



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115537358 A

(43) 申请公布日 2022. 12. 30

(21) 申请号 202211312714.7 *A01N 63/22* (2020.01)  
(22) 申请日 2022.10.25 *A01P 3/00* (2006.01)  
(83) 生物保藏信息 *C12R 1/07* (2006.01)  
CCTCC NO:M20221140 2022.07.21 *C12R 1/77* (2006.01)  
(71) 申请人 湖南省农业环境生态研究所  
地址 410125 湖南省长沙市芙蓉区马坡岭  
远大二路560号大院内  
(72) 发明人 鲁耀雄 张嘉超 李超 高鹏  
崔新卫 谢坤英  
(74) 专利代理机构 深圳峰诚志合知识产权代理  
有限公司 44525  
专利代理师 张腾  
(51) Int. Cl.  
*C12N 1/20* (2006.01)  
*C12Q 1/04* (2006.01)

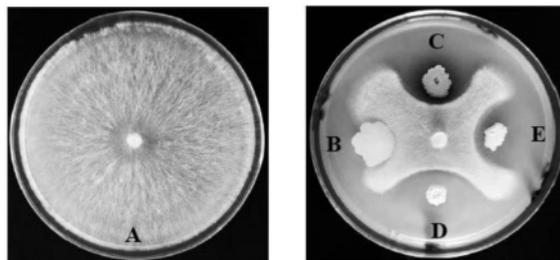
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54) 发明名称

一种贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1及其分离筛选与鉴定方法和应用

(57) 摘要

本发明属于微生物技术领域,具体涉及一种贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1及其分离筛选与鉴定方法和应用。所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为CCTCC M20221140,保藏机构地址:湖北省武汉市武昌区八一路299号。本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1对百合枯萎病主要致病菌-尖孢镰刀菌的抑菌效果较强,并对百合的土传病原真菌三线镰刀菌、茄腐镰刀菌、链格孢、齐整小核菌、疫霉菌、青霉和黑曲霉都具有较好的拮抗效果,抑制率均在75%以上,具有高效广谱抗土传病原真菌的能力;本发明方法能够有效从蚯蚓肠道中分离、纯化、筛选和鉴定贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1,本发明方法易于操作,能够快速分离蚯蚓肠道内含物,通过筛选和鉴定能够准确可靠得到所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1。



1. 一种贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1,其特征在於,所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为CCTCC M20221140,保藏机构地址:湖北省武汉市武昌区八一路299号。

2. 根据权利1所述的一种贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1,其特征在於,所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1菌落为乳白色,无光泽,表面皱褶,边缘隆起不整齐,中间凹陷。

3. 一种用于分离筛选和鉴定权利要求1所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1的方法,其特征在於,包括如下步骤:

(1) 分离:用无菌水清洗蚯蚓表面,然后用酒精对蚯蚓体表消毒并致其死亡,接着解剖取出蚯蚓肠道内含物;

(2) 纯化:将步骤(1)得到的含物加入到装有经过灭菌处理的无菌水三角瓶中,振荡后制成悬液,再用无菌水将悬液稀释成 $10^{-3}$ 梯度的稀释液、 $10^{-4}$ 梯度的稀释液和 $10^{-5}$ 梯度的稀释液;将稀释后的 $10^{-3}$ 梯度的稀释液涂布在NA培养基的平板上进行培养,将稀释后的 $10^{-4}$ 梯度的稀释液涂布到孟加拉红琼脂培养基的平板上进行培养,将稀释后的 $10^{-5}$ 梯度的稀释液涂布到改良高氏一号培养基的平板上进行培养;然后挑取三种培养基平板上长势好的单菌落进行划线纯化菌株;

(3) 筛选:将百合尖孢镰刀菌在PDA上进行活化,接着用打孔器在活化后的菌落边缘进行打孔,并取菌饼;将菌饼上长有菌丝的一面朝下转接到新PDA平板中央,然后采用交叉法点样分离纯化好的菌株进行培养并筛选出对百合病原真菌尖孢镰刀菌拮抗作用最强的拮抗菌株;

(4) 鉴定:将步骤(3)所筛选出的拮抗菌株进行形态学鉴定,然后进行分子生物学鉴定,鉴定出所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1。

4. 根据权利要求3所述方法,其特征在於,步骤(1)中所述酒精的体积分数为75%。

5. 根据权利要求3所述方法,其特征在於,步骤(2)中所述振荡时间为15-45min,所述NA培养基的成分包括:蛋白胨7.5-15g,牛肉膏2-5g,NaCl 3-6g,琼脂18-22g,去离子水1000mL;所述孟加拉红琼脂培养基成分包括:蛋白胨3-8g,葡萄糖8-12g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25-1.5g, $K_2HPO_4$  1.0g,孟加拉红0.015-0.045g,琼脂18-22g,去离子水1000mL,质量浓度为1%的链霉素溶液2-5mL;所述高氏1号培养基的成分包括: $KNO_3$  0.5-1.5g,可溶性淀粉18-22g, $K_2HPO_4$  0.25-1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25-1g,NaCl 0.25-1.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.005-0.015g,琼脂18-22g,去离子水1000mL;所述培养温度为25-45℃。

6. 根据权利要求3所述方法,其特征在於,步骤(3)中所述PDA的制备方法为:将马铃薯去皮切块并称取100-300g,加水煮沸25-45min后制成浸汁,然后加入葡萄糖18-22g,琼脂18-22g,加去离子水定容至1000mL;所述培养温度为25-45℃。

