



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106916764 B

(45)授权公告日 2019.08.23

(21)申请号 201710081711.X

(22)申请日 2017.02.15

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106916764 A

(43)申请公布日 2017.07.04

(83)生物保藏信息  
CGMCC No. 13204 2016.10.27

(73)专利权人 中国农业科学院烟草研究所  
地址 266101 山东省青岛市崂山区科苑经  
四路11号

专利权人 湖南省烟草公司张家界市公司

(72)发明人 王静 彭德元 孔凡玉 王振华  
王新伟 李斌 余祥文 王贻鸿  
(续)

(74)专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限  
公司 37221  
代理人 王志坤

(51)Int.Cl.  
C12N 1/20(2006.01) (续)

(56)对比文件  
CN 105586303 A,2016.05.18,参见全文。  
WO 2012040343 A2,2012.03.29,参见全文。  
US 20150147303 A1,2015.05.28,参见全

(54)发明名称  
一株耐酸性的韩国假单胞菌CLP-7及其应用

(57)摘要  
一株耐酸性防病促生生防韩国假单胞菌(Pseudomonas koreensis)菌株CLP-7,该菌株已于2016年10月27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,其生物保藏号为CGMCC No.13204。该菌株抑菌谱较广,能够抑制烟草黑胫病菌、烟草青枯病菌、赤星病菌的生长;酸性条件下拮抗活性强,能够产生嗜铁素,具有蛋白酶和葡聚糖酶活性且具有解钾能力。生防盆栽实验表明能够有效的防治酸性土壤条件下的

文。  
Rafikova, GF.A new bacterial strain, Pseudomonas koreensis IB-4, as a promising agent for plant pathogen biological control.《MICROBIOLOGY》.2016,第85卷(第3期),第333-341页,参见全文。

陈庆.一粒系小麦Pina基因与小麦生防细菌荧光假单胞菌研究.《中国优秀博硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》.2012,D047-10,参见全文。

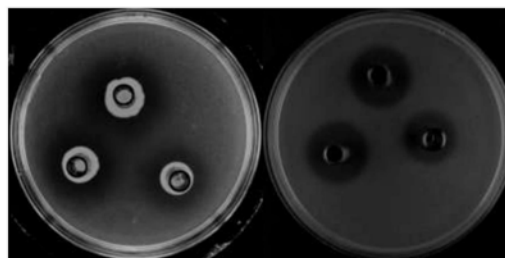
Hultberg, M.Suppression of disease in tomato infected by Pythium ultimum with a biosurfactant produced by Pseudomonas koreensis.《BIOCONTROL》.2010,第55卷(第3期),第435-444页。

Kwon, SW.Pseudomonas koreensis sp nov., Pseudomonas umsongsensis sp nov and Pseudomonas jinjuensis sp nov., novel species from farm soils in Korea.《INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY》.2003,第53卷第21-27页,参见全文。(续)

审查员 李振鹏

权利要求书1页 说明书7页  
序列表1页 附图4页

烟草青枯病,且能促进酸性土壤中烟苗的生长和叶绿素的合成;因此本发明提供的CLP-7菌株及其微生物菌剂能够有效防治连作或酸性土壤条件下烟草真菌和细菌性根茎病害,具有很高的应用价值。



CN 106916764 B

[接上页]

(72)发明人 陈德鑫

(51)Int.Cl.

*A01N 63/00*(2006.01)

*A01P 3/00*(2006.01)

*A01P 1/00*(2006.01)

*C12R 1/38*(2006.01)

(56)对比文件

Sundh, I.Safety assessment of biocontrol and plant growth-promoting pseudomonads useful in crop production.《ANNALS OF APPLIED BIOLOGY》.2011,第159卷(第2期),第291-301页,参见全文.

1. 一株耐酸性防病促生生防韩国假单胞菌 (*Pseudomonas koreensis*) 菌株CLP-7, 该菌株已于2016年10月27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, 其生物保藏号为CGMCC No.13204。

2. 一种微生物菌剂, 其特征在于, 所述菌剂包括权利要求1所述韩国假单胞菌菌株CLP-7。

3. 权利要求1所述韩国假单胞菌菌株CLP-7或权利要求2所述微生物菌剂在防治烟草真菌、细菌病害中的应用。

4. 权利要求1所述韩国假单胞菌菌株CLP-7或权利要求2所述微生物菌剂在促进烟草生长中的应用。

5. 如权利要求3所述应用, 其特征在于, 所述烟草真菌、细菌病害为烟草黑胫病、烟草青枯病和赤星病。

6. 如权利要求3或4所述应用, 其特征在于, 所述菌株或微生物菌剂用于酸性条件中。

7. 如权利要求6所述应用, 其特征在于, 所述酸性条件pH为5.5-6.5。

## 一株耐酸性的韩国假单胞菌CLP-7及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及一株耐酸性的韩国假单胞菌CLP-7及其应用。

### 背景技术

[0002] 烟草在整个生育期往往会遭受多种真菌和细菌病害的危害,主要包括烟草黑胫病、烟草青枯病、赤星病、野火和角斑病等。有些病原可在烟草的各个生育期危害,如有些病原只在烟草的某个生育期危害某些器官,如烟草赤星病(*Alternaria alternata* (Fries) Keissler)仅在烟草成熟期为害叶片;根茎病害如烟草黑胫病(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianaer*)和青枯病(*Ralstonia solanacearum*),在烟草苗期到成熟期均可受害,且随着不同年份的气候而发生流行,根茎病害是严重影响烟叶产量和质量的土传病害。

