



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117210366 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 12

(21) 申请号 202311209407.0

A01N 63/20 (2020.01)

(22) 申请日 2023.09.18

A01P 21/00 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

GDMCC NO.63514 2023.06.01

(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 李琼 涂铁要 简曙光

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)

C05F 11/08 (2006.01)

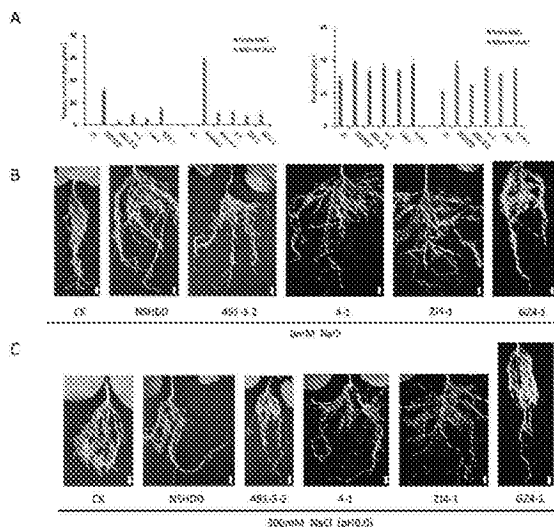
权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

一株海刀豆慢生根瘤菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株海刀豆慢生根瘤菌及其应用。本发明的慢生根瘤菌NSHDD,其保藏编号为:GDMCC NO.63514;该菌耐盐性较好,可促使海刀豆植株在较高的盐胁迫环境下生长,显著促进海刀豆的结瘤固氮和根的生长,促进植株的生长发育。本发明的慢生根瘤菌NSHDD对海刀豆的开发利用具有重要意义,在滨海沙地的保护、生态恢复和引种栽培中具有重要应用价值。



1. 一株慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium* sp.) NSHDD, 其特征在于, 保藏编号为: GDMCCN0.63514。
2. 一种菌剂, 其特征在于, 含有权利要求1所述的慢生根瘤菌NSHDD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所述的慢生根瘤菌NSHDD和肥料载体。
4. 权利要求1所述的慢生根瘤菌NSHDD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) 促进植物根的生长。
5. 根据权利要求4所述的应用, 其特征在于, 包括将所述的慢生根瘤菌NSHDD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, 所述的慢生根瘤菌NSHDD是以慢生根瘤菌NSHDD菌液的形式使用的, 所述的慢生根瘤菌NSHDD菌液是将慢生根瘤菌NSHDD加入到植物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6所述的应用, 其特征在于, 所述的植物营养液为海刀豆营养液。
8. 根据权利要求4所述的应用, 其特征在于, 所述的植物为海刀豆。

一株海刀豆慢生根瘤菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体涉及一株海刀豆慢生根瘤菌及其应用。

背景技术

[0002] 盐碱地在全球分布广泛,从寒带、温带到热带的各个地区,据统计,世界范围内不同类型的盐碱地所覆盖的陆地面积几乎占陆地总面积的10%。我国盐碱土主要集中在东北、华北、西北、长江中上游及滨海新区。相对于其它地区的极端气候条件,滨海盐碱地优势的水热条件使之成为盐碱地开发利用中的重点区域。

[0003] 豆科植物是被子植物的第三大科,在全世界广泛分布和种植,其与根瘤菌形成的共生体系,可提高土壤中氮素含量。选择耐盐豆科植物进行盐碱地改良,能为农业生产带来巨大的经济效益,有利于实现农业、环境和生态可持续利用与发展。

[0004] 海刀豆(*Canavalia maritima*)别名滨刀豆,为豆科(Leguminosae)刀豆属,多年生草质藤本植物。海刀豆生长迅速、覆盖面广、防沙固土能力强,具备良好的耐盐碱、耐贫瘠能力,被誉为滨海沙地生态恢复工程的“理想物种”之一。海刀豆共生固氮体系可以很好的抵御滨海沙地的恶劣条件,因此,进一步了解海刀豆对盐胁迫的响应机制,研究海刀豆根瘤菌共生固氮体系的耐盐性及其中的关键菌,对海刀豆开发利用具有重要意义。

