

# 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

张越己<sup>1</sup> 秦盛<sup>1\*</sup> 卞光凯<sup>1</sup> 费世明<sup>2</sup> 李钦<sup>1</sup> 曹成亮<sup>1</sup> 王乐辉<sup>2</sup> 蒋继宏<sup>1\*</sup>

(1. 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)

(2. 四川省林业科学研究院 四川 成都 610081)

**摘要:**【目的】获得具有产 ACC、IAA, 铁载体, 能固氮或解磷的潜在促生菌株。【方法】通过稀释涂布的方法, 从麻疯树根际土壤中分离得到 98 株细菌, 从中选取 28 株以产 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶为主要促生指标进行筛选, 同时检测了其产吲哚乙酸(IAA)、固氮、解磷及铁载体等促生指标的能力。【结果】结果显示, 46%的菌株能产 ACC 脱氨酶, 其含量最高可达到 128.308  $\mu\text{mol } \alpha\text{-KA}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ , 68%的菌株能产生 IAA, 54%的菌株有固氮的能力, 32%的菌株有解磷的能力。少量菌株同时具有产 ACC 脱氨酶、IAA, 固氮, 解磷等能力。挑选代表性菌株进行 16S rRNA 序列分析, 这些菌株属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和产碱杆菌属(*Advenella*)等 8 个属, 其中多数菌株(50%)属于芽孢杆菌属, 系统发育分析表明菌株 KLBMP 4817、KLBMP 4821 和 KLBMP 4824 为窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)的潜在新种。【结论】攀枝花麻疯树根际土壤细菌中含有丰富的遗传多样性, 且存在大量的促生菌株。其中, 菌株 KLBMP 4804 产 ACC 脱氨酶含量最高。菌株 KLBMP 4820 产 IAA 含量最显著。

**关键词:** ACC 脱氨酶, 麻疯树, PGPR, 促生, 系统发育分析

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31000005, 30872028); 江苏省高校自然科学基金项目(No. 10KJB180008); 江苏省高校优秀科技创新团队资助项目(药用微生物前期开发); 江苏省研究生教育创新工程项目(No. CXLX11\_0911)

\*通讯作者: 秦盛: Tel: 86-516-83403515; ㊚: shengqin@jsnu.edu.cn

蒋继宏: ㊚: jhjiang@jsnu.edu.cn

收稿日期: 2011-10-17; 接受日期: 2011-11-24

# Isolation, screening and phylogenetic analysis of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase from *Jatropha curcas* L.

ZHANG Yue-Ji<sup>1</sup> QIN Sheng<sup>1\*</sup> BIAN Guang-Kai<sup>1</sup> FEI Shi-Ming<sup>2</sup>  
LI Qin<sup>1</sup> CAO Cheng-Liang<sup>1</sup> WANG Le-Hui<sup>2</sup> JIANG Ji-Hong<sup>1\*</sup>

(1. The Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants of Jiangsu Province,  
Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

(2. Sichuan Academy of Forestry, Chengdu, Sichuan 610081, China)

**Abstract:** [Objective] In order to obtain plant growth promoting strains of production 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase, nitrogen fixation, phosphate solubilization, and production of indoleacetic acid and siderophore. [Methods] 98 rhizobacteria from *Jatropha curcas* L. were isolated by the method of grinding separation and 28 isolates were selected for the detection of plant growth promoting index of production ACC deaminase, nitrogen fixation, phosphate solubilization, and production of indoleacetic acid and siderophore. [Results] The results showed that 46% of the isolates produced ACC with the maximum ACC deaminase was 128.308  $\mu\text{mol } \alpha\text{-KA}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ , 68% of the isolates produced IAA, 54% had nitrogen fixation ability and 32% of them had phosphate solubilization ability. Some of the representative isolates were selected for the 16S rRNA gene sequencing and analyzing. The representative strains belonged to 8 different genera including *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas* and *Alcaligenes*, with *Bacillus* as the predominant genus (50%). Phylogenetic analysis demonstrated that strain KLBMP 4817, KLBMP 4821 and KLBMP 4824 could be potential novel species of the genera *Stenotrophomonas* and *Paenibacillus*. [Conclusion] The rhizobacteria of *Jatropha curcas* L. in Panzhihua City contain a variety of bacteria as well as source of new taxa. Some of them had the ability of plant growth promoting. Among them, strain KLBMP 4804 (*Bacillus*) had the strongest ACC deaminase activity. Strain KLBMP 4820 (*Bacillus*) had the strongest ability of IAA production respectively.

**Keywords:** ACC deaminase, *Jatropha curcas* L., PGPR, Growth promoting, Phylogenetic analysis

麻疯树(*Jatropha curcas* L.)是耐旱而非食用型的油种子植物, 很容易适应半干旱土壤和荒地, 因此麻疯树被认为是潜在的可替代能源植物。在印度, 麻疯树已晋升为该国的生物柴油资源<sup>[1]</sup>。此外, 麻疯树也是重要的药用植物, 其代谢产物具有抗病毒、抗肿瘤等药用价值。然而麻疯树抗寒能力较弱, 因而在高海拔寒冷地区以及我国中东部的栽培与引种受到了限制。另外, 近年

