

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 1/20

A01N 63/00

//(C12N1/20, C12R

1:465)

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98802311.3

[43]公开日 2000年3月8日

[11]公开号 CN 1246890A

[22]申请日 1998.1.24 [21]申请号 98802311.3

[30]优先权

[32]1997.2.5 [33]KR [31]3568/1997

[86]国际申请 PCT/KR98/00015 1998.1.24

[87]国际公布 WO98/35017 英 1998.8.13

[85]进入国家阶段日期 1999.8.5

[71]申请人 徐亨源

地址 韩国汉城

[72]发明人 徐亨源

[74]专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司

代理人 丁业平 王达佐

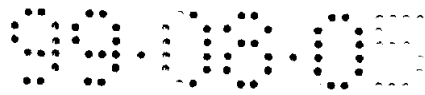
权利要求书 3 页 说明书 53 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 抗真菌生物控制剂,制备和处理该控制剂的方法

[57]摘要

本发明涉及通过抑制真菌病源体而加强植物生长和降低植物病害的抗真菌生物控制剂以及该控制剂的制备和应用方法。本发明的抗真菌生物控制剂由新分离的链霉菌属的菌株 WYE20(KCTCO341BP)和 WYE324(KCTCO342BP)之一和携带细胞并且使之稳定的递送介质组成。具体地说,本发明的 WYE20 和 WYE324 显示强烈的抗茄属丝核菌和辣椒疫病的抗真菌活性并且可用于各种方式以降低植物例如黄瓜(Cucumis sativus L.),胡椒(Capsicum annuum L.)和高尔夫球场的草皮的真菌病害。

ISSN 1008-4274



## 权 利 要 求 书

---

1. 微生物链霉菌 WYE20 和链霉菌 WYE324 的生物学纯的培养物，分别具有 KCTC0341BP 和 KCTC0342BP 的鉴定特性。

5

2. 包括链霉菌 WYE20 和链霉菌 WYE324 的生物学纯的培养物的微生物的抗真菌生物控制剂。

10

3. 根据权利要求 1 和 2 所述的微生物，其中的微生物能够保护敏感性植物使其免受真菌感染。

15

4. 根据权利要求 3 所述的微生物，其中保护是指抗引起幼苗疾病的真菌病源体，所述疾病包括枯萎病和根部腐烂以及叶的病害，包括黄瓜霜霉病、胡椒的疫霉枯萎病或草坪的丝核菌棕色/大斑。

20

5. 根据权利要求 2 所述的抗真菌生物控制剂，其中生物控制剂包括链霉菌 WYE20 或链霉菌 WYE324 的生物学纯的培养物和递送介质。

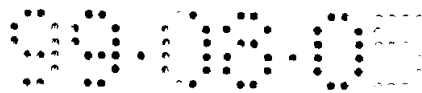
6. 根据权利要求 5 所述的抗真菌生物控制剂，其中递送介质由占递送介质总重量 40-65w/w%的麦饼、1-5w/w%的脱乙酰壳多糖、30-55w/w%的木屑、1-3w/w%的几丁质和 1-3w/w%的 Pharmamedia 组成。

25

7. 根据权利要求 6 所述的抗真菌生物控制剂，其中递送介质还含有 0.2-3.5w/w%的孢子形成培养基。

30

8. 根据权利要求 6 和 7 所述的抗真菌生物控制剂，其中链霉菌 WYE20 或链霉菌 WYE324 的生物学纯的培养物包含  $10^5$ - $10^{10}$  个菌落形成单位/克递送介质。



9. 根据权利要求 5 所述的抗真菌生物控制剂，其中递送介质由在水中的 1.0-3.0w/w%的果胶和 0.1-0.6w/w%的胶体几丁质组成。

5 10. 根据权利要求 9 所述的抗真菌生物控制剂，其中链霉菌 WYE20 或链霉菌 WYE324 的生物学纯的培养物包含  $10^5$ - $10^{10}$  个菌落形成单位/克递送介质。

11. 制备抗真菌生物控制剂的方法，包括生产链霉菌 WYE20 或链霉菌 WYE324 的生物学纯的培养物的培养过程；和下游过程。

10 12. 根据权利要求 11 所述的培养过程，其中该过程包括在 25°C-33°C 以 130-300rpm 培养 3-7 天。

15 13. 根据权利要求 11 所述的下游过程，其中该过程包括将收获的链霉菌 WYE20 或链霉菌 WYE324 的纯培养物冻干。

14. 根据权利要求 11 所述的下游过程，其中该过程包括将收获的纯培养物掺入到合适的递送介质中。

20 15. 制备抗真菌生物控制剂的方法，其中该方法包括下面的步骤：

制备含有占递送介质总重量 40-65w/w%的麦饼、1-5w/w%的脱乙酰壳多糖、30-55w/w%的木屑、1-3w/w%的几丁质和 1-3w/w%的 Pharmamedia 的递送介质；

25 将获得的递送介质高温蒸汽灭菌；

将链霉菌 WYE20(KCTC 0341BP) 或链霉菌 WYE324(KCTC 0342BP)掺入到所得递送介质中；

在 25°C-33°C 将被掺入的链霉菌 WYE20(KCTC 0341BP)或链霉菌 WYE324(KCTC 0342BP)培养 5-14 天；和

30 无菌干燥所获得的产物。



16. 根据权利要求 15 所述的制备抗真菌生物控制剂的方法，其中该方法包括无菌混合所获得的干燥产物。

5 17. 根据权利要求 15 所述的递送介质的制备，其中该制备包括使递送介质形成团丸，并且用 0.2-3.5w/w%的孢子形成培养基包被所得的团丸。

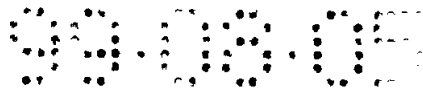
10 18. 根据权利要求 15 所述的掺入，其中链霉菌 WYE20 或 WYE324 包含  $10^5$ - $10^{10}$  菌落形成单位/克递送介质。

19. 根据权利要求 15 所述的高压蒸汽灭菌，其中该高压蒸汽灭菌包括在 121°C 灭菌 30-40 分钟。

15 20. 制备抗真菌生物控制剂的方法，其中该方法包括如下步骤：  
制备由 1.0-3.0w/w%的果胶、0.1-0.6w/w%的胶体几丁质和余量的水组成的递送介质；  
将获得的递送介质高温蒸汽灭菌；  
20 将链霉菌 WYE20(KCTC 0341BP)或链霉菌 WYE324(KCTC 0342BP)掺入到所得的递送介质中。

21. 根据权利要求 20 所述的掺入，其中链霉菌 WYE20 或 WYE324 包含  $10^5$ - $10^{10}$  菌落形成单位/克递送介质。

25 22. 权利要求 2-10 所述的抗真菌生物控制剂的应用方法，其中所述的应用包括包被、混合、喷洒，或在犁田时应用到植物种子、盆栽混合物、生长的植物或其土壤上。



# 说明书

## 抗真菌生物控制剂，制备和处理该控制剂的方法

### 5 发明领域

本发明涉及抗真菌生物控制剂，并且涉及制备和处理该控制剂的方法。具体地说，本发明涉及通过抑制真菌病源体在宿主植物的根际土壤形成菌落而加强植物生长和降低植物病害的链霉菌属的两个抗真菌生物控制菌株 WYE20 和 WYE324 以及该控制剂的制备方法和应用方法。

10

### 发明背景

土壤滋生的植物病源真菌导致农业和园艺业的巨大的经济损失是人所共知的。特别是，茄属丝核菌是显示强烈的致病性的主要的植物真菌病源体之一；该病源体与幼苗疾病以及叶的疾病如许多植物种类和品种的苗腐烂、根腐烂、矮化、叶和茎的腐烂相关，导致巨大的经济损失。例如，茄属丝核菌 AG 1(1B)引起作物例如黄瓜(*Cucumis sativus* L.)和胡椒(*Capsicum annuum* L.)的植物病害以及高尔夫球场的绿色爬行牧草的棕色斑块，茄属丝核菌 AG 2-2 在大面积的高尔夫球场上引起跑道草皮的大斑块，导致巨大的经济损失。另外，辣椒疫霉是广泛传播和高度破坏性的土壤滋生的植物病源真菌，导致根部和冠部的腐烂以及胡椒(*Capsicum annuum* L.)的叶、果实和茎的气生的枯萎病。如果受辣椒疫霉的感染，抑制胡椒植物的疫霉枯萎病是非常困难的。辣椒疫霉是特别具有破坏性的植物病源体，在热的和湿的雨季引起胡椒植物的枯萎病，导致杀死胡椒植物并且随后导致巨大的经济损失。如上提到的，茄属丝核菌和辣椒疫霉是显示强烈的致病性的主要的植物真菌病源体并且产生在苛刻条件下长时间存活的孢子。因此，当具有最适的发病条件时，它们重复导致大面积的植物病害。

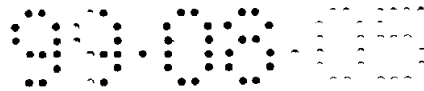
15

20

25

30

因此，种植者通常有规律地将杀真菌剂混合物应用到植物以控制

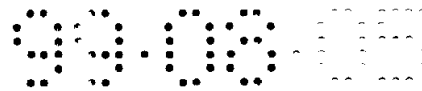


茄属丝核菌和辣椒疫霉引起的植物病害。但是，由于对杀真菌剂有抗性的植物病源真菌菌株的出现，控制胡椒植物的疫霉和爬行牧草的丝核菌棕色斑越来越困难。由于对杀真菌剂有抗性的茄属丝核菌在高尔夫球场的广泛传播和辣椒植物的连续的栽培引起的辣椒疫霉的增殖，使得控制这些病害的困难逐渐增加。

农用化学药剂的广泛使用也引起了毒性的残留和环境问题。此外，由于流失和缺乏允许有效地渗透到根际土壤的有效的应用，农用化学药剂被认为对控制土壤滋生的植物病害没有效果。期望通过应用化学杀真菌剂长期保护植物也是非常困难的。因此，利用根际细菌作为生物控制剂不仅可以更有效的和更经济地控制植物病害例如由辣椒疫霉引起的疫霉枯萎病和由茄属丝核菌引起的高尔夫球场牧草疾病，而且也可以加强保护环境。

已经证明拮抗微生物的应用是控制病源增加的有吸引力的途径(Suh, 博士论文(Ph. D. Dissertation), 爱达荷州立大学, 美国爱达荷州, 1991; Crawford 等人, 环境应用微生物, 59: 3899-3905, 1993; 美国专利 5403584)。在现有技术中发明人公开了链霉菌菌株可通过在盆栽混合物/土壤中利用含有草炭、沙子和玉米粉的递送介质或通过用含有生物控制剂的海藻酸钠包被植物种子, 导致在根部形成菌落, 从而用于控制植物病源体(美国专利 5403584)。在现有技术中也公开了含有有益的生物控制剂的草炭可用于控制植物病源体(美国专利 4595589)。现有技术中的递送介质的方法适用于幼苗/盆栽混合物的使用, 但是不十分适用于直接应用到植物种子或植物根部以有效地保护植物抵抗植物病源真菌。

