



## (12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116286498 A

(43) 申请公布日 2023.06.23

(21) 申请号 202310135559.4

(22) 申请日 2023.02.20

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M 2022954 2022.06.23

(71) 申请人 湖南省核农学与航天育种研究所

地址 410125 湖南省长沙市芙蓉区马坡岭

申请人 清华大学 古巴甘蔗衍生品研究所  
湖南省农业科学院

(72) 发明人 刘安 王克勤 刘德华

尤拉利亚·戈麦斯·桑提斯特班

谭新球 陈亮 武小芬 齐慧

张祺玲 王振 邓明 陈振

伊芙琳·法夫·佩雷斯 张鑫

安娜·内利斯·圣胡安·罗德里格斯

内拉·奥乔亚·维纳尔斯

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所(普通  
合伙) 31219

专利代理师 聂月美 高燕

(51) Int.Cl.

*C12N 1/20* (2006.01)

*A01N 63/22* (2020.01)

*A01P 3/00* (2006.01)

*G05F 11/08* (2006.01)

*C12R 1/07* (2006.01)

权利要求书1页 说明书10页  
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

贝莱斯芽孢杆菌菌株及其用途

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及贝莱斯芽孢杆菌及其用途。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis* BAC81712)菌株,所述菌株的保藏编号为CCTCC NO:M 2022954。本发明的菌株或其发酵液能有效抑制水稻稻瘟病菌和炭疽病菌,且遗传稳定性高。

1. 贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis* BAC81712) 菌株或其发酵液, 所述菌株的保藏编号为CCTCC NO:M 2022954。
2. 如权利要求1所述的菌株或其发酵液, 其特征在于, 所述菌株包括如SEQ ID No.1所示序列。
3. 如权利要求1或2所述的菌株或其发酵液在制备防治植物病原菌的产品中的用途。
4. 一种防治植物病原菌的产品, 其特征在于, 含有如权利要求1或2所述的菌株或其发酵液。
5. 如权利要求4所述的产品, 其特征在于, 所述产品选自农药或肥料。
6. 如权利要求1所述的菌株的发酵液的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:  
将如权利要求1所述的菌株经发酵培养, 得到所述菌株的发酵液。
7. 如权利要求6所述的制备方法, 其特征在于, 所述发酵培养的温度25~40℃;  
和/或, 所述发酵培养的时间为24~96h;  
和/或, 所述发酵培养的培养基包含: 20~40g/L蔗糖、15~25g/L葡萄糖。
8. 如权利要求1或2所述的菌株或其发酵液或如权利要求4或5所述的产品在预防和/或治疗植物病原菌中的用途。
9. 如权利要求3或8所述的用途, 其特征在于, 所述病原菌选自炭疽病菌和稻瘟病菌中的一种或两种;  
和/或, 所述植物选自双子叶植物或单子叶植物。
10. 一种植物病原菌的防治方法, 其特征在于, 向植物施用如权利要求1或2所述的菌株或其发酵液或如权利要求4或5所述的产品。

## 贝莱斯芽孢杆菌菌株及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及贝莱斯芽孢杆菌及其用途。

### 背景技术

[0002] 水稻和蔬菜是我国人民日常食用的重要农作物,2021年我国水稻消费量约为2.3亿吨,蔬菜消费量约为7.4亿吨,且随着生活水平的提高,人们对水稻和蔬菜的需求量还在逐步上升,因此,对水稻和蔬菜的产量和质量要求也越来越高。与人民日益增长的需求量相矛盾的是,我国生产的6亿吨粮食、8亿吨蔬菜在有害生物的危害下减产严重,损失可达10%,其中危害尤为甚的是植物病原菌。

[0003] 稻瘟病(RiceBlast)是由子囊菌Magnaporthe oryzae(T.T.Hebert)引起的一种突发性强、易于流行的真菌病害、分布广泛,全球85个国家均有发生,也是我国南北稻区危害最严重的水稻病害之一。稻瘟病在整个水稻生育期都会发生,根据受害的时期和部位不同,可以分为苗瘟、叶瘟、叶枕瘟、节瘟、穗颈瘟、枝梗瘟和谷粒瘟等,发病严重时,可造成苗期或成株期枯死,甚至绝产,每年给水稻造成10-30%的产量损失。除了从叶、茎等的表部位侵入水稻外,稻瘟病菌还可以危害其他禾本科植物,如稷、大麦、小麦等。

[0004] 炭疽病是蔬菜经常发生的一大类病害,炭疽病主要发生在蔬菜叶片上,常常为害叶缘和叶尖,严重时,使大半叶片枯黑死亡,严重时,引起蔬菜死亡。此病由于有潜伏侵染的特征,早期一般不易被发现。因此,有时常常会失去早期防治机会,造成一定损失。

[0005] 目前对于水稻和蔬菜中病原菌的防治方法主要是化学防治,虽然化学防治方便且经济,但其过量使用容易造成环境污染、植物病虫害抗药性增加等问题,所以具有绿色、无污染、对人畜安全、不产生抗药性特点的生物防治是目前最具有前景的防治办法。

[0006] 现有文献中贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病原菌和炭疽病原菌具有抑菌作用,其从自然界分离筛选得到,但其抑菌作用低,因此本申请研究一种对稻瘟病原菌和炭疽病原菌具有高效抑菌作用的贝莱斯芽孢杆菌。

### 发明内容

[0007] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供贝莱斯芽孢杆菌菌株及其用途,以期解决现有技术中存在的问题。

[0008] 为实现上述目的,本发明具体采用如下技术方案。

[0009] 本发明的第一方面保护贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis* BAC81712)菌株或其发酵液,所述菌株的保藏编号为CCTCC NO:M2022954。

