



浑源黄芪内生细菌的菌群组成及其功能

高红¹, 盛剑², 白旭², 康宝铃², 孙欢欢², 孙海峰^{2*}, 曹秋芬^{3*}

¹ 山西大学黄土高原研究所, 山西 太原 030006

² 山西大学化学化工学院, 山西 太原 030006

³ 山西农业大学生命科学学院, 山西 太原 030031

摘要:【目的】分离、鉴定浑源黄芪内生细菌, 筛选潜在促生菌, 并研究绿叶挥发物对其生长的影响。

【方法】以山西浑源 7 年生传统采收期黄芪为材料, 采用平板培养法分离内生菌, 16S rRNA 基因序列进行菌株鉴定; 通过培养基中添加 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)、色氨酸及缺氮素培养的方式进行含 ACC 脱氨酶、吡啶乙酸产生及固氮菌初筛; 通过培养基中添加 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、钾长石的方式进行解磷、解钾菌初筛; 电感耦合等离子体质谱等方法进行定量; 通过液体培养基中添加绿叶挥发物的方式, 研究其对含 ACC 脱氨酶菌株的影响; 利用顶空气相色谱-质谱法测定黄芪绿叶挥发物含量。【结果】从浑源黄芪根中分离得 85 株代表性内生菌株, 分别属于变形菌门(*Proteobacteria*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的 13 个属, 其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)、泛菌属(*Pantoea*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株数量较高, 占分离菌株总数的 80.00%。筛选获得的促生菌中, 具有吡啶乙酸合成能力的菌株所占比例最高(69.41%), 其次为含 ACC 脱氨酶和具有固氮活性的菌株, 分别占分离菌株的 40.00%和 31.76%, 而解磷、解钾菌株所占比例较低(分别为 14.12%、7.06%); 双重促生效应菌株中, 兼具吡啶乙酸合成与含 ACC 脱氨酶菌株所占比例最高(37.65%), 其次为兼具吡啶乙酸合成和固氮活性、兼具含 ACC 脱氨酶和固氮活性的菌株, 分别占分离菌株的 28.24%和 24.71%, 兼具含 ACC 脱氨酶和解钾活性的菌株占比最低(1.18%)。2–50 $\mu\text{mol/L}$ 正己醛和 Z-3-己烯醛、5–125 $\mu\text{mol/L}$ 正己醇具有促进部分含 ACC 脱氨酶内生菌株生长的作用。【结论】吡啶乙酸产生和含 ACC 脱氨酶的内生菌株占比高、绿叶挥发物促生菌的存在很可能是浑源黄芪内生菌群适应栖息地独特生境的产物, 绿叶挥发物很可能是影响浑源黄芪内生菌群组成与功能的重要因素之一。

关键词: 黄芪, 内生菌群, 促生菌, 筛选, 绿叶挥发物

基金项目: 山西省黄芪资源产业化及产业国际化协同创新中心项目(HQXTCXZX2016-002, HQXTCXZX2016-003); 国家重点研发技术项目(2019YFC1710800)

*通信作者。Tel: +86-351-7010588; E-mail: 孙海峰, haifeng@sxu.edu.cn; 曹秋芬, qiufengcao@163.com

收稿日期: 2019-10-30; 修回日期: 2020-02-12; 网络出版日期: 2020-02-23

内生菌是栖居在植物组织内部、以宿主植物代谢物为营养物质的一类微生物。通过增加植物养分获取、改善土壤结构、诱导植物防御应答、合成抗生素和植物生长类激素物质或酶等方式,内生菌在植物生长、防御应答等过程中发挥着积极作用^[1-2]。此外,内生菌还具有促进药用植物活性成分合成积累的作用。如 Li 等发现,从黄花蒿分离的一株内生细菌具有促进青蒿素积累的作用^[3]; Zhou 等发现,内生荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* ALEB7B)通过触发活性氧产生的方式,具有增加苍术(*Atractylodes lancea*)氧化性倍半萜种类和含量的作用^[4]。挖掘药用植物内生菌资源,发现其有益功能,对于中药材活性成分合成积累机制研究、中药材生态种植具有重要意义。

已有研究表明,植物微生物装配驱动不仅受环境、土壤因素影响,还与植物因素如水分、营养素的释放及次生代谢物的产生有关。通过对比两种百里香植物叶片、根及根际土壤可培养细菌组成, Checcucci 等发现叶腺挥发油是影响内生菌群组成的重要因素之一,富含挥发油的叶片菌群多样性指数高^[5]。众所周知,中药材品质与产地息息相关,产自道地产区的药材即道地药材除品质佳、临床疗效好外,有的还含有较高水平的挥发性有机化合物,其影响是否会在药用植物内生菌群组成及功能上有所体现?

