, 成品中活菌总浓度 10^9 个孢子/毫升, 获得生防菌剂。菌株于 PDA 斜面 4℃ 保存, B221 菌株表现出较好的平板拮抗效果、温室防效和促生效果。试验表明, 菌株 B221 温室防效达到 58.96%, 生物量的增加达 51.20%; 有较大的潜力开发成商业化的活菌生防制剂。



1、防治棉花黄萎病的菌株 B221，其特征在于，该菌株为球毛壳属 (*Chaetomium globosum*)，于 2008 年 05 月 09 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，菌种保藏号为 CGMCC NO.2493。

2、权利要求 1 所述防治棉花黄萎病的菌株 B221 在防治温室棉花黄萎病方面的应用。

3、用权利要求 1 所述防治棉花黄萎病的菌株 B221 制备的生防菌剂。

防治棉花黄萎病的菌株 B221

一、技术领域

本发明涉及防治棉花黄萎病的单一菌株,属于农作物防病治病技术领域,专用于棉花黄萎病的无公害防治。

二、背景技术

由棉花黄萎病菌大丽轮枝孢 (*Verticillium dahliae* Kleb.)引起的棉花黄萎病是世界性、毁灭性病害,素有棉花“癌症”之称。自1914年首次在美国报道以来,现已遍及世界各大棉区。我国自1935年由美国引进斯字棉时传入,后随棉种调运不断扩大。近年来,棉花黄萎病在国内各棉区连续流行为害,尤其是2002~2003年,在全国各棉区大面积流行,发病面积高达 3×10^6 hm²以上,对棉花生产构成极大威胁。

由于该病是通过土壤和秸秆传播的维管束病害,所以防治难度较大。首先,目前对棉花黄萎病的药剂防治中没有有效的化学农药。即使有,使用化学农药不仅会产生农药残留,而且随着化学农药的逐年使用也会出现棉花黄萎病菌的抗药性问题。其次,我国目前对此病害主要是采用选育选用抗病品种为主的综合治理措施。但目前我国棉花品种的抗病性只能达到耐至抗病水平,致使该病在环境条件合适的情况下仍然连续流行危害。

此外,随着经济的发展,人们生活水平的提高,人们越来越注重食品安全问题,绿色作物、有机农产品等也越来越受人青睐。社会对安全、健康食品的需求促进了利用无公害方法来控制有害生物的研究。通过几年的研究实践,现已开发出一些生物杀菌剂,如农用链霉素、井冈霉素,前者可以配成200 mg/L液灌根防治蔬菜软腐病、青枯病,后者配成1000-1500倍液防治蔬菜炭疽病、霜霉病。

因为迄今为止尚缺乏理想的高抗丰产品种和有效药剂,且化学防治对环境污染的问题日益突出,所以在注重发展无公害生产技术的今天,生物防治作为防治棉花黄萎病的一种新思路,将得到进一步的重视与发展。

三、发明内容

技术问题 针对棉花黄萎病没有较高防效的生防菌株制剂现状,提供开发一种防治棉

花黄萎病的单一菌株及其菌剂，专用于防治棉花黄萎病，菌株的防效高，并且有增产功能。

技术方案

防治棉花黄萎病的菌株 B221，为球毛壳属 (*Chaetomium globosum*)，于 2008 年 05 月 09 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，菌种保藏号为 CGMCC NO.2493。

用防治棉花黄萎病的菌株 B221 制备生防菌剂的方法为：

将上述防治棉花黄萎病的菌株 B221 在 PDA 培养液 25 °C 200 rpm 振荡培养 7 天，用 8 层灭菌纱布过滤后得到其孢子悬浮液菌剂成品，用血球计数法将菌剂成品中活菌总浓度调节为 10^9 个孢子/毫升。其应用方法为，菌株制剂在作物移栽前喷雾使用，也可以做成堆肥使用，或稀释后在移栽时灌根使用。

