

ACC 脱氨酶对大豆快生根瘤菌及苜蓿中华根瘤菌共生固氮与竞争结瘤的影响

钟喆栋 曾小波 李友国

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 利用大肠杆菌 S17-1 与根瘤菌进行两亲本接合转移, 将苜蓿中华根瘤菌 Sm1021 中的 ACC 脱氨酶基因导入大豆快生根瘤菌 HH103, 在苜蓿中华根瘤菌 Sm1021 中过表达 ACC 脱氨酶基因, 探讨 ACC 脱氨酶对根瘤菌共生固氮及竞争结瘤的影响。结果显示: 接种过表达 ACC 脱氨酶的重组根瘤菌 Sm1021, 宿主植物地上部分鲜质量与结瘤数量有所增加; 接种外源导入 ACC 脱氨酶的重组根瘤菌 HH103, 能够增加结瘤数, 提高植物地上部分干质量且竞争结瘤能力增强。但是, 接种 2 种重组根瘤菌后, 宿主植物的根瘤鲜质量和根瘤固氮酶活性无明显变化。

关键词 ACC 脱氨酶; 苜蓿中华根瘤菌; 大豆快生根瘤菌 HH103; 竞争结瘤; 共生固氮

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)01-0028-07

接种根瘤菌菌剂能够减少氮肥使用, 促进豆科作物生长。但一些研究也显示, 常规接种根瘤菌菌剂, 通常很难达到预期效果, 其影响因素多样, 其中之一是接种的根瘤菌无法竞争土壤中土著根瘤菌^[1-2]。乙烯是一种常见的植物激素, 在很多豆科植物中, 乙烯能够抑制结瘤早期的信号级联, 影响侵染线的形成和伸长, 最终抑制结瘤^[3-6]。在苜蓿中, 乙烯能够影响根瘤形成、发育以及数量^[7-8]。但在大豆中, 没有发现明显的抑制作用^[9]。部分根瘤菌进化出一些机制来减少乙烯对结瘤的抑制作用。慢生型根瘤菌可以分泌根瘤菌毒素, 能够抑制乙烯合成途径中的 2 种酶^[10-11], 不能合成根瘤菌毒素的突变体, 结瘤竞争性降低。一些植物促生菌能够分泌 ACC 脱氨酶, 可将乙烯合成的直接前体物 ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate) 分解成氨和 α -酮丁酸^[12]。ACC 脱氨酶最早在假单胞菌中发现^[13]。之后在蚕豆根瘤菌与苜蓿根瘤菌中也发现了 ACC 脱氨酶的存在^[14-15]。在根瘤菌中, 一般认为 ACC 脱氨酶作用模式是根瘤菌吸附在种子或植物根部, 将种子或根渗出的 ACC 分解, 从而降低乙烯水平, 解除乙烯对于植物根部的抑制作用^[16-17]。Ma 等^[18]报

道在根瘤菌中具有活性 ACC 脱氨酶, 但与假单胞菌相比, 活性比较低, 他们将豌豆根瘤菌 128C53K 中 ACC 脱氨酶基因和上游调控基因导入无 ACC 脱氨酶的苜蓿根瘤菌, 研究结果显示, 改造后菌株的结瘤效率和竞争性提高 35%~40%; 而根瘤菌 ACC 突变体则显示结瘤能力下降^[19]。本研究通过将苜蓿根瘤菌中的 ACC 脱氨酶基因导入大豆根瘤菌, 在苜蓿根瘤菌中过表达 ACC 脱氨酶, 检测和分析其对于共生固氮及结瘤竞争性的影响, 旨在为构建高效固氮和强竞争能力的根瘤菌接种剂提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料及载体

大豆快生型根瘤菌费氏中华根瘤菌 HH103 (*Sinorhizobium fredii* HH103, 以下简称 HH103)、苜蓿中华根瘤菌 Sm1021 (*Sinorhizobium meliloti* 1021, 简称 Sm1021)、带 GFP 标签的 HH103-GFP、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、大肠杆菌 S17-1 及质粒 pBBRMCS-5 均由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室生物固氮室保