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 或膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge 的干燥根,是一味临床使用率极高的中药,产于我国北方各地。其中,产自山西浑源、应县等恒山山脉周边的黄芪,属道地药材,不仅药材品质佳,也含有较高水平的绿叶挥发物^[6]。基于 16S rRNA 高通量测序技术的前期研究已揭示,浑

源黄芪根细菌菌群多样性较高,产地独特的细菌分类单元(operational taxonomic units, OTUs)数较高^[7]。但是,浑源黄芪可培养内生菌群组成与功能如何?绿叶挥发物影响如何?目前还不清楚。

本研究以 7 年生浑源黄芪为研究材料,首先采用平板培养法进行内生菌的分离及潜在促生菌的筛选,再以含 ACC 脱氨酶的内生菌株为代表,分析浑源黄芪主要绿叶挥发物对内生菌生长的影响;最后,通过基于根解剖学结构的黄芪绿叶挥发物含量数据,佐证黄芪内源绿叶挥发物促进其内生菌生长的作用。研究表明,中药材挥发物很可能是影响药用植物微生物招募及其功能的重要因素,中药材种植与田间管理应重视与挥发物具协同作用的内生菌资源挖掘与利用。

1 材料和方法

1.1 植物样品

山西浑源 7 年生黄芪,经山西医科大学高建平教授鉴定为蒙古黄芪。田间采集时,挑取健康、无病害症状的根,将其装入无菌塑料袋中,低温运至实验室(24 h 内)。在实验室中,用自来水冲洗干净根表面附着的土后,将样本分成 2 份,一份立即用于内生菌分离;另一份置于冰上,按其解剖学结构,剥离为周皮、次生韧皮部和次生木质部, -80 °C 保存,用于绿叶挥发物的定量分析。

1.2 试剂

1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)、正己醛、Z-3-己烯醛和正己醇购自 Sigma-Aldrich(德国); *Taq*TM酶等分子生物学用试剂购自大连宝生物。

1.3 内生菌株分离与纯化

参照文献报道方法^[8],进行黄芪根表面消毒及

内生菌分离。根据菌落长出时间及菌落特征，挑选代表性单菌落，转接于新的 LB 固体培养基上，进行纯化培养，直至获得菌落特征完全一致的单菌落，视为已纯化内生菌株。确定菌株编号并接种于 LB 液体培养基中，30 °C、180 r/min 摇床培养至对数生长期后期($OD_{600}=1.8-2.0$)，-80 °C 保存(内含 20%甘油)。

1.4 内生菌株鉴定

利用 16S rRNA 基因序列进行菌株鉴定。无菌牙签沾取细菌培养物少许，混悬于 50 μ L 无菌水中，100 °C 裂解 5 min，作为 PCR 扩增用模板；利用 1492R 和 27F 引物对，进行 PCR 扩增。PCR 反应体系组成、反应条件及引物序列见文献[8]。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测确认后，委托中美泰和进行双向测序，获得的序列经 BLAST 软件在线比对(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)，获得序列相似度数据，鉴定菌株至属或种。

1.5 潜在促生菌筛选

参照文献报道方法^[9]，进行含 ACC 脱氨酶菌株筛选。鉴于固氮菌在含/不含 ACC 的 DF 培养基上均可生长，筛选时，设置不含 ACC 和 $(NH_4)_2SO_4$ 的 DF 盐培养基对照。连续传代 5 次后，在含 ACC 和不含氮源的 DF 培养基上均可生长者，具有固氮活性；仅在含 ACC 的培养基上生长者，含 ACC 脱氨酶。

参照文献报道方法^[10]，进行产吲哚乙酸(IAA)菌株初筛以及 IAA 合成量的定量分析。利用 Pikovskaya 固体培养基进行解磷菌初筛，钼蓝法定量分析解磷活性^[11]。参照 Anjanadevi 等报道方法^[12]，进行解钾菌初筛，电感耦合等离子体质谱法定量分析解钾活性。

1.6 黄芪主要绿叶挥发物对含 ACC 脱氨酶内生菌生长的影响

以 50%乙醇(V/V)为溶剂，配制绿叶挥发物储备液，-20 °C 保存。按 1‰ (V/V)的量添加于 DF 盐液体培养基中，再接种 1‰ (V/V)液体培养物(处于对数生长期后期)，28 °C、180 r/min 摇床培养至对数生长期后期，测定 OD_{600} 。以正常培养物为正常对照，添加 1‰ (V/V) 50%乙醇者为溶剂对照，每组生物学重复 3 次。以正常对照组 OD_{600} 为参照，计算溶剂对照(vehicle control, VC)和绿叶挥发物处理组菌株相对生长率，即相对生长率= $OD_{600, VC/处理组}/OD_{600, 正常对照}$ 。

鉴于醛类挥发物抑菌活性强于醇类^[13]，醛类挥发物浓度梯度设置如下：2、10、50、250、1250 和 6250 μ mol/L，醇类挥发物为：5、25、125、625、3125 和 6250 μ mol/L。