[0010] 在本申请的某些实施方式中,所述的菌株包括如SEQ ID No.1所示序列。

[0011] 本发明的第二方面保护如上文所述的菌株或其发酵液在制备防治植物病原菌的产品中的用途。

[0012] 本发明的第三方面保护一种防治植物病原菌的产品,含有如上文所述的菌株或其发酵液。

- [0013] 在本申请的某些实施方式中,所述产品选自农药或肥料。
- [0014] 在本申请的某些实施方式中,所述产品还包括还包括载体。
- [0015] 优选地,所述载体可为固体载体或液体载体。
- [0016] 更优选地,所述固体载体为矿物材料、生物材料。
- [0017] 进一步优选地,所述矿物材料可为草炭、粘土、滑石、高岭土、蒙脱石、白碳、沸石、硅石和硅藻土中的至少一种。
- [0018] 进一步优选地,所述生物材料为各类作物的秸秆、松壳、稻草、花生壳、玉米粉、豆粉、淀粉、草炭和动物的粪便中的至少一种。
- [0019] 更优选地,所述液体载体可为水。
- [0020] 所述产品中,贝莱斯芽孢杆菌BAC81712或/和贝莱斯芽孢杆菌BAC81712的代谢物可以以被培养的活细胞、活细胞的发酵液、细胞培养物的滤液或细胞与滤液的混合物的形式存在。
- [0021] 在本申请的某些实施方式中,所述产品为液体菌剂或固体菌剂。
- [0022] 在本申请的某些实施方式中,所述产品的剂型可为多种剂型,如液剂、乳剂、悬浮剂、粉剂、颗粒剂、可湿性粉剂或水分散粒剂。
- [0023] 优选地,所述产品中还可添加表面活性剂(如吐温20、吐温80等)、粘合剂、稳定剂(如抗氧化剂)、pH调节剂等。
- [0024] 本发明的第四方面保护如上文所述的菌株的发酵液的制备方法,包括如下步骤:
- [0025] 将上文所述的菌株经发酵培养,得到所述菌株的发酵液。
- [0026] 本申请中发酵液包括发酵上清液和含有菌株的发酵液。
- [0027] 在本申请的某些实施方式中,所述发酵培养的培养基为LB高糖培养基。以LB高糖培养基的总体积为基准计,所述LB高糖培养基包括:8~12g/L蛋白胨、3~7g/L酵母粉、3~7g/L氯化钠、25~35g/L蔗糖、10~20g/L葡萄糖。在某个具体实施方式中,为10g/L蛋白胨、5g/L酵母粉、5g/L氯化钠、30g/L蔗糖、15g/L葡萄糖。
- [0028] 在本申请的某些实施方式中,所述发酵培养的温度为25~40℃。优选地,温度可以为25~32℃,也可以为29~36℃,也可以为32~40℃。在某些优选的实施方式中,为37℃。
- [0029] 在本申请的某些实施方式中,所述发酵培养的时间为24~96h。优选地,时间可以为24~45h,也可以为40~60h,也可以为50~96h。在某些优选的实施方式中,为42h。
- [0030] 在本申请的某些实施方式中,所述发酵培养的培养基包含:20~40g/L蔗糖、15~25g/L葡萄糖。
- [0031] 在本申请的某些实施方式中,所述发酵培养后还包括离心、过滤。
- [0032] 优选地,所述过滤包括第一次过滤和第二次过滤。
- [0033] 更优选地,所述第一次过滤在有机膜上进行。所述有机膜的孔径为0.45μm。
- [0034] 更优选地,所述第二次过滤在细胞过滤膜上进行。所述细胞过滤膜的孔径为0.22μm。
- [0035] 在本申请的某些实施方式中,所述发酵培养包括第一发酵培养和第二次发酵培养。
- [0036] 优选地,所述第一次发酵培养的温度为25~40℃。
- [0037] 更优选地,所述第一次发酵培养的温度可以为25~34℃,也可以为29~38℃,也可

以为31~40℃。在某个优选的实施方式中,为37℃。

[0038] 优选地,所述第一次发酵培养的时间为10~40h。

[0039] 更优选地,所述第一次发酵培养的时间可以为10~20h,也可以为15~25h,也可以为20~40h。在某个优选的实施方式中,为18h。

[0040] 优选地,所述第二次发酵培养的温度为25~40℃。

[0041] 更优选地,所述第二次发酵培养的温度可以为25~34℃,也可以为29~38℃,也可以为31~40℃。在某个优选的实施方式中,为37℃。

[0042] 优选地,所述第二次发酵培养的时间为15~56h。

[0043] 更优选地,所述第二次发酵培养的时间可以为15~35h,也可以为25~50h,也可以为40~56h。在某个优选的实施方式中,为24h。

[0044] 本发明的第五方面保护如上文所述的菌株或其发酵液或如上文所述的产品在预防和/或治疗植物病原菌中的用途。

[0045] 本发明的第六方面保护一种植物病原菌病的防治方法,向植物施用如上文所述的菌株或其发酵液或如上文所述的产品。

[0046] 在本申请的某些实施方式中,所述病原菌选自炭疽病菌和稻瘟病菌中的一种或两种。

[0047] 优选地,所述炭疽病菌为辣椒炭疽病菌。具体地,为胶孢炭疽(*Colletotrichum gloeosporioides*)。

[0048] 优选地,所述稻瘟病菌为水稻稻瘟病菌。具体地,为水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)。

[0049] 在本申请的某些实施方式中,所述植物选自双子叶植物或单子叶植物。

[0050] 优选地,所述双子叶植物为水稻、稷、大麦、小麦、蔬菜。所述蔬菜包括辣椒。

[0051] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0052] 1) 本发明筛选的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712能有效拮抗水稻稻瘟病菌和蔬菜炭疽病菌。

[0053] 2) 相比于自然界中的出发菌贝莱斯芽孢杆菌,本发明的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712对稻瘟病菌的抑制率提高了2.1%,对炭疽病菌的抑制率提高了6.5%。

[0054] 3) 本发明的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712对植物病原菌病拮抗作用的遗传学稳定,遗传第5代、第6代的菌株对稻瘟病菌和炭疽病菌的抑制效果与1代一致,且显著高于出发菌株。

[0055] 4) 本发明的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712的发酵上清液也具有对植物病原菌的抑菌效果,其菌液和发酵液均可后续用于水稻和蔬菜的生物防治,因此在农业生产上有良好的应用价值。

