

## 小麦内生固氮菌分离及其 ACC 脱氨酶测定

秦宝军, 罗琼, 高淼, 胡海燕, 徐晶, 周义清, 孙建光

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所/农业部作物营养与施肥重点实验室, 北京 100081)

**摘要:**【目的】了解小麦内生固氮菌数量, 筛选具有 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate, 1-氨基环丙烷-1-羧酸) 脱氨酶活性的小麦内生固氮菌, 确定筛选菌株的系统发育地位与分类地位, 为微生物肥料生产收集菌种资源。【方法】样品表面灭菌后采用无氮培养基筛选内生固氮菌, 乙炔还原法测定菌株固氮酶活性; 采用 ACC 唯一氮源法筛选 ACC 脱氨酶阳性菌, 比色法定量测定 ACC 脱氨酶活性; PCR 扩增得到菌株 16S rDNA, 通过序列测定和相似性分析研究菌株的系统发育; 通过形态、生理生化特征和 16S rDNA 序列比对鉴定菌种。【结果】小麦体内固氮菌数量为  $(0.2-17.8) \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜重; 分离到小麦内生固氮菌 60 株, 固氮酶活性在 1—36 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg 蛋白, 其中 9 株具有 ACC 脱氨酶活性, 活性在 0.87—9.32 μmol α-丁酮酸/h·mg 蛋白; 新分离菌株 9136 固氮酶活性为 1.82 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg 蛋白, ACC 脱氨酶活性为 9.32 μmol α-丁酮酸/h·mg 蛋白, 初步鉴定为假单胞菌 *Pseudomonas* sp.。【结论】田间自然生长的小麦体内有大量固氮菌, 数量在 10<sup>5</sup> cfu·g<sup>-1</sup> 鲜重, 其中部分菌株具有 ACC 脱氨酶活性, 个别菌株具有较高的 ACC 脱氨酶活性, 可能对作物抵御不良环境具有作用。

**关键词:** 小麦; 内生固氮菌; ACC 脱氨酶; 根际促生细菌

## Isolation of Wheat Endophytic Diazotrophs and Determination of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Deaminase

QIN Bao-jun, LUO Qiong, GAO Miao, HU Hai-yan, XU Jing, ZHOU Yi-qing, SUN Jian-guang

(Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Nutrition and Fertilization of Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of this study is to determine the amount of wheat endophytic diazotrophs and screen for ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity from the diazotrophs, determine the phylogenetic and classific position of selected strains and prepare strains for microbial fertilizer production. 【Method】 Surface sterilization and nitrogen-free medium were used to isolate diazotroph and ACC was used as sole nitrogen source to screen strains with ACC deaminase activity. Nitrogenase activity was determined with acetylene reduction assay. 16S rDNA was amplified with PCR and analysed with MEGA software. Strain identification was carried out based on the morphology, physiology, biochemical test results and 16S rDNA analysis. 【Result】 The amount of endophytic diazotrophs at jointing stage of wheat was  $(0.2-17.8) \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> fresh weight. Sixty endophytic diazotrophs with nitrogenase activity ranging 1-36 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg protein were isolated from wheat. Nine of the 60 endophytic diazotrophs were ACC deaminase positive, the range of enzyme activity is 0.87-9.32 μmol α-ketobutyric acid/h·mg protein. New isolate 9136 with nitrogenase activity 1.82 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg protein and ACC deaminase activity 9.32 μmol α-ketobutyric acid/h·mg protein was identified as *Pseudomonas* sp.. 【Conclusion】 About 10<sup>5</sup> cfu·g<sup>-1</sup> (fresh weight) endophytic diazotrophs naturally colonized field grown wheat, some of these endophytic diazotrophs could produce ACC deaminase. A few strains showed relatively high ACC deaminase activity, and they might play a role in crop resistance to enviromental stress.