1.7 黄芪主要绿叶挥发物定量分析

液氮研磨样品呈粉末，精密称定 0.20 g，转移至 20 mL 顶空瓶中，密封，置于 TriPlus 300 顶空进样器(Thermo Fisher)中 25 °C 平衡 20 min，顶空进样于 TRACETM 1300 气相色谱-ISQTM 质谱仪。进样量：1 mL；色谱柱：TR-5(0.25 μ m \times 0.25 mm \times 30 m)。

色谱条件：进样口温度：230 °C；载气：氦气；流速：1.1 mL/min；升温程序：30 °C 2 min, 1 °C/min 升至 38 °C, 20 °C/min 升至 250 °C, 250 °C 5 min。

质谱条件：汽化室温度：250 °C；电子能量：70 eV；离子源温度：230 °C；四极杆温度：150 °C； m/z 扫描范围：30-500；进样模式：非分流模式。选择性离子监测模式进行定量分析，扫描时间：0.20 s；定量离子信息：Z-3-己烯醛为 83，正己醛为 72，正己醇为 69。

1.8 数据处理

菌株活性定量分析数据、相对生长率及绿叶挥发物含量以平均值±标准偏差形式表示。采用 GraphPad Prism 7.01 进行制图, 利用 IBM SPSS Statistics(v25)进行单因素方差分析, 阈值设定为 $P \leq 0.05$ 。

2 结果和分析

2.1 浑源黄芪内生细菌菌群组成分析

从黄芪根部共分离得 85 株内生细菌。基于 16S rRNA 基因序列分析表明, 所有菌株的序列同源性与现有数据库相似度均大于 99%, 鉴定为已知种属, 分属 4 个门和 13 个属。在门水平, 67 株属变形菌门(*Proteobacteria*), 在分离菌株中所占比例最高, 为 78.82%; 8 株属厚壁菌门(*Firmicutes*)、7 株属放线菌门(*Actinobacteria*), 分别占分离菌株总数的 9.41% 和 8.24%; 3 株属拟杆菌门(*Bacteroidetes*), 所占比例最小(3.53%)。相关序列

已提交 GenBank, 登录号分别为 KY633768、KY633769、KY634236、KY634241、KY634419、KY634431、KY636436、KY636441–KY636443、MN954231–MN954287。

属水平的分离菌株分布见图 1。从该图可以看出, 泛菌属(*Pantoea*)菌株占比最高, 达 45.88%, 有 39 株; 其次为假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株, 占分离菌株总数的 25.88%(22 株); 再次为葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株(7 株), 占分离菌株的 8.24%。节杆菌属(*Arthrobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)菌株所占比例较低, 分别为 3.53%、3.53%和 2.35%。此外, 还包括欧文氏菌属(*Erwinia*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、贪噬菌属(*Variovorax*)、色杆菌属(*Chryseobacterium*)、微杆菌属(*Microbacterium*)和植物杆菌属(*Plantibacter*)菌株各 1 株(1.18%)。

2.2 潜在促生菌筛选及其组成分析

筛选结果表明, 59 株可以合成植物生长类激

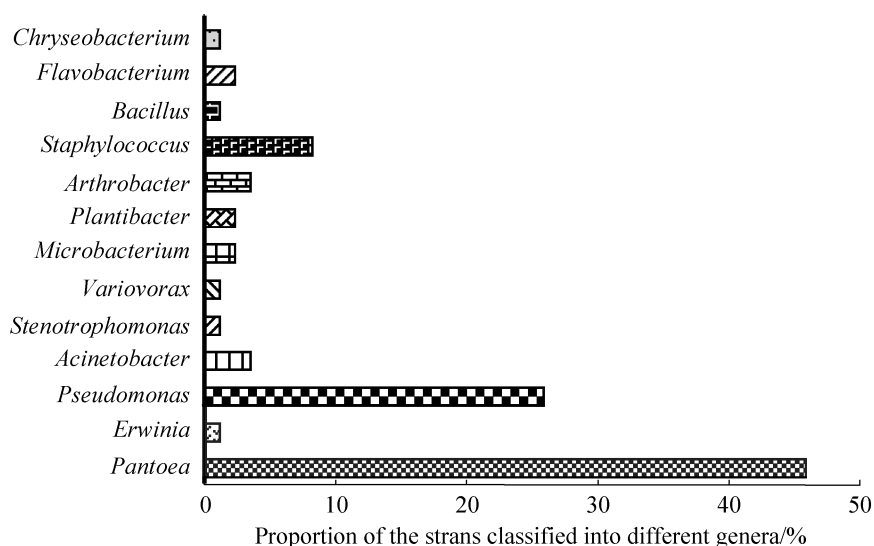


图 1. 属水平上的浑源黄芪内生细菌菌株分布

Figure 1. Distribution of the bacterial isolates from *Astragali Radix* in Hunyuan, Shanxi, China at the genus level.

