

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*

54 (7): 760–769; 4 July 2014

ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q

http://journals.im.ac.cn/actamicrocn

doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.006

一株人参内生 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨酶活性细菌的筛选、鉴定及其对宿主生长的影响

田磊¹, 姜云^{1*}, 陈长卿², 张冠军¹, 李桐², 佟斌³, 许朋¹

吉林农业大学,¹ 生命科学学院,² 农学院, 吉林 长春 130118

³ 辽宁职业学院农艺学院, 辽宁 铁岭 112099

摘要: 【目的】从人参内生细菌中获得具有 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 脱氨酶活性的菌株, 并进行促生效果的验证。【方法】结合初筛和复筛的方法筛选具有 ACC 脱氨酶活性的人参内生菌株; 采用 Ashby 培养基和固氮酶基因验证其固氮潜能; 菌碟法及钼锑抗比色法测定其解磷能力; CAS 方法检测产生铁载体能力; 通过室内及田间试验测定菌株对人参生长的促进作用。通过形态学、生理生化测定及 16S rRNA 序列分析明确菌株的分类地位。【结果】从 120 株人参内生菌中获得了一株具有较高 ACC 脱氨酶活性的菌株 JJ8-3, 其酶活性为 α -酮丁酸 $6.7 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$; 且具有解磷特性、固氮潜能和产生铁载体能力; 能明显促进人参种子及根部的生长; 经鉴定菌株 JJ8-3 为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)。【结论】获得了一株具有 ACC 脱氨酶活性的人参内生细菌, 将为其在促进植物生长中的应用和研究奠定基础。

关键词: 人参, 内生细菌, 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶, 促生

中图分类号: Q939 文章编号: 0001-6209 (2014) 07-0760-10

长期以来我国农业增产主要依靠大量肥料的投入, 然而化肥的不合理使用不仅影响了农作物的品质, 也破坏了土壤环境。农业生产随着对化肥的过度依赖, 其使用量也在不断增加, 造成了肥料利用率的降低, 并逐渐形成了一个恶性循环^[1]。为缓解这一亟待解决的问题, 发展微生物菌肥是一条有效途径, 微生物菌肥肥效持久, 可提高作物产量, 改进作物品质, 不破坏土壤结构, 无毒无污染, 保护生态环境。近 20 年来, 新的微生物肥料品种不断出现, 其中利用高效植物生长促进菌研制的新型微生物肥料已成为国内外生物菌肥研究的热点^[2], 而获得高效

促生的活性菌株是研制微生物菌肥的基础和核心。因此, 筛选出具有提高植物抗性及促进植物生长和改善环境的菌株具有重要意义。目前有关植物促生菌报道较多的是植物根际促生细菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR), 主要具有产 ACC 脱氨酶、生长激素 (IAA)、固氮、解磷、解钾等特性^[3-5], 其中 ACC 脱氨酶是近年研究的热点之一。ACC 脱氨酶的作用机理主要是降解乙烯合成的前体物质 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC), 进而减少乙烯的合成。植物体在各种逆境条件下会产生乙烯等生长调节物质, 乙烯的产生会影响植物体的正常生长,

基金项目: 吉林省科技厅重点科技攻关项目 (20140204055NY); 国家大学生创新创业训练计划项目 (201310193001)

* 通信作者。Tel: +86-431-84538028; Fax: +86-431-84532887; E-mail: jyjyccq@163.com

作者简介: 田磊 (1989-), 男, 山东省临沂市人, 硕士研究生, 主要从事农业微生物开发与利用研究。E-mail: tl616789@163.com

收稿日期: 2013-12-27; 修回日期: 2014-03-13

而具有产生 ACC 脱氨酶活性的微生物,能够有效缓解植物体内乙烯的积累,促进植物生长,提高作物的抗性和增加产量,现已报道其在促进植物抗盐碱、干旱及重金属离子方面都有显著作用^[6]。

人参是我国最为重要的中药材之一,被称为“百草之王”。2012年,人参(人工种植)获批为新资源食品,消费量和市场需求量极具增加^[7]。人参种植对土壤和环境条件要求较高,在我国主要集中在吉林省长白山地区。在有限的土地资源条件下,提高人参产量和品质是满足市场需求的基础,保护种植区生态环境是人参产业可持续发展的必要条件。因此,分离筛选获得具有促进植物生长的微生物并研制成菌肥加以应用对于发展人参产业具有重要意义。人参内生细菌作为一类重要的微生物资源,在人参病害防治方面已有相关报道^[8-9],而关于人参促生菌的研究还较少。本文以筛选出具有 ACC 脱氨酶高活性的内生细菌菌株为目标,丰富植物促生菌资源,为人参微生物菌肥的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株:菌株为从健康人参中分离纯化的 120 株内生细菌,在牛肉膏试管培养基上保存备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:ACC 购自上海瀚鸿生化有限公司, *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, α -酮丁酸购自 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯;所用仪器主要有 Eppendorf Mastercycler 5333 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司),722 型可见分光光度计(上海元析仪器有限公司),3K18 型台式高速低温离心机(SIGMA 公司),GelDoc-It 200 型自动凝胶图像分析系统(Ultra-Violet Products Ltd 公司),JY-C600 电泳仪(北京六一公司)。

1.1.3 培养基:① DF 盐培养基: KH_2PO_4 4.0 g, Na_2HPO_4 6.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 葡萄糖 2.0 g, 葡萄糖酸 2.0 g, 柠檬酸 2.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 g, 去离子水 1000 mL, pH 7.2^[10], 用于 ACC 脱氨酶菌株筛选培养;② ADF 培养基: ACC 溶于灭菌的超纯水后,用 0.22 μm 一次性无菌过滤器过滤除菌,加到不含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 DF 盐培养基中,使其终浓度

