



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103756911 B

(45)授权公告日 2017.02.08

(21)申请号 201310643960.5

C12R 1/645(2006.01)

(22)申请日 2013.12.05

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 103243029 A, 2013.08.14,

申请公布号 CN 103756911 A

CN 103290000 A, 2013.09.11,

(43)申请公布日 2014.04.30

CN 103290000 A, 2013.09.11,

(83)生物保藏信息

CN 102399703 A, 2012.04.04,

CGMCC No.7995 2013.08.13

CN 102399703 A, 2012.04.04,

(73)专利权人 江西天人生态股份有限公司

CN 102532247 A, 2012.07.04,

地址 343100 江西省吉安市国家井冈山经

CN 103243029 A, 2013.08.14,

济技术开发区君山大道181号

审查员 刘铮

(72)发明人 李肖宇 梁小文 王根豪 陈晓燕

周立峰 马忠岩 曾升华 曾繁富

(51)Int.Cl.

C12N 1/14(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

A01P 3/00(2006.01)

序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一株成绿肉座菌及其应用

(57)摘要

本发明公开了一株成绿肉座菌及其制备方法和应用。本发明所提供的成绿肉座菌(*Hypocrea virens*)TRCC27001保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其保藏号为:CGMCC No.7995,本发明还公布了该菌株在抑制多种土传植物病原真菌中的应用。

1. 一株成绿肉座菌菌株(*Hypocrea virens*), 其于2013年8月13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CGMCC, 保藏编号为CGMCC No.7995。

2. 一种权利要求1所述的成绿肉座菌菌株的培养方法, 其特征在于: 按5%的接种量接种于装有40毫升液体培养基的100毫升三角瓶中, 置于120转/分钟、25摄氏度全温震荡培养箱中震荡培养7天。

3. 根据权利要求2所述的成绿肉座菌菌株的培养方法, 其特征在于: 所述的培养基的组成包括葡萄糖20克/升、白砂糖20克/升、蛋白胨10克/升、酵母浸出粉10克/升组合。

4. 根据权利要求1所述的成绿肉座菌菌株在防治土传植物病原真菌中的应用。

一株成绿肉座菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种成绿肉座菌(*Hypocrea virens*),同时还涉及一种该成绿肉座菌(*Hypocrea virens*)的制备方法,及其在抑制多种土传植物病原真菌中的应用。

背景技术

[0002] 随着可持续农业观的建立,探索无公害、无污染的生物防治措施已成为植物病害综合治理中的重要课题,日益受到世界各国的重视。

[0003] 重寄生是指病原物被其它微生物寄生的现象。它作为植物病害生物防治的主要机制,已经越来越受到各国植物病理学家的重视。重寄生菌作为生物防治的重要因子,主要通过重寄生作用、拮抗作用和产生细胞壁降解酶来抑制病原菌的生长,进而达到防治植物病害的目的。重寄生作用包括活体营养寄生和死体营养寄生两类。活体营养的寄生菌从活的寄主细胞摄取养料,在寄主上的寄生方式不同,有的接触寄主后菌丝不穿入其中,有的菌丝则伸入细胞内部,最终杀死寄主。这类寄生菌一般具有高度的寄生专化性,一种寄生菌仅能寄生于某一种或者少数几种紧密相关的真菌。死体营养的寄生真菌是以酶解或产生有毒物质来杀死寄主,再从死亡的寄主细胞中吸收所必需的营养物质。重寄生菌对寄主菌的作用机制包括寄主菌形态学上的微小畸变、对菌丝的附着生长、侵入并产生吸器、菌丝的溶解,以及产生酶和抗生物质等。重寄生菌对寄主菌的寄生程度亦受营养及环境因素的影响,如碳/氮比、温度、光照、pH等。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供了一种抑制多种土传植物病原真菌的重寄生菌——成绿肉座菌(*Hypocrea virens*)。菌株tef序列:

