



(10) 授权公告号 CN 114350552 B

(45) 授权公告日 2023.06.20

(21) 申请号 202111619260.3

(22) 申请日 2021.12.27

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 114350552 A

(43) 申请公布日 2022.04.15

(83) 生物保藏信息  
CCTCC NO: M 20211286 2021.10.18

(73) 专利权人 湖北省生物农药工程研究中心  
地址 430000 湖北省武汉市武昌南湖瑶苑  
专利权人 宁夏农林科学院植物保护研究所  
(宁夏植物病虫害防治重点实验室)

(72) 发明人 黄大野 何嘉 曹春霞 张蓉  
杨丹 郑娇莉 王蓓蓓 李飞

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所(普通合伙) 42001  
专利代理师 龚莹莹

(51) Int.Cl.  
C12N 1/20 (2006.01)  
A01G 13/00 (2006.01)  
A01G 17/00 (2006.01)  
A01N 63/22 (2020.01)  
A01P 3/00 (2006.01)  
A01P 21/00 (2006.01)  
C12R 1/07 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 105410031 A, 2016.03.23  
CN 104946567 A, 2015.09.30

审查员 李阳

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

一株深褐芽孢杆菌及在枸杞病害防控中的应用

(57) 摘要

本发明属于农作物防治技术领域,具体涉及一株深褐芽孢杆菌及在枸杞病害防控中的应用。所述的深褐芽孢杆菌为深褐芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*) GQ260,保藏编号为:CCTCC NO: M20211286,该菌株首次被报道可用于叶面喷雾防治枸杞白粉病及灌根防控枸杞根腐病,在农业生产中具有广阔的应用前景。

1. 一种分离的深褐芽孢杆菌,所述深褐芽孢杆菌的保藏编号为CCTCC NO: M 20211286。

2. 权利要求1所述的深褐芽孢杆菌在制备植物病原菌抑制剂中的应用,所述的抑菌剂的抑制对象为:镰刀菌(*Fusarium* spp.)、穆氏节丝壳(*Arthrocladiella mougeotii*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、茄链格孢(*Alternaria solani*)、胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和/或灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)。

3. 权利要求1所述的深褐芽孢杆菌在枸杞栽培中的应用。

4. 权利要求1所述的深褐芽孢杆菌在防治枸杞根腐病中的应用。

5. 权利要求1所述的深褐芽孢杆菌在防治枸杞白粉病中的应用。

6. 权利要求1所述的深褐芽孢杆菌在促进枸杞生长中的应用。

## 一株深褐芽孢杆菌及在枸杞病害防控中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于农作物防治技术领域,具体涉及一株深褐芽孢杆菌及在枸杞病害防控中的应用。

### 背景技术

[0002] 枸杞是一种名贵的中药,具有较高的营养保健和药用价值,具有抗衰老、保护神经、消炎、促进代谢控制血糖、免疫调节及抗肿瘤等多种生物学活性。青海和宁夏是我国枸杞的主要产地,枸杞生命力顽强,对生长环境的适应性很强,具有较强的耐盐碱性,能适应西部地区恶劣的生存环境,使之成为我国西北地区的重要经济作物,产业开发前景十分广阔。

[0003] 由镰刀菌(*Fusarium* spp.)引起的枸杞根腐病和穆氏节丝壳(*Arthrocladiella mougeotii*)引起的枸杞白粉病是枸杞的2种主要病害,对枸杞生产具有重要影响。目前2种病害的防控主要采用化学杀菌剂,根腐病生产上主要采用恶霉灵和多菌灵等灌根,经中国农药信息网查询,枸杞白粉病登记药剂主要为苯醚甲环唑、吡唑醚菌酯和戊唑醇,由于化学杀菌剂频繁使用,抗药性日益严重。另外,枸杞作为高附加值保健产品,对农药残留要求较为严格,基于上述原因,亟需更为安全有效的防控方法。

[0004] 微生物菌剂不易产生抗药性,无农药残留和环境污染,对土壤微生物群落结构具有调控作用,抑制病害发生。基于上述特点,微生物菌剂已经广泛用于作物病害的防控。如拜耳公司的解淀粉芽孢杆菌QST713在欧盟和中国获得登记,广泛用于作物病害的防控。