7. 根据权利要求3所述方法,其特征在於,步骤(4)中所述形态学鉴定的方法为:将拮抗菌划线到所述NA培养基固体平板上,在25-45℃条件下恒温培养箱中培养2-5天,并且记录有单菌落的菌落形态,然后采用革兰氏染色法对菌体染色,观察菌体的形态特征以及扫描电镜观察菌体形态和测量大小进行形态学鉴定;所述分子生物学鉴定的方法为:采用细菌16S rDNA基因片段的通用引物扩增,然后进行基因测序进行分子生物学鉴定。

8. 一种利用权利要求1所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1在防治百合枯萎病上的应用。

## 一种贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1及其分离筛选与鉴定方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及一种贝莱斯芽孢杆菌 YFB3-1及其分离筛选与鉴定方法和应用。

### 背景技术

[0002] 百合枯萎病又称根腐病、茎腐病,是百合生产栽培中最为严重、造成经济损失最大的一种真菌性病害,具有危害大、分布广、防治难 等特点,严重影响了百合的产量和品质,阻碍了百合产业的发展。镰 刀菌引起的百合枯萎病是其栽培过程中最为普遍和严重的。在百合栽培过程中的任何温度和湿度条件下,镰刀菌都能够有效存活或者进行 生长繁殖,因此,百合在整个生长周期均可能被染病。连作百合的枯萎病具有发生广泛、发病严重、防治困难等特点,造成产量和品质急剧下降,已成为百合种植及其相关产业发展的主要限制因素,因此,防治百合枯萎病已经成为其种植过程中面临的主要难题。

[0003] 蚯蚓是土壤动物中生物量最大的物种,对土壤生态系统的物质循环和能量转换起着重要的作用,对维持土壤生态系统的结构和功能起着重要的调控作用,蚯蚓是土壤改良的“工程师”,与微生物具有互 作关系,通过其肠道将随食物进入体内的部分微生物被杀死,与蚯蚓 存在互利共生的微生物会成为优势菌群,在蚯蚓肠道内迅速扩繁,并且通过其挖掘和排泄有利于在土壤中进一步繁殖和传播,改变了土壤 微生物群落结构和组成。蚯蚓肠道中分离出的菌群与土壤和新鲜的蚯蚓粪的菌群存在显著差异,主要有四个生理类群,即植物生长促进剂、游离活氮固化剂、杀菌剂和磷酸盐溶解剂。

[0004] 蚯蚓可以通过直接或间接作用影响了微生物组成、丰富度和活性,进而有效调节土壤的微生物生态系统,促进土壤养分循环,提高土壤生物 肥力,并且减少作物枯萎病的发生。

[0005] 因此,利用蚯蚓调控土壤微生态环境成为了缓解作物连作障碍的 新途径。其肠道内是否具有高效拮抗百合尖孢镰刀菌的微生物以及其 作用和运用方向成为目前研究的主要发展方向。

### 发明内容

[0006] 针对上述缺点,本发明提供了一种贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1及其 分离筛选与鉴定方法和应用。本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1对百合 枯萎病主要致病菌-尖孢镰刀菌的抑菌效果较强,并对百合的土传病原真菌三线镰刀菌、茄腐镰刀菌、链格孢、齐整小核菌、疫霉菌、青 霉和黑曲霉都具有较好的拮抗效果,抑制率均在75%以上,具有高效 广谱抗土传病原真菌的能力;本发明方法能够有效从蚯蚓肠道中分离、纯化、筛选和鉴定贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1,本发明方法易于操作,能够快速分离蚯蚓肠道内含物,通过筛选和鉴定能够准确可靠得到所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1。

[0007] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0008] 一种贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1,其特征在于,所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为CCTCC M 20221140,保藏机构地址:湖北省武汉市武昌区

八一路299号,保藏日期:2022年7月21日,分类名称:*Bacillus velezensis* YFB3-1。

[0009] 优选的,所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1菌落为乳白色,无光泽,表面皱褶,边缘隆起不整齐,中间凹陷。

[0010] 本发明还要求保护一种用于分离筛选和鉴定上述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1的方法,包括如下步骤:

[0011] (1)分离:用无菌水清洗蚯蚓表面,然后用酒精对蚯蚓体表消毒并致其死亡,接着解剖取出蚯蚓肠道内含物;

[0012] (2)纯化:将步骤(1)得到的含物加入到装有经过灭菌处理的无菌水三角瓶中,振荡后制成悬液,再用无菌水将悬液稀释成 $10^{-3}$ 梯度的稀释液、 $10^{-4}$ 梯度的稀释液和 $10^{-5}$ 梯度的稀释液;将稀释后的 $10^{-3}$ 梯度的稀释液涂布在NA培养基的平板上进行培养,将稀释后的 $10^{-4}$ 梯度的稀释液涂布到孟加拉红琼脂培养基的平板上进行培养,将稀释后的 $10^{-5}$ 梯度的稀释液涂布到改良高氏一号培养基的平板上进行培养;然后挑取三种培养基平板上长势好的单菌落进行划线纯化菌株;

[0013] (3)筛选:将百合尖孢镰刀菌在PDA上进行活化,接着用打孔器在活化后的菌落边缘进行打孔,并取菌饼;将菌饼上长有菌丝的一面朝下转接到新PDA平板中央,然后采用十字交叉法点样分离纯化好的菌株进行培养并筛选出对百合病原真菌尖孢镰刀菌拮抗作用最强的拮抗菌株;