[0005] 5'-GTGGTCGTCATCGTACGTATTATCCCACCACCTTTTCGTCGGCATCGTCCGCCGCTCTGACTCTGGAA
CATTTGTGCTAACCACCGTCCCTCTAGGGGTGCGTATTCCGTCCATCATCATGAATGAGATCTCGAACACAATACTGA
CTTGCGACAACAGCCACGTCGACTCCGGCAAGTCGACCACCGTGAGTTACACCCTCTGCCTCTCGCCTCCGCATCAA
ACGTTGCCGTTTGTATGCGGGGAGTCTACGCTTTGATACACAGCTAACCATTGCCATACAGACTGGTCACTTGATCT
ACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTGAGCTCAATCAACTGCTTTTCGCATCAAT
TTCCCTTACATTCAATTGTGCTCGACAATTCTGTTCAGAAT CATCGAGGCAACAATTTTTTCGTCACCCCGCTTTC
GTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGCAAAAATTTTTGTGCTGCCTCTGGTTTTTGTGGGGTGCACCAGCAACCCCA
CCACTACCTCGCTGCTCTTTGCCATCGTCTACCACTTCCCAGTCCTCATTC AACGATCTGTGTCTCGTTATTTGCAG
CGATGCTAACCACCGTTCCCTCAACAGAAGCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACA
AGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTA
CCGTATTGGTATGTCTCGTCCCATTCATCCAGCCCCCGCAAACCAGTGCTAACCAGGACCTCACAGACGCCCCCGGC
CACCGTGATTTTCATCAAG-3'

[0006] 同时,本发明的目的还在于提供一种成绿肉座菌(*Hypocrea virens*)的制备方法。

[0007] 更进一步地,本发明的目的在于提供了一种成绿肉座菌(*Hypocrea virens*)的应

用。

[0008] 为了实现上述目的,本发明的技术方案采用了一种成绿肉座菌(*Hypocrea virens*),其保藏号为CGMCC NO.7995。

[0009] 同时,本发明的技术方案采用了一种成绿肉座菌(*Hypocrea virens*)的制备方法,按5%的接种量接种于装有40毫升液体培养基的100毫升三角瓶中,置于120r/分钟、25摄氏度全温震荡培养箱中震荡培养7天。

[0010] 所述的培养基的具体成分为:混合碳源按葡萄糖40克/升、白砂糖40克/升、(葡萄糖20克/升+白砂糖20克/升)用量与(10克/升蛋白胨+10克/升酵母浸出粉)组合;氮源按全氮含量2%的比例分别与(2%葡萄糖+2%白砂糖)相混合。

[0011] 进一步地,本发明的技术方案采用了一种成绿肉座菌(*Hypocrea virens*)在抑制多种土传植物病原真菌方面的应用。

[0012] 本发明选取了立枯丝核菌、镰刀菌、腐霉菌三种常见土传植物病原真菌进行抑制试验。

[0013] 本发明所涉及的成绿肉座菌在对土传植物病原真菌有良好的抑制作用。其非挥发性代谢产物能完全抑制立枯丝核菌、镰刀菌、腐霉菌三种病原菌的生长;其挥发性代谢产物对立枯丝核菌、镰刀菌、腐霉菌的抑制作用分别为26.7%、51.5%、43.5%。

[0014] 本发明的菌株:成绿肉座菌(*Hypocrea virens*),保藏单位名称:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGICC),保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物所,保藏日期为2013年08月13日,其保藏编号为CGICC No.7995。

[0015] 具体实施方式:

[0016] 实施例1

[0017] TRCC27001菌株的鉴定:

[0018] 分子系统学鉴定,DNA提取方法:采用石英砂研磨CTAB提取法(Scott et al., 2000)。

[0019] 遗传标记:选用翻译延伸因子(*tef 1-alpha*)基因(*tef*),扩增引物:EF1T,EF2T (Bischoff et al.,2006)。

[0020] PCR扩增反应条件:先94摄氏度加热3分钟使模板DNA变性,然后进入下列温度循环:94摄氏度变性30秒,50摄氏度退火30秒,72摄氏度延伸45秒,共进行35个循环,最后在72摄氏度延伸5分钟(Wang,2012)。

[0021] PCR产物检测和测序:PCR产物与100bp DNA ladder(MBI Fermentas)用2.0%的琼脂糖凝胶(agarose gel)在0.5×TBE电泳缓冲液中于80V电压下电泳20分钟,然后置于0.5μg/ml的溴乙锭(EB,ethidium bromide)溶液中染色15分钟,在波长365和254nm的紫外光下检测为明显单一条带的产物由擎科生物技术有限公司纯化后用ABI3700(Applied Biosystems)进行双向直通测序。

