



## 中华补血草内生与根际具ACC脱氨酶活性细菌的筛选及其生物多样性

冯维维<sup>1</sup>, 武美贤<sup>2</sup>, 司雨婷<sup>2</sup>, 邢珂<sup>2</sup>, 秦盛<sup>1\*</sup>, 蒋继宏<sup>1</sup>, 彭学<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 江苏师范大学江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116

<sup>2</sup> 江苏师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116

**摘要:** 【目的】获得江苏沿海滩涂盐生药用植物中华补血草内生及根际具有1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶活性的细菌, 研究其遗传多样性和潜在促生活性。【方法】从中华补血草和根际土壤分离筛选具有ACC脱氨酶活性的菌株, 对其ACC脱氨酶活性定量检测, 通过16S rRNA基因序列分析确定菌株系统发育地位。同时研究其固氮、溶磷、产植物生长素吲哚乙酸(IAA)及耐盐能力。【结果】分离筛选获得18株具有ACC脱氨酶活性的内生与根际细菌, 定量检测发现其中有13株菌的ACC脱氨酶含量在20 nmol  $\alpha$ -KA/(mg Pr·h)以上, 有11株菌可以固氮, 7株菌能够解磷, 9株菌产生IAA。菌株的NaCl盐耐受范围多数在0-13%之间。16S rRNA基因测序表明, 活性菌株分属于7个属, 多样性丰富, 节杆菌属(*Arthrobacter*)为优势类群。其中菌株KLBMP 5180为节杆菌属的潜在新种。【结论】江苏沿海滩涂盐生药用植物中华补血草共生环境中具有丰富多样的具ACC脱氨酶活性的菌株, 并存在潜在新物种资源, 具有进一步研究价值。

**关键词:** 盐生植物, ACC脱氨酶, 内生菌, 多样性, 促生特性

土壤盐渍化是影响农业生产和生态环境的严重问题。盐渍化土壤中的盐生植物(halophyte)是盐渍生境中的天然植物类群, 在进化过程中形成了适应逆境的各种遗传与生理机制<sup>[1]</sup>。此外, 盐生植物还通过招募形成互惠共生关系的微生物, 从而抵御盐胁迫<sup>[2]</sup>。近年来, 随着人们对植物微

生物组功能的深入认识, 揭示出植物的表型除了受自身遗传特性的影响外, 植物内生和根际环境的有益微生物也对其进行积极调控<sup>[3]</sup>。植物内生菌已经成为当前微生物学研究的热点之一, 是有待深入开发的资源宝库<sup>[4-5]</sup>。

含有1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶的植

基金项目: 国家自然科学基金(31370062, 31000005); 江苏省高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师项目(2014); 江苏省高校优势学科项目

\*通信作者。Tel/Fax: +86-516-83403515; E-mail: 秦盛, shengqin@jsnu.edu.cn; 彭学, pengxueinchina@yahoo.com.cn

收稿日期: 2015-09-16; 修回日期: 2015-10-23; 网络出版日期: 2015-12-31

物促生菌近年来备受关注, 该类菌能利用并降解植物产生的乙烯合成前体ACC, 降低逆境条件下大量产生的植物生长抑制剂和植物衰老促进剂—乙烯的浓度, 促进植物特别是根系快速生长, 提高植物在逆境条件(高盐、干旱、低温、重金属污染等)下的适应性<sup>[6]</sup>。已有的研究已经从小麦、番茄、人参等多种植物内部及根际土壤中分离得到有促生、抗旱、抗重金属以及抗盐作用的ACC脱氨酶活性的菌株<sup>[7]</sup>, 但是这些工作绝大多数是研究微生物与非盐生植物, 特别是与经济作物的关系。而目前有关盐生植物生境具有ACC脱氨酶活性的内生菌的研究报道还较少。

盐生药用植物中华补血草(*Limonium sinense*)属兰雪科多年生泌盐草本植物, 该植物可改善盐碱地的土壤结构, 使盐土脱盐, 被誉为盐碱地改造的“先锋植物”。同时全草含多种黄酮体、多糖等有效成份, 是目前医学常用中药之一, 具有非常重要的实际临床药用价值<sup>[8]</sup>。而近年来, 补血草属植物的适生环境受到威胁破坏, 造成中华补血草群居退化, 野生种群数量越来越少, 亟待保护。为探讨盐生植物微生物组的生态学功能, 本文采集盐生植物中华补血草及其根际土壤, 分离筛选其具有ACC脱氨酶活性的细菌, 研究其多样性及潜在促生功能, 以期获得对植物生长有促进作用并能提高植物抗盐胁迫能力的菌种资源, 为后续深入研究植物与微生物的互作提供材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:** 中华补血草植株及其根际土壤材料采样自江苏连云港沿海滩涂地区(119°26'37.30"E, 34°40'27.38"N), 采样地常年平均气温14.1 °C, 平均降水883.6 mm。野外选取健康且长势较好的带根植物及其根际土样品放入无菌采样袋中, 采集回来后48 h内立即进行分离。

