

长春花内生细菌多样性与柑橘黄龙病菌的相关性

李佳¹, 王中康¹, 谢攀¹, 吴东², 殷幼平^{1*}

¹ 重庆大学生物工程学院, 重庆市杀虫真菌生物农药工程技术中心, 重庆市基因功能与调控重点实验室, 重庆 400030

² 亚洲果业广西利添柑橘生物技术公司, 合浦 536128

摘要: 【目的】分析感柑橘黄龙病长春花植株与健康长春花植株不同部位内生细菌菌群结构变化, 为柑橘黄龙病菌与长春花内生细菌的相关性研究提供理论基础。【方法】本研究利用兼性厌氧可培养技术、16S rDNA 限制性片段长度多态性分析 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 以及 16S rDNA 序列分析相结合的方法。【结果】分别从感病和健康长春花叶、茎、根的组织中分离获得 67 株内生细菌, 与 GenBank 中 29 种细菌的相似性达到 97% - 100%。其中短小杆菌属 (*Curtobacterium* sp.)、欧文氏菌属 (*Erwinia* sp.)、蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 为感病长春花内生细菌的优势菌群, 鞘胺醇单胞菌属 (*Brevundimonas* sp.)、芽胞杆菌属 (*Bacillus* sp.) 为健康长春花内生细菌的优势菌群; 马胃葡萄球菌 (*Staphylococcus equorum*) 为两者的共同优势菌群。通过 RFLP 方法分析, 感病株得到 16 个、健康株得到 23 个操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs), 感病植株中除柑橘黄龙病菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* 外, 还有丰富的 *Candidatus Liberibacter* sp. 存在。【结论】感病与健康长春花植株中均含有丰富的内生细菌, 黄龙病菌的存在改变了长春花原有内生细菌的菌群结构, 且菌群多样性下降。可见长春花内生细菌在一定程度上受到柑橘黄龙病菌的抑制。

关键词: 长春花, 柑橘黄龙病菌, 16S rDNA, 可培养, 限制性片段长度多态性分析 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP), 相关性

中图分类号: Q938 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 04-0489-09

中国是世界柑橘的原产地之一, 栽培历史悠久, 品种资源丰富。同世界各地柑橘产区一样, 我国柑橘生产也受到柑橘黄龙病 (*Citrus Huanglongbing*, HLB) 的严重威胁^[1]。柑橘黄龙病是由寄生于韧皮部筛管细胞内的革兰氏阴性细菌引起, 目前认为该病菌属于 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria) 的候选韧皮杆菌属 (*Candidatus Liberibacter*)^[2], 是一种难培养原核微生物。柑橘黄龙病在我国广东、广西、福

建、江西、浙江、湖南、海南、台湾、云南、四川和贵州等 11 个柑橘产区均有不同程度发生, 并有北上的趋势。

柑橘黄龙病菌的自然感染寄主为芸香科植物, 其传播途径主要为柑橘木虱吸食嫩芽汁液

而在田间扩散, 病穗嫁接也是该病传播的重要途径。研究发现, 在人工接种情况下, 柑橘黄龙病菌可以侵染非芸香科植物, 早在 1983 年, Bove 等成功

基金项目: 国家自然科学基金 (30971875); 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201003067); 公益性行业科研专项“柑橘黄龙病和溃疡病综合防控技术与示范” (201003067-02-5); 农业部“农作物病虫害疫情监测与防治项目” (农财发 [2009] 137 号)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-23-65120489; E-mail: ypyl28@sina.com

作者简介: 李佳 (1986-) 女, 河南周口人, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源开发与利用。E-mail: lijia4199@yahoo.cn

收稿日期: 2011-10-18; 修回日期: 2012-01-14

的用感病柑橘上的菟丝子将柑橘黄龙病病原接种到作为观赏和药用植物的长春花 (*Catharanthus roseus*)^[3]上,首次证明该病原可在长春花筛管细胞内大量繁殖^[4]。柯冲用电镜观察感柑橘黄龙病菌的长春花叶脉,发现在其筛管细胞中存在柑橘黄龙病病原,且数量远比柑橘病苗上的多^[5]。利用竞争性定量多聚酶链式反应技术分别检测柑橘黄龙病菌在不同寄主中的浓度,结果表明虫媒柑橘木虱中病原菌含量最高、长春花次之、柑橘中带菌量最少^[6]。以上研究表明长春花是柑橘黄龙病菌大量增殖的适宜草本寄主。

柑橘黄龙病菌为难培养菌。虽有柑橘黄龙病菌纯培养成功并完成 Koch 氏证病的报道^[7],但至今为止尚未得到重复验证。Sagaram 等人的研究表明柑橘黄龙病菌、昆虫媒介及寄主植物体内的微生物群落可能存在相互作用的关系^[8]。Wang N. 也提出柑橘黄龙病菌不仅导致柑橘寄主罹病,而且可能改变柑橘体内内生细菌的菌群结构^[9]。目前该病菌在长春花体内容易大量增殖的原因尚不清楚,且感染黄龙病后的长春花植株中内生细菌的菌群差异及数量变化的研究尚未见相关报道,本研究利用兼性厌氧的可培养技术及 16S rDNA-RFLP 分子生物学方法,对长春花病、健植株的内生细菌菌群结构进行多样性分析,以揭示黄龙病菌侵染长春花后体内内

