



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113755408 B

(45) 授权公告日 2022. 09. 02

(21) 申请号 202111222649.4

(22) 申请日 2021.10.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113755408 A

(43) 申请公布日 2021.12.07

(83) 生物保藏信息
CGMCC No. 23455 2021.09.22

(73) 专利权人 河北萌帮生物科技有限公司
地址 054300 河北省邢台市临城县临城经济开发区纬六路6号

(72) 发明人 郭兴龙 康耀卫 黄燕菲 苑莹

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务所(特殊普通合伙) 11463
专利代理师 王焕

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A01N 63/22 (2020.01)

A01P 3/00 (2006.01)

A01P 21/00 (2006.01)

C12R 1/125 (2006.01)

审查员 刘九成

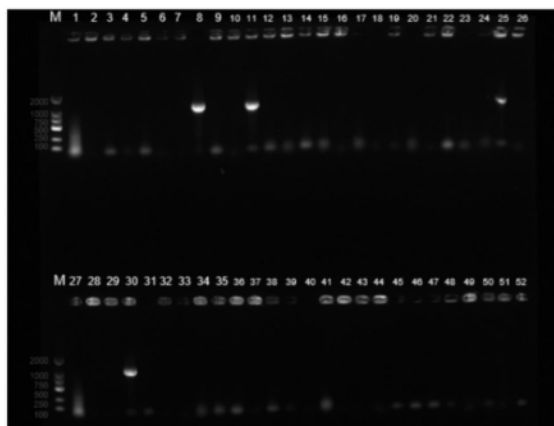
权利要求书1页 说明书12页
序列表2页 附图10页

(54) 发明名称

一种多功能枯草芽孢杆菌、复合菌剂及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种多功能枯草芽孢杆菌、复合菌剂及其应用,涉及微生物技术领域。所述枯草芽孢杆菌为枯草芽孢杆菌菌株KY374,保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.23455;所述菌株KY374对植物根系具有良好的定殖能力。本发明菌株对植物根系具有高亲和力,并对多种农作物的重要病原微生物具有极强杀菌活性,同时对作物根系具有促进生长的功能,尤其是在自然条件下具有高的植物根系定殖能力,能够促进植物生长,具有极高的商业价值及广阔的市场前景。



1. 一种多功能枯草芽孢杆菌, 其特征在于, 所述枯草芽孢杆菌为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株KY374, 保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为CGMCC No. 23455; 所述菌株KY374对植物根系具有良好的定殖能力、与植株具有亲和性。

2. 一种复合菌剂, 其特征在于, 所述复合菌剂包含权利要求1的所述枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株或所述枯草芽孢杆菌菌株的发酵产物。

3. 权利要求1所述的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株或权利要求2所述的复合菌剂在抑制或防治植物病害中的应用。

4. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述植物病害包括苹果斑点落叶病、梨黑斑病、小麦纹枯病、小麦根腐病、棉花枯萎病、西瓜枯萎病和番茄早疫病中的一种或多种。

5. 权利要求1所述的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株或权利要求2所述的复合菌剂在促进植物生长中的应用。

6. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于, 所述促进植物生长包括促进植物根系生长和/或促进植物种子萌发。

7. 根据权利要求5或6所述的应用, 其特征在于, 所述植物包括单子叶植物或双子叶植物。

8. 根据权利要求7所述的应用, 其特征在于, 所述植物为单子叶植物纲或双子叶植物纲的农作物。

9. 根据权利要求7所述的应用, 其特征在于, 所述植物包括大豆、玉米、绿豆和小麦中的一种或多种。

10. 根据权利要求7所述的应用, 其特征在于, 所述植物为玉米。

11. 权利要求1所述的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株或权利要求2所述的复合菌剂在制备植物促生长剂或微生物有机肥中的应用。

12. 一种促进植物在自然土壤条件下生长的方法, 其特征在于, 所述方法包括将权利要求1所述的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株或权利要求2所述的复合菌剂施用于所述植物或所述植物周围环境。

一种多功能枯草芽孢杆菌、复合菌剂及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,尤其是涉及一种多功能枯草芽孢杆菌、复合菌剂及其应用。

背景技术

[0002] 植物病害是影响作物减产的重要因素之一。植物病害包括例如根腐病、枯萎病、猝倒病、立枯病、疫病、黄萎病等种类。这类病害的病原物的生活史部分或大部分存在于土壤中,在条件适宜时,病原物萌发并侵染植物叶子、茎部或根部导致植物发生病害(Shi-Dong LI等,2011)。尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp.cubense)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)、大丽轮枝菌(*Verticillium dahlia*)、麦根腐平脐蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)和尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)这几种植物病原真菌对农作物的危害较大,一旦发病则大量减产,给农业生产带来巨大的经济损失。灰葡萄孢可以侵染多种蔬菜、水果和观赏植物的茎、叶、花和果实,寄主范围较广,危害较大(Bouchra C等,2003);茄病镰刀菌可在多种植物上引起根茎腐病、枯萎病、根腐病等(Roy K W,1997;Comparison of *Fusarium solani* and *F.oxysporum* as Causal Agents of Fruit Rot and Root Rot of Muskmelon[J],1993),造成多种农作物和经济作物发生严重的病害;尖孢镰刀菌侵染引起的枯萎病为毁灭性的土传病害,造成农作物严重减产甚至绝收。

[0003] 目前国内外通常采用物理、化学及生物方法防治植物病害。物理防治费时费力,且防治效果有限、受环境条件影响较大,因此应用受到限制;化学方法是国内外防治植物病害使用最频繁的防治方法。半个世纪以来,应用化学药剂防治植物土传病害在农业生产中发挥着重要作用,但长期不合理使用化学农药产生了诸多问题。化学农药的高毒、高残留不仅对人、畜的健康造成危害,而且对土壤、水体、大气造成严重污染;同时由于病菌和害虫抗药性的不断增强,农药的使用量和使用频率不断加大,造成土壤肥力严重下降,土壤微生物区系紊乱,伤害非靶标生物,破坏生态平衡,出现了用药量与病害相互递增的恶性循环,同时增加了农产品中农药的残留量,对人畜安全构成极大的威胁。大量使用化学药剂造成的各种问题已经不符合农业健康可持续发展的要求,因而,促使人们探寻一种对人类和环境友好并具良好防治效果的新的植物病虫害防治策略。

[0004] 生物防治因其环境友好、有效、持久和无药物残留等特点,特别是避免了化学防治带来的一系列问题(徐美娜,2005;许志刚,2000),已成为当前国内外防治植物土传病害的研究热点,具有较为广阔的应用前景。生物防治是指利用一种或多种微生物来抑制病原菌生命活力和繁殖能力的方法,常见机制有:改善土壤理化性质及营养状况促进植物生长,提高植物健康水平,增强寄主植物的抗病能力;利用生防细菌、真菌及放线菌等拮抗微生物的寄生、抗生作用,及其与病原菌的营养物质、生态位的竞争效应抑制和消灭病原菌;诱导寄主植物产生对病原菌的系统抗性(Current status and development strategy for biological control of plant diseases in China[J],2010;刘明稀等,2004)。利用有益

微生物防治植物病害始于1921年Hartely利用真菌防治猝倒病(*Pythium debaryanum damping-off*) (Tika B Adhikari等,2001);1973年Kerr利用放射土壤杆菌(*Agrobacterium radiobacter* K84)成功防治植物根瘤病。

[0005] 多年来植物病害生防微生物已涉及真菌、放线菌、细菌乃至病毒(噬菌体)等种群。细菌因庞大的种群、高繁殖力、复杂的代谢活动、对病原物的作用方式多样、易于人工培养,在自然发生的生物防治和人类应用生物防治的活动中起到了重要作用。目前,应用较多的生防细菌主要有芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、假单胞杆菌(*Pseudomonas* spp.)、土壤放射杆菌(*Agrobacterium radiobacter*)等(程亮等,2003)。

[0006] 芽孢杆菌是自然界广泛分布的生防细菌,因其具有庞大的种群,较强的繁殖力,稳定的理化性质,在科研和生产中应用较多,是理想的生防菌筛选对象。已报道的生防芽孢杆菌有枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)、多粘芽孢杆菌(*B. polymyxa*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) (Jamil Shafi等,2017)、蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、短小芽孢杆菌(*B. brevis*)等。枯草芽孢杆菌因其不污染环境,对人畜无害,抗逆能力强、内生芽孢、繁殖速度快、营养要求简单和对农作物安全,可以产生细菌素、酶类、活性蛋白质类、脂肽类和多肽类等多种抗菌物质(孟兆丽等,2018),抑菌谱广且对多种植物病害具较好防效的特点,被美国食品药品监督管理局和我国农业部列为对人畜安全的微生物,已作为益生菌和生物防治剂产品广泛应用于医药、畜牧、水产及农作物种植等领域(Chen Z等,2010;Mishra S等,2012),特别是开发成应用于多种植物病害生物防治的产品。

