

## 柑橘黄龙病寄主长春花内生细菌的分离及功能鉴定

李佳<sup>1</sup> 殷幼平<sup>2</sup> 郑莉萍<sup>1</sup> 孙梦黎<sup>1</sup> 向晟<sup>1</sup> 郑月慧<sup>1\*</sup> 王中康<sup>2\*</sup>

(1. 南昌大学 医学院 医学实验教学部 江西 南昌 310006)

(2. 重庆大学 生命科学学院 重庆市基因功能及调控重点实验室 重庆市杀虫真菌生物农药工程技术中心 重庆 400030)

**摘要:** 【目的】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及功能对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】利用兼性厌氧可培养技术以及植物内生菌功能特性分析相结合的方法。【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。29 种内生细菌进行功能分析, 其中 6 株内生细菌至少具有 4 种功能特性, 分属于马胃葡萄球菌、苏云金芽胞杆菌、巨大芽胞杆菌、短小杆菌属、摩氏摩根菌(*Morganella morganii*)及溶杆菌属(*Lysobacter* sp.) 5 个属。【结论】感病与健康长春花植株中均含有丰富的内生细菌且差异较大, 黄龙病菌的存在改变了长春花原有内生细菌的菌群结构。通过分析菌群的差异, 有望找到与柑橘黄龙病菌生长相关的菌种。

**关键词:** 长春花, 黄龙病菌, 内生细菌, 16S rDNA, 基本功能

## Isolation, identification and basic function analysis of plant associated bacteria from huanglongbing's host plant-*Catharanthus roseus*

LI Jia<sup>1</sup> YIN You-Ping<sup>2</sup> ZHENG Li-Ping<sup>1</sup> SUN Meng-Li<sup>1</sup> XIANG Sheng<sup>1</sup>  
ZHENG Yue-Hui<sup>1\*</sup> WANG Zhong-Kang<sup>2\*</sup>

(1. Department of Experimental Teaching, Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 310006, China)

(2. Chongqing Engineering Research Center for Fungal Insecticides, Key Laboratory of Genetic Function and Regulation in Chongqing, Life Science College of Chongqing University, Chongqing 400030, China)

**Abstract:** [Objective] The healthy and huanglongbing-affected *Catharanthus roseus* under manual-grafting condition were used as materials for research. The endophytic bacterial community structure and function of different parts of healthy and huanglongbing-affected *Catharanthus roseus* were analysed, which provided a basis theoretical foundation for correlative study between citrus

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30971875); 国家自然科学基金项目(No. 81260098)

\*通讯作者: 郑月慧: Tel: 86-791-83827148; 信箱: yuehuizheng@163.com

王中康: 信箱: zk-w128@sina.com

收稿日期: 2013-06-04; 接受日期: 2013-07-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-12

huanglongbing and *Catharanthus roseus* endophytic bacterial. [Methods] The endophytic bacterial communities were analysed based on the method of facultative anaerobic culture techniques compared with endophytic bacteria features analysis. [Results] The endophytic bacteria were isolated from sterilized-surface midribs of leaves and phloems, which from stems and roots. With the method of artificial anaerobic culturing, 67 strains were obtained and identified as 29 genera based on the blast results of 16S rDNA. The dominant bacterial population of diseased and healthy *C. roseus* were mainly came from *Curtobacterium* sp., *Erwinia* sp., *Bacillus cereus*, *Brevundimonas* sp. and *Bacillus* sp., While, the common dominant population of both diseased and healthy *C. roseus* was belonged to *Staphylococcus equorum*. Performing the methods of physiological and biochemical identification, total of 6 bacterial isolates showed a minimum of four traits related to indole acetic acid (IAA) synthesis, nitrogen (N) fixation and siderophore production. production of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate deaminase, production of antibiotic, amylolysis and protease activity were characterized. Dominant isolates were characterized as 6 genera by functional analysis: *Staphylococcus equoru* subsp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Curtobacterium* sp., *Morganella morganii*, and *Lysobacter* sp.. These traits may be involved in HLB-affected *C. roseus*. [Conclusion] The results of bacterial community of the identified endophytic bacteria of *Catharanthus roseus* and their functional analysis showed the potential role on biological control of HLB pathogen.

