

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

A01N 63/00

C12N 1/20

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 98813221.4

[43]公开日 2001年4月11日

[11]公开号 CN 1291078A

[22]申请日 1998.11.20 [21]申请号 98813221.4

[30]优先权

[32]1997.11.20 [33]US [31]08/974,938

[32]1997.12.18 [33]US [31]08/994,035

[86]国际申请 PCT/US98/24883 1998.11.20

[87]国际公布 WO99/26479 英 1999.6.3

[85]进入国家阶段日期 2000.7.20

[71]申请人 美国政府农业部

地址 美国华盛顿

共同申请人 华盛顿州州立大学研究基金会

[72]发明人 J·M·拉艾马克斯 D·M·维勒

L·S·托马肖 R·J·库克 黄征宇

D·V·马弗洛蒂

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗宏 谭明胜

权利要求书4页 说明书52页 附图页数7页

[54]发明名称 控制根系病害的生物控制剂

[57]摘要

披露了能有效控制由丝核菌属、禾顶囊壳菌和腐霉属中的一种或几种导致病害的荧光假单胞菌。所述目标生物控制菌株具有独特的基因型,表现在具有特殊的带形上,并表现出根系寄居能力,其特征是,与G_g-抑制型菌株相比,在根上具有较高的群体密度和广泛的寄居能力。另一个特征是,一种菌株再现在全枯病衰减土壤中天然获得的生物控制水平的能力。提供了分离和鉴定所述菌株的方法,以及将其用于控制由G_g导致的病害的用途。还披露了转基因荧光假单胞菌,该细菌具有编码抗生素2,4-二乙酰间苯三酚产生的基因座,和稳定导入其基因组的编码抗生素吩嗪-1-羧酸产生的生物合成基因座。

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

权 利 要 求 书

1. 一种荧光假单胞菌菌株的生物学上纯的培养物，它含有编码 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的生物合成基因座。

2. 如权利要求 1 的生物学上纯的培养物，其中，所述荧光假单胞菌具有稳定导入其基因组中的吩嗪-1-羧酸产生的生物合成基因座。

3. 如权利要求 1 或 2 的生物学上纯的培养物，其中，所述荧光假单胞菌在用引物 M13 通过随机扩增多态 DNA (RAPD) 分析鉴定使具有下列带：600 ± 50bp; 700 ± 50bp; 800 ± 50bp; 900 ± 50bp。

4. 如权利要求 3 的生物学上纯的培养物，其特征还在于具有 330 ± 20bp 和 1100 ± 60bp 的带。

5. 如权利要求 1-4 中一项的生物学上纯的培养物，其中所述菌株的特征还在于具有在大田生长的小型谷类作物或草坪草上抑制由禾顶囊壳菌 (Gg) 真菌导致的病害的能力，所述能力优选相当于当所述小型谷类作物生长在处于全枯病衰减状态的土壤中时所获得的生物控制水平。

6. 如权利要求 1 或 2 的生物学上纯的培养物，其中，所述菌株的特征还在于具有抑制植物上由丝核菌属真菌导致的根系病害的能力。

7. 如权利要求 1 或 2 的生物学上纯的培养物，其中，所述的菌株的特征还在于具有在植物上抑制由禾顶囊壳菌 (Gg) 或腐霉菌属真菌导致的根系病害的能力。

8. 如权利要求 1-4 中一项所述的生物学上纯的培养物，其中，所述菌株的特征还在于具有以至少大约 10^5 菌落形成单位 (CFU) / 克根 (包括相关的根际土壤) 寄居根系的能力，该能力可持续至少 5 个连续的生长周期。

9. 如权利要求 8 的生物学上纯的培养物，其中，所述菌株的根系寄居能力不受土壤类型影响。

10. 如权利要求 1 的生物学上纯的培养物，其中，所述荧光假单胞菌菌株具有荧光假单胞菌 NRRL B-21806、NRRL B-21807、NRRL B-21808、NRRL B-21905、NRRL B-21906、NRRL B-21907、或 NRRL B-21908 的识别特征。

11. 如权利要求 1 的生物学上纯的培养物，它还包括一种农业载

体。

12. 一种用于筛选细菌以便选择具有权利要求 1 或 3 的特征的菌株的方法，该方法包括：

(1) 在天然全枯病抑制土壤上用连续的生长周期栽培小型谷类作物或草坪草，以便富集 Ph1-生产荧光假单胞菌，包括以下步骤：(a) 在温室中在处于全枯病衰减状态的土壤（TAD 土壤）上生长小型谷类作物或生产草坪草的种子至少 3 周，生产条件为能有效支持所述小型作物或草坪草生长以便获得幼苗；(b) 收集所述土壤和生长在该土壤上的小型谷类作物或草坪草幼苗的根系，并将其混合在一起；(c) 一共重复步骤 (a) 至 (b) 至少 4 个连续的周期，其中，将步骤 (b) 的混合物用于在随后的周期中种植种子；

(2) 从在步骤 (1) 中连续栽培的小型谷类作物或草坪草的根系和相关的根际土壤中分离潜在的抑制性荧光假单胞菌菌株，让所述菌株在使假单胞菌有效生长的条件下；在假单胞菌属筛选培养基上生长 1 次，并选择生长在该培养基上的假单胞菌；

(3) 对步骤 (2) 中分离的菌株进行筛选，通过让所述菌株的菌落与 2, 4-二乙酰间苯三酚特异性探针杂交并筛选能与该探针杂交的菌株，选择含有编码 2, 4-二乙酰间苯三酚（Ph1）产生的生物合成基因座的菌株；

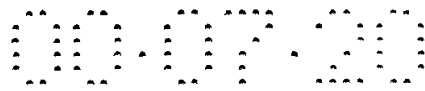
(4) 用引物 M13 进行随机扩增多态 DNA 分析，并选择具有下列带的菌株作为 Gg 抑制菌株： $600 \pm 50\text{bp}$ ； $700 \pm 50\text{bp}$ ； $800 \pm 50\text{bp}$ ； $900 \pm 50\text{bp}$ 。

13. 如权利要求 12 的方法，在步骤 (3) 和 (4) 之间还包括一个步骤，该步骤包括用扩增具有 Ph1 生物合成基因座的序列的引物证实 Ph1 生产菌株，并选择能产生阳性 PCR 反应的菌株。

14. 一种用于在易感由丝核菌属、腐霉菌属、或禾顶囊壳菌真菌(Gg)导致的根系病害的植物上控制所述根系病害的方法，该方法包括在有效生物控制量的权利要求 1-4 中一项的荧光假单胞菌菌株的培养物的条件下生长所述植物。

15. 如权利要求 14 的方法，其中，所述植物选择下列一组：小型作物、草坪草或粮食、纤维或观赏植物。

16. 如权利要求 14 的方法，其中，用有效 Gg-生物控制量的所述



菌株处理用于生长所述小型谷类作物或草坪草的土壤或开沟，然后在种植。

17. 如权利要求 14 的方法，用一种细菌处理溶液处理所述草坪草，该溶液含有有效 Gg-生物控制量的所述菌株，和一种合适的液体载体。

18. 如权利要求 14 的方法，所述荧光假单胞菌属菌株是具有 NRRL B-21806、NRRL B-21807、NRRL B-21808、NRRL B-21905、NRRL B-21906、NRRL B-21907、或 NRRL B-21908 的识别特征的荧光假单胞菌菌株。

19. 如权利要求 15 的方法，其中，所述种子具有大约 10^2 - 10^6 CFU/种子的浓度。

20. 如权利要求 17 的方法，所述处理溶液具有大约 10^8 - 10^{10} CFU/ml 溶液的浓度。

21. 如权利要求 14 的方法，将所述植物的根系浸入一种细菌悬浮液中，其浓度为 10^2 - 10^5 CFU/ml 悬浮液。

22. 一种用于控制在易感由丝核菌属、腐霉菌属、或禾顶囊壳菌真菌 (Gg) 导致的根系病害的植物上所述根系病害的农用组合物，该组合物含有一种合适的载体和有效生物控制量的权利要求 1-4 中一项所述的荧光假单胞菌菌株的生物学上纯的培养物。

23. 如权利要求 22 的农用组合物，其中，所述载体选择下列一组：水、缓冲液、甲基纤维素、泥炭、和蛭石。

24. 如权利要求 22 的农用组合物，其中，所述菌株的浓度为大约 10^8 - 10^{10} CFU/ml 液体载体，或 10^7 - 10^9 CFU/克固体载体。

25. 如权利要求 22 的农用组合物，其中，所述荧光假单胞菌属菌株是具有 NRRL B-21806、NRRL B-21807、NRRL B-21808、NRRL B-21905、NRRL B-21906、NRRL B-21907、或 NRRL B-21908 的识别特征的荧光假单胞菌菌株。

26. 一种小型谷类作物的种子，在它上面施用了有效生物控制量的权利要求 1-3 中任一项所述的生物学上纯的培养物。

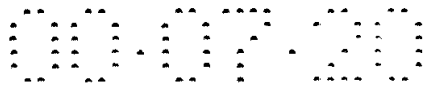
27. 如权利要求 26 的种子，其中，所述种子具有大约 10^2 - 10^5 CFU/种子的浓度。

28. 一种用于制备具有权利要求 1 或 2 所述特征的转基因荧光假单胞菌菌株的方法，该方法包括：

(1) 将包括吩嗪-1-羧酸基因座的基因克隆到一个启动子的控制之下，该基因座编码吩嗪-1-羧酸的产生。

(2) 在一种输送系统中构建可转座拷贝的所述克隆的吩嗪-1-基因座，该系统具有介导将吩嗪-1-羧酸基因座稳定插入受体荧光假单胞菌菌株的能力，并将所述输送系统置入一种供体细菌菌株；和

(3) 通过细菌接合，将所述输送系统从所述供体细菌菌株稳定地插入一种受体亲本荧光假单胞菌属菌株，该亲本菌株含有编码 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的生物合成基因座，并在用引物 M13 进行随机扩增多态 DNA 分析鉴定时具有下列带： $600 \pm 50\text{bp}$ ； $700 \pm 50\text{bp}$ ； $800 \pm 50\text{bp}$ ； $900 \pm 50\text{bp}$ ，以便获得荧光假单胞菌的转化的菌株，该转化菌株具有稳定导入其基因组中的编码吩嗪-1-羧酸产生的生物合成基因座，它还含有编码 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的生物合成基因座。



说明书

控制根系病害的生物控制剂

本发明背景

5 1. 本发明领域

本发明涉及用荧光假单胞菌菌株对由丝核菌属、禾顶囊壳菌 (Gaeumannomyces graminis) 和腐霉属中的一种或几种导致的植物根系病害的生物控制, 特别是使用对小型谷类作物具有独特的根系寄居能力, 和对小型谷类作物的根腐病和草坪草的全枯斑具有生物控制活性的菌株。本发明还涉及生物控制菌株的分离和鉴定, 该菌株含有编码抗生素 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的生物合成基因座, 和表现为特殊带形的特殊基因型, 并涉及另外额外具有编码稳定导入其基因组的抗生素吩嗪-1-羧酸产生的生物合成基因座的菌株。本发明还包括制备所述转基因菌株的方法, 以及将其用于控制植物根系病害的用途。

15 2. 现有技术说明

由丝核菌属、腐霉属和禾顶囊壳菌导致的根系病害, 在世界范围内对重要作物的生产产生了显著的不利影响, 并由于作物产量的减少而导致重大经济损失。由土传真菌禾顶囊壳菌 (Gg) (特别是小麦变种 (Ggt)) 导致的根系病害全枯病、由立枯丝核菌 (Rhizoctonia solani) 和稻枯斑丝核菌 (R. oryzae) 导致的丝核菌根腐病、和由若干腐霉菌中的任一种, 尤其是 Pythium ultimum 和 P. irregulare 导致的腐霉菌根腐病, 在世界范围内是诸如小麦、大麦、triticale 和黑麦之内的小型谷类作物的重要根系病害。

丝核菌属是真菌担子菌纲的一个成员, 它能在世界范围内导致大部分粮食、纤维、和观赏植物的根和茎上的根腐病, 所述植物包括小型谷类作物、草坪草、芦笋、canola、玉米、甜菜、烟草、马铃薯、稻、菜豆、大豆、草莓、小西葫芦和棉花。由丝核菌属导致的小型作物的根腐病发生在美国西北太平洋地区、澳大利亚、南非, 并有可能发生在世界上种植小型谷类作物的所有温带地区, 特别是如果进行省耕或不整地 (直接条播) 种植时尤其如此。由立枯丝核菌 AG8 导致的丝核菌根腐病最初是以褐色溃疡斑形式出现在种子根和冠根上, 环切并断开所述根。被这种病害断掉根系的植物保持矮化, 不抽穗就死亡。所述病害倾向于以斑

痕形式影响植物，并有其他名称，如裸斑病、紫斑、crater 病，以及大
 麦矮化病。在所有小型谷类作物中，大麦尤其易感立枯丝核菌 AG8。稻
 枯斑丝核菌感染发芽种子的胚胎，阻止发芽或限制种子根的形成，只有
 1 或 2 条根，而健康的幼苗能产生 5 或 6 个种子根。以上两种丝核菌以
 5 及禾本科丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 以及其他可能的丝核菌以不
 同混合形式存在，这要取决于土壤、耕作制度、杂草控制方法、以及尚
 未确定的其他可能的因素。

腐霉菌的上传病原体复合物包括一类真菌，这一类真菌是农业土壤
 中的所有寄生者中最成功的一类。据估计，在世界上几乎所有耕作过的
 10 土壤中都含有至少 1 种、2 种、3 种、甚至高达 10 种腐霉菌的孢子。腐
 霉菌属是卵菌纲的一员，它与丝核菌属相似，能感染世界上几乎所有的粮
 食、纤维、和观赏植物。这些植物的例子如上文所述。腐霉菌属对小型谷
 类作物的损害始于胚胎感染，并与出苗率或群丛形成较差相关，并继续
 到对细小的侧面支根和根毛造成破坏。具有腐霉菌根腐病的植物在外观
 15 上与施肥不足的植物相似，因为所述病害通过破坏细小的支根和根毛而
 限制其根系的吸收能力。有若干腐霉菌具有感染禾谷类的能力，它能感
 染发芽中的种子的胚胎、根端和细支根，或所有细小的以及通常为新生
 的分生组织。

小型谷类作物和草坪草的传播性病害是由上传真菌禾顶囊壳菌
 20 (*Gg*) 引起的，这种真菌是真菌的子囊菌纲的一员，并会由于作物产量
 的减少而导致大的经济损失。全枯病是一种由顶囊壳小麦变种 (*Ggt*)
 引起的病害，发生在世界上所有小麦种植区，并可能是世界范围内小麦
 以及相关的小型谷类的最重要的根系病害。小麦全枯病的症状包括出现
 在根系上的黑色长形溃疡，在严重的情况下，整个根系都有可能因病而
 25 变黑，所述真菌会迁移到小麦植株的冠部（冠根从这里产生）和分蘖上
 （茎）。在大田中可以根据其白色果穗确认严重感染的小麦植株，这一
 结果是当所述真菌感染其冠部时切断了水分向植株上部的输送而导致植
 株提前死亡所致。产量损失相当大，可高达潜在的小麦产量的 50%。没
 有抗性小麦栽培品种，并且注册过的杀真菌剂其作用不一致。另外，种
 30 植者正面临着日益增加的最低限度的整地或不整地种植小麦的挑战，以
 便减少土壤流失。这些措施增加了全枯病和其他根系病害的严重性。尽
 管小麦特别易感全枯病真菌，诸如大麦、黑麦和 triticales 的很多其他

禾本科植物也会受到感染。

5 传统上，全枯病是通过轮作和整地的结合而进行控制的，这些措施能减少接种所述病原体的可能性。不过，由于长期的轮作通常在经济上是不合算的，并且耕作会造成土壤流失。谷类生产的趋势是较少整地，并且在种植小麦作物 2 或 3 次之后就休耕。这两种措施都加重了全枯病。在小麦上还没有抗全枯病的遗传学抗性资源，化学控制方法也很有限。让农业变得更加可持续发展，并且较少依赖化学杀虫剂的要求，使得有必要开发控制全枯病和其他上传病害的替代方法。

10 业已鉴定了其他 Gg 真菌，例如感染燕麦和牧草的禾顶囊壳菌燕麦变种 (Gga)，它能在诸如剪股颖的草坪草上导致全枯斑。禾顶囊壳菌禾本科变种 (Ggg) 能感染某些牧草，并提出能在稻上导致冠鞘腐烂病。

15 所有的农业土壤都表现出一定程度的对 Ggt 和其他土传病原体的拮抗性。这种拮抗性被称为“一般抑制性”(N.Gerlagh, 荷兰植物病理学杂志 74: (增补 2) 1-97 (1968)) 或“一般拮抗性”(D.Hornby, 植物病理学年度综述, 年度综述公司, Palo Alto, CA (1983) 65-85 页)。一般拮抗性是由土壤中整个微生物活性所导致的。另外，在某些场合下形成的对 Ggt (被称为全枯病衰减) 的“特殊”(生物学控制) 超过了“一般抑制”，并且会导致对全枯病的几乎完全控制。全枯病的衰减 (TAD) 是对全枯病的生物学控制，被定义为在长期单一种植诸如小麦和大麦的
20 Ggt-易感小型谷类作物时病害的自动减轻和产量的增加。第一次发现 TAD 是在 50 年以前，现在已被认识到是一种世界性的现象。就栽培小麦、大麦和其他小型谷类的广泛的土壤类型、气候、和农艺条件而言，TAD 在世界范围内的相似性是十分突出的。大田研究业已表明，在所有地方 TAD 的形成遵循一定的模式，连续栽培一种小型谷物，并存在全枯病病原
25 原体。诸如土壤类型和以前的耕作历史的因素似乎只能调节 TAD 形成的程度和速度。尽管事实上全枯病衰减了，大多数种植者提前放弃了单一种植，因为过渡期的损失相当大。不过，一旦形成 TAD，TAD 可以恢复产量并且只要单一种植继续就一直持续下去。TAD 的实际利用，提供了作为全枯病的天然生物学控制的潜力。不过，为了达到这一目的，有必
30 要确定决定 TAD 的机制并加以应用。然而，迄今为止的研究大多是示意性的，还不完全理解任何特定的 TAD 现象。在建立的草坪上出现了由 Gga 导致的全枯病斑的类似的衰减。

为了确定控制天然全枯病抑制的机制，业已对 TAD 进行了深入的研究。用于解释这种现象的最流行的理论包括土壤微生物学状态的改变，拮抗性细菌的形成，所述真菌致病性和群体的改变，以及保护性真菌的出现 (D. Hornby, “全枯病衰减：理论家乐园”，土传植物病原体，
 5 B. Schippers 和 W. Gams 著，学术出版社，纽约 (1979)，133-156 页和 D. Hornby, 植物病理学年度综述，年度综述公司，Palo Alto, CA (1983)，65-85 页)，Hornby 对以上解释进行了综合，并得出这样的结论：任何一种单一的机制都不能解释世界范围内的 TAD，并且这一观点业已被土壤病害抑制领域的工作者普遍接受。