**1.1.2 培养基:** (1) 细菌分离培养基: 海藻糖-脯氨酸培养基、NA培养基、R<sub>2</sub>A培养基、1/5 ISP 2培养基、TWYE改良培养基、KMB-金氏培养基等<sup>[9]</sup>。(2) 活性筛选培养基: 含1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)的SMA培养基(ACC终浓度为3 mmol/L)、无氮培养基、有氮培养基和无机磷培养基<sup>[10]</sup>。

**1.1.3 主要试剂和仪器:** ACC购自Sigma公司; PCR体系购自生工生物工程(上海)有限公司; 16S rRNA基因扩增所用PCR引物由生工生物工程(上海)有限公司合成; PCR仪购自Bio-Rad公司。

### 1.2 植物内生及根际细菌的分离

**1.2.1 植物内生菌的分离:** 将植物样品剪碎进行超声清洗, 用5%次氯酸钠处理3–5 min后用2.5%的Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理10 min, 用无菌水清洗后再用75%的乙醇处理3–5 min, 用无菌水清洗3–5次除去残留乙醇。取最后一次清洗样本的无菌水涂布到培养基上验证表面消毒是否彻底。将表面消毒的植物样本匀浆破碎并稀释至10<sup>-1</sup>–10<sup>-4</sup>浓度梯度, 取10<sup>-2</sup>–10<sup>-4</sup>浓度的植物样本稀释液涂布于分离培养基上用于分离细菌。将表面消毒后的植物样本浸泡到10%质量浓度的NaHCO<sub>3</sub>溶液中10 min, 干燥后将植物样本放入于80–100 °C烘箱中放置20–30 min, 粉碎后涂抹在分离培养基上用于分离放线菌<sup>[11]</sup>。

**1.2.2 植物根际菌的分离:** 将采集的补血草根系除去表面浮土后轻轻抖动得到根际土壤。用无菌水溶解并进行梯度稀释后涂布于各分离培养基的平板上, 37 °C进行培养。

### 1.3 ACC脱氨酶活性菌株的筛选

**1.3.1 ACC脱氨酶定性检测:** 将菌株接种于ADF固体平板, 连续传代5次后仍能够在该培养基上正常生长则证明该菌株具有产ACC脱氨酶的能力。

**1.3.2 ACC脱氨酶定量检测:** 将筛选得到的产ACC脱氨酶的细菌、放线菌分别接种于NA和ISP 2液体培养基中摇床(28 °C、200 r/min)培养3–7 d,

将纯培养得到的菌体用不含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的DF培养液冲洗, 然后在4 °C条件下用转速5000 r/min离心10 min, 之后收集菌体, 重复3次, 用液体ADF重悬, 摇床(28 °C、200 r/min)暗培养7 d以诱导产生ACC脱氨酶。低温离心收集菌体, 用0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 7.6)洗涤离心2次, 重悬浮于600  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L Tris-HCl缓冲液(pH 8.5)中, 在液氮中快速冷冻1 min, 迅速放入25 °C水浴5 min, 重复3次, 然后再分别加入30  $\mu\text{L}$  甲苯并迅速振荡30 s以破碎细胞。按照Honma等<sup>[12]</sup>和Saleh等<sup>[13]</sup>的步骤做ACC脱氨酶活性的测定, 于540 nm测其吸光度。每组实验重复3次, 用重蒸水作为空白对照。每分钟形成1  $\mu\text{mol}$   $\alpha$ -丁酮酸的活性作为ACC脱氨酶的单位酶活, 并用Bradford比色法测定酶蛋白浓度<sup>[14]</sup>。

#### 1.4 菌株产IAA能力检测

**1.4.1 产IAA定性检测:** 参照Salkowski比色法<sup>[15]</sup>, 在含有色氨酸的培养基中培养7 d后与显色剂混匀, 室温显色2 min, 如果出现粉红色则为阳性, 说明能够产生IAA。

**1.4.2 产IAA定量检测:** 将菌株接种于无菌的有氮培养基(含0.5 mg/mL色氨酸)中28 °C摇床培养7 d(不接菌的作为对照), 4000 r/min离心, 取上清溶液于试管中加入等体积的RI试剂, 混匀后避光放置30 min, 530 nm波长条件下测定其OD值。通过IAA浓度与OD值得关系曲线计算相应的IAA浓度。

#### 1.5 菌株溶磷能力检测

将菌株点接于无机磷培养基上, 放线菌于28 °C、细菌于37 °C培养箱中培养3–8 d后观察是否有溶磷圈。

#### 1.6 菌株固氮能力检测

将菌株点接到无氮培养基上, 放线菌于28 °C、细菌于37 °C培养箱中培养3–8 d, 转接5次后仍能正常生长的菌株视为有固氮活性。

#### 1.7 菌株耐盐性检测

将菌株点接到不同盐浓度(0–30% NaCl, 1%浓度递增)的固体平板上, 放线菌于28 °C培养7 d、细菌于37 °C培养箱培养3 d之后。观察生长情况并进行统计。

