



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119242516 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 03

(21) 申请号 202411541186.1

A01P 21/00 (2006.01)

(22) 申请日 2024.10.31

C05F 11/08 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO.29873 2024.02.07

(71) 申请人 广西民族大学

地址 530006 广西壮族自治区南宁市西乡塘区大学东路188号

(72) 发明人 周燕 姜明国 谢晓莹

(74) 专利代理机构 北京盛询知识产权代理有限公司 11901

专利代理师 张彦昊

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/20 (2020.01)

A01P 5/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

一株粪稳杆菌GXUN3754及其在防治象耳豆根结线虫上的应用

(57) 摘要

本发明公开了一株粪稳杆菌GXUN3754及其在防治象耳豆根结线虫上的应用,属于微生物应用技术领域。本发明提供的粪稳杆菌(*Empedobacter stercoris*)GXUN3754于2024年2月27日保藏于中国普通微生物保藏管理中心,保藏编号为CGMCC No.29873。实验表明,粪稳杆菌GXUN3754具有产嗜铁素、产NH₃能力、产蛋白酶和植酸酶能力,粪稳杆菌GXUN3754菌液和挥发性物质具有促进植物生长的作用,同时具有杀灭象耳豆根结线虫的能力。因此,粪稳杆菌GXUN3754对于研究、开发新的高效杀象耳豆根结线虫生物制剂和植物生长促进剂具有非常重要的意义。



1. 一株粪稳杆菌 (*Empedobacter stercoris*) GXUN3754, 其特征在于, 所述粪稳杆菌 GXUN3754 的保藏编号为 CGMCC No. 29873, 已于 2024 年 2 月 27 日保藏于中国普通微生物保藏管理中心, 保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所。

2. 含有权利要求 1 所述的粪稳杆菌 GXUN3754 的菌剂, 其特征在于, 所述菌剂的制备方法包括以下步骤:

将所述粪稳杆菌 GXUN3754 以接种至 LB 培养基, 振荡培养至 OD_{600nm} 为 1.0, 即得。

3. 一种权利要求 1 所述的粪稳杆菌 GXUN3754 的无菌发酵滤液, 其特征在于, 所述无菌发酵滤液的制备方法包括以下步骤:

将所述粪稳杆菌 GXUN3754 接种至 LB 培养基, 振荡培养至菌液 OD_{600nm} 为 1.0, 离心, 取上清, 使用 $0.22\mu m$ 过滤膜过滤, 即得。

4. 如权利要求 1 所述的粪稳杆菌 GXUN3754 或权利要求 2 所述的菌剂或权利要求 3 所述的无菌发酵滤液在制备防治象耳豆根结线虫的生物制剂中的应用。

5. 一种防治象耳豆根结线虫的生物制剂, 其特征在于, 有效成分包括权利要求 1 所述的粪稳杆菌 GXUN3754 或权利要求 2 所述的菌剂或权利要求 3 所述的无菌发酵滤液。

6. 如权利要求 1 所述的粪稳杆菌 GXUN3754 或权利要求 2 所述的菌剂或权利要求 3 所述的无菌发酵滤液或权利要求 5 所述的生物制剂在防治象耳豆根结线虫中的应用。

7. 一种防治象耳豆根结线虫的方法, 其特征在于, 包括向植物根际土壤施加权利要求 1 所述的粪稳杆菌 GXUN3754 或权利要求 2 所述的菌剂或权利要求 3 所述的无菌发酵滤液或权利要求 5 所述的生物制剂的步骤。

8. 如权利要求 1 所述的粪稳杆菌 GXUN3754 或权利要求 2 所述的菌剂在以下任一项中的应用:

(1) 在促进植物生长中的应用;

(2) 在制备促进植物生长的微生物制剂中的应用。

9. 一种促进植物生长的微生物制剂, 其特征在于, 有效成分包括权利要求 1 所述的粪稳杆菌 GXUN3754 或权利要求 2 所述的菌剂。

10. 一种包含权利要求 9 所述的微生物制剂的菌肥, 其特征在于, 还包括农业上常用的有机肥和/或化肥。

一株粪稳杆菌GXUN3754及其在防治象耳豆根结线虫上的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物应用技术领域,特别是涉及一株粪稳杆菌GXUN3754及其在防治象耳豆根结线虫上的应用。

背景技术

[0002] 象耳豆根结线虫(*Meloidogyne enterolobii*)最早发现与1983年,Yang等人在中国海南地区的象耳豆(*Enterolobium cyclocarpum*)树的根结上发现一种根结线虫,依据形态特征鉴定为象耳豆根结线虫新种。1988年,Rammah在茄子根结上发现一种根结线虫并将其命名为玛雅根结线虫(*Meloidogyne mayaguensis*)。通过对这两种线虫的酯酶表型、mtDNA CO II 和1rRNA等分析,以及模式种标本玻片分析和描述,认为玛雅根结线虫应为象耳豆根结线虫的同物异名种。

[0003] 象耳豆根结线虫是全世界热带及亚热带地区重要的病原线虫,具有强致病性和繁殖潜力,寄主分布范围广泛,主要有豆科、葫芦科、茄科等,同时它还可以寄生在携带抗性基因的辣椒(N基因)、番茄(Mi-1基因)等作物上进行繁殖,往往造成蔬菜作物或果树产量的严重损失。目前,防治象耳豆根结线虫主要依赖于化学药物,化学方法高效便捷,具有良好的防效。但同时,化学农药的过度使用,容易造成环境的污染,农药的堆积会破坏土壤生态的平衡甚至危害人类健康,推行绿色环保的防治措施迫在眉睫。

