

李华山, 雷 鹏, 许宗奇, 等. 耐盐促生菌 *Agrobacterium* sp. DF-2 增强黄瓜幼苗耐盐性的研究[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 654-661.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.03.025

## 耐盐促生菌 *Agrobacterium* sp. DF-2 增强黄瓜幼苗耐盐性的研究

李华山<sup>1</sup>, 雷 鹏<sup>1</sup>, 许宗奇<sup>1</sup>, 冯小海<sup>1</sup>, 徐 虹<sup>1</sup>, 马洪波<sup>2</sup>

(1. 南京工业大学食品与轻工学院, 江苏 南京 211816; 2. 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 本研究从盐碱区域植物根际土壤中筛选到 1 株具有较高 ACC 脱氨酶活性[405.17 nmol/(g·h)] 的耐盐促生菌 *Agrobacterium* sp. DF-2。除 ACC 脱氨酶活性外, 菌株还具有降解不溶磷活性, 产生植物生长激素 IAA, 产胞外多糖等特性。此外, 菌株可耐受最高 8% NaCl 浓度胁迫, 证明其可应用到盐碱土壤中。通过盆栽试验研究了在 75 mmol/L NaCl 盐胁迫下接种 DF-2 对黄瓜幼苗的生长的影响以及作用机理。结果表明, 与盐胁迫处理相比, 接种 DF-2 处理幼苗株高、根长、生物量积累以及叶绿素含量分别显著增加 15.08%、34.35%、13.10% 和 22.58%。同时, DF-2 也增强宿主植物对 K<sup>+</sup> 的吸收, 提高抗氧化酶活性和脯氨酸含量; 降低对 Na<sup>+</sup> 的吸收和丙二醛含量。菌株 DF-2 主要通过高效的 ACC 脱氨酶活性, 调控 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 值, 增强细胞清除活性氧能力和渗透调节能力等途径增强黄瓜幼苗的耐盐性。因此, 耐盐促生菌 *Agrobacterium* sp. DF-2 具有作为生物肥料用于盐渍土的潜力。

**关键词:** 耐盐促生菌; 耐盐性; ACC 脱氨酶; K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 值; 抗氧化酶; 脯氨酸积累

**中图分类号:** S642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)03-0654-08

## Halotolerance in cucumber seedlings enhanced by plant growth-promoting rhizobacterium *Agrobacterium* sp. DF-2

LI Hua-shan<sup>1</sup>, LEI Peng<sup>1</sup>, XU Zong-qi<sup>1</sup>, FENG Xiao-hai<sup>1</sup>, XU Hong<sup>1</sup>, MA Hong-bo<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Light Industry, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China; 2. Institute of Agricultural Resource and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** An *Agrobacterium* sp. DF-2 with high 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase activity was isolated from the rhizosphere of saline soil. Apart from producing ACC deaminase, the strain exhibited the plant growth-promoting traits of phosphorus-solubilizing activity and yielded IAA and exopolysaccharide. It could tolerate up to 8% NaCl concentration (*w/v*) stress, indicating its potential for applications to saline soil. The effects of DF-2 inoculation on the growth and physiological responses of cucumber seedlings under salt stress and the mechanism were investigated by pot experiment.

收稿日期: 2017-01-12

**基金项目:** “十二五”国家科技支撑计划重点项目(2015BAD15B04); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)项目(2015AA020951); 国家自然科学基金青年基金项目(21506098); 江苏省高校自然科学基金面上项目(15KJB530007)

**作者简介:** 李华山(1990-), 男, 河南汤阴人, 硕士研究生, 主要从事耐盐促生菌的筛选及微生物菌剂开发等研究。(E-mail) huashan@njtech.edu.cn

**通讯作者:** 冯小海, (E-mail) fengxiaohai@njtech.edu.cn; 许宗奇, (E-mail) zqxu@njtech.edu.cn

Compared to control plants under salt stress, inoculation with DF-2 significantly increased shoot, root and plant biomass and chlorophyll content by 15.08%, 34.35%, 13.10% and 22.58%, respectively. Moreover, DF-2 boosted the uptake of K<sup>+</sup>, antioxidant enzyme activity and proline content, and reduced the uptake of Na<sup>+</sup> and malondialdehyde content in the host plant. In conclusion, DF-2 enhanced cucumber seedlings salt tolerance through superior ACC deaminase activity, regulation of K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratio, enhancement of ROS scavenging capacity and an os-

motric adjustment ability of cucumber cells. The halotolerant *Agrobacterium* sp. DF-2 offers great potential for the use as a biological fertilizer in saline soil agriculture to advance sustainable development.

**Key words:** *Agrobacterium* sp.; salt tolerance; ACC deaminase;  $K^+/Na^+$  ratio; antioxidant enzyme activity; proline accumulation

全球范围内 70% 的作物减产是由非生物胁迫造成的。其中,盐胁迫是非生物胁迫中影响最为广泛的<sup>[1]</sup>。全球超过 6% 的土地受到盐胁迫的影响,尤其是在干旱和半干旱区域<sup>[2]</sup>。更糟的是,全球 20% 的耕地正在遭受盐胁迫的威胁,而这种威胁还在持续增加<sup>[3]</sup>。