#### 1.8 菌株16S rRNA基因序列的测定以及系统发育分析

将产ACC脱氨酶活性的菌株纯化后提取基因组DNA, 细菌通用引物对27F: 5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3'和1492R: 5'-AAGGAGG TGATCCAGCCGCA-3'用于16 S rRNA基因的PCR扩增。PCR反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): DNA 2  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ buffer 5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$ (25 mmol/L) 3  $\mu\text{L}$ , dNTPs (10 mmol/L) 1  $\mu\text{L}$ , 引物27F (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 引物1492R (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , *Taq*酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ; PCR反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35个循环; 72 °C 5 min; 反应完后用1%的琼脂糖凝胶进行检测。PCR产物送至生工生物工程(上海)有限公司测序。根据测序结果, 利用NCBI中的BLAST以及EzBioCloud数据库进行序列比对, 调出相似性较高的相关菌株的16S rRNA基因序列, 然后分别通过Clustal X 1.8及MEGA 5.0软件进行序列比对及分析, 最后用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树并进行系统发育分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株分离

本研究采用海藻糖-脯氨酸培养基、NA培养基、R<sub>2</sub>A培养基、1/5 ISP 2培养基、TWYE改良培养基和KMB-金氏培养基等多种培养基, 经过初筛去重复从中华补血草植物叶片、根和根际土壤共获得168株菌。

### 2.2 菌株ACC脱氨酶活性测定结果

以分离得到的内生及根际细菌作为供试菌

株, 并以ACC脱氨酶为指标进行初级定性筛选。经多次传代后有18株菌仍然能够在ADF固体平板上正常生长, 说明他们具有ACC脱氨酶活性。活性菌株中有5株为根内生菌, 3株为叶内生菌, 10株为根际细菌。进一步的酶活定量结果显示有13株菌的ACC脱氨酶含量在20 nmol  $\alpha$ -KA/(mg Pr·h)以上(表1)。其中KLBMP 4978、KLBMP 5180、KLBMP 5140、KLBMP 5116及KLBMP 5315的ACC脱氨酶活性较高, 活性最高的菌株是KLBMP 5315和KLBMP 5180, 酶活分别为149.26  $\mu$ mol  $\alpha$ -KA/(mg Pr·h)和147.59  $\mu$ mol  $\alpha$ -KA/(mg Pr·h)。

## 2.3 菌株其它潜在促生特征筛选的结果

以18株具有ACC脱氨酶活性的菌株作为待试菌株, 分别检测其产IAA、固氮及解磷能力(表1)。在无氮培养基上转接5次后仍有11株菌可以正常生长, 具有潜在固氮能力。有7株菌可以产生溶磷圈, 能够溶解无机磷。有9株菌可以产IAA, 但IAA含量较低, 其中菌株KLBMP 4978、KLBMP 5116和KLBMP 5279三株菌产IAA能力相对较高, 分别为1.19、3.27、4.16 mg/L。有13株菌具有ACC脱氨酶活性的同时还拥有1种或1种以上的其它潜在促生特征。其中, 菌株KLBMP 4949、

表 1. ACC 脱氨酶活性菌株及其植物促生潜在性特征

Table 1. ACC deaminase activity and other plant growth promoting (PGP) characteristics of the isolates

Strains and origin	Nitrogen fixation	Phosphate solubilization	Salt tolerance/%	IAA/(mg/L)	ACC/ $\mu$ mol $\alpha$ -KA/(mg Pr·h)
Endophytes					
KLBMP 4949 (R)	+	+	0-9	+	17.64±0.07
KLBMP4978 (R)	-	-	0-10	1.19±0.04	126.27±0.46
KLBMP 4989 (L)	+	+	0-23	+	+
KLBMP 5180 (R)	+	-	0-13	-	147.59±0.52
KLBMP 5105 (L)	+	-	0-10	-	34.37±0.15
KLBMP 5116 (R)	+	-	0-15	3.27±0.06	91.21±0.03
KLBMP 5140 (L)	+	-	0-14	-	81.32±0.11
KLBMP 5183 (R)	+	-	0-14	-	29.51±0.03
Rhizobacteria					
KLBMP 5268	-	-	0-12	+	+
KLBMP 5219	-	+	0-8	+	10.62±0.60
KLBMP 5274	+	+	0-8	-	9.32±0.31
KLBMP 5279	+	+	0-11	4.16±0.06	24.29±0.07
KLBMP 5299	+	-	0-12	-	+
KLBMP 5310	+	+	0-8	-	14.40±0.43
KLBMP 5315	-	-	0-9	-	149.26±0.41
KLBMP 5318	-	+	0-16	+	39.25±0.09
KLBMP 5339	-	-	0-23	+	+
KLBMP 5366	-	-	0-23	-	+

IAA, ACC quantitative analysis of the data expressed as mean value± SD; R, root; L, leaf.