10 对 TAD 的最普遍的解释是基于全枯病病原体和特殊的拮抗性根系相关微生物相互作用 (R. J. Cook 和 A. D. Rovira, 土壤生物学和生物化学 8: 269-273 (1976))。有几种类型的证据支持微生物拮抗性在 Ggt 的抑制中的作用。例如，可以通过将少量 (1-10%w/w) 的 TAD (抑制性) 土壤掺入全枯病传导性土壤中转移其抑制作用。另外，通过湿加
 15 热对土壤进行巴氏灭菌 (60℃, 30 分钟)，通过用甲基溴对土壤进行熏蒸或通过种植不是所述病原体的宿主的作物可以消除 TAD 土壤的抑制作用。

对涉及 TAD 的微生物拮抗作用的研究集中在试图鉴定特殊的 Ggt-拮抗性微生物和将所述生物转移到土壤中以便再现抑制性。业已对多种
 20 微生物进行了实验，所得到的流行的看法是在不同的 TAD 土壤之间，其作用的具有菌株不同。Cook 和 Rovira, 1976, 同上，最初假设在拮抗性微生物中，荧光假单胞菌在 TAD 中起着关键作用。美国专利号 4, 456, 684 披露了能抑制由全枯病和其他 Gg 真菌导致的病害的假单胞菌菌株，以及筛选和应用所述菌株的方法。

25 很多最有效的菌株能产生抗生素 2, 4-二乙酰间苯三酚 (Ph1) (C. Keel 等, 应用和环境微生物学 62: 552-563 (1996))。Ph1 是一种酚类代谢物，具有抗多种细菌、病毒和包括全枯病病原体在内的真菌的活性，包括 (参见 L. S. Thomashow 和 D. M. Weller, G. Stacey 和 N. T. Keen (著) 植物-微生物相互作用, I 卷, Chapman&Hall 公司,
 30 伦敦, 187-236 (1996)。据 J. M. Raaijmakers 等 (应用和环境微生物学 63: 881-887 (1997)) 报导，产生 Ph1 的荧光假单胞菌存在于种植在来自华盛顿州 (美国) 的三种 TAD 土壤上的小麦的根系上。在从靠

近 TAD 大田的地方采集的全枯病传导性土壤中，未检测到产生 Ph1 的
 荧光假单胞菌或者检测到的密度至少比 TAD 土壤中的密度低 40 倍。
 尽管微生物生物控制剂的应用在作为土传病原体的实用工具方面具有
 美好前景，但公开或获得专利权的用于全枯病的生物控制剂都具有作
 用不一致的缺陷，对土壤具有专一性，并且不能一致地再现在 TAD 土
 壤中观察到的控制水平。迄今为止实验过的微生物都未能表现出预期
 的与 TAD 相关的菌株的病害控制能力。因此，尚没有全枯病的生物控
 制剂被商业化这一事实一点也不另人吃惊。需要的是全枯病的有效生
 物控制剂，它能再现 TAD 土壤的抑制作用，并且独立于土壤类型地起
 作用，并且稳定地起作用。

控制全枯病和丝核菌根腐病的病原体通过其寄生活性以菌丝或菌丝
 体的形式存活于它所寄居的宿主植物的组织中。腐霉菌以厚壁卵孢子或
 孢子囊形式存活于土壤中，所述卵孢子或孢子囊是通过寄生从植物中掠
 夺的养分中产生的。通常，以上三种病害同时出现在同一个植株上，不
 过有一种根系病害占优势。

尽管腐霉菌在种植小型谷物的农业土壤中是普遍存在的，但由腐霉
 菌对小型谷物造成的损害，例如，出苗率和植物活性的降低在保持潮湿
 的土壤中最大，特别是如果所述土壤同时天然具有高的粘土含量并且 pH
 值低于 6.0 的话更是如此。在收获一种作物之后容许自生谷物（由收割
 机降落或掉落在土壤表面上的种子形成的植物）在大田中生长直到在播
 种下一茬作物之前 1 或 2 天，然后喷洒诸如 glyphosate (Round-up®,
 Monsanto) 的除草剂，控制杂草，但十分有利于腐霉属根腐病和丝核菌
 属根腐病。将小麦直接播种到前茬小麦作物残留的茎中，通过喷灌保持
 土壤湿润，或者留下茎秆覆盖土壤，有利于所有三种根系病害的发生。

小麦、大麦、和其他作物的很多病害是通过培育具有对所述病原体
 有抗性的作物而控制的，不过，该方法主要适用于小麦、大麦、triticale
 或黑麦的叶片病害，而不适用于其根系病害。对全枯病和丝核菌根腐病
 的唯一已知的抗性资源是一种亲源关系很远的二倍体 *Daysapyrum*
villosum，但它们的亲源关系太远使得该抗性资源太远没有用处，因为
 在分类学上如此远的亲源关系之间进行基因转移是困难的。目前，在
 世界范围内还没有对全枯病、丝核菌根腐病、或腐霉菌根腐病有抗性的
 商业化小麦、大麦、黑麦或 triticale。

对植物上的真菌病原体进行生物控制的方法包括具有病原体专一性活性的假单胞菌的菌株。美国专利号 4456684 披露了能抑制由全枯病和其他 Gg 真菌导致的病害的假单胞菌菌株。对涉及全枯病衰减微生物拮抗性的研究（全枯病的一种天然生物控制，被定义为长期单一种植诸如小麦和大麦的 Ggt-易感型小型谷类作物时病害的自主减轻，以及产量的提高）集中在试图鉴定特殊的 Ggt-拮抗微生物和将这种微生物转移到土壤中以便再现抑制作用。最有效的菌株都能产生抗生素 2, 4-二乙酰间苯三酚 (Ph1) (C. Keel 等, 应用和环境微生物学 62: 552-563 (1996)). J. M. Raaijmakers 等 (应用和环境微生物学 63: 881-887 (1997)) 报导, 产生 Ph1 的荧光假单胞菌存在于种植在来自华盛顿州 (美国) 的三种 TAD 土壤上的小麦的根系上。尽管微生物生物控制剂的应用在作为土传病原体的实用工具方面具有美好前景, 但公开或获得专利权的用于全枯病的生物控制剂都具有作用不一致的缺陷, 对土壤具有专一性, 并且不能一致地再现在 TAD 土壤中观察到的控制水平。

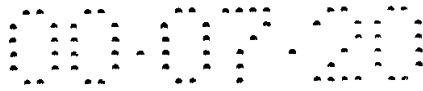
美国专利号 4647533 报导了能抑制由腐霉属导致病害的假单胞菌菌株。业已报导了能在棉花上抑制立枯丝核菌或 *Pythium ultimum* 的假单胞菌菌株。(参见授予 Howell 等的美国专利号 5348742)。业已报导了芽孢杆菌 L324-92 能同时控制禾顶囊壳菌、丝核菌和腐霉菌 (Kimm 等植物病理学 87: 551-558 (1997))。不过, 尚未报导有单一的假单胞菌菌株能有效控制所有三种上述病原体。

本发明概述

我们分离了用于控制由诸如土传真菌禾顶囊壳菌 (Gg) 在小型谷类作物和草坪草上导致的病害的特殊的生物控制剂。本发明包括荧光假单胞菌的特殊菌株, 该菌株能在低剂量下抑制 (抑制发病率或降低发病率或严重程度) 由诸如全枯病 (take all) 的 Gg 导致的病害, 并且其根系寄居能力大于所有现有的 Gg 生物控制剂。另外, 所述菌株的根系寄居能力和生物控制活性不受土壤类型的影响。

本发明的生物控制剂提供的对由诸如全枯病的 Gg 导致的病害的生物控制一致地大于所有已知生物控制剂的控制能力。另外, 所述菌株具有能够再现在 TAD 土壤中观察到的生物控制水平的其他特殊特征。

本发明的第一方面, 本发明的生物控制剂包括荧光假单胞菌菌株的生物学上纯的培养物, 该培养物含有编码抗生素 2, 4-二乙酰间苯三酚



产生的生物合成基因座，该培养物具有表现为特有的特殊随机扩增多态 DNA (RAPD) 特征的特殊基因型，在低于迄今已知的全枯病抑制微生物 10-1000 倍的剂量水平上具有生物控制活性，并具有良好的根系寄居能力，表现在群体密度增加 10-1000 倍，和延长的寄居活性。我们业已发现，本发明的代表性菌株以平均为每克根（包括根际土壤）至少 10^5 菌落形成单位的群体密度寄居在根系上的能力，至少可保持 7 个连续的生长周期。所述根系寄居能力是没有先例的。而且，所述新型菌株不受土壤类型的影响。

本发明还包括分离和鉴定所述特殊菌株的方法。在图 6 中示出了一种筛选细菌的方案，而筛选方法在下面详细披露。

本发明的另一方面是将所述特殊菌株或含有该菌株的组合物用于对由禾顶囊壳菌导致的植物病害进行生物控制的用途。在被用作种子、土壤、开沟处理剂或浸透剂时，本发明的特殊菌株具有在大田条件下抑制 Gg 的能力。在将所述菌株用于种子或土壤处理时，表现出前所未有的再现相当于天然全枯病衰减的全枯病抑制能力（参见下面的表 1），这一结果以前从来没有出现过。另外，由于所述菌株在低的剂量下能抑制全枯病，所述菌株能以低于现有全枯病生物控制剂将近 10-1000 倍的成本生长和使用。另外，由于所述菌株能控制天然 TAD，预计在大田中只需要使用 1 次。而所有其他全枯病的生物控制剂都需要反复使用。

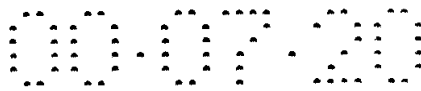
根据本发明，本发明的一个目的是提供荧光假单胞菌的特殊菌株，该菌株提供对于由 Gg 导致的病害的生物控制大于现有生物控制菌株。

本发明的另一个目的是提供其根系寄居能力大于所有已知全枯病生物控制剂的寄居能力（较高的根系群体密度和较长的活性）的生物控制菌株。这一特征特别有价值，因为众所周知，为了抑制诸如全枯病的根系病害，根系寄居能力的提高会导致更高和更持续的生物控制活性。

本发明的另一个目的是提供用于在小型谷物和草坪草上控制由禾顶囊壳菌导致的生物控制剂，该控制剂不受土壤类型影响。

本发明的另一个目的是提供基于 RAPD 分析的方法，用于筛选本发明的具有特殊带型的菌株。

本发明的再一个目的是用本发明的菌株和含有该菌株的农用组合物对小型谷类作物上的全枯病和草坪草上斑点病（patch）进行生物学控



制的方法。

通过下面的说明可以更好地理解本发明的其他目的和优点。

在本发明的第二种实施方案中，我们业已生产了荧光假单胞菌的转化菌株的生物学上纯的培养物，该培养物具有稳定导入其基因组中的编
5 码抗生素吩嗪-1-羧酸产生的生物合成基因座，并且它能抑制由土传病原体丝核菌导致的病害。所述菌株除了能抑制由丝核菌属导致的病害之外，还能选择性地抑制由腐霉属导致的病害或由禾顶囊壳菌（Gg）导致的病害，或者具有控制所有三种病害的能力。

上述第二种实施方案的生物控制剂是通过将编码吩嗪-1-羧酸生物
10 合成基因座稳定地导入荧光假单胞菌的菌株的基因组中而获得的，下面称之为第一实施方案菌株，该菌株含有编码抗生素 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的生物合成基因座，具有表现为特有的特殊随机扩增多态 DNA（RAPD）特征的特殊基因型，并具有上文所述的良好根系寄居能力。

15 在温室实验中筛选转化过的菌株，以便选择具有针对由丝核菌属导致的病害的活性的菌株。还可以选择性地进行温室实验，以便选择同样具有针对由禾顶囊壳菌或腐霉属导致的病害的转化菌株。

在温室筛选实验之前的一个选择性步骤是用转化的菌株对丝核菌属分离物进行体外抑制。

20 因此，所述第二实施方案的生物控制剂提供了对由丝核菌属导致的病害的生物控制，并选择性地提供对由腐霉属和禾顶囊壳菌导致的病害的生物控制。我们业已发现，本发明的代表性转化菌株具有以低的剂量抑制丝核菌根腐病的能力（剂量低至 10^2 菌落形成单位（cfu）/种子）。另外，我们还发现所述代表性菌株还保留了所述第一实施方案菌株的抑
25 制其他根系病害的能力，如由禾顶囊壳菌或腐霉属导致的病害。因此，本发明的代表性菌株具有针对三种重要的植物根系病害-丝核菌、腐霉菌、和禾顶囊壳菌的活性。

本发明的另一方面是将所述特殊菌株或含有该菌株的组合物用于植物根系病害的生物控制的用途。在被用作种子、土壤、开沟处理剂或浸
30 泡剂时，本发明的特殊菌株具有在大田条件下抑制由丝核菌属导致的病害的能力，并可选择性地抑制由腐霉属或顶囊壳导致的病害。

另外，本发明的生物控制剂可被用于制备生物控制混合物，该混合

物包括至少一种本发明的转基因菌株，并且包括一种或几种其他生物控制菌株，例如，本发明的其他转基因菌株；本发明第一实施方案的菌株，或其他生物控制菌株。本发明提供了含有至少一种本发明的生物控制菌株的农用组合物，该组合物可用于控制至少一种植物根系病害。

5 通过下面的说明可以更好地理解本发明的其他目的和优点。

附图的简要说明

图 1 是表示荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 菌株 Q8r1-96, ML4.9-96, 和 L5.1-96 的带型 (RAPD) 的照片。泳道 1 表示作为参考的 1kb 梯带。

10 图 2-4 表示本发明荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96 与荧光假单胞菌菌株 M1-96 和 Q2-87 (不是本发明的菌株) 分别在 Quincy 未垦土壤、Lind 未垦土壤、和 Moses 湖未垦土壤寄居能力的比较。

图 5 表示本发明荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96 在 Quincy 未垦土壤、Lind 未垦土壤、和 Moses 湖未垦土壤上的寄居能力。

15 图 6 表示与 *tac* 启动子连接的吩嗪生物合成基因座的物理图谱。箭头表示编码吩嗪生物合成的基因及其转录方向。符号 P_{tac} 表示 *tac* 启动子的位置和方向。

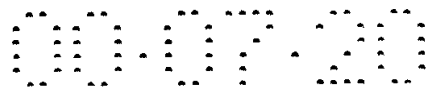
图 7 表示 pUTKm: *phz* 质粒的物理图谱。划斜线的部分表示吩嗪生物合成基因。卡那霉素抗性决定子的转录位置和方向用空心方框表示。

20 带 X 的小方框表示 Tn5 19-bp 末端的位置。

本发明的详细说明

本发明的生物控制剂。本发明的生物控制剂含有至少一种荧光假单胞菌的生物学上纯的菌株。在本发明的第一种实施方案中，该菌株具有下列识别特征：该菌株含有编码 2, 4-二乙酰间苯三酚的产生的生物合成基因座；它具有特殊的基因型，表现为在下面将要详细描述的并且在图 1 示出的特殊带形；它能抑制由 Gg 在大田生长的小型谷类作物或草坪草上导致的病害；并且具有根系寄居能力，其特征是与已知的 Gg 抑制菌株相比具有较高的群体密度和较长的寄居活性。

30 优选地，所述菌株优选具有下面的其他识别特征：其生物控制活性（病害抑制能力）和根系寄居能力不受土壤类型的影响和/或它在小型谷类作物上对 Gg 的抑制相当于当该小型作物种植在全枯病衰减状态的土壤中所获得的生物控制水平，就是说它能再现在全枯病衰减土壤上



出现的生物控制水平。

本发明第一种实施方案的菌株的例子是荧光假单胞菌菌株荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96、ML4.9-96, 和 L5.1-96。

在本发明的第二种实施方案中, 所述生物控制剂含有至少一种荧光假单胞菌的生物学上纯的菌株, 该菌株具有下列识别特征: 该菌株具有稳定整合到其基因组上的抗生素吩嗪-1-羧酸的产生的生物合成基因座; 它保留了上述第一种实施方案菌株的编码 2, 4-二乙酰间苯三酚的产生的生物合成基因座; 并且它能抑制由土传丝核菌属病原体导致的病害。该菌株除了能抑制由丝核菌属导致的病害之外, 还可选择性地抑制由腐霉菌导致的病害或由禾顶囊壳菌 (Gg) 导致的病害, 或具有针对所有三种根系病害的生物控制活性 (病害抑制能力)。

本发明第二种实施方案的菌株的例子是荧光假单胞菌菌株 Z30-97; Z32-97; Z33-97; 和 Z34-97。

特有的带型。本发明第一种实施方案的生物学上纯的荧光假单胞菌菌株具有特有的带型。这一特征可以通过用引物 M13 进行的 RAPD 分析鉴定, 如下面的例 1 所披露的。图 1 表示荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96、ML4.9-96, 和 L5.1-96 的带型 (RAPD), 所述菌株是本发明的代表性菌株。泳道 1 表示作为参考的 1kb 梯带。如图 1 所示, 所述菌株具有的带有: $330 \pm 20\text{bp}$; $600 \pm 50\text{bp}$; $700 \pm 50\text{bp}$; $800 \pm 50\text{bp}$; $900 \pm 50\text{bp}$; 和 $1100 \pm 60\text{bp}$ 。 $800 \pm 50\text{bp}$ 的带最强。

对于第一种实施方案来说, 在使用下面例 1 中所述的条件下, 如果一个菌株具有下列带的话, 该菌株就具有本发明特有的带型: $600 \pm 50\text{bp}$; $700 \pm 50\text{bp}$; $800 \pm 50\text{bp}$; $900 \pm 50\text{bp}$ 。在一种优选实施方案中, 所述菌株还具有 $330 \pm 20\text{bp}$ 和 $1100 \pm 60\text{bp}$ 的泳带。

鉴定一种菌株是否具有第一种实施方案的特有带型的另一种方法是在琼脂糖凝胶上用荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96 和实验菌株进行并排比较, 并用肉眼比较大约 600 ± 50 和 $900 \pm 50\text{bp}$ 之间的带。如果实验菌株的特征与菌株 Q8r1-96 的特征在这一范围内吻合的话, 则该实验菌株就具有本发明所包括的特有的带型。

鉴定一种转化的菌株是否具有第一种实施方案的特有带型的另一种方法, 是在琼脂糖凝胶上用第一种实施方案的代表性菌株荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96, 实际的第一种实施方案的菌株、或诸如 Z34-97 的本发明

代表性菌株和实验菌株进行并排比较,并用肉眼比较大约 600 ± 50 和 $900 \pm 50\text{bp}$ 之间的带。如果实验菌株的特征与第一种实施方案的代表性菌株 Q8r1-96、实际的亲本菌株或本发明的代表性菌株的特征在这一范围内吻合的话,则该实验菌株就具有本发明所包括的特有的带型。

