

硼处理根瘤菌胞外多糖提取条件优化

陈永岗,师尚礼,张高宁,臧聪宇,马卉锦,李自立,张辉辉,
李兴龙,周彤,陈建纲

(甘肃农业大学草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/甘肃省草业工程实验室/中一美
草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃兰州 730070)

摘要:为了研究硼处理根瘤菌 12531f 胞外多糖的提取条件,以根瘤菌 12531f 为材料,筛选适宜硼浓度并以此浓度处理为诱导条件,优化三氯乙酸体积分数、醇沉倍数和醇沉时间。结果表明:1 mg/L 的硼处理菌株 12531f 可以显著提高胞外多糖的含量;通过 $L_9(3^4)$ 正交实验发现,在三氯乙酸体积分数 10%、醇沉时间 24 h 的条件下,醇沉倍数由 2 倍提高到 3 倍时,硼处理根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖平均含量最高,达 33.23 $\mu\text{g/mL}$,与优化前相比,胞外多糖含量提高了 56.97%。得到纯度高、含杂量低的胞外多糖,有利于进行进一步结构鉴定和分析,为硼处理根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖的进一步研究奠定良好基础。

关键词:硼;根瘤菌;胞外多糖;正交设计

中图分类号:S541.1;Q93

文献标志码:A

文章编号:1009-5500(2021)02-0040-08

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2021.02.006

苜蓿是一种多年生优质豆科牧草,因其耐干旱、耐贫瘠、品质好和经济价值高,被誉为“牧草之王”^[1]。根瘤菌可与豆科植物形成共生关系,并在植物根部结瘤固氮^[2]。苜蓿接种根瘤菌,是提高苜蓿产量和品质的重要措施^[3-4]。但由于宿主和根瘤菌种类以及其他因素的影响,使根瘤菌的结瘤能力千差万别,部分根瘤菌难以高效地与豆科植物结瘤固氮,达到应有的增产效果^[5]。近年来,内生根瘤菌研究兴起,通过根瘤菌对苜蓿的侵染、运移、定殖^[5-6],内生于次代种子,构建种子与根瘤菌共生体,以便于内生根瘤菌在种子萌发时优先结瘤固氮。因此如何提高根瘤菌接种效果一直是豆科植物固氮体系构建研究的热点。

研究表明,根瘤菌产生的胞外多糖(EPS)可以减弱或规避根瘤菌侵染宿主时遇到的防御反应,保护自

身免受宿主防御^[7],或在侵染过程中诱导菌体和宿主合成水解酶,引起宿主胞壁结构变化从而减弱宿主植物的防御反应,促进根瘤菌的侵染^[8]。苗阳阳等^[9]研究发现添加硼可以促进根瘤菌胞外多糖的合成,同时增强根瘤菌的侵染能力,提高根瘤菌在苜蓿各组织中的定殖数量^[10]。缺硼会导致糖脂和多糖减少,膜厚度降低^[11],减弱根瘤菌的固氮能力^[12]。根瘤菌与宿主间能否成功共生主要取决于其对宿主防御反应的阻碍或抵御的能力^[13]。研究发现根瘤菌侵染宿主时可以通过分泌胞外多糖来阻遏宿主的防御反应^[14],促进根瘤菌的侵染。因此,提取高含量高纯度的根瘤菌胞外多糖对于研究硼促进根瘤菌合成胞外多糖及侵染宿主的机制显得尤为重要,同时也为深入研究根瘤菌胞外多糖的生物学功能奠定基础。

胞外多糖的分离过程一般包括分离菌体、除蛋白、除色素、沉淀 EPS 等^[15]。除蛋白常用三氯三氯乙烷法、三氯乙酸法、酶解法和 Sevag 法等^[16]。传统脱色方法是 H_2O_2 脱色和活性炭脱色^[17]。树脂吸附是 20 世纪发展起来的新脱色工艺,具有稳定性高、脱色效果好、时间短、速度、多糖保留率高等优点。罗玺等^[18]通过大孔树脂脱色法对颜色较深、杂质较多的灵芝多糖