[0004] 近些年来,生物防治因为其绿色环保、节约成本、无毒无害等优点,逐渐成为当下的研究重点。生防菌株能够从植物根际、土壤和动植物体内获得,它们通常具有溶解无机磷、有机磷和固氮等功能,同时分泌的胞外酶还能够通过破坏真菌细胞壁来抵御病原真菌的侵染。2015年,Thorsten于沼气厂的样本中首次分离得到一株粪稳杆菌(*Empedobacter stercoris*) SCVM0123,并确定其分类地位。2020年,Cheng等人从6个畜牧场的粪便样本中筛选到一株具有Tet变体基因的菌株粪稳杆菌ES183,菌株ES183具有一个新的替加环素抗性基因Tet(X14),并通过结构模型预测Tet(X14)的同源性关系。目前,有关粪稳杆菌的报道仍旧较少,且并没有针对其生防功能进行深入研究。然而,与粪稳杆菌同属的短稳杆菌(*Empedobacter brevis*)却是近些年应用较为广泛的微生物农药。短稳杆菌可以通过昆虫取食进入虫体并大量繁殖,产生蛋白质毒素来干扰虫体的新陈代谢,从而杀死昆虫,通常应用在水稻卷叶螟、斜纹夜蛾、茶尺蠖、花椰菜虫、玛卡小菜蛾等多种生物害虫的防治上。

[0005] 目前,国内对于生防菌对象耳豆根结线虫的有关防治报道鲜少,且未见有关粪稳杆菌应用于生物防治上的研究。由于生防菌功能的多样性和其绿色无污染的特性,符合绿色新农业可持续发展道路,其制成的功能菌剂能够帮助作物抵制病虫害和提高作物产量。因此,筛选、研究对象耳豆根结线虫具有毒杀活性的生防菌具有良好的研究意义和广阔的农业应用前景。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一株粪稳杆菌GXUN3754及其在防治象耳豆根结线虫上的应

用,以解决上述现有技术存在的问题,本发明提供的粪稳杆菌GXUN3754及其菌剂可以高效杀灭象耳豆根结线虫且对植物具有促生作用。

[0007] 为实现上述目的,本发明提供了如下方案:

[0008] 本发明提供了一株粪稳杆菌(*Empedobacter stercoris*)GXUN3754,所述粪稳杆菌GXUN3754于2024年2月27日保藏于中国普通微生物保藏管理中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.29873。

[0009] 本发明还提供了含有所述的粪稳杆菌GXUN3754的菌剂,所述菌剂的制备方法包括以下步骤:

[0010] 将所述粪稳杆菌GXUN3754以接种至LB培养基,振荡培养至OD_{600nm}为1.0,即得。

[0011] 本发明还提供了一种根据所述的粪稳杆菌GXUN3754制备的无菌发酵滤液,所述无菌发酵滤液的制备方法包括以下步骤:

[0012] 将所述粪稳杆菌GXUN3754接种至LB培养基,振荡培养至菌液OD_{600nm}为1.0,离心,取上清,使用0.22μm过滤膜过滤,即得。

[0013] 本发明还提供了所述的粪稳杆菌GXUN3754或所述的菌剂或所述的无菌发酵滤液在制备防治象耳豆根结线虫的生物制剂中的应用。

[0014] 本发明还提供了一种防治象耳豆根结线虫的生物制剂,有效成分包括所述的粪稳杆菌GXUN3754或所述的菌剂或所述的无菌发酵滤液。

[0015] 本发明还提供了所述的粪稳杆菌GXUN3754或所述的菌剂或所述的无菌发酵滤液或所述的生物制剂在防治象耳豆根结线虫中的应用。

[0016] 本发明还提供了一种防治象耳豆根结线虫的方法,包括向植物根际土壤施加所述的粪稳杆菌GXUN3754或所述的菌剂或所述的无菌发酵滤液或所述的生物制剂的步骤。

[0017] 本发明还提供了所述的粪稳杆菌GXUN3754或所述的菌剂在以下任一项中的应用:

[0018] (1) 在促进植物生长中的应用;

[0019] (2) 在制备促进植物生长的微生物制剂中的应用。

[0020] 本发明还提供了一种促进植物生长的微生物制剂,有效成分包括所述的粪稳杆菌GXUN3754或所述的菌剂。

[0021] 本发明还提供了一种包含所述的微生物制剂的菌肥,还包括农业上常用的有机肥和/或化肥。

[0022] 本发明公开了以下技术效果:

[0023] 本发明提供了一株粪稳杆菌GXUN3754,其挥发性气体物质能够用于高效杀灭象耳豆根结线虫,且对拟南芥具有良好的促生作用。另外,所述粪稳杆菌GXUN3754及其代谢产物对象耳豆根结线虫也具有有良好的致死效果,可显著防治线虫感染作物。因此,粪稳杆菌GXUN3754对于研究、开发新的高效杀象耳豆根结线虫生物制剂具有非常重要的意义。

