

研究报告

红树植物老鼠簕内生细菌数量的时空动态变化

林巧玲^{1,2} 严玉宁¹ 何红^{1*} 孙兴涛¹ 杨定祥¹

(1. 广东海洋大学农学院 广东 湛江 524088)

(2. 省级现代农业(热带特色园艺)产业技术研发中心 广东 湛江 524088)

摘要:【目的】了解红树植物老鼠簕内生细菌数量的时空动态变化。【方法】分别用荧光显微计数法和平板计数法对老鼠簕内生细菌总量和可培养内生细菌总量进行周年动态测定。【结果】老鼠簕根、茎、叶部内生细菌总量年平均分别为 12.25×10^7 、 7.59×10^7 和 5.72×10^7 ind./g(FW); 而可培养内生细菌总量年平均分别为 3.98×10^3 、 3.70×10^3 和 2.18×10^3 CFU/g(FW)。【结论】老鼠簕植株体内含有大量的内生细菌,根部含量最高,茎部次之,叶部最少。但分离的可培养内生细菌占比极少(仅为 0.000 2%–0.146 8%)。老鼠簕内生细菌总量及可培养内生细菌总量均随采样季节不同而呈现波动性变化,内生细菌总量最大值出现在夏季(7月),可培养内生细菌总量最大值出现在春季(3月)。

关键词: 老鼠簕, 内生细菌, 时空动态

Spatiotemporal dynamic of endophytic bacteria numbers in *Acanthus illicifolius*

LIN Qiao-Ling^{1,2} YAN Yu-Ning¹ HE Hong^{1*} SUN Xing-Tao¹ YANG Ding-Xiang¹

(1. Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

(2. Guangdong Agricultural Research and Development Center for Horticulture Technology, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: [Objective] To study the spatiotemporal dynamic of endophytic bacteria numbers in *Acanthus illicifolius*. [Methods] Annual dynamic of total endophytic bacteria and culturable endophytic bacteria in different organs of *A. illicifolius* were studied using fluorescence microscopy and plate counting method, respectively. [Results] The number of total endophytic bacteria in roots, stems and leaves was 12.25×10^7 , 7.59×10^7 and 5.72×10^7 ind./g(FW) successively. And the number of culturable endophytic bacteria corresponds to 3.98×10^3 , 3.70×10^3 and 2.18×10^3 CFU/g(FW). [Conclusion] There were numerous endophytic bacteria in *A. illicifolius*. The highest concentration of endophytic bacteria was in roots, followed by stems and leaves. Culturable endophytic bacteria accounted for only 0.000 2%–0.146 8% of total endophytic bacteria in *A. illicifolius*. The fluctuation

Foundation item: Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2015A020209126)

*Corresponding author: E-mail: hehong893@163.com

Received: December 02, 2016; Accepted: February 20, 2017; Published online (www.cnki.net): February 27, 2017

基金项目: 广东省科技计划项目(No. 2015A020209126)

*通讯作者: E-mail: hehong893@163.com

收稿日期: 2016-12-02; 接受日期: 2017-02-20; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-02-27

of the number of total endophytic bacteria and culturable endophytic bacteria in *A. illicifolius* varied greatly with the change of seasons. The number of total endophytic bacteria in *A. illicifolius* was highest in summer (July). While the number of culturable endophytic bacteria in *A. illicifolius* was highest in spring (March).

Keywords: *Acanthus illicifolius*, Endophytic bacteria, Spatiotemporal dynamic

植物内生菌作为植物微生态系统中的重要成员,几乎所有健康植物各组织器官中都能检测出内生菌的存在。内生菌与其宿主植物存在共生、互惠或互养关系,在宿主植物健康生长发育及繁殖中具有十分重要的生理生化作用^[1]。

红树林是一种特殊植物群落的统称,由于红树林受到周期性海水浸淹,生境特殊,导致其内生及根际土壤微生物具有独特性质。现已从红树体内及根际土壤中分离获得大量的微生物菌株,这些菌株很多具有特殊的代谢方式,能合成多种具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤等重要用途的代谢产物,在生物制药及农业植物病害生物防治中显示出广阔的应用前景,成为国内外研究热点之一^[2-3]。