素吡啶乙酸，占分离菌株的 69.41%；根据 Salkowski 试剂显色结果，选取其中 36 株进行吡啶乙酸合成量的定量分析，进一步筛选得 6 株合成量高于 20 mg/L 的菌株；其中菌株 H61 吡啶乙酸合成量最高，为 32.09 ± 1.25 mg/L。含 ACC 脱氨酶的内生菌株 34 株，占分离菌株的 40.00%；具有固氮活性的菌株 27 株，占分离菌株的 31.76%。相对而言，具有解磷和解钾活性的内生菌株所占比例较小，分别为 14.12% (12 株) 和 7.06% (6 株)；定量分析表明，菌株 H78 解磷活性最高，培养至对数生长后期，培养液中可溶性磷含量为 126.36 ± 9.79 mg/L；菌株 H17 解钾活性最高，培养至对数生长后期，培养液中可溶性钾含量为 14.23 ± 0.23 mg/L。

属水平的促生分离菌株的分布特征见图 2。就筛选涉及的 5 种促生效应而言，泛菌属促生菌株所占比例均为最高，其中含 ACC 脱氨酶的分生菌属占比最高，达 70.58%，占比最低的解钾菌所占比例亦高达 33.33%；其次为假单胞菌属促生菌，其中解钾菌占比最高，为 33.33%，含 ACC 脱氨酶的菌株占比最低，为 14.71%。此外，本实验分

离获得的芽孢杆菌属和黄杆菌属细菌菌株中，未筛选得到具潜在促生效应的菌株。

在上述分析的基础上，我们进一步统计了兼具吡啶乙酸产生、含 ACC 脱氨酶及其他促生活性的菌株。结果表明，兼具吡啶乙酸产生和含 ACC 脱氨酶的菌株数量最高 (32 株)，占分离菌株的 37.65%；其次为兼具吡啶乙酸产生和固氮活性的菌株 (24 株)，占分离菌株的 28.24%；兼具含 ACC 脱氨酶和固氮活性的菌株数量也比较高 (21 株)，占分离菌株的 24.71%；兼具含 ACC 脱氨酶和解钾活性的菌株数量最少，仅 1 株。

2.3 绿叶挥发物对含 ACC 脱氨酶菌株生长的影响

在植物-内生菌共生体系中，含 ACC 脱氨酶的内生菌可以利用乙烯合成前体 ACC 作为营养源，阻断植物体内乙烯的合成，在缓解宿主植物环境胁迫中发挥作用^[10]。绿叶挥发物是植物在受到昆虫啃食、辐射等环境胁迫时，细胞膜损伤产生的游离不饱和脂肪酸，在脂肪氧合酶、脂肪酸氢过氧化物裂解酶催化作用下形成的 C6 挥发醛、醇及其酯化产物，不仅与植物特有气味如“青草

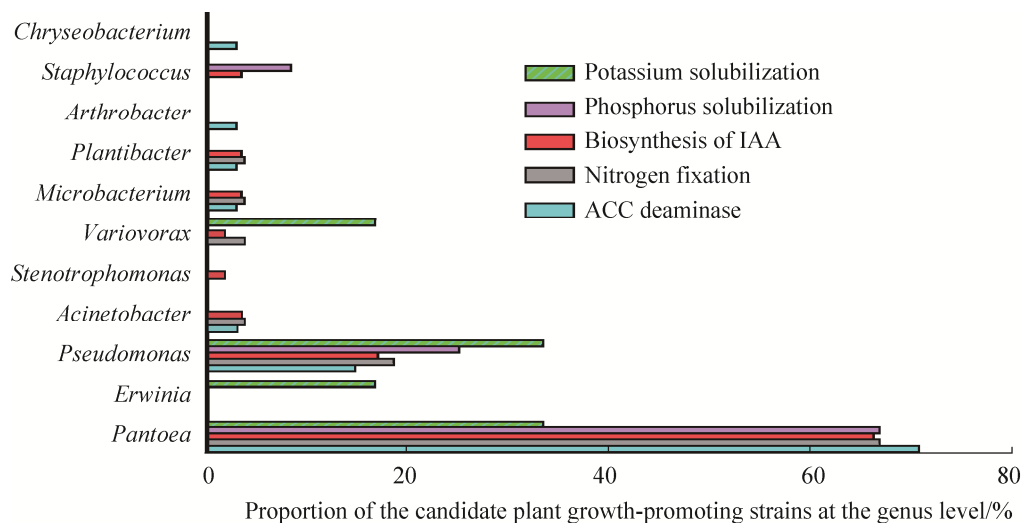


图 2. 属水平的植物生长促进分离菌株分布

Figure 2. Distribution of the candidate plant growth-promoting isolates at the genus level.