[0007] 近年来国内外有关枯草芽孢杆菌生防制剂的研究报道多偏重于菌株实验室筛选和其在培养皿上的抗菌功效评估(叶云峰,2011;叶云峰等,2011),很少研究不同枯草芽孢杆菌菌株在土壤或作物根系周围的生长和活动情况,在田间进行的大规模实际应用研究则更为缺乏,因此目前生物防治面临一个巨大的挑战:在田间生物防治产品的防治效果不稳定,市场上作为生防产品的枯草芽孢菌剂也面临着同样的问题。影响生物防治产品田间防治效果不稳定有多种因素如产品质量不达标、不适应田间土壤环境(温度、湿度、pH等)、土壤中原本存在的微生物种类的影响以及不具有植物亲和性等,决定田间防治效果最主要的因素是产品是否具有植物亲和性及产品在土壤中是否存活且可稳定繁殖。若产品与植物亲和性不高,施用后在土壤中活性弱,就容易被土壤中本身存在的细菌或者有害微生物竞争而取代,会导致施用产品中的微生物数量不具优势,在应用过程中就容易因其不能在田间地头的土壤中稳定存在和繁殖而导致其有效杀菌物质分泌量降低,从而造成防治效果不稳定,无法发挥出最大效应,影响产品的生防功能,进而影响产品的大面积推广应用,致使农民最终还是选择使用化学农药解决问题,无从响应国家减肥减药,绿色种植、环境友好的政策,最终形成一个“化学农药-抗药性病害-加大化学农药用量”的闭环。因此有必要进一步筛选出具有植物亲和力、可在田间土壤稳定存在和繁殖的且具有稳定生物防治效果的、适用于大规模应用的枯草芽孢杆菌菌株。

[0008] 鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0009] 本发明的目的在于提供一种多功能枯草芽孢杆菌、复合菌剂及其应用,以解决现

有技术中生物防治产品在田间防治效果不稳定、不具有植物亲和性以及易受土壤环境影响的技术问题。

[0010] 本发明提供的技术方案如下：

[0011] 在一个方面，本发明提供了一种多功能枯草芽孢杆菌，所述枯草芽孢杆菌为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株KY374，保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为CGMCC No.23455；所述菌株KY374对植物根系具有良好的定殖能力。

[0012] 本发明采集到30个不同省市的土样，采用加热-富集和高通量相结合的方法筛选枯草芽孢杆菌，从大约2.5万株微生物菌株中筛选得到3724株耐高温产芽孢的微生物菌株，以此为基础采用枯草芽孢杆菌的特异引物对3724株菌株进一步筛选，获得了35株与特异引物有阳性反应的枯草芽孢杆菌。通过分别将35株枯草芽孢杆菌接种于玉米根系，发现了5株枯草芽孢杆菌在玉米根系具有良好的定殖能力，同时也针对它们的杀真菌生物活性和促进作物种子发芽能力等生物功能做了进一步的测试。结果发现，其中一株具有高植物亲和力、杀菌活性稳定的枯草芽孢杆菌命名为KY374。经过进一步研究，该枯草芽孢杆菌的16s DNA基因序列如SEQ ID NO:5所示，属于*Bacillus subtilis*菌株。

[0013] 本发明筛选得到的枯草芽孢杆菌KY374与单子叶、双子叶植物均具有较好的亲和性，同时对土传病原微生物具有明显的拮抗作用，还兼具有抗逆性(耐盐、耐酸碱)、促进作物发芽的功能。

[0014] 在另一个方面，本发明提供了一种复合菌剂，所述复合菌剂包含前述枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株KY374或所述枯草芽孢杆菌菌株的发酵产物。所述复合菌剂包含有效量的所述枯草芽孢杆菌，例如活菌量在 10^5 cfu/g以上。所述菌株KY374可与农业上可接受的载体、赋形剂和/或佐剂一起混合。所述复合菌剂可以为液态菌剂或者固态菌剂。

[0015] 在另一个方面，本发明还提供了所述枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株KY374或所述复合菌剂在抑制或防治植物病害中的应用。特别地，本发明的菌株或复合菌剂可用于防治植物土传病。

[0016] 在一个实施方案中，所述植物病害包括苹果斑点落叶病、梨黑斑病、小麦纹枯病、小麦根腐病、棉花枯萎病、西瓜枯萎病、番茄早疫病和香蕉枯萎病专化型3中的一种或多种。

[0017] 在另一个方面，本发明还提供了所述枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株或所述复合菌剂在促进植物生长中的应用。

[0018] 在一个实施方案中，所述促进植物生长包括促进植物根系生长和/或促进植物种子萌发。

[0019] 在一个实施方案中，所述植物包括单子叶植物或双子叶植物；优选地，所述植物为单子叶植物纲或双子叶植物纲的农作物。

[0020] 在一个实施方案中，所述植物包括大豆、玉米、绿豆和小麦中的一种或多种；优选地，所述植物为玉米。本发明的菌株KY374与所述植物具有较好的亲和性。在本发明的研究中，35株不同的枯草芽孢杆菌中仅显示有5株对玉米根系具有良好的亲和性。本发明中，亲和性判断的方法为作物(例如玉米)发芽后，用枯草芽孢杆菌的菌悬液对作物进行浇灌，生长1周后，作物根系分离的细菌量可达 10^5 cfu/g以上，则被认定为与作物具有亲和性。

[0021] 在另一个方面，本发明还提供了所述枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌株KY374或所述复合菌剂在制备植物促生长剂或微生物有机肥中的应用。本发明的菌株KY374

或所述复合菌剂的使用可以显著减少化肥用量。本发明的所述枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株或所述复合菌剂可用于制备田间生物防治产品 (例如生防菌剂、种子包衣剂等) 以促进植物在田间自然条件下的生长发育。

[0022] 在另一个方面, 本发明还提供了一种促进植物在自然土壤条件下生长的方法, 所述方法包括将有效量的所述的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株KY374或所述复合菌剂施用于所述植物或所述植物根部周围环境。具体地, 可将所述菌株制成菌悬液施用于植物 (例如以浇根、蘸根等方法) 或植物种子 (例如拌种、包衣), 或者施用于围绕植物或植物种子的土壤中。所述植物包括单子叶植物纲或双子叶植物纲的农作物, 例如包括但不限于大豆、玉米、绿豆或小麦等。

[0023] 本发明的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株KY374采集自江西省南昌市青山湖区; 该菌株于2021年9月22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, 地址: 北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所, 菌种保藏号: CGMCC No. 23455。经该保藏中心于2021年9月22日检测为存活。

[0024] 有益效果:

[0025] 本发明提供的枯草芽孢杆菌KY374以及含有其的复合菌剂对植物具有高的亲和力, 能够促进植物种子萌发和根系生长, 可以促进增加作物产量; 同时, 本发明的枯草芽孢杆菌KY374及含所述复合菌剂能够全面防治多种植物常见病害 (对植物病原菌抑菌谱较广), 有利于提升农作物的品质。特别地, 本发明的菌株能够在自然条件下在植物根际能够快速大量定殖, 长期定居存活, 具有生态位优势, 能够发挥促进植物在自然土壤条件下的生长和营养吸收。

[0026] 本发明的枯草芽孢杆菌KY374兼具良好的耐盐、耐碱性、耐酸性, 综合性能突出, 是一株具有高植物亲和力、可稳定防治植物病害且兼具抗逆性、促进作物种子发芽的多功能微生物菌株。本发明对降低化肥使用量, 维持农业健康、可持续发展有重要意义。

附图说明

[0027] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案, 下面将对具体实施方式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, 下面描述中的附图是本发明的一些实施方式, 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。

[0028] 图1为本发明从筛选得到的芽孢菌属菌株中随机挑选50株进行枯草芽孢杆菌特异性PCR验证实验的琼脂糖电泳结果图 (其中, 泳道8、11、30为枯草芽孢杆菌阳性, 泳道25、26分别为阳性对照枯草芽孢菌株92068和空白对照);

[0029] 图2为本发明从筛选得到的5株枯草芽孢菌株与各植物病原菌拮抗实验的结果;

[0030] 图3为本发明筛选得到的5株枯草芽孢菌株在5%、10%、15%、20% KNO_3 上的生长结果;

[0031] 图4为本发明筛选得到的5株枯草芽孢菌株在pH11、pH12和pH4.5的R2A培养基上的生长结果;

[0032] 图5为本发明筛选得到的5株枯草芽孢菌株对玉米种子的促生结果;

[0033] 图6为本发明筛选得到的5株枯草芽孢菌株对小麦种子的促生结果;

- [0034] 图7为本发明筛选得到的5株枯草芽孢菌株对绿豆种子的促生结果；
- [0035] 图8为本发明筛选得到的5株枯草芽孢菌株对大豆种子的促生结果；
- [0036] 图9为本发明菌株KY374在显微镜下观察结果；
- [0037] 图10为本发明实施例7中菌株植物亲和力实验验证结果；
- [0038] 图11为本发明实施例7中菌落特异性PCR的验证结果(其中,上胶为从涂布的Rif-R2A培养基上随机挑选的菌株PCR结果:泳道1和2分别为92068、92068-1,泳道26为空白的电泳结果;下胶为从涂布的Sm-R2A培养基上随机挑选的菌株PCR结果:泳道1和2分别为KY374、KY374-2,泳道26为空白的电泳结果)。

具体实施方式

[0039] 下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。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。

[0040] 实施例1. 枯草芽孢杆菌的筛选

[0041] 利用高温加热-高通量法筛选枯草芽孢杆菌,具体步骤如下:

[0042] 1.1. 土样的采集

[0043] 从全国各地30个不同省份选择具有代表性的土壤进行采集,比如沙土、粘土、黑土等,样品可以来源于农田、牧草地、森林土等不同的区域,尤其是对种植玉米、甘蔗等的土壤进行采样,每个点采集15~20克样品,同时标明来源地(省,县)、采集年月、土壤的来源(植物,沙土、或其他),放于-80℃冰箱保藏,建立土壤资源库,目前共采集到来源于全国各个省市的土样230个。