为 3.0 mmol/L^[10],用于 ACC 脱氨酶菌株筛选培养;③ Ashby 培养基:甘露醇 10 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, CaCO_3 5 g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, 去离子水 1000 mL^[11],用于固氮潜能菌株培养筛选;④ PVK 培养基: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 3.0 g, 蔗糖 10.0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, KCl 0.2 g, 酵母粉 0.5 g, MnSO_4 1 mL (0.004 g/L), $\text{FeSO}_4(\text{Fe} \cdot \text{EDTA})$ 0.1 mL (0.002 g/L), 琼脂 15 g, 去离子水 1000 mL, pH 值 7.0^[12],用于具有解磷能力菌株的筛选。

1.2 ACC 脱氨酶活性菌株的筛选

1.2.1 ACC 脱氨酶活性菌株的初步筛选:将冰箱中保藏的菌株用 NA 培养基活化后,再转接到试管斜面中。取一接种环活化后的菌株接种到 8 mL LB 培养液中,28℃、160 r/min 培养 12 h。取 0.2 mL 菌悬液转入 8 mL DF 盐培养基,相同培养条件培养 12 h。然后再取 0.2 mL 菌液转入 8 mL ADF 培养液。并以不含 ACC 的 ADF 培养基作为对照,培养 24-48 h,测定其 600 nm 处吸光值。各 3 个重复,比对照吸光值大的菌株为阳性菌株^[9]。

1.2.2 ACC 脱氨酶活性测定:①参照 Honma 的方法,将 ACC 脱氨酶阳性菌株接种到 7.5 mL LB 培养液中,28℃、160 r/min 培养 12 h,取出菌悬液 7730 \times g 离心 5 min,用无菌的 DF 培养液(不含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)离心洗涤两次。将菌体重新悬浮于 7.5 mL ADF 培养液,28℃、160 r/min 培养 16 h,取出菌悬液 7730 \times g 离心 5 min,用 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)离心洗涤 2 次。弃去上清收集菌体。所得菌体重悬浮于 600 μL 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5),加入 30 μL 纯甲苯,超声破碎 30 s,得粗酶液备用^[13]。②取 2 支试管,分别加入 200 μL 粗酶液。其中一支试管中加入 0.5 mol/L ACC 20 μL ,混匀后于 30℃ 水浴 15 min 后加入 1 mL 0.56 mol/L HCl 以终止反应,17400 \times g 离心 5 min,取上清液 1 mL,加入 800 μL 0.56 mol/L 和 300 μL 0.2% 的 2,4-二硝基苯胍,30℃ 水浴 30 min,取出后加入 2 mL 浓度为 2 mol/L NaOH 溶液混匀。另一只试管未加入 0.5 mol/L ACC,处理同上,作为对照管,在 540 nm 处测定吸光值。并取出 100 μL 粗酶液,采用考马斯亮蓝法测定蛋白含量^[14]。 α -酮丁酸

标准曲线的绘制参照李郑义^[15]的方法。③ACC脱氨酶活性定义为每mg菌体蛋白下,每1h产生的 α -酮丁酸量(μmol),单位为 α -酮丁酸 $\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。

1.3 JJ8-3 菌株 ACC 脱氨酶基因片段及表达蛋白量大小的检测

采用李郑义^[15]用CODEHOP法设计的3条兼并引物, Afl: 5'-CAGCGGCCTGGCCTTNGGNGN AAYA-3', A3: 5'-ATCGCGGCATCCAGWSNAAYC ANAC-3', Ar1: 5'-GTGCATCGACTTGCCTCRWAN ACNGGRT-3',以JJ8-3菌株基因组DNA^[16]为模板,进行ACC脱氨酶基因片段扩增。PCR反应体系包括 $10\times\text{Buffer}$ 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 2.5 μL , 2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL , 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 引物各 1.0 μL , Taq 酶 1 U, 模板 50 ng, 最后加水补足至 25 μL 。PCR反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,用凝胶成像系统观察是否有目的条带。

按照1.2.2方法收集菌体并称重,按照150 mg/mL的量计算,分别加入超纯水和SDS上样缓冲液,裂解破碎细胞后进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳^[17],观察35-42 kDa处条带的变化,用Quantity one 4.6.2软件分析条带大小,用Bandscan 5.0软件分析条带占整个泳道的灰度值,最后综合分析ACC脱氨酶分子量大小。

1.4 分离菌株其它促生特性分析

采用Ashby筛选培养基和nifH固氮基因^[3]扩增对JJ8-3菌株进行了固氮活性的检测;平板鉴定和钼锝抗比色法定量测定解磷能力^[12,18];Salkowski法测定产吲哚乙酸的能力^[19];CAS法测定产铁载体能力^[20]。

1.5 菌株 JJ8-3 的鉴定

1.5.1 培养特征和形态特征观察:将菌株JJ8-3划线接种在NA培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养18 h,观察记录单菌落形态。采用革兰氏染色法^[21]观察细胞形态。电镜形态观察,取在LB液体培养基中培养24 h的JJ8-3菌株菌液,离心后用无菌水反复冲洗,进行负染色制备样品,用镊子夹住带膜的铜网蘸取微量菌液,静置2 min,从边缘用滤纸吸干剩余液;然后再用