[0003] 针对烟草青枯病和黑胫病的防治,从抗病育种、农业防治、化学防治和生物防治等方面已开展了大量的研究工作,但存在耕地资源不足、成本高、优质抗病品种缺乏的制约因素,至今仍无理想的防治措施。除此之外,烟草是忌连作作物,然而目前我国主产烟区,如渝东南烟区、福建南平烟区及山东植烟土壤(张东2015;申国明等,2011),由于长期连作、大量施用化肥而优质有机肥施用不足,造成植烟土壤板结、酸碱度不平衡,土壤的pH呈下降趋势,并且这种酸化趋势与连作障碍密切相关,部分植物必须营养元素含量不足、土壤酶活降低及有机质活性下降等问题,导致烟草根茎类病害发生严重(李志宏2004;刘天毅2006)。尤其是酸性土壤中青枯病和黑胫病混合发生,难以防治且造成损失越来越严重,目前仍以化学药剂防治为主,已成为我国烟草生产可持续发展的重要障碍。

[0004] 鉴于化学防治对环境的污染和生态平衡的破坏,因此烟草病害的生物防治越来越被重视。以生物防治为主导的病害非化学控制策略,因其环保、无抗药性等优点,一直被认为是极具前景的病害防控措施。利用有益微生物防治植物病害,已成为一个十分活跃并开始显示良好应用前景的领域。大量的研究表明,生防细菌的作用是非常明显的,种类繁多、繁殖速度快的细菌在植物根际和土壤中大量存在,对植物的生态比较适宜;有益细菌通过竞争、拮抗和诱导植物产生抗性等方式对病原菌产生作用;可以人工培养的细菌在实践中易于操作;且有些细菌不仅能防病而且可以促进作物生物量的累积。

[0005] 国内对烟草黑胫病、青枯病和赤星病病害的生物防治已有报道,但未有应用于酸性土壤烟草青枯病和黑胫病防治的生防菌株。多数生防菌株仅针对于其中一类真菌或细菌病害有较好的防治效果,而具有耐酸性且对多种真菌、细菌病害病原菌均具有生防作用的韩国假单胞菌株尚未有报道。

### 发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的上述问题,本发明提供一株耐酸性防病促生生防韩国假单胞菌株,适用于酸性土壤条件下烟草真菌、细菌病害的生物防治,为烟草主要根茎病害青枯病和黑胫病及叶部病害赤星病的防治提供了新的微生物资源。

[0007] 具体的,本发明涉及以下技术方案:

[0008] 一株耐酸性防病促生生防韩国假单胞菌 (*Pseudomonas koreensis*) 菌株CLP-7,已于2016年10月27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(地址:中国北京市朝阳区北辰西路1号院3号),其生物保藏号为CGMCC No.13204。

[0009] 本发明针对烟草主要真菌和细菌病害病原菌:烟草黑胫病菌 (*Phytophthora parasitica* var.*nicotianaer*)、烟草青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 和赤星病菌 (*Alternaria alternata* (Fries) Keissler),通过室内平板对峙法和温室盆栽防治效果测定,筛选出在酸性土壤中对烟草青枯病和黑胫病具有良好防病和促生作用的拮抗细菌CLP-7,测定其16S rDNA全序列(见序列表SEQ ID NO.1),结合菌落、菌体形态特征,生理生化特征和16S rDNA序列分析,将CLP-7鉴定为韩国假单胞菌 (*Pseudomonas koreensis*)。该菌株的培养条件为28℃,采用普通牛肉汁蛋白胨培养基 (NA) 进行培养。

[0010] 所述牛肉汁蛋白胨培养基 (NA) 为:酵母浸膏1g,牛肉浸膏3g,蛋白胨5-10g,蔗糖或葡萄糖10g,水1000ml;pH为5.5-6.0。

[0011] 生物学测定表明,CLP-7菌株含菌发酵液和除菌上清液对青枯菌均具有较强的抑制作用(见图1),CLP-7菌体能有效破坏青枯菌的杆状菌体,造成内含物外泄(见图2),抑制黑胫病菌和赤星病菌菌落生长(图3,5),导致黑胫病菌菌丝畸形(图4),赤星菌分生孢子(见图6);

[0012] 另外,CLP-7菌株还具有蛋白酶和葡聚糖酶活性(见图7,8),能合成嗜铁素(见图9),具有一定的解钾能力(见图10)。防病试验显示,在酸性土壤条件下,CLP-7发酵液能推迟烟草青枯病发病10d;在接种后第25d时,CLP-7发酵液处理的烟苗发病率为15.7%,病情指数为3.71,防效为85.60%,而对照药剂农用链霉素WP处理的烟苗发病率为24.4,病情指数为7.65,对青枯病的盆栽防效仅为70.23%,CLP-7菌株处理的防效高于对照药剂的防效,且处理间差异显著;在pH7.0中性土壤条件下,CLP-7发酵液处理对青枯病的盆栽防效为71.6%;农用链霉素WP的防效为70.46%,两个处理防效相当,处理间差异不显著,即CLP-7菌株含菌发酵液对酸性土壤条件中烟草青枯病的防治效果比中性土壤条件的防效理想。