**Keywords:** *Catharanthus roseus*, Huanglongbing, Endophytic bacteria, 16S rDNA, Basic function

中国是柑橘最大的输出国之一。目前,柑橘黄龙病(Huanglongbing)是影响柑橘产量的最主要病害之一,该病害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 $\alpha$ -变形菌纲(Alphaproteobacteria)的候选韧皮杆菌属(*Candidatus Liberibacter*),是一种难培养原核微生物,分别包括亚洲种、非洲种及美洲种。该病菌的寄主范围广泛,主要寄生于柑橘属、枳属、金桔属以及草本非芸香科植物<sup>[1]</sup>。

长春花(*Catharanthus roseus*)属非芸香科草本药用植物<sup>[2]</sup>。Lacava等发现引起CVC病害的苛养木杆菌(*Xylella fastidiosa*)可寄生于长春花植株并进行增殖<sup>[3]</sup>。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1986年,电镜下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原,且数量远比柑橘病苗上的多<sup>[4]</sup>。随后用感病柑橘上的菟丝子将柑橘黄龙病原接种到作为观赏和药用植物的长春花上,发现该病原可在长春花筛管细胞内大量繁殖<sup>[5]</sup>。田亚南等在柑橘黄龙病菌的不同寄主中检测柑橘黄龙病菌的浓度,结果显示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<sup>[6]</sup>。以上研究结果表明,长春花是柑橘黄龙病菌大量增殖的适宜

草本寄主。

目前,有关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报道,且有关长春花内生菌研究的相关报道较少。本研究主要通过传统的可培养分离技术,分析不同状态下长春花植株中不同部位内生细菌的种类及数量差异,并鉴定其内生细菌的生理功能,为揭示柑橘黄龙病菌在长春花植株体内增殖的原因奠定基础,并希望找到与柑橘黄龙病菌生长相关的菌种。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试植物材料

显症的3年生长春花植株由福建省农业科学院植物保护研究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,并在一周内进行内生菌的分离培养。

### 1.2 主要试剂

培养基:含2.5 mmol/L色氨酸的KingB;肉胨淀粉培养基<sup>[7]</sup>;脱脂牛奶培养基<sup>[8]</sup>;阿斯毕(Ashby)无氮培养基<sup>[3]</sup>;CAS琼脂培养基<sup>[9]</sup>;PYG、SMA、SM培养基<sup>[10]</sup>。

试剂:细菌生理生化鉴定管,杭州天和微生物

试剂有限公司；细菌 DNA 提取试剂盒、纯化试剂盒，Axygen 公司；*Taq plus* 酶，Sangon 公司；*E. coli* Trans MAX Competent Cell，TransGen 公司；PMD19-T 载体，TaKaRa 公司。

### 1.3 内生细菌的分离纯化与培养

**样品的采集与预处理：**用流动水冲洗长春花的叶、茎及根，以去除表面灰尘和杂物，用滤纸吸干材料表面的水分。采用联合消毒法对叶、茎部位进行表面消毒，其具体做法是：先用 75% 的无水乙醇浸 60 s，随即浸入 2% 次氯酸钠分别处理 45 s、5 min 和 12 min，最后分别用无菌水冲洗 5–6 次。收集最后一次冲洗液 100  $\mu$ L 在 1% TSA 和 1% LB 培养基上分别涂布，28  $^{\circ}$ C 培养过夜，以确定表面消毒是否完全。

**菌种的分离纯化：**在超净工作台上，叶片取其中脉；枝条及根部先去除表皮，取其韧皮部，切成 0.2 cm 长左右的条段，放入 5 mL 离心管中。材料与水比例为 1:2 (质量体积比)，加入无菌水浸泡 2–3 h，取 10  $\mu$ L 菌悬液为原液，依次梯度稀释至  $10^{-3}$  (3 个梯度)。吸取每个梯度的菌悬液 100  $\mu$ L，分别铺在 1% TSA 和 1% LB 半固体培养基上(形成兼性厌氧的环境)，每个梯度 3 个重复，28  $^{\circ}$ C 培养 2–6 d，观察并记录结果。