来我国南方常遭遇连续降雪、冰冻、干旱等恶劣天气, 使得麻疯树生长也面临着如何有效提高幼苗的抗寒性、抗干旱能力的严峻问题。因此, 如何提高该物种在低温、干旱环境的适应性及其初期幼苗活力, 建立良好的生长体系, 已成为综合开发该资源必须解决的问题和实现麻疯树各种生物价值的重要途径。

植物根际促生菌 (Plant growth-promoting

rhizobacteria, PGPR)是指生存于植物根际、根表,并能间接或直接地促进或调节植物生长的微生物<sup>[2]</sup>。PGPR 能够通过协助植物从环境中摄取养分来进行直接的促生作用;也能够降低恶劣环境给植物造成的伤害而间接地产生促生作用。尽管 PGPR 的促生机制还没有完全弄清楚,但是它多样的促生作用已被广泛接受。其促生机制主要包括:(1)产生调节植物生长的信号物质,如赤霉素、吲哚乙酸、细胞分裂素和乙烯;(2)非共生固氮;(3)产嗜铁素、抗生素和氰化物抵抗病原菌;(4)溶解磷矿物及其它养分<sup>[3]</sup>。一些 PGPR 也能通过影响共生固氮结瘤、结节促进植物生长<sup>[4]</sup>。另外已有的研究表明<sup>[5]</sup>,存在于植物根际土壤并能产生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-Aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶的天然细菌可以把乙烯合成的前体 ACC 水解成氨和  $\alpha$ -丁酮酸,并将这两种分解产物分别作为 N 源和 C 加以利用,从而降低应激乙烯的含量,减轻逆境胁迫对植物造成的伤害,促进植物生长。因此,以 ACC 脱氨酶为主要指标来筛选根际促生菌用以提高植物对外界环境的适应性是个很好的切入点,具有较好的应用前景。

目前,对麻疯树的研究多集中于对其资源分布、化学成分、生物柴油转化技术、生理胁迫、良种选育和繁殖技术等方面,而麻疯树根际具有 ACC 脱氨酶活性促生菌的研究国内外还未见报道。本文通过对麻疯树根际细菌的分离以及对菌株进行促生指标的筛选,寻找有潜在促生作用的菌株,为后续微生物提高麻疯树抗寒、抗干旱能力的研究提供菌种资源,并为植物-根际促生菌的进一步深入研究打下前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:** 样品采自四川省攀枝花市延边

县麻疯树种植基地,野生麻疯树根部及其根际土壤一并带回处理。

**1.1.2 培养基:** 细菌分离培养基: 营养琼脂(NA)、LB 培养基、TSA 培养基、蔗糖无机盐培养基(YN)、R2A 培养基、KMB 培养基、1/4 ISP2 培养基及改良后的 BPA 培养基(加入 200 mL 根际土壤浸提液)。

促生筛选培养基: 有氮培养基、无氮培养基、SM 培养液、无机磷培养基参照文献[6]配制。以上培养基配好后置于  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。SMA 培养基: 向 SM 培养基中添加经滤器过滤除菌的 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC),使其终浓度为 3 mmol/L。

**1.1.3 主要试剂及仪器:** ACC 购自 Sigma 公司, *Taq* 酶及 pMD-18T 连接试剂盒购自 TaKaRa 公司, 16S rRNA 基因扩增引物由上海生工生物工程公司合成; Spectromax M2 多功能全自动定量绘图酶标仪(美国 Molecular Devices), PTC 200 梯度 PCR 仪(美国 MJR. I), 凝胶成像仪, 冷冻离心机。

### 1.2 根际土壤中细菌的分离

称取 1 g 土样于灭菌的 50 mL 锥形瓶中,加入 4 mL 灭菌水,超声(150 W) 15 min 使泥土分散,之后振荡将其混匀。取溶液于 1.5 mL 离心管中再分别稀释  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$ 。从其中各吸取 100  $\mu$ L 于 LB 平板上涂布均匀。置于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中培养 3-5 d。待平板上出现较多单菌落时,在无菌条件下挑取菌落颜色、形态等培养性状不同的单菌落分别接种于 LB 斜面上保存。

### 1.3 根际细菌促生活性的筛选

**1.3.1 产 ACC 脱氨酶能力的测定:** (1) 定性测定: 菌株接种于 SMA 固体培养基,选取传代 5 次后能够在唯一氮源为 ACC 的培养基上生长的菌株为产 ACC 脱氨酶阳性菌株。

(2) 定量测定: 菌株在 LB 培养液中培养 24 h,

将所获得的培养物在 4 °C 下以 8 000 r/min 离心 10 min, 之后收集菌体, 用 SM 培养液洗涤离心 2 次, 菌体悬浮于 SMA 培养液, 在 28 °C 旋转摇床 180 r/min 的条件下培养 24 h, 以诱导产生 ACC 脱氨酶。4 °C 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, 重新悬浮于 600  $\mu$ L 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液中(pH 8.5), 然后加入 30  $\mu$ L 甲苯并迅速振荡 30 s 以破碎细胞。ACC 脱氨酶活性的测定方法参照 Honma<sup>[7]</sup>和 Saleh<sup>[8]</sup>的方法, 于 540 nm 下测定其 OD 值。ACC 脱氨酶的单位酶活为在测酶体系中以 1  $\mu$ mol/min 的速率形成  $\alpha$ -丁酮酸的活性。蛋白质测定采用 Bradford 比色法<sup>[9]</sup>, 以牛血清蛋白为标准绘制标准曲线, 计算得到线性方程。ACC 脱氨酶酶活单位为  $\mu$ mol  $\alpha$ -KA/(mg·h), 各菌株酶活性测定均扣除样品对照中自发产物后计算。

