

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 1/14

A01N 63/04 C12Q 1/18

//(C12N1/14, C12R1 : 645)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 95192307.2

[43] 授权公告日 2003 年 3 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1102958C

[22] 申请日 1995.1.27 [21] 申请号 95192307.2

[30] 优先权

[32] 1994. 1. 31 [33] FI [31] 940463

[86] 国际申请 PCT/FI95/00042 1995. 1. 27

[87] 国际公布 WO95/20646 英 1995. 8. 3

[85] 进入国家阶段日期 1996. 9. 26

[71] 专利权人 基米勒·艾格罗公司

地址 芬兰赫尔辛基

[72] 发明人 里斯托·T·塔沃恩

米加·T·凯金恩

马加-利纳·莱登普拉

佩克·T·塞斯卡里

埃萨·P·泰普里

乌拉·A·图米恩

[56] 参考文献

EP0133878A 1985. 03. 13 A01N63/04 C12N1/14

WO9105475A 1991. 05. 02 A01N63/00 C12Q1/18

C12N1/20

审查员 潘爱群

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 1 页 说明书 28 页 附图 3 页

[54] 发明名称 用于植物疾病生物控制的微生物

[57] 摘要

本发明涉及植物疾病的生物控制并且涉及丛赤壳 *Nectria* 属的新的微生物及其在控制植物真菌感染中的应用。本发明还涉及含有该丛赤壳属的新菌株的组合物以及为所说目的的应用。本发明还提供了从土壤的微生物菌株中筛选有效的控制生物体的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种真菌 Nectria Pityrodes Montagne J76 菌株的生物学纯培养物，保藏号为 DSM 7522。

5 2、一种真菌 Nectria Pityrodes Montagne J1431 菌株的生物学纯培养物，保藏号为 DSM 8805。

3、一种真菌 Nectria Pityrodes Montagne J1432 菌株的生物学纯培养物，保藏号为 DSM 8806。

10 4、一种真菌 Nectria Pityrodes Montagne MOS1 菌株的生物学纯培养物，保藏号为 DSM 8807。

5、一种真菌 Nectria Pityrodes Montagne ROS2 菌株的生物学纯培养物，保藏号为 DSM 8808。

15 6、一种生物杀真菌剂组合物，它包含至少一种选自 Nectria Pityrodes Montagne J76, J1431, J1432, MOS1 和 ROS2 的真菌菌株，所说真菌的保藏号分别为 DSM7522, DSM8805, DSM8806, DSM8807 和 DSM8808，和本领域惯用的载体和/或添加剂。

7、根据权利要求 7 所说的组合物，其中该载体和添加剂选自硅石，奶粉，羧甲基纤维素，蔗糖，抗坏血酸和淀粉。

8、根据权利要求 7 或 8 所说的组合物，其生产过程包括：

20 (a)在合适的生长培养基中培养权利要求 1 - 5 任意之一所说的真菌菌株，分离细胞物质，然后向其中加入载体和/或添加剂，干燥和粉碎所说的物质，或

25 (b)在合适的含硅石生长培养基中培养权利要求 1 - 5 任意之一所说的真菌菌株，和如果需要，然后向其中加入载体和/或添加剂，干燥和粉碎所说的物质。

9、一种阻止真菌感染植物的方法，它包括对植物或其种子施用权利要求 6 所说的杀真菌剂或者施用权利要求 7 - 9 任意之一所说的杀真菌剂组合物或在播种之前或之后向植物生长基质中加入杀真菌剂或杀真菌剂组合物。

10、权利要求 1 - 5 任一项所说的 Nectria Pityrodes 菌株作为农药的应用。

用于植物疾病生物控制的微生物

5 本发明涉及植物疾病的生物控制，更具体地涉及属于丛赤壳属的新的微生物及其在控制植物真菌感染中的应用。本发明还涉及含有新的丛赤壳属菌株的组合物及其在所述目的中的应用。本发明还提供了从土壤中分离的微生物菌株中筛选具有生物控制效果的微生物的方法。

农作物深受各种真菌、细菌和病毒病以及许多昆虫害虫的侵害。为了控制这些病害已经研制了许多栽培技术的、化学的和生物的控制方法。这些方法的目的是为了防止植物病害和其它虫害引起的作物产量和品质的损失。

植物疾病的生物控制一般是指由其它生物对植物病原体的控制，这些生物体被称为生物控制剂(BCA)。通常将所研制的 BCA 产品称为生物农药。植物疾病的生物控制机理是多样的，防治效果经常是以许多不同机理的共同作用实现的。控制效果可能是基于生物控制剂产生的抑制性代谢物，有时还能寄生于病原体内或者与病原体竞争生活空间与营养。

由于许多传统的化学控制剂对环境和人类有害这一事实，需要并发新的生物控制剂。化学制剂还有其它缺点：许多害虫已经对一种或多种控制剂产生了抗性。对生物农药的抗性的产生几乎是不可能的，因为它的效果是以许多不同类型的机理为基础的。通常化学制剂产生效果更快并且比生物制剂更有效。由于生物农药的效果是以存活的和可重复产生的微生物为基础的，因此生物农药比化学制剂作用的持续时间更长。

最重要的一组生物农药是抗昆虫的细菌产品。基于苏云金芽胞杆菌的生物杀虫剂是其中最普遍使用的。芬兰生产了一种基于放线菌链霉菌的生物杀真菌剂，可有效地抵抗许多土壤来源的和种子来源的植物的真菌疾病。已经从无害的能使木头腐烂的真菌 *Phlebia gigantea* 研制出能够抵抗根腐病(Fomes root rot)(*Heterobasidion annosum* 引起的)在针叶林中传播的产品。

已经对假单胞菌属，尤其是荧光假单胞菌种的细菌进行大量的研究，现在已知许多荧光假单胞菌菌株具有杀真菌活性。参见例如已公开的专利申请 WO 92/18613, FI 921722 和 WO 90/01327，以及 EP 专利 228457。

在寻找适用于生物控制的微生物时，通常需要对大量的微生物菌株进行

筛选,检测其控制活性或其它特性。在专利申请中已经描述了一些筛选方法。

在美国专利 4,647,533 中,描述了一种三步骤方法,其中包括首先从土壤中分离细菌,所说土壤含有大量的有害腐霉属真菌的孢子。在第二个步骤中,通过在含有许多腐霉孢子的土壤中栽培谷物种子,加入各种待测细菌的
5 和没有细菌的对照的悬液,在温室中对分离到各个细菌进行筛选。从该筛选试验中选出这样的细菌即在这种细菌存在下植物的叶子长得最大并且也长得最高。第三步是,在大田中进一步对选定的细菌进行筛选,采取的方法与在温室中的试验相似。在该步骤中也选出这样的细菌即在其存在下植物生长最好。

10 另一方面在 FI 专利申请 NO.921722 中使用了下列方法。首先在合适的培养基中培养腐霉菌菌株菌丝体,在该菌丝体上面覆盖一层无菌土,向该土中加入待检测的微生物,并评价其对腐霉生长的作用。在第二阶段用引起腐烂的腐霉菌株接种土壤样品,在土壤中播种对该真菌感染敏感的植物种子,并且确定该待测微生物对植物生长的作用。在该进一步检测步骤试验中,选出
15 这样的物质,它们在上面介绍的两个检测试验中都能够抑制腐霉。

本发明涉及从丛赤壳菌属,即 *Nectria pityrodes* Montagne, 发现该微生物特别有效地抵抗镰刀菌属真菌。

本发明还涉及生物杀真菌组合物,它包括作为活性成分的上述属于丛赤壳菌的真菌菌株,以及任选的本领域常规的作为配剂的添加剂或载体。这种
20 配剂的例子有适于拌种的组合物,适于喷撒于作物的粉状或颗粒状组合物或用于处理土壤的液体配剂。