收稿日期: 2018-04-12

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0201006); 国家自然科学基金项目(31670243); 华中农业大学科技创新基金项目(2662017PY052, 2662017PY121)

钟喆栋, 硕士研究生。研究方向: 生物固氮与菌植互作。E-mail: 704727913@qq.com

通信作者: 李友国, 博士, 教授。研究方向: 生物固氮与菌植互作。E-mail: youguoli@mail.hzau.edu.cn

存;pMD18-T购自 TaKaRa 公司;蕹藜苜蓿(*Medicago truncatula*)A17由华中农业大学农业微生物国家重点实验室生物固氮室扩繁,天隆1号大豆种子由中国农业科学院油料作物研究所周新安研究员馈赠。

限制性内切酶、T4-DNA 连接酶购自 Fermentas 公司和 TaKaRa 公司,PCR 反应相关试剂、琼脂糖凝胶电泳 Marker 购自东盛公司,PCR 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自上海华舜(Watson)生物公司,链霉素、卡那霉素、庆大霉素

(Gm)等抗生素购自 Duchefa 公司、培养基相关组分等分子生物学常规药品及试剂均购自中国国药集团,气相色谱仪 GC4000A 购自东西仪器。

1.2 引物设计

根据 GenBank 登录的基因序列用 Primer 5.0 软件设计引物,引物由南京金斯瑞公司合成,详见表1。ACC-F 为 ACC 脱氨酶基因上游引物,ACC-F-rbs 为在 ACC 脱氨酶上游引物基础上再增加一个核糖体结合位点;ACC-R 为 ACC 脱氨酶基因下游引物,并设计了 flag 标签。

表1 供试 PCR 引物

Table 1 Primers sequences of target genes

引物 Primers	序列 Sequences of primers (5'→3')	用途 Usage
ACC-F	CGGAATTCATGTCACCTGTTGGAAAAGTTCGA	扩增 ACC 脱氨酶基因片段 To amplify fragment of ACC deaminase gene
ACC-F-rbs	CCGGAATTCCTAAACGAGGAG-GTCGACGATGTCACCTGTTGGAAAAGTTCGA	扩增添加核糖体结合位点的 ACC 脱氨酶基因片段 To amplify fragment of ACC deaminase gene adding ribosomebinding site
ACC-R	CGGGATCCTTACTTATCGTCGTCATCCTT-GTAATCGCCGTCCCTGTAGTAATAGCTATAG	扩增 ACC 脱氨酶基因片段 To amplify fragment of ACC deaminase gene
M13-F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	通用引物 Universal primer
M13-R	AGCGGATAACAATTTACACACAGG	通用引物 Universal primer

1.3 大豆盆栽试验

选择颗粒饱满、大小均一的天隆1号大豆种子进行盆栽试验。播种前对大豆种子进行消毒处理:75%乙醇浸泡5 min 去除表面蜡质,加入0.5%次氯酸钠浸泡3 min,立刻用无菌水洗8~10次,直到洗出液澄清透亮。于超净台将消毒后的大豆种子用灭菌的镊子转接到1%水琼脂平板上,均匀分布,置于28℃培养箱2~3 d,待长出1 cm左右的根后,转接到已灭菌处理过的沙钵,每钵1粒种子,用沙轻轻覆盖,置于28℃光照室培养,待大豆萌发出第1片真叶后,于根部均匀接种1 mL 重悬根瘤菌菌液,在光照室培养25~30 d后观察大豆长势,测定地上部分鲜质量、单株根瘤数、单株根瘤鲜质量、固氮酶活等指标。

1.4 苜蓿盆栽试验

挑选粒大饱满的蕹藜苜蓿种子,用刀片或1 mL注射器针头在种子表面轻划出一道浅划痕,移至100 mL 无菌 PA 瓶中,再加入2%次氯酸钠溶液,表面消毒2~5 min,至种子划痕处出现褐色破损,弃废液,立即用无菌水冲洗种子至 PA 瓶中液体呈无色。加入无菌水浸没种子。将种子放入4℃冰箱,低温黑暗处理24 h。将吸胀的种子移入 FM 平

