



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102250810 A

(43) 申请公布日 2011.11.23

(21) 申请号 201110197669.0 *C05F 11/08*(2006.01)

(22) 申请日 2011.07.15 *C05G 3/00*(2006.01)

(83) 生物保藏信息 *C12R 1/07*(2006.01)

CGMCC No. 5036 2011.07.06

(71) 申请人 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所

地址 100081 北京市海淀区中关村南大街12号

(72) 发明人 孙建光 徐晶 高淼 胡海燕

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅 任风华

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

A01N 63/00(2006.01)

A01P 3/00(2006.01)

C12N 9/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页

序列表 2 页 附图 2 页

(54) 发明名称

拮抗赤霉病菌和菌核病菌的水稻内生固氮菌及其用途

(57) 摘要

本发明公开了拮抗赤霉病菌和菌核病菌的水稻内生固氮菌及其用途。该水稻内生固氮菌是芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GSD223, 其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏号为 CGMCC No. 5036。本发明所提供的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GSD223 CGMCC No. 5036 具有较高的固氮活性, 可以有效拮抗作物赤霉病菌 (*Gibberella zeae*) 和菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*), 在固氮微生物菌剂和生物有机肥生产中具有广阔的应用前景。

1. 芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) GDS223, 其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏编号为 CGMCC No. 5036。

2. 一种菌剂, 它的活性成分为权利要求 1 所述的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) GDS223 CGMCC No. 5036。

3. 根据权利要求 2 所述的菌剂, 其特征在于: 所述菌剂为下述 1)-4) 中任一的菌剂:

- 1) 用于抑制病原真菌的菌剂;
- 2) 用于防治植物真菌病害的菌剂;
- 3) 用于固氮的菌剂;
- 4) 产生固氮酶的菌剂。

4. 根据权利要求 1 所述的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) GDS223 CGMCC No. 5036 在制备下述 1)-4) 中任一菌剂中的应用:

- 1) 用于抑制病原真菌的菌剂;
- 2) 用于防治植物真菌病害的菌剂;
- 3) 用于固氮的菌剂;
- 4) 产生固氮酶的菌剂。

5. 根据权利要求 3 所述的菌剂或权利要求 4 所述应用, 其特征在于: 所述病原真菌为引起赤霉病的真菌、或为引起菌核病的真菌; 所述植物真菌病害为赤霉病或菌核病。

6. 根据权利要求 5 所述的菌剂或应用, 其特征在于: 所述引起赤霉病的真菌为玉米赤霉菌 (*Gibberella zeae*) 或禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*); 所述引起菌核病的真菌为核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)。

7. 权利要求 1 所述的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) GDS223 CGMCC No. 5036 或权利要求 2、3、5、或 6 所述菌剂在生产固氮酶中应用; 或

权利要求 1 所述的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) GDS223 CGMCC No. 5036 或权利要求 2、3、5、或 6 所述菌剂在制备生物有机肥中应用。

8. 含有权利要求 1 所述芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) GDS223 CGMCC No. 5036 或权利要求 2、3、5、或 6 所述菌剂的生物有机肥。

9. 培养权利要求 1 所述芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) GDS223 CGMCC No. 5036 的方法, 包括将芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) GDS223 CGMCC No. 5036 在用于培养芽孢杆菌的培养基中培养的步骤。

10. 权利要求 2、3、5 或 6 所述菌剂的制备方法, 包括如下步骤: 将权利要求 1 所述的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) GDS223 CGMCC No. 5036 作为活性成分, 得到所述菌剂。

拮抗赤霉病菌和菌核病菌的水稻内生固氮菌及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及拮抗赤霉病菌和菌核病菌的水稻内生固氮菌及其用途。

背景技术

[0002] 氮肥是农业生产中最重要的生产资料之一。生产化学氮肥消耗大量能源,占生产总成本的70%~80%。近年来能源日趋紧张,我国化肥生产用煤价格飙升导致化学氮肥价格上涨,农民难以承受,反响强烈。此外,化学氮肥在提高作物产量、保障我国粮食安全方面发挥了巨大作用,但是不合理施氮已经形成了严重的面源污染,造成一系列的严重危害,如太湖蓝藻事件令人触目惊心。城市地下水硝酸盐污染已经对饮用水安全造成了威胁。