收稿日期:2020-04-02; **修回日期:**2020-04-20

基金项目:国家农业产业技术体系项目(CARS-34)资助

作者简介:陈永岗(1988-),男,甘肃定西,在读硕士研究生。

E-mail:1547558857@qq.com

师尚礼为通讯作者。

E-mail:shishl@gsau.edu.cn

进行脱色处理,脱色率达到 85%以上,脱色效果显著,可将其应用到乳酸菌粗多糖的脱色。Zhou 等^[19]采用 DEAE 色谱分离法分离组分,并采用 Sepharose CL-6B 色谱对单一组分进一步纯化,纯化效果较好。

已有研究对细菌、乳酸菌和真菌等的胞外多糖提取条件进行了深入探讨^[20-22],然而,硼处理苜蓿根瘤菌胞外多糖提取条件的优化鲜见报道。基于此,本研究以苜蓿根瘤菌 12531f 为研究对象,筛选适宜的硼浓度,并通过正交试验优化硼处理根瘤菌胞外多糖的提取条件,为进一步深入研究根瘤菌胞外多糖的结构和生物学功能奠定良好的基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

根瘤菌:由草业生态系统教育部重点实验室提供的荧光标记根瘤菌 *Ensifer meliloti* 12531f(12531f)。其原始菌株为 *E. meliloti* 12531(购自中国科学院微生物保藏中心,分离自中华苜蓿的根瘤菌)。

硼:购自于天津市凯通化学试剂有限责任公司,含量不少于 99.5%。

YMA 固体培养基配方:甘露醇 10 g;K₂HPO₄ 0.5 g;MgSO₄ · 7 H₂O 0.2 g;NaCl 0.1 g;酵母粉 1g;调节 pH 为 6.8~7.0,用蒸馏水定容至 1 L。YMA 固体培养基添加琼脂:15~20 g/L。

1.2 试验方法

1.2.1 硼浓度梯度的设置以及培养基的配制 配制硼浓度梯度为 0(CK)、0.05、1、5、10 和 100 mg/L。将硼酸置于无菌三角瓶中,在无菌操作台杀菌 30 min 后,用无菌滤膜(0.22 μm)过滤 3 次,然后按浓度梯度加入已配制好的 40 mL YMA 液体培养基中,每个处

理 3 个重复。以上操作均在无菌操作台进行。

1.2.2 荧光标记根瘤菌的活化 将保存于甘油的根瘤菌 12531f 接种到 YMA 固体培养基,在培养箱 28℃,培养 24 h。

1.2.3 根瘤菌 12531f 适宜硼浓度的筛选 将上述活化后的菌株接种到 50 mL YMA 液体培养基,在 28℃,180 r/min 培养至 $D_{600nm}=0.5\sim 0.8$,将该菌液取 5 mL 加入到上述不同浓度梯度的 40 mL YMA 液体培养基。将该菌液在 28℃,180 r/min 培养,在不同的时间段测定 D_{600nm} 值,比较硼浓度与对照的大小,确定菌株 12531f 的适宜硼浓度。

1.2.4 适宜硼浓度对根瘤菌胞外多糖含量的影响

配制上述所选适宜硼浓度,加入配制好的 40 mL YMA 液体培养基中,对照不加硼液,每处理 3 次重复。将活化后在 50 mL YMA 液体培养基中培养至 $D_{600nm}=0.5\sim 0.8$ 的该菌株菌液加入上述已配好的适宜硼浓度的 40 mL 液体培养基中,加入体积与 2.3 相同。然后在 28℃,180 r/min 培养 72 h,在 4℃下,10 000 r/min 离心 10 min,得根瘤菌上清液。

1)标准曲线的制作 葡萄糖标准曲线制作过程如下:取 8 支干净的试管,分别编号 1—8;按下表顺序用移液枪分别加入 100 μg/mL 葡萄糖标准溶液和蒸馏水,然后加入 1 mL 6%苯酚溶液,摇匀;再加入 5 mL 浓硫酸,在恒温下放置 5 min,至沸水浴中(此次试验沸水浴是 95℃)加热 15 min;取出后用水冲洗试管外壁,使其迅速冷却到 25℃后,用分光光度计测定 485 nm 波长下的吸光度;然后以吸光值为横坐标,以葡萄糖浓度为纵坐标,利用 Excel 软件绘制标准曲线,得标准曲线方程为: $y=54.4858x-0.01024$, $R^2=0.9921$; x 为浓度(μg/mL)。