生细菌菌群结构的变化,希望为寻找柑橘黄龙病菌能在长春花体内大量增殖的内在原因及其侵染机理和利用功能性内生细菌病害防治研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源: 显症的 3 年生长春花植株由福建省农业科学院植保所刘利华研究员惠赠;健康长春花植株样品为来自重庆、河南、福建、广西等不同采集地或本实验室栽培。所有采集样品在 4℃ 保存并在一周内分离培养。

1.1.2 主要试剂和仪器: 细菌生理生化鉴定管(杭州天和微生物试剂有限公司,中国);细菌 DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒(Axygen, USA);Taq Plus 酶(上海生工生物技术公司,中国);Taq DNA 聚合酶 pMD19-T, *Hae* III、*Msp* I、*Rsa* I 限制性内切酶(TaKaRa, Japan);*E. coli* TransMAX Competent Cell (TransGen, 北京);PCR 仪(Bio-Rad, USA);高速冷冻离心机(Beckman, Germany);核酸蛋白检测仪(Beckman, Germany)。

1.1.3 引物: 表 1 是本研究中使用的引物,引物合成由华大基因合成(中国)。

表 1 PCR 扩增所需引物

Table 1 The Primers used for the PCR amplified

Primer name	Primer sequence(5'→3')
A2/J5	5'-TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3'/5'-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3'
27F/1492r	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'
799F/1492r	5'-AACMGGATTAGATACCCCKG-3'/5'-GGCTACCTTGTACGACTT-3'

1.2 样品的采集与预处理

取样品的根、茎、叶,分别用流水冲洗干净,去除表面灰尘和杂物,用滤纸吸干样品表面的水分。采用联合消毒法对植株各个部位进行表面消毒,具体步骤:75% 无水乙醇浸泡 45-60 s,随即浸入 2% 次氯酸钠分别处理 12 min、5 min、45 s,最后分别用无菌水冲洗 5-6 次。收集最后一次冲洗液涂布在 1% LB 培养基上,28℃ 培养过夜,检查表面消毒是否完全。

1.3 长春花内生细菌的分离纯化与培养

无菌操作条件下,叶片取中脉,枝条与根部去除表皮后取韧皮部,切成 0.2 cm 长左右的条段;各材

料(g)与水(mL)比例为 1:2,分别加入无菌水浸泡 2-3 h;以浸泡液为原液,按 10 倍梯度稀释至 10⁻³,吸取每个梯度的菌悬液 100 μL,分别涂布在 1% TSA 和 1% LB 半固体培养基上,于 28℃ 细菌培养箱中培养 2-6 d,每个梯度均设 3 个重复。

根据培养所得菌落的颜色及形态,取具不同表形特征的菌落进行多次划线纯化,得到该菌株的单菌落,编号后 4℃ 冰箱保存并同时以甘油菌形式于 -80℃ 超低温冰箱中保存备份。

1.4 长春花内生细菌生理生化鉴定

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第九版^[10]和《常见细菌系统鉴定手册》^[11],对分离到的内生细菌进

行形态及生理生化测定。依据可数性原则,对培养基中长出的微生物菌落进行计数,统计出长春花不同植株部位菌落数量的相对丰度:

内生菌菌落丰富度 (cfu/g 鲜重) = 平板菌落数 × 稀释倍数 × 10²。

1.5 长春花内生细菌检测及种属鉴定

1.5.1 长春花组织总 DNA 及细菌基因组 DNA 提取: 植株组织总 DNA 提取: 分别取经表面消毒过的病、健长春花植株叶片中脉、根及茎的韧皮部, 用无菌研钵加入液氮研磨成粉, 然后提取各组织的总 DNA, 于 -20℃ 保存备用。细菌基因组 DNA 提取: 挑取已纯化菌株的单菌落, 接入液体 LB 培养基中, 28℃ 250 r/min 过夜培养与 28℃ 恒温培养箱静置培养, 吸取 2 mL 菌液提取细菌基因组 DNA, 于 -20℃ 保存备用。

1.5.2 长春花中柑橘黄龙病菌的检测: 选用引物 A2/J5^[12] 检测样品中是否带有柑橘黄龙病菌。扩增片段为 703 bp, PCR 反应体系为 25 μL, 反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 10 min。取 PCR 产物 3 μL 用经 EB 染色的 1.5% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.3 细菌 16S rDNA PCR 扩增、克隆及序列测定: 以细菌总 DNA 为模板, 利用细菌通用引物 27F/1492r^[13] 进行扩增, 扩增片段长度为 1.5 kb 左右。PCR 反应体系为 50 μL, 反应条件为: 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 100 s, 共 30 个循环; 72℃ 7 min。取 PCR 产物 3 μL 用经 EB 染色的 1% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测。将扩增出的 PCR 产物用凝胶纯化试剂盒纯化回收, 连接到 PMD19-T 载体上, 转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞中。筛选阳性转化子并送深圳华大基因测序。