5 在本发明的第二种实施方案中,所述转化菌株优选具有下列其他鉴定特征:它保留了编码 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的亲本或第一种实施方案菌株的带型中的至少 4 个特殊的带。第二种实施方案的转化菌株具有与所述亲本或第一实施方案菌株相同的识别的特有带型。所述特征可以通过下面的第 5 和 11 中所述的用引物 M13 进行的随机扩增多态 DNA
10 (RAPD) 分析鉴定。图 1 表示荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96、ML4.9-96, 和 L5.1-96 的带形 (RAPD), 所述菌株是本发明的第一种实施方案的代表性菌株。泳道 1 表示作为参考的 1kb 梯带。如图 1 所示,第一种实施方案的代表性菌株所具有的带有: $330 \pm 20\text{bp}$; $600 \pm 50\text{bp}$; $700 \pm 50\text{bp}$; $800 \pm 50\text{bp}$; $900 \pm 50\text{bp}$, 和 $1100 \pm 60\text{bp}$ 。在 $800 \pm 50\text{bp}$ 的带最强。

15 转化菌株 Z32-97; Z33-97, 和 Z34-97 具有下列与其亲代荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96 相同的带: $330 \pm 20\text{bp}$; $600 \pm 50\text{bp}$; $700 \pm 50\text{bp}$; $800 \pm 50\text{bp}$; $900 \pm 50\text{bp}$, 和 $1100 \pm 60\text{bp}$ 。

 转化的菌株 Z30-97 具有与其亲本菌株 Q8r1-96 相同的下列带: $600 \pm 50\text{bp}$; $700 \pm 50\text{bp}$; $800 \pm 50\text{bp}$; $900 \pm 50\text{bp}$ 。

20 对于本发明来说,如果一种转化的菌株在使用下面实施例的 5 或 11 所述的条件下具有下列带的话,该菌株具有所述代表性亲本菌株的特有带型: $600 \pm 50\text{bp}$; $700 \pm 50\text{bp}$; $800 \pm 50\text{bp}$; $900 \pm 50\text{bp}$ 。在一种优选实施方案中,所述转化菌株还具有 $330 \pm 20\text{bp}$ 和 $1100 \pm 60\text{bp}$ 的带。

 生物控制活性。本发明第一种实施方案的生物学上纯的荧光假单胞
25 菌菌株具有抑制(抑制发病或降低发病率或严重度)由 Gg 在小型谷类作物或草坪草上导致的病害,如全枯病的能力。下面实施例中的表 1、2 和 4 提供了表示生物控制活性的数据。如下列例 3 中的表 2 所示,菌株 Q8r1-96 在大田中能使小麦植株感染全枯病的百分比降低 20%。如下面
30 例 4 中的表 4 所示,在种植小麦 9 轮之后,菌株 Q8r1-96 表现出对全枯病的减弱接近荧光假单胞菌菌株 Q2-87(一种已知的抑制性 Ph1-产生菌株)的 2 倍。如下文所述, Q8r1-96 能再现 TAD 土壤的生物控制能力。

 本发明的生物学上纯的 Q8r1-96 具有稳定插入其基因组上的编码抗

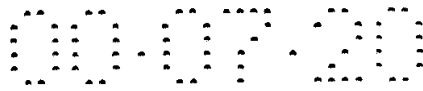
生素吩嗪-1-羧酸的产生的生物合成基因座，并具有抑制（抑制发病或降低发病率或严重度）由土传丝核菌属病原体导致的病害。所述菌株除了能抑制由丝核菌导致的病害之外，还能抑制由腐霉菌导致的病害或由禾顶囊壳菌导致的病害，或具有控制所有三种病害的能力。

5 在下面的实施例 8 的表 6、7 和 8 中提供了表示生物控制活性的数据。如图 6 所示，转化的菌株 Z30-97、Z32-97 和 Z34-97 在 10^2 - 10^3 cfu/种子的剂量下与相似剂量的亲代菌株 Q8r1-96、荧光假单胞菌菌株 2-79（吩嗪-1-羧酸基因的来源）和两种非处理的对照相比能降低小麦根系受立枯丝核菌 AG8 感染的百分比。只有当 Q8r1-96 以较大剂量使用时，
10 亲代菌株 Q8r1-96 在抑制丝核菌属方面的能力与 Z30-97 和 z32-97 相当。如下面实施例 8 中的表 7 所示，在抑制腐霉菌属方面，剂量为 10^2 cfu/种子的菌株 Z34-97 与剂量为 10^3 cfu/种子的亲本菌株 Q8r1-96 同样有效。如下面的例 8 中表 8 所示，能产生对禾顶囊壳菌小麦变种（Ggt）的明显抑制作用。如下面实施例 8 中表 4-8 所示，Z34-97 能抑制所有三
15 种根系病害。

寄居能力。上述第一种实施方案的生物学上纯的荧光假单胞菌菌株具有特殊的寄居能力。其特征是与已知的抑制性菌株相比，具有（a）在根系上具有较高的群体密度和（b）较长的寄居活性。就是说本发明的菌株具有寄居并存在于小型谷物的根系上的能力。如下面的实施例所
20 示，本发明的菌株具有以平均为至少为大约 10^5 菌落形成单位（cfu）/克根（包括相关的根际土壤）的群体密度寄居根系的能力，可以持续至少 7 个连续的生长周期。图 2 表示在 Quincy 未垦土壤上在 9 轮小麦种植期间 Q8r1-96 在小麦（品种 Penawawa）根系上的寄居。到 5 轮时，Q8r1-96 的群体密度比荧光假单胞菌菌株 Q2-87 和 M1-96（不是本发明的菌株）的群体密度高将近 1000 倍。在图 3 和 4 中，Land 和 Moses 湖
25 未垦土壤上 Q8r1-96 也表现出明显较大的群体密度。

对本发明来说，如果第一种实施方案的菌株在下面的例 4 中所述的生长条件下能在至少 5 个连续的生长周期中以至少大约 10^5 CFU/克根（包括相关的根际土壤）寄居小麦根系的话，该菌株就具有所述特有的寄居
30 能力。

所述第二种实施方案的生物学上纯的转基因菌株具有寄居植物种子和根的能力。如下面实施例 9 中的表 9 所示，本发明的代表性菌株在种



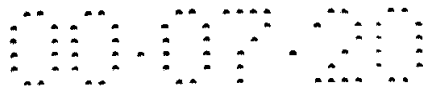
植处理过的种子之后 66 小时和 1 周能达到与其亲本菌株相同的群体密度。

5 不受土壤类型影响，在一种优选实施方案中，本发明的生物控制菌株还具有其他特征，即其生物控制活性和根系寄居能力不受土壤类型影响。如图 5 所示，在第 7 轮中 Q8r1-96 的群体密度不受土壤类型的影响。

10 再现 TAD 土壤的生物控制。本发明生物控制菌株的特征优选还在于具有抑制由 Gg 在小型谷类作物上导致的病害的能力，该能力相当于当所述小型作物种植在全枯病衰减 (TAD) 土壤上时所获得的生物控制水平。就是说该菌株具有再现在全枯病衰减土壤上获得的生物控制水平的能力。如下面实施例 1 中表 1 所示，以 10^4 菌落形成单位 (CFU) / 种子的剂量使用 Q8r1-96，然后播种到 Quincy 未垦土壤 (传导性) 上，在抑制全枯病方面与 Quincy TAD 土壤同样有效。另外，Qr81-96 在 Lind 未垦土壤 (传导性) 上以 10%w/w 的量 Quincy TAD 土壤加入 Lind 未垦土壤中同样有效。这种相当于天然全枯病衰减的全枯病抑制的再现是前
15 所未有的。

20 将抑制性转基因菌株用于植物根系病害的生物控制。将本发明第二种实施方案的转基因微生物菌株用于控制植物根系病害，特别是由土传病原体丝核菌导致的病害，并选择性地控制由腐霉属和禾顶囊壳菌导致的病害。本发明的生物控制剂特别可用于在小型谷类和草坪草上控制根系病害。小型谷类作物的例子包括小麦、大麦、黑麦和 triticale。另外，所述菌株还可用于在易感由土传病原体、丝核菌属、腐霉属或禾顶囊壳菌导致的根系病害的其他粮食、纤维和观赏植物上控制根系病害。所述植物包括芦笋、canola、玉米、甜菜、番茄、马铃薯、豌豆、稻、
25 菜豆、大豆、草莓、小西葫芦、和棉花。

30 为了在一种特定的植物上实现对目标植物根系病害的生物控制，在存在有效抑制量的本发明的一种或几种荧光假单胞菌菌株的条件下种植该植物。有效的生物控制量被定义为相对在未处理过的对照中发生的病害而言能抑制 (抑制发病或降低发病率或严重度) 目标根系病害的生物控制剂的量。假设诸如水、肥料、土壤和气温的因素不会限制目标作物的生长。在特定情况下的有效量可以通过本领域已知的实验方案很方便地加以确定。



生物控制是通过将有效量的生物控制剂喷洒在植物上、植物的种子上或喷洒在植物或种子的局部而实现的。例如，所述菌株可以作为种子、土壤或开沟处理剂或作为草坪或土壤的浸透剂使用。可以使用新鲜的细胞或冷冻干燥的细胞。

5 可将所述菌株掺入适用于需要控制根系病害的植物的组合物中。它可以与不会影响该菌株活性的任何农业上可以接受的载体或合适的农艺上可以接受的载体混合。代表性载体有水、缓冲液、甲基纤维素、碎泥炭或蛭石。其中所述菌株以存在于液体载体中的悬浮液或乳液形式使用，该悬浮液或乳液可选择性地含有常规添加剂，如本领域公知的表面
10 活性剂或湿润剂。本发明的菌株还可以制备成包括其他生物控制菌株，包括本发明第二种实施方案的其他菌株，第一种实施方案的菌株，或本领域公知的菌株。

下面将披露代表性使用方法和代表性有效量。可以通过实验确定在特定场合下的有效用量的范围。

15 对于小型谷类或草坪草或其他粮食、纤维或观赏植物的种子处理来说，将细菌加入含有大约 0.5-2.0% 甲基纤维素的悬浮液中，以便减少所述细菌的干燥并改善对种子的粘着。将所述悬浮液加入种子中并混合，以便以大约 10^2 - 10^5 CFU/种子的用量对每一粒种子进行包衣。一般，优选用量为大约 10^2 - 10^4 CFU/种子。将处理过的种子风干。

20 对于土壤处理来说，将细菌悬浮在水或缓冲液中，并喷洒在土壤上，使每 1 克土壤得到大约 10^2 - 10^5 CFU。对于草坪来说，将所述细菌悬浮在水或缓冲液中，并作为含有大约 10^2 - 10^5 CFU/ml 的浸透剂喷在草上。

25 为了直接处理根系，将根系浸入大约 10^2 - 10^5 CFU/ml 悬浮液的细菌悬浮液中。

当所述载体是固体，例如，泥炭或蛭石时，典型的制剂是大约 10^6 - 10^9 CFU/克载体。当载体是液体时，典型的制剂为大约 10^8 - 10^{10} CFU/ml 载体。对于冷冻干燥的制剂来说，典型的用量为大约 10^{10} - 10^{11} CFU/克制剂。冷冻干燥的制剂可以含有本领域公知的添加剂。

30 筛选方法。本发明的第一种实施方案还包括筛选本发明特殊的荧光假单胞菌菌株的方法。采用我们的方法，获得了具有上述特征的微生物菌株。简单地讲，我们的方法包括以下步骤：(1) 在全枯病抑制土壤（例

如，处于全枯病衰减状态的土壤）上用连续的生长周期栽培小型谷类作物或草坪草，以便富集编码含有 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的生物合成基因座的荧光假单胞菌（又被称为产生 Ph1-的荧光假单胞菌）；（2）分离潜在的抑制性荧光假单胞菌菌株；（3）筛选所分离的菌株，以便选择含有编码 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的生物合成基因座的菌株，通过与 2, 4-二乙酰间苯三酚特异性 DNA 探针进行菌落杂交检测 Ph1 生产菌；和（4）利用 RAPD 分析筛选具有上述特殊带型的菌株。在步骤（3）之后可以增加一个选择性的步骤，以便证实 Ph1 的产生。

以下是本发明筛选方法的更详细的说明。

10 步骤 1. 用连续的生长周期富集 Ph1 生产菌。

在该步骤中，在天然全枯病抑制性土壤上用连续的生长周期栽培小型谷类作物或草坪草，以便富集 Ph1-产生荧光假单胞菌，方法如下：（a）在温室中在处于全枯病衰减状态的土壤（TAD 土壤）上生长小型谷类作物或草坪草的种子至少 3 周，生产条件为能有效支持所述小型作物或草坪草生长以便获得幼苗；（b）收集所述土壤和生长在该土壤上的小型谷类作物或草坪草幼苗的根系，并将其混合在一起；（c）一共重复步骤（a）至（b）至少 4 个连续的周期，其中，将步骤（b）的混合物用于在随后的周期中种植种子。

步骤 2. 从在 TAD 土壤中循环的根系中分离荧光假单胞菌。

20 在该步骤中，从在步骤（1）中连续栽培的小型谷类作物或草坪草的根系和相关的根际土壤中分离潜在的抑制性荧光假单胞菌菌株，让所述菌株在假单胞菌属筛选培养基上生长 1 次，并在生长在该培养基上的假单胞菌和筛选菌株能有效生长的条件下进行。

步骤 3. 与特异性探针进行菌落杂交，以便检测 Ph1 生产菌。

25 在该步骤中，对步骤 2 中分离的菌株进行筛选，以便选择含有编码 2, 4-二乙酰间苯三酚（Ph1）产生的生物合成基因座的菌株，通过让所述菌株的菌落与 2, 4-二乙酰间苯三酚特异性探针杂交并筛选能与该探针杂交的菌株。挑选选择的单一菌落，划线，并重复划线，直到该菌株稳定并纯化，就是说，它是生物学上纯的培养物。该菌株可以在-80℃
30 保存在甘油中，以便保持其稳定。

步骤 3a（选择性的步骤）。通过 PCR 证实 Ph1 生产菌。在该选择性的步骤中，Ph1 生产菌株的证实是使用能扩增位于所述 Ph1 生物合成基

绝对需要的。PhzG 与吡哆胺-5'-磷酸氧化酶相似，并有可能是 PCA-合成酶辅因子的来源。phzA 和 phzB 基因的产物彼此高度同源，并有可能与推测的 PCA 合成多酶复合物的稳定化相关。phzABCDEFG 基因位于源于菌株 2-79 的吩嗪生物合成基因座的 6.8kbBglIII-XbaI 片段上。将该 DNA 片段置于 tac 启动子控制之下，然后克隆到下文所述的输送质粒上。将所得到的质粒用于在天然状态下不能产生吩嗪化合物的荧光假单胞菌中产生稳定的染色体插入。

为了构建遗传工程的细菌菌株，采用了基于 Tn5 的转座子特征和质粒 pUT 的输送特征的系统 (V. de Lorenzo, M. Herrero, U. Jakubzik 和 K. N. Timmis, 细菌学杂志 172: 6568-6572 (1990))。pUT 具有质粒 R6K 的 π 蛋白依赖型复制起点，并且只能在 π 蛋白产生细菌中维持，例如，专门生产的大肠杆菌 S17-1 (λ pir) 菌株。pUT 还携带质粒 RP4 的转移 oriT 起点，这使得它能从表达 RP4-接合功能的供体大肠杆菌中由接合转移到受体假单胞菌菌株中。最后，pUT 携带 IS50_R 的 tnp 基因，该基因编码小型-Tn5 因子转座所需要的转座酶。通过上述输送系统将吩嗪生物合成基因插入目标假单胞菌菌株的染色体中。在这里它们保持低的，通常为天然的拷贝数目，并且至少在理论上与其他染色体基因一样稳定。

在交配之后，将培养物悬浮在缓冲液中，并铺平板到添加了卡那霉素的 KMB 上。有荧光的并且是卡那霉素抗性的菌株是推测的转化菌株。挑选筛选的单一菌落，划线，并反复划线直到该菌株稳定并纯化，就是说它是生物学上纯的培养物。该菌株可以在-80℃下保存在甘油中，以便保持其稳定。

在温室中筛选。筛选转化的菌株，以便选择具有针对由丝核菌属导致的病害，如小麦丝核菌根腐病的活性的菌株，所述筛选是在温室生物实验中进行。用丝核菌属接种物感染土壤，并放入塑料管中，如在下面的例 8 中所述。用所述转化的菌株处理诸如小麦的易感作物的种子，并播种到土壤中。分别用 Gg 或腐霉菌作为接种物选择性地对温室生物实验，以便筛选同时能有效抗由禾顶囊壳菌 (Gg) 或腐霉属导致的病害的转化菌株。

在体外进行选择性的筛选。在温室筛选之前的一个选择性的步骤是通过一种转化的菌株抑制丝核菌属分离物。该实验包括在琼脂平板上对

别特征的菌株也包含在本发明中。对于本发明来说，包括具有菌株 NRRL B-21806、NRRL B-21807、或 NRRL B-21808 的识别特征的所有分离物，包括其继代培养物和变体。其中含有编码抗生素 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的生物合成基因座，并具有上述特殊带型。术语“变体”在本文中
5 被定义为包括具有上述特征的转化体和突变体。

荧光假单胞菌菌株 Z32-97、Z33-97、和 Z34-97 的生物学上纯的培养物于 1997 年 12 月 11 日并将荧光假单胞菌菌株 Z30-97 的生物学上纯的培养物于 1997 年 12 月 15 日保存在农业研究培养物保藏所 (NRRL),
10 1815North University Street, Peoria, Ill. 61604, 所获得的保藏号分别为 NRRL B-21905, NRRL B-21906, NRRL B-21907 和 NRRL B-21908。所有菌株都是根据布达佩斯条约的规定进行保存的。具有 NRRL B-21905, NRRL B-21906, NRRL B-21907 或 NRRL B-21908 识别特征的菌株也包含在本发明中。对于本发明来说，包括具有菌株 NRRL B-21905, NRRL B-21906, NRRL B-21907 或 NRRL B-21908 的识别特征的
15 所有分离物，包括其继代培养物和变体，其中含有编码稳定导入其基因组的编码抗生素吩嗪-1-羧酸产生的生物合成基因座，并且能抑制由土传病原体丝核菌属导致的病害，并保留了其亲代菌株的 2, 4-二乙酰间苯三酚基因座。在一种优选实施方案中，所述分离物还保留了其亲代菌株的遗传学特征的 4 条带，如上文所详细说明的。术语“变体”在本文中
20 被定义为包括具有上述特征的转化体和突变体。

本发明菌株的生长。可以在任何合适的固体或液体细菌培养基上生长本发明第一种实施方案的荧光假单胞菌菌株。一种代表性培养基是 King's 培养基 B。所述菌株的生长是在有氧条件下在能满足有关细菌生长的任何温度下进行的，即大约 15-30℃；优选的温度范围是大约 24-28
25 ℃。营养培养基的 pH 优选为中性，即 pH6.7-7.2。

本发明第二种实施方案的荧光假单胞菌可以生长在任何合适的固体或液体细菌培养基上。一种代表性培养基是 King's 培养基 B。所述菌株的生长是在有氧条件下在能满足有关细菌生长的任何温度下进行的，即大约 15-30℃；优选的温度范围是大约 24-28℃。营养培养基的 pH 优选
30 为中性，即 pH6.7-7.2。

