

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A01N 63/00
C12N 1/20
//(C12N1/20,C12R1 : 465)



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 94192638.9

[45] 授权公告日 2003 年 7 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 1113604C

[22] 申请日 1994.6.29 [21] 申请号 94192638.9
[30] 优先权
[32] 1993. 6.30 [33] US [31] 08/085,448
[86] 国际申请 PCT/US94/07373 1994.6.29
[87] 国际公布 WO95/01099 英 1995.1.12
[85] 进入国家阶段日期 1995.12.29
[71] 专利权人 爱达荷研究基础公司
地址 美国爱达荷州
[72] 发明人 唐纳德 L·克劳福特 徐衡源
[56] 参考文献
US4534965 1985.08.13 A01N63/00
审查员 常 矛

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司
代理人 丁业平

权利要求书 2 页 说明书 49 页 附图 2 页

[54] 发明名称 应用链霉属菌 WYEC108 控制植物病原菌

[57] 摘要

本发明涉及适于降低植物对真菌性植物病原菌感病性的生物控制制剂。在本发明的一个方面，将一种新分离的链霉属菌株(链霉属菌 WYEC108)掺入适当的转移培养基中并施加到植物种子和植物根上。

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

1. 一种利迪链霉菌 (*Streptomyces lydicus*) WYEC 108 的生物学纯的培养物, 具有 ATCC 55445 的鉴定特征。
2. 权利要求 1 的微生物, 其中微生物能对敏感植物的真菌感染提供保护。
3. 一种组合物, 包含:
一种利迪链霉菌 WYEC 108 的生物学纯的培养物; 和
一种转移培养基。
4. 权利要求 3 的组合物, 其中转移培养基至少包含下列成份中的一种: 藻酸盐凝胶, 泥炭, 沙和玉米粉。
5. 权利要求 3 的组合物, 其中转移培养基包含足够量的氮源。
6. 权利要求 4 的组合物, 其中转移培养基包含泥炭、沙、玉米粉和足够量的氮源。
7. 权利要求 6 的组合物, 其中氮源是氯化铵。
8. 权利要求 3 的组合物, 其中利迪链霉菌 WYEC 108 生物学纯的培养物包含利迪链霉菌 WYEC 108 的孢子。
9. 一种用于保护植物抵抗真菌感染的组合物, 包含利迪链霉菌 WYEC 108 和在合适的容器内的传递介质。
10. 一种降低植物对真菌感染的易感性的方法, 其中的方法包含将利迪链霉菌 WYEC 108 传递到植物的根部。
11. 一种降低植物对真菌感染的易感性的方法, 其中的

方法包含下列步骤：

将种子浸入含利迪链霉菌 WYEC 108 的组合物中；和
将种子种植在合适的生长培养基上。

12. 权利要求 11 的方法，其中 组合物进一步包含藻酸盐凝胶。

13. 一种保护植物抵抗真菌感染的方法，包含下列步骤：

提供一种利迪链霉菌 WYEC 108 的培养物；
制备含所述培养物的转移培养基；以及
将所说的转移培养基传递给植物。

14. 一种促进植物生长的方法，包含给种子或幼苗提供一种组合物，该组合物包含一种转移培养基和选自利迪链霉菌 WYEC 108 细胞，利迪链霉菌 WYEC 108 孢子和由利迪链霉菌 WYEC 108 产生的抗真菌代谢物组成的一组中的至少一种成份。

应用链霉属菌 WYEC 108 控制植物病原菌

发明领域

本发明涉及能抑制土生植物病原菌生长并促进植物生长的链霉属细菌新菌株。

发明背景

真菌性植物病原菌在农业和园艺产业上引起严重的经济损失。许多不同类型的真菌性植物病原菌已被描述：这些病原菌引发诸如(湿)烂病,白色腐烂病,棕色腐烂病和根腐烂病的植物疾病。这些疾病能杀死萌发的幼苗,降低植物活力并对农作物产量产生不利影响。

为减少真菌感染,在苗圃植物的苗圃上,可以在蒸汽灭菌或化学处理的土壤上生长幼苗。然而,这些处理也去掉了土壤中的有益微生物,包括在正常情况下与土壤真菌相竞争的微生物。在此情况下,如果意外地引入真菌性病原菌,它会迅速传播并产生普遍的疾病。

在农业生产上,被植物病原性真菌感染的土壤不适于生长某些农作物。例如,在密歇根州和其它产大豆州,大豆生产经常受到由真菌 *Phytophthora megasperma* 引起的疫霉属根腐烂病的严重限制(Filinow and Lockwood, 1985)。Pythium 真

菌种类在加利福尼亚州,华盛顿州和爱达荷州的部分地区土壤中普遍存在。*Pythium ultimum* 是遇到的最普遍的病原菌种类,并与幼苗芽前和芽后的(湿)烂相联系。这些是生长于这些州的土壤和其它州和其它国家的土壤中的小麦、豌豆、鹰嘴豆和其它农作物植物的严重病原菌(Trapero—Casas et al., 1990; Stanghellini and Hancock, 1970; Kraft and Burke, 1971; Westerlund et al., 1988)。使用化学试剂来控制真菌性植物病原菌通常并不实际,因为花费昂贵,缺乏效力并且会出现具有抗性的真菌菌株。而且从环境角度来看,不应使用化学杀真菌剂。

本发明的目的是提供减少植物被真菌性病原菌感染的生物控制方法。

发明概要

上述目的是经过分离许多显示出有效抑制真菌性植物病原菌生长的放线菌类细菌来实现的。特别是本文命名为链霉菌属 WYEC 108(本文也称作 WYEC 108)的一种分离的放线菌类细菌对大范围的真菌性植物病原体(包括引起通常作湿烂病,根腐烂病,白色腐烂病和棕色腐烂病的植物疾病的病原菌)表现出强烈的拮抗作用。因此,本发明的一个方面是链霉菌属 WYEC 108 的生物学纯的培养物。

本发明还提供了适于用链霉菌属 WYEC 108 处理植物种子或植物根的各种组合物。这些组合物对降低植物对真菌感染的易感性和促进处理的植物的生长有用。在优选的实施

方案中,这类组合物包含链霉菌 WYEC 108 生物学纯的培养物和转移培养基。在特定实施方案中,转移培养基可包含藻酸盐凝胶,泥炭、沙或玉米粉。在一个实施方案中,本发明包括包含泥炭、沙和玉米粉的转移培养基和链霉菌属 WYEC 108。在另一实施方案中,转移培养基包含每克转移培养基至少 10^5 集落形成单位。

在另一实施方案中,本发明包含含有链霉菌属 WYEC 108 的藻酸盐凝胶块。这种凝胶块能直接加到生长植物的根部或园艺或农用土壤中以减少由植物病原性真菌引起的对植物的损害。

本发明还包含降低植物对真菌感染易感性的方法。在一个实施方案中,该方法包含将链霉菌属 WYEC 108 传递到植物根部。在另一实施方案中,该方法包含将种子浸入含有链霉菌属 WYEC 108 的组合物中并随后将覆盖的种子种植在适当的生长培养基中。在这种方法中,适当的组合物包括含有链霉菌属 WYEC 108 的藻酸盐凝胶。

附图的简要描述

图 1 包括扫描电子显微照片,显示链霉菌 WYEC 108 的螺旋形链(上面)和表面的孢子(下面)。

图 2 显示生长于感染了腐霉属种类的土壤上的鹰嘴豆植物。右侧植物由用链霉菌 WYEC 108 处理过的种子生长而成。左侧植物由未处理过的种子生成。

本发明的详细描述

本发明描述了从土壤中分离许多放线菌类菌株。这些菌株中许多显示出能有效降低真菌性病原菌对植物(包括莴苣、鹰嘴豆和胡椒)的影响。特别是本发明阐述了本文称作链霉菌 WYEC 108 的菌株的分离。菌株 WYEC 108 对大范围的真菌性植物病原菌(包括引起幼苗芽前和芽后的湿烂病,根腐烂病,棕色腐病和白色腐烂病的病原菌)表现出强烈的拮抗作用。因此,菌株 WYEC 108 特别适于作为生物控制剂、能用于保护植物免遭这些植物病原菌的感染。因而链霉菌 WYEC 108 在降低植物对真菌感染的易感性的方法中 useful。于是,用链霉菌 WYEC 处理过的植物将显示出降低真菌感染的影响。易感染的未处理的植物被真菌感染后影响该植物的某些生长特征。例如:未处理的植物遭受真菌性病原菌作用后与未受真菌性病原菌作用的植物相比在植物高度、植物生物量和作物产量上显著减少。在本发明优选的实施方案中,用链霉菌 WYEC 108 处理过并接着受真菌性病原菌作用的植物与受真菌性病原菌作用的未处理植物相比在植物高度、植物生物量和农作物产量上表现出降低的严重程度较轻微。在更优选的实施方案中,用链霉菌 WYEC 处理并受真菌性病原菌作用的植物可显示出与未处理,未受病原菌作用的植物相似的生长特征。在最优选的实施方案中,用链霉菌 WYEC 108 处理并遭受真菌性病原菌作用的植物表现出生长特征优于未处理未受病原菌作用的植物。

菌株 WYEC 108 在与根际小菌丛的竞争中定居于植物

根上。菌株 WYEC 108 表现出促进生长于蒸汽灭菌土壤上的莴苣植物和生长于耕地上的胡椒植物的生长。

本发明还包括生产适于掺入转移培养基中的菌株 WYEC 108 营养细胞或孢子的方法。含有 WYEC 108 营养细胞和孢子及转移培养基的组合物显示出具有长的贮存寿命并适于将菌株 WYEC 108 传递给植物。

材料和方法

细菌生长培养基:

所有的细菌生长培养基用蒸馏水配制并在使用前压热灭菌。所有的细菌样品用标准的无菌实验室技术处理以保持纯净。

YGM(酵母提取物/葡萄糖/无机盐)培养基含有 0.6%/(wt/vol)酵母提取物(Difco Laboratories, Detroit, Michigan), 1.0% (wt/vol)葡萄糖, 无机磷酸盐溶液(5.3g Na_2HPO_4 , 1.98g KH_2PO_4 , 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g NaCl , 0.05g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 每升去离子 H_2O 中加 1.0ml 微量元素(Pridham and Gottlieb, 1948); pH7.1 到 7.2)。微量元素溶液由 0.64g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.11g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.79g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.15g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶于 100ml 蒸馏水中组成。