[0003] 大气中含有78%的氮素,但其存在形式是分子态氮气,动植物不能直接利用,自然界只有某些原核微生物具有直接利用大气中氮气的能力,将其还原成氨,这就是生物固氮作用。选用高效固氮微生物菌种工厂化生产制成菌剂,或进一步与其它富含植物营养的物料复合加工成生物制品,应用于农业生产,可以提供作物氮素营养,改善作物根际生态环境,提高土壤生物肥力性状,这就是通常所说的固氮微生物菌剂或固氮微生物肥料。生物氮肥具有多种优势:①生物氮肥由可再生的生化制剂和活体微生物组成,可以再生,不存在资源枯竭问题,是可持续发展农资产品。②生物氮肥是环境友好型肥料,其生产和使用过程均不产生三废等污染性物质,而且能改善土壤理化性质,提高土壤肥力,是生态农业农资产品。③生物氮肥生产耗能少、成本低,其成本仅为等效化学氮肥的20%~40%,可以为国家节省大量的煤炭和石油等能源战略物资。④使用生物氮肥可以显著降低农业生产成本,提高农产品品质,提升土壤肥力,使农民受益,促进社会和谐发展。

[0004] 作物赤霉病的病原菌为玉米赤霉菌(*Gibberella zeae*)无性世代为禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*),是粮食作物的重要致病菌。我国小麦赤霉病有95%是麦类赤霉病菌引起的,是长江中下游冬麦区和东北春麦区的重要病害,发病时经常造成20%~30%的产量损失。此外,该菌还侵染玉米、水稻、大麦等作物,引起苗枯、茎腐、基腐、穗腐等。菌核病的病原菌是菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*),其形态特征表现为:子囊盘小,呈小杯状,浅肉色至褐色,单个或几个从菌核上生出,直径0.5-1cm,柄褐色细长,弯曲,长3-5cm,向下渐细,与菌核相连。菌丝体可以形成菌核,长柄的褐色子囊盘产生在菌核上。菌核形状多样,长3-15 μ m。子囊圆柱形,120-140 μ m \times 11 μ m,孢子通常8个,单行排列,椭圆形,8-14 μ m \times 4-8 μ m,侧丝细长,线形,无色,顶部较粗。该菌是一种危害作物和蔬菜的世界性的重要的植物病原菌,广泛地侵染、危害十字花科、豆科、茄科、芸香科等植物,如造成油菜、大豆、向日葵、黄瓜、辣椒等经济作物和蔬菜菌核病。目前对上述真菌病害的防治主要依靠化学农药,然而化学防治不仅成本高、污染环境,而且防效也不理想,同时食品的安全性也受到严重影响。

[0005] 菌种是微生物肥料生产应用的基础。目前,限制我国微生物肥料行业发展的瓶颈就是高效菌种的选育问题。农业生产迫切需求固氮效能高、拮抗病原真菌、抗逆性强、货架期长的微生物肥料生产用菌种。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一株可以在水稻体内进行高效固氮,并且拮抗作物赤霉病病原菌玉米赤霉菌 (*Gibberella zeae*) 和作物菌核病病原菌核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的细菌。

[0007] 本发明所提供的水稻内生固氮菌,是芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223,该菌株已于 2011 年 7 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称 CGMCC,地址为:北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号),保藏编号为 CGMCC No. 5036。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种菌剂,该菌剂的活性成分为所述的芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036。

[0009] 该菌剂除包含作为活性成分的芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036 外,还可包括辅料,如草炭、动物的粪便、各类作物的秸秆、松壳、稻草、花生皮等。

[0010] 该菌剂可用于抑制病原真菌、防治植物真菌病害、固氮、产生固氮酶等。

[0011] 所述芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036 在制备下述 1)-4) 中任一菌剂中的应用也属于本发明的保护范围:

[0012] 1) 用于抑制病原真菌的菌剂;

[0013] 2) 用于防治植物真菌病害的菌剂;