根据菌落的颜色及形态，将不同菌种在 1% TSA 和 1% LB 培养基上进行划线纯化以得到该菌株的单菌落。于 28  $^{\circ}$ C 培养 1–2 d 之后，4  $^{\circ}$ C 保存备用；同时用 15% 甘油保存菌株，置于 -80  $^{\circ}$ C 保存备用。

### 1.4 内生细菌生理生化鉴定

依据《伯杰氏细菌鉴定手册》第 9 版<sup>[11]</sup>和《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[7]</sup>，分别采用快速革兰氏染色液试剂盒和生理生化鉴定管对分离得到的菌群进行形态和生理生化测定。

根据可数性原则，对培养基表面长出的微生物菌落进行计数，统计出九里香不同植株部位菌落的相对丰富度。

内生菌菌落丰富度 (CFU/g 鲜重) =

平板菌落数  $\times$  稀释倍数  $\times 10^2$

### 1.5 长春花内生细菌的种属鉴定

**1.5.1 长春花内生细菌总 DNA 的提取：**挑取已纯化菌种的单菌落，接入液体 LB 培养基中，28  $^{\circ}$ C，分别进行静置培养与 250 r/min 摇床过夜培养。吸取 2 mL 菌液利用 AxyGen 细菌基因组 DNA 小量试剂盒，提取细菌总 DNA，采用紫外分光光度计与 0.8% 琼脂糖凝胶测定所提取的 DNA 浓度、纯度及片段大小。-20  $^{\circ}$ C 保存，备用。

**1.5.2 柑橘黄龙病菌的检测：**为了检测所提取的细菌总 DNA 是否含有长春花黄化植原体基因组，选用引物 primerA2/J5 (A2 :5'-TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3'；J5 :5'-ACAAAAGCAGAAA TAGCACGAACAA-3')<sup>[12]</sup>。以所提取的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L，包含 10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L、25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.5  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L 引物各 1  $\mu$ L、10 mmol/L dNTPs 2  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L *Taq plus* DNA 聚合酶 0.3  $\mu$ L，模板 DNA 1.5  $\mu$ L。扩增条件为：95  $^{\circ}$ C 5 min；95  $^{\circ}$ C 30 s，56  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 100 s；共 30 个循环；72  $^{\circ}$ C 7 min。取 PCR 产物 3  $\mu$ L，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.5.3 长春花内生细菌的 16S rDNA PCR 扩增与鉴定：**以细菌总 DNA 为模板，利用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[13]</sup> 进行 PCR 扩增，扩增片段长度约为 1.5 kb。PCR 扩增体系和扩增条件参考 1.5.2。取 PCR 产物 3  $\mu$ L，1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

将经 PCR 扩增出的目的基因片段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。通过氨苄抗性标记筛选阳性转化子并送深圳华大基因测序。

### 1.6 植物内生细菌功能研究

植物内生细菌一般具有产生吲哚-3-乙酸 (IAA)、抗生素、铁载体、溶解磷、固氮及诱导 ISR 等功能。本文利用 KingB 液体培养基与 Salkowski

Reagent 试剂测定 IAA 的合成<sup>[14]</sup>,颜色变为粉色的为具有 IAA 合成能力的菌株;利用脱脂牛奶培养基<sup>[15]</sup>测定菌株的蛋白酶合成能力;利用 Ashby 无氮培养基及 *nifH* 基因功能验证测定菌株的固氮能力<sup>[16]</sup>;利用 CAS-agar 培养基测定菌株的铁细胞合成能力<sup>[9]</sup>;通过对 *phlD* 基因的扩增及功能验证测定菌株合成抗生素的能力<sup>[17]</sup>;利用 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)作氮源测定菌株的 1-氨基环丙烷-1-羧酸脱氨酶合成能力<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与分析

### 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(图 1):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分析

经对 1% LB 和 1% TSA 两种半固态分离培养基上所分离到的菌落的多样性分析可知,根、茎、叶 3 个不同植株部位的内生细菌丰度明显不同,但病、健长春花植株中内生细菌数量没有显著差异(表 1)。不同组织内生细菌菌落丰度依次为:根 > 茎 > 叶,其数量范围为  $1.76 \times 10^4 - 2.6 \times 10^6$  CFU/g