植物幼苗受到盐胁迫后,会出现植株矮小,叶色发黄及生长速率下降的现象。这可能是盐胁迫抑制了细胞的正常伸长和分裂。盐胁迫不仅对植物生长方面产生影响还引起生理方面的变化。植物在遭遇盐胁迫时,体内活性氧(ROS, Reactive oxygen species)大量的累积,导致体内脂质过氧化,造成氧化胁迫<sup>[4-5]</sup>;同时也会导致植物细胞生理性缺水,造成渗透胁迫<sup>[6]</sup>。此外,盐胁迫下  $Na^+$  取代  $K^+$  被大量转运进入细胞内,并对细胞产生毒害作用,造成  $K^+-Na^+$  离子失衡<sup>[7-10]</sup>。因此,提高作物的耐盐性在农业发展进程中具有不言而喻的意义和迫切性。

利用植物根际促生菌(PGPR, Plant growth-promoting rhizobacteria)缓解胁迫对植物生长的危害,促进作物的生长是近年来国内和国外学者研究的新动向。通常,PGPR 通过一个或多个机制诱导宿主植物产生系统抗逆性,改善植物生长。例如 PGPR 可以固定大气中的氮元素<sup>[11]</sup>;产生嗜铁素,与有害菌争夺土壤中的铁元素,抑制有害菌的生长<sup>[12]</sup>;合成分泌植物激素<sup>[13-14]</sup>;溶解矿物质不溶磷<sup>[15]</sup>;分泌胞外多糖<sup>[16]</sup>以及合成可调节植物生长和发育的酶<sup>[1,17]</sup>。其中利用具有 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate)脱氨酶活性的 PGPR 诱导植物产生胁迫抗逆性是最常见的机制之一。胁迫环境条件导致植物体内应激乙烯浓度迅速增加,从而抑制植物生长发育。而 PGPR 产生的 ACC 脱氨酶可降解合成植物乙烯的前体物质 ACC 生成氨和  $\alpha$ -丁酮酸,从而降低植物体内的应激乙烯浓度,增加植物胁迫耐受性<sup>[18]</sup>。由于 PGPR 改善植物生长具有低成本,环境友好等特点,农业科研工作者一直致力于筛选高效 PGPR 用于可持续农业生产。

本研究目的是从盐碱区域植物根际土壤中分离具有 ACC 脱氨酶活性的耐盐 PGPR 菌株,通过人工模拟盐胁迫评估菌株对黄瓜(*Cucumis sativus* L.)幼苗生长发育和相关生理指标的影响。探讨 PGPR 菌株促进黄瓜幼苗生长和提高黄瓜耐盐性的机制。以期获得高效耐盐植物促生菌,作为生物肥料用于盐碱农业可持续发展进程中。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

土壤样品采集于山东青岛盐碱区域小麦植物根际。津优 1 号作为供试黄瓜品种。

耐盐培养基:蛋白胨 10 g,牛肉膏 10 g,氯化钠 65 g, pH 7.4。

DF-ACC 培养基:  $KH_2PO_4$  4.0 g,  $Na_2HPO_4$  6.0 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g, 葡萄糖 2.0 g, 葡萄糖酸 2.0 g, 柠檬酸 2.0 g,  $H_3BO_3$  10.00  $\mu g$ ,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  11.19  $\mu g$ ,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  124.60  $\mu g$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  78.22  $\mu g$ ,  $MoO_3$  10.00  $\mu g$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  1.00 mg, ACC 303.00 mg(0.22  $\mu m$  水相膜过滤除菌), pH 7.2。以上培养基 121  $^{\circ}C$ 、15 min 灭菌,备用。

### 1.2 筛选具有 ACC 脱氨酶活性的耐盐菌

取 2 g 土样在 100 ml 耐盐培养基<sup>[19]</sup>中富集培养,培养条件为 150 r/min, 30  $^{\circ}C$ , 培养 48 h。然后取 2 ml 培养液转接到 100 ml 含有 3.0 mmol/L ACC 的 DF-ACC 无机盐培养基<sup>[17]</sup>中相同条件下培养,取 2 ml 培养液转入含相同组分的新鲜培养基再次培养。最后经一系列稀释的培养液涂布到含有 3.0 mmol/L ACC 的 DF-ACC 固体培养基中, 30  $^{\circ}C$  培养 48 h。从中挑取不同形态的菌株单菌落。将所得菌株在 DF-ACC 固体培养基中反复培养 3 次,以证明菌株具有利用 ACC 作为唯一氮源的能力。以甘油管冷藏法将菌株保存于 -70  $^{\circ}C$  冰箱,备用。

### 1.3 ACC 脱氨酶活性测定

菌株 ACC 脱氨酶活性的测定按照 Penrose 等<sup>[18]</sup>提出的方法进行。方法原理为使用 ACC 为唯一氮源的无机盐培养基进行菌株 ACC 脱氨酶诱导

试验。菌株产生的 ACC 脱氨酶可降解 ACC 形成  $\alpha$ -丁酮酸和氨。通过测定一定时间内 ACC 脱氨作用生成  $\alpha$ -丁酮酸的含量,计算 ACC 脱氨酶活性。

#### 1.4 菌株鉴定

依据菌株形态学、生理生化特性和 16S rRNA 序列鉴定菌株种属。使用细菌基因组提取试剂盒 (TaKaRa, 中国) 提取细菌基因组 DNA。通用引物 27F-1492R 对 16S rRNA 基因片段进行 PCR 扩增。PCR 产物纯化后,送至南京金斯瑞测序公司进行测序,测序结果提交到 NCBI 基因库进行序列比对分析,邻接法构建系统发育树,鉴定菌株种属。