1.6 长春花内生细菌 PCR-RFLP 分析

1.6.1 长春花内生细菌 16S rDNA 文库构建: 为避免植物叶绿体 16S rDNA 的影响, 本研究选用细菌通用引物 799F/1492r^[8] 扩增 16S rDNA 的 V5、V6、V7、V8 及 V9 5 个高变区域。PCR 反应体系为 50 μL, 长春花植株组织总 DNA 为模板 (步骤 1.6.1 中保存)。反应条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min。取 PCR 产物 3 μL 于 1.5% (W/V) 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到分子量约为 730 bp 与 840 bp 的两条片段, 其 730 bp 的条带为目的条带。目的片段用凝胶纯

化试剂盒纯化后与载体 PMD19-T 连接, 转化至 *E. coli* TransMAX 高效感受态细胞中; 随机挑取克隆子构建 16S rDNA 克隆文库。

1.6.2 16S rDNA 克隆文库的 RFLP 分析: 选用 *Hae* III、*Msp* I、*Rsa* I 3 种限制性内切酶进行单酶切分析。37℃ 恒温培养箱中酶切 4 h, 然后用 2.0% (W/V) 琼脂糖凝胶, 130 V 电压下电泳 40 min, 分析酶切结果, 记录酶切图谱类型。

1.7 数据分析

1.7.1 16S rDNA 克隆文库的充分性分析: 利用 Analytic Rarefaction 1.3 软件进行 Rarefaction Curve 分析, 检测 16S rDNA 克隆文库的完整性。同时用 Coverage C 验证 16S rDNA 克隆文库中所包含的微生物种类 (Operational Taxonomic Units, OTUs) 占样品中全部微生物种类的比例^[14, 15], 评价文库质量。其计算公式如下:

$$C = (1 - n1/N) \times 100\%$$

N 表示克隆文库中克隆子的数目; n1 表示在克隆文库中该克隆子所代表的 OUT 仅出现过一次的数量。

1.7.2 序列分析与登录: 利用 NCBI-blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行序列比对; 并将序列上传到 GenBank 数据库, 获得登录号。

2 结果

2.1 长春花中柑橘黄龙病菌的检测

来自不同地方的 22 份样品进行 PCR 检测。结果显示: 由刘利华教授提供的长春花植株带有大量的柑橘黄龙病菌, 作为本研究的感病植株材料 (Diseased plant, DP); 其余省市的长春花植株均未检测到柑橘黄龙病菌的存在, 作为健康植株材料 (Healthy plant, HP)。

2.2 长春花内生可培养细菌的多样性

在 1% LB 和 1% TSA 两种半固态分离培养基上, 病、健长春花植株中内生细菌数量没有显著差异, 但不同部位中的内生细菌丰度明显不同 (表 2)。经 88 次分离长春花植株的不同部位进行内生细菌, 得出不同组织内生细菌菌落丰富度依次为: 根 > 茎 > 叶; 其数量范围在 1.76 × 10⁴ cfu/g 鲜重 - 2.6 × 10⁶ cfu/g 鲜重。

表 2 感病及健康长春花植株内生细菌在的分布情况

Table 2 Endophytic bacterial population in diseased and healthy *C. roseus*

Host Plant	1% LB (No. , cfu/g fresh weight)		1% TSA (No. , cfu/g fresh weight)		No. of Species	
	DP	HP	DP	HP	DP	HP
Root	-	2.56×10^{6a}	-	2.4×10^{6a}	-	13
Stem	3.12×10^{5b}	2.24×10^{5b}	2.96×10^{5b}	2.08×10^{5b}	10	14
Leaf	7.04×10^{4c}	1.92×10^{4c}	6.24×10^{4c}	1.76×10^{4c}	11	19

a/b/c: A different letters indicate significant different among the different plant parts ($P \leq 0.05$)

对分离培养出的 67 株内生细菌 (DP:21 株; HP:46 株) 进行 16S rDNA 序列测序及常规的理化分析,共鉴定获得 29 种不同的内生细菌 (DP:14 种; HP:23 种),分属 19 个不同的属 (表 3)。其中短小杆菌属 (*Curtobacterium* sp.)、欧文氏菌属 (*Erwinia* sp.)、蜡样芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*) 为感病长春花

中的优势菌属;芽胞杆菌属 (*Bacillus* sp.)、鞘胺醇单孢菌属 (*Sphingomonas yabuuchiae*) 为健康长春花中的优势菌属。马胃葡萄球菌 (*Staphylococcus equoru*) 为病、健长春花内生细菌的共同优势菌属 (图 1)。

表 3 感病、健康长春花内生细菌分离及鉴定

Table 3 Identification of endophytic bacteria isolated from diseased and healthy *C. roseus*

