



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114190404 A

(43) 申请公布日 2022.03.18

(21) 申请号 202111612846.7

C12N 1/20 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.27

C12R 1/01 (2006.01)

(71) 申请人 沈阳农业大学

地址 110161 辽宁省沈阳市沈河区东陵路  
120号

申请人 中国烟草总公司四川省公司

(72) 发明人 张崇 李斌 谢云波 江连强  
闫芳芳 徐传涛 杨洋 何佶弦  
吴元华

(74) 专利代理机构 西安铭泽知识产权代理事务  
所(普通合伙) 61223

代理人 崔瑞迎

(51) Int.Cl.

A01N 63/20 (2020.01)

A01P 3/00 (2006.01)

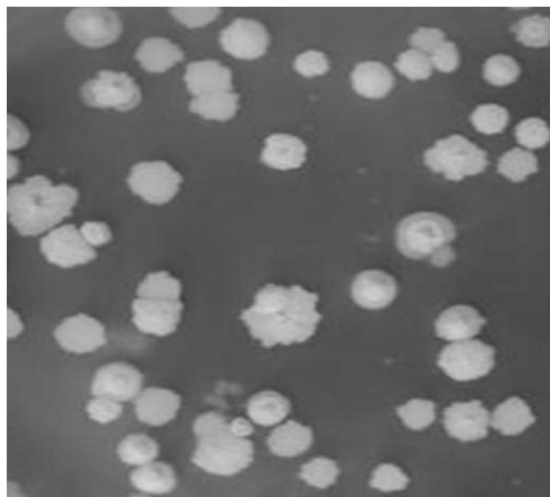
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种烟草靶斑病的生物防治方法及应用

(57) 摘要

本发明涉及烟草病害防治方法领域,具体公开了一种烟草靶斑病的生物防治方法及应用,通过将含有水菜茵海默氏菌的生防菌剂喷施于旺长期的烟草叶片上对烟草靶斑病进行防治,所述水菜茵海默氏菌保藏编号为CCTCC NO: M2015245。本发明的方法能够防治烟草靶斑病,且防效可达68.8%-86.2%。



1. 一种烟草靶斑病的生物防治方法,其特征在于,具体为:在烟草叶片上喷施生防菌剂稀释液;

所述生防菌剂的有效成分为水莱茵海默氏菌;

所述水莱茵海默氏菌保藏编号为CCTCC NO:M2015245;

所述生防菌剂稀释液中水莱茵海默氏菌的有效活菌数为 $6 \times 10^6$ - $6 \times 10^8$ cfu/mL。

2. 如权利要求1所述的烟草靶斑病的生物防治方法,其特征在于,所述的生防菌剂稀释液喷施时期为烟草九叶期至旺长期。

3. 如权利要求2所述的烟草靶斑病的生物防治方法,其特征在于,所述生防菌剂稀释液由生防菌剂用无菌水稀释0-100倍获得。

4. 如权利要求3所述的烟草靶斑病的生物防治方法,其特征在于,所述生防菌剂中莱茵海默氏菌的有效活菌数为 $6 \times 10^8$ cfu/mL。

5. 如权利要求1所述的烟草靶斑病的生物防治方法,其特征在于,所述生防菌剂的制备过程为:

S1,菌悬液制备:将水莱茵海默氏菌于LB固体培养基平板上进行划线活化培养,纯化后挑取单菌落转接至LB液体培养基中培养24h,离心获得菌体,将菌体加入到无菌生理盐水混合均匀获得 $OD_{600}$ 等于0.7的菌悬液;

S2,生防菌剂制备:将菌悬液按照体积比3mL:100mL加入到LB液体培养基中于32℃、140r/min下培养48h,获得生防菌剂。

6. 如权利要求5所述的烟草靶斑病的生物防治方法,其特征在于,S1中,水莱茵海默氏菌的培养条件为32℃、140r/min。

7. 如权利要求5所述的烟草靶斑病的生物防治方法,其特征在于,S1中,离心条件为4℃,4000r/min,离心15min。

8. 一种权利要求1所述的生防菌剂在烟草靶斑病防治中的用途。

9. 如权利要求8所述的生防菌剂在烟草靶斑病防治中的用途,其特征在于,所述烟草靶斑病是由立枯丝核菌引起的。

10. 一种权利要求1所述的水莱茵海默氏菌在烟草靶斑病防治中的用途。

## 一种烟草靶斑病的生物防治方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及烟草病害防治方法领域,具体涉及一种烟草靶斑病的生物防治方法及应用。

### 背景技术

[0002] 烟草属于茄科(Solanaceae)烟草属(Nicotiana)一年生草本植物。是重要的经济作物,种植面积广,烟草种植为大量烟农带来了收益,也促进了当地经济的发展。