鲜重。

对分离培养出的 67 株内生细菌(DP:21 株;HP:46 株)进行 16S rDNA 序列测定及常规的理化分析,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。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(*Brevundimonas* sp.)为健康长春花中的优势菌属;马胃葡萄球菌(*Staphylococcus equorum*)为病、健长春花内生细菌的共同优势菌属(表 2)。

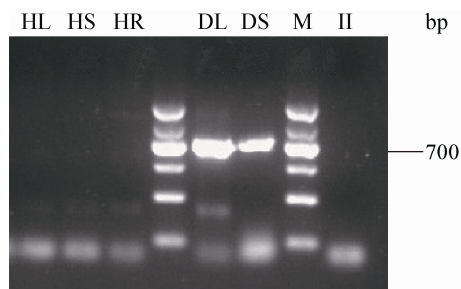


图 1 PCR 检测无症状及显症植株中 HLB 病菌  
Figure 1 PCR with the A2/J5 primer set for the detection of *Ca. L. asiaticus* in HLB disease and healthy samples  
注: M: 100 bp DNA 梯度; HL: 健康株叶片; HS: 健康株茎秆; HR: 健康株根部; DL: 感病株叶片; DS: 感病株茎秆.  
Note: M: 100 bp DNA ladder; HL: Healthy leaf; HS: Healthy stem; HR: Healthy root; DL: Disease leaf; DS: Disease stem.

宿主 Host plant	1% LB			1% TSA		
	Root	Stem	Leaf	Root	Stem	Leaf
健康植株 Health plant	$2.56 \times 10^{6a}$	$2.24 \times 10^{5b}$	$1.92 \times 10^{5c}$	$2.4 \times 10^{6a}$	$2.08 \times 10^{5b}$	$1.76 \times 10^{4c}$
病感植株 Disease plant	—	$3.12 \times 10^{5b}$	$7.04 \times 10^{4c}$	—	$2.96 \times 10^{5b}$	$6.24 \times 10^{4c}$

注: a, b, c: 植株不同部位的显著性差异( $P < 0.05$ )。

Note: a, b, c: A different letters indicate significant different among the different plant parts ( $P < 0.05$ ).

表 2 长春花内生优势菌群序列比对结果  
Table 2 Identification of endophytic bacteria isolated from diseased and healthy *C. roseus*

	菌株 代码 Strain code	部位 Plant tissue	NCBI 中相似序列 Hit in NCBI database (Accession No.)	分离频率 IF (%)		相似度 Identity (%)
				DP	HP	
厚壁菌门	C01	Leaf/Stem	<i>Bacillus</i> sp. DYJL-H (JN224955)	4.76	10.87	100
Firmicutes	C02	Leaf/Stem	<i>Staphylococcus equoru</i> subsp. (JN224956)	28.57	21.74	99
	C03	Leaf	<i>Bacillus flexus</i> strain Twd (JN224957)	4.76	0	100
	C04	Leaf/Stem	<i>Bacillus subtilis</i> strain DYJL-B (JN224958)	4.76	8.70	100
	C05	Leaf/Stem	<i>Bacillus megaterium</i> strain P4 (JN224959)	4.76	4.35	99
	C06	Leaf	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain AG1 (JN224964)	0	2.17	100
	C07	Leaf/Root	<i>Bacillus pumilus</i> strain AU MB (JN224960)	4.76	4.35	100
	C21	Leaf	<i>Planomicrobium</i> sp. QD9 (JN224979)	4.76	0	100
	C25	Root	<i>Lysinibacillus</i> sp. (JN224968)	0	2.17	99
	C28	Root	<i>Paenibacillus</i> sp. (JN224982)	0	2.17	100
	C29	Leaf	<i>Staphylococcus</i> sp. B2-46 (JN224983)	0	2.17	99
$\gamma$ -变形菌门	C08	Stem	<i>Bacillus cereus</i> strain G9667 (JN224961)	9.52	4.35	99
Gamma- proteobacteria	C09	Leaf	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. (JN224962)	0	2.17	99
	C13	Stem	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> strain LKS06 (JN224971)	0	2.17	99
	C14	Stem	<i>Psychrobacter faecalis</i> strain hyss34 (JN224972)	0	4.35	99
	C16	Stem	<i>Pantoea</i> sp. M3S5 (JN224974)	4.76	0	99
	C17	Stem	<i>Erwinia</i> sp. R8-2A (JN224975)	9.52	0	99
$\alpha$ -变形菌门	C10	Leaf	<i>Brevundimonas</i> sp. PrLB12 (JN224963)	0	2.17	100
Alpha- proteobacteria	C15	Stem	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i> strain A1-18 (JN224973)	0	6.52	99
	C19	Root	<i>Morganella morganii</i> strain Sam123-6 (JN224977)	0	2.17	99
	C20	Stem	<i>Pseudomonas</i> sp. OK-5 (JN224978)	4.76	2.17	97
	C22	Leaf	<i>Sphingobium</i> sp. (JN224965)	0	2.17	100
	C26	Root	<i>Lysobacter</i> sp. (JN224980)	0	2.17	99
	C27	Root	<i>Rhizobium</i> sp. (JN224981)	0	4.35	100
Actino- bacteria	C11	Leaf	<i>Kocuria</i> sp. (JN224969)	0	2.17	97
	C12	Stem	<i>Brachy bacterium</i> sp. (JN224970)	0	2.17	99
放线菌门	C18	Stem	<i>Curtobacterium</i> sp. Fek20 (JN224976)	9.52	0	100
	C23	Leaf/Stem	<i>Microbacterium</i> sp. (JN224966)	0	4.35	100
	C24	Stem	<i>Kocuria palustris partial</i> strain R-39201 (JN224967)	4.76	0	100