发明内容

[0005] 针对现有技术的上述不足,本发明的目的是提供一株海刀豆慢生根瘤菌及其应用。

[0006] 本发明的慢生根瘤菌从南沙海刀豆中分离得到,编号为NSHDD。菌株NSHDD主要形态和生物学特征:在YMB培养基平板上菌落偏乳白色,边缘光滑,具有凸起。菌株NSHDD可以在以甘露醇、肌醇、淀粉、葡萄糖、D-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,具有红霉素、氯霉素、磷霉素、庆大霉素、利福平、金霉素、四环素、氨基糖苷类抗生素抗性,具有产碱的能力,不具有解钾、解有机磷、解无机磷的能力,最高可耐2%NaCl,在28℃生长。根据菌株NSHDD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NSHDD属于Bradyrhizobium属,因此命名为Bradyrhizobium sp.NSHDD(慢生根瘤菌NSHDD)。

[0007] 因此,本发明的第一个目的是提供一株慢生根瘤菌NSHDD,其保藏编号为:GDMCCN0.63514。

[0008] 本发明的第二个目的是提供一种菌剂,其含有所述的慢生根瘤菌NSHDD作为活性成分。

[0009] 本发明的第三个目的是提供一种生物菌肥,其含有所述的慢生根瘤菌NSHDD和肥料载体。

[0010] 本发明的第四个目的是提供所述的慢生根瘤菌NSHDD在如下(1)-(3)中至少一种中的应用;

- [0011] (1) 提高植物耐盐性;
- [0012] (2) 促进植物结瘤固氮;
- [0013] (3) 促进植物根的生长。
- [0014] 优选,所述的应用,包括将所述的慢生根瘤菌NSHDD接种至植物根部或植物根际土壤的步骤。
- [0015] 优选,所述的慢生根瘤菌NSHDD是以慢生根瘤菌NSHDD菌液的形式使用的,所述的慢生根瘤菌NSHDD菌液是将慢生根瘤菌NSHDD加入到植物营养液中混合至菌液浓度 $OD_{600} = 0.01$ 制备得到的。
- [0016] 优选,所述的植物为海刀豆。
- [0017] 优选,所述的植物营养液为海刀豆营养液。
- [0018] 本发明的慢生根瘤菌NSHDD耐盐性较好,可促使海刀豆植株在较高的盐胁迫环境下生长,显著促进海刀豆的结瘤固氮和根的生长,从而促进植株的生长发育。本发明的慢生根瘤菌NSHDD对海刀豆的开发利用具有重要意义,在滨海沙地的保护、生态恢复和引种栽培中具有重要应用价值。
- [0019] 保藏说明:
- [0020] 本发明的*Bradyrhizobium* sp. NSHDD (慢生根瘤菌NSHDD) 于2023年06月01日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),保藏编号:GDMCC NO.63514,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

- [0021] 图1为菌株NSHDD在YMB培养基上的菌落形态。
- [0022] 图2为菌株NSHDD的16S rDNA系统发育树;其中4-1、ZJ4-1、GZ4-1、491-3-2依次分别表示对比根瘤菌*Burkholderia symbiotica* 4-1、菌*Rhizobium pakistanense* ZJ4-1、菌*Burkholderia* sp. GZ4-1、菌*Rhizobium* sp. 491-3-2。
- [0023] 图3为菌株NSHDD的基本生物学特性分析;其中图A为碳源利用和适宜pH检测,图B为抗生素抗性检测,图C为产酸产碱能力检测和解磷解钾能力检测,图D为NaCl耐受性检测,图E为温度耐受性检测。
- [0024] 图4为菌株NSHDD和对比根瘤菌回接海刀豆后在正常条件(0mM NaCl,海刀豆营养液)及NaCl(300mM NaCl营养液,pH8.0)处理下的表型;其中,图A为不接种根瘤菌、接种菌株NSHDD及对比根瘤菌30天后不同条件下海刀豆植株的根瘤数目及根长统计;图B为不接种根瘤菌、接种菌株NSHDD及对比根瘤菌在正常条件下30天后海刀豆植株的表型;图C为不接种根瘤菌、接种菌株NSHDD及对比根瘤菌在NaCl处理下30天后海刀豆植株的表型;其中图上各标记分别表示:CK:不接种根瘤菌,NSHDD:接种菌株NSHDD,491-3-2:接种菌株*Rhizobium* sp. 491-3-2,4-1:接种菌株*Burkholderia symbiotica* 4-1,ZJ4-1:接种菌株*Rhizobium pakistanense* ZJ4-1,GZ4-1:接种菌株*Burkholderia* sp. GZ4-1。