板中,于28℃倒置暗培养12~24 h,直至种子长出0.5~1.5 cm 胚轴和胚根。将已发芽的种子移植入灭菌盆中沙培,第1片真叶展开后接种苜蓿中华根瘤菌。光照室培养30 d后,收获植株。

1.5 重组根瘤菌菌株的构建与筛选

利用上游引物 ACC-F、ACC-F-rbs 及下游引物 ACC-R,从 Sm1021 总 DNA 中扩增得到 ACC 脱氨酶片段,约1.2 kb,将 ACC 脱氨酶基因片段酶切、酶连克隆构建于 pBBRMCS5 质粒载体。进一步采用氯化钙法转入大肠杆菌 S17-1,利用 S17-1 与野生型菌株 Sm1021 和 HH103 为受体菌,进行两亲本接合转移,将带有 ACC 脱氨酶基因的质粒载体导入根瘤菌。混合菌液作梯度稀释,取150 μL 适当浓度菌液涂布在筛选培养基 SM+Gm 平板上,长出来的菌落进一步进行单菌落划线分离,最后采用 M13 引物扩增,测序分析和鉴定突变体是否构建成功。

1.6 竞争结瘤试验

摇床培养 HH103(GFP)、HH103-*Hacds*(含核糖体结合位点的 ACC 脱氨酶基因),收菌后用无菌水洗涤、重悬至 OD=0.5,以1:1、1:10、10:1 将 HH103(GFP)、HH103-*Hacds* 在灭菌的 PA 瓶中混匀,混合菌液接种天隆1号,每株大豆接种1 mL

菌液,均匀接种到根部,接菌后的植物于 28 °C 光照室培养,25 d 后收获植株。洗净大豆根部,摘取根瘤,在培养皿中排列整齐,于荧光显微镜下观察根瘤发光情况(对不发光的根瘤切开检查和确证),不发光的根瘤即为目标菌株所结根瘤,除以总瘤数,即为目标根瘤菌的占瘤率。

2 结果与分析

2.1 基于 ACC 脱氨酶基因的重组大豆根瘤菌和苜蓿根瘤菌的构建

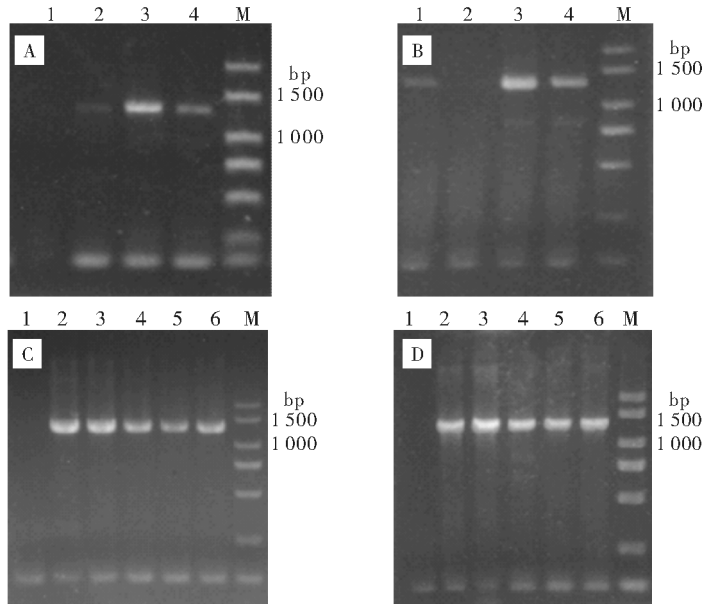
以野生型 Sm1021 基因组 DNA 为模板,以 ACC-F 和 ACC-R 为引物,通过 PCR 反应扩增得到 ACC 脱氨酶基因 *acds*,约 1.2 kb,以及带有核糖体结合位点的 ACC 脱氨酶基因 *Hacds*。克隆 ACC 脱氨酶基因片段至 TA 克隆载体 pMD-18T,经测序

验证正确,抽提质粒。质粒用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切,回收目的片段。目的片段酶连到经相同内切酶酶切的质粒 pBBRMCS5 上,质粒转化大肠杆菌 S17-1,转化子用 M13 引物 PCR 验证。

