

ACC 脱氨酶菌株的分离筛选及对丹参毛状根的影响

尤红^{1a}, 普倩^{1a}, 文芳^{1a}, 饶君凤², 李欧^{1a,b}, 胡秀芳^{1a,b}

(1. 浙江理工大学, a. 生命科学学院; b. 浙江省植物次生代谢与调控重点实验室, 杭州 310018;

2. 杭州职业技术学院临江学院, 杭州 310018)

摘要:为研究 1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氨酶菌株对丹参次生代谢物合成的影响,使用筛选获得的 ACC 脱氨酶活性最强的丹参根际菌株对丹参毛状根进行诱导,并分析诱导前后毛状根生物量以及药用活性物质含量的差异。结果表明:获得了 ACC 脱氨酶活性最高的菌株为 DS3T3,其酶活力达到 0.3899 U/mg,经鉴定该菌株为假单胞菌属细菌(*Pseudomonas* sp.);丹参毛状根经该菌株诱导处理后,其干重与对照组相比增加 16.22%,主要酚酸物质总量增加 16.07%;对 DS3T3 进行进一步的测定结果表明,该菌株还具有固氮、产铁载体及产吲哚-3-乙酸和水杨酸等植物激素的能力。因此,该菌株可作为提高丹参产量以及品质的候选菌株。

关键词: ACC 脱氨酶;生物固氮;铁载体;植物激素;促生作用;丹参毛状根;丹酚酸;假单胞菌

中图分类号: Q939.96

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851 (2017) 05-0720-07

0 引言

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)是唇形科鼠尾草属多年生草本植物,它作为重要的药用植物,广泛用于心脑血管疾病的治疗^[1]。丹参药用有效成分主要分水溶性的丹酚酸类物质(丹参素、丹酚酸 B 和迷迭香酸等)和脂溶性的丹参酮类物质(丹参酮 I、丹参酮 IIA、二氢丹参酮和隐丹参酮等),均有着非常明确的药理活性^[2]。目前,医药化工等行业对丹参需求量增加,然而丹参的野生资源锐减,种植丹参量虽多,但其生长周期长,药用有效成分含量低,产地存在环境污染,这些因素严重影响种植丹参的品质和产量^[3]。因此,需要使用现代生物学技术来提高丹参的品质和产量。

近几年,丹参毛状根是研究丹参药效成分代谢调控用于提高丹参品质的重要体系^[4]。诱导是增加毛状根的生物量及次生代谢物含量常见的有效策略^[5]。丹参作为药用植物,其次生代谢物的合成通常在受到环境胁迫的情况下发生,特别是在植物防御病原微生物入侵时。因此,微生物通常作为诱导子用于促进植

物次生代谢。植物根际促生微生物为常见的微生物诱导子之一,它依附于植物根表,直接或间接地影响植物的生长和发育^[4]。1-氨基环丙烷-1-羧酸(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC)脱氨酶是许多植物根际促生细菌共有的特征性酶^[6]。Xu 等^[7]发现含有 ACC 脱氨酶活性的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)能够显著提高番茄幼苗生长。Shaharoona 等^[8]发现含有 ACC 脱氨酶活性的假单胞菌(*Pseudomonas*)属菌株在氮源丰富情况下能够促进玉米生长和产量。Holguin 等^[9]将含有 ACC 脱氨酶基因 *acdS* 的质粒转化巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*),结果提升该菌株的促生作用。因此,通过检测 ACC 脱氨酶来筛选植物促生长菌的方法被广泛使用^[10]。

目前,国内外关于具 ACC 脱氨酶活性菌株对丹参生物量以及丹酚酸含量积累影响的研究尚未见报道。本文以 ACC 为唯一氮源筛选丹参根际 ACC 脱氨酶菌株并测定 ACC 脱氨酶活性,以获得的酶活性最强菌株为材料,测定该菌对丹参毛状根生长和次生代谢的影响,并进一步测定该菌株的固氮、产

收稿日期: 2017-03-20 网络出版日期: 2017-08-07

基金项目: 浙江省公益农业项目(2015C32104);浙江省自然科学基金项目(LY15C010005);浙江理工大学启动基金项目(14042217-Y)