WYE(水/酵母提取物/琼脂)培养基对 Reddi 和 Rao (1971)作了修饰,它含有酵母提取物(Oxoid, 0.25g/l)作为唯一的碳和氮源并含有琼脂(Oxoid, 18.0g/l)。培养基用 K_2HPO_4 (0.5g/l)缓冲到 pH7.2—7.4。

WYEC (水/酵母提取物/纤维素/琼脂)是在 WYE 琼脂中加了一薄层覆盖琼脂。覆盖琼脂含 0.25g/l 纤维素(Solka Floc, Sigma Chemical Co.)和 18.0g/l 琼脂,溶于蒸馏水中。

CYD(酪蛋白氨基酸/酵母提取物/右旋糖琼脂)培养基含酪蛋白氨基酸(Difco; 0.5g/l)。酵母提取物(Oxoid 或 Difco; 0.8g/l),D—葡萄糖(0.4g/l), K_2HPO_4 (2.0g/l, pH7.2—7.4)和 18.0g/l 琼脂,溶于蒸馏水中。

YCED(酪蛋白氨基酸/酵母提取物/右旋糖/琼脂)是对 Reddi 和 Rao(1971)的修饰,它含有酵母提取物(Oxoid, 0.3g/l),酪蛋白氨基酸(Difco, 0.3g/l),D—葡萄糖(0.3g/l)和琼脂(Oxoid, 18.0g/l)。培养基用 K_2HPO_4 (2.0g/l)缓冲。

CYPC(纤维素/酵母提取物/蛋白胨/培养料提取物/琼脂)含有纤维素(Solka Flock, Sigma Chemical Col.: 5.0g/l),酵母提取物(1.0g/l),蛋白胨(Oxoid, 1.0g/l),磷酸盐缓冲液(K_2HPO_4 , 0.75g/l),琼脂(18.0g/l),并用培养料提取物(100ml/l)代替培养基中的 100ml 蒸馏水。将它直接注入且不用作覆盖琼脂。

MSSC(无机盐/淀粉/酪蛋白/琼脂;Turhan, 1981)含有由 $NaCl$ (2.0g/l), $MgSO_4 \cdot 17H_2O$ (0.05g/l), $CaCO_3$ (0.02g/l), $FeSO_4 \cdot 18H_2O$ (0.01g/l)和 KNO_3 (2.0g/l)组成的无机盐溶液,加入包括可溶淀粉(10.0g/l)和酪蛋白(0.3g/l)的有机组分并加入琼脂(18.0g/l)。培养基用 K_2HPO_4 (2.0g/l)缓冲。

孢子形成培养基(ATCC 培养基 #5)含酵母提取物(1.0g/l),牛肉膏(1.0g/l),胰蛋白胨(2.0g/l), $FeSO_4$ (0.01g/

1),葡萄糖(10.0g/l)和琼脂(15.0g/l)。培养基在压热灭菌前调到 pH7.2(ATCC 细菌和噬菌体目录第 17 版)。

CYG 培养基含酪蛋白氨基酸(酸水解产物)(5.0g/l),酵母提取物(5.0g/l)和葡萄糖(10.0g/l),溶于蒸馏水,调到 Ph7.1—7.2。

转移培养基(含下面所述比例的沙/玉米粉/水或泥炭/沙/玉米粉)使用前进行蒸汽灭菌。经压热灭菌 3 次,每次 90 分钟来进行典型的灭菌。

细菌生长的收获:

为了链霉菌 WYEC 108 菌丝体的生长,含 500ml YGM 培养基(pH7.1—7.2)的 1 升锥形瓶中接种 20ml 种子培养物(按实施例 II 所述制备),在 30℃ 下以 250rpm 摇动培养 3 天。然后 5000rpm 离心 10 分钟收获菌丝体。作为选择,可使培养物静置直到菌丝体和孢子沉到锥形瓶底来收获菌丝体。然后小心倒去上清液培养基,浓缩的菌丝体和孢子悬液直接用于接种转移培养基。

在固体培养基(例如孢子形成琼脂)上生长也产生细胞和孢子。经过从琼脂表面刮到蒸馏水中从孢子形成琼脂上收获菌丝体和孢子。然后孢子和菌丝体悬液直接混合进转移培养基中。

为了生产链霉菌 WYEC 108 孢子,向含 1200ml YGM 培养基的 2 升锥形瓶中各接种 50ml 种子培养物并在 30℃ 下以 250rpm 摇动培养 12—18 天。9000rpm 离心 10 分钟收获孢子。

真菌性病原菌:

Phthium ultimum PuMXL 从园艺研究国际组织(英国, Worthing Road; Littlehampton, West Sussex BN1764)微生物和农作物保护部门的培养物保藏中心获得。白腐菌 *Phanerochaete chrysosporium* 和 *Coriolus versicolor*; 棕色腐菌 *Postia placenta*, *Caldariomyces fumago* 和 *Gloeophyllum trabeum*; 土生真菌性病原菌 *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sambucinum*, *Geotrichum candidum*, 和 *Verticillium dahliae* 来自爱达荷大学(Moscow, ID)细菌学系 Don L. Crawford 教授的培养物保藏中心。*Phthium irregulare*, *Phytophthora capsici*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora parasitica*, *Sclerotinia Cepivorum* 和 *Sclerotinia Sclerotiorum* 来自爱达荷大学(Moscow, ID)植物土壤昆虫科学系 Dr. Wesley Chun 的培养物保藏中心。*Fusarium oxysporum* 来自爱达荷大学(Moscow, ID)森林资源系 Dr. Arthur D. Partridge 的培养物收集中心。所有培养物在土豆右旋糖琼脂或玉米粉琼脂上保种并在 25℃ 下生长。这些菌株获得时鉴定为病原菌,但没有重新检测其致病力。

土壤生物鉴定:

为用于生物鉴定,从爱达荷 MOSCOW 附近 Palouse 地区的几处收集天然感染 *Pythium ultimum* 的土壤。从在前两季收获过小麦和豌豆的耕地上部 15cm 收集土壤。按下面方法测定腐霉属(*Pythium*)种类的土壤种群:1.0g 空气干燥的土

壤在 50ml 无菌蒸馏水中形成的土壤稀释液用涡流管混合器彻底混合。0.1ml 充分混合稀释的样品以小滴加到老化 3 天的 2% 水琼脂板 (Stanghellini and Hancock, 1970) 上。平板在 25℃ 下培养并使用低倍 (X10) 解剖显微镜在荧光照明下定期观察以测定存在的腐霉属种类的特性和数量。在估计最终种群前, 培养 12, 48 和 72 小时后检查每个板上的菌落。根据在显微镜下腐霉属种类真菌菌丝体的形态学特征和在 2% (w/v) 水琼脂板上的生长方式来鉴定。生长于 2% (w/v) 水琼脂板上纯净培养物的真菌菌落用作观察鉴定目的对照 (Stanghellini and Hancock, 1970; Stasz et al., 1980)。

对这些土壤的检查表明在播种时 (1992 年春季) 空气干燥的土壤中 *P. ultimum* 和 *P. irregulare* 种群密度分别为 354 ± 15 和 194 ± 11 cfu/g。其它腐霉属种类的种群密度为 57 ± 9 cfu/g 空气干燥的土壤。*P. ultimum* 和 *P. irregulare* 是从收集的土壤中分离出的最普遍的种类。

实施例 I

对真菌性植物病原菌表现出

拮抗作用的放线菌类菌株的分离

从 4 种与根际相关的和 4 种与根系不相关的土壤样品中分离放线菌类菌株。然后试验这些菌株以便用作真菌性植物病原菌的抑制剂。

放线菌类的分离

经系列稀释/涂板技术从 8 种不同土壤中分离出放线菌

类分离物。稀释液(10^{-5} 到 10^{-7})涂板到各种琼脂分离培养基上。这些培养基组合物在上面“材料和方法”中所阐述。根据分离时所用的分离培养基命名放线菌类分离物。例如, WYEC 108 在 WYEC 培养基上分离, YCED 9 在 YCED 培养基上分离。一般来说, 这类培养基缺乏有机碳, 能有效控制真细菌类和真菌生长并帮助分离生长缓慢的放线菌类。由于 WYE 和 YCED 琼脂是特别有效的分离培养基, 因此主要使用它们。稀释液平板在 25°C 培养 4 到 10 天, 使放线菌形成孢子, 然后挑出菌落并划线到 WYE 或 YCED 琼脂板上进行纯化。从这些平板上将纯菌落转移到 YCED 琼脂斜面或 CYD 琼脂斜面上, 25°C 或 37°C 培养, 直到形成孢子, 贮存于 5°C 备用。种子培养物每 3 到 4 周转移一次。

土壤

(I) 与根系无关的土壤

土壤样品(100 到 200g)取自英国 4 个地方土壤剖面的上部 7.5 到 10cm 处。包括在 Rustington, West Sussex 的栽培玫瑰花园(土壤 S1); 在 Littlehampton, West Sussex 园艺研究国际组织(H. R. T.)农场小麦地的行间(土壤 S2); 在南威尔士 Wynd Cliff 硬材森林贮备区的森林土壤(土壤 S6), 在 West Sussex, South Downs, Hastings Hill 有时牧羊的草地(土壤 S7)。这些土壤认为与根系无关, 尽管它们含不同量的植物根。

(II) 与根系有关的土壤

基本上按 Miller et al. (1990)的方法从 4 个地区制备与

根系有关的土壤。土壤 3(S3)与英国 West Sussex H. R. I. 玫瑰花园的蒲公英植物(*Taracum officinale*)根相联系。土壤(S5)与小麦根相联系,取自与 S2 相同的土壤(West Sussex. Littlehampton H. R. I. 农场的小麦地)。土壤 4(S4)也与小麦根相联系,但土壤取自 West Sussex, 沿 South Downs Way 的 Big-nor Hiu 田野。土壤 8(S8)与亚麻子植物根相联系并取自与 S7 取样地相邻的田野(West Sussex, South Downs, Hasting Hill 有时牧羊的草地)。