储存培养物的保持。对每一种菌株进行维持，以便保持它的稳定性，如在-80℃下储存在甘油中。

Gg-抑制性菌株的应用。本发明的微生物菌株可用于控制由 Gg 导致的小型谷类作物或草坪草的病害。小型谷类作物的例子有小麦、大麦、黑麦和 triticale。由 Gg 导致的病害的例子是由 Ggt 导致的全枯病，这种病是最重要的小麦根系病害，它还能感染其他禾本科植物，如大麦、黑麦和 triticale。其他 Gg 真菌包括 Gga，这种真菌能感染燕麦和牧草。这种草的特征是能在诸如剪股颖的草坪草上导致全枯病；以及能感染某些牧草的 Ggg。

为了实现在小型谷类作物和草坪草上实现对由 Gg 导致的病害的生物控制，在存在有效量的本发明的一种或几种荧光假单胞菌菌株的条件下生长所述作物或草。有效的生物控制量被定义为相对在未处理过的对照中的发病而言，抑制（抑制发病或降低发病率或严重度）由 Gg 导致的病害的生物控制剂的用量。与未处理过的对照相比，使用所述生物学上纯的培养物最好能在大田种植的小型谷类作物或草坪草上获得至少 15% 的发病率。生物控制是通过将有效量的生物控制剂喷在植物上、植物种子上或植物或种子的局部而实现的。例如，所述菌株可以作为种子、土壤或开沟处理剂或作为浸透剂用于草坪或土壤上。可以使用新鲜细胞或冷冻干燥的细胞。

所述菌株可以掺入适用于小型谷物或草坪草的组合物中。它可以与不会影响该菌株活性的任何农业上可接受的载体或合适的农艺上可接受的载体混合。代表性载体有水、缓冲液、甲基纤维素、碎泥炭或蛭石。当所述菌株以存在于液体载体中的悬浮液或乳液形式使用时，所述悬浮液或乳液可选择性地含有常规添加剂，如本领域公知的表面活性剂或湿润剂。本发明的菌株还可制备成含有其他生物控制菌株。

代表性使用方法和有效量在下文披露。在特定场合下的有效量的范围可以通过实验确定。

对于小型谷物或草坪草的种子处理来说，将细菌加入含有 0.5-2.0% 甲基纤维素的悬浮液中，以便减少细菌的脱水，并改善与种子的粘着。将该悬浮液加入种子中并混合，以便每一粒种子以大约 10^2 - 10^6 CFU/种子的包衣。一般，优选用量为大约 10^4 - 10^5 CFU/种子。将处理过的种子风干。

对于土壤处理来说，将细菌悬浮在水或缓冲液中，并在土壤第一次浇水时使用，达到大约 10^2 - 10^6 CFU/克土壤。对于草坪来说，将 2ml 含

有大约 10^2 - 10^6 细菌/ml 浸透剂加入大约 1cm 直径的草地中。

当所述载体是泥炭或蛭石的固体时，一种典型的制剂是大约 10^7 - 10^9 CFU/克载体。当所述载体是液体时，典型的制剂是大约 10^8 - 10^9 CFU/ml 载体，对于冷冻干燥的制剂来说，典型的用量为大约 10^{10} - 10^{11} CFU/克制剂。冷冻干燥的制剂可以含有本领域公知的添加剂。

用于制备本发明转基因菌株的亲本菌株。用于制备本发明转基因菌株的亲本是具有下列特征的菌株：该菌株含有编码 2, 4-二乙酰间苯三酚产生的生物合成基因座，它具有特殊的基因型，其表现为具有将在下面详细说明并在图 1 中示出的特殊的带型。这一特征可以通过用引物 M13 进行 RAPD 分析而鉴定，如在下面实施例 5 中所述。代表性亲本菌株是由上文所述的荧光假单胞菌菌株 Qr1-96、L5.1-96、和 ML4.9-96。

对于本发明来说，在使用下面实施例 5 中所述的条件下如果一种亲本菌株具有下列带则该菌株具有上述特殊带形： 600 ± 50 bp； 700 ± 50 bp； 800 ± 50 bp； 900 ± 50 bp。在一种优选实施方案中，所述亲本菌株还具有 330 ± 20 bp 和 1100 ± 60 bp 的带。

确定一种亲本菌株是否具有特殊带型的另一种方法是用荧光假单胞菌菌株 Qr1-96 和实验菌株在琼脂糖凝胶上进行并排比较，并用肉眼比较大约 600 ± 50 bp 和 900 ± 50 bp 之间的带。如果实验菌株的带型在该范围内与菌株 Q8r1-96 的带型吻合，则该实验菌株具有所述特殊带型，另外，它还选择性地抑制由 Gg 在大田生长的小型谷类作物或草坪草上导致的病害，而且它还具有根系寄居能力，其特征是与已知的 Gg 抑制性菌株相比具有较大的群体密度和较长的寄居活性。

亲本菌株的生物控制活性。在上文讨论了生物学上纯的荧光假单胞菌亲本菌株的生物控制活性。

TAD 土壤的生物控制的重复性。本发明的亲本菌株优选还具有下列特征，它具有能在小型谷类作物上抑制由 Gg 导致的病害的能力，该能力相当于当所述小型谷类作物生长在处于全枯病衰减 (TAD) 状态的土壤上时所获得的生物控制水平。就是说该菌株具有再现在全枯病衰减土壤获得的生物控制水平的能力，以 10^4 菌落形成单位 (CFU) / 种子的用量使用所述代表性亲本菌株 Q8r1-96。然后播种到荧光假单胞菌菌株 Qr1-96、L5.1-96、和 ML4.9-96。Lind 未垦 (传导型) 土壤上

与 Quincy TAD 土壤以 10%w/w 的用量添加到 Lind 未垦（传导型）土壤上同样有效。这种相当于天然全枯病衰减的全枯病抑制的重复性是前所未有的。

5 上面结合生物学上纯的荧光假单胞菌菌株 Qr1-96、L5.1-96、和 ML4.9-96 的培养物，对获得优选用作上述方法的原始材料的亲本菌株的方法进行了说明，所述菌株是亲本菌株的代表。

所述亲本菌株的生长和该亲本菌株的储存培养物的保持，是按照结合本发明转基因菌株所述方法进行。

实施例

10 下面的实施例仅仅是为了进一步说明本发明，而不是要限定本发明的范围，本发明的范围由权利要求书限定。

实施例 1

下面的实施例披露了本发明第一种实施方案的荧光假单胞菌的筛选。

15 概述。荧光假单胞菌菌株 Qr1-96、L5.1-96、和 ML4.9-96 是于 1996 年从分别生长在华盛顿（美国）的 Quincy、Lind、和 Moses 湖的农田中收集的土壤中的小麦根系中分离的，所述土壤处于全枯病衰减状态（TAD）。Q8r1-96 是从生长在持续了 8 个连续的周期，每个周期 3 周的 Quincy TAD 土壤中的的小麦根系中分离的；L5.1-96 是从生长在持续
20 了 5 个连续的周期，每个周期 3 周的 Lind TAD 土壤中的的小麦根系中分离的；ML4.9-96 是从生长在持续了 4 个连续的周期，每个周期 3 周的 Moses 湖 TAD 土壤中的的小麦根系中分离的。

下面将详细披露所述的土壤和分离以及确定特性的技术

25 土壤。三种不同的土壤是从靠近华盛顿（美国）Quincy、Lind、和 Moses 湖的处于 TAD 状态的农田中获得的。所有三种土壤都能抑制小麦全枯病。在 1995 年，Lind TAD 农田业已连续种植小麦 28 年。在 1980 年，位于 Quincy 和 Moses 湖的 TAD 的农田业已连续种植小麦 22 年；在 1980 年-1995 年之间还种植了除小麦之外的其他作物。土壤是于 1995 年 3 月从土壤上部 30cm 收集的，风干 1 周，并在使用之前过 0.5cm 网
30 眼的筛子。其物理学和化学特性是由爱达荷大学的分析科学实验室测定的。

步骤 1: 连续种植小麦以便富集 Ph1 生产菌。

将 12 粒小麦种子播种到方形 PVC 盆（8cm 高，7.5cm 宽）中，该盆中装有 200 克筛过的天然土壤（Quincy、Lind、或 Moses 湖 TAD 土壤）和 50ml 添加了 metalaxyl（Novartis, Greensboro, NC）的水中，其添加量为 2.5mg/ml 活性成分，以便控制腐霉菌根腐病。芽孢菌不受这种杀真菌剂的影响。将 1cm 厚的土层撒在种子上面。让植物在 16℃ 在控制环境的生长箱中生长，给以 12 小时光照周期。每周 2 次给所述花盆使用 50ml 的稀释的（2: 3, v/v）Hoaglund's 溶液）仅含有大量元素。在生长 3-4 周之后，从土壤表面将所述植株的幼苗切除，将土壤及相关的根系倒入一个塑料袋中，并剧烈摇动，以便通气并混合。在 15℃ 将所述 '栽培过' 的土壤储存 1 周，再送回到原来的花盆里，然后重新种植 12 粒小麦种子。重复所述植物生长和收获的过程至少 4-8 个连续的周期。此时，从每一个重复中收获随机挑选的 4 个植株，并制备根系样品，以便确定产生抗生素的荧光假单胞菌的群体的大小。对每一种土壤来说，使用 4 个重复。

15 步骤 2: 从 TAD 土壤中轮作的 (cycled) 小麦根系中分离荧光假单胞菌。

从每一个重复中收获 4 个随机挑选的在步骤 1 中生长的植株，并通过轻摇从其根系上除去结合不牢的土壤。将 1.0 克根系和相关的根际土壤悬浮在 5.0ml 无菌水中，并在涡旋搅拌器上剧烈摇动 1 分钟，然后在一个超声波净化器中超声处理所述样品 1 分钟，将所述根系洗液的系列稀释液铺平板到添加了环己酰亚胺（100 微克/毫升）、氯霉素（13 微克/毫升）和氟卜青霉素（40 微克/毫升）的 [KMB⁺] King's 培养基 B [KMB] 琼脂（Proteose 蛋白胨 20 克；甘油 10 毫升；磷酸氢二钾 1.5 克；硫酸镁 1.5 克；琼脂 15 克；水 1000 毫升）上。在 25℃ 培养平板，并在 48 小时之后统计菌落。在紫外光（波长 366nm）下可以区分荧光假单胞菌菌落和非荧光菌落。

步骤 3: 用特殊的探针进行菌落杂交，以便检测 Ph1 生产菌。

通过菌落杂交确定编码 Ph1 荧光假单胞菌的数量。通过标准方法将细菌菌落转移到 Hybond-N⁺ 尼龙膜（Amersham）上。在风干之后，将所述膜放在真空烘箱中在 80℃ 下烘烤 1 小时。为了除去细菌细胞碎片，在 42℃ 下在含有 2×SSPE（20mM 磷酸二氢钠 [pH7.4]，0.36M 氯化钠，2M EDTA）、0.1% 十二烷基磺酸钠（SDS）和链霉蛋白酶（100 微克/毫升）

的溶液中洗涤 1.5 小时，并在 56℃ 下在 2×SSPE 和 0.1%SDS 中再次洗涤 1 小时。用标准方法进行杂交。高严格条件包括在 65℃ 下预杂交 1.5 小时，在 65℃ 杂交 12 小时，在室温下用 2×SSPE 和 0.1%SDS 中次洗涤膜 2 次，每次 5 分钟，并在 65℃ 用 0.1×SSPE 和 0.1%SDS 洗涤膜 2 次，
5 每次 30 分钟。

探针是由编码 2, 4, 二乙酰间苯三酚的生物合成基因座上的序列制备的 (GenBank 保藏号 U41818)。所述探针是用 Q2-87 的 Ph1D 上的序列通过用非放射性 DIG 系统 (Boehringer Mannheim) 随机引物法标记 PCR 片段形成的。用抗-洋地黄毒苷-AP-Fab 片段免疫检测杂交的探针，并用
10 比色底物氨兰四唑盐和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸按照生产商提供的方法进行观察。

为了分离 Ph1 生产菌，将所述膜上的信号与琼脂平板上的菌落进行比较。挑选能在膜上产生信号的每一个菌落，划线，并反复划线直到该菌株稳定并纯化，就是说它是一种生物学上纯的培养物。将每一种菌株
15 放在甘油中于-80℃ 保存，以保持其稳定。

步骤 3a (选择性步骤): 通过 PCR 证实 Ph1 生产菌。该选择性步骤可以通过分析，从菌落杂交中消除假阳性。

用于 PCR 分析的热解细菌悬浮液是用于在 25℃ 下在 KMB 上生长 48 小时的培养物制备的。将 2 个细菌菌落 (直径 2 毫米) 悬浮在 100 微升裂解溶液 (0.05M 氢氧化钠, 0.25%SDS)，并在 100℃ 下温浴 15 分钟。以
20 12000rpm 的速度离心该悬浮液 1 分钟，并用无菌蒸馏水稀释 50 倍。在每一次反应中使用 5 微升的稀释悬浮液。

引物和 PCR 分析。用于 PCR 的寡核苷酸引物是由编码荧光假单胞菌 Q2-87 (GenBank 保藏号 U41818) 的 2, 4, 二乙酰间苯三酚 (Ph1) 的生物合成基因座上的序列形成的。引物是由 Operon 技术公司
25 (Alameda CA) 合成的。引物 Ph12a (序列: GAGGACGTCGAAGACCACCA) 和 Ph12b (序列: ACCGCAGCATCGTGTATGAG) 是由 ph1d 上的序列形成的，预示了一种具有 349 个氨基酸的蛋白，该蛋白与源于植物的查耳酮合酶同源。

在 25 微升反应混合物中进行 PCR 扩增，该反应混合物含有 5 微升稀释过的热解细胞悬浮液，1×GeneAmp PCR 缓冲液 (Perkin Elmer 公司, Norwalk, CT), dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP (Perkin Elmer) 各 200
30

5 μM , 20 皮摩尔每一种引物, 和 2.0U 的 AmpliTaq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer), 用一滴矿物油覆盖每一种混合物。扩增是在 Perkin Elmer 热循环仪 480 上进行的。PCR 程序包括在 94°C 下最初变性 2 分钟, 接着进行 30 轮的 94°C 60 秒, 67°C 45 秒, 和 72°C 60 秒。在 1.2% 琼脂糖凝胶上在 $1\times\text{TBE}$ 缓冲液 (90mM Tris-硼酸, 2mMEDTA (pH8.3)), 在 75 伏电压下电泳 3 小时分离所述 PCR 产物的样品 (9 微升), 并用 UV 透射仪观察所述 PCR 产物。

10 步骤 4: RAPD 分析, 以便鉴定具有特定带型的 Ph1 生产菌。用引物 M13 进行 RAPD 分析 (随机扩增多态 DNA), 以便群集从生长在 Quincy、Lind、和 Moses 湖 TAD 土壤上的小麦根系中分离的不同的 Ph1 生产荧光假单胞菌菌株。

15 DNA 扩增是在 25 微升反应混合物中进行的, 该混合物含有 5 微升稀释过的热解细胞悬浮液, $1\times\text{GeneAmp}$ PCR 缓冲液 (Perkin Elmer 公司, Norwalk, CT), dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP (Perkin Elmer) 各 $200\mu\text{M}$, 80 皮摩尔的引物 M13, 和 2.0U 的 AmpliTaq DNA 聚合酶 (Perkin Elmer)。用一滴石油覆盖每一种混合物。扩增是在一台 Perkin Elmer 热循环仪 480 上进行的。PCR 程序包括在 94°C 下进行 1 分 30 秒的最初变性, 接着进行 2 轮的 94°C 30 秒, 36°C 30 秒, 72°C 2 分钟, 接着 4 轮的 94°C 20 秒, 36°C 15 秒, 45°C 15 秒, 72°C 1 分 30 秒, 接着是 1 轮 72°C 10 分钟。
20 在 2.5% 琼脂糖凝胶上在 $1\times\text{TBE}$ 缓冲液 (90mM Tris-硼酸, 2mMEDTA (pH8.3)), 在 75 伏电压下电泳 5 小时分离所述 PCR 产物的样品 (9 微升)。用溴化乙锭对所述凝胶进行染色 60 分钟, 然后用 UV 透射仪观察所述 PCR 产物。

25 通过用引物 M13 进行的 RAPD 分析证实本发明的生物学上纯的荧光假单胞菌菌株具有特殊的带型。图 1 表示荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96、ML4.9-96 和 15.1-96 的带型 (RAPD)。泳道 1 表示作为参考的 1kb 梯带。由图 1 所示, 本发明的菌株具有下列带: $330\pm 20\text{bp}$; $600\pm 50\text{bp}$; $700\pm 50\text{bp}$; $800\pm 50\text{bp}$; $900\pm 50\text{bp}$ 和 $110\pm 60\text{bp}$ 。

实施例 2

30 下面的实施例说明用本发明第一种实施方案的生物控制菌株再现 TAD。

按实施例 1 所述方法分离并繁殖荧光假单胞菌菌株 8r1-96。将该

细菌悬浮在 0.5% 甲基纤维素中，并与小麦种子（品种 Penawawa）混合，使剂量为 10^4 CFU/种子。用作对照的种子仅使用甲基纤维素。用 0.5% 的 (w/w) 全枯病病原体的燕麦粒接种物（大约 0.25-0.5 毫米）对 Quincy 处女土壤、Quincy TAD、Pullman 传导型土壤和 Pullman 土壤进行改良。

5 将 4 粒处理过的种子播种到方形盆（3CM × 3CM）中，该盆装有 50 克过筛的天然土壤，并添加了 metalaxyl（Novartis, Greensboro, NC）的水湿润，其添加量为 2.5 mg/ml 活性成分，以便控制腐霉菌根腐病。让植物在 16℃ 在控制环境的生长箱中生长，给以 12 小时的光照周期。每周 2 次给所述花盆使用稀释的（2: 3v/v）Hoaglund's 溶液（大量元素）。在生长 4 周之后收获植物，评价根系病害，并对幼苗进行称重和测定。

10

其结果在下面列表，并表明，导入 Quincy 未垦土壤或 Pullman 传导型土壤中的菌株 Q8r1-96 能产生与 Quincy TAD、Pullman TAD 土壤和转移到 Pullman 传导型土壤中的 Quincy TAD 上相同的病害抑制作用。

15 菌株 Q8r1-96 不能加强 Pullman TAD 土壤的抑制作用。

^U对小麦全枯病来说, Quincy 和 Pullman Cond 土壤都是传导型的, 而补充型 TAD 土壤对全枯病具有抑制作用. Quincy 处女土壤和 Quincy TAD 土壤事先业已栽培小麦 6 个连续的周期, 每个周期 4 周, 以便激
5 活微生物区系. Pullman Cond 和 Pullman TAD 土壤是从生长小麦的大田中直接获得的. 所有土壤都用)0.5% (wt/wt) 的全枯病病原体的燕麦粒接种物改良. 用 Q8r1-96 处理的小麦种子所使用的剂量为 10^4 CFU/种子.