作者简介: 尤红(1990-),女,浙江嘉兴人,硕士研究生,主要从事药用植物次生代谢调控方面的研究。

通信作者: 胡秀芳, E-mail: huxiuf@zstu.edu.cn

铁载体和产植物激素能力。

1 材料与方法

1.1 材料

a) 丹参样品:野生丹参样品采集于丹参主要产地陕西省商洛市。

b) 培养基:富集培养基 PAF、筛选培养基 DF 和加富培养基 ADF 培养基配制参考文献[11]。

1.2 ACC脱氨酶菌株的分离筛选及酶活力测定

1.2.1 ACC脱氨酶菌株的分离和初步筛选

将野生丹参根部紧密结合的土壤刷下作为根际土壤样品,将同地区3个根际土壤样品等量混合后,

加入100 mL 无菌水,振荡,获得土壤悬浮液。将土壤悬浮液接入50 mL PAF 培养基中,28 ℃,220 r/min 振荡培养2 d;取1 mL PAF 培养液,接种于50 mL DF 培养基中培养1 d后,取1 mL DF 培养液接种于ADF 培养基中培养1 d。稀释ADF 培养液,并将其涂布于ADF 固体平板上,28 ℃培养至出现单菌落并纯化,保存于-80 ℃冰箱中。

1.2.2 ACC脱氨酶活力测定

将保藏菌株活化后,参照Bradford法测定细菌细胞提取液中总蛋白质含量^[12]。以牛血清白蛋白为标准物,制作标准曲线。参照Saleh等^[13]的方法测定ACC脱氨酶活力,比活力的计算公式为:

$$\text{酶比活力}/(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{\text{生成 } \alpha\text{-丁酮酸物质的量}/\mu\text{mol}}{\frac{\text{总蛋白质含量}/\text{mg}}{\text{测总蛋白质时所取量}/\mu\text{L}} \times \text{测酶活时所用量}/\mu\text{L} \times \text{反应时间}/\text{min}}.$$

测定结果为重复三次的平均值。

1.3 ACC脱氨酶菌株对丹参毛状根生物量以及次生代谢的影响

1.3.1 毛状根制样

毛状根由本实验室保存。无菌条件下,在50 mL 的6,7-V 培养基中加入0.2 g 生长旺盛的丹参毛状根,25 ℃,110 r/min 避光振荡培养18 d。

1.3.2 ACC脱氨酶菌株诱导子的制备及诱导

将保存在-80 ℃冰箱的菌株活化后,接入50 mL 营养肉汤培养基中;28 ℃,220 r/min 振荡培养3 d;4 ℃,12000 r/min,离心10 min,收集上清液。使用0.22 μm 无菌过滤器过滤除菌,滤液作为后续实验的诱导子,放入4 ℃冰箱备用。

在培养18 d后的毛状根中加入制备好的诱导子1.5 mL,对照组中加入相同体积的培养基,设3个重复,相同条件下继续培养6 d。

1.3.3 丹参毛状根生物量以及次生代谢物含量的测定

收集诱导后的毛状根,吸水纸吸干,45 ℃干燥至恒重,称量。用研钵磨碎烘干的毛状根,过0.45 mm 筛网,称取0.05 g,加入5 mL 70%的甲醇提取液,超声45 min(间或颠倒混合),8000 r/min 离心10 min,取上清过0.45 μm 滤膜备用。

丹酚酸类成分含量的测定采用高效液相法,所测定的物质为丹参素、咖啡酸、阿魏酸、迷迭香酸、丹酚酸B和肉桂酸。所使用的高效液相色谱仪为Waters 1525,检测器为Waters 2996,色谱柱为ZORBAX Extend-C18 柱(4.6 mm×250 mm,5 μm)。色谱条件为:流速1 mL/min,柱温30 ℃,上样体积20 μL,检