**1.3.2 产生长素(IAA)能力的测定:** (1) 定性测定: 向含有氮元素培养液中添加除菌后的色氨酸溶液, 使色氨酸浓度最终达到 0.5 g/L。挑取菌株接种于上述培养液中, 37 °C 摇床培养 24 h, 用无菌枪头吸取 1 mL 菌液于无菌离心管中, 加入 2 mL Sackowcki's 显色剂<sup>[10]</sup>之后迅速充分混合, 室温下避光显色 20 min。出现粉红色为阳性, 说明有 IAA 产生。

(2) 定量测定: 阳性菌株避光放置 30 min, 测定其  $OD_{530}$  值。通过 IAA 浓度与  $OD_{530}$  的线性方程计算相应的 IAA 浓度, 每组实验重复 3 次。各菌株 IAA 含量测定均扣除样品对照中自发产物后计算。

**1.3.3 固氮能力测定:** 将菌株接种于无氮培养基, 37 °C 培养 3–8 d 观察其生长情况, 转接 5 次。

**1.3.4 解磷能力测定:** 将菌株接种于无机磷培养基, 37 °C 培养 3–8 d, 观察有无溶磷圈。

**1.3.5 产铁载体能力测定:** 将菌株接种于 CAS 检测培养基, 37 °C 培养 2–3 d, 观察培养基上有

无形成橙色铁载体分泌圈<sup>[11]</sup>。

## 1.4 根际细菌 16S rRNA 基因序列的测定以及系统发育分析

分离菌株总 DNA 的提取参照文献[12]的方法进行; PCR 扩增采用细菌 16S rRNA 通用引物<sup>[13]</sup>, 27f: 5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3'; 1492r: 5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用经 EB 染色的 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测后测序。依照测序结果, 从 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 EzTaxon (<http://www.eztaxon.org>) 数据库中调出相似性较高的相关菌株 16S rRNA 基因序列, 分别用 ClustalX 2.0 及 MEGA 5.0<sup>[14]</sup> 软件进行序列比对分析, 最后用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统进化树, 并做系统发育分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤根际细菌的分离

在 NA、LB、TSA、YN、R2A、改良后的 BPA、KMB 及 1/4 ISP2 这 8 种培养基上涂布混合的土壤悬液, 共分离得到 98 株细菌, 根据菌落颜色、形态、大小等特征初步去重复后获得 28 株细菌, 继而对这 28 株细菌进行促生潜在性评价。

### 2.2 内生细菌的促生长潜力

从表 1 中可以看出, 28 株供试菌株中有 15 株具有固氮的能力, 占总菌株的 54%; 9 株具有解磷的能力, 占总菌株的 32%; 仅有 2 个菌株能产生铁载体, 占总菌株的 7%; 有 19 株菌可以产生 IAA (68%), 其中 KLBMP4820、KLBMP4806、KLBMP4807 及 KLBMP4804 产 IAA 的含量分别高达  $57.063 \pm 0.016$ 、 $50.811 \pm 0.001$ 、 $54.467 \pm 0.017$  及  $50.439 \pm 0.015$  mg/L。在之前的 ACC 脱氨酶活性定性筛选中, 经 5 次传代后有 13 株(46%)细菌仍能够在 SMA 固体培养基上正常生长, 这说明

表 1 麻疯树 PGPR 促生潜在性相关指标筛选  
Table 1 The index of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from *Jatropha curcas* L.

菌株编号 No. of isolates	固氮 Nitrogen fixation	解磷 Phosphate Solubilization	铁载体 Siderophore	IAA (mg/L)	ACC $\mu\text{mol } \alpha\text{-KA}/(\text{mg}\cdot\text{h})$
KLBMP4801	-	-	-	42.996±0.040	56.698±0.783
KLBMP 4802	+	-	-	43.983±0.010	113.909±1.873
KLBMP 4803	+	+	-	-	111.666±0.991
KLBMP 4804	+	+	-	50.439±0.015	128.308±0.577
KLBMP 4805	-	-	-	-	-
KLBMP 4806	+	-	-	50.811±0.001	113.878±0.050
KLBMP 4807	-	-	+	54.467±0.017	-
KLBMP 4808	+	-	-	-	78.462±1.789
KLBMP 4809	+	-	-	29.971±0.013	16.324±0.904
KLBMP 4810	+	+	-	-	45.368±0.968
KLBMP 4811	-	-	-	-	-
KLBMP 4812	+	-	-	31.571±0.019	-
KLBMP 4813	+	-	-	2.343±0.008	-
KLBMP 4814	+	-	-	1.675±0.001	-
KLBMP 4815	-	-	-	-	-
KLBMP 4816	+	++	-	35.770±0.019	-
KLBMP 4817	-	-	-	29.139±0.030	-
KLBMP 4818	-	+	-	4.027±0.014	-
KLBMP 4819	+	+	-	-	21.939±1.230
KLBMP 4820	-	-	-	57.063±0.016	-
KLBMP 4821	-	-	-	36.462±0.054	5.826±0.907
KLBMP 4822	-	++	-	-	26.038±2.395
KLBMP 4824	+	-	-	9.096±0.005	-
KLBMP 4825	-	-	+	-	-
KLBMP 4826	+	+	-	36.200±0.020	22.613±0.267
KLBMP 4827	-	+	-	47.376±0.015	-
KLBMP4828	+	-	-	42.117±0.012	95.521±3.211
KLBMP 4829	-	-	-	6.490±0.008	-
Total (%)	15(54%)	9(32%)	2(7%)	19(68%)	13(46%)

注: IAA、ACC 定量分析中的数据为  $\bar{x} \pm s$ 。

Note: IAA、ACC quantitative analysis of the data expressed as mean value  $\pm s$ .