具体实施方式

- [0025] 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。
- [0026] 实施例1

[0027] 1. 菌株NSHDD的分离获得

[0028] 取南沙的海刀豆植株的根瘤,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液体培养基,用无菌镊子捣碎根瘤,在YMB平板划线纯化,28℃恒温培养2-3d。

[0029] 2. 菌株NSHDD的基本生物学特性分析

[0030] 2.1 菌株NSHDD的NaCl耐受特性分析

[0031] (1) 提前一天配制YMB培养基(分别为正常的YMB固体培养基或添加质量分数1%、2%、3%、4%、5% NaCl的YMB固体培养基)。根据表1配方称取各组分并混合,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。

[0032] 表1 YMB培养基配方(1L)

组分	用量
甘露醇	10.0 g
酵母浸粉	3.0 g
三水磷酸氢二钾	0.1 g

无水硫酸镁	0.1 g
氯化钠	0.1 g
六水氯化钙	0.05 g
刚果红	0.2 g
琼脂粉	15 g

[0035] (2) 将不同来源的菌液分别稀释 10^2 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)。

[0036] (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℃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。

[0037] 2.2 pH实验

[0038] 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。

[0039] 2.3 温度耐受性

[0040] 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℃、28℃、37℃及45℃)的培养箱中培养,3d后观察长势并拍照。

[0041] 2.4 碳源利用和抗生素

[0042] 配制不同碳源的YMB(用不同碳源代替YMB培养基中的甘露醇组分,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);配制加不同抗生素的YMB(抗生素都是过滤灭菌,在

培养基灭菌后冷却至60℃再加入;不同处理分别是100mL YMB培养基中加200μL红霉素、100μL氯霉素、50μL磷霉素、100μL庆大霉素、100μL利福平、100μL卡那霉素、25μL金霉素、100μL链霉素、20μL四环素、100μL氨苄霉素、100μL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。

[0043] 然后吸取稀释后的菌液5μL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℃培养,3天后观察长势拍照。

[0044] 2.5解磷解钾能力

[0045] 配制蒙金娜有机磷(卵磷脂)、磷酸三钙、解钾活性测定培养基平板,每个平板划分6个区域,依次吸取5μL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℃培养箱培养3d,观察菌株是否生长以及是否形成解磷圈。

[0046] 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, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, NaCl 0.3g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3g, FeSO₄ 0.03g, MnSO₄ · H₂O 0.03g, KCl 0.3g, CaCO₃ 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℃的培养基混合后倒平板。

[0047] ②蒙金娜无机磷(磷酸三钙)细菌培养基(1L):葡萄糖10g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, NaCl 0.3g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3g, FeSO₄ · 7H₂O 0.03g, MnSO₄ · H₂O 0.03g, CaCO₃ 5.0g, KCl 0.3g, Ca₃(PO₄)₂ 5.0g, 琼脂20g, pH7.0。

[0048] ③解钾活性测定培养基(1L):蔗糖2.0g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, Na₂HPO₄ 1.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, 钾长石粉5.0g, pH7.2。

[0049] 2.6 NSHDD菌株培养基上的产酸或产碱能力检测

[0050] 配制酸碱(溴百酚蓝)培养基。根据表2配方称取各组分并混合,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。

[0051] 表2酸碱培养基配方(1L)

[0052]

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

[0053] 灭菌后接种本实验分离的固氮菌5μL,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。

[0054] 结果表明,菌株NSHDD在YMB平板28℃恒温培养3d后,菌落边缘平滑,菌落凸起,菌落颜色呈乳白色(图1)。菌株NSHDD可以在以甘露醇、肌醇、淀粉、葡萄糖、D-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,具有红霉素、氯霉素、

磷霉素、庆大霉素、利福平、金霉素、四环素、氨基霉素抗性,具有产碱的能力,不具有解钾、解有机磷、解无机磷的能力,最高可耐2%NaCl,在28℃生长(图3)。3. 菌株NSHDD的分子生物学鉴定

[0055] 通过16S rDNA对NSHDD菌株进行分子学鉴定,利用引物(F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG;R:TACGGCTACCTGTTACGACTT)对NSHDD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,1292bp),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NSHDD菌株属于Bradyrhizobium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,NSHDD与Bradyrhizobium elkanii亲缘关系最近(图2),因此将该株分离自海刀豆根瘤的菌株NSHDD菌命名为Bradyrhizobium sp.NSHDD(慢生根瘤菌NSHDD)。