测波长为288 nm;以乙腈和0.026%磷酸水溶液为流动相,梯度洗脱,梯度设定参照张顺仓等的方法^[14]。

1.4 固氮、产铁载体和产植物激素能力测试

1.4.1 固氮能力测定

在无氮培养基中接入待测菌株,28 ℃,220 r/min,振荡培养一周,再转接到新的培养基中,重复5次,观察菌株的生长状况。

1.4.2 产铁载体能力测定

在CAS产铁载体能力检测平板上接入待测菌株,28 ℃,220 r/min,培养一周,观察培养基上是否有橙色晕圈出现。

1.4.3 产植物激素能力测定

菌株接入50 mL 的营养肉汤培养基中培养3 d后,稀释至OD₆₀₀为1.0;4 ℃,12000 r/min,离心5 min,取上清过0.22 μm 膜,供液相色谱串联质谱分析。液相色谱串联质谱测定植物生长素、脱落酸、茉莉酸、水杨酸、细胞分裂素和赤霉素在内的43种植物激素,具体种类和测定方法参照Cao等方法^[15]。测定结果为三次生物重复值。

1.5 形态特征测定和16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

1.5.1 形态观察以及生理生化测定

参照《常见细菌系统鉴定手册》中的方法^[16],对具有ACC脱氨酶的菌株进行形态以及生理生化测定。

1.5.2 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

以十六烷基三甲基溴化铵法提取细菌总DNA为模板,进行16S rRNA 基因PCR扩增;所用引物、反应体系,反应条件参见文献[17]。目的基因PCR

产物送往苏州金维智生物科技有限公司测序,测序结果采用 EzTaxon 和美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology information, NCBI)数据库进行同源性比对分析,并采用 Mega 5.0 软件建立系统发育树。

2 结果分析

2.1 ACC脱氨酶活性菌株的筛选以及酶活性检测

从 ACC 为唯一氮源的 ADF 培养基上分离到 25 株丹参根际微生物,ACC 脱氨酶活性测定结果表明,酶活力较高的菌株编号分别为 DS1G1、DS3G1 和 DS3T3。这 3 株菌株的酶活力见表 1,其中酶活力最高的为 DS3T3(0.3899 U/mg),最低的为 DS3G1(0.1424 U/mg)。

表 1 ACC 脱氨酶菌株的酶活力

菌株编号	来源	ACC 脱氨酶活力/(U · mg ⁻¹)
DS1G1	丹参根部	0.220±0.012
DS3G1	丹参根部	0.142±0.001
DS3T3	丹参根际土壤	0.390±0.005

2.2 菌株对丹参毛状根生物量以及丹酚酸类物质积累的影响

选取酶活力最高的菌株 DS3T3 用于分析其对丹参毛状根生物量以及丹酚酸类物质积累的影响,结果如表 2 所示。菌株 DS3T3 处理后,丹参毛状根的干重比对照组增加 16.22%;丹参素、丹酚酸 B 以及肉桂酸含量增加,增加量分别为 8.15%、27.94%和 62.77%,而咖啡酸和阿魏酸的含量降低;综合分析该菌株对六

种酚酸总含量的影响,结果显示含量增加 16.07%。

表 2 菌株 DS3T3 对丹参毛状根生物以及丹酚酸类物质积累的影响

物质	CK	DS3T3	变化率/%
干重/g	0.148±0.009	0.172±0.007	+16.22
丹参素/(mg · g ⁻¹)	1.043±0.074	1.128±0.131	+8.15
咖啡酸/(mg · g ⁻¹)	0.819±0.067	0.489±0.047	-40.29
阿魏酸/(mg · g ⁻¹)	1.390±0.214	0.994±0.128	-28.49
迷迭香酸/(mg · g ⁻¹)	40.409±2.139	39.472±4.190	-2.32
丹酚酸 B/(mg · g ⁻¹)	71.557±4.974	91.547±12.554	+27.94
肉桂酸/(mg · g ⁻¹)	0.231±0.024	0.376±0.074	+62.77
六种酚酸总量/(mg · g ⁻¹)	115.447±5.748	134.005±16.719	+16.07