从土壤分离的放线菌类可分成从与根际无关(S1,S2,S6 和 S7)或与根际有关(S3,S4;S5 和 S8)的土壤分离的放线菌类。经过在 100℃干燥 3g(湿重)样品(一式三份)58h 并重新称重来鉴定所有土壤的水份含量。经过彻底混合土壤:水为 1:1 的悬液,使固体沉积 2h。取上清液测 pH 值来鉴定土壤 pH。收集后,土壤贮存于 4℃备用(24 到 48h)。经过对这些菌株形成的菌落显示为典型放线菌类菌落(坚硬并呈革质,具有含孢子的气生菌丝)的观察检查来证实分离物是放线菌类菌株。鉴定这些菌株为放线菌类的进一步证实可经显微镜检术获得。

测定生长的 pH 范围

试验每个放线菌分离物在 pH5.5 到 8.0 的生长力。培养物以点接种到用 100mM 浓度的 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 缓冲液组合物缓冲成 pH5.5, 6.0, 6.5, 7.0 和 8.0 的 CYD 琼脂板上。压热灭菌前将每种培养基的最终 pH 调成其最终值。

25 或 37℃培养 5 到 7 天后检查培养物的生长。经观察评估平板上的很少或观察不到的生长(±),一些生长(十或十十),或优良生长(十十十)。

如表 I 所示,与根际有关的土壤得到的分离物数量几乎是与根际无关的土壤的两倍。试验了每种分离物在 pH5.5 到 pH8.0 范围的 CYD 琼脂培养基上的生长。所有分离物在 pH6.5 到 8.0 生长,仅 9 号在 pH6.0 不生长,57 个(21%)在 pH5.5 时不生长。在 pH5.5 生长的菌株中,取决于分离物的不同生长状况从很差到优良之间变动。经培养 5—10 天后肉眼和显微镜观察菌落还测定了分离物在 CYD 琼脂上形成孢子的能力。

表 I

选择性培养基				
土壤	土壤 pH	YCED	WYE	总数
与根系无关的土壤				77
1	7.5	8	16	24
2	5.4	5	6	11
6	7.2	20	8	28
7	7.4	13	1	14
与根系相关的土壤				140
3	7.0	17	22	39
4	7.6	32	33	65
5	6.5	11	15	26
8	7.3	8	2	10
总分离物		114	103	217

体外拮抗试验

根据在 CYD 琼脂上充分生长和大量形成孢子的能力选择了 82 个分离物。

使用体外平板试验检测这些分离物抑制 *P. ultimum* 生长的能力。将每种放线菌划线接种到玉米粉琼脂(CMA)板中心的一侧。将培养物在 25℃培养大约 8 天或直到培养物形成孢子。然后将含活跃生长的 *P. ultimum* 菌丝体的 CMA 琼脂块(0.5cm²)无菌放置到平板中央。继续培养 96 小时。48 小时和 96 小时后检查对 *P. ultimum* 生长的抑制。当在放线菌菌落方向 *P. ultimum* 菌丝体的生长停滞或受阻时表明有抑制作用。本试验的结果如表 II 所示。

表 II

培养物	来源 (土壤)	生长于 pH 5.5 (+或-)	观察到的拮抗作用 ^a 48 hr 96 hr	
拮抗的(96 hr)				
WYEC 108	8	+	+++	+++
YCED 1	1	+	++	++
YCED 9	2	+	+++	+++
YCED 35	4	+	+	+
YCED 48	4	+	+	+
YCED 95	7	+	+	+
YCED 106	7	+	++	+++
WYE 21	4	+	+	+
WYE 22	4	+	+	+
WYE 30	4	-	+	+
WYE 31	4	+	+	+
WYE 78	1	+	++	++
WYE 88	1	+	+	+
WYE 90	6	+	+++	+++
WYE 91	6	+	+++	+++
WYE 97	1	+	++	++
MSSC 1	2	+	+	+
MSSC 2	2	+	+	+

培养物	来源	生长于 pH 5.5	观察到的拮抗作用*	
	(土壤)	(+或-)	48 hr	96 hr
无拮抗的(96hr)				
WYE 6	1	+	+	-
WYE 9	3	+	-	-
WYE 11	3	+	+	-
WYE 12	4	+	+	-
WYE 13	4	+	-	-
WYE 20	4	+	-	-
WYE 23	3	+	-	-
WYE 27	4	-	-	-
WYE 28	3	+	-	-
WYE 29	4	+	+	±
WYE 34	3	+	-	-
WYE 35	3	+	-	-
WYE 38	4	+	-	-
WYE 42	3	+	-	-
WYE 43	4	+	-	-
WYE 45	3	+	-	-
WYE 47	3	+	-	-
WYE 53	4	+	-	-
WYE 54	3	+	-	-
WYE 56	3	+	-	-
WYE 68	5	+	-	-
WYE 69	6	+	-	-
WYE 73	6	+	-	-
WYE 75	2	+	-	-
WYE 77	2	+	±	±
WYE 84	2	+	-	-
WYE 85	2	+	-	-
WYE 93	1	+	-	-
WYE 94	1	+	-	-
WYE 120	8	+	-	-
WYE 121	7	+	-	-

培养物	来源 (土壤)	生长于 pH 5.5 (+或-)	观察到的拮抗作用 ^a	
			48 hr	96 hr
YCED 11	1	+	—	—
YCED 15	4	+	—	—
YCED 16	4	+	—	—
YCED 17	3	+	—	—
YCED 25	4	+	—	—
YCED 28	4	+	—	—
YCED 29	3	+	—	—
YCED 30	3	+	—	—
YCED 31	3	+	—	—
YCED 32	4	+	—	—
YCED 41	4	+	—	—
YCED 44	4	+	±	—
YCED 54	4	+	—	—
YCED 56	4	+	—	—
YCED 62	5	+	—	—
YCED 64	5	—	—	—
YCED 71	5	+	—	—
YCED 73	5	+	—	—
YCED 85	6	—	—	—
YCED 88	5	+	—	—
YCED 93	7	+	—	—
YCED 96	7	+	—	—
YCED 98	8	+	—	—
YCED 105	7	+	—	—
WYEC 101	4	+	—	—
WYEC 104	8	+	—	—
WYEC 107	7	—	±	—
WYEC 111	8	+	—	—
WYEC 113	8	+	±	±
WYEC 116	8	+	—	—
WYEC 118	7	+	—	—
CYPC 2	6	+	—	—
CYPC 5	6	+	—	—

⁴. 对 *P. ultimum* 的抑制定义为在平板上生长放线菌的一侧菌丝生长量较少和生长轻微停滞。

+++ . 抑制圈 $\geq 2.0\text{cm}$ 的非常强烈抑制。

++ . 抑制圈 $\geq 1.0\text{cm}$ 的非常强烈抑制。

+ . 生长明显停滞,菌落周围有明显的抑制圈。

± . 对 *P. ultimum* 有轻微的抑制(菌丝生长量较小和生长停滞)

— . 无抑制

96 小时后,5 种分离(WYEC 108, YCED 9, WYE 91, WYE 90 和 YCED 106)对 *P. ultimum* 表现出非常强的拮抗作用,4 种(YCED 1, YCED 106, WYE 97 和 WYE 98)表现出强烈拮抗作用,其它 10 种表现出微弱拮抗作用。剩下的分离物无拮抗作用或有非常微弱的拮抗作用。明显抑制 *P. ultimum* 生长的培养物在从与根际相关的土壤中分离的菌株和从与根际无关的土壤中分离的菌株中的分布大约相等。

在玉米粉琼脂(CMA)上也检查了 70 种在 pH5.5 生长的分离物对白斑腐菌 *Phanerochaete chrysosporium* 的体外拮抗作用。对白斑腐菌表现出一定程度拮抗作用的 13 种分离物如表 III 所示。以抑制圈的大小定义的拮抗作用程度范围从非常强烈(++++)到相当弱(+). 对 *P. Chrysosporium* 表现出拮抗作用的 5 种培养物(WYEC 108, WYE 78, WYE 90, YCED 9 和 MSSC2)在 CMA 上进一步检查了它们对其它白斑腐菌(*Coriolus Versicolor*)和 2 类棕斑腐菌(*Postia placenta*)

和 *Gloeophyllum trabeum*) 的拮抗作用。4 种分离物(MSSC2, YCED9, WYE90, WYEC 108)对上述白斑和棕斑腐菌表现出非常强烈的拮抗作用。一种分离物(WYEC78)仅对两种白斑腐菌表现出强烈拮抗作用。

表 III

培养物	来源	生长于 pH 5.5	观察到的拮抗作用 ^a	
	(土壤)	(+或-)	48 hr	96 hr
有拮抗的				
WYEC 108 ^b	8	+	+++	+++
WYE 22	4	+	++	++
WYE 78 ^c	1	+	+	+
WYE 90 ^b	6	+	+++	+++
WYE 97	1	+	++	++
YCED 9 ^b	2	+	+++	+++
YCED 29	3	+	+	+
YCED 41	4	+	+	+
YCED 48	4	+	+	+
YCED 95	7	+	++	+
CYPC 2	6	+	++	++
CYPC 5	6	+	+	+
MSSC 2 ^b	2	+	+++	++

a. 对 *P. Chrysosporium* 的抑制定义为在放线菌生长的平板一侧区域菌丝的生长量较少和生长轻微停滞。

+++ . 抑制圈 ≥ 2.0 cm 的非常强烈的抑制

- ++ 抑制圈 $\geq 1.0\text{cm}$ 的强烈的抑制
- + 生长明显停滞,菌落附近有明显的抑制圈
- ± 对 *P. Chrysosporium* 的轻微抑制(菌丝生长量较少且生长停滞)
- 一. 无抑制
- b. 对 *Coriolus versicolor*, *Postia placenta*, *Gloeophyllum trabeum* 和 *P. Chrysosporium* 的抑制。
- c. 除 *P. chrysosporium* 外,对 *Postia placenta* 和 *Gloeophyllum trabeum* 的抑制。

