

产ACC脱氨酶细菌的筛选及对低温胁迫下垂穗披碱草生长的影响

李明源^{1,2}, 王继莲^{1,2}, 姚拓^{1*}, 王振龙¹, 张惠荣¹, 柴加丽¹, 刘晓婷¹, 李青璞¹

(1. 甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070; 2. 喀什大学生命与地理科学学院, 新疆帕米尔高原生物资源与生态自治区重点实验室, 新疆 喀什 844006)

摘要:为筛选具有1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶活性的植物促生菌,验证其对低温胁迫牧草生长的影响,为多功能生物菌肥研制提供菌种资源与数据基础,以实验室前期从祁连山高寒草地优势牧草根际或根内分离的821株固氮、溶磷菌为材料,采用DF和ADF培养基筛选产ACC脱氨酶菌株,并定量分析酶活性,结合16S rRNA基因测序和系统发育分析确定菌株的分类地位。选取ACC脱氨酶活性最高的菌株接种垂穗披碱草幼苗,验证其幼苗对低温胁迫的响应。结果共筛选到11株ACC脱氨酶活性较高的菌株,分属于5个不同细菌属。用ACC脱氨酶活性最高的4株菌接种垂穗披碱草,在低温胁迫下不仅能有效提高植株株高、茎粗、地上干重和地下干重,而且能减缓叶绿素含量的下降,提高超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶活性,减少丙二醛(MDA)的积累。本研究筛选到的产ACC脱氨酶菌株能有效促进垂穗披碱草在低温下生长,增强其抗逆性,对进一步开发适用于高寒草地的生物菌肥有重要意义。

关键词:ACC脱氨酶;植物促生菌;低温胁迫;垂穗披碱草

中图分类号:S543.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2022)05-0037-09

DOI:10.13817/j.cnki.cycp.2022.05.005



1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)是高等植物内源激素乙烯合成的直接前体,当植物遭受生物(如病原体感染)或非生物(如高温、盐渍、重金属等)胁迫时,往往会引起体内乙烯的大量合成^[1-3]。但高浓度的乙烯会严重抑制植物生长,对农牧业生产极为不利。有研究表明,一些土壤有益菌可分泌ACC脱氨酶,能将ACC水解成 α -酮丁酸盐和氨,从而降低逆境中植物体内的乙烯水平^[1,4-5]。现已证实,通过微生物来源的ACC脱氨酶降低植物内源乙烯水平是植物与土壤微生物共同进

化过程中应对逆境胁迫的一项关键策略^[6-8]。微生物通过水解其直接前体ACC降低植物乙烯浓度,增强植物抗逆性。作为回报,ACC可被这些微生物用作营养来源。植物和微生物之间的这种互惠关系有望被用于缓解植物在逆境环境中的生长压力。

植物促生菌(Plant Growth-Promoting Bacteria, PGPB)是一类能对植物产生直接或间接促生作用的土壤有益菌^[9]。产ACC脱氨酶是PGPB促进植物生长和增强抗逆性的重要机制之一^[2]。植物遭受逆境时,体内会积累大量的ACC,其中部分ACC通过ACC氧化酶转化为乙烯;同时,大量的ACC以根系分泌物的形式释放到根际土壤中,吸引能以ACC为营养的微生物在根际集聚^[10]。这些微生物通过分解ACC,在实现自身营养繁殖的同时降低了根际的ACC浓度,致使植物根系内外形成ACC浓度差,促使体内ACC顺浓度梯度释放到土壤中,最终减少植物体内的乙烯

收稿日期:2021-05-24; **修回日期:**2021-08-13

基金项目:国家重点研发计划(2019YFC0507703)

作者简介:李明源(1984-),男,甘肃民勤人,博士研究生。

E-mail:limy@st.gsau.edu.cn

*通信作者。E-mail:yaot@gsau.edu.cn

积累并产生促进作用^[10-11]。

祁连山是我国西北地区重要的生态安全屏障。为获得适用于该地区农牧业可持续发展所需生物肥料的优良菌种,本研究以前期从祁连山高寒草地优势牧草根际或根内分离的具有固氮、溶磷功能的PGPB为材料,筛选产ACC脱氨酶菌株,并通过盆栽接种实验评估其对低温胁迫下植物生长的影响。研究结果将对深入理解PGPB作用机制以及研制适用于高寒草地的生物菌肥提供理论依据。

表1 供试菌株来源

Table 1 Information of tested strains

样品编号	采样地	来源植物	分离培养基		
			NFM	NBRIP	Mongina's
A	TZ/MY	扁蓿豆 <i>Medicago ruthenica</i>	49	19	19
B	TZ/MY	无芒雀麦 <i>Bromus inermis</i>	51	20	19
C	TZ/MY	高山嵩草 <i>Kobresia pygmaea</i>	56	8	25
D	TZ/MY	黄花棘豆 <i>Oxytropis ochrocephala</i>	34	24	17
E	TZ/MY	垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	37	24	26
F	TZ/MY	珠芽蓼 <i>Polygonum viviparum</i>	44	9	20
G	TZ/MY	燕麦 <i>Avena sativa</i>	58	23	21
H	TZ/MY	委陵菜 <i>Potentilla chinensis</i>	35	12	11
I	TZ/MY	秦艽 <i>Gentiana macrophylla</i>	34	17	16
J	TZ/MY	草地早熟禾 <i>Poa pratensis</i>	51	20	22