2.3 菌株的固氮、产铁载体和产植物激素能力

为了研究菌株 DS3T3 对丹参毛状根的促生长以及促丹酚酸物质合成的机理,进一步测定菌株的固氮、产铁载体和植物激素能力。菌株 DS3T3 固氮能力检测结果如图 1 所示,菌株 DS3T3 能够在无氮培养基上生长,说明该菌具有固氮能力。DS3T3 产铁载体能力检测结果如图 2 所示,从图中可见,在 CAS 检测平板上,菌株 DS3T3 周围出现橙色晕圈,表明该菌株有产铁载体能力。菌株 DS3T3 产生的植物激素种类和含量如表 3 所示。由表 3 可知,菌株 DS3T3 发酵液含有多种不同的植物激素,主要为吲哚-3-乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)及其衍生物,IAA 的含量最高,为 559.182 ng/mL,其次为水杨酸、反式-玉米素-α-葡萄糖苷和反式-玉米素-7-葡萄糖苷,含量分别为 112.441、35.551 ng/mL 和 14.830 ng/mL。

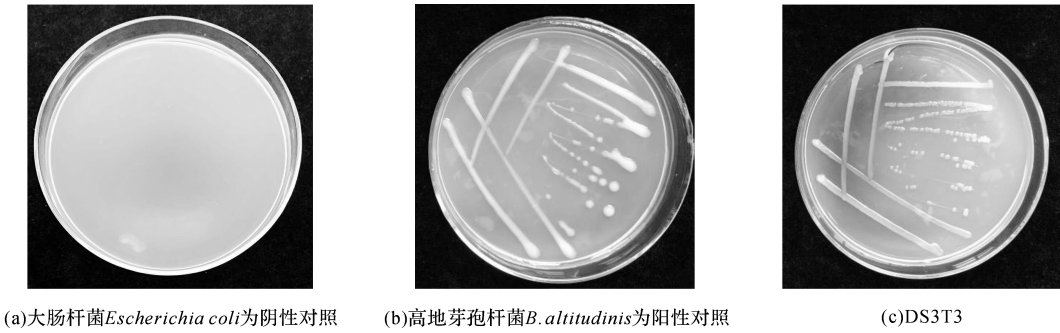


图 1 DS3T3 固氮能力分析

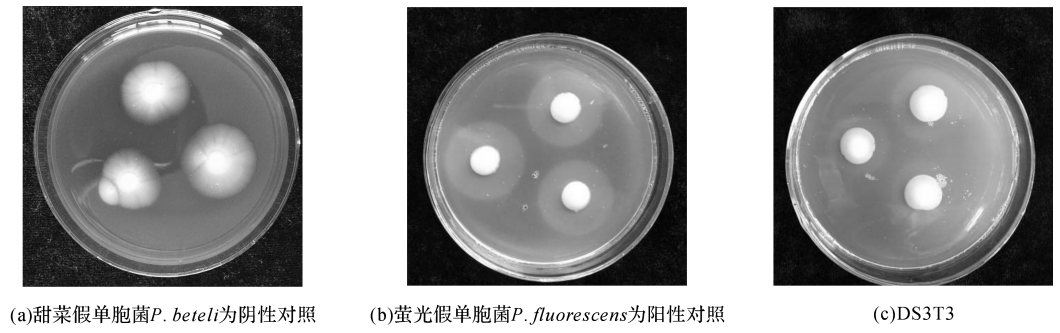


图 2 DS3T3 产铁载体能力分析

表 3 菌株 DS3T3 产生的植物激素种类和含量

植物激素	含量/(ng · mL ⁻¹)
吲哚-3-乙酸(IAA)	559.182±0.782
吲哚-3-乙酰基-L-丙氨酸(IAA-Ala)	1.269±0.009
吲哚-3-乙酰基-L-天冬氨酸(IAA-Asp)	10.915±0.021
吲哚-3-乙酰基-L-亮氨酸(IAA-Leu)	1.051±0.028
吲哚-3-乙酰基-L-苯丙氨酸(IAA-Phe)	0.133±0.024
N ⁶ -异戊烯基腺嘌呤(iP)	2.201±0.014
水杨酸(SA)	112.441±0.665
反式-玉米素-7-葡萄糖苷(Z7G)	14.830±0.008
反式-玉米素-α-葡萄糖苷(ZOG)	35.551±0.068