[0014] (4)鉴定:将步骤(3)所筛选出的拮抗菌株进行形态学鉴定,然后进行分子生物学鉴定,鉴定出所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1。

[0015] 优选的,步骤(1)中所述酒精的体积分数为75%。

[0016] 优选的,步骤(2)中所述振荡时间为15-45min,所述NA培养基的成分包括:蛋白胨7.5-15g,牛肉膏2-5g,NaCl 3-6g,琼脂18-22g,去离子水1000mL;所述孟加拉红琼脂培养基成分包括:蛋白胨3-8g,葡萄糖8-12g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25-1.5g, $K_2HPO_4$  1.0g,孟加拉红0.015-0.045g,琼脂18-22g,去离子水1000mL,质量浓度为1%的链霉素溶液2-5mL;所述高氏1号培养基的成分包括: $KNO_3$  0.5-1.5g,可溶性淀粉18-22g, $K_2HPO_4$  0.25-1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.25-1g,NaCl 0.25-1.5g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.005-0.015g,琼脂18-22g,去离子水1000mL;所述培养温度为25-45℃。

[0017] 优选的,步骤(3)中所述PDA的制备方法为:将马铃薯去皮切块并称取100-300g,加水煮沸25-45min后制成浸汁,然后加入葡萄糖18-22g,琼脂18-22g,加去离子水定容至1000mL;所述培养温度为25-45℃。

[0018] 优选的,步骤(4)中所述形态学鉴定的方法为:将拮抗菌划线到所述NA培养基固体平板上,在25-45℃条件下恒温培养箱中培养2-5天,并且记录有单菌落的菌落形态,然后采用革兰氏染色法对菌体染色,观察菌体的形态特征以及扫描电镜观察菌体形态和测量大小进行形态学鉴定;所述分子生物学鉴定的方法为:采用细菌16S rDNA基因片段的通用引物扩增,然后进行基因测序进行分子生物学鉴定。

[0019] 本发明还要求保护一种利用上述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1在防治百合枯萎病上的应用。

[0020] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0021] (1)本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1对百合枯萎病主要致病菌-尖孢镰刀菌的抑菌

效果较强,并对百合的土传病原真菌三线镰刀菌、茄腐镰刀菌、链格孢、齐整小核菌、疫霉菌、青霉和黑曲霉都具有较好的拮抗效果,抑制率均在75%以上,具有高效广谱抗土传病原真菌的能力。

[0022] (2) 本发明方法能够有效从蚯蚓肠道中分离、纯化、筛选和鉴定贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1,本发明方法易于操作,能够快速分离蚯蚓肠道内含物,通过筛选和鉴定能够准确可靠得到所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1。

[0023] (3) 本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1对百合尖孢镰刀菌枯萎病具有较好的预防和治疗效果,在对缓解作物连作障碍有很大的应用价值。

## 附图说明

[0024] 图1为蚯蚓肠道微生物对尖孢镰刀菌的拮抗效果图;

[0025] 图2为本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1菌落形态图;

[0026] 图3为本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1菌膜形态图;

[0027] 图4为本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1光学显微镜图;

[0028] 图5为本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1扫描电镜图;

[0029] 图6为本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1的16S rDNA基因序列的系统发育树;

[0030] 图7为本发明贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1百合部分病原真菌的抑菌效果图。

## 具体实施方式

[0031] 以下将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述地实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0032] 如无特殊说明外,本发明中的化学试剂和材料均通过市场途径购买或通过市场途径购买的原料合成。

[0033] 所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为CCTCC M 20221140,保藏日期:2022年7月21日,分类名称: *Bacillus velezensis* YFB3-1,保藏机构地址:湖北省武汉市武昌区八一路299号。

[0034] 百合品种为卷丹百合,由湖南龙山绿叶农产品有限公司提供。蚯蚓品种为赤子爱胜蚓大平2号,收集于中国科学院亚热带农业生态研究所长沙市农业与环境监测研究站开展接种蚯蚓缓解百合连作障碍试验的土壤。

[0035] 供试病原菌:尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、三线镰刀菌(*F. trilobium*)和链格孢(*A. alternata*)来源于湖南农业大学植保学院,齐整小核菌(*S. rolfssii*)、疫霉菌(*Phytophthora parasitica*)、茄病镰刀菌(*F. solani*)、青霉(*Penicillium cyclopium*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)来源于湖南省农业环境生态研究所,其中以上的病原真菌均从染病百合植株或种球上分离获得。

[0036] 市售芽孢杆菌复合制剂为北京臻裕疆某农业科技有限公司生产粉剂,含有枯草芽孢杆菌、侧芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和胶质芽孢杆菌,有效活菌总数 $\geq 2 \times 10^8$ CFU/g。

[0037] NA固体培养基的成分如下:蛋白胨10.0g,牛肉膏3.0g,NaCl 5.0g,琼脂20.0g,去

离子水1000mL,pH自然,121℃灭菌30min。

[0038] 孟加拉红琼脂培养基的成分如下:蛋白胨5.0g,葡萄糖10.0g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g,  $K_2HPO_4$  1.0g,孟加拉红0.033g,琼脂20.0g,去离子水1000mL,质量浓度1%的链霉素溶液3mL;