注：分离频率(IF) = 分离菌株数目/菌株总数。

Note: The isolation frequency (IF) was calculated as the frequency of stain per sample exhibiting bacterial growth.

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)； $\gamma$ -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)； $\alpha$ -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 2)。从表 2 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。

结合 N-J (Neighbor-Joining)法，利用 Clustal X 和 MEGA 4.0 软件估算序列间遗传距离，构建系统进化树，对比所测序列与其相似序列的遗传进化关系(图 3)。

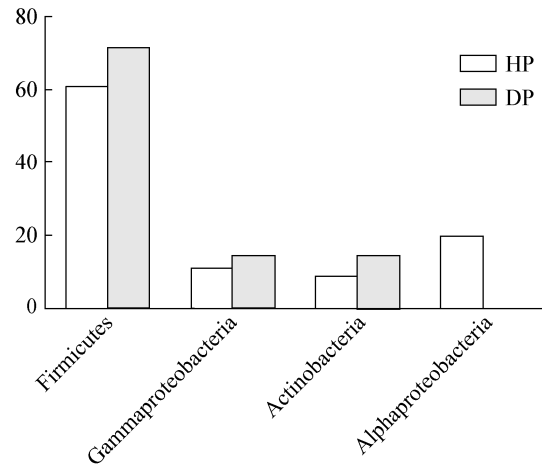


图 2 长春花内生细菌操作分类单元的分类  
Figure 2 Distribution of major bacterial taxa at the phylum level

注：健、病植株不同部位内生细菌的显著性差异( $P < 0.05$ ).  
Note: The results between the disease and healthy samples were not significantly different for all the traits at  $P < 0.05$ .