附图说明

[0024] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

- [0025] 图1为粪稳杆菌GXUN3754的菌落形态图；
- [0026] 图2为粪稳杆菌GXUN3754革兰氏染色光学显微镜观察(100×油镜)结果图；
- [0027] 图3为粪稳杆菌GXUN3754基于16S rRNA基因序列的系统发育树图；
- [0028] 图4为粪稳杆菌GXUN3754抑菌胞外酶检测及促生特性相关指标检测结果图；其中，A为蛋白酶，B为植酸酶，C为产嗜铁素，D为产氨，CK为对照组，E为纤维素酶，F为淀粉酶；
- [0029] 图5为粪稳杆菌GXUN3754对空心菜种子萌发的促生情况观察图；其中，A为空白培养基浸种30min的萌发情况；B为粪稳杆菌GXUN3754浸种30min的萌发情况；
- [0030] 图6为粪稳杆菌GXUN3754挥发性物质对拟南芥的促生情况观察图；其中A为空白培养基处理，B为粪稳杆菌GXUN3754处理；
- [0031] 图7为粪稳杆菌GXUN3754对象耳豆根结线虫杀虫作用的显微观察图；其中，A为空白培养基处理下象耳豆根结线虫的虫体状态；B为经粪稳杆菌GXUN3754处理后象耳豆根结线虫虫体状态；
- [0032] 图8为粪稳杆菌GXUN3754挥发性物质对象耳豆根结线虫杀虫作用的显微观察图，其中，A为象耳豆根结线虫在空白培养基处理后的虫体状态；B为经粪稳杆菌GXUN3754挥发性气体处理后象耳豆根结线虫虫体状态；
- [0033] 图9为粪稳杆菌GXUN3754无菌发酵滤液对象耳豆根结线虫杀虫作用的显微观察图，其中：A为空白培养基处理下象耳豆根结线虫的虫体状态；B为经粪稳杆菌GXUN3754无菌发酵滤液处理后象耳豆根结线虫虫体状态；
- [0034] 图10为粪稳杆菌GXUN3754对象耳豆根结线虫盆栽防治效果，其中，A为阴性对照植株根系，(a)和(b)为典型区域及其放大图；B为阳性对照植株根系(施加化学农药氟吡菌酰胺)，(c)和(d)为典型区域及其放大图；C为粪稳杆菌GXUN375处理后的植株根系，(e)和(f)为典型区域及其放大图；红色点为象耳豆根结线虫形成的根结。

具体实施方式

[0035] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式，该详细说明不应认为是对本发明的限制，而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0036] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式，并非用于限制本发明。另外，对于本发明中的数值范围，应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值，以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0037] 除非另有说明，否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料，但是在本发明的实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入，用以公开和描述与本文所述文献相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时，以本说明书的内容为准。

[0038] 在不背离本发明的范围或精神的情况下，可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化，这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本发明说明书和实施例仅是示例性的。

[0039] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即意指包含但不限于。

[0040] 本发明实施例中所用实验材料:LB固体培养基、MS固体培养基、蛋白酶检测培养基、淀粉酶检测培养基、纤维素酶检测培养基、阿须贝固氮培养基、蛋白胨水培养基、Nessler试剂、植酸钙培养基、PK0无机磷培养基、嗜铁素检测培养基、L-色氨酸、Salkowski比色液、IAA标准品和所使用的象耳豆根结线虫均来源于广西壮族自治区多糖材料与改性重点实验室。

[0041] 实施例1菌株GXUN3754的分离

[0042] 从广西壮族自治区北海市铁山港区青山头(东经109°25',北纬21°36')采集植物根际土壤进行细菌分离。具体方法如下:称取5g土壤样品加入50mL无菌水中,30℃、180r/min震荡4h后,梯度稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的土壤悬液,各吸取100 μ L均匀涂布于LB固体培养基上,30℃倒置培养,24h后挑取大小、形态不同的单菌落至LB固体平板中划线纯化,将纯化好的菌株接种于LB固体平板上,划线备用。

[0043] 实施例2菌株GXUN3754的鉴定

[0044] 1.菌株形态观察

[0045] 将实施例1所得菌株GXUN3754划线接种于LB固体培养基中,30℃培养24h,观察单菌落颜色、大小、透明度等形态特征。挑取单菌落经革兰氏染色后,通过光学显微镜观察菌株形态。

[0046] 对菌株GXUN3754进行形态学观察的结果见图1,结果显示该菌株在LB固体培养基上呈黄色,表面光滑、奶油状,有隆起。革兰氏染色情况结果见图2,光学显微镜下菌体呈杆状,革兰氏染色试验呈阳性。