老鼠簕(*Acanthus illicifolius* L.)为生长在热带海岸地带的爵床科(Acanthaceae)灌木型红树植物,高约 0.5 m–1.5 m,在我国主要生于南部海岸(广东、广西、福建等),为红树林重要组成之一。它是一种药用植物,富含生物碱类、黄酮类、三萜类等活性成分,具有抗氧化、止痛和抗炎等作用,在民间常用于治疗急慢性肝炎、哮喘、咳嗽、蛇伤等^[4-8]。目前有关老鼠簕根际土壤微生物及其内生真菌、内生放线菌的分离与活性研究等已有报道^[9],但有关老鼠簕内生细菌数量的测定及其周年动态变化的研究目前尚未见报道。本研究采用荧光显微计数法和平板分离法,对来源于广东省湛江市红树林自然保护区的老鼠簕植株内生细菌总量和可培养内生细菌总量进行调查,以明确其内生细菌分布规律,为进一步开发利用老鼠簕内生细菌资源奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试植物

分别于 2010 年 1、3、5、7、9、11 月在广东省湛江市麻章区库竹大桥红树林自然保护区一块

0.5 km² 的面积内随机采集老鼠簕(*A. illicifolius*)全株植株,对应编号放入无菌保鲜袋,并立即带回实验室,24 h 内完成内生细菌的分离。

1.2 供试培养基

内生细菌平板计数测定采用海水 NA 培养基^[10],分装后 1×10⁵ Pa 灭菌 20 min。

1.3 主要试剂和仪器

牛肉浸膏、蛋白胨、琼脂,北京奥博星生物技术有限责任公司;甲醛、吡啶橙染色液(1 g/L)、香柏油,北京诺博莱德科技有限公司;黑色微孔滤膜(0.2 μm),北京中西远大科技有限公司。

旋片真空泵(2X2-4 型),浙江黄岩宁溪医疗器械;生化培养箱(LRH-250A),上海博迅实业有限公司;荧光显微镜(Olympus BH22),Olympus 公司;取液器(1 000 μL),Eppendorf 公司。

1.4 样品的消毒和制备

参考文献[10]分离红树植物内生细菌的方法对老鼠簕植株进行表面消毒。首先用自来水冲洗样品表面,洗净晾干后,分别称取其根、茎、叶各 5 g,在超净工作台用 75%酒精进行表面消毒(30 s),再用 0.1%升汞进行消毒(根和茎浸泡 1 min,叶 30 s),最后用无菌海水冲洗 3 次,去除表面残留药剂。消毒完毕后用无菌剪刀充分剪碎样品,然后加入 20 mL 无菌海水,于灭菌研钵中轻微研磨,浸泡 15 min,备用。

吸取最后一次冲洗过植物组织块的无菌海水 100 μL,将其涂布于海水 NA 培养基上,并置于 25 °C 黑暗培养箱中培养 2–5 d,以检查表面消毒效果。

1.5 可培养内生细菌总量的测定

吸取上述研磨后的样品浸泡液 100 μL,将其涂布于海水 NA 培养基上。放置于 25 °C 黑暗培养箱中培养 2–5 d,观察细菌菌落并计数。每处理 3 个重复,挑取单菌落纯化后保存。

1.6 内生细菌总量的测定

参考赵海萍等^[11]测定海洋细菌的方法并略加改进: 吸取上述研磨后的样品浸泡液 1 mL, 加入 40% 甲醛溶液固定 3 min, 吸取 100 μ L 该固定液, 转移至抽滤装置管中(带有黑色微孔滤膜), 并滴加 1-2 滴 0.01% 吖啶橙染色剂, 染色 3 min 后真空抽滤。将滤膜取出放置于载玻片上, 滴加香柏油, Olympus BH22 荧光显微镜下 100 倍观察计数, 观察 30 个不同视野, 每个样品重复 3 次并求其平均值。依据下列公式计算内生细菌总量: $E=(\bar{X}\times S_1\times V_0)/(m\times S_2\times V_1)$ 。其中, E : 样品中的细菌含量(个/g); \bar{X} : 计数视野细菌数量的平均值(个); S_1 : 滤膜面积(mm^2); S_2 : 显微镜的视野面积(mm^2); V_0 : 浸泡样液体积, 即 20 mL; V_1 : 过滤样液体积, 即 0.1 mL; m : 植物样品质量(g)。