**Key words:** wheat; endophytic diazotrophs; ACC deaminase; PGPB

收稿日期: 2011-03-29; 接受日期: 2011-12-29

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201203045)

联系方式: 秦宝军, E-mail: bjinqin6688@126.com. 通信作者孙建光, Tel: 010-82108701; E-mail: jgsun@caas.ac.cn

## 0 引言

【研究意义】生物固氮在农业科学研究中意义重大,近年来,大量植物内生固氮菌的发现加深了人们对生物固氮的理解,也预示着生物固氮的巨大潜力和逐步走向农业生产的光明前景。1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)脱氨酶是近年来发现的许多植物促生细菌(plant growth promoting bacteria, PGPB)共有的1个特征酶。研究小麦内生固氮菌及其ACC脱氨酶活性,可以揭示固氮菌在小麦体内的自然存在和固氮、促生潜能,同时收集固氮微生物资源,为生物固氮在小麦生产中的应用提供理论依据和物质基础。【前人研究进展】水稻和甘蔗是内生固氮菌研究较多的作物。在水稻研究中,人们建立了有效的内生固氮菌分离方法,检测到了水稻内生固氮菌<sup>[1]</sup>,近年来水稻内生固氮菌新种属也不断被发现<sup>[2]</sup>,证明了接种固氮菌对于增加水稻氮素营养具有实际意义<sup>[3]</sup>。常见的甘蔗内生固氮菌有 *Gluconacetobacter diazotrophicus*、*Herbaspirillum seropedicae*、*H. rubrisubalbicans* 和 *Burkholderia* sp. 等<sup>[4]</sup>,人工接种固氮菌在甘蔗育苗中显示出效果<sup>[5]</sup>。近年来研究发现,很多植物促生菌具有ACC脱氨酶活性,因此人们采用检测ACC脱氨酶的方法来筛选植物促生菌<sup>[6]</sup>,而且发现具有ACC脱氨酶活性的细菌能够使番茄抗病促生<sup>[7]</sup>,缓解植物盐害<sup>[8]</sup>。【本研究切入点】目前,人们对小麦内生固氮菌了解很少,对内生固氮菌产生ACC脱氨酶了解更少。直接从大田采集小麦植株样品,检测自然状态下小麦内生固氮菌的数量,分离、培养内生固氮菌,测定分离物在纯培养条件下的固氮酶活性和ACC脱氨酶活性,筛选、鉴定高活性菌株的研究未见报道。【拟解决的关键问题】检测、确认自然生长状态下小麦体内固氮菌的数量,评价固氮菌分离物的生物固氮和ACC脱氨酶活性。

## 1 材料与方法

试验于2010年1月至2011年3月在中国农业科学院农业资源与农业区划研究所完成。

### 1.1 样品、试剂、培养基

1.1.1 样品、试剂 新鲜小麦植株样品处于拔节期,第一批于2010年4月28日采自中国农业科学院院部东门外试验地,编号为160-1、160-2,第二批于2010年5月11日采自北京市农林科学院院部试验地,编号为161-1、161-2。试验所用试剂购自北京化学试剂公

司和Sigma公司。

1.1.2 培养基 多碳源低氮培养基(CCM)<sup>[9-10]</sup>: 溶液:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g,  $\text{NaCl}$  0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8 g,  $\text{Na}_2\text{FeEDTA}$  28 mg, 钼酸钠 25 mg, 酵母浸膏 100 mg, 甘露醇 5 g, 蔗糖 5 g, 乳酸钠 0.5 mL, 蒸馏水 900 mL。溶液:  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.06 g, 蒸馏水 100 mL。将溶液、分别灭菌,冷却至50左右混合,加入生物素( $5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )和维生素( $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )各0.5 mL。

无氮培养基<sup>[11]</sup>: 蔗糖 10 g,  $\text{NaCl}$  0.12 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{CaCO}_3$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH7.2。

DF培养基<sup>[12]</sup>:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4.0 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g, 葡萄糖 2.0 g, 葡萄糖酸钠 2.0 g, 柠檬酸 2.0 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0 g, 组分一、组分二溶液各0.1 mL,  $\text{H}_2\text{O}$  1 000 mL, pH 7.2; 其中组分一:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  10 mg,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  11.19 mg,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  124.6 mg,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  78.22 mg,  $\text{MoO}_3$  10 mg, 溶于100 mL 灭菌蒸馏水中; 组分二:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  100 mg 溶于10 mL 灭菌蒸馏水中。

ADF培养基: ACC溶于超纯水,过滤灭菌,加到不含 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的灭菌DF培养基中,终浓度为 $3.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 1.2 小麦内生固氮菌数量测定与固氮菌分离