本发明的目的是提供新的链霉菌菌株, 该菌株能够通过将特别设计的配方直接应用到植物种子或植物根部而控制植物病源真菌, 所述配方包括含有选自于新分离的链霉菌菌株的生物学纯化的培养物的递送介质。



此外，本发明的目的是提供抗真菌生物控制剂并且描述了其在保护植物免受土壤滋生的植物病原真菌引起的感染中的应用。

## 5 发明概述

通过分离链霉菌 WYE20 和 WYE324 完成了本发明，所述菌株能够保护植物免受茄属丝核菌和辣椒疫霉的侵袭。链霉菌 WYE20 和 WYE324 菌株可有效地阻止植物真菌疾病的发生并且加强温室和农业大田试验的植物生长。因此，本发明的一个方面是微生物学纯化的培养物链霉菌 WYE20 和 WYE324。

本发明也包括适用于用链霉菌 WYE20 和 WYE324 处理植物种子、幼苗床/苗钵、盆栽混合物/土壤的递送介质。所述递送介质非常适用于携带链霉菌 WYE20 和 WYE324 以抑制由植物病原真菌引起的植物病害。

在本发明的一个特定的实施方案中，递送介质由木屑、麦饼、几丁质、脱乙酰壳多糖和 Pharmamedia(商品名；由 Budkeye 油菜籽种子产品公司制造，美国德克萨斯州)与链霉菌 WYE20 或 WYE324 一起组成的。在另一个特定的实施方案中，递送介质由果胶和胶体几丁质和水与链霉菌 WYE20 或 WYE324 一起组成的。在优选的实施方案中，递送介质包括每克递送介质至少  $10^5$  菌落形成单位的链霉菌 WYE20 或 WYE324。

本发明也包括降低种子、幼苗和/或生长的植株在播种和生长季节之前或生长期受真菌感染的方法，该方法通过处理植物种子、苗床/苗钵、盆栽混合物/土壤，喷洒或犁田而应用。

## 发明详述

30 根据本发明，提供了有效地抑制真菌疾病和加强植物如胡椒、黄



瓜和牧草生长的链霉菌 WYE20 和 WYE324, 虽然其范围不仅限于这些实例。

5 本发明包括可用于携带链霉菌 WYE20 和 WYE324 以抑制由植物病源真菌引起的植物病害的各种递送介质。

10 在本发明的一个特定的实施方案中, 递送介质由占递送介质总重量 40-65w/w% 的麦饼, 1-5w/w% 的脱乙酰壳多糖, 30-55w/w% 的木屑, 1-3w/w% 的几丁质和 1-3w/w% Pharmamedia 组成。在优选的实施方案中, 递送介质进一步含有作为附加成分的占递送介质总重量 0.2-3.5w/w% 的孢子形成培养基。优选的孢子形成培养基选自于 ATCC # 5 孢子形成培养基或酵母提取物-葡萄糖-无机盐, 但是不排除其它培养基。

15 在另一个特定的实施方案中, 递送介质由溶于水的 1.0-3.0w/w% 的果胶和 0.1-0.6w/w% 的胶体几丁质组成。

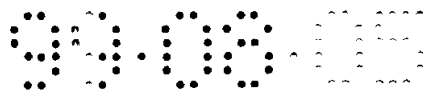
20 在优选的实施方案中, 递送介质包括每克递送介质至少  $10^5$ - $10^{10}$ , 优选的是  $10^7$ - $10^8$  菌落形成单位的链霉菌 WYE20 或 WYE324。

25 本发明包括用于生产链霉菌 WYE20 和 WYE324 的菌丝体和孢子接种体的方法。通过在酵母提取物-无机盐或改良液体培养基中在适当的条件下培养营养细胞来生产链霉菌 WYE20 和 WYE324 活细胞。

25 制备抗真菌生物控制剂的方法包括如下步骤:

通过在 25-33°C 的温度下, 以 130rpm 到 300rpm 培养 3-7 天来生产链霉菌 WYE20 或 WYE324。

30 在收获链霉菌 WYE20 或 WYE324 细胞之后, 将细胞冷冻或直接混合到递送介质中。



此外，根据本发明，制备抗真菌生物控制剂的方法包括下面的步骤：制备含有占递送介质总重量 40-65w/w%的麦饼，1-5w/w%的脱乙酰壳多糖，30-55w/w%的木屑，1-3w/w%的几丁质和 1-3w/w%Pharmamedia 的递送介质；

将获得的递送介质高温蒸汽灭菌；

将链霉菌 WYE20(KCTC 0341BP)或链霉菌 WYE324(KCTC 0342BP)掺入到递送介质中；

在 25℃-33℃将掺入的链霉菌 WYE20(KCTC 0341BP)或链霉菌 WYE324(KCTC 0342BP)培养 5-14 天；和

无菌干燥所获得的产物以获得抗真菌生物控制剂。

优选的是，该方法进一步包括将所获得的干燥产物无菌混合。

在上述方法中，可将递送介质制成丸并且然后用占递送介质总重量 0.2-3.5w/w%的孢子形成培养基包被。

掺入链霉菌 WYE20 或 WYE324 到浓度达每克递送介质  $10^5$ - $10^{10}$ ，优选达  $10^7$ - $10^8$  菌落形成单位。

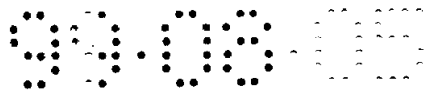
在 121℃将递送介质高温蒸汽灭菌 30-40 分钟。

在本发明的另一个实施方案中，提供了用于制备抗真菌生物控制剂的方法，该方法包括：

制备由溶于水的 1.0-3.0w/w%的果胶和 0.1-0.6w/w%的胶体几丁质组成的递送介质；

将获得的递送介质高温蒸汽灭菌；和

将链霉菌 WYE20(KCTC 0341BP)或链霉菌 WYE324(KCTC 0342BP)掺入到递送介质中。



在本发明的上述实施方案中，加入链霉菌 WYE20 或 WYE324 到递送介质至终浓度为每克递送介质  $10^5$ - $10^{10}$ ，优选的是  $10^7$ - $10^8$  菌落形成单位。

5 此外，本发明涉及处理抗真菌生物控制剂的方法，该方法包括将所述控制剂包被、混合、喷洒或在犁田时应用于植物种子、盆栽混合物、植物或其土壤。

10 本发明也涉及抗真菌生物控制剂，该控制剂包括新分离的链霉菌 WYE20 和 WYE324 菌株。因此，应认识到含有具有等同于与本发明的递送介质在一起的那些菌株的抗真菌特性的微生物的抗真菌生物控制剂亦在本发明的精神和范围内。

15 在下面的实施例中将进一步描述本发明。但是本发明不限于下面的实施例。

## 材料和方法

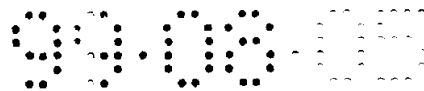
### 1. 微生物的培养基

20 所有的细菌培养基使用蒸馏水并且在使用之前进行高温蒸汽灭菌。采用标准的无菌试验技术处理所有的细菌样品以保持纯度。

25 1) CYD(酪蛋白氨基酸/酵母提取物/葡聚糖/琼脂)培养基含有溶于蒸馏水的酪蛋白氨基酸(Difco: 0.5 克/升)，酵母提取物(Difco: 0.8 克/升)，D-葡萄糖(0.4 克/升)，磷酸氢二钾(2.0 克/升；pH 7.2-7.4)和琼脂(18 克/升)。

2) 从 Reddi 和 Rao(1971)改良的 WYE(水/酵母提取物/琼脂)培养基含有溶于蒸馏水的酵母提取物(0.25 克/升)，磷酸氢二钾(2.0 克/升；pH 7.2-7.4)和琼脂(18 克/升)。

30 3) YGM(酵母提取物/葡萄糖/无机盐)培养基包括 0.6%(w/v)的酵母提取物(Difco 实验室，美国密执安州，底特律市)，1.0%(w/v)的葡萄糖



和无机磷酸盐溶液(每升去离子水中溶有 5.3 克磷酸氢二钠, 1.98 克的磷酸二氢钾, 0.2 克的 7 水合硫酸镁, 0.2 克的氯化钠, 0.05 克的 2 水合氯化钙, 和 1.0 毫升的微量元素(Pridham 和 Gottlieb, 细菌学杂志 56: 107-114, 1984), pH 7.1-7.2)。微量元素溶液由溶于 100 ml 蒸馏水的 0.64 克 5 水合硫酸铜, 0.11 克的 7 水合硫酸亚铁, 0.79 克的 4 水合绿化锰, 0.15 克的 7 水合硫酸锌组成。

4) CM(几丁质/无机盐/琼脂)培养基包括在每升如上描述的无机磷酸盐溶液中含有 0.4%-0.6%(w/v)由以前已知的方法制备的胶体几丁质(Hsu 和 Lockwood, 应用微生物学, 第 422-426 页, 1975), 0.6%(w/v)硫酸铵和 2.0%(w/v)琼脂; pH 7.0-7.2。

5) 昆布多糖琼脂培养基包括在每升如上描述的无机磷酸盐溶液中含有 0.25%(w/v)昆布多糖, 0.6%(w/v)硫酸铵和 2.0%(w/v)琼脂; pH 7.2-7.4。

6) 改良的贝纳特液体培养基含有溶于蒸馏水的酵母提取物(2 克/升), 牛肉提取物(2 克/升), 蛋白胨(2 克/升), 葡萄糖(10 克/升)和制霉菌素(5 微克/毫升); pH6.5-7.5。

7) 改良的贝纳特琼脂培养基含有溶于蒸馏水的酵母提取物(2 克/升), 牛肉提取物(2 克/升), 蛋白胨(2 克/升), 葡萄糖(10 克/升), 制霉菌素(5 微克/毫升; pH6.5-7.5), 和琼脂(20 克/升)。

8) ISP 培养基 # 2(Difco)。

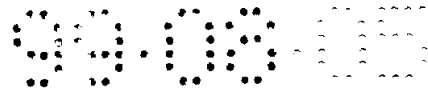
9) ISP 培养基 # 3(Difco)。

10) ISP 培养基 # 4(Difco)。

11)孢子形成培养基(ATCC 培养基 # 5)含有酵母提取物(1 克/升), 牛肉提取物(1 克/升), 胰蛋白胨(2 克/升), 磷酸亚铁(0.01 克/升), 葡萄糖(10 克/升), 和琼脂(15 克/升)(ATCC 细菌和噬菌体目录第 17 版)。

## 2. 链霉菌 WYE20 和 WYE324 的鉴定

根据伯杰氏手册的细菌系统分类(1989)、国际链霉菌项目(ISP)(1974)和 Williams 等人(1983)定义的链霉菌属的形态学、生理学和化学特性, 将菌株 WYE20 和 WYE324 鉴定为链霉菌属的种的菌株。



这些菌株的形态学、生理学和化学特性的概括结果列于表 I-V。

### 3. 链霉菌 WYE20 和 WYE324 的种子培养基的制备和储存

5 用接种环将 CYD 琼脂斜面的孢子接种到含有 50 毫升的改良的贝纳特液体培养基(pH6.5-7.5)的 500 毫升的摇瓶中。在接种之前将培养基在 121°C 高压蒸汽灭菌 15 分钟。然后将接种的摇瓶以 130-300rpm, 在 25°C-33°C 振荡培养 1-4 天以提供标准的种菌。

