



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116751714 A

(43) 申请公布日 2023. 09. 15

(21) 申请号 202310692947.2

A01G 7/06 (2006.01)

(22) 申请日 2023.06.12

A01G 22/40 (2018.01)

C12R 1/41 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

GDMCC NO.63247 2023.04.04

(71) 申请人 中国科学院华南植物园

地址 510650 广东省广州市天河区兴科路
723号

(72) 发明人 陈雅平 樊一晓 刘占锋 姜华武
任海

(74) 专利代理机构 广州京诺知识产权代理有限公司 44407

专利代理师 朱双

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/20 (2020.01)

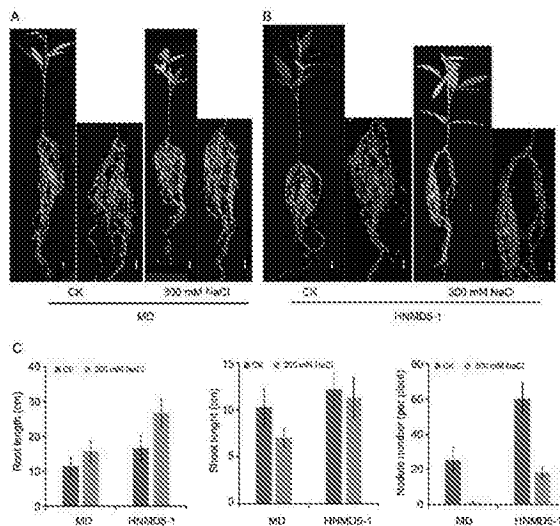
权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一株诱导木豆具有耐盐性并促进结瘤固氮的根瘤菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株诱导木豆具有耐盐性并促进结瘤固氮的根瘤菌及其应用。本发明的木豆根瘤菌HNMD5-1 (*Burkholderia* sp. HNMD5-1) 的保藏编号为: GDMCC NO.63247; 该菌耐盐性较好, 可促使木豆植株在较高的盐胁迫环境下生长, 显著促进木豆的结瘤固氮, 促进植株的生长发育。



1. 一株木豆根瘤菌HNMD5-1,其特征在于,保藏编号为:GDMCC NO.63247。
2. 一种菌剂,其特征在于,含有权利要求1所述的木豆根瘤菌HNMD5-1作为活性成分。
3. 一种生物菌肥,其特征在于,含有权利要求1所述的木豆根瘤菌HNMD5-1和肥料载体。
4. 权利要求1所述的木豆根瘤菌HNMD5-1在如下(1) - (3)中至少一种中的应用;
 - (1) 提高植物耐盐性;
 - (2) 促进植物结瘤固氮;
 - (3) 促进植物生长。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,包括将权利要求1所述的木豆根瘤菌HNMD5-1接种至植物根部或植物根际土壤的步骤。
6. 根据权利要求5所述的应用,其特征在于,所述的木豆根瘤菌HNMD5-1是以木豆根瘤菌HNMD5-1菌液的形式使用的,所述的木豆根瘤菌HNMD5-1菌液是将木豆根瘤菌HNMD5-1加入到木豆营养液中混合至菌液浓度 $OD_{600}=0.01$ 制备得到的。
7. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述的植物为木豆。

一株诱导木豆具有耐盐性并促进结瘤固氮的根瘤菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于农业微生物技术领域,具体涉及一株诱导木豆具有耐盐性并促进结瘤固氮的根瘤菌及其应用。

背景技术

[0002] 根据联合国教科文组织和粮农组织不完全统计,全世界盐碱地的面积为9.54亿公顷,我国约为9900万公顷。盐碱地是我国重要土地资源的一部分。在我国农业持续发展的21世纪,盐碱地的改良利用仍是一个问题。根际微生物能有效促进植物的抗逆能力,一些根际有益微生物能够显著促进作物在盐胁迫下的生长,具有开发为盐碱地增产专用微生物肥料的潜力,为利用农业微生物技术提高盐碱耕地作物产量提供成本低、环境友好的新策略。