[0014] 3) 用于固氮的菌剂;

[0015] 4) 产生固氮酶的菌剂。

[0016] 所述病原真菌可为通过土壤、施入土壤中的肥料、和 / 或种子传播的真菌,具体可为引起赤霉病的真菌、或为引起菌核病的真菌;所述植物真菌病害可为赤霉病或菌核病。

[0017] 所述引起赤霉病的真菌可为玉米赤霉菌 (*Gibberella zeae*) 或禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*);所述引起菌核病的真菌可为核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)。

[0018] 所述的芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036 或以芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036 为活性成分的菌剂在生产固氮酶中的应用以及在制备生物有机肥中的应用也属于本发明的保护范围。

[0019] 本发明的再一个目的是提供一种含有芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036 或以芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036 为活性成分的菌剂的生物有机肥。

[0020] 本发明的又一目的是提供一种培养芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036 的方法,该方法包括将芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036 在培养芽孢杆菌培养基中培养的步骤。

[0021] 本发明的又一目的是提供一种制备所述菌剂的方法,该方法包括如下步骤:将所述的芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036 作为活性成分,得到所述菌剂。

[0022] 实验证明,本发明是从土壤样品中经过层层筛选,最终筛选出了芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*)GDS223 CGMCC No. 5036,该菌株具有很高的固氮酶活性,能够拮抗作物赤霉病病原菌玉米赤霉菌 (*Gibberella zeae*) 和菌核病病原菌核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*),竞争适应能力强,接种效果好,在固氮微生物菌剂和生物有机肥生产中具

有广阔的应用前景。

- [0023] 保藏说明
- [0024] 菌种名称:芽孢杆菌
- [0025] 拉丁名:(*Bacillus* sp.)
- [0026] 菌株编号:GDSD223
- [0027] 保藏机构:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
- [0028] 保藏机构简称:CGMCC
- [0029] 地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号
- [0030] 保藏日期:2011年7月6日
- [0031] 保藏中心登记入册编号:CGMCC No. 5036

附图说明

- [0032] 图1为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)GDSD223 CGMCC No. 5036的固氮酶活性。
- [0033] 图2为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)GDSD223 CGMCC No. 5036拮抗玉米赤霉菌(*Gibberella zeae*)。左侧菌落为玉米赤霉菌(*Gibberella zeae*),右侧菌落为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)GDSD223 CGMCC No. 5036。
- [0034] 图3为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)GDSD223 CGMCC No. 5036拮抗菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)。左侧菌落为菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*),右侧菌落为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)GDSD223 CGMCC No. 5036。

具体实施方式

- [0035] 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。
- [0036] 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。
- [0037] 多碳源低氮培养基(CCM):溶液I: KH_2PO_4 0.2g, NaCl 0.1g, K_2HPO_4 0.8g, Na_2FeEDTA 28mg, 钼酸钠 25mg, 酵母浸膏 100mg, 甘露醇 5g, 蔗糖 5g, 乳酸钠 0.5mL, 蒸馏水 900mL。溶液II: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.06g, 蒸馏水 100mL。将溶液I、II分别灭菌,冷却至50℃左右混合,加入生物素(5 μg/L)和维生素(10 μg/L)各0.5mL。
- [0038] 无氮培养基:蔗糖 10g, NaCl 0.12g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, CaCO_3 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, 蒸馏水 1000mL, pH7.2。
- [0039] 改良固氮培养基成份:蔗糖 10g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.5g、NaCl 0.2g、 CaCO_3 1g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、酵母膏 0.5g、蒸馏水 1000ml、琼脂 1.5%~2.0%, pH7.0~7.2。
- [0040] 圆褐固氮菌(*Azotobacter chroococcum*)ACCC11103(参见“孙建光等. 高效固氮芽孢杆菌筛选及其生物学特性. 中国农业科学, 2009, 42(6):2043-2051”)。
- [0041] 赤霉病菌-玉蜀黍赤霉菌(*Gibberella zeae*)(中国农业微生物菌种保藏管理中心, ACCC31053)。
- [0042] 菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)(中国农业微生物菌种保藏管理中心, ACCC30046)。
- [0043] 实施例1、水稻内生固氮菌GDSD223的分离与鉴定
- [0044] 一 水稻内生固氮菌GDSD223的分离