10 对于短期使用, 将链霉菌 WYE20 和 WYE324 在 CYD 或 WYE 琼脂斜面上, 在 25°C 培养直到孢子形成, 然后储存于 4°C 直到使用。每隔 4 星期转移培养物一次。悬浮于经高压蒸汽灭菌的甘油(121°C, 15 分钟)中的孢子(15%-30%)用于在 -70°C 长期储存。

### 4. 液体培养物中菌丝体和孢子的收获和生产

15 在含有 200 毫升的改良的贝纳特液体培养基或 200 毫升的 YGM(pH6.5-7.5)培养基的 1 升摇瓶中接种 8 毫升的改各种种子培养物, 以产生链霉菌 WYE20 和 WYE324 的菌丝体和孢子的活细胞。接种的摇瓶以 130-300rpm, 在 25°C-33°C 振荡培养 3-7 天。通过以 4000rpm 离心 10 分钟来无菌收获通过上面方法产生的菌丝体和孢子的活细胞。

20 5. 用递送介质生产菌丝体和孢子的活细胞和抗真菌生物控制剂的制备

25 (1) 将由占培养基总重量 40-65w/w% 的麦饼, 1-5w/w% 的脱乙酰壳多糖, 30-55w/w% 的木屑, 1-3w/w% 的几丁质和 1-3w/w% Pharmamedia(Budkeye 油菜籽产品公司, Fortworth, Texas, 美国)组成的本发明的递送介质彻底混合。将所获得的递送介质制成团丸并且用 0.2-3.5w/w% 的孢子形成培养基(ATCC # 5 或 YGM 培养基)喷涂包被, 然后在 121°C 高压蒸汽灭菌 30-40 分钟。当加入的孢子形成培养基低于 0.2w/w% 时对细胞生长没有作用, 而当加入的孢子形成培养基在 3.5w/w% 以上时则起始细胞生长被延迟。

30



5 将 100 毫升-200 毫升的链霉菌 WYE20 和 WY324( $10^5$ - $10^7$ cfu/ml) 接种到所获得的高压蒸汽灭菌的递送介质中并且然后在 30℃培养 5-14 天。在无菌条件下收获递送介质中的链霉菌 WYE20 和 WY324，并且在用 UV 灭菌的分层的流动工作台中干燥。将获得的干燥产物在无菌条件下混合以获得包括递送介质和链霉菌 WYE20 或 WYE324 的抗真菌生物控制剂。

10 (2)制备包括链霉菌 WYE20 或 WYE324 和液体递送介质的抗真菌生物控制剂

通过将上述所获得的链霉菌 WYE20 或 WYE324 的菌丝体和孢子的活细胞接种到经高压蒸汽灭菌的由溶于水的 1.0-3.0w/w%果胶和 0.1-0.6w/w%的胶体几丁质组成的递送介质中，来完成抗真菌生物控制剂的制备。

## 15 6. 真菌病源体

下面的真菌病源体可用于抗真菌测试：终极腐霉(*Pythium ultimum*)，禾生腐霉(*Pythium graminicola*)，茄属丝核菌(*Rhizoctonia solani*)，茄属丝核菌 AG 1(1B)(*Rhizoctonia solani* AG 1 (1B))，茄属丝核菌 AG2-2(IV)(*Rhizoctonia solani* AG 2-2(IV))，尖孢镰胞(*Fusarium oxysporum*)，接骨木镰胞(*Fusarium sambucinctum*)，茄病镰胞(*Fusarium solani*)，辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)，寄生疫霉(*Phytophthora parasitica*)，油菜核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)，葱核盘菌(*Sclerotium cepivarum*)和大丽花轮枝孢(*Verticillium dahliae*)。所有菌株在马铃薯葡萄糖琼脂(Difco)或玉米粉琼脂(Difco)上在 25℃生长，并且在 4℃储存。

## 25 7. 测定递送介质中的细胞数

30 将 1 克含有链霉菌 WYE20 或 WYE324 的递送介质加入到 9 毫升无菌蒸馏水中并且用 vortex™ 彻底混合。将获得的悬浮液连续稀释并且涂布在 CMA 平板培养基上以测定每克的菌落形成单位(cfu)数量。在



30°C培养该平板并且观察菌落的形成。将相同的方法用于测定 cfu/毫升液体递送介质。

5 8. 进行体外生物测试以测定链霉菌 WYE20 和 WYE324 的抗真菌活性

10 通过用递送介质中的链霉菌 WYE20 或 WYE324 处理黄瓜、胡椒或高尔夫球场牧草，然后将处理的和未处理的种子播种于合适的生长培养基或农田中，以此来测定链霉菌 WYE20 或 WYE324 加强植物生长和降低由真菌病源体引起的植物病害的活性。就突出体、植物的生长晕、植物高度和疾病控制能力，测定递送介质中的链霉菌 WYE20 或 WYE324 作为生物控制剂的活性。

#### 实施例 1

##### 链霉菌 WYE20 和 WYE324 的分离

15 从韩国 Chungbuk 省的 Goesan 的四个不同的根际相关的土壤获得土壤样品。通过连续稀释/在 WYE 琼脂平板上的铺板技术来分离菌株。对获得的菌株就抗茄属丝核菌和辣椒疫霉的拮抗活性；显示真菌细胞壁降解的酶活性；根际定殖，在低温(4°C, 8°C)的生长；和产生大细胞群的可能性进行测试以分离两个新菌株。将两个新菌株分别命名  
20 为链霉菌 WYE20 和 WYE324。通过在 25°C，在 WYE 平板培养基上培养菌株 4-10 天以允许菌株形成孢子，然后分离其菌落，在新的 WYE 琼脂平板上划线培养来获得纯培养物，从而纯化链霉菌 WYE20 和 WYE324。将链霉菌 WYE20 和 WYE324 纯培养物转移到 CYD 琼脂斜面，在 25°C-30°C 培养，直到形成孢子并且储存在 4°C。每隔 4 星期转移培养物一次。  
25

#### 实施例 II

##### 链霉菌 WYE20 和 WYE324 的鉴定和特征分析

30 根据系统细菌学伯杰氏手册(1989)检查实施例 1 获得的微生物的形态学、生理学和化学特性。结果显示于表 I-V。

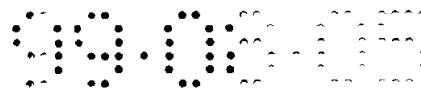


表 I

培养基	细胞生长		气生菌丝体		基生菌丝体		孢子群的颜色	
	WYE 20	WYE 324	WYE 20	WYE 324	WYE 20	WYE 324	WYE 20	WYE 324
ISP # 2	好	好	丰富	丰富	浅黄	浅黄	灰红	灰红
ISP # 3	好	好	丰富	丰富	淡黄	淡黄	灰红	灰红
ISP # 4	好	好	丰富	丰富	淡黄	淡黄	灰红	灰红

表 IIa

特性	WYE20 菌株	WYE324 菌株
孢子链形态学	螺旋状	螺旋状
孢子链纹饰	光滑	光滑
孢子形状	圆柱形	圆柱形
可扩散色素	-	-
黑色素的产生	+	+
	(棕色-深棕色)	(棕色-深棕色)
抗菌活性		
黑曲霉	+	+
枯草芽孢杆菌 NCIB3610	+	+
鼠灰链霉菌	+	+
白色念珠菌	-	-
啤酒酵母 CBS1172	-	-
藤黄微球菌 NCIB196	+	+
卵磷脂酶活性	+	+
果胶水解	-	-
脱脂奶水解	+	+
淀粉水解	+	+
硝酸盐的还原	+	+
硫化氢的产生	+ <sup>4 星期</sup>	-

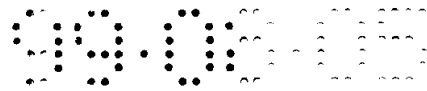


表 IIa(续)

特性	WYE20 菌株	WYE324 菌株
对抗生素的抗性 (微克/毫升):		
夹竹桃霉素(100)	_1 毫米 giz	_1 毫米 giz
新霉素(50)	+	+
利福平(50)	_2 毫米 giz	-
林肯霉素(100)	+	+
新生霉素(100)	-	-
Ganamycin(100)	_2 毫米 giz	_3 毫米 giz
氨苄西林(100)	+	+
链霉素(100)	_3 毫米 giz	_2 毫米 giz
春雷霉素(100)	+	_1 毫米 giz
四环素(100)	+	+
氯霉素(100)	-	_3 毫米 giz
	-: 生长抑制圈(giz)>4 毫米	+: 没有生长抑制圈

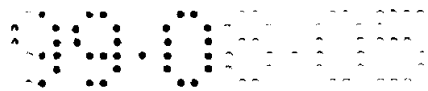


表 IIb

特性	WYE20 菌株	WYE324 菌株
降解活性:		
黄嘌呤	-	-
弹性蛋白	+	+
熊果苷	-	-
木聚糖	+	+
L-酪氨酸	+	+
尿囊素	+	+
在 45°C 生长	-	-
在 pH 4.3 生长	-	-
在化学抑制剂(w/v, %)		
存在下的生长:		
氯化钠(7.0)	-	-
叠氮化钠(0.01)	-	-
苯酚(0.1)	+	+
亚碲酸钾(0.001)	+	+
结晶紫(0.0001)	+	-
Neolin(0.5)	+	+
Neolin(1.0)	+	+
吐温 20(0.5)	+	+
吐温 20(1.0)	+	+
Rizorax™ (0.1)	+	+
Rizorax™ (1.0)	+	+
Gochutan™(0.1)	+	+
Smirax™(0.1)	-	-
Lidomil MG™(0.125)	+	±
Lidomil MG™(0.25)	-	-
Angcol™(0.1)	-	-

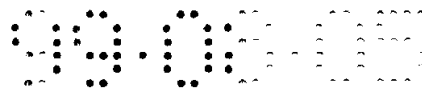


表 IIb(续)

特性	菌株 WYE20	菌株 WYE324
氮的利用(0.1%w/v):		
L-天冬氨酸	+	+
DL- $\alpha$ -氨基-正丁酸	-	-
L-半胱氨酸	±	+
L-缬氨酸	±	+
L-苯丙氨酸	-	±
L-组氨酸	+	+
L-羟基脯氨酸	+	+
L-精氨酸	+	+
L-甲硫氨酸	±	-
硝酸钾	-	+
L-丝氨酸	+	+
L-苏氨酸	+	