取新鲜小麦植株,首先用自来水冲洗干净,然后依次用70%乙醇浸泡1 min,2%次氯酸钠表面消毒灭菌10 min,无菌水冲洗3次。无菌操作条件下,准确称取待测部位样品10.0 g,在无菌研钵内磨成糊状,转移、定容至100 mL,继续稀释制成系列稀释样品,分别从 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 稀释液中取0.1 mL分别均匀涂布在上述CCM培养基和无氮培养基平板上,28倒置培养,3—4 d后计数内生固氮数量。同时,将表面消毒时最后一次洗涤水涂布在牛肉膏蛋白胨培养基上检测确认植株样品消毒彻底。完成菌落计数后,挑取单菌落划线纯化,得到小麦内生固氮菌。

### 1.3 固氮酶活性测定

测定方法参照文献[13]。

### 1.4 ACC脱氨酶阳性菌筛选

参考Penrose等的方法<sup>[12]</sup>,把分离到的内生固氮菌,接入5 mL液体无氮培养基中,30、200 r/min振荡培养24 h;吸取上述培养液0.1 mL接种至5 mL DF培养基振荡培养24 h;吸取上述培养液0.1 mL接种至5 mL ADF培养基中振荡培养24—48 h;将在

ADF 中生长的菌种重复转接、培养,并以 ADF 培养基作为阴性对照,能够以 ACC 为唯一氮源生长的菌株为 ACC 脱氨酶阳性菌株。

### 1.5 ACC 脱氨酶活性测定

参照 Honma 等<sup>[14]</sup>的方法,用 5 mL 无氮液体培养基活化菌株,吸取 0.5 mL 培养液接种到 60 mL 培养液中,30 ℃ 培养 24—48 h,4 × 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 15 mL 不含(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>的 DF 液体培养基离心洗涤菌体 2 次,将菌体重悬于 24 mL ADF 培养基中,30 ℃ 培养 24 h,收集并记录菌体重量。用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6)离心洗涤菌体 2 次,将菌体平均分在 3 个 EP 管中,-20 ℃ 贮存。取贮存菌体重悬于 1 mL 0.1 mol·L<sup>-1</sup>Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6),12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,重悬于 600 μL 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl 缓冲液(pH 8.5)中,加入 30 μL 甲苯,迅速振荡 30 s 破碎细胞,取 100 μL 粗酶液 4 ℃ 贮存用于测定蛋白浓度;其余粗酶液进行 ACC 脱氨酶活性测定。取粗酶液 200 μL 加入 0.5 mol·L<sup>-1</sup>ACC 20 μL 混匀,置于 30 ℃ 水浴反应 15 min,加入 1 mL 0.56 mol·L<sup>-1</sup> HCl 终止反应,12 000 r/min 离心 5 min,取上清 1 mL,加入 800 μL 0.56 mol·L<sup>-1</sup> HCl 和 300 μL 0.2% 2,4-二硝基苯肼溶液(2 mol·L<sup>-1</sup>HCl)中溶解,30 ℃ 保温 30 min;加入 2 mL 2 mol·L<sup>-1</sup>NaOH 混匀,540 nm 测吸光度值。对照 α-丁酮酸标准曲线和蛋白测定标准曲线计算菌株的酶活性。ACC 脱氨酶表示方法为:反应条件下,每毫克菌体蛋白每小时催化 ACC 脱氨形成 α-丁酮酸的微摩尔数,单位是(μmol α-丁酮酸/h·mg 蛋白)。蛋白质测定采用比色法,以牛血清白蛋白作为标准物。测定结果为 3 次重复平均值。

### 1.6 形态、生理生化特征测定

形态及生理生化特征测定方法参考《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[15]</sup>和《微生物学实验》<sup>[16]</sup>。

### 1.7 16S rDNA 序列测定与系统发育分析

16S rDNA PCR 扩增、序列测定与系统发育分析参考文献[11],基因在线比对采用 EzTaxon 和 NCBI 数据库,系统发育分析采用 Mega 软件系统。

## 2 结果

### 2.1 小麦内生固氮菌数量

用 2 种培养基,对 2 次采集的 4 个小麦植株样品进行了内生固氮菌数量测定,3 个稀释度 6 次重复测定结果,及统计分析结果如表 1 所示。总体来看,拔节期小麦体内的固氮菌数量在(0.2—17.8) × 10<sup>5</sup>

cfu·g<sup>-1</sup>鲜重;同一时间、地点采集的小麦植株样品,其内生固氮菌数量无差异,如 160-1、160-2 内生固氮菌数量在(0.2—2.2) × 10<sup>5</sup> cfu·g<sup>-1</sup>鲜重,161-1、161-2 内生固氮菌数量在(13.2—17.8) × 10<sup>5</sup> cfu·g<sup>-1</sup>鲜重;但不同来源的 2 批样品存在显著差异,可能与采样时间、小麦品种、土壤肥力等因素有关。此外,多碳源低氮培养基(CCM)和无氮培养基测定效果相同。