[0045] 水稻内生固氮菌的分离的具体操作如下：取新鲜水稻植株（采自中国黑龙江省），首先用自来水冲洗干净，然后依次用 70% 乙醇浸泡 1min，2% 次氯酸钠表面消毒灭菌 10min，无菌水冲洗 3 次。无菌操作条件下，准确称取样品 10.0g，在无菌研钵内磨成糊状，转移、定容至 100ml，继续稀释制成系列稀释样品，分别从 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液中取 0.1ml 分别均匀涂布在上述 CCM 培养基和无氮培养基平板上，28℃ 倒置培养，3 ~ 4d 后，挑取单菌落划线纯化，得到水稻内生固氮菌。同时，将表面消毒时最后一次洗涤水涂布在牛肉膏蛋白胨培养基上检测确认植株样品消毒彻底。将其中一株分离所得固氮菌命名为水稻内生固氮菌 GDSD223。

[0046] 二、水稻内生固氮菌 GDSD223 的鉴定

[0047] 从以下几个方面鉴定步骤一分离并纯化得到的水稻内生固氮菌 GDSD223：

[0048] 1、形态学鉴定

[0049] 将处于对数生长期，且菌落大小稳定，上述步骤一分离并纯化得到的固氮菌 GDSD223 进行单菌落状态描述，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）。

[0050] 对于处于对数生长期的所述固氮菌 GDSD223，经涂片染色后采用光学显微镜观察菌体的形态。

[0051] 结果表明，上述步骤一分离并纯化得到的固氮菌 GDSD223 菌落圆形平铺，乳白色，有光泽，表面光滑，边缘整齐；菌体杆状， $0.5 \times 2.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$ ，有芽孢。

[0052] 2、生理生化特征分析

[0053] 参考《常见细菌系统鉴定手册》（东秀珠，蔡妙英．常见细菌系统鉴定手册．北京：科学出版社，2011.）和《微生物学实验》（沈萍，范秀容，李广武．微生物学实验（第三版）．北京：高等教育出版社，1999.）测定上述固氮菌 GDSD223 的生理生化特征。

[0054] 所述固氮菌 GDSD223 的生理生化特征测定结果如表 1 所示：

[0055] 表 1 固氮菌 GDSD223 的生理生化特征

生理生化特征	实验结果	生理生化特征	实验结果	
接触酶反应	+	糖 醇 类 发 酵 产 酸	D+葡萄糖	+
VP 反应	-		D+蔗糖	+
吲哚实验	+		D+乳糖	-
明胶液化	+		D+半乳糖	-
淀粉水解	+		D+核糖	+
卵磷脂酶	-		L+阿拉伯糖	-
硝酸盐还原	+		D+果糖	+
甲基红	-		D+甘露醇	-
石蕊牛奶反应	+		D+山梨醇	-
柠檬酸盐利用	-		D+麦芽糖	+
苯丙氨酸脱氨酶	-	D+纤维二糖	+	
产二羟基丙酮	-	甘油 glycerol	-	
葡萄糖产气	+	2%NaCl	-	
pH5.7 生长测定	+			
0.001%溶菌酶	+			

[0057] 注：“+”表示阳性，“-”表示阴性。

[0058] 3、16s rDNA 序列同源性分析

[0059] 常规方法培养上述步骤一分离纯化得到的固氮菌 GDS223, 提取菌株的总 DNA 作为基因扩增模板, 以细菌 16s rDNA 通用引物, 27f :5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' , 1492r :5' -TACGGTTACCTTGTACGACTT-3' 进行 PCR 反应。反应体系采用上海生物工程有 限公司 PCR 扩增试剂盒。反应程序为 :95℃变性 30s、55℃退火 1min、72℃延伸 2min, 共 30 个循环。DNA 测序由北京三博远志生物技术公司完成, 序列拼接及相似性分析使用 DNASTar 软件完成, 序列比对通过美国国家生物技术信息中心 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 在线完成。