[0044] 1.2. 利用高温加热-高通量法筛选枯草芽孢杆菌

[0045] (1)取0.5g土样于15mL纯净水中摇匀后吸取1mL混合液于两个1.5mL离心管中,取其中一个离心管于金属浴中80℃加热30min,待冷却至室温后震荡摇匀,取上述两个离心管的混合液经梯度稀释后各取100μL分别涂布于R2A固体培养基上(酵母粉0.5g,蛋白胨0.5g,胰蛋白胨0.5g,葡萄糖0.5g,可溶性淀粉0.5g,磷酸氢二钾0.3g,丙酮酸钠0.3g,七水硫酸镁0.05g,琼脂粉15g,水1000mL),每个稀释度分别涂布3个R2A固体培养基,培养箱37℃培养待菌株生长,观察加热处理后的土样与正常土样混合液菌株数量和种类的区别;

[0046] (2)从上述经加热处理后的土样稀释培养基中挑取菌株于固体R2A培养基上划线培养纯化(培养箱37℃),待菌株生长后对所得菌株进行枯草芽孢杆菌特异性PCR的初步验证。

[0047] 1.3. 枯草芽孢杆菌特异性PCR验证

[0048] 将步骤2所得的菌株进行枯草芽孢杆菌特异性PCR验证,判断所得菌株的是否为枯草芽孢杆菌(阳性对照为枯草芽孢杆菌92068)。

[0049] 1.3.1CTAB法提取细菌DNA

[0050] (1)接种一单菌落于5mL的R2A中,30℃培养过夜;(2)取1mL种子培养液接入100mL R2A液体中,37℃、220r/min培养16小时;(3)5000r/min离心10分钟,弃去上清;(4)加入10mL TE离心洗涤后,用10mL TE溶解菌体,混匀,-20℃保存备用;(5)取3.5mL菌悬液,加入184μL

10% SDS, 混匀, 加入37 μ L 10mg/mL的蛋白酶K, 混匀, 37 $^{\circ}$ C温育1小时; (6) 加入740 μ L 5mol/L NaCl, 再加入512 μ L CTAB/NaCl, 混匀, 65 $^{\circ}$ C温育10分钟; (7) 加入等体积的氯仿/异戊醇, 混匀, 10000r/min离心5分钟, 保留上清; (8) 上清中加入等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1), 混匀, 10000r/min离心5分钟, 保留上清; (9) 加入0.6倍体积的异丙醇, 混匀, 10000r/min离心5分钟, 收集DNA沉淀, 用70%乙醇离心洗涤DNA沉淀; (10) 用1mL TE溶解DNA, 加入终浓度为20 μ g/mL RNaseA, 4 $^{\circ}$ C保存。

[0051] 1.3.2 扩增与测序

[0052] 采用枯草芽孢杆菌特异性引物EN1F (SEQ ID No. 1: 5'-CCAGTAGCCAAGAATGGCCAGC-3') 和EN1R (SEQ ID No. 2: 5'-GGAATAATCGCCGCTTTG TGC-3') 进行16S rDNA的PCR扩增。PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5min; 94 $^{\circ}$ C变性1min, 55 $^{\circ}$ C退火30s, 72 $^{\circ}$ C延伸90s, 30个循环。将PCR产物进行1.5%的琼脂糖凝胶电泳, PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后进行电泳成像, 根据对照枯草芽孢杆菌92068的跑胶结果, 将所得菌株与对照进行对比, 初步判定是否为枯草芽孢杆菌。

[0053] 1.4. 结果分析

[0054] 通过上述方法对所采集到的30个不同省市的土样进行高温加热-高通量法筛选, 筛选得到约3724株芽孢菌属菌株, 其中有35株菌株与枯草芽孢杆菌的特异引物有阳性反应(比例大约是0.9%), 表明它们属于枯草芽孢杆菌。

[0055] 图1为从所得的3724株芽孢菌属菌株中随机挑选50株, 以中国农业科学院赠予的枯草芽孢杆菌92068为对照(图1中泳道25)进行枯草芽孢杆菌特异性PCR验证后琼脂糖电泳的结果, 从图中可以看出50株菌株内有3株菌株(泳道8、11、30)与枯草芽孢杆菌的特异引物有阳性反应的菌株。此外, 研究结果也表明, 枯草芽孢杆菌的数量在不同土壤样品中差异极为显著, 在我们采集的许多土壤样品中没有分离到枯草芽孢杆菌。

[0056] 实施例2. 筛选所得的枯草芽孢杆菌菌株与玉米植株的亲性和测试

[0057] 2.1. 菌悬液的制备

[0058] 将35株不同的枯草芽孢杆菌株接种到含50mL R2A液体培养基的250mL三角瓶中, 30 $^{\circ}$ C下200r/min培养48小时后分别配制成OD_{600nm}=0.1的菌液备用。

[0059] 2.2. 不同枯草芽孢杆菌对玉米植株的亲性和测试

[0060] (1) 取适量蛭石进行121 $^{\circ}$ C高压灭菌20min后用合适的杯子分装成35份, 每份蛭石重量误差控制在5g之内, 并根据不同的枯草芽孢杆菌株进行编号标记;

[0061] (2) 挑选颗粒饱满、大小均匀、未破碎的玉米种子, 接种到步骤(1)中分装好的蛭石中, 每杯种植玉米约5粒, 适时浇水待玉米发芽;

[0062] (3) 待玉米发芽后, 分别浇入对应的所制备的枯草芽孢杆菌菌液30mL, 待玉米生长1周(期间适时补浇水确保玉米正常生长), 分别收集浇灌不同枯草芽孢杆菌菌液的玉米根系, 并做好记录;

[0063] (4) 分别从不同枯草芽孢杆菌菌液浇灌的玉米根系采集根系样品并对这些根系样品采用梯度稀释分离方法进行细菌的分离和计量。剪下玉米根部, 分别从玉米根系进行细菌分离, 加少量水充分研磨后收集研磨液, 梯度稀释涂布于R2A固体培养基, 培养箱30 $^{\circ}$ C培养, 待菌株生长进行菌株数量统计;

[0064] 注: 菌株数量达到 $\geq 10^5$ cfu/g, 判定为与植株具有亲和性; 菌的数量越大, 表明该

菌株与植物的亲和性越好； $<10^5$ cfu/g,判定为与植株不具有良好的亲和性； $>10^5$ cfu/g,判定为与植株具有高亲和性。

[0065] (5) 从步骤(4)中R2A固体培养基中分别挑选25个菌落进行枯草芽孢杆菌特异性PCR的验证,验证菌落是否为枯草芽孢杆菌。如果大部分菌落与枯草芽孢杆菌的特异引物没有阳性反应,则表明接种该玉米的枯草芽孢杆菌对玉米根系不具有良好的亲和力(即良好的定殖能力),或表明在R2A培养基上分离到的细菌不是来源于接种的枯草芽孢杆菌(即不是筛选所得的35株枯草芽孢杆菌),而是来源于环境中的背景微生物菌株。

[0066] 2.3. 不同枯草芽孢杆菌对玉米植株的亲和性测试的结果

[0067] 通过用35株不同枯草芽孢杆菌对玉米进行菌液浇灌,分别从对应玉米根系进行细菌分离进行菌株数量统计,依据亲和性判定标准:经过玉米1周的生长,35株枯草芽孢杆菌中有5株枯草芽孢杆菌从玉米根系分离的细菌量可达 10^5 cfu/g以上,这些菌株被认定为与玉米具有亲和性(结果见表1),其他测试菌株的数量都不能达到 10^5 cfu/g以上(例如KY417(ZZ-1)的细菌量为 4.45×10^4 cfu/g);达到亲和性标准的菌株分别为KY231、KY374、KY384、KY423(LTZ-3)、KY474(ALE-2),其中细菌量最多的菌株为KY374和KY423(LTZ-3),二者细菌量分别为 4.77×10^6 cfu/g和 1.58×10^6 cfu/g,与玉米具有高亲和性。

[0068] 表1. 5株具有玉米植株的亲和性的枯草芽孢杆菌的菌株数量结果

[0069]

菌株	从根部分离得到的细菌量(cfu/g)
KY231	1.27×10^5
KY384	3.41×10^5
KY374	4.77×10^6
KY423(LTZ-3)	1.58×10^6
KY474(ALE-2)	5.36×10^5
KY417(ZZ-1)	4.45×10^4

[0070] 实施例3. 测试枯草芽孢菌杀病原微生物活性的实验

[0071] 3.1. 测试功能菌株对植物病原菌的杀菌活性实验

[0072] 将筛选得到的5株枯草芽孢菌株(KY231、KY374、KY384、KY423(LTZ-3)、KY474(ALE-2))分别与植物病原菌苹果斑点落叶病、梨黑斑病、小麦纹枯病、小麦根腐病、棉花枯萎病、西瓜枯萎病、番茄早疫病、香蕉枯萎病专化型3同时接种于PDA培养基上,观察枯草芽孢菌株是否对植物病原菌产生拮抗作用。设置枯草芽孢杆菌92068菌株为对照。

[0073] 3.2. 菌株抗植物病原菌试验结果

[0074] 结果测定(图2和表2)表明,与对照菌株92068相比,筛选所得的5株枯草芽孢菌株(KY231、KY374、KY384、KY423(LTZ-3)、KY474(ALE-2))对小麦根腐病、梨黑斑病、苹果斑点落叶病、番茄早疫病具有更强或者相似的拮抗作用,且不同枯草芽孢菌株对同一个植物病原菌的拮抗力度具有个体差异性。