[0039] 高氏1号培养基的成分如下: $KNO_3$  1.0g,可溶性淀粉20.0g,  $K_2HPO_4$  0.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g,NaCl 0.5g,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.01g,琼脂20.0g,去离子水1000mL;

[0040] PDA的制备方法如下:将马铃薯去皮切块并称取200.0g,加800mL 去离子水煮沸30min后制成浸汁,然后进行过滤得到滤液,在滤液中 加入葡萄糖20.0g和琼脂20.0g,最后加去离子水定容至1000mL。

[0041] 实施例1

[0042] 一种上述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1的分离筛选和鉴定方法,包括 如下步骤:

[0043] (1) 分离:首先无菌水清洗蚯蚓表面,再用75%的酒精对蚯蚓 体表消毒并致其死亡,然后解剖取出蚯蚓肠道内含物;

[0044] (2) 纯化:将步骤(1)得到的含物加入到装有经过灭菌处理的 无菌水三角瓶中,振荡30min后制成悬液,再用无菌水将悬液稀释成  $10^{-3}$ 梯度的稀释液、 $10^{-4}$ 梯度的稀释液和 $10^{-5}$ 梯度的稀释液;将稀释后 的 $10^{-3}$ 梯度的稀释液涂布在NA培养基的平板上进行培养,将稀释后的  $10^{-4}$ 梯度的稀释液涂布到孟加拉红琼脂培养基的平板上进行培养,将 稀释后的 $10^{-5}$ 梯度的稀释液涂布到改良高氏一号培养基的平板上进行 培养;置于30℃培养,待菌落长到一定程度出后,然后挑取三种培养 基平板上长势好的单菌落进行划线纯化菌株(菌落形态相同的归纳为 一株),保存备用。

[0045] (3) 筛选:将百合尖孢镰刀菌在PDA上进行活化,接着用直径 为0.6cm的打孔器在活化后的菌落边缘进行打孔,并取菌饼;将菌饼 上长有菌丝的一面朝下转接到新PDA平板中央,然后采用十字交叉法 在距离平板正中央2.5cm处点样分离纯化好的菌株,以不接种 作为对 照。置于30℃培养,待对照的病菌长满整个平板为止,测量各病原菌 直径、抑菌带 宽等指标,计算抑制率,根据抑制率大小筛选出对百合 病原真菌尖孢镰刀菌拮抗作用最强的拮抗菌株。按照以下公式计算抑 制率:

[0046] 抑制率 =  $[(\text{对照病原菌半径} - 0.3) - (\text{处理病原菌半径} - 0.3)] / (\text{对照病原菌 半径} - 0.3) \times 100\%$ 。

[0047] (4) 鉴定:将步骤(3)所筛选出的拮抗菌株进行形态学鉴定, 然后进行分子生物学 鉴定,鉴定出所述贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1。

[0048] 形态学鉴定:将优选的蚯蚓肠道拮抗菌划线到NA培养基固体平 板上,在30℃条件 下恒温培养箱中培养3天,记录有单菌落的菌落形 态,采用革兰氏染色法对菌体染色,观察 菌体的形态特征,扫描电镜 观察菌体形态和测量大小。

[0049] 分子生物学鉴定:将待测菌株接种到灭菌好的NB培养基中30℃ 培养48h后,取发 酵菌液10000r/min离心10min,收集沉淀,用无菌生 理盐水混匀再次离心,收集菌体沉淀, 置于在-80℃下迅速冷冻后, 利用冰袋快递到送至长沙奥基生物科技有限公司,采用细菌 16S rDNA基因片段的通用引物(27F和1492R)扩增,进行基因测序。

[0050] 从接种蚯蚓缓解连作百合试验的蚯蚓肠道中分离纯化得到146株 菌株(包括细 菌、真菌和放线菌)。利用平板对峙法并以尖孢镰刀菌 为靶标,对分离纯化好的菌株进行抑

菌试验初筛,一共筛选到对尖孢镰刀菌具有明显抑菌效果的菌株33株(其中细菌18株、真菌3株、放线菌12株),对百合尖孢镰刀的抑制率超过76%的菌株有11株,如表1所示:

[0051] 表1蚯蚓肠道微生物对尖孢镰刀菌的拮抗效果

类型	菌株编号	尖孢镰刀菌半径 (cm)	抑菌带宽 (cm)	抑菌 (%)
细菌	YFB1-1	1.23±0.02bc	0.46±0.01e	76.73±0.39de
	YFB1-4	1.16±0.01d	0.56±0.01d	78.50±0.14c
	YFB2-1	1.21±0.02c	0.54±0.01d	77.20±0.42d
	YFB3-1	1.10±0.00f	0.64±0.01a	80.03±0.11a
	YFB4-1	1.22±0.02c	0.56±0.01d	77.03±0.46d
	YFB5-3	1.25±0.01ab	0.63±0.02ab	76.38±0.25ef
	YFB6-2	1.13±0.01e	0.62±0.01bc	79.28±0.25b
	YFB6-6	1.26±0.01a	0.39±0.02g	76.01±0.19f
	YFS1-1	1.26±0.01a	0.42±0.02f	76.08±0.32f
	放线菌	YFS2-2	1.23±0.01bc	0.61±0.00c
YFS3-1		1.22±0.01c	0.47±0.01e	77.13±0.32d

[0053] 注:数据为四次重复的平均值。小写字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )

[0054] 由表1可知,细菌菌株YFB3-1对尖孢镰刀的抑菌效果最好,其抑制率显著大于其他菌株,为80.03%。图1为蚯蚓肠道微生物对尖孢镰刀菌的拮抗效果图,图中A为阴性对照,B为阳性对照(枯草芽孢杆菌),C为YFB1-4,D为YFB3-1,E为YFB6-2。

[0055] 对拮抗细菌YFB3-1进行形态学鉴定,拮抗细菌YFB3-1在NA培养基上,如图2所示,在28℃的培养条件下生长3d形成的纯培养物具有如下特征:菌落为乳白色,无光泽,表面皱褶,边缘隆起不整齐,中间凹陷;如图3所示,液体静止培养时形成乳白色菌膜;如图4所示,经革兰氏染色后,显微镜下观察发现YFB3-1菌体呈蓝紫色,为革兰氏阳性细菌,大部分为椭圆形,小部分为杆状,直或略弯,单个或短链状排列;如图5所示,芽孢呈椭圆形,芽孢中生,长度1.4~1.8 $\mu\text{m}$ ,宽0.7 $\mu\text{m}$ 。根据菌落、菌体的形态特征,初步确定YFB3-1属于为芽孢杆菌类。

[0056] 对拮抗细菌YFB3-1进行分子生物学鉴定,以待测菌株YFB3-1的基因组DNA为模板,利用细菌通用引物27F/1492R,对YFB3-1进行PCR扩增,得到1条长度1417bp的DNA片段。将菌株YFB3-1的16S rDNA基因序列输入到NCBI数据库中进行Blast相似性比对分析,以16S rDNA基因序列同源性为基础,从结果中选取12株具有代表性的菌株,采用MEGA 7.0软件构建该菌株的系统发育树,如图6所示,菌株YFB3-1的遗传进化距离与芽孢杆菌属最近,与已知菌株 *B.velezensis* Wh-1 (MK522153.1S) 处于一个最小的分支,同源性达到99%,可以确定菌株YFB3-1为贝莱斯芽孢杆菌。

[0057] 对贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1进行抗菌谱测定,取试验所需的百合不同病原真菌在PDA培养基上进行活化。将不产和产生孢子较差的病原真菌,如尖孢镰刀菌、茄腐镰刀菌、疫霉菌、三线镰刀菌、齐整小核菌、链格孢,用直径为0.6cm的打孔器在病菌边缘进行打孔取菌饼,将菌饼上长有菌丝的一面朝下转接到新的PDA平板中央。而产孢子较好的百合病原真菌如黑曲霉和青霉,采用点样法接种到PDA平板中央。

[0058] 抑菌试验方法和利用菌饼转接法的抑制率计算公式如下:采用十字交叉法在距离平板正中央2.5cm处点样分离纯化好的菌株,以不接种作为对照。置于30℃培养,待对照的病菌长满整个平板为止,测量各病原菌直径、抑菌带宽等指标,计算抑制率。抑制率计算

公式如下：

[0059] 抑制率 =  $[(\text{对照病原菌半径} - 0.3) - (\text{处理病原菌半径} - 0.3)] / (\text{对照病原菌半径} - 0.3) \times 100\%$ 。

[0060] 利用病孢子点样法的抑制率计算公式如下：

[0061] 抑制率 =  $(\text{对照病原菌半径} - \text{处理病原菌半径}) / \text{对照病原菌半径} \times 100\%$ 。

[0062] 结果如表2所示：

[0063] 表2 YFB3-1的抑菌谱结果

	病原真菌	病原菌落半径 (cm)	抑菌带宽 (cm)	抑制率 (%)
	<i>Fusarium oxysporum</i>	1.12±0.01b	0.65±0.01e	79.45±0.15f
	<i>Fusarium solani</i>	1.07±0.01c	0.77±0.01b	80.85±0.15e
	<i>Fusarium trilobium</i>	1.04±0.01d	0.73±0.01d	81.39±0.19d
[0064]	<i>Alternaria alternata</i>	0.98±0.01g	0.79±0.01a	83.01±0.17a
	<i>Sclerotium rolfsii</i>	1.28±0.01a	0.56±0.02f	75.59±0.23e
	<i>Phytophthora parasitica</i>	1.02±0.01e	0.75±0.01c	82.04±0.18c
	<i>Penicillium cyclopium</i>	1.00±0.01f	0.79±0.01a	82.40±0.16b
	<i>Aspergillus niger</i>	1.03±0.00e	0.78±0.01ab	81.83±0.12c

[0065] 注：数据为四次重复的平均值。小写字母表示不同处理间差异显著 ( $P < 0.05$ )

[0066] 由表2可知，贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1对百合尖孢镰刀菌、三线镰刀菌、茄腐镰刀菌、链格孢、齐整小核菌、疫霉菌、青霉和黑曲霉八种病原真菌都具有较好的抑菌效果，抑菌效果图如图7所示，图中A为尖孢镰刀菌；B为茄腐镰刀菌；C为三线镰刀菌；D为链格孢；E为齐整小核菌；F为黑曲霉。

[0067] 采用盆栽防治试验，选择圆形花盆（上内直径0.25m×下内直径0.16m×内高0.16m），每个花盆栽种3株百合种球，第一年9月25日左右栽种后放置在网室进行过冬出苗管理，第二年4月3日左右等百合出苗，将出苗高度为0.15m的百合花盆转移到具有一定光照室内备用。