## 附图说明

[0056] 如图1显示为本发明实施例4初筛中贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病菌的抑菌效果图。

[0057] 如图2显示为本发明实施例4初筛中贝莱斯芽孢杆菌对炭疽病菌的抑菌效果图。

[0058] 如图3显示为本发明实施例4复筛中贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病菌的抑菌效果图。

[0059] 如图4显示为本发明实施例4复筛中贝莱斯芽孢杆菌对炭疽病菌的抑菌效果图。

[0060] 如图5显示为本发明实施例4复筛中贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病菌和炭疽病菌的抑制率柱状图。

[0061] 如图6显示为本发明实施例5初筛中贝莱斯芽孢杆菌拮抗植物病原菌效果的遗传稳定性。

[0062] 如图7显示为本发明实施例6的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712的发酵上清液对稻瘟病菌的抑菌效果图。

[0063] 如图8显示为本发明实施例1的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712的发酵上清液对炭疽病菌的抑菌效果图。

[0064] 如图9显示为本发明实施例1的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712的发酵上清液对稻瘟病菌和炭疽病菌的抑菌率柱状图。其中,左边为水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*), 右边为胶孢炭疽 (*Colletotrichum gloeosporioides*)。

### 具体实施方式

[0065] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0066] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围。下列实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,或者按照各制造商所建议的条件。

[0067] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0068] 下述实施例所用培养基如下:

[0069] PDA培养基:准确称取马铃薯淀粉5g、葡萄糖20g、琼脂15g,适量蒸馏水溶解,后定容至1L。

[0070] LB肉汤培养基:准确称量胰蛋白胨10g、酵母粉5g、氯化钠5g、葡萄糖1g,适量蒸馏水溶解,后定容至1L。

[0071] LB高糖培养基:准确称量胰蛋白胨10g、酵母粉5g、氯化钠5g、蔗糖30g、葡萄糖15g,适量蒸馏水溶解,后定容至1L。

[0072] LB琼脂培养基:准确称量胰蛋白胨10g、酵母粉5g、氯化钠5g、葡萄糖1g、琼脂15g,适量蒸馏水溶解,后定容至1L。

[0073] LB琼脂高糖培养基:准确称量胰蛋白胨10g、酵母粉5g、氯化钠5g、琼脂15g、蔗糖30g、葡萄糖15g,适量蒸馏水溶解,后定容至1L。

[0074] 水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 已经公开,详见文献1(吴希阳气、罗路云等,沼泽红假单胞菌Atp2蛋白的原核表达及稻瘟病菌的互作蛋白初步筛选,中国生物防治学报,2020,3:424-428)。

[0075] 胶孢炭疽(*Colletotrichum gloeosporioides*),已经公开,详见文献2(曾泉水、满益龙等,辣椒胶孢炭疽菌遗传转化体系的建立,植物保护,2019,4:156-184)。

[0076] 实施例1贝莱斯芽孢杆菌的诱变、分离

[0077] 本实施例中,诱变分离得到贝莱斯芽孢杆菌。包括如下步骤:

[0078] 1.1、贝莱斯芽孢杆菌辐照诱变实验

[0079] 1.1.1从之前培养的野生出发菌株(由清华大学应用化学研究所提供)中挑取一环,接种至装液量为50mL的LB肉汤培养基三角瓶中,37℃,180rpm摇瓶培养16h,此为一级活化液。

[0080] 1.1.2将本实施例中步骤1.1.1得到的一级活化种子液按4%(2mL)的接种量接入LB高糖培养基中(250mL的三角瓶装液量为50mL),在37℃,180rpm的条件下摇床振荡培养,在菌株的培养对数期取样,取样的菌液用生理盐水进行稀释,调节菌悬液浓度为 $10^7$ CFU/mL左右。

[0081] 1.1.3无菌操作吸取本实施例中步骤1.1.2的菌悬液分装于10mL灭菌离心管中,做好标记,使用不同剂量的 $^{60}\text{Co}$   $\gamma$ -射线进行诱变处理,每个灭菌离心管写明诱变剂量,每个剂量辐照两管,并留两管不辐照的菌液作为对照(即CK)。

[0082] 1.2、诱变后菌落计数及致死率计算

[0083] 1.2.1用移液枪吸取1mL辐照后菌液于9mL生理盐水中充分混匀,制成1:10的样品匀液。用无菌移液枪吸取1:10样品匀液1mL,沿管壁缓慢注于盛有9mL生理盐水的无菌试管中,振摇试管或换用1支无菌吸管反复吹打使混合均匀,制成1:100的样品匀液。重复上述操作,制备10倍系列稀释样品匀液。

[0084] 1.2.2选取 $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$ 四个稀释梯度的样品匀液,吸取1mL本实施例中步骤1.2.1的样品匀液于无菌平板培养皿内,每个稀释度做两个平板培养皿。同时,分别吸取1mL空白稀释液加入两个无菌平板培养皿内作空白对照。及时将15~20mL冷却至45℃左右的LB琼脂培养基倾注至各平板培养皿,并转动平板培养皿使其混合均匀。琼脂凝固后,将平板翻转,37℃培养24h后进行计数。

[0085] 1.2.3计算出CK的活菌数及不同诱变剂量的活菌数,以CK为对照,计算出不同诱变剂量的存活率和致死率,致死率见表1。

[0086] 存活率=诱变后菌落总数/CK菌落总数 致死率=1-存活率

[0087] 1.3、诱变后单菌落纯化培养

[0088] 用接种环挑取致死率在80%~90%左右的平板培养皿中单菌落,用走“之”字型的方式接种至LB琼脂斜面培养基上,每支LB琼脂斜面培养基上接种一个纯化菌落,获得纯化菌株共144株,编号为A01-A144。

[0089] 重复上述操作,将接好的斜面放37℃培养24h后拿出放冰箱保存备用。

[0090] 表1为根据致死率筛选辐照诱变贝莱斯芽孢杆菌适宜条件

辐照剂量 (Gy)	致死率 (%)	
	$^{60}\text{Co}$ $\gamma$ -射线	电子束
71	9.10	47.8
152	24.70	68.5
378	47.60	91.8