镊子夹住带菌的铜网浸入盛有双蒸水的烧杯内漂洗,再用滤纸吸干液体,接着用2%磷钨酸负染色5 min,干燥后用JEM-4200EXII型透射电镜观察。

1.5.2 生理生化特征:参照《常见细菌系统鉴定手册》^[21]和《伯杰系统鉴定手册》^[22]中推荐的部分培养基(表1)和方法进行。

1.5.3 系统发育学分析:参照姜云等方法^[23]对JJ8-3菌株16S rDNA片段进行扩增并测序。利用通用引物(27F:5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3', 1492R:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')对基因组DNA进行16S rDNA片段进行扩增;反应体系为 $10\times\text{Taq buffer}$ 2 μL , MgCl_2 (25 mmol/L) 1.5 μL , 正反向引物各 1.0 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL , Taq DNA聚合酶 1.5 U, 基因组DNA 50 ng, 加超纯水补足至 25 μL ;反应条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,53 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,反应结束后,取3 μL PCR产物用1%琼脂糖凝胶进行电泳检测,PCR产物送至上海生工生物有限公司进行序列测序。所得序列与GenBank数据库中序列进行BLAST比对分析,以相似性达98%以上的标准选择参考菌株,采用MEGA 5.0软件,用Neighbor-Joining法构建系统进化树,分析菌株的系统发育学特征,同时向GenBank提交序列并获得登录号。

1.5.4 确定分类地位:综合菌株的培养特征、形态特征、生理生化学特征和系统发育学特征确定其分类地位。

1.6 菌株 JJ8-3 对人参的促生作用

1.6.1 菌株 JJ8-3 对人参种子发芽和出苗的促生作用:菌株JJ8-3接种LB培养液摇床过夜培养后,7730 $\times\text{g}$ 离心5 min收集菌体。用无菌水洗涤2次后重悬浮于无菌水中,将其稀释成浓度为 10^9 cfu/mL的细菌悬浮液。选择已后熟破口的人参种子浸泡在菌悬液中3 h,取出晾干表面液体后,置于装有无菌湿润沙子的培养皿中,每皿15粒种子,即为1次重复,共6次重复,于暗处18-23 $^{\circ}\text{C}$ 催芽10-15 d,以无菌水处理的种子为对照。

将经菌株JJ8-3菌悬液浸泡过的人参种子种植于沙土培养钵内,种植深度2 cm,打足底水,每钵10粒种子,3次重复,以无菌水处理的种子做对照,18-23 $^{\circ}\text{C}$ 条件下生长,7 d后每日观察记录出苗情

况,共持续6 d。

1.6.2 菌株 JJ8-3 对人参苗根部的促生作用: 试验于2012年10月20日将大小均匀的2年生人参苗种植于土壤肥力一致的人参床中,种植深度5 cm。2013年6月5日,人参出苗完全展叶后用 10^8 cfu/mL的JJ8-3菌悬液(制备同1.6.1)进行灌根处理,4次重复,每重复10株人参苗,每株浇灌200 mL菌悬液,每10 d浇灌1次,共3次,对照浇灌相同体积的水,处理方法相同。2013年10月25日人参地上部茎叶脱落后,挖出人参根,10株为1单位测定根鲜重和干重。

2 结果和分析

2.1 ACC 脱氨酶阳性菌株筛选

在ACC脱氨酶初筛中,从120株菌株中筛选到8株阳性菌株;进行ACC脱氨酶复筛实验, JJ8-3菌株具有很高的酶活性。定量测定其酶活性,经过与2,4-二硝基苯肼反应后在碱性条件下成褐色,计算得出其活性为 α -酮丁酸 $6.7 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。

2.2 ACC 脱氨酶基因的扩增

采用两对兼并引物对JJ8-3菌株基因组扩增,经Quantity one 4.6.2软件分析,利用f1、r1这对引物在800 bp左右得到了一条亮带;利用f3、r1这对引物,在682 bp处得到了一条亮带(图1),与报道的扩增条带大小相同。

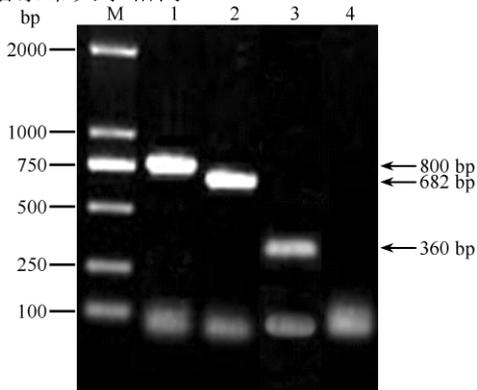


图1. JJ8-3 ACC脱氨酶基因及固氮基因检测

Figure 1. Gene detection of ACC deaminase and nitrogen enzyme. M: DL2000 marker; lane 1 and 2: gene segments of ACC deaminase; lane 3: gene segments of nifH; lane 4: ultrapure water contrast.

2.3 SDS 全细胞蛋白质组电泳

对不同培养处理的JJ8-3菌体进行全细胞蛋白质组电泳,电泳条带经Quantity one 4.6.2软件分析大小和Bandscan 5.0软件分析灰度值,得到一条占整个36 kDa泳道且灰度值明显增强的条带(图2),与报道的ACC脱氨酶分子量为35-42 kDa之间相符。

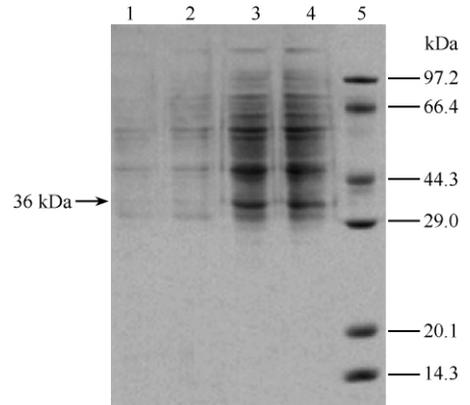


图2. JJ8-3 全细胞蛋白质电泳图谱

Figure 2. Whole-cell protein electrophoresis of the strain JJ8-3. Lane 1 and 2 without ACC treated JJ8-3 strain; lane 3 and 4 with ACC treated JJ8-3 strain; M, protein molecular weight marker.