[0003] 木豆是一种多年生粮饲兼用的豆科木本作物,也是世界第六大食用豆类作物。原产于印度,是印度、东非和中美洲加勒比地区的重要经济作物。中国的木豆栽培主要分布于西南和华南省区,如福建、广东、贵州等地。木豆耐旱、耐贫瘠、生长迅速,是南方山地和海岛荒山造林、水土保持的优良先锋树种;木豆籽粒蛋白质含量高,具有重要的经济价值;而且木豆能与根瘤菌形成共生固氮体系,在改良土壤方面也具有重要的意义。但是大部分木豆品种耐盐性比较差,因此,筛选合适的根瘤菌,提高木豆-根瘤菌共生固氮体系的耐盐性,对盐渍化土壤的改良及扩大木豆栽培范围、提高木豆产业化等都具有重要意义。

发明内容

[0004] 针对现有技术的上述不足,本发明的目的是提供一株诱导木豆具有耐盐性并促进结瘤固氮的根瘤菌及其应用。

[0005] 本发明的木豆根瘤菌从珊瑚岛礁海南木豆中分离得到,编号为HNMD5-1。菌株HNMD5-1主要形态和生物学特征:在YMB培养基平板上菌落颜色微黄,边缘光滑,具有凸起。菌株HNMD5-1可以在以甘露醇、肌醇、柠檬酸钠、丙二酸、葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖为碳源的平板生长,适宜生长的pH范围为pH5-pH9,具有磷霉素、四环素、氨基苄霉素抗性,具有产碱、解有机磷、无机磷的能力,不具有解钾能力,最高可耐4%NaCl,在28℃和37℃下均可生长。对照菌株HNMD5-1的形态特征、生理生化特性以及通过16S rDNA基因序列构建系统发育树分析,鉴定菌株HNMD5-1属于Burkholderia属,因此命名为Burkholderia sp.HNMD5-1。

[0006] 因此,本发明的第一个目的是提供一株木豆根瘤菌HNMD5-1,其保藏编号为:GDMCC NO.63247。

[0007] 本发明的第二个目的是提供一种菌剂,其含有所述的木豆根瘤菌HNMD5-1作为活性成分。

[0008] 本发明的第三个目的是提供一种生物菌肥,其含有所述的木豆根瘤菌HNMD5-1和肥料载体。

[0009] 本发明的第四个目的是提供所述的木豆根瘤菌HNMD5-1在如下(1)-(3)中至少一

种中的应用;

[0010] (1)提高植物耐盐性;

[0011] (2)促进植物结瘤固氮;

[0012] (3)促进植物生长。

[0013] 优选,所述的应用,包括将所述的木豆根瘤菌HNMD5-1接种至植物根部或植物根际土壤的步骤。

[0014] 优选,所述的木豆根瘤菌HNMD5-1是以木豆根瘤菌HNMD5-1菌液的形式使用的,所述的木豆根瘤菌HNMD5-1菌液是将木豆根瘤菌HNMD5-1加入到木豆营养液中混合至菌液浓度 $OD_{600}=0.01$ 制备得到的。

[0015] 优选,所述的植物为木豆。

[0016] 本发明的木豆根瘤菌HNMD5-1耐盐性较好,可促使木豆植株在较高的盐胁迫环境下生长,显著促进木豆的结瘤固氮,从而促进植株的生长发育。

[0017] 保藏说明:

[0018] 本发明的Burkholderia sp. HNMD5-1(木豆根瘤菌HNMD5-1)于2023年04月04日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏编号:GDMCC NO.63247,保藏地址:广州市先烈中路100号大院59号楼5楼,广东省科学院微生物研究所。

附图说明

[0019] 图1为木豆根瘤菌HNMD5-1在YMB培养基上的菌落形态。

[0020] 图2为木豆根瘤菌HNMD5-1的16S rDNA系统发育树。

[0021] 图3为木豆根瘤菌HNMD5-1的基本生物学特性分析。

[0022] 图4为木豆根瘤菌HNMD5-1和对照木豆根瘤菌(MD, *Rhizobium pakistanense* strain)回接木豆后在正常条件(CK,木豆营养液)及NaCl(300mM)处理下的表型;其中,图A为接种对照菌MD 5周后木豆植株的表型;图B为接种菌HNMD5-1 5周后植株的表型;图C为接种对照菌MD及菌HNMD5-1 5周后木豆植株的根长、株高及根瘤数目统计。

具体实施方式

[0023] 以下实施例是对本发明的进一步说明,而不是对本发明的限制。

[0024] 实施例1

[0025] 1. 菌株HNMD5-1的分离获得

[0026] 取珊瑚岛礁的海南木豆植株的根瘤,用75%酒精消毒30s,再用2%NaClO水溶液消毒5min,无菌水漂洗5-6遍,加适量YMB培养基,用无菌镊子捣碎根瘤,在YMB平板划线纯化,28℃恒温培养2-3d。