Strain code	Accession NO.	length/bp	Close relative from GenBank (Accession NO.)	Isolate frequency/%		Identity/%
				DP	HP	
C01	JN224955	1392	<i>Bacillus</i> sp. DYJL-H (HQ317199.1)	4.76	10.87	100
C02	JN224956	1523	<i>Staphylococcus equoru</i> subsp. (AF527483.1)	28.57	21.74	99
C03	JN224957	1348	<i>Bacillus flexus</i> strain Twed (FJ948078.1)	4.76	0	100
C04	JN224958	1367	<i>Bacillus subtilis</i> strain DYJL-B (HQ317175.1)	4.76	8.70	100
C05	JN224959	1428	<i>Bacillus megaterium</i> strain P4 (HQ423382.1)	4.76	4.35	99
C06	JN224964	1405	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain AG1 (HM989844.1)	0	2.17	100
C07	JN224960	1412	<i>Bacillus pumilus</i> strain AU MB (HQ122449.1)	0	4.35	100
C08	JN224961	1521	<i>Bacillus cereus</i> strain G9667 (AY138273.1)	9.52	4.35	99
C09	JN224962	1401	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. (AF373198.1)	0	2.17	99
C10	JN224963	1201	<i>Brevundimonas</i> sp. PrLB12 (HM352402.1)	0	2.17	100
C11	JN224969	1411	<i>Kocuria</i> sp. (AY745813.1)	0	2.17	97
C12	JN224970	1491	<i>Brachybacterium</i> sp. (AM697367.1)	0	2.17	99
C13	JN224971	1278	<i>Pseudomonas oryzae</i> strain LKS06 (HQ331135.1)	0	2.17	99
C14	JN224972	1375	<i>Psychrobacter faecalis</i> strain hyss34 (FJ613304.1)	0	4.35	99
C15	JN224973	1285	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> strain A1-18 (NR_028634.1)	0	6.52	99
C16	JN224974	1351	<i>Pantoea</i> sp. M3S5 (FJ560472.1)	4.76	0	99
C17	JN224975	1449	<i>Erwinia</i> sp. R8-2A (HQ154566.1)	9.52	0	99
C18	JN224976	1357	<i>Curtobacterium</i> sp. Fek20 (EU741030.1)	9.52	0	100
C19	JN224977	1380	<i>Morganella morganii</i> strain Sam123-6 (FJ418576.1)	0	2.17	99
C20	JN224978	1244	<i>Pseudomonas</i> sp. OK-5 (EF157292.1)	4.76	2.17	97
C21	JN224979	1288	<i>Planomicrobium</i> sp. QD9 (FJ263010.1)	4.76	0	100
C22	JN224965	1327	<i>Sphingobium</i> sp. (AY689029.1)	0	2.17	100
C23	JN224966	1323	<i>Microbacterium</i> sp. (FJ959372.1)	0	4.35	100
C24	JN224967	1286	<i>Kocuria palustris</i> partial strain R-39201 (FR691399.1)	4.76	0	100
C25	JN224968	1370	<i>Lysinibacillus</i> sp. (FJ233851.1)	0	2.17	99
C26	JN224980	1367	<i>Lysobacter</i> sp. (AB552868.1)	0	2.17	99
C27	JN224981	1247	<i>Rhizobium</i> sp. (HQ589028.1)	0	4.35	100
C28	JN224982	1344	<i>Paenibacillus</i> sp. (EU072707.1)	0	2.17	100
C29	JN224983	1462	<i>Staphylococcus</i> sp. B2-46 (FJ386519.1)	0	2.17	99

Isolate frequency (IF) = isolated number of strain / total isolated number of strains

67 株内生细菌分别属于 4 个不同的类群。低 G + C 革兰氏阳性菌 (Firmicutes) 为主要类群, 分别占感病株分离菌的 71.41% (DP) 和健康株分离菌的 60.87% (HP); γ -变形菌门 (Gammaproteobacteria) 占 14.28% (DP) 和 10.87% (HP); 放线菌门 (Actinobacteria) 占 14.28% (DP) 和 8.7% (HP); α -

变形菌门 (Alphaproteobacteria) 只在健康长春花植株上分离到, 占内生细菌的 19.57% (图 1)。从表中还可以看出, 感病和健康长春花内生细菌在种类上有较大的差异, 即使共有类群, 在病、健植株中所占的比例也有明显差异。