本发明还提供了一种新的有效的用于筛选真菌菌株的方法,在该方法中使用了一个三步骤的检测顺序,包括砂,泥炭,和大田土壤的检测。在每一个检测步骤中,从进一步的筛选步骤中排除无效的真菌菌株。在温室中被证
25 明是最好的真菌菌株用于进行大田筛选试验。

附图简述

图 1 显示 92 年夏天用 J76 进行的剂量应答试验。用大刀镰刀菌 (*F.culmorum*)接种的种子产生的病苗的百分数。

K = 未处理, B = Baytan 拌种(Baytan dressing)

30 J76 - 0 = J76 的孢子悬液, 1.2×10^7 cfu/ml

J76 - 1 = J76 的孢子悬液, 1.2×10^6 cfu/ml

J76 - 2 = J76 的孢子悬液, 1.2×10^5 cfu/ml

J76 - 3 = J76 的孢子悬液, 1.2×10^4 cfu/ml

图 2 显示在 92 年夏天用 J76 进行的剂量应答试验。用健康种子产生的病菌的百分数。缩写的含义如图 1 所示。

5 图 3a - 3d 图解表示在温室试验不同阶段排除掉的真菌分离株对大田条件下健康幼苗的作用。K = 未处理, B = Baytan I 拌种。缩写的含义如图 1 所示。

下文中对本发明的真菌菌株进行详细描述。报道了这些菌株的分离和特性鉴定, 以及在大田条件下对其效果的测定。进一步描述了由这些菌株形成的生物杀真菌剂的组合物的配制, 以及该组合物的特性和用这些组合物进行的效果试验。还描述了用于筛选从土壤样品中分离的真菌菌株的方法。

微生物的分离

在 89 年, 90 年和 91 年收集土壤样本, 从这些样本中分离出本发明的真菌菌株, 总共约 190 个样品。在芬兰的不同地区, 主要是从 MTT 研究站(农业研究中心), 从不同的土壤类型和不同的作物的轮作地域收集样品。样品是从根层土壤中获取的(0 - 15 cm 深)。从各个田中取几个小样品, 集成 1 - 2 升样品。

通过稀释方法(土壤分离)或诱饵植物法(bait plant method)(根分离)进行分离, 下文中方法一节中描述了具体过程。

20 微生物的定性

从土壤样品中获得的真菌菌株用本发明的筛选方法进行试验, 见下文方法一节中的描述。发现五个菌株显示出非常好的结果。命名为 J76, J1431, J1432, MOS1 和 ROS2 并在 Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Netherlands 进行鉴定。按照布达佩斯条约的规定, 将这些菌株保藏于 DSM 保藏中心(德国微生物和细胞培养物保藏中心), 保藏号分别为 DSM 7522(1993 年 3 月 15 日), DSM 8805(1993 年 12 月 10 日), DSM 8806(1993 年 12 月 10 日), DSM 8807(1993 年 12 月 10 日), DSM 8808(1993 年 12 月 10 日)。

微生物的形态特征如下:

30 形态学: 无边缘不育菌丝的分生孢子座。分生孢子梗具有重复分枝, 在每个节处产生几个分枝。未级分枝带有排列成栅栏层状的管瓶螺环。管瓶柱

长达 15 μm ，并有一个顶端孔。分生孢子为带有门脐(hilum)的链形或微球形， $7 - 8 \times 4 \mu\text{m}$ ，壁光滑，没有附脐。

菌落特性：在燕麦琼脂上，22 $^{\circ}\text{C}$ 生长 7 天至直径为 40 mm 的菌落；菌丝透明，孢子形成区为多泡状突起的分生孢子座，绿色，排列成紧密环状。

5 没有突出的气味，菌落反面无色，有限的渗出物，菌落清亮。

J76 菌株的分生孢子梗结构类似于疣孢漆斑菌，但不同的是产生非边缘分生孢子，分生孢子为干链形式，没有典型的扇形附脐。

胶霉属的模式种与该新菌株不同之处在于，对于典型的胶霉产生单个画笔状的分生孢子。

10 因此 J76, J1431, J1432, MOS1 和 ROS2 菌株被认作为 Nectria pityrodes Montagne 种。

利用这些菌株，可以配制经久的制剂，该制剂易于散播到需要进行疾病防治的植物上。可以生产例如粉状形式的制剂。微生物的培养可以从一个接种物开始，该接种物是保存于 - 80 $^{\circ}\text{C}$ 的含有孢子的 PDA 沉淀丸，该微生物
15 可以培养成液体培养物或在固体支撑物上培养。营养培养基含有糖例如蔗糖，和氮源以及少量的其它营养物。在培养时，可以使用非特异性营养培养基，例如玉米浸出物(Corn Steep Liquor, CSL)，也可使用特异性营养培养基，例如 GYM(葡萄糖 4 g/l，酵母抽提物 4 g/l，麦芽抽提物 10 g/l)或 PDB(土豆 - 葡萄糖 - 液体培养基)，在灭菌之前调整 pH 值至 6.0。振荡培养一至两星
20 期。通过滤纸过滤或离心可从液体培养基中分离出细胞。如果使用液体培养，将一种载体与细胞混合，所说载体例如硅石，奶粉和/或 CMC(羧甲基纤维素)。在室温下将细胞物质干燥并且磨成粉状。

方法

微生物的分离

25 a) 稀释法(从土壤中分离)

将 10 克土壤与 100 ml 0.5 % 水琼脂(Bactoagar)混合。从该混合物中取出三个 10 ml 的小样本，将每个样品用 0.5 % 水琼脂制备两个稀释液(10^{-1} 和 10^{-2})。用振荡器将稀释液振动(在水浴中)20 - 30 分钟。将一毫升稀释液吸移到一个空培养皿中并且倾倒入 20 ml Littman Oxgall 琼脂(LOA)。在室温下
30 培养 3 - 7 天并且在 PDA(土豆葡萄糖琼脂)上将单个真菌分离至纯培养物。

b) 诱饵植物法(bait plant method)(根分离)

- 将来自一个样品的土壤填充到一个系列花盆平板(Vefi - VP 96系列花盆平板, 带有各 50 ml 的花盆)上的 15 个花盆中。在每个花盆中播种 4 个小麦种子, 或 4 个大麦种子或约 15 个萝卜种子(turnip rape), 每个植物品种使用五个花盆。用砂土覆盖种子, 花盆中加水, 并在 15 °C 的培养室中培养, 每天 14 小时光照。培养两个星期之后, 摘取植物并且在流动的水中洗涤或用无水刷子清洁之。从根上切下小片, 放入平皿中。使用培养基: LOA(10 g 蛋白胨, 10 g 葡萄糖, 15 g Bacto - Oxgall, 0.01 g B - 结晶紫, 0.03 g 链霉素, 20 g 琼脂, 加水至 1000 ml), PCNB(15 g 蛋白胨, 1g KH_2PO_4 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g Avicol, 3 ppm 链霉素, 20 g 琼脂, 加水至 1000 ml), 和 PDA - 链霉素(39 g PDA - 制剂, 300 ppm 链霉素, 加水至 1000 ml)。培养几天之后, 分离单个菌落, 在 PDA 平板上继代培养。将菌株以 PDA 沉淀丸形式装于安瓿管(Nalgene 5000 - 0012, PP 无菌 1.2 ml)中储存于 - 80 °C。