[0027] 2. 菌株HNMD5-1的基本生物学特性分析

[0028] 2.1 菌株HNMD5-1的NaCl耐受特性分析

[0029] (1)提前一天配制YMB培养基(正常的YMB;添加质量分数1%、2%、3%、4%、5% NaCl的YMB固体培养基)。根据表1配方称取个组分并混合,加水定容至1L,用5% NaOH溶液或5% HCl溶液调节pH至7.0,121℃灭菌30min;然后分装成YMB培养基平板。

[0030] 表1 YMB培养基配方(1L)

| [0031] | 组分 | 用量 |
|--------|---------|-------|
| | 甘露醇 | 10.0g |
| | 酵母浸粉 | 3.0g |
| | 三水磷酸氢二钾 | 0.1g |
| | 无水硫酸镁 | 0.1g |
| | 氯化钠 | 0.1g |
| | 六水氯化钙 | 0.05g |
| | 刚果红 | 0.2g |
| | 琼脂粉 | 15g |

[0032] (2) 将不同来源的菌液分别稀释 10^4 后备用(用2mL灭菌的离心管加1mL YMB后加入相应的根瘤菌10 μ L,混匀,酒精灯旁操作)。

[0033] (3) 吸取稀释后的菌液5 μ L点在平板上,在平板写上菌株号和日期,放置28 $^{\circ}$ C培养箱培养,3天后,对照正常YMB上的长势观察不同盐浓度下菌的长势,记录并拍照。

[0034] 2.2pH实验

[0035] 配制YMB培养基(pH3、pH5、pH7、pH9、pH11、pH14的培养基),吸取稀释后的菌液5 μ L点在不同pH的平板上,3天后观察长势,拍照。

[0036] 2.3温度耐受性

[0037] 配制YMB培养基,吸取稀释后的菌液5 μ L点在YMB平板上划板,放置于不同温度(16 $^{\circ}$ C、28 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C及45 $^{\circ}$ C)的培养箱中培养,3d后观察长势并拍照。

[0038] 2.4碳源利用和抗生素

[0039] 配制不同碳源的YMB(用不同碳源代替甘露醇,不同处理分别是含0碳源或10g/L的甘露醇、肌醇、甘油、柠檬酸钠、丙二酸、草酸钠、淀粉、葡萄糖、果糖、D-木糖、阿拉伯糖、乳糖、蔗糖或麦芽糖)和加不同抗生素的YMB(抗生素都是过滤灭菌,在培养基灭菌后冷却至60 $^{\circ}$ C再加入;不同处理分别是100mL YMB培养基中加200 μ L红霉素、100 μ L氯霉素、50 μ L磷霉素、100 μ L庆大霉素、100 μ L利福平、100 μ L卡那霉素、25 μ L金霉素、100 μ L链霉素、20 μ L四环素、100 μ L氨苄霉素、100 μ L壮观霉素或0添加抗生素,调pH6.8灭菌后用5mL的移液器吸取2mL不同碳源/抗生素的培养基放置于24孔灭菌板中,记录好不同位置对应的碳源/抗生素。

[0040] 然后吸取稀释后的菌液5 μ L点在孔内培养基的中央,静置几分钟后(防止流动)盖好盖子并封上封口膜置于28 $^{\circ}$ C培养,3天后观察长势拍照。

[0041] 2.5解磷解钾能力

[0042] 配制蒙金娜有机磷(卵磷脂)、磷酸钙培养基平板,每个平板划分6个区域,依次吸取5 μ L菌液点在每个区域的中心(取样确保精确,不要让菌液流动),在28 $^{\circ}$ C培养箱培养3d,观察菌株是否生长以及是否形成解磷圈。

[0043] 培养基配方如下:①蒙金娜有机磷(卵磷脂)细菌培养基(1L):葡萄糖10.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, NaCl 0.3g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, FeSO_4 0.03g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03g, KCl 0.3g, CaCO_3

[0044] 1.0g, 卵磷脂0.3g, 琼脂20g, pH 7.0。其中卵磷脂用75%乙醇加热溶解,单独灭菌,与灭菌冷却至60 $^{\circ}$ C的培养基混合后倒平板。