™ 商标

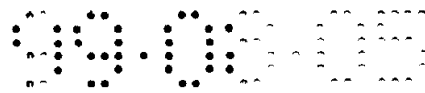


表 IIc

特性	菌株 WYE20	菌株 WYE24
碳的利用(1.0%w/v):		
蔗糖	+	+
内消旋肌苷	-	-
甘露醇	-	-
L-鼠李糖	+	-
棉籽糖	-	-
D-松三糖	+	+
阿东糖醇	-	-
D-蜜二糖	±	±
葡聚糖	±	-
木糖醇	±	-
L-阿拉伯糖	±	±
D-果糖	+	+
D-半乳糖	+	+
D-葡萄糖	+	+
D-水杨苷	±	+
D-木糖	+	+
山梨糖	+	+
D-乳糖	+	+
D-甘露糖	+	+
海藻糖	+	+
麦芽糖	+	+
纤维二糖	+	+
菊粉	-	-
乙酸钠(0.1)	+	+
柠檬酸钠(0.1)	+	+
丙二酸钠(0.1)	±	±
丙酸钠(0.1)	+	+
丙酮酸钠(0.1)	+	+
二氨基庚二酸	LL	LL

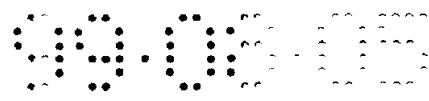


表 IV

链霉菌 WYE324									
脂肪酸	含量(%)								
	1	2	3	4	最小	最大	平均		
饱和脂肪酸									
14:0	0.28	0.26	0.42	0.45	0.26	0.45	0.35		
15:0	2.22	2.19	1.23	1.25	1.23	2.22	1.72		
16:0	4.34	4.40	5.89	6.19	4.34	6.19	5.21		
17:0	0.40	0.43	—	—	nd	nd	nd		
不饱和脂肪酸									
15:1 B	0.20	0.15	—	—	nd	nd	nd		
16:1 顺 9	6.40	6.39	5.66	5.54	5.54	6.40	6.00		
17:1 顺 9	1.40	1.43	0.78	0.71	0.71	1.43	1.08		
甲基支链									
13:0 异	0.08	0.10	—	—	nd	nd	nd		
13:0 反异	0.13	0.14	—	—	nd	nd	nd		

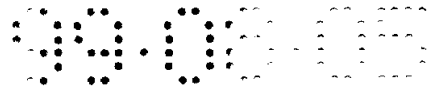


表 IV (续)

脂肪酸	链霉菌 WYE324									
	含量(%)									
	1	2	3	4	最小	最大	平均			
14:0 异	1.64	1.62	2.18	2.30	1.62	2.30	1.94			
15:0 异	7.48	7.48	8.15	8.10	7.48	8.15	7.80			
15:0 反异	30.25	30.10	31.65	31.76	30.10	31.76	30.94			
16:1 异 H	2.59	2.57	3.34	3.23	2.57	3.34	2.93			
16:0 异	14.05	14.06	16.67	16.69	14.05	16.69	15.37			
16:0 9? CH <sub>3</sub>	3.56	3.56	3.29	3.12	3.12	3.56	3.38			
17:1 反异 C	6.68	6.65	5.97	5.90	5.90	6.68	6.30			
17:0 异	1.77	1.82	2.14	2.16	1.77	2.16	1.97			
17:0 反异	10.78	10.95	10.68	10.72	10.68	10.95	10.78			
17:0 10 CH <sub>3</sub>	0.18	0.18	—	—	nd	nd	nd			
18:1 异 H	0.49	0.50	—	—	nd	nd	nd			
羟基支链										
17:0 异 2OH	0.50	0.51	—	—	nd	nd	nd			

表 III (续)

脂肪酸		链霉菌 WYE324						
		含量(%)						
1		2	3	4	最小	最大	平均	
未知 17.595 SM	0.78	0.82	0.50	0.55	0.50	0.82	0.66	

注释: 第 1 和第 2 次: 细胞在胰蛋白酶 大豆肉汤 (TSB) 中生长。

第 3 和第 4 次: 细胞在胰蛋白酶 大豆琼脂 (TSA) 中生长。

—: 未检测。 nd: 未测定。



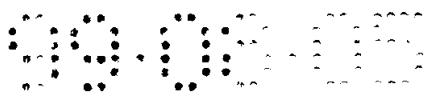


表 IV

链霉菌 WYE324									
脂肪酸	含量(%)								平均
	1	2	3	4	最小	最大			
饱和脂肪酸									
14:0	0.28	0.26	0.42	0.45	0.26	0.45		0.35	
15:0	2.22	2.19	1.23	1.25	1.23	2.22		1.72	
16:0	4.34	4.40	5.89	6.19	4.34	6.19		5.21	
17:0	0.40	0.43	—	—	nd	nd		nd	
不饱和脂肪酸									
15:1 B	0.20	0.15	—	—	nd	nd		nd	nd
16:1 顺 9	6.40	6.39	5.66	5.54	5.54	6.40		6.00	
17:1 顺 9	1.40	1.43	0.78	0.71	0.71	1.43		1.08	
甲基支链									
13:0 异	0.08	0.10	—	—	nd	nd		nd	nd
13:0 反异	0.13	0.14	—	—	nd	nd		nd	nd



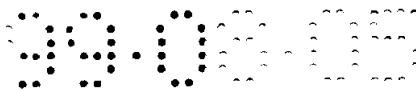
表 IV (续)

		链霉菌 WYE324						
脂肪酸		含量(%)						
		1	2	3	4	最小	最大	平均
17:0 3OH	0.24		0.19	—	—	nd	nd	nd
环丙烷								
17:0 环丙烷	3.15		3.14	1.95	1.89	1.89	3.15	2.53
未知 17.595 SM	0.68		0.69	—	—	nd	nd	nd

注释: 第 1 和第 2 次: 细胞在胰蛋白酶 大豆肉汤 (TSB) 中生长。

第 3 和第 4 次: 细胞在胰蛋白酶 大豆琼脂 (TSA) 中生长。

—: 没有检测。 nd: 未测定。







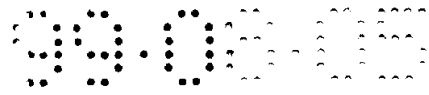


表 V (续)

特性	链霉菌 WYE20	哥伦比亚链霉菌 ATCC 27425	链霉菌 WYE324	五色链霉菌 ATCC 23914
在 45°C 生长	-	-	-	-
在氯化钠(7%, w/v)中生长	-	-	-	-
在叠氮化钠(0.01%, w/v)中生长	-	-	-	-
在苯酚(0.1%, w/v)中生长	+	+	+	+
D-木糖(1.0%, w/v)的利用	+	-	+	-
内消旋肌醇(1.0%, w/v)的利用	-	-	-	-
甘露醇(1.0%, w/v)的利用	-	-	-	-
D-果糖(1.0%, w/v)的利用	+	+	+	+
L-鼠李糖(1.0%, w/v)的利用	+	-	-	-
棉子糖(1.0%, w/v)的利用	-	-	-	-
菊粉(1.0%, w/v)的利用	-	-	-	-
阿东糖醇(1.0%, w/v)的利用	-	-	-	-
纤维二糖(1.0%, w/v)的利用	+	+	+	+



根据伯杰氏手册的细菌系统分类(1989); 国际链霉菌项目 (ISP)(1974); 和 Williams 等人(1983)分析表 I-V 的数据将实施例 1 获得的两个菌株鉴定为链霉菌属。

5 将两个菌株分别命名为 WYE20 和 WYE324。根据链霉菌属的形态学、生理学和化学特性, 菌株 WYE20 属于哥伦比亚链霉菌种或与 61 簇密切相关的种, 但是该菌株被鉴定为链霉菌属的新的菌株。根据链霉菌属的形态学、生理学和化学特性, 菌株 WYE324 属于五色链霉菌种或与 61 簇密切相关的种, 但是该菌株被鉴定为链霉菌属的新的菌株。

10 按照国际承认的专用于专利程序目的的微生物保藏布达佩斯条约, 于 1997 年 6 月 18 日将 WYE20 和 WYE324 菌株寄存于韩国典型培养物保藏中心(KCTC), 韩国生物科学和生物技术研究院(韩国, Taejon), 保藏号分别为 KCTC 0341BP 和 KCTC0342BP。

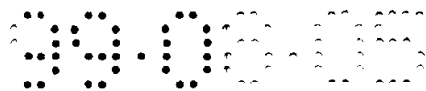
15 实施例 III

链霉菌 WYE20 和 WYE324 的细胞生长的最适温度

20 为了调查温度对链霉菌 WYE20 和 WYE324 的细胞生长的影响, 将 WYE20 和 WYE324 菌株的孢子划线接种于改良的贝纳特琼脂平板上。将划线的平板在 4°C, 8°C, 27°C, 37°C 和 45°C 的预定的温度下培养 3 星期。在 7, 14 和 21 天记录生长。结果显示于表 VI, 以生长好(+); 生长慢(±); 没有生长(-)表示。

表 VI

菌株	4°C		8°C		27°C		37°C		45°C	
	7 天	21 天	7 天	14 天	7 天	14 天	7 天	14 天	7 天	14 天
WYE 20	±	+	+	+	+	+	±	+	-	-
WYE 324	-	±	±	+	+	+	±	+	-	-



5 如表 VI 显示的，WYE20 菌株在 4℃ 培养一星期之后表现为缓慢生长，在培养 3 星期之后表现为生长良好，而菌株 WYE324 在 4℃ 培养 3 星期之后缓慢生长。菌株 WYE20 在 8℃ 和 27℃ 生长良好。但是菌株 WYE324 在 8℃ 培养 1 星期之后缓慢生长和在 8℃ 培养 2 星期之后生长良好。另外，菌株 WYE324 在 27℃ 生长良好。菌株 WYE20 和 WYE324 在 37℃ 培养 1 星期之后缓慢生长和在 37℃ 生长 2 星期之后生长良好，但是它们在 45℃ 均不生长。

## 10 实施例 IV

### 酶活性和拮抗性测试

#### (1) 酶活性测试

15 为了测试菌株 WYE20 和 WYE324 的酶活性，使用了几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶，已知它们是能够寄生于/抑制真菌病源体的酶。

15 为了测定菌株 WYE20 和 WYE324 的几丁质酶活性，将各个菌株在 CM 琼脂平板上划线培养，然后在 30℃ 培养 14 天，所述平板包含了胶体几丁质作为唯一的碳源。观察到菌落的形成和生长。上述结果证明菌株 WYE20 和 WYE324 具有几丁质酶活性。

20 为了测定菌株 WYE20 和 WYE324 的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性，将各个菌株在昆布多糖琼脂平板上划线培养，然后在 27℃ 培养 7 天，所述平板包含了昆布多糖作为唯一的碳源。观察到菌落的形成和生长。上述结果证明菌株 WYE20 和 WYE324 具有  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性。

#### 25 (2) 拮抗性测试

25 进行体外平板测试，根据植物病源真菌的生长抑制情况检测菌株 WYE20 和 WYE324 的拮抗性。将各个菌株在 CMA 琼脂平板上划线接种，并且在 30℃ 培养 6-10 天。然后在无菌状态下将含有活跃生长的真菌菌丝体的 PDA(马铃薯-葡萄糖琼脂)块置于平板的中央并且在 25℃ 培

30



养 24-192 小时。将上述 PDA 块接种到不含有菌株 WYE20 或 WYE324 的 CMA 平板上并且用作为对照。在三个平板上进行生物测试。将拮抗性记录为抑制真菌病源体的菌丝体生长的抑制的程度，如表 VII 所示。