[0075] 表2. 枯草芽孢菌株与各植物病原菌拮抗实验的结果

	香蕉枯萎病专化型 3	小麦根腐病	梨黑斑病	苹果斑点落叶病	番茄早疫病	西瓜枯萎病	小麦纹枯病	棉花枯萎病
92068	-	++	+	+	++	-	-	+
KY231	-	++	+	+	++	-	+	-
KY374	+	++	+	+	++	+	+	+
KY384	++	++	++	++	++	+	+++	+
KY423	++	++	++	++	++	+	++	+
KY474	+	++	++	++	++	-	++	-

[0076] (注：“++”代表菌株对植物病原菌拮抗作用较强；“+”代菌株对植物病原菌具有拮抗作用；“-”代表菌株对植物病原菌拮抗作用弱或者几乎没有。)

[0077] 综合图2和表2,结果表明与对照菌株92068相比,筛选所得的5株枯草芽孢杆菌中拮抗植物病原菌种类最多的菌株为KY374、KY384、KY423、KY474次之。

[0078] 实施例4. 测试枯草芽孢菌株抗逆性实验

[0079] 4.1. 菌株抗逆性测定

[0080] 将筛选得到的5株枯草芽孢菌株 (KY231、KY374、KY384、KY423 (LTZ-3)、KY474 (ALE-2)), 接种到条件为5%KNO₃、10%KNO₃、15%KNO₃、20%KNO₃、pH4.5、pH11、pH12的R2A培养基上, 观察菌株是否生长, 以及生长是否受抑制和生长速度的快慢。设置枯草芽孢杆菌92068菌株为对照。

[0081] 4.2. 菌株抗逆性测定结果

[0082] 综合图3、图4和表3, 结果表明与对照菌株92068相比, 筛选所得的5株枯草芽孢杆菌 (KY231、KY374、KY384、KY423 (LTZ-3)、KY474 (ALE-2)) 均具有很好的耐盐性, 且在pH11、pH12的培养基上具有与对照菌株92068相似的耐碱性; 其中菌株KY231、KY423与对照菌株92068在pH12的培养基上可以生长, KY374、KY474长势稍弱; 在pH4.5培养基上, 菌株KY374、KY384可正常生长, 其他菌株的生长受到抑制。

[0083] 表3. 枯草芽孢菌株在pH4.5和pH12的R2A培养基上的生长结果

	5%KNO ₃	10%KNO ₃	15%KNO ₃	20%KNO ₃	pH4.5	pH11	pH12
92068	++	++	++	++	弱	++	++
KY231	++	++	++	++	-	++	++
KY374	++	++	++	++	++	+	弱
KY384	++	++	++	++	+	+	-
KY423	++	++	++	++	-	++	++
KY474	++	++	++	++	-	++	+

[0084] (注：“++”代表菌株在此条件下可生长且不受抑制；“+”代表菌株在此条件下可生长且开始受抑制；“弱”代表菌株在此条件下生长微弱；“-”代表菌株在此条件下不可生长。)

[0085] 实施例5. 枯草芽孢菌株对植物根际促生作用 (PGPR) 实验

[0086] 5.1 菌悬液的制备

[0089] 将对照92068、5株枯草芽孢菌株 (KY231、KY374、KY384、KY423 (LTZ-3)、KY474 (ALE-2)) 接种到含50mLR2A液体培养基的250mL锥形瓶中,30℃下,200r/min培养48小时后分别配制成 $OD_{600nm} = 0.1$ 的菌液备用。

[0090] 5.2种子包衣

[0091] 分别进行大豆种子、玉米种子、绿豆种子、小麦种子的包衣,每100克种子喷洒300 μ L菌液,挑选颗粒饱满、大小均匀、未破碎经包衣处理的种子,接种到琼脂浓度为0.5%培养基中(琼脂5g,水1000L)进行发芽试验,每皿10粒,每个处理重复4次,避光培养。

[0092] 设置枯草芽孢杆菌92068菌株包衣的种子为阳性对照,设置分别用水包衣的种子为空白对照。从第2天起观察种子的根生长情况,计算各种子的发芽指数。

[0093] 注:大豆、绿豆种子发芽指数 $G = 0*N + 1*N + 2*N + 3*N + 4*N$ (N表示该级别的个数);玉米、小麦种子发芽指数 $G = N*(0+X) + N*(1+X) + N*(2+X) + N*(3+X) + N*(4+X)$ (N表示该级别的个数,X表示该级别种子的侧芽及侧根总数);

[0094] 0代表未发芽;1代表芽长为0-0.5cm;2代表芽长为0.5-1.0cm;3代表芽长为1.0-1.5cm;4代表芽长为大于3cm。

[0095] 5.3种子萌发实验结果

[0096] 图5至图8分别示出了枯草芽孢菌株对玉米种子、小麦种子、绿豆种子以及大豆种子促生结果,表4示出了不同菌液对玉米种子、小麦种子、绿豆种子、大豆种子发芽指数的影响。

[0097] 表4. 不同菌液对玉米种子、小麦种子、绿豆种子、大豆种子发芽指数的影响

P<0.01	玉米种子发芽指数	小麦种子发芽指数	绿豆种子发芽指数	大豆种子发芽指数
水	52.0d	38.0b	23.3c	19.3c
92068	60.3c	41.3ab	23.7c	20.3c
[0098] KY231	61.0bc	45.3a	29.0ab	28.3a
KY374	72.7a	46.0a	30.3a	27.7a
KY384	62.3bc	47.0a	30.7a	29.7a
LTZ-3(KY423)	66.7b	44.0ab	31.0a	24.7abc
ALE-2(KY474)	65.7bc	44.0ab	27.7ab	27.7a

[0099] 综合图5-图8和表4,结果表明,5株枯草芽孢菌株 (KY231、KY374、KY384、KY423 (LTZ-3)、KY474 (ALE-2)) 对大豆种子、玉米种子、绿豆种子、小麦种子有促进萌发的作用,发芽指数明显高于对照枯草芽孢杆菌菌株92068。其中与对照枯草芽孢杆菌菌株92068、空白对照(水)相比,菌株KY231、KY374、KY384对小麦种子萌发的促进作用通过SPSS分析在 $P < 0.01$ 水平上有极显著差异性;菌株KY374、KY384、KY423 (LTZ-3)对绿豆种子萌发的促进作用通过SPSS分析在 $P < 0.01$ 水平上有极显著差异性;菌株KY231、KY374、KY384、KY474 (ALE-2)对大豆种子萌发的促进作用通过SPSS分析在 $P < 0.01$ 水平上有极显著差异性;KY374菌株对玉米种子萌发的促进作用通过SPSS分析在 $P < 0.01$ 水平上有极显著差异性。

[0100] 综合可得出结论:菌株KY374对大豆种子、玉米种子、绿豆种子、小麦种子均有促进萌发的作用,且具有极显著差异 ($P < 0.01$)。因此,有理由认为菌株KY374对植物亲和性较好,同时菌株KY374还具有较好的耐盐、耐碱性、耐酸性及对植物病原菌抑菌谱较广的特点。

[0101] 实施例6. 菌株KY374的16sDNA测序及菌株生理形态分析

[0102] 6.1KY374菌株16sDNA的测定

[0103] 6.1.1CTAB法提取细菌DNA(具体步骤同实施例1.3.1)。

[0104] 6.1.2扩增与测序

[0105] 采用16S rDNA通用引物27f(SEQ ID No.3:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492r(SEQ ID No.4:5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3')进行16S rDNA的PCR扩增。

[0106] PCR反应条件:94℃预变性30s;94℃变性30s,52℃退火30s,72℃延伸60s,35个循环。将PCR产物进行1.5%的琼脂糖凝胶电泳,PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后回收纯化测序,根据获得的16S rDNA序列在GenBank中Blast搜索同源序列并进行同源序列分析对比,建立系统发育树。

[0107] 6.2菌株KY374的16s DNA测序结果

[0108] 测序结果显示,菌株KY374的16s DNA序列如下SEQ ID No.5所示:TTCGGCGGCTGGCTCCTAAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTACAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGCCCCGG AACGTATTCACCGCGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGGTTTCGCTGCCCTTGTCTGTCCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGTTTGTACCCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCAGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCCTGCCCCGAAGGGGACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGTTCTTCGCGTTGCTTCAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATCCACTCTCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTCTGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTCGAACGGTACTTGTCTTCCCTAACACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGGCGGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCATTGCGGAAGATTCCTACTGCTGCCCTCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGATCACCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTTGCCCTGGTGAGCCGTTACCTACCAACTAGCTAATGCGCCGCGGGTCCATCTGTAAGTGGTAGCCGAAGCCACCTTTTATGTTTGAACCATGCGGTTCAAACAACCATCCGTATTAGCCCCGTTTCCCGGAGTTATCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTACCCGTCGCGCGCTAACATCAGGGAGCAAGCTCCCATCTGTCCGCTCGACTTGC。

[0109] 将菌株KY374的16sDNA序列与已知枯草芽孢杆菌进行同源比对分析(采用Fast Minimum Evolution方法),证明其与已知枯草芽孢杆菌(如Bacillus subtilis菌株JCL-16,IB-22)具有100%的同源性。