味”、“豆腥味”形成有关,更是植物化学防御体系的重要信号分子^[14]。基于顶空 GC-MS 技术的挥发性有机化合物谱表征表明, 浑源黄芪中主要含有的绿叶挥发物有正己醛、正己醇和 Z-3-己烯醛, 属黄芪主要挥发物(未发表数据)。基于此, 选取 10 株含 ACC 脱氨酶的内生菌株为代表, 研究绿叶挥发物对黄芪根内生菌生长的影响, 结果见图 3。

就最高浓度处理组(6250 $\mu\text{mol/L}$)而言, 正己醛处理组生长的菌株数量为 3, 分别是 H35、H53 和 H82; 正己醇处理组生长的菌株包括 H35、H44、H53、H65 和 H82, 共 5 株; 而 Z-3-己烯醛处理组无菌株生长。就 1250 $\mu\text{mol/L}$ 处理组而言, 10 株菌在含正己醛的培养液中均有不同程度的生长, 且菌株 H44 相对生长率明显高于溶剂对照; 而 Z-3-己烯醛处理组中, 仅有 3 株菌(H35、H65 和 H82) 生长。该结果提示, 较高浓度的 Z-3-己烯醛抑菌作用较正己醛强, 正己醇抑菌作用最弱, 与文献报道一致^[13]。当培养液中正己醛和 Z-3-己烯醛浓度较低(2、10、50 $\mu\text{mol/L}$)时, 二者对菌株 H19、H35、H65 生长表现出明显的促进作用。此外, 低、中浓度的正己醇(5、25、125 $\mu\text{mol/L}$)对上述 3 菌株生长亦具有明显的促进作用, 培养液中正己醇浓度高达 625 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对菌株 H65 生长还具有明显的促进作用。

2.4 浑源黄芪主要绿叶挥发物含量分析

已有研究表明, 植物根微生物装配不仅与土壤、生物地理因素有关, 亦与其解剖学部位有关^[15]。分析不同解剖学部位中的挥发物组成和含量变化, 将有助于阐释该问题。传统采收期早、晚两时间点浑源黄芪周皮、次生韧皮部、次生木质部中 3 种绿叶挥发物含量测定结果见表 1。从表中数据可以看出, 9 月 28 日采集的样本中均可以检测到正己醛, 且周皮中含量最高(155.36 \pm 43.79 $\mu\text{mol/kg}$, 鲜重),

次生韧皮部含量最低(95.94 \pm 10.20 $\mu\text{mol/kg}$), 次生木质部含量介于二者之间(116.03 \pm 17.42 $\mu\text{mol/kg}$), 而 10 月 17 日采集的样本中均未检测到该挥发物。

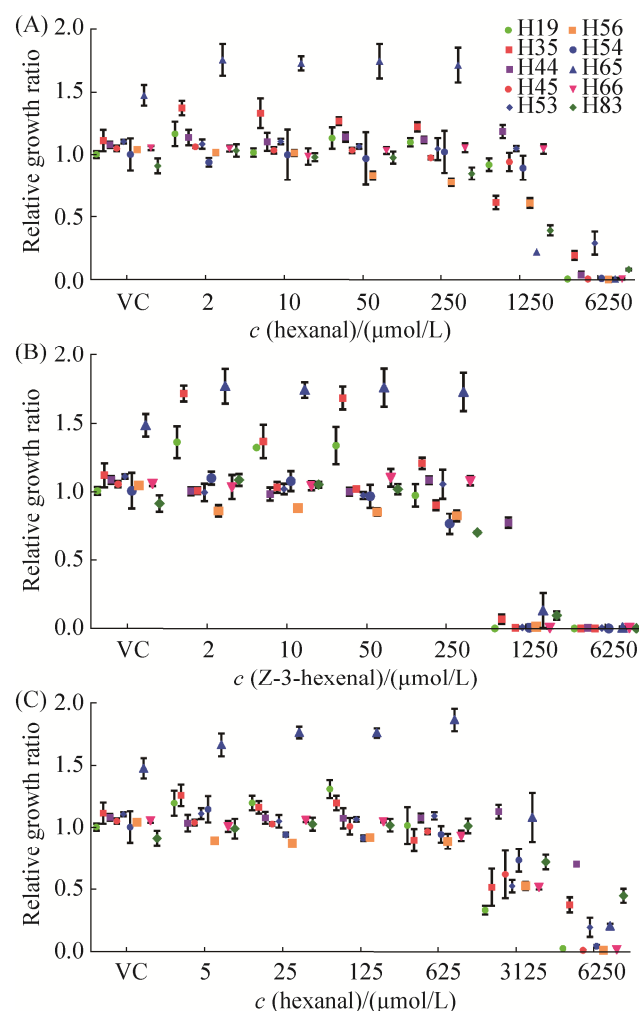


图 3. 浑源黄芪主要绿叶挥发物对含 ACC 脱氨酶的 10 株内生菌株生长的影响

Figure 3. Effects of main green leaf volatiles in *Astragali Radix* in Hunyuan on the growth of the ten strains with ACC deaminase. Relative growth ratios of the strains in the vehicle control (VC) and treated groups with different concentrations of green leaf volatiles were calculated using the average OD_{600} of the normal control as reference. The icons in the rectangle frame correspond to the different strains examined. VC: vehicle control; A: hexanal; B: Z-3-hexenal; C: hexanol.

