

# 枣树实生苗固有内生细菌的检测

侯晓杰

(衡水学院 生命科学系, 河北 衡水 053000)

**摘要:**通过光学显微镜、扫描电镜观察和分子检测方法对阜平大枣实生组培苗体内的固有内生细菌进行了研究。结果表明:在光学显微镜 1 000 倍下可观察到球状、短杆状和杆状细菌,其大小分别为  $1.5\sim 1.8\ \mu\text{m}$ 、 $(2.2\sim 2.9)\ \mu\text{m}\times(1.1\sim 1.9)\ \mu\text{m}$ 、 $(3.7\sim 4.4)\ \mu\text{m}\times(1.6\sim 1.9)\ \mu\text{m}$ ;扫描电镜下拍摄到杆状细菌,大小为  $(3.5\sim 4.0)\ \mu\text{m}\times(1.5\sim 2.0)\ \mu\text{m}$ ;应用细菌通用引物 pf27/1525 扩增该实生苗体内的 16S rDNA 时,检测到大小为 1.5 kb 的细菌 DNA 特异性条带。

**关键词:**枣;内生细菌;检测;光学显微镜;扫描电镜;16S rDNA

**中图分类号:**S 665.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)22-0108-04

植物内生菌是指能够定殖在植物组织内不引起宿主任何症状的微生物<sup>[1]</sup>。内生细菌具有丰富的生物多样性,其寄生在宿主体内,有足够的碳源、氮源,且受到植物组织保护,具有更稳定的环境,所以作为生防菌及外源基因载体更容易发挥作用<sup>[2]</sup>。研究发现一部分植物内生细菌还能使植物获益,如促进植物生长或抑菌等<sup>[3-5]</sup>。种子内微生物群落被认为是影响种子性能和后期植物生长的一个重要因素。一些种子内生细菌对真菌有拮抗作用<sup>[6]</sup>。

我国科研人员从黄瓜种子及实生苗内分离得到了芽孢杆菌属、土壤杆菌属、黄单胞菌属、假单胞菌属、欧文氏菌属和短小杆菌属的大量内生细菌,为进一步筛选拮抗黄瓜病害的内生细菌提供了必要的基础<sup>[7]</sup>。油菜种子内生菌带菌率很高,这些内生菌的存在不仅影响种子的萌发和无菌苗的生长,而且在油菜无菌苗对菌核病的抗性鉴定中会严重干扰油菜菌核病菌的繁殖和自发接种<sup>[8]</sup>。1976 年, Mundt 等<sup>[9]</sup>研究了胚珠和草本植物、木本植物、非谷类种子及谷物种子的内生细菌,从草本植物中 30% 的胚乳和 15% 的种子,木本植物 16% 的种子,5.4% 的过冬保存的非谷类种子和 13.5% 的过冬保存的谷物种子内都分离到了细菌。

植物内生细菌的研究多以农作物为主,树木内生细菌的研究多集中在能够促进植物生长的根部内生细菌<sup>[10-12]</sup>,迄今为止,有关树木种子内生菌的报道较少<sup>[9]</sup>。国外学者发现咖啡种子内存在大量内生菌,其中 *Pseudozyma flocculosa* 对白粉病有拮抗作用, *P. fusiformata*

对许多酵母菌有拮抗效果<sup>[13-15]</sup>。加拿大英属哥伦比亚大学的研究人员发现,一种分离自黑松的内生芽孢杆菌 (*Bacillus polymyxa*) Pw-2 菌株对黑松幼苗的生长量有明显的促进作用<sup>[16]</sup>。2005 年, Cankar 等<sup>[17]</sup>从挪威云杉胚珠及种子内分离到内生细菌。

枣树是我国广泛栽培的特果树,近年来,随着枣产业的发展壮大,枣树病害也随之扩展蔓延,目前对枣疯病、枣缩果病等毁灭性病害的防治尚无有效的方法,枣炭疽病等病害的防治也只限于化学药剂的使用。该试验用不同方法检测枣树体内的固有内生细菌,为更好地利用植物内生菌防治枣树病害奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