[0110] 6.3菌株形态观察

[0111] 将筛选的菌株接种到R2A平板上,室温下培养2d,观察菌落的大小、形状、颜色、光泽度、黏稠度、隆起形状、透明度、边缘特征等。

[0112] 经观察菌株在R2A培养基上培养生长2d,显微镜下观察菌株呈杆状,菌落在培养基上呈圆形片状,菌落白色,粗糙褶皱,边缘不整齐,较大,不透明,不粘稠,经显微镜测定其菌体直径约2-3μm,孢子直径约1-2μm,如图9所示。

[0113] 实施例7.菌株KY374在自然土壤与玉米植物亲和力实验验证

[0114] 在前述实施例中筛选与植物具有良好亲和性的枯草芽孢杆菌菌株的方法采用的种植环境体系为经过高压灭菌消毒的蛭石材料,优点是避免了自然土壤中天然微生物或已经存在的枯草芽孢杆菌菌株对筛选与植物具有良好亲和性的枯草芽孢杆菌试验结果的干扰,同时也为了方便菌株筛选工作的正常进行;但是不能表明经过本体系筛选的枯草芽孢杆菌菌株在自然条件下也对玉米作物具有同样的亲和性和根系定殖能力。

[0115] 为了进一步测试菌株KY374与植物的亲和力或根系的定殖能力,需要采用以一株广泛应用的商业菌株92068为对照来比较二者在自然土壤条件下对玉米的亲和性和根系的定殖能力。由于在自然土壤中存在大量的天然微生物种群,其中也包括天然的枯草芽孢杆菌,因此为避免不能区分目标菌株,需要对菌株KY374和商业菌株92068进行生物标记以方便区分目标菌株和土壤中的枯草芽孢杆菌。

[0116] 我们采用两种不同抗生素对菌株KY374和商业菌株92068进行生物标记,利用自发突变的方法,分别获得了商业菌株92068对利福平的自发突变体--变异株92068-1及KY374菌株抗链霉素的自发突变株KY374-2,采用二者抗生素的突变体菌液对自然土壤种植的植物进行浇灌,并结合枯草芽孢杆菌的特异PCR引物进行特异性PCR作进一步确认,就可以研究目标菌株在自然土壤条件下对植物根部的定殖能力,即与植物的亲和性。以下为实验的具体操作过程和实验结果。

[0117] 7.1菌株KY374与92068菌株单一抗性突变实验

[0118] (1) 将92068、KY374菌株接种到含50mL R2A液体培养基的250mL锥形瓶中,30℃下200r/min培养48小时;

[0119] (2) 取200μL、400μL、600μL菌株92068的菌悬液分别涂布于含100μg/mL利福平抗生素的R2A (Rif-R2A) 固体培养基中;取200μL、400μL、600μL KY374菌悬液涂布于含50μg/mL链霉素抗生素的R2A (Sm-R2A) 固体培养基中,培养箱30℃培养待菌株生长;

[0120] 挑取在Rif-R2A和Sm-R2A固体培养基生长的细菌5株于R2A上进行划线纯化,将纯化的菌株进行枯草芽孢杆菌特异性PCR的验证,验证菌落是否为枯草芽孢杆菌,从电泳条带结果判定菌株与野生型菌株是否存在很大的差异,差异很大的表明不是枯草芽孢杆菌,应及时排除。

[0121] 7.2菌株KY374与92068菌株单一抗性突变结果

[0122] 将纯化后和琼脂糖电泳确定的菌株重新在100μg/mL Rif-R2A和50μg/mL Sm-R2A固体培养基进行培养,排除二者抗生素假阳性菌株,最后得到菌株92068-1和菌株KY374-2可分别在100μg/mL Rif-R2A和50μg/mL Sm-R2A上稳定生长,因此后续植物亲和性试验均使用这两菌株进行。

[0123] 7.3菌株KY374植物亲和力实验验证

[0124] (1) 取适量的玉米播种于装有自然土壤(广东肇庆鼎湖永安镇玉米地土壤)的盆栽中,观察盆中土壤的湿润情况,适时浇灌(一般间隔2天浇灌一次),直至玉米萌发;

[0125] (2) 将变异株菌株92068-1和变异株菌株KY374-2接种到含100mLR2A液体培养基的250mL锥形瓶中,30℃下200r/min培养48小时后分别配制成 $OD_{600nm}=0.8$ 的菌悬液;

[0126] (3) 取 $OD_{600nm}=0.8$ 菌株92068-1和菌株KY374-2的菌悬液各100mL,混合后浇入已萌发的玉米盆栽中,2小时后待土壤完全吸收菌液后,拔出适量玉米苗,设置为零点,剪下其根部约1g,加少量水充分研磨后收集研磨液,梯度后稀释涂布于100μg/mL Rif-R2A和50μg/mL

Sm-R2A固体培养基,培养箱30℃培养,待菌株生长进行菌株数量统计,计算二者的比例;

[0127] (4) 每天观察玉米生长情况,适量浇水,两天后,拔出适量玉米苗,设置为2天点(每间隔两天取一次玉米苗进行菌株数量统计,每点分别标记为2天、4天、6天.....),剪下玉米苗根部约1g,加少量水充分研磨后,梯度稀释涂布于100 μ g/mL Rif-R2A和50 μ g/ml Sm-R2A固体培养基,培养箱30℃培养,待菌株生长进行菌株数量统计,计算二者的比例。

[0128] (5) 从最后一次(6天点)梯度稀释后于培养箱培养24h的100 μ g/mL Rif-R2A和50 μ g/mL Sm-R2A固体培养基中随机分别挑选25个菌落进行枯草芽孢杆菌特异性PCR的验证,验证菌落是否为枯草芽孢杆菌。

[0129] 7.4菌株KY374植物亲和力实验验证结果

[0130] 图10和表5结果表明,零点时,菌株92068-1和菌株KY374-2菌株数量分别是0.58亿/g和0.54亿/g,二者比例为1:1,随着时间的增长,二者菌株数量为0.03亿/g和0.96亿/g,二者比例为1:20,数量相差近有20倍;从图11结果可见,从100 μ g/mL Rif-R2A固体培养基中挑选的菌株经枯草芽孢杆菌特异性PCR,菌株条带与其原始菌株92068和92068-1条带位置不一,有的甚至没有条带,说明随时间的推移菌株92068-1数量有不断减少,甚至趋于0的情况;而从Sm-R2A固体培养基中挑选的菌株经枯草芽孢杆菌特异性PCR,菌株条带与其原始菌株KY374和KY374-2条带位置相同,说明菌株KY374-2与玉米亲和性高,可定殖于玉米根部,不会随着时间的增长而减少。

[0131] 表5. 菌株植物亲和力实验验证结果

[0132]

	92068-Rif-R2A (亿/g)	KY374-Sm-R2A (亿/g)
0天	0.58	0.54
2天	0.43	0.52
4天	0.21	0.89
6天	0.027	0.96

[0133] 本研究通过采用高温加热-高通量法筛选方法从江西省南昌市青山湖区采集的土壤中分离到了一株具有高植物亲和力、可稳定防治植物病害的枯草芽孢杆菌KY374,经过对该菌株的16sDNA的序列测定分析,该菌株与*Bacillus subtilis*具有高度同源。KY374与商业菌株枯草芽孢菌株92068相比,其与植物具有较高的亲和性,在种子萌发实验中,KY374菌株对大豆种子、玉米种子、绿豆种子、小麦种子均有促进萌发的作用,且具有极显著差异($P < 0.01$),同时菌株KY374还兼具较好的耐盐、耐碱性、耐酸性及对植物病原菌抑菌谱较广的特点。由此可见,KY374是一株具有高植物亲和力、可稳定防治植物病害的枯草芽孢杆菌,兼具抗逆性、促进作物种子发芽的功能性微生物菌株。

[0134] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 河北萌帮生物科技有限公司
- [0003] <120> 一种多功能枯草芽孢杆菌、复合菌剂及其应用
- [0004] <130> PA21028443
- [0005] <160> 5
- [0006] <170> PatentIn version 3.3
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 22
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] ccagtagcca agaatggcca gc 22
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 21
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列
- [0017] <400> 2
- [0018] ggaataatcg ccgctttgtg c 21
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 20
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列
- [0023] <400> 3
- [0024] agagtttgat cctggctcag 20
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 19
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <400> 4
- [0030] ggttacctg ttacgaatt 19
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 1421
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 16s DNA
- [0035] <400> 5
- [0036] ttcgccggct ggctcctaaa aggttacctc accgacttcg ggtgttacia actctcgtgg 60
- [0037] tgtgacgggc ggtgtgtaca aggcccggga acgtattcac cgcggcatgc tgatccgca 120
- [0038] ttactagcga ttccagcttc acgcagtcga gttgcagact gcgatccgaa ctgagaacag 180
- [0039] atttgtggga ttggetaac ctcgcggttt cgctgccett tgtttctgtcc attgtagca 240
- [0040] gtgtgtagcc caggtcataa ggggcatgat gatttgacgt catccccacc ttcctccgt 300
- [0041] ttgtcaccgg cagtcacctt agagtgccca actgaatgct ggcaactaag atcaagggtt 360