注:NFM培养基分离固氮菌,NBRIP培养基分离溶无机磷菌株,Mongina's培养基分离溶有机磷菌株

1.2 培养基

采用DF和ADF培养基^[12]筛选有ACC脱氨酶活性的菌株,ADF培养基即用ACC(3.0 mmol/L,过滤灭菌)代替DF培养基中的(NH₄)₂SO₄。Hogland's营养液参照文献[1]配制。

1.3 主要试剂与设备

实验所用试剂和设备为:ACC和 α -丁酮酸(分析纯)购自Sigma公司;MDA、SOD、POD和CAT检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司;细菌基因组DNA提取试剂盒(OMEGA,USA);紫外可见分光光度计(TU-1901,北京普析通用仪器有限责任公司),光照培养箱(SPX-GB-300F,上海跃进医疗器械有限公司)。

1.4 产ACC脱氨酶菌株的筛选

参照Penrose等^[12]方法,以点种法将供试菌株分别接种至DF和ADF培养基上,15℃培养3~5d,每天观察菌落生长情况。在连续3次传代培养过程中,若ADF培养基上的菌落生长情况明显好于DF培养基,

1 材料和方法

1.1 菌种来源

供试菌株为实验室前期从甘肃农业大学天祝高山草原生态系统试验站(代号TZ),地理位置为N 37°11'、E 102°48',海拔2 884 m、中国科学院海北高寒草甸生态系统定位研究站(代号MY),地理位置N 37°37'、E 109°11',3 240 m的高寒草地优势牧草根际或根内分离保存的PGPB,共821株(表1)。所有菌株经LB培养基活化后备用。

则说明该菌株能够以ACC为唯一氮源生长,即能合成ACC脱氨酶。

定量分析:将阳性菌株接入5 mL液体LB培养基,15℃、180 r/min培养36 h,8 000×g、4℃离心10 min弃上清。沉淀经不含(NH₄)₂SO₄的DF液体洗涤2次后重悬于7.5 mL的ADF液体中,15℃、180 r/min培养36 h,8 000×g、4℃离心10 min弃上清液。沉淀再经0.1 mol/L Tris-HCl(pH值7.6)洗涤2次,加入600 μ L的0.1 mol/L Tris-HCl(pH值8.5)重悬菌体沉淀,加入30 μ L甲苯后涡旋振荡30 s以裂解菌体。取100 μ L甲苯化的菌液通过Bradford法测定菌体蛋白量表征其生物量。剩余的甲苯化菌液参照Glick等^[12]方法测定ACC脱氨酶活性。分别以牛血清白蛋白和 α -丁酮酸为标准物绘制标准曲线计算菌株ACC脱氨酶活性。酶活性是指单位时间内,菌体蛋白催化ACC脱氨分解为 α -丁酮酸的微摩尔数,单位: μ mol/(mg·h)。

1.5 产 ACC 脱氨酶菌株 16S rRNA 基因扩增与系统发育分析

通过细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取阳性菌株 DNA,以通用引物 27F 和 1 492R^[13] 扩增 16S rRNA 基因,PCR 产物送由杨凌天润奥科生物科技有限公司完成测序。测序结果提交 <http://ezbiocloud.net/> 数据库比对分析,利用 MEGA 7.0 软件以邻近法(Neighbor-joining)构建系统发育树,Bootstrap 值为 1000。

1.6 植物促生实验

选用祁连山高寒草地人工补播主要牧草品种—垂穗披碱草(*Elymus nutans*)为供试植物,栽培方式为沙培。种子经 1% 的 NaClO 溶液表面消毒 5 min,无菌水冲洗 3 遍后均匀播种于塑料杯中(口径 9.5 cm×底径 6.0 cm×杯高 13 cm,每杯装约 500 g 灭菌河沙),置于光照培养箱培养(25 °C,光照 14 h、黑暗 10 h,湿度为 60%~70%,光强度为 4 000 lx)。实验分接种处理(接种产 ACC 脱氨酶菌株)和对照(接种无菌 LB 液体)。待幼苗生长至 14 d 后进行接种和低温胁迫。供试菌株先经 LB 液体培养基于 15 °C、180 r/min 培养 36~48 h,调整培养液 $D_{600\text{nm}}$ 值为 0.8(细胞浓度约 1×10^{10} CFU/mL)。细菌接种量为 3 mL/杯,每种菌接种 5 杯。设置 25、18、12、8、4 °C 共 5 个温度梯度,不同温度下胁迫处理 48 h 后,取样通过试剂盒测定植株地上部茎、叶中主要抗氧化酶(SOD、CAT 和 POD)活性及 MDA 含量,以无水乙醇浸提取法测定叶绿素含量。

实验结束后收获幼苗,每个塑料杯中随机选取 5 株,采用卷尺测定株高;利用游标卡尺测量茎粗;采用根系扫描仪(LA2400 Scanner, Epson Expression 10000XL)扫描根系,得到总根长、根表面积、平均根直径和根尖数等数据;分别将植株地上和地下部分装入纸袋,于烘箱 105 °C 杀青 30 min 后调至 70 °C 烘干至恒重,用分析天平测定地上和地下部干重。

1.7 数据统计分析

采用 SPSS 25.0 和 Origin 2021 软件对实验数据进行统计分析和绘图;通过 One Way ANOVA 和 Duncan 法进行方差分析和多重比较($\alpha=0.05$)。图表数据为平均值±标准差。