#### 1.5 菌株其他促生特性的测定

依据钼锑抗比色法定量测定菌株培养 7 d 的解磷能力<sup>[20]</sup>。菌株产生 IAA 定量测定参考 Gordon<sup>[21]</sup>报道的方法。菌株产生赤霉素定量测定参考 Holbrook 报道的方法<sup>[22]</sup>。使用 Machuca 等<sup>[23]</sup>的方法定性测定菌株产生嗜铁素能力。使用张青等<sup>[24]</sup>的方法定性测定菌株产生多糖能力。

#### 1.6 生物接种处理和促生试验设计

菌株经 LB 培养基培养,取 30 ml 培养液,10 000 r/min 离心 15 min,弃去上清液,无菌水悬浮菌体,再离心,弃去上清液,无菌水调整菌悬液到一定浓度 ( $OD_{600} = 0.15$ ) 备用。挑选颗粒饱满的黄瓜种子进行消毒灭菌<sup>[25]</sup>,然后浸泡在上述菌悬液中,100 r/min 振荡 45 min,在无菌条件下干燥。

平皿促生试验:将已接种的黄瓜种子放入培养皿中(皿底放 2 层湿润的无菌滤纸),每皿 20 粒种子,每组 3 次重复。未接种的种子作为对照。所有平皿在温室培养 5 d。试验结束后,统计发芽率和根长。选取促生效果最佳的菌株进行后续试验。

盆栽试验:土壤基质由沙土与营养土等比例混合。将 5 粒已接种处理的黄瓜种子播种到装有 1 kg 土壤的塑料花盆中。播种未接种的种子作为对照。播种后,每隔 1 d 浇灌 200 ml Hoagland 培养液<sup>[26]</sup>为植物提供营养及水分。播种 5 d 后向花盆中浇灌含 75 mmol/L NaCl 的 Hoagland 培养液模拟盐胁迫条件。将盆栽随机分为 4 个处理:无盐胁迫条件下,不接种耐盐 PGPR 菌株处理,为空白对照组(CK);无盐胁迫条件下,接种耐盐 PGPR 菌株处理,为 DF-2 处理组(DF-2);75 mmol/L NaCl 盐胁迫处理,为 NaCl 处理组(NaCl);75 mmol/L NaCl 盐胁迫条件下,接种耐盐 PGPR 菌株处理,为 NaCl+DF-2 处理组(NaCl+DF-

2)。所有的盆栽完全随机放置,每个处理重复 3 次。培养条件室温 25 °C,光照周期 12 h : 12 h,环境相对湿度 60%~70%。在施加盐胁迫后 3 d、6 d、9 d、12 d、15 d 对黄瓜幼苗进行取样,测定相关生理指标。15 d 后测定幼苗的株高、根长、鲜质量以及叶绿素含量<sup>[27]</sup>。

#### 1.7 黄瓜幼苗相关生理生化指标测定

黄瓜组织中  $Na^+$ 、 $K^+$  含量测定参考 Singh 等<sup>[17]</sup>的方法;丙二醛(MDA)含量测定采用赵世杰等<sup>[28]</sup>的方法;脯氨酸的测定参照朱广廉等<sup>[29]</sup>的方法;抗氧化酶系统中的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性测定参考尹干等<sup>[30]</sup>的方法。

#### 1.8 统计分析

所有试验重复 3 次。试验结果以平均值 $\pm$ 标准差(SD)来表示。使用 SPSS 17.0 软件对数据运用邓肯多重比较分析方法进行差异性分析( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 具有 ACC 脱氨酶活性的耐盐菌的分离和鉴定

从土样中共筛选出 147 株耐盐菌株,约 36% 的菌株可在含有 ACC 为唯一氮源的 DF-ACC 培养基中生长。从中选取 6 株具有较高 ACC 脱氨酶活性的菌株,考察接种菌株对黄瓜种子萌发的影响。结果(表 1)显示这些菌株对黄瓜种子萌发几乎没有影响,而对根部伸长有不同程度的促进效果。其中菌株 DF-2 促进效果最佳,根长比对照组高 69.03%。同时 DF-2 具有的 ACC 脱氨酶活性在所选菌株中最高,达到 405.17 nmol/(g·h)。因此将 DF-2 作为后续试验的研究对象。

表 1 具有 ACC 脱氨酶活性菌株对黄瓜种子萌发的影响

Table 1 Effect of strains with ACC deaminase activity on cucumber seed germination

菌株	ACC 脱氨酶活性 [nmol/(mg·h)]	根长 (cm)
CK	—	2.26 $\pm$ 0.17d
DF-1	124.49 $\pm$ 4.35c	3.30 $\pm$ 0.21bc
DF-2	405.17 $\pm$ 16.83a	3.82 $\pm$ 0.15a
DF-3	112.38 $\pm$ 10.31c	3.14 $\pm$ 0.32bc
DF-4	82.31 $\pm$ 7.78d	2.77 $\pm$ 0.41cd
DF-5	310.64 $\pm$ 14.26b	3.43 $\pm$ 0.13b
DF-6	25.29 $\pm$ 3.91e	2.45 $\pm$ 0.56d

同一列数据后不同小写字母表示不同处理间在 0.05 水平差异显著。

DF-2 的菌落形态为圆形凸起,白色,表面光滑湿润,边缘整齐,菌体周围分泌有偏透明的粘性胞外产物,经鉴定该菌体为革兰氏阴性杆菌。同时,DF-2 能在含 8% NaCl 的培养基中生长,具有较高的耐盐性。基于 16S rRNA 基因序列片段(1 351 bp)同