以含有重组质粒 pBBRMCS5-*acds* 或 pBBRMCS5-*Hacds* 的大肠杆菌 S17-1 为供体菌,野生型 *S. fredii* HH103、*S. meliloti* 1021 为受体菌,进行两亲本接合转移,将带有脱氨酶基因的重组质粒导入根瘤菌,转化子用 M13 引物 PCR 验证,条带大小约 1.2 kb,与预期结果一致(图 1)。

2.2 过表达 ACC 脱氨酶对苜蓿根瘤菌 Sm1021 共生固氮表型的影响

将野生型的 Sm1021 与重组根瘤菌 Sm1021-*Hacds*、Sm1021-*acds* 在无氮条件下进行盆栽试验,接菌后 30 d 收获植物,测定共生固氮相关表型。接



A: Sm1021-*acds*; B: Sm1021-*Hacds*; C: HH103-*acds*; D: HH103-*Hacds*; M: DL2000 marker; 1-6: 重组菌株 Recombinant rhizobia strains.

图 1 重组根瘤菌 HH103 与 Sm1021 中的 ACC 脱氨酶基因鉴定

Fig.1 Identification of ACC deaminase gene in the recombinant rhizobia strains HH103 and Sm1021

种苜蓿根瘤菌能显著提高苜蓿地上部分鲜质量,与接种野生型 Sm1021 相比,Sm1021-*Hacds* 地上部分鲜质量提高 5%,Sm1021-*acds* 地上鲜质量提高 24%(图 2),显示重组根瘤菌对地上部分的促进作用大于野生型根瘤菌的。根瘤鲜质量表型数据显示过表达 ACC 脱氨酶对鲜质量几乎无影响,接种 Sm1021 根瘤鲜质量为 0.033 2 g,Sm1021-*Hacds* 为 0.033 0 g,Sm1021-*acds* 为 0.032 1 g(图 3)。Sm1021-*Hacds*,Sm1021-*acds* 能够促进苜蓿结瘤,

Sm1021-*Hacds*,Sm1021-*acds* 较野生型 Sm1021,结瘤数量均有所增加,增量分别达到 18% 和 15%(图 4)。接种 Sm1021 的根瘤菌固氮酶活为 20.80 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$,同样,接种 Sm1021-*Hacds* 的根瘤菌固氮酶活为 21.52 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$,接种 Sm1021-*acds* 的根瘤菌固氮酶活为 18.56 $\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$ (图 5)。

2.3 导入 ACC 脱氨酶对大豆快生根瘤菌 HH103 共生固氮表型的影响

进行大肠杆菌 S17-1 与 HH103 两亲本接合转

移,将带有脱氨酶基因的 pBBRMCS5 重组质粒导入野生型菌株 HH103,PCR 扩增验证。选用天隆 1 号大豆进行盆栽试验,接菌后 30 d 收获大豆植株,测定地上部分干质量、瘤数、瘤质量以及根瘤酶活性。结果表明:与接种 HH103 相比,接种 HH103-*Hacds* 与 HH103-*acds* 后植株地上部分干质量分别提高 7% 和 12%(图 6)。接种 HH103、HH103-*Hacds* 和 HH103-*acds* 后,大豆单株根瘤鲜质量差异不明显(图 7)。但是,根瘤数量相差较大,HH103 平均结瘤数为 37 个,HH103-*Hacds* 与 HH103-*acds* 较 HH103 分别增加了 35% 和 27%,分别达到 50 个和 47 个(图 8),但根瘤较小。接种 HH103, HH103-*Hacds* 和 HH103-*acds* 后大豆单株的固氮酶活分别为 5.3、6.9 和 5.5 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。

2.4 导入 ACC 脱氨酶对大豆快生根瘤菌 HH103 竞争结瘤能力的影响

将带有 GFP 标签的费氏中华根瘤菌 HH103 作为标记菌株,目标菌株与标记菌株混合接种,25 d 后收获根瘤,在荧光显微镜下观察根瘤的发光情况。(图 9),具有绿色荧光的为 HH103-GFP。当 HH103-GFP 与 HH103-*Hacds* 按 1 : 1 接种时,HH103-*Hacds* 的平均占瘤率为 62.1%。HH103-GFP 与 HH103-*Hacds* 按 1 : 10 接种时,HH103-*Hacds* 的平均占瘤率为 99.1%。HH103-GFP 与 HH103-*Hacds* 按 10 : 1 接种时,HH103-*Hacds* 的平均占瘤率为 21.8%。在 3 种混合接种比例下,HH103-*Hacds* 占瘤率均高于理论值(图 10)。因此,外源导入 ACC 脱氨酶的 HH103 竞争结瘤能力增强。