2.4 菌株 JJ8-3 其它促生潜能的分析

扩增nifH条带及Ashby培养基培养发现菌株JJ8-3能扩增出nifH基因条带(图1)并且在Ashby培养基上能够正常生长(图3-A),说明其具有固氮潜能。

溶解无机磷平板培养实验,能看到培养后JJ8-3菌株具有较大的溶磷圈(图3-B),采用钼锑抗比色法定量测定其解磷活性为 $380 \mu\text{g}/\text{mL}$,说明JJ8-3具有解磷特性。

对JJ8-3菌株进行铁载体实验,在JJ8-3生长周围CAS平板变粉红色,说明菌株JJ8-3具有产生铁载体的能力;通过铁载体复筛定量分析(图3-C),其铁载体活性高达91.8%。说明菌株能够高效的产生铁载体。

2.5 菌株 JJ8-3 的鉴定

2.5.1 培养特征和形态特征观察: JJ8-3在NA培养基上呈浅绿色不透明圆形菌落,边缘完整微透明(图4);通过光学显微镜和电子显微镜观察发现,细菌单个个体杆状,生有极端生长鞭毛(图5)。

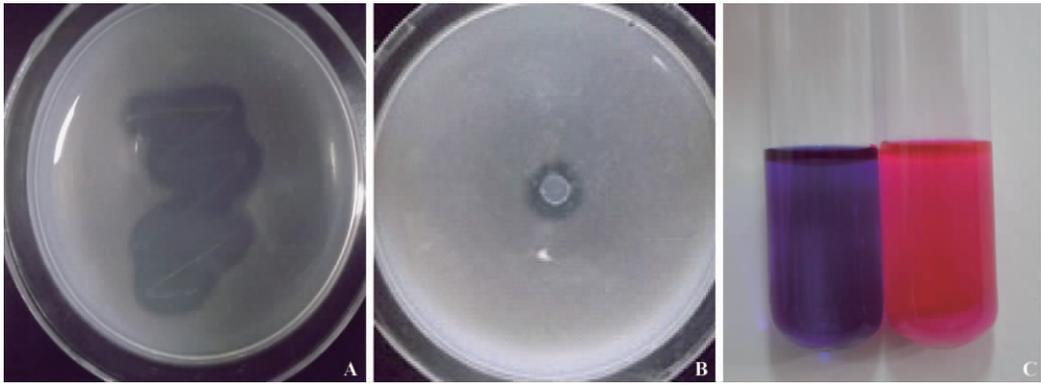


图 3. JJ8-3 其他促生功能分析

Figure 3. Other growth promoting traits' analysis of the strain JJ8-3. A: nitrogen fixation potential; B: phosphate solubilizing ability; C: ability of producing siderophores.

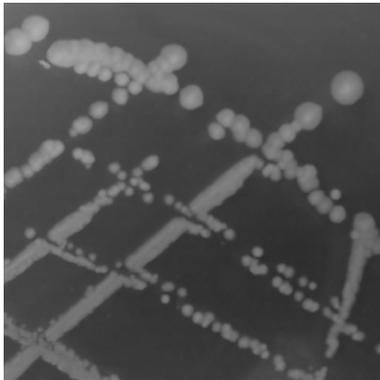


图 4. 菌株 JJ8-3 菌落形态

Figure 4. Colonial morphology of the strain JJ8-3.

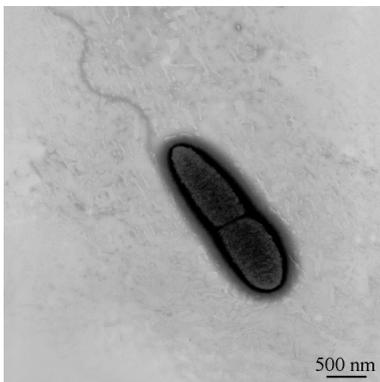


图 5. 菌株 JJ8-3 透射电镜照片 (12000 ×)

Figure 5. Morphological characteristics of the strain JJ8-3 under transmission electron microscope (12000 ×).

2.5.2 生理生化特征: 菌株 JJ8-3 革兰氏染色阴性, 无运动性, 有荧光性 (图 6)。接触酶、氧化酶反应为阳性, V-P 反应为阴性; 能利用柠檬酸、不能使硝酸盐还原、淀粉水解, 但能使油脂水解、明胶液化, 石蕊

牛奶还原但不凝化, 对 NaCl 的耐受性为 7%; 可以利用葡萄糖、甘露醇和半乳糖 (表 1)。

2.5.3 分子鉴定: 菌株 JJ8-3 16S rDNA 基因片段序列 (1425bp) 在 GenBank 数据库经 Blast 比对分析, 结果显示相似性在 98% 以上的均为 *Pseudomonas* 属细菌, 其中与 *Pseudomonas fluorescens* strain NBRC 3925 (AB680178) 相似性最高, 相似性达 99.44%。选择相似性在 99% 以上的同属和同种菌株序列, 以 *Azospirillum lipoferum* 为外群, 采用 Neighbor-Joining (NJ) 法构建的系统发育树 (图 7) 可以看出, 菌株 JJ8-3 与 *Pseudomonas fluorescens* 聚于同一分支中, 亲缘关系最近。



图 6. 菌株产荧光色素

Figure 6. The fluorescent pigments produced by the strain JJ8-3.