风干的阜平大枣果实,置于 4℃ 冰箱中备用。

### 1.2 试验方法

1.2.1 阜平大枣实生苗的培养 将阜平大枣果实外果皮、中果皮去掉,内果皮和种子充分干燥后用锋利的枝剪撬开,注意不要伤及种子。种子取出后用 70% 的酒精浸泡 30 s, 0.1% 的升汞消毒 3.5 min, 无菌水清洗 3 次后吸干表面水分,将种子置于装有适量 MS 培养基的三角瓶中,于 25℃ 光照培养箱内培养。待苗高 3 cm 左右时,将同一株实生苗上的侧芽剪下,插入新的 MS 培养基上,繁殖成另一株苗木,以得到同一起来源的枣苗。

1.2.2 实生苗内生细菌的显微观察 光学显微镜观察:称取 0.016 g 阜平大枣实生苗材料置于灭菌研钵中,加入 1 mL 的无菌水后充分研磨,将研磨液全部转移至 1.5 mL 灭菌离心管中, 900 r/min 离心 5 min, 去除大部分植物组织,取上清液, 8 000 r/min 离心 5 min, 沉淀物稀释 2 倍后制备临时玻片,显微镜(型号 Motic BA300)下观察并拍照记录试验结果。扫描电镜观察:无

**作者简介:**侯晓杰(1981-),女,河北衡水人,博士,讲师,研究方向为植物病害生物防治。E-mail:houxiaojie23@163.com

**基金项目:**衡水学院青年专项资助项目(2010058)。

**收稿日期:**2012-07-27

菌条件下,用灭菌的锋利刀片迅速切取阜平大枣实生苗茎段,取横切面,迅速将样品置于4%的戊二醛溶液内固定12 h以上;用磷酸缓冲液充分清洗,然后放入1%锇酸中固定2~4 h,再用磷酸缓冲液浸洗4次;乙醇梯度脱水(50%、70%、80%、90%、100%),每次10 min;脱水后的样品放入醋酸异戊酯中置换掉酒精,处理2次,每次15 min;CO<sub>2</sub>临界点干燥6 h。干燥后进行金属镀膜,表面导电处理;最后置于扫描电镜下观察摄影记录。

1.2.3 实生苗内生细菌的分子检测 选取2株来源于同一种子的组培苗,采用CTAB改良法提取其体内的总DNA<sup>[18]</sup>。应用细菌通用引物<sup>[19]</sup>,扩增阜平大枣组培苗内细菌的16S rDNA。正向引物 pf27: 5'-GAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3',反向引物 1525: 5'-(A)GAAAG-GAGGTGATCCAGCC-3'(上海生工合成)。25 μL 反应体系中含有10×PCR缓冲液2.5 μL(含Mg<sup>2+</sup>),引物各0.125 μL(引物浓度10 pmol/μL),各2.5 mM dNTP 1 μL, Taq 酶0.2 μL(5 U/μL),DNA模板0.5 μL。反应程序为95℃预变性10 min,95℃变性30 s,54℃退火30 s,72℃延伸1.5 min,30个循环,最后72℃延伸5 min。PCR扩增产物经1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 显微观察

2.1.1 光学显微镜观察 阜平大枣健康种子组培苗经研磨,离心去除大部分植物组织后取上清液再次离心沉淀细菌,沉淀物稀释后显微镜下观察。由图1可知,阜平大枣实生苗含有大量球状、短杆状或杆状细菌,其大小分别为1.5~1.8 μm、(2.2~2.9) μm×(1.1~1.9) μm、(3.7~4.4) μm×(1.6~1.9) μm。该现象表明大量内生细菌存在于阜平大枣实生苗内。实生苗来源于干燥的种子,表明种子内的固有内生细菌在风干后的大枣中仍能存活。

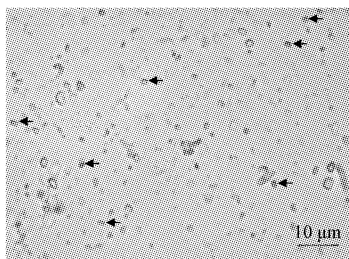


图1 阜平大枣实生苗内生细菌光学显微观察  
(箭头指示为细菌1 000×)

Fig.1 Observation of endophytic bacteria in seedlings germinated from seeds of *Ziziphus jujuba* var. fupingdazao by optical microscope

2.1.2 扫描电镜观察 阜平大枣种子组培苗茎段经一系列处理后,样品横切面在扫描电镜下观察。图2表明扫描电镜4 500倍下可以观察到杆状细菌,其大小为(3.5~4.0) μm×(1.5~2.0) μm。内生细菌在大枣种子