[0013] 促生试验结果显示,酸性土壤条件(pH5.5-6.0)下,与对照相比,CLP-7菌培养液能有效的促进烟株生长,平均株高、整株干重、根干重与叶绿素含量增长率分别为27.6%、20.1%、86.7%和24.1%,与对照处理间差异显著,促生效果明显。

[0014] 本发明还提供一种微生物菌剂,所述微生物菌剂包括上述韩国假单胞菌 (*Pseudomonas koreensis*) 菌株CLP-7或韩国假单胞菌 (*Pseudomonas koreensis*) 菌株CLP-7的培养物。

[0015] 此外,本发明公开了上述韩国假单胞菌 (*Pseudomonas koreensis*) 菌株CLP-7或菌剂在生物防治烟草真菌、细菌病害中的应用,同时也公开了上述韩国假单胞菌 (*Pseudomonas koreensis*) 菌株CLP-7或微生物菌剂在促进烟草生长中的应用;优选的,所述菌株或菌剂适用于酸性条件中,所述酸性条件pH为5.5-6.5。

[0016] 其中,所述烟草真菌、细菌病害包括烟草黑胫病菌 (*Phytophthora parasitica* var.*nicotianaer*)、烟草青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 和赤星病菌 (*Alternaria alternata* (Fries) Keissler)。

[0017] 本发明通过室内平板培养和活体温室防效首次筛选出一株的韩国假单胞菌

(*Pseudomonas koreensis*) 菌株CLP-7,所述菌株具有耐酸性,防病、促生效果俱佳,且其抗逆性强,所述CLP-7菌株及其微生物菌剂能够有效防治连作或酸性土壤条件下烟草真菌、细菌根茎病害,是新型优质的微生物农药资源,具有广阔的应用前景。

### 附图说明

[0018] 图1为实施例1中CLP-7对烟草青枯菌的拮抗活性示意图,其中,左为CLP-7含菌发酵液处理,右为CLP-7除菌的发酵上清液。

[0019] 图2为CLP-7菌发酵液对青枯病菌菌体的破坏作用电镜照片。其中,左为对照,右为CLP-7除菌上清液处理。

[0020] 图3为CLP-7对黑胫病菌菌落生长的抑制作用示意图,其中,左为CLP-7菌株处理,右为对照。

[0021] 图4为CLP-7抑菌物质对黑胫病菌菌丝的抑制作用显微图,其中,左为CLP-7,右为空白对照。

[0022] 图5为CLP-7菌株对烟草赤星病菌的拮抗活性示意图,其中左为CLP-7菌株处理,右为对照。

[0023] 图6为CLP-7抑菌物质对赤星病菌分生孢子的抑制作用示意图,其中,左为正常分生孢子,右为CLP-7处理后的肿胀、畸形孢子,标尺为20 $\mu$ m。

[0024] 图7为CLP-7菌株蛋白酶活性示意图。

[0025] 图8为CLP-7菌株葡聚糖酶活性示意图。

[0026] 图9为CLP-7合成嗜铁素的示意图。

[0027] 图10为CLP-7菌株解钾能力示意图。

[0028] 图11为CLP-7菌株在不同酸碱度条件下对青枯病菌的拮抗活性差异。

### 具体实施方式

[0029] 下面结合实施例对本发明做进一步说明。

[0030] 实施例1 CLP-7及其发酵液对烟草青枯病、黑胫病和赤星病菌的拮抗作用

[0031] 接种CLP-7于NA平板上30 $^{\circ}$ C培养48h,然后采用平板对峙法,即在燕麦和马铃薯葡萄糖培养基(PDA)平板上接种黑胫病菌和赤星病菌菌饼(直径为5mm),用接种环挑取AR03在菌饼两侧等距离划线,置于30 $^{\circ}$ C培养5d,对青枯雷尔氏菌的抑制采用牛津杯平板扩散法;即将CLP-7菌株接种于牛肉汁蛋白胨液体培养液(NB)中,30 $^{\circ}$ C、150rpm振荡培养2天,取适量发酵液和无菌上清液(经细菌过滤器过滤)置于含青枯菌的牛肉汁蛋白胨培养基平板(NA)上的牛津杯内,静置培养2天,观察CLP-7对上述各致病菌的抑制情况。从室内平板抑菌效果观察,CLP-7菌体、发酵液和无菌上清对烟草黑胫病菌、赤星病菌和青枯病菌均具有很好的抑制作用(见图1、3和5)。

[0032] CLP-7菌株分泌的抑菌物质对青枯菌菌体的破坏作用的拮抗活性是将活化的CLP-7接种于NB培养基中30 $^{\circ}$ C振荡培养48h得到发酵液,取其去菌体后的上清液与青枯菌悬液(浓度为 $2 \times 10^8$ cfu/ml)等体积混合,空白对照为等量无菌水与菌悬液混合处理。处理24h,取稀释后的各处理的混合液于扫描电镜下观察。从结果可以看出,CLP-7菌株分泌的抑菌物质对青枯菌菌体破坏作用较强,导致杆状菌体变形,内含物外泄,而无菌水对照的青枯菌杆