表 1. 浑源黄芪主要绿叶挥发物含量($\mu\text{mol}/\text{kg}$, 鲜重)Table 1. The contents of main green leaf volatiles ($\mu\text{mol}/\text{kg}$, fresh weight) in different parts of *Astragali Radix* in Hunyuan

Anatomical parts	Date of sampling	Hexanal	Z-3-hexenal	Hexanol
Periderm	2018.09.28	155.36 \pm 43.79 ^a	69.88 \pm 8.36 ^b	21.60 \pm 2.08 ^b
	2018.10.17	—	39.93 \pm 3.46	25.28 \pm 4.37 ^b
Secondary phloem	2018.09.28	95.94 \pm 10.20 ^b	204.61 \pm 50.37 ^a	23.14 \pm 4.31 ^b
	2018.10.17	—	38.41 \pm 1.60	22.50 \pm 1.10 ^b
Secondary xylem	2018.09.28	116.03 \pm 17.42 ^{ab}	198.52 \pm 49.89 ^a	31.59 \pm 2.10 ^a
	2018.10.17	—	40.70 \pm 5.12	76.35 \pm 15.99 ^a

与正己醛不同的是, 两个取样时间点样本中均可以检测到 Z-3-己烯醛和正己醇。9月28日采集的样本中, 次生韧皮部和木质部中 Z-3-己烯醛含量较高, 分别为 204.61 \pm 50.37 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 和 198.52 \pm 49.89 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, 周皮中的含量较低, 为 69.88 \pm 8.36 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 。10月17日采集的样本中, 虽然都可以检测到 Z-3-己烯醛, 但与9月28日采集的样本对应部位相比, 含量显著降低。正己醇含量数据分析表明, 两个取样点样本中均可以检测到该挥发物, 且在次生木质部的含量显著高于其他部位; 10月17日采集样本中木质部正己醇含量(76.35 \pm 15.99 $\mu\text{mol}/\text{kg}$)明显高于9月28日对应部位(31.59 \pm 2.10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$)。由此可以看出, 黄芪绿叶挥发物含量受具体的采收时间点、根解剖学结构影响, 存在含量减少、增加或检测不到的情况; 浑源黄芪绿叶挥发物含量普遍低于 250 $\mu\text{mol}/\text{kg}$, 在本研究涉及的 10 株内生菌株可生长浓度范围内, 也在具促生效应的绿叶挥发物浓度范围。

3 讨论

普遍的观点认为, 中药材的道地性是在遗传因素、环境变化和人文因素的共同作用下产生的。

除遗传因素外, 特定地域的独特生境在道地药材品质形成中发挥着重要作用。通过综述内生菌与宿主植物关系, 马昭等提出“不同产地独特的内生菌种群和群落结构特征很可能赋予了不同产地一些中药材独有的品质特点, 在影响中药材道地性的诸多因素中, 内生菌可能发挥着独特作用”^[16]。本研究采用传统培养法, 从 7 年生浑源黄芪中分离得 85 株内生菌中, 59 株可以合成吡啶乙酸, 32 株含 ACC 脱氨酶, 27 株具有固氮活性, 兼具吡啶乙酸产生和含 ACC 脱氨酶或固氮活性的菌株数量亦较高, 分别为 30 株和 26 株, 兼具固氮活性和含 ACC 脱氨酶的菌株数量也比较高(22 株); 促生内生菌株所占比例较高, 很可能与浑源黄芪内生细菌适应道地产区独特生境有关。

通过比较 8 种绿叶挥发物对临床致病菌生长的影响, Nakamura 和 Hatanaka 发现, 醛类挥发物杀菌效应强于醇, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1–10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) Z-3-己烯醛抑制金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) IFO 12732 和大肠杆菌(*E. coli*) IFO 3301 效应最佳^[17]。Demirtas 等发现, 绿叶挥发物对牛瘤胃革兰氏阳性菌的抑菌效果优于革兰氏阴性菌, 其中 Z-3-己烯醛抑菌效应最佳, 最小抑菌浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (~5 mmol/L); 187.5、375、750 mg/d 的添加量, 处理瘤胃 14 d, *Butyrivibrio fibrisolvens*