在温室中实施该筛选方法

砂土试验

- 15 将谷物种子播种于砂土层上。在种子和生长基质上首先接种含菌丝体和孢子的水溶液, 然后再接种待测真菌的孢子溶液, 之后用砂土覆盖种子。两个半星期之后, 检测幼苗疾病的病症的程度。从进一步的试验中排除那些不能影响疾病程度或本身就是病原菌的真菌。

泥炭试验

- 20 将谷物的种子浸于病原菌的孢子悬液中, 随后干燥, 之后用待测真菌的孢子悬液浸湿种子, 干燥和播种。将煮过的泥炭用作生长基质。培养两个半星期之后, 观察幼苗的健康状况。将明显有疾病防治效果的真菌菌株进行大田土壤试验。

大田土壤试验

- 25 将研细的和湿润的大田土壤放入 1.5 升大小的花盆中, 每个花盆中播种 36 个谷物种子。在播种以前按泥炭试验中的方法对谷物进行处理, 每个处理使用三个相同的试验花盆。培养四周之后, 检查幼苗的症状。

将有良好效果的菌株进行大田试验, 以便最终确定这些微生物分离株的生物杀真菌效果。

- 30 真菌菌株的致病力

对 J76 真菌菌株的可能的有害作用进行初步检测。目前得到的结果显示

该真菌对植物没有致病力。检测了 33 个植物品种。

试验

下列试验阐明本发明的用途。在项目(A)中描述了使用本发明的 Nectria pityrodes J76, J1431, J1432, MOS1 和 ROS2 菌株控制主要由镰刀菌(Fusarium)引起的植物疾病。在项目(B)中描述这些菌株的制备及其应用, 在项目(C)中介绍如何对 J76 真菌菌株的作用模式进行检测, 项目(D)是本发明筛选方法的实施和评价。

(A)真菌菌株孢子悬液的使用

用菌株 J76 的孢子悬液进行的试验

10 在 92 年夏天, 在三个不同的试验点, 对 J76 菌株的孢子悬液的效果进行检测。在试验中使用两种不同的种子: 人工接种巨大镰刀菌(Fusarium culmorum)的小麦和自然感染雪腐病镰刀菌(F. nivale)的大麦。

表 1 给出了小麦试验的结果。表 2 给出了人工接种的小麦的产量。

15 表 3 中列出了观察大麦幼苗的结果。疾病对大麦的产量没有统计学意义上显著影响。

表1 在92年夏天用人工接种的小麦在三个试验点进行的试验。幼苗的出苗和发病率

	处理	幼苗数/排米- (rowmeter)	发病率 - 严重 发病的幼苗的 百分数
5			
	JOKIOINEN:		
	健康种子	50	5.2
	未处理	11	48
	Baytan-拌种	45	10
10	J76	47	7.2
	MIETOINEN:		
	健康种子	45	7.3
	未处理	10	42
	Baytan-拌种	39	3.8
15	J76	33	13
	PÄLKÄNE:		
	健康种子	50	3.0
	未处理	15	57
	Baytan-拌种	51	24
20	J76	45	11

表2 在92年夏天用人工接种的小麦在三个试验点进行的试验。产量效果(kg/公顷(ha))

	处理	JOKIOINEN	MIETOINEN	PÄLKÄNE
25	健康种子	3650	3190	5290
	未处理	1830	1690	1950
	Baytan-拌种	3270	3190	4940
	J76	3530	2950	4900
30				

表 3 在 92 年夏天用自然感染(雪腐病镰刀菌)的大麦在三个试验点进行的试验。幼苗的出苗和发病率

	处理	幼苗数/排米	发病率 - 严重 发病的幼苗的 百分数
5			
	JOKIOINEN:		
	未处理	39	7.7
	Baytan-拌种	40	1.2
10	J76	40	0.9
	MIETOINEN:		
	未处理	42	7.4
	Baytan-拌种	42	1.4
15	J76	43	2.8
	PÄLKÄNE:		
	未处理	42	26
	Baytan-拌种	42	9.4
20	J76	44	6.3

在 92 年夏天进行的对菌株 J76 的剂量应答检测

由于在 92 年夏初的幼苗检测中 J76 显示很好结果，在仲夏到来之前播种的一个试验中检测该菌株的应用比例对控制效果的影响。使用健康的小麦种子和人工接种巨大镰刀菌的种子。

在试验中使用 2 m² 的小块土地。观察幼苗疾病的出现和症状。在四个不同的时间点收集持续发病的幼苗样本。在每个取样的时间点从分别播种的四块试验地中获取各个处理的样本。表 4 中列出了观察的幼苗的量，表 5 中分别列出了发病和健康种子产生发病幼苗的百分数。表 5 中的数据以图解形式显示于图 1 和图 2 中。

表4 在92年夏天进行的J76的剂量效应试验。出苗

处理		幼苗数/排米
5	用镰刀菌感染的种子	
	未处理	18
	Baytan-拌种	57
	J76 孢子悬液 (1.2×10^7 cfu/ml)	74
	J76 孢子悬液 (1.2×10^6 cfu/ml)	58
	J76 孢子悬液 (1.2×10^5 cfu/ml)	51
10	J76 孢子悬液 (1.2×10^4 cfu/ml)	20
	健康种子	
	未处理	71
	Baytan-拌种	66
	J76 孢子悬液 (1.2×10^7 cfu/ml)	80

15

表5 在92年夏天进行的J76的剂量效应试验。巨大镰刀菌接种的种子和健康种子产生的发病幼苗的百分数。缩写按照图2的含义。

处理	出苗后天数			
	10	17	30	44
镰刀菌感染的种子				
K	75.4	82.8	79.5	85.1
B	15.9	60.9	65.3	78.2
J76-0	10.1	50.0	66.6	70.3
J76-1	23.1	51.8	55.5	62.9
J76-2	36.4	64.7	76.0	78.0
J76-3	68.6	72.8	77.1	76.2
健康种子				
K	54.7	71.8	67.7	85.1
B	8.4	50.4	58.3	73.6
J76-0	14.3	48.0	69.9	73.8

30

在 93 年夏天用 J76 孢子悬液进行的大田试验

在 Jokioinen, Mietoinen 和 Palkane 进行试验。在试验中使用了六个种子样本:

- ‘Luja’ 小麦, 自然感染了巨大镰刀菌真菌
- 5 - ‘Luja’ 小麦, 人工接种了巨大镰刀菌真菌
- ‘Luja’ 小麦, 健康
- ‘Laari’ 小麦, 健康
- ‘Kustaa’ 大麦, 自然感染了各种镰刀菌真菌和 Bipolaris sorokiniana 真菌
- 10 - ‘Yty’ 燕麦, 自然感染了燕麦镰刀菌真菌(F. avenaceum)

仅在 Jokioinen 播种健康小麦样本, 对于其它四个种子样本试验在三个试验点均进行。对于该试验, 播种于 10 m² 小块土地上, 每个处理进行六个重复。

对于每个种子样本都进行相同处理:

- 15 K = 未处理对照
- B = 化学控制, Baytan I 拌种
- J76S = 从平板培养物得到的 J76 孢子悬液(8.4×10^9 cfu/kg 种子)

在表 6 中, 分别列出了每个处理和种子样本的疾病损失程度。表 7 中列出了产量结果。

表 6 在 93 年用 J76 孢子悬液进行的大田试验。严重发病幼苗的百分数。

	大麦	燕麦	自然感染 的小麦	人工接种 的小麦	健康的 'LUJA'	健康 'LAARI'
5	JOKIOINEN					
	K	6.0	10.1	7.4	34.2	20.6
	B	0.9	2.0	2.1	1.0	1.4
	J76S	0.9	1.4	0.7	1.0	3.3
	MIETOINEN					
10	K	12.8	3.5	20.4	72.0	
	B	1.3	0.6	5.7	6.6	
	J76S	5.4	0	7.1	7.3	
	PÄLKÄNE					
	K	9.6	7.4	10.9	26.9	
	B	2.5	3.3	2.1	0.6	
15	J76S	2.4	3.6	2.3	0	