[0045] ②蒙金娜无机磷(磷酸三钙)细菌培养基(1L):葡萄糖($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) 10g, 硫酸铵 [$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$] 0.5g, 氯化钠(NaCl) 0.3g, 硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.3g, 硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.03g,

硫酸锰 ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.03g, 碳酸钙 (CaCO_3) 5.0g, 氯化钾 (KCl) 0.3g, 磷酸三钙 [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] 5.0g, 琼脂20g, pH7.0~7.5。

[0046] ③解钾活性测定培养基 (1L): 蔗糖2.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, Na_2HPO_4 1.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, 钾长石粉5.0g, pH7.2。

[0047] 2.6HNMD5-1菌株培养基上的产酸或产碱能力检测

[0048] 配制酸碱(溴百酚蓝)培养基。根据表2配方称取个组分并混合,加水定容至1L,用5%NaOH溶液或5%HCl溶液调节pH至7.0,121℃灭菌30min。然后分装平板。

[0049] 表2酸碱培养基配方 (1L)

[0050]

| 组分 | 用量 |
|---------|-------|
| 甘露醇 | 10.0g |
| 酵母浸粉 | 3.0g |
| 三水磷酸氢二钾 | 0.1g |
| 无水硫酸镁 | 0.1g |
| 氯化钠 | 0.1g |
| 六水氯化钙 | 0.05g |
| 溴百酚蓝 | 0.2g |
| 琼脂粉 | 15g |

[0051] 灭菌后接种本实验分离的固氮菌5 μL ,28℃培养3-5天,观察培养基颜色。培养基变蓝色,代表固氮菌产碱;培养基变黄色,代表固氮菌产酸;培养基不变色,为绿色,代表不产酸碱。

[0052] 结果表明,菌株HNMD5-1在YMB平板28℃恒温培养3d后,菌落边缘平滑,菌落凸起,菌落颜色微黄(图1)。菌株HNMD5-1可以在以甘露醇、肌醇、柠檬酸钠、丙二酸、葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖为碳源的平板生长,适宜生长的pH范围为pH5-pH9,具有磷霉素、四环素、氨基霉素抗性,具有产碱、解有机磷、无机磷的能力,不具有解钾能力,最高可耐4% NaCl,在28℃和37℃下均可生长(图3)。

[0053] 3. 菌株HNMD5-1的分子生物学鉴定

[0054] 通过16S rDNA对HNMD5-1菌株进行分子学鉴定,利用引物(F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG;R: TACGGCTACCTTGTTACGACTT)对HNMD5-1菌株基因组DNA进行PCR扩增,扩增出约为1.4kb大小的片段(核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,1433bp),将该序列经DNAMAN软件进行序列比对,SNAPGENE软件进行序列拼接,在NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)基因库进行同源性比对,发现HNMD5-1菌株属于Burkholderia属。采用MEGA5.0软件用邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树,进行系统发育分析,HNMD5-1与Burkholderia sp.亲缘关系最近(图2),因此将该菌命名为Burkholderia sp.HNMD5-1。

[0055] 实施例2:菌株HNMD5-1诱导木豆具有耐盐性、促进结瘤固氮

[0056] 一、木豆接种及盐处理方法

[0057] 1. 种子萌发

[0058] 选择饱满的木豆种子,在罐头瓶中用无菌水浸泡过夜(种子:水质量比约1:2-4)。然后将木豆种子放入培养皿中,将滤纸微微润湿铺在培养皿下方,种子保持一定间隔铺在

培养皿中。待种子吸涨后(约2d)种入土壤,保持种子露出一部分在土壤外,用保鲜膜封起来,3-4d后去掉保鲜膜。

[0059] 2.拌土

[0060] 土壤为将灭菌的蛭石:陶粒以体积比1:1混匀制备得到。实验使用对照木豆根瘤菌(MD, *Rhizobium pakistanense* strain)及菌株HNMD5-1进行木豆的接种处理。其中,对照菌MD为从木豆根瘤中分离出的另一株根瘤菌,与寄主植株木豆的亲缘关系最接近;发明人前期进行了对比实验,结果表明,在正常条件下或NaCl处理条件下,木豆接种菌MD与不接种任何菌(作为对比)二者在结瘤数、植株根长、株高方面均无显著差异;所以选择菌MD作为对照菌。将菌MD或菌HNMD5-1分别加入300mM NaCl溶液或木豆营养液(每L水中加表1中的A、B、C、D母液各125 μ L)中,共设4个处理:木豆营养液+菌MD、300mM NaCl+菌MD、木豆营养液+菌HNMD5-1、300mM NaCl+菌HNMD5-1,分别加入混合后菌液浓度OD600=0.01,用菌液拌土,留部分菌液待种子埋入土壤后喷洒在土壤上。用木豆营养液和过滤无菌水轮流浇水,4-5周后观察木豆结瘤表型,测定各项生理指标。其中,所述的木豆营养液的母液的配方如表3所示。

