



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108925577 A

(43)申请公布日 2018.12.04

(21)申请号 201810511644.5

(22)申请日 2018.05.24

(71)申请人 林荣铨

地址 424400 湖南省郴州市桂阳县太和镇
工业园

(72)发明人 林荣铨

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 任重 单香杰

(51) Int. Cl.

A01N 59/00(2006.01)

A01N 63/00(2006.01)

A01P 3/00(2006.01)

A01P 21/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种含有氧化石墨烯的植物疫霉病抗菌剂

(57)摘要

本发明公开了一种含有氧化石墨烯的植物疫霉病抗菌剂,具体是氧化石墨烯和拮抗菌萎缩芽孢杆菌复配在防治植物疫霉病方面的应用。本发明研究显示,氧化石墨烯对多种疫霉病菌具有显著的抑制作用,尤其是与拮抗菌萎缩芽孢杆菌联用可发挥明显的协同增效作用,对植物疫霉病防效显著,可应用于研制防治植物病害、提高作物产量的生物防病制剂,在相关的农业生产上具有很好的推广应用前景。

1. 氧化石墨烯和萎缩芽孢杆菌联用在防治植物疫霉病菌方面的应用。
2. 氧化石墨烯和萎缩芽孢杆菌联用在制备植物疫霉病菌抗菌剂方面的应用。
3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在於,所述植物疫霉病菌为荔枝霜疫霉菌、烟草疫霉菌、大豆疫霉菌、黄瓜疫霉菌或辣椒疫霉菌。
4. 一种抗疫霉病菌的抗菌剂,其特征在於,含有氧化石墨烯和萎缩芽孢杆菌。
5. 一种防治植物疫霉病的药剂,其特征在於,含有氧化石墨烯和萎缩芽孢杆菌。
6. 根据权利要求4所述抗菌剂或权利要求5所述药剂,其特征在於,萎缩芽孢杆菌和氧化石墨烯的质量比为100:1~15。
7. 根据权利要求4所述抗菌剂或权利要求5所述药剂,其特征在於,所述疫霉病为荔枝霜疫霉、烟草疫霉、大豆疫霉、黄瓜疫霉或辣椒疫霉。

一种含有氧化石墨烯的植物疫霉病抗菌剂

技术领域

[0001] 本发明属于农业生物技术领域。更具体地,涉及一种含有氧化石墨烯的植物疫霉病抗菌剂,具体是氧化石墨烯和拮抗菌萎缩芽孢杆菌复配在防治植物疫霉病方面的应用。

背景技术

[0002] 疫霉属(*Phytophthora*)大多为寄生病菌,危害经济植物的毁灭性病原菌,诱发许多重要的植物病害,所引起的病害通常称为疫病。目前,植物疫霉病的防治多采用物理防治、化学药剂防治和拮抗菌生物防治手段。但是现有的方法存在各种缺陷,如物理防治方式防效差,化学药剂污染大、易产生耐药性,拮抗菌防效不稳定且具有选择性。

[0003] 氧化石墨烯(GO)是石墨烯的氧化物,研究显示具有潜在的抗菌应用前景。Hu等在2010年首次报道了GO的抗菌作用,这项实验结果一经发表,立即引起了众多研究者的广泛关注。随后,大量研究结果表明,GO对多种常见细菌,如大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌和伤寒沙门菌等均显示出优异的抗菌活性。然而,GO作为一种具有潜在应用价值的抗菌剂也受到了质疑。Ruiz等发现GO不仅不能抗菌,而且可作为细菌黏附的骨架,促进其生长、增殖和形成细菌生物膜。另外,迄今为止对GO的抗菌机制的研究尚未完全阐明。

[0004] 总之,根据诸多的研究显示,尽管GO的抗菌性能存在争议,但其依然具有潜在的抗菌前景,只是其抗菌活性具有明显的选择性。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有农植物疫霉病防治技术的缺陷和不足,氧化石墨烯和萎缩芽孢杆菌联用在防治植物疫霉病菌方面的应用。

[0006] 本发明的再一目的是提供一种新型的植物疫霉病菌抗菌剂。

[0007] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0008] 本发明研究发现,氧化石墨烯对烟草疫霉菌、辣椒疫霉菌等疫霉病具有显著的抑制作用,尤其是与拮抗菌萎缩芽孢杆菌联用可发挥明显的协同增效作用,对植物疫霉病防效显著,可应用于研制防治植物病害、提高作物产量的生物防病制剂,在相关的农业生产上具有很好的推广应用前景。