他们具有 ACC 脱氨酶活性。据文献报道, 当 ACC 脱氨酶酶活不低于 20 nmol  $\alpha$ -KA/(mg·h) 时, 就可促进植物的生长<sup>[15]</sup>。通过进一步的定量检测显示,

13 株菌的 ACC 脱氨酶酶活均高于 20 nmol  $\alpha$ -KA/(mg·h)。而菌株 KLBMP4801、KLBMP 4828、KLBMP 4803、KLBMP4802 以及 KLBMP

4806 和 KLBMP4804 的 ACC 脱氨酶酶活较高, 最高达到  $128.308 \pm 0.577 \mu\text{mol } \alpha\text{-KA}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 。另外 KLBMP4801、KLBMP4802、KLBMP4804、KLBMP4806、KLBMP4821、KLBMP4826 和 KLBMP4828 这几株菌同时具有产 ACC 脱氨酶及 IAA 的能力, 且与之前一些研究相比, IAA 含量和 ACC 脱氨酶含量都有所上升。值得关注的是, 本研究获得的 KLBMP 4821 菌株属于窄食单胞菌属, 而有研究表明, 该属的大部分细菌能够在宿主植物中定殖并对植物具有促生等有益作用<sup>[16]</sup>。KLBMP4803、KLBMP4808 和 KLBMP4810 这几株菌也有较高的 ACC 脱氨酶酶活, 但并无产 IAA 的能力。而 KLBMP4807、KLBMP4820 和 KLBMP4827 等几株菌产 IAA 的含量较高, 却不具备产 ACC 脱氨酶的能力。综合几个促生指标的检测结果: 获得了几株同时具备多个促生指标的菌株以及一些仅具单一促生指标能力但含量较高的菌株。由此推断, 四川省麻疯树根际土壤中应该拥有较多具有潜在促生长作用的细菌, 而这些菌株也有一定的研究价值。

### 2.3 根际细菌 16S rRNA 基因序列的测定以及系统发育分析

从麻疯树根际土壤中分离后经促生指标初步筛选出的 22 株细菌(其中 6 株属于经典产丝放线菌, 待进一步单独研究, 因此不在本文中列出), 以提取的总 DNA 为模板, 扩增得到 16S rRNA 基因序列。结果显示, 它们属于 Firmicutes 门, Proteobacteria 门和 Actinobacteria 门的三大系统发育类群(表 2)。经统计共 8 个属, 其中有 11 株属于芽孢杆菌属(*Bacillus*), 为分离菌株总数的 50%, 占主要地位。而其中的 KLBMP4802、KLBMP4804 以及 KLBMP4820 均为产 ACC 脱氨酶或 IAA 较高的菌株。KLBMP4806 和 KLBMP4816 属于粪产碱杆菌属(*Advenella*); KLBMP4814 和 KLBMP4810 两株菌属于节杆菌

属(*Arthrobacter*); KLBMP4821 属于窄食单胞菌属(*Stenotrophomonas*); KLBMP4826 和 KLBMP4829 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*); KLBMP4803 属于西地西菌属(*Cedecea*); KLBMP4827 属于产碱杆菌属(*Alcaligenes*)。而 KLBMP4817 和 KLBMP4824 属于类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*), 这也充分显示了四川麻疯树根际细菌的丰富多样性。经 MEGA 5 构建 Neighbor-Joining 系统进化树分析(图 1)以及在 EzTaxon 数据库中进行有效种的 16S rRNA 基因序列相似性搜索后发现, 其中 KLBMP4817 (1 462 bp)与该属的典型菌株相似性低于 98%, 与最近的标准菌株 *Paenibacillus fonticola* ZL<sup>T</sup> 相似性为 97.8%, 在系统发育树中(图 2)又独立成一进化分支并且有较高的自举值, 可能为潜在的新种。而与 KLBMP4821 (1 454 bp)的 16S rRNA 基因相似性高于 97%的菌有 6 株, 但从系统进化树上来看(图 3), KLBMP4821 只与 *Stenotrophomonas chelatiphaga* (EU573216)、*Stenotrophomonas pavanii* (FJ748683) 以及 *Stenotrophomonas maltophilia* (AB008509)同聚在一个大分支上, 并有较高的自举值。同样, KLBMP4824 (1 455 bp)与 *Paenibacillus glycanilyticus* (AB042938)以及 *Paenibacillus xinjiangensis* (AY839868)聚在系统发育树的一个分支上(图 4), 而 KLBMP4824 与这两株菌的相似性分别为 98.7%和 97.0%。另外, 经由对菌株 KLBMP4817、KLBMP4821 和 KLBMP4824 的表型及生理生化特征与各自相关的典型菌株之间的比较分析, 均存在较大差异性, 因此我们初步认为它们代表 *Stenotrophomonas* 和 *Paenibacillus* 属的新种, 但要最终确定它们的分类地位, 仍需综合各自形态特征、生理生化与化学分类特征以及与最近菌株的 DNA-DNA 同源性分析结果来判断, 而我们也正同时进行这些新种鉴定工作的研究, 相关文章将在后期发表。