^V在植物生长 4 周之后测定导入的菌株 Q8r1-96 或天然存在的 Ph1
10 生产荧光假单胞菌的群体大小, 病害严重程度, 植物鲜重和苗高. 除了每 2 个植株的平均 6 次重复的平均值. 在 TURKEY' s Studentized Range 测验之后通过方差分析测定不同处理之间 Ph1 生产假单胞菌的群体密度, 植物鲜重和苗高方面的差别. 通过 Wilcoxon Rank Sum 测验分析病害严重程度的差别. 对于每一次试验和每一个参数来说, 具有不同字母
15 的平均值表示统计学上的显著差异 ($\alpha = 0.05$).

^W低用 0-8 的等级对全枯病的严重程度进行分类 (0-无病害, 而 8=死亡植株).

^X低于 10^4 CFU/克根的检测下限.

^YPullman Cond 和 Pullman TAD 土壤分别以 9: 1 的比例 (wt/wt)
20 与 Quincy TAD 土壤混合.

实施例 3

下面的实施例说明了在种植小麦的大田中的全枯病生物控制. 在华盛顿 Almoto 的商业大田中试验了荧光假单胞菌 Q8r1-96. 使用的大田在上一年业已种植过小麦, 并且天然感染了全枯病.

25 试验. 将春小麦 (Alpowa) 播种到没整过地的冬小麦茬上. 将悬浮在 1.5% 甲基纤维素悬浮液中的按实施例 1 所述方法分离并繁殖的荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96 用于 Alpowa 春小麦种子上, 剂量为大约 $1 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ CFU/种子. 对照由未处理过的小麦种子组成. 在一种对照中, “熏蒸”, 将未处理过的种子播种到用甲基溴熏蒸过的土壤中,
30 熏蒸是为了消除病原体并产生“健康的”对照. 在其他对照中, 表示为“对照”, 将未处理过的种子播种到天然土壤中, 以便形成发病的对照. 处理小区有 8 行 (间隔 1 英尺), 25 英尺长. 播种之后 135 天收

获小麦。

结果。结果在下面的表 2 中示出。从表中的数据可以看出，菌株 8r1-96 能将受感染植株的数量减少 20%。

表 2

5

处理	感染全枯病的植物 (%) ^a
对照	69.3A
Q8r1-96	48.0B
熏蒸	13.3C

^a 表示随后是相同的字母数值没有显著差别

P=0.1. LSD=21.1

实施例 4

10

下面的实施例证实了本发明 菌株的良好寄居能力。

将本发明的荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96 与荧光假单胞菌菌株 M1-96 和 Q2-87 (不是本发明的) 进行比较。这三种菌株都能产生抗生素 2, 4-二乙酰间苯三酚, 并且具有在 Bergey's 手册中披露的荧光假单胞菌所特有的生理学性状和底物利用特征 (参见下面的表 3)。不过, 以 Q8r1-

15

96 本发明的菌株具有非本发明菌株所没有的特殊 RAPD 带型。

表 3

	Q8r1-96	Q2-87
革兰氏菌株	-	-
形状	杆状	杆状
荧光色素	+	+
氧化酶	+	+
精氨酸二氢水解酶	+	+
葡糖发酵	-	-
β -半乳糖苷酶	-	-
明胶水解	-	+
反硝化作用	+	+
利用:		
D-葡萄糖	+	+
L-阿拉伯糖	+	+
蔗糖	+	+
丙酸盐	+	+
丁酸盐	-	-
山梨醇	+	+
阿东糖醇	-	-
D-甘露糖醇	+	+
N-乙酰-D-葡糖胺	+	+
麦芽糖	-	-
D-葡糖酸盐	+	+
癸酸盐	+	+
己二酸盐	-	-
L-苹果酸盐	+	+
柠檬酸盐	+	+
苯基乙酸盐	-	-

在上述评价寄居能力的研究中, 以每克土壤 100 CFU (细菌细胞)

的剂量将每一种菌株单独施加到 Quincy 未垦土壤、Lind 未垦土壤、和 Moses 湖未垦土壤（所用的花盆的大小为 8cm 高，7.5cm 宽）。让小麦品种（Penawawa）在每一种土壤上生长 3 周，收获植株，并通过稀释平板法测定其根系上的细菌群体。

5 将土壤和相关的根系倒入塑料袋中，并摇动以便通气并混合所述土壤。在收获之后 1 周将每一种土壤送回到原来的花盆中，并再次播种小麦，这样，两次种植期间的每一个周期持续 4 周时间。

结果。图 2 表示，在种植 9 轮以后 Quincy 未垦土壤中三种菌株的群体密度（CFU/克根）。从图中的数据可以看出，即使在种植 9 轮之后，
10 菌株 Q8r1-96 表现出的群体密度也大于 10^5 CFU/克根。相反，菌株 M1-96 和 Q2-87（不是本发明的菌株）下降到 10^2 CFU/克根。从图中的数据可以看出，本发明菌株的寄居能力优于其他生物控制菌株的；本发明菌株能以明显较高的水平寄居根系，并具有较长的寄居活性。

在 Quincy 未垦土壤上比较生物控制活性。将第 9 轮将 Ggt 的接种物以寄居在燕麦粒上的形式加入土壤中。将所述接种物粉碎并过筛，将
15 大小为 0.25-0.50mm 的颗粒以 0.5%（w/w）的浓度混入土壤中。根据下文披露的 0-8 的等级为全枯病打分。将细菌与没有将细菌添加到土壤中的对照进行比较。让植物在花盆（8cm 高，7.5cm 宽）生长 4 周。结果如下面的表 4 所示。从表 4 可以看出，只有 Q8r1-96（本发明菌株）能
20 抑制病害。用非本发明菌株处理过的植物表现出与对照（未处理过的植株）相同量的病害。本发明菌株 Q8r1-96 出色的抑制能力（在第 9 轮中）可以归因于本发明菌株的良好根系寄居能力和持续能力，并表现出该菌株作为生物控制剂的效力。

表 4

25

菌株	病害严重度 ¹
Q8r1-96	3.33a ²
M1-95 ³	6.42b
Q2-87 ³	6.08b
对照	6.00b

¹以 0-8 的等级对全枯病打分（Ownley 等，植物病理学 82: 178-184

(1992)), 其中: 0 无发病现象; 1 < 10%的根系面积具有黑色溃疡; 2 表示 10%-25%的根系面积具有黑色溃疡; 3 > 25%的根系面积具有黑色溃疡, 并且有一个根在茎的基部具有溃疡; 4=有一个以上的根在茎的基部具有溃疡; 5 所有的根在茎的基部都有溃疡, 至少一个溃疡是在茎的下部, 但没有叶片缺氮症; 6 在茎上有很多溃疡, 并且第一真叶缺氮; 7 所有叶片缺氮并且植株严重矮化; 8 植株死亡或接近死亡。

²表示后面采用相同字母的数字没有显著差别, P=0.05.

³不是本发明的, 仅仅是为了比较。

图 3-4 表示在种植 7 轮之后三种菌株分别在 Lind 和 Moses 湖未垦土壤上的群体密度 (CFU/克根)。从图中的数据可以看出, 即使在 7 轮之后, 菌株 Q8r1-96 的群体密度也大于 10^5 CFU/克根, 相反, 菌株 M1-96 和 Q2-87 (不是本发明的菌株) 降低到 10^2 CFU/克根。从以上数据可以看出, 本发明菌株的寄居能力优于其他菌株的; 它能以明显高的水平的水平寄居根系, 并具有较长的寄居活性。所述较强的寄居能力产生了比非本发明菌株更大的生物控制能力。

图 5 表示本发明荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96 在 Quincy 未垦土壤、Lind 未垦土壤、和 Moses 湖未垦土壤上的寄居能力。从图中的数据可以看出, 本发明的菌株不受土壤类型的影响。

实施例 5

下面的实施例披露了荧光假单胞菌属的代表性转基因吩嗪生产菌株的构建。在下面所提供的所有实验中, 用标准方法进行质粒 DNA 分离、限制酶消化、琼脂糖凝胶电泳、连接、和转化 (Ausubel, F. M. R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, 和 K. Struhl (著), 1995, 分子生物学简便方法, J. Wiley 和 Sons, 纽约)。进行下文所述实验所需要的所有酶 (包括限制性内切核酸酶, T4DNA 连接酶, DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段) 和试剂都是从生命技术公司 (Gaithersburg, MD) 购买的。将由 Qiagen 公司 (Chatworth, C) 提供的 Qiaex II 凝胶提取试剂盒用于从琼脂糖凝胶中提取 DNA。用于所有 DNA 克隆实验的大肠杆菌菌株 JM109 是从 Promega 公司 (Madison, WI) 购买的。所有细菌菌株都是用常规方法在 LB 培养基上繁殖 (细菌培养用胰化蛋白胨 (Disco 实验室, Detroit, MI) 10 克; 细菌培养用酵母提取物 (Disco 实验室, Detroit, MI) 5 克; 氯化钠 5 克; 水 1000 毫升)。

步骤 1. 将 *phz* 基因克隆到 *tac* 启动子的控制之下。

将源于荧光假单胞菌 2-79 的含有 *phzA*、-B、-C、-D、-E、-F、和 -G 基因的 6.8-kb *Bgl*III-*Xba*I DNA 片段插入 *pALTER-Ex1* 克隆载体的 *Bam*HI 和 *Xba*I 克隆位点上，克隆后的载体含有一个多用途多接头和一个强的 *tac* 启动子，用于克隆基因的体内和体外表达。*pALTER-Ex1* 克隆载体可以从 Promega 公司 (Madison, WI) 购买的。在连接之后将 DNA 样品转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞中，并在添加了 12 微克/毫升四环素的 LB 琼脂上筛选转化体。若干单一菌落可以在含有四环素的 LB 培养液上生长，将所述菌落用于纯化质粒 DNA。通过用限制性内切核酸酶消化证实 *phz* 生物合成基因座的插入。

步骤 2. 构建吩嗪生物合成基因座的可转座的拷贝。

用 *Sca*I、*Xba*I、和 *Hind*III 限制性内切核酸酶消化含有 *phz* 基因的 *pALTER-Ex1* 的 DNA，由此产生 6.8kb、4.3kb、和 1.4kb 的 DNA 片段。

通过制备凝胶电泳将连接在 *tac* 启动子上的含有 *phz* 基因的 6.8kb 的 *Hind*III-*Xba*I DNA 片段 (图 6) 与其他片段分离，从琼脂糖凝胶上纯化，并用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段进行平端连接。将该片段与 *pUC18Sfi* 克隆载体的 DNA 连接 (M. Herrero, V. de Lorenzo, K. Timmis, 细菌学杂志 172: 6557-6567 (1990))，所述载体预先用 *Eco*RI 限制性内切核酸酶裂解过，并用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段处理。将连接混合物转化入大肠杆菌 JM109 中，并根据具有插入的 *phz* 基因座的转化体在 LB 琼脂上的白色菌落的颜色进行筛选，所述 LB 琼脂添加了 40 微克/毫升 5-溴-4-氯-3 吲哚- β -D-半乳糖吡喃糖苷 (X-gal) 和 80 微克/毫升氨苄青霉素。对来自具有白色菌落的转化体的质粒 DNA 的样品进行筛选，按上述方法筛选 *phz* 基因的存在。

含有 *phz* 基因座的杂合的 *pUC18Sfi* 质粒用 *Sfi*I 限制性内切酶消化，并与用 *Sfi*I 打开的 *pUTKm* 质粒 (参见 Herrero 等) 连接。用连接混合物转化大肠杆菌 S17-1 (λ pir) 的感受态细胞，并在添加了浓度分别为 100 微克/毫升的卡那霉素和氨苄青霉素的 LB 上筛选转化体。纯化来自若干单一菌落的质粒 DNA，并通过用限制性内切酶 *Eco*RI 和 *Hind*III 裂解筛选 *phz* 基因的存在。所得质粒 *pUTKm*: *phz* 的遗传图如图 6 所示。将获得了 *pUTKm*: *phz* 的大肠杆菌 S17-1 (λ pir) 用作供体与假单胞菌接合。

步骤 3. 大肠杆菌 S17-1 (λ pir) 和假单胞菌之间的接合。

用 Herrero 等披露的交配技术将质粒 pUTKm: phz 从大肠杆菌 S17-1 (λ pir) 中转移到荧光假单胞菌 Q8r1-96 中。在 37°C 下在 10 毫升添加了 100 微克/毫升氨卞青霉素和卡那霉素的 LB 培养液中生长获得了 pUTKm: phz 的供体菌株大肠杆菌 S17-1 (λ pir) 过夜，同时摇动生长过夜。让利福平抗性 Q8r1-96 受体菌株单独在 10 毫升不含抗生素的 LB 培养液上生长过夜。分别以 6000rpm 的速度将供体菌株和受体菌株的培养物离心 5 分钟，并将细胞悬浮在 1 毫升新鲜 LB 培养液中。将供体大肠杆菌 S17-1 (λ pir) 菌株的细胞悬浮液点在放在 LB 平板上的一片 (2 × 2cm) 硝酸纤维素膜上，然后将 20 微升受体菌株的悬浮液点在供体上面。纯硝酸纤维素膜 (0.45 微米) 是从 Bio-Rad 实验室购买的 (Hercules, CA)。在 27°C 下培养带有膜的平板过夜，然后将膜上的细胞悬浮在 1 毫升无菌水中。通过以 6000rpm 的速度离心 5 分钟使细胞沉淀，然后悬浮在 1 毫升无菌水中。将细胞悬浮液稀释 10 倍，并将 100 微升稀释液铺平板到添加了 100 微克/毫升卡那霉素的 M9 基本培养基 (七水合磷酸氢二钠 1 克; 磷酸二氢钾 3 克; 氯化钠 0.5 克; 氯化铵 1.0 克; 1M 氯化钙 0.1 毫升; 1M 硫酸镁 2 毫升; 20% 葡萄糖 20 毫升; 加水到 1000 毫升) 上，并在 27°C 下培养 3 天。将在 M9 卡那霉素平板上生长的 Q8r1-96 受体菌株的若干菌落转移到添加了 100 微克/毫升卡那霉素的 King's 培养基 B 平板 (胰化蛋白胨 (Disco 实验室, Detroit, MI) 20 克; 甘油 10 毫升; 磷酸氢二钾 1.5 克; 硫酸镁 1.5 克; 细菌培养用琼脂 (Disco 实验室, Detroit, MI) 15 克; 加水到 1000 毫升)，并进行检查，以便证实荧光色素的产生。在经过上述筛选之后，让克隆在 LB 培养液中生长过夜，然后在 -80°C 下保存在 50% (v/v) 甘油中，用于进一步的研究。

25 实施例 6

下面的实施例披露了真菌体外抑制实验。在装在培养皿中的马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 上用按照实施例 5 所述方法制备的 Q8r1-96 受体菌株 (转化菌株) 对三种根系病原体的生长进行抑制。所使用的方法类似于 Thomashow 和 Weller 披露的方法 (细菌学杂志 170: 3499-3508 (1988))，所不同的是，在下面标出的改进。将 3 微升细菌菌株的过夜 LB 培养液培养物点在 PDA 平板表面上，每个平板点 2 次，位于相反的两侧，距离平板边缘大约 1cm。将取自生长在 PAD 培养基上的病原体培养

物的 0.5cm 的前缘柱条放在所述平板中央。在 28℃ 下培养平板，并通过测定细菌菌落和真菌菌丝体边缘之间的距离打分。为了抑制禾顶囊壳菌小麦变种，在放置所述真菌柱条之后 24 小时将细菌培养液培养物点在平板上，并在施加细菌之后 5 天对抑制作用打分。为了抑制立枯丝核菌 AG8，在放置真菌柱条的同时将细菌培养液培养物点在平板上，并在 5 天之后对抑制作用打分。为了抑制 *Pythium irregulare*，在放置真菌柱条之前 48 小时将细菌培养液培养物点在平板上，并在放置真菌 2 天之后对抑制作用打分。

结果。结果如下面的表 5 所示。从表中的数据可以看出，转基因菌株 Z30-97、Z32-97、Z33-97 和 Z34-97 的抑制面积明显大于 Q8r1-96 的抑制面积。

表 5. 在马铃薯葡萄糖琼脂上用亲本荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96 和转基因衍生物 Z30-97、Z32-97、Z33-97 和 Z34-97 体外抑制禾顶囊壳菌小麦变种、立枯丝核菌 AG8、和 *Pythium irregulare*。

抑制面积的大小

菌株	Ggt	丝核菌属	腐霉属
荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96	0.50D	0.17B	0.47B
Z30-97	1.55B	0.55A	0.80A
Z32-97	1.13C	0.53A	0.70
Z33-97	1.66AB	0.57A	0.67A
Z34-97	1.70A	0.55A	0.73A

后面带有相同字母的数字没有明显差别， $P=0.05$ 。

实施例 7

下面的实施例披露了温室筛选生物实验。

材料和方法

种子处理：用悬浮在 0.5% 甲基纤维素中的不同剂量的在 KMB（用于假单胞菌）或 NBY（用于芽孢杆菌）上培养的细菌菌株对春小麦 Penawawa 的种子进行包衣。将细菌悬浮液均匀喷洒在整个平板表面上，并在 27℃ 下培养 3 天。每个菌株制备 3 个平板。通过将细菌细胞刮入带盖的离心管中收集细菌细胞，并用 40ml 无菌蒸馏水洗涤 2 次。将细菌细胞重新

悬浮在 15ml 0.5% 甲基纤维素中，并用 0.5% 的甲基纤维素制备 10 倍稀释液系列。将 25 克小麦种子与 9ml 细菌-甲基纤维素悬浮液重新混合，并风干过夜。在每粒种子上的细菌细胞的真正剂量通过稀释平板计数确定。

- 5 病害抑制的温室实验。用试管实验 (Ownley 等, 植物病理学 82: 178-184 (1992) 和 Weller 等植物病害 69: 710-713 (1985)) 实验转基因菌株对全枯病 (由禾顶囊壳菌小麦变种 (Ggt))、丝核菌根腐病 (由立枯丝核菌 AG8 导致) 和腐霉菌根腐病 (由腐霉菌的混合物导致, 包括 *Pythium irregulare*) 的抑制作用。通过让每一种病原体分别在高压灭
- 10 菌的全燕麦粒上生长 4 周制备上述三种病原体每一种的接种物 (参见被收作本文参考文献的美国专利号 4456684)。将接种物保存在冰箱中待用。该实验使用在底部开孔的塑料锥形管 (直径 2.5cm, 长 20cm)。将所述管以悬挂状态支撑在塑料架上。用棉球塞住每一个管, 然后用的细的蛭石填充一半, 然后放入 13 克生土, 添加或不添加磨碎的燕麦接种
- 15 物。为了对全枯病和丝核菌根腐病进行实验, 将所述土壤与 1% (wt/wt) 新磨碎的燕麦粒培养接种物 (粒度: 0.25-0.50mm) 混合。对丝核菌根腐病进行实验, 用寄生了 *Pythium irregulare* 的全燕麦粒感染所述土壤。然后分别将 10ml 水加入腐霉菌感染的土壤, 将 10ml 添加了 metalaxyl 的水 (Ridomil 0.075g/l; Norvatis, Greensboro, NC) 加入 Ggt 和
- 20 立枯丝核菌感染的土壤中。在浇水之后, 在室温下培养装有用 *Pythium irregulare* 和立枯丝核菌感染过的土壤的试管, 48 小时, 然后播种。在浇水之后马上给用装有用 Ggt 感染过的土壤的试管播种。每一个试管中播种 2 粒小麦种子, 用少量的细蛭石覆盖, 并给腐霉菌试管浇 3ml 水, 或者给 Ggt 或丝核菌试管浇含有 metalaxyl 的水。然后, 用塑料覆盖所
- 25 述试管 3 天, 以便保持土壤湿度, 进行发芽, 放入温室中, 给以 12 小时的光照周期和 16°C 的恒温, 培养 4-5 周。小麦幼苗现出之后 (3-4 天), 每周 2 次给试管浇 1/3 强度的 Hoagland's 溶液。所有实验是在获自华盛顿 Quincy 的 Quincy 未垦土壤上进行的, 重复 5-6 次, 每一个重复使用 5 个试管。在洗去根系上的发根培养基之后, 评价三种根系病害的严重程度。丝核菌根腐病的严重程度以受感染根系的百分比表示。腐霉菌感染的严重程度通过幼苗的现出和高度评价。全枯病的严重程度根据由
- 30 Qwnley 等 (1992, 同上) 提出的 0-8 的等级评价。