表 7 在 93 年用 J76 孢子悬液进行的大田试验的产量情况(kg/ha)

	大麦	燕麦	自然感染 的小麦	人工接种 的小麦	健康的 'LUJA'	健康 'LAARI'
20	JOKIOINEN					
	K	7460	6650	6060	2950	6100
	B	7500	6790	5870	5690	5940
	J76S	7840	6650	6050	6040	6150
25						
	K	7460	6650	6060	2950	6100
	B	7500	6790	5870	5690	5940
	J76S	7840	6650	6050	6040	6150

MIETOINEN

K	5900	5780	4920	3890
B	6070	5200	4910	4990
J76S	6120	5440	4670	4810

5

PÄLKÄNE

K	4670	5560	3630	2950
B	4550	5200	4190	4000
J76S	4710	5430	3710	3650

10

J76 抗小麦腥黑穗病和大麦根腐病的检测

在 93 年夏天, 在大田试验中使用了 J76 和九种用于掺拌谷物种子的化学杀真菌剂, 检测它们抗小麦腥黑穗病(由小麦网腥黑粉菌引起)的情况。J76 以分生孢子悬液形式使用, 按照其使用说明使用化学制剂。使用 0.1 m² 小块土地, 进行五个重复。(表 8)

15

表 8 小麦的腥黑穗病试验中拌种处理的效果。

控制效率 (%)
(= 感染穗数量的降低)

20

处理

Täyssato S 液体	78
Baytan WS	100
Beret 050	100
Fungazil C	100
Panoctine 35	100
Raxil I 粉剂	100
Raxil I 液体	100
Prelude LS	100
Vitavax 200 FF	100
J76	85

25

在 Baytan 中, 活性成分是氯苯氧基二甲乙基三唑乙醇(triadimenol)。Baytan I 是一种含有氯苯氧基二甲乙基三唑乙醇和 imazalil 的混合物。Tayssato S 含有萎锈灵(carboxin)和 imazalil。在 Panoctin 中活性成分是双胍盐(gnazatine)。

- 5 在大田试验中还包括用 J76 孢子处理种子, 试验中还检测了化学控制试剂抗大麦根腐烂(*Bipolaris sorokiniana*)的能力。在该试验中使用 10 m² 小块土地以及四个重复。在不同处理之间它们在出苗上没有出现差异。J76 明显降低疾病症状(表 9), 尽管该病原菌与能被 J76 抑制的镰刀菌有很大差别。

表 9 抗大麦根腐烂的拌种处理的效果

10

		控制效率 (%)
		(= 发病幼苗数量的降低)
处理		
15	Prelude LS	85
	Dividend 37.5 (400 ml)	84
	Dividend 37.5 (200 ml)	81
	Baytan I	81
	Beret Special (400 ml)	74
	Raxil I 粉剂	70
	Täyssato S 液体	66
	Panoctine Plus	66
	Fungazil C	66
	Beret Special (200 ml)	65
20	Raxil I 液体	64
	Beret FS 050	49
	PNL 210	39
	J76	69

(B)从该真菌菌株制备的制剂及其在大田试验中的效果

- 25 按如下方法从 J76 制备粉剂:

制剂 1

- 30 在含有 0.5 升营养培养基的一升 erlenmeyer 瓶中进行培养, 该培养基含有蔗糖 4 g/l, 酵母抽提物 4 g/l 和麦芽抽提物 10 g/l。在高压蒸汽灭菌之前将 pH 调至 6.0。利用已在 - 80 °C 储存的含有孢子的琼脂团丸(土豆葡萄糖琼脂培养基)作为接种物。振荡器的振动速度是 150 rpm, 生长温度为室温(22 °C), 并且培养 7 - 12 天。通过用滤纸过滤分离细胞。按如下配方将硅石, 奶粉和

CMC(羧甲基纤维素)与细胞物质混合:

	细胞	20 %
	硅石	55 %
	奶粉	15 %
5	CMC(7 % 的水溶液)	10 %

在无菌空气中于敞开培养皿中室温下将混合物干燥2天。该层的厚度是1 - 2 cm。将干燥的混合物研磨至粉状。该制剂的活性是 10^7 cfu/g。(cfu = 菌落形成单位)。

cfu(菌落形成单位)是在微生物的存活性测定中使用的单位。将稀释的微生物的悬液涂布在琼脂平板上,几天之后计算菌落数。在已知稀释度的情况下,可以计算出原始样品中菌落数或微生物细胞数。

制剂 2

按制剂 1 中所述方法培养细胞,随后按如下比例向细胞中加入硅石、奶粉、CMC(羧甲基纤维素)和抗坏血酸

15	细胞	60 %
	硅石	20 %
	奶粉	14 %
	CMC(7 %)	3 %
	抗坏血酸	3 %

20 按制剂 1 中描述的方法进行干燥,该制剂活性为 10^7 cfu/g

制剂 3

细胞培养同制剂 1,将蔗糖和淀粉与细胞混合:

	细胞	20 %
	蔗糖	25 %
25	淀粉	55 %

干燥方法同制剂 1,研成粉状。活性为 10^7 cfu/g

制剂 4

将 J76 菌株直接培养于含有硅石的固体培养基上。加入 8 % 麦芽提取物(Maltax MP 10, Lahden Polttimo),作为营养液体培养基。将 120 g 营养液体培养基与 50 g 硅石粉在烧杯中混合,随后于 120 °C 高压灭菌 20 分钟。将 PDA 平板上的 J76 孢子刮至无菌水中得到孢子悬浮液,往冷却后的培养基中加入

10 g 该孢子悬浮液。于 16 °C 培养 20 天，随后于室温干燥两日。干品的活性为 10^7 cfu/g。

本发明其余各菌株的制备也以此类推。

在大田使用中粉剂的效果

5 下文中描述了在 93 年夏天由芬兰农业研究中心的植物保护研究院用 J76 菌株的粉剂进行的试验。试验是在 Jokioinen, Mietoinen 和 Pälkäne 的 MTT(农业研究中心)进行的。在该试验中使用了六个种子样本：

- ‘Luja’ 小麦，自然感染了巨大镰刀菌真菌
- ‘Luja’ 小麦，人工接种了巨大镰刀菌真菌
- 10 - ‘Luja’ 小麦，健康
- ‘Laari’ 小麦，健康
- ‘Kustaa’ 大麦，自然感染了各种镰刀菌真菌和 Bipolaris sorokiniana 真菌
- ‘Yty’ 燕麦，自然感染了燕麦镰刀菌(F. avenaceum)真菌

15 仅在 Jokioinen 播种健康小麦样本，其它四个种子样本的试验在三个试验点进行。对于该试验，小块土地面积为 10 m²，进行 6 个得复。

对于每个种子样本都进行相同处理：

K = 未处理对照

B = 化学控制，Baytan I 拌种

20 J76PK = 作为干燥拌种物的 J76 粉剂(8.4×10^8 cfu/kg = 种子吸取的最大量)

J76PN = 作为液体拌种物的 J76 粉剂(8.4×10^8 cfu/kg)