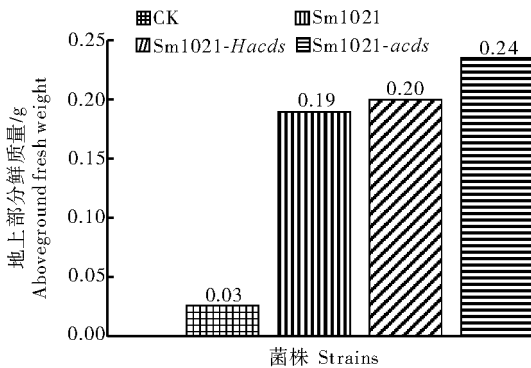


图 2 分别接种 Sm1021、Sm1021-*Hacds* 和 Sm1021-*acds* 后苜蓿植株地上部分植物鲜质量

Fig.2 Plants aboveground fresh weight of alfalfa inoculated with Sm1021, Sm1021-*Hacds* and Sm1021-*acds*

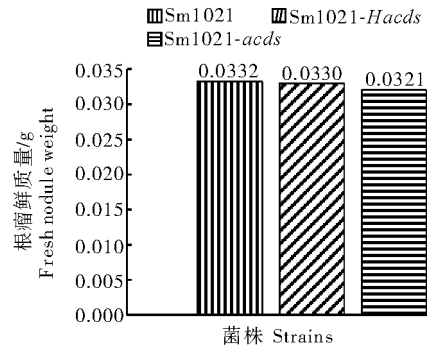


图 3 分别接种 Sm1021、Sm1021-*Hacds* 和 Sm1021-*acds* 后苜蓿根瘤鲜质量

Fig.3 Nodule weight of alfalfa inoculated with Sm1021, Sm1021-*Hacds* and Sm1021-*acds*

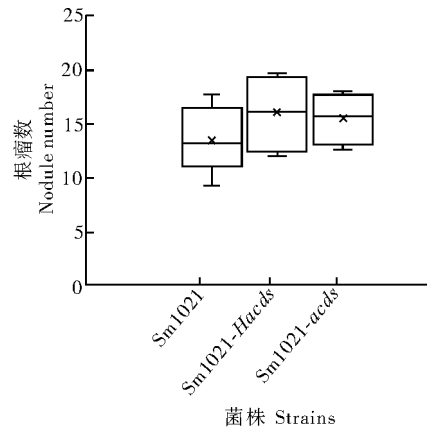


图 4 分别接种 Sm1021、Sm1021-*Hacds* 和 Sm1021-*acds* 后苜蓿根瘤数量

Fig.4 Nodule number of alfalfa inoculated with Sm1021, Sm1021-*Hacds* and Sm1021-*acds*

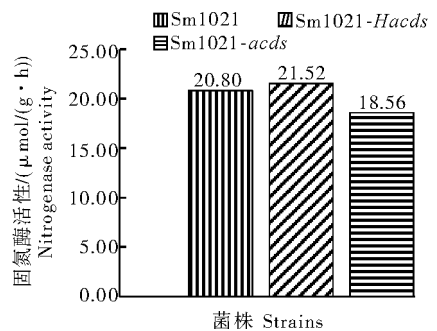


图 5 分别接种 Sm1021、Sm1021-*Hacds* 和 Sm1021-*acds* 后苜蓿的根瘤固氮酶活性

Fig.5 Nitrogenase activity of nodules inoculated with Sm1021, Sm1021-*Hacds* and Sm1021-*acds*