表 1 小麦内生固氮菌数量测定

Table 1 Amount of wheat endophytic nitrogen-fixing bacteria

样品 Sample	培养基 Medium	结果 Result (10 <sup>5</sup> cfu·g <sup>-1</sup> 鲜重)
160-1	CCM 培养基 CCM medium	2.2±0.5a
	无氮培养基 Nitrogen free medium	2.1±0.3a
160-2	CCM 培养基 CCM medium	0.9±0.2a
	无氮培养基 Nitrogen free medium	0.2±0.1a
161-1	CCM 培养基 CCM medium	13.2±2.8b
	无氮培养基 Nitrogen free medium	13.5±2.4b
161-2	CCM 培养基 CCM medium	17.8±4.6b
	无氮培养基 Nitrogen free medium	16.5±2.4b

表中同列数据后不同小写字母表示差异显著(P=0.05)

Different lowercase in the same column mean significant differences at 5% level

### 2.2 小麦内生固氮菌及其固氮酶活性和 ACC 脱氨酶活性

共分离到小麦内生固氮菌 60 株,全部检测到了固氮酶活性,多数在 1—36 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg 蛋白,其中 9 株固氮菌具有 ACC 脱氨酶活性(表 2)。菌株 9136 固氮酶活性为 1.82 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg 蛋白,但其 ACC 脱氨酶活性为 9.32 μmol α-丁酮酸/h·mg 蛋白。

### 2.3 菌株 9136 鉴定

菌株 9136 ACC 脱氨酶活性在所有分离到的菌株中最高,因此,对其进行了菌种鉴定和系统发育分析。

2.3.1 形态及生理生化特征 菌株 9136 在无氮培养基上菌落半透明、表面光滑湿润有光泽、边缘整齐、脐状突起、易挑起。菌体直杆状,1.0 μm × (2.0—2.5) μm,革兰氏染色阴性。生理生化特征如表 3 所示。

2.3.2 16S rDNA 序列比对及菌种鉴定 菌株 9136 的 16S rDNA 基因约 1.5 kb(图 1),经序列测定,采用 EzTaxon 和 NCBI 数据库进行 16S rDNA 基因在线比对,结果显示 9136 菌株与假单胞菌属的模式菌株

表 2 小麦内生固氮菌固氮酶活性和 ACC 脱氨酶活性

Table 2 Nitrogenase and ACC deaminase activity of endophytic nitrogen-fixing bacteria

菌株 Strain	分离样品 Sample	固氮酶活性 Nitrogenase activity (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h·mg 蛋白)	ACC 脱氨酶活性 ACC deaminase activity (μmol α-丁酮酸/h·mg 蛋白)
9101	160-1	1.22	-
9102	160-1	1.16	-
9103	160-1	0.93	-
9104	160-1	12.68	7.24
9105	160-1	8.06	-
9106	160-1	30.24	-
9107	160-1	0.97	-
9108	160-1	8.32	-
9109	160-1	11.98	-
9110	160-1	1.58	-
9111	160-1	0.65	-
9112	160-1	1.72	-
9113	160-1	1.01	-
9114	160-1	2.57	-
9115	160-2	15.52	-
9116	160-2	8.45	-
9117	160-2	8.18	-
9118	160-2	9.04	-
9119	160-2	2.07	-
9120	160-2	5.63	-
9121	160-2	1.57	-
9122	160-2	6.43	-
9123	160-2	7.60	-
9124	160-2	14.02	-
9125	160-2	7.62	-
9126	160-2	36.42	-
9127	160-2	4.23	-
9128	160-2	18.62	-
9129	160-2	7.60	-
9130	160-2	3.62	-
9131	160-2	5.16	-
9132	160-2	7.74	-
9133	160-2	16.63	-
9134	161-1	1.38	-
9135	161-1	0.95	-
9136	161-1	1.82	9.32
9137	161-1	0.90	-
9138	161-1	1.59	3.83
9141	161-1	0.49	-