[0005] 枸杞种植主要集中于宁夏、青海和新疆这些地区,常年干旱少雨、盐碱化严重且紫外线强烈。芽孢杆菌对于阳光中的紫外线极为敏感,一般紫外线照射30min可完全将其杀死。芽孢杆菌作为一种微生物,高盐碱的土壤不利于其生存和繁殖,所以,用于枸杞病害防控的芽孢杆菌还需对紫外线和盐碱具有一定的耐受性。因此筛选出对枸杞根腐病和白粉病具有良好防控效果,且对紫外线和盐碱具有一定的耐受性的芽孢杆菌具有重要意义。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种分离的芽孢杆菌,所述芽孢杆菌为深褐芽孢杆菌GQ260,其保藏号为CCTCC NO:M 20211286。

[0007] 本发明的另一个目的在于提供了深褐芽孢杆菌GQ260的液体发酵液的制备方法。

[0008] 本发明的最后一个目的在于提供深褐芽孢杆菌GQ260在制备植物病原菌抑制剂中的应用,特别是用于制备防治枸杞根腐病和白粉病的药物。

[0009] 为了达到上述目的,本发明采取以下技术方案来实现

[0010] 一种分离的芽孢杆菌,从枸杞根际土壤中分离,经鉴定为深褐芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*),已于2021年10月18日送至中国典型培养物保藏中心进行保藏,分类命名:深褐芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)GQ260;保藏编号为CCTCC NO:M 20211286;地点:中国,武汉,武汉大学。

[0011] 深褐芽孢杆菌GQ260在LB培养基菌落生长良好,菌落乳白色(图1)。

[0012] 深褐芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)GQ260在制备植物病原菌抑制剂中的应用,特别是用于制备防治枸杞根腐病和白粉病药物;

[0013] 以上所述的应用中,优选的,所述的病原菌为镰刀菌(*Fusarium spp.*)、穆氏节丝壳(*Arthrocladiella mougeotii*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、茄链格孢(*Alternaria solani*)、胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和/或灰葡萄胞(*Botrytis cinerea*)。

[0014] 本发明的保护范围还包括深褐芽孢杆菌GQ260在枸杞栽培种的应用,包括用于枸杞根腐病和白粉病的防治,促进枸杞生长。

[0015] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0016] (1) 本发明提供了一种深褐芽孢杆菌,该菌株首次被报道可同时用于枸杞白粉病和根腐病的防治,与现有技术相比,本发明提供的深褐芽孢杆菌的抗菌谱更广,与现有杀菌剂和杀虫剂无交互抗药性。

[0017] (2) 与目前使用化学合成农药防治相比,由于其来自于自然环境,具有高效、低毒、不污染环境和不易产生抗药性等优点。

[0018] (3) 本发明筛选到的深褐芽孢杆菌具有枸杞根际和叶际的定殖特性,同时具备抗紫外线和耐盐的能力,特别适用于枸杞生长地的施用,适用于枸杞白粉病和根腐病的防治。

## 附图说明

[0019] 图1 GQ260菌株菌落形态。

[0020] 图2 GQ260抑菌活性示意图。

[0021] 图3 GQ260耐盐性。

[0022] 图4 GQ260产嗜铁素和水解酶能力。

## 具体实施方式

[0023] 为了更好地解释本发明,以下结合具体实施例进一步阐明本发明的主要内容,但本发明的内容不仅仅局限于以下实施例。本发明所述技术方案,如未特别说明,均为本领域的常规技术,所述试剂或材料,如未特别说明,均来源于商业渠道。

[0024] 实施例1:

[0025] 深褐芽孢杆菌的获得及鉴定:

[0026] 一株分离的细菌,从枸杞根际土壤中分离得到,经16s rDNA结合生理生化鉴定后属于深褐芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*) (图1,表1),已于2021年10月18日送至中国典型培养物保藏中心进行保藏,分类命名:深褐芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)GQ260;保藏编号为CCTCC NO:M 20211286;地点:中国,武汉,武汉大学。

