

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12N 1/14

A01N 63/04

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97192337.X

[43]公开日 1999年3月17日

[11]公开号 CN 1211276A

[22]申请日 97.10.1 [21]申请号 97192337.X

[30]优先权

[32]96.10.17 [33]JP [31]274869/96

[86]国际申请 PCT/JP97/03511 97.10.1

[87]国际公布 WO98/17780 日 98.4.30

[85]进入国家阶段日期 98.8.17

[71]申请人 日本烟草产业株式会社

地址 日本东京都

[72]发明人 乡原雅敏

高森美千代

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 壳二孢属的微生物及其应用

[57]摘要

通过用壳二孢属菌株对苔草科 蔗草属杂草实施选择性致枯或生长控制而又不影响诸如稻的作物的方法,所述壳二孢属菌株对萤蔺欧万斯变种(*S. juncoides* Var. *ohwianus*)、萤蔺侯塔瑞变种(*S. juncoides* Var. *hotarni*)、猪毛草(*S. Wallichii*)或线状蔗草(*S. Lineolatus*)中的任一种具有致病性。

权 利 要 求 书

1. 一种属于壳二孢属菌株，它对萤茵欧万斯变种、萤茵侯塔瑞变种、猪毛草或线状蕉草中的任一种具有致病性。

5 2. 如权利要求 1 的菌株，其特征在于所述壳二孢属菌株是壳二孢菌 JT - 1006、壳二孢菌 JT - 1007、壳二孢菌 JT - 1008、壳二孢菌 JT - 1009、壳二孢菌 JT - 1010。

3. 一种除草剂，含有对萤茵欧万斯变种，萤茵侯塔瑞变种，猪毛草或线状蕉草的任一种有致病性的属于壳二孢属的菌株作为活性成份。

10 4. 如权利要求 3 的除草剂，其所述属于壳二孢属的菌株是壳二孢菌 JT - 1006、壳二孢菌 JT - 1007、壳二孢菌 JT - 1008、壳二孢菌 JT - 1009、壳二孢菌 JT - 1010。

5. 一种用权利要求 3 或 4 的除草剂控制杂草的方法。

说明书

壳二孢属的微生物 及其应用

5

发明领域

本发明涉及壳二孢属 (the genus *Ascochyta*) 的新菌株, 含有该菌株的除草剂和使用该菌株的杂草控制方法。

发明背景

- 10 作为控制莎草科藨草属杂草 (the genus *Scirpus* in *Cyperaceae*) (生长于稻田和大田中的主要杂草)的方法, 主要是采用使用化学除草剂的方法。近来, 鉴于因大量使用农药而造成的环境污染问题, 希望开发出不依赖于农药的除草剂和使用这种除草剂的方法。具体地讲, 特别希望使用植物致病性真菌的微生物除草剂。迄今为止, 已注册为除草剂并实现商品化的有 Devine(美国; 目标杂草 (target weed): *Stranglervine*, 萝藦科)、*Collego*(美国; 目标杂草: *Novthern jointvech*, 豆科)和 *BioMal*(加拿大; 目标杂草: 圆叶锦葵, 锦葵科)。不过, 尚未开发出针对莎草科藨草属杂草的微生物除草剂。而且, 还不知道属于壳二孢属的微生物并具有对稻田主要杂草萤蔺欧万斯变种 (*Suirpus junicoides* var.*ohwianus*), 萤蔺侯塔瑞变种(*S.juncoides* var.*hotarui*)、
- 15 猪毛草(*S.wallichii*)或线状藨草(*S.lineolatus*)的致病性。
- 20

本发明要解决的问题

本发明的目的是提供一种用微生物控制莎草科藨草属杂草的方法。

发明内容的公开

- 25 作为对上述问题的解决方案进行广泛、深入研究的结果, 本发明人已发现了壳二孢属的几个菌株对藨草属的杂草具有卓越的控制能力。因此, 本发明已达到了目的。

本发明涉及一种属于壳二孢属的菌株, 它对下列杂草中的任一种具有致病性: 萤蔺欧万斯变种、萤蔺侯塔瑞变种、猪毛草或线状藨草。

- 30 本发明还涉及一种含有一种作为活性成分的菌株的除草剂, 该菌株属于壳二孢属, 并对下列杂草中的任一种具有致病性: 萤蔺欧万斯变种、萤蔺侯

方法中，孢子浓度优选约为 $10^6 - 10^{12}$ 孢子/ml，但其浓度并不局限于这一特定范围。在将孢子悬浮于水中时，可以加入诸如表面活性剂，和展布剂的佐剂。作为主剂的所述微生物可以是刚发酵出来的新鲜微生物。另外，还可以使用经水等复性（renaturing）后的一次保存的微生物。作为保存方法，可以使用众所周知的微生物保存方法，如超低温保存（ -80°C ）、或真空冷冻干燥等。