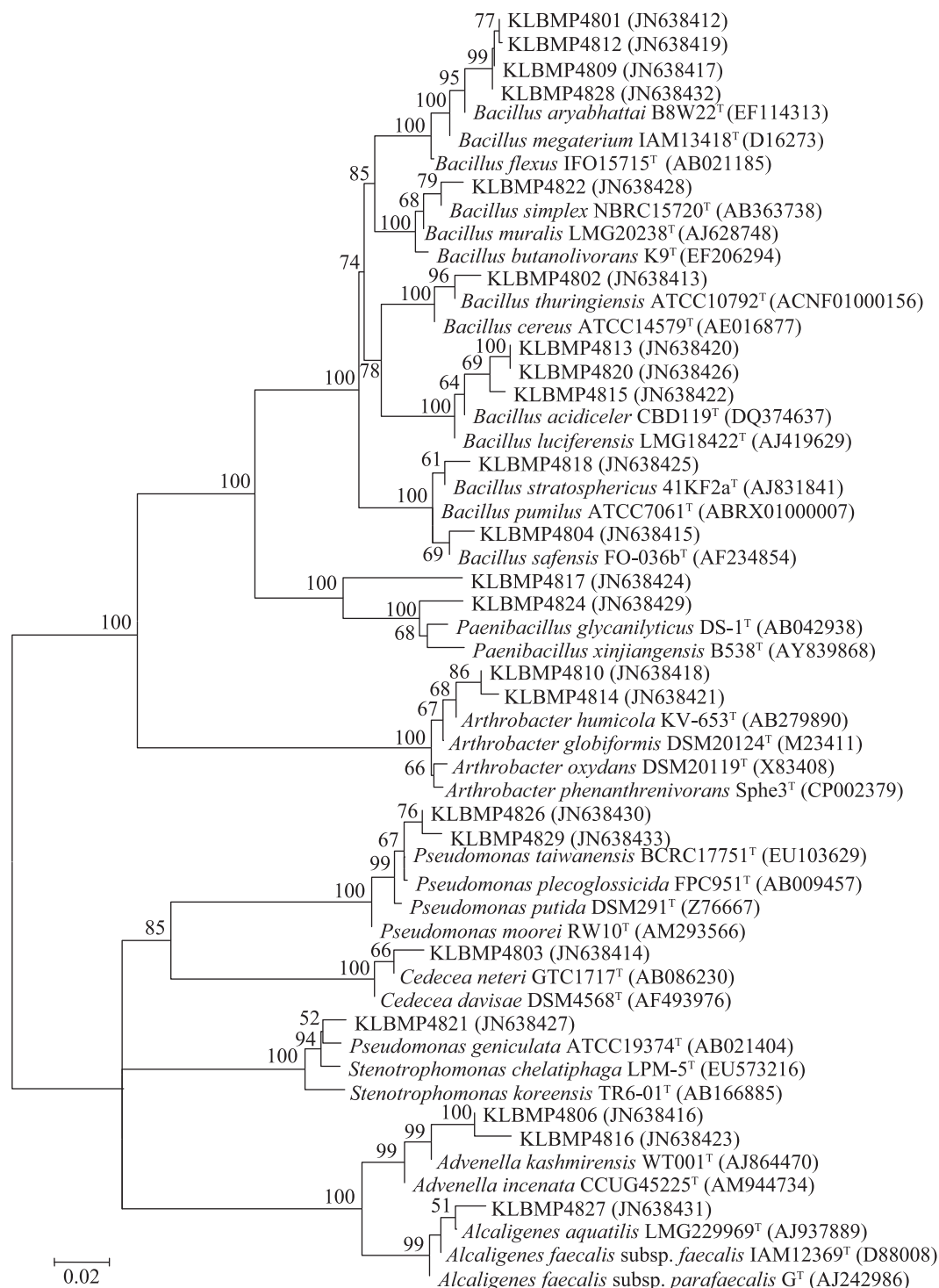


图 1 基于 16S rRNA 基因序列采用邻接法构建的 PGPR 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic Neighbour-Joining tree of the isolated PGPR based on the 16S rRNA gene sequences

Note: The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample date sets. After each bacterial name, the GenBank accession number is shown in parentheses. Bar: 0.02 nucleotide substitution of 16S rRNA gene sequence.