1.7 数据处理

所测数据采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析, Excel 2003 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 老鼠簕内生细菌总量及其动态变化

老鼠簕内生细菌总量及时空动态变化测定结果表明(图 1), 老鼠簕体内含有大量的内生细菌, 老鼠簕根、茎、叶部内生细菌年平均总量分别为 12.25×10^7 、 7.59×10^7 和 5.72×10^7 ind./g(FW)。根部含量最高, 茎部次之, 叶部最少。

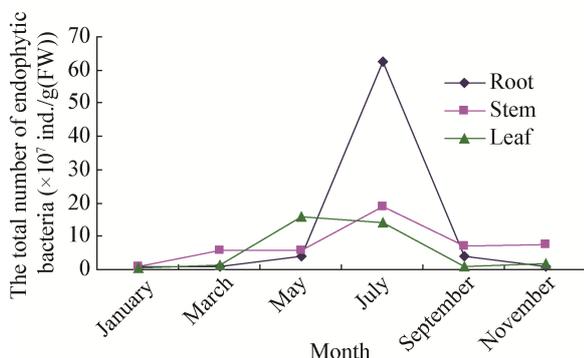


图 1 老鼠簕内生细菌总量的时空变化
Figure 1 Spatiotemporal changes of the total number of endophytic bacteria in *Acanthus illicifolius*

从图 1 可以看出, 不同时期老鼠簕植株不同部位其内生细菌总量表现出不同变化趋势。其中根部和茎部变化趋势相似, 均表现为 1-7 月逐渐上升, 7 月份达到最大值, 7-11 月逐渐下降, 其中根部最大值达 62.62×10^7 ind./g(FW), 茎部最大值为 19.12×10^7 ind./g(FW); 而叶部表现为 1-5 月缓慢上升, 5 月份达到最大值, 为 15.63×10^7 ind./g(FW), 5-9 月逐渐下降, 9-11 月又略上升, 综合老鼠簕全株(根、茎、叶)来看, 其内生细菌总量最大值出现在夏季(7 月)。

2.2 老鼠簕可培养内生细菌总量的时空变化

老鼠簕可培养内生细菌总量及其时空动态变化测定结果表明(图 2), 老鼠簕体内分离的可培养内生细菌总量以根部的含量最高, 年平均达 3.98×10^3 CFU/g(FW); 其次为茎部, 年平均达 3.70×10^3 CFU/g(FW); 叶部最少, 年平均为 2.18×10^3 CFU/g(FW)。

从图 2 可以看出, 老鼠簕根、茎、叶三者可培养内生细菌总量的变化趋势基本相似: 1-3 月数量逐渐增多, 3 月份达到最大值, 3-9 月逐渐下降; 9-11 月又略上升, 可见老鼠簕植株可培养内生细菌总量最大值出现在春季(3 月)。

2.3 老鼠簕可培养内生细菌占其相应内生细菌总量的比率分析

从表 1 可看出, 从老鼠簕植株根、茎、叶中分离出可培养内生细菌, 其数量分别占其相应部

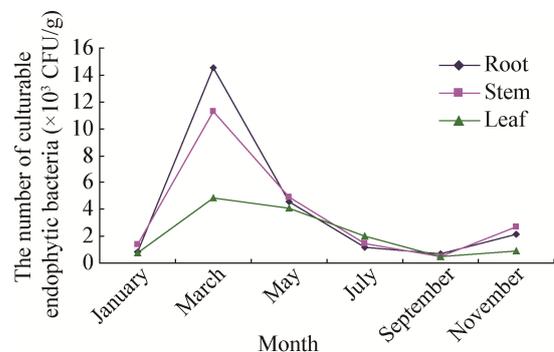


图 2 老鼠簕可培养内生细菌总量的时空变化
Figure 2 Spatiotemporal changes of the number of culturable endophytic bacteria in *Acanthus illicifolius*