体内生物鉴定以测定放线

菌分离物在莴苣幼苗上的活性

使用 Lynch et al. (1991,1992)的生物控制试验程度试验 12 种分离物对莴苣 (*Lactuca sativa*) 种子发芽和长出的影响。

对于对照植物,向 9cm 直径的塑料盆中装入莴苣盆栽混合物并用培养皿填塞下去。在上面放入 10 个莴苣种子。轻轻压进盆栽混合物中,并轻轻覆盖上疏松的混合物。危害后将盆放在水槽中的托盘上。在黑暗中 20 到 22℃ 培养直到明显发芽(大约 3 天)。然后将托盘转移到维持在 15 到 25℃ 的温室毛细草度上并根据需要浇水。定期计数每个盆中发芽的幼苗数,计数到第 18 天。

对于用放线菌分离物处理的植物,向盆中装入接种了特异性放线菌孢子的盆栽混合物。用 CYD 种子斜面的孢子接种盆栽混合物,平均水平为 10^8 到 10^9cfu/g (干重)盆栽混合

物。经过接种时在 CYD 琼脂板上的活体计数测定盆栽混合物的 cfu/g, 然后按上述种植莴苣种子, 盖上少量的接种过的盆栽混合物, 随后与对照相同进行处理。

对于用特异性放线菌和湿烂病真菌 *Pythium ultimum* (菌株 PuMXL, Lynch et al., 1991) 处理过的植物, 混合物还以 ca. 200 孢子囊/g(干量)的混合物接种真菌性病原菌。使用 Lynch 等(1991, 1992)的程序生产病原菌孢子囊并接种盆栽混合物。用血细胞计数器进行孢子囊计数, 用前经通过莴苣传代证实 *P. ultimum* 菌株的致病力。

在所有处理中, 准备一式五盆。在温室里, 盆的放置以随机的区组排列并补充“卫士植物”包围, 卫士植物用于提供均匀的条件并充当缓冲物。种植 18 天后, 收获植物, 测量最终伸出的突出体, 测定湿重量和干重(地面上的叶和茎)。植物湿重和干重记录为每盆总 mg 生物量, 并作为每个植物的平均 mg 生物量。此值报道为 5 份的平均值±标准误差。因此, 每个值是根据每次处理种植的 50 粒种子(种植了 5 盆, 每盆 10 粒种子)得到的。同样计算种子发芽百分数和最终植物长出值。

表 IV

放线菌类 菌株	浓度 $\times 10^5$ cfug ⁻¹	每盆的健康		幼苗重量			
		植物数(n)		鲜重		干重	
		-P1	+P1 ^a	-P1	+P1	-P1	+P1
未接种的对照		9.8	3.6	1.34	0.75	0.074	0.034
YCED 85	5.19	10.0	6.6 ^a	1.44	0.98	0.087	0.054 ^a
WYE 27	3.02	10.0	5.0	1.54	0.72	0.090	0.039
YCED 64	3.21	9.8	5.6 ^a	1.44	0.91	0.084	0.057 ^a
WYEC 107	2.88	9.8	5.6 ^a	1.68 ^a	0.81	0.096 ^a	0.041
WYE 41	1.18	10.0	4.2	1.45	0.73	0.087	0.047
YCED 106	1.30	10.0	5.4 ^a	1.49	0.69	0.08	0.040
YCED 71	5.25	10.0	6.2 ^a	1.42	0.85	0.082	0.050
WYE 88	1.44	10.0	6.2 ^a	1.42	0.73	0.082	0.042
MSSC 1	2.13	9.8	4.6	1.38	1.16 ^a	0.079	0.060 ^a
WYE 21	9.56	10.0	6.6 ^a	1.49	1.09 ^a	0.091	0.059 ^a
WYE 30	18.90	10.0	5.0	1.53	0.86	0.088	0.046
WYE 28	0.18	10.0	3.6	1.39	0.90	0.079	0.049

P1* *P. ultimum*; 200 个孢子囊每 g 干重量盆栽混合物。其中 n=总共 5 盆的 10 株植物中每盆的健康植物平均数。

a. 与相应的时照值以 $P=0.05$ 水平的显著不同, 自由度=100

当不存在病原菌时(表 IV 是表示为“-P1”), 接种放线菌的盆和对照盆(无放线菌)之间种子发芽和产生健康植物百分数无明显区别。所有例子中种子发芽和生长平均 $\geq 98\%$ 。然而, 放线菌类的存在有时使种子生长延迟 1 到 3 天

(数据未显示)。同样,不存在病原菌时在接种放线菌的盆和对照盆之间以鲜重或干重测量的植物幼苗重一般无明显区别。接种了 WYEC 107 的盆是一个例外,其中放线菌的存在明显提高了植物生物量的产量。

存在病原菌时(+P1),种植 20 天后在对照盆中每盆健康植物数平均为每 10.0 株中有 3.6 株,而无病原菌的对照盆中每 10.0 株中有 9.8 株。然而,当存在特异性放线菌时,可见在接种病原菌的盆中有些健康植物数明显提高。12 种放线菌中的 7 种(YCED85,YCED64,WYEC107,YCED106,YCED71,WYE88,和 WYE21)明显提高健康植物产量。其中,YCED85,YCED64 和 WYE21 与仅有病原菌的对照相比还明显提高植物干重产量。WYE21 相对于仅有病原菌的对照而言还明显提高湿重产量。不明显提高健康植物量的一个菌株(MSSC1)使植物幼苗的鲜重和干重产量都提高(表 IV,5 和 7 栏)。因此,证明 MSSC1 在保护植物抵抗比本实验所用剂量更低的 *P. ultimum* 上是有用的。

实施例 II

链霉菌 WYEC 108 的分离

根据伯捷氏细菌分类手册(1986)定义的链霉菌属形态特征鉴定菌株 WYEC 108 是链霉菌属种类。WYEC 108 是丝状细菌,在气生菌丝体上产生孢子链。如上所述。链霉菌属 WYEC 108 作为许多放线菌类菌株中的一员被分离,分离这些放线菌的土壤取自英国的 8 个不同地点。链霉菌属 WYEC 108 与其它放线菌类一起以系列稀释/涂板技术从取自英国

West Sussex, South Downs, Hasting Hill 耕地的与亚麻子植物根相联的根系土壤中分离出。该土壤的稀释液(10^{-5} 和 10^{-7})涂板到分离琼脂培养基 WYE 上。稀释液板在 25 培养 4 到 10 天,使放线菌类菌落生长和形成孢子。然后挑出菌落,划线到 WYEC 琼脂板上进行纯化。从这些板上将纯化的 WYEC 108 菌落转移到 CYD 琼脂斜面上,25℃培养到形成孢子,贮存于 4℃备用。种子培养物每 3 到 4 周转移一次。

链霉菌属 WYEC 108 的鉴定

如上所述,检查分离的放线菌类菌株在 CYD 琼脂上充分生长和大量形成孢子的能力。随后,试验大量分离物在体内抑制植物病原菌 *Pythium ultimum* 生长的能力。还试验了分离物在体外对白斑腐菌 *Phanerochaete Chrysosporium* 和 *Coriolus Versicolor* 及棕斑腐菌 *Postia placenta* 和 *Gloeophyllum trabeum* 的拮抗作用。作为这些试验的结果,根据其有利特性选出了这些菌株中的一种,本文称作链霉菌属 WYEC 108。

生长于酪蛋白氨基酸/酵母提取物/右旋糖(CYD)板上的链霉菌属 WYEC 108 菌落用扫描电子显微镜检术进行了检查。样品制备如下:

(1):用含 1.5%戊二醛的 0.2M 二甲胍酸钠缓冲液覆盖 CYD 板上的链霉菌属 WYEC 108 菌落并固定至少 2 小时;
(2)使用 0.2M 二甲胍酸钠缓冲液经过用吸管吸出上次的液体并用新缓冲液代替来彻底洗涤(2X)菌落。注意确保样品不干涸;(3)经制备含菌落的琼脂“栓”取出菌落;(4)将“栓”放入单个网眼容器中并在 100%乙醇(2X)中进行脱水(J. T.

Baker Inc., Phillipsberg, NJ); (5)然后在临界点干燥器中干燥样品并使用胶体银传导染料在单个标本桩中封固。用 60/40 金—钼覆盖后用扫描电子显微镜观察。图 1 是扫描电子显微照片,显示了链霉菌 WYEC 108 的螺旋形链(上部)和孢子表面(下部)。观察到孢子表面相当光滑。

也鉴定了菌株 WYEC 108 的各种生理特征:菌株 WYEC 108 在蛋白胨—酵母—铁琼脂和蛋白胨—铁琼脂 (Difco Lab. Detroit, Michigan)上都不产生黑色素或 H_2S 。链霉菌属 WYEC 108 在 CYD 板上产生的孢子团颜色是灰色。菌株在 $45^{\circ}C$ 不生长。链霉菌属 WYEC 108 属于按伯捷氏细菌鉴定手册(1986)定义的利迪链霉菌(*Streptomyces lydicus*)种类。因此,这种微生物也可称作利迪链霉菌(*Streptomyces Lydicus*) WYEC 108,为了简洁,本文称该微生物为链霉菌属 WYEC 108,或简称为 WYEC 108。

ATCC 保藏号

按照布达佩斯条约的规定于 1993 年 6 月 29 日将链霉菌属 WYEC 108 保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC) (Rockville, MD)。该菌株命名的 ATCC 保藏号为 No. 55445。

链霉菌属 WYEC 108 种子

培养物的制备

对于短期使用,将链霉菌属 WYEC 108 在 CYD 琼脂或孢子形成琼脂斜面上 $25^{\circ}C$ 培养直到形成孢子并贮存在 $4^{\circ}C$ 备用。对于长期贮存的培养物将单个琼脂斜面或平板上的孢子悬浮于 10ml 无菌的 YGM 培养基中制备 10ml 孢子悬液。

然后用该孢子悬液接种含 100ml YGM(酵母提取物/葡萄糖/无机盐)培养基的 250ml 锥形瓶。接着在 30℃ 下将锥形瓶以 250rpm 摇动培养 32—36 小时以提供标准接种物。