表 1 葡萄糖标准曲线制作表

Table 1 The chemical composition of glucose standard curve

管号	1	2	3	4	5	6	7	8
葡萄糖/mL	0.0	0.1	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2
蒸馏水/mL	2.0	1.9	1.8	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8
苯酚/mL	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
浓硫酸/mL	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

2)胞外多糖分泌量的测定(苯酚-硫酸法) 苯酚-硫酸法的原理是在 H₂SO₄ 存在条件下,多糖可以水解成单糖,而单糖可以与苯酚反应生成橙黄色化合物,其可脱水形成衍生物糖醛,该橙黄色化合物在 485 nm 波

长处有最大吸收峰,在 10~100 mg 其颜色变化与糖的含量成正比例,因此可以用比色法在 485 nm 波长下测定其中糖含量,利用葡萄糖的标准曲线,换算出糖的含量^[23]。

胞外多糖提取参考文献^[15]的方法进行。具体实验步骤如下:菌株培养方法同上,培养 72 h 后,在 4℃ 下,离心 10 min(15 000 r/min),弃沉淀,收集上清液;各取离心上清液 5 mL 于 10 mL 离心管中,按 Sevag 液:上清液=1:4 加入 Sevag 液,振荡 30 min,离心 10 min(6 000 r/min),弃沉淀,反复处理 3 次;将上清液移到 50 mL 离心管中,加入 3 倍体积 95%乙醇,4℃ 冰箱中浸提 12 h,4℃ 离心 45 min(10 000 r/min),并收集沉淀,弃上清液;在超净工作台内风干,即得粗多糖,加入 2 mL 蒸馏水使其完全溶解,放入 4℃ 冰箱,以备后用。

将上述样品溶液,按标准曲线中的测定方法,测定样品溶液的吸光值,按标准曲线回归方程计算待测溶液的糖含量。

1.2.5 适宜硼浓度处理根瘤菌株 12531f 胞外多糖提取条件优化 1)TCA 体积分数确定 取 15 个 10 mL 离心管加入上述制备的上清液 2 mL,分别加入体积分数为 1%、5%、10%、15%、20%的三氯乙酸溶液(3 个重复),反应 12 h 后,4℃,10 000 r/min,离心 45 min,将上清液移至新的 10 mL 离心管中,加入三倍体积的 95%的乙醇溶液,4℃ 冰箱中浸提 12 h 后,4℃,10 000 r/min,离心 45 min,弃上清液。向沉淀中加入 2 mL 蒸馏水使粗制多糖溶解,然后移至新的 10 mL 试管中,加入 1 mL 6%的苯酚溶液,摇匀,再加入 5 mL 的浓硫酸,放置 5 min 后置于沸水浴(95℃)中加热 15 min;取出并使其迅速冷却到 25℃,用分光光度计于 485 nm 测定吸光度。根据葡萄糖标准曲线计算根瘤菌胞外多糖的含量。

2)醇沉倍数确定 方法同上,在离心管中加入上清液后,加入上述所选最适体积分数的 TCA 溶液,反应 12 h 后,在 4℃,10 000 r/min,离心 45 min 取上清液,将上清液移至新的 10 mL 离心管中分别加入 1、2、3、4、5 倍体积的 95%乙醇溶液,每处理 3 个重复,用 1.2.5 方法,计算胞外多糖含量。

3)醇沉时间确定 方法同上,在离心管中加入上清液,加入体积分数 10%的 TCA 溶液,反应 12 h 后,4℃,10 000 r/min,离心 45 min 获取上清液,加入上述所选最适醇沉倍数的 95%乙醇溶液,4℃ 冰箱中分别浸提 6,12,24,36,48 h,每处理 3 个重复,用 1.2.5 方法,计算胞外多糖含量。

根据上述试验结果,选取影响苜蓿根瘤菌胞外多

糖提取的 3 个主要因素:TCA 体积分数(A)、醇沉倍数(B)、醇沉时间(C),以苜蓿根瘤菌胞外多糖含量为考察指标,进行 $L_9(3^4)$ 正交试验(表 1)。