表 2 PGPR 16S rRNA 基因序列登录号以及同源性  
Table 2 The 16S rRNA gene accession number and sequence homology of the isolated PGPR

No. of isolates	Genus	Nearest type strain	Accession No.	Homology (%)
KLBMP 4802	<i>Bacillus</i>	<i>B. thuringiensis</i> (ACNF01000156)	JN638413	100
KLBMP 4804		<i>B. safensis</i> (AF234854)	JN638415	100
KLBMP 4809		<i>B. aryabhatai</i> (EF114313)	JN638417	100
KLBMP 4812		<i>B. aryabhatai</i> (EF114313)	JN638419	100
KLBMP 4828		<i>B. aryabhatai</i> (EF114313)	JN638432	100
KLBMP 4801		<i>B. aryabhatai</i> (EF114313)	JN638412	100
KLBMP 4813		<i>B. acidiceler</i> (DQ374637)	JN638420	99.1
KLBMP 4815		<i>B. acidiceler</i> (DQ374637)	JN638422	99.6
KLBMP 4820		<i>B. acidiceler</i> (DQ374637)	JN638426	99.1
KLBMP 4818		<i>B. stratosphericus</i> (AJ831841)	JN638425	100
KLBMP 4822		<i>B. simplex</i> (AB363738)	JN638428	100
KLBMP 4806	<i>Advenella</i>	<i>A. kashmirensis</i> (AJ864470)	JN638416	99.7
KLBMP 4816		<i>A. kashmirensis</i> (AJ864470)	JN638423	98.8
KLBMP 4814	<i>Arthrobacter</i>	<i>A. humicola</i> (AB279890)	JN638421	99.2
KLBMP 4810		<i>A. oxydans</i> (X83408)	JN638418	99.4
KLBMP 4817	<i>Paenibacillus</i>	<i>P. fonticola</i> (DQ453131)	JN638424	97.8
KLBMP 4824		<i>P. glycanilyticus</i> (AB042938)	JN638429	98.7
KLBMP 4821	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>S. chelatiphaga</i> (EU573216)	JN638427	98.8
KLBMP 4826	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. taiwanensis</i> (EU103629)	JN638430	99.6
KLBMP 4829		<i>P. taiwanensis</i> (EU103629)	JN638433	99.6
KLBMP 4803	<i>Cedecea</i>	<i>A. neteri</i> (AB086230)	JN638414	100.
KLBMP 4827	<i>Alcaligenes</i>	<i>A. faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> (D88008)	JN638431	99.5

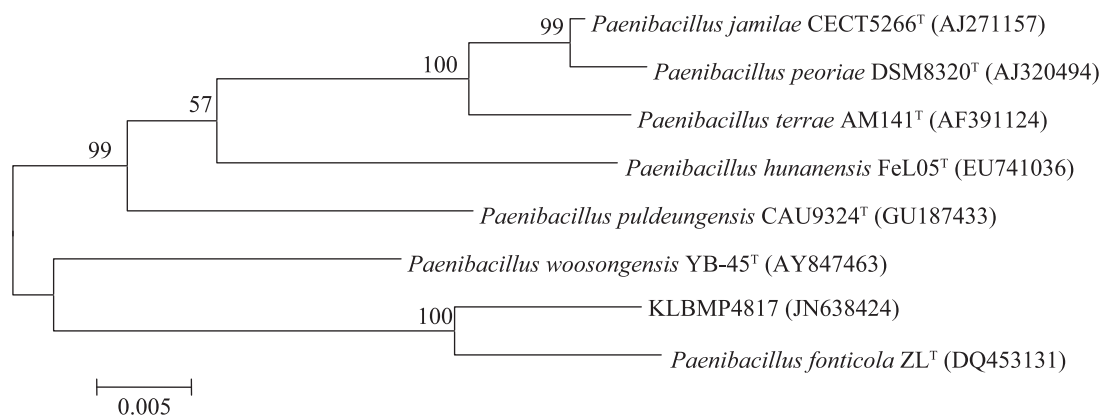


图 2 基于 16S rRNA 基因序列采用邻接法构建的菌株 KLBMP4817 及其相关典型菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationships of strain KLBMP 4817 and closely related *Paenibacillus* type strains

Note: The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 is resample date sets. After each bacterial name, the GenBank accession number is shown in parentheses. Bar: 0.005 nucleotide substitution of 16S rRNA gene sequece.



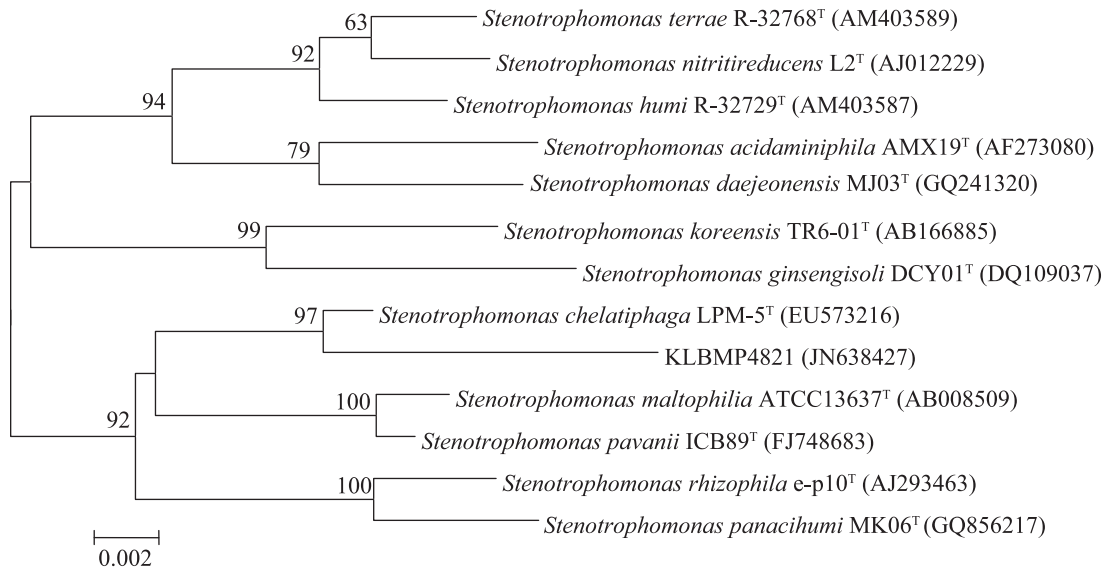


图 3 基于 16S rRNA 基因序列采用邻接法构建的菌株 KLBMP4821 及其相关典型菌株的系统发育树  
 Fig. 3 Phylogenetic Neighbour-Joining tree based upon 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships between strain KLBMP4821 and closely related *Stenotrophomonas* type strains