表 1 老鼠簕可培养内生细菌总量占其内生细菌总量的比率

Table 1	Proportion of the culturable number in the total number of endophytic bacteria in <i>Acanthus ilicifolius</i> (%)						
部位	1月	3月	5月	7月	9月	11月	平均值
Organs	January	March	May	July	September	November	Average
Root	0.008 0	0.146 8	0.011 4	0.000 2	0.001 7	0.023 7	0.032 0
Stem	0.018 6	0.019 9	0.008 7	0.000 7	0.000 7	0.003 7	0.008 7
Leaf	0.014 9	0.040 7	0.002 6	0.001 4	0.005 0	0.005 1	0.011 6

位内生细菌总量的 0.032 0% (0.000 2%–0.146 8%)、0.008 7% (0.000 7%–0.019 9%)和 0.011 6% (0.001 4%–0.040 7%)，老鼠簕植株中可培养内生细菌总量要远小于内生细菌总量，说明所采用的海水 NA 培养基只能分离培养出极少部分内生细菌，绝大多数内生细菌在该培养基上不可培养或难培养。

3 讨论

由于荧光显微计数法具有简单方便、快速准确的优点，目前该方法被广泛应用于测定各种水环境的细菌总数，在海洋微生物资源调查中也有广泛应用^[12]，但将该方法应用于红树内生细菌的资源调查则鲜见报道。近年来，卢乃会等^[13-14]将该方法应用于红树植物秋茄、桐花树内生细菌的资源调查，研究结果证实相应植株根、茎、叶内均含有大量的内生细菌。本研究从老鼠簕植株中同样可观察到上述现象，说明该方法应用于红树内生细菌的含量测定是稳定可靠的。但通过传统的平板分离法对其内生细菌进行分离却发现，老鼠簕植株可培养内生细菌总量占其内生细菌总量比率仅为 0.000 2%–0.146 8%，证实老鼠簕植株中内生细菌总量要远大于可培养内生细菌总量，说明本研究所采用的海水 NA 培养基只能分离培养出极少部分内生细菌，绝大多数内生细菌在该培养基上不可培养或难培养，这与卢乃会等^[13-14]从秋茄、桐花树中获得的相关研究结果相似。有报道认为，平板分离法只能观察到适合在人工培养基上生长的细菌类群，而大部分细菌类群不能人工培养，因此该法只能反映自然环境中极其有限的细菌数(<5%)^[15]，本研究结果也证实了这一点。但由于不同培养基对可培养细菌存在一定的选择

性，本研究仅采用一种培养基(海水 NA 培养基)进行分离培养，难以反映老鼠簕可培养内生细菌的客观数量，因此在分离老鼠簕内生细菌时选择多种具有不同选择性的分离培养基也许可以获得较为丰富的细菌种群。

有研究认为，内生菌可能对寄主植物的种类乃至相应定殖部位都有一定的选择倾向^[16]。从本研究结果来看，老鼠簕植株根、茎、叶内均含有大量的内生细菌，但以根部的含量最高，茎部次之，叶部最少；分离的可培养内生细菌也是根部含量最高，茎部次之，叶部最少。分析其原因很可能是老鼠簕大部分内生细菌来源于根际土壤，这些根际细菌最先可能从其根部侵入从而进入其体内，再向上蔓延，但由于受到植株体内天然组织屏障的影响，从而导致体内各部分分布不均，越向末端分布越少。因此根部含量最高，茎部次之，叶部最少。据报道，红树林根部能分泌一些物质，这些渗出物可为细菌的生长提供养分；而内生细菌在其根部定殖又促使根部分泌更多渗出物，从而形成循环，使得根际内生细菌数量大大增加^[17]。这也许可以解释老鼠簕大部分内生细菌来源于根际土壤的原因。

唐依莉等^[1]对不同红树林地区老鼠簕内生放线菌进行分离，结果表明，老鼠簕体内内生放线菌的数量动态变化与其分离部位及季节和环境的影响相关。本研究对广东湛江地区老鼠簕内生细菌数量测定结果表明，夏季(7月)老鼠簕植株内生细菌总量达到最大值；而可培养内生细菌总量根、茎、叶部最大值均出现在春季(3月)。说明老鼠簕内生细菌数量随季节不同而显示出明显的波动，这可能是不同季节的环境因素(降水、温度、湿度、日光等)的变