在表 10 中，分别列出了每个处理和种子样本的疾病损失程度。表 11 中列出了产量结果。

25

表 10 在 93 年用 J76 粉剂进行的大田试验。严重发病幼苗的百分数。

	大麦	燕麦	自然感染 的小麦	人工接种 的小麦	健康 'LUJA'	健康 'LAARI'
5	JOKIOINEN					
	K	6.0	10.1	7.4	34.2	20.6
	B	0.9	2.0	2.1	1.0	1.4
	J76PK	2.2	1.5	2.7	7.0	6.2
	J76PN	1.2	1.9	3.9	1.3	5.7
	MIETOINEN					
10	K	12.8	3.5	20.4	72.0	
	B	1.3	0.6	5.7	6.6	
	J76PK	10.1	0	17.2	42.5	
	J76PN	9.1	0.3	13.7	14.3	
	PÄLKÄNE					
	K	9.6	7.4	10.9	26.9	
	B	2.5	3.3	2.1	0.6	
	J76PK	5.3	2.6	4.8	6.1	
15	J76PN	3.9	3.8	3.9	2.7	

表 11 在 93 年用 J76 粉剂进行的大田试验的产量结果。

20

	大麦	燕麦	自然感染 的小麦	人工接种 的小麦	健康 'LUJA'	健康 'LAARI'
	JOKIOINEN					
25	K	7460	6650	6060	2950	6100
	B	7500	6790	5870	5690	5940
	J76PK	7610	6940	6060	5140	6400
	J76PN	7610	6970	6040	6020	6000

MIETOINEN

K	5900	5780	4920	3890
B	6070	5200	4910	4990
J76PK	6000	5670	4770	4620
J76PN	6110	5760	4790	4950

5

PÄLKÄNE

K	4670	5560	3630	2950
B	4550	5200	4190	4000
J76PK	4730	5560	3600	3390
J76PN	4870	5470	3660	3760

10

另外在 93 年检测了用 J76 菌株制备的不同制剂抗各种真菌的防治效果。这些试验的结果列于表 12 - 18。

表 12 在接种过 Gaeumannomyces 真菌的砂土中播种 Polkka 小麦时, J76 的防治效果。花盆试验, 有遮蔽。

15

处理	出苗率%	完全健康的百分数	发病指数 (0-3)	鲜重	
				g/ 重复(replicat)	g/ 幼苗
疾病控制(未用 J76 处理) 8 g/kg	78.7	65.3	0.76	5.8	0.28
J76 KF 干拌种	81.3	76.0	0.55	10.1	0.46
J76 液体拌种 10 ⁶ cfu/ml	90.7	81.3	0.31	10.4	0.43

20

25

KF = 固体制剂(制剂 4)

发病指数

0 健康

1 轻微发病

30

2 强烈发病

3 未出苗

表 13 在 Polkka 小麦上 J76 制剂抗巨大镰刀菌的防治效果。化盆试验, 泥炭作底物。KF = 固体生长(制剂 4), R = 液体振荡培养(制剂 1), M = 琼脂培养得到的微生物。

5

处理	出苗百分数	完全健康的百分数	发病指数 (0-3)	鲜重 g/重复 (replicat.)
健康	91	84	0.37	16.2
疾病对照	30	5	2.54	4.5
J76 KF 40/93I li- 液体拌种 10^6 cfu/ml	72	44	1.17	14.0
J76 R 10/2 C li- 液体拌种 10^6 cfu/ml	71	49	1.21	13.0
J76 M 10^6 cfu/ml	76	58	0.99	14.8

10

15

发病指数

0 健康

1 轻微发病

2 强烈发病

3 未出苗

20

表 14 在黄瓜上对 J76 抗腐霉(Pythium)真菌的效果的检测。结果是三个花盆试验的平均值(pH 6.2, pH 6.9 和 pH 7.4)。

25

处理	活苗百分数	发病指数 (0-2)	鲜重 g/重复
健康	98	0.04	12.1
发病对照	47	0.63	5.4
J76 液体拌种 10^6 cfu/ml	58	0.52	6.9

发病指数

0 健康

1 死亡

2 未出苗

- 5 表 15 在污染了茄属丝核菌的砂土中 J76 菌株对花椰菜病害的防治效果。温室中花盆试验。

10

处理	出苗百分数	完全健康百分数	鲜重	
			g/ 重复	g/幼苗
未处理	92.7	52.0	21.7	0.79
J76 液体拌种 10^7 cfu/ml	94.7	72.0	24.1	0.84

- 15 表 16 在接种了雪腐镰刀菌的砂土中 J76 真菌菌株对 ‘Kustaa’ 大麦病害的防治作用。在户外，有遮蔽的花盆试验。

20

处理	出苗百分数	完全健康的百分数	发病指数 (0-3)	鲜重 g/重复
健康	93.3	37.3	0.91	8.9
发病对照	73.3	29.3	1.43	7.8
J76 KF 液体拌种 10^6 cfu/ml	80.0	52.0	0.91	9.7
J76 液体拌种 10^6 cfu/ml	81.3	52.0	0.93	10.3

25

发病指数

0 健康

1 轻微发病

30

2 严重发病

3 未出苗

表 17 J76 真菌菌株对花椰菜上甘蓝链格孢真菌的防治效果。结果为三个不同温度(15 °C, 20 °C 和 25 °C)试验的平均值。

处理	出苗百分数	发病指数 (0-3)	鲜重 g/重复
健康	96	0.17	33.2
疾病对照	50	2.01	21.8
J76 液体拌种 10 ⁶ cfu/ml	96	0.22	35.4

10 发病指数

0 健康

1 轻微发病

2 强烈发病

3 死亡或未出苗

15 表 18 中列出了有关本发明的五个 *Nectria Pityrodes* 菌株

(J76, J1431, J1432, MOS1 和 ROS2)对小麦上巨大镰刀菌的防治作用的试验结果。该结果是两个试验的平均值, 一个试验以泥炭作为底物, 另一个是大田土壤作为底物。

20

表 18 五个 *Nectria pityrodes* 菌株(J76, J1431, J1432, MOS1 和 ROS2)对小
麦上巨大镰刀菌的防治作用。该结果是两个花盆试验的平均值(泥炭和大田土
壤)。

处理	完全健康的 百分率	发病指数 (0-3)	鲜重 g/重复
发病对照	23	2.06	3.0
J76 液体拌种 cfu/ml 10^7	73	0.66	8.0
J1431 液体拌种 cfu/ml 10^7	80	0.51	8.5
J1432 液体拌种 cfu/ml 10^7	72	0.78	8.0
MOS1 液体拌种 cfu/ml 10^7	76	0.66	8.8
ROS2 液体拌种 cfu/ml 10^7	76	0.66	8.3

发病指数

0 健康

1 轻微发病

2 强烈发病

3 未出苗

(C)J76 的作用模式

采用显微镜和一些实验室试验初步观察了 J76 对其它真菌的拮抗作用。

由于在显微镜下观察到 J76 菌丝和巨大镰刀菌的相互作用, 因此第一个
显著反应可很快发现。接触后约一小时在菌丝接触点, 镰刀菌菌丝的细胞开
始明显地分解。首先是细胞壁变松散。然后是细胞流空, 最后细胞壁完全分
解。镰刀菌菌丝的分解从接触点开始缓慢地向前延伸。当 J76 和巨大镰刀菌
混合生长几天之后, 镰刀菌的菌丝已不存在。其孢子(分生孢子和厚垣孢子)
也由于 J76 的作用而分解, 但比菌丝慢。通常在其分解之前 J76 菌丝体松散
地折叠在镰刀菌孢子周围。没有观察到 J76 能穿透镰刀菌菌丝的结果。