续表 2 Continued Table 2

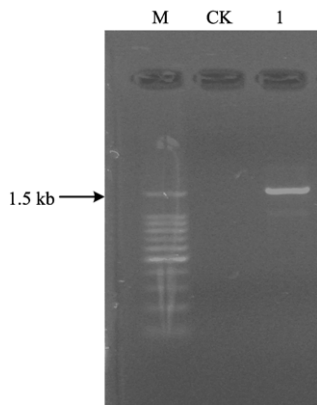
菌株	分离样品	固氮酶活性	ACC 脱氨酶活性
Strain	Sample	Nitrogenase activity (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> /h·mg 蛋白)	ACC deaminase activity (μmol α-丁酮酸/h·mg 蛋白)
9143	161-1	3.23	-
9144	161-1	0.30	6.50
9145	161-1	0.63	-
9147	161-2	1.03	7.87
9148	161-2	13.53	-
9149	161-2	13.31	0.87
9150	161-2	3.15	-
9151	161-2	1.05	-
9152	161-2	0.33	-
9153	161-2	25.29	-
9154	161-2	9.91	-
9155	161-2	17.20	-
9156	161-2	15.88	-
9157	161-2	6.74	-
9158	161-2	12.62	3.96
9159	161-2	4.90	6.86
9160	161-2	18.63	-
9161	161-2	1.06	5.50
9162	161-2	8.05	-
9163	161-2	16.4	-
9164	161-2	8.02	-

表 3 固氮菌 9136 的生理生化特征

Table 3 Physiological and chemical characteristics of strain 9136

生理生化特征	结果	生理生化特征	结果
Physiological and chemical characteristics	Result	Physiological and chemical characteristics	Result
接触酶反应 Catalase reaction	+	糖醇类发酵产酸 Sugar fermentation	
VP 反应 VP test	-	D+葡萄糖 D+glucose	-
吡啉实验 Idol test	+	D+蔗糖 D+sucrose	-
明胶液化 Gelaune liquefaction	+	D+乳糖 D+lactose	-
淀粉水解 Starch hydrolization	-	D+半乳糖 D+galactose	+
卵磷脂酶 Lecithinase test	+	D+核糖 D+ribose	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	L+阿拉伯糖 L+arabinose	-
甲基红 Methyl red test	-	D+果糖 D+fructose	+
石蕊牛奶反应 Litmus milk	+	D+甘露醇 D+mannitol	-
柠檬酸盐利用 Citrate test	+	D+山梨醇 D+sorbitol	+
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	D+麦芽糖 D+maltose	-
产二羟基丙酮 Dihydroxyacetone test	-	D+纤维二糖 D+cellobiose	-
葡萄糖产气 Gas production on glucose	-	甘油 Glycerol	-
pH5.7 生长测定 Growth at pH5.7	+	2% NaCl	-
0.001%溶菌酶 Lysozyme test	+		

“+”: 阳性;“-”: 阴性 “+”: Positive;“-”: Negative



M: DNA marker; CK: 阴性对照; I: 菌株 9136  
M: DNA marker; CK: Negative control; I: Strain 9136

图 1 菌株 9136 的 16S rDNA 电泳图

Fig. 1 16S rDNA electrophoresis of strain 9136

*Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* ATCC49054<sup>T</sup> (GenBank: EU391388)<sup>[17]</sup>亲缘关系最近, 序列相似性高达 99.15% 与 *Pseudomonas thivervalensis* CFBP11261<sup>T</sup> (GenBank: AF100323)<sup>[18]</sup>和 *Pseudomonas kilonensis* 520-20<sup>T</sup> (GenBank: AJ292426)<sup>[19]</sup>的相似性分别为 99.14% 和 99.08%。根据菌株的形态特征、生理生化特性, 及 16S rDNA 基因比对结果, 参照《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》<sup>[20]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》, 菌株 9136 被鉴定为假单胞菌 *Pseudomonas* sp.。基于 16S rDNA 序列, 图 2 列出了与菌株 9136 同源性高于 98% 的假单胞菌属各种的模式菌株及其系统发育地位。