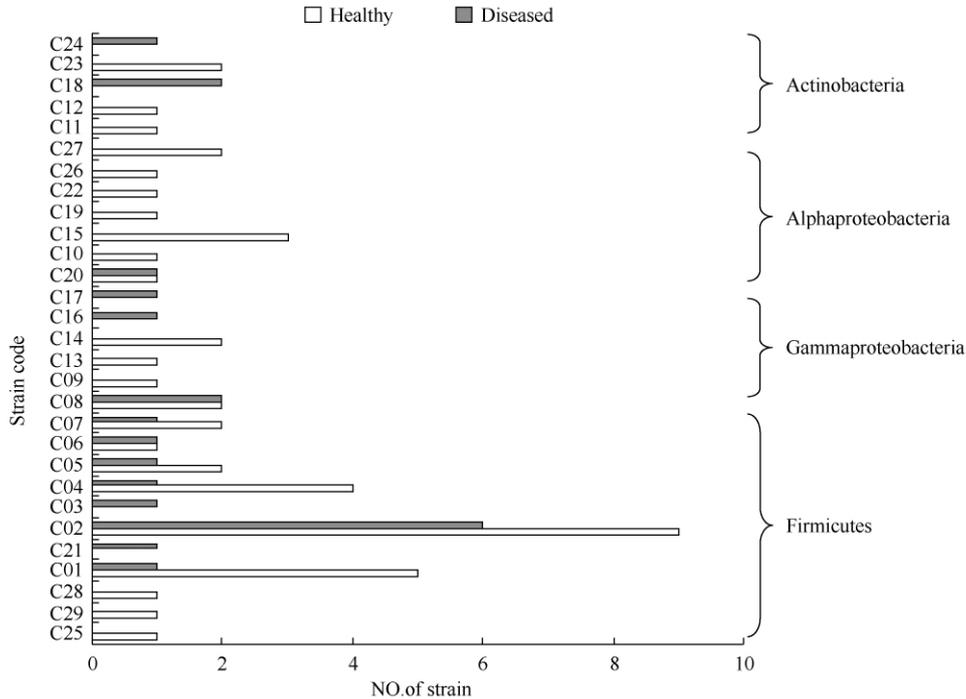


图 1 感病、健康长春花植株中可培养内生细菌的类群

Fig.1 Taxonomical group of endophytic bacteria from diseased and healthy *C. roseus*.

2.3 长春花内生细菌 16S rDNA 克隆文库的充分性分析

利用 Analytic Rarefaction 1.3 软件进行 Rarefaction Curve 分析 (图 2), 当克隆子数为 188 (DP)、182 (HP) 个时, Rarefaction 曲线趋于平缓, 表

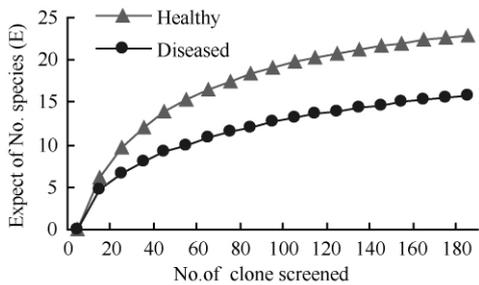


图 2 长春花 16SrDNA 克隆文库的 Rarefaction 分析曲线

Fig.2 Rarefaction Curve of endophytic bacterial 16SrDNA clone library of *C. roseus*.

明继续增加检测克隆子数目, 对微生物种群数目增加的影响已不显著。Coverage C 计算得出该 16S rDNA 克隆文库中所包含的微生物种类分别覆盖了样品中全部微生物种类的 97.87% (DP) 和 97.25% (HP)。说明所构建的克隆文库是相对充分的, 可以反映样品中微生物的种类和组成。

2.4 长春花内生菌多样性 PCR-RFLP 分析

将经 PCR 验证的 188 (DP)、182 (HP) 个阳性克隆分别用 *Hae*III、*Msp*I、*Rsa*I 3 种限制性内切酶分别进行 RFLP 分析, 根据电泳条带, 3 种限制性内切酶分别酶切得到 7 条、8 条、5 条 (DP) 与 9 条、9 条、11 条 (HP) 不同的酶切图谱 (图略)。

将每一个克隆子的 3 种酶切图谱进行组合, 具有不同组合类型的克隆子即为一个不同的操作分类单元 (OTU)。对测序结果分析, 分别从感病和健康长春花植株中筛选得到 16 和 23 个正确的操作分类

单元(表4),其中仅3个 OTUs (OTU01、OTU05、OTU09)为病、健植株共有;沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)为健康长春花中可培养内生细菌最优势菌属;亚洲柑橘韧皮杆菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)和一种未培养的韧皮杆菌属(Uncultured

Candidatus Liberibacter sp.)为感病长春花中未培养内生细菌最优势菌属。这一结果从另一角度证明长春花感染柑橘黄龙病菌后,其内生细菌区系发生了明显改变,亚洲韧皮杆菌成为植株中的优势菌属。

表4 16S rDNA-RFLP 分析鉴定结果

Table 4 Results of RFLP analyses for 16S r DNA in diseased and healthy *C. roseus*