[0027] 在本发明中,深褐芽孢杆菌GQ260或被简称为GQ260。

[0028] 形态特征:菌落圆形,乳白色。

[0029] 菌株生理生化特性:

[0030] 表1菌株GQ260生理生化特性-碳源利用

检测项目	结果	检测项目	结果
A1 阴性对照	-	E1 明胶	W
A2 糊精	W	E2 e 氨基乙酰-L-脯氨酸	W
A3 D-麦芽糖	+	E3 L-丙氨酸	+
A4 D-麦海藻糖	+	E4 L-精氨酸	+
A5 D-纤维二糖	+	E5 L-天冬氨酸	+
A6 龙胆二糖	+	E6 L-谷氨酸	+
A7 蔗糖	+	E7 L-组胺	W
A8 D-松二糖	W	E8 L-焦谷氨酸	-
[0031] A9 水苏糖	-	E9 L-丝氨酸	W
A10 阳性对照	+	E10 林肯霉素,洁霉素	W
A11 pH6	+	E11 盐酸胍	W
A12 pH5	+	E12 硫酸四癸钠	-
B1 蜜三糖,棉子糖	-	F1 果胶	W
B2 $\alpha$ -D-乳糖	-	F2 D-半乳糖醛酸	+
B3 蜜二糖	-	F3 L-半乳糖醛酸内酯	W
B4 $\beta$ -甲酰-D-葡糖苷	+	F4 D-葡糖酸	+
B5 D-水杨苷	+	F5 D-葡糖醛酸	w
B6 N-乙酰-D-葡糖胺	+	F6 葡糖醛酰胺	W

	B7	N-乙酰-β-D-甘露糖胺	-	F7	粘酸; 粘液酸	W
	B8	N-乙酰-D-半乳糖胺	w	F8	奎宁酸	-
	B9	N-乙酰神经氨酸	-	F9	糖质酸	W
	B10	1% NaCl	+	F10	万古霉素	-
	B11	4% NaCl	+	F11	四唑紫	W
	B12	8% NaCl	+	F12	四唑蓝	-
	C1	α-D-葡萄糖	+	G1	p-羟基-苯乙酸	-
	C2	D-甘露糖	+	G2	丙酮酸甲酯	W
	C3	D-果糖	+	G3	D-乳酸甲酯	-
	C4	D-半乳糖	-	G4	L-乳酸	+
	C5	3-甲酰葡萄糖	-	G5	柠檬酸	+
	C6	D-岩藻糖	w	G6	α-酮-戊二酸	-
	C7	L-岩藻糖	-	G7	D-苹果酸	-
	C8	L-鼠李糖	-	G8	L-苹果酸	+
[0032]	C9	肌苷	-	G9	溴-丁二酸	W
	C10	乳酸钠	+	G10	茶啉酮酸	-
	C11	梭链孢酸	-	G11	氯化锂	+
	C12	D-丝氨酸	+	G12	亚碲酸钾	+
	D1	D-山梨醇	+	H1	吐温 40	-
	D2	D-甘露醇	+	H2	γ-氨基-丁酸	-
	D3	D-阿拉伯醇	-	H3	α-羟基-丁酸	-
	D4	肌醇	+	H4	β-羟基-D,L 丁酸	+
	D5	甘油	+	H5	α-酮-丁酸	-
	D6	D-葡萄糖-6-磷酸	-	H6	乙酰乙酸	-
	D7	D-果糖-6-磷酸	W	H7	丙酸	-
	D8	D-天冬氨酸	-	H8	乙酸	W
	D9	D-丝氨酸	W	H9	甲酸	W
	D10	醋竹桃霉素	-	H10	氨曲南	W
	D11	利福霉素 SV	-	H11	丁酸钠	+
[0033]	D12	二甲胺四环素	-	H12	溴酸钠	W

[0034] +: 阳性反应; -: 阴性反应; W: 弱阳性反应

[0035] 实施例2:

[0036] 深褐芽孢杆菌GQ260的发酵(以下培养基配方中的百分数均为质量分数):