状菌体正常(见图2)。

[0033] 实施例2 CLP-7菌株对黑胫病菌和赤星病菌菌丝生长的抑制作用

[0034] 以黑胫病菌和赤星病菌为靶标菌,即接种CLP-7于NA平板上30℃培养48h,然后采用平板对峙法,即在燕麦平板上接种黑胫病菌、PDA平板上接种赤星病菌,用接种环挑取AR03并以菌饼为中心等距离划线,置于30℃培养5d,分别挑取黑胫病菌和赤星病菌菌饼边缘菌丝于显微镜下镜检,结果显示经CLP-7处理后的黑胫病菌菌饼边缘菌丝与正常菌丝相比,其菌丝细胞内的细胞质聚集为球状,脱离于细胞膜和细胞壁,因此影响其正常生长(图4);而经CLP-7处理后的赤星病菌分生孢子与正常的分生孢子相比,抑制作用表现为分生孢子产生的数量减少,外形上则为膨胀、变形,分隔异常(图6)。

[0035] 实施例3 CLP-7菌株蛋白酶活性测定

[0036] 蛋白酶活性测定采用蛋白培养基进行,蛋白培养基及配方为:A:脱脂奶粉6.4g,溶于240mL水中,121℃灭菌20min;B:琼脂6.4g,定容至240mL,121℃灭菌20min,A与B分别灭菌后混合,用于蛋白酶检测。测定方法如下:将蛋白培养基溶化并制成平板。取灭菌牙签将CLP-7菌株点接于蛋白培养基平板上,接菌后培养3d,观察菌落生长情况和透明圈的大小,分别测定透明圈直径 $R_2$ 与菌落直径 $R_1$ ,利用 $R_2/R_1$ 比值定性表示其蛋白酶活性。结果显示(图7),CLP-7菌株有蛋白酶活性,其酶活大小,即 $R_2/R_1$ 为4.10。CLP-7菌株的蛋白酶活性显示了该菌株对真菌的抑制机理-抗生作用,即通过产生蛋白酶来降解寄主病原菌的细胞壁,使病原菌细胞瓦解。

[0037] 实施例4 CLP-7菌株葡聚糖酶活性测定

[0038] 葡聚糖酶活性测定采用选择性培养基-葡聚糖培养基进行,葡聚糖培养基及配方为:葡聚糖培养基: $\beta$ -1,3-葡聚糖0.1g,TSB 0.4g,琼脂1.6g,4g/L的刚果红1mL,定容至100mL,121℃灭菌20min,倒成培养基平板待用。取灭菌牙签将CLP-7菌株点接于葡聚糖培养基平板上,接菌后培养3d,观察菌落生长情况和透明圈的大小。结果显示(图8),CLP-7菌株有葡聚糖酶活性,在菌体周围有明显的、较宽的透明圈,即产生细胞壁降解酶,葡聚糖是真菌细胞壁的成分之一,CLP-7可以通过水解真菌细胞壁的葡聚糖对真菌细胞造成破坏,从而达到抑菌的效果。

[0039] 实施例5 CLP-7菌株合成嗜铁素的测定

[0040] 细菌合成嗜铁素采用嗜铁素检测培养基-CAS培养基进行测定。CAS培养基及配方如下:CAS培养基:A:1,60.5mg CAS(络天青S)溶于50mL去离子水;2,10mL三价铁溶液(1mM  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ,10mM盐酸为溶剂);3,72.9mg HDTMA溶于40mL去离子水。上述三个溶液混合定容至100mL,pH调至中性,121℃灭菌20min。B:30.24g Pipes加入900mL Waker agar培养基,12g、50%(W/V)的NaOH溶液将培养基pH调至6.8,121℃灭菌20min。A,B液混合,制成平板备用。取接种环挑取活化后的CLP-7点接于嗜铁素培养基上,30℃培养48h,观察CLP-7菌落周围是否产生晕圈,若有晕圈产生,表明为阳性。结果显示(图9),CLP-7菌株具有合成嗜铁素的能力。分泌嗜铁素是拮抗细菌控制真菌病害的一种主要机制,嗜铁素可以通过与植物病原菌竞争土壤中有限的铁元素,从而抑制病原菌的营养生长,起到生物防治作用。另外,嗜铁素在促进植物生长方面亦具有重要的作用。

[0041] 实施例6 CLP-7菌株的解钾能力测定

[0042] 细菌解钾能力采用解钾培养基进行测定。解钾培养基及配方如下: $NaH_2PO_4$ 2.0g,

MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2g, FeCl<sub>3</sub> 0.05g, 蔗糖5.0g, CaCO<sub>3</sub> 0.1g, 钾长石粉1.0g, 琼脂15g, 蒸馏水1000mL, pH 7.2, 121℃灭菌20min, 制成平板备用。取接种环挑取活化后的CLP-7点接于解钾培养基上, 30℃培养48h, 观察CLP-7菌落周围是否产生晕圈, 若有晕圈产生, 表明为阳性。结果显示(图10), CLP-7菌落周围产生一定宽度的晕圈, 说明该菌株具有一定的解钾能力。解钾菌可将土壤中无效钾转为有效钾, 增加土壤中的钾元素。烟草是喜钾作物, 因此若将CLP-7菌株应用于烟草, 为烟株提供足够的钾营养, 从而在提升烟叶品质和产量方面具有较大的应用价值。