Note: The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample date sets. After each bacterial name, the GenBank accession number is shown in parentheses. Bar: 0.002 nucleotide substitution of 16S rRNA gene sequence.

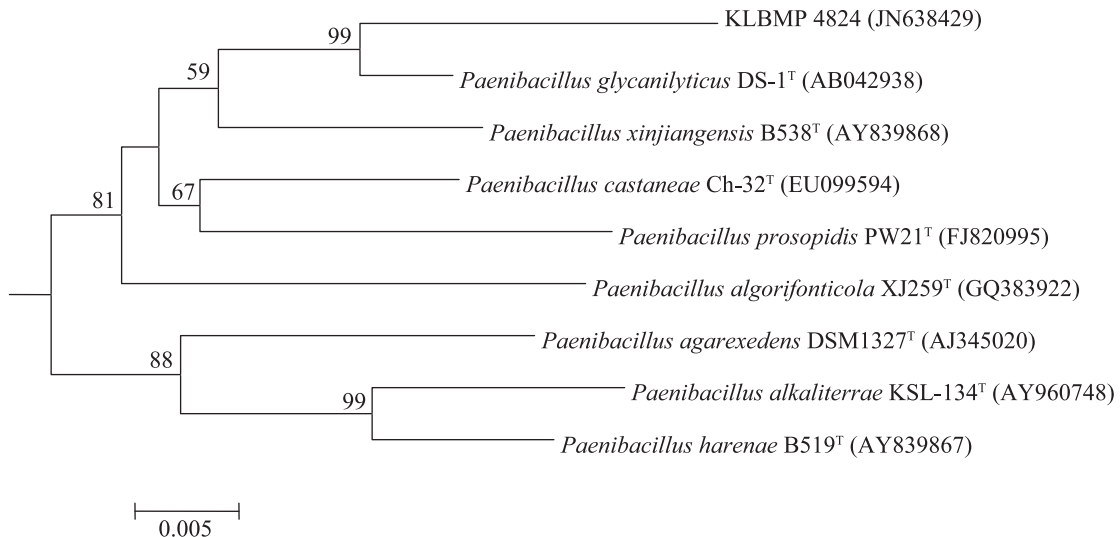


图 4 基于 16S rRNA 基因序列采用邻接法构建的菌株 KLBMP4824 及其相关典型菌株的系统发育树  
 Fig. 4 Phylogenetic Neighbour-Joining tree based upon 16S rRNA gene sequences showing the phylogenetic relationships between strain KLBMP4824 and closely related *Paenibacillus* type strains

Note: The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on Neighbor-Joining analyses of 1 000 resample date sets. After each bacterial name, the GenBank accession number is shown in parentheses. Bar: 0.005 nucleotide substitution of 16S rRNA gene sequence.

### 3 讨论

目前国内对麻疯树已经进行了大量的研究,通过对种植资源分布的调查,基本摸清了麻疯树的种植和分布地带,在此基础上,建立了生物物质能源植物数据库。但是,麻疯树目前只自然分布于我国的热带和亚热带地区,分布范围比较有限;虽然麻疯树幼苗对盐胁迫、干旱胁迫以及低温胁迫具有一定的抗逆性,但要想在我国其它地区大面积推广栽培,就必须进一步加以研究以提高其抗逆性<sup>[17]</sup>。

研究发现,植物根际促生菌(PGPR)通常可以通过直接和间接两种方式促进植物的生长和发育<sup>[18]</sup>。此外,PGPR还能够提高植物耐非生物胁迫的能力(如盐胁迫和干旱胁迫等)<sup>[19]</sup>。同时研究表明,ACC脱氨酶被认为能降低植物乙烯的浓度,是PGPR促进植物生长发育的主要机制之一。迄今为止,国内外已有许多科研人员报道了具ACC脱氨酶活性的植物根际促生菌能提高植物的抗极端温度胁迫和土壤pH胁迫<sup>[20]</sup>,抗水涝胁迫,抗重金属胁迫,能够增加植物在盐碱环境中的成活率,延长水果保质期,有效防止病原菌对植物的伤害等<sup>[21]</sup>。本文首次对麻疯树根际具有ACC脱氨酶活性的菌株进行了分离筛选,发现在28株供试菌株中,46%的菌株能产生ACC脱氨酶,有54%的菌株具有固氮能力;32%的菌株具有解磷能力;68%的菌株能产生IAA;其中有13株菌株的ACC脱氨酶酶活超过了20 nmol  $\alpha$ -KA/(mg·h),最高含量达到128  $\mu$ mol  $\alpha$ -KA/(mg·h)。比滕松山<sup>[22]</sup>报道中的ACC脱氨酶活性以及吉秀云<sup>[23]</sup>报道的IAA及ACC脱氨酶活性均有较大幅度的提升。