[0056] 实施例2:菌株NSHDD诱导海刀豆具有耐盐性、促进结瘤固氮

[0057] 一、海刀豆接种及盐处理方法

[0058] 1. 种子萌发

[0059] 选择饱满的海刀豆种子,放在太阳下晾晒一天,用剪刀剪破种皮后在清水中泡6-8小时,之后剥去种皮,将种子放在滤纸皿中28℃催芽。28℃萌发12-24h,种子生根后用于移植到蛭石基质(5-8mm粗度)中。

[0060] 2. 拌土

[0061] 实验分别使用对比根瘤菌(为Rhizobium sp.491-3-2、Burkholderia symbiotica 4-1、Rhizobium pakistanense ZJ4-1、Burkholderia sp.GZ4-1)及菌株NSHDD进行海刀豆的接种处理。其中,作为对比的根瘤菌均为从海刀豆根瘤中分离出的其他根瘤菌株。

[0062] 将对比根瘤菌或菌株NSHDD分别加入300mM NaCl营养液或海刀豆营养液中,共设12个菌液处理:(1)海刀豆营养液不加菌、(2)300mM NaCl营养液不加菌、(3)海刀豆营养液+菌株NSHDD、(4)300mM NaCl营养液+菌株NSHDD、(5)海刀豆营养液+菌株Rhizobium sp.491-3-2、(6)300mM NaCl营养液+菌株Rhizobium sp.491-3-2、(7)海刀豆营养液+菌株Burkholderia symbiotica 4-1、(8)300mM NaCl营养液+菌株Burkholderia symbiotica 4-1、(9)海刀豆营养液+菌株Rhizobium pakistanense ZJ4-1、(10)300mM NaCl营养液+菌株Rhizobium pakistanense ZJ4-1、(11)海刀豆营养液+菌株Burkholderia sp.GZ4-1、(12)300mM NaCl营养液+菌株Burkholderia sp.GZ4-1,各加菌的处理分别加入对应菌株后混合并控制各菌液浓度 $OD_{600}=0.001$,用处理液(营养液或菌液)拌蛭石基质,基质拌匀装小钵后,每钵移栽一株海刀豆生根的种子,并每钵补浇5mL对应处理液(营养液或菌液)。所述的海刀豆营养液是在每1L水中加表3中的A、B、C、D母液各125 μ L后混合均匀制备得到的,pH为7.2;所述的300mM NaCl营养液是在海刀豆营养液中加入终浓度为300mM的NaCl,然后用碳酸钠溶液调pH为8.0后制备得到的。用海刀豆营养液和过滤无菌水轮流浇水,30天后观察海刀豆结瘤表型,测定各项生理指标。

[0063] 表3海刀豆营养液的母液配方

[0064]

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
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.01
	CoSO ₄ ·6H ₂ O	0.0046
	Na ₂ MoO ₂ ·2H ₂ O	0.0048

[0065] 二、结果

[0066] 图4结果表明,在正常条件下,使用NSHDD菌株处理的海刀豆植株平均根瘤数为29颗,使用对比菌株处理的海刀豆植株的平均根瘤数为3-5颗,NSHDD菌株处理组结瘤数显著多于各对比菌株处理组;且在NaCl处理下,NSHDD菌株处理的海刀豆植株平均根瘤数为15颗,对比菌株处理的海刀豆植株的平均根瘤数为1-6颗,NSHDD菌株处理组相较于对比菌株处理组有较多结瘤。在NaCl处理下,菌株NSHDD处理的植株平均根长为18.91cm,对比菌株 *Rhizobium* sp.491-3-2处理的植株平均根长为12.57cm,对比菌株 *Burkholderia symbiotica* 4-1处理的植株平均根长为17.87cm,对比菌株 *Rhizobium pakistanense* ZJ4-1处理的植株平均根长为15.80cm,对比菌株 *Burkholderia* sp.GZ4-1处理的植株平均根长为17.39cm,菌株NSHDD处理组植株的根部生长情况优于各对比菌株处理组,证明菌株NSHDD提高植株耐盐性且促进植株结瘤固氮和植株根的生长。

