



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104403960 A

(43) 申请公布日 2015.03.11

(21) 申请号 201410593447.4

(22) 申请日 2014.10.29

(83) 生物保藏信息

CGMCC No9283 2014.06.09

(71) 申请人 中国科学院西双版纳热带植物园

地址 666303 云南省西双版纳傣族自治州勐
腊县勐仑镇

(72) 发明人 李扬苹 冯玉龙 景兆鹏

(74) 专利代理机构 昆明协立知识产权代理事务

所(普通合伙) 53108

代理人 谢嘉 旃习涵

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A01N 63/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种降低紫茎泽兰化感作用的生防菌株及其
使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种降低紫茎泽兰化感作用的生防菌株及其应用。所述生防菌株为节杆菌(*Athrobacter* sp.) ZS3, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏号 CGMCC NO. 9283。本发明的节杆菌 ZS3 在无机盐培养基中 5 天内能将浓度均为 100ug/mL 的泽兰二酮和羟基泽兰酮的降解 49.8% 和 56.8%。以 4mL/100g 土的比例喷施浓度为 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/mL ZS3 菌剂后, 紫茎泽兰的化感作用降低了 46.8%。这表明该菌株能够有效降解化感物质, 在防控紫茎泽兰方面具有广阔的应用前景。

1. 一种降低紫茎泽兰化感作用的生防菌株,其特征在于:该菌株的分类命名为节杆菌 *Arthrobacter* sp. ZS3,保藏号为 CGMCC No. 9283。

2. 权利要求 1 所述的生防菌株的使用方法,其特征在于:将节杆菌 ZS3 扩大发酵培养后制成浓度为 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml 的菌剂,然后以 4mL/100g 土的量喷施到土壤中。

3. 根据权利要求 2 所述的生防菌株的使用方法,其特征在于,所述的扩大发酵培养具体为:将节杆菌 ZS3 用活化培养基进行活化;将灭菌的扩大培养基定量备用;活化后的菌种分别接种至灭菌处理过的扩大培养基中扩大培养,振荡培养 1~5 天;将菌液在 4000~6000r/min 离心 10 分钟,沉淀用灭菌水稀释成 ZS3 活菌浓度总数为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ CFU/ml 的菌剂。

一种降低紫茎泽兰化感作用的生防菌株及其使用方法

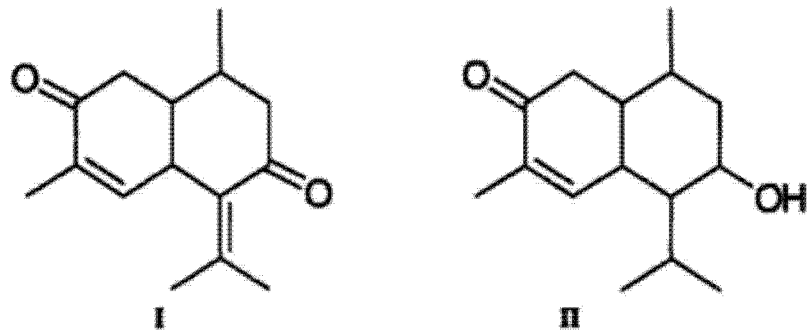
技术领域

[0001] 本发明属于植物保护技术领域，具体是涉及一种能够有效降低外来入侵植物紫茎泽兰化感作用的生防菌株。同时，本发明还涉及所述生防菌株在生物防治中的使用方法。

背景技术

[0002] 紫茎泽兰 (*Ageratina adenophorum*) 是菊科多年生的恶性外来入侵杂草，原产于中美洲的墨西哥和哥斯达黎加，目前广泛分布在世界热带、亚热带 30 多个国家和地区。紫茎泽兰入侵对当地生态环境造成了严重的影响，主要表现在排挤本地其他植物的生长，形成单优种群，破坏生物多样性。紫茎泽兰入侵农田、林地、牧场后，与农作物、牧草和林木争夺肥、水、阳光和空间，对农作物和经济植物、草地维护、森林更新有显著的影响。研究发现紫茎泽兰的茎、叶提取液和根分泌物均含有化感物质，能显著抑制当地植物的萌发和生长。杨国庆等 (2006) 使用色谱分离和生测跟踪相结合的方法，分离和筛选出紫茎泽兰淋溶途径的 2 种主效化感物质，并采用核磁共振及气质连用技术对其进行了结构鉴定：

[0003]



[0004] 分别命名为 I :4,7-二甲基-1-(丙烷-2-亚甲基)-1,4,4a,8a-四氢萘-2,6(1H,7H)-二酮(泽兰二酮,DTD)和 II :6-羟基-5-异丙基-3,8-二甲基-4a,5,6,7,8.,8a-六氢萘-2(1H)-酮(羟基基泽兰酮,HHO)。