KLBMP 4989等9株菌具有3种及以上的多重潜在促生活性特征。

## 2.4 菌株盐浓度实验

对18株具有ACC脱氨酶活性的菌株进行了耐受NaCl浓度的检测。结果显示, 这些菌株的盐耐受范围多数在0–13%之间, 没有严格的嗜盐菌, 菌株KLBMP 5116、KLBMP 4989、KLBMP 5339、KLBMP 5318及KLBMP 5366能承受15%–23%的高盐浓度, 菌株KLBMP 5116分离自根部, KLBMP 4989分离自叶片, KLBMP 5339、KLBMP 5318及KLBMP 5366分离自根际土壤。菌株耐盐性可能与植物生长的盐碱环境有关。

## 2.5 具有ACC脱氨酶活性菌株系统发育分析

对18株具有ACC脱氨酶活性的内生和根际细

菌进行16S rRNA基因测序, 同时与GenBank中序列相近的模式菌株的16S rRNA基因序列比对, 构建系统进化树(图1)并进行系统发育分析。菌株16S rRNA基因序列在EzTaxon数据库中比对的相似性分析结果见表2。结果显示18株ACC脱氨酶活性菌株属于Firmicutes门、Proteobacteria门和Actinobacteria门的三大系统发育类群, 在系统发育上分布于节杆菌属(*Arthrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、库克菌属(*Kocuria*)、原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)以及芽孢杆菌属(*Bacillus*)共7个属(图1)。显示了沿海滩涂盐生植物体内和根际较为丰富的潜在促生细菌资源。其中节杆菌属有8株, 占其中44.4%, 是其中的优势菌属, 其次

表 2. 菌株16S rRNA基因序列登录号以及同源性

Table 2. The 16S rRNA gene accession numbers and sequence similarities of the isolated strains

No. of isolates	Genera	Nearest type strain	Accession No.	No. of bases	Similarity of 16S rRNA gene/%
KLBMP 4978(R)	<i>Arthrobacter</i>	<i>A. nicotianae</i> (X80739)	KT724294	1369	98.79
KLBMP 5116(R)		<i>A. nicotianae</i> (X80739)	KT724295	1367	98.93
KLBMP 5105(L)		<i>A. nicotianae</i> (X80739)	KT724297	1361	99.00
KLBMP 5268		<i>A. nicotianae</i> (X80739)	KT724298	1361	99.14
KLBMP 5140(L)		<i>A. arilaitensis</i> (FQ311875)	JX993760	651	98.62
KLBMP 5180(R)		<i>A. nicotianae</i> (X80739)	JX993762	1517	99.32
KLBMP 5183(R)		<i>A. arilaitensis</i> (FQ311875)	JX993763	651	98.62
KLBMP 5315		<i>A. arilaitensis</i> (FQ311875)	JX993769	651	98.62
KLBMP 5310	<i>Serratia</i>	<i>S. rubidaea</i> (AB004751)	JX993781	671	100
KLBMP 5274		<i>S. rubidaea</i> (AB004751)	JX993782	671	100
KLBMP 5366	<i>Bacillus</i>	<i>B. megaterium</i> (JJMH01000057)	KT724296	531	99.81
KLBMP 5318		<i>B. thuringiensis</i> (ACNF01000156)	JX993784	671	100
KLBMP 5219	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. brassicacearum</i> (EU391388)	JX993777	511	99.60
KLBMP 4949(R)		<i>P. geniculata</i> (AB021404)	JX993787	661	99.67
KLBMP 5299		<i>P. granadensis</i> (HG764746)	KT724299	522	98.62
KLBMP 5279	<i>Promicromonospora</i>	<i>P. xylanilytica</i> (FJ214352)	JX993806	541	99.63
KLBMP 4989(L)	<i>Kocuria</i>	<i>K. rosea</i> (X87756)	JX993788	601	99.43
KLBMP 5339	<i>Microbacterium</i>	<i>M. maritypicum</i> (AJ853910)	JX993786	641	99.50