本发明的控制方法是通过将上述除草剂用于大田中而实现的。施用量可取决于杂草的旺盛生长程度。通常，需要在每 10 英亩（a.）大田中使用具有 $10^{11} - 10^{15}$ 孢子的除草剂。

10 本发明除草剂和控制方法和目标植物无特别限制，但对于藨草属的植物尤其有效。藨草属植物的例子包括，但不限于萤蔺侯塔瑞变种、萤蔺欧万斯变种、猪毛草、线状藨草、日本藨草（*Scirpus nipponicus*）、藨草（*Scirpus triquetus*）、水毛花（*Scirpus trianglatus*）、荆三棱（*Scirpus yagara*）和扁秆藨草（*Scirpus planiculmis*）。另外，对目标植物的生长阶段没有特别限制。本发明的除草剂和控制方法可用于各种植物，从刚萌发的植物到已长成的植物。

实现本发明的最佳方式

1) 产生本发明新菌株的方法，

收集生长于稻田或大田中的、表现出染病症状的莎草科藨草属杂草或其种子，并切除染病部分。将切除的叶片部分在 70 % 的乙醇中浸泡 30 - 60 秒，然后悬浮于通过将 1 % 次氯酸钠溶液悬浮于等体积 0.1 % Tween80 溶液而制备溶液中，并浸泡 1 - 3 分钟，以将其表面消毒。随后，用 0.1 % Tween80 溶液洗涤所述叶片 1 次，用无菌水洗涤 2 次。然后，将所述叶片放在含有抗生素的 PDA 培养基上，并于培养箱中在 25°C 下培养 2 - 5 天。将长形菌落的边缘部分转移到新鲜 PDA 培养基上，以产生分生孢子。另外，将该分生孢子划线接种到新鲜 PDA 培养基上，并进行培养，以得到单菌落。因此，实现了微生物的纯化分离。

再次，检验所分离每一菌株对莎草科藨草属杂草的致病性，同时检验其对稻、小麦、玉米、蕃茄和黄瓜的影响。结果，分离得到了对莎草科藨草属杂草具有良好控制作用，但不影响稻、小麦、玉米、蕃茄和黄瓜的新菌株壳二孢 JT - 1006（*Ascochyta* sp. JT - 1006）、壳二孢菌 JT - 1007（*Ascochyta* sp. JT - 1007）、壳二孢菌 JT - 1008（*Ascochyta* sp. JT - 1008）、壳二孢菌 JT

- 1009(*Ascochyta* sp. JT - 1009)和壳二孢菌 JT - 1010(*Ascochyta* sp. JT - 1010)。

2)鉴定所产生的菌株

本发明菌株的鉴定主要是通过观察其分生孢子的形态学而实现的。结果是，所述菌株被鉴定为属于壳二孢属的微生物，如上文所述。

3)大量培养和制备的方法

通过以下方法一次将大量属于壳二孢属的微生物接种到培养皿(直径为9cm)中是可行的。简单地讲，将灭过菌的水加至生长于 PDA 的培养基上的微生物中，并搅拌，以制成高浓度的孢子悬浮液。然后将大约 100 μ l 该悬浮液滴加到 V - 8 汁 (juice) 琼脂培养基上，并用灭过菌的 L 形玻璃分散。结果，孢子的产量为 6×10^7 孢子/培养皿。

如上所述，通过平板培养很容易由本发明微生物获得大量的孢子。

然后，通过将所获得孢子悬浮于 10 % 脱脂乳中并进行真空干燥，可以制成可湿性粉剂。由此得到的可湿性粉剂悬浮于水中，并加入诸如 Tween80 的表面活性剂之后，可以用在杂草上。

4)对萤菌欧万斯变种的致病性试验。

将萤菌欧万斯变种的种子悬浮于由次氯酸钠溶液和等体积的 0.1 % Tween80 溶液组成的混合液中，并浸泡 1 - 3 分钟，以进行表面消毒。将作过表面消毒的种子植入装在预先消过毒的植物培养试管中。然后，将种子培养至 1 - 2 叶期 (leaf stage)，从而获得测试样品。

在马铃薯琼脂培养基上培养本发明的微生物，并用软木打孔器对所得到的菌丝体进行打孔，以得到两个圆片 (disk)，将其接种到上述试管中。将所述试管放入培养箱中，在 25 $^{\circ}$ C 下培养 10 天，然后检查对萤菌欧万斯变种的控制百分比。结果如表 1 所示。本发明微生物对萤菌欧万斯变种的杀伤百分比为 100 %；而且，本发明微生物对萤菌欧万斯变种的控制百分比也为 100 %。