[0060] 水稻内生固氮菌 GDS223 菌株 16s rDNA 的序列详见序列表中序列 1。

[0061] 4、生长特性分析

[0062] 进行了菌株最适温度和最适 pH 生长实验。采用无氮培养基, 分别在 4℃、28℃、37℃、60℃培养、观察、记录菌株的温度适应性, 每个处理 3 次重复。调整酸度分别为 pH3、pH4、pH5、pH6、pH7、pH8、pH9、pH10、pH11, 每个处理 3 次重复, 培养、观察、记录菌株生长的最适 pH。

[0063] 结果表明, 所述水稻内生固氮菌 GDS223 的最适生长温度为 28℃, 最适生长 pH 为 pH7 ~ 8。

[0064] 鉴于上述形态、生理生化特征分析和 16s rDNA 序列同源性分析结果, 将步骤一分离并纯化得到的水稻内生固氮菌 GDS223 鉴定为变型细菌 α 亚群芽孢杆菌科芽孢杆菌属

(*Bacillus* sp.)。该芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 已于 2011 年 7 月 6 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (简称 CGMCC, 地址为: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号), 保藏编号为 CGMCC No. 5036。

[0065] 实施例 2、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 固氮酶活性测定

[0066] 对实施例 1 所得到的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 进行固氮酶活性测定, 具体方法如下所述: 在 15×150mm 螺口玻璃管中加入 5ml 改良固氮培养基制成斜面, 接种芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036, 28℃ 培养。以微生物肥料常用生产菌种圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*)ACCC11103 为阳性对照, 不接种空白斜面为阴性对照, 设 3 个重复。培养 72h 后, 换橡胶塞, 注入乙炔气体使终浓度为 10%, 用医用胶布密封, 继续培养 72h, 取 100 μl 反应气体, 用气相色谱仪测定乙烯生成量, 根据以下公式计算菌株的固氮酶活性。固氮酶活性 (nmol/mg·h) = C_2H_4 nmol/[菌体蛋白量 (mg)×反应时间 (h)], 其中 C_2H_4 nmol = 1000× C_2H_4 体积 (μl)×273×P/[22.4×(273+t)×760], 其中 P 为气压 (mm 汞柱), t 为反应温度 (℃)。

[0067] 其中, 菌体蛋白含量测定方法如下所述: 用 5ml 生理盐水将试管斜面上的菌苔洗入离心管中, 收集菌体, 向沉淀中加入 3ml 0.5M 的 NaOH 沸水煮沸 5min, 加入 3ml 0.5M 的 HCl 混合, 离心后取上清 1.0ml, 加入 5ml 考马斯亮蓝溶液, 在漩涡混合器上混合, 显色 3min, 测定 595nm 处的吸光值 A_{595} , 根据牛血清白蛋白标准曲线计算菌体蛋白含量。

[0068] 结果显示, 筛选到的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 的固氮酶活性为 38.725nmol C_2H_4 /h·mg 蛋白, 统计分析显著高于微生物肥料常用生产菌种圆褐固氮菌 ACCC11103 的固氮酶活性 25.100nmol C_2H_4 /h·mg 蛋白如图 1 所示。这一结果表明, 本发明的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 能高效固氮。

[0069] 实施例 3、芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 拮抗病原真菌抑菌率测定

[0070] 采用两点对峙法对实施例 1 所得到的芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 进行拮抗病原真菌抑菌率测定, 具体操作如下所述: 在 PDA 平板上距离中心 2cm 的两点上分别接种作物病原真菌玉米赤霉病菌 (*Gibberella zeae*) (或菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)) 和芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036, 每个筛选处理 3 个重复, 以只接病原真菌不接芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 的平板为对照。28℃ 恒温培养, 15d 后用毫米刻度尺测量对峙平板上病原真菌沿被测芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 方向的菌落半径 r_1 、及对照平板上病原真菌的菌落半径 r_0 。病原真菌生长抑制率 (%) = (对照半径 r_0 - 对峙培养病原真菌菌落半径 r_1) / 对照半径 r_0 × 100%。