### 3 讨论

氮素是农业生产中必需的大量营养元素, 工业固

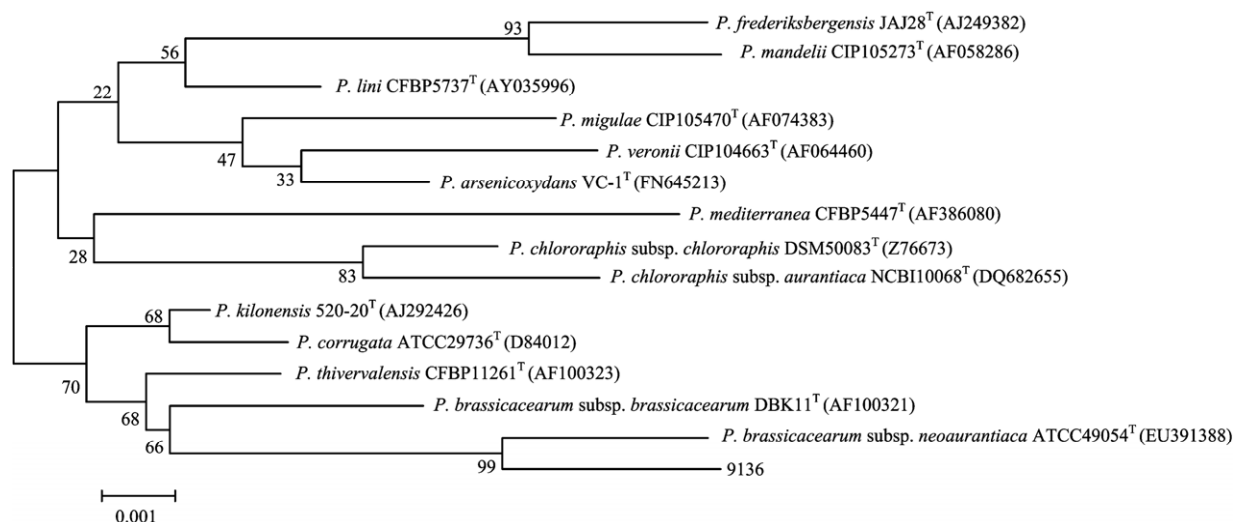


图 2 固氮菌 9136 及其高同源种系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain 9136 and homological species

氮需要消耗大量能源和资源, 而生物固氮是最符合自然生态规律、最环保、节能的氮素供应方式。目前, 生物固氮为农业生产提供的氮素养分还很少, 但随着科学技术的不断进步, 生物固氮技术有望为农作物提供大量氮素, 在农业生产中发挥巨大的作用。

根据固氮菌与植物关系的紧密程度, 人们把生物固氮划分为自生固氮、联合固氮和共生固氮 3 种主要类型<sup>[21]</sup>。固氮菌与植物结合的紧密程度存在大量的中间过渡态, 如近年来在很多非豆科植物的体内发现大量内生固氮菌, 它们不像根瘤菌与豆科植物那样形成

典型的根瘤结构, 也不同于传统意义上的自生固氮和联合固氮。这些内生固氮菌在非豆科植物体内生存、固氮, 对寄主植物没有严格的专一性, 它们对于农业生产意义更大。内生固氮菌与非豆科植物寄主氮素营养的关系正在成为生物固氮领域关注的焦点和研究热点。

人们对水稻内生固氮菌的研究相对较多, 测得大田水稻根部内生固氮菌的数量为  $7.94 \times 10^7$  cfu·g<sup>-1</sup> 干重, 秆部数量为  $2.57 \times 10^6$  cfu·g<sup>-1</sup> 干重<sup>[1]</sup>。盆栽和大田接种试验表明, 水稻接种固氮菌后植株含氮量分别有

40%和 42%来源于生物固氮<sup>[3]</sup>。甘蔗内生固氮菌的数量可以达到  $10^5$ — $10^6$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜重, 接种固氮菌对甘蔗育苗和生产均有促进作用<sup>[5, 22]</sup>。对于小麦固氮的研究, 国内外报道都很少。Iniguez 等在盆栽条件下用肺炎克氏杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 342 接种小麦, 采用 <sup>15</sup>N 测定固氮量。结果显示, 在小麦植株组织内发现大量固氮菌, 而且接种固氮菌的植株含氮量比不接种增加 317%—394%, 但这个固氮量还不足以提供植株对氮素的全部需求, 不能缓解不施氮肥导致植株缺氮的症状<sup>[23]</sup>。本研究检测到的小麦内生固氮菌数量为  $(0.2—17.8) \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜重, 折合为干重后与上述水稻内生固氮菌的数量在同一数量级; 分离到小麦内生固氮菌 60 株, 固氮酶活性在 1—36 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg 蛋白, 说明小麦内生固氮菌具有固氮潜能。大田自然生长状态下小麦内生固氮菌数量和 ACC 脱氨酶活性未见报道, 本文对于固氮菌与小麦氮素营养的关系研究具有重要意义。