基于显微镜观察结果, 可以总结出 J76 可能向环境中分泌生物活性物
质。其特性类似于酶或抗菌素。这些物质的产生是 J76 的主要作用模式, 因

为没有发现它直接寄生于其它真菌，并且由于它生长缓慢，显然不能十分有效地竞争营养物。在赛璐玢的试验中也暗示出 J76 产生了影响其它真菌生长的代谢物。

当 J76 和巨大镰刀菌在十分薄的生长基质上紧挨着生长时，形成了一个
5 抑菌圈，在抑菌圈中镰刀菌生长停止。在正常厚度的基质上没有发现抑菌圈。这可能是由于低浓度的物质扩散到基质中造成的。也已发现 J76 分泌的挥发物质对巨大镰刀菌的生长具有微弱控制效果。

赛璐玢试验:

在生长基质上安置赛璐玢薄片，并且在这些薄片上培养 J76 菌株。在培
10 养 10 天之后，除去薄片和其带有的 J76。由 J76 分泌并且通过薄片传递的物质留在基质中。作为对照，使用了仅有赛璐玢薄片但没有 J76 的平板。表 19 中列出了赛璐玢试验的结果。

表 19 在赛璐玢试验中由真菌 J76 产生的代谢物对巨大镰刀菌生长的影响，生长速度 mm/天

15	-----	
	J76	2.5
	对照	6.2

(D)筛选方法的实施和结果的评价

20 砂土试验
播种基质

使用砂土作为播种基质，粒度大小为 0.2 - 0.7 mm(Kauniston Sora Oy, Loimaa)。通过以 4 份砂土和 1 份水的比例湿润砂土。从多花盆平板(Vefi - VP 96)上，切下一个 5 × 7 花盆(50 ml)的平板，将它置于塑料盒中。在花盆
25 中装填湿砂土，上部边缘留 1 - 1.5 cm 高的空间。向每个花盆中播种三颗 ‘Luja’ 春小麦。

处理

巨大镰刀菌感染：室温下于 PDA 平板上将巨大镰刀菌生长约一个月(直到完全形成孢子)。将有孢子的菌丝体与平板分离并且通过 Ultra - Turrax 匀
30 浆器使之与水混合。将孢子的量调至 10⁶ 孢子/ml。将 30 ml 的溶液装于 Minigrip 袋中于 - 20 °C 冷冻。在进行试验时将冷冻溶液解冻并且再混合。使用这样的

溶液(基础溶液)以及使用该溶液的 10^{-2} 稀释液。通过在植物中循环感染而保持镰刀菌的致病力(用镰刀菌悬液接种小麦种子并且再从发病的幼苗中分离该病原菌)。

拮抗剂悬液: 将深度冷冻的含的拮抗剂的 PDA 沉淀丸分成三部分并且置于三个 PDA 平板上生长。在室温下(黑暗)将平板培养三星期。通过刮取两个拮抗剂平板至 50 ml 蒸馏水中而制备拮抗剂悬液的基础溶液。用 Ultra - Turrax 匀浆器混合。从该基础溶液制备 10^{-1} 和 10^{-3} 稀释液。

种子处理: 首先将巨大镰刀菌的悬液 1 ml 吸移到播种于多花盆平板中的种子上, 随后在种子上吸移 1 ml 的拮抗剂悬液。用 6 种不同孢子浓度的悬液的组合处理五个 50 ml 花盆中的 15 颗种子(巨大镰刀菌悬液的两种稀释液 × 拮抗剂悬液的三种稀释液)。

对照处理: 在 5 个用于检测一种真菌的每个花盆平板中另外加入 15 颗种子, 它们仅用待测真菌的基础溶液进行处理。

在砂土试验中, 同时检测 15 - 30 个真菌菌株。每天开始检测时, 还播种一个单独的花盆平板, 在此帮助下检查种子的健康状况以及引起疾病的巨大镰刀菌接种物的致病力。在一个单独的平板上播种三个对照处理: 未接种(仅水), 接种了巨大镰刀菌的基础溶液和接种巨大镰刀菌的基础溶液的稀释液(10^{-2})。在每个对照处理中, 播种 30 颗种子至 10 个花盆中。

生长条件: 吸移了真菌悬液之后, 用湿的砂土覆盖种子。将装有花盆平板的盒包装于透明塑料袋中并且转移到生长室($10 - 15^{\circ}\text{C}$, 14 小时光照期)。

观察

在幼苗生长 16 - 18 天之后, 在流动的自来水中清洗, 并观察其上的疾病症状。将根和子叶鞘细胞未变黑的幼苗以及保留硬度的未出苗种子认为是健康的。有明显症状的幼苗和变软的未出苗的种子认为是发病。

首先检查对照处理植物。如果仅用水处理的种子能发展成健康植物, 并且用两种病原菌处理会获得明显发病症状, 那么, 这样的检测可以认可, 并且确定用待测真菌菌株处理的植物的情况。

在砂土试验中, 依据经真菌处理后的植株的发病株数将分离到的真菌进行分级。如果用待测真菌处理的植物的出苗情况与对照相比明显降低, 或如果发现其它病症, 则在进一步的检测中不用该真菌。如果未发现损害, 则按

照下列标准将病原菌的孢子密度与待测真菌的孢子密度构成的6个组合进行分级:

- 0 = 所有15株植物健康
 1 = 受损伤植物不超过2株
 5 2 = 3 - 5株植物受损伤
 3 = 6 - 9株植物受损伤
 4 = 10 - 13株植物受损伤
 5 = 健康植物不超过1株

- 根据上面介绍的6个等级,选出那些待测真菌菌株用于下面的泥炭试验。接受那些至少在三次试验中评为0级和1级的菌株继续试验。如果该真菌没有获得0级,则只选至少四次试验证明为1级的菌株进行继续试验。

泥炭试验

生长基质

- 使用蒸过的,施过肥的并且用石灰处理过的泥炭作为生长基质。直到1992年秋天使用来自Torronsuo的未筛分过的粗泥炭,之后使用已经筛分过的来自Eurajoki的粗泥炭。(施肥: 800 g的大理石石灰和100 g泥炭Y-lannos/100L的泥炭(Y-lannos = 芬兰通用肥料的商标))。将湿润的泥炭装到塑料盒中(28.5 × 49.5 × 9.4 cm, Weibulls Robusta “Mammut” - 盒, Muoviyhtymä Oy),约5 cm厚。在盒底有一块塑料薄片。

- 20 处理

T = 健康的,未接种的种子,‘Luja’春小麦。用蒸馏水浇灌。

F = 巨大镰刀菌接种的种子。将种子放入巨大镰刀菌的基础溶液(使用过量的溶液)中吸涨,该溶液含有 10^6 孢子/ml(镰刀菌培养,参见砂土试验)。处理之后将种子在纸上摊开干燥过夜。

- 25 F0 = 如F处理中一样进行巨大镰刀菌接种。当种子干燥之后,用拮抗剂的基础溶液浸湿种子,拮抗剂溶液是通过从一个拮抗剂平板上刮下的菌丝和孢子放入25ml蒸馏水而制备的。通过在一个塑料瓶中振荡种子和拮抗剂而进行处理。处理之后将种子在纸上干燥。