2 结果与分析

2.1 产 ACC 脱氨酶菌株的筛选

根据 ADF 与 DF 培养基上菌落生长情况,从 821 株供试菌株中初筛得到 19 株产 ACC 脱氨酶菌株(图 1)。通过定量分析菌株 ACC 脱氨酶活性,并按照 Penrose 和 Glick 的建议,以 ACC 脱氨酶活性不低于 20 nmol/(mg·h)作为活性菌株筛选标准,最终得到 11 株酶活性较高的菌株(表 2)。其中 TZnG2 菌株的酶活性最高,达 $3.42 \pm 0.12 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$,但酶活性大于 $1 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$ 的菌株仅有 4 株。

2.2 产 ACC 脱氨酶菌株系统发育分析

经 16S rRNA 基因测序和系统发育分析,11 株产

表 2 11 株产 ACC 脱氨酶菌株的酶活性与分类地位

Table 2 Enzyme activity and classification status of 11 ACC deaminase-producing strains

菌株编号	酶活单位/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	最相似菌株	相似度/%
TZnG2	3.42 ± 0.12^a	<i>Pseudomonas kairouanensis</i> KC12 ^T (LR031357)	99.50
MYnI4	2.75 ± 0.09^b	<i>Flavobacterium pectinovorum</i> DSM 6368 ^T (NR114994)	98.93
MYnD11	2.14 ± 0.25^c	<i>Variovorax boronicum ulans</i> BAM-48 ^T (AB300597)	98.68
TZnFn7	1.31 ± 0.06^d	<i>Pseudomonas vancouverensis</i> ATCC 700688 ^T (AJ011507)	99.10
MYpJn8	0.37 ± 0.13^e	<i>Erwinia rhapontici</i> ATCC 29283 ^T (U80206)	99.65
TZnH12	0.28 ± 0.02^{ef}	<i>Erwinia rhapontici</i> ATCC 29283 ^T (U80206)	99.58
MYpAn1	0.25 ± 0.07^{ef}	<i>Erwinia persicina</i> NBRC102418 ^T (BCTN01000053)	99.23
MYpJn1	0.23 ± 0.02^{ef}	<i>Flavobacterium psychroterrae</i> CCM 8827 ^T (MH100901)	98.26
MYpEn7	0.23 ± 0.03^{ef}	<i>Acinetobacter guillouiae</i> CIP63.46 ^T (APOS01000028)	98.68
MYpB7	0.21 ± 0.02^{ef}	<i>Erwinia rhapontici</i> ATCC 29283 ^T (U80206)	99.58
MYmF1	0.17 ± 0.08^f	<i>Pseudomonas silesiensis</i> A3 ^T (KX276592)	99.31

注:菌株编号中前两个字母表示采样点,TZ 和 MY 分别表示天祝和门源;第 3 个字母代表分离培养基,n、p 和 m 分别代表 NFM、NBRIIP 和 Mongina's 培养基;第 4 个字母代表样品编号;第 5 个小写字母 n 代表根内(若有)

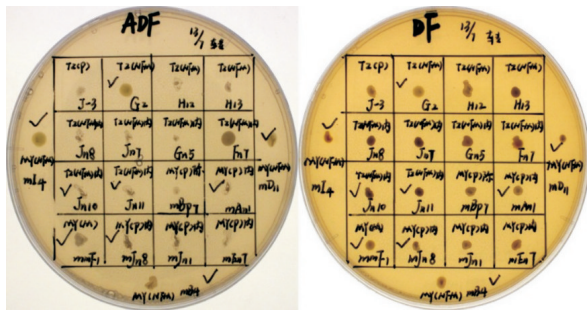


图1 ACC脱氨酶活性菌株定性筛选

Fig. 1 Qualitative screening of ACC deaminase-producing strains

ACC脱氨酶菌株分别属于欧文氏菌属(*Erwinia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和贪噬菌属(*Variovorax*)5个不同细菌属(表2,图2),其中以欧文氏菌属(4株)占比最多,占总菌数的36.36%;假单胞菌属3株,占27.27%;黄杆菌属2株,占18.18%;不动杆菌

属和贪噬菌属各1株,分别占9.09%。

2.3 接种产ACC脱氨酶菌株对低温胁迫下垂穗披碱草生长的影响

选取ACC脱氨酶活性大于1 μmol/(mg·h)的4株菌(TZnG2、MYnI4、MYnD11和TZnFn7)接种垂穗披碱草幼苗,结果表明,它们对垂穗披碱草生长和生物量积累均有积极影响(表3)。相比对照组,接菌处理显著促进了株高、茎粗、地上干重和地下干重的增长。其中以MYnI4对株高促进作用最大,相比对照增加了22.96%。对茎粗、地上和地下干重促进作用最突出的均为菌株TZnG2,分别增长了29.09%、126.38%和186.67%。除接种菌株TZnFn7外,其他菌株均对根系发育有明显促进作用,尤以MYnI4作用最明显(表4)。但接种菌株TZnFn7减少了根尖数量,具体原因尚不明确。