乙烯是高等植物的内源激素, 植物生长发育通常只需要较低水平的乙烯, 但在接近成熟或遇到干旱、淹水、高温、机械损伤、病虫害侵袭时会大量产生乙烯, 这是植物对环境的一种生理应激反应, 但过量乙烯会导致植物生长发育受阻甚至死亡。ACC 是乙烯合成的前体物质, 近年来发现, 某些细菌具有 ACC 脱氨酶活性, 能够把 ACC 分解成氨和  $\alpha$ -丁酮酸减少植物乙烯合成, 从而降低植物对逆境的敏感性, 提高植物抗逆能力<sup>[24]</sup>, 而且可以促进有机物污染和重金属污染土壤的植物修复<sup>[25]</sup>。接种 ACC 脱氨酶阳性菌可以显著增强番茄的抗涝性<sup>[26]</sup>、缓解油菜盐害<sup>[8]</sup>、玉米增产<sup>[6, 27]</sup>、番茄抗病促生<sup>[7, 28]</sup>。本文分离到小麦内生固氮菌 60 株, 其中 9 株具有 ACC 脱氨酶活性, 活性在 0.87—9.32  $\mu$ mol  $\alpha$ -丁酮酸/h·mg 蛋白, 预示了植物促生细菌在小麦上的抗逆促生潜能。新分离到 ACC 脱氨酶活性最高的菌株 9136 与 *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* ATCC49054<sup>T</sup> 亲缘关系最近, 初步鉴定到属, 定为假单胞菌 *Pseudomonas* sp., 与国外关于促生细菌的报道相一致<sup>[7-8, 27]</sup>。

## 4 结论

田间自然生长的小麦体内含有大量的固氮菌, 拔节期时检测到的数量为  $(0.2—17.8) \times 10^5$  cfu·g<sup>-1</sup> 鲜重。分离到的 60 株小麦内生固氮菌固氮酶活性在 1—36 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg 蛋白, 其中 9 株 ACC 脱氨酶活性在 0.87—9.32  $\mu$ mol  $\alpha$ -丁酮酸/h·mg 蛋白, 这些菌株对作

物抵御不良环境可能具有重要作用。新分离、筛选的菌株 9136 固氮酶活性为 1.82 nmol C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>/h·mg 蛋白, ACC 脱氨酶活性为 9.32  $\mu$ mol  $\alpha$ -丁酮酸/h·mg 蛋白, 初步鉴定为假单胞菌 *Pseudomonas* sp., 该菌株 ACC 脱氨酶活性较高, 值得进一步研究其在小麦体内的作用。

## References

- [1] Barraquiu W, Revilla L, Ladha J. Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. *Plant and Soil*, 1997, 194: 15-24.
- [2] Zhang G X, Peng G X, Wang E T, Yan H, Yuan Q H, Zhang W, Lou X, Wu H, Tan Z Y. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov.. *Archives of Microbiology*, 2008, 189: 431-439.
- [3] Govindarajan M, Balandreau J, Kwon S W, Weon H Y, Lakshminarasimhan C. Effects of the inoculation of *Burkholderia vietnamiensis* and related endophytic diazotrophic bacteria on grain yield of rice. *Microbial Ecology*, 2008, 55(1): 21-37.
- [4] Boddey R M, Urquiaga S, Alves B J R, Reis V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant and Soil*, 2003, 252: 139-149.
- [5] Govindarajan M, Balandreau J, Muthukumarasamy R, Revathi G, Lakshminarasimhan C. Improved yield of micropropagated sugarcane following inoculation by endophytic *Burkholderia vietnamiensis*. *Plant and Soil*, 2006, 280: 239-252.
- [6] Shaharoon B, Arshad M, Zahir Z A. 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: 155-159.
- [7] Belimov A A, Dodd I C, Safronova V I, Hontzas N, Davies W J. *Pseudomonas brassicacearum* strain Am3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(6): 1485-1495.
- [8] Jalili F, Khavazi K, Pazira E, Nejati A, Rahmani H A, Sadaghiani H R, Miransari M. Isolation and characterization of ACC deaminase-producing fluorescent pseudomonas, to alleviate salinity stress on canola (*Brassica napus* L.) growth. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166: 667-674.
- [9] 李倍金, 罗明, 周俊, 孔德江, 张铁明. 几种禾草内生固氮菌的分离及固氮活性测定. *草业学报*, 2008, 17(5): 37-42.
- Li B J, Luo M, Zhou J, Kong D J, Zhang T M. Isolation of endophytic