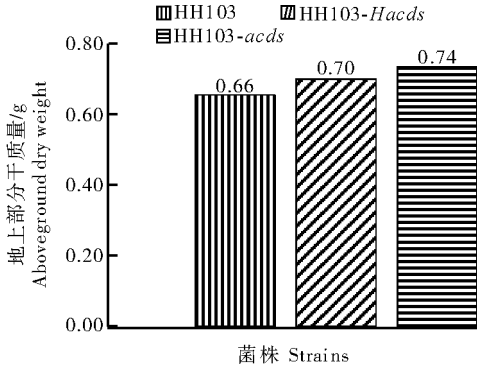


图 6 分别接种 HH103、HH103-Hacds 和 HH103-acds 后的大豆植株地上部分干质量

Fig.6 Plants aboveground dry weight of soybean inoculated with HH103, HH103-Hacds and HH103-acds

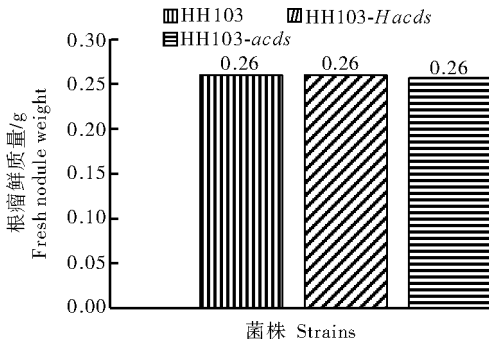


图 7 分别接种 HH103、HH103-Hacds 和 HH103-acds 后的大豆根瘤鲜质量

Fig.7 Nodule weight of soybean inoculated with HH103, HH103-Hacds and HH103-acds

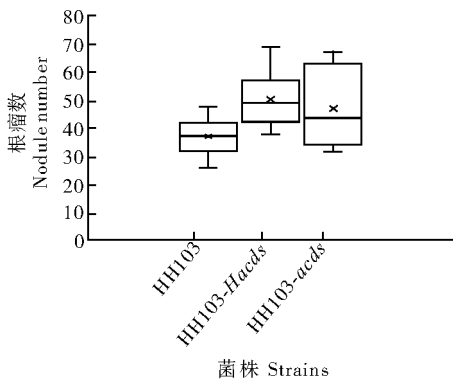
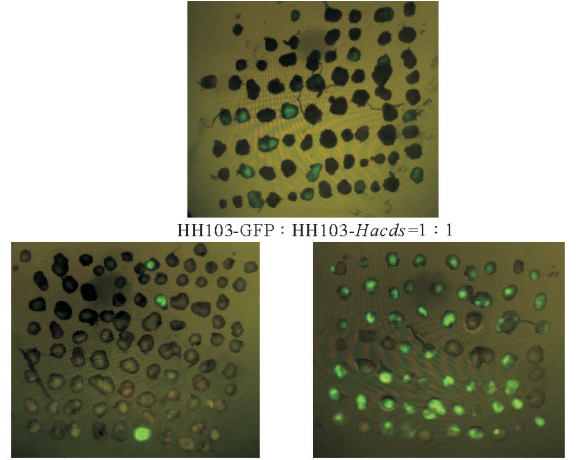


图 8 分别接种 HH103、HH103-Hacds 和 HH103-acds 后的大豆根瘤数量

Fig.8 Nodule number of alfalfa inoculated with HH103, HH103-Hacds and HH103-acds



HH103-GFP : HH103-Hacds=1 : 10 HH103-GFP : HH103-Hacds=10 : 1

图 9 HH103-GFP 与 HH103-Hacds 混合接菌后根瘤发光情况

Fig.9 Nodules with the luminescence of GFP when mix inoculated HH103-GFP and HH103-Hacds

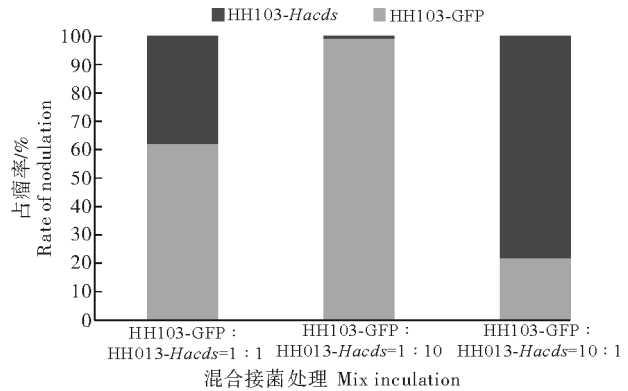


图 10 HH103-GFP 与 HH103-Hacds 混合接菌的占瘤率

Fig.10 The rate of nodulation when soybean mix inoculated with HH103-GFP and HH103-Hacds