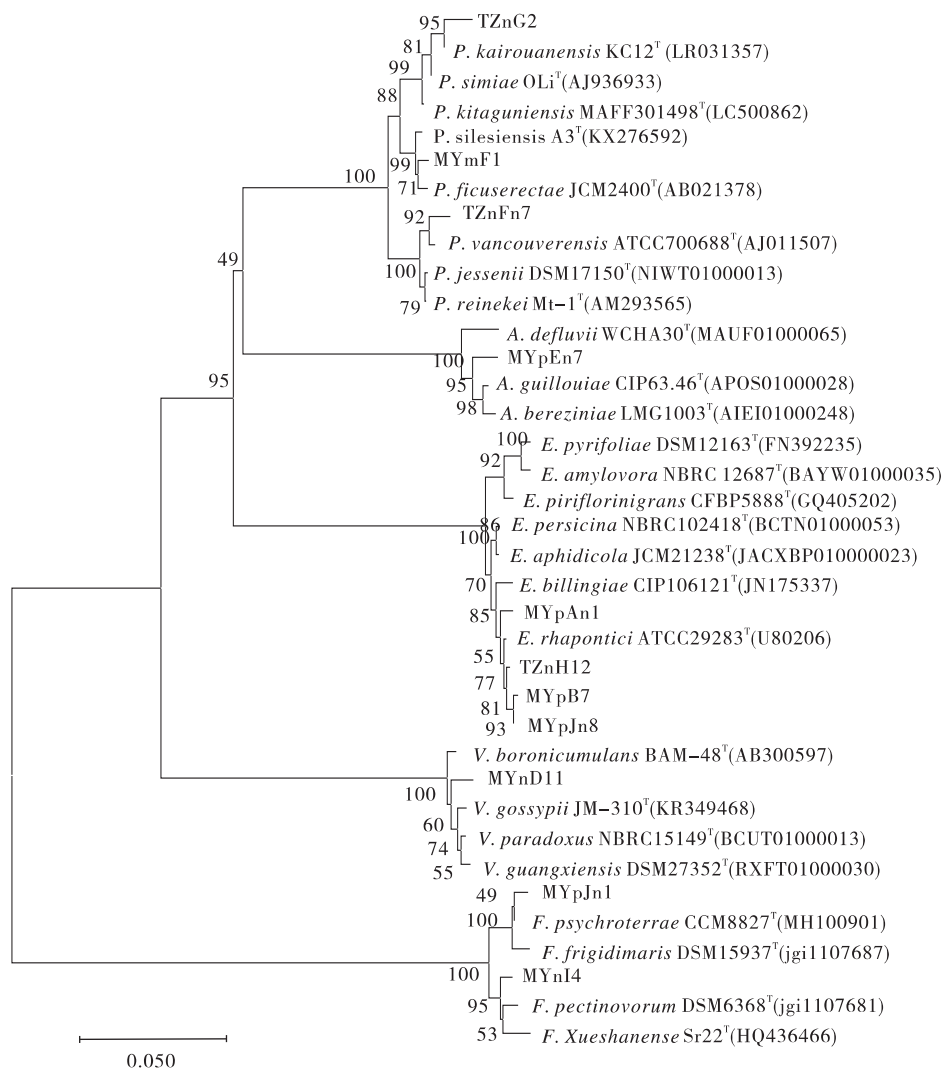


图2 产ACC脱氨酶菌株系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of ACC deaminase-producing strains

表 3 低温胁迫下接种产 ACC 脱氨酶菌株垂穗披碱草的生长状况

Table 3 Growth states of *E. nutans* inoculated with ACC deaminase-producing strains under low temperature stress

菌株编号	株高/cm	增长率/%	茎粗/mm	增长率/%	地上干重/mg	增长率/%	地下干重/mg	增长率/%
TZnG2	29.67±1.53 ^{ab}	20.25	1.42±0.03a	29.09	53.20±5.31a	126.38	11.47±1.71a	186.67
TZnFn7	27.67±1.15b	12.15	1.23±0.02b	11.82	32.30±0.35b	37.45	6.03±1.48bc	50.83
MYnD11	28.33±1.15 ^{ab}	14.85	1.20±0.06b	9.09	38.27±2.50b	62.84	6.17±0.21bc	54.17
MYnI4	30.33±0.58 ^a	22.96	1.26±0.06b	14.55	37.47±3.30b	59.43	9.23±2.40ab	130.83
CK	24.67±1.53 ^c	/	1.10±0.03c	/	23.50±1.78c	/	4.00±1.47c	/

表 4 低温胁迫下接种产 ACC 脱氨酶菌株垂穗披碱草的根系发育状况

Table 4 Root growth states of *E. nutans* inoculated with ACC deaminase-producing strains under low temperature stress

菌株编号	总根长/cm	增长率/%	总根表面积/cm ²	增长率/%	平均根系直径/mm	增长率/%	根尖数	增长率/%
TZnG2	59.41±2.52 ^b	23.64	6.42±0.83 ^b	42.79	0.35±0.06 ^{ab}	24.79	264.33±36.02 ^a	6.59
TZnFn7	51.68±4.40 ^{bc}	7.55	5.03±0.48 ^c	11.84	0.29±0.01 ^{bc}	4.81	148.67±41.48 ^b	-40.05
MYnD11	58.44±4.42 ^{bc}	21.63	5.24±0.64 ^{bc}	16.53	0.31±0.02 ^{bc}	10.23	279.67±40.20 ^a	12.77
MYnI4	77.63±10.12 ^a	61.57	8.63±0.81 ^a	91.89	0.38±0.01 ^a	35.50	296.33±40.05 ^a	19.49
CK	48.05±3.24 ^c	/	4.50±0.50 ^c	/	0.28±0.02 ^c	/	248.00±30.05 ^a	/

2.4 接种产 ACC 脱氨酶菌株对低温胁迫下垂穗披碱草植株叶绿素含量的影响

随温度降低,对照组植株叶片叶绿素 a 含量逐渐减少(图 3-A),相比 25℃处理,4℃时下降了 30.27%。但接种产 ACC 脱氨酶菌株后,叶绿素 a 呈现出随温度下降呈先降低后升高的趋势,且变化幅度变小。比较之下,接种 TZnFn7 效果最显著,相比 25℃,叶绿素 a 含量在 4℃仅下降了 2.08%。