源性分析,菌株 DF-2( GenBank 登陆号: KY463445) 与模式菌株 *Agrobacterium tumefaciens* IAM 12048<sup>T</sup> (AB247615) 聚合成一簇(图 1),结合伯杰氏细菌手册初步确定 DF-2 为 *Agrobacterium*。菌株重新命名为 *Agrobacterium* sp. DF-2。

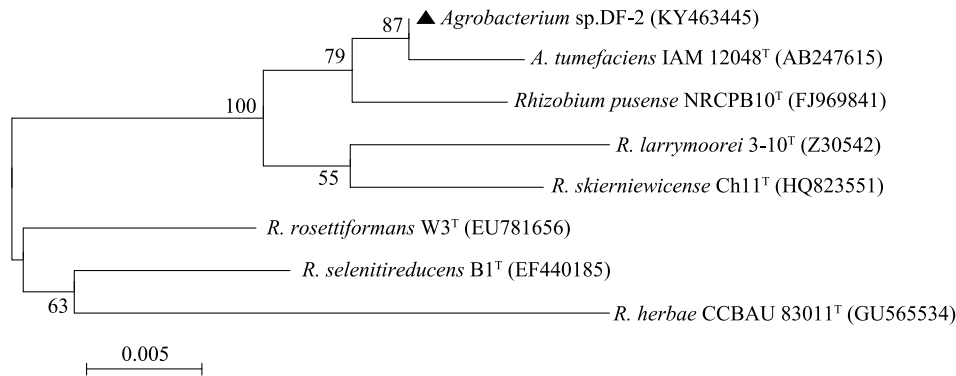


图 1 基于菌株 DF-2 和相关种群 16S rRNA 序列比较的 Neighbour-joining 系统发育树

Fig.1 Neighbour-joining phylogenetic dendrogram based on 16S rRNA sequences showing relationships between strain DF-2 and related taxa

## 2.2 DF-2 的其他促生特性

除具有 ACC 脱氨酶活性外,DF-2 还具有其他促生特性(表 2)。定量测定 DF-2 解磷能力发现,培养 7 d 后培养基中可溶性磷含量高达 321.29 mg/L。DF-2 也被证明在存在前体物 L-色氨酸时可以产生植物生长激素 IAA 15.39 mg/L,而不产生赤霉素。另外,CAS 琼脂平板中 DF-2 菌落周围未形成橙黄色光晕圈,说明 DF-2 不能分泌嗜铁素。菌株 DF-2 可产生具有粘性的胞外物质,苯酚硫酸法测定发现,该物质与苯酚和硫酸作用可产生显色反应,证明 DF-2 产生的胞外物质为多糖。

表 2 *Agrobacterium* sp. DF-2 植物促生特性

Table 2 Plant-growth-promoting traits of strain *Agrobacterium* sp. DF-2

促生特性	活性
ACC 脱氨酶活性 [nmol/(mg·h)]	405.17±6.83
解磷能力 (mg/L)	321.29±23.64
产 IAA (mg/L)	15.39±2.57
产生多糖	+
分泌赤霉素	-
分泌嗜铁素	-

“+”表示有产生多糖的特性;“-”表示没有分泌赤霉素和嗜铁素。

## 2.3 盐胁迫下接种 DF-2 对黄瓜幼苗生长的影响

基于 DF-2 可促进黄瓜根部伸长的特性,考察了盐胁迫下接种 DF-2 对黄瓜幼苗生长的影响。结果(表 3)显示,在无盐胁迫时,接种 DF-2(DF-2 组)对黄瓜幼苗的生长均有不同程度的促进效果。DF-2 组黄瓜幼苗株高、根长、鲜质量、叶绿素含量较 CK 组分别增加了 13.50%、19.88%、10.58%、16.79%。盐胁迫条件下(NaCl 组),黄瓜幼苗生长受到严重抑制。尤其是根长,比 CK 组降低了 33.39%。同样叶绿素含量也显著地降低 19.03%。与 CK 组相比,盐胁迫下接种 DF-2 处理(NaCl+DF-2 组)的黄瓜株高、根长、鲜质量和叶绿素含量分别降低了 2.85%、10.51%、8.65%和 0.74%。然而,经 NaCl+DF-2 组处理的黄瓜幼苗,株高、根长、鲜质量和叶绿素含量较 NaCl 组分别提高 15.08%、34.35%、13.10%和 22.58%。

## 2.4 黄瓜幼苗组织内 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>含量变化

表 4 显示,与 CK 组相比,DF-2 组黄瓜幼苗地上部分和地下部分中 Na<sup>+</sup> 含量分别降低 10.79%、20.43%,K<sup>+</sup> 含量分别升高 10.92%、4.94%,K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 值分别升高 24.34%、31.88%。相反地,与 CK 组相比,NaCl 组黄瓜幼苗地上部分和地下部分的 Na<sup>+</sup> 含



量分别显著增加 4.32 倍、4.62 倍,  $K^+$  含量分别显著降低 27.69%、32.93%,  $K^+/Na^+$  值显著下降, 分别为 83.27%、85.49%。与 CK 组相比, NaCl+DF-2 组黄瓜幼苗地上部分和地下部分  $K^+/Na^+$  值同样显著下降, 分别下降 68.32%、76.39%。然而, NaCl+DF-2

组无论地上部分还是地下部分的  $Na^+$  含量均显著低于 NaCl 组,  $K^+$  和  $K^+/Na^+$  值均显著高于 NaCl 组。说明, 在盐胁迫条件下, 黄瓜幼苗组织内的  $K^+/Na^+$  比会大幅下降, 接种 DF-2 可以有效地缓解  $K^+/Na^+$  值的下降。