和 *Streptococcus bovis* 数量明显增加, *Ruminococcus albus* 和 *Ruminococcus flavefaciens* 数量较为稳定, 提示 Z-3-己烯醛具有选择性促进牛瘤胃微生物生长的作用^[18]。在本研究中, 我们分析了浑源黄芪主要绿叶挥发物对含 ACC 脱氨酶内生菌生长的影响, 发现内生菌对低浓度绿叶挥发物响应有所不同, 存在相对生长率明显增加的菌株。鉴于浑源黄芪在其自然生境中, 根释放的绿叶挥发物浓度应低于其含量数据, 我们推测浑源黄芪根中栖居着可以代谢、转化绿叶挥发物的内生菌株。通过对比盆栽拟南芥局部受损叶片中, 损伤及完好无损部位绿叶挥发物谱, Matsui 等提出, 在无损伤部位 Z-3-己烯醛还原为 Z-3-己烯醇及其乙酸酯, 有助于降低 Z-3-己烯醛的毒性, 利于健康细胞的生存^[19]。因此, 除植物自身的酶系统外, 栖居的微生物亦可能参与绿叶挥发物特别是醛类挥发物的代谢转化, 基于微生物-宿主植物互作的药用植物次生代谢物质合成积累研究中应重视挥发性有机化合物的潜在有益作用挖掘。

参 考 文 献

- [1] Pańka D, Piesik D, Jeske M, Baturo-Cieśniewska A. Production of phenolics and the emission of volatile organic compounds by perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.)/*Neotyphodium lolii* association as a response to infection by *Fusarium poae*. *Journal of Plant Physiology*, 2013, 170(11): 1010–1019.
- [2] Santhanam R, Luu VT, Weinhold A, Goldberg J, Oh Y, Baldwin IT. Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(36): E5013–E5020.
- [3] Li J, Zhao GZ, Varma A, Qin S, Xiong Z, Huang HY, Zhu WY, Zhao LX, Xu LH, Zhang S, Li WJ. An endophytic *Pseudonocardia* species induces the production of artemisinin in *Artemisia annua*. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e51410.
- [4] Zhou JY, Yuan J, Li X, Ning YF, Dai CC. Endophytic bacterium-triggered reactive oxygen species directly increase oxygenous sesquiterpenoid content and diversity in *Atractylodes lancea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(5): 1577–1585.
- [5] Checcucci A, Maida I, Bacci G, Ninno C, Bilia AR, Biffi S, Firenzuoli F, Flamini G, Fani R, Mengoni A. Is the plant-associated microbiota of *Thymus* spp. adapted to plant essential oil? *Research in Microbiology*, 2017, 168(3): 276–282.
- [6] Sun HF, Kang BL, Chai Z, Sun HH, Du HZ, Gao JP, Feng QJ, Zhang CF, Cao QF, Guo LP. Characterization of root-associated microbiota in medicinal plants *Astragalus membranaceus* and *Astragalus mongholicus*. *Annals of Microbiology*, 2017, 67(9): 587–599.
- [7] Sun HF, Kang BL, Kang LP, Guo LP, Sun HH, Gao JP. Involvement of C6-volatiles in quality formation of herbal medicine: a case study in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus*. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 2017, 90: 214–223.
- [8] 康宝玲. 山西黄芪根际及根微生物组初探. 山西大学硕士学位论文, 2017.
- [9] Tian L, Jiang Y, Chen CQ, Zhang GJ, Li T, Tong B, Xu P. Screening and identification of an endophytic bacterium with 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase activity from *Panax ginseng* and its effect on host growth. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(7): 760–769. (in Chinese) 田磊, 姜云, 陈长卿, 张冠军, 李桐, 佟斌, 许朋. 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. *微生物学报*, 2014, 54(7): 760–769.
- [10] Feng WW, Wu MX, Si YT, Xing K, Qin S, Jiang JH, Peng X. Screening and biodiversity of endophytic and rhizosphere bacteria containing ACC deaminase from halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(4): 719–728. (in Chinese) 冯维维, 武美贤, 司雨婷, 邢珂, 秦盛, 蒋继宏, 彭学. 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. *微生物学报*, 2016, 56(4): 719–728.
- [11] Murphy J, Riley JP. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 1962, 27: 31–36.
- [12] Anjanadevi IP, John NS, John KS, Jeeva ML, Misra RS. Rock inhabiting potassium solubilizing bacteria from Kerala, India: characterization and possibility in chemical K fertilizer substitution. *Journal of Basic Microbiology*, 2016, 56(1): 67–77.
- [13] Gardner HW, Dornbos Jr DL, Desjardins AE. Hexanal, *trans*-2-Hexenal, and *trans*-2-nonenal inhibit soybean, *Glycine max*, seed germination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38(6): 1316–1320.
- [14] Sun HF, Li ZY, Wu B, Qin XM. Review of recent advances on the production and eco-physiological roles of green leaf volatiles. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 2013, 37(3): 268–275. (in Chinese)
孙海峰, 李震宇, 武滨, 秦雪梅. 绿叶挥发物产生特征及其生态生理作用研究进展. *植物生态学报*, 2013, 37(3): 268–275.
- [15] Fitzpatrick CR, Copeland J, Wang PW, Guttman DS, Kotanen PM, Johnson MTJ. Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(6): E1157–E1165.
- [16] Ma Z, Tang CC, Zhang C, Hu ZB, Wang LL, Li WK. The relationship between endophytes and host plants: implications for research on geoherbism. *Acta Universitatis Traditionis Medicinalis Sinensis Pharmacologiaeque Shanghai*, 2015, 29(6): 4–11. (in Chinese)
马昭, 唐承晨, 张纯, 胡之璧, 王莉莉, 黎万奎. 内生菌与宿主植物关系对中药材道地性研究的启示. *上海中医药大学学报*, 2015, 29(6): 4–11.
- [17] Nakamura S, Hatanaka A. Green-leaf-derived C6-aroma compounds with potent antibacterial action that act on both Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(26): 7639–7644.
- [18] Demirtas A, Ozturk H, Sudagidan M, Keyvan E, Yavuz O, Gulay OY, Musa SAA. Effects of commercial aldehydes from green leaf volatiles (green odour) on rumen microbial population and fermentation profile in an artificial rumen (Rusitec). *Anaerobe*, 2019, 55: 83–92.
- [19] Matsui K, Sugimoto K, Mano J, Ozawa R, Takabayashi J. Differential metabolisms of green leaf volatiles in injured and intact parts of a wounded leaf meet distinct ecophysiological requirements. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e36433.