[0091]

[0092]	513	50.60	96.8
	692	55.40	97.8
	931	69.91	98.5
	1059	62.94	—
	1495	74.68	—
	1826	87.52	—

[0093] 从表1可知,贝莱斯芽孢杆菌的适宜辐照诱变条件:辐照源为<sup>60</sup>Co-γ射线,剂量为1826Gy,剂量率为92Gy/h,经该剂量和剂量率辐照后的菌株,即为本申请筛选得到的贝莱斯芽孢杆菌菌株。

[0094] 实施例2贝莱斯芽孢杆菌的鉴定

[0095] 本实施例中,对实施例1得到的贝莱斯芽孢杆菌进行生理生化鉴定,包括以下步骤:

[0096] 2.1形态学特征和生理生化鉴定

[0097] 将实施例1中步骤1.3得到的纯培养物划线于LB培养基平板上,28℃培养48h后,菌落为淡黄色,隆起,表面褶皱,不透明,干燥,边缘不整齐,有芽孢。在显微镜下观察,其菌体形态呈短杆状,见图7。

[0098] 参照《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠2001)进行革兰氏染色试验、硝酸盐还原、VP试验、脲酶、精氨酸双水解酶等进行菌株生理生化特性测定,结果见表2。

[0099] 从表2可知,菌株BAC81712为革兰氏阳性菌,精氨酸双水解酶、β-半乳糖苷酶、接触酶、柠檬酸生长、脲酶、氧化酶、明胶水解、硝酸盐还原、VP试验反应等为阳性,赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、甲基红反应、产生H<sub>2</sub>S、产生吲哚等测试反应为阴性。

[0100] 表2

实验项目	结果	实验项目	结果	实验项目	结果	实验项目	结果
细胞形态	杆状	革兰氏染色	阳性	形成芽孢	+	芽孢膨大	-
精氨酸双水解酶	+	接触酶	+	氧化酶	+	50℃生长	-
赖氨酸脱羧酶	-	柠檬酸生长	+	明胶水解	+	硝酸盐还原	+
β-半乳糖苷酶	+	甲基红反应	-	产生H <sub>2</sub> S	-	VP反应	+
鸟氨酸脱羧酶	-	脲酶	+	产生吲哚	-		

[0102] 注:“+”表示阳性;“-”表示阴性。

[0103] 2.2Biolog鉴定

[0104] 采用BIOLOG GENⅢ试剂盒(按照试剂盒说明书操作)对菌株BAC81712进行鉴定,所有仪器耗材皆为Biolog公司产品,结果见表3。

[0105] 从表3可知,菌株BAC81712符合贝莱斯芽孢杆菌的特性。

[0106] 表3 Biolog GEN III(化学敏感实验)

实验项目	结果	实验项目	结果	实验项目	结果	实验项目	结果
阳性对照	+	1%乳酸钠	+	林可霉素	+	萘啶酸	-
pH 6.0	+	夫西地酸	-	盐酸胍	+	氯化锂	+
pH 5.0	+	醋竹桃霉素	-	溴酸钠	-	亚碲酸钾	+
利福霉素SV	+	1%NaCl	+	万古霉素	-	氨曲南	-
二甲胺四环素	-	4%NaCl	+	四唑紫	-	丁酸钠	+

十四烷硫酸钠	-	8%NaCl	+	四唑蓝	-		
--------	---	--------	---	-----	---	--	--

[0108] 注：“+”表示阳性；“-”表示阴性。

[0109] 2.3分子生物鉴定

[0110] 本发明贝莱斯芽孢杆菌BAC81712送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序如下:

[0111] AGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTC  
CCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGG  
GGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGAC  
CCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCG  
GCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGT  
CTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCG  
TTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTAAAGCC  
CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAG  
CGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGC  
GAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTAGGGGG  
TTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAA  
GGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT  
TGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA  
GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTACAGTTGGG  
CACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG  
GGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCACAAATCTGTTC  
TCAGTTCCGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGT  
GAATACGTTCCCGGCCCTTGACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGTCCGGTGAGGTAAC  
CTTTTAGGAGCCAGCCCGCAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCG (SEQ ID No.1)

[0112] 测序所得序列在<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>上进行同源比对分析,结果表明该纯培养物与*Bacillus velezensis*(基因库登陆号:FJ713021.1)的相似性达100%,在基于16s rDNA序列构建的系统发育树中,该菌株与*Bacillus velezensis*(基因库登陆号:FJ713021.1)聚在一枝上。综合,菌株形态学、生理生化鉴定、化学敏感性鉴定,诱变菌株中编号为A17的菌株即为本申请的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis* BAC81712),于2022年6月23日保藏在中国典型培养物保藏中心,地址为湖北省武汉市武昌区八一路299号中国典型培养物保藏中心,保藏编号为CCTCC NO:M 2022954。

[0113] 实施例4贝莱斯芽孢杆菌的对炭疽病菌、稻瘟病菌的抑制作用

[0114] 本实施例中,采用实施例1得到的贝莱斯芽孢杆菌针对稻瘟病菌和炭疽病菌进行抑菌实验,包括如下步骤:

[0115] 4.1贝莱斯芽孢杆菌抑制稻瘟病菌和炭疽病菌效果初筛

[0116] 4.1.1从斜面保藏的CK菌株和诱变后的菌株分别接种一环单菌落于装有50mL LB高糖培养基的三角瓶中,37℃,180rpm摇瓶培养24h后测量其吸光值,计算贝莱斯芽孢杆菌浓度,用LB高糖培养基将所有菌株浓度调至接近。后用无菌生理盐水进行稀释,将菌液浓度

调至合适值。

[0117] 4.1.2将水稻稻瘟病菌和蔬菜炭疽病菌用点接法点接在含有PDA培养基的平板中间,28℃培养,直至长满平板。

[0118] 4.1.3抑菌试验(采用平板对峙法):