综合以上培养特征、形态特征、生理生化学特征和系统发育学特征最终确定菌株为为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*), 向 GenBank 提交序列并获得登录号为 KF727589。

表 1. 菌株 JJ8-3 的生理生化特性

Table 1. Physiological and biochemical characteristics of strain JJ8-3

characteristics	results	characteristics	results	characteristics	results
fluorochrome	+	gelatin liquefaction	+	M. R test	+
oxidase	+	litmus milk	reduced	highest salt tolerance	7%
catalase	+	urease test	-	glucose utilization	+
V-P test	-	nitrate reduction	-	mannitol utilization	+
indole test	-	citrate utilization	+	lactose utilization	-
amylohydrolysis	-	malonic utilization	+	D-galactose utilization	+
lipid hydrolysis	+	arginine dihydrolase	+	D-fructose utilization	-

“+” Positive reaction “-” Negative reaction.

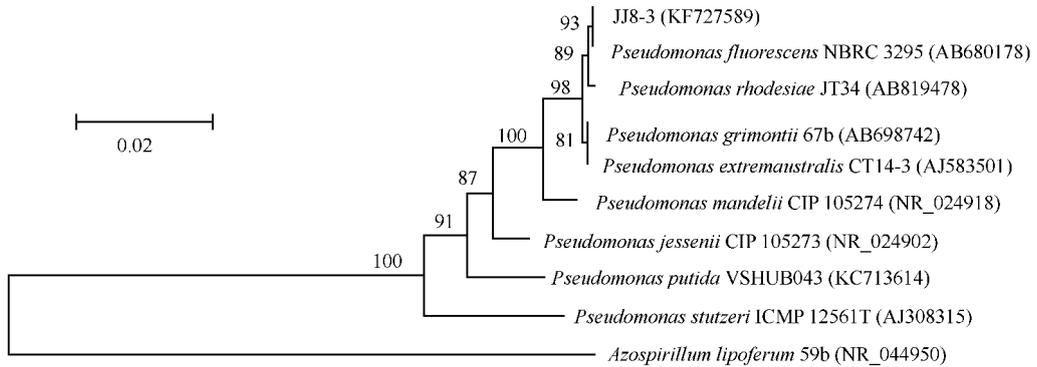


图 7. 菌株 JJ8-3 16S rRNA 基因序列邻接法系统进化树

Figure 7. Phylogenetic tree of strain JJ8-3 based on 16S rRNA gene sequences. JJ8-3 refers to the strain isolated. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap in 1000. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position. Numbers in parentheses were the sequence accession number in GenBank.

2.6 菌株 JJ8-3 对人参的促生作用

2.6.1 对人参种子发芽和出苗的促生效果: JJ8-3 菌株处理的人参种子平均长出的根长为 20.5 mm, 清水对照处理的平均根长为 12.2 mm, 根长增加 68.03%, 差异极显著 (图 8), 试验结果表明 JJ8-3 菌株对人参种子发芽具有显著地促进作用。出苗试验结果显示, 经菌株 JJ8-3 处理的人参种子出苗率达到 70% 时需要 10 d, 与对照相比提前了 5 d。

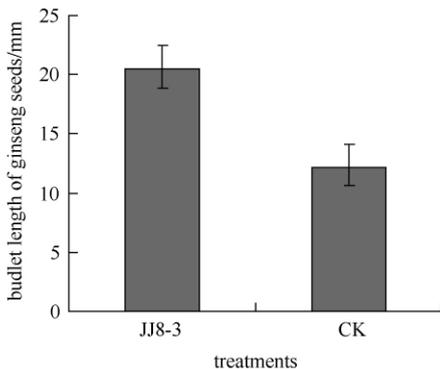


图 8. 菌株 JJ8-3 对人参种子发芽的影响

Figure 8. Effect of ginseng seeds sprouting with the JJ8-3 strain.

2.6.2 对人参苗根部的促生效果: 用浓度为 10^8 cfu/mL 的 JJ8-3 菌悬液对两年生人参苗进行 3 次

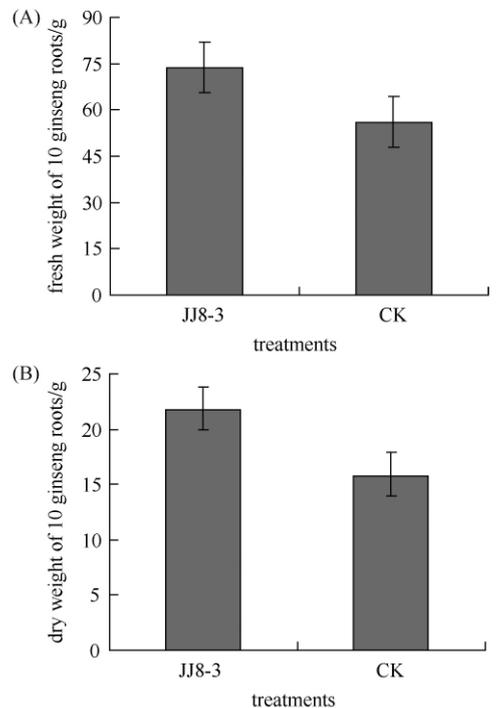


图 9. 菌株 JJ8-3 对人参苗根部的促生效果

Figure 9. Effects on growth promoting of ginseng seedling roots with the JJ8-3 strain.