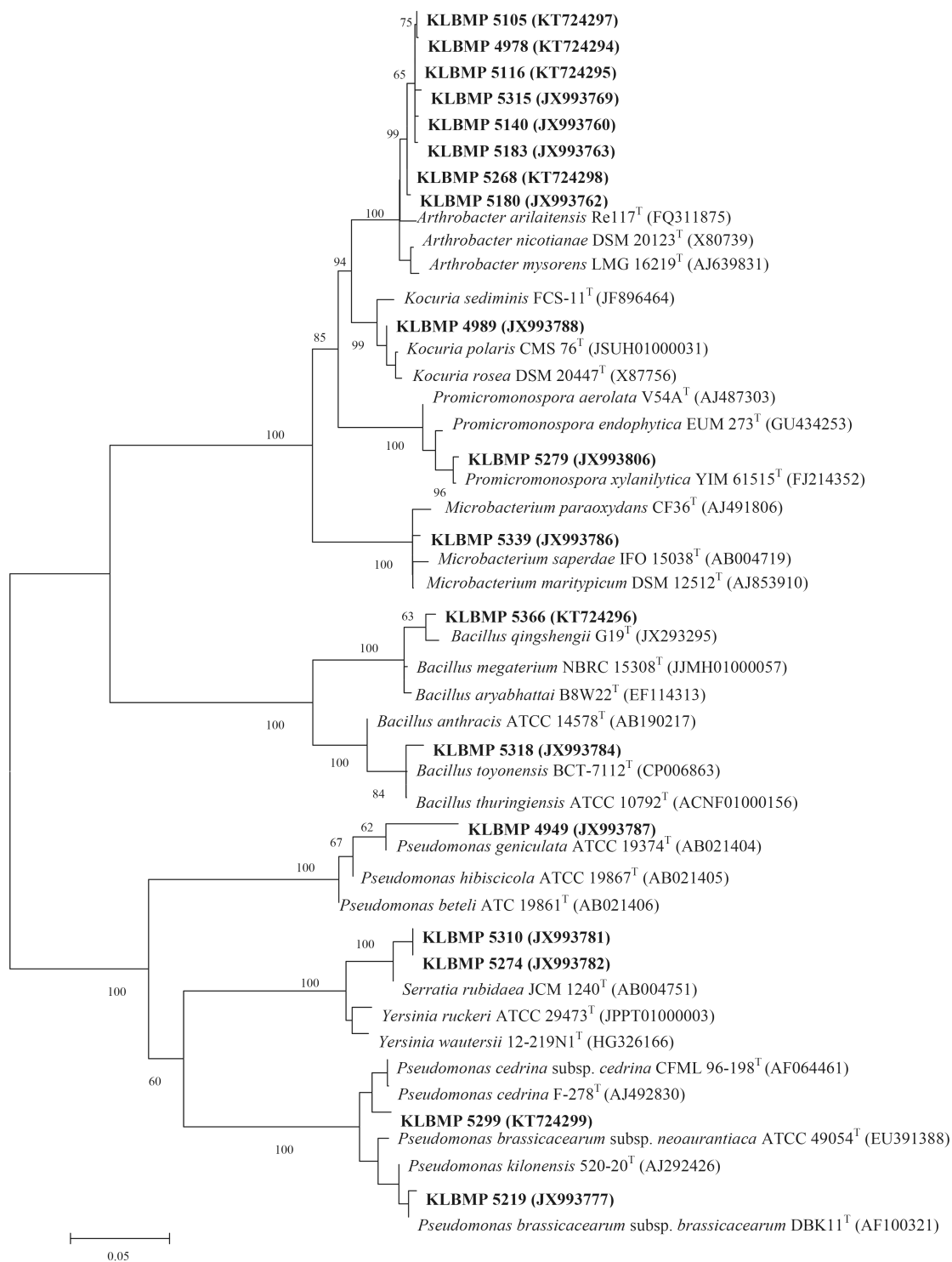


图 1. 基于16S rRNA基因序列构建的ACC脱氨酶活性菌株系统发育树

Figure 1. Phylogenetic Neighbour-Joining tree of the isolates with ACC deaminase activity based on the 16S rRNA gene sequences. Numbers in the parentheses indicate the GenBank accession numbers. Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 replicates). Bar, 0.05 nucleotide substitution of 16S rRNA gene sequence.

为假单胞菌属和芽孢杆菌属。产ACC脱氨酶活性较高的菌株KLBMP 5180、KLBMP 4978、KLBMP 5140和KLBMP 5116等都属于节杆菌属。具有4种潜在促生特征的菌株KLBMP 4949、KLBMP 4989、KLBMP 5279属于假单胞菌属、库克菌属和原小单胞菌属。

菌株16S rRNA基因序列系统发育分析表明, 优势节杆菌属中的8株菌相似性较高, 与*A. arilaitensis* Re117<sup>T</sup>, *A. nicotianae* DSM 20123<sup>T</sup>以及*A. mysorens* LMG 16219<sup>T</sup>聚类到同1个大的分支上(图1), 很可能属于同1个种的不同菌株。我们对

其中产ACC脱氨酶活性较高的菌株KLBMP 5180的16S rRNA基因进行克隆测序, 获得了全长序列(1517 bp)。该菌株通过前期回接中华补血草的种子和组培幼苗, 在不同NaCl浓度胁迫下能显著促进幼苗的生长<sup>[9]</sup>。与该属典型菌株构建的系统发育树表明, 菌株KLBMP 5180与*A. arilaitensis* Re117<sup>T</sup>形成一独立的进化分支(二者16S rRNA基因序列相似性为99.26%), 并有较高的自举值(图2)。但是菌株KLBMP 5180的生理生化特征与典型菌株比较分析发现存在较大差异, 且该菌株的全基因组序列与最近的有效种*A. arilaitensis* Re117<sup>T</sup>的