Sample source	RFLPOTUs	Accession NO.	No. of clones	Total clones/%	closest NCBI match (Accession NO.)	Identity/%
Healthy	OTU01	JN224919	68	37.36	<i>Serratia</i> sp. JG05 (EU798943.1)	99
	OTU02	JN224920	3	1.65	Uncultured <i>Serratia</i> sp. clone A1 (JF833451.1)	100
	OTU03	JN224921	15	8.24	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain M66 (HQ676601.1)	95
	OTU04	JN224922	1	0.55	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene isolate BF0002A074 (AM696889.1)	99
	OTU05	JN224923	2	1.1	<i>Xanthomonas</i> sp. TE9 (GQ381284.2)	100
	OTU06	JN224924	1	0.55	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain LMG 5830 (GU198109.1)	99
	OTU07	JN224925	1	0.55	Uncultured bacterium clone J166 (HM920056.1)	99
	OTU08	JN224926	19	10.44	Uncultured <i>proteobacterium</i> clone MFC-B162-F07 (FJ393121.1)	96
	OTU09	JN224927	8	4.4	Uncultured bacterium clone WEC005 (EF397362.1)	98
	OTU10	JN224928	3	1.65	<i>Serratia marcescens</i> strain DAP30 (EU302855.1)	99
	OTU11	JN224929	1	0.55	Uncultured bacterium clone P5D18-494 (EF511611.1)	99
	OTU12	JN224930	2	1.1	Uncultured bacterium clone WEC126 (EF397402.1)	92
	OTU13	JN224931	7	3.85	Uncultured bacterium clone 1-2C (EU289424.1)	98
	OTU14	JN224932	4	2.2	<i>Curtobacterium</i> sp. WJ13 (HM045837.1)	99
	OTU15	JN224933	3	1.65	<i>Sphingomonas</i> sp. BH3 (FJ834325.1)	99
	OTU16	JN224934	5	2.75	<i>Stenotrophomonas</i> sp. p22(2011) (HQ652605.1)	100
	OTU17	JN224935	1	0.55	<i>Dietzia</i> sp. p9(2011) (HQ652544.1)	99
	OTU18	JN224936	11	6.04	Uncultured bacterium clone 1-11B (EU289473.1)	97
	OTU19	JN224937	10	5.5	<i>Serratia marcescens</i> strain 21-3 (JF429937.1)	99
	OTU20	JN224938	6	3.3	Uncultured beta proteobacterium clone D8W_3 (HM057713.1)	99
	OTU21	JN224939	2	1.1	Uncultured <i>Bacillus</i> sp. clone Filt. 164 (EU289424.1)	97
	OTU22	JN224940	4	2.2	Uncultured bacterium partial 16S rRNA gene, clone FB02G1 (FM873010.1)	98
	OTU23	JN224941	5	2.75	Uncultured bacterium clone FCPT516 (EF515998.1)	96
Diseased	OTU24	JN224953	1	0.53	<i>Brevibacterium</i> sp. BS01 (GQ274005.1)	99
	OTU25	JN224954	1	0.53	Uncultured bacterium clone WEC088 (EF397392.1)	99
	OTU26	JN224942	61	32.45	<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i> genes for 16S ribosomal RNA (AB480102.1)	100
	OTU27	JN224943	1	0.53	Uncultured <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. clone DS398 (FJ388771.1)	99
	OTU28	JN224944	65	34.57	Uncultured <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. clone DS489 (FJ388862.1)	99
	OTU29	JN224945	6	3.19	Uncultured <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. clone DS497 (FJ388870.1)	99
	OTU30	JN224946	4	2.13	Uncultured <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. clone GS229 (FJ388005.1)	99
	OTU31	JN224947	10	5.32	Uncultured <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. clone GS13 (FJ387791.1)	99
	OTU01	JN224919	2	1.06	<i>Serratia</i> sp. JG05 (EU798943.1)	99
	OTU05	JN224923	4	2.13	<i>Xanthomonas</i> sp. TE9 (GQ381284.1)	97
	OTU32	JN224948	2	1.06	Uncultured <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. clone DS216 (FJ388589.1)	99
	OTU33	JN224949	19	10.12	Uncultured <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. clone GS19 (FJ387797.1)	99
	OTU34	JN224950	2	1.06	<i>Pseudomonas</i> sp. BZ55 (HQ588844.1)	99
	OTU35	JN224951	7	3.72	Uncultured <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. clone GS255 (FJ388031.1)	99
	OTU36	JN224952	2	1.06	Uncultured <i>Candidatus Liberibacter</i> sp. clone GA74 (FJ387662.1)	99
	TOU09	JN224927	1	0.53	Uncultured bacterium clone WEC005 (EF397362.1)	98

所获得的36个分类操作单元分别属于5个不同的类群, γ -变形菌门(Gammaproteobacteria)占感病

株分离菌的4.25%(DP)和健康株分离菌的48.91%(HP);放线菌门(Actinobacteria)占0.53%

(DP) 和 2.75% (HP); α -变形菌门 (Alphaproteobacteria) 占 32.44% (DP) 和 1.65% (HP); β -变形菌门 (Betaproteobacteria) 占 11.54% (HP); 未知菌 (Uncultured bacterium) 占 62.76% (DP) 和 35.73% (HP) (图 3)。

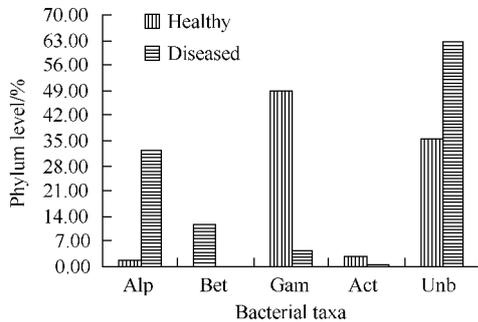


图 3 16S rDNA 克隆文库中操作分类单元的分类

Fig. 3 Distribution of major bacterial taxa in the 16S rRNA gene clone libraries at the phylum level. Alp: Alphaproteobacteria; Bet: Betaproteobacteria; Gam: Gammaproteobacteria; Act: Actinobacteria; Unb: Uncultured bacterium.