- diazotrophic bacteria from several gramineae grasses and determination of their nitrogenase activity. *Acta Prataculturae Sinica*, 2008, 17(5): 37-42. (in Chinese)
- [10] Tan Z Y, Peng G X, Xu P Z, Ai S Y, Tang S H, Zhang G X, Zeng F Y. Diversity and high nitrogenase activity of endophytic diazotrophs isolated from *Oryza rufipogon* Griff. *Chinese Science Bulletin*, 2009, 54: 2839-2848.
- [11] 孙建光, 张燕春, 徐 晶, 胡海燕. 高效固氮芽孢杆菌选育及其生物学特性研究. *中国农业科学*, 2009, 42(6): 2043-2051.  
Sun J G, Zhang Y C, Xu J, Hu H Y. Isolation and biological characteristic investigation on efficient nitrogen-fixing bacilli. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(6): 2043-2051. (in Chinese)
- [12] Penrose D M, Glick B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiological Plantarum*, 2003, 118: 10-15.
- [13] 孙建光, 徐 晶, 胡海燕, 张燕春, 刘 君, 王文博, 孙燕华. 中国十三省市土壤中非共生固氮微生物菌种资源研究. *植物营养与肥料学报*, 2009, 15(6): 1450-1465.  
Sun J G, Xu J, Hu H Y, Zhang Y C, Liu J, Wang W B, Sun Y H. Collection and investigation on symbiotic nitrogen-fixing microbial resources from 13 provinces over China. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2009, 15(6): 1450-1465. (in Chinese)
- [14] Honma M, Shimomura T. Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1978, 42(10): 1825-1831.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.  
Dong X Z, Cai M Y. *Manual of Systematic Determinative Bacteriology*. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)
- [16] 沈 萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1999.  
Shen P, Fan X R, Li G W. *Microbiology Experiment. 3rd ed.* Beijing: High Education Press, 1999. (in Chinese)
- [17] Ivanova E P, Christen R, Bizet C, Clermont D, Motreff L, Bouchier C, Zhukova N V, Crawford R J, Kiprianova E A. *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neourantiaca* subsp. nov., orange-pigmented bacteria isolated from soil and the rhizosphere of agricultural plants. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 2476-2481.
- [18] Achouak W, Sutra L, Heulin T, Meyer J M, Fromin N, Degraeve S, Christen R, Gardan L. *Pseudomonas brassicacearum* sp. nov. and *Pseudomonas thivervalensis* sp. nov., two root-associated bacteria isolated from *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 9-18.
- [19] Sikorski J, Stackebrandt E, Wackernagel W. *Pseudomonas kilonensis* sp. nov., a bacterium isolated from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51: 1549-1555.
- [20] Holt J G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1st ed.* Baltimore: Williams & Wilkins, 1984-1989.
- [21] 陈文新. 生物固氮//中国土壤学会. 氮素循环与农业和环境学术研讨会论文集, 厦门: 厦门大学出版社, 2001: 4-5.  
Chen W X. Biological nitrogen fixation//Soil Science Society of China. *Proceeding of Conference on Nitrogen Cycling and Agriculture Environment*, Xiamen: Xiamen University Press, 2001: 4-5. (in Chinese)
- [22] Munoz-Rojas J, Caballero-Mellado J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, 2003, 46: 454-464.
- [23] Iniguez A L, Dong Y, Triplett E W. Nitrogen fixation in wheat provided by *Klebsiella pneumoniae* 342. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(10): 1078-1085.
- [24] Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti A S. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2007, 34: 635-648.
- [25] Arshad M, Saleem M, Hussain S. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *TRENDS in Biotechnology*, 2007, 25(8): 356-362.
- [26] Grichko V P, Glick B R. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, 39: 11-17.
- [27] Shaharouna B, Arshad M, Zahir Z A, Khalid A. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer. *Soil Biology Biochemistry*, 2006, 38: 2971-2975.
- [28] Onofre-Lemus J, Hernandez-Lucas I, Girard L, Caballero-Mellado J. ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) deaminase activity, a widespread trait in *Burkholderia* species, and its growth-promoting effect on tomato plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(20): 6581-6590.

(责任编辑 岳 梅)