[0005] 长期以来，对紫茎泽兰的防治多从农业防治和化学防治出发，防治效果不明显，而且造成了一定程度的环境污染。因此，生物防治由于其自身的优点开始受到越来越多的重视。但现有技术生物防治方面的研究相对较少，且主要是从紫茎泽兰的天敌方面开展的，如泽兰食蝇 (*Procecidochares utilis* Stone) 和泽兰尾孢菌 (*Cercospora eupatorii*) 等。如果能从降低紫茎泽兰的化感作用、削弱其竞争能力的角度出发，将为有效控制紫茎泽兰入侵提供一种新的途径，但现有技术中尚未见有成功的报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有技术的不足，提供一种能够有效降低紫茎泽兰化感作用的生防菌株。

[0007] 本发明的目的还在于提供所述的生防菌株在紫茎泽兰生物防治中的使用方法。

[0008] 本发明的目的通过下述技术方案予以实现。

[0009] A. 本发明从紫茎泽兰入侵土壤中分离了一株优势微生物 ZS3 作为试验菌株, 对其进行 16s rRNA 测序及 NCBI 比对, 鉴定结果表明该菌株的 16s rDNA 序列与节杆菌属相似性达到 99%, 其分类命名为节杆菌 (*Arthrobacter* sp). ZS3, 保藏号为 CGMCC No. 9283。

[0010] 本发明所述的节杆菌 ZS3 (*Arthrobacter* sp ZS3) 菌株的形态学特征为: 细胞呈不规则杆状, 长 1 ~ 3 μm , 宽为 0.4 ~ 1 μm 。常呈 V 形排列, 端圆。杆状断裂成小球, 直径 0.5 ~ 1 μm , 单个, 成对排列, 不规则堆状。存在球杆周期。革兰氏阳性, 不生孢, 好氧, 水解淀粉, 氧化酶阴性, 接触酶阳性。

[0011] 本发明提供了一种节杆菌制剂, 该制剂按常规方法制备, 即将节杆菌 ZS3 (*Arthrobacter* sp ZS3) 扩大发酵培养后制成菌剂。

[0012] 菌剂的制备方法优选为: 将节杆菌 ZS3 (*Arthrobacter* sp ZS3) 用活化培养基进行活化; 将灭菌的扩大培养基定量备用; 活化后的菌种分别接种至灭菌处理过的扩大培养基中扩大培养, 振荡培养 1 ~ 5 天; 将菌液在 4000 ~ 6000r/min 离心 10 分钟, 沉淀用灭菌水稀释成 ZS3 活菌浓度总数为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ CFU/ml 的菌剂。

[0013] B. 本发明还提供了所述节杆菌 ZS3 (*Arthrobacter* sp ZS3) 在紫茎泽兰生物防治中的使用方法, 其具体作法如下: 用制备好的 ZS3 生防菌剂 (浓度为 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml) 以 4mL/100g 土的量喷施到土壤中。

[0014] 与现有技术相比, 本发明具有以下突出的优点:

[0015] 实验证明, 节杆菌 ZS3 (*Arthrobacter* sp ZS3) 在无机盐培养基中 5 天内能将 DDT 和 HHO (浓度均为 10mg/L) 降解 49.8% 和 56.8%。萌发实验表明, 将 ZS3 菌株喷施生土后能降低紫茎泽兰化感作用 46.8%。该菌株能有效降解紫茎泽兰化感物质 DDT 和 HHO, 减小紫茎泽兰的化感作用, 在一定程度上削弱了其竞争力, 给与之竞争的本地植物的生长提供更多的机会, 促进干扰生境的生物多样性。由于是生物制剂, 完全没有使用除草剂所带来的一系列问题。该菌株在防治紫茎泽兰方面具有广阔的应用前景。

[0016] 保藏生物材料的说明

[0017] 本发明的菌株, 已于 2014 年 06 月 09 日, 保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC); 该中心地址: 中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号, 中国科学院微生物研究所。该菌株分类命名为节杆菌 (*Arthrobacter* sp). ZS3; 保藏号为 CGMCC No. 9283。

具体实施方式

[0018] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白, 以下通过实施例及试验数据, 对本发明作进一步详细说明。应当理解, 此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明, 并不用于限定本发明。

[0019] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。

[0020] 实施例 I、DDT 和 HHO 降解菌 ZS3 菌株的分离与鉴定

[0021] 一、降解菌 ZS3 菌株的分离

[0022] 菌株筛选步骤: 分别将 1g 紫茎泽兰根土投入含有泽兰二酮和羟基泽兰酮的 60ml 无机盐培养基, 摇床培养 1 天后, 分别取 100 μL 涂布于含两个化感物质无机盐培养平板上, 倒置于恒温培养箱, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养。待菌长出后, 用接种环在两种培养基上挑取不同形态特征的