3 讨论

植物内生细菌是一类定殖在植物内部而不引起病害的细菌^[16]。作为植物微生态环境的一部分,其种类组成及结构变化会受到外界环境或人为干扰的影响。目前,有关外界病原菌入侵植物而造成内生细菌群落结构改变及两者作用关系的研究报道较少。本研究以感柑橘黄龙病的长春花及未感病的健康长春花(经 PCR 验证)为研究对象,在兼性厌氧的生长环境下分离培养不同组织中的内生细菌,共获得 29 种不同的可培养内生细菌。植株不同部位中,根部的内生细菌丰富度最高,叶片中最低。这与 Gagne^[17] 等人提出的根际土壤是内生细菌的主要来源,内生细菌是由根向茎部传播,因而植物根部内生细菌含量最高,越往植株上部,其内生细菌的含量越少的理论基本一致。

对病、健两类植株可培养菌的分离培养显示,两类植株中可培养内生细菌优势菌属的类型基本一致,如 *Bacillus* sp.、*Staphylococcus equoru* subsp. 为共同的可培养优势菌属。在健康植株中, *Morganella morgani* 和 *Lysobacter* sp. 为次优势内生细菌;而

Paenibacillus sp.、*Microbacterium* sp.、*Pseudomonas putida* 仅在健康植株中出现,其中一些种类可能有抑菌的功能, Lee^[18] 就曾报道海岸沙丘植物中 *Lysobacter* sp. 具有抗植物病原菌的特性, Trivedi^[19] 在柑橘中发现 *Paenibacillus* sp.、*Microbacterium* sp. 等具有减少柑橘黄龙病菌增殖的作用。 *Bacillus flexus*、*Erwinia* sp.、*Curtobacterium* sp.、*Planomicrobium* sp. 是仅出现在感病植株中的特有内生细菌,此外,我们的后续研究发现 *Curtobacterium* sp. 与柑橘黄龙病菌的增殖关系密切,这些差异菌株为后续筛选利用促生性伴生菌株培养柑橘黄龙病菌提供了选择依据,有关柑桔黄龙病菌和促生性伴生细菌的动态互作关系正在深入研究之中。

在分离获得的共生菌及 RFLP 文库中,我们发现已报道的植物病原菌 *Pantoea stewartii*、*Erwinia* sp.、*Curtobacterium* sp.、*Xanthomonas* spp. 及 *Serratia marcescens*, 但这些内生细菌在长春花体内是否是正在的植物致病菌,尚需经过科赫氏证病律测试验证和深入研究。目前,我们也正在从 IAA 测定、固氮能力、ACC 脱氨酶合成能力、铁载体合成及蛋白酶合成能力等功能上分析这些潜在的植物病原菌。另外, *Serratia marcescens* 作为植物组织上的机会致病菌,但具有抑制细菌病原菌作用的沙雷氏菌属目前尚无报道^[20]。

RFLP 分析时发现,感病植株中,除 *Candidatus Liberibacter asiaticus* 外,另一种 *Candidatus Liberibacter* sp. 也为优势内生细菌,而健康植株中没有检测到这类细菌,推断 *Candidatus Liberibacter* sp. 也可能与黄龙病有关。感病植株与健康植株仅有 3 个共有的 OTUs,且感病植株中除柑橘黄龙病菌外的可培养 α -proteobacteria 内生细菌较无病组织中明显降低,说明柑橘黄龙病菌的侵染改变了原有内生细菌的区系组成,并推断柑橘黄龙病菌不利于植物体内原有 α -proteobacteria 内生细菌的繁殖。

可培养菌的分离培养及 RFLP 的多样性分析,都显示长春花在感染柑橘黄龙病后,其内生细菌区系发生了显著改变,且多样性下降。其原因可能是由于柑橘黄龙病菌的入侵,占据了一些内生菌的位置或其代谢产物抑制了其它内生菌的生长繁殖。