生长于 YGM 的标准接种物样品也用于制备甘油培养物,适于长期贮存于-70℃和适于冻干。

实施例 III

链霉菌属 WYEC 108 对真菌性

植物病原菌的体外拮抗

在菌落生长抑制方面测定了链霉菌属 WYEC 108 抑制选定的真菌性植物病原菌生长的能力。

将链霉菌属 WYEC 108 划线接种玉米粉琼脂(CMA)(Difco Lab., Detroit, Michigan)平板中央的一侧。接种的平板在 25℃ 培养大约 8—12 天直到培养物形成孢子。经过肉眼观察灰色气生菌丝体和孢子团可检查孢子的形成。经过相差显微镜检术(1000)可观察孢子形成。从真菌培养物前缘取下含活跃生长的特定真菌性植物病原菌菌丝体的 5mm 直径的 CMA 琼脂圆片并无菌放置到琼脂平板的中央。平板在 25℃ 下培养直到试验真菌达到不含链霉菌属 WYEC 108 的对照平板边缘。经过测定在链霉菌属 WYEC 108 影响下真菌性病原菌的放射状生长与在对照板上的单独生长之比率来定量对真菌生长的抑制。取决于选定的病原性真菌的不同在培养 48、96 和 192 小时后记录真菌生长的抑制百分数。生物测定在 5 个平板上重复,分别测定抑制,以平均值±标准误差来记录。

这些体外生物测定的结果如表 V 所示。这一资料表明：链霉菌属 WYEC 108 对大范围的真菌性植物病原菌，包括湿烂病 (*Pythium ultimum*)，根腐病 (*Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*. 和 *Phytophthora cinnamomi*)，白斑腐病 (*Phanerochaete chrysosporium* 和 *Coriolus versicolor*)，棕斑腐病 (*Postia placenta* 和 *Gloeophyllum trabeum*) 和叶及茎腐病 (*Sclerotinia* sp.) 真菌表现出非常强烈的拮抗作用。

表 V

真 菌 性 病 原 菌	抑制百分数±标准误差 ^a 观察到的拮抗作用	
	48 小时	96 小时
<i>Pythium irregulare</i>	100±0.0	100±0.0
<i>Pythium ultimum</i>	100±0.0	100±0.0
<i>Rhizoctonia solani</i>	100±0.0	84±0.0
<i>Fusarium oxysporum</i>	26±2.5	26±3.6
<i>Fusarium sambucinctum</i>	44±2.4	35±2.4
<i>Fusarium solani</i>	36±2.5	19±2.5
<i>Phytophthora capsici</i>	100±0.0	100±0.0
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	100±0.0	100±0.0
<i>Phytophthora parasitica</i>	100±0.0	100±0.0
<i>Sclerotinia cepivorum</i>	100±0.0	95±1.5
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	100±0.0	100±0.0
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	100±0.0	100±0.0
<i>Coriolus versicolor</i>	100±0.0	100±0.0
<i>Postia placenta</i>	100±0.0 ^c	100±0.0 ^d
<i>Caldariomyces fumago</i>	100±0.0 ^c	100±0.0 ^d
<i>Gloeophyllum trabeum</i>	100±0.0 ^c	100±0.0 ^d
<i>Geotrichum candidum</i>	47±2.1	45±2.1
<i>Verticillium dahliae</i>	73±2.0 ^c	59±2.0 ^d

a. 该值由 5 个重复的平板单个值取平均数得到。经过分别测量每个平板中菌丝体的生长来测定单个值。

b. 真菌性病原菌抑制定义为在链霉菌属 WYEC 108 的影响下病原菌菌丝生长比在对照 CMA 板上的单独生长。

c 和 d 分别为在培养 96 小时和 192 小时的抑制%。

实施例IV

使用链霉菌属 WYEC 108 处理种子

经过给未发芽的鹰嘴豆种子施用菌株 WYEC 108 并将这些种子种植在用真菌性植物病原菌 *P. ultimum* 和 *P. irregulare* 感染的土壤中来测定链霉菌属 WYEC 108 细胞保护植物抵抗植物病原菌的效力。

经乙醚提取从培养物中提取由菌株 WYEC 108 产生的胞外代谢物。还测定了这些代谢物对萌发的鹰嘴豆幼苗感染真菌的影响。

链霉菌属 WYEC 108 的生长

为了菌株 WYEC 108 细胞的生长,向 1 升含有 500ml YGM (pH7.1—7.2) 的锥形瓶中接种 20ml 种子培养物并在 30℃ 以 250rpm 摇动培养 3 天以产生细胞团。为了产生抗真菌代谢产物,向含 500ml CYD (pH7.1—7.2) 的 1 升锥形瓶中接种 20ml 种子培养物并在 30℃ 以下 250rpm 摇动培养 7 天。

用链霉菌属 WYEC 108 和抗真菌代谢产物处理种子

经以 5000rpm 离心 10 分钟从 500ml 培养 3 天的 YGM

液体培养物中收获链霉菌属 WYEC 108 菌丝体悬液。收获的菌丝体重量悬于 200—300ml 灭菌的 3%(W/V)藻酸钠溶液中以得到 $1.0-1.2 \times 10^4$ cfu/ml 的培养物密度。然后将鹰嘴豆种子加入充分混合的细胞藻酸盐悬液中并一个一个地将种子转移到灭菌的 0.25M CaCl_2 蒸馏水溶液中。这些种子用于下面所述的生物控制试验中。

按下面以纯化形式获得链霉菌 WYEC 108 产生的抗真菌代谢物。过滤 7 日龄的 500ml 培养物以去掉细胞,接着使用提取漏斗以 150ml 乙醚进行提取。然后经真空蒸发去掉乙醚并将所得的提取物重溶于 1.5ml 蒸馏水中。将这一溶液通过无菌的 0.45 μm 滤器过滤灭菌并加入到 10ml 3%(W/V)藻酸钠溶液中。纯化的抗真菌代谢和可用于保护植物抵抗真菌感染。优选的是抗真菌代谢物可被纯化以便基本上不含 WYEC 108 细胞。然而,WYEC 108 细胞和/或孢子以及抗真菌代谢物制品预期也对真菌性植物病原菌有效。抗真菌代谢物—藻酸盐悬液按上面所述用于处理鹰嘴豆种子以便用于生物控制试验。

活体生物控制试验:

被 *P. ultimum* 和 *P. irregulare* 自然感染的土壤在上面“材料和方法”中已描述。这种农用土壤用于本活体生物控制试验。经过彻底混合土壤:水(1:1)悬液,使固体沉降 2 小时,测上清液的 pH 来测定土壤的 pH 值为 pH5.6。切碎土壤,彻底混匀并放入苗盆(10cm 深 X 直径 10cm)中。

将用链霉菌属 WYEC 108 或抗真菌代谢物处理过的未

发芽的鹰嘴豆种子种入感染的土壤中进行活体生物控制试验。未处理的种子种入相同的土壤中用作对照。该方法包括下面的步骤：

1). 每个盆底放入 1cm 深的泥炭以防止土壤流失且还能提供通气 and 排水。

2). 用感染的土壤填塞苗盆。

3). 从底部浇水使土壤浸透。土壤表面浸透后,将未处理的和处理的鹰嘴豆种子放到土壤上并用相同的土壤覆盖 1.5—2.0cm 深。经过从下面湿土壤空隙的毛细作用使上部湿润。在 3 份相同的苗盆中各植入 10 粒种子。土壤中不加肥料。为减少干燥和阻止表面结块,用干净的塑料布盖住苗盆直到幼苗长出。从幼苗长出后开始,如果需要,向盆顶喷洒更多的水,实验在 15—30℃ 具有 12hr 光照和 12hr 黑暗和循环光周期(16000lux)的温室中进行。

定期计数鹰嘴豆幼苗萌发数,20 天后计下最终萌发数。萌发数据以每种处理的平均数来报道。链霉菌属 WYEC 108 作为生物控制剂的能力以总萌发数,植物高度,植物鲜重为基础并与未用生物控制剂处理的种子萌发的对照植物进行比较。生物控制试验的结果如表 VI 所示。

表 VI

处理	湿烂病(%)		出率(%)	高度(cm)	鲜重(g/植物)
	芽前	芽后			
对照	86.7	6.6	6.7	4.3 ^x	0.34 ^x
链霉菌属 WYEC 108 ^c	36.7	0.0	63.3	11.3	1.05
3%藻酸盐 ^d	83.3	10.0	6.7	4.1 ^x	0.32 ^x
抗真菌代谢物 ^e	63.3	3.3	33.3	8.9	0.66

c. 在3%的藻酸盐中,覆盖于种子上。

d. 不含 WYEC 108

x. 指在栏中这种标记的值在 $P=0.05$ 水平差异不显著。

链霉菌属 WYEC 108 细胞和这些细胞产生的抗真菌代谢物都减少鹰嘴豆 *Pythium* 湿烂病。

当种子用链霉菌 WYEC 108 细胞覆盖时,植物表现出茁壮生长。与覆盖了链霉菌属 WYEC 108 细胞的种子发芽的植物相比,对照(未处理的)鹰嘴豆种子萌发的植物高度和鲜重明显减少。由于当种子天然感染 *P. ultimum* 和 *P. irregular* 的土壤中时,由 *P. ultimum* 引起的种子腐烂和芽前的湿烂病使未处理的鹰嘴豆种子出芽率大量降低(6.7%出芽率)。与此相反,播种前用链霉菌 WYEC 108 细胞处理的种子萌发率为 63.3%。仅用藻酸盐处理的种子萌发率不增加。*Pythium* 根腐病的典型症状包括根毛缺乏和根褪色在收获的对照种子发芽的鹰嘴豆根中较明显,但在用链霉菌属 WYEC 108 细胞处理的种子长成的植物中缺乏这些症状。在对照中,鹰嘴豆

的损伤主要以种子腐烂,出芽前的湿烂病的形式出现,萌发和生长的鹰嘴豆幼苗发育迟缓,其根被 *P. ultimum* 严重感染。图 2 显示了生物控制试验中的鹰嘴豆植物的并肩比较。左侧显示的对照植物从未处理的种子发芽而成,表现出普遍的根部感染并缺乏次生根和根毛,而右侧所示的从链霉菌属 WYEC 108 覆盖的种子萌发的植物表现出良好的生长并正常形成次生根和根毛。