菌落,然后在营养固体培养基上多次划线、分离、纯化。然后将筛选出的菌株转接到在含两种化感物质无机盐固体培养基上划线,分离得到对两种化感物质有良好耐受性及降解性能的菌株。通过上述方法从紫茎泽兰根土筛选到 10 株菌。为确保菌株降解性能的稳定,进一步筛选。将 10 株菌在营养培养基扩大培养 2 天,分别取 1 菌环菌液接入 40mL 含泽兰二酮和羟基泽兰酮各 400 μ L 的无机盐培养液中,摇床培养 4 天后,分别取 100 μ L 涂布于相应化感物质无机盐固体培养基上,观察是否有菌长出。选择在化感物质无机盐固体培养基上长出的菌。将驯化得到的菌接入营养培养基扩大培养 2 天,取 1mL 菌液(采用平板计数法确定数量)接入 10mL 含泽兰二酮和羟基泽兰酮各 100 μ L 的无机盐培养液中,摇床培养 5 天,取样测定其中 2 个化感物质的含量。通过这些试验,我们发现菌株 ZS3 对紫茎泽兰的化感物质有较稳定的降解作用。因此选择将菌株 ZS3 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC No. 9283。

[0023] 所用的营养培养基:葡萄糖 5g;蛋白胨 2g;酵母提取物 1g;水 1L;琼脂 15-20g;pH = 7.5。

[0024] 无机盐培养基:硝酸铵 3g;磷酸二氢钾 0.5g;磷酸氢二钾 0.5g;微量元素储备液 2mL;水 1L;琼脂 15 ~ 20g;pH = 7.5。其中微量元素储备液包含:硫酸镁 4g,硫酸铜 1g,硫酸锰 1g,硫酸铁 1g,氯化钙 1g,水 1L。灭菌后放置 40C 中保存备用。

[0025] 化感物质储备液:称取泽兰二酮和羟基泽兰酮 10mg,溶于 10mL 丙酮中,即得 1g/L(1mg/mL)的储备液。

[0026] 化感物质无机盐培养基:取一定量化感物质储备液于上述无机盐培养基中,使终浓度为 1mg/L。

[0027] 化感物质无机盐固体培养基:在已制备好的无机盐固体培养基上,涂布 100 μ L 化感物质储备液。

[0028] 二、紫茎泽兰化感物质降解菌 ZS3 的鉴定

[0029] 从以下几个方面,鉴定用上述方法分离纯化得到的降解紫茎泽兰化感物质 DDT 和 HHO 的菌株 ZS3。

[0030] 形态学鉴定:将处于对数生长期,且菌落大小稳定的降解菌 ZS3 进行单菌落形态描述,主要包括菌落的大小、颜色、透明度、湿润度、菌落表面状态(是否平坦、突起、褶皱、凹陷等)、菌落边缘状态(是否整齐、不规则、放射状等);对于处于对数生长期的降解菌株 ZS3,经涂片染色后采用光学显微镜观察菌体的形态。

[0031] 生理生化特征分析:参考《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠,蔡妙英. 2011. 常见细菌系统鉴定手册. 北京:科学出版社)和《微生物学实验》(沈萍,范秀容,李广武. 1999. 微生物学实验(第三版). 北京:高等教育出版社)测定上述 ZS3 菌株的生理生化特征。

[0032] 结果:ZS3 菌株细胞不规则杆状,长 1 ~ 3 μ m,宽为 0.4 ~ 1 μ m。常呈 V 形排列,端圆。杆状断裂成小球,直径 0.5 ~ 1 μ m,单个,成对排列,不规则堆状。存在球杆周期。革兰氏阳性,不生孢,好氧,水解淀粉,氧化酶阴性,接触酶阳性。通过 16s rDNA 测序,及 NCBI 比对,我们发现菌株 ZS3 的 16s rDNA 序列与节杆菌属相似性达到 99%。该菌株 ZS3 已于 2014 年 6 月保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏号为 CGMCC No. 9283。

[0033] 实施例 II、节杆菌 (*Arthrobacter* sp.) ZS3 降解 DDT 和 HHO 能力定量测定

[0034] 一、化感物质 DDT 和 HHO 的标准曲线制作

[0035] 用 HPLC 级甲醇配置浓度分别为 5、20、80、120、200 $\mu\text{g/mL}$ 的 DDT 和 HHO 标准溶液。每个浓度进样 3 次,结果取平均值,以峰面积对浓度作图,绘制标准曲线。

[0036] 二、ZS3 菌株降解 DDT 和 HHO 能力测定

[0037] 将菌株 ZS3 接入 40mL 营养培养基扩大培养 2 天,4000r/min 离心 5 分钟,沉淀用 1mL 无菌水悬浮,采用平板计数法测定菌悬液浓度。取 100 μL 菌液接入 10mL 各含 DDT 和 HHO 200 μg 的无机盐培养液中,摇床培养 5 天,取样测定两个化感物质的含量。