[0042] gcgctcgttg cgggacttaa cccaacatct cagcacacga gctgacgaca accatgcacc 420
[0043] acctgtcact ctgccccga aggggacgtc ctatctctag gattgtcaga ggatgtcaag 480
[0044] acctggtaag gttcttcgcg ttgcttcgaa ttaaaccaca tgctccaccg cttgtgcggg 540
[0045] cccccgtaa ttctttgag tttcagtctt gcgaccgtac tccccaggcg gagtgtctaa 600
[0046] tgcgttagct gcagcactaa ggggcgaaa ccccctaaca cttagcactc atcgttttacg 660
[0047] gcgtggacta ccagggtatc taatctgtt cgctccccac gctttcgtc ctcagegtca 720
[0048] gttacagacc agagagtcgc cttegccact ggtgttcctc cacatcteta cgcatttcaac 780
[0049] cgctacacgt ggaattccac tctctcttc tgcactcaag ttccccagtt tccaatgacc 840
[0050] ctccccggtt gagccggggg ctttcacatc agacttaaga aaccgcctgc gagcccttta 900
[0051] cgccaataa ttccggacaa cgcttgccac ctacgtatta ccgcggtgc tggcacgtag 960
[0052] ttagccgtgg ctttctggtt aggtaccgtc aaggtaccgc cctattcgaa cggtagcttgt 1020
[0053] tcttccctaa caacagagct ttacgatccg aaaaccttca tcaactcagc ggcgttctc 1080
[0054] cgtcagactt tcgtccattg cggaagattc cctactgctg cctcccgtag gagtctgggc 1140
[0055] cgtgtctcag tcccagtgtg gccgatcacc ctctcaggtc ggctacgcat cgttgccttg 1200
[0056] gtgagccgtt acctaccaa ctagctaatg cgccgcgggt ccatctgtaa gtggtagccg 1260
[0057] aagccacctt ttatgtttga accatgcggt tcaacaacc atccggtatt agccccggtt 1320
[0058] tcccggagtt atcccagtct tacaggcagg ttaccacgt gttactcacc cgtccgccgc 1380
[0059] taacatcagg gagcaagctc ccatctgtcc gctcgacttg c 1421