- 30 F2 = 如F处理中一样进行巨大镰刀菌接种。拮抗剂的处理按F0中处理进行,用 10^{-2} 稀释的拮抗剂基础溶液进行。

向泥炭中播种10排种子,每排30颗。播种顺序如下:保护行, F, F0, F2,

T, F, F0, F2, T, 保护行。在播种之后, 用泥炭覆盖种子并且湿润盒子。

生长条件

在温室中 15 °C 条件下使种子生长。在黑暗季节(dark season)用多金属灯每天光照 12 小时。如果需要, 用水湿润种子。培养时间是 18 天。

5 评级

清洗幼苗并且按照砂土试验的方法观察这些植物的疾病症状。基于从 T 和 F 处理观察到的结果, 决定是否认可这些试验结果。作为健康对照(T)发病植株总共不允许超过 12 棵(在播种的 60 颗植株中)并且发病对照(F)必须至少有 52 棵植株发病(在 60 颗播种的植株中)。如果用两种浓度的溶液之一处理种子发病植株不超过 19 株(共 60 颗), 则接受该真菌菌株用于下面试验阶段(大田土壤试验)。

大田土壤试验

播种基质

所使用的土壤(砂性粘土)取自 Jokioinen 的大田试验区。土壤由手工研磨(在 1992 - 1993 年冬天)或者用一个 1 × 1 cm 格状筛子过筛。填充到 1.5 升塑料盆(Φ 14 cm)中, 装填至离上部边缘 3 - 4 cm。在盆底放一张滤纸。

处理

1.健康种子。仅用蒸馏水浸湿。

2.镰刀菌对照。用含有约 10^6 孢子/ml 镰刀菌接种剂, (配制, 参见砂土试验)浸湿种子, 使用过量的溶液。

3.与镰刀菌对照一样接种。在种子干燥之后, 用拮抗剂悬液处理, 所说悬液是通过将一个平板上的菌丝体和孢子混合到 25 ml 蒸馏水中而制备的。处理是在塑料瓶中进行, 每瓶中加入 130 颗种子(120 - 150 颗种子), 和 1 ml(或者 1.5 ml)的拮抗剂悬液。

25 4.杀真菌剂对照。按镰刀菌对照一样进行接种。在种子干燥之后, 每 1 kg 种子用 2 g Baytan I 拌种粉处理。也使用早期的 Ceresan 和 Tayssato S 处理。

将被处理的种子播种到花盆中, 每盆 36 颗种子, 每个处理设置三个重复。播种后用大田土壤覆盖。生长条件与泥炭试验相同。培养时间约 4 星期。

检查和评级

30 将嫩芽洗干净, 然后估测它们的病害率:

0 = 完全健康

1 = 轻微的镰刀菌病害危害

2 = 中强度病害危害

3 = 嫩芽全部变为黑褐色 -- 死亡

温室试验的效果

- 5 93 年夏季, 在一大田试验中对本发明筛选方法的效果进行了测试。在该试验中检查在 1991 年 10 月到 1993 年 2 月期间的一系列筛选试验中分离出的真菌菌株用于进一步的试验是否正确。任意选出 60 个菌株处理种子, 这些菌株在砂土试验中被删去并且对小麦没有致病力。将在泥炭试验中删去的 92 个菌株安排到该试验中。将选出的用于土壤试验的 58 个真菌也用于该试验。
- 10 其中的 43 株已在土壤试验中被弃去并且基于此试验选出 15 株进行大田试验。

除了上面介绍的 210 种处理以外, 该试验还包括 6 个对照处理: 未处理 (K), Baytan I 拌种 (B) 和在早期试验中研究最多的四个真菌菌株, a.o. J76。

- 15 在该试验中使用了自然感染了巨大镰刀菌的 ‘Luja’ 小麦。由于观察单元是一个 1.4 m 长的幼苗排, 因而使用了 5.5 克种子用于播种。对所有 216 种处理其播种各设置 6 个重复。根据立方点阵试验设计进行随机试验。这样降低了由土壤因素引起的误差变异。在播种后约五个星期, 从土然中挖出发芽的幼苗, 对其计数并且研究其病症。

- 20 在图 3a - 3d 中的四个柱状图描述了该试验结果。在泥炭试验中删去的分离株和在砂土试验中删去的非致病分离株之间没有发现差异。泥炭试验效果很好。在该试验中选出的用于进一步试验的菌株平均情况比该试验中删去的真菌显然较好。

- 25 在泥炭试验和砂土试验中总共弃去的不应该被删去的真菌菌株非常少。另一方面根据土壤试验结果, 丢去了大量的最好菌株, 但是在带到大田试验的这些菌株中, 十五个中仅有两个在天然条件下不合格。

根据这些结果可以总结出基于砂土和泥炭试验能可靠地选出用于进一步试验的最好的拮抗剂, 但是在在大田土壤试验中甚至会将最好的拮抗剂候选物丢去。

- 30 在选择试验中检测真菌菌株 J1431

在温室中进行的所有三个选择试验中对本发明的真菌菌株 J1431 进行检

测。

在砂土试验中 J1431 获得了 0, 0, 1, 1, 1 和 2 的等级, 并且用于进一步试验中。

在泥炭试验中 J1431 获得如下结果:

- 5 T: 3 株发病
F: 36 株发病
F0: 3 株发病
F2: 7 株发病

在大田土壤试验中, 其中包括 J1431, 在不同处理中获得的发病苗百分数是:

健康	66 %
镰刀菌对照	87 %
Baytan I 拌种	31 %
J1431	19 %

15 基于该选择试验, 将 J1431 菌株带到于 93 年夏天用其它 61 个真菌菌株进行的大田土壤试验中。在该试验中使用人工接种了真菌巨大镰刀菌的孢子悬液的 ‘Luja’ 春小麦。种子播种到单排(1.4 m)地块中并且该试验设置 6 个重复。播种 34 天之后从土壤中挖出发芽的幼苗, 洗涤和观察它们的发病症状。在不同的试验中获得的每排米的健康幼苗数目如下:

20 镰刀菌对照	5.9
Baytan I 拌种	56
J76	61
J1431	65
其它被测菌株	30 - 68

25 在选择试验中检测 J1431 真菌菌株

在温室中的所有三种筛选试验中检测 J1432。

在砂土试验中 J1432 获得了 0, 0, 0, 1, 1, 和 2 的等级, 并且用于进一步试验中。

在泥炭试验中 J1432 获得如下结果:

- 30 T: 10 株发病
F: 60 株发病

F0: 10 株发病

F2: 37 株发病

在大田土壤试验中, 其中包括 J1432, 在不同处理中获得的发病百分数
是:

5	健康	56 %
	镰刀菌对照	98 %
	Baytan I 拌种	18 %
	J1432	38 %

基于大田土壤试验结果, 将 J1432 从大田试验中除去。

10 微生物的保藏

按照布达佩斯条约的规定, 下列微生物保藏于 DSM - 德国微生物和细胞培养物保藏中心, Mascheroder Weg 1 b, D - 38124 Braunschweig, 德国

	微生物	保藏号	保藏日期
	<u>Nectria Pityrodes</u>		
15	Montagne J76	DSM 7522	1993 年 3 月 15 日
	<u>Nectria Pityrodes</u>		
	Montagne J1431	DSM 8805	1993 年 12 月 10 日
	<u>Nectria Pityrodes</u>		
	Montagne J1432	DSM 8806	1993 年 12 月 10 日
20	<u>Nectria Pityrodes</u>		
	Montagne MOS1	DSM 8807	1993 年 12 月 10 日
	<u>Nectria Pityrodes</u>		
	Montagne ROS2	DSM 8808	1993 年 12 月 10 日