表 3 不同处理下 *Agrobacterium* sp. DF-2 对黄瓜生长的影响

Table 3 Effects of the *Agrobacterium* sp. DF-2 on different growth parameters of cucumber seedlings subjected to different treatments

处理	株高 (cm)	根长 (cm)	鲜质量 (g)	叶绿素含量 (mg/g, FW)
CK	9.11±0.14b	11.32±0.24b	1.04±0.04b	2.68±0.32ab
DF-2	10.34±0.35a	13.57±0.49a	1.15±0.06a	3.13±0.31a
NaCl	7.69±0.51c	7.54±0.65d	0.84±0.08c	2.17±0.36c
NaCl+DF-2	8.85±0.28b	10.13±0.87c	0.95±0.09bc	2.66±0.11b

CK: 空白对照; DF-2: 无盐胁迫条件下, 接种 DF-2 处理; NaCl: 75 mmol/L NaCl 盐胁迫处理; NaCl+DF-2: 75 mmol/L NaCl 盐胁迫条件下接种 DF-2 处理。同一列数据后不同小写字母表示不同处理间在 0.05 水平差异显著。

表 4 不同处理下 *Agrobacterium* sp. DF-2 对黄瓜幼苗组织中  $Na^+$ 、 $K^+$  含量的影响

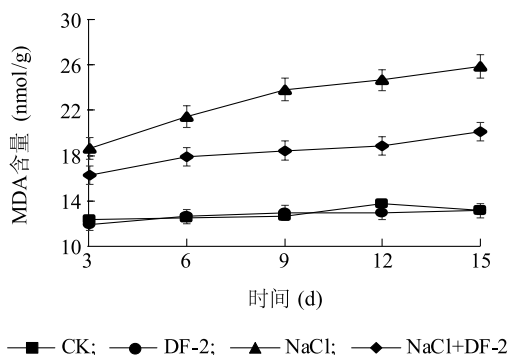
Table 4 Effects of the *Agrobacterium* sp. DF-2 on  $Na^+$  and  $K^+$  contents of cucumber seedlings subjected to different treatments

处理	地上部分(茎+叶)			地下部分(根)		
	$Na^+$ (mg/g)	$K^+$ (mg/g)	$K^+/Na^+$	$Na^+$ (mg/g)	$K^+$ (mg/g)	$K^+/Na^+$
CK	1.76±0.12c	33.62±1.56ab	19.10	2.35±0.52c	43.51±2.26a	18.51
DF-2	1.57±0.23c	37.29±3.14a	23.75	1.87±0.24c	45.66±2.71a	24.41
NaCl	7.61±0.42a	24.31±1.30c	3.19	10.86±0.44a	29.18±2.64c	2.69
NaCl+DF-2	5.42±0.82b	32.77±2.75b	6.05	8.33±0.69b	36.44±3.11b	4.37

CK、DF-2 处理、NaCl 处理、NaCl+DF-2 处理见表 3 注; 同一列数据后不同小写字母表示不同处理间在 0.05 水平差异显著。

## 2.5 黄瓜组织中 MDA 含量的变化

图 2 显示, DF-2 组的 MDA 含量与 CK 组没有显著的差异。与 CK 组相比, NaCl 组和 NaCl+DF-2 组的 MDA 含量均显著提高, 不同的是在取样时间内 NaCl+DF-2 组的 MDA 含量始终显著低于 NaCl 组。



CK、DF-2 处理、NaCl 处理、NaCl+DF-2 处理见表 3 注。

图 2 不同处理下 *Agrobacterium* sp. DF-2 对黄瓜幼苗中 MDA 含量的影响

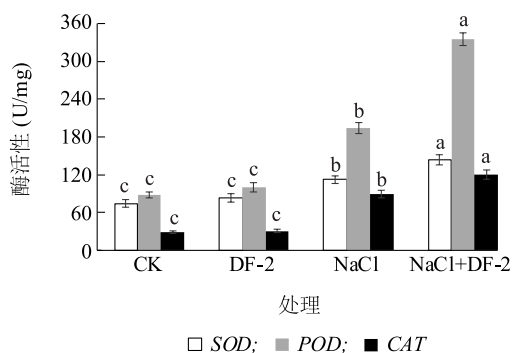
Fig.2 Effects of the *Agrobacterium* sp. DF-2 on MDA content in cucumber seedlings subjected to different treatments

## 2.6 黄瓜幼苗胞内抗氧化酶活性变化

如图 3 所示, 黄瓜幼苗胞内 *SOD*、*POD*、*CAT* 活性具有相似的变化趋势。无胁迫条件下, DF-2 组的 *SOD*、*POD*、*CAT* 的酶活性与 CK 组相比, 3 种酶活性均高于 CK 组, 分别高出 11.55%、13.67%、6.05%, 但差异均不显著。在盐胁迫条件下, NaCl 组与 NaCl+DF-2 组 *SOD*、*POD*、*CAT* 的酶活性均比 CK 组显著提高。值得一提的是, NaCl+DF-2 组的 *POD*、*SOD*、*CAT* 的酶活水平显著高于 NaCl 组, 分别高出 27.79%、72.44%、34.66%。

## 2.7 黄瓜幼苗体内脯氨酸含量的变化

黄瓜幼苗体内脯氨酸含量的变化如图 4 所示, 在无胁迫条件下, CK 组的脯氨酸含量保持在相对稳定水平。与 CK 组相比, 在取样时间内, DF-2 组的脯氨酸含量呈上升趋势。在 15 d 时, DF-2 组脯氨酸含量达到 68.85  $\mu\text{g/g}$ , 比 CK 组高出 27.86%。这说明无胁迫条件下, 接种 DF-2 可以诱导脯氨酸的合成。在盐胁迫条件下, NaCl 组与 NaCl+DF-2 组的脯氨酸含量均显著高于 CK 组并且呈上升趋势, 不同的是, 在