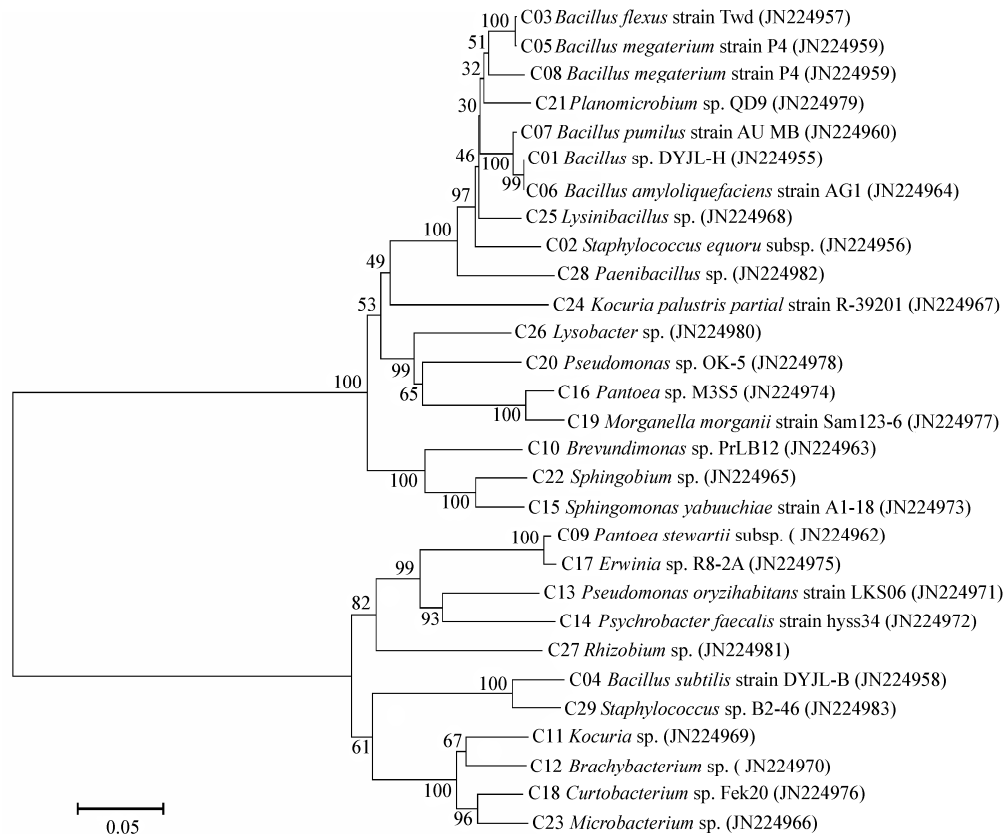


图 3 基于 16S rDNA 序列的长春花内生细菌系统进化树

Figure 3 Neighbor-Joining tree of 16S rRNA gene sequences from endophytic bacterial isolates from *C. roseus*

注：节点值重复检测 1 000 次。

Note: The nodes are supported by 1 000 bootstrap replications.

### 2.3 长春花可培养内生细菌功能鉴定结果

测定了 29 株内生细菌的功能, 其中 18 株菌能产生吲哚-3-乙酸(DP : 90.5% ; HP : 78.25%) ; 具有抗生素(*phlD*)合成能力的内生细菌有 1 株(DP : 4.76% ; HP : 10.87%) ; 结合 *nifH* 和 Nfb 固氮培养基确定有 4 株内生细菌具有固氮能力(DP : 4.76% ; HP : 10.87%) ; 8 株内生细菌具有 ACC 脱氨酶合成能力(DP : 61.6% ; HP : 36.95%) ; 11 株内生细菌具有铁

细胞合成能力(DP : 47.6% ; HP : 58.69%) ; 5 株内生细菌具有淀粉水解能力(DP : 9.8% ; HP : 23.92%) ; 7 株内生细菌显示强阳性的蛋白酶合成能力(DP : 28.56% ; HP : 30.44%) (表 3, 图 4)。可见, 健康植株中内生细菌的功能特征高于感病株 ; 6 株内生细菌具有以上 4 种功能, 分属于马胃葡萄球菌、芽孢杆菌属、短小杆菌属、摩氏摩根菌属(*Morganella morganii*)及溶杆菌属(*Lysobacter* sp.) 5 个属。

表 3 长春花内生细菌的功能特性鉴定结果  
Table 3 The functional analysis of endophytic bacteria isolated from *C. roseus*