灌根处理,110 d 后挖出人参根,测定的鲜重和干重结果表明, JJ8-3 菌株对人参根生长具有明显的促进作用,菌株 JJ8-3 处理的 10 株人参根平均鲜重为 73.50 g,比对照增加 31.72% (图 9-A),平均干重为 21.74 g,比对照增加 37.94%,差异均极显著 (图 9-B)。

3 讨论

近 20 年来,随着生物技术的不断发展,微生物肥料的研究与应用有了很大发展,新的微生物肥料品种不断出现,其中利用高效植物生长促进菌研制的新型微生物肥料已成为国内外生物菌肥研究的热点^[2]。自 1978 年 Honma 等首次从土壤中分离出一株具有降解 ACC 能力的 *Pseudomonas* sp. 菌株^[13],国内外学者从小麦^[24]、麻疯树^[5]、番茄^[25]、油菜^[6, 26]、芥菜^[27]、燕麦^[28]、紫花苜蓿^[29]、鹰嘴豆^[30]等多种植物根际土壤或组织中筛选出具有 ACC 脱氨酶活性的菌株,并证明某些活性菌株具有能够促进植物生长的功能^[31-32]。同时李郑义等^[15]通过 Codehop 方法设计出对 ACC 脱氨酶基因具有较高特异性的兼并引物,通过 PCR 方法筛选出一些具有 ACC 脱氨酶活性的菌株。然而有关从人参组织中分离获得 ACC 脱氨酶活性细菌的研究目前还未见报道。本研究从来源于人参的 120 株内生细菌中筛选到一株高产 ACC 脱氨酶的菌株 JJ8-3,通过兼并引物对 JJ8-3 进行目的基因条带的扩增也得到了目的条带,同时该菌株还兼具固氮、解磷和产铁载体特性,生测结果显示其对人参种子发芽具有促生作用。菌株 JJ8-3 的获得丰富了 ACC 脱氨酶细菌的寄主来源,为研究菌株功能及其与寄主之间的相互作用奠定了基础。

结合形态特征、培养特性、生理生化以及 16S rDNA 基因片段序列分析,菌株 JJ8-3 鉴定为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)。荧光假单胞菌是广泛分布于自然界中的革兰氏阴性菌^[33],作为植物促生菌已有报道。例如,沈萍等^[34]用分离自番茄根内部的具有 ACC 脱氨酶活性的荧光假单胞菌对辣椒进行处理,证明了菌株能显著促进辣椒的根长和

下胚轴的伸长。Jalili 等^[27]在土壤中分离出具有 ACC 脱氨酶活性荧光假单胞菌 25 株,并对促进油菜在耐盐条件下生长进行试验,结果大部分菌株能够较好的提高油菜的耐盐能力。Zahir 等^[35]通过对 10 株来自于不同作物根际土壤细菌的盆栽试验,证明其中荧光假单胞菌株 ACC-5 能够显著促进豌豆 (*Pisum sativum*) 苗的生长,并提高了植株的抗旱能力。本研究发现菌株 JJ8-3 能够显著促进人参种子芽的生长、提高种子发芽势,促进出苗,对人参的根部生长也有明显的促进作用。该菌株对人参的胁迫抗性和药用成分积累等方面的影响将做进一步的研究。

参考文献

- [1] Han W, Yao T, Xi L, Sun H, Liu W, Sun L. PGPR bio-fertilizers producing and its effect on *Avena sativa* growth and quality development. *Acta Practaculture Science*, 2008, 17 (2): 75-84. (in Chinese)
韩文星, 姚拓, 席琳乔, 孙红阳, 刘雯雯, 孙丽娜. PGPR 菌肥制作及其对燕麦生长和品质影响的研究. 草业学报, 2008, 17 (2): 75-84.
- [2] Hafeez FY, Yasmin S, Ariani D. Plant growth-promoting bacteria as biofertilizer. *Agronomy Sustainable Development*, 2006, 26: 143-150.
- [3] Tan Z, Peng G, Xu PZ, Ai S, Tang S. Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54 (13): 1885-1893. (in Chinese)
谭志远, 彭桂香, 徐培智, 艾绍英, 唐拴虎. 普通野生稻内生固氮菌多样性及高固氮酶活性. 科学通报, 2009, 54 (13): 1885-1893.
- [4] Furnkranz M, Muller H, Berg G. Characterization of plant growth promoting bacteria from crops in Bolivia. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2009, 116: 149-155.
- [5] Zhang Y, Qin S, Bian G, Fei S, Li Q. Isolation, screening and phylogenetic analysis of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase from *Jatropha curcas* L. *Microbiology China*, 2012, 39 (7): 901-911. (in Chinese)
张越己, 秦盛, 卞光凯, 费世明, 李钦. 具有 ACC 脱氨酶活性的麻疯树根际促生菌 (PGPR) 的分离筛选及