[0037] 1) 一级种子培养: 500ml三角瓶中装有100ml一级种子培养基, 121℃湿热灭菌20min, 取GQ260冻干管菌种接种于一级种子培养基中, 在35℃, 180rpm摇床振荡培养10h; 一级种子培养所用培养基的原料及用量为: 葡萄糖1%, 牛肉膏2%, 蛋白胨3%, 氯化钠0.5%, 培养基pH为7;

[0038] 2) 二级种子培养: 500L发酵罐中装有300L二级种子培养基, 121℃湿热灭菌20min, 将200ml一级种子接种于二级种子培养基中; 在35℃培养10h; 控制罐压0.05Mpa, 搅拌转速200rpm, 通气比1:1, 二级种子培养所用培养基的原料及用量为: 葡萄糖1%, 酵母抽提物2%, 蛋白胨3%, 磷酸二氢钾0.002%, 硫酸镁0.01%, 培养基pH 7;

[0039] 3) 发酵: 10吨发酵罐中装有6吨GQH-260发酵培养基, 121℃湿热灭菌20min, 将250L二级种子液移种于发酵培养基中, 控制罐0.05Mpa, 搅拌转速150rpm, 通气比1:1, 在35℃培养36h; 发酵所用培养基的原料及用量为: 玉米粉2.0%、棉粕3.0%、酵母提取物1%、玉米浆0.5%、磷酸二氢钾0.01%、硫酸镁0.02%、碳酸钙0.05%, 培养基pH7;

[0040] 4) 芽孢脱落20-40%时结束发酵。芽胞数95亿cfu/mL。

[0041] 实施例3:

[0042] 深褐芽孢杆菌GQ260的抑菌活性及防控枸杞根腐病和白粉病效果

[0043] 供试枸杞根腐病病原菌茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)分离自枸杞病株, 4℃保存于PDA斜面, 其他病原真菌4℃保存于PDA斜面。将斜面菌株转入PDA平板进行活化, 30℃培养6d备用。将灭菌滤纸片置于PDA平板两端, 随后滴入GQ260发酵液7μL。24h后用4mm打孔器接入上述病原菌菌碟, 以接无菌水作为空白对照, 病原菌和滤纸片距离为25mm。带对照长满平板后统计各处理和对照菌落直径, 并计算抑菌率。

[0044] 抑菌率 =  $[(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / (\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径})] \times 100\%$

[0045] 通过离体抑菌试验表明, GQ260对枸杞根腐病病原菌具有良好的抑菌活性(图2(表2))。

[0046] 表2GQ260对病原菌抑菌活性

	病原菌	抑菌率 (%)
	茄病镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	63.78
	核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	53.85
[0047]	胶胞炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	70.47
	灰葡萄胞 <i>Botrytis cinerea</i>	61.12
	立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	57.90
	茄链格孢 <i>Alternaria solani</i>	61.66

[0048] 枸杞根腐病试验地位于宁夏中宁县大战场镇花豹湾村百瑞源枸杞基地,枸杞品种宁杞7号,树龄8年。2021年4月25日开展菌剂处理试验,实施例2制备的菌剂GQ260发酵液原液稀释200倍,每株菌液用量2.5L灌根,对照灌清水,每个处理3次重复,每个重复30株枸杞。

[0049] 枝条生长量调查,每个处理设3个重复,每个重复选取3株大小一致的枸杞树,每个处理9株树,每株树随机选取东南西北中5个枝条,定枝挂标签,写好编号,作为调查枝条。春季新枝生长期(4月20至5月20日),每7-10d用卷尺对标记枝条进行生长量调查并记录。

[0050] 采集标记9株树的鲜果,称量鲜重测产。

[0051] 7月1日统计处理和对照的死亡枸杞数量并计算死亡率。

[0052] 试验结果表明,GQ260菌剂能明显降低枸杞根腐病死亡率,并具有显著的促生和增产作用(表3,4和5)。

[0053] 表3 GQ260菌剂对枸杞生长量的影响(cm/株/枝条)

	重复	GQH260	CK
[0054]	1	45.93	34
	2	40	34
[0055]	3	47.2	34.73
	平均	44.38	34.24

[0056] 表4 GQ260菌剂对枸杞产量的影响(kg/株)