统计学分析。用统计学软件 SAS (SAS 研究所, Cary, NC) 分析结果。在对数据进行反正弦转化之后分析出苗率。通过非参数统计学分析全枯病的发病等级数据。用 $P=0.05$ 的 Fisher's 保护最小显著差 (LSD) 分别处理平均值。

5 结果。结果如下面的表 6-10 所示。如表 6 所示, 对剂量相似的亲本菌株 Q8r1-96、荧光假单胞菌 2-79 (吩嗪-1-羧酸基因的来源) 和两种非处理的对照相比, 剂量为 10^2-10^3 CFU/种子的转化菌株 Z30-97、Z32-97 和 Z34-97 能降低受立枯丝核菌 AG-8 感染的小麦根系的百分比。只有当 Q8r1-96 以较大剂量使用时, 亲本 Q8r1-96 菌株在抑制丝核菌方面相当于 Z30-97 和 Z32-97。如下面的表 7 所示, 在抑制腐霉菌方面, 10 剂量为 10^2 CFU/种子的菌株 Z34-97 与剂量为 10^3 CFU/种子的亲本菌株 Q8r1-96 同样有效。如下面的表 8 所示, 菌株 Z34-97 能对禾顶囊壳菌小麦变种 (Ggt) 产生明显的抑制作用。如下面的表 5-8 所示, Z34-97 能抑制所有三种根系病害。

15 表 6. 用野生型和转基因细菌生物控制剂处理种子对小麦丝核菌根腐病 (立枯丝核菌 AG-8 的抑制作用)。

处理	CFU/ 种子 ¹	受感染的根系 (%) ²
甲基纤维素 ³	0	60.7 a ⁴
非处理 ³	0	55.3 ab
荧光假单胞菌 2-79 ⁵	10^6	48.9 b
荧光假单胞菌 Q8r1-96 ^{5,6}	10^3	37.3 c
荧光假单胞菌 Q2-87 ⁵	10^6	34.8 cd
荧光假单胞菌 Q8r1-96 ^{5,6}	10^4	30.8 cde
芽胞杆菌 L324-92 ⁵	10^7	28.1 def
转基因的 Z32-97	10^2	25.1 efg
转基因的 Z30-97	10^2	25.1 efg
转基因的 Z34-97	10^2	21.6 fg
转基因的 Z34-97	10^3	18.8 g

20 ¹ 用悬浮在 0.5%甲基纤维素中的细菌处理种子, 达到所标明的每粒种子的剂量。

² 在播种 4 周之后测定具有典型的丝核菌溃疡的根的百分比。

³ 甲基纤维素处理过的种子仅用 0.5%的甲基纤维素处理。非处理种

子不进行处理。

⁴后面由相同字母的数字没有明显差别, $p=0.05$ 。

⁵不是本发明的, 仅用于比较。

⁶亲本菌株。

5 表 7. 用野生型和转基因细菌生物控制剂处理种子对小麦腐霉菌根腐病 (*Pythium irregulare*) 的抑制作用。

处理	CFU/ 种子 ¹	出苗率 ²
甲基纤维素 ³	0	50 d ⁴
非处理 ³	0	54 cd
荧光假单胞菌 2-79 ⁵	10 ⁶	63 cd
荧光假单胞菌 Q8r1-96 ^{5,6}	10 ³	92 ab
荧光假单胞菌 Q2-87 ⁵	10 ⁶	50 d
荧光假单胞菌 Q8r1-96 ^{5,6}	10 ⁴	71 bcd
芽胞杆菌 L324-92 ⁵	10 ⁷	92 ab
转基因的 Z32-97	10 ³	67 cd
转基因的 Z30-97	10 ³	67 cd
转基因的 Z34-97	10 ³	96 a
转基因的 Z34-97	10 ³	79 abc

10 ¹用悬浮在 0.5%甲基纤维素中的细菌处理种子, 达到所标明的每粒种子的剂量。

²在播种 4 周之后测定出苗数。

³甲基纤维素处理过的种子仅用 0.5%的甲基纤维素处理。非处理种子不进行处理。

⁴后面由相同字母的数字没有明显差别, $p=0.05$ 。

15 ⁵不是本发明的, 仅用于比较。

⁶亲本菌株。

表 8. 用野生型和转基因细菌生物控制剂处理种子对小麦全枯病根腐病（禾顶囊壳菌小麦变种）的抑制作用。

处理	CFU/ 种子 ¹	发病等级 ²
甲基纤维素 ³	0	4.2 a ⁴
非处理 ³	0	4.2 ab
荧光假单胞菌 2-79 ⁵	10 ⁶	3.9 abc
荧光假单胞菌 Q8r1-96 ^{5,6}	10 ³	2.9 e
荧光假单胞菌 Q2-87 ⁵	10 ⁶	3.7 bcd
荧光假单胞菌 Q8r1-96 ^{5,6}	10 ⁴	2.9 e
芽胞杆菌 L324-92 ⁵	10 ⁷	3.5 cd
转基因的 Z32-97	10 ²	3.9 ab
转基因的 Z30-97	10 ³	3.8 abc
转基因的 Z34-97	10 ²	3.5 d
转基因的 Z34-97	10 ³	3.4 d

5 ¹ 用悬浮在 0.5%甲基纤维素中的细菌处理种子，达到所标明的每粒种子的剂量。

10 ² 0-8 的等级评价全枯病 (Ownley 等, 1992)，其中，0，无发病现象；1，< 10%的根系面积具有黑色溃疡；2，10-25%的根系面积具有黑色溃疡；3，> 25%的根系面积具有黑色溃疡，并且一个根在茎的基部具有黑色溃疡；4=一个以上的根在茎的基部有溃疡；5，所有的根在茎的基部有溃疡，至少在茎的下部有一个溃疡，但没有叶片缺氯症；6，在茎上有很多溃疡，并且第 1 真叶缺氯；7，所有叶片都缺氯，并且植株严重矮化；8，植株死亡或接近死亡。

15 ³ 甲基纤维素处理过的种子仅用 0.5%的甲基纤维素处理。非处理种子不进行处理。

⁴ 后面由相同字母的数字没有明显差别，p=0.05。

⁵ 不是本发明的，仅用于比较。

⁶ 亲本菌株。

实施例 8

该实施例说明了野生型菌株和转基因菌株对小麦根系的寄居作用。

根际寄居作用。使用在上面的病害抑制实验中所披露的试管生物实验鉴定转基因菌株的根际寄居作用。播种以 10^3 CFU/种子的剂量实验菌株的细菌细胞包衣的小麦种子。播种之后 66 小时和 1 周，通过在 KMB 培养基上进行稀释铺平板测定所述种子上 CFU 的数量，所述 KMB 培养基分别添加了 100 微克/毫升的利福平和环己酰亚胺。

结果。结果如下面的表 9 所示。从表中的数据可以看出，本发明的转基因菌株在播种处理过的种子 66 小时和 1 周之后达到与亲本菌株相同的群体密度。

10

表 9

播种后天数

菌株 ^a	66 小时 (CFU × 10 ⁷ /种子)	7 天 (CFU × 10 ⁷ /克根)
荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96	1.4A ^b	26.8A
Z32-97	1.1A	11.7A
Z33-97	1.1A	16.2A
Z34-97	1.1A	16.0A
Z30-97	1.5A	13.2A

^a以 10^3 CFU/种子的剂量对小麦种子进行包衣。

15 ^b按照 Fisher's 较显著测验 (LSD) 后面有相同字母的数字没有显著差别, P=0.05.

实施例 9

下面的实施例说明了生理学特征和底物利用特征。

20 将代表性亲本菌株荧光假单胞菌 Q8r1-96 与荧光假单胞菌菌株 Q2-87 (它还具有编码抗生素 2, 4-二乙酰间苯三酚的基因座) 进行比较。所述菌株具有 Bergey's 手册中所披露的荧光假单胞菌所特有的生理学特征和底物利用特征 (参见下面的表 10)。

表 10

	Q8r1-96	Q2-87
革兰氏菌株	-	-
形状	杆状	杆状
荧光色素	+	+
氧化酶	+	+
精氨酸二氢水解酶	+	+
葡糖发酵	-	-
β -半乳糖苷酶	-	-
明胶水解	-	+
反硝化作用	+	+
利用:		
D-葡萄糖	+	+
L-阿拉伯糖	+	+
蔗糖	+	+
丙酸盐	+	+
丁酸盐	-	-
山梨醇	+	+
阿东糖醇	-	-
D-甘露糖醇	+	+
N-乙酰-D-葡糖胺	+	+
麦芽糖	-	-
D-葡糖酸盐	+	+
癸酸盐	+	+
己二酸盐	-	-
L-苹果酸盐	+	+
柠檬酸盐	+	+
苯基乙酸盐	-	-

实施例 10

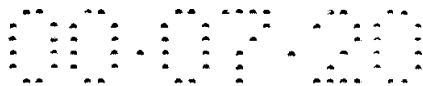
5

该实施例披露了 RAPD 分析, 用于鉴定具有所述特殊带型的转化菌

株。

5 将采用引物 M13 的 RAPD 分析用于比较转化菌株和亲本菌株 Q8r1-96。DNA 扩增是在 25 微升反应混合物中进行的，该反应混合物含有 5 微升稀释的热解细胞悬浮液，1 × GeneAmp PCR 缓冲液（Perkin Elmer 公司，Norwalk, CT），dATP、dTTP、dGTP 和 dCTP（Perkin Elmer 公司）各 200 微摩尔，引物 M13 80 皮摩尔，和 2.0 U 的 AmpliTaq DNA 聚合酶（Perkin Elmer）。用 1 滴矿物油覆盖每一种混合物。扩增是在 Perkin Elmer 热循环仪 480 上进行的。PCR 程序包括在 94℃ 下的最初变性 1 分 30 秒，然后进行 2 轮 94℃ 30 秒，36℃ 30 秒，72℃ 2 分，然后是 40 轮 94
10 ℃ 20 秒，36℃ 15 秒，45℃ 15 秒，72℃ 1 分 30 秒。随后是 1 轮 72℃ 10 分钟。在琼脂糖凝胶上在 1 × TBE 缓冲液（90mMTris-硼酸，2mMEDTA（pH8.3））中在 75 伏电压下电泳 5 小时分离 PCR 产品样品（9 微升）。用溴化乙锭染色所述凝胶 60 分钟，并用 UV 透射仪观察 PCR 产物。

15 转化菌株 Z32-97、Z33-97、Z34-97 与亲本荧光假单胞菌菌株 Q8r1-96 具有下列共同的带：330 ± 20bp；600 ± 50bp；700 ± 50bp；800 ± 50bp；900 ± 50bp，和 1100 ± 60bp。转化的菌株菌株 Z30-97 与其亲本菌株 Q8r1-96 具有下列共同带：600 ± 50bp；700 ± 50bp；800 ± 50bp；900 ± 50bp。



序 列 表

(1) 一般资料:

(i) 申请人: 美国, 以农业部长和华盛顿州立大学研究基金为代表

5 (ii) 发明名称: 控制根系病害的生物控制剂

(iii) 序列数: 10

(iv) 相关地址:

(A) 收件人: Margaret A. Connor, USDA - ARS

(B) 街道: 800 Buchanan 大街

10 (C) 城市: Albany

(D) 州: CA

(E) 国家: USA

(F) 邮编: 94710

(v) 计算机可读形式:

15 (A) 媒体类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release#1.0, Version#1.30

(vi) 当前申请数据:

20 (A) 申请号: US08/974, 938 和 US08/994, 035

(B) 申请日: 1997 年 11 月 20 日和 1997 年 12 月 18 日

(C) 分类号:

(viii) 律师/代理人资料:

(A) 姓名: Connor, Margaret A.

25 (B) 注册号: 30043

(C) 资料/档案号: 0027. 97

(ix) 通信资料:

(A) 电话: (510) 559-6067

(B) 传真: (510) 559-5736

30

(2) 序列 1 资料:

(i) 序列特征:

- (A)长度: 10 个碱基对
- (B)类型: 核酸
- (C)链型: 单
- (D)拓扑结构: 线形
- 5 (ii)分子类型: 其它核酸
 - (A)说明: /desc= "M13 引物"
 - (iii)假说: 无
 - (iv)反义: 无
 - (ix)特征
- 10 (A)名称/键: misc-feature
 - (B)位置: 1..10
 - (x)文献资料:
 - (A)作者: Keel, C
 - Weller, DM
 - 15 Natsch, A
 - DeFago, G
 - Cook, RJ
 - Thomas, LS
 - (B)标题: 2, 4-二乙酰间苯三酚生物合成基因座在源于荧光假
- 20 单胞菌菌株之间的保守性
 - (C)杂志: 应用环境微生物学
 - (D)卷号: 62
 - (E)期号: 2
 - (F)页码: 552-563
 - 25 (G)日期: 1996
 - (K)序列 1 上的相关残基: 1-10
 - (xi)序列描述: 序列 1:
- GGTGGTCAAG
- 30 (2)序列 2 资料:
 - (i)序列特征:
 - (A)长度: 20 个碱基对

- (B) 类型: 核酸
- (C) 链型: 单
- (D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类型: 其它核酸

5 (A) 说明: /desc= "Ph12a"

(iii) 假说: 无

(iv) 反义: 无

(x) 文献资料:

(A) 作者: Raaijmakers, Jos M

10 Weller, David M

Thomashow, Linda S

(B) 标题: 天然环境中抗生素生产假单胞菌的频率

(C) 杂志: 应用环境微生物学

(D) 卷号: 63

15 (E) 期号: 3

(F) 页码: 881-887

(G) 日期: 1997年3月

(K) 序列 2 上的相关残基: 1-20

(xi) 序列描述: 序列 2:

20 GAGGACGTCG AAGACCACCA

(2) 序列 3 资料:

(i) 序列特征:

(A) 长度: 20 个碱基对

25 (B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑结构: 线形

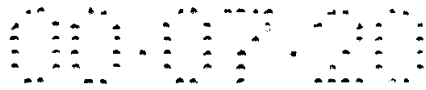
(ii) 分子类型: 其它核酸

(A) 说明: /desc= "Ph12b"

30 (iii) 假说: 无

(iv) 反义: 无

(x) 文献资料:



(A) 作者: Raaijmakers, Jos M

Weller, David M

Thomashow, Linda S

(B) 标题: 天然环境中抗生素生产假单胞菌的频率

5 (C) 杂志: 应用环境微生物学

(D) 卷号: 63

(E) 期号: 3

(F) 页码: 881-887

(G) 日期: 1997年3月

10 (K) 序列 2 上的相关残基: 1-20

(xi) 序列描述: 序列 3:

ACCGCAGCAT CGTGTATGAG

(2) 序列 4 资料:

15 (i) 序列特征:

(A) 长度: 7198 个碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链型: 单

(D) 拓扑结构: 线形

20 (ii) 分子类型: DNA(基因组)

(iii) 假说: 无

(iv) 反义: 无

(vi) 来源:

(A) 生物: 荧光假单胞菌

25 (ix) 特征

(A) 名称/键: CDS

(B) 位置: 互补 (1810..2859)

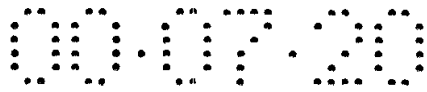
(D) 其它信息: /产物 = "Ph1D"

(x) 文献资料:

30 (A) 作者: Thomashow, L S

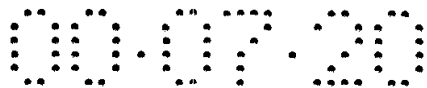
Banger, M G

(B) 标题: U41818

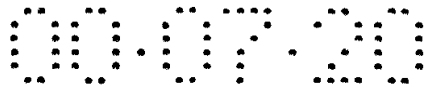


(xi) 序列描述: 序列 4:

GTCGACCCAG TAAAGGCAGA CAATGCATGG CTCGCTGCTG ATGCTTTGGG CGTGGTAAGG 60
AATCTGCAAC GGGTCCCCGT CAGTCTTGAG CAATCGACCG TTGCCTTTGT AATACCAGGC 120
CTGTTCCGTC TTGGCGGTGC ACAGTGTGAT CTCGCTGACC TGAACAGCCA AGTTGTTCATC 180
GGGTTTGAGC GGCGGCCTGT ATTTCCGCGCC TGTGGGCGAG AGCGGATAGG GCGTCGATGG 240
GAGGCTCCTG AGGTAGGATT CCCAATCCAT GTTCAGGCGA GCGCAGTGGC TCAGGGCTTC 300
ATAAAGGTTT CCCTGCGGTG ATCGTACTTC CAGGCTTTGC CCGGATTTGA AGTCGAATAC 360
ACCCAGCCCG CGCAGCGGCT GCGGCGAGTC CAATAGCATT ACGTAATGCG TCATCACTTA 420
TCCTCCAGCG TCAAGCGAGC GGGCAGGGGG CCGTAGTCCG CACGGTCATT GAAAACAGGG 480
CTGGCTTCCT TGAGCCGCAG GGACAGCAAC CCGCCCATCA AACTACCAGC CAGTGCCAGA 540
AACAGAATGG CGGTAAGCCC CCAGTTCACG GCGATGTACC CGGCGACCAC GGGCGCAACG 600
CCACCGCCCA GGATTTCTCC GCAACCCACC ACCAGGCCCG TAGCGGTGGC CAGTAAACTG 660
GGTGGCACTG ATTCGCTGGT CAGTGGGCCG ACGGTGATGC AGATCAGGCT GAAATTGATG 720
AAAGATAAAA AGAACAGCTG GAGGAACAGT AGCCACGGTA ACGGCGGGGA AATGATGAGC 780
AAGCCGACCA GTAGTGTGCT GATCAGGAAG CAGATGGAAA CGACAGGCTT GCGGCCCAGT 840
TGGTGAGACA AACCAGGAAT GACGAGCTGG CCGAAAAAC CACCCAGGCC GATCGCGGAG 900
ATGATCATGG CCATGGAGAA ATTGCTCAGG TGCAAGACGT CTGTCAGGTA GCTGGGGAGC 960
AGGGCGCACA GGACGAATTG GCACGTCAGT ATGCATAGCA TCAAGGCAAT GTTGAGGCGC 1020
ACGTTGCCGC TGGACAGGGC TGTTCCGCAT TGGCTGCCGG AGGGTTCTAC GAGCGGCCTT 1080
GGATGGGGCG CCTGGCTCGG TTGGTAGGTT CGATACAGAT ACCAGGCCAC CAGCAGGCCC 1140
GGCAACGAGA TGATGGCGAA CACGGCGCGC CACGATCCGA ACATTTCAAA CAATACGCCC 1200
GCCAGCAGCG GCCCCAGGCA CAGGCCGATG ATGGGAAACA GTGCCTGCTG GATGCCCAGG 1260
TTGAGCCCGC GTCGGCACGG CTGCGAAACT TCATCGGTGA CAATGATGCT GACCGGGGTG 1320
AAGGCGCCTT CGCAGATCCC CATCAAGGCG CGCAGGAGCA CCAGGCCCAT AAGGCTTGAG 1380
ATCAACGCAG ATGCGCCGGC CAGGAGCGAT ACCAAGGTAA TCGAAAGCAC CAGCAGTTGC 1440