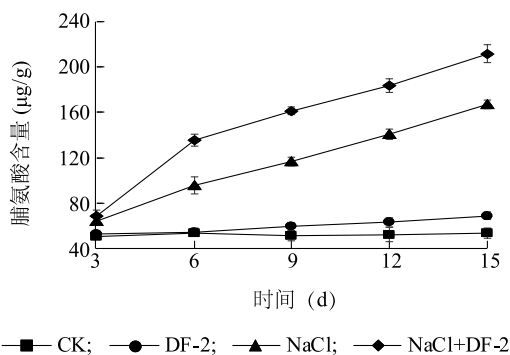


CK、DF-2 处理、NaCl 处理、NaCl+DF-2 处理见表 3 注;不同小写字母表示不同处理间在 0.05 水平差异显著。

图 3 不同处理下 *Agrobacterium* sp. DF-2 对黄瓜幼苗 SOD、POD、CAT 酶活性的影响

Fig.3 Effects of the *Agrobacterium* sp. DF-2 on SOD, POD and CAT enzymes activities in cucumber seedlings subjected to different treatments

取样时间内,NaCl+DF-2 组的脯氨酸含量始终显著高于 NaCl 组,在 15 d 时,NaCl+DF-2 组的脯氨酸含量达到 211.87  $\mu\text{g/g}$ ,比 NaCl 组高出 26.75%。



CK、DF-2 处理、NaCl 处理、NaCl+DF-2 处理见表 3 注。

图 4 不同处理下 *Agrobacterium* sp. DF-2 对黄瓜幼苗脯氨酸含量的影响

Fig.4 Effect of *Agrobacterium* sp. DF-2 on proline content in cucumber seedlings subjected to different treatments

### 3 讨论

土壤盐渍化引起的盐胁迫是农业生产中最常见的非生物胁迫,严重影响到农业生产,尤其是抑制植物生长和作物产能<sup>[2,31]</sup>。在胁迫条件下促进植物生长的很多 PGPR 大都具有 ACC 脱氨酶活性<sup>[1, 32-33]</sup>,所以本研究主要基于有较高 ACC 脱氨酶活性的标准筛选耐盐促生菌。本研究从盐碱区域小麦根际土

壤筛选得到 1 株具有促生潜力的耐盐菌株 *Agrobacterium* sp. DF-2。菌株 *Agrobacterium* sp. DF-2 展现了较高的 ACC 脱氨酶活性。Penrose 等<sup>[18]</sup>曾提出,菌株 ACC 脱氨酶活性大于 20 nmol/(mg · h) 可以通过减少植物乙烯的产生从而促进植物生长。这一假设在 Siddikee 的研究中被证实,盐胁迫下接种耐盐 ACC 脱氨酶细菌降低了红辣椒幼苗中 47%~57% 的乙烯<sup>[34]</sup>。*Agrobacterium* sp. DF-2 具有优越的盐耐受性,表明 DF-2 具有作为促生菌应用到盐土农业的潜力。盐胁迫严重抑制黄瓜幼苗生长,接种 DF-2 可以缓解盐胁迫引起的不良影响,尤其是根长、叶绿素含量。根部是植物吸收营养和水分最重要的器官,根长的提高有利于植物吸收外界营养和水分,起到抵御盐胁迫的作用。叶绿素含量的增加,间接地改善幼苗的光合作用。根际促生菌能提高植物叶绿素含量和光合作用活力在其他研究中已被证实<sup>[35]</sup>。这与本研究相一致。例如 Singh 等<sup>[17]</sup>研究结果表明具有 ACC 脱氨酶活性的 *Klebsiella* sp. SBP-8 可以提高小麦的盐耐受性。相似地,接种具有 ACC 脱氨酶活性的细菌 *P. putida* UW4 能显著提高油菜的多项生长参数<sup>[36]</sup>。

通常,植物生长过程需要大量的  $\text{K}^+$  而对  $\text{Na}^+$  的吸收很少,过量的  $\text{Na}^+$  会影响植物对矿物营养的吸收。盐胁迫下, $\text{Na}^+$  取代  $\text{K}^+$  大量转运进入胞内,并对细胞产生毒害作用<sup>[7]</sup>。因此,植物细胞内的  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  能够反映出植物细胞受胁迫伤害的程度。本研究中,盐胁迫增加了黄瓜幼苗组织  $\text{Na}^+$  的含量,降低了  $\text{K}^+$  的含量, $\text{K}^+/\text{Na}^+$  值大幅度地下降,然而接种 DF-2 显著地降低  $\text{Na}^+$  的含量,增加  $\text{K}^+$  的含量,有效缓解了  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  值的下降。与我们的结果类似,Mayak 等<sup>[37]</sup>的研究结果表明盐胁迫下接种具有 ACC 脱氨酶活性的细菌能有效地增加马铃薯植株中  $\text{K}^+$  的含量。此外,本研究发现 DF-2 可分泌胞外多糖。PG-PR 产生的胞外多糖可以将  $\text{Na}^+$  粘合到多糖表面来限制  $\text{Na}^+$  在根部的流动性以及减少植物对  $\text{Na}^+$  的吸收利用,从而减轻  $\text{Na}^+$  对植物的毒害作用<sup>[38]</sup>。因此,盐胁迫下接种 DF-2 可以通过减少黄瓜植株对  $\text{Na}^+$  的吸收,增加对  $\text{K}^+$  的吸收,增加  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  值,进而增强黄瓜的耐盐能力。