苗茎内数量较少且分布不均匀,有些存在于植物细胞腔内,也有些存在于细胞间隙。

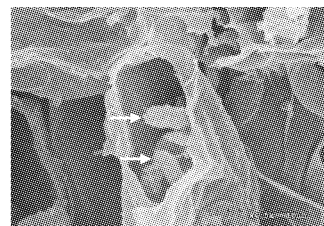


图2 阜平大枣实生苗茎段横切面扫描电镜观察  
(箭头指示为细菌4 500×)

Fig.2 Observation of endophytic bacteria in seedlings germinated from seeds of *Ziziphus jujuba* var. fupingdazao by SEM

### 2.2 内生细菌的分子检测

提取阜平大枣种子组培苗总DNA,应用细菌通用引物 pf27/1525 扩增其16S rDNA,PCR产物经1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测。由图3可知,阜平大枣种子组培苗扩增出1.5 kb的细菌DNA条带。

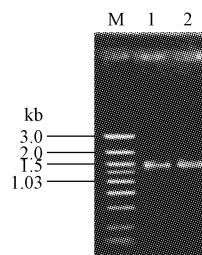


图3 阜平大枣实生苗内生细菌的分子检测图谱

注:M;Marker DL 3000;1,2;分别代表2株枣苗内生细菌图谱。

Fig.3 Amplification of 16S rDNA fragments of endophytic bacteria in jujube seedlings germinated from seeds

Note:M;Marker DL3000;Lane 1 and 2;Two seedlings germinated from *Ziziphus jujuba* var. fupingdazao seeds.

## 3 结论与讨论

该试验所用材料为同一粒种子繁殖的实生苗经过扩繁得到的,保证了试验材料来源的一致性。在运用显微镜和分子检测技术对阜平大枣健康种子组培苗进行内生细菌检测时,在普通光学显微镜1 000倍下观察到了不同形态和大小的细菌,但普通光学显微镜对内生细菌的检测观察倍数低,组织碎片去除不彻底使观察产生误差;细胞学水平上仅仅有很少的研究去描述内生细菌的感染和定殖<sup>[20-24]</sup>。2004年,德国学者应用扫描电镜观察玉米和其内生菌之间的交互作用及内生细菌在玉米叶片细胞内的空间结构。结果表明,玉米叶片组织内生菌定殖的立体结构显而易见<sup>[25]</sup>。该试验进一步采用扫描电子显微镜对横切面进行观察,清晰地观察到了阜平大枣实生苗嫩茎细胞内也含有内生细菌。分子检测结果出现了亮而清晰的1.5 kb细菌DNA条带,表明阜

平大枣种子内含有大量细菌。

自然界中的多数微生物是不可以培养的,因此用常规的微生物学方法难以进行检测<sup>[26]</sup>。种子内不可培养内生菌在植物栽培上可能有重要的生态和经济影响<sup>[27]</sup>。不同植株内生细菌种类的变化以及同一植株内生细菌种类的多少尚需利用其它方法进行研究。简单的区分植物体内内生细菌种类的方法,可以通过室内细菌平板培养将内生细菌分为可培养内生细菌和不可培养内生细菌2种,通过观察可培养内生细菌菌落形态,将内生细菌进行初步归类。分析植物体内内生细菌含量的变化,种类的多少,需要应用分子检测方法。定量PCR检测技术可以检测到不同植株间内生菌含量的差异;变性梯度凝胶电泳(DGGE)或温度梯度凝胶电泳(TGGE)可以测定不同植株间内生菌的种类变化或同一植株内内生菌的种类多少。目前,DGGE和TGGE已广泛用于微生物种类多样性的研究中。

该试验证实了枣树种子实生苗内存在大量的固有内生细菌。植物体是一个复杂的微生物体系,内生细菌寄生在植物组织内部,其代谢产物不仅对植物本身有各种不同的影响,而且对其它病原生物也有抵抗作用<sup>[28-29]</sup>。植物内生细菌与宿主植物之间存在着复杂的相互关系,研究植物内生细菌,并将其应用到生产实践中,还需要进行更加深入细致的研究。