菌株代码 Strains No.	IAA 合成 Production of IAA	<i>phlD</i>	<i>nifH</i>	固氮作用 N-fixation	ACC 脱氨酶 ACC deaminase	Fe <sup>2+</sup> Siderophore	淀粉水解 Amylolysis	蛋白酶活性 Protein activity
C02	+	-	+	-	+	+	-	-
C03	-	-	+	+	-	-	-	+
C04	+	-	+	-	+	+	+	+
C05	+	-	-	+	-	+	+	+
C06	-	-	+	-	-	-	-	-
C07	-	-	+	+	-	+	-	-
C08	+	-	+	-	-	-	-	-
C09	+	-	-	+	-	-	-	-
C10	+	-	-	+	-	+	-	-
C11	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	-	-	-	-	-	-	-
C13	-	-	-	-	-	+	-	-
C14	+	-	+	-	-	-	-	-
C15	+	-	-	-	-	+	-	-
C16	+	-	+	-	+	-	-	-
C17	+	-	-	-	+	-	-	-
C18	+	-	+	-	+	-	-	+
C19	+	-	-	+	+	-	+	-
C20	+	-	-	-	+	+	-	-
C21	-	-	+	-	-	+	-	-
C22	-	-	-	-	-	-	-	-
C23	-	-	-	-	-	-	+	+
C24	-	-	+	-	-	-	-	-
C25	+	-	-	-	+	-	-	-
C26	-	-	+	+	-	+	-	+
C27	+	-	-	+	-	+	-	-
C28	+	-	+	-	-	-	+	-
C29	+	-	+	-	-	-	-	-

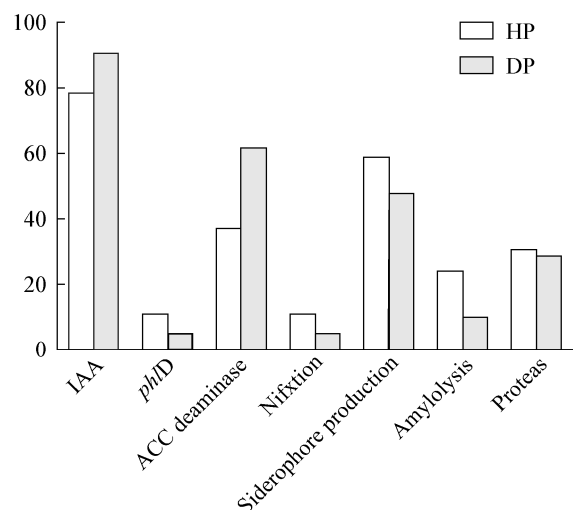


图4 健、病植株中内生细菌功能特性差异比较

**Figure 4 Isolation frequency of endophytic bacteria possessing various plant growth traits isolated from effect-HLB plant (DP) and healthy *C. roseus* plant (HP)**

注：健、病植株不同部位内生细菌功能特异性的显著性差异 ( $P < 0.05$ ).

Note: The results between the healthy and disease plant were not significantly different for all the traits at  $P < 0.05$ .

### 3 讨论

植物内生菌为存在于植物生活周期的某个阶段或全部阶段中,是从表面消毒的植物组织中所分离培养到的一类菌,包括细菌和真菌,但该类菌未引起植物的表型和功能特征发生改变<sup>[19]</sup>。目前,内生细菌对宿主植物的影响,如促进植物生长、营养吸收、抑制植物病原菌、抗生素产生及抗击外界压力等作用,是植物内生菌研究的热点。Sagaram等研究表明黄龙病菌、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<sup>[20]</sup>。Wang N.等也提出黄龙病菌不仅有害于柑橘寄主的健康,而且可能改变其体内内生菌的菌群结构<sup>[21]</sup>。因此,本研究分析了感黄龙病菌长春花植株与健康长春花植株中内生细菌种类及数量的差异,首次验证了其体内内生细菌的多样性及其生理生化功能。迄今为止,尚未有关于长春花内生细菌生理功能的研究报道。

采用传统的可培养分离技术对感病及健康长

春花植株的不同部位进行了内生细菌菌群分析,由表1可知,感病、健康植株的不同部位中的内生细菌种类及数量均有明显的差异,其中根部内生细菌的数量最多。*Paenibacillus* sp.、*Microbacterium* sp.、*Pseudomonas putida*、*Morganella morganii*与*Lysobacter* sp.为健康植株中内生细菌的优势菌属,*Bacillus flexus*、*Erwinia* sp.、*Curtobacterium* sp.与*Planomicrobium* sp.仅在感病植株中出现。