[0061] 表3木豆营养液的母液配方

| 名称 | 成分 | 含量/每 100 mL 中用量 (g) |
|--------|---|---------------------|
| A 母液 | CaCl ₂ ·2H ₂ O | 29.41 |
| B 母液 | NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 13.61 |
| C 母液 | Fe-citrate | 0.67 |
| | MgSO ₄ ·7H ₂ O | 12.33 |
| | K ₂ SO ₄ | 8.70 |
| | MnSO ₄ ·H ₂ O | 0.0338 |
| D 母液 | H ₃ BO ₃ | 0.0247 |
| | ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.0288 |
| [0063] | CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.01 |
| | CoSO ₄ ·6H ₂ O | 0.0046 |
| | Na ₂ MoO ₂ ·2H ₂ O | 0.0048 |

[0064] 二、结果

[0065] 图4结果表明,在正常条件下,使用HNMD5-1菌株处理的木豆植株结瘤显著,结瘤数显著多于菌MD处理的木豆植株;且在NaCl处理下,HNMD5-1菌株处理的木豆植株相较于菌MD处理的也有较多结瘤。菌MD和菌HNMD5-1在NaCl处理下根长都长于在正常条件下的根长,且株高矮于正常条件下的株高。菌HNMD5-1处理的植株株高、根长在NaCl处理下和正常条件下都高于对照菌MD处理的,证明HNMD5-1提高植株耐盐性且促进植株结瘤固氮和植株生长。