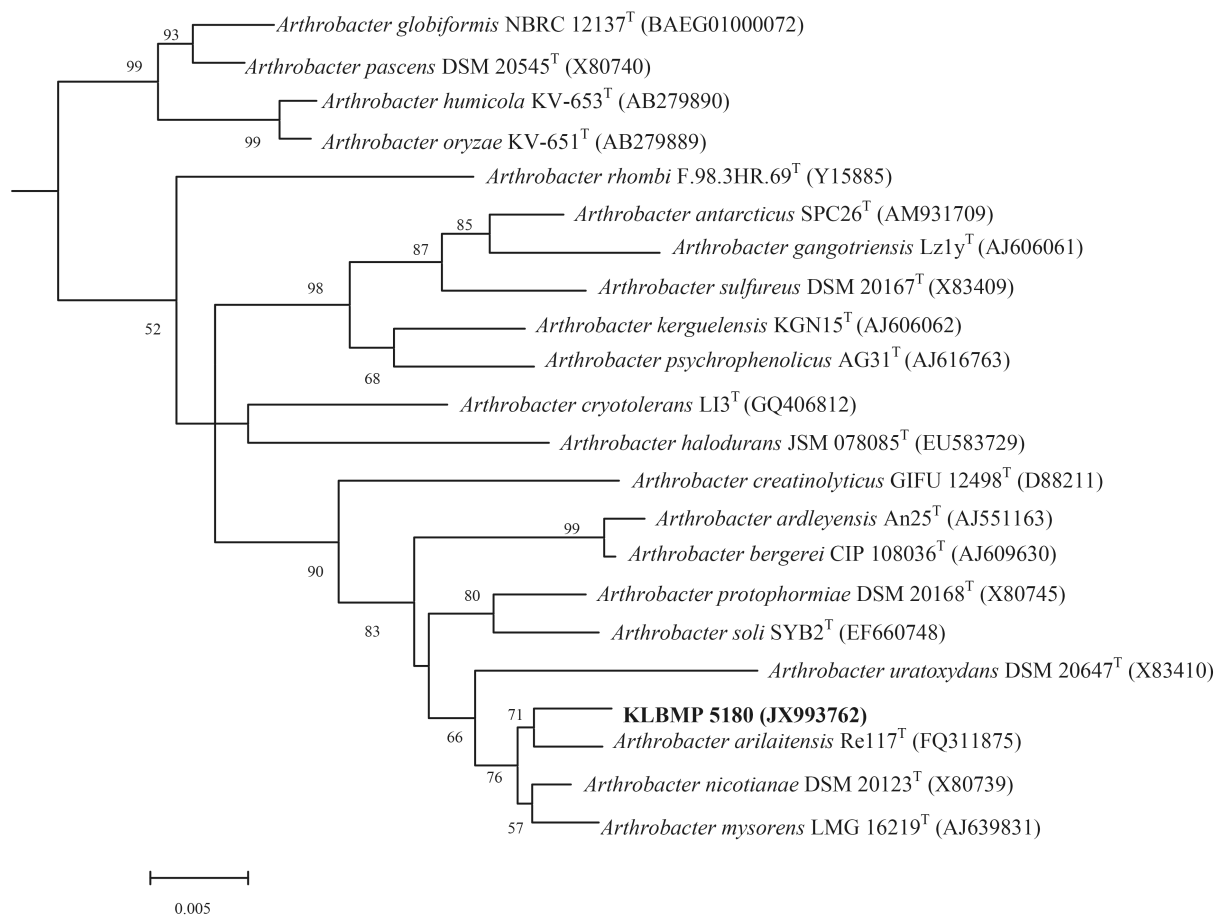


图 2. 基于16S rRNA基因序列采用邻接法构建的菌株KLBMP 5180及其相关典型菌株的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationship of strain KLBMP 5180 and closely related *Arthrobacter* type species. Numbers in the parentheses indicate the GenBank accession numbers. Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 replicates). Bar, 0.005 nucleotide substitution of 16S rRNA gene sequence.

基因组平均核苷酸相似性(Average Nucleotide Identity, ANI)低于95% (未发表数据)。因此该菌株应该为*Arthrobacter*属的一个新物种, 有关该菌株的多相分类工作正在进行中, 将另文发表。

### 3 讨论

中国的盐渍化土壤分布广泛, 土壤盐渍化严重影响生态环境, 是制约农业发展的一个重要因素。虽然利用微生物促进植物生长并提高植物耐盐性目前已有许多报道, 如利用菌根真菌和根际促生细菌(PGPR)可帮助植物提高对盐碱等逆境的耐受性, 但是从盐生植物内生微生物中寻找促生菌的研究报道很少。近年来, 植物在逆境下正常生长因受到其内生和根际微生物组调节的“生境适应性共生(habitat-adapted symbiosis)”假说已经被越来越多的研究所证实<sup>[16]</sup>。盐生植物中华补血草植物根系与盐碱地土壤直接接触并吸收盐分, 按照“生境适应性共生假说”, 我们可以推测植物体内微环境中的内生菌在与植物长期协同进化的过程中可能形成了某些机制来缓解逆境对植物的胁迫。