[0057]	重复	GQH260	CK
--------	----	--------	----

1	6.4	7.2
2	7.9	5.2
3	7.1	6.3
平均	7.13	6.23

[0058] 表5菌剂处理对枸杞根腐病的防治效果

重复	死亡率 (%)	
	GQ260	CK
1	4.17	12.50
2	4.67	23.33
3	3.75	9.06
平均	4.19	14.97

[0059]

[0060] 枸杞白粉病设在红寺堡大河乡百瑞源枸杞种植基地,根据枸杞白粉病常年的发病时间,于枸杞白粉病发病前期9月10日喷药,GQ260发酵液原液稀释200倍,喷至叶面上有液体滴落即可,对照为清水,每个处理3次重复,每个重复调查10个枝条,每枝条调查枝条端部的10个叶片,药后14d调查枸杞白粉病的病情指数,并计算其防效。

[0061] 枸杞白粉病分级标准:

[0062] 0级:无病;

[0063] 1级:病斑占整个叶面积的5%以下;

[0064] 3级:病斑占整个叶面积的6%~10%;

[0065] 5级:病斑占整个叶面积的11%~25%;

[0066] 7级:病斑占整个叶面积的26%~50%;

[0067] 9级:病斑占整个叶面积的51%以上。

[0068] 病情指数 =  $\Sigma$  (各级病叶数 × 相对级数值) × 100 / (调查总叶数 × 9)

[0069] 防治效果 (%) =  $[1 - (\text{空白对照区施药前病情指数} \times \text{处理区施药后病情指数}) / (\text{空白对照区施药后病情指数} \times \text{处理区施药前病情指数})] \times 100$

[0070] 表6 GQ260防控枸杞白粉病效果

处理	病情指数	防效 (%)
GQ260	13.63	68.37
对照	43.09	-

[0072] 实施例4:GQ260耐盐和紫外线能力

[0073] 制备含5%、10%和15%NaCl的LB平板,将GQ260发酵液在LB平板划线,以不加NaCl的LB平板作为空白对照,以从实施例1相同枸杞根际分离的贝莱斯芽孢杆菌作为菌株对照,24h观察菌株生长情况,结果如图3所示。

[0074] 制备含0、5%、10%和15%NaCl的LB液体培养基,接入GQ260发酵液(1%接种量),37℃,180rpm/min摇床震荡培养16h后,采用梯度稀释平板计数。

[0075] 试验结果表明,GQ260具有良好的耐盐能力(图3,表7),在5%NaCl生长良好,芽胞

数量无明显下降,而贝莱斯芽孢杆菌在5%NaCl培养条件下芽胞数量下降约100倍。

[0076] 表7 GQ260在不同浓度NaCl生长情况

NaCl 浓度	芽胞数 (cfu/mL)	
	GQ260	贝莱斯芽孢杆菌
0	$4.03 \times 10^8$	$3.90 \times 10^8$
5%	$3.59 \times 10^8$	$4.08 \times 10^6$
10%	855.3	0
15%	3.5	0

[0077] 将100mL上述两个菌株的对照发酵液(无NaCl的处理)在紫外灯光254nm,在紫外灯光强 $27.8 \mu\text{w}/\text{cm}^2$ 、35℃的条件下培养5h后计数。比较菌株的耐紫外线能力,试验结果表明,GQ260较强的紫外线耐受能力(表8)。

[0079] 表8 GQ260耐紫外线能力

时间 (h)	芽胞数 (cfu/mL)	
	GQ260	贝莱斯芽孢杆菌
0	$4.03 \times 10^8$	$6.73 \times 10^8$
5	$3.90 \times 10^8$	0

[0082] 实施例5:GQ260产嗜铁素和水解酶活性

[0083] 产嗜铁素活性测定:用灭菌牙签将GQ260单菌落接种于CAS培养基平板,28℃培养箱黑暗培养7d后观察是否产生黄色晕圈。

[0084] 水解酶活性测定:分别接种于几丁质(几丁质酶)、酪蛋白(蛋白酶)、CMC(纤维素酶)、淀粉(淀粉酶)和茯苓粉培养基( $\beta$ -1,3-葡聚糖酶)平板,28℃培养箱黑暗培养7d后观察是否产透明圈。其中酪蛋白平板需在培养后加入10%三氯乙酸,CMC平板需加入用1g/L刚果红染1h后,倒掉染液,再用1mol/L NaCl溶液浸泡1h,淀粉平板需加入用2.5%卢氏碘液,浸泡15min后倒掉,用无菌水冲洗。