[0003] 烟草靶斑病危害烟草叶片,初为小的圆形水渍状斑点,随后迅速扩大,病斑不规则,直径可达2-10cm,病斑内的组织浅褐色,常有同心轮纹,病斑的坏死部分易碎脱落形成穿孔,形似枪弹射击后留在靶子上的空洞,因此,称之为靶斑病。我国最初是2005年在辽宁省发现的烟草靶斑病,对病斑上的病菌分离鉴定为立枯丝核菌。烟草靶斑病主要危害烟草成熟期叶片,造成叶片穿孔和坏死,降低烟叶品质和等级,严重地块烟叶失去烘烤价值,甚至绝产绝收,给烟农造成严重损失。

[0004] 目前对于烟草靶斑病的防治大多是利用化学药剂喷施进行防治,主要有嘧菌酯、苯甲嘧菌酯等,对烟草靶斑病有一定的防治效果;但是长期使用化学药剂防治病害,容易使得病原菌产生抗药性,同时长期使用也对环境产生危害,因此,寻找新的生物防治方法是迫在眉睫的。

### 发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种烟草靶斑病的生物防治方法及应用,通过在烟草叶片上喷施生防菌剂稀释液,能够防治烟草靶斑病,且防效高达68.8%-86.2%。

[0006] 本发明的第一个目的是提供一种烟草靶斑病的生物防治方法,具体为:在烟草叶片上喷施生防菌剂稀释液;

[0007] 所述生防菌剂的有效成分为水菜茵海默氏菌;

[0008] 所述水菜茵海默氏菌保藏编号为CCTCC NO:M2015245;

[0009] 所述生防菌剂稀释液中水菜茵海默氏菌的有效活菌数为 $6 \times 10^6$ - $6 \times 10^8$ cfu/mL。

[0010] 进一步地,所述的生防菌剂稀释液喷施时期为烟草九叶期至旺长期。

[0011] 进一步地,所述生防菌剂稀释液由生防菌剂用无菌水稀释0-100倍获得。

[0012] 进一步地,所述生防菌剂中水菜茵海默氏菌的有效活菌数为 $6 \times 10^8$ cfu/mL。

[0013] 进一步地,所述生防菌剂的制备过程为:

[0014] S1,菌悬液制备:将水菜茵海默氏菌于LB固体培养基平板上进行划线活化培养,纯化后挑取单菌落转接至LB液体培养基中培养24h,离心获得菌体,将菌体加入到无菌生理盐水混合均匀获得 $OD_{600}$ 等于0.7的菌悬液;

[0015] S2,生防菌剂制备:将菌悬液按照体积比3mL:100mL加入到LB液体培养基中于32℃、140r/min下培养48h,获得生防菌剂。

[0016] 进一步地,S1中,水菜茵海默氏菌的培养条件为32℃、140r/min。

- [0017] 进一步地, S1中, 离心条件为4℃, 4000r/min, 离心15min。
- [0018] 本发明的第二个目的是提供了所述生防菌剂在烟草靶斑病防治中的用途。
- [0019] 进一步地, 所述烟草靶斑病是由立枯丝核菌引起的。
- [0020] 本发明的第三个目的是提供了所述的水莱茵海默氏菌在烟草靶斑病防治中的用途。
- [0021] 与现有技术相比, 本发明的有益效果在于:
- [0022] 1、本发明通过在烟草叶片喷施防菌剂稀释液实现了对烟草靶斑病的有效防治, 防效可达68.8%-86.2%, 对烟草种植过程中的病害防治提供了技术思路;
- [0023] 2、本发明制备得到的生防菌剂能够抑制立枯丝核菌的生长, 抑菌效果可达到92.1%, 为防治烟草靶斑病提供了依据;
- [0024] 3、本发明制备得到的生防菌剂的活性成分为水莱茵海默氏菌(CCTCC NO: M2015245), 目前并没有发现该菌株能用于烟草靶斑病的防治中, 而本发明发现了该菌株在烟草靶斑病防治中的新用途。

## 附图说明

[0025] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案, 下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍, 显而易见地, 下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例, 对于本领域普通技术人员来讲, 在不付出创造性劳动的前提下, 还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0026] 图1为本发明实施例1中的水莱茵海默氏菌的菌落形态图。

## 具体实施方式

[0027] 下面对本发明的具体实施方式进行详细描述, 但应当理解本发明的保护范围并不受具体实施方式的限制。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的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。本发明各实施例中所述实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法, 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。