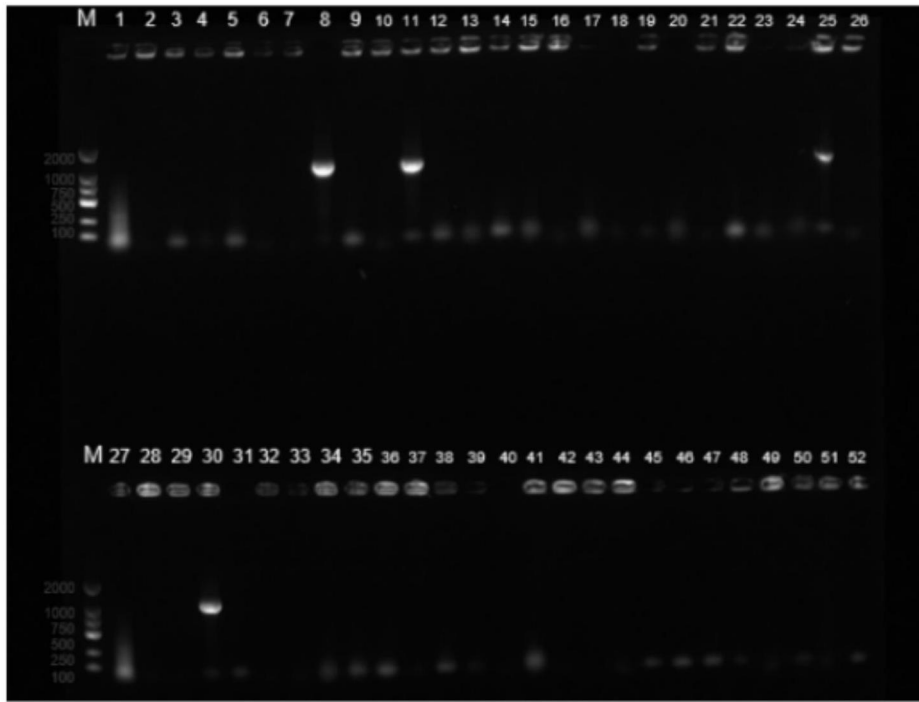


图1

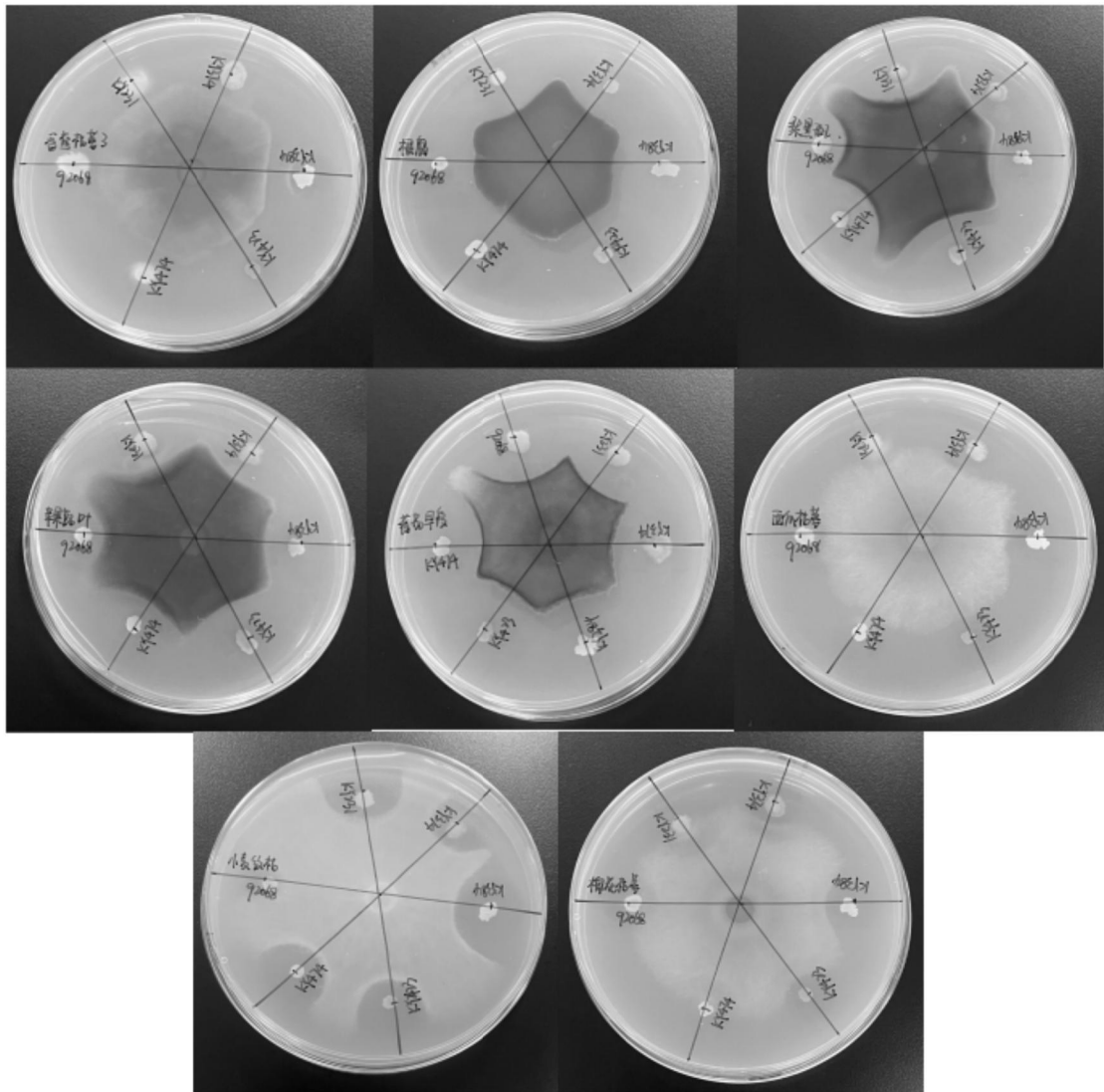


图2

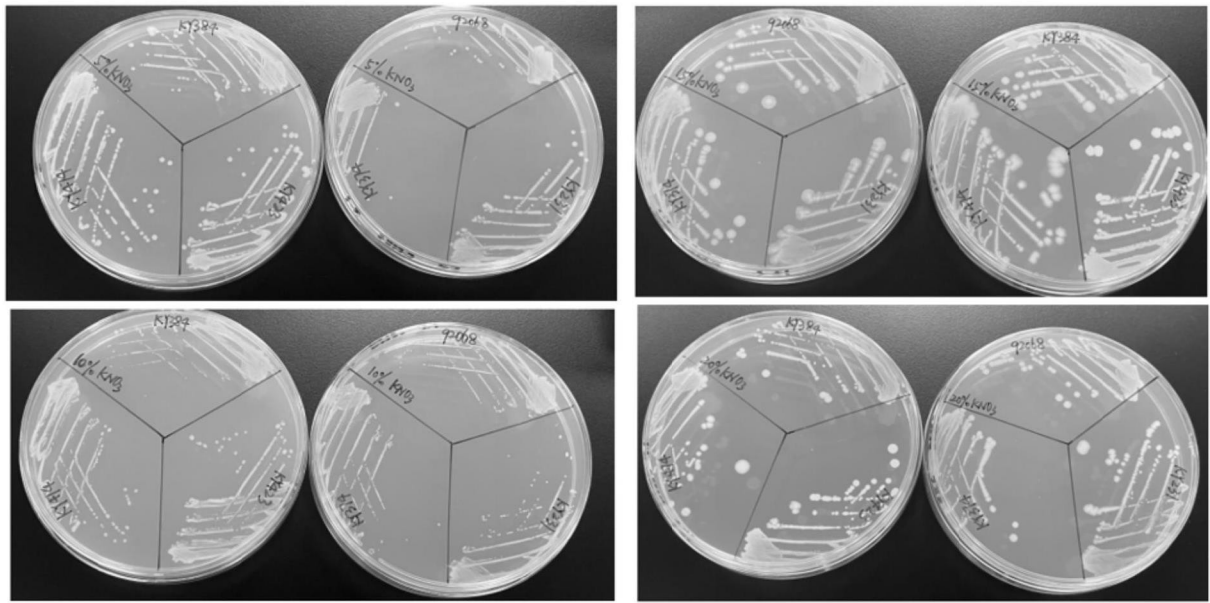


图3

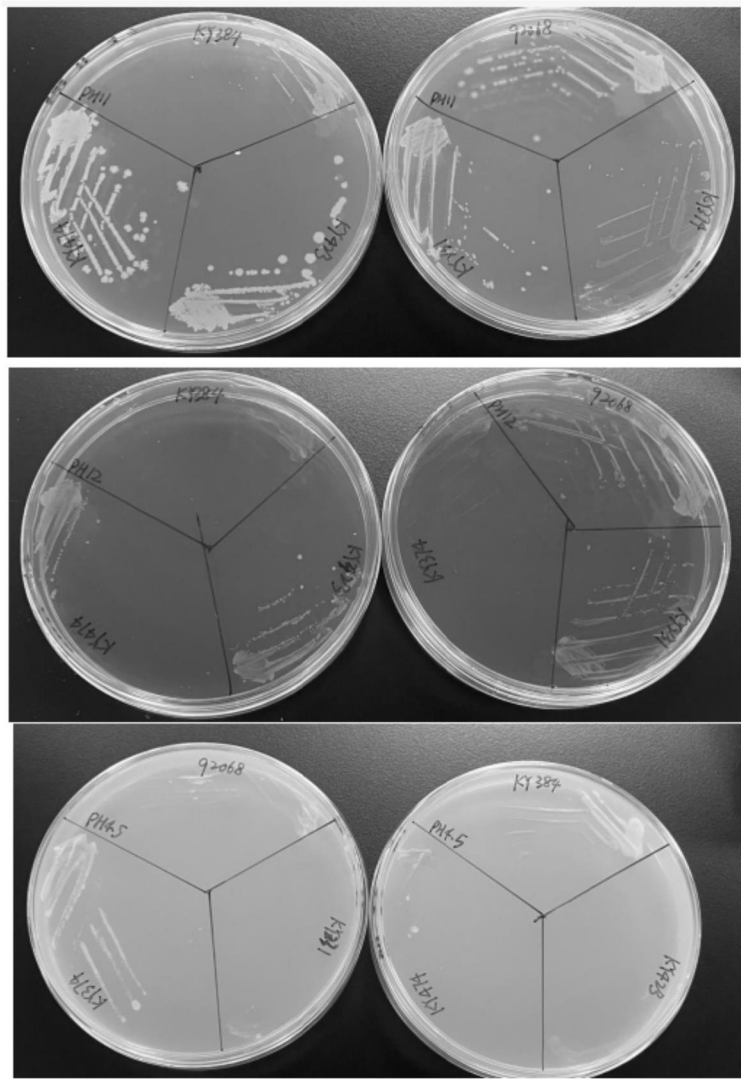


图4

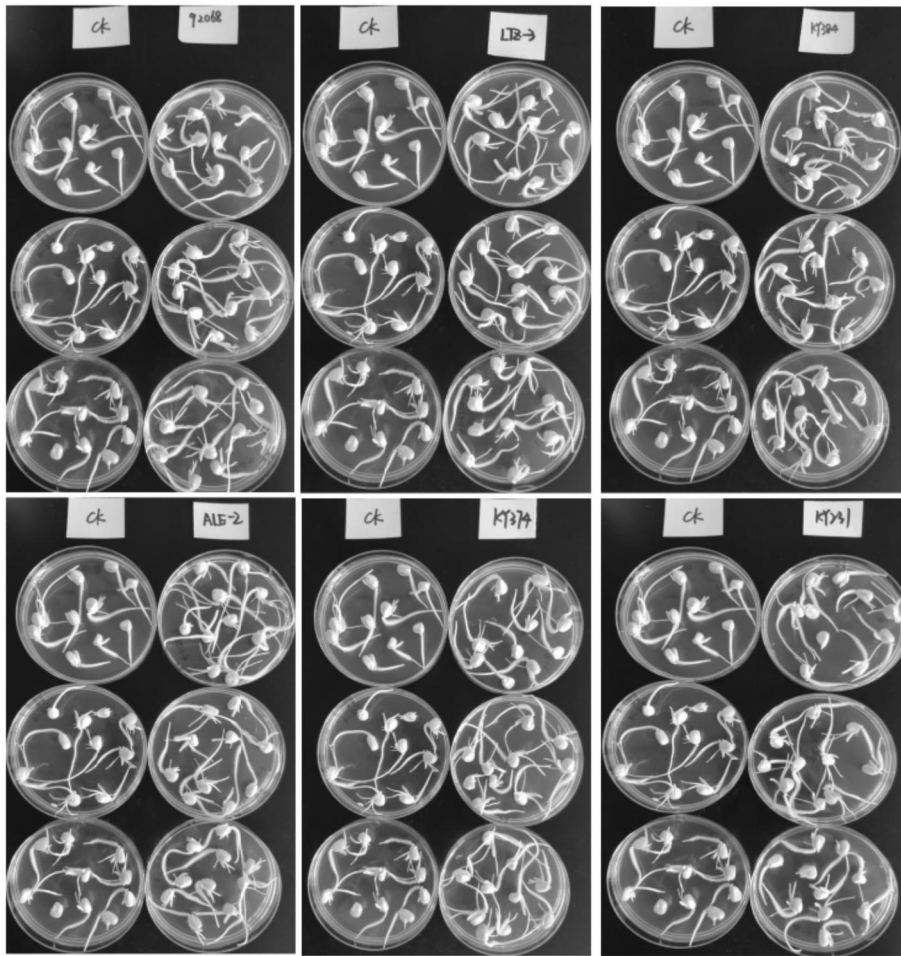


图5

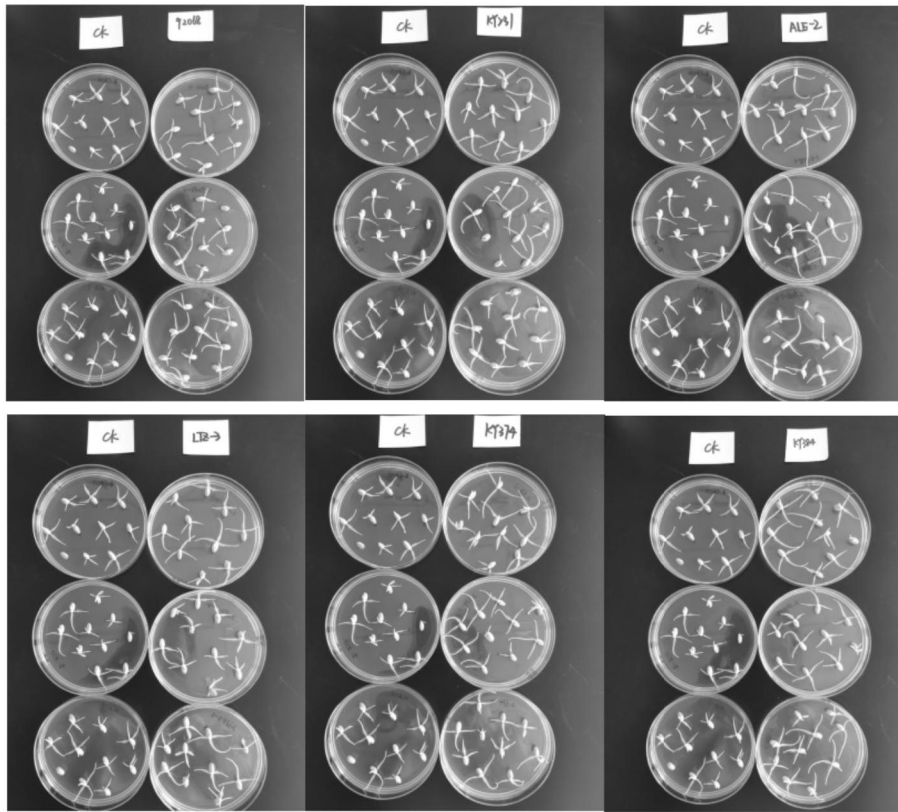