我们从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,研究结果显示,健康植株中内生细菌的功能特征高于感病株,并且健康长春花植株中分离得到的植物内生菌具备多种生理生化特性。Lee M.S.等<sup>[22]</sup>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 P.等<sup>[17]</sup>在柑橘中发现*Paenibacillus* sp.和*Microbacterium* sp.等具有减少柑橘黄龙病菌增殖的作用。根据本实验结果以及已报道结果推断,植物内生细菌生理生化功能的改变可能与柑橘黄龙病菌的入侵有关。同时我们在研究中还发现,*Bacillus* sp.为唯一一株具备产抗生素能力的菌株。目前,我们也正在进一步验证所得到6株功能型内生细菌与柑橘黄龙病菌增殖的相互作用机制以及*Bacillus* sp.产抗生素的能力与柑橘黄龙病菌增殖的相互关系。

本研究结果表明,由于柑橘黄龙病菌的入侵,影响了长春花植株体内的内生细菌数量、种类及生理功能。该研究结果为揭示柑橘黄龙病菌在长春花植株体内增殖的原因奠定基础,有望找到与柑橘黄龙病菌生长相关的菌种。

### 参 考 文 献

- [1] Bové JM. Huanglongbing: A destructive, newly emerging, century-old disease of citrus[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2006, 88(1): 7-37.
- [2] 余启高. 长春花栽培技术[J]. *现代农业科技*, 2008(15): 83.
- [3] Laguerre G, Nour SM, Macheret V, et al. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris*



- symbionts[J]. Microbiology, 2001, 147(4): 981-993.
- [4] 柯穗, 李开本, 柯冲, 等. 通过菟丝子成功地将黄龙病病原从柑桔传到长春花[J]. 福建省农科院学报, 1986, 1(1): 11-16.
- [5] Garnier M, Bové JM. Transmission of the organism associated with citrus greening disease from sweet orange to periwinkle by dodder[J]. Phytopathology, 1983, 73(10): 1358-1363.
- [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[J]. 植物病理学报, 1996, 26(3): 243-250.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] 黄志强, 林白雪, 谢联辉. 产碱性蛋白酶海洋细菌的筛选与鉴定[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(4): 416-420.
- [9] Milagres AMF, Machuca A, Napoleão D. Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay[J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 37(1): 1-6.
- [10] 孙乐妮, 何琳燕, 张艳峰, 等. 海州香薷(*Elsholtzia splendens*)根际铜抗性细菌的筛选及生物多样性[J]. 微生物学报, 2009, 49(10): 1360-1366.
- [11] John GH, Nobel RK, Peter HA. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 9th eds. Baltimore: Williams and Wilkins Press, 1994: 39-138.
- [12] Wang Z, Yin Y, Hu H, et al. Development and application of molecular-based diagnosis for 'Candidatus Liberibacter asiaticus', the causal pathogen of citrus huanglongbing[J]. Plant Pathology, 2006, 55(5): 630-638.
- [13] 王爱华, 殷幼平, 李佳, 等. 广西柑橘黄龙病植株韧皮部内生细菌多样性分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(23): 4823-4833.
- [14] Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Araujo WL, et al. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(22): 7259-7267.
- [15] 黄志强, 林白雪, 谢联辉. 产碱性蛋白酶海洋细菌的筛选与鉴定[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(4): 416-420.
- [16] 李倍金, 罗明, 周俊, 等. 几种禾草内生固氮菌的分离及固氮活性测定[J]. 草业学报, 2008, 17(5): 37-42.
- [17] Trivedi P, Spann T, Wang N. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida[J]. Microbial Ecology, 2011, 62(2): 324-336.
- [18] 孙乐妮, 何琳燕, 张艳峰, 等. 海州香薷(*Elsholtzia splendens*)根际铜抗性细菌的筛选及生物多样性[J]. 微生物学报, 2009, 49(10): 1360-1366.
- [19] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(10): 895-914.
- [20] Sagaram US, DeAngelis KM, Trivedi P, et al. Bacterial diversity analysis of huanglongbing pathogen-infected citrus, using phylochip arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(6): 1566-1577.
- [21] Trivedi P, Duan YP, Wang N. Huanglongbing, a systemic disease, restructures the bacterial community associated with citrus roots[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(11): 3427-3436.
- [22] Lee MS, Do JO, Park MS, et al. Dominance of *Lysobacter* sp. in the rhizosphere of two coastal sand dune plant species, *Calystegia soldanella* and *Elymus mollis*[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2006, 90: 19-27.