[0047] 2.生理生化特征

[0048] 参照《常见细菌系统鉴定手册》和《伯杰氏细菌鉴定手册》,对菌株GXUN3754氧化酶、淀粉水解、明胶液化、甲基红等生理生化指标进行鉴定。

[0049] 生理生化特征分析结果见表1,结果显示:该菌株为需氧菌,氧化酶、甲基红试验、柠檬酸盐利用试验、V-P试验呈阴性,明胶水解、丙二酸盐利用试验呈阳性。

[0050] 表1生理生化特征分析结果

	检测项目	结果
[0051]	厌氧实验	—
	明胶水解	+
	氧化酶	—
	丙二酸盐利用试验	+
	甲基红试验	—
	柠檬酸盐利用实验	—
	V-P 试验	—

[0052] 3.分子生物学鉴定

- [0053] 将菌株GXUN3754活化后提取总DNA,以此为模板,分别利用细菌通用引物:
- [0054] 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (SEQ ID NO.1);
- [0055] 1492R:5'-TACGGCTACCTTGTTACGAGTT-3' (SEQ ID NO.2);
- [0056] 对菌株GXUN3754 16S rRNA基因进行PCR扩增。
- [0057] PCR扩增体系(50 μ L):模板1 μ L, ddH₂O 22 μ L, 2 $\times$ Taq PCR Mix 25 μ L, 正向引物1 μ L, 反向引物1 μ L。
- [0058] PCR扩增程序:95 $^{\circ}$ C预变性5min;95 $^{\circ}$ C变性1min,55 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸2min,32个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min;4 $^{\circ}$ C保存。
- [0059] 扩增产物送至奥科生物工程(武汉)股份有限公司测序,序列与NCBI数据库中序列进行同源性对比,采用MEGA 11.0软件构建系统发育树。
- [0060] 分子生物学鉴定结果如图3所示,将菌株GXUN3754的16S rRNA基因序列与NCBI数据库中已有数据进行同源性分析并构建系统发育树,发现菌株GXUN3754的16S rRNA序列与粪稳杆菌(*Empedobacter stercoris*) SCVM0123相似度在99.65%,且系统发育树聚在同一支。
- [0061] 综合菌株形态特征、生理生化特性和分子生物学鉴定结果,确定该菌株为粪稳杆菌(*Empedobacter stercoris*)。发明人已将该菌株GXUN3754于2024年2月27日保藏于中国普通微生物保藏管理中心,保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,保藏编号为CGMCC No.29873。
- [0062] 实施例3粪稳杆菌GXUN3754产酶能力测定
- [0063] 分别滴加5 μ L粪稳杆菌GXUN3754发酵液($OD_{600} \approx 1.0$)于蛋白酶检测培养基、淀粉酶检测培养基、纤维素酶检测培养基中央,30 $^{\circ}$ C培养3d,纤维素酶检测培养基用1mol/L刚果红染色30min,再用1mol/LNaCl溶液脱色30min,淀粉酶检测培养基用碘液显色。
- [0064] 产氨:取50 μ L粪稳杆菌GXUN3754菌液($OD_{600} \approx 1.0$)接入装有4mL蛋白胨水培养基的试管中,30 $^{\circ}$ C震荡培养48h后,加入0.5mLNessler试剂,溶液颜色由黄色变至红棕色,且有沉淀产生,则表明其具有产NH₃能力。
- [0065] 溶磷:取5 μ L粪稳杆菌GXUN3754菌液($OD_{600} \approx 1.0$),分别接种于蒙金娜培养基、PK0无机磷培养基中央,30 $^{\circ}$ C培养5d后,若菌株周围有透明圈产生,则表明其具有解有机磷或无机磷能力。
- [0066] 产铁载体:将粪稳杆菌GXUN3754菌株接种于嗜铁素检测培养基中央,30 $^{\circ}$ C恒温培养7d,若菌株周围产生橙黄色晕圈,则表明其具有产铁载体能力,根据晕圈大小判断拮抗菌株产铁载体能力。
- [0067] 粪稳杆菌GXUN3754的促生功能及产酶特性定性检测结果如图4所示,粪稳杆菌GXUN3754在CAS检测培养基上产生橙黄色晕圈,加入Nessler试剂后,蛋白胨水培养基变为红棕色且有沉淀产生,蛋白酶检测培养基和植酸酶检测培养基上均有透明圈产生,但纤维素酶检测培养基和淀粉酶检测培养基上无透明圈产生,说明粪稳杆菌GXUN3754具有产嗜铁素、产NH₃能力、产蛋白酶和植酸酶能力,不具有产淀粉酶、纤维素酶的能力。
- [0068] 实施例4粪稳杆菌GXUN3754的促生效果
- [0069] 1.粪稳杆菌GXUN3754对空心菜种的促生作用
- [0070] 将种子进行种子表面消毒。无菌水浸泡1h挑取坏种,75%乙醇1min洗涤1次,1%次

氯酸钠浸泡3min洗涤2次,无菌水清洗3-5次。将粪稳杆菌GXUN3754以2% (V/V) 接入50mL LB培养基中,30℃,180rpm振荡培养24h至 OD_{600nm} 约为1.0备用。以LB空白培养基为对照,放入25粒表面消毒过的空心菜种,菌液浸泡1h。将空心菜种装于铺有湿润滤纸的无菌培养皿中,30℃,16:8h(光培养:暗培养)条件下,5d后观察发芽率与芽长情况。

[0071] 发芽率的计算公式如下所示:

[0072] 发芽率(%) = 发芽的种子数/供试种子数 × 100%;

[0073] 菌株GXUN3754对空心菜种的促生作用如图5所示,可以发现对照组的萌发率为68%,经过GXUN3754处理后的空心菜种萌发率为88%,且处理组5d后萌发的空心菜种芽长相比对照组有明显的提高。

[0074] 2. 粪稳杆菌GXUN3754挥发性物质对拟南芥的促生作用

[0075] 将粪稳杆菌GXUN3754以2% (V/V) 接入50mL LB培养基中,30℃180r/min振荡培养24h至 OD_{600nm} 约为1.0备用。拟南芥于4℃春化72h,随后点种至MS固体培养基上,培养4-5d至两叶一心。在二分隔板左右分别倒入MS固体培养基和LB固体培养基,超净台凝固紫外灭菌备用。将长至两叶一心的拟南芥移栽至二分隔板的MS固体培养基上,每组三次重复处理,每次处理移栽5株拟南芥幼苗;取5μL菌液滴加在二分隔板另一侧的LB固体培养基中央,以LB液体培养基为对照,30℃,16:8h(光培养:暗培养)条件下,14d后观察拟南芥的生长状况。