[0038] DDT 和 HHO 的萃取方法:DDT 和 HHO 在水中的溶解度很低,实验采用的浓度远远大于其溶解度,因此在溶液中是以不均匀的晶体状态分布的,其浓度的测定必须整瓶样品全部萃取。选择正己烷为萃取剂,具体步骤如下:将培养液转移到 50mL 分液漏斗,用 1/2 培养液体积的正己烷洗涤三角瓶,洗液也转移至分液漏斗中,水平振荡 5min,静置分层。将下层液(有机相)通过无水硫酸钠脱水(在一个小漏斗底部塞少许棉花,上面放约 2g 无水硫酸钠)后收集于鸡心瓶内;上层液(水相)再用 1/2 培养液体积的正己烷依前法再萃取一次,同样将下层液脱水,收集于鸡心瓶内。鸡心瓶内的液体用旋转蒸发器 40 $^{\circ}\text{C}$ 减压蒸发、浓缩至 2mL,过 -0.45 μm 的微孔滤膜,取 1mL 至色谱进样瓶。用超高效液相色谱仪测定。菌株的降解率用加有 ZS3 菌株处理中化感物质含量相对于对照处理中化感物质含量的减少百分比来表示,即 $(V_{\text{对照}} - V_{\text{ZS3}}) / V_{\text{对照}} \times 100$ 。

[0039] 结果:化感物质 DDT 和 HHO 的初始浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时,5 天后节杆菌 ZS3 对 DDT 和 HHO 的降解率分别为 49.8% 和 56.6%。

[0040] 表 1 节杆菌 ZS3 降解化感物质 DDT 和 HHO 的效果

[0041]

化感物质	实验处理	初始含量 ($\mu\text{g/mL}$)	5 天残留量 ($\mu\text{g/mL}$)	降解率 %
DDT	ZS3	100	48.4 \pm 84.3	49.8 \pm 8.6
	空白对照	100	96.5 \pm 2.7	
HHO	ZS3	100	28.9 \pm 3.6	56.6 \pm 5.5
	空白对照	100	66.6 \pm 3.2	

[0042] 实施例 III、ZS3 生防菌剂制备

[0043] 将生防菌株 ZS3,用活化培养基进行活化;将灭菌的扩大培养基定量备用;活化后的菌种分别接种至灭菌处理过的扩大培养基中扩大培养,振荡培养 1~5 天;将菌液在 4000~6000r/min 离心 10 分钟,沉淀用灭菌水稀释成 ZS3 活菌总浓度为 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ CFU/ml 的菌剂。

[0044] 菌剂制备中所使用的培养基:

[0045] 活化培养基:硝酸铵 3g;磷酸二氢钾 0.5g;磷酸氢二钾 0.5g;微量元素储备液 2ml;酵母提取物 1g;水 1L;DTD 1g;HHO 1g;pH 7.0 左右。微量元素储备液包含:硫酸镁 4g,硫酸铜 1g,硫酸锰 1g,硫酸铁 1g,氯化钙 1g,水 1L。

[0046] 扩大培养基:蛋白胨 5g,酵母提取物 1g,NaCl 2g;DTD 2g;HHO 2g;pH 7.0。

[0047] 实施例 IV、应用实验

[0048] 用制备好的 ZS3 生防菌剂(浓度为 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml)以 4mL/100g 土的量喷施到 50g 生土中,然后在土壤上播种受体植物白菜种子。同时,设置不加生防菌剂的对照处理。每个处理 8 个重复,每个重复播种 30 粒白菜种子。24h 后浇上 10% 的紫茎泽兰叶片淋溶液 20mL,以及浇上同体积的水为空白对照。5 天后,记录白菜的萌发数。化感作用以紫茎泽兰

淋溶液处理后白菜种子萌发率相对于加水对照降低的百分比来表示,即 $E = (V_{\text{水}} - V_{\text{淋溶液}}) / V_{\text{水}} \times 100$ 。

[0049] 结果表明,喷施 ZS3 菌剂后紫茎泽兰的化感作用降低了 46.8%。ZS3 菌株对化感效应的影响通过接种生防菌土壤相对于未接种土壤的减少百分比来表示,即 $(E_{\text{对照}} - E_{\text{ZS3}}) / E_{\text{对照}} \times 100$ 。

[0050] 表 2 添加和未添加节杆菌 ZS3 处理下紫茎泽兰对白菜的化感效应

[0051]

处理	化感效应(发芽率降低百分比%)
ZS3	34.7±8.2
空白对照	65.3±8.2
化感效应减少百分比(%)	46.8