[0043] 实施例7 酸性、中性和碱性条件下CLP-7菌株对青枯病菌的拮抗活性差异

[0044] 将NA培养基与适量酸性缓冲液(0.2mol/L的乙酸钠与0.3mol/L的乙酸按照体积比1:9混合)混合, 制备成pH分别为5.5、6.0、6.5、7.0和7.5的不同酸碱度的NA培养基, 采用牛津杯法(同实例1)测定CLP-7号菌株发酵液在不同酸碱度条件下抑菌活性的差异。结果显示(如图11), 在酸性(5.5 ≤ pH ≤ 6.5)范围内, CLP-7菌株对青枯菌的抑制效果最强, 且高于中性或碱性条件, 说明酸性条件有利于该菌株其发挥最佳抑菌效果, 因此将该菌株应用于酸性土壤条件下青枯病的生物防治将具有很大潜力。

[0045] 实施例8 酸性和中性条件下CLP-7发酵液对烟草青枯病及盆栽防效测定

[0046] CLP-7发酵液在对酸性和中性土壤条件下烟草青枯病的盆栽防治效果测定方法如下: 首先制备青枯菌菌悬液: 青枯病菌活化后, 接入装有NB培养液的三角瓶中, 恒温30℃培养2天, 培养液于6000rpm离心, 除去上清, 菌体沉淀与适量无菌水混合制成青枯菌菌悬液浓度为2 × 10<sup>10</sup>cfu/ml, 备用。酸性土壤的制备: 取过20目筛(孔径为1.0mm)的灭菌土, 用适量青枯菌菌悬液与pH 2.0酸性缓冲液(将0.2mol/L的乙酸钠与0.3mol/L的乙酸按照体积比1:9混合)分别将灭菌土pH调整为5.5和7.0, 且青枯菌浓度为2 × 10<sup>8</sup>cfu/g的不同pH的混菌土壤, 用于盆栽接种试验。

[0047] 供试烟草品种为红花大金元, 取4-6片叶烟苗, 分别移栽到装有pH5.5和7.0土壤的花盆中, 用CLP-7发酵液(浓度为2 × 10<sup>8</sup>cfu/ml)灌根, 每株50ml, 充分浸润烟苗根部, 对照药剂为农用链霉素可湿性粉剂, 2500倍稀释, 每株灌根50ml, 空白CK为清水处理的烟苗。间隔5天后再灌根1次, 每处理15株烟苗, 3次重复。病情指数与防治效果的计算公式分别如下:

$$[0048] \quad \text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总株数} \times 4} \times 100$$

$$[0049] \quad \text{防治效果}(\%) (\text{施药前无基数}) = \frac{\text{空白对照区病指} - \text{处理区病指}}{\text{空白对照区病指}} \times 100$$

[0050] 调查结果显示(如表1), 接种青枯菌后25d, 在pH5.5土壤条件下, 拮抗细菌CLP-7发酵液(2 × 10<sup>8</sup>cfu/ml)处理组能够推迟烟苗发病10天, 处理组烟株发病率为15.6%, 病情指数为3.71, CLP-7菌株对青枯病的的盆栽防治效果为85.60%, 而对照药剂农用链霉素WP处理的烟苗发病率为24.4, 病情指数为7.65, 对青枯病的盆栽防效为70.23%, CLP-7菌株处理与对照药剂农用链霉素处理间差异显著; 在pH7.0土壤条件下, CLP-7发酵液处理对青枯病的盆栽防效为71.6%; 农用链霉素WP的防效为70.46%, 两个处理防效相当, 且处理间差异不显著。CLP-7菌株在酸性条件下对烟草青枯病的防效高于中性土壤条件, 所以在连作酸性植烟土壤的烟区, 应用该菌株防治和减轻黑胫病和青枯病的发生, 对连作老烟区根茎病害



的可持续控制具有重要意义。

[0051] 表1 酸性和中性条件下CLP-7发酵液对烟草青枯病的盆栽防效测定\*

处理	土壤 (pH 5.5)			土壤 (pH 7.0)		
	发病率 (%)	病情指数	防治效果	发病率(%)	病情指数	防治效果
[0052] CLP-7 发酵液	15.6	3.71	85.60a	20.0	6.17	71.6a
农用链霉素 WP	24.4	7.65	70.23b	22.2	6.42	70.46a
清水 CK	57.8	25.7	—	53.3	21.73	—