菌株 No.	杀伤百分比	控制百分比(%)
JT - 1006	100	100
JT - 1007	100	100
JT - 1008	100	100
JT - 1009	100	100
JT - 1010	100	100
JTKA - 644	0	0
JTH - 102	0	0
JTSS - 001	0	0

* 控制百分比: 植物在整体上减弱的比例(远测)

* JTH - 102: 获自稗 (barnyard grass) 的 *Exserohilum monoceras*

由表 1 可以看出, 本发明的每一种微生物均对萤菌欧万斯变种表现出卓越的控制作用。

对莎草属的致病性试验是以大体上与萤菌欧万斯变种的致病性试验相同的方式进行的。所用的圆片数为2个。

所使用的试验植物有萤蔺侯塔瑞变种、猪毛草、线状藨草和日本藨草。结果如表 2 所示

15

植物	作用的有/无
萤蔺侯塔瑞变种	+
猪毛草	+
线状蕉草	+
日本蕉草	+

6

Figure 1 shows a schematic diagram of a 3D hexagonal lattice structure. The lattice is composed of black dots representing atoms, arranged in a hexagonal pattern. A central atom is highlighted with a larger dot. The lattice is shown in a perspective view, with atoms at different heights indicated by vertical lines. The diagram is labeled with 'a' and 'b' axes, and a 'c' axis is also indicated.

6)对作物的影响

表 3 对作物的影响

植物	有或无
稻	-
小麦	-
玉米	-
茄子	-
大豆	-
甘蓝	-
黄瓜	-
萤蔺欧万斯变种	+

10 -： 无影响

〔制剂实施例 1〕(液体制剂)

[制剂实施例2] (可湿性粉剂)

20 [制剂实施例3](可湿性粉剂)

7

燥，然后混合干燥的材料，并将其粉碎，以制成可湿性粉剂。

[制剂实施例 4] (粉剂)

将 10^8 个壳二孢菌 JT - 1009(*Ascochyta* sp. JT - 1009)的分生孢子混入由羟丙基 - β - 环糊精(14 %)、白炭黑(12 %)和粘土(74 %)组成的 1g 混合物中。干燥所得到的混合物，并均匀粉碎，以制成粉剂。

[制剂实施例 5] (颗粒)

将 10^8 个壳二孢菌 JT - 1010(*Ascochyta* sp. JT - 10¹⁰)的分生孢子加入由 β - 环糊精(15 %)、淀粉(2 %)、膨润土(18 %)、碳酸钙(36 %)和水(29 %)组成的 1g 混合物中并捏和。然后，用造粒机将捏和的材料成形为颗粒状，并干燥。由此制得颗粒。

[制剂实施例 6] (可乳化浓缩物)

将 10^8 个壳二孢菌 JT - 1008(*Ascochyta* sp. JT - 1008)的分生孢子加入由聚氧乙烯壬基苯基醚磷酸铵(18 %)、聚氧乙烯壬基苯基醚(6 %)、磷酸三乙酯(29 %)和磷酸三丁酯(47 %)组成的 1g 混合物中，并使其均相悬浮，从而得到可乳化浓缩物。

[制剂实施例 7] (油状制剂)

将 10^8 个壳二孢菌 JT - 1008(*Ascochyta* sp. JT - 1008)的分生孢子悬浮于由锭子油(95 %)、蓖麻油(4 %)和硅油(1 %)组成的 1ml 混合物中，从而制成油状制剂。

[制剂实施例 8] (干性流动剂)

将 10^8 个壳二孢菌 TJ - 1006(*Ascochyta* sp. JT - 1006)的分生孢子悬浮于由烷基苯磺酸钠(12 %)和聚乙二醇醚(88 %)组成的 1ml 组合物中，从而制成干性流动剂。

[制剂实施例 9] (胶囊)

将 10^8 个壳二孢菌 JT - 1007(*Ascochyta* sp. JT - 1007)的分生孢子悬浮于由藻酸钠(0.7 %)、高岭土(5 %)、甘油(15 %)和水(79.3 %)组成的 1ml 溶液中，将该悬浮液滴入 0.2M 乙酸钙溶液中，从而获得胶囊状制品。将该制品切成块，过筛和风干，以制成胶囊。

本发明效果

本发明的除草剂可选择性地杀伤莎草科蘆草属的杂草，或抑制其生长，从而对这些杂草加以控制，而又不含影响诸如稻的作物。另外，与农药不同

的是，本发明的除草剂不会污染或破坏环境。