- 系统发育分析. 微生物学通报, 2012, 39 (7): 901-911.
- [6] Zhang YF, He LY, Chen ZJ, Wang QY, Qian M, Sheng XF. Characterization of ACC deaminase producing endophytic bacteria isolated from copper-tolerant plants and their potential in promoting the growth and copper accumulation of *Brassica napus*. *Chemosphere*, 2011, 83: 57-62.
- [7] Ministry of health publishes ginseng (artificial cultivations) a new resource of food. *China Health Standard Management*, 2012, 3 (6): 45. (in Chinese)
卫生部公布人参(人工种植)为新资源食品. 中国卫生标准管理, 2012, 3 (6): 45.
- [8] Jiang Y, Yin W, Cheng CQ, Tian L, Xu P. Identification and optimized fermentation condition of an endophyte antagonistic bacteria NJ13. *Agrochemicals*, 2013, 52 (2): 97-101. (in Chinese)
姜云, 尹望, 陈长卿, 田磊, 许鹏. 人参内生拮抗细菌 NJ13 的鉴定及发酵条件. 农药, 2013, 52 (2): 97-101.
- [9] Jiang Y, Yin W, Cheng C, Cheng G, Gao J. Isolation and screening of antagonistic endophyte from *Panax ginseng*. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2012, 34 (5): 517-521. (in Chinese)
姜云, 尹望, 陈长卿, 陈光, 高洁. 人参内生菌的分离及拮抗菌株的筛选. 吉林农业大学学报, 2012, 34 (5): 517-521.
- [10] Chen Q, Hu H, Gao M, Xu J, Zhou Y, Sun J. Screening and identification of a nitrogen fixing bacteria with 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2011, 17 (6): 1515-1521. (in Chinese)
陈倩, 胡海燕, 高淼, 徐晶, 周义庆, 孙建光. 一株具有 ACC 脱氨酶活性固氮菌的筛选与鉴定. 植物营养与肥料学报, 2011, 17 (6): 1515-1521.
- [11] Sen M, Sen SP. Interspecific transformation in *Azotobacter*. *Journal of General Microbiology*, 1965, 41: 1-6.
- [12] Tian H, Li F, Zhang D, Yao T. Primary research on isolation and ability of phosphorus-solubilizing of turf phosphorus-solubilizing bacteria. *Practaculture Science*, 2005, 22 (10): 92-96. (in Chinese)
田宏, 李凤霞, 张德罡, 姚拓. 草坪草溶磷菌筛选及溶磷能力的初步研究. 草业科学, 2005, 22 (10): 92-96.
- [13] Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978, 43: 1825-1831.
- [14] Wang X, Xing S. Determination of protein quantitation using the method of coomassie brilliant blue. *Tianjin Chemical Industry*, 2009, 23 (3): 40-41. (in Chinese)
王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝测定蛋白含量的研究. 天津化工, 2009, 23 (3): 40-41.
- [15] 李郑义. 高通量筛选和鉴定具 ACC 脱氨酶的细菌. 浙江大学硕士学位论文, 2011.
- [16] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验. 第四版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [17] 汪家政, 范明, 主编. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000.
- [18] Zhang X. Analysis of the factors affecting the available P content in the fermentation liquid of P bacteria determined by Mo-Sb colorimetry. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2008, 36 (12): 4822-4823. (in Chinese)
张祥胜. 钼锑抗比色法测定磷细菌发酵液中有有效磷含量测定值的影响因素分析. 安徽农业科学, 2008, 36 (12): 4822-4823.
- [19] Zhou J, Jia Y, Wang H, Dai C. Diversity and plant growth-promoting potential of culturable endophytic bacteria isolated from the leaves of *Atractylodes lancea*. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33 (4): 1106-1117. (in Chinese)
周佳宇, 贾永, 王宏伟, 戴传超. 茅苍术叶片可培养内生细菌多样性及其促生潜力. 生态学报, 2013, 33 (4): 1106-1117.
- [20] Wang P, Dong B. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobacteria. *Microbiology*, 1994, 21 (6): 323-324. (in Chinese)
王平, 董飏. 小麦根圈细菌铁载体的检测. 微生物学通报. 1994, 21 (6): 323-324.
- [21] 东秀珠, 主编. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [22] Buchana RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [23] Jiang Y, Yin W, Cheng C, Ni R. 16S rDNA-RFLP analysis of culturable endophytic bacteria from *Panax ginseng*. *Journal of Northeast Forestry University*, 2012,