3 讨论

乙烯能够抑制植物茎的伸长、促进茎或根的增粗、引起叶柄和胚轴偏上生长。逆境条件下,植物会合成大量乙烯,导致胁迫发生,表现出叶片衰老、落叶,植株矮小,根长变短,影响植物的养分获取和光合作用。在豆科植物中,乙烯还会抑制结瘤过程^[20-21],降低乙烯的浓度,能够部分解除逆境胁迫,促进生产。在小麦根际接种含 ACC 脱氨酶的假单胞菌,能够提高小麦的产量 20%^[22],在盐胁迫条件下,小麦产量增加达到 76%,干质量增加达到 67%^[23]。

赵龙飞等^[24]从 276 株大豆根瘤内生菌中筛选出 8 株具有 ACC 脱氨酶活性的菌株,其中 1 株芽胞杆菌菌株对小麦生长具有促进作用。ACC 脱氨酶在植物促生菌(PGPR)中研究较多,虽然自然界中部分根瘤菌也存在 ACC 脱氨酶,但其在豆科植物中的应用研究较少。

本研究通过构建 Sm1021 过表达 ACC 脱氨酶菌株以及外源导入 ACC 脱氨酶基因的 HH103 菌株,分别进行苜蓿和大豆的盆栽试验评价 ACC 脱氨酶在共生固氮中的作用,结果显示:在苜蓿和大豆中,ACC 脱氨酶主要作用是促进结瘤,植株地上部分质量略有增加,但根瘤固氮酶活和根瘤鲜质量变化不明显。这可能与乙烯在结瘤信号早期传导中起作用有关,ACC 脱氨酶解除了乙烯对于早期结瘤信号的抑制,导致形成更多根瘤;而对于地上部分促进作用不大,可能是由于根瘤菌中 ACC 脱氨酶的活性比较低,没有达到显著影响乙烯的水平。

中国是大豆原产国之一,大豆的长期栽培使得土壤中富含土著根瘤菌,常规根瘤菌剂因无法在与土著根瘤菌竞争中占居优势而应用效果不佳。本研究发现,ACC 脱氨酶能够提高大豆根瘤菌的竞争结瘤能力,特别是当改造后的菌株占比较大时,占瘤率几乎可达到 100%。但研究也发现,同一个菌株在不同大豆个体间的占瘤率变异较大,竞争性易受植物生长状况影响。本研究结果为改造根瘤菌提高其竞争力提供了一定的依据和基础,但构建一个真正具有应用价值的稳定高效重组根瘤菌株,仍需进一步改良和田间试验。