表 2 根瘤菌胞外多糖提取工艺优化 $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平

水平	因素		
	三氯乙酸体积分数/%	醇沉倍数	沉醇时间/h
1	5	1	12
2	10	2	24
3	15	3	36

2 结果与分析

2.1 适宜硼浓度的筛选

适量的硼处理可以促进根瘤菌 12531f 的生长。20 min 时,除 0.05 和 10 mg/L 硼处理菌株生长速度与对照差异显著($P<0.05$),其余处理与对照均差异不显著($P>0.05$);60 min 时,与对照相比硼处理菌株生长速度均不显著($P>0.05$);100 min 时,当硼浓度大于 0.05 mg/L 时,菌株生长速度均显著大于对照($P<0.05$),其余处理与对照相比差异不显著($P>0.05$);140 min 时,当硼浓度为 1 mg/L 时菌株生长速度显著高于对照($P<0.05$),其余处理与对照差异均

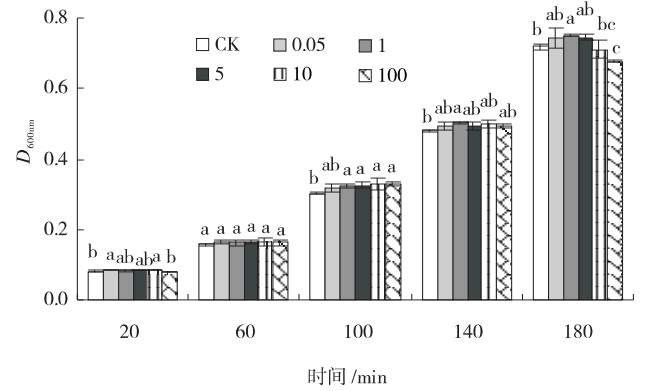


图 1 不同浓度硼处理下根瘤菌 12531f 菌株的 D_{600nm}
Fig. 1 Effects of different boron concentrations on D_{600nm} in 12531f

注:图中 CK、0.05、1、5、10 和 100 表示培养基中添加 0、0.05、1、5、10 和 100 mg/L 硼;不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同

不显著($P>0.05$);180 min 时,当硼浓度为 1 mg/L 时根瘤菌生长速度显著高于对照($P<0.05$),其余处理除添加 100 mg/L 的硼处理生长速度显著低于对照外,均与对照差异不显著($P>0.05$)(图 1)。

结合本课题组苗阳阳的试验结果(1 mg/L 硼处理根瘤菌 12531f 接种紫花苜蓿时,更有利于其在紫花苜蓿体内运移和定殖。),确定本试验中根瘤菌 12531f 菌株的适宜硼浓度为 1 mg/L。

2.2 硼对根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖含量的影响

1 mg/L 硼处理菌株 12531f,与对照相比可显著提高胞外多糖含量($P<0.05$),提高 25.9%(图 2)。

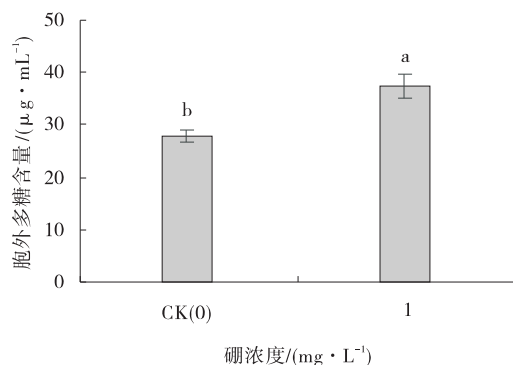


图 2 不同浓度硼处理下根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖的含量

Fig. 2 Effects of boron concentration on the concentration of extracellular polysaccharides by rhizobia 12531f

2.3 硼处理根瘤菌 12531f 菌株产胞外多糖提取条件优化

2.3.1 三氯乙酸体积分数对胞外多糖含量的影响

随三氯乙酸体积分数的增加,胞外多糖含量呈先上升后下降的趋势,在三氯乙酸体积分数为 10% 时胞外多糖含量达最大。选择此时的三氯乙酸体积分数(10%)进行后续试验(图 3)。

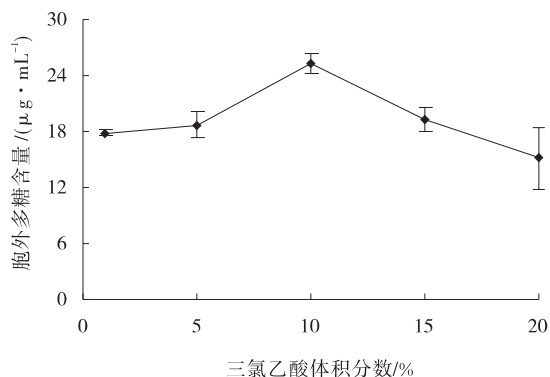


图 3 不同三氯乙酸体积分数下胞外多糖的含量

Fig. 3 Effects of trichloroacetic acid volume fraction on the concentration of extracellular polysaccharide