[0085] 试验结果表明,GQ260具有产嗜铁素、淀粉酶和几丁质酶能力(图4)。

[0086] 实施例6:GQ260在枸杞叶际和根际定殖能力

[0087] 将深褐芽孢杆菌GQ260在含不同浓度利福平培养基进行抗性筛选,获得抗利福平突变菌株(该菌株经检测除具有利福平抗性外,其余生理生化特性与GQ260无显著性差异),该菌株可在含 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的利福平的LB中正常生长。

[0088] 将抗利福平突变菌株按照实施例2发酵,调整菌浓度与实施例2制备的深褐芽孢杆菌GQ260发酵液菌浓度相同,将突变株或深褐芽孢杆菌GQ260的发酵液喷施于枸杞叶片和对照番茄叶片,10d后将叶片表面使用75%消毒,并用无菌水冲洗3次。晾干后称取枸杞和番茄各1g,随后加入1mL无菌水置于研钵中研磨,静置后吸取上清液,采用梯度稀释法稀释后,涂布于含 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的利福平的LB平板,37℃培养24h后计数,测定GQ260在茶叶和番茄叶片

的定殖能力。

[0089] 将上述发酵液灌根枸杞苗根部,10d后取出植株,用无菌水将根部清洗干净,称1g、研磨、稀释后,涂布于含 $300\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的利福平的LB平板,37℃培养24h后计数,测定GQ260在枸杞和番茄根系的定殖能力。

[0090] 试验表明,在枸杞根际分离的GQ260对枸杞叶片和根际具有专一的定殖效果,定殖量分别为 $3.7\times 10^5\text{cfu/g}$ 和 $9.3\times 10^5\text{cfu/g}$ (表9),而在番茄叶片无定殖作用,GQ260的这种专一定殖效果能持续性防控白粉病和根腐病的侵染。

[0091] 表9 GQ260在枸杞和番茄叶际和根际定殖能力

植物	定殖部位	
	叶际	根际
番茄	0	0
枸杞	$3.7\times 10^5\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$	$9.3\times 10^6\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$