[0068] 预防试验：先将贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1经灭菌好的NB培养基发酵后稀释为菌体浓度为 $10^7$ CFU/mL的菌液，以无菌水为阴性对照，以商品芽孢杆菌溶于无菌水制成菌体浓度为 $10^7$ CFU/mL的菌液为阳性对照，每株百合用50mL菌液或无菌水灌根3d后，在距离每株百合3cm处接种百合病原真菌尖孢镰刀菌的直径1cm的菌饼1个，每处理栽培5盆，每盆种植有3株百合种球，重复3次，一共45盆。室内温度控制在28℃，相对湿度保持在90%左右，灌根20d后观察百合发病情况。

[0069] 治疗试验：先在距离每株百合3cm处接种百合病原真菌-尖孢镰刀菌的1个直径1cm的菌饼7d后，再以贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1的配制菌液为处理，以无菌水为阴性对照，以市售芽孢杆菌复合制剂的菌液为阳性对照，每株百合用50mL菌液或无菌水灌根，每处理栽培5盆，每盆种植有3株百合种球，重复3次，一共45盆。室内温度控制在28℃，相对湿度保持在90%左右，灌根20d后观察百合发病情况。以株为单位进行调查，根据百合枯萎病发病程度进行相关的分级调查，统计好总株数、各级病株数。调查分级标准如下：0级为植株茎秆正常，全株无病叶；1级为病株底部变黄或变紫叶片数不超过整株叶片数的25%，茎顶端变浅紫色，心叶向一侧轻度弯曲；2级为病株底部叶片枯萎或枯萎叶片数占整株的25%~50%，茎上部变紫色且明显弯曲；3级为病株枯萎的叶片超过50%，茎中上部变紫色，且严重弯曲；4级为全株的叶片都枯萎或整株枯死，茎基部维管束变褐。其中：

[0070] 发病率 = 发病株数 / 总株数 × 100%

[0071] 病情指数 =  $\Sigma$  (各级病株数 × 相对级数值) / (总株数 × 最高级数值) × 100

[0072] 相对防治效果 = (对照的病情指数 - 处理的病情指数) / 对照的病情指数 × 100%

[0073] 结果如表3所示:

[0074] 表3贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1对百合枯萎病的防治效果

处理	预防作用			治疗作用		
	发病率 (%)	病情指数	相对防治效果 (%)	发病率 (%)	病情指数	相对防治效果 (%)
[0075] 无菌水	82.22 ± 3.85a	37.22 ± 0.96a	-	80.00 ± 6.67a	36.67 ± 1.67a	-
市售芽孢杆菌复合制剂	51.11 ± 10.18b	19.44 ± 2.55b	47.76	71.11 ± 10.18b	28.33 ± 4.41b	22.73
贝莱斯芽孢杆菌 YFB3-1	35.56 ± 3.85c	13.33 ± 1.67c	64.18	62.22 ± 7.70c	25.56 ± 3.47b	30.3

[0076] 由表3可知,在预防条件下,灌根贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1菌液,其尖孢镰刀菌引起的百合枯萎病发病率和病情指数最低,分别为 35.56%和13.33,都显著低于无菌水和商用生防菌剂对照,其相对于 无菌水的防治效果为64.18%,比市售芽孢杆菌复合制剂的防效提高了34.38%。在治疗条件下,灌根贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1菌液,其尖孢镰刀菌引起的百合枯萎病发病率和病情指数最低,分别为62.22% 和25.56,都显著低于清水对照,其相对于清水的防治效果为30.3%,比市售芽孢杆菌复合制剂的防效提高了33.3%。因此,贝莱斯芽孢杆菌YFB3-1在灌根条件下对百合尖孢镰刀菌枯萎病具有较好的预防和 治疗效果。

[0077] 以上内容是结合具体实施实例对本发明所做的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明,对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