由过剩 ROS 氧化膜脂而导致的膜损伤,也被认为是盐胁迫对植物细胞产生危害的主要原因。而 MDA 作为脂膜氧化的最终代谢产物可直观反映植

物受胁迫伤害的程度<sup>[4]</sup>。在本研究中,接种 DF-2 可以显著抑制由盐胁迫引发的 MDA 含量的升高,证明 DF-2 减轻了盐胁迫造成的 ROS 氧化伤害,增强了黄瓜对盐胁迫的耐受能力。通常认为,植物主要通过自身的抗氧化系统清除过量的 ROS,而 SOD、POD、CAT 是最重要的组成部分。为了解释接种 DF-2 使 MDA 含量降低的原因,本研究考察了接种 DF-2 对黄瓜幼苗 SOD、POD、CAT 等抗氧化酶活性的影响。结果发现接种 DF-2 提高了黄瓜幼苗的 SOD、POD、CAT 的酶活性水平。因此,我们认为接种 DF-2 刺激并增强了黄瓜细胞内抗氧化系统酶活性,然后快速清除黄瓜体内过剩的 ROS,减轻盐胁迫黄瓜细胞膜的损伤,降低了 MDA 的含量,从而提高黄瓜的耐盐性。

盐胁迫除了引起细胞内产生过剩的活性氧,还会导致细胞生理性缺水。脯氨酸一定程度上可以维持细胞渗透压,提高细胞持水能力,减轻盐胁迫对植物造成的伤害<sup>[39]</sup>。盐胁迫可以诱导黄瓜幼苗脯氨酸的积累,而接种 DF-2 可以诱导黄瓜幼苗积累更多的脯氨酸,来提高黄瓜的渗透调节能力,增强黄瓜对胁迫的抵抗力,从而使黄瓜更好地适应胁迫环境。

植物促生菌对植物的促生作用是一个极其复杂的现象,作用机制到现在为止还没有被完全揭示。但是细菌产生植物激素,分泌嗜铁素,降解不溶磷能力,产生 ACC 脱氨酶,产生多糖等,常常被用来作为促生特性研究。除了 ACC 脱氨酶活性, *Agrobacterium* sp. DF-2 还具有其他的促生特性。菌株产生适量的 IAA、多糖以及解磷活性可作为附加特性来帮助抵御盐胁迫的伤害,促进植物生长发育。

在本研究中,从土壤中筛选到 1 株具有较高 ACC 脱氨酶活性的耐盐促生菌 DF-2。盐胁迫条件下,接种 DF-2 可以有效地缓解盐胁迫对黄瓜幼苗的生长抑制,增强黄瓜的胁迫耐受性。我们分析接种 DF-2 能缓解盐胁迫伤害主要由以下几个方面共同完成调控,第一,高效的 ACC 脱氨酶活性减少盐胁迫诱导的乙烯生成,减轻应激乙烯的不良影响;第二,抑制黄瓜幼苗对 Na<sup>+</sup> 的吸收,促进对 K<sup>+</sup> 的吸收,提高 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 比值,正向调节盐胁迫引起的 K<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> 离子失衡。同时,DF-2 产生的胞外多糖也参与了 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> 离子平衡调节的过程;第三,增强了黄瓜幼苗抗氧化酶系统活性,可以快速清除黄瓜体内过剩的 ROS,降低 MDA 含量,从而提高黄瓜幼苗的耐盐性;

第四,诱导黄瓜幼苗中脯氨酸的大量积累,进而提高细胞持水能力和渗透调节能力,减轻由盐胁迫引起的渗透胁迫。因此,将拥有多种促生特性的耐盐促生菌 *Agrobacterium* sp. DF-2 作为开发利用盐碱土地的生物肥料具有非常大的潜力。

#### 参考文献:

- [1] ETESAMI H, HOSSEINI H M, ALIKHANI H A, et al. Bacterial biosynthesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase and indole-3-acetic acid (IAA) as endophytic preferential selection traits by rice plant seedlings[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2014, 33(3): 654-670.
- [2] BUI E N. Soil salinity: a neglected factor in plant ecology and biogeography[J]. *Journal of Arid Environments*, 2013, 92: 14-25.
- [3] LAKHDAR A, RABHI M, GHNAYA T, et al. Effectiveness of compost use in salt-affected soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 171(1-3): 29-37.
- [4] 韩金龙,李 慧,蔺 经,等. 核黄素对盐胁迫下杜梨叶片抗氧化系统的影响[J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(4): 893-898.
- [5] 韩金龙,李 慧,蔺 经,等. 钙对盐胁迫下杜梨叶片抗氧化系统的影响[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(6): 245-248.
- [6] LEI P, XU Z, LIANG J, et al. Poly( $\gamma$ -glutamic acid) enhanced tolerance to salt stress by promoting proline accumulation in *Brassica napus* L.[J]. *Plant Growth Regulation*, 2016, 78(2): 1-9.
- [7] 孙验玲,徐远超,李 帅,等. 玉米耐盐胁迫的调控机理研究进展[J]. *山东农业科学*, 2016, 48(11): 157-153.
- [8] 呼红梅,王 莉,氮、磷、钾对盐胁迫谷子幼苗形态和生理指标的影响[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(2): 117-122.
- [9] 孙 伟,郑崇珂,解丽霞,等. 水稻对盐胁迫的生理和分子反应研究进展[J]. *山东农业科学*, 2016, 48(4): 148-153.
- [10] MAATHUIS F J M, AHMAD I, PATISHTAN J. Regulation of Na<sup>+</sup> fluxes in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 467.
- [11] ZHOU G, WANG Y, ZHAI S, et al. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(9): 4065-4074.
- [12] 刘永锋,陆 凡,陈志谊,等. 拮抗细菌 T429 和 T392 的生物活性及其对水稻白叶枯病的防治效果[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(4): 733-737.
- [13] NAVEED M, QURESHI M A, ZAHIR Z A, et al. L-Tryptophan-dependent biosynthesis of indole-3-acetic acid (IAA) improves plant growth and colonization of maize by *Burkholderia phytofirmans* PsJN[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(3): 1381-1389.
- [14] ETESAMI H, ALIKHANI H A, HOSSEINI H M. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting a-