### 参考文献

- [1] Bacon C W, Hinton D M. Isolation and culture of endophytic bacteria and fungi. In: Hurst C J, Knudsen G R, McInerney M J, et al. Manual of Environmental Microbiology [M]. Washington (DC): ASM Press, 1996: 413-421.
- [2] 韩继刚,宋末.植物内生细菌研究进展及其应用潜力[J].自然科学进展,2004(4):374-379.
- [3] Fisher P J, Petrini O, Lappin-scott H M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.) [J]. New Phytologist, 1992, 122:299-305.
- [4] Bacilio J M, Aguilar F S, Del Valle M V, et al. Endophytic bacteria in rice seeds inhibit early colonization of roots by *Azospirillum brasilense* [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33:167-172.
- [5] 邱思鑫,何红,阮宏椿,等.具有抑菌促生作用的植物内生细菌的筛选[J].应用与环境生物学报,2004,10(5):655-659.
- [6] Mukhopadhyay N K, Garrison N K, Hinton D M, et al. Identification and characterization of bacterial endophytes of rice [J]. Mycopathologia, 1996, 134:151-159.
- [7] 田雪亮,单长卷.黄瓜种子及幼苗内生细菌分离鉴定[J].安徽农业科学,2006,34(8):1574-1575.
- [8] 张志元,罗永兰,官春云.油菜种子内生菌的检测及杀菌消毒处理方法[J].湖北农业科学,2005(1):52-55.
- [9] Mundt J O, Hinkle N F. Bacteria within ovules and seeds [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1976, 32(5):694-698.
- [10] Garbaye J. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis [J]. New phytologist, 1994, 128:197-210.
- [11] Shishido M, Breuil C, Chanway C P. Endophytic colonization of spruce by plant growth-promoting rhizobacteria [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 29:191-196.
- [12] Chanway C P, Shishido M, Nairn J, et al. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Forest Ecology and Management, 2000, 133: 81-88.
- [13] Fernando E V, Francisco P, Catherine A M, et al. Fungal endophytes in green coffee seeds [J]. Mycosystema, 2008, 27(1):75-84.
- [14] Golubev V I, Kulakovskaia T V, Golubeva E V. *Pseudozyma fusiformata* BKM Y-2821-a producer of antifungal glycolipid [J]. Mikrobiologiya, 2001, 70 (5):642-646.
- [15] Avis T J, Belanger R R. Mechanisms and means of detection of biocontrol activity of *Pseudozyma* yeasts against plantpathogenic fungi [J]. FEMS Yeast Research, 2002(2):5-8.
- [16] Bal A S, Chanway C P. Isolation and identification of endophytic bacteria from lodgepole pine and western red cedar [EB/OL]. Auburn University website, available: <http://www.ag.auburn.edu/argentina/pdfmanuscripts/bal.2000>.
- [17] Cankar K, Kraigher H, Ravnkar M, et al. Bacterial endophytes from seeds of Norway spruce (*Picea abies* L. Karst) [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 244:341-345.
- [18] 李永,田国忠,朴春根,等.我国几种植物植原体的快速分子鉴别与鉴定的研究[J].植物病理学报,2005,35(4):293-299.
- [19] 张德民,黄志勇,杨惠芳.紫色非硫细菌 *Rhodocista* 属一新分离株的鉴定及其系统学研究[J].微生物学报,2000,40(1):14-20.
- [20] Döbereiner J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: endophytic N<sub>2</sub> fixing bacteria [J]. Ciencia e Cultura (Sao Paulo), 1992, 44: 310-313.
- [21] Dong Z, Canny M J, McCully M E, et al. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems (A new role for the apoplast) [J]. Plant Physiology, 1994, 105:1139-1147.
- [22] James E K, Reis V M, Olivares F L, et al. Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus* [J]. Journal of Experimental Botany, 1994, 45:757-766.
- [23] Döbereiner J, Baldani V L D, Reis V M. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In I: Fendrik M, Del Gallo J, Vanderleyden M, et al. *Azospirillum* VI and Related Microorganisms [J]. Springer-Verlag, Berlin, Germany, 1995: 3-14. Mikrobiologia, 70: 642-646 (in Russian).
- [24] Taechowisan T, Peberdy J F, Lumyong S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2003, 19:381-385.
- [25] de Souza A O, Pamphile J A, de Mello Sartori Cardoso da Rocha C L, et al. Plant-microbe interactions between maize (*Zea mays* L.) and endophytic microorganisms observed by Scanning Electron Microscopy [J]. Acta Scientiarum Biological Sciences, 2004, 26(3):357-359.
- [26] Amann R I, Ludwig W, Schleifer K H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1995, 59(1):143-169.
- [27] Tyson G W, Chapman J, Hugenholtz P, et al. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment [J]. Nature, 2004, 428:37-43.
- [28] 黎起秦,罗宽.番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选[J].植物病理学报, 2003, 33(4):364-367.
- [29] 何红,邱思鑫,胡方平.植物内生细菌生物学作用研究进展[J].微生物学杂志,2004,5(3):40-45.