2.3.2 醇沉倍数对胞外多糖含量的影响 随醇沉倍数的增加胞外多糖含量呈先上升后缓慢下降的趋势,当醇沉倍数为 2 倍时胞外多糖含量达最大。选择 2 倍醇沉倍数进行后续试验(图 4)。

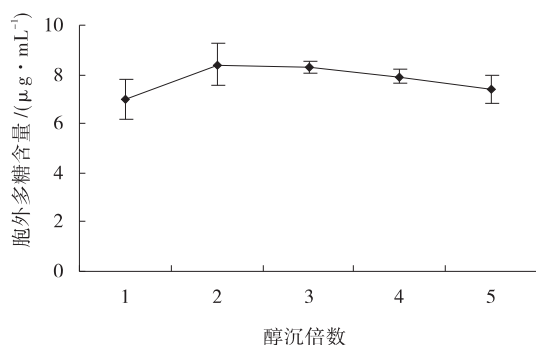


图 4 不同醇沉倍数下胞外多糖的含量

Fig. 4 Effects of the volume of alcohol for precipitation on the concentration of extracellular polysaccharide

2.3.3 醇沉时间对胞外多糖含量的影响 随醇沉时间的增加胞外多糖含量呈先缓慢上升之后又下降的趋势,醇沉时间为 24 h 时胞外多糖含量达最高(图 5)。选择 24 h 为醇沉时间进行后续试验。

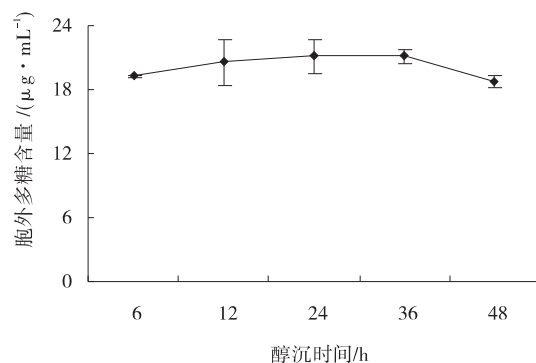


图 5 醇沉时间对胞外多糖含量的影响

Fig. 5 Effects of alcohol precipitation time on the concentration of extracellular polysaccharide

2.3.4 $L_9(3^4)$ 正交试验 在上述试验结果的基础上,通过正交试验得到硼处理根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖含量提取条件优化结果(表 3),各因素极差大小次序为 $A>B>C$,各因素的变化对根瘤菌胞外多糖提取影响的大小次序为:三氯乙酸>醇沉倍数>醇沉时间;从各因素在不同水平下的胞外多糖均值含量可知,胞外多糖的最优提取条件为 $A_2B_3C_2$ 。表 4 方差分析中 F 值大小次序为 $F_A>F_B>F_C$,表明各因素对硼处理根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖提取的影响情况与表 3 正交试验分析结果一致,三氯乙酸体积分数对硼处理根瘤菌胞外多糖提取的影响显著($P<0.05$),其余两

因素影响不显著。

综合上述分析,结合单因素试验得硼处理根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖提取的最优条件为:三氯乙酸体积分数为10%,醇沉倍数为3倍,醇沉时间为

24 h。在此最优条件下进行验证试验,平行试验 3 次得到硼处理根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖含量平均值为 33.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与优化前相比胞外多糖含量提高了 56.97%。

表 3 根瘤菌胞外多糖提取正交试验

试验号	因素			胞外多糖含量
	A:三氯乙酸	B:醇沉倍数	C:醇沉时间	$/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$
1	1(5%)	1(1 倍)	1(12)	15.52
2	1	2(2 倍)	2(24)	15.45
3	1	3(3 倍)	3(36)	16.79
4	2(10%)	1	2	27.56
5	2	2	3	20.76
6	2	3	1	26.06
7	3(15%)	1	3	16.44
8	3	2	1	14.81
9	3	3	2	26.83
均值 $k1/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	15.92	19.84	18.79	
均值 $k2/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	24.79	16.79	23.28	
均值 $k3/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	19.36	23.22	17.75	
R	8.87	6.43	5.53	