化直接影响了内生细菌的侵染,同时植物组织的内环境也随着外界环境的变化而变化,从而影响了内生细菌在植株体内的定殖和分布。

目前普遍认为红树内生菌及其活性物质是新型医药研发的重要资源,已有研究者从红树植物中筛选出多株能够产生丰富的抗菌、抗氧化和抗肿瘤活性物质的内生真菌^[18],而老鼠簕作为稀有的药用红树植物,其内生菌及其次生代谢产物的研究显得尤为重要。红树内生菌及其代谢产物不仅是获得新的天然产物及开发新药的潜在资源,同时在农业领域也显示出良好的应用前景。有研究表明,红树林体内含有大量对植物病原真菌和细菌具有较强拮抗和防病作用的海洋细菌,显示出红树内生细菌可能在植物病害生物防治中具有巨大的开发应用潜力^[10]。本课题组近年来已从红树植物中分离筛选到多株对引起香蕉枯萎病、芒果炭疽病、辣椒青枯病、辣椒疫病等植物病害病原菌具有较好拮抗作用的内生细菌菌株,并证实相关菌株能在作物体内定殖并具有促生作用^[19-22]。由此可见,红树内生细菌及其活性物质是不可多得的海洋微生物资源,是良好生防菌株的来源,具有较好的理论与开发利用价值。本文研究了红树植物老鼠簕体内内生细菌的数量及其时空动态变化,研究结果证实老鼠簕植株体内含有大量的内生细菌,其数量随采样季节不同而呈现波动性变化,但采用海水 NA 培养基分离的可培养内生细菌数量极其有限,因此拟进一步采用多种具有不同选择性的培养基对老鼠簕内生细菌进行分离,以期获得更多的内生细菌菌株实体,为老鼠簕内生细菌资源的进一步开发利用打下基础。

参 考 文 献

- [1] Tang YL, Wang R, Hong K. Isolation and environmental adaptation of endophytic actinomycetes in *Acanthus ilicifolius* of different mangrove[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(1): 25-32 (in Chinese)
唐依莉, 王蓉, 洪葵. 不同红树林地区老鼠簕内生放线菌的分离及其环境适应性[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(1): 25-32
- [2] Compant S, Duffy B, Nowak J, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 4951-4959
- [3] Hasegawa S, Meguro A, Nishimura T, et al. Drought tolerance of tissue-cultured seedlings of mountain laurel (*Kalmia latifolia* L.) induced by an endophytic actinomycete I. Enhancement of osmotic pressure in leaf cells[J]. *Actinomycetologica*, 2004, 18(2): 43-47
- [4] Zhong LJ, Huang MY, Zhang JG, et al. Study on the chemical constituents from *Acanthus ilicifolius* Linn. var. *xiamenensis*[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2012, 31(6): 23-28 (in Chinese)
钟林静, 黄明玉, 张建钢, 等. 红树植物厦门老鼠簕的化学成分研究[J]. *中国海洋药物杂志*, 2012, 31(6): 23-28
- [5] Babu BH, Shylesh BS, Padikkala J. Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*[J]. *Fitoterapia*, 2001, 72(3): 272-277
- [6] Babu BH, Shylesh BS, Padikkala J. Tumour reducing and anticarcinogenic activity of *Acanthus ilicifolius* in mice[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002, 79(1): 27-33
- [7] Kapil A, Sharma S, Wahidulla S. Leishmanicidal activity of 2-benzoxazolinone from *Acanthus ilicifolius* *in vitro*[J]. *Planta Medica*, 1994, 60(2): 187-188
- [8] Kumar KTSM, Gorain B, Roy DK, et al. Anti-inflammatory activity of *Acanthus ilicifolius*[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008, 120(1): 7-12
- [9] Wang R, Hong K. Isolation and activity assessment of rhizospheric and symbiotic microbes from bear's-breech (*Acanthus ilicifolius*)[J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 27(3): 24-26 (in Chinese)
王蓉, 洪葵. 老鼠簕(*Acanthus ilicifolius* L.)根际内生菌分离与活性评价[J]. *微生物学杂志*, 2007, 27(3): 24-26
- [10] Chen ZM, He JJ, He H, et al. Isolation and screening of endophytic antifungal bacteria from mangroves[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(3): 18-23 (in Chinese)
陈振明, 何进坚, 何红, 等. 红树林内生细菌的分离及拮抗菌筛选[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(3): 18-23
- [11] Zhao HP, Li QX, Tao JH. Methods of fluorescence enumeration of marine bacteria and application[J]. *Journal of Hebei University of Engineering (Natural Science Edition)*, 2007, 24(1): 57-60 (in Chinese)
赵海萍, 李清雪, 陶建华. 海洋细菌荧光显微计数法及其应用[J]. *河北工程大学学报: 自然科学版*, 2007, 24(1): 57-60
- [12] Li HY, Chen MX, Li G, et al. Occurrence of total and culturable bacteria in Shenzhen coastal waters and their application in the environment assessment[J]. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(4): 487-491 (in Chinese)
李和阳, 陈明霞, 李刚, 等. 深圳海域细菌总数及可培养细菌总数的分布及其在环境评价中的应用研究[J]. *海洋环境科学*, 2011, 30(4): 487-491
- [13] Lu NH, Yan YN, He H, et al. Spatiotemporal dynamic of endophytic bacteria in *Kandelia candel*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2013, 33(4): 7-10 (in Chinese)
卢乃会, 严玉宁, 何红, 等. 红树植物秋茄内生细菌数量时空变化动态初步研究[J]. *广东海洋大学学报*, 2013, 33(4): 7-10
- [14] Lu NH, Yan YN, He H, et al. The spatiotemporal dynamic of