本研究中可培养方法得出的优势菌属与非培养方法中得出的优势菌属不完全一致,这主要是由于细菌的培养受到所选用的培养基及培养条件对培养

物的选择性影响,因此,可培养细菌的种类及数量丰富度不一定反映组织中细菌的真实状态,而非培养方法更能反映客观实际。

参考文献

- [1] 范国成,刘波,吴如健,李韬,蔡子坚,柯冲. 中国柑橘黄龙病研究 30 年. 福建农业学报 (*Fujian Journal of Agricultural Sciences*) 2009 24 (2):183-190.
- [2] Bové JM. Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 2006 88 (1):7-37.
- [3] 余启高. 长春花栽培技术. 现代农业科技 (*Modern Agricultural Sciences and Technology*) 2008 (15):83.
- [4] Garnier M, Bové JM. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder. *Phytopathology* 1983 73(10):1358-1363.
- [5] 柯穗,李开本,柯冲,蔡希灼. 通过菟丝子成功地将黄龙病病原从柑桔传到长春花. 福建省农科院学报 (*Fujian Journal of Agricultural Sciences*) 1986 1(1):11-16.
- [6] 田亚南,柯穗,柯冲. 应用多聚酶链式反应 (PCR) 技术检测和定量分析柑桔黄龙病病原. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica Sinica*) 1996 26(3):243-250.
- [7] Sechler A, Schuenzel EL, Cooke P, Schneider WL, Damsteegt VD, Schaad NW. Cultivation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus', 'Ca. L. africanus', and 'Ca. L. americanus' Associated with Huanglongbing. *Phytopathology* 2009 99 (5):480-486.
- [8] Sagaram US, DeAngelis KM, Trivedi P, Andersen GL, Lu SE, Wang N. Bacterial Diversity Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected Citrus, Using PhyloChip Arrays and 16S rRNA Gene Clone Library Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 2009 75(6):1566-1577.
- [9] Trivedi P, Duan YP, Wang N. Huanglongbing, a Systemic Disease, Restructures the Bacterial Community Associated with Citrus Roots. *Applied and Environmental Microbiology* 2010 76(11):3427-3436.
- [10] John GH, Nobel RK, Peter HA. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th eds. Baltimore: Williams and Wilkins Press, 1994:39-138.
- [11] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 科学出版社 2001.
- [12] Hocquellet A, Bové JM, Garnier M. Isolation of DNA from the Uncultured 'Candidatus Liberibacter Species Associated with Citrus Huanglongbing by RAPD. *Current Microbiology* 1999 38:176-182.
- [13] 王爱华,殷幼平,熊红利,李颜方,李佳,贤家旭,王中康. 广西柑橘黄龙病植株韧皮部内生细菌多样性分析. 中国农业科学 (*Scientia Agricultura Sinica*) 2010, 43(23):4823-4833.
- [14] Allison E, McCaig L, Prosser JJ, Glover A. Molecular Analysis of Bacterial Community Structure and Diversity in Unimproved and Improved Upland Grass Pastures. *Applied and Environmental Microbiology* 1999 65(4):1721-1730.
- [15] Lei S, Qiu Fb, Zhang Xx, Dai X, Dong Xz, Wei S. Endophytic Bacterial Diversity in Rice (*Oryza sativa* L.) Roots Estimated by 16S rDNA Sequence Analysis. *Microbial Ecology* 2008 55:415-424.
- [16] Klopper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 1992 38 (12):1219-1232.
- [17] Gagné S, Richard C, Rousseau H, Antoun H. Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Canadian Journal of Microbiology* 1987 33 (11):996-1000.
- [18] Lee MS, Do JO, Park MS, Jung S, Lee HK, Bae KS, Park SJ, Kim SB. Dominance of *Lysobacter* sp. in the rhizosphere of two coastal sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2006 90:19-27.
- [19] Trivedi P, Spann T, Wang N. Isolation and Characterization of Beneficial Bacteria Associated with Citrus Roots in Florida. *Microbial Ecology* 2011.
- [20] Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Reinhold-Hurek B, Ladha JK. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 2001, 183(8):2634-2645.

Endophytic bacterial community analysis of *Catharanthus roseus* and its association with huanglongbing pathogen

Jia Li¹, Zhongkang Wang¹, Pan Xie¹, Dong Wu², Youping Yin^{1*}

¹ Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing Engineering Research Center for Fungal Insecticide, Chongqing Key Lab of Genetic Function and Regulation, Chongqing 400030, China

² Lucky Team Biotech Development (Hepu) Ltd., Co. Hepu 536128, China

Abstract: [Objective] To analyze the microbial diversity in healthy and HLB-affected *Catharanthus roseus* under manual-grafting conditions and to find the association between the endophytic bacteria and the HLB pathogen. [Methods] The endophytic bacterial communities were delineated by using the traditional culturable approach and cultivation-independent techniques based on 16S rRNA gene. The endophytic bacteria were isolated from surface-sterilized *C. roseus* midribs of leaves and phloem of stems and roots by plating and restriction fragment length polymorphism (RFLP). [Results] By anaerobic culture, we obtained 67 strains that were identified 29 genus by GenBank. *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Bacillus cereus* and *Brevundimonas* sp., *Bacillus* sp. were the dominant bacterial population in diseased and healthy *C. roseus*. However, *Staphylococcus equorum* was the common dominant isolate in both *C. roseus*. We picked 188 and 182 positive clones in 16S rDNA libraries of diseased and healthy *C. roseus* that were respectively restricted by the *HaeIII*, *MspI*, *RsaI* restriction endonuclease. Based on the similarity of the RFLP banding profiles in diseased and healthy *C. roseus*, we obtained 16, 23 OTUs (Operational Taxonomic Units, OTUs) respectively. In addition to *Candidatus Liberibacter asiaticus*, *Candidatus Liberibacter* sp. was the dominant bacterial population only in diseased *C. roseus*. [Conclusions] With the infection of 'Ca. L. asiaticus', the diversity in diseased *C. roseus* decreased. The endophytic bacteria isolated from diseased and healthy *C. roseus* are abundant and have remarkable differences in the composition and function, suggesting that its endophytic bacteria might be inhibited by the HLB pathogen.

Keywords: *Catharanthus roseus*, Huanglongbing, 16S rDNA, restriction fragment length polymorphism (RFLP)

(本文责编:王晋芳)

Support by the National Natural Science Foundation of China (30971875), by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201003067), by the Special Program of Public Benefit Profession Research "Citrus Huanglongbing and Canker Disease Comprehensive Prevention and Control Technology Research and Demonstration" (201003067 - 02 - 5) and by the Special Program of Agricultural Ministry "Epidemic Situation Monitor and Control of Crop Diseases, Pests, Weeds and Rats" ([2009]137)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-23-65120489; E-mail: ypy128@vip.sina.com

Received: 18 October 2011 / Revised: 14 January 2012