[0071] 结果显示, 赤霉病菌 (*Gibberella zeae*) 的 r_0 是 63.3±2.8mm, r_1 是 26.6±2.8mm; 菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的 r_0 是 63.0±2.1mm, r_1 是 15.00±1.83mm。将平均值代入上述公式计算得: 所述芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 对赤霉病菌 (*Gibberella zeae*) 的抑菌率为 57.98%, 如图 2 所示; 对菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的抑菌率为 76.19%, 如图 3 所示。这一结果表明所述芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)GDS223 CGMCC No. 5036 可以有效拮抗作物赤霉病菌 (*Gibberella zeae*)、菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)。

[0001]

序 列 表

- <110> 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所
 <120> 拮抗赤霉病菌和菌核病菌的水稻内生固氮菌及其用途
 <130> CGGNAR11120691

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1409

<212> DNA

<213> 水稻内生固氮菌GDSD223

<400> 1

```

ggctcctaaa ggttacctca cggacttcgg gtgttacaaa ctctcgtggt gtgacggggeg      60
gtgtgtacaa ggccccggaa cgtattcacc gcggcgatgct gatcccgat tactagcgat      120
tccagcttca cgcagtcgag ttgcagactg cgateccgaa tgagaacaga tttgtgggat      180
tggettaacc tcgcggtttc gctgcecttt gttctgtcca ttgtagcaeg tgtgtagccc      240
aggtcataag gggcatgatg atttgacgtc atccccacct tcctccggtt tgcaccggcg      300
agtcacctta gagtgcceaa ctgaatgctg gcaactaaga tcaagggttg cgctcgttgc      360
gggacttaac ccaacatctc acgacacgag ctgacgacaa ccatgcacca cctgtcactc      420
tgccccgaa ggggacgtcc tatctctagg attgtcagag gatgtcaaga cctggtaagg      480
ttcttcgctg tgetttegaat taaaccacat gctccaccgc ttgtgcgggc ccccgtcaat      540
tcctttgagt ttcagttctg cgaccgtact ccccaggcgg agtgcttaat gcgtagctg      600
cagcactaag gggcggaaac cccctaacac ttagcactca tcgtttacgg cgtggactac      660
caggglatcl aatcctgttc gctccccacg ctltcgctcc tcagcgtcag tlacagacca      720
gagagtgcgc ttcgccaactg gtgttctctc acatctctac gcatttcacc gctacacgtg      780
gaattccact ctctctttct gactcaagt tccccagttt ccaatgacc tccccggttg      840
agccgggggc ttteacatca gacttaagaa accgcctgcg agccctttac gccaataat      900
tccggacaac gcttgccacc tacglallac cggcgctgct ggcacglagl lagcglggc      960
tttctggta ggtaccgtca aggtgcgccc ctatttgaac ggcacttggt ctccctaac      1020
aacagagett tacgatecga aaaccttcac cactcacgcg gcgttgcctc gtcagacttt      1080
cgtccattgc ggaagattcc ctactgctgc ctcccgtagg agtctgggce gtgtctcagt      1140

```

[0002]

cccagtgtgg cgatecacc tctcaggteg gctacgcac gtcgccttgg tgagccgta	1200
cctcaccaac tagctaatge gccgcgggte catctgtaag tggtagccga agccaccttt	1260
tatgtctgaa ccatgceggtt cagacaacca tccggtatta gccccggttt cccggagtta	1320
tcccagtett acaggcaggt tacecaegtg ttactcacc gtcgcgcgct aacatcaggg	1380
agcaagctcc catctgtccg ctgactct	1409