[0022] 数据处理和统计学分析:原始序列用生物软件Bioedit7.0.9(Hall,1999)编辑后得到准确无误的序列,与GenBank下载的模式和权威菌株序列组成序列数据矩阵。对于序列矩阵,在Bioedit7.0.9下做必要的人工编辑和调整得到的新矩阵。将该矩阵用MEGA5.0 (Tamura et al.,2011)进行邻居连接法(neighbor-joining,NJ)分析,推断出系统发育树,并用自展法(bootstrap)进行1000次重复评估各分支的可靠性。

[0023] 菌株系统发育树见附图1、附图2。结果表明TRCC27001菌株与((*Hypocrea virens*))相似度为98.90%，并且其菌体形态和生理生化指标符合((*Hypocrea virens*))的特征，所以可以鉴定TRCC82001菌株为((*Hypocrea virens*))。后经中科院微生物研究所将((*Hypocrea virens*))命名为成绿肉座菌。TRCC27001菌株于2013年8月13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，保藏编号为：CGMCC No.7995。

[0024] 实施例2

[0025] PDA培养基：马铃薯200克，葡萄糖20克，琼脂17克，1000毫升，pH自然。在300毫升三角瓶中加入100毫升PDB培养液，接入1毫升 1.0×10^6 个/毫升孢子悬浮液，同时加入无菌的小玻璃球，在27摄氏度，转速为120转/分钟的恒温摇床中振荡培养。

[0026] 实施例3

[0027] 1、培养基：马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)；胶霉毒素(Gliotoxin)发酵培养基(葡萄糖25.00克，酒石酸铵2.00克，硫酸亚铁0.01克， KH_2PO_4 2.00克， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.00克，蒸馏水1000.00毫升)

[0028] 2、重寄生的观察：

[0029] (1)营养空间的竞争：将成绿肉座菌(抗生素菌)、丝核菌、镰刀菌、腐霉菌活化后接种在PDA平板上对峙培养。具体操作是将成绿肉座菌和三种病原真菌分别接种在PDA平板中央，25摄氏度培养3天后，用孔径0.5厘米的打孔器取样，在同一培养皿(PDA)内分别接种抗生素菌和一种病原真菌的菌丝块，两者间距为平板直径的1/2。25摄氏度培养并观察各菌生长情况。

[0030] (2)重寄生的观察：当对峙培养的两菌菌落接触后，切取接触区琼脂块，用2.5%戊二醛固定3小时(4摄氏度)，然后用PH7.2的缓冲液(NaH_2PO_4 和 Na_2HPO_4)清洗3次，每次10分钟；用乙醇在4摄氏度下梯度脱水；再用醋酸乙戊二酯置换15分钟以上(4摄氏度)；随后进行临界点干燥；离子溅射喷金；最后经KYKY1000B型扫描电子显微镜观察和摄影。

[0031] 3、成绿肉座菌的非挥发性代谢产物对病原菌的作用

[0032] 将发酵7~9天的成绿肉座菌胶霉毒素发酵液用细菌过滤器抽滤灭菌，取1毫升滤液于10ml PDA培养基中，摇匀后倒平板，分别接种立枯丝核菌、镰刀菌、腐霉菌，以不接种成绿肉座菌的发酵滤液为对照，重复三次，25摄氏度培养两天后观察三种病菌生长情况，并量测病原菌的直径。

[0033] 4、成绿肉座菌的挥发性代谢产物对病原菌的作用

[0034] 用对扣法测定成绿肉座菌的挥发性代谢产物对三种病原真菌生长的作用。在6套直径相同的PDA平板中央接种三种病原真菌菌落边缘菌丝块(直径0.5cm)各一块，每种菌接两皿，在3套同样直径的PDA平板中央接种成绿肉座菌菌落边缘菌丝块各一块，另取3套相同直径的PDA平板不接种。所有的平板除去皿盖，用不接种的平板和接种成绿肉座菌的平板扣上接种三种病原菌的平板，两皿的接触处用胶带密封。重复.3次，25摄氏度培养，待病原菌不再生长时量测病原菌的直径。

[0035] 5、试验结果

[0036] (1)营养空间的竞争

[0037] 培养1天后，丝核菌和成绿肉座菌以同等速度生长，菌落直径相同，丝核菌菌丝直立，生长旺盛，培养2天后，两菌菌落边缘相互交叉，成绿肉座菌迅速向丝核菌菌落上延伸和