近年来研究表明, 具有ACC脱氨酶活性的菌株通过调节植物体内的乙烯水平促进植物生长, 提高植物抗逆性<sup>[6]</sup>。有报道显示, 当ACC脱氨酶活性高于或等于20 nmol  $\alpha$ -KA/(mg Pr·h)时, 即能对植物起到促生作用<sup>[17]</sup>。本研究以生活在沿海地区的盐碱地指示植物中华补血草及其根际土壤为材料, 筛选得到18株具有ACC脱氨酶活性菌株。其中8株来自植物内部, 10株来自植物根际土壤。72.2%的菌株ACC脱氨酶活性高于20 nmol  $\alpha$ -KA/(mg Pr·h), 5株菌的ACC脱氨酶活性高于80  $\mu$ mol  $\alpha$ -KA/(mg Pr·h), 72.2%的菌株还同时拥有1种或1种以上的其它潜在促生特征。滕松山等<sup>[18]</sup>从沿海滩涂盐生植物碱蓬中发现4株ACC脱氨酶活性的内生细菌, 具有较强的促生潜力。我们前期从

江苏沿海滩涂地区的田菁、互花米草、芦苇、柽柳等4种盐生植物中分离到9株产ACC脱氨酶内生细菌, 具有促生潜在性同时, 对重金属Cd<sup>2+</sup>、Pb<sup>2+</sup>等具有很好的抗性<sup>[19]</sup>。这些研究表明海岸带盐生植物生境广泛存在着ACC脱氨酶活性的菌株。

16S rRNA基因测序表明, 18株ACC脱氨酶活菌株分属于假单胞菌属、芽孢杆菌属等7个属中, 其中节杆菌属和假单胞菌属是分离的最优势菌属。在先前报道的文献中, 许多有促生作用的细菌都属于节杆菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属等属。例如, 研究表明芽孢杆菌JD37对番茄种子萌发率及番茄幼苗的鲜重根长等有明显促生作用, 具有作为微生物肥料进行开发的潜质<sup>[20]</sup>; 从蔬菜根际土壤中分离的恶臭假单胞菌为嗜铁素高产菌株, 其对黄瓜幼苗的生长有明显促进作用<sup>[21]</sup>; 莫文萍等研究表明节杆菌 Rs 15-4能在盐胁迫下提高棉花种子的发芽率并促进棉花的生长<sup>[22]</sup>。属于放线菌门的节杆菌属的菌株是土壤中的重要微生物类群, 具有聚磷, 固氮, 脱硫以及降解多种物质的功能<sup>[23]</sup>。本文发现的中华补血草内生和根际产ACC脱氨酶活的优势属以及酶活最高的菌也都为节杆菌属菌株, 系统发育分析表明这些菌株可能为同1个新种的不同菌株。而高酶活菌株KLBMP 5180已经被证明可以显著促进宿主在NaCl胁迫下的生长, 并且促进植物体内类黄酮类物质的积累<sup>[9]</sup>, 说明产ACC脱氨酶活的内生和根际细菌一定程度上能够有助于宿主植物对盐渍环境的适应性。

现有研究表明, 植物内生菌大多来源于根部土壤, 从植物根部进入其它内部组织, 这些微生物在与植物长期的协同进化过程中成为植物中重要的一部分, 为植物的抗逆性做出一定贡献<sup>[25]</sup>。我们通过16S rRNA基因V3-V4区的高通量测序发现所采集植物的根际和根内部优势放线菌也都是节杆菌属(未发表数据)。那么, 盐胁迫下中华补血草是如何选择性招募根际高产ACC脱氨酶活的节杆菌属菌株进入植物根部, 帮助植物抵御盐胁迫



迫的呢? 菌株的定殖能力又如何? 菌株与植物的交互调控机制还有待进一步深入研究。

综上所述, 沿海滩涂盐生植物中华补血草生境蕴藏丰富的产ACC脱氨酶细菌资源, 并存在新的物种。有关高活性菌株的解盐促生作用还需要进一步通过滩涂盐土栽培实验验证, 而它们具体的作用机制也是我们今后要开展的工作。