www.patviewer.com

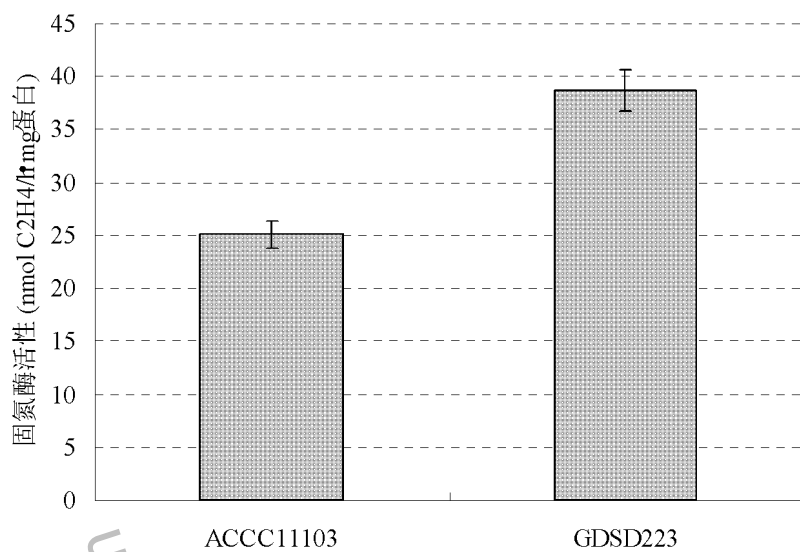


图 1

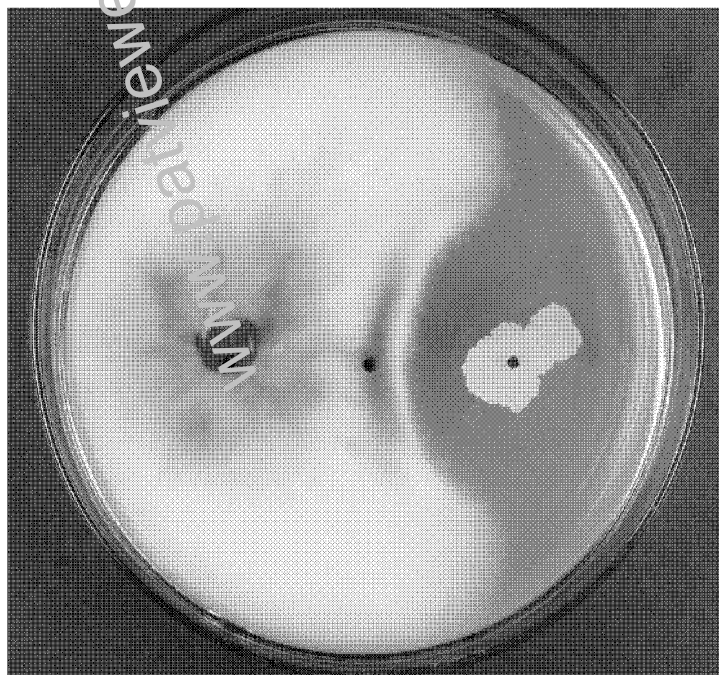


图 2

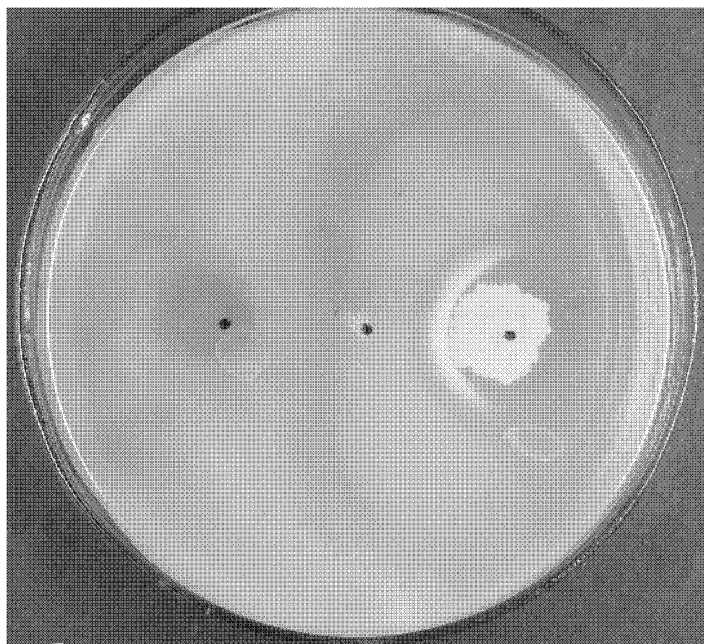


图 3

www.patviewer.com