产孢,丝核菌菌丝萎焉,生长停滞。

[0038] 镰刀菌和腐霉的生长速度小于成绿肉座菌的生长速度,成绿肉座菌迅速占领营养空间,并向镰刀菌和腐霉的菌落延伸和产孢,两菌相遇处有抑菌圈。

[0039] (2)成绿肉座菌的非挥发性代谢产物对三株病原菌的拮抗作用

[0040] 实验结果表明(表1),成绿肉座菌的非挥发性代谢产物完全抑制了三种病原菌的生长,一般认为抗生素在成绿肉座菌的生防机制中是主要的因素之一,而且胶霉毒素(Gilotoxin)是成绿肉座菌产生的一系列抗生素中起主要作用的一种抗生素。

[0041] (3)成绿肉座菌的挥发性代谢产物对病原菌的拮抗作用

[0042] 挥发性代谢产物对病原菌生长的影响如表2所示,成绿肉座菌的挥发性代谢产物对立枯丝核菌、镰刀菌、腐霉的抑制作用分别为26.7%、51.5%、43.5%,对丝核菌的影响相对较小。

[0043] 最后所应说明的是,以上实例仅用于说明而非限制本发明的技术方案,尽管参照上述实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解:依然可以对本发明进行修改或者等同替换,而不脱离本发明的精神和范围的任何修改或局部替换,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

[0044] 表1:非挥发性代谢产物对病原菌的抑制作用

[0045]

	立枯丝核菌	镰刀菌	腐霉菌
处理(cm)	-	-	-
对照(cm)	8.00	2.96	1.35

[0046] “-”:不生长

[0047] 表2:挥发性代谢产物对病原菌的抑制作用

[0048]

	立枯丝核菌	镰刀菌	腐霉菌
处理(cm)	4.40	2.33	2.43
对照(cm)	6.00	4.80	4.30
抑菌率	26.7%	51.5%	43.5%

附图说明

[0049] 图1成绿肉座菌(*Hypocrea virens*)TRCC27001CGMCC No.7995的tef序列。

[0050] 图2成绿肉座菌(*Hypocrea virens*)TRCC27001CGMCC No.7995基于tef序列构建的系统发育树。

[0001]

一株成绿肉座菌的 *tef* 序列表

5'-GTGGTCGTCATCGTACGTATTATCCCACCACTTTCGTCGGCATCGTCCGCCGCTCTGA
CTCTGGAACATTTGTGCTAACCACCGTCCTCTAGGGGTGCGTATTCCGTCCATCATCATG
AATGAGATCTCGAACACAATACTGACTTGCGACAACAGCCACGTGCGACTCCGGCAAGT
CGACCACCGTGAGTTACACCCTCTGCCTCTCGCCTCCGCATCAAACGTTGCCGTTTGAT
GCGGGGAGTCTACGCTTTGATACACAGCTAACCATTGCCATACAGACTGGTCACTTGA
TCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATCGAGAAGTTCGAGAAGGTGAGCTC
AATCAACTGCTTTCGCATCAATTTCCCTTACATTCAATTGTGCTCGACAATTCTGTTCAG
AATCATCGAGGCAACAATTTTTTCGTCACCCCGCTTTCGTTCCATTACCCCTCCTTTGCA
GCGACGCAAATTTTTTGCTGCCTCTGGTTTTTGTGGGGTGCACCAGCAACCCACCA
CTACCTCGCTGCTCTTTGCCATCGTCTACCACTTCCCAGTCCTCATTCAACGATCTGTGT
CTCGTTATTTGCAGCGATGCTAACCACCGTTCCTCAACAGAAGCGCCGAACCTCGGCA
AGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGG
TATCACCATCGACATTGCCCTGTGGAAGTTCGAGACTCCCAAGTACTATGTACCGTATT
GGTATGTCTCGTCCATTCATCCAGCCCCGCAAACCAGTGCTAACCAGGACCTCACA
GACGCCCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAG -3'