[0028] 实施例1

[0029] 本实施例提供一种烟草靶斑病的生物防治方法及应用。

[0030] 一、菌株准备

[0031] 1、供试菌株

[0032] (1) 烟草靶斑病菌(立枯丝核菌AG-3)由沈阳农业大学植物保护学院植物病毒研究室提供;

[0033] (2) 水莱茵海默氏菌, 购买于中国典型培养物保藏中心, 其保藏编号是CCTCC NO: M2015245。

[0034] LB液体培养基: 胰蛋白胨(Tryptone) 10g, 酵母提取物(Yeast extract) 5g, 氯化钠(NaCl) 10g, 去离子水1000mL。LB固体培养基: 液体培养基加琼脂(Agar) 1.5%~2%。

[0035] PDA培养基: 马铃薯200g, 葡萄糖20g, 琼脂15~20g, 蒸馏水1000mL。

[0036] 2、生防菌剂的制备

[0037] (1) 水菜茵海默氏菌活化, 鉴定

[0038] 将购买的菌株接种在LB固体培养基上进行划线活化培养, 培养条件为32℃、140r/min、24h; 活化的单菌落形态为白色菌落, 表面干燥皱缩, 边缘不规则(如图1所示)。

[0039] 转接3-4次后挑取单菌落于LB液体培养基中于32℃、140r/min下培养24h获得菌液, 然后吸取2.5mL菌液于4℃, 4000r/min的条件下离心15min, 弃上清液收集菌体, 然后在菌体中加入100μL TE Buffer混匀, 再加10μL溶菌酶于恒温水浴锅中37℃处理12h, 然后按照上海生工细菌DNA提取试剂盒步骤提取DNA。

[0040] DNA提取成功后, 以菌株DNA为模板, 用16S rRNA基因序列的通用引物对其保守区段核苷酸序列进行PCR扩增。细菌PCR反应体系为25μL的体系, 上游引物为0.5μL, 下游引物为0.5μL, 模板为1μL, ddH<sub>2</sub>O 10.5μL, PCRmix 12.5μL, 获得的PCR产物送至测序公司进行测序。

[0041] 所述的通用引物序列为:

[0042] 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

[0043] 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

[0044] 测序结果通过在NCBI中的GenBank中进行BLAST比对分析, 确定为目的菌株为水菜茵海默氏菌, 与GenBank中一株水菜茵海默氏菌的相似性达到99%, 说明采购活化过程未发生污染, 是所需要的目的菌株。

[0045] (2) 制备生防菌剂

[0046] 将水菜茵海默氏菌在LB固体培养基上进行划线活化培养, 培养条件为32℃、140r/min、24h; 转接3-4次后挑取单菌落于LB液体培养基中于32℃、140r/min下培养24h获得菌液, 然后吸取2.5mL菌液于4℃, 4000r/min的条件下离心15min, 弃上清液收集菌体, 然后将菌体中加入无菌生理盐水, 制成OD<sub>600</sub>等于0.7的菌悬液;

[0047] 将获得的菌悬液按照体积比3:100加入到新鲜的LB液体培养基中, 32℃、140r/min下培养48h, 获得生防菌剂, 其中, 莱茵海默氏菌的有效活菌数为6 x 10<sup>8</sup>cfu/mL。

[0048] 3、生防菌剂对立枯丝核菌AG-3的抑制作用

[0049] (1) 采用平板对峙培养法检测。

[0050] 在PDA固体培养基上接种立枯丝核菌AG-3, 培养48h, 用直径5mm的打孔器从菌落边缘打出菌饼, 接种在新鲜的空白PDA固体培养基平板中央位置, 在距离菌饼2.0cm处的两边分别接种2μL的生防菌剂, 以无菌水为对照, 在28℃恒温培养并观察抑菌情况, 每个处理重复三次, 待对照组PDA固体培养基平板中的立枯丝核菌AG-3菌丝长满全板时, 测量病原菌菌落的生长半径, 利用以下公式计算抑菌率。

[0051] 相对抑菌率 = (对照菌落半径 - 处理菌落半径) / 对照菌落半径 x 100%

[0052] (2) 将所述生防菌剂用无菌水稀释10倍、30倍、50倍、60倍、80倍和100倍, 分别用平板对峙培养法检测生防菌剂原液, 生防菌剂10倍液, 生防菌剂30倍液, 生防菌剂50倍液, 生防菌剂60倍液, 生防菌剂80倍液和生防菌剂100倍液对立枯丝核菌AG-3的抑制作用;