表 4 正交试验方差分析

Table 4 ANOVA of orthogonal test						
因素	偏差平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
三氯乙酸体积分数(A)	120.09	2	60.05	24.74	0.04	显著
醇沉倍数(B)	58.18	2	29.09	11.99	0.07	不显著
醇沉时间(C)	48.65	2	24.33	10.02	0.09	不显著
误差	4.85	2	2.43			

注: $R^2=0.979$ (调整 $R^2=0.916$), $P<0.05$ 表示差异显著

3 讨论

3.1 适宜硼浓度的筛选

$D_{600\text{nm}}$ 值表示被检测细菌所吸收的光密度值,在此波长下,同一种细菌菌悬液的浓度与被吸收的能量成定量关系。因此,可以用 $D_{600\text{nm}}$ 值表示所测细菌在特定试验条件下含有的细菌相对数目,以此来反映细菌的相对生长量^[24]。细菌的生长主要是指细胞繁殖而引起的细菌细胞数目的增多,包括细菌胞内所有物质的倍增^[25]。本研究发现,与对照相比,硼浓度为 1 mg/L 时,根瘤菌 12531f 菌株的 $D_{600\text{nm}}$ 增加最显著,说明适宜浓度的硼可以加速细胞分裂,使细胞数目增加^[9]。

Montanari 等^[26]研究发现细菌遭遇环境胁迫时,会产生一系列的生理应激反应来响应环境胁迫,包括蛋白质复合物的重组,代谢物质变化以及细胞形态的变化,本研究表明硼胁迫引发了根瘤菌内响应机制,使体内某些代谢途径或酶发生变化,继而使生长加快。Lee 等^[27]也发现 *Lactobacillus plantarum* 受到碱胁迫时,菌体细胞会分散成单个菌落,菌体明显变长,长丝状菌体生长加快。钙调蛋白是广泛存在于真核生物体内的蛋白质,与细胞内很多酶的活性有关^[28],已有研究发现原核生物体内存在类钙调蛋白,其与原核生物体内孢子形成,细胞分裂,异型细胞形成等有关^[29],硼对根瘤菌繁殖的影响可能与根瘤菌体内的类钙调蛋白的作

用有关。根瘤菌的繁殖和个体的生长依赖于胞内物质的合成和加倍,硼可以促进根瘤菌体内一些酶的活性^[30],继而促进根瘤菌的繁殖和生长。

3.2 硼对根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖含量的影响

根瘤菌产生的胞外多糖不仅可以富集环境中的营养元素,还参与根瘤菌与宿主植物相互作用时的信号交流,在促进根瘤菌侵染宿主、改变宿主植物的根毛细胞骨架结构、决定宿主专一性、参与自身抵御宿主防御系统反应等过程中扮演着不可替代的作用^[31]。硼与根瘤菌胞外多糖和脂多糖(LPS)的形成有关^[32],适宜浓度硼可以引起菌丝生物量积累并可能引起糖代谢障碍以及菌体可溶性糖的分泌^[33],研究表明适宜浓度的硼可以显著促进根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖的含量。适宜浓度的硼通过影响微生物体内碳水化合物的能量代谢^[34],继而影响根瘤菌体内胞外多糖的合成。同时适宜浓度硼可以调节根瘤菌体内某些代谢通路及其相关酶的活性,间接促进胞外多糖的分泌量^[30]。

3.2 硼处理根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖提取条件的优化

目前,根瘤菌胞外多糖提取工艺仍存在提取方法不纯熟、提取量少、效率低等缺点,与其他脱蛋白方法相比,适宜的三氯乙酸可以提高胞外多糖提取过程中脱蛋白效率,减少胞外多糖的损失^[35]。本研究表明,三氯乙酸体积分数为 10% 时,硼处理根瘤菌 12531f 菌株的胞外多糖提取含量最高。硼处理菌株 12531f 胞外多糖提取过程中,适宜的醇沉倍数降低了多糖的溶解度^[36],有利于多糖的析出,同时也有助于小分子和水溶性大分子色素的脱去并减少乙醇的浪费^[37],提高胞外多糖提取量及纯度。醇沉时间在胞外多糖提取过程中也尤为重要,时间太短,胞外多糖不能够充分析出,继而影响胞外多糖提取量,时间太长会影响胞外多糖的纯度^[38]。