## 参考文献

- [ 1 ] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59(1): 651–681.
- [ 2 ] Ruppel S, Franken P, Witzel K. Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. *Functional Plant Biology*, 2013, 40(9): 940–951.
- [ 3 ] Reinhold-Hurek B, Bünge W, Burbano CS, Sabale M, Hurek T. Roots shaping their microbiome: global hotspots for microbial activity. *Annual Review of Phytopathology*, 2015, 53(1): 403–424.
- [ 4 ] Qin S, Xing K, Jiang JH, Xu LH, Li WJ. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3): 457–473.
- [ 5 ] Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2015, 79(3): 293–320.
- [ 6 ] Hontzas N, Hontzas CE, Glick BR. Reaction mechanisms of the bacterial enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(4): 420–426.
- [ 7 ] Glick BR. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 2014, 169(1): 30–39.
- [ 8 ] Dong BH, Hao MG, Liu Y. Morphology and protection of *Limonium sinense* in tidal wetlands of Jiangsu Province. *Biology Teaching*, 2005, 30(12): 3–5. (in Chinese)  
董必慧, 郝明干, 刘意. 江苏滩涂湿地中华补血草的形态特征及保护栽培. *生物学教学*, 2005, 30(12): 3–5.
- [ 9 ] Qin S, Zhang YJ, Yuan B, Xu PY, Xing K, Wang J, Jiang JH. Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant and Soil*, 2014, 374(1/2): 753–766.
- [10] Egamberdieva D. *Pseudomonas chlororaphis*: a salt-tolerant bacterial inoculant for plant growth stimulation under saline soil conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34(2): 751–756.
- [11] Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, Xu LH, Li WJ. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(19): 6176–6186.
- [12] Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978, 42(10): 1825–1831.
- [13] Saleh SS, Glick BR. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(8): 698–705.
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–254.
- [15] Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 1951, 26(1): 192–195.
- [16] Vivas M, Kemler M, Slippers B. Maternal effects on tree phenotypes: considering the microbiome. *Trends in Plant Science*, 2015, 20(9): 541–544.
- [17] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118(1): 10–15.
- [18] Teng SS, Liu YP, Zhao L. Isolation, identification and characterization of ACC deaminase-containing endophytic bacteria from halophyte *Suaeda salsa*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(11): 1503–1509. (in Chinese)  
滕松山, 刘艳萍, 赵蕾. 具ACC脱氨酶活性的碱蓬内生细菌的分离、鉴定及其生物学特性. *微生物学报*, 2010, 50(11): 1503–1509.
- [19] Bian GK, Zhang YJ, Qin S, Xing K, Xie HS, Jiang JH. Isolation and biodiversity of heavy metal tolerant endophytic bacteria from halotolerant plant species located in coastal shoal of Nantong. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(11): 1538–1547. (in Chinese)  
卞光凯, 张越己, 秦盛, 邢珂, 谢焕松, 蒋继宏. 南通沿海滩涂耐盐植物重金属抗性内生细菌的筛选及生物多样性. *微生物*

- 学报, 2011, 51(11): 1538–1547.
- [20] 王婧. 桔黄假单胞菌JD37菌株对植物的促生作用及其微生物肥料的研制. 上海师范大学硕士学位论文, 2012.
- [21] 罗欢. 芽孢杆菌对植物的促生和耐盐作用及其相关机制的研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2013.
- [22] Mo WP, Li C, Zheng YY, Yue HT, Li H. Effect of relieving-salt-stress and growth-promoting bacteria on germination of cotton seed under salt stress. *Transactions of the CSAE*, 2006, 22(8): 260–263. (in Chinese)
- 莫文萍, 李春, 郑元元, 岳海涛, 李晖. 盐胁迫下解盐促生菌对棉花种子发芽过程的影响. *农业工程学报*, 2006, 22(8): 260–263.
- [23] Mihasan M, Brandsch R. pAO1 of *Arthrobacter nicotinovorans* and the spread of catabolic traits by horizontal gene transfer in gram-positive soil bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 2013, 77(1/2): 22–30.

## Screening and biodiversity of endophytic and rhizosphere bacteria containing ACC deaminase from halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze

Weiwei Feng<sup>1</sup>, Meixian Wu<sup>2</sup>, Yuting Si<sup>2</sup>, Ke Xing<sup>2</sup>, Sheng Qin<sup>1\*</sup>, Jihong Jiang<sup>1</sup>,  
Xue Peng<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> School of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] We isolated and screened endophytic and rhizosphere bacteria with 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase from halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze collected from Jiangsu coastal area and investigated their diversity and plant growth promoting potential. [Methods] Strains were obtained from inner tissues and rhizosphere soils using pure culture cultivation method and identified by 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis. Their potential plant growth promoting index of nitrogen fixation, phosphate solubilization, indoleacetic acid (IAA) production and NaCl tolerance ability were evaluated. [Results] Eighteen strains with ACC deaminase were obtained and 13 of them exhibited more than 20 nmol  $\alpha$ -KA/(mg Pr·h) ACC deaminase activity. Nine isolates produced IAA, 11 had nitrogen fixation ability and 7 of them had phosphate solubilization ability. Most of the isolates could grow under 0%-13% NaCl. The results of 16S rRNA sequencing showed that these strains belonged to seven genera, with *Arthrobacter* as the most predominant genus. Among them, strain KLBMP 5180 was found to be a potential novel species of the genus *Arthrobacter*. [Conclusion] The halophyte plants *Limonium sinense* (Girard) Kuntze located in the area of coastal shoal contain a variety of symbiotic bacteria with ACC deaminase as well as the source of novel species. Some of them had good research prospect in the future.

**Keywords:** halophyte, ACC deaminase, endophytic bacteria, diversity, plant growth promoting characteristics

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31370062, 31000005), by the Qing Lan Project of Jiangsu Province (2014), and by the Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-516-83403515; E-mail: Sheng Qin, shengqin@jsnu.edu.cn; Xue Peng, pengxueinchina@yahoo.com.cn

Received: 16 September 2015; Revised: 23 October 2015; Published online: 31 December 2015