- endophytic bacteria in *Aegiceras corniculatum* and screening and identification of antagonistic bacteria against plant pathogens[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(2): 323-328 (in Chinese)
- 卢乃会, 严玉宁, 何红, 等. 桐花树内生细菌动态及拮抗植物病原菌株筛选鉴定[J]. 热带作物学报, 2014, 35(2): 323-328
- [15] Porter J, Morris SA, Pickup RW. Effect of trophic status on the culturability and activity of bacteria from a range of lakes in the English lake district[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4): 2072-2078
- [16] Adams PD, Klopper JW. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Plant and Soil, 2002, 240(1): 181-189
- [17] Lynch JM, Whipps JM. Substrate flow in the rhizosphere[J]. Plant and Soil, 1990, 129(1): 1-10
- [18] Liu W, Ni H, Huang GL, et al. Screening of endophytic fungi with antibacterial, antioxidant and antitumor activities from mangrove plants[J]. Acta Laser Biology Sinica, 2012, 21(6): 569-574 (in Chinese)
- 刘伟, 倪辉, 黄高凌, 等. 从红树植物中筛选具有抗菌、抗氧化和抗肿瘤活性的内生真菌[J]. 激光生物学报, 2012, 21(6): 569-574
- [19] Yu S, He H, Zhan RL, et al. Purification and bio-control mechanism against mango anthracnoses of antifungal protein of mangrove endophytic bacteria AiL3[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2013, 29(1): 104-109 (in Chinese)
- 余莎, 何红, 詹儒林, 等. 红树内生细菌 AiL3 抗菌蛋白的纯化及其防治芒果炭疽病机理研究[J]. 中国生物防治学报, 2013, 29(1): 104-109
- [20] Liu F, Ou XC, He H, et al. Antifungal activity of endophytic bacterium AmS2 against *Colletotrichum gloeosporioides* and its identification[J]. Acta Phytopythologica Sinica, 2010, 37(5): 453-458 (in Chinese)
- 柳凤, 欧雄常, 何红, 等. 红树内生细菌 AmS2 菌株对芒果炭疽病菌的抑制作用[J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 453-458
- [21] Wang Y, Zhan RL, He H, et al. Antibiotic substances produced by mangrove endophytic bacteria Kc-38 and biocontrol efficacy on anthracnose of postharvest mangoes[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(1): 82-87 (in Chinese)
- 汪远, 詹儒林, 何红, 等. 红树内生细菌菌株 Kc-38 的抗菌物质及对采后芒果炭疽病的防效[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(1): 82-87
- [22] Huang QZ, Lu NH, He H, et al. Colonization and promotion growth of mangrove endophytic bacteria AiL3 in soybean[J]. Soybean Science, 2014, 33(2): 223-227 (in Chinese)
- 黄勤知, 卢乃会, 何红, 等. 红树内生细菌 AiL3 在大豆体内的定殖与促生作用研究[J]. 大豆科学, 2014, 33(2): 223-227