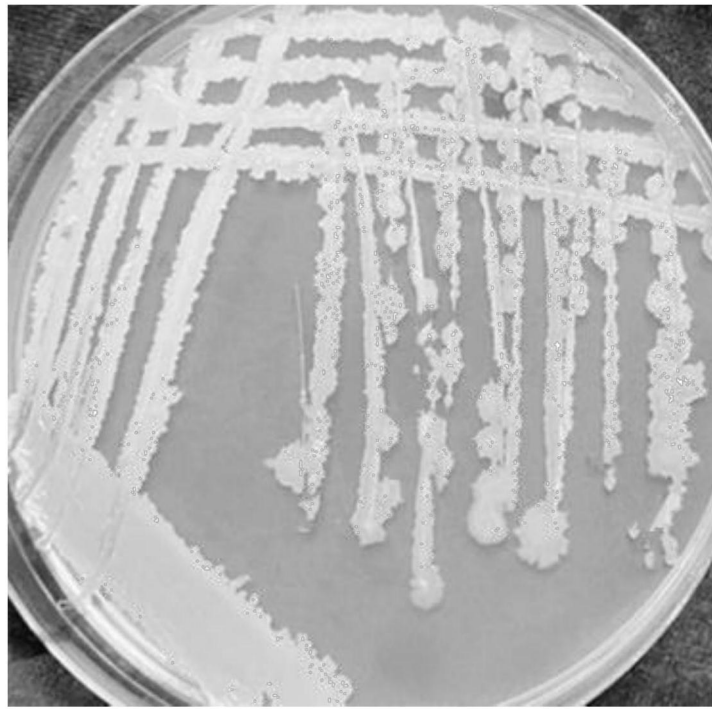


图1

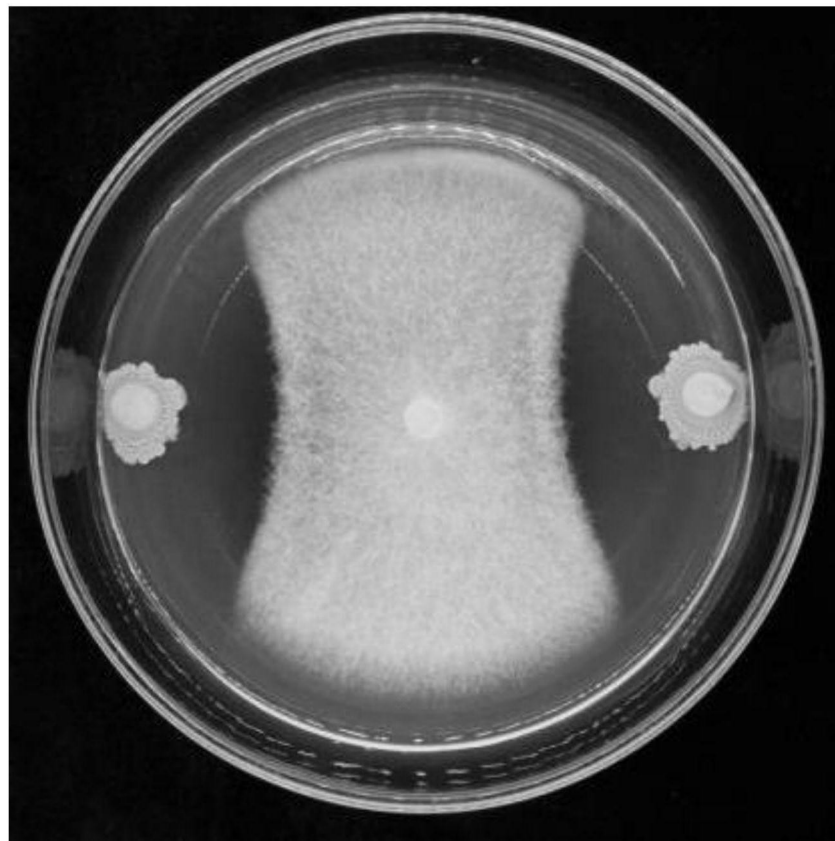


图2

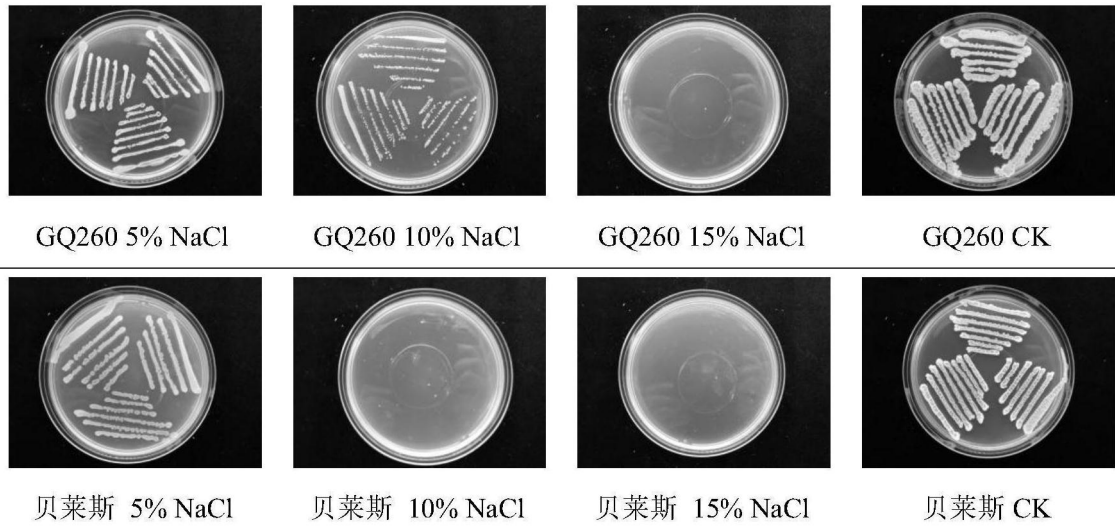


图3



图4