[0053] \*:表中数据均为3次重复平均值,字母为在0.05水平上,供试菌株与对照药剂的差异显著性。

[0054] 实施例9 酸化土壤条件下CLP-7发酵液对烟草的促生作用

[0055] CLP-7发酵液在酸性土壤条件下烟草的促生效果测定方法如下:首先制备CLP-7发酵液,活化的CLP菌株接种于锥形瓶中,30℃、150rpm振荡培养48h,发酵液经低温、6000rpm条件离心8min,弃上清后的菌体沉淀与适量无菌水配成浓度为 $3 \times 10^8$ cfu/ml的菌悬液。将大十字期的烟苗(品种为K326)的根无菌水漂洗干净后,浸根于CLP-7的菌悬液中,静置40min后,将烟苗分别移栽到盛有预先湿润土壤(pH5.5)的小花盆中,对照为清水处理根部的烟苗,所有供试材料置于 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 、光周期10/14h、相对湿度75%的人工气候室内常规管理,每处理20株烟苗,3次重复。至第40d,每处理随机选取10株烟苗,小心将烟苗的根部冲洗干净,分别测量各处理烟苗的株高整株鲜重生理指标,然后180℃烘干至恒重,测定整株干重、根干重。各处理的促生做效果采用邓肯氏新复极差法进行分析。参照文献(曾建敏,等.烤烟叶片叶绿素含量的测定及其与SPAD值的关系,分子植物育种,2009年第1期)方法进行叶绿素的提取和含量测定。促生试验结果显示,与清水CK处理对比,CLP-7菌株能够有效的促进株高,增长率分别为27.6%,累积烟株根部的干物质效果显著,增长率为86.7%;根部干物质积累是作物产量形成的基础,烟草根部作为储存养分的贮藏器官和烟碱的合成器官,干物质积累的多,则有利于满足烟叶生长所需的氨基酸、植物激素和烟碱等物质合成。此外,该菌株还能有效促进烟草叶片的叶绿素含量增加,增长率为24.1%。叶绿素含量升高,即CLP-7菌株能够提高烟草叶片的光合作用能力以及光和产物的运输,从而增强酸性环境下烟株自身的抗逆性,能有效的抵抗和忍耐外界不良环境,这些是CLP-7菌株在酸性土壤中特有的优良特性。

[0056] 表2 CLP-7菌株对酸性土壤条件下烟草的促生效果测定\*

[0057]

菌株 编号	株高/ cm	增长 率/%	整株鲜 重/g	增长 率/%	整株干 重/g	增长 率/%	根干 重	增长 率/%	叶绿素含 量/mg·g <sup>-1</sup>	增长 率/%
CLP-7发 酵液	9.61a	27.6	20.78b	0.04	8.67b	2.2	2.93a	86.7	2.05a	24.1
清水 CK	7.53b	—	20.77b	—	8.48b	—	1.57b	—	1.65b	—

[0058] \*:表中数据均为3次重复平均值,字母为在0.05水平上,CLP-7菌株处理与对照的差异显著性。

[0059] 应注意的是,以上实例仅用于说明本发明的技术方案而非对其进行限制。尽管参照所给出的实例对本发明进行了详细说明,但是本领域的普通技术人员可根据需要对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围。