[0076] 菌株GXUN3754对拟南芥的促生作用如图6所示,各项指标数据如表2,可以发现在分蘖数和根长并无明显差异的情况下,GXUN3754挥发性物质处理后显著提高了拟南芥的叶长、叶宽及鲜重,表明GXUN3754挥发性物质对拟南芥具有明显促生效果。

[0077] 表2GXUN3754挥发性物质对拟南芥的促生效果

	菌株	叶长(mm)	叶宽(mm)	分蘖数(片)	根长(mm)	鲜重(mg)
[0078]	对照	7.95±1.95	3.42±0.55	9.30±1.79	44.90±9.11	11.22±6.20
	GXUN3754	13.52±3.38**	5.77±1.48**	10.19±1.44	43.44±2.09	31.17±4.21**

[0079] 注:“*”表示同组间差异显著($p < 0.05$),“**”表示差异极显著($p < 0.01$);

[0080] 实施例5粪稳杆菌GXUN3754对象耳豆根结线虫的杀虫活性

[0081] 将象耳豆根结线虫进行人工饲养:将空心菜种植育苗至15cm-20cm高,移栽至含象耳豆根结线虫的感染土中,培育15d,使象耳豆根结线虫在空心菜根系附着成结。挑取卵块,30℃常温孵育,挑取象耳豆根结线虫 J_2 幼虫进行生物活性测定。

[0082] 将粪稳杆菌GXUN3754以2% (V/V) 接种至50mL LB培养基中,30℃,180rpm振荡培养24h左右至菌液 $OD_{600nm} \approx 1.0$,取200μL菌液于六孔板内,加入600μL无菌水,并放入30头象耳豆根结线虫 J_2 幼虫(200μL虫悬液),实验液体总体积为1mL。以LB空白培养基为阴性对照,化学农药氟吡菌酰胺为阳性对照,稀释十三个梯度,每组重复3次,28℃恒温培养72h,观察象耳豆根结线虫死亡情况,并计算死亡率和校正死亡率及校正死亡率下的 LC_{50} 。

[0083] 死亡率和校正死亡率的计算公式如下所示:

[0084] 死亡率(%) = 象耳豆根结线虫死亡条数/象耳豆根结线虫总条数 × 100%;

[0085] 校正死亡率(%) = [(处理组死亡率 - 对照组死亡率) / (1 - 对照组死亡率)] × 100%。

[0086] 粪稳杆菌GXUN3754对象耳豆根结线虫杀虫活性虫体结果如图7所示,数据如表3,

LC₅₀数据如表4。

[0087] 表3粪稳杆菌GXUN3754对象耳豆根结线虫杀虫活性

	处理	死亡数	总数	死亡率	校正死亡率	平均校正死亡率
[0088]	对照	3	30	10.00%		
		1	30	3.33%		
		0	30	0		
[0088]	GXUN3754	28	30	93.33%	93.03%	
		26	30	86.67 %	86.07%	88.39%
		26	30	86.67%	86.07%	

[0089] 由表3可知,粪稳杆菌GXUN3754对象耳豆根结线虫杀虫活性可达88.39%。

[0090] 表4LC₅₀运算结果比较

	处理	回归方程	LC ₅₀ (FL) ^a (μL/mL)
[0091]	化学农药(氟吡菌酰胺)	y=-10.698+4.961x	143.290(2.115~2.198)
	GXUN3754	y=-5.412+2.704x	100.379(1.912~2.073)

[0092] 由表4可知,相较而言,粪稳杆菌GXUN3754的LC₅₀更小,粪稳杆菌GXUN3754对象耳豆根结线虫的杀虫活性药高于化学农药氟吡菌酰胺。

[0093] 实施例6粪稳杆菌GXUN3754挥发性物质和无菌发酵滤液对象耳豆根结线虫的杀虫活性测定

[0094] 1. 粪稳杆菌GXUN3754挥发性物质对象耳豆根结线虫的杀虫活性

[0095] 将粪稳杆菌GXUN3754以2% (V/V) 接种于50mL LB培养基中,30℃,180r/min振荡培养24h左右至菌液OD_{600nm}≈1.0,备用。在无菌六孔板中央倒入LB固体培养基,超净工作台内紫外灭菌备用。取100μL菌液涂布于六孔板内的培养基上,并在相邻孔内放入30头象耳豆根结线虫J₂幼虫,以LB空白培养基为对照,每组重复3次,28℃恒温培养72h,观察象耳豆根结线虫死亡情况,并计算死亡率和校正死亡率。

[0096] 粪稳杆菌GXUN3754挥发性物质对象耳豆根结线虫杀虫活性虫体结果如图8所示,数据如表5所示,粪稳杆菌GXUN3754挥发性物质对象耳豆根结线虫杀虫活性可达98.85%。

[0097] 表5GXUN3754挥发性物质对象耳豆根结线虫杀虫活性

处理	死亡数	总数	死亡率	校正死亡率	平均校正死亡率
[0098] CK	1	30	3.33%		
	1	30	3.33%		
	1	30	3.33%		
GXUN3754 (VOCs)	30	30	100.00%	100.00%	
	29	30	96.67%	96.55%	98.85%
	30	30	100.00%	100.00%	