5

表 VII

真菌病源体	拮抗活性	
	WYE20	WYE324
终极腐霉 <sup>1</sup>	+	+
禾生腐霉 <sup>2</sup>	++	++
尖孢镰胞	++	++
接骨木镰胞	++	nt
茄病镰胞	++	++
茄属丝核菌	++	++
茄属丝核菌 AG 1(IB)	++	++
茄属丝核菌 AG2-2(IV)	++	++
辣椒疫霉	++	++
寄生疫霉	++	++
油菜核盘菌	++	++
葱核盘菌 <sup>3</sup>	++	++
大丽花轮枝孢 <sup>3</sup>	++	nt

<sup>1</sup>24 小时培养，<sup>2</sup>36 小时培养，<sup>3</sup>192 小时培养

其余：96 小时培养

++：抑菌圈≥1.0 厘米的强烈抑制

+: 在菌落附近有明显的抑菌圈，生长明显受阻

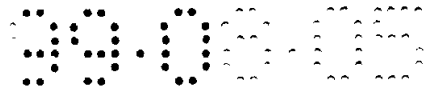
10

-: 没有拮抗性，或拮抗性非常弱

nt: 没有测试

15

如表 VII 所示，菌株 WYE20 和 WYE324 显示出抗终极腐霉的明显抑菌圈。菌株 WYE20 显示对禾生腐霉、尖孢镰胞、接骨木镰胞、茄病镰胞、茄属丝核菌、茄属丝核菌 AG 1(IB)、茄属丝核菌 AG2-2(IV)、辣椒疫霉、寄生疫霉、油菜核盘菌、葱核盘菌和大丽花轮枝孢有强烈的拮抗性。另外，菌株 WYE324 也显示对禾生腐霉、尖孢镰胞、茄病



镰胞、茄属丝核菌、茄属丝核菌 AG 1(1B)、茄属丝核菌 AG2-2(IV)、辣椒疫霉、寄生疫霉、油菜核盘菌、葱核盘菌有强烈的拮抗性。

## 实施例 V

### 5 粉末形式的抗真菌生物控制剂的制备

根据表 VIII，通过将麦饼、脱乙酰壳多糖、木屑、几丁质和 Pharmamedia 混合来制备递送介质。利用挤出机将使递送介质造粒制成团丸。在造粒成团的过程中，测定团丸形成的程度，对于没有碎片和破裂的形成好团丸的情况记录为好；而对于很少形成团丸的情况记录为差。结果显示于表 VIII。测定空气渗透性和递送介质的细胞生长，并记录为差、中等和好。结果显示于表 VIII。

15 将在“材料和方法”中获得的链霉菌 WYE20 或 WYE324( $10^5$ - $10^7$ cfu/毫升)培养物 150 毫升接种到所获得的经高压蒸汽灭菌的递送介质中并然后在 30℃培养 5-14 天。无菌收获各个递送介质中的链霉菌 WYE20 或 WYE324 培养物并且在 UV 灭菌的分层流动工作台中干燥。将干燥的产物在无菌条件下混合以获得由递送介质和链霉菌 WYE20 或 WYE324 组成的粉末形式的抗真菌生物控制剂。

20 在递送介质中将链霉菌 WYE20 或 WYE324 的细胞数调整到  $10^5$ - $10^{10}$ cfu/克递送介质。将所获得的由递送介质和链霉菌 WYE20 或 WYE324 组成的抗真菌生物控制剂在 4℃和 25℃保持 3 个月。以一个月为间隔测定递送介质中的 WYE20 或 WYE324 的存活性和生长并且在 3 个月时记录。

25 将含有 WYE20 或 WYE324 的 1 克递送介质加入到 9 毫升的无菌蒸馏水并且彻底涡旋混合。通过连续稀释和涂布平板技术测定每克所得的悬浮液的 cfu 并且列于表 VIII 和 IX。

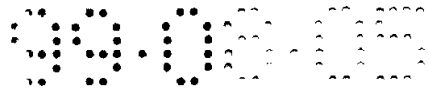


表 VIII

递送介质 (D.M.)	麦饼	脱乙酰壳多糖	木屑	几丁质	Pharma media	团丸形成	空气渗透	细胞生长
D.M. 1	65	1	30	2	2	好	中等	中等
D.M. 2	65	2	30	1	2	好	中等	中等
D.M. 3	65	2	30	2	1	好	中等	中等
D.M. 4	65	1	30	1	3	好	中等	中等
D.M. 5	65	1	30	3	1	好	中等	中等
D.M. 6	63	5	30	1	1	好	中等	中等
D.M. 7	60	5	30	2	3	好	中等	中等
D.M. 8	50	1	45	2	2	好	好	好
D.M. 9	45	5	45	2	3	好	好	好
D.M. 10	45	3	50	1	1	好	好	好
D.M. 11	40	3	55	1	1	好	好	好
D.M. 12	40	1	55	3	1	好	好	好

(单位: w/w%)

表 VIII(续)

递送介质 (D.M.)	麦饼	脱乙酰壳多糖	木屑	几丁质	Pharma media	团丸形成	空气渗透	细胞生长
D.M. 13	40	1	55	1	3	好	好	好
对照 1	90	2	5	2	1	好	差	差
对照 2	80	5	10	3	2	好	差	差
对照 3	70	3	25	1	1	好	差	差
对照 4	30	5	60	2	3	差	好	nt
对照 5	20	5	70	2	3	差	好	nt
对照 6	10	5	80	2	3	差	好	nt

nt: 未检测



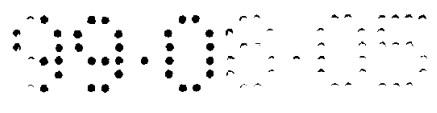


表 IX

递送介质 (D.M.)	麦饼	脱乙酰壳多糖	木屑	几丁质	Pharma media	WYE 20 或 WYE324 的 起始细胞数 (cfu/g)	3 个月后 WYE 20 或 WYE324 的细胞数 (cfu/g)		细胞生长
							在 4°C	在 25°C	
D.M. 1	65	1	30	2	2	$1.2 \times 10^7$	$1.0 \times 10^6$	$2.3 \times 10^5$	好
D.M. 2	65	2	30	1	2	$1.9 \times 10^7$	$1.5 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$	好
D.M. 3	65	2	30	2	1	$1.3 \times 10^7$	$1.4 \times 10^6$	$2.5 \times 10^5$	好
D.M. 4	65	1	30	1	3	$2.1 \times 10^7$	$1.7 \times 10^6$	$3.6 \times 10^5$	好
D.M. 5	65	1	30	3	1	$2.0 \times 10^7$	$1.2 \times 10^6$	$3.1 \times 10^5$	好
D.M. 6	63	5	30	1	1	$2.7 \times 10^7$	$1.1 \times 10^6$	$2.7 \times 10^5$	好
D.M. 7	60	5	30	2	3	$1.5 \times 10^7$	$1.3 \times 10^6$	$3.3 \times 10^5$	好
D.M. 8	50	1	45	2	2	$1.6 \times 10^8$	$2.1 \times 10^7$	$2.1 \times 10^6$	好
D.M. 9	45	5	45	2	3	$2.6 \times 10^8$	$1.1 \times 10^7$	$2.5 \times 10^6$	好

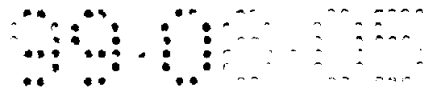
(单位: w/w%)

表 IX (续)

递送介质 (D.M.)	麦饼	脱乙酰壳多糖	木屑	几丁质	Pharma media	WYE 20 或 WYE324 的 起始细胞数 (cfu/g)	3 个月后 WYE 20 或 WYE324 的细胞数 (cfu/g)		细胞生长
							在 4°C	在 25°C	
D.M. 10	45	3	50	1	1	$2.1 \times 10^8$	$1.0 \times 10^7$	$3.1 \times 10^6$	好
D.M. 11	40	3	55	1	1	$1.9 \times 10^8$	$1.6 \times 10^7$	$3.5 \times 10^6$	好
D.M. 12	40	1	55	3	1	$1.8 \times 10^8$	$1.9 \times 10^7$	$2.4 \times 10^6$	好
D.M. 13	40	1	55	1	3	$2.2 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$	$1.9 \times 10^6$	好

(单位: w/w%)





如表 VIII 和 IX 所示，D.M.1-13 的团丸形成、空气渗透性和细胞生长情况为好和中等，而各组分的含量不同的对照 1-6 在团丸形成、空气渗透性或细胞生长情况方面差。

- 5 另外，用 YGM 孢子形成培养基包被 D.M.1-13 团丸，并且测定其对细胞生长和存活的作用。结果显示于表 X。

表 X

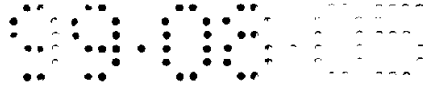
递送介质 (D.M.)	麦饼	脱乙酰壳多糖	木屑	几丁质	Pharma media	YGM*	WYE 20 或 WYE324 的 起始细胞数 (cfu/g)	3 个月后 WYE 20 或 WYE324 的细胞数 (cfu/g)		细胞生长
								在 4°C	在 25°C	
D.M. 14	65	1	30	2	2	0.2	$1.1 \times 10^7$	$1.2 \times 10^6$	$2.4 \times 10^5$	好
D.M. 15	65	2	30	1	2	0.5	$1.4 \times 10^7$	$1.4 \times 10^6$	$2.9 \times 10^5$	好
D.M. 16	65	2	30	2	1	1.0	$1.6 \times 10^7$	$1.6 \times 10^6$	$2.6 \times 10^5$	好
D.M. 17	65	1	30	1	3	1.5	$2.0 \times 10^7$	$1.9 \times 10^6$	$4.2 \times 10^5$	好
D.M. 18	65	1	30	3	1	1.8	$2.2 \times 10^7$	$1.3 \times 10^6$	$3.2 \times 10^5$	好
D.M. 19	63	5	30	1	1	2.0	$1.7 \times 10^7$	$2.1 \times 10^6$	$3.7 \times 10^5$	好
D.M. 20	60	5	30	2	3	3.5	$1.1 \times 10^7$	$2.3 \times 10^6$	$3.4 \times 10^5$	好
D.M. 21	50	1	45	2	2	3.5	$1.2 \times 10^8$	$2.3 \times 10^7$	$2.3 \times 10^6$	好
D.M. 22	45	5	45	2	3	2.5	$1.6 \times 10^8$	$2.1 \times 10^7$	$2.5 \times 10^6$	好
D.M. 23	45	3	50	1	1	2.0	$2.2 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$	$3.2 \times 10^6$	好

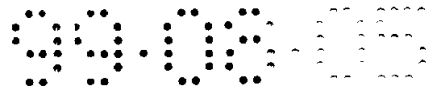
(单位: w/w%)

表 X (续)

递送介质 (D.M.)	麦饼	脱乙酰壳多糖	木屑	几丁质	Pharma media	YGM*	WYE 20 或 WYE324 的 起始细胞数 (cfu/g)	3 个月后 WYE 20 或 WYE324 的细胞数 (cfu/g)		细胞生长
								在 4°C	在 25°C	
D.M. 24	40	3	55	1	1	1.5	$2.9 \times 10^8$	$2.1 \times 10^7$	$3.6 \times 10^6$	好
D.M. 25	40	1	55	3	1	0.5	$1.4 \times 10^8$	$1.9 \times 10^7$	$2.6 \times 10^6$	好
D.M. 26	40	1	55	1	3	0.2	$1.2 \times 10^8$	$1.3 \times 10^7$	$2.9 \times 10^6$	好