正交试验法是在全面试验组合中挑选出代表性强的少数试验组合,并通过对其结果进行分析,推断出最优因素水平组合,其优点是简单易行、高效省时,具有较大的利用价值,但缺点是它仅对孤立试验点进行分析,而无法找到整个区域上因素的最佳组合^[39-40]。本试验在提高胞外多糖含量时,从经济成本和时间成本考虑,改变提取条件,分别进行单因素试验和正交试验,从而得到根瘤菌胞外多糖的最佳提取条件,所得产量相比优化前提高了 56.97%。

4 结论

以苜蓿根瘤菌 12531f 菌株为研究材料,筛选出适宜硼浓度为 1 mg/L。用此浓度硼处理根瘤菌 12531f 菌株,采用三氯乙酸提取为基础,乙醇沉淀的方法提取胞外多糖,在三氯乙酸体积分数、醇沉倍数、醇沉时间各单因素试验的基础上,采用正交试验得硼处理根瘤菌 12531f 菌株胞外多糖的最佳提取条件:三氯乙酸体积分数为 10%、醇沉倍数为 3 倍、醇沉时间为 24 h。在该条件下,试验提取所得胞外多糖含量为 33.23 $\mu\text{g/mL}$,较优化前胞外多糖含量提高了 56.97%。

参考文献:

- [1] 戚志强,王永雄,胡跃高,等. 当前我国苜蓿产业发展的形势与任务[J]. 草业学报,2008,17(1):107-113.
- [2] Endre G, Kereszt A, Kevei Z, *et al.* A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development [J]. *Nature*, 2002, 417(6892):962-966.
- [3] 宁国赞,刘惠琴,马晓彤. 中国苜蓿根瘤菌大面积应用研究现状及展望[C]//首届中国苜蓿发展大会论文集, 2001:76-82.
- [4] 黄新,王亚琴,刘建新. 接种根瘤菌对不同紫花苜蓿品种结瘤和生物学产量的影响[J]. 浙江农业学报,2005,17(6):391-394.
- [5] 苗阳阳. 外源物质对苜蓿内生根瘤菌运移定殖的影响研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2017.
- [6] 张运婷,师尚礼,苗阳阳,等. 磷酸二氢钾对苜蓿幼苗体内根瘤菌运移及定殖的影响[J]. 草原与草坪,2018,38(3):40-49.
- [7] D' Haeze W, Holsters M. Surface polysaccharides enable bacteria to evade plant immunity[J]. *Trends in Microbiology*, 2004, 12(12):555-561.
- [8] 赵龙飞,徐亚军. 根瘤菌胞外多糖的结构与功能研究进展[J]. 中国酿造,2008,11(12):18-20.
- [9] 苗阳阳,周彤,师尚礼,等. 硼对根瘤菌在紫花苜蓿体内运移和定殖及对幼苗生长的影响[J]. 草业学报,2017,26(4):120-133.
- [10] 李剑峰,张淑卿,师尚礼,等. 几种外源物质对内生根瘤菌侵染苜蓿芽苗并在植株体内运移的影响[J]. 草地学报,2015,23(6):1259-1264.
- [11] Garcia-Gonzalez M, Mateo P, Bonilla I. Boron Requirement for Envelope Structure and Function in *Anabaena* PCC 7119 heterocysts[J]. *Journal of Experimental Bota-*