[0099] 2. 粪稳杆菌GXUN3754无菌发酵滤液对象耳豆根结线虫的杀虫活性

[0100] 将粪稳杆菌GXUN3754以2% (V/V) 接种至50mL LB培养基中, 30°C, 180r/min振荡培养24h左右至菌液 $OD_{600nm} \approx 1.0$, 8000r/min离心4min, 取上清, 使用0.22 μ m过滤膜进行过滤, 4°C保存备用。取200 μ L无菌发酵滤液于六孔板内, 加入600 μ L无菌水, 并放入30头象耳豆根结线虫J₂幼虫(200 μ L虫悬液), 5倍稀释进行实验, 使得实验液体总体积为1mL, 以LB空白培养基为对照, 重复3次, 28°C恒温培养72h, 观察象耳豆根结线虫死亡情况, 并计算死亡率和校正死亡率。

[0101] 粪稳杆菌GXUN3754无菌发酵滤液对象耳豆根结线虫杀虫活性虫体结果如图9所示, 数据如表6所示, 粪稳杆菌GXUN3754无菌发酵滤液对象耳豆根结线虫杀虫活性高达86.07%。

[0102] 表6粪稳杆菌GXUN3754无菌发酵滤液对象耳豆根结线虫杀虫活性

处理	死亡数	总数	死亡率	校正死亡率	平均校正死亡率
[0103] CK	1	30	3.33%		
	3	30	10.00%		
	0	30	0		
GXUN375	27	30	90.00%	89.55%	
	26	30	86.67%	86.07%	86.07%
	25	30	83.33%	82.58%	

[0104] 实例7粪稳杆菌GXUN3754盆栽防治效果

[0105] 粪稳杆菌GXUN3754于LB培养基中30°C、180r/min培养至 $OD_{600nm} \approx 1.0$ 备用。将空心菜种植育苗至四叶一心备用。感染土与普通营养基质土质量比1:1混匀, 取200g混合土于透明小花盆中, 将长势一致的空心菜幼苗移栽至装有混合土的花盆中。以LB空白培养基为阴性对照, 化学农药(氟吡菌酰胺)为阳性对照, 每组五株空心菜幼苗, 在第1d、11d、21d浇灌稀释5倍的粪稳杆菌GXUN3754菌液, 第30d收获, 观察植株根结情况, 并计算根结防治率。根结防治率的计算公式如下所示:

[0106] 根结防治率 = $[(\text{阴性对照组根结数} - \text{处理组根结数}) / \text{阴性对照组根结数}] \times 100\%$ 。

[0107] 菌株GXUN3754盆栽防治效果如图10, 根结情况如表7, 使用粪稳杆菌GXUN3754处理

后的植株根结防治率可达91.67%，与化学农药氟吡菌酰胺的防治率相近，具有良好的盆栽防治效果。

[0108] 表7菌株GXUN3754对象耳豆根结线虫的盆栽防治效果

[0109]	处理	平均根结数(个)	防治率(%)
	对照	192	
	氟吡菌酰胺	5	97.40%
	粪稳杆菌 GXUN3754	16	91.67%

[0110] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述，并非对本发明的范围进行限定，在不脱离本发明设计精神的前提下，本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进，均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。