图6

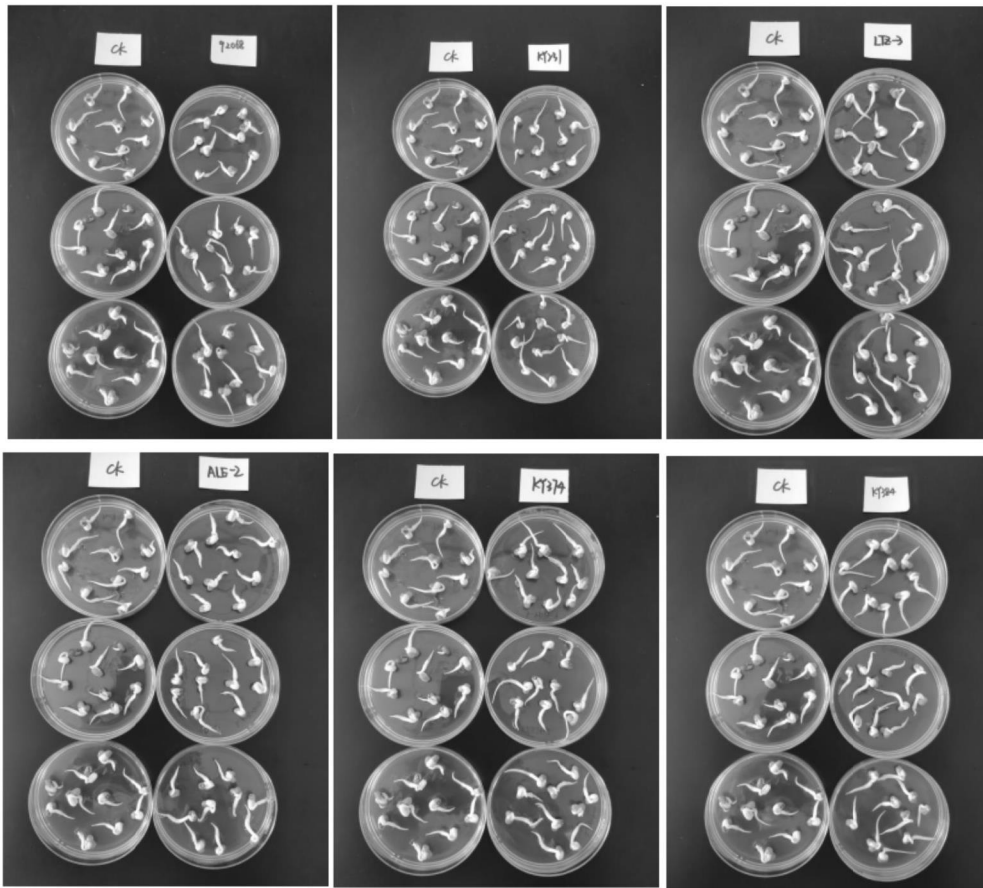


图7

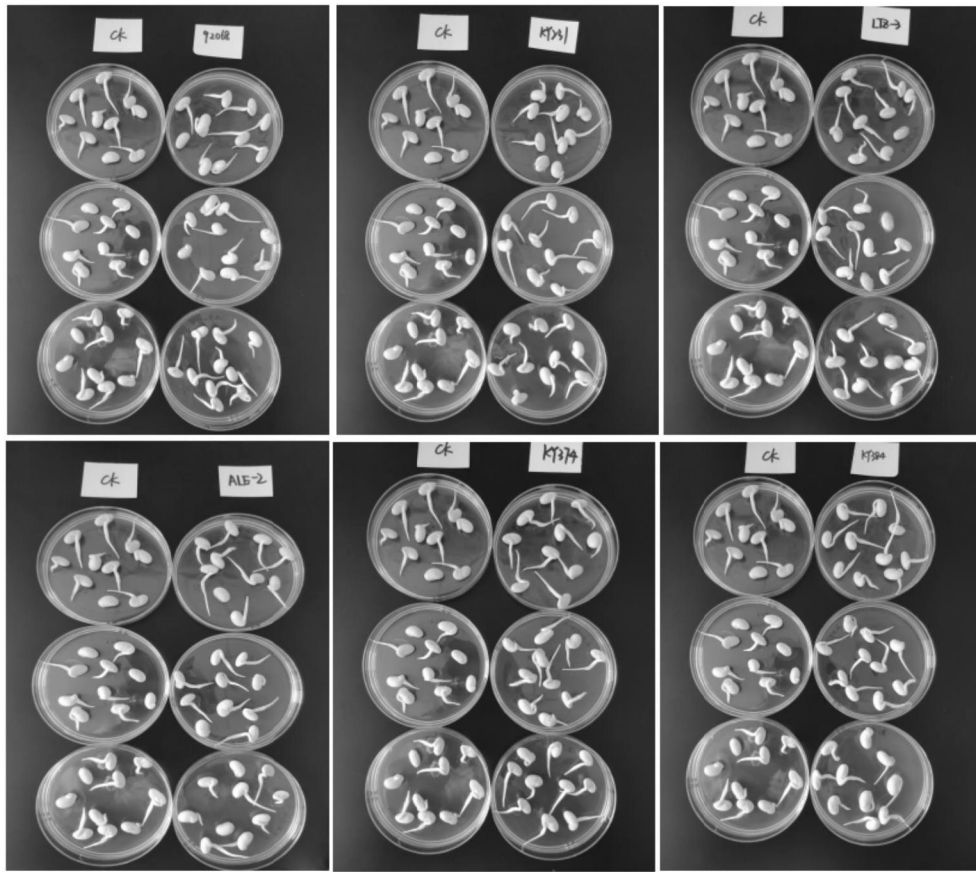


图8

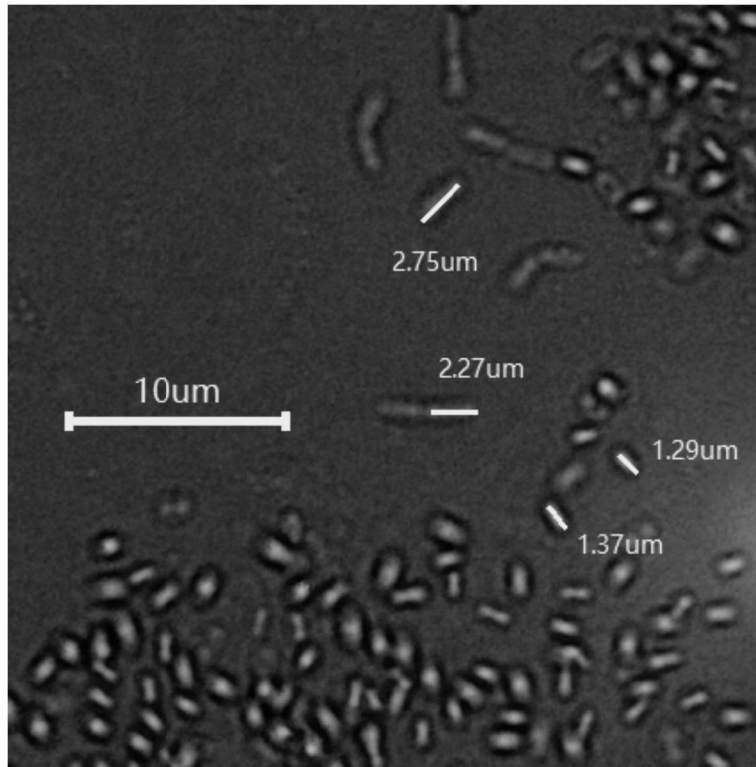


图9

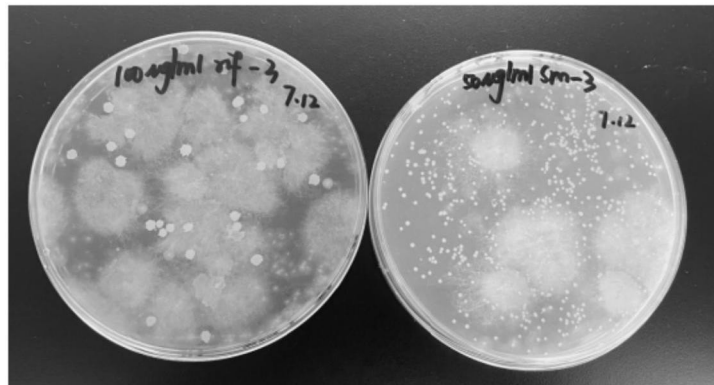


图10

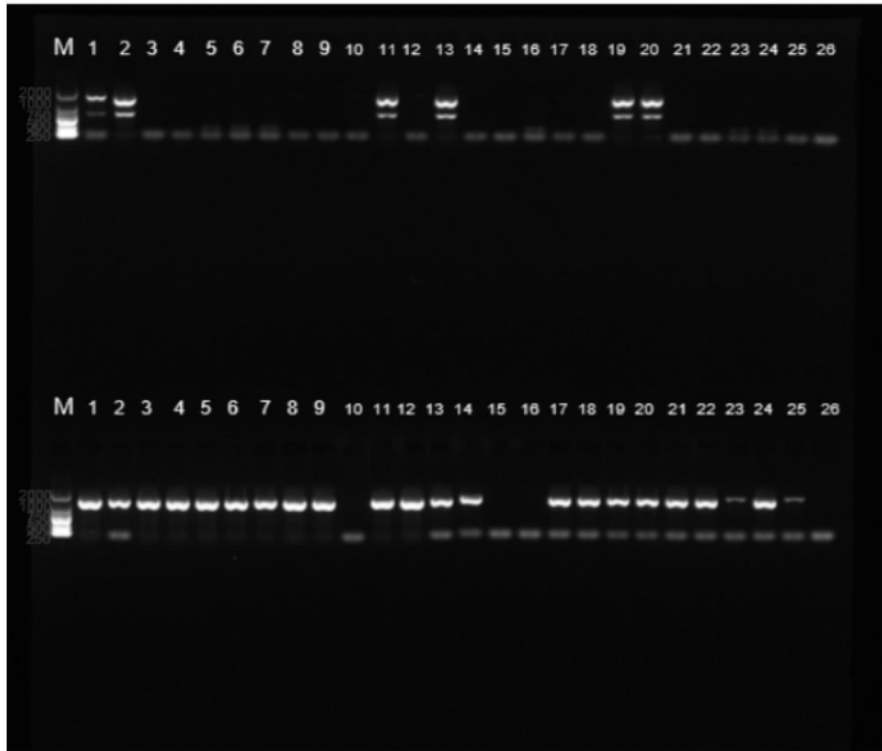


图11