与叶绿素 a 含量变化趋势相似,伴随温度降低,对照组叶绿素 b 含量显著减少(图 3-B)。叶绿素 b 含量在 4℃时相比 25℃下降了 47.82%。但接种 TZnFn7 后叶绿素 b 含量表现出先降低后升高趋势,其中在 12℃时含量最低,仅为 25℃时的 84.55%,随后逐渐升高,4℃时的叶绿素 b 含量达到 25℃时的 93.79%。其它接种处理呈现出与对照相似的规律,叶绿素 b 含量随温度降低而下降,但总体下降趋势减缓。

随温度降低,对照组类胡萝卜素含量呈逐渐下降趋势,相比 25℃,在 4℃时下降了 18.65%。但接种菌株 TZnFn7 和 MYnI4 后表现出先下降后升高趋势,在 4℃时,类胡萝卜素含量分别为 25℃时的 96.64% 和 105.01%(图 3-C)。接种 TZnG2 和 MYnD11 后植株类胡萝卜素含量变化规律与对照相似,但相比对照下降趋势平缓。

2.5 接种产 ACC 脱氨酶菌株对低温胁迫下垂穗披碱草抗氧化酶活性的影响

2.5.1 对低温胁迫下植株 SOD 的影响

SOD 是植物体内极为重要的抗氧化酶,随着温度降低,各处理植株茎叶中 SOD 酶活性均呈现出逐渐升高趋势(图 4-A)。但接种菌株处理后,SOD 酶活性表现出一定规律的波动变化。接种 TZnG2 和 TZnFn7 后在 25℃到 12℃时 SOD 酶活性逐步升高,但在 8℃时降低,4℃时又再次升高。而接种 MYnD11 和 MYnI4 在 18℃时酶活性最低,后随温度降低而逐步升高。

2.5.2 对低温胁迫下植株 POD 的影响

随着温度降低,无论对照还是接种处理,POD 活性总体呈现出先升高后降低再上升的趋势(图 4-B)。接种 TZnG2 后在 8℃时 POD 活性达到最高值,相比 25℃时提高了 42.98%。接种 TZnFn7、MYnD11 和 MYnI4 后在 25℃到 12℃时 POD 活性逐渐升高,8℃时下降,而在 4℃时又升高且达到最高值,相比 25℃分别提高了 9.48%、74.27% 和 42.55%。相比之下,对照组变化幅度更大,POD 活性在 12℃时最低,相比 25℃时下降了 21.97%,8℃时最高,相比 25℃时提高了 35.93%。

2.5.3 对低温胁迫下植株内 CAT 的影响

随温度降低,接种菌株与对照植株茎叶中 CAT 活性均呈现出先上升后下降的趋势,且波动幅度均不大(图 4-C)。

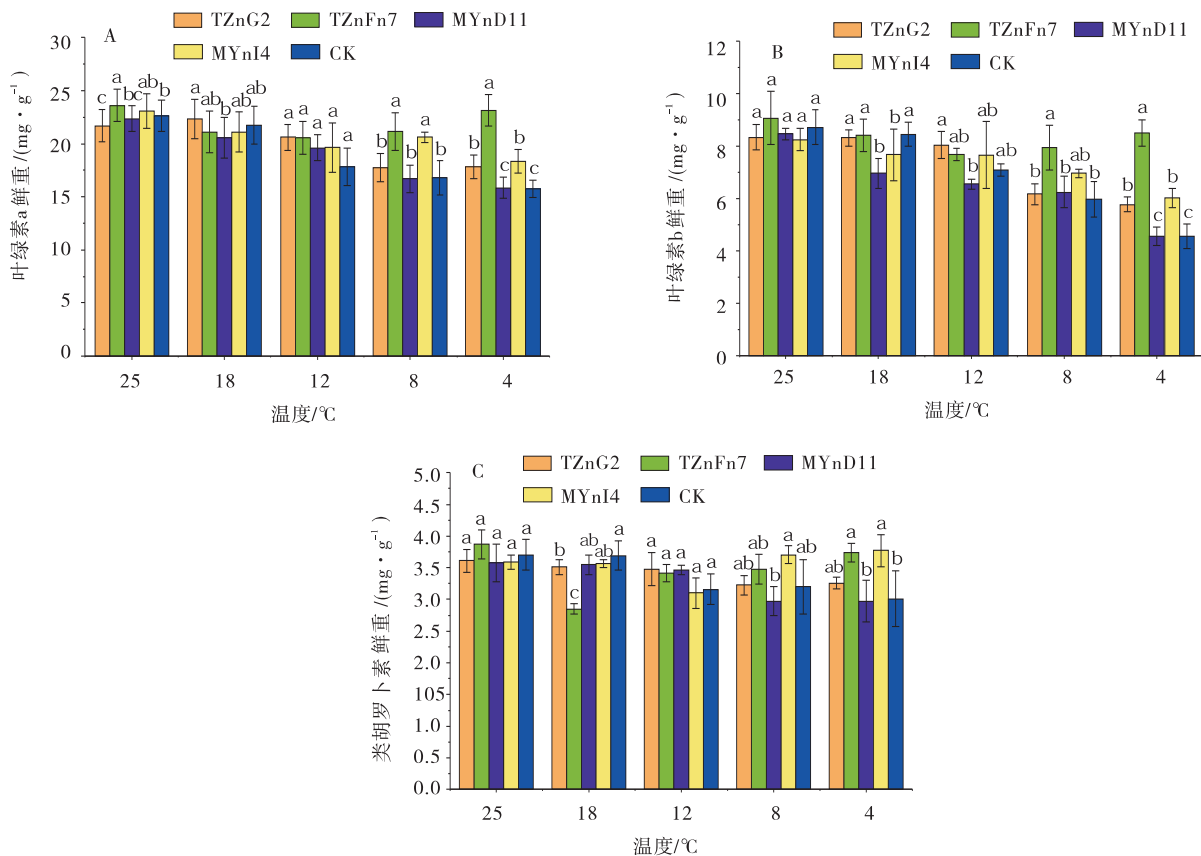


图3 低温胁迫下接种产ACC脱氨酶菌株垂穗披碱的草叶绿素含量

Fig. 3 Chlorophyll content of *E. nutans* inoculated with ACC deaminase-producing strains under low temperature stress