有益效果

本发明与现有棉花黄萎病防治技术相比，其优点和积极效果表现在：本发明是专门针对棉花黄萎病开发的生防菌株，因而在防治棉花黄萎病方面与目前其他广谱生物杀菌剂相比防治效果显著提高。由于是生物菌株制剂，完全没有因化学农药的使用所带来的一系列问题，因而有利于作物的无公害生产，农民可以不用或减少其他防治棉花黄萎病化学农药的用量，这不仅可为农民节省开支，而且有利于作物的出口。同时，生防菌株制剂还有增产功能，可为农民增加收入。

B221 菌株制剂可以在温室移栽前，喷在肥料中，然后随肥料在整地过程中埋到土里，也可以在栽苗时灌根使用。栽苗后，菌株通过多种生防机制起作用，从而达到防治棉花黄萎病的效果。试验表明，在温室中使用 B221 菌株制剂对棉花黄萎病有一定程度的防治效果，达到 58.96%；B221 菌株制剂对棉花还有一定程度的增产效果，达到 51.20%。

四 附图说明

图 1 温室试验中 B221 菌剂在播种 55 天后对棉花黄萎病的防治效果

注：左—CK，右—B221；防效

图 2 温室试验中 B221 菌剂在播种 55 天后对棉花黄萎病的促生效果

注：左—CK，右—B221；促生

图 3 温室试验中 B221 菌剂在播种 55 天后对棉花黄萎病的促生效果(根)

注：左—CK，右—B221；促生(根)

五 具体实施方式

1 菌株的鉴定

防治棉花黄萎病菌大丽轮枝孢 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 的生防菌株 B221, 它是由南通市如东县掘港镇丁字岸村某棉花黄萎病发生严重的田块中, 棉花健株的根部分离得来, 发明人对菌株 B221 的平板拮抗活性、产纤维素酶、蛋白酶、几丁质酶活性和利用磷和氮元素的测定进行了研究, 发现菌株 B221 对棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 具有较强的平板拮抗活性, 但不具有蛋白酶, 纤维素酶和几丁质酶活性, 不能利用磷和氮元素, 菌株用 PDA 培养基培养, 于 PDA 斜面 4 °C 保存。发明人还对其进行了温室防效和促生实验研究, 发现 B221 菌株制剂有很好的防病增产效果, 防效达到 58.96%, 生物量的增加达 51.20%, 有较大的潜力开发成商业化的活菌生防制剂。

将待测真菌 B221 接于 PDA 培养基, 25 °C 培养 5 天, 用无菌手术刀刮取成熟的菌丝, 根据 Wang *et al.* 方法 (Wang, H., Qi, M., and Cutler, A.J. 1993 A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Res.* 21, 4153-4154.) 提取真菌的 DNA。利用引物 ITS₁ 和 ITS₄ (ITS₁: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS₄: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (生兴生物技术有限公司合成) 进行 PCR 扩增待测真菌的 ITS 区域。所有反应采用 25- μ L 体系: ITS₁ 0.25 μ L, ITS₄ 0.25 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 25 mM MgCl₂ 1.5 μ L, 2.5 mM dNTP 1 μ L, 5 μ /ml r-Tag polymerase (Takara) 0.25 μ L, ddH₂O 18.25 μ L, DNA 1 μ L 为模板。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 cycles, with 10 min extension at 72 °C used for the final cycle (Wang *et al.*, 1993)。PCR 产物用 1% (w/v) 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 电压 90 V, 15 min, EB 染色 30 min, 找到目标条带 (500-600 bp), 采用凝胶回收试剂盒 (H. Q. & Q. Gel Extraction Kit II) 对所需条带进行回收。将目标片段连接至载体 pMD18-T, 然后转入 *E. coli* Top-10 感受态细胞中, 获得阳性克隆。通过测序获得 ITS 区域核酸序列, 在因特网中使用 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 于 NCBI (National Center for Biotechnology Information) Nucleotide Sequence Database 进行比对, 获得鉴定结果 B221 为球毛壳属 (*Chaetomium globosum*)。