注:表中未列出的植物激素为菌株 DS3T3 中未检测出的。

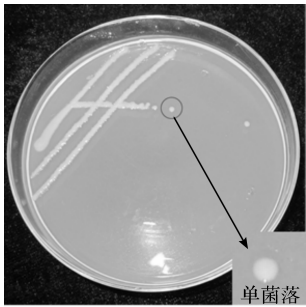


图 3 DS3T3 菌落形态

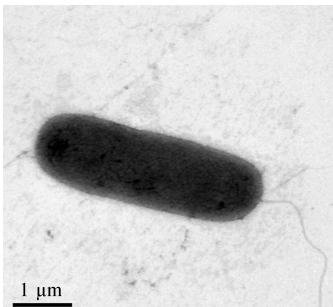


图 4 DS3T3 菌体形态

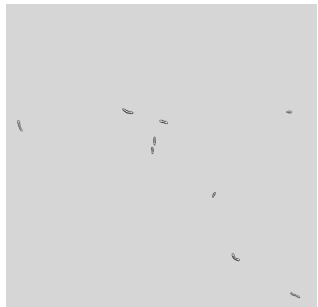


图 5 DS3T3 革兰氏染色结果

表 4 菌株 DS3T3 的生理生化特征

生理生化特征	结果	生理生化特征	结果
革兰染色	—	V. P 试验	+
运动能力	+	M. R 试验	—
产芽孢	—	纤维素水解	—
过氧化氢酶反应	+	柠檬酸盐利用	—
氧化酶反应	+	明胶液化	—
固氮作用	+	吐温 20	—
产铁载体	+	吐温 80	—
产 H ₂ S	—	酪蛋白水解	—
淀粉水解	—	硝酸盐还原	+

2.4 形态特征与菌株鉴定

2.4.1 形态及生理生化特征

菌株 DS3T3 在营养肉汤固体培养基上培养 3 d 后,形成浅黄色、表面湿润有光泽、圆形凸起且边缘整齐的菌落(图 3)。在显微镜下观察到其菌体为杆状,有鞭毛,无芽孢,革兰氏阴性(图 4 和图 5)。DS3T3 生理生化特征如表 4 所示,菌株 DS3T3 的生理生化特征与假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)相似,它能产生过氧化氢酶和氧化酶,不能产生淀粉酶、酪蛋白酶和纤维素酶,不能利用柠檬酸盐,不产生 H₂S 等。

2.4.2 16S rRNA 基因比对及菌株鉴定

16S rRNA 基因比对结果显示菌株 DS3T3 与杰氏假单胞菌的模式菌株 *P. jessenii* CIP 105274^T 序列相似性最高,为 99.93%。图 6 显示菌株 DS3T3 与其相似度最高的菌株之间的系统进化关系。系统进化树分析表明菌株 DS3T3 与 *P. jessenii* CIP 105274^T 在同一分支上。根据菌株的形态特征、生理生化特征、16 rRNA 基因比对结果以及系统发育树等等结果表明:菌株 DS3T3 属于假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。