- 40 (8) : 34-39. (in Chinese)
- 姜云, 尹望, 陈长卿, 倪瑞卿. 人参内生可培养细菌 16S rDNA-RFLP 分析. 东北农业大学学报, 2012, 40 (8) : 34-39.
- [24] Qin B, Luo J, Gao M, Hu HY, Xu J, Sun J. Isolation of wheat endophytic diazotrophs and determination of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45 (6) : 1066-1073. (in Chinese)
- 秦宝军, 罗琼, 高淼, 胡海燕, 徐晶, 孙建光. 小麦内生固氮菌分离及其 ACC 脱氨酶测定. 中国农业科学, 2012, 45 (6) : 1066-1073.
- [25] Liu W, Yan S, Yang Q, Wen X. Screening of bacteria with ACC deaminase activity and the effect of the bacteria on the growth of tomato seedlings. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2006, 2: 80-84. (in Chinese)
- 刘维红, 闫淑珍, 杨启银, 温小娟. ACC 脱氨酶活性细菌筛选及其对番茄初生苗生长的影响. 江苏农业科学, 2006, 2: 80-84.
- [26] Jalili F, Khavazi K, Pazira E, Nejati A. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing *Pseudomonas fluorescens* to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*, 2008, 166 (6) : 667-674.
- [27] Ma Y, Rajkumar M, Freitas H. Inoculation of plant growth promoting bacterium *Achromobacter xylooxidans* strain Ax10 for the improvement of copper phytoextraction by *Brassica juncea*. *Journal of Environmental Management*, 2009, 90 (2) : 831-837.
- [28] Xin S, Gao Y, Zhao J. The isolation of PGPR strains with ACC deaminase and their influences on the resistance of oat. *Journal of Changchun Normal University*, 2011, 30 (8) : 58-62. (in Chinese)
- 辛树权, 高扬, 赵骥民. 含 ACC 脱氨酶 PGPR 菌株的分离及其对燕麦耐盐性的影响. 长春师范学院学报, 2011, 30 (8) : 58-62.
- [29] Fu B, Wang W, Tang M, Chen X. Isolation and identification of hydrogen-oxidizing bacteria producing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and the determination of enzymatic activity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49 (03) : 395-399. (in Chinese)
- 付博, 王卫卫, 唐明, 陈兴都. 一株产 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶的氢氧化细菌的分离鉴定及酶活力测定. 微生物学报, 2009, 49 (03) : 395-399.
- [30] Shahzad SM, Khalid A, Arshad M, Kalilur R. Screening rhizobacteria containing ACC-deaminase for growth promotion of chickpea seedlings under axenic conditions. *Soil and Environment*, 2010, 29 (1) : 38-46.
- [31] Shaharoon B, Arshad M, Zahir ZA. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Letters in Applied Microbiology*, 2006, 42 (2) : 155-159.
- [32] Bal HB, Das S, Dangar TK, Adhya TK. ACC deaminase and IAA producing growth promoting bacteria from the rhizosphere soil of tropical rice plants. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53 (12) : 972-984.
- [33] Zhang W, Bai Y, Peng J. Diversity of the *Pseudomonas fluorescens* from rhizosphere of different plants in Shanghai. *Journal of Shanghai Normal University*, 2008, 37 (2) : 182-188. (in Chinese)
- 张文茹, 白燕, 彭珺. 上海地区不同植物根际荧光假单胞菌多样性. 上海师范大学学报, 2008, 37 (2) : 182-188.
- [34] Shen P, Yan S, Chen S, Cui X, Li L. Growth promotion and control for blight of endophytic bacterium with ACC deaminase in capsicum. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2008, 35 (1) : 28-32. (in Chinese)
- 沈萍, 闫淑君, 陈双林, 崔晓灿, 李莉. 具 ACC 脱氨酶活性的植物内生细菌对辣椒的促生作用和对疫霉病的防治作用. 植物保护学报, 2008, 35 (1) : 28-32.
- [35] Zahir ZA, Munir A, Asghar HN, Shaharoon B, Arshad M. Effectiveness of rhizobacteria containing ACC deaminase for growth promotion of peas (*Pisum sativum*) under drought conditions. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 18 (5) : 958-963.

Screening and identification of an endophytic bacterium with 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity from *Panax ginseng* and its effect on host growth

Lei Tian¹, Yun Jiang^{1*}, Changqing Chen², Guanjun Zhang¹, Tong Li², Bin Tong³, Peng Xu¹

¹College of Life Science, ²College of Agronomy, Jilin Agriculture University, Changchun 130118, Jilin Province, China

³Agronomic College, Liaoning Vocational College, Tieling 112099, Liaoning Province, China

Abstract: [Objective] This study aimed to screen endophytic bacteria with 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity from *Panax ginseng* and test the capability of growth promotion to its host. [Methods] In total 120 endophytic bacterial strains isolated from *Panax ginseng* were screened for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity using the qualitative and quantitative methods. The obtained strain was also tested for its ability of nitrogen fixation using the Ashby agar plates and the gene of nifH, for its ability of phosphate solubilization using the Pikovaskaia's plates and quantitative analysis of Mo-Sb-Azocrobiology acid colorimetry, for its ability of producing siderophores using the method of Chrome azurol S detecting, and its effect on promoting growth of *Panax ginseng* by laboratory and field experiments. The bacterial strain with ACC deaminase was identified based on morphology, physiological and biochemical traits, and 16S rRNA sequence analysis. [Results] The bacterial stain JJ8-3 with the ability of producing ACC deaminase activity was obtained through screening, which its ACC deaminase activity was α -ketobutyric acid $6.7 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$. Strain JJ8-3 had other traits of phosphate solubilizing, nitrogen fixation, producing siderophores, and the ability of promoting growth of *Panax ginseng*. Strain JJ8-3 was identified as *Pseudomonas fluorescens*. [Conclusions] Strain JJ8-3 of endophytic bacterium with ACC deaminase activity from *Panax ginseng* was obtained and would lay the foundation for its further study and application on plant growth promotion.

Keywords: *Panax ginseng*, endophytic bacteria, ACC deaminase, growth promoting

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Key Scientific and Technological Project of Jilin Provincial Science and Technology Department (20140204055NY) and by the National Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship (201310193001)

* Corresponding author. Tel: +86-431-84538028; Fax: +86-431-84532887; E-mail: jyjccq@163.com

Received: 27 December 2013/ Revised: 13 March 2014

1953年创刊以来所有文章全文上网

从2008年1月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicron>)浏览、查询、免费下载全文!由于《微生物学报》历史久远,为方便读者查阅,将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、卷、期统计表

2014年7月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953-1956	半年刊	1-4	1-2
1957-1958	季刊	5-6	1-4
1959	季刊	7	1-2
1959-1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3-4
1963-1965	季刊	9-11	1-4
1966	季刊	12	1-2
1966-1972	停刊6年半		
1973-1988	季刊	13-28	1-4
1989-2007	双月刊	29-47	1-6
2008-2013	月刊	48-53	1-12
2014	月刊	54	1-7