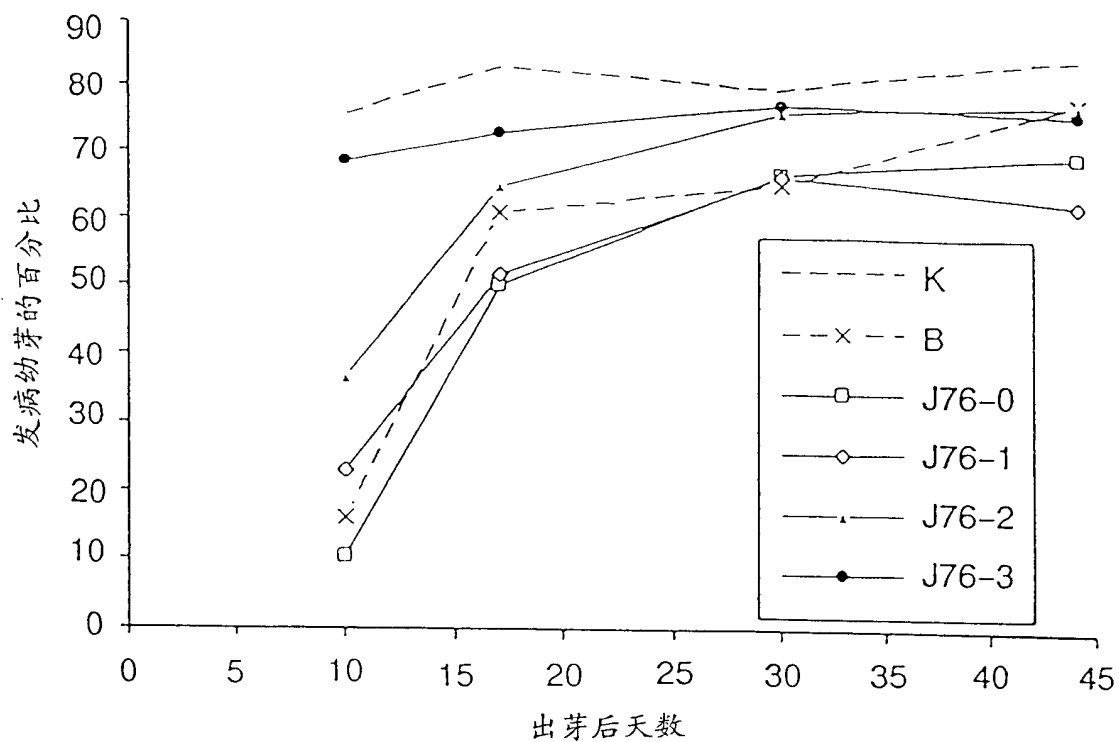


图 1

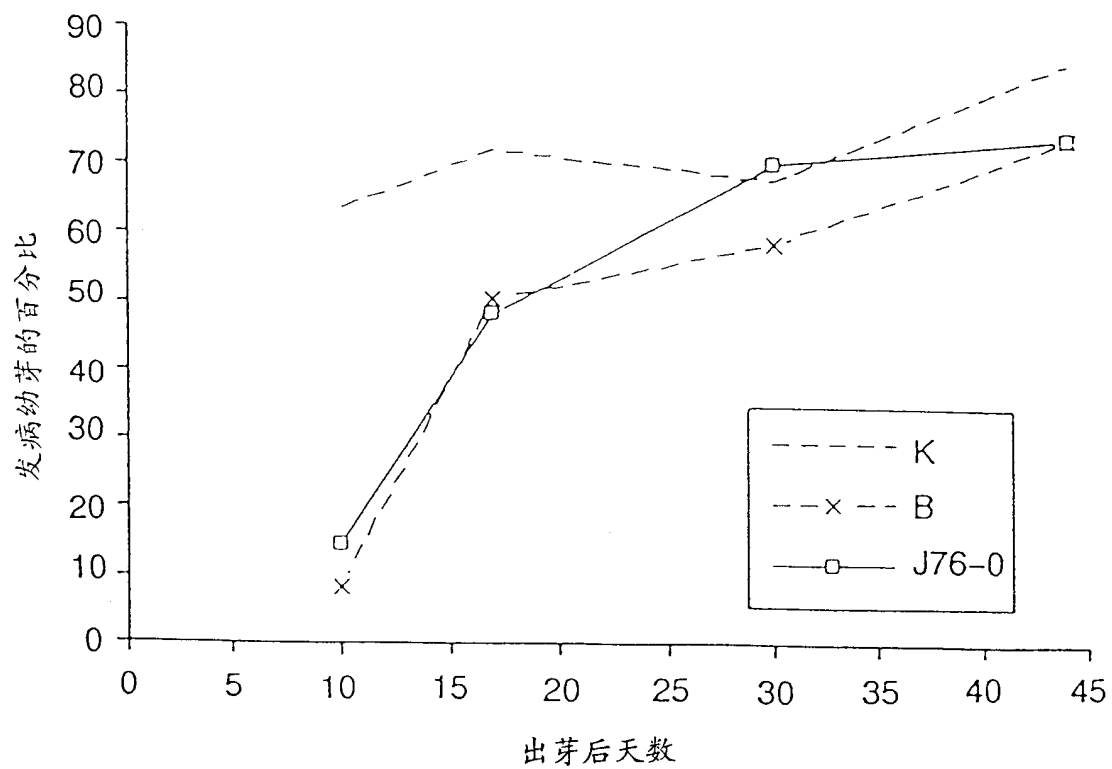


图 2

□ = 从根分离的分离株 ■ = 直接从土壤分离的分离株

图 3a

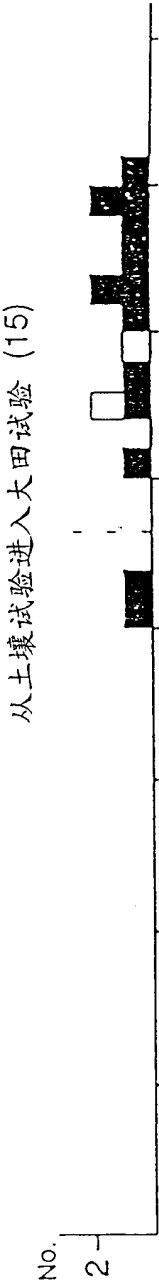
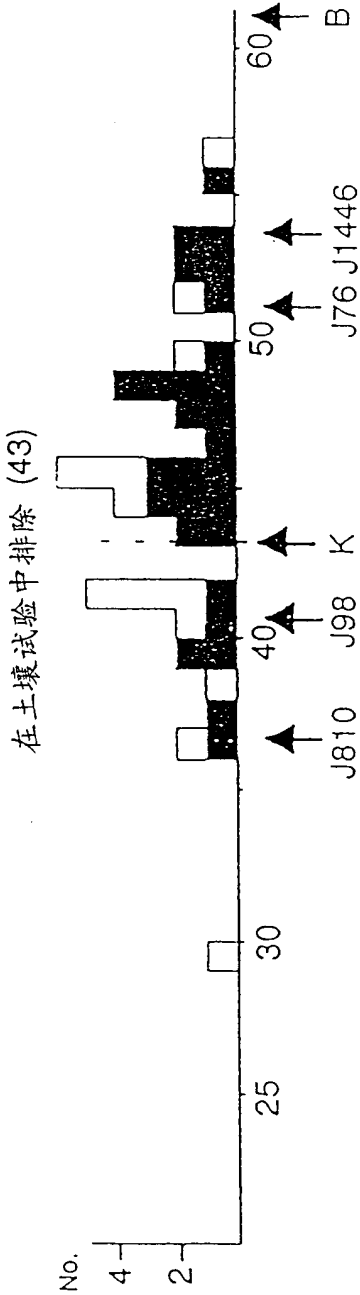


图 3b



□ = 从根分离的分离株
■ = 直接从土壤分离的分离株