YGM\*: 总重 w/w%





5 如表 IX 和 X 所示，在 D.M.1-26 中 WYE20 和 WYE324 的细胞长时间稳定(>3 个月)。D.M.1-26 的 WYE20 和 WYE324 的细胞显示 >10<sup>5</sup>cfu/克，这是储存 3 个月后生物控制活性所需的细菌浓度。特别是，当使用包被了 YGM 培养基的 D.M.14-26 时，WYE20 和 WYE324 细胞的稳定性得到改善。

## 实施例 VI

### 悬浮液形式的生物控制剂的制备

10 将在 1.0 升蒸馏水的总体积中包含 20 克果胶和 2 克胶体几丁质的递送介质在 121℃ 高压蒸汽灭菌 15 分钟。通过将在“材料和方法”部分描述的链霉菌 WYE20 或 WYE324 掺入到所获得的经高压蒸汽灭菌递送介质中而制备悬浮液形式的生物控制剂(1.2×10<sup>7</sup>cfu/毫升)。

15 将获得的产物保存在 4℃。该生物控制剂的形式适用于处理植物种子并且通过犁田或在用水稀释之后喷洒而适用于苗床的处理。

## 实施例 VII

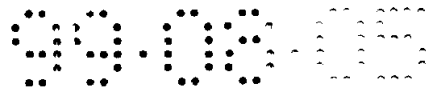
### 抗真菌活性测试

20 进行体内生物控制测试以测定实施例 V 和实施例 VI 制备的生物控制剂的效力。通过处理植物、植物种子、植物根部、苗床、苗钵、盆栽混合物或土壤，对生物控制剂的降低真菌病害和加强植物生长的能力进行测试。

#### (1)对黄瓜丝核菌枯萎病的生物控制活性

25 进行生物控制测试以检测 WYE20 作为抑制丝核菌枯萎黄瓜的生物控制剂的效力。

30 通过将种子浸于 20 毫升的实施例 VI 制备的 WYE20(1.2×10<sup>7</sup>cfu/毫升)中 3 小时并且然后播种于苗钵中，以此对黄瓜种子进行处理。将种子分别在无菌蒸馏水和递送介质中浸 3 小时，将所得的各个种子作



为对照。

5 用 Hortus(英国)作为盆栽混合物。将盆栽混合物在 121℃ 高压蒸汽灭菌 60 分钟，并且在 25℃ 放置 12 小时，然后再次在 121℃ 高压蒸汽灭菌 60 分钟。将该高压蒸汽灭菌循环重复 3 次。

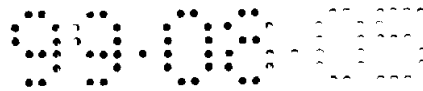
10 将茄属丝核菌培养于 PDB(马铃薯葡萄糖肉汤; Difco)在 25℃ 培养 14 天，收获，并且与经高压蒸汽灭菌的盆栽混合物混合以获得约 60% 致病机会。将黄瓜种子用生物控制剂处理，将各个对照种子播种于含有盆栽混合物的苗钵中，该盆栽混合物中已经人工接种了茄属丝核菌。

15 将废弃的纸杯(直径 9 厘米)用作为播种苗钵。在每个测试制备每个杯含有 3 个种子的 6 个纸杯。将纸杯置于随机设计的温室的试验区中。湿度保持在 40% 和 60% 并且如果必要使用更多的水。温度保持在 25℃ 和 30℃ 的日光。

有周期地记录枯萎出现和发病率的结果。最后的结果显示于表 XI。

表 XI

处理	种植的黄 瓜 种子数	发芽的黄瓜种子数	健康植株	鲜重(克)/
		(%)	(%)	地上部分
		7 天	14 天	18 天
没有病源体 + 对照	18	18b*(100)	18b*(100)	2.61b*
茄属丝核菌 + 对照	18	7a(39)	7a(39)	1.73a
茄属丝核菌 + 液体 D.M. 处理	18	8a(44)	8a(44)	1.75a
茄属丝核菌 + WYE20 处理	18	18b(100)	18b(100)	2.51b



\*跟随相同字母的栏中的平均值在  $P=0.05$  水平的差异不十分显著。D.M.: 递送介质。

5 如表 XI 所示, 用作为生物控制剂的递送介质中的 WYE20 处理的黄瓜种子没有显示黄瓜的丝核菌枯萎病。另外, 由对照种子生长的黄瓜植物显示由茄属丝核菌导致的严重的生长延迟, 而由经处理的种子长出的植物没有这种现象。该结果显示 WYE20 可有效地控制茄属丝核菌和加强植物生长。

10 (2)对黄瓜霉粉病的生物控制活性

进行生物控制测试以检测实施例 VI 制备的 WYE324( $1.2 \times 10^7$ cfu/毫升)作为抑制苗钵中的黄瓜植株的霉粉病的生物控制剂的效力。

15 将废弃的纸杯(直径 9 厘米)用作为播种苗钵。在含有盆栽混合物的每个杯中播种 1 个黄瓜种子。所述盆栽混合物由农田土壤和 Hortus(英国)(4:1; v/v 比例)组成。将纸杯置于温室。如果必要使用更多的水。温度保持在  $25^{\circ}\text{C}$  和  $30^{\circ}\text{C}$  的日光。

20 在测试开始时将 20 毫升的含有 WYE324 的生物控制剂喷洒到一株黄瓜植株(14 天龄)上并且在 1 星期之后再喷洒 1 次。将用相同量的水喷洒的植物作为对照。在该测试中处理组和对照组各有 3 个黄瓜植株(每杯一个黄瓜植株)。

25 为了天然诱导由苍耳单丝壳菌引起的霜霉病, 使用每组 3 个纸杯和三个发病的黄瓜植物(每纸杯一个植物)并且随机排布置于温室中。将湿度保持在 70%到 90%之间。如果必要使用更多的水。温室温度保持在  $25^{\circ}\text{C}$  和  $30^{\circ}\text{C}$  之间。调查黄瓜霜霉病发生的机会。试验持续 2 星期并且重复该测试。结果显示于表 XII。



表 XII

处理	黄瓜霜霉病发病机会	
	试验 1	试验 2
对照	+	+
WYE324 处理的	-	-

5 如表 XII 所示，在用含有 WYE324 的生物控制剂喷洒的黄瓜植物中没有检测到霜霉病，而在对照植物中观察到疾病。结果显示 WYE324 可有效地控制黄瓜的霜霉病。

(3)链霉菌 WYE20 或 WYE324 对高尔夫球场绿色爬行牧草的丝核菌棕色斑的生物控制活性

10 进行生物控制测试以检测链霉菌 WYE20 和 WYE324 对高尔夫球场绿色爬行牧草的丝核菌棕色斑的抑制效力。

15 将上述“材料和方法”部分描述的液体培养基产生的链霉菌 WYE20 和 WYE324 用于该测试。将链霉菌 WYE20 或 WYE324 的细胞数调整到  $2.0 \times 10^5$  cfu/毫升。在用 WYE20 或 WYE324 或对照处理的各个试验块进行该测试。在一个高尔夫球场制备各含四个试验块(1.5 厘米  $\times$  1.5 厘米)的处理组和对照组。以随机设计的试验块进行该测试。从 1996 年 6 月 25 日到 1996 年 8 月 23 日在试验块上每隔 7-10 天喷洒 WYE20 或 WYE324 菌株。每次喷洒每个试验块使用 2.5 升的 WYE20 20 或 WYE324；而给对照试验块提供相同量的水。在试验期间没有使用化学杀真菌剂。定期地记录丝核菌棕色斑的出现并且显示于表 XIII(位置 1)和 XIV(位置 2)。

25 如表 XIII(位置 1)和 XIV(位置 2)所示，在用 WYE20 或 WYE324 菌株处理的试验块中丝核菌棕色斑急剧降低。结果显示 WYE20 和 WYE324 可有效地抑制高尔夫球场绿色爬行牧草的丝核菌棕色斑。



表 XIII(位置 1)

处理	丝核菌棕色斑出现(%)		
	7/25/96	8/6/96	8/23/96
对照	10.18a*	14.6a*	59a*
WYE20 处理的	3.38b	9.2b	24b
WYE324 处理的	0.00c	5.2c	24b

\*跟随相同字母的栏中的平均值在 P=0.05 水平时没有显著差异。

5

表 XIV(位置 2)

处理	丝核菌棕色斑出现(%)		
	7/25/96	8/6/96	8/23/96
对照	5.6a*	9.3a*	28.3a*
WYE20 处理的	0.0b	0.8b	5.3b
WYE324 处理的	0.0b	0.0b	0.7c

\*跟随相同字母的栏中的平均值在 P=0.05 水平时没有显著差异。

10

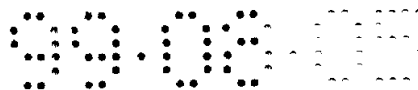
(4)对走道草坪(*Zoysia japonica*)的丝核菌大斑块的生物控制活性。

进行生物控制测试以检测在实施例 VI 制备的包括链霉菌 WYE20 或菌株 IBT678 的生物控制剂对走道草坪(*Zoysia japonica*)的丝核菌大斑的抑制效力。将生物控制剂中的链霉菌 WYE20 或菌株 IBT678 的细胞数调整到  $2.0 \times 10^6$ cfu/毫升。

15

将茄属丝核菌 AG2-2 感染的土壤接种到走道草坪(*Zoysia japonica*)上并然后移植到苗钵(直径 25 厘米)中。分别在 1996 年和 1997 年每隔 1 星期用 200 毫升的生物控制剂处理一次,共处理 2 星期到 3 星期。用相同量的水处理的苗钵作为对照。每组使用三个苗钵并且置于温室中,按随机块排布。为了天然诱导疾病,从 1996 年的 9 月初到 10 月

20



初以及从 1997 年 3 月初到 6 月末分别将苗钵置于高尔夫球场的走道附近。调查丝核菌大斑的出现，在用含有 WYE20 的生物控制剂处理的苗钵没有检测到大斑；而在对照和 IBT678 处理的苗钵中观察到疾病，如表 XV 所示。

5

表 XV

处理	Zoysia japonica 大斑出现	
	1996 秋季	1997 春季
病源体 + 对照	+	+
病源体 + WYE20 处理的	-	-
病源体 + WYE324 处理的	没有测试	+

如表 XV 所示，结果显示 WYE20 有效地控制走道草坪(*Zoysia japonica*)的丝核菌大斑。

10

#### (5)对胡椒植物疫霉枯萎病的生物控制

进行生物控制测试以检测实施例 VI 的含有链霉菌 WYE20 或 WYE324 的生物控制剂对苗钵中胡椒幼苗的幼苗枯萎病的抑制效力。

15

将胡椒种子浸于无菌水中 2 天并且通过用实施例 VI 制备的生物控制剂 WYE20 或 WYE324 将胡椒种子浸泡 18 小时(处理组)而对其进行处理。将链霉菌 WYE20 或 WYE324 细胞数分别调整到  $1.2 \times 10^7$ cfu/毫升和  $1.7 \times 10^7$ cfu/毫升。将胡椒种子浸于无菌水中 2 天并且然后浸泡 18 小时。将它们作为对照组。另一方面，将浸于无菌水中 2 天的胡椒种子再置于实施例 VI 的递送介质中 18 小时。将它们用作为其它的对照组。