# 响应曲面法优化万寿菊叶黄素的提取工艺

汪殿蓓, 张胜红, 李建华

(湖北工程学院 生命科学技术学院, 湖北 孝感 432000)

**摘要:**以乙酸乙酯为提取溶剂,以提取时间、提取温度以及液料比为自变量,采用 Box-Behnken 中心组合设计原理和响应曲面分析法,研究了各因素及其交互作用对万寿菊叶黄素提取的影响。结果表明:叶黄素提取工艺最佳条件为:提取时间 54.32 min,提取温度 32.09℃,液料比 (mL:g) 为 16.15:1,吸光度的预测值为 2.357,当选取提取时间 55 min,提取温度 32℃,液料比 (mL:g) 为 16.15:1 的实际条件时,吸光度实际值为 2.356。该试验所得工艺参数准确,可用于万寿菊叶黄素的提取生产。

**关键词:**万寿菊;叶黄素;响应曲面;提取工艺

**中图分类号:**TS 264.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)22-0111-04

万寿菊 (*Tagetes erecta* L.) 属菊科万寿菊属多年生草本花卉,原产于墨西哥及热带美洲,在我国多作 1 a 生栽培。花色有黄色、橙色等,花瓣中富含叶黄素<sup>[1]</sup>。叶黄素在预防视黄斑退化、肿瘤、心血管疾病、增加机体免疫力等方面具有重要的生理功能,现已被广泛用于药品、饮料、糕点、油脂食品等领域,被认为是一种优良的天然色素添加剂<sup>[2]</sup>。目前对万寿菊中叶黄素的提取工艺和条件已有相关报道,如采用单因素和正交实验方法探讨不同提取剂、提取温度、提取时间以及料液比等因素对万寿菊叶黄素提取率的影响<sup>[3-4]</sup>;以及采用柱层析

法<sup>[5]</sup>、超声波法<sup>[6-7]</sup>和超临界二氧化碳萃取法<sup>[8]</sup>对万寿菊叶黄素提取工艺的研究;且吴兴壮等<sup>[9]</sup>对制备万寿菊叶黄素技术的研究作了综合阐述。但到目前为止,采用响应曲面法研究万寿菊叶黄素提取工艺的报道较少。该试验在查阅大量文献的基础上,兼顾食品安全及减少环境污染的原则<sup>[7]</sup>,选用乙酸乙酯作为提取剂,采用 Box-Behnken 中心组合设计原理和响应曲面分析法,对影响万寿菊叶黄素的提取时间、提取温度以及液料比等因素进行研究,以期获得最佳工艺条件,为工业生产提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

万寿菊花朵于 2011 年 9 月采自浙江工程院校园内,取万寿菊花瓣在自然条件下充分阴干,然后放入粉

**第一作者简介:**汪殿蓓(1968-),女,湖北洪湖人,博士,教授,研究方向为植物资源利用及观赏园艺。

**基金项目:**湖北省教育厅重大科研资助项目(Z20092601)。

**收稿日期:**2012-07-17

## Detection of Indigenous Endophytic Bacteria in Jujube Seedlings Germinated From Seeds

HOU Xiao-jie

(Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui, Hebei 053000)

**Abstract:** The indigenous endophytic bacteria in the tissue culture seedlings germinated from seeds of *Ziziphus jujuba* var. fupingdazao were studied using observation with optical microscope and scanning electronic microscope (SEM), and detection of specific 16S rDNA fragment. The results showed that a large quantity of endophytic bacteria in jujube seedlings were detected under optical microscope with a magnification of 1 000 times, and round, short rod or rod bacterial cells with the size of 1.5~1.8  $\mu\text{m}$ , (2.2~2.9)  $\mu\text{m} \times$  (1.1~1.9)  $\mu\text{m}$  and (3.7~4.4)  $\mu\text{m} \times$  (1.6~1.9)  $\mu\text{m}$ , respectively, were observed. Rod bacteria were found by SEM as well. The 16S rDNA fragment of 1.5 kb was amplified from the total DNA of seedlings of jujube with the bacterial primer pair pf27/1525.

**Key words:** *Ziziphus jujuba*; endophytic bacteria; detection; optical microscope; scanning electronic microscope; 16S rDNA