- gents[J]. Methods X, 2015, 2: 72-78.
- [15] 张云霞,雷 鹏,许宗奇,等. 一株高效解磷菌 *Bacillus subtilis* JT-1 的筛选及其对土壤微生态和小麦生长的影响[J]. 江苏农业学报,2016, 32(5): 1073-1080.
- [16] MINAH M, BAHARUDDIN, SUBAIR H, et al. Isolation and screening bacterial exopolysaccharide (EPS) from potato rhizosphere in highland and the potential as a producer indole acetic acid (IAA)[J]. Science Direct, 2015(6): 74-81.
- [17] SINGH R P, JHA P, JHA P N. The plant-growth-promoting bacterium *Klebsiella* sp. SBP-8 confers induced systemic tolerance in wheat (*Triticum aestivum*) under salt stress[J]. Journal of Plant Physiology, 2015, 184: 57-67.
- [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] RAJPUT L, IMRAN A, MUBEEN F, et al. Salt-tolerant PGPR strain *Planococcus rifietoensis* promotes the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in saline soil[J]. Pakistan Journal of Botany, 2013, 45(6): 1955-1962.
- [20] DASTAGER S G, DEEPA C K, PANDEY A. Isolation and characterization of novel plant growth promoting *Micrococcus* sp. NII-0909 and its interaction with cowpea[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12): 987-992.
- [21] GORDON S A, WEBER R P. Colorimetric estimation of IAA[J]. Plant Physiology, 1951, 26(1): 192-195.
- [22] HOLBROOK A A, EDGE W J W, BAILEY F. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid[M]. Washington: The American Chemical Society Publications, 1961: 159-167.
- [23] MACHUCA A, MILAGRES A M. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(3): 177-181.
- [24] 张 青,张天民. 苯酚-硫酸比色法测定多糖含量[J]. 山东食品科技,2004, 6(7): 17-18.
- [25] ZHAO L, ZHANG Y. Effects of phosphate solubilization and phytohormone production of *Trichoderma asperellum* Q1 on promoting cucumber growth under salt stress[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(8): 1588-1597.
- [26] HOAGLAND D R, BROYER T C. General nature of the process of salt accumulation by roots with description of experimental methods [J]. Plant Physiology, 1936, 11(11): 471-507.
- [27] 张宪政. 植物叶绿素含量测定——丙酮乙醇混合液法[J]. 辽宁农业科学,1986(3): 28-30.
- [28] 赵世杰,许长成,邹 琦,等. 植物组织中丙二醛测定方法的改进[J]. 植物生理学报,1994(3): 207-210.
- [29] 朱广廉,邓兴旺,左卫能. 植物体内游离脯氨酸的测定[J]. 植物生理学报,1983(1): 37-39.
- [30] 尹 干,李慧明,陈 健,等. 外源一氧化氮对微囊藻毒素诱导青菜氧化胁迫的缓解[J]. 江苏农业学报,2015, 31(2): 253-259.
- [31] 潘世驹,李红宇,姜玉伟,等. 寒地水稻幼苗期耐盐资源筛选[J]. 南方农业学报,2015,46(10): 1775-1779.
- [32] SHAHZAD S M, KHALID A, ARSHAD M, et al. Improving nodulation, gronide wth and yield of *Cicer arietinum* L. through bacterial ACC-deaminase induced changes in root architecture[J]. European Journal of Soil Biology, 2010, 46(5): 342-347.
- [33] SALEEM M, ARSHAD M, HUSSAIN S, et al. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2007, 34(10): 635-648.
- [34] SIDDIKEE M A, GLICK B R, CHAUHAN P S, et al. Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity[J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2011, 49(4): 427-434.
- [35] DONG K, HAN H S, LEE K D, et al. Corresponding author: plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity[J]. Research Journal of Agriculture & Biological Sciences, 2005,1(3): 210-215.
- [36] CHENG Z, PARK E, GLICK B R. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase from *Pseudomonas putida* UW4 facilitates the growth of canola in the presence of salt[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2007, 53(7): 912-918.
- [37] MAYAK S, TIROSH T, GLICK B R. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(6): 565-572.
- [38] ASHRAF M, HASNAIN S, BERGE O, et al. Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress.[J]. Biology and Fertility of Soils, 2004, 40(3): 157-162.
- [39] DOLATABADIAN A, SAMM S, CHASHMI N A. The effects of foliar application of ascorbic acid (Vitamin C) on antioxidant enzymes activities, lipid peroxidation and proline accumulation of Canola (*Brassica napus* L.) under conditions of salt stress[J]. Journal of Agronomy and Crop Science, 2008, 194(3): 206-213.

(责任编辑:陈海霞)