[0053] 以上实验每个组分别做三个平行, 计算平均数。

[0054] 4、防治方法对烟草靶斑病的防治效果研究

[0055] (1) 将上述获得的生防菌剂原液, 生防菌剂10倍液, 生防菌剂30倍液, 生防菌剂50倍液, 生防菌剂60倍液, 生防菌剂80倍液和生防菌剂100倍液用于喷施烟草, 检测对烟草靶

斑病的防效；

[0056] (2) 选择烟草NC89进行盆栽,待生长至9叶期时,分别将生防菌剂原液,生防菌剂60倍液,生防菌剂80倍液,生防菌剂100倍液喷施至烟草叶片上,以叶片全部湿润至滴水为宜,对照组喷施等量的无菌水,每个处理3个重复,24h后实验组烟草叶片上接种立枯丝核菌AG-3菌饼(直径5mm),每株接种第4片,第5片和第6片真叶,每片接种3个菌饼(三个菌饼均匀分布在叶片上),48小时后挑下菌饼,培养10天后测量叶片病斑的直径,从而计算病斑的面积,利用以下公式计算防效;

[0057] 防效 = (对照组病斑面积 - 实验组病斑面积) / 对照组病斑面积 × 100%

[0058] 式中实验组即喷施了生防菌剂原液,生防菌剂10倍液,生防菌剂30倍液,生防菌剂50倍液,生防菌剂60倍液,生防菌剂80倍液或生防菌剂100倍液的烟草叶片的病斑面积;

[0059] 二、实验结果

[0060] 1、生防菌剂对立枯丝核菌AG-3的抑菌效果研究

[0061] 表1本发明制备的生防菌剂对立枯丝核菌AG-3的抑菌效果

不同稀释倍数的 生防菌剂	对照菌落半径 (cm)	处理菌落半径 (cm)	相对抑菌率 (%)
原液	3.8	0.3	92.1
10 倍液	3.6	0.5	86.1
30 倍液	3.8	0.6	84.2
50 倍液	3.7	0.7	81.1
60 倍液	3.8	0.9	76.3
80 倍液	3.7	0.9	75.7
100 倍液	3.5	0.9	74.3

[0063] 由表1可知,本发明制备的生防菌剂能够抑制立枯丝核菌,且相对抑菌率达到92.1%,生防菌剂各倍数稀释液也能够有效的抑制立枯丝核菌,抑制效率在74.3% - 92.1%。说明本发明制备的生防菌剂能够用于制备抑制立枯丝核菌的试剂,且能够应用于防治由立枯丝核菌引起的烟草靶斑病中。

[0064] 2、本发明的防治方法对烟草靶斑病的防治效果研究

[0065] 表2本发明的方法对烟草靶斑病的防治效果

分组	病斑直径 (mm)	病斑面积 (mm <sup>2</sup> )	防效 (%)
对照组	8.6	58.1	—
生防菌剂原液	3.2	8.0	86.2
生防菌剂10倍液	3.8	11.3	80.6
生防菌剂30倍液	4.0	12.6	78.3
生防菌剂50倍液	4.2	13.8	76.2
生防菌剂60倍液	4.3	14.5	75

生防菌剂80倍液	4.6	16.6	71.4
生防菌剂100倍液	4.8	18.1	68.8

[0067] 由表2可知,通过将本发明制备的生防菌剂和生防菌剂10-100倍稀释液喷施于烟草叶片上,能够有效的防治烟草靶斑病,对烟草靶斑病的防效为68.8%-86.2%,对烟草种植过程中的病害防治意义重大。

[0068] 尽管已描述了本发明的优选实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0069] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

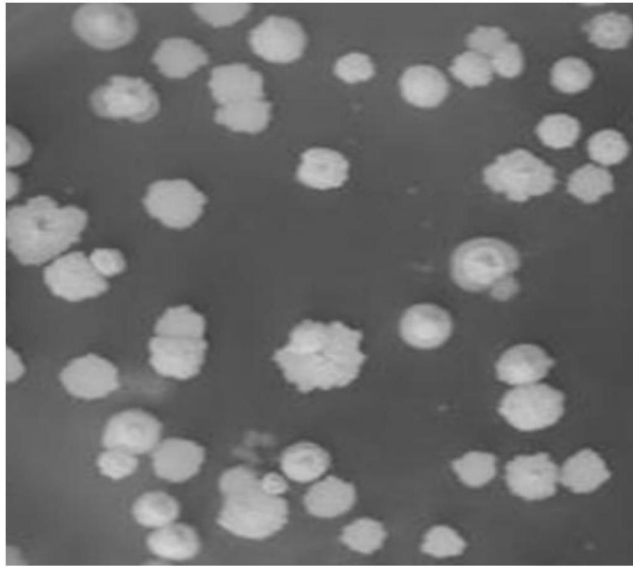


图1