[0119] 用打孔器在长好的病原菌边缘打大小相同的菌饼接在新的培养基中间(炭疽病菌接在LB琼脂高糖培养基里,稻瘟病菌接在PDA培养基里),在距平板中央2cm处的两端放置滤纸片,分别吸取10μL菌悬液滴于滤纸片上,一端为未诱变的贝莱斯芽孢杆菌即CK,一端为诱变后的贝莱斯芽孢杆菌。28℃培养,5天后用游标卡尺测量抑菌效果,每个菌株做两个平行。

[0120] 4.1.4抑菌试验(采用四点法):

[0121] 与本实施例中步骤4.1.3操作相似,但是是用十字交叉法在距平板中心2cm处的四个点放置滤纸片,吸取10μL菌悬液滴于滤纸片上(一个板上接同一株菌),28℃培养5天,测量病原菌直径,以CK为对照,病原菌直径小于CK的即抑菌效果比CK好。每个菌株做3个平行,计算抑菌提高率。

[0122] 抑菌提高率 = (诱变菌株侧抑菌带距离 / 诱变菌株菌落生长半径 - CK侧抑菌带距离 / CK菌株菌落生长半径) × 100%

[0123] 备注:

[0124] 如图1为本实施例初筛中贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病菌的抑菌效果图。

[0125] 从图1可知,通过平板对峙法初筛,编号为A12、A14、A17、A18的贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病菌的抑菌效果较出发菌株CK提高。

[0126] 如图2为本实施例初筛中贝莱斯芽孢杆菌BAC81712对炭疽病菌的抑菌效果图。

[0127] 从图2可知,通过平板对峙法初筛,编号为A11、A13、A17、A20的贝莱斯芽孢杆菌对炭疽病菌的抑菌效果较出发菌株CK提高。

[0128] 4.2、贝莱斯芽孢杆菌抑制稻瘟病菌和炭疽病菌效果复筛

[0129] 4.2.1从斜面保藏的CK菌株和本实施例中步骤4.1初筛后单菌落分别接种一环于装有50mL LB高糖培养基的三角瓶中,37℃,180rpm摇瓶培养16h后测量其吸光值,计算贝莱斯芽孢杆菌浓度,用LB高糖培养基将所有菌株的菌液浓度调至接近。

[0130] 4.2.2将水稻稻瘟病菌和蔬菜炭疽病菌用点接法点接在含有PDA培养基平板中间,28℃培养,直至长满平板。

[0131] 4.2.3用打孔器在长好的病原菌边缘打大小相同的菌饼接在新的含有PDA培养基平板中间,28℃培养一天后,用十字交叉法在距病原菌菌饼中央2.5cm处的四端放置滤纸片,吸取同一菌株的10μL菌悬液分别滴于四个滤纸片,每株菌做三个平行(空白为滤纸片上接10μL无菌水)。28℃培养,5天后用游标卡尺测量植物病原菌生长直径,计算抑制率。

[0132] 抑制率 = (对照菌落生长直径 - 处理菌落生长直径) / 对照菌落生长直径 × 100%

[0133] 备注:

[0134] 如图3为本实施例中复筛中贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病菌的抑菌效果图。

[0135] 从图3可知,出发菌株CK和编号为A17的贝莱斯芽孢杆菌都具有显著对稻瘟病菌的抑菌效果,且编号为A17的贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病菌的抑菌效果高于CK。

[0136] 如图4为本实施例中复筛中贝莱斯芽孢杆菌对炭疽病菌的抑菌效果图。

[0137] 从图4可知,出发菌株CK和编号为A17的贝莱斯芽孢杆菌都具有显著对炭疽病菌的

抑菌效果,且编号为A17的贝莱斯芽孢杆菌对炭疽病菌的抑菌效果高于CK。

[0138] 图5为本实施例中抑菌复筛中贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病菌和炭疽病菌的抑制率柱状图(四点法)。

[0139] 从图5可知,在初筛的11株诱变菌株中,与出发菌株CK相比,编号为A17的贝莱斯芽孢杆菌对稻瘟病菌和炭疽病菌的抑制效果均显著增加。

[0140] 从图1、2、3和4可知,相比出发菌种,贝莱斯芽孢杆菌BAC81712(即图中A17)对稻瘟病菌的抑制率提高了2.1%,对炭疽病菌的抑制率提高了6.5%,且该活性在六代内遗传稳定。

[0141] 实施例5贝莱斯芽孢杆菌的遗传稳定性

[0142] 本实施例中,进行贝莱斯芽孢杆菌的遗传稳定性研究,包括如下:

[0143] 1) 传代培养:分别从CK、编号为A04、A12、A17、A18的贝莱斯芽孢杆菌的初代斜面挑取一环单菌落于LB肉汤培养基中,37℃,180r/min摇瓶培养24h后,分别从三角瓶中蘸取一环于LB培养皿中划线培养使其出现单菌落,后分别挑取单菌落于LB肉汤培养基37℃,180r/min摇瓶培养24h,如此摇瓶-平板-摇瓶循环培养,后分别挑取培养至第五代和第六代的单菌落于试管斜面划线培养。

[0144] 2) 解淀粉芽孢杆菌菌液的制备:分别挑取第一代、第五代、第六代的CK、A04、A12、A17、A18于装有50mL LB高糖的三角瓶中,37℃,180r/min摇瓶培养16h,后测量其吸光值,计算解淀粉芽孢杆菌浓度,用LB高糖培养基将其浓度调至接近。

[0145] 3) 病原菌的培养:将水稻稻瘟病菌和辣椒炭疽病菌用点接法点接在含有PDA培养基平板中间,28℃培养,直至长满平板。

[0146] 4) 遗传稳定性验证试验:用打孔器在长好的病原菌边缘打大小相同的菌饼接在新的PDA培养基平板中间,28℃培养一天后,用十字交叉法在距病原菌菌饼中央2.5cm处的四端放置滤纸片,分别吸取10μL菌悬液滴于滤纸片上(一个板上接同一株菌),每株菌做三个平行(空白为滤纸片上接10μL无菌水)。28℃培养,待空白对照病原菌长满平板后用游标卡尺测量抑菌效果。计算抑制率。