以乙醚可溶性代谢物形式的抗真菌代谢物处理的鹰嘴豆种子的萌发率(33.3%)比对照种子(6.7%)要高,但比链霉菌 WYEC 108 细胞覆盖的种子(63.3%)要低。用抗真菌代谢物处理的种子长出的植物与对照植物相比表现出茁壮生长,根较长,根毛发育的密度较高。

实施例 V

链霉菌属 WYEC 108 对 *Pythium ultimum* 引

起的根部感染和种子腐烂的影响

检查按实施例IV所述生长于天然感染 *Pythium ultimum* 的土壤中并用 WYEC 108 预先处理和不处理的鹰嘴豆幼苗以测定菌株 WYEC 108 对 *P. ultimum* 感染的影响。

用生长 20 天后收获的对照(未处理的)鹰嘴豆幼苗研究 *P. ultimum* 引起的根部感染。从这些对照植物腐烂的根中还分离出了引起根腐烂的 *P. ultimum*。经过先用自来水洗涤鹰嘴豆根(小根和根毛)部的土壤并接着用无菌蒸馏水漂洗两次来完成 *P. ultimum* 的分离。用剃刀刀片无菌切下褪色的和腐烂的根并放在 3 日龄 2%水琼脂板上。将平板在室温培养

24—48 小时并在相差显微镜下(X40)观察。从感染的鹰嘴豆根部长出的 *P. ultimum* 在新鲜的 2%水琼脂上传代培养并随后按以前所述(Ingram and Cook, 1990)进行鉴定。

用 20 天后收获的腐烂的对照种子研究由 *P. ultimum* 引起的种子腐烂。用无菌牙签将腐烂种子的一部分无菌放入 3 日龄 2%水琼脂板上,室温下培养 24—48 小时。按上面所述检查平板。

观察感染生长于天然感染的土壤中的未处理的鹰嘴豆植物根的 *Pythium*。 *P. ultimum* 是从腐烂的种子和根中分离出的最普遍的种类。 *P. irregulare* 通常较少观察到。

在用实施例 II 中所述的链霉菌属 WYEC 108 细胞藻酸盐悬液处理的种子发芽的 20 日龄鹰嘴豆植物根部检查了链霉菌属 WYEC 108 对根部的附着。这些植物生长于如实施例 II 中所述的天然感染 *P. ultimum* 和 *P. irregulare* 的土壤中。从苗盆中取出植物并轻轻用自来水洗涤以去掉附着的根际土壤。然后用无菌蒸馏水漂洗。经过将部分根放到玻璃片上,加一滴亚甲蓝,然后盖上盖玻片制备显微镜检术的根样品。接着用相差显微镜(X1000)观察制备的样品。

存在于种子上的链霉菌 WYEC 108 与萌发的根相联系。随着根的伸长,链霉菌运输到伸长的根毛和尖端,观察到链霉菌 WYEC 108 广泛定居于主根,次生根,根毛和尖端。与未覆盖 WYEC 108 的种子萌发的对照植物相比,被链霉菌属 WYEC 108 覆盖的种子长出的植物更健康,具有更长的根且根毛以更大的密度存在。这一差别明显与生物控制剂定居于

根部相联系。被生物控制剂定居的根不显示出任何根疾病的症状。在存在当地根际微生物区系竞争的条件下,链霉菌 WYEC 108 表现出优良的根部定居。

抗菌活性

链霉菌属 WYEC 108 除了具有定居于植物根部和产生抗菌代谢物的能力外,还观察到 WYEC 除 *P. chrysosporium* 外,108 溶解真菌细胞壁和真菌卵孢子。使用扫描电子显微镜检术表明:链霉菌属 WYEC 108 菌丝定居于真菌菌丝或卵孢子(包括 *Pythium ultimum* 菌丝和卵孢子表面。被定居的菌丝和卵孢子被链霉菌属 WYEC 108 降解,很可能是 WYEC 108 分泌细胞外酶(如几丁质酶和纤维素酶)的结果。已表明链霉菌属 WYEC 108 产生这两种酶。很可能链霉菌属 WYEC 108 还产生一系列其它的细胞外降解酶。

实施例 VI

链霉菌属 WYEC 108 掺入

转移培养基中

接下面方法配制适于长期保存活链霉菌属 WYEC 108 孢子并用于农业生产的组合物。向含 500ml YGM 培养基 (pH7.0—7.1) 的 1 升锥形瓶中接种 20ml 种子培养物并在 30℃ 下以 250rpm 摇动培养 3 天。培养后,在 5,000rpm 下离心 10 分钟收获培养物,收获的物质重悬于 1600ml 10% YGM 中并与灭菌的 8 gNH₄Cl 溶于 400ml 蒸馏水的溶液混合。然后向装有 4kg 灭菌的由沙—水—玉米粉混合物以 9—

2—1(W/W)的比例组成的转移培养基的塑料容器中接种 2 升细胞与 NH_4Cl 的混合物。在培养培养物前,将转移培养基灭菌 2 次(121°C 3 小时)。然后将混合物在 25°C 培养 10—14 天以增加混合物中存在的孢子数。在 10—14 天的培养中链霉菌属 WYEC 108 产生孢子,导致 cfu/g 转移培养基增加(平均水平为 10^8 到 10^9 cfu/g 转移培养基(干重))。然后将这种混合物贮存于 4°C 备用。

作为选择,除了 YGM 培养基外,细胞和孢子也能在 CYG 培养基中生产。作为离心收获细胞的其它选择,也可使培养瓶静置以便细菌菌丝体和孢子沉积。此后,小心倒出清亮的上清液浓缩的菌丝体/孢子悬液直接接种到转移培养基中。当使用这种收获程序时,不必向培养基中加入 NH_4Cl ,因为细菌生长培养基(YGM 或 CYG)是合适的氮源。

实施例 VII

链霉菌属 WYEC 108 对莴苣幼苗

萌发率和鲜重的影响

为测定链霉菌属 WYEC 108 对莴苣生长的影响,使莴苣种子生长于上面实施例 IV 所述的含链霉菌属 WYEC 108 的转移培养基中或生长于蒸汽灭菌的土壤中。每种生长培养基中共植入 30 粒种子(盆中每 $4 \times 3.5\text{cm}$ 一粒种了),生长 21 天后记录萌发率。生长 35 天后,以收获地面上生长的植物测定鲜重。鲜重以平均值记录。结果如下面表 VII 所示。

表 VII

处理	萌发的植物数			萌发率(%)	鲜重 (g/植物)
	7 天	9 天	21 天		
无菌土壤 +种子	13	17	21	(21/30) 70	0.81
转移培养基 +WYEC 108 +种子	23	27	29	(29/30) 97	1.41

这些结果表明:用链霉菌属 WYEC 108 处理的莴苣种子萌发率和幼苗鲜重都提高。

实施例VIII

含链霉菌属 WYEC 108 的转移培养

基在耕地上的使用

为测定链霉菌属 WYEC 108 掺入上述转移培养在时作为生物控制剂的有效性进行了活体生物控制试验。

使用在 YGM 培养基中生长了 3 天的链霉菌属 WYEC 108,按在上面实施例VIII所述生产链霉菌属 WYEC 108 并掺入转移培养基中。在盆栽幼苗前以在 CYD 板上进行平板计数测定在转移培养基中链霉菌属 WYEC 108 的起始数量大约为 $1.0-1.2 \times 10^6$ cfr/g 土壤。然后这种处理的土壤用于填塞苗盆(4cm/13.5cm)。

对照植物生长于含蒸汽灭菌土壤(100℃灭菌 60 分钟)的盆中。

然后在仅装有蒸汽灭菌土壤或装有用含链霉菌属 WYEC108 的转移培养基接种的蒸汽灭菌土壤混合物的苗盆

中植入胡椒幼苗(绿色辣椒)。在温室中生长6周后,将这些植物移植到耕地上。在一些例子中,移植前将含 450 ± 17 cfu/g *Phytophthora parasitica* 的 100g 转移培养基接种到种植孔中。

移植55天后测植物高度并以平均植记录。移植后再培养110天后经收获并测植物鲜重测定植物生物量。此时,以平均值记录形成的胡椒数及每植物的胡椒重。该野外试验的结果如表VIII所示。

表 VIII

处理	植物 高 (cm)	生物量 鲜重 (g/植物)	#胡椒 每植物	胡椒产量 鲜重 (g/植物)
b 对照: 未处理	22.4k ^y	274.1k ^y	19.1k ^y	158.8k ^y
c 用 WYEC 108 处理的	29.1m	353.3m	36.5m	279.8m
b 未处理的 + <i>P. parasitica</i> ^d	20.3k	238.5k	13.8k	151.2k
c 用 WYEC108 处理 的 + <i>P. parasitica</i> ^d	28.6m	266.6k	22.7k	221.6

b. 胡椒植物生长于仅含蒸汽灭菌土壤的盆(4cm × 13.5cm)。

- c. 胡椒植物生长于装有蒸汽灭菌土壤和含链霉菌属 WYEC108 的转移培养基的混合物的盆中。
- d. 移植前 100g 含 *Phytophthora parasitica* 的转移培养基接种到单独的孔中 ($450 \pm 17 \text{cfu/g}$ 转移培养基)。
- y. 指在栏中标有相同字母的值在 $P=0.05$ 水平差异不显著。

如表 VIII 所示,在未接受 WYEC108 的对照植物相比用 WYEC108 处理的胡椒幼苗当不存在 *P. parasitica* 时植物高度,生物量,胡椒数和胡椒产量在统计上明显提高。比较表 VIII 横排 3 和 4 表明:菌株 WYEC108 能保护胡椒免受 *P. parasitica* 的有害影响。而且与不含 *P. parasitica* 未处理的植物相比用菌株 WYEC108 处理的相对不存在 *P. parasitica* 时基生长有显著的增强。