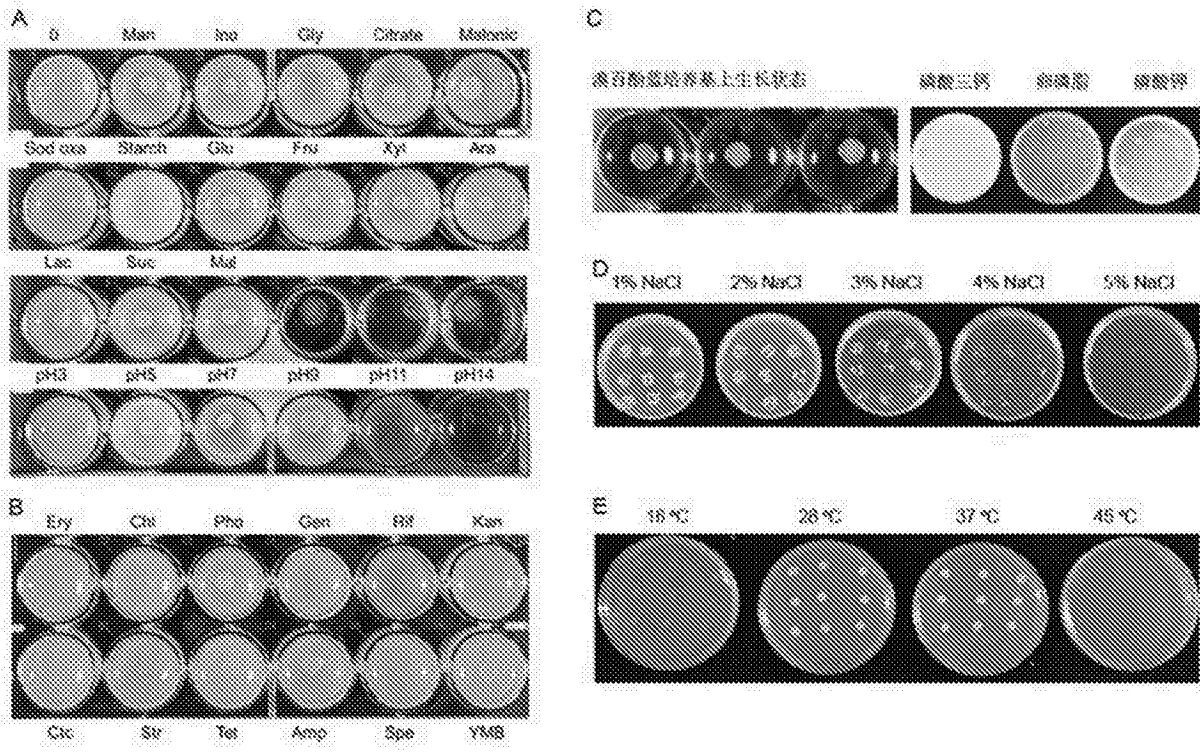


图3

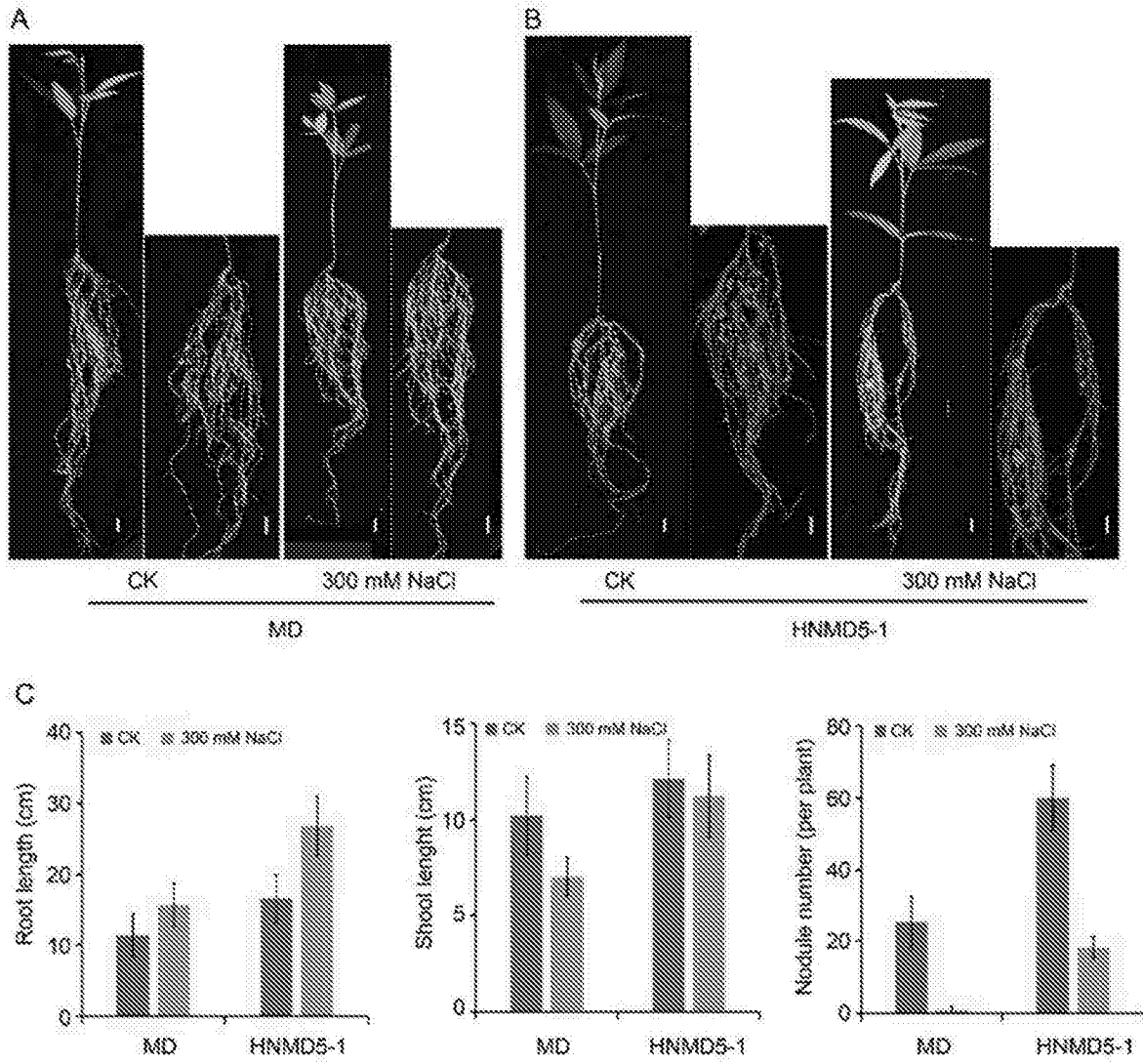


图4