GTGGTCGTCATCGTACGTATTATCCACCACCTTTCGTCGGCATCGTCCGCCGCTCTGACTCTGGAACAT
 TTGTGCTAACCACCGTCCTCTAGGGGTGCGTATTCCGTCCATCATCATGAATGAGATCTCGAACACAAT
 ACTGACTTGGGACAACAGCCACGTGCGACTCCGGCAAAGTCGACCACCGTGAGTTACACCCTCTGCCTC
 TCGCCTCCGCATCAAACGTTGCCGTTTGATGCGGGGAGTCTACGCTTTGATAACACAGCTAACCATTCG
 CCATACAGACTGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGTACCATCGAGAAGTTTCGAG
 AAGGTGAGCTCAATCAACTGCTTTCGCATCAATTTCCCTTACATTCAATTGTGCTCGACAATTCTGTTC
 AGAATCATCGAGGCAACAATTTTTTCGTACCCCGCTTTCGTTCCATTACCCCTCCTTTGCAGCGACGC
 AAAATTTTTTGTGCTGCCTCTGGTTTTTGTGGGGTGCACCAAGCAACCCACCCTACCTCGCTGCTCTTT
 GCCATCGTCTACCACTTCCAGTCCTCATTCAACGATCTGTGTCTCGTTATTTGCAGCGATGCTAACCA
 CCGTTCCTCAACAGAAGCGCCGAACCTCGGCAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAG
 CTCAAGGCCGAGCGTGAGCGTGGTATCACCATCGACATTGCCCTGTGGAAGTTTCGAGACTCCCAAGT
 ACTATGTACCGTATTGGTATGTCTCGTCCCATTCATCCAGCCCCGCAAACCAGTGCTAACCAAGGACCT
 CACAGACGCCCCCGGCCACCGTGATTTTCATCAAG

图1

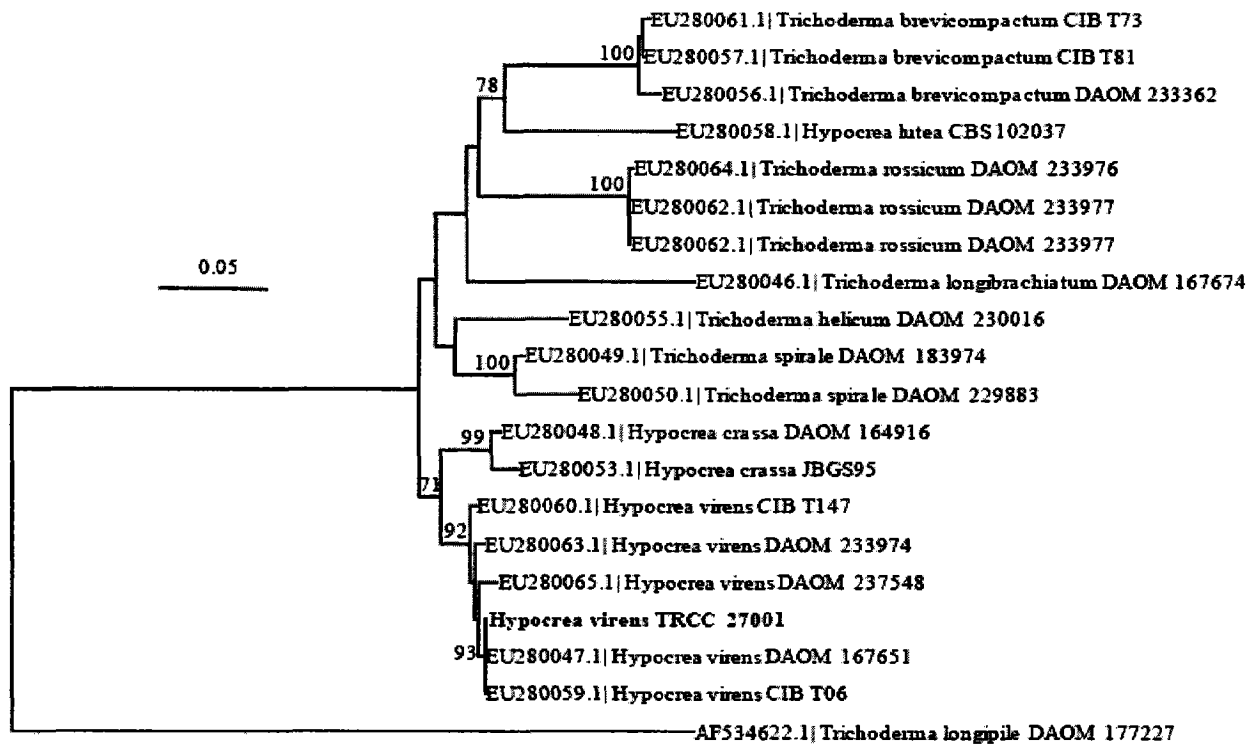


图2