Composition and function of endophytic bacteria residing the root tissue of *Astragalus mongholicus* in Hunyuan

Hong Gao¹, Jian Sheng², Xu Bai², Baoling Kang², Huanhuan Sun², Haifeng Sun^{2*}, Qiufen Cao^{3*}

¹ Institute of Loess Plateau, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China

² College of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi Province, China

³ College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taiyuan 030031, Shanxi Province, China

Abstract: [Objective] This study aimed to isolate and screen bacterial endophytes with potential plant growth-promoting activities from *Astragali Radix*, and to explore effects of green leaf volatiles (GLVs) on the endophytes. [Methods] Plate culture method was used to isolate bacterial endophytes from the root tissue of 7-year old plants of *A. mongholicus* in Hunyuan, Shanxi, China and 16S rRNA gene sequencing was used to identify the isolates. The screening for plant growth-promoting endophytes was performed by adding exogenous 1-aminocycline-1-carboxylic acid (ACC), tryptophan, calcium phosphate and feldspar into the medium and by incubation in the medium lacking nitrogen source, further quantification was carried out by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and spectrophotometry. Effect of the main GLVs in *Astragali Radix* on the isolates was investigated by adding synthetic chemicals into the liquid medium and the ten isolates containing ACC deaminase were used as representative strains. Headspace GC-MS was performed to determine the contents of the main GLVs in *Astragali Radix*. [Results] A total of 85 bacterial strains were obtained and classified into the follow phyla: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *actinobacteria* and *Bacteroides*. At the genus level, they were categorized into 13 genera and the stains of *Pseudomonas*, *Pantoea* and *Staphylococcus* were more abundant (80.00%) than the ones of the others. Among candidate plant growth-promoting isolates, these that can synthesize indoleacetic acid (IAA) shared the biggest proportion (69.41%), followed by these with ACC deaminase (40.00%) and nitrogen fixation activity (31.76%), and these that can solubilize phosphorus and potassium shared relatively lower proportions (i.e., 14.12% and 7.06%). Among the isolates with double plant growth-promoting activities, the IAA-producing strains containing ACC deaminase shared the biggest proportion (37.65%), followed by the IAA-producing strains with nitrogen fixation activity and the strains with ACC deaminase and nitrogen fixation activity, accounting for 28.24% and 24.71%, respectively, while these that not only contain ACC deaminase but can solubilize potassium bearing minerals shared the smallest part (1.18%). Besides, low concentrations of GLVs (i.e., 2–50 $\mu\text{mol/L}$ of hexanal and Z-3-hexenal, and 5–125 $\mu\text{mol/L}$ hexanol) exerted positive effects on the growth of a few strains with ACC deaminase. [Conclusion] There were bigger proportions of the isolates that can produce IAA and/or contain ACC deaminase and GLV growth-promoting strains in the bacterial community residing the root tissue of *A. mongholicus* in Hunyuan, which might be resulted from the local adaptation. GLVs might be involved in the shaping of the composition and function of endophytic communities in *Astragali Radix* in Hunyuan.

Keywords: *Astragali Radix*, endophytic bacteria, plant growth-promotion, screening, green leaf volatiles

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Collaborative Innovation Center of Astragali Radix Resource Industrialization and Internationalization (HQXTCXZX2016-002, HQXTCXZX2016-003) and by the National Key R&D Program of China (2019YFC1710800)

*Corresponding author. Tel: +86-351-7010588; E-mail: Haifeng Sun, haifeng@sxu.edu.cn; Qiufen Cao, qiufengcao@163.com

Received: 30 October 2019; Revised: 12 February 2020; Published online: 23 February 2020