TTGGTGCCCA ATCGCCTGAT AGCAACGCCC ATGAAGAGGG CCGAGCCTCC CCAGGCAAAT 1500
GCCAGGATCG CCGATAACAG GCCCAGGTCC TGATAGTCCA GGGCCAGGTC ATGCATGATC 1560
ACCGGGAACA ACGGCATGAT AATGAATCGA TCAAGTCCTA CCAGCCCGAA GCTCAGCGAC 1620
AAAAGAACGA CCATGCGTCT TTCGTAGCCA CCCCAAGGTC GAGTGGCAAG ATACGTACTC 1680
TCCATGTTCT TCCCCTTCTT TCCTTAGCCC TTTCGACGTT TTCTCGAAAC GGGTGAACGC 1740
TTGTGTTTGA TACTCCTGTA GCCAGGGGCG GATCCGCCCC CGGCTTGGTG CGTGCAATGT 1800
GTTGGTCTGT CAGGCCACCC ACTTGCCAC GGCATTTC A GCTGTGAAGC CAGGGCCGAA 1860
GGCTGCCAGC ATGCCGGTCG CTCCATTGGC CGGCCCGCTG TCGAACTGGC GCTTGAGGAC 1920
GTGGAAGACC ACCACGCTGG CAATATTGCC GGCCTCGCTC AAGCTGTGCG GAGACTGCGC 1980
GACCCTGCCA GGTTCAGAT CGAGCTGCAG CACCAGCTCA TCAAGAATT TTCGTCCACC 2040
GCTGTGGAAG ATGAAAAAGT CATTTTGAGC GCAATGTTGG TTGAAGGTCT CGAAGTTCAA 2100
TTCCTCCATC ATCGGGGCCA CGTCTTAAAT GGAGTTCATG ACGGCTTGT CCAGGGTGAA 2160
GTGAAAGCCG CTGTCCTTGA CGTCATATTT AATGTAGTGC TCGCTGTCAG GCAGGAAATA 2220
AGAGCCGGTT TTGGCGATCT TGAATCCGG CGCCTTATCG TCGGCGCGCA TTACGCAGGC 2280
CGAGACGGCA TCGCCGAACA GCGCTGCGGA TATGAACGCG TGCAACTGG TGTCCTGTGG 2340
TTGATAGCAG AGTGACGAGA ACTCCAGCGA GACAATAAGG GCGTGGTTGT CTGGAGACAG 2400
GCTGGCAAAG TCGTTGGCTC GATTAATCGC CGCGGCGCCT GCCACGCATC CCAATTGAGC 2460
GATCGGCAAT TGTACGGTCG ACGTTCGCAG TCCCAAGTCA TTGATCAGGT GGGCTGTCAG 2520
CGATGGCATC ATGAACCCGG TGCAAGAGGT AACGGCGACC ATCCGGATGT CGTCCGTGGT 2580
CAAGCCCGCG TTTTCAATGG CCTGGCGCGC GCGATTGAA GACATGCGGC GAGCCTCTCG 2640
CTCATAACG ATGCTGCGGT GGGTAAAGCC GGTATGCACC GCAAGTTCAT CGATGGGCAA 2700
GACCAGATAC CGTTCATTGA CTTGGGTGTT TTGAATCATC CGTTTAGCCA ATGCCATGCG 2760
CGGATGATCG TCATGCAACT GTTCCAAGTG ATCGATCATC TGTTGTTGGG TAATTTTGT 2820
ATCGGGGAAA AGCAAGCTGG GTTTGCAAAG AGTAGACATG ACAAGTCCTC GGCTGAAAGC 2880
CAATAAAGAG TAGAAAACCA CGTTAAGGC AATGGCAAAG CAGGACTCTG AAAAGCAGAA 2940
TCAAACAACG GGCCGGTTGG CCGGAAATAG CGACTGTTGT TATGGATGGC GCGGTATGCA 3000
GCAGTAACTT GTTTGTTATT TCGCCAATAC GAATTTATAA GCGTATTGCC ACGCCAGGTT 3060



GCTTTCCCGA ACGTGCTTGC GAATAACCAT TCGCACTGGT GCTCCAGTCA CGACTTGCCG 3120
GGGATCGACG ACATCGACGA TTCCGAGGC GATCACCAAG CCATCGTCCA GGGCACCAT 3180
TGCCATGAAG CGCGGGACGG TTTCGCCATA TCCCATGGCC GCGAGAATGG GGTTTTTCAGC 3240
ATGGGGCGTG ACCTGGATCG TGCCGGTGCG TGCGCAGCGA TACGGTTCCA CGTTCAATGA 3300
GTTGCATGCG CCGCAGACGG TGCGCCGTGG GAAGAAGATT TCTTCGCAAT CCTGGCAGCG 3360
GCTGCCTTCG AGACGATATT TTCCGCCATG TTCGCGCCAT TCGCGCAACA TGCTGGCGGT 3420
GGTCATGCGG TGTATTTGTT CTGGGTAAAG GGACATGGTC GGCTCCTTAA TCGTTGGAAA 3480
GCACAATGAC GCTGTTATGC GCGGCGTAAC CGCCCAAGTT CTGCGAGACG CCAATGCGAG 3540
CGTCCTTGAC TTGGTTGTTG GACTCGCCGC GAAGTTGTCG GAACAGCTCG GTAATGTGCA 3600
GGATGCCGTC GCAACCAGAG GCGTGGCCGC GGCCAATATT GCCGCCATCG GTGTTTAAATG 3660
GCAGTTGCCC GTCGAGGGCT ATGCCGCCTT CCAATACAAA GTCGCCTGCC TGGCCTGGAC 3720
CACATACGCC CATGGATTCC ATCTGAATCA ATCCGGCACC CAGCAAGTCG TAGACTTGGG 3780
CCACATCGAT ATCCTTGGCG GTGATGCCGG CTTTTTTGTA GCGGATTCG GCGCAAGCAA 3840
TGGAGTTGGC GGAAACCGCC ATGCCGACGT CTTTTGGCAG GCCTGGATAT TTCAGGGTCG 3900
GGTTGTGATA GCGCGTCCCG AAATAATGGG ATACGCCGGT ATAGGCACAA CCACGGACGA 3960
ATACCGGTTG GGTCGTGTAG CGGTGCGCCA GGTGTTCCGC GACCAGGATG GCGCAACCGC 4020
TGGCTTCACC CCAGGCCAGC ATCGAGCCAC ATGCTTCGCT GTTCTTGAGG GTTTCAGGG 4080
ATGGCACCGG CACGCCATAG CGGGTTGCCG TGGGCGTGTT GTGCGCATAG ATGCGCATT 4140
GCCGACCAA CGTTGCCAGG ACATCCGCTT CGCGTCCTGC ATAGCCAAAT TTTTCAAAT 4200
ATTCCGGCGG TCGGAGGGCA AAGGCGTCGG TGTGCGAAAT GCCCAGGAA TAATCGTACT 4260
CACATTCGGT ACTGGAGCCG ATGTATTCGG CATAGTTGAA GTGGTCGCTC ATTTTTTCAA 4320
AGCCACCACA CAGGACGATG TCGTACTCAC CCGAGGCGAC CATCTGATGG GCCATCTGAA 4380
AGGAAACCGA GCTGCTGGTG CAGTTGGCAG TGCTCATGAA CGTCGGGGCA GGGCTGATGC 4440
CCAGGGCATC GGAAATAGTC GGGCCAGGC CGCCGTATTC GGAAATACCT TCACCGTGAT 4500
ATCCATAAGC GACTGCCTGA AGTTCACGGG GATGCATCTT GATGGCGTTG AGCGCCTGAT 4560
AGGCGGACTC GACGATCATC TCCTTGAAGG TTTGACGGAC TCTGGAGCTG CCGGGTTTGG 4620
AAGTATAGGC AGCCGAAACG ATAGCAACGC GTCGTGCGCT CATTGGAAGT GCTCCTTGCT 4680
GGATGGTTGG GAATCAGAGG TAGGCTGTCA GGGCGTAGTC AGGCCGCAAG TATTTGAACT 4740

CGTACTTGAT CGACGTCCCG TAATCCACGT AATACTTGTC TTCCAGCAGC GTGCGCAGCG 4800
 CAACGTTGGT CTTTTGGTAG GCTTCGATGG CATCGGTCAC TGTC AACGCA ATCGCATCGC 4860
 TGCCCGCACC AAACCCGTAC GACACCAAGA GGATTTTTTC ACCCGGACGC GCTCGGTCCA 4920
 GTACGCTCAC CAAGCCCAGC AACGGACTCG CGGCCCCCGC ATCACCGACA CTCTGGGCAT 4980
 AAATGCCAGG TTCGATCTGC GCTTTGGTGA AGCCCAGGCC TTTGCCAAGA GAGAAGGGGG 5040
 TCGAAACCAG GTTTTGCTGG AATACGACAT AGTCGAAATC GCTGGCCTGT ACATTCATCT 5100
 TGGCCATCAA TCCCGACGCA GCACGATGGG TCTGGTCTTC AAGGCCAATG CTGTTCCTGT 5160
 CGGAGCCCAG CCCCATTCCT GAGCGAATGT AGCGGTCTCC CTGGGGGCGG ATGTTGTCAG 5220
 CCACATCGGC GCGCAAGAA AAGCTGGCAT CGAAATGCGC GATCACATTT TCAGTACCCA 5280
 ACAACAGTGC GCGGGCTCCC GCTCCGGCGT AGGACTCGGT CAAGTCGCCG GGGGCGGTGT 5340
 TGCGGTTGAT CGTATCGCGC CCTATTGCCA GTGCATTGCC GGCCATGCCC GAGGCTACCA 5400
 GGGCATAGGC GATCTGCAGG GCGCTGGTGC CTGATTTGCC GGCAAACTGT ACGTCCGCGC 5460
 AGAAGGCGTC ATAACCGCAG CCGAGCATTT CCAGAATGAC CGCGGCCGAG GCGCGGGAGT 5520
 CATATGGGTT GGTGCACGTA CCCAGGTACA GCGCTTCCAG GTCGCAAGAA GGGGCTTTGT 5580
 CCAGCGCAGG TTGAGCGGCC AGGACACTCA AGGTAATGAC GTCCTCATCG GGTGGAGTA 5640
 CAGCCCTTTC AACGACGCCC AGTTGGTTGG TGACCAGACT CAAGTCTGTG TTTTCCAGA 5700
 CGTGGATCAC GTCTTCCACT TTAAGGCGGC ACACCGGGAT GCCCGCGCCA TAGCTCACAA 5760
 TTCCTACTTT ATTCACGTGT ACTTCCTCCA GATTCCTTTC TTCACCTGCC AGCGGATAGC 5820
 CGTGACCGAT GCATGAAATA TTTAGAACT ATCTAACGGT GCCCGCAAAG TGTCGTTGGC 5880
 AGTCCTATGC CCGGAAATCG GGCTCCTCAA GGGGAAAAC TACAGTTCCT TTGAGGGAGA 5940
 ACGGGTTTAT TATCCTTCTA TTATTATGTA TGATACGAAA CGTGCCGTAT CGTTAAGGTC 6000
 TTGTTAAAAA TTGATGACTA TTTATCGGGT TTCTTCCTAT CTAGTGGCAA GTTCCGCTAT 6060
 TGAGGTGTGC AGTTAAGCAG AAACCTAGAT CATAAAAACA TACAAAACGA AACGATCCGT 6120
 TTCATTGCTT TTCGAGAGAA TCCTATACCT TGCGTCTCTT TTGTCAAGCG CCATATTGGA 6180
 GATTTTGAAT TATGGCCCGT AAACCGTCTC GGAGCTCCAT TGGCTCATTG AGGAGCCCAC 6240
 ATACGCACAA AGCGATCATC ATCTCCGCTA TAGAAACACT CAAGGAGTGC GGTATTTCAG 6300
 GGTTGAGTAT CGAGGCTGTG GCTCGCCGTG CCGGCGCGAG CAAGCCGACC ATCTATCGAT 6360

GGTGGGGTAA CAAGGCGGCT TTGATCGCCG AAGTCTACGA GAGCGAAAGC GAGCAGATTC 6420
 GCAAGGAGCC TGATAAAGGA TCCTTCAAGG AGAACCTCAA TTCCTGCTG CTCAATCTGT 6480
 GGAAGGTCTG GAGAGAAACG ATTTGCGGGG AGGCGTTTCG GTGTGTCATC GCTGAAGCCC 6540
 AGCTCGACCC CAGTACGCTG CCCAAGCTGA AGGATGAATT CATGGAGCGT CGTCGGGAAT 6600
 TGCCCGGAAA GCTGGTGGAA AACGCCATCC AGCAAGGTGA GTTGCCCAAG GACACGTCCC 6660
 GTGAGTTGTT GTTGGACATG ATCTTCGGAT TTTGCTGGTA CAGGCTGTTG ACTGAGCAAC 6720
 TGGAAGTGGA GGGTGACATC AATGAATTCA CGACGCTTCT GTTGAACGGC GTGTTGCGTA 6780
 CGACTTCGGC GGCGGAGTAA GGCGCCGCCG AAGCCTGTTT AAGGGTGAGG ATTGGCCTTA 6840
 CGCCGCGCCG CTGAACTGTG CATGAAGGCC AGGCAGGATA CTGGCCAGGT GGTGAACTC 6900
 ACACAGATCA TGCACAGCAA ATTCATAAGC CAGGGTTTCC AGTTCGGCTT CCCCAAACCC 6960
 GTTTTCCTTC AACAACTGCG CGGCGGTTT GGCACCGGGA AAACGCAGCA TCGCTGGGTG 7020
 GCTGCCACC CAGTAACGGC TGGTCAGGTA CAAGCCTTCG GGCATTCTT TGAACAAGTG 7080
 CACCATGAGC GATATCGGCA CTTGCGGCTG ATCCGCCAGG CTCATCAAGG CGCTGACGCT 7140
 GCCGTCTATT TTTGATTTCG GATACAGGTC CGCAGAGAAA CCCAGCTCGC ATGGATCC 7198

(2) 序列 5 资料:

(i) 序列特征:

- 5 (A) 长度: 350 个氨基酸
 (B) 类型: 氨基酸
 (D) 拓扑结构: 线形

(ii) 分子类型: 蛋白

(xi) 序列描述: 序列 5:

10

Met Ser Thr Leu Cys Lys Pro Ser Leu Leu Phe Pro His Tyr Lys Ile
 1 5 10 15
 Thr Gln Gln Gln Met Ile Asp His Leu Glu Gln Leu His Asp Asp His
 20 25 30
 Pro Arg Met Ala Leu Ala Lys Arg Met Ile Gln Asn Thr Gln Val Asn
 35 40 45
 Glu Arg Tyr Leu Val Leu Pro Ile Asp Glu Leu Ala Val His Thr Gly
 50 55 60