[0009] 因此,以下应用均应在本发明的保护范围之内:

[0010] 氧化石墨烯和萎缩芽孢杆菌联用在防治植物疫霉病菌方面的应用。

[0011] 氧化石墨烯和萎缩芽孢杆菌联用在制备植物疫霉病菌抗菌剂方面的应用。

[0012] 其中优选地,所述植物疫霉病菌为荔枝霜疫霉菌(*Peronophthora litchii* Chen)、烟草疫霉菌(*Phytophthora nicotianae*)、大豆疫霉菌(*phytophthora sojae*)、黄瓜疫霉菌(*Phytophthora melonis*)或辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici* Leonian)。

[0013] 另外,含有氧化石墨烯和萎缩芽孢杆菌的植物疫霉病菌的抗菌剂,以及含有氧化石墨烯和萎缩芽孢杆菌的防治作物疫霉病的药剂,也都应在本发明保护范围之内。

[0014] 研究显示,氧化石墨烯的抑菌作用具有剂量依赖性。

[0015] 优选地,所述抗菌剂中,氧化石墨烯的浓度不低于3g/L。

[0016] 更优选地,所述抗菌剂中,氧化石墨烯的浓度为3~20g/L。

[0017] 更优选地,所述抗菌剂中,氧化石墨烯的浓度为5~15g/L。

[0018] 优选地,萎缩芽孢杆菌和氧化石墨烯的质量比为100:1~15。

[0019] 本发明通过大量研究探索,发现氧化石墨烯对病菌的抑制作用具有选择性,对某些特定的生物细胞的生长具有抑制作用,而对另一些生物细胞的生长能力却具有促进提高作用。基于大量的筛选研究实验,本发明提出氧化石墨烯对多种疫霉病菌具有优异的抑制活性,且能够与萎缩芽孢杆菌联用表现出优异的协同增效作用,显著提升对植物疫霉病的防效。其中的机理仍需进一步研究,推测可能是氧化石墨烯能够促进拮抗菌的生长,因此,在发挥自身抑制疫霉病菌作用的同时,还能够提升病原拮抗菌的作用,发挥出显著的协同增效作用。

[0020] 本发明具有以下有益效果:

[0021] 本发明研究显示,氧化石墨烯对多种疫霉病菌具有显著的抑制作用,尤其是与拮抗菌萎缩芽孢杆菌联用可发挥明显的协同增效作用,对植物疫霉病防效显著,可应用于研制防治植物病害、提高作物产量的生物防病制剂,在相关的农业生产上具有很好的推广应用前景。

具体实施方式

[0022] 以下结合具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0023] 除非特别说明,本发明所用试剂和材料均为市购。

[0024] 实施例1氧化石墨烯的抗疫霉菌活性

[0025] 1、实验材料

[0026] (1) 供试病原菌:大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*)、烟草疫霉菌 (*Phytophthora nicotianae*)、荔枝霜疫霉菌 (*Peronophthora litchii* Chen)、黄瓜疫霉菌 (*Phytophthora melonis*)、辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici* Leonian)。

[0027] (2) 药剂:利用常规的hummers法制备所得氧化石墨烯(GO)。

[0028] 2、活体病原菌菌丝生长速率法

[0029] (1) 将氧化石墨烯加入经灭菌并冷却的病菌培养基中,混匀,稀释成系列浓度的含药培养基(0.1、1、3、5、10、15、20、25g/L),每培养皿接种一菌碟(直径d=0.6cm),每个浓度设3个重复;以不加氧化石墨烯的培养基为对照(CK),以甲霜灵为阳性对照药剂,测定氧化石墨烯对供试病原菌的抑制活性。在25℃培养至对照菌落长满培养皿2/3以上时以交叉法测定各浓度处理的菌落直径(cm),取其平均值代表,计算药剂对菌丝体的生长抑制率。

[0030] 抑菌率 (%) =
$$\frac{(\text{CK组菌落直径} - 0.6) - (\text{处理组菌落直径} - 0.6)}{\text{CK组菌落直径} - 0.6} \times 100$$