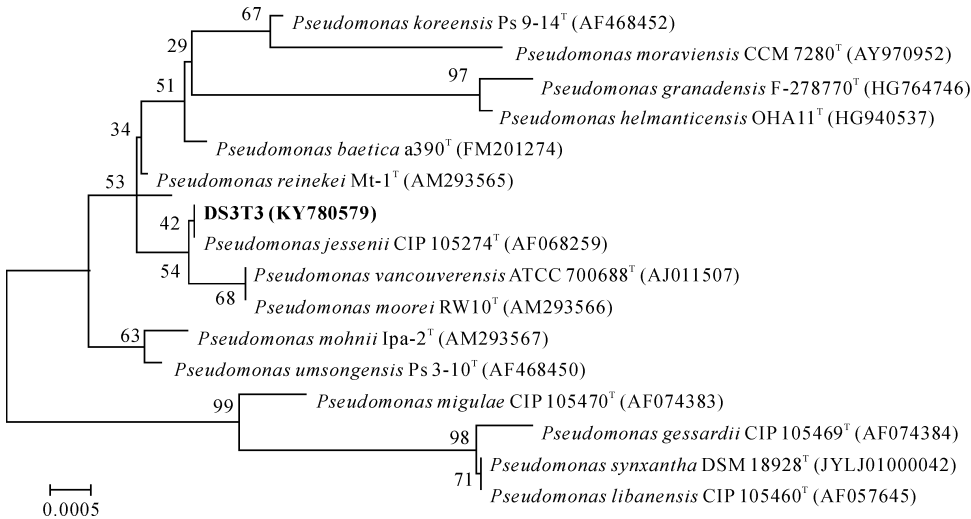


图 6 菌株 DS3T3 16S rRNA 基因序列系统发育树

注:系统发育树采用邻接法进行构建;分支上的数值表示经 1000 次计算后的 Bootstrap 值;括号内为 GenBank 登录号;比例尺表示菌株间的遗传距离。

3 讨 论

植物根际微生物是影响植物生长发育的主要菌株类型之一。目前,许多研究已经发现这类菌株中有许多具有 ACC 脱氨酶活性的菌株,而 ACC 脱氨酶是促生长菌株的特征酶,本文从丹参根际中筛选具有 ACC 脱氨酶活性并且能够促进丹参活性成分合成的菌株作为优良的微生物资源用于提高丹参的产量和品质。

据文献报道,当 ACC 脱氨酶活性高于 $20 \text{ nmol} \cdot \alpha \text{ KA} / (\text{mg} \cdot \text{h})$ 时,可促进植物生长^[18]。从丹参根际中分离 DS1G1、DS3G1 和 DS3T3 菌种的酶活力均高于这个值,而菌株 DS3T3 的 ACC 脱氨酶活性最高,达 0.3899 U/mg 。通过生理生化以及 16S rRNA 基因鉴定,得出 DS3T3 属于假单胞菌属,其酶活力明显高于之前报道的同菌属 *P. brassicacearum* Zy-2-1 (酶活力为 0.088 U/mg)^[19] 和恶臭假单胞菌 (*P. putida*) UW4 (0.056 U/mg)^[19] 以及荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) STAD384 (酶活力为 $0.143 \sim 0.208 \text{ U/mg}$)^[20]。通过进一步的实验,发现该菌株还具有固氮、产铁载体和高产植物激素等特征。生物固氮能力可以为植物提供丰富的氮源,产铁载体能力能够帮助植物更好的摄取环境中的铁源^[21],两种能力都能为植物提供生长所需的原料,促进植物生长。另外,有研究表明,微生物源的植物激素有着调控植物生长和发育的能力^[22],而 DS3T3 所产生的生长素、戊烯腺嘌呤和玉米素等植物激素已被证实有该能力。例如,绿针假单胞菌 (*P. chlororaphis*) 和温哥华假单胞菌 (*P. vancouverensis*) 分泌的 IAA 能够分别促进青椒和小麦的生长^[23-24];戊烯腺嘌呤和玉米素分别对覆盆子和越橘有一定的促生长作用^[25-26]。在本文中,丹参毛状根经菌株 DS3T3 诱导后,其干重与对照组相比增加 16.22% ,说明该菌株的促生长能力显著。因此,该菌株有着多种促生长特征,并且实际效果明显,在植物促生长方面具有一定的应用价值。

菌株 DS3T3 除具促生长作用外,对丹酚酸类物质合成也有显著的影响,但其影响因丹酚酸种类而异。综合分析,六种丹酚酸的总含量与对照组相比增加 16.07% 。其中,评估丹参品质的重要指标之一丹酚酸 B 的含量增加了 27.94% ,增加量非常显著。而迷迭香酸的含量有小幅降低,可能原因是该物质是丹酚酸 B 重要的前体物质^[27],其在 DS3T3 的作用下更高效率的转化为丹酚酸 B。目前,许多生物诱导子都能显著促进丹参酮类物质含量的积累,而生物诱导