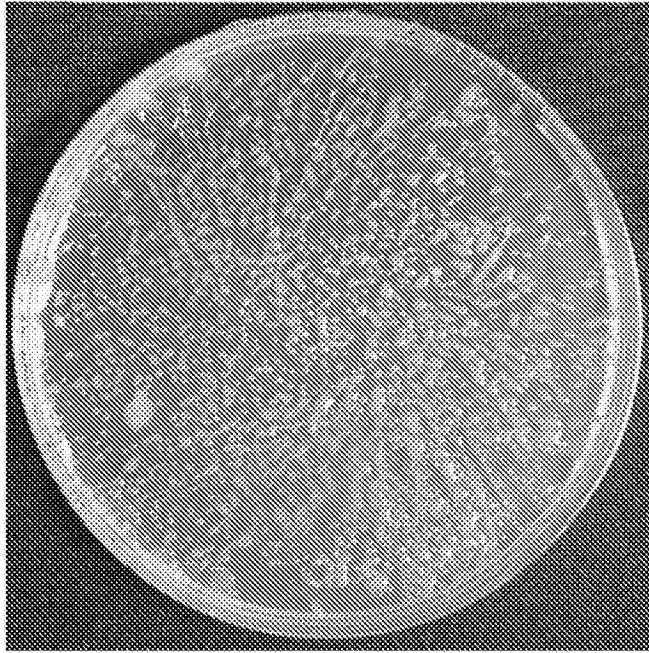


图1

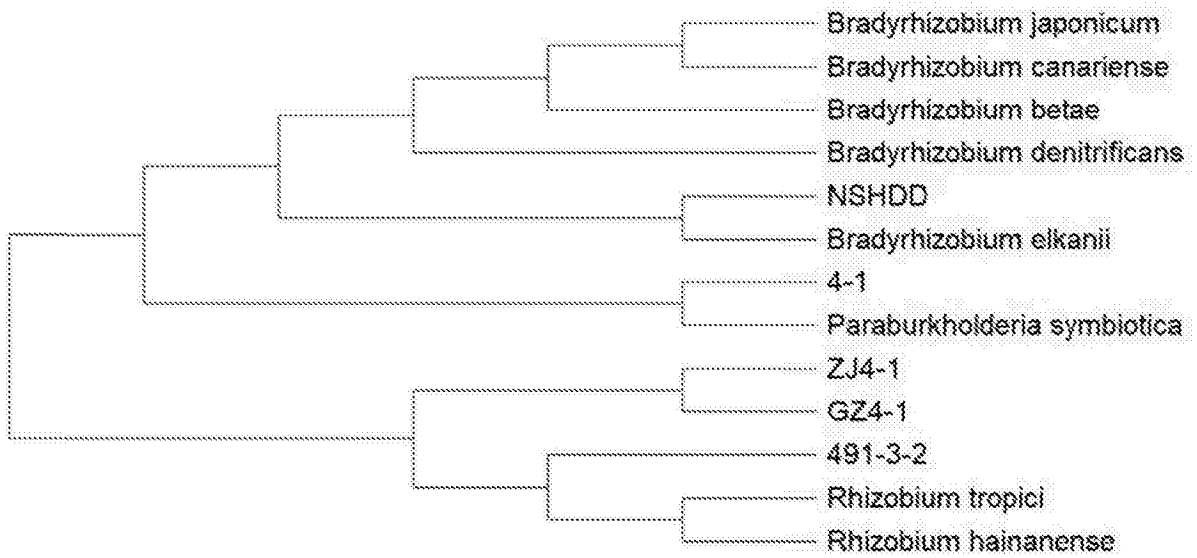


图2