[0031] (2) 结果如表1所示。

[0032] 表1氧化石墨烯对五种不同病原菌的抑制作用

	组别	抑菌率(%)				
		辣椒疫 霉菌	黄瓜疫 霉菌	烟草疫 霉菌	大豆疫 霉菌	荔枝霜疫 霉菌
[0033]	0.1g/L GO	10.23	12.78	25.04	25.78	26.03
	1 g/L GO	12.14	15.65	30.26	28.41	31.45
	3 g/L GO	30.45	34.25	48.21	46.02	48.85
	5 g/L GO	58.15	63.45	77.46	75.23	78.52
	10 g/L GO	60.26	65.21	80.65	79.42	82.15
[0034]	15 g/L GO	59.21	63.26	79.14	77.65	80.82
	20 g/L GO	40.15	43.45	58.15	55.87	60.75
	25 g/L GO	21.52	24.05	32.68	30.65	33.28
	甲霜灵	85.23	82.45	80.16	85.41	89.23

[0035] 由表1结果可知,氧化石墨烯处理对五种不同病原菌的菌丝生长均表现出优异的抑制活性,而且具有剂量依赖性,优选浓度为3~20g/L,最优选为5~15g/L。

[0036] 3、稀释平板计数法进行微生物数量的测定

[0037] (1) 将氧化石墨烯加入经灭菌并冷却的病菌培养基中混匀,稀释成系列浓度的含药培养基(0.1、1、3、5、10、15、20、25g/L),每培养瓶接种病原菌进行培养,每个浓度设3个重复;以不加氧化石墨烯(CK)为对照,以甲霜灵为阳性对照药剂。处理在无菌操作台进行,试验中所用容器均经高温灭菌,操作过程中防止杂菌污染。恒温培养3天后开始计数,连续计数三天,取菌数最多一次为最后结果,结果取3次重复的平均值。

[0038] (2) 结果如表2所示。

[0039] 表2氧化石墨烯对五种不同病原菌的抑制作用

	组别	菌数 $\times 10^5$				
		辣椒疫 霉菌	黄瓜疫 霉菌	烟草疫 霉菌	大豆疫 霉菌	荔枝霜疫 霉菌
[0040]	CK	2.63	2.65	2.45	2.68	2.81
	0.1g/L GO	2.13	2.08	2.08	2.11	1.97
	1 g/L GO	1.85	1.81	1.77	1.79	1.68
	3 g/L GO	1.41	1.39	1.31	1.32	1.23
	5 g/L GO	1.36	1.32	1.22	1.24	1.12
	10 g/L GO	1.28	1.25	1.13	1.14	1.06
	15 g/L GO	1.31	1.27	1.18	1.20	1.08
	20 g/L GO	1.45	1.41	1.25	1.28	1.21
	25 g/L GO	2.01	1.97	1.91	2.01	1.89
	甲霜灵	1.02	1.01	1.12	0.97	0.85

[0041] 由表2结果可知,与对照组相比,氧化石墨烯处理对五种不同病原菌均表现出优异的生长抑制活性,而且具有剂量依赖性。

[0042] 实施例2氧化石墨烯抗疫霉菌的盆栽实验

[0043] 1、实验材料同实施例1,同时将氧化石墨烯与水混匀,配成一系列浓度(1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21g/L)的抗菌液。然后分别利用大豆、烟草、黄瓜、辣椒苗进行盆栽实验。

[0044] 2、实验方法

[0045] 将氧化石墨烯抗菌液均匀浇灌于子叶充分展开的植物苗根部,24h后接种各病原菌,每7天浇灌一次,连续浇灌3次,以清水和空白培养基为对照,每个处理重复3次,处理后21天取样测定,计算防效。

[0046] 3、防病结果如表3所示。

[0047] 表3氧化石墨烯防治植物疫霉病的测定结果

[0048]	组别	防效 (%)				
		辣椒疫霉病	黄瓜疫霉病	烟草疫霉病	大豆疫霉病	荔枝霜疫霉病
	0.1g/L GO	15.75	17.56	19.46	18.21	19.86
	1 g/L GO	28.15	32.28	35.04	33.28	36.21
	3 g/L GO	51.08	52.36	65.78	62.56	66.85
	5 g/L GO	55.23	58.41	73.26	71.92	74.89
[0049]	10 g/L GO	59.12	63.22	77.15	76.34	79.25
	15 g/L GO	56.42	59.25	73.18	72.52	75.14
	20 g/L GO	50.18	55.08	67.13	65.85	68.27
	25 g/L GO	31.52	32.05	43.12	39.46	44.56
	甲霜灵	75.12	77.23	75.25	78.15	80.16