目前,已报道的具有促进植物生长的细菌主要包括:芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、弧菌属(*Vibrio*)、窄

食单胞菌属(*Stenotrophomonas*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)<sup>[5,15,24-27]</sup>等。在本文的研究中,综合ACC脱氨酶、IAA、固氮、解磷、产铁载体等5个指标及经16S rRNA基因序列分析发现,芽孢杆菌属的菌株KLBMP4802、KLBMP4809、KLBMP4804,窄食单胞菌属的KLBMP4821等都具有较强的潜在促生作用,这与之前的有关研究相符;然而本研究得到的粪产碱杆菌属的菌株KLBMP4806和KLBMP4816,节杆菌属的KLBMP4810、KLBMP4814等也具有较强的促生长潜在性,这也扩大了已知的具有潜在促生长作用的细菌种属范围。本实验室也同时运用富集定向筛选法筛选出具有ACC脱氨酶活性的菌株,但这些菌株的实际促生作用究竟如何,仍需通过进一步的盆栽试验来验证。

综上所述,四川省攀枝花市麻疯树基地土壤中不仅含有大量的细菌资源,而且具有丰富的多样性,其中不乏高促生作用的细菌类群,这不仅为我们日后研究对麻疯树有促生作用的菌株的回接提供了很好的材料,也为研究微生物对麻疯树的抗寒、抗旱、促生、抗病虫、快繁等方面提供了良好的资源。

### 参考文献

- [1] Desai S, Narayanaiah C, Kumari CK, et al. Seed inoculation with *Bacillus* spp. improves seedling vigour in oil-seed plant *Jatropha curcas* L.[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2007, 44(1): 229-234.
- [2] Ahmad F, Ahmad I, Khan MS. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. *Microbiological Research*, 2008, 163(2): 173-181.
- [3] 康贻军,程洁,梅丽娟,等.植物根际促生菌的筛选及鉴定[J].*微生物学报*, 2010, 50(7): 853-861.
- [4] Fuhrmann J, Wollum AG. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as

- influenced by rhizosphere bacteria and iron availability[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1989, 7(2): 108–112.
- [5] 魏素娜, 蒋帅, 黄锡云, 等. 旱地小麦根际细菌中产生1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶菌株的分离和鉴定[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(5): 722–728.
- [6] 夏娟娟. 植物促生内生细菌的筛选及其强化油菜富集土壤铅镉重金属的研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2006.
- [7] Saleh SS, Glick BR. Involvement of *gacs* and *rpos* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2001, 47(8): 698–705.
- [8] Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978, 42(10): 1825–1831.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248–258.
- [10] Gordon SA, Weber RP. Colorimetric estimation of indoleacetic acid[J]. *Plant Physiology*, 1951, 26(1): 192–195.
- [11] 王平, 董飏, 李阜棣, 等. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. *微生物学通报*, 1994, 21(6): 323–326.
- [12] Janso JE, Carter GT. Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(13): 4377–4386.
- [13] Magarvey NA, Keller JM, Bernan V, et al. Isolation and characterization of novel marine-derived actinomycete taxa rich in bioactive metabolites[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7520–7529.
- [14] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [15] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118(1): 10–15.
- [16] Robert PR, Monchy S, Cardinale M, et al. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(7): 514–525.
- [17] 张彪, 何文广, 肖华山. 麻疯树研究进展[J]. *能源与环境*, 2011(1): 53–55.
- [18] Jha B, Gontia I, Hartmann A. The roots of the halophyte *Salicornia brachiata* are a source of new halotolerant diazotrophic bacteria with plant growth-promoting potential[J]. *Plant Soil*, 2011. DOI: 10.1007/s11104-011-0877-9.
- [19] Yang J, Kloepper JW, Ryu CM. Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress[J]. *Trends in plant science*, 2009, 14(1): 1–4.
- [20] Saraf M, Jha CK, Patel D. The role of ACC deaminase producing PGPR in sustainable agriculture[J]. *Microbiology Monographs*, 2010, 18: 365–385.
- [21] Glick BR, Todorovic B, Czarny J, et al. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2007, 26(5/6): 227–242.
- [22] 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[J]. *微生物学报*, 2010, 50(11): 1503–1509.
- [23] 吉秀云. 含 ACC 脱氨酶 PGPR 分离及提高植物抗逆性[D]. 大连: 大连海事大学博士学位论文, 2007.
- [24] Sheng XF, Xia JJ, Jiang CY, et al. Characterization of heavy metal-resistant endophytic bacteria from rape (*Brassica napus*) roots and their potential in promoting the growth and lead accumulation of rape[J]. *Environmental Pollution*, 2008, 156(3): 1164–1170.
- [25] Sun LN, Zhang YF, He LY, et al. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(2): 501–509.
- [26] Dastager SG, Kumaran DC, Pandey A. Characterization of plant growth-promoting rhizobacterium *Exiguobacterium* NII-0906 for its growth promotion of cowpea (*Vigna unguiculata*)[J]. *Biologia*, 2010, 65(2): 197–203.
- [27] 陆俊锟, 陈俊, 康丽华. 四株红树林促生菌的遗传分析鉴定及其促生能力[J]. *微生物学报*, 2010, 50(10): 1358–1365.