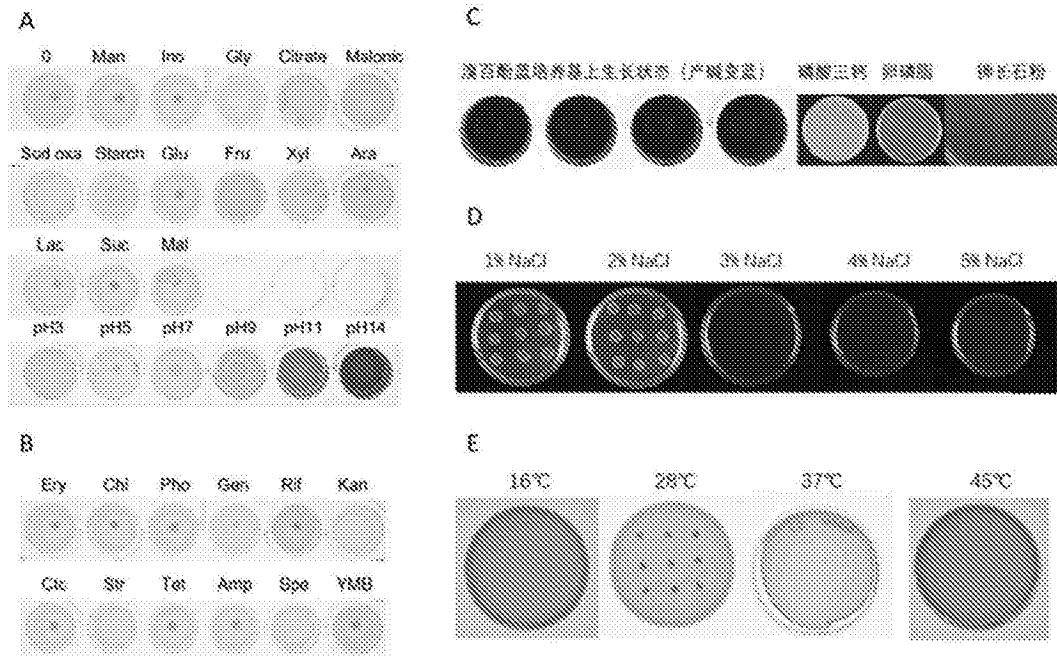


图3

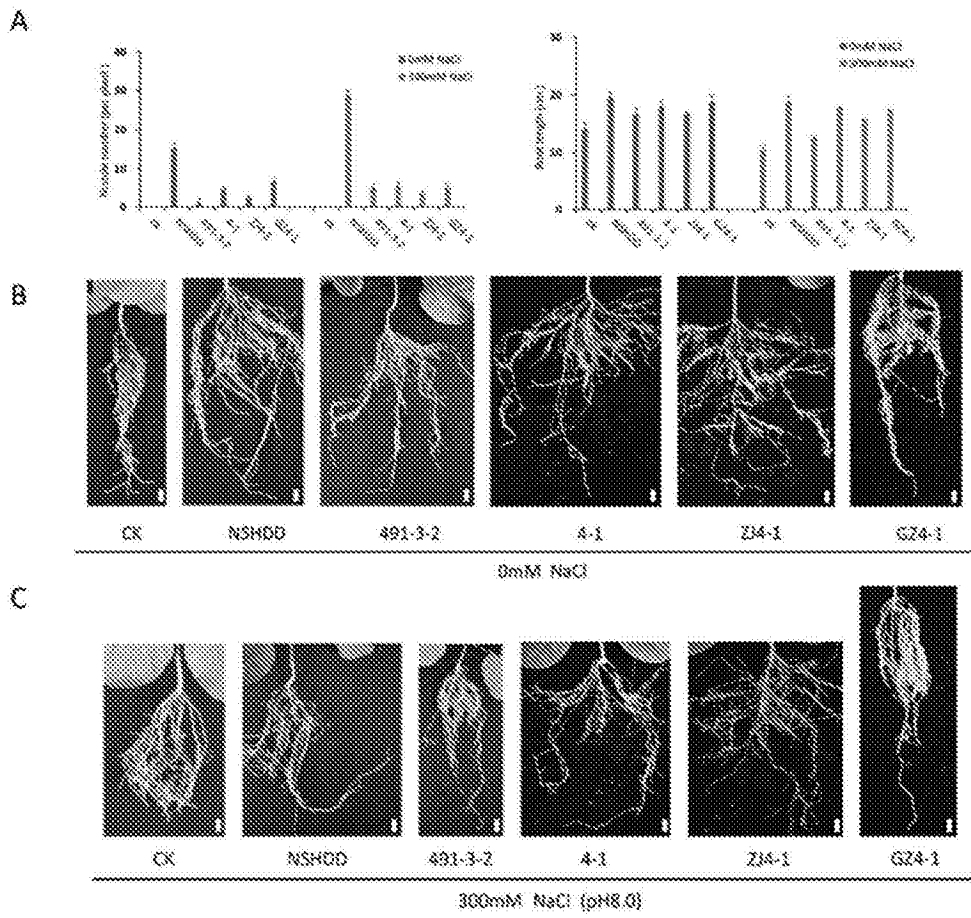


图4