注:相同温度下不同小写字母表示各处理间在0.05水平差异显著($P < 0.05$),下同

除接种菌株MYnI4在8 °C时酶活力变化较大外,其余菌株与对照在各温度下均无显著差异。

2.5.4 对低温胁迫下植株内MDA含量的影响
MDA是植物细胞膜脂过氧化的分解产物,其含量变化可反映植物遭受逆境损伤的程度。随着温度降低,接种菌株和对照植株茎叶中MDA含量均呈上升趋势(图4-D)。相比而言,对照植株内MDA积累更快,除12 °C外,其他温度下接种菌株与对照之间无显著差异。

3 讨论

乙烯是一种重要的植物内源激素,能作为信息分子在植物细胞之间传递进而实现对植物生长发育的调节。当植物遭受高温、冷害、盐碱等逆境胁迫时会增强细胞内ACC合成酶活性,导致产生大量乙烯进而对植物生长不利。产ACC脱氨酶的PGPB能降解植物乙烯合成的直接前体ACC而赋予植物对盐碱胁迫^[1,2,11]、冷胁迫^[14]及干旱胁迫^[15]等多种逆境的耐受

性,被认为是提高植物抗逆性的有效途径。

Li等^[16]将阴沟肠杆菌*Enterobacter cloacae* UW4中的ACC脱氨酶基因(*acdS*)导入大肠杆菌(*Escherichia coli*)、巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)及恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)等细菌中,发现阳性转化菌株都能促进油菜幼苗根的生长。而失去ACC脱氨酶基因的负突变株也同时失去促生能力,说明产ACC脱氨酶是PGPB促进植物生长的关键机制之一。Onofre-Lemus等^[17]研究发现,产ACC脱氨酶是伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)的普遍特征,能调节番茄乙烯水平并促进其生长。本研究将产ACC脱氨酶菌株接种低温胁迫下的垂穗披碱草幼苗获得了相似结果,进一步验证产ACC脱氨酶菌株能有效减缓低温对垂穗披碱草幼苗的损害,增强其抵御低温胁迫能力,发挥促生作用。