图1

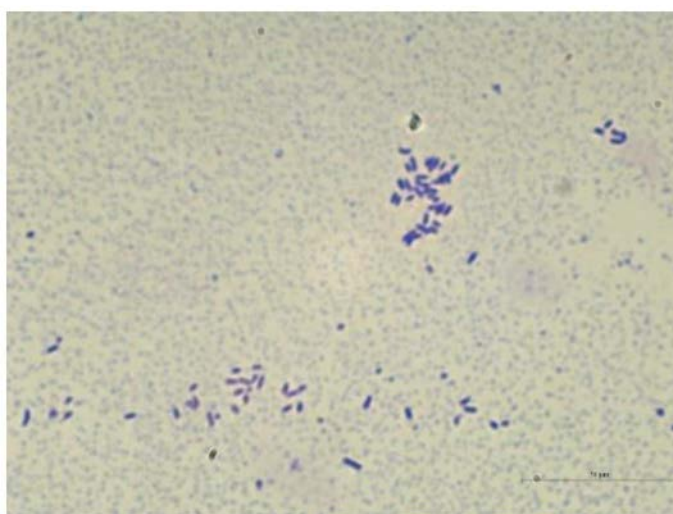


图2

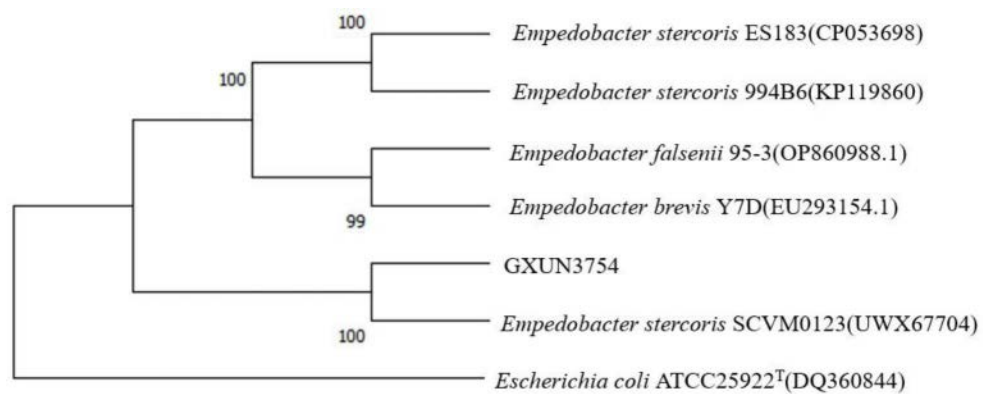


图3

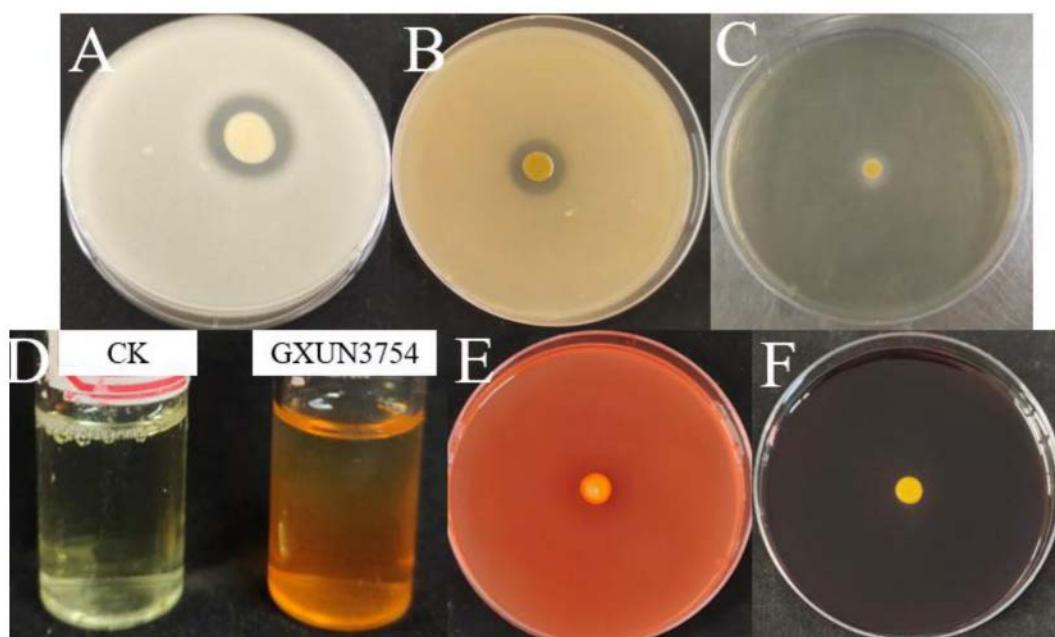


图4

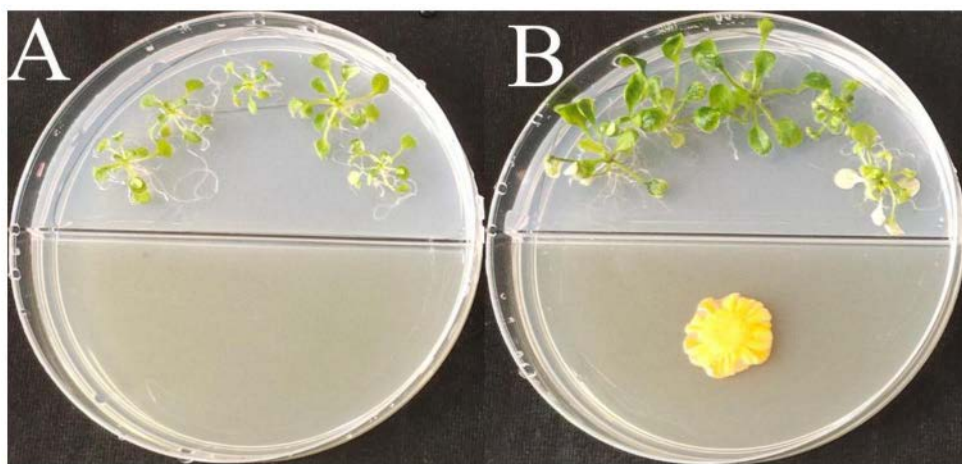