[0078] 本领域的技术人员容易理解,以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

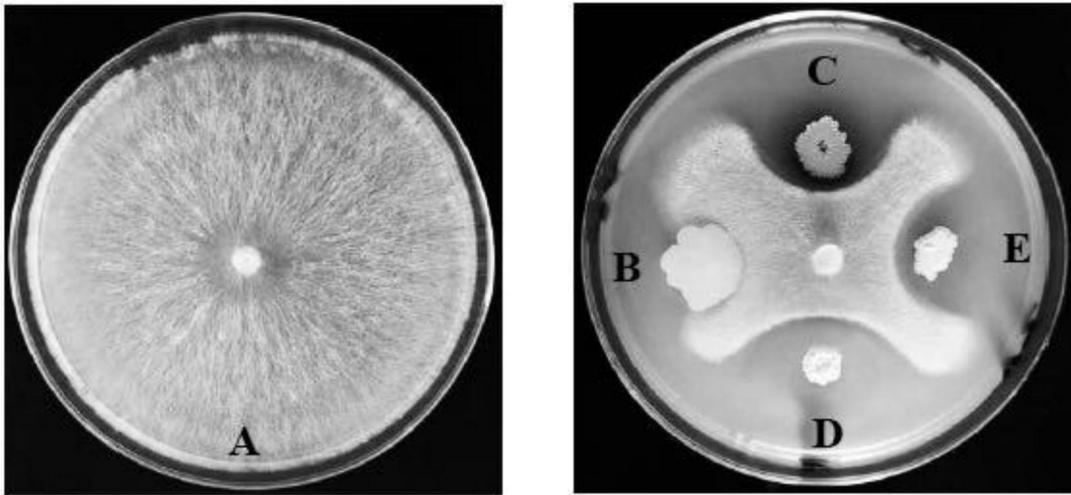


图1



图2

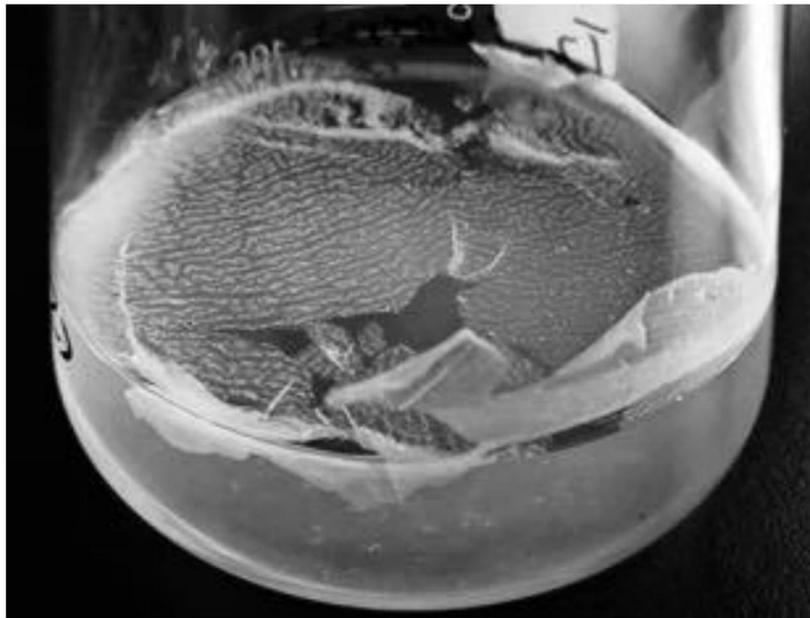


图3