优良菌种是研制功能性生物菌肥的基础。目前,筛选产ACC脱氨酶菌株的方法主要有定向富集法^[12],即以ACC为唯一氮源配制培养基进行筛选与

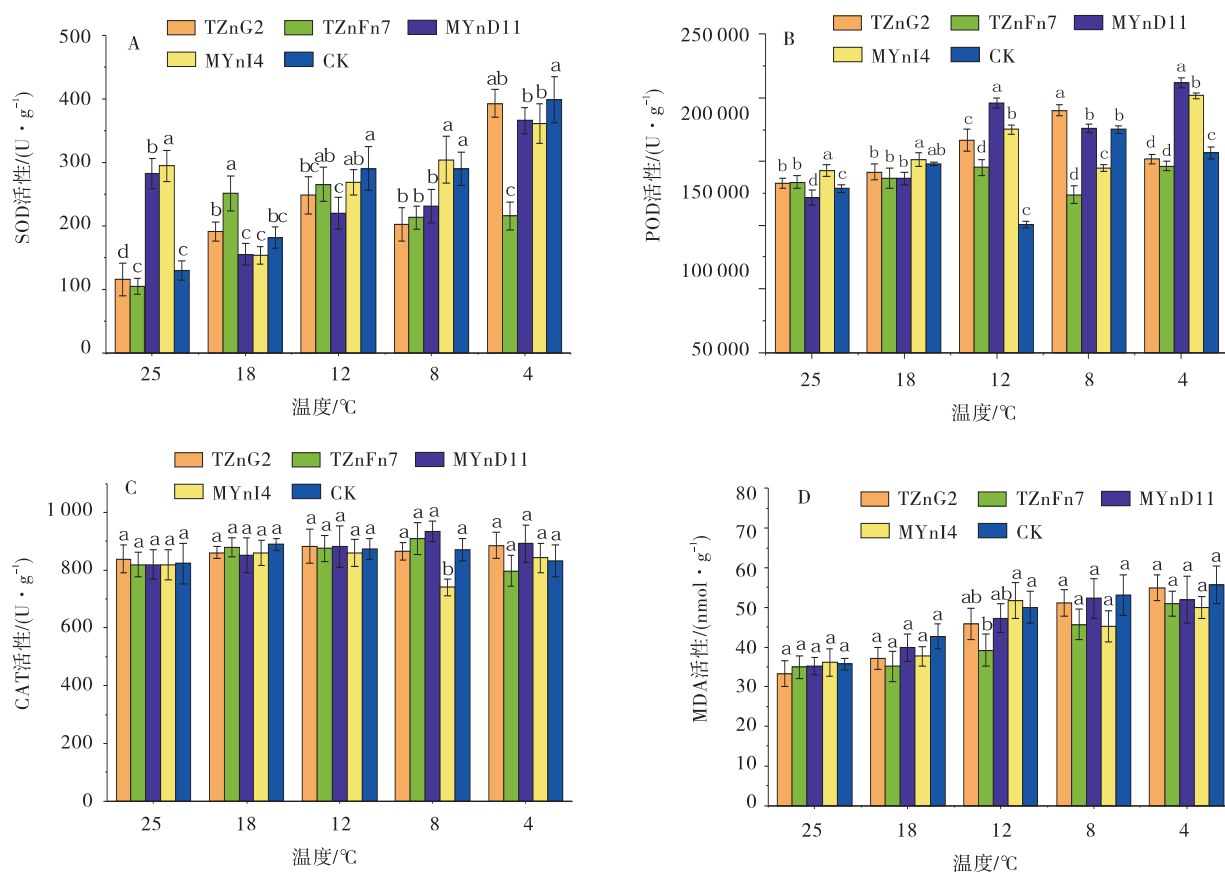


图 4 低温胁迫下接种产 ACC 脱氨酶菌株垂穗披碱草植株的抗氧化酶活性

Fig. 4 Antioxidant enzyme activity of *Elymus nutans* inoculated with ACC deaminase-producing strains under low temperature stress

培养;或针对编码 ACC 脱氨酶基因的 *acdS* 基因设计特异性引物,借助 PCR 手段进行筛选。相比之下,传统的定向富集法耗时较长,工作量巨大而效率低;PCR 法快捷、灵敏、高效,但依赖于特异性高的引物设计和 PCR 反应条件。因此,两种方法各有利弊,需根据实际操作选择应用。

低温是影响植物生长和限制其地理分布的重要胁迫因素,它能通过破坏植物细胞结构和引起生理生化代谢紊乱而对植物产生伤害^[18]。冷胁迫下,植物细胞叶绿素合成受阻,细胞膜脂过氧化产物丙二醛大量积累,活性氧增多而使细胞膜系统功能丧失和结构改变,为消除活性氧,细胞内抗氧化酶(如 SOD、POD、CAT 等)活性迅速升高^[19]。因此,MDA 含量变化及抗氧化防御酶活性是低温胁迫下植物应激反应的重要监测指标。研究表明,分泌 ACC 脱氨酶的 PGPB 能通过诱导植物细胞抗氧化酶活性进而提升抗逆能力^[20]。Singh 将 ACC 脱氨酶菌株 *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 接种小麦,发现其能提高小麦应对

非生物胁迫的能力,促进其在逆境下的生长^[21]。Habib 等^[22]将产 ACC 脱氨酶菌株 *Enterobacter* sp. UPMR18 接种秋葵,可以提高幼苗在高盐胁迫下的发芽率、生长参数和叶绿素含量,而且秋葵植株内抗氧化酶(SOD、APX 和 CAT)活性也有效提高。

何敏等^[23]从青藏高原北部退化草原的土壤中分离到的短杆菌属 *Brevibacterium* sp. TS22 和蕈状芽孢杆菌 *Bacillus mycoides* TS27 具有较高 ACC 脱氨酶活性,在 10 °C 环境下接种早熟禾和老芒麦实验表明,它们能有效促进株高、根长、地上和地下部干重的增长,但促生效果因植物和菌种的不同而有所不同。Tara 等^[24]从芦荟根际分离得到 1 株具有多种促生属性的耐冷短杆菌 *Brevibacterium frigiditolerans* SMA23,在 10 °C 低温下对小麦生长有积极影响。李玫等^[25]在低温胁迫下对海榄雌幼苗进行接种 PGPB 试验,结果表明接种 PGPB 能有效增强海榄雌幼苗抗寒能力并促进其生长,且 PGPB 的混合接种比单一接种效果更佳。刘维红等^[14]采用定向富集法从不同蔬菜根际筛选到

多株 ACC 脱氨酶活性菌株,选取活性最高的 LA1、XG32 和 YC1 接种番茄幼苗,发现 3 株菌能明显缓解低温胁迫对番茄初生苗的伤害,促进其生长,且浇菌液接菌促生效果优于浸种接菌。因此,土壤中产 ACC 脱氨酶菌株的开发应用是提升植物抗逆性的有效策略,对盐碱地的高效应用以及增强植物应对生物或非生物胁迫有重要意义。

4 结论

从祁连山高寒草地的 821 株细菌中筛选得到 11 株有 ACC 脱氨酶活性的菌株,被区分为 5 个不同菌属,其中有 4 株酶活性大于 $1 \mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{h})$,具有进一步开发应用价值。接种产 ACC 脱氨酶菌株能有效减缓低温胁迫下垂穗披碱草叶绿素含量下降,提高 SOD、POD 和 CAT 等抗氧化酶活性,促进植物生长。

参考文献:

- [1] 梁焯,何楚婷,杨悦,等. 碱胁迫条件下含 ACC 脱氨酶的根际细菌对大豆生长的影响[J]. 生物技术通报,2020,36(9):100—108.
- [2] Liu H, Khan M Y, Carvalhais L C, *et al.* Soil amendments with ethylene precursor alleviate negative impacts of salinity on soil microbial properties and productivity[J]. Scientific Reports, 2019,9(1):6892.
- [3] Bleecker A B, Kende H. Ethylene: A gaseous signal molecule in plants[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2000,16:1—18.
- [4] 陈坚,丁琴,王敏,等. 根际 ACC 脱氨酶活性细菌的分离及其促生作用研究[J]. 中国土壤与肥料,2012(2):92—97.
- [5] Zarei T, Moradi A, Kazemeini S A, *et al.* The role of ACC deaminase producing bacteria in improving sweet corn (*Zea mays* L. var *saccharata*) productivity under limited availability of irrigation water[J]. scientific reports, 2020, 10(1):20361.
- [6] Liu H, Carvalhais L C, Crawford M, *et al.* Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2017,8:2552.
- [7] Glick B R. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world[J]. Microbiological Research, 2014,169(1):30—39.
- [8] Singh R P, Shelke G, Kumar A, *et al.* Biochemistry and genetics of ACC deaminase: a weapon to “stress ethylene” produced in plants [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6:937.
- [9] Basu A, Prasad P, Das S N, *et al.* Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects [J]. Sustainability, 2021,13(3):1140.
- [10] Shrivastava P, Kumar R. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2015,22(2):123—131.
- [11] 王琪媛,王甲辰,叶磊,等. 含 ACC 脱氨酶的根际细菌提高植物抗盐性的研究进展[J]. 生物技术通报,2021,37(2):174—186.
- [12] Penrose D M, Glick B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118(1):10—15.
- [13] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991,173(2):697—703.
- [14] 刘维红,闫淑珍,杨启银,等. ACC 脱氨酶活性细菌筛选及其对番茄初生苗生长的影响[J]. 江苏农业科学, 2006,34(2):80—84.
- [15] Danish S, Zafar M, Mohsin F, *et al.* ACC—deaminase producing plant growth promoting rhizobacteria and biochar mitigate adverse effects of drought stress on maize growth[J]. PLoS One, 2020,15(4):e0230615.
- [16] Li J, Ovakim D H, Charles T C, *et al.* An ACC deaminase minus mutant of enterobacter cloacae UW4 no longer promotes root elongation[J]. Current Microbiology, 2000,41(2):101—105.
- [17] Onofre-Lemus J, Hernández-Lucas I, Girard L, *et al.* ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants[J]. Appl Environ Microbiol, 2009,75(20):6581—6590.
- [18] 杨艳梅,赵喜娟,聂语琪,等. 草本拟南芥和木本毛果杨在冷胁迫下的研究进展[J]. 分子植物育种, 2020,18(17):229—238.
- [19] Maureen R D, Diana A A. Activation of apoptosis signaling pathways by reactive oxygen species[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2016,1863(12):2977—2992.

- [20] Shahid M, Akram M S, Khan M A, *et al.* A phyto-beneficial strain *Planomicrobium* sp. MSSA-10 triggered oxidative stress responsive mechanisms and regulated the growth of pea plants under induced saline environment [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124 (6) : 1566—1579.
- [21] Singh R P, Jha P N. The PGPR *Stenotrophomonas maltophilia* SBP-9 augments resistance against biotic and abiotic stress in wheat plants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8:1945.
- [22] Habib S H, Kausar H, Saud H M. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance salinity stress tolerance in Okra through ROS—scavenging enzymes[J]. *BioMed research international*, 2016, 2016:6284547.
- [23] 何敏,王秀璞,李彦,等. 两株耐寒 PGPB 的分离及其对藏北当地牧草生长的影响[J]. *广西植物*, 2021, 49(9): 1425—1432.
- [24] Tara N, Singh B. Plant growth promoting traits shown by bacteria *Brevibacterium frigidotolerans* SMA23 isolated from Aloe vera rhizosphere [J]. *Agricultural Science Digest*, 2017, 37(3): 226—231.
- [25] 李玫,何雪香,廖宝文. PGPR 接种对海榄雌幼苗抗寒性的影响[J]. *福建林业科技*, 2019, 46(4): 29—32.

Screening of ACC deaminase producing bacteria and their effects on the growth of *Elymus nutans* under low-temperature stress

LI Ming-yuan^{1,2}, WANG Ji-lian^{1,2}, YAO Tuo^{1*}, WANG Zhen-long¹, ZHANG Hui-rong¹, CHAI Jia-li¹, LIU Xiao-ting¹, LI Qing-pu¹

(1. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University/Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education, Lanzhou 730070, China; 2. Department of Biologic and Geographic Sciences, Key Laboratory of Biological Resources and Ecology of Pamirs Plateau in Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kashi University, Kashgar 844006, China)

Abstract: To screen plant growth-promoting bacteria (PGPB) with ACC deaminase activity and verify their effects on forage growth under low temperature conditions, a total of 821 PGPB strains were used to identify the ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) deaminase activity in DF and ADF medium. These PGPB strains were all isolated from the dominant forage species in alpine grassland of the Qilian Mountains. 16S rRNA gene sequences coupled with phylogenetic analysis were used to determine the taxonomic status of ACC deaminase producing bacteria. Moreover, the growth—promoting effects of 4 strains with high enzyme activity on the growth of *Elymus nutans* seedlings were verified by a seedling sand culture experiment under low—temperature stress. A total of 11 strains with high ACC deaminase activity were identified and divided into 5 genera. The inoculation of ACC deaminase strains could increase the stem height, stem diameter, stem dry weight and root dry weight. It also affected the root development, inhibited the decrease of chlorophyll content. Moreover, the activity of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), and catalase (CAT) in the seedlings were enhanced. These ACC deaminase producing bacteria can effectively promote the growth of *E. nutans* at low temperature and enhance the stress resistance. These bacteria have potential for the further development of biological fertilizer suitable for alpine grassland.

Key words: ACC deaminase; plant growth-promoting bacteria; low temperature stress; *Elymus nutans*