子对丹酚酸类物质含量提高的研究尚未见报道,所以菌株 DS3T3 在其中的作用机制值得关注。目前研究表明,丹参毛状根在水杨酸作用下,其丹酚酸 B 和迷迭香酸的含量明显增加^[28-29]。而在该菌株的发酵液中测得丰富的植物激素,且水杨酸的含量较高,达到 112.441 ng/mL 。所以,推测水杨酸可能是其中起作用的主要物质之一,但需要进一步的实验验证。

4 结 论

本文获得的 ACC 脱氨酶活性最强的丹参根际菌株 DS3T3 (*Pseudomonas* sp.), 确定 DS3T3 酶活力达 0.3899 U/mg , 并且有多种其它促生长特征,包括固氮、产铁载体以及产植物激素的能力;该菌株显著促进丹参毛状根的生物量;DS3T3 还能够促进丹参毛状根中丹酚酸类物质的合成。故该菌株可作为提高丹参产量以及品质的候选菌株。

参考文献:

- [1] LIU L, YANG D, LIANG T, et al. Phosphate starvation promoted the accumulation of phenolic acids by inducing the key enzyme genes in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots[J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(9): 1933-1942.
- [2] 黄志成, 任加惠, 沈丽红, 等. 丹参毛状根和丹参药材 HPLO 指纹图谱的比较研究[J]. 浙江理工大学学报, 2016, 35(3): 444-449.
- [3] QIU D, SONG J. Danshen's in Vitro Culture [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2015: 69-87.
- [4] SZYMAŃSKA S, PŁOCINICZAK T, PIOTROWSKA-SEGET Z, et al. Metabolic potential and community structure of endophytic and rhizosphere bacteria associated with the roots of the halophyte *Aster tripolium* L [J]. Microbiological Research, 2016, 182(2): 68-79.
- [5] ZHOU L G, WU J Y. Development and application of medicinal plant tissue cultures for production of drugs and herbal medicinals in China [J]. Natural Product Reports, 2006, 23(5): 789-810.
- [6] 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.
- [7] XU M S, SHENG J P, CHEN L, et al. Bacterial community compositions of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds and plant growth promoting activity of ACC deaminase producing *Bacillus subtilis* (HYT-12-1) on tomato seedlings [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(3): 835-845.