2 温室防效试验

将病原菌(*Verticillium dahliae* Kleb.) (Li, X.L., Li, Y. and Zhang, T.Y. 2003 Studies on Cotton Verticillium Wilt Control by Fungal Antagonists. Acta Gossypii Sinica 15, 26~28.) 接于PDA培养基, 25℃恒温箱培养5天后, 挑取菌丝于PDA培养液 (Li, X.L., Li, Y. and Zhang, T.Y. 2003 Studies on Cotton Verticillium Wilt Control by Fungal Antagonists. Acta Gossypii Sinica 15, 26~28.) 中, 200 rpm, 25℃培养7天, 8层灭菌纱布过滤后, 利用血球记数法测得孢子悬浮液浓度, 接于灭菌土壤中, 使得每克土壤含有 3.6×10^7 个孢子, 病原菌定殖10天后按照上述方法将生防菌B221接于土壤中 (浓度为每克土壤约 10^7 个孢子), 同时播种品种为鲁棉研15的棉花包衣种子, 设只接种病原菌的处理为对照。每个处理重复3次, 每个重复20株棉花。播种55天后统计结果, 计算病情指数和防效。

调查结果时发病强度的分级标准 (温室苗期): 0级—健苗, 子叶、真叶无病状; I级—1~2片子叶发病, 真叶未显病状; II级—子叶和1片真叶发病; III级—2片或2片以上真叶发病; IV级—叶片大量脱落或棉花枯死。病情指数和防效计算公式如下:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{病植株数} \times \text{病级数})}{\text{总植株数} \times \text{最高病级数}} \times 100\%$$

$$\text{防效} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{生防菌病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

苗期盆栽试验结果表明 (表 1, 图 1), 接种 B221 的棉花表现出一定程度的防治效果。

表1 生防菌施用后55天对棉花黄萎病的盆栽防效

菌株编号	病情指数	防效(%)
B221	0.110	58.96
CK	0.268	/

3 温室促生试验

在促生试验中, 处理组植株只接种拮抗菌B221的孢子悬浮液, 设清水处理植株为对照。方法同温室防效试验。播种55天后测量棉花的株高, 根长, 鲜重, 并计算生物

量的增加，用以估计生防菌对植物促生作用的影响。生物量的增加计算公式如下：

$$\text{生物量增加} = \frac{\text{处理组鲜重} - \text{对照组鲜重}}{\text{对照组鲜重}} \times 100\%$$

表2 生防菌施用后55天对棉花黄萎病的盆栽促生效果

菌株编号	根长(cm)	株高(cm)	鲜重(g)	生物量的增加(%)
B221	12.43	24.85	15.09	51.20
CK	15.45	24.67	9.98	/



图 1



图 2

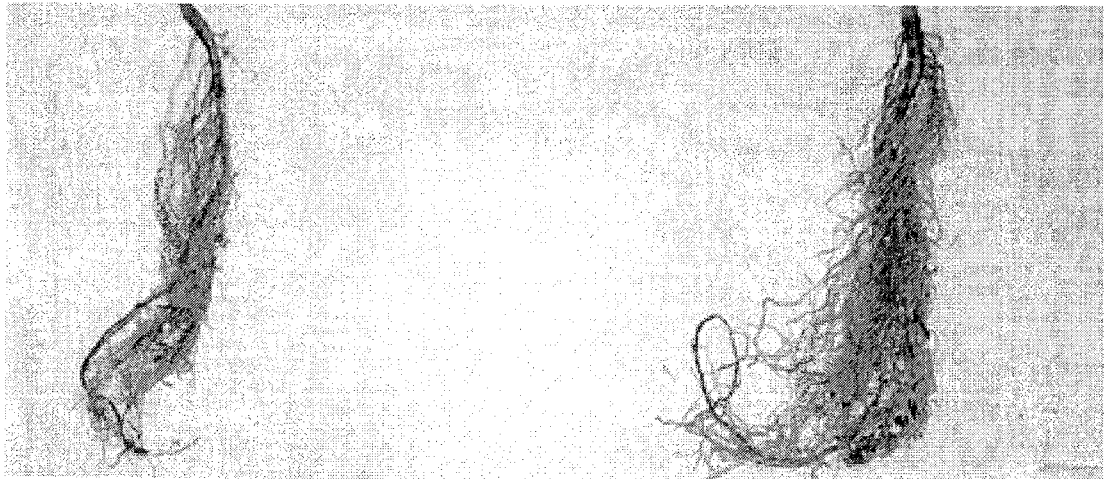


图 3