[0001] SEQUENCE LISTING

[0002] <110> 中国农业科学院烟草研究所 湖南省烟草公司张家界市公司

[0003] <120> 一株耐酸性的韩国假单胞菌CLP-7及其应用

[0004] <130>

[0005] <160> 1

[0006] <170> PatentIn version 3.5

[0007] <210> 1

[0008] <211> 1369

[0009] <212> DNA

[0010] <213> 韩国假单胞菌*Pseudomonas koreensis*

[0011] <400> 1

[0012] gttaactagc tacttctggt gcacccactc ccatggtgtg acgggcggtg tgtacaaggc 60

[0013] ccgggaacgt attcaccgcg acattctgat tcgcgattac tagcgattcc gacttcacgc 120

[0014] agtcgagttg cagactgcga tccggactac gatcggtttt gtgggattag ctccacctcg 180

[0015] cggcttgca accctctgta ccgaccattg tagcacgtgt gtagcccagg ccgtaagggc 240

[0016] catgatgact tgacgtcacc cccaccttcc tccggtttgt caccggcagt ctcccttagag 300

[0017] tgcccacat aacgtgctgg taactaagga caagggttgc gctcgttacg ggacttaacc 360

[0018] caacatctca cgacacgagc tgacgacagc catgcagcac ctgtctcaat gctcccgaag 420

[0019] gcaccaatcc atctctggaa agttcattgg atgtcaaggc ctggttaaggt tcttcgcggt 480

[0020] gcttgaatt aaaccacatg ctccaccgct tgtgcccggc cccgtcaatt catttgagtt 540

[0021] ttaaccttgc ggccgtactc cccaggcggc caacttaatg cgtttagctgc gccactaaga 600

[0022] gctcaaggct cccaacggct agttgacatc gtttacggcg tggactacca gggatatctaa 660

[0023] tcctgtttgc tccccacgct ttcgcacctc agtgtcagta tcagtccagg tggctgcctt 720

[0024] cgccactggt gttccttctt atatctacgc atttaccgc tacacaggaa attccaccac 780