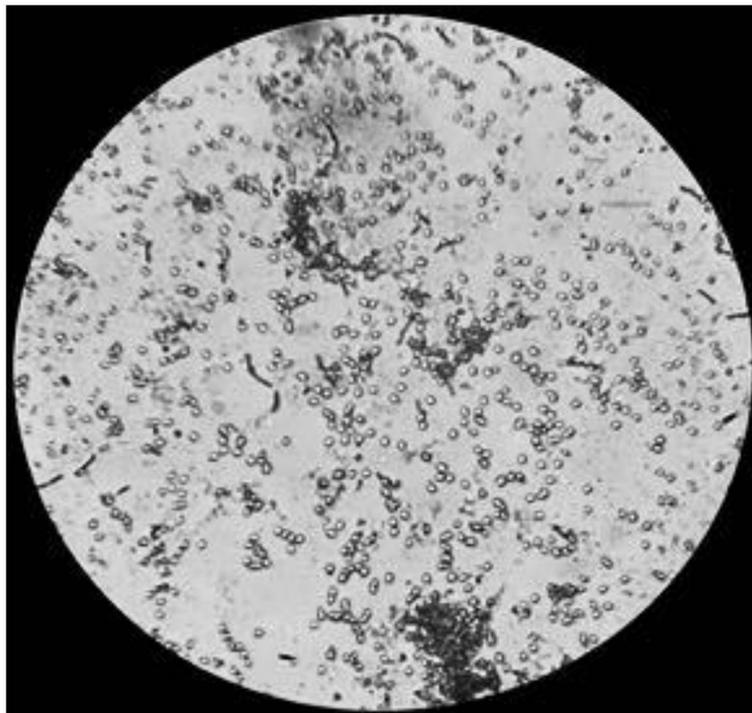


图4

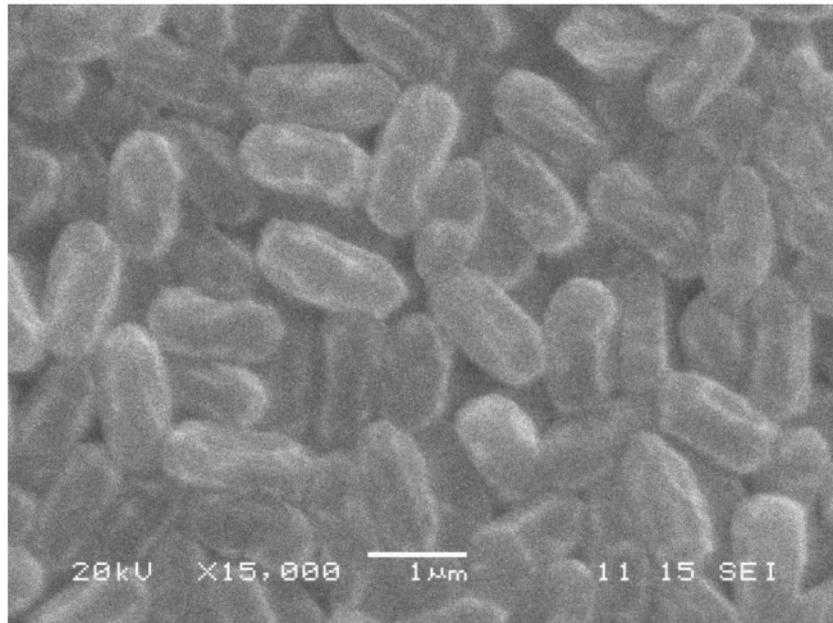


图5

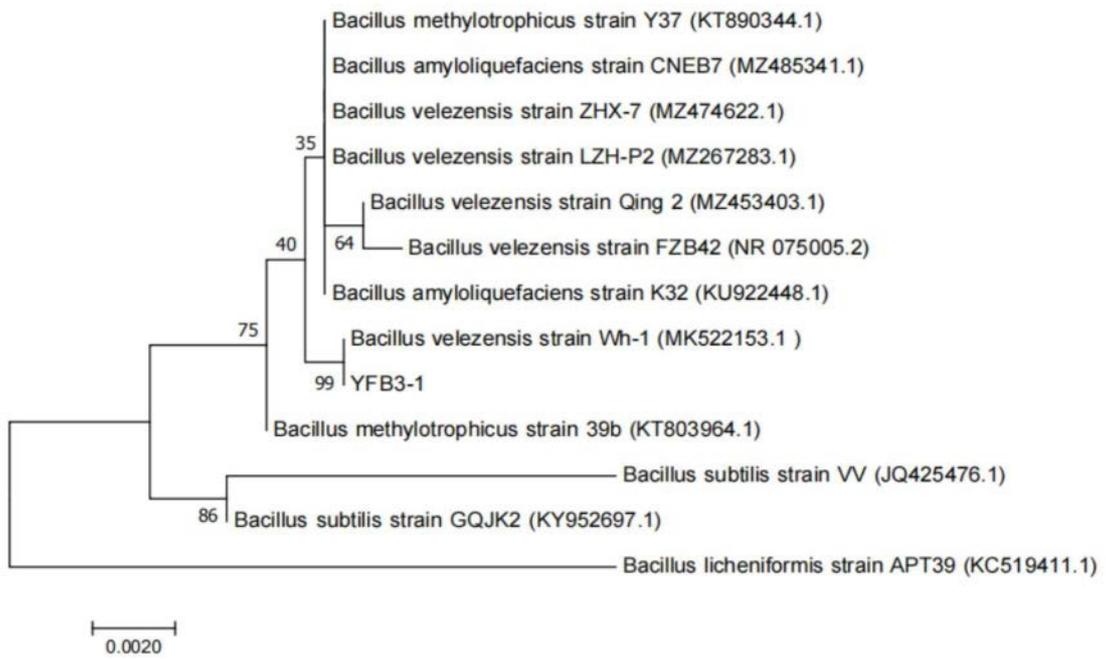


图6

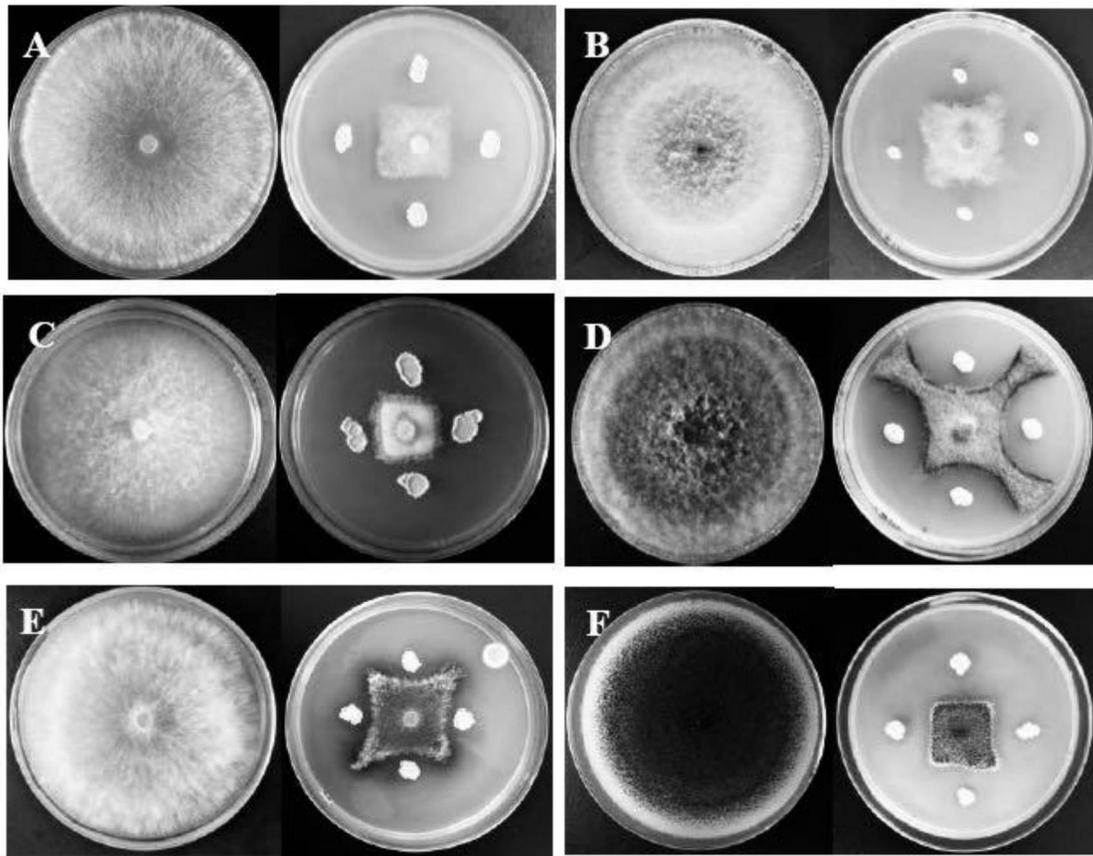


图7