[0147] 抑制率=(对照菌落生长直径-处理菌落生长直径)/对照菌落生长直径×100%

[0148] 图6为本实施例中贝莱斯芽孢杆菌拮抗植物病原菌效果的遗传稳定性。

[0149] 从图6可知,诱变菌株A17直至第5、6代,其对稻瘟病菌和炭疽病菌的抑制效果均和第1代一致,且诱变菌株A17的第1代、第5代、第6代的对稻瘟病菌和炭疽病菌的抑制效果均显著高于出发菌株CK。

[0150] 实施例6贝莱斯芽孢杆菌BAC81712发酵液的抑菌实验

[0151] 1) 将CK(对照菌落)、A17的一个单菌落(处理菌落)分别接入LB高糖培养基后放入摇床,37℃,180rpm培养18h。

[0152] 2) 分别将上述培养获得的菌液摇匀,于600nm下测量其吸光值,当OD值高于2.5,调节菌群密度为 $1 \times 10^9$ cfu/mL后,分别吸取5mL菌液接入装有50mL LB高糖培养基的250mL锥形瓶中,37℃,180rpm摇床发酵培养24h。

[0153] 3) 24h后将2)中发酵液分别分装于10mL离心管,10000rpm离心10min,分别取上清液先后过0.45μm有机膜(天津津腾实验设备有限公司)和0.22μm细胞专用过滤膜(美国Millipore公司),获得无菌发酵上清液。

[0154] 4) 用打孔器分别在长满的炭疽病菌平板和稻瘟病菌平板打孔直径6mm的圆饼,用镊子将打孔后的菌饼放于含有PDA培养基平板中心,用四点法在菌饼中心2.5cm的四周放置牛津杯,每个牛津杯里面加200 $\mu$ L无菌发酵上清液,作为空白对照的牛津杯中加入200 $\mu$ L无菌水。每个菌株各做三个平行。上述平板置于28 $^{\circ}$ C培养,待空白对照病原菌长满平板后用游标卡尺测量各个平板病原菌直径。计算抑制率。

[0155] 抑制率 = (对照菌落生长直径 - 处理菌落生长直径) / 对照菌落生长直径  $\times$  100%

[0156] 如图7为本实施例中贝莱斯芽孢杆菌的发酵上清液对稻瘟病菌的抑菌效果图。

[0157] 从图7可知,出发菌株CK和编号为A17的贝莱斯芽孢杆菌的发酵上清液都具有显著对稻瘟病菌的抑菌效果。

[0158] 如图8为本实施例中贝莱斯芽孢杆菌的发酵上清液对炭疽病菌的抑菌效果图。

[0159] 从图8可知,出发菌株CK和编号为A17的贝莱斯芽孢杆菌的发酵上清液都具有显著对炭疽病菌的抑菌效果。如图9为本实施例中贝莱斯芽孢杆菌的发酵上清液对稻瘟病菌和炭疽病菌的抑菌率柱状图。其中,左边为稻瘟病菌 (*magnapothe grisea*), 右边为炭疽病菌 (*bacillus anthracis*)。

[0160] 从图9可知,编号为A17的贝莱斯芽孢杆菌对炭疽病菌和稻瘟病菌的抑菌效果均高于CK组。

[0161] 本发明的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712对稻瘟病菌的抑制率可达到64.6%,相比于自然界中的出发菌贝莱斯芽孢杆菌,提高了2.1%;对炭疽病菌的抑制率可达到58.7%,相比于自然界中的出发菌贝莱斯芽孢杆菌,提高了6.5%。本发明的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712对植物病原菌拮抗作用的遗传学稳定,遗传第5代、第6代的菌株对稻瘟病菌和炭疽病菌的抑制效果与1代一致,且显著高于出发菌株。本发明的贝莱斯芽孢杆菌BAC81712的发酵上清液也具有对植物病原菌的抑菌效果,其菌液和发酵液均可后续用于水稻和蔬菜的生物防治,因此在农业生产上有良好的应用价值。