除了本实施例所述的实验外,WYEC108 在保护一系列植物抵抗真菌感染方面表现为有效。试验的植物包括下面表 IX 所示的植物。

表 IX
用 WYEC 108 保护农作物抵抗真菌感染
用 WYEC 108 试验的植物^a

植物	野外试验 (+/-)	温室/实验室试验 (+/-)
莴苣	-	+
鹰嘴豆	-	+
绿豆	-	+
胡椒	+	-
棉花	+	+
Turf Grass	+	+
洋葱	+	+
马铃薯	+	+

a. 试验在温室或野外进行,或两者都做,如表所示。试验比较了用 WYEC 108 处理的植物与未处理的对照植物和/或与用 WYEC 108 和一种特异性真菌病原菌(Pythium, Aphanomyces, Rhizoctonia, Fusarium, Phytophthora 或 Phytophthora)处理的植物。在每种情况下,WYEC 108 都保护植物抵抗真菌性疾病。

实施例 IX

链霉菌属 WYEC 108 孢子在液体培养

基中的生产

生物控制剂必须存活持久的时间以满足装运的需要和农用的时间方式。在具体生物控制组合物中使用菌株 WYEC

108 的孢子而不用营养细胞改善了生物控制组合物的贮存寿命,因为孢子在有害条件下和经过较长一段时间后仍保持活力。

典型地,链霉菌属种类的孢子只在固体培养基上产生。然而,如下面所阐述的,发现下面的方法适于在液体培养基中产生孢子。

向含 1200ml YGM 培养基(pH6.5)的 2 升锥形瓶中各接种 50ml 种子培养物(如实施例 II 所述生产)并在 30℃ 以下 250rpm 摇动培养 12—18 天。以相差显微镜(X1000,用亚甲基蓝色)观察来监测培养物中的孢子产生。900rpm 离心 10 分钟收获孢子。

然后,将孢子重悬于 1600ml 灭菌的 10%YGM 液体培养基中,加入 400ml 含 8g NH_4Cl 溶于蒸馏水的无菌溶液(得到最终孢子密度为 $1.0—1.2 \times 10^7$ cfu/ml)。然后将这种混合物直接接种到 4kg 由沙,水和玉米粉以 9:2:1(W/W)的比例组成的无菌转移培养基中。接种孢子前转移培养基高压灭菌 2 次(121℃3 小时)。

以所述方式在液体培养物中直接产生孢子避免了需要对混合物进行进一步的培养。含孢子的转移培养基贮存于 4℃ 备用。

检查了以所述液体培养方法产生的孢子在 4℃ 贮存 4 个月后的存活率。1ml 孢子悬液接种到含 100ml 灭菌的 10%YGM 液体培养基(pH6.5)的瓶中,在 30℃ 以下 250rpm 摇动培养。以相差显微镜检术(X1000,用亚甲基蓝色)观察孢子

发芽。大约8天时孢子完全发芽。这一简单的观察试验表明贮存这段时间后,存活率无损失。

按下面所述试验掺入转移培养基(沙、水、玉米粉为9:2:1)的链霉菌属 WYEC 108 的存活率。将 1.0g 含链霉菌属 WYEC 108 的转移培养基样品进行系列稀释并涂布到 CYD 琼脂板上。平板在 25℃ 下培养直到形成菌落。用贮存 30 天的样品记录下平均水平为 10^8 到 10^9 cfu/g 转移培养基(干重)。

作为选择,从孢子形成琼脂的琼脂板上得到的孢子重悬于 10—20ml 无菌蒸馏水或 YGM 培养基中并混合进 10—100g 转移培养基中,以得到活体数为 10^{12} 到 10^{14} cfu/g 培养基的密度。然后将这种混合物空气干燥,彻底混匀并贮存于 4℃ 备用,该混合物是一种浓缩产品,能用另外的转移培养基稀释成任一所需 cfu/g 的较低最终活体数。

实施例 X

藻酸盐凝胶混合物的稳定性

以 5000rpm 离心 10 分钟从 500ml 3 日龄 YGM 液体培养物中收获链霉菌属 WYEC 108 菌丝体。收获的菌丝体重悬于 125ml 10% YGM 中并加入 125ml 灭菌的 5%(W/V)藻酸钠溶液使培养物密度为 $1.0—1.2 \times 10^4$ cfu/ml。经向灭菌的 0.25M CaCl_2 蒸馏水溶液中一滴一滴地加入细胞藻酸盐悬液形成含链霉菌属 WYEC 108 菌丝体的藻酸盐块。

为了测定以这种方法形成的藻酸盐块的存活率,含培养物的藻酸盐块接着平铺到灭菌的塑料培养皿(10cm×10cm)

上并在层流无菌通风橱中干燥 1 小时。成块的链霉菌属 WYEC 108 在 250℃ 贮存 6 到 8 个月后易于形成孢子(平均水平为 10^8 到 10^9 cfu/g 干燥的藻酸盐块)。当它们在 250℃ 下的无菌水中培养时,这些孢子易于发芽。以相差显微镜检术(X1000 倍放大率,用亚甲兰染色)观察孢子的发芽。

实施例 XI

含链霉菌属 WYEC 108 的转移

培养基的优选组合物

上面已阐述了分离放线菌类菌株,检查这些菌株用作生物控制剂的方法,以菌丝体形式和以孢子,合适的转移培养基及在优选的实施例中的链霉菌属 WYEC 108 生产这些生物控制剂的方法,对本领域的技术人员而言,对本发明以多种形式进行修改且不偏离本发明的实质是显而易见的。

下面阐述了本发明作为选择的实施例,并描述了特别优选的实施方案。

最适培养条件:

菌株 WYEC 108 生长的最适条件包括:温度在 20℃ 和 30℃ 之间,pH 值在 pH5.5 和 pH7.5 之间,发酵搅拌速度在 200rpm 和 300rpm 之间。在 YGM 液体培养基中和 30℃,pH6.5,以 200rpm 摇动的培养条件下培养 72 小时(到对数期末)时,一般可获得链霉菌属 WYEC 108 的最大细胞团产量,为大约 5.3g 干重的生物量/升。对数生长期的加倍时间是大约 10 小时。经过使用更高接种水平的对数期细胞可明显减少 72 小时的培养时间。

作为选择,可在固体琼脂培养基(如孢子形成琼脂)上生产孢子。这些孢子可经过利进合适的液体培养基(如10% YGM)中来直接收获,然后直接掺入转移培养基中。这种方法避免了需要对培养物进行液体生长。因此缩短了生产程序。

优选的和作为选择的转移培养基:

链霉菌属 WYEC 108 可被掺入转移培养基中用于园艺和农业方面。实施例 VI 描述了一种转移培养基的配方,它包含以 9—2—1(W/W)比例混合的沙—水—玉米粉。本领域的技术人员将明白转移培养基的配方受到所需生物控制剂特定应用的支配。例如,可将各种有机和无机填充物(如粘土、蛭石、小麦麸、玉米棒子或几丁质)加入转移培养基中。根据所需的结构和物理特征来决定转移培养基成份的比率。例如,诸如水份保持能力,适于处理和运输的轻重,为菌丝体和植物根生长和伸展提供空间的多孔性等特性是重要的。作为选择,可向藻酸盐悬液中加入链霉菌属 WYEC 108 的营养菌丝体或孢子以生产对这种菌株的藻酸盐包埋块。生产藻酸盐块的方法是本领域已知的并在 Lewis 等的美国专利申请 No. 4668512 中作了进一步的描述。其它成份(如肥料)也可掺入这些块中。

在一个优选的实施方案中,本发明的确定了包含以 1:3.5:1 重量/重量的比率混合的泥炭—沙—玉米粉的转移培养基是特别合适的。这一比率提供了合适的密度和水份保持能力,使这种产品能在农业和园艺应用中使用。然而,正如

上面所述,这些组合物和其它组合物的其它比率作为转移培养基也是可接受的。例如,一种有效的作为选择的转移培养基包含泥炭(620g)—沙(3380g)—玉米粉(270g)—几质(10g)。

在一个实施方案中,向大约 1.6 升收获的含如上所述生长于 YGM 培养基的链霉菌属 WYEC 108 菌丝体的培养物培养液(对数期细胞,例如大约 72 小时的培养物)中加入 400ml 无菌 NH_4Cl 溶液(含 8g NH_4Cl 溶于 400ml 蒸馏水中)并接种到含 4kg 灭菌的由泥炭沙和玉米粉组成的转移培养基的塑料容器中。在接种链霉菌 WYEC 108 前,将转移培养基灭菌 2 次(121°C 3 小时)。接种后的容器在 30°C 培养 10 到 14 天,使形成的孢子达到最大数。然后容器贮存于 4°C 备用。

在转移培养基中使用 NH_4Cl 给链霉菌 WYEC 108 的孢子发芽提供了氮源。除 NH_4Cl 外,其它氮源也可用于该目的,这对本领域的技术人员而言是显而易见的。例如,正如本文所述,在掺入转移培养基前,当孢子重悬于细菌生长培养基(如 10% YGM)时,不需要加入这种氮源。在本发明优选的实施方案中,转移培养基包含足够量的氮源。经过测定增加或减少特定氮源的量对出芽率的影响或改变氮源的影响可确定氮源的“足够量”所包含的量,这对本领域的技术人员言是显而易见的。一种氮源的足够量是指使霉菌属 WYEC 108 的孢子容易出芽的特定氮源的量。

在选择实施方案中,正如实施例 XI 所述,链霉菌属 WYEC 108 的孢子 in 液体培养基中产生并直接掺入优选的

转移培养基中,然后贮存于 4℃。

在本发明的优选的实施方案中,链霉菌属 WYEC 108 加入转移培养基中使终浓度至少为 1×10^5 cfu/g。在更优选的实施方案中,转移培养基中链霉菌属 WYEC 108 的终浓度在 1×10^5 cfu/g 和 1×10^8 cfu/g 之间。

实施例 X II

含有链霉菌属 WYEC 108 的转移

培养基配方的详细描述

以下面所述程序大量生产含链霉菌属 WYEC 108 的转移培养基的优选组合物。所述的全部程序都使用标准的无菌技术(例如,在紫外灯灭菌的层流室中)进行以保证无菌,直到被最终用户打开包装袋。

细胞的产生:

1). 将从 CYD 斜面得到的链霉菌 WYEC 108 孢子悬浮于 10ml 灭菌的 YGM 或 CYG 培养基(pH6.5)中,这一接种悬液用于接种培养瓶。

2). 接种 6 个含 100ml YGM(pH6.5)的 250ml 瓶。每瓶使用 10ml 孢子悬液作为接种液。接种后,在 30℃ 下以 200rpm 将瓶摇动培养 36 小时。

3). 用上面制备的菌丝体接种液(每瓶 100ml 接种液)接种 6 个各含 1.1 升 YGM 培养液(pH6.5)的 2.0 升瓶。接种后,瓶在 30℃ 下以 200rpm 摇动培养大约 24 到 48 小时或更长(达 4 天)。这成为发酵罐的接种液。

发酵:

上面制备的大约 7.2 升种子培养物接种到含 40 升无菌 YGM 培养基(pH6.5)的发酵罐中(=15%的接种体积;该方法是用与实施时一样高的细胞悬液密度进行接种)。发酵罐在 30℃下搅拌发酵大约 72 小时(接近对数期末)。

发酵罐收获:

1). 含 WYEC 108 细胞的发酵培养液(大约培养 72 小时后)无菌收获到无菌的 20 升塑料瓶中。

2). 将无菌 NH_4Cl 溶液加入仍含 WYEC 108 细胞的收获培养液中(每 3.2 升收获的培养液使用 16g NH_4Cl 溶于 800ml 蒸馏水中配成的溶液,预先以高压灭菌来除菌)。所得的 1.2 升体积的含 NH_4Cl 的细胞悬液在接种到预先制备的转移培养基前经过摇动瓶子使其充分混匀。

转移培养基的制备:

1)分别称量转移培养基的每种成份并加入大型可灭菌的盘子或其它容器中。组合的混合物定义为转移培养基。它由泥炭,沙和玉米粉(540g : 2700g : 540g : 比例为 1 : 3.5 : 1W/W)组成。

2)将转移培养基彻底混匀并用坚实的铝箔或棉花胎覆盖,然后灭菌 2 次(每次在 121℃下 90 分钟,两次灭菌期间间隔 12 小时)。

3)第二次灭菌后和在接种含菌株 WYEC 108 的收获培养物和 NH_4Cl 溶液(上面制备的)前将转移培养基冷却到室温。

将链霉菌属 WYEC 108 掺入转移培养基中以产生泥炭、沙、水、玉米粉和 NH_4Cl 的混合

1) 大约 0.5 升含菌株 WYEC 108— NH_4Cl 溶液(上面制备的)的收获培养物彻底掺入到所需数量的每个含 3.78kg 转移培养基的预先灭菌的塑料容器中。

2) 然后将接种的容器在 30°C 下培养 10—14 天(培养到 20 天可能是最佳的), 此后贮存于 4°C 备用(该混合物在数日内保持稳定)。

处理和运输

1) 使用小无菌铲或等效工具将含链霉菌属 WYEC 108 的完全组合物无菌转移到无菌的三层塑料袋中, 优选在紫外灭菌的层流橱中进行。

2) 然后将装满的袋子封口并放入用于装运的 1.5 立方英尺移动盒中。然后用强力胶带密封每个盒子。

实施例 X III

将含链霉菌属 WYEC 108 的混合

物掺入苗圃苗床中

如实施例 X III 所述的含链霉菌属 WYEC 108 生物控制剂的混合物和转移培养基与苗圃土壤或盆栽混合物混合, 使链霉菌的终浓度 $\geq 1.0\text{—}1.2 \times 10^5$ 或更大的 cfu/g 土壤。育苗程序如下:

1) 每个盆底(或苗床)放入大约 1.0cm 的泥炭以防止土壤(或盆栽混合物)流失且还能提供通气 and 排水。

2)然后向苗盆中填入农用(苗圃或盆栽混合物)土壤达到盆(或苗床)顶下大约3.0cm处。然后向盆(苗床)浇水至浸透。

3)然后向每个盆(床)上部加入大约1.5cm含链霉菌属WYEC 108的混合物和转移培养基。如果需要,也可将混合物预先与苗圃土壤或盆栽土壤混合以增加体积和调节cfu/g数。然而,为产生最佳效力,在最终混合物中cfu/g应维持在至少 10^5 cfu/g。

4)将种子放到制备的苗盆或苗床表面并盖上另外1.5cm(大约)的苗圃土壤或盆栽土壤/混合物。

5)然后加入少量水湿润土壤和种子。

6)为了减轻干燥和防止结块,一般用干净的黑塑料布覆盖盆,直到幼苗萌发(如果控制湿度可不需这一步)。

7)幼苗萌发后,如果需要,向盆(或床)顶喷洒更多的水。

由于提供了本发明的实施例和优选实施例,在不偏离本发明和其主要方面的前提下作出转移和修改对本领域的技术人员而言是显而易见的。因此我们试图用附加的权利要求来覆盖所有这类落入本发明实质和范围内的变化和修改。

参考文献

ATTC Catalogue of Bacteria and bacteriophages, 17th Edition, 1989. American Type Culture collection, Rockville, MD.

Locci, r. 1989. "Streptomyces and Related genera," in

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 4;2451—2492.

Filnow, A. B. and J. L. Lockwood. 1985. Evaluation of several actinomycetes and the fungus *Hypochytrium catenoides* as bio-control agents of *Phytophthora* root rot of soybean. *Plant Disease* 69 : 1033—1036.

Cook. 1990. Pathogenicity of four *Pythium* species to wheat, barley, peas, and lentils. *Plant Pathology* 39; 110—117.

Kraft, J. M. and D. W. Burke. 1971. *Pythium ultimum* as a pathogen of beans and peas in Washington. *Plant Dis. rep.* 55 : 1056—1060.

Lynch, J. M., R. D. Lunsden, P. T. Atkey, and M. A. Ousley. 1992. Prospects for control of *Pythium* damping-off of lettuce with *Trichoderma*, *Gliocladium*, and *Enterobacter* spp. *Biol. Fertil. Soils* 12 : 95—99.

Lynch, J. M., K. L. Wilson, M. A. Ousley, and J. M. Whipps. 1991. Response of lettuce to *Trichoderma* treatment. *Lett. Appl. Microbiol.* 12 : 59—61.

Miller, J. J. E. Liljeroth, G. Henken, and J. A. van Veen. 1990. Fluctuations in the fluorescent pseudomonad and actinomycete populations of rhizosphere and rhizoplane during the growth of spring wheat. *Can. J. Microbiol.* 36 : 254—258.

Pridham, T. G. and D. Gottlieb. 1948. The utilization of

carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. J. Bacteriol. 56 : 107—114.

Reddi, G. S. , and A. S. Rao. 1971. Antagonism of soil actinomycetes to some soil borne plant pathogenic fungi. Indian Phytopathol. 24 : 649—657.

Stanghellini, M.E. and J.G. Hancock. 1970. A Quantitative Method of the Isolation of *Pythium ultimum* from Soil. Phytopathology. 60:551;552.

Stasz, T. E. , G. E. Harman and G. A. Marx. 1980. Time and site of infection of resistant and susceptible germinating pea seeds by *Pythium ultimum*. Phytopathology. 70:730—733.

Trapero — Casas, A. , W. J. Kaiser and D. M. Ingram. 1990. Control of *Pythium* seed rot and preemergence damping-off of chickpea in the U. S. Pacific northwest and Spain. Plant Dis. 74:563—569.

Westerlund, F. V. , Jr. , R. N. Campbell and K. A. Kimble. 1974. Fungal root rots and wilt of chickpea in California. Phytopathology 64:432—436.



图 1

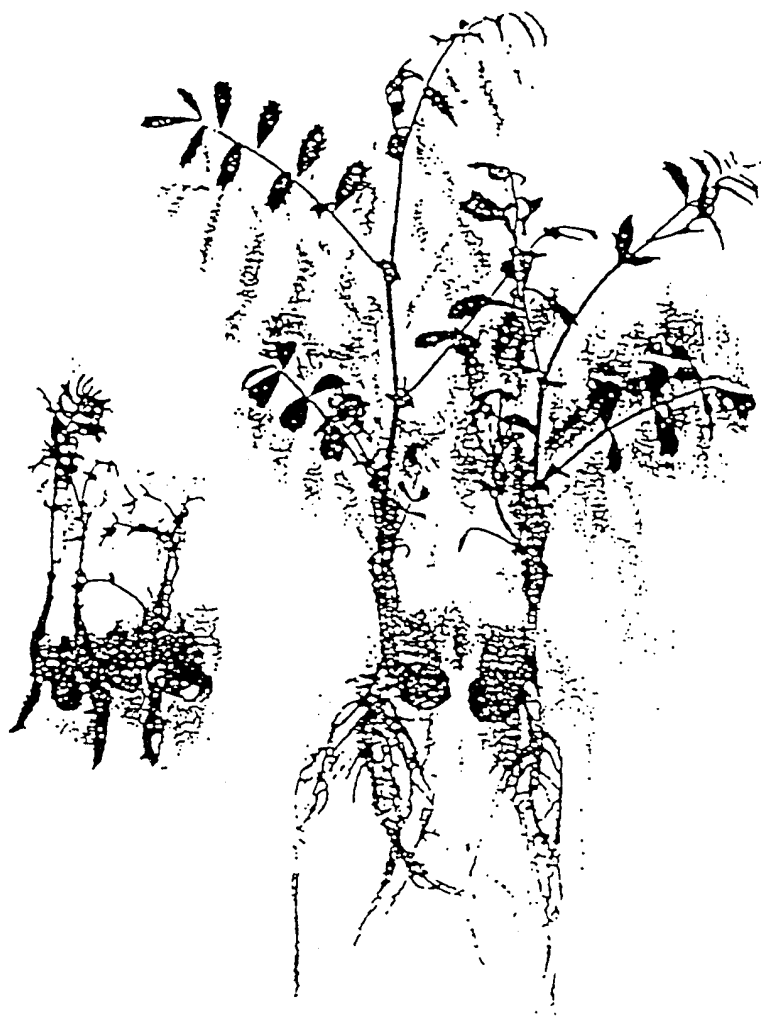


图 2