20

如在上述用黄瓜进行的测试所述，将辣椒幼苗培养于 PDB(马铃薯葡萄糖肉汤)在 25℃ 培养 14-21 天，收获，并且接种到无菌的盆栽混合物(Hortus, 英国)中以获得感染的盆栽混合物，其对于对照组胡椒幼苗

25



疫霉枯萎病有约 80%疾病机会。所获得的用辣椒疫霉感染的盆栽混合物用于测定递送介质中链霉菌 WYE20 或 WYE324 对该测试中辣椒疫霉的幼苗枯萎病的抑制效力

5 将废弃的纸杯(直径 9 厘米)用作为幼苗苗钵。在每个测试中制备每个杯含有 3 个种子的 14 个纸杯。在温室中以 25℃和 32℃之间的日光温度进行试验。在该温室中, 苗钵置于温室中, 按随机排布。湿度保持在 80%并且如果必要使用更多的水喷洒苗钵的顶部。

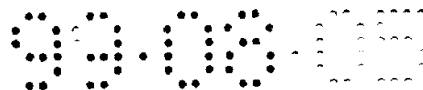
10 记录辣椒疫霉枯萎病的发生和发病率, 结果显示于表 XVI。

表 XVI

处理	种植的胡椒种子数	发芽的胡椒种子数 (发芽%)	显示疫霉枯萎病的胡椒幼苗(发病%)	
			14 天	18 天
没有病源体 +对照	42	37(88a*)	0(0c*)	0(0c*)
辣椒疫霉 +对照	42	34(81a)	28(82a)	33(97a)
辣椒疫霉+液体 D.M.处理的	42	35(83a)	29(83a)	34(97a)
辣椒疫霉+ WYE20 处理的	42	34(81a)	12(35b)	26(76b)
辣椒疫霉+ WYE324 处理的	42	36(86a)	22(61c)	28(78b)

\*跟随相同字母的栏中的平均值在 P=0.05 水平时没有显著差异。

15 如表 XVI 所示, 经 WYE20 或 WYE324 菌株处理的种子长出的胡椒植物的疫霉枯萎病显著降低。结果显示本发明的 WYE20 和 WYE324 有效地抑制胡椒植物的疫霉枯萎病。



(6)利用胡椒幼苗测定加强植物生长的测试

进行幼苗控制测试以测定本发明的含有链霉菌 WYE20 和 WYE324 的生物控制剂对加强胡椒幼苗的生长的效力。

5

将胡椒种子浸于无菌水中 2 天并且用实施例 V(D.M.22)制备的生物控制剂中的 WYE20 或 WYE324 处理(每 4 克生物控制剂处理 1000 个种子)。在种子处理之前分别将链霉菌 WYE20 和 WYE324 细胞数分别调整到  $1.2 \times 10^7$ cfu/毫升和  $1.7 \times 10^7$ cfu/毫升。将胡椒种子浸于无菌水中并且用作为对照组(对照 1)。同时, 将胡椒种子用不含有 WYE20 或 WYE324 的递送介质处理(每 4 克 D.M.22 处理 1000 个种子)并且将它们用作为其它的对照组(对照 2)。

10

如在上述用黄瓜进行的测试所述相同的方法将辣椒种子种植。

15

将废弃的纸杯(直径 9 厘米)用作为幼苗苗钵。在每个测试制备每个杯含有 1 个种子的 121 个纸杯。在温室中以 25°C 和 32°C 之间的日光温度进行试验。在该温室中, 按随机块安排将苗钵置于温室。湿度保持在 40%到 60%的范围内, 并且如果必要使用的水喷洒苗钵的顶部。将 15 毫升的在“材料和方法”部分获得的链霉菌 WYE20 或 WYE324 细胞培养物肉汤接种到在栽培 4 星期之后用生物控制剂处理的幼苗苗钵中。给对照组相同量的水。试验持续 9 星期并且结果显示于表 XVII。

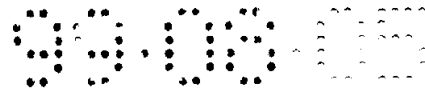
20

表 XVII

处理	胡椒幼苗	植物高度(厘米)(平均)
对照 1	121	23.7a*
对照 2	121	24.5a
WYE20 处理的	121	27.4b
WYE324 处理的	121	28.6b,c

25

\*跟随相同字母的栏中的平均值在  $P=0.05$  水平时没有显著差异。



如表 XVII 所示，与从对照种子繁殖的那些植物相比，用 WYE20 或 WYE324 处理的胡椒种子生长的植株其生长显著加强。这表明本发明的 WYE20 或 WYE324 可高度有效地加强胡椒植物的生长。

5

(7)利用胡椒幼苗在农田进行生物控制测试

进行生物控制测试以测定本发明的生物控制剂对农田控制疫霉枯萎病和加强植物生长的效力。

10 将在无菌水中浸泡 2 天的胡椒种子浸泡于由实施例 VI 制备的生物控制剂中 3 小时。将种子用实施例 V 制备的生物控制剂(D.M.22)处理(每 4 克 1000 和种子)。在处理种子之前分别将链霉菌 WYE20 和 WYE324 细胞数分别调整到  $1.2 \times 10^7$ cfu/毫升和  $1.7 \times 10^7$ cfu/毫升。

15 再将胡椒种子浸于无菌水中 2 天和 3 小时。由此将胡椒种子用不含有 WYE20 或 WYE324 的相同递送介质处理并且将它们用作为对照组。将各个种子种植于苗床。按需喷洒水并且将温度保持在 20°C 和 35 °C 之间。当幼苗生长到 1.5-2.0 厘米高度时，将胡椒幼苗移植到由 25 幼苗穴(5 厘米×5 厘米，6 厘米深)组成的幼苗盘中，所述幼苗穴含有  
20 精细沙子的盆栽土壤和递送介质中的 WYE20 或 WYE324 的混合物(每个幼苗穴 0.1 克)。将对照胡椒幼苗移植到含有相同量的精细沙子的盆栽土壤和相同量的仅为递送介质的幼苗穴。将这些幼苗苗钵置于温度为 18°C-35°C 的温室，如果必要供应更多的水。在该温室中，将苗钵按随机试验块安排。在温室生长 11 星期之后，将各个植株移植到农田。  
25 在移植之前 1 星期，向每个处理组的幼苗穴加入 10 毫升的 WYE20 或 WYE324 的培养物肉汤( $1.2-1.7 \times 10^5$ cfu/毫升)。给对照幼苗苗钵提供相同量的水。

30 定期地观察移植的胡椒的发病率和生长情况，记录平均值显示于表 XVIII(农田 I)和 XIX(农田 2)。

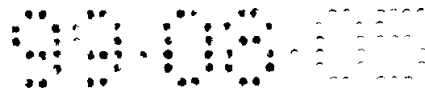


表 XVIII(农田 1)

处理	移植的胡椒植物的数量	在移植 62 天之后植株高度(厘米)	疫霉枯萎病的发病率(%)	
			移植之后 62 天	移植之后 101 天
对照	1.340	78.5a*	28.4a*	98.6a*
WYE20 处理	1.340	86.0b	23.5b	89.2b
WYE324 处理	1.340	90.5c	8.7c	76.1c

\*跟随相同字母的栏中的平均值在 P=0.05 水平时没有显著差异。

5

表 XIX(农田 2)

处理	移植的胡椒植株的数量	疫霉枯萎病的发病率(%)	
		移植之后 82 天	移植之后 101 天
对照	860	26a*	42.4a*
WYE20 处理的	860	0b	7.6b
WYE324 处理	860	0c	2.0c

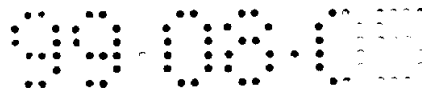
\*跟随相同字母的栏中的平均值在 P=0.05 水平时没有显著差异。

10

如表 XVIII 和 XIX 所示, 与从对照种子繁殖的那些植物相比, 用 WYE20 或 WYE324 处理的胡椒种子生长的植株的生长显著加强和疫霉枯萎病降低。这表明本发明的 WYE20 或 WYE324 可高度有效地控制农田疫霉枯萎病和加强胡椒植物的生长。

15

已经提供了本发明的实施方案的实施例和优选的实施方案, 对本领域内技术人员来说可以进行不背离本发明精神和不超越其更宽的方面的修饰和改变是不言而喻的。因此, 许多变化, 修饰和实施方案被认为在本发明的真实的精神和范围内。



### 参考文献

ATCC 细菌和噬菌体目录, 第 17 版, 1989, 美国典型培养物保藏中心, Rockville, MD。

5

Crawford, D.L., J.M. Lynch, J.M. Whippsw, 和 M.A. Ousley, 1993, 真菌根部病源体的放线菌拮抗剂的分离和鉴定, 环境应用微生物学, 59:3899-3905。

10

Hsu, S.C. 和 J.L. Lockwood 1975, 粉末状的几丁质琼脂作为选择性培养基选择水和土壤中的放线菌, 应用微生物学, 第 422-426 页。

Kannwisher, M.E. 和 Mitchell, D.J. 1978, 杀真菌剂对马铃薯黑茎病流行的影响, 植物病理学 68:1760-1765

15

Locci, R. 1989, 伯杰氏手册系统细菌学, 链霉菌和相关的属, Williams 和 Wilkens 出版社, Baltimore, Md 4:2451-2492。

20

Pridham, T.G. 和 D. Gottlieb 1948, 由放线菌目利用含碳化合物来帮助种的鉴定, 细菌学杂志 56:107-114。

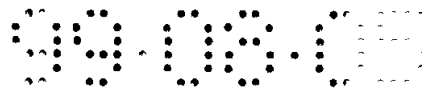
Reddi, G.S. 和 A.S. Rao 1971, 土壤放线菌对一些土壤滋生的植物病源体真菌的拮抗性, 印度植物病理学 24:649-657。

25

Stanghellini, M.E. 和 J.G. Hancock 1970, 从土壤分离终极腐霉的定量方法, 植物病理学 60:551-552。

Stasz, T.E., G.E. Harman 和 G.A. Marx. 1980, 由终极腐霉感染抗性和敏感性繁殖的种子的时间和位置, 植物病理学, 70:730-733。

30



Suh,H.W. 1992, 由 *Pisolithus tinctorius* SMF 和链霉菌 WYEC108 产生的抗真菌化合物和其在生物控制中的作用, 美国爱达荷州立大学博士论文, Moscow, 爱达荷州, 美国。

5 William 等人, 1983, 可能用于鉴定链霉菌的基质, 普通微生物学杂志, 129:1815-1830。

William 等人, 1983, 链霉菌和相关属的系统分类, 普通微生物学杂志, 129:1743-1813。

10

#### 所引用的美国专利文献

4534965	8/1985	Brown 等人
4595589	6/1986	Tahvonen, Risto
4668512	5/1987	Lewis 等人
15 5391493	2/1995	Signorini 等人
5403584	5/1995	Crawford 等人