[0025] cctctaccat actctagctt gccagttttg gatgcagttc ccaggttgag cccggggatt 840

[0026] tcacatcaa cttacaacac cacctacgcg cgctttacgc ccagtaattc cgattaacgc 900

[0027] ttgaccctc tgtattaccg cggctgctgg cacagagtta gccggtgctt attctgtcgg 960

[0028] taacgtcaaa attgcagagt attaattctac aacccttctt cccaacttaa agtgctttac 1020

[0029] aatcgaaga cttcttctac acacgcggca tggctggatc aggtttctgc ccattgtcca 1080

[0030] atattcccca ctgctgcctc ccgtaggagt ctggaccgtg tctcagttcc agtgtgactg 1140

[0031] atcatctct cagaccagtt acggatcgtc gccttggtga gccattacct caccaactag 1200

[0032] ctaatccgac ctaggtctcat ctgatagcgc aaggcccga ggtcccctgc tttctcccgt 1260

[0033] aggacgtatg cggatttagc gttcctttcg aaacgttgtc cccactacc aggcagattc 1320

[0034] ctaggcatta ctaccctgct cgccgctgaa tccaggagca agctcctct 1369

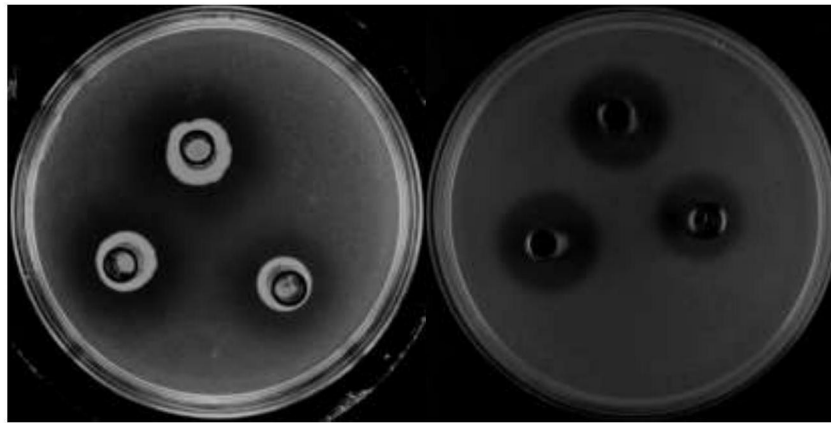


图1

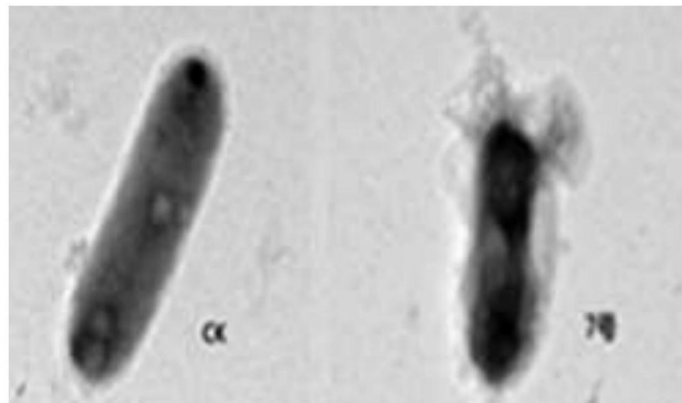


图2

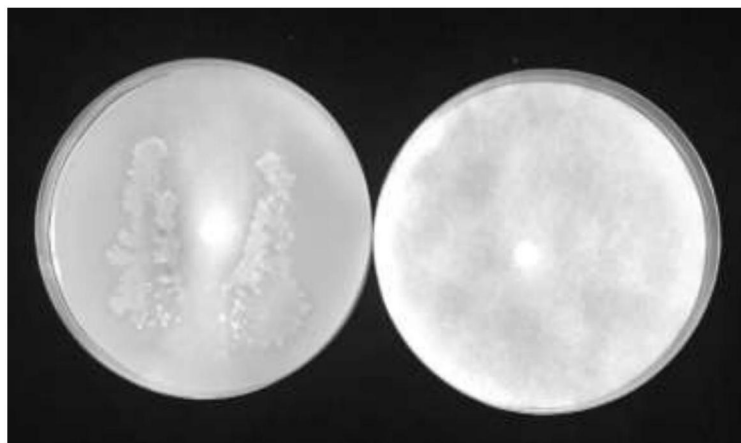


图3



图4

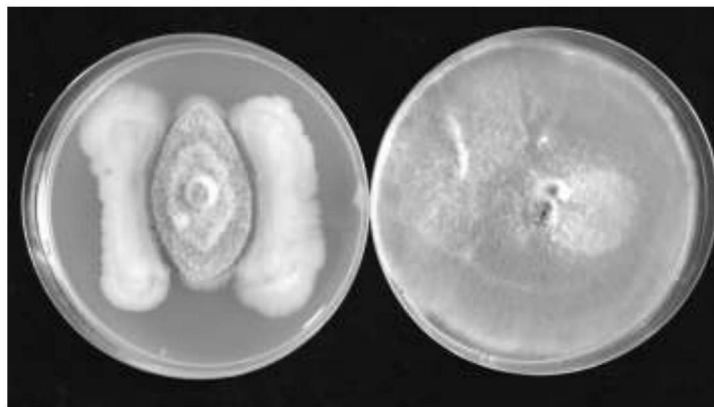


图5

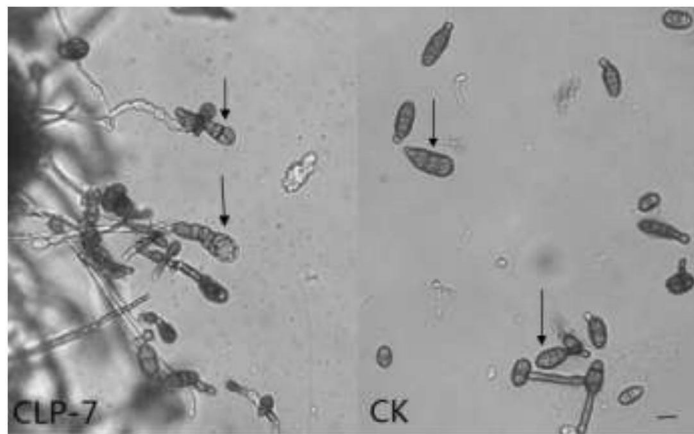


图6

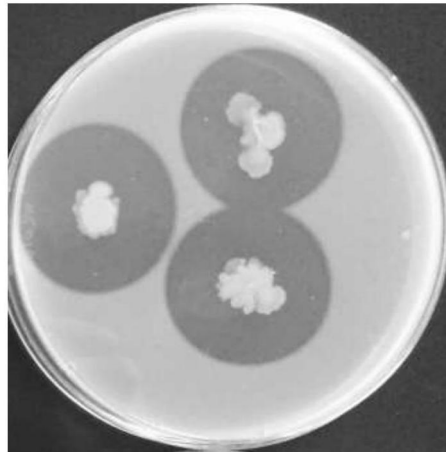


图7

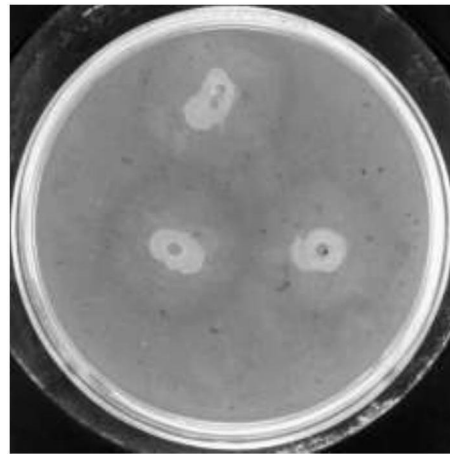


图8

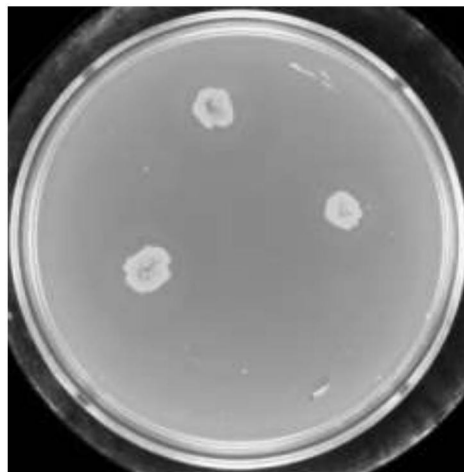


图9

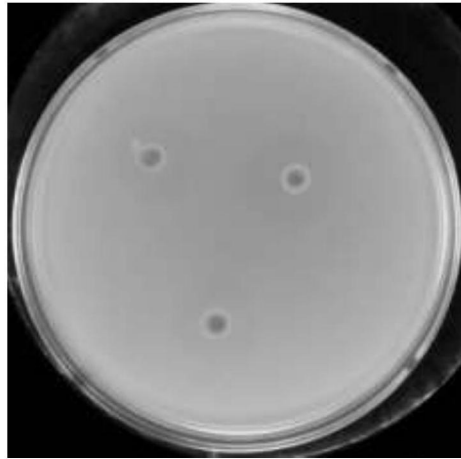


图10

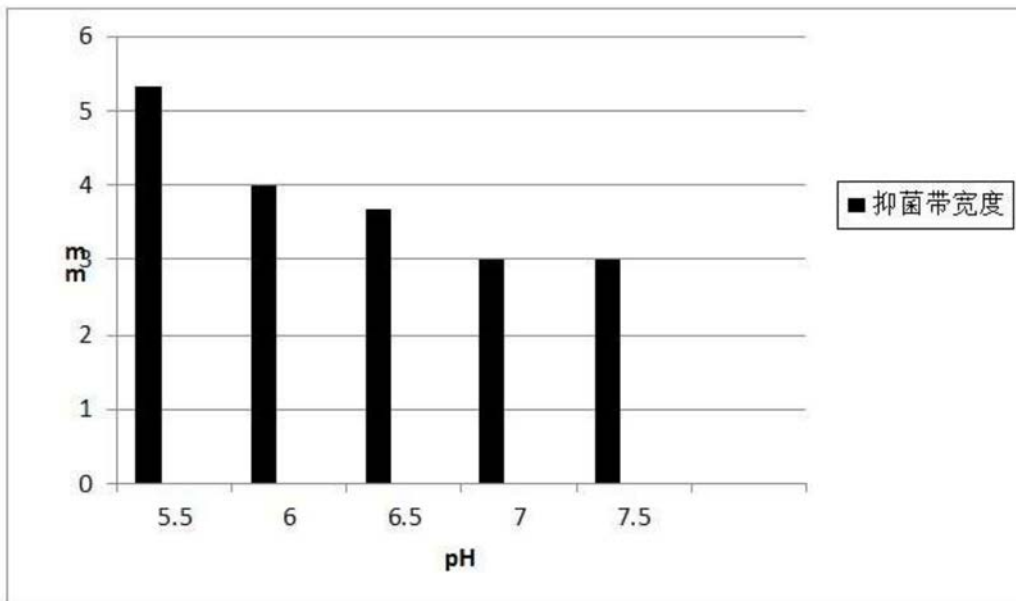


图11