000700

Phe Thr His Arg Ser Ile Val Tyr Glu Arg Glu Ala Arg Arg Met Ser
65 70 75 80

Ser Ile Ala Ala Arg Gln Ala Ile Glu Asn Ala Gly Leu Thr Thr Asp
85 90 95

Asp Ile Arg Met Val Ala Val Thr Ser Cys Thr Gly Phe Met Met Pro
100 105 110

Ser Leu Thr Ala His Leu Ile Asn Asp Leu Gly Leu Arg Thr Ser Thr
115 120 125

Val Gln Leu Pro Ile Ala Gln Leu Gly Cys Val Ala Gly Ala Ala Ala
130 135 140

Ile Asn Arg Ala Asn Asp Phe Ala Ser Leu Ser Pro Asp Asn His Ala
145 150 155 160

Leu Ile Val Ser Leu Glu Phe Ser Ser Leu Cys Tyr Gln Pro Gln Asp
165 170 175

Thr Lys Leu His Ala Phe Ile Ser Ala Ala Leu Phe Gly Asp Ala Val
180 185 190

Ser Ala Cys Val Met Arg Ala Asp Asp Lys Ala Pro Gly Phe Lys Ile
195 200 205

Ala Lys Thr Gly Ser Tyr Phe Leu Pro Asp Ser Glu His Tyr Ile Lys
210 215 220

Tyr Asp Val Lys Asp Ser Gly Phe His Phe Thr Leu Asp Lys Ala Val
225 230 235 240

Met Asn Ser Ile Lys Asp Val Ala Pro Met Met Glu Glu Leu Asn Phe
245 250 255

Glu Thr Phe Asn Gln His Cys Ala Gln Asn Asp Phe Phe Ile Phe His
260 265 270

Thr Gly Gly Arg Lys Ile Leu Asp Glu Leu Val Leu Gln Leu Asp Leu
275 280 285

Glu Pro Gly Arg Val Ala Gln Ser Arg Asp Ser Leu Ser Glu Ala Gly
290 295 300

Asn Ile Ala Ser Val Val Val Phe Asp Val Leu Lys Arg Gln Phe Asp
305 310 315 320

Ser Gly Pro Ala Asn Gly Ala Thr Gly Met Leu Ala Ala Phe Gly Pro
325 330 335

Gly Phe Thr Ala Glu Met Ala Val Gly Lys Trp Val Ala *
340 345 350

说明书附图

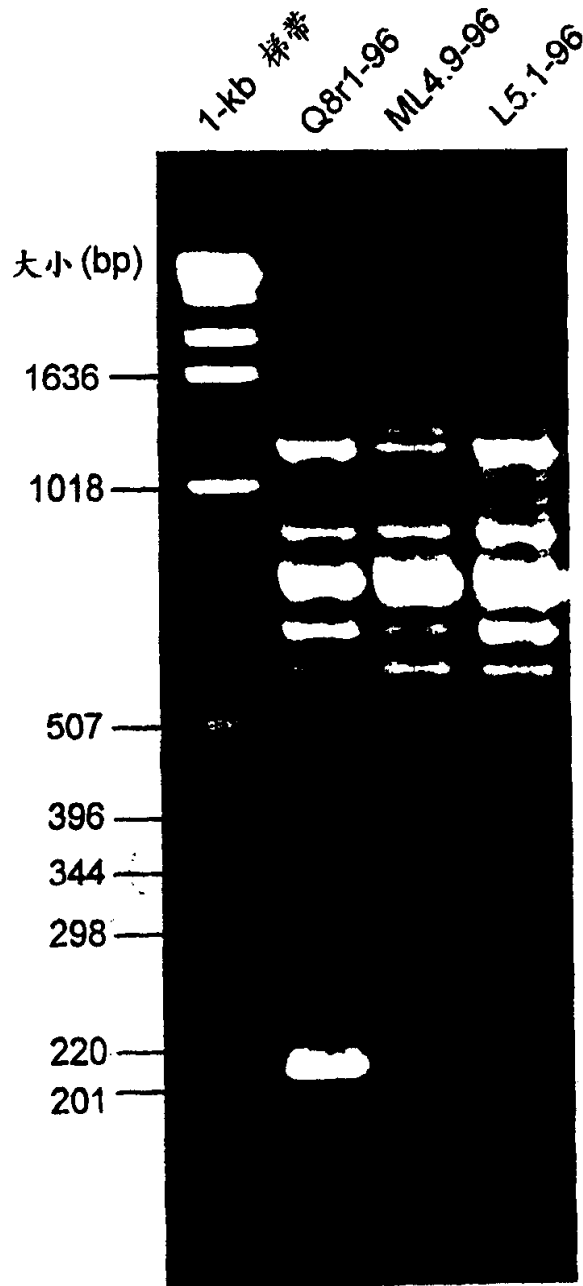


图 1

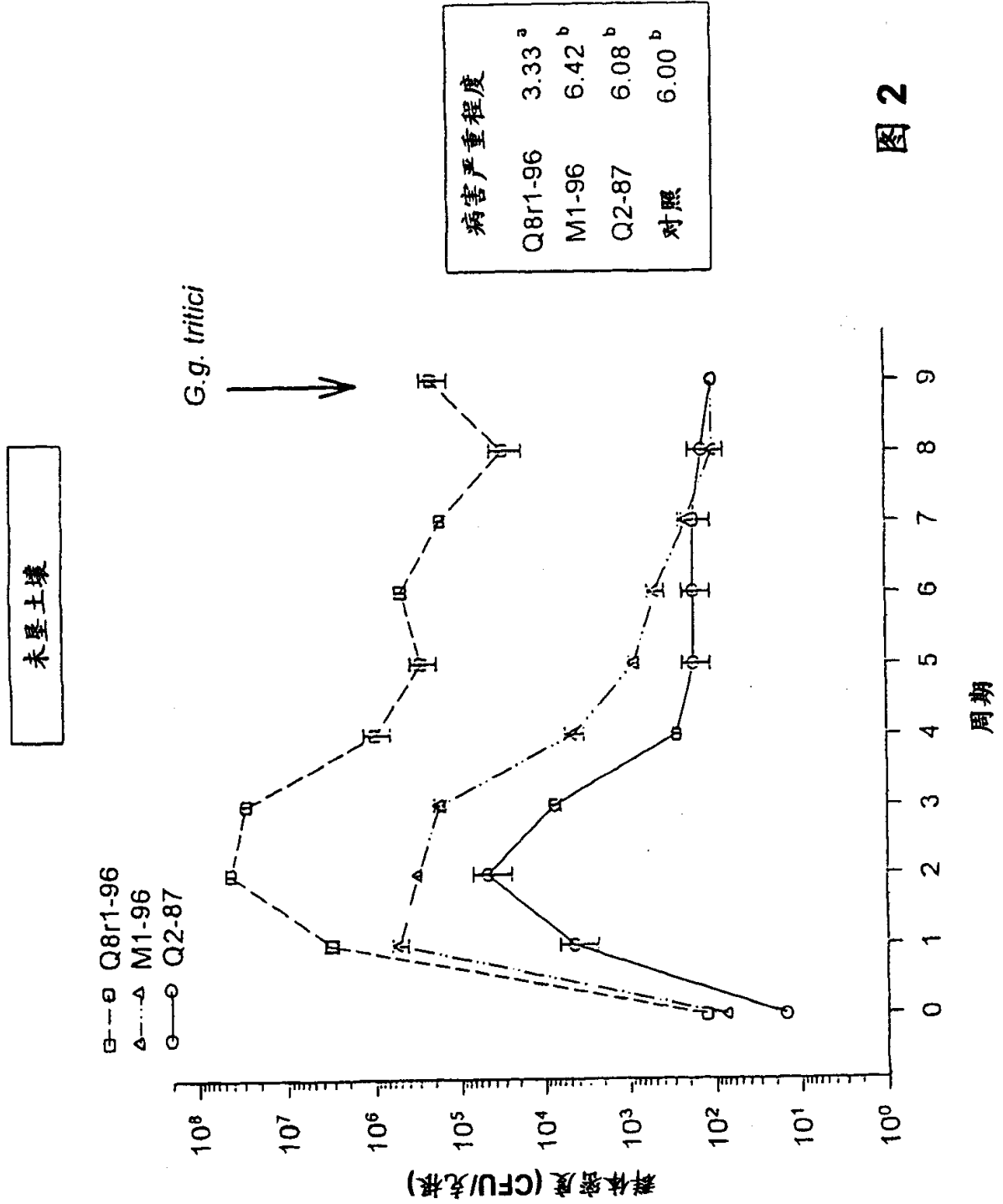


图 2

未垦土壤

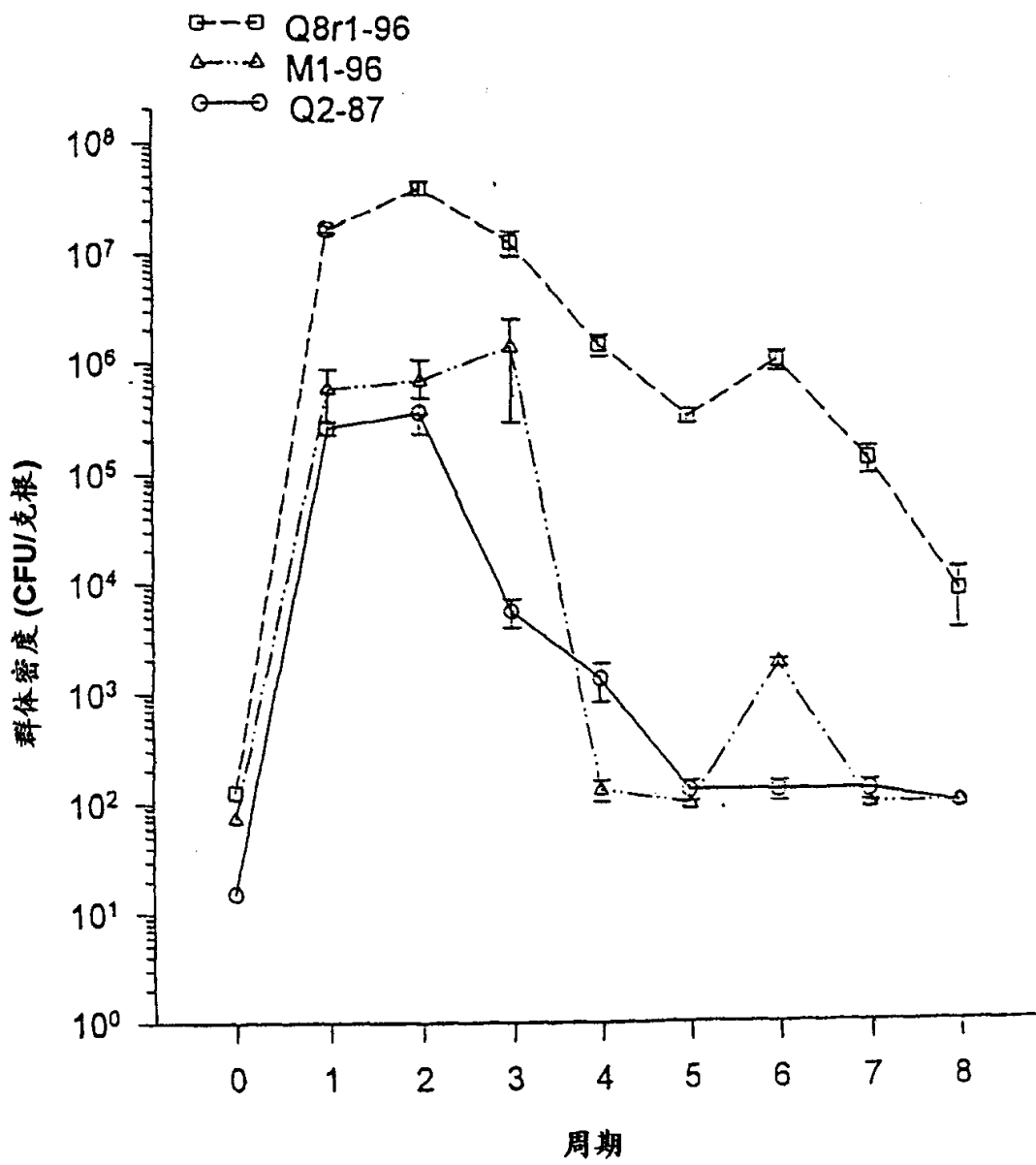


图 3

Moses湖未垦土壤

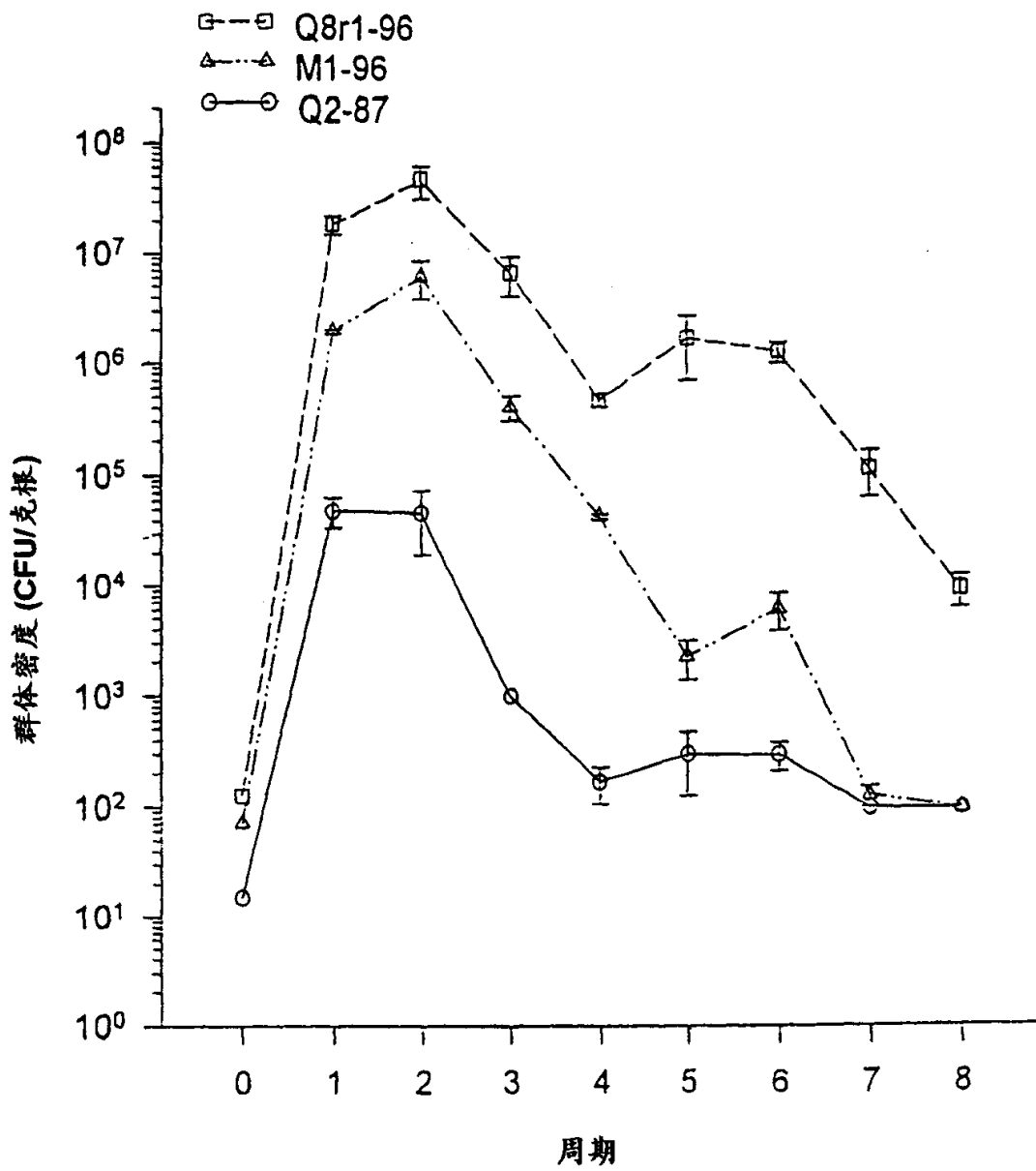


图 4

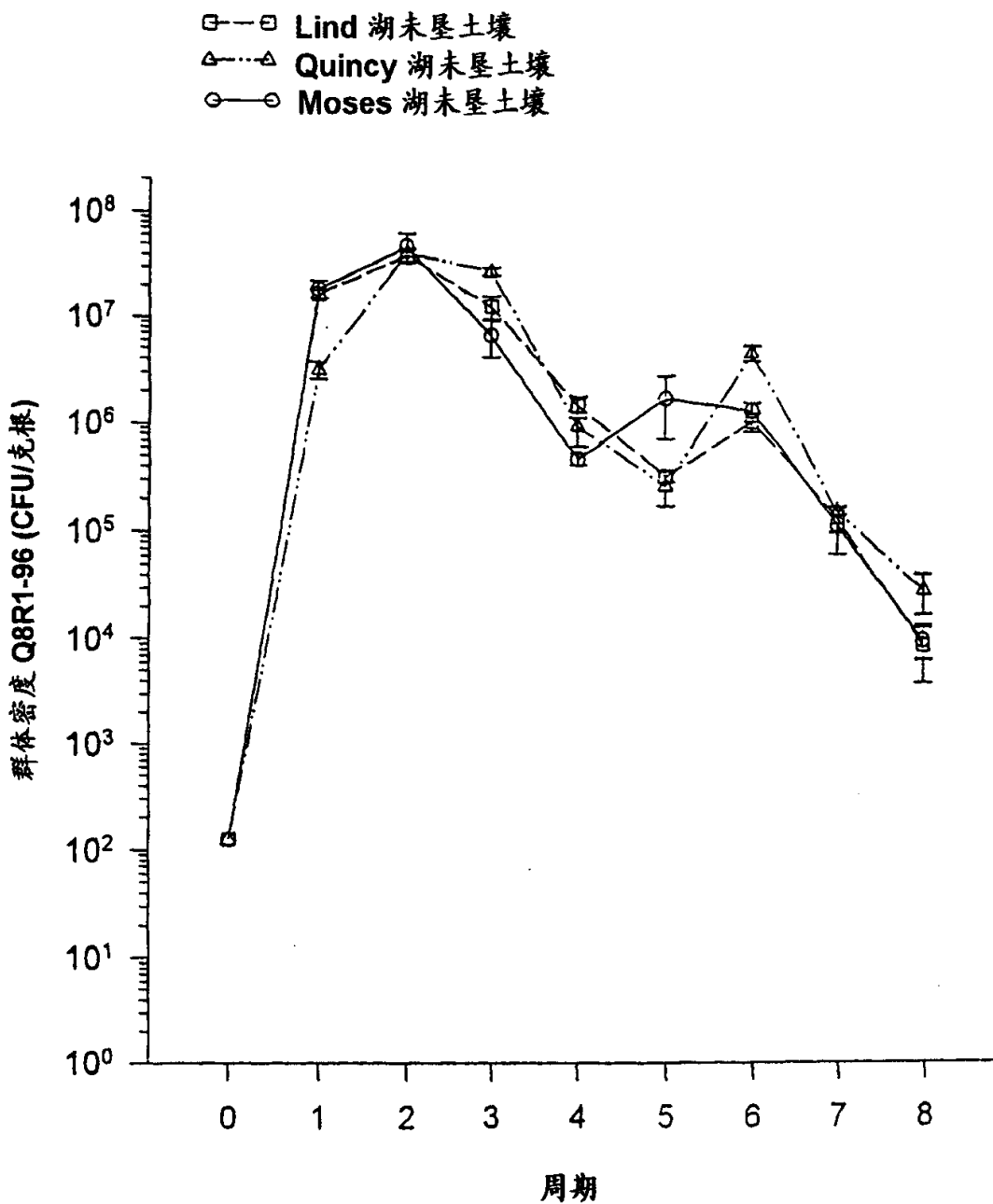


图 5

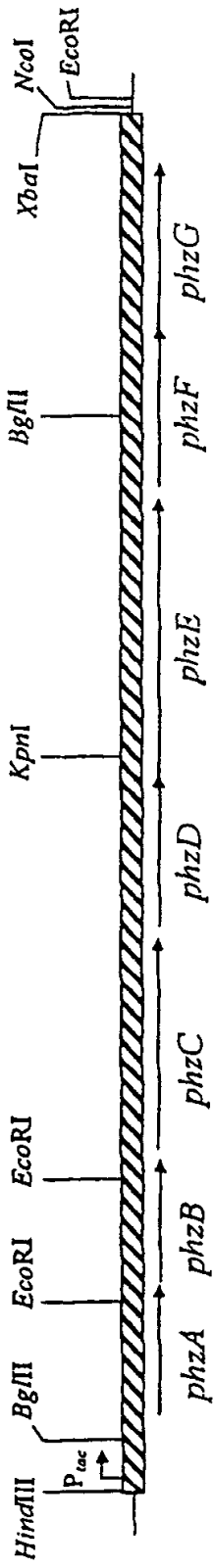
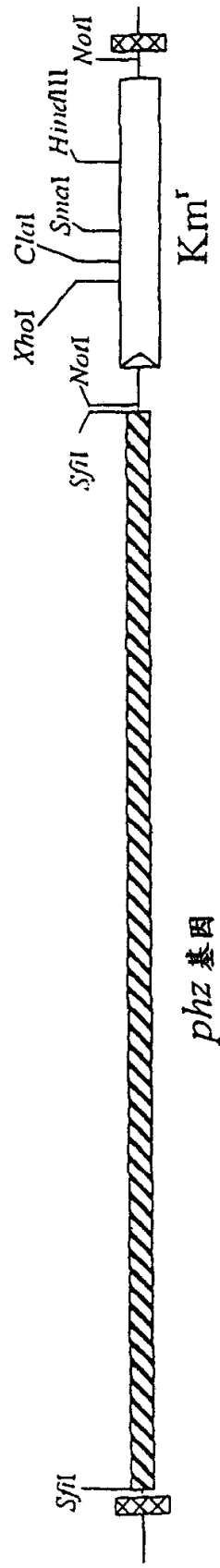


图 6



phz 基因

图 7