- [8] SHAHAROONA B, ARSHAD M, ZAHIR Z A, et al. Performance of *Pseudomonas* spp. containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of nitrogenous fertilizer[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(9): 2971-2975.
- [9] HOLGUIN G, GLICK B. Expression of the ACC deaminase gene from *Enterobacter cloacae* UW4 in *Azospirillum brasilense*[J]. Microbial Ecology, 2001, 41(3): 281-288.
- [10] SHAHAROONA 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.)[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(2): 155-159.
- [11] CHEN X, LIU X, ZHANG X, et al. Phytoremediation effect of *Scirpus triquetus* inoculated plant-growth-promoting bacteria (PGPB) on different fractions of pyrene and Ni in co-contaminated soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 325: 319-326.
- [12] 黄盖, 高焱, 王琛, 等. ACC脱氨酶活性菌株 ACC 30 的分离、鉴定及其促生作用[J]. 微生物学通报, 2013, 40(5): 812-821.
- [13] SALEH S S, GLICK B R. 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.
- [14] 张顺仓, 刘岩, 沈双, 等. 诱导子对丹参毛状根酚酸类和丹参酮类成分积累的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(10): 1269-1274.
- [15] CAO Z Y, SUN L H, MOU R X, et al. Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography A, 2016, 1451: 67-74.
- [16] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [17] YU J, ZHOU X F, YANG S J, et al. Design and application of specific 16S rDNA-targeted primers for assessing endophytic diversity in *Dendrobium officinale* using nested PCR-DGGE[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(22): 9825-9836.
- [18] 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.
- [19] KONG Z, DENG Z, GLICK B R, et al. A nodule endophytic plant growth-promoting *Pseudomonas* and its effects on growth, nodulation and metal uptake in *Medicago lupulina* under copper stress[J]. Annals of Microbiology, 2016, 67(1): 1-10.
- [20] RASHID S, CHARLES T C, GLICK B R. Isolation and characterization of new plant growth-promoting bacterial endophytes[J]. Applied Soil Ecology, 2012, 61(5): 217-224.
- [21] KLOEPFER J W, LEONG J, TEINTZE M, et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Nature, 1980, 286(2): 885-886.
- [22] YANG S, ZHANG X, CAO Z, et al. Growth-promoting *Sphingomonas paucimobilis* ZJSH1 associated with *Dendrobium officinale* through phytohormone production and nitrogen fixation [J]. Microbial Biotechnology, 2014, 7(6): 611-620.
- [23] MISHRA P K, MISHRA S, SELVAKUMAR G, et al. Characterisation of a psychrotolerant plant growth promoting *Pseudomonas* sp. strain PGERs17 (MTCC 9000) isolated from North Western Indian Himalayas [J]. Annals of Microbiology, 2008, 58(4): 561-568.
- [24] LIU H, HE Y, JIANG H, et al. Characterization of a phenazine-producing strain *Pseudomonas chlororaphis* GP72 with broad-spectrum antifungal activity from green pepper rhizosphere [J]. Current Microbiology, 2007, 54(4): 302-306.
- [25] JAAKOLA L, TOLVANEN A, LAINE K, et al. Effect of N^6 -isopentenyladenine concentration on growth initiation in vitro and rooting of bilberry and lingonberry microshoots [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001, 66(1): 73-77.
- [26] REED B M, ABDELNOUR-ESQUIVEL A. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars [J]. HortScience, 1991, 26(10): 1320-1322.
- [27] DONG J E, WAN G W, LIANG Z S. Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture [J]. Journal of Biotechnology, 2010, 148(2): 99-104.
- [28] HAO W F, GUO H B, ZHANG J Y, et al. Hydrogen peroxide is involved in salicylic acid-elicited rosmarinic acid production in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures [J]. The Scientific World Journal, 2014, 2014: 843764. doi: 10.1155/2014/843764.
- [29] GUO H, ZHU N, DEYHOLOS M K, et al. Calcium mobilization in salicylic acid-induced *Salvia miltiorrhiza* cell cultures and its effect on the accumulation of rosmarinic acid [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(5): 2689-2702.

Isolation and Screening of Bacteria Strain with ACC Deaminase Activity and Its Effect on Hairy Root of *Salvia Miltiorrhiza*

YOU Hong^{1a}, PU Qian^{1a}, WEN Fang^{1a}, RAO Junfeng², LI Ou¹, HU Xiufang¹

(1a. College of Life Science; 1b. Zhejiang Province Key Laboratory of Plant

Secondary Metabolism and Regulation, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. Linjiang School, Hangzhou Vocational and Technical College, Hangzhou 310018, China)

Abstract: To study the effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) deaminase from bacteria strain on synthesis of secondary metabolite of *Salvia miltiorrhiza*, rhizosphere bacteria strain of the highest activity of ACC deaminase obtained via screening was used to induce hairy roots of *S. miltiorrhiza*, and analysis was made on the difference of hairy root biomass and medicinal active substance content before and after induction. The results indicate that the bacteria strain with highest ACC deaminase activity is DS3T3 (of deaminase activity up to 0.3899 U/mg), which turns out to be *Pseudomonas* sp. through identification. Through treatment with the bacteria strain (DS3T3), the dry weight of hairy root of *S. miltiorrhiza* has increased by 16.22% comparing with the control group, and the total phenolic acids by 16.07%. Further measurement of DS3T3 shows that the bacteria strain also has the abilities of nitrogen fixation, iron production and the production of phytohormones such as indole-3-acetic acid, and salicylic acid. Therefore, the bacteria strain (DS3T3) can be used to improve the yield and quality of *S. miltiorrhiza*.

Key words: ACC deaminase; biological nitrogen fixation; siderophore; phytohormone; growth-promoting effect; *Salvia miltiorrhiza* hairy root; salvianolic acid; *Pseudomonas*

(责任编辑:唐志荣)