图5



图6

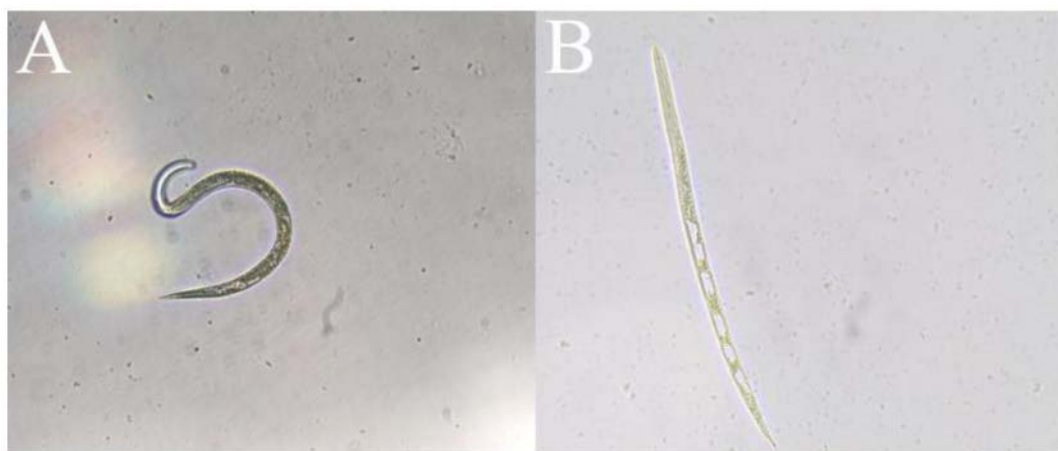


图7



图8

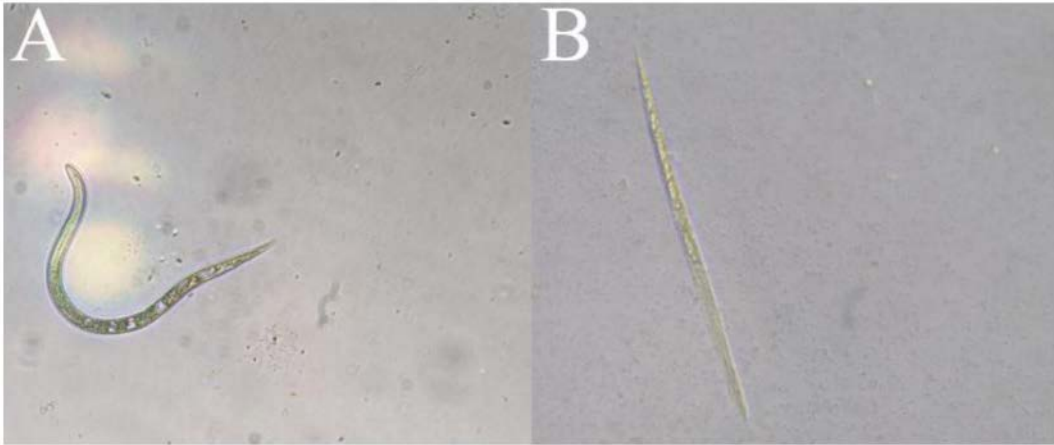


图9

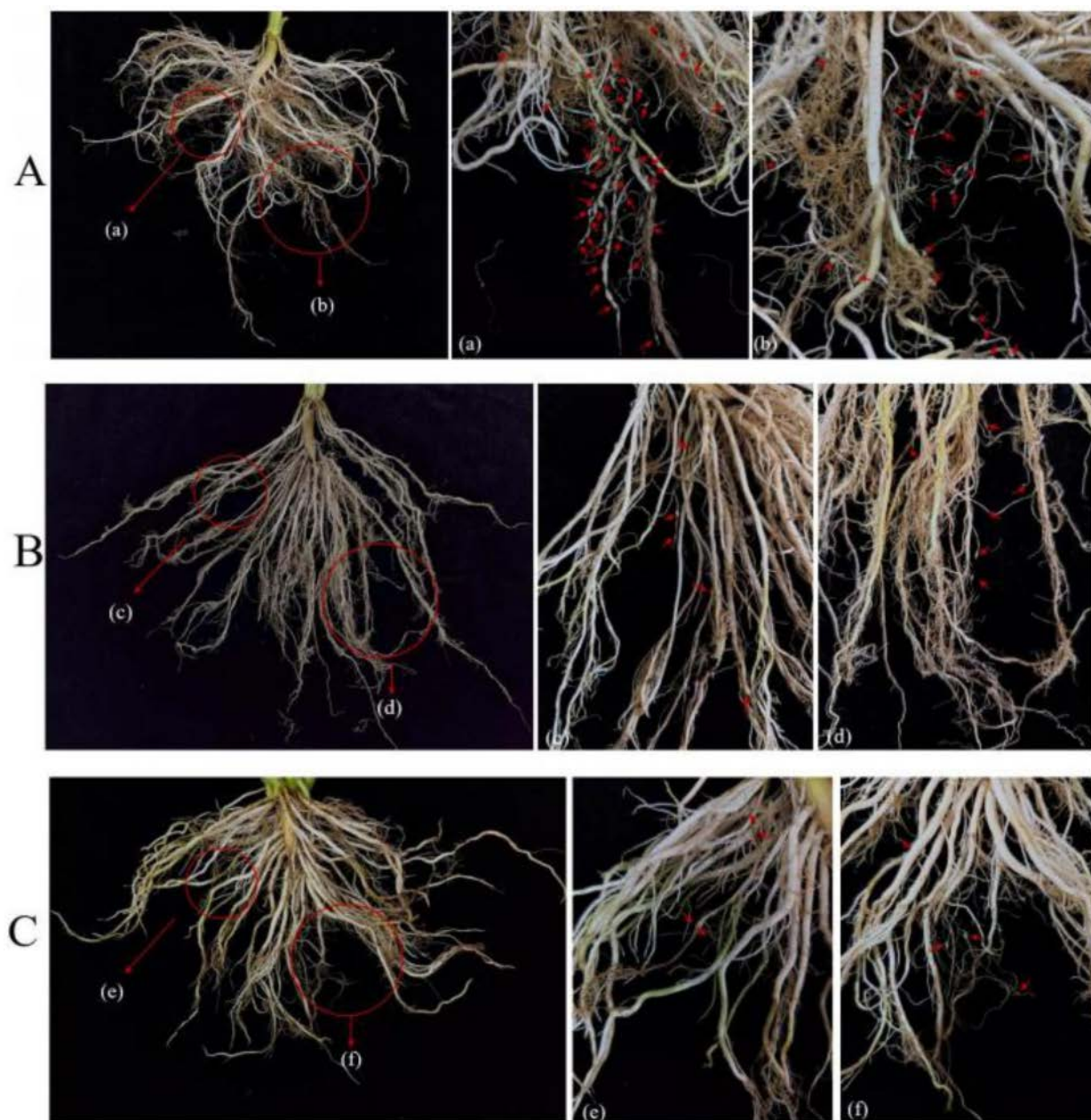


图10