[0050] 结果显示,氧化石墨烯对五种不同疫霉病均表现出很好的防效,对荔枝霜疫霉病、烟草疫霉病、大豆疫霉病菌的防效最佳,且具有剂量依赖性。

[0051] 实施例3氧化石墨烯与萎缩芽孢杆菌联用的抗疫霉菌活性

[0052] 1、实验材料

[0053] (1) 病原菌:同实施例1。

[0054] (2) 抗菌组分:氧化石墨烯(GO),以及拮抗菌:萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*) (市购,活菌数约 2.00×10^{10} /g)、棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*) (市购,活菌数约 1.00×10^9 /g)。

[0055] 2、实验方法

[0056] 分别将拮抗菌与氧化石墨烯按照100:8的质量比混匀,用水稀释成抗菌液,其中氧化石墨烯的终浓度为10g/L。

[0057] 另外分别以10g/L氧化石墨烯抗菌液和甲霜灵为对照。

[0058] 然后参照实施例1的方法,分别采用活体病原菌菌丝生长速率法测试抑菌率和稀释平板计数法进行微生物数量的测定。

[0059] 3、结果如表4和5所示

[0060] 表4各组对五种不同病原菌的抑制作用

组别	抑菌率(%)				
	辣椒疫霉菌	黄瓜疫霉菌	烟草疫霉菌	大豆疫霉菌	荔枝霜疫霉菌
[0061] GO+萎缩芽孢杆菌	94.21	93.56	93.08	92.28	91.05
GO+棘孢木霉	65.14	73.02	84.95	84.18	85.89
10 g/L GO	61.45	66.35	80.78	80.05	81.14
甲霜灵	84.25	83.16	80.75	82.36	88.41

[0062] 表5各组对五种不同病原菌的抑制作用

组别	菌数 $\times 10^5$				
	辣椒疫霉菌	黄瓜疫霉菌	烟草疫霉菌	大豆疫霉菌	荔枝霜疫霉菌
[0063] GO+萎缩芽孢杆菌	0.70	0.78	0.77	0.81	0.85
GO+棘孢木霉	1.23	1.21	1.08	1.11	1.01
10 g/L GO	1.25	1.22	1.10	1.12	1.03
甲霜灵	1.12	1.08	1.15	1.01	0.94

[0064] 由上述实验结果可知,氧化石墨烯与拮抗菌萎缩芽孢杆菌联用,可产生明显的协同增效作用,对五种病原菌的抑制活性得到显著提升。

[0065] 实施例4氧化石墨烯与萎缩芽孢杆菌联用的抗疫霉菌盆栽实验

[0066] 1、实验材料同实施例3,实验方法同实施例2,将拮抗菌与氧化石墨烯制成的抗菌液分别利用大豆、烟草、黄瓜、辣椒苗进行盆栽实验。

[0067] 2、防病结果如表6所示。

[0068] 表6各组防治植物疫霉病的测定结果

组别	防效(%)				
	辣椒疫霉菌	黄瓜疫霉菌	烟草疫霉菌	大豆疫霉菌	荔枝霜疫霉菌
[0069] GO+萎缩芽孢杆菌	91.35	90.18	90.02	89.27	88.36
GO+棘孢木霉	62.53	70.15	78.08	79.12	82.05
10 g/L GO	60.25	63.85	76.82	77.08	79.63
甲霜灵	76.05	77.82	75.16	77.42	81.09

[0070] 结果显示,氧化石墨烯与拮抗菌萎缩芽孢杆菌联用,可产生明显的协同增效作用,对五种植物疫霉病的防效得到显著提升。

[0071] 实施例5氧化石墨烯与萎缩芽孢杆菌的配比优化

[0072] 以氧化石墨烯与萎缩芽孢杆菌的用量比为因素变量,进行了优化筛选试验。实验材料和方法同实施例3,以辣椒疫霉菌为例,采用活体病原菌菌丝生长速率法测试抑菌率。结果如表7所示,当萎缩芽孢杆菌和氧化石墨烯的质量比为100:1~15时,复合药剂的防效最好。

[0073] 表7各组对五种不同病原菌的抑制作用

	GO: 萎缩芽孢杆菌 (质量比)	辣椒疫霉菌抑菌率(%)	
[0074]	100: 0.1	56.15	
	100: 1	90.03	
	100: 3	92.45	
	100: 5	94.13	
	100: 7	94.56	
	100: 9	95.26	
	100: 12	95.18	
	100: 15	91.48	
	100: 18	86.36	
	100: 20	80.11	
		甲霜灵	83.79