[0162] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

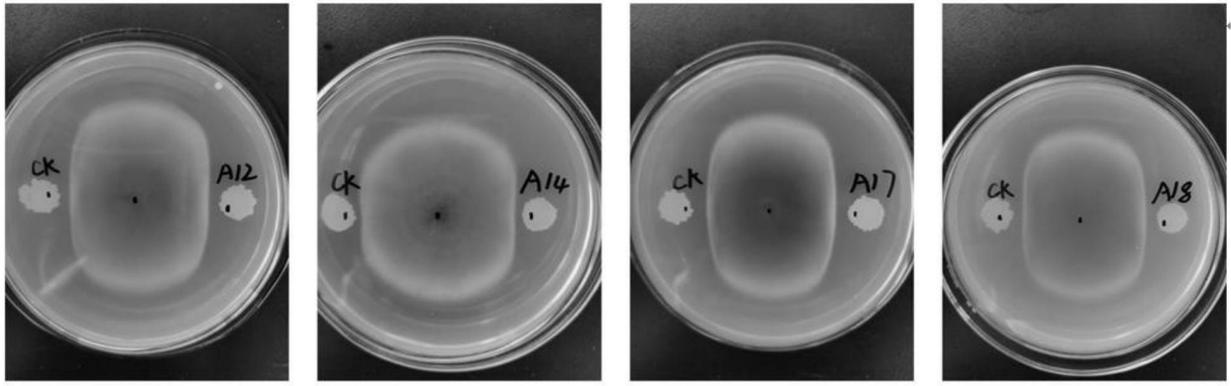


图1

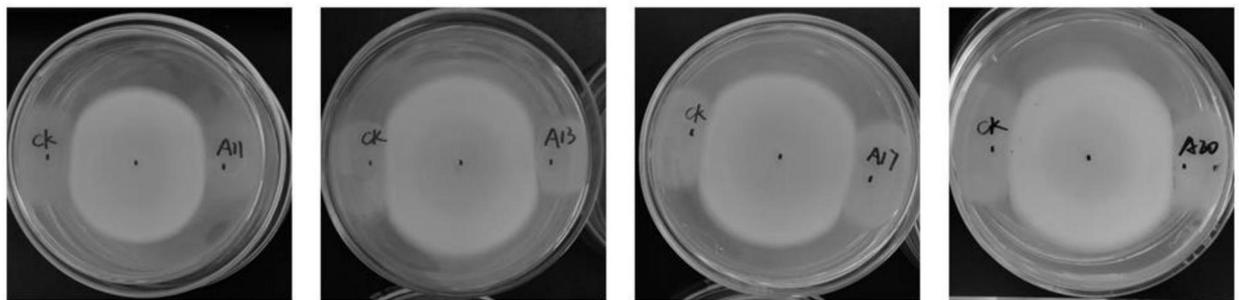


图2

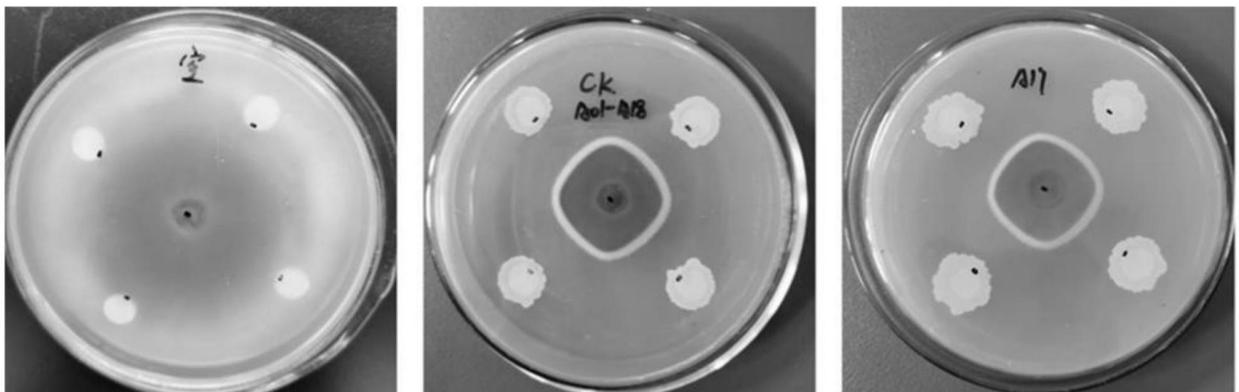


图3

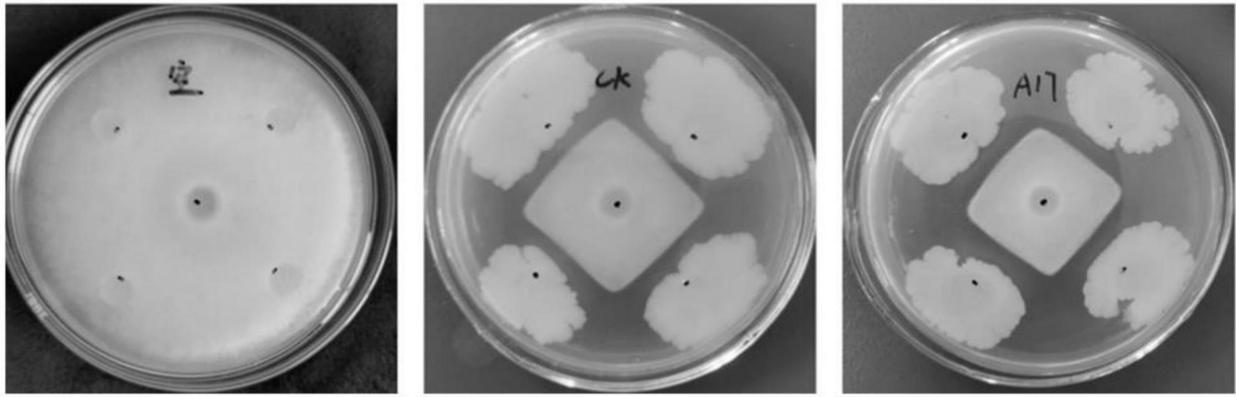