参 考 文 献

- [1] MAIER R J, TRIPLETT E W. Toward more productive, efficient, and competitive nitrogen-fixing symbiotic bacteria[J]. Critical reviews in plant sciences, 1996, 15: 191-234.
- [2] VLASSAK K M, VANDERLEYDEN J. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia[J]. Critical reviews in plant sciences, 1997, 16: 163-229.
- [3] HIRSCH A M, FANG Y. Plant hormones and nodulation: what's the connection? [J]. Plant Mol Biol, 1994, 26: 5-9.
- [4] NUKUI N, EZURA H. Transgenic *Lotus japonicus* with an ethylene receptor gene *Cm-ERS/H70A* enhances formation of infection threads and nodule primordia[J]. Plant cell physiology, 2004, 45: 427-435.
- [5] OLDROYD G E, ENGSTROM E M, LONG S R. Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*[J]. Plant cell, 2001, 13: 1835-1849.
- [6] GAGE D J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes[J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2004, 68: 280-300.
- [7] PENMETSA R V, COOK D R. A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont[J]. Science, 1997, 275: 527-530.
- [8] PETERS N K, CRIST-ESTES D K. Nodule formation is stimulated by the ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine[J]. Plant physiology, 1989, 91: 690-693.
- [9] SCHMIDT S, HARPER J S, BENT T. Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signaling[J]. Plant physiology, 1999, 119: 951-959.
- [10] OKAZAKI S, NUKUI N, SUGAWARA M, et al. Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase[J]. Microbes Environ, 2004, 19: 99-111.
- [11] YUHASHI K, ICHIKAWA N, EZURA H, et al. Rhizobitoxine production by *Bradyrhizobium elkanii* enhances nodulation and competitiveness on *Macroptilium atropurpureum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2000, 66: 2658-2663.
- [12] GLICK B R, PENROSE D M, LI J. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria[J]. J Theor Biol, 1998, 190: 63-68.
- [13] HONMA M. Stereospecific reaction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase [M]//PECH J C, LATCHE A, BALAGUE C. Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene. Dordrecht: Kluwer Academic, 1993: 111-116.
- [14] BELIMOV A A, SAFRONOVA V I, SERGEYEVA T A, et al. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria isolated from polluted soils and containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase[J]. Can J Microbiol, 2001, 47: 642-652.
- [15] KANEKO T, NAKAMURA Y, SATO S, et al. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*[J]. DNA Res, 2000, 7: 331-338.
- [16] GLICK B R, CHENG Z, CZARNY J, et al. Promotion of plant-growth by ACC deaminase-producing soil bacteria[J]. Eur J Plant Pathol, 2007, 119: 329-339.
- [17] OLDROYD G E, MURRAY J D, POOLE P S, et al. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis[J]. Annual review of genetics, 2011, 14: 119-144.
- [18] MA W, SEBESTIANOVA S B, SEBESTIAN J, et al. Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium* spp[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2003, 83: 285-291.
- [19] MA W, CHARLES T C, GLICK B R. Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70: 5891-5897.
- [20] VAN DE POEL B, VAN DER STRAETEN D. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) in plants: more than just the precursor of ethylene[J]. Front Plant Sci, 2014, 5: 1-11.
- [21] RAJNISH P S, SHEKLE G M, KUMAR A, et al. Biochemistry

- and genetics of ACC deaminase; a weapon to “stress ethylene” produced in plants[J/OL]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 937. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00937>.
- [22] BABY S, MUHAMMAD N, MUHAMMAD A. Fertilizer-dependent efficiency of pseudomonads for improving growth, yield, and nutrient use efficiency of wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Environmental biotechnology*, 2008, 79: 147-155. doi10: 1007500253-008-1419-0.
- [23] HAMDIA A B E, SHADDAD M A K, DOAA M M. Mechanisms of salt tolerance and interactive effects of *Azospirillum brasilense* inoculation on maize cultivars grown under salt stress conditions[J]. *Plant growth regulation*, 2004, 44: 165-174.
- [24] 赵龙飞, 徐亚军, 常佳丽, 等. 具 ACC 脱氨酶活性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及促生作用[J]. *微生物学报*, 2016, 56(6): 1009-1021.

Effects of ACC deaminase on symbiotic nitrogen fixation and competitive nodulation in *Sinorhizobium meliloti* 1021 and *Sinorhizobium fredii* HH103

ZHONG Zhedong ZENG Xiaobo LI Youguo

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract An ACC deaminase gene from *Sinorhizobium meliloti* 1021 was introduced into *Sinorhizobium fredii* HH103 and Sm1021 (providing extra copy of ACC deaminase gene) using the conjugation of *Escherichia coli* S17-1 and *Rhizobium*. These genetic engineering strains were inoculated to host plants to study the effect of ACC deaminase on symbiotic nitrogen fixation and competitive nodulation ability. The results showed that overexpression of ACC deaminase in Sm1021 increased the nodule number and fresh weight in alfalfa. In soybean, inoculated with HH103 containing ACC deaminase also increased the nodule number, the dry weight and competitive nodulation ability. But the nodule fresh weight and nodule nitrogenase enzyme activity had no significant change both in alfalfa and soybean.

Keywords ACC deaminase; *Sinorhizobium meliloti* 1021; *Sinorhizobium fredii* HH103; competitive nodulation ability; symbiotic nitrogen fixation

(责任编辑:张志钰)