#### 外国专利文献

2524486	10/1983	法国
20 WO93/18135	9/1993	世界知识产权组织

#### 其它出版物

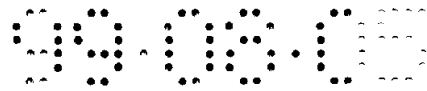
Bric 等人, “由固定于硝酸纤维素膜上的细菌产生吲哚乙酸的快速原位测试”, 环境应用微生物学, 57:535-538(1991)。

25

Bruhlmann 等人, “来自于放线菌的果胶裂解酶用于 ramie bast 纤维的脱胶”, 环境应用微生物学 60:2107-2112(1994)。

30

M.L.Lahdenpera, “用链霉菌制剂控制石竹上的镰胞”, 园艺学 216:85-92(1987)。



Ames, “对用几丁质分解的放线菌接种应答的洋葱的 Mycorrhiza 发育”, 新的植物病理学, 112:423-427(1989)。

5 Bolton, “具有含有拮抗微生物的土壤的改良无土生长混合物对由禾生腐霉引起的根部腐烂和天竺葵黑腿的作用”, 加拿大植物科学杂志 58:379-383(1978)。

10 Bolton, “通过用绿色木霉和链霉菌对无土培养的一品红的瓜果腐霉的控制”, 加拿大植物病理学杂志 2:93-95(1980)。

Broadbent 等人, 在澳大利亚土壤中细菌和放线菌对真菌根部病原体的拮抗性, 澳大利亚生物科学杂志, 24:925-944(1971)。

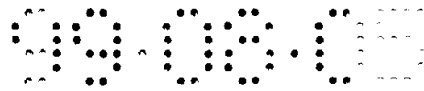
15 DeFrank 和 Putnam, 鉴定土壤滋生的可以产生除草剂化合物的放线菌的筛选程序, 杂草科学 33:271-274(1985)。

20 Filnow 和 Lockwood, 几种放线菌和 *Hypochoytrium catenoides* 真菌作为大豆疫霉根部腐烂的生物控制剂的评价, 植物病害 69:1033-1036(1985)。

Fravel 等人, 将潜在的生物控制剂包封于海藻酸-粘土基质, 植物病理学 75:774-777(1985)。

25 Hussain 等人, 太阳花和绿豆的莱豆大壳球孢炭腐烂的生物控制, 植物病理学杂志 130:157-160(1990)。

30 Kobayashi 等人, Pironetin, 一种来自于链霉菌的新的植物生长调节剂, 摘要 S2-3, 第 34 页, BMP 日本, 95 年 4 月 23-26 日, Osio, Kanagawa, 日本(1995)。



Lahdenpera 等人, “基于链霉菌细菌的新的生物杀真菌剂 Mycostop-A”, 1991 年之前公开。

5 Leong, Siderophores:它们的生物化学和在生物控制植物的病源体真菌方面的作用, 植物病理学年评, 24:187-209(1986)。

10 Liljeroth 等人, 两种小麦品系的根际的同化转座和随后在两种土壤氮浓度由根际微生物的利用, 土壤生物学和生物化学 22:1015-1021 (1990)。

Marcos 等人, 混合肥料对番茄的根际微生物菌群的作用和对促进植物生长的根际细菌(PGPR)的发病率的影响, 环境应用微生物学 61:194-199(1995)。

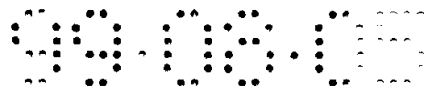
15 Merriman 等人, 芽孢杆菌和链霉菌应用到种子的作用, E. Bruehl(编辑), 土壤滋生的植物病源体的生物学和控制, pp.130-133(1977)。

20 Meyer 和 Linderman, 由 *Glomus fasciculatum* 形成的菌根对根际或根面细菌和放线菌菌群的选择性影响, 土壤生物学和生物化学 18:191-196(1986)。

25 Miller 等人, 在玉米, 小麦和栽培牧草根际的细菌群体的变化和分解, 加拿大微生物学杂志 35:656-660(1989)。

Miller 等人, 在春小麦生长期间根际和根面的荧光假单孢菌和放线菌群体的变化, 加拿大微生物学杂志 36:254-258(1989)。

30 Miller 等人, 在小麦根面和根际的放线菌和荧光假单孢菌的动



力学 ， Symbiosis 9:389-391(1982)。

Panosyan 等人， 放线菌的生理学活性物质的特性和其代谢产物对植物生长的影响 ， 植物和微生物的关系， pp. 241-245(1965)。

5

Scrivansan 等人， 放线菌的生理学和营养学方面 :综述， 世界微生物学和生物技术杂志 7:171-184(1991)。

10

Singh 和 Mehrota ， 通过用芽孢杆菌和链霉菌包被种子 Rhizoctonia bataticola 的生物控制对 gram 的影响和它们对植物生长的影响 ， 植物和土壤 56:475-483(1980)。

Stevenson ， 通过直接观察技术证明的土壤放线菌的抗生素活性 ， 普通微生物学 15:372-380(1956)。

15

Sutherland 和 Papavizas ， 对超寄生物卵孢子控制胡椒疫霉冠的腐烂的评价 ， 植物病理学杂志 131:33-39(1991)。

20

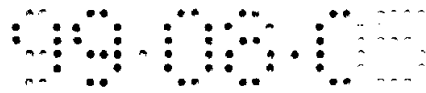
Tahvonen ， 从泥炭分离的链霉菌用于生物控制泥炭培养物中土壤和种子滋生的疾病的初步试验 ， 芬兰科学农业协会杂志 54:357-369(1982)。

25

Tahvonen ， “ Mycostop ettbiologiski Bekämpningsmodel mot svampsjukdomar ” 。 (控制真菌病害的生物制剂， Mycostop ) ， Vaxtskyddsnotiser49:86-90， 仅有英语概述(1985)。

30

Tahvonen 和 Avikainen ， 用链霉菌的粉末制剂生物控制土壤滋生的十字花科植物的甘蓝链格孢 ， 芬兰科学农业协会杂志 59:199-207(1987)。



Tu, 白色链霉菌在破坏性真菌上寄生物 *nectria inventa* 超寄生作用, 植物病理学杂志 117:71-76(1986)。

5 Turhan, 用于生物控制土壤滋生的植物病源体的赭核链霉菌新种类, 植物疾病和保护杂志 88:422-434(1981)。

Turhan 和 Turhan, 与 *trichoderma harzianum* Rifai 相比, 新拮抗剂对终极腐霉 *Trow* 和茄属丝核菌 *Kuhn* 引起的胡椒枯萎病的抑制, 植物病理学杂志 126:175-182(1989)。

10 Zuberer 等人, 包埋于 houston 黑土的 *Phymatotrichum omnivorum* 的菌核相关的细菌和放线菌群体, 植物和土壤 112:69-76(1988)。

15 Warren 等人, 在被浸没的培养物中的三种放线菌的流变学和系统学, 生物技术和生物工程 45:80-85(1995)。

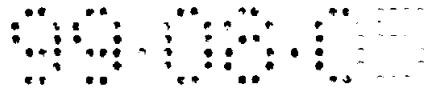
Shahab 等人, 在固体培养基上生长的蓝色链霉菌的细胞生理学和抗生素的生产, 生物技术通讯 16:1015-1020(1994)。

20 Fukuchi 等人, *Rotihibins*:来自于禾生链霉菌的新的植物生长调节剂, 抗生素杂志 48:1004-1010(1995)。

Liu 等人, 用拮抗生物疮痂病链霉菌生物控制大田的马铃薯疮痂病, 植物病理学 85:827-831(1995)。

25 Bowers 等人, 通过分析细胞脂肪酸测定链霉菌的抑制疾病的菌株对土壤中天然的链霉菌共同体的影响, 加拿大微生物学杂志 42:27-37(1996)。

30 Bayer 和 Diekmann, 链霉菌 ATCC11238 的几丁质酶系统和其



对真菌细胞壁降解的显著性 ， 应用微生物学和生物技术 23:140-146 (1985)。

5 Lorito 等人， 真菌细胞壁降解酶和不同的抗真菌化合物的协同作用加强了对孢子繁殖的抑制 ， 微生物学 140:623-629(1994)。

Mahadevan 和 Crawford, 抗真菌生物控制剂利迪链霉菌 WYEC108 的几丁质酶的特性 ， 酶促微生物学技术(1996)， 在出版中。

10 Mohamed, 在植物根际的链霉菌的生理学和拮抗剂活性 ， 埃及植物生理学杂志 14:121-128(1982)。

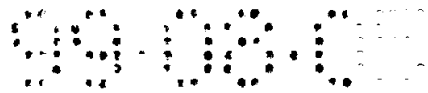
15 Sardi 等人， 从表面无菌的根部分离内生植物的链霉菌菌株 ， 环境应用微生物学 58:2961-2963(1992)。

20 Sneh 等人， 由卵菌纲， 壶菌纲， 丝孢菌纲， 放线菌纲和细菌对土壤中大雄疫霉 *sojae* 变种， 仙人掌疫霉， 腐霉和根腐丝囊霉的卵孢子的寄生作用 ， 植物病理学 67:622-628(1977)。

Yuan 和 Crawford, 作为抗真菌根部和种子腐烂的潜在的生物控制剂的利迪链霉菌 WYEC108 的特性 ， 环境应用微生物学 61:3119-3128(1995)。

25 Fravel, 生物控制植物疾病中的抗生作用 ， 植物病理学年评 26:75-91(1988)。

30 Evalier , 农业和森林的放线菌纲 p.327-358 。 由 M. Goodfellow, S.T. Williams 和 M.Mordarski 编辑， 放线菌生物技术学术出版社,纽约(1989)。



Merriman 等人， 用茄属丝核菌接种到种子对小麦生长的影响 ， 澳大利亚农业研究杂志 25:213-218(1974)。

5 Merriman 等人， 用枯草芽孢杆菌和灰色链霉菌接种种子对谷物和胡萝卜生长的影响 ， 澳大利亚农业研究杂志 25:219-226(1974)。

10 Sivasthamparam 和 Parker ， 细菌和放线菌分离株对 *Gaeumannomyces graminis* 变种 *tritici* 和小麦全蚀病的作用 ， 澳大利亚植物学杂志 26:773-782(1978)。

Suslow, 植物生长时根部形成菌落的细菌的作用， 植物病原真菌原核生物 ， M.S.Mount, G. H. Lacy 编辑， 1:187-223。 伦敦， 学术出版社(1982)。

15 David 和 Thomashow, 将有益的微生物导入根际的现代挑战 ， 第 1-18 页(198)。

20 Jones 和 Samac, 用链霉菌的抑制疾病的菌株生物控制引起苜蓿幼苗枯萎病的真菌 ， 生物控制 7:196-204(1996)。

Lee 和 Rho, 微黄色链霉菌 SMF301 的表面和包埋培养物形成的孢子的特性 ， 普通微生物学杂志 139:3131-3137(1993)。