- ny, 1991, 42(7): 925—929.
- [12] 吴静, 李春俭, 王贺, 等. 缺硼对大豆根瘤结构和功能的影响[J]. 西北植物学报, 1999, 19(3): 439—445.
- [13] Soto J, Rea J, Valderrama M, *et al.* Efficacy of Extended (Six Weeks) Treatment with Miltefosine for Mucosal Leishmaniasis in Bolivia[J]. American Journal of Tropical Medicine & Hygiene, 2009, 81(3): 387—389.
- [14] Kannenberg E L, Perotto S, Bianciotto V, *et al.* Lipopolysaccharide epitope expression of Rhizobium bacteroids as revealed by in situ immunolabelling of pea root nodule sections[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(7): 2021—2032.
- [15] 王路瑶, 汤斌. 根瘤菌胞外多糖的分离纯化及组分分析[J]. 食品与发酵工业, 2019(11): 71—77.
- [16] 王瑞琼, 张红星, 熊利霞, 等. 乳酸菌胞外多糖分离纯化方法研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(8): 700—703.
- [17] 常明泉, 车向前, 江蓉敬. 含多糖中药提取物脱色方法研究进展[J]. 中国药师, 2017(5): 893—895.
- [18] 罗玺, 唐庆九, 张劲松, 等. 灵芝多糖树脂法脱色工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 5—10.
- [19] Zhou K, Zeng Y, Yang M, *et al.* Production, purification and structural study of an exopolysaccharide from *Lactobacillus plantarum* BC-25 [J]. Carbohydrate Polymers, 2016, 144: 205—214.
- [20] 程红兵, 任盛, 谢红, 等. 细菌胞外多糖提取优化及毒性试验研究[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(3): 74—78.
- [21] 刘晶, 张翠茹, 刁春英. 乳酸菌胞外多糖提取条件的研究[J]. 农产品加工(学刊), 2008(5): 22—23.
- [22] 邓振山, 崔凡, 李军, 等. 1株结皮真菌胞外多糖的初步研究[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(2): 62—68.
- [23] 侯文洁. 苜蓿中华根瘤菌胞外聚合物吸附铜机制研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [24] 马晟利, 董雪, 夏雪, 等. 血链球菌细菌素对牙龈卟啉单胞菌生长曲线及胞内钙离子浓度的影响[J]. 口腔医学研究, 2014, 30(2): 108—111.
- [25] 柴瑞娟, 王玉良. 镧和铈对两种细菌生长的影响及胞内DNA的荧光光谱分析[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(7): 1829—1833.
- [26] Montanari C, Kamdem S L S, Serrazanetti D I, *et al.* Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses[J]. Food Microbiology, 2010, 27(4): 493—502.
- [27] Lee K B, Rho B S, Pi K B, *et al.* Proteomic analysis of protein expression in *Lactobacillus plantarum* in response to alkaline stress[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 153(1—2): 1—7.
- [28] Kushwaha R, Singh A, Chattopadhyay S. Calmodulin7 Plays an Important Role as Transcriptional Regulator in Arabidopsis Seedling Development[J]. Plant Cell, 2008, 20(7): 1747—1759.
- [29] 张蔚文. 原核生物中的类钙调蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, 22(2): 98—102.
- [30] Kabu M, Uyarlar C, Zarczynska K, *et al.* The role of boron in animal health[J]. Journal of Elementology, 2015, 20(2): 535—541.
- [31] Spaink, Herman P. Root Nodulation and Infection Factors Produced by Rhizobial Bacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54(1): 257—288.
- [32] Allan D J. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(2): 150—170.
- [33] 罗锦, 王小红, 叶必顺, 等. 外源硼酸抑制柑橘采后绿霉病害 *Penicillium digitatum* 的效果研究[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2018, 17(2): 159—165.
- [34] Qin G, Zong Y, Chen Q, *et al.* Inhibitory effect of boron against *Botrytis cinerea* on table grapes and its possible mechanisms of action[J]. International Journal of Food Microbiology, 2010, 138(1): 145—150.
- [35] 王金玲, 杜文婧, 王琦. 桦褐孔菌胞外多糖脱蛋白工艺比较研究[J]. 吉林农业大学学报, 2010, 32(6): 633—638.
- [36] 刘丽波, 李春, 孟祥晨, 等. 乳酸杆菌胞外多糖高纯度提取工艺的优化[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 182—184.
- [37] 王迎华, 曹郁生, 陈燕, 等. 产胞外多糖乳酸菌筛选及胞外多糖提取方法[J]. 乳业科学与技术, 2007, 30(4): 166—168.
- [38] 陶静, 凌飞跃, 张博, 等. 乳酸乳球菌胞外多糖提取纯化工艺研究[J]. 中国食品添加剂, 2019, 30(10): 100—104.
- [39] 陈敬, 温庆果, 刘韶, 等. 正交设计与响应面法优化壳聚糖对莲子心提取液除杂工艺对比研究[J]. 中草药, 2012, 43(11): 2183—2188.
- [40] 程敬丽, 郑敏, 楼建晴. 常见的试验优化设计方法对比[J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(7): 19—23.