图4

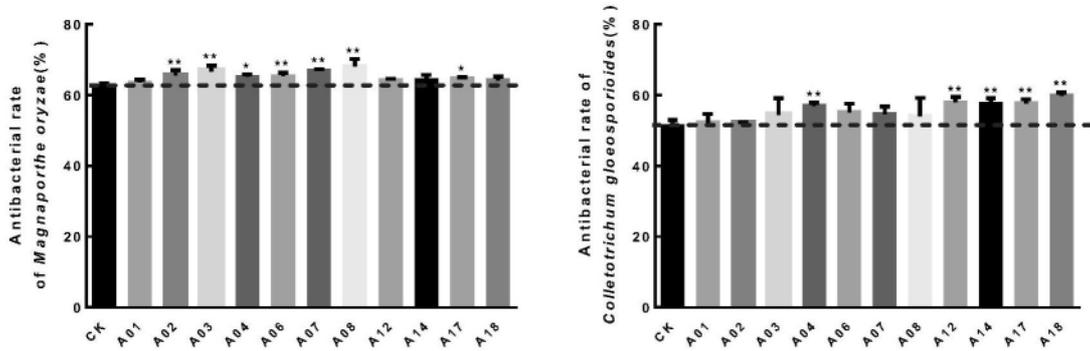


图5

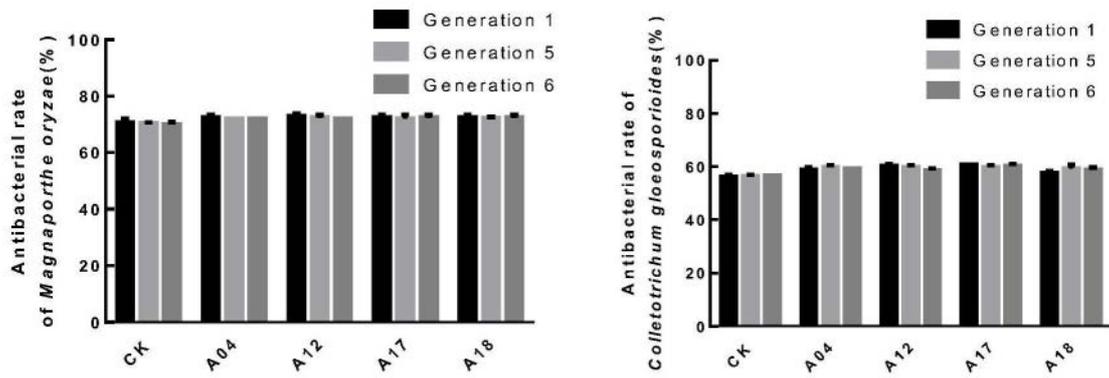


图6

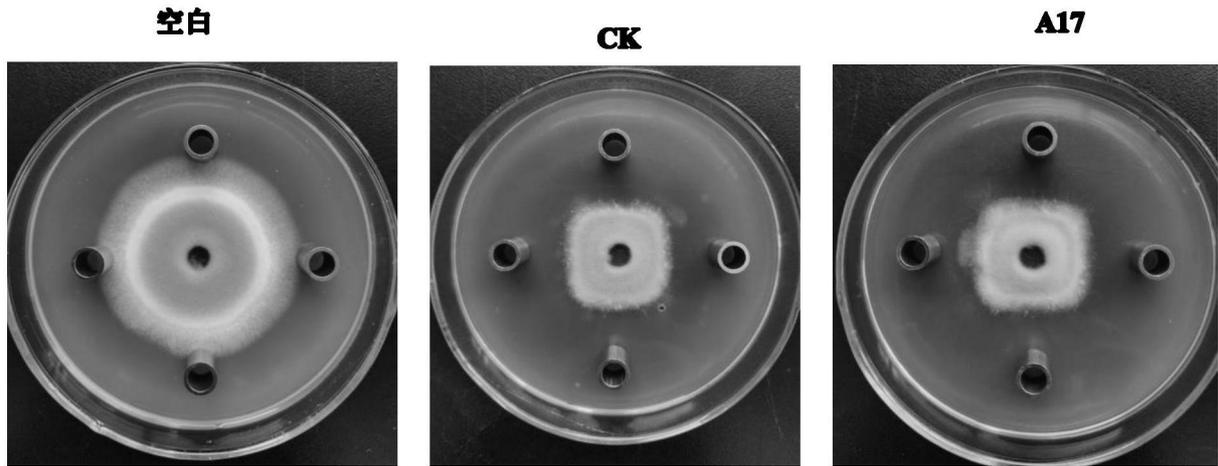


图7

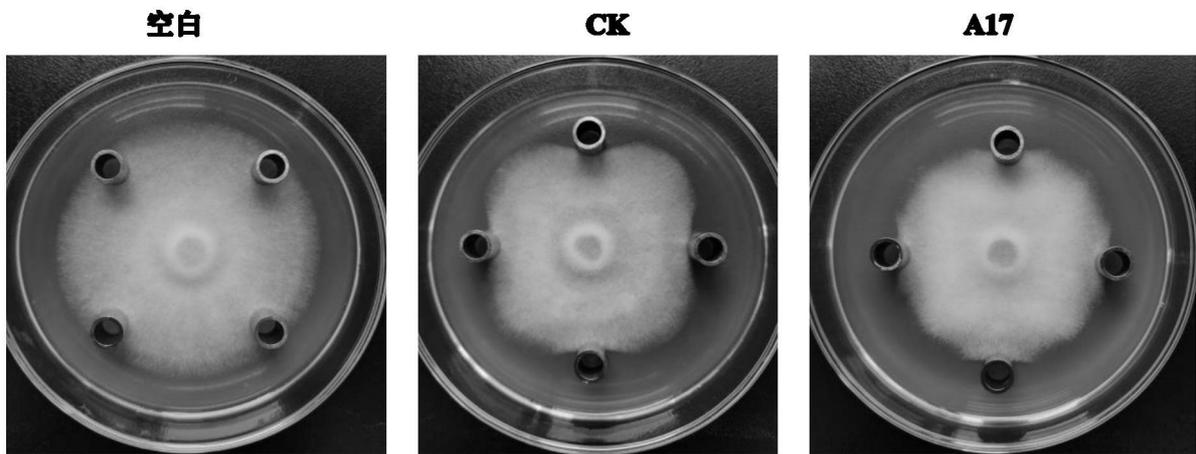


图8

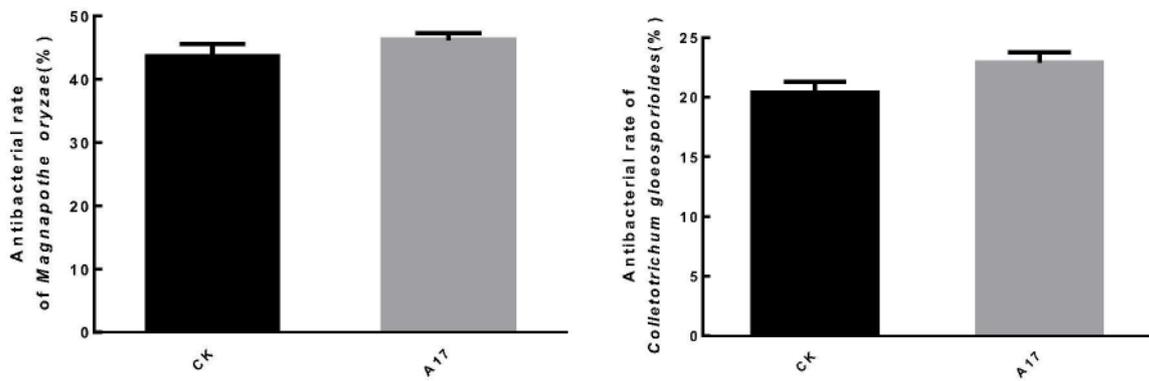


图9