

柑橘黄龙病隐症寄主九里香内生细菌 分离及功能鉴定

殷幼平¹ 李佳¹ 林亚玉¹ 陈世伟² 王中康^{1*}

(1. 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)

(2. 亚洲果业广西利添柑橘生物技术公司 广西 合浦 536128)

摘要:【目的】分析黄龙病高发区的九里香植株叶及茎干中内生细菌,为寻找具有抗柑橘黄龙病的内生细菌奠定基础。【方法】利用平板培养法及基于 16S rDNA 的限制性酶切长度多态性(Restriction fragment length polymorphism, RFLP)序列分子鉴定法,对九里香植物内生细菌进行多样性分析。【结果】在兼性厌氧的生长环境下,从九里香植株中分离获得可培养内生细菌 26 株,分属于 9 个细菌属的 14 个种,其中肠杆菌属(*Enterobacter* sp.) (IF=19.23%)、芽胞杆菌属(*Bacillus* sp.) (IF=38.46%)为九里香可培养内生细菌的优势菌属。茎干中内生细菌丰度高于叶中内生菌丰度。建立了九里香内生细菌 16S rDNA 文库,对文库质量检测显示,该克隆文库的覆盖度(Coverage C)为 94.97%,结合 Rarefaction 曲线分析,表明所构建的克隆文库是相对充分的。对文库中 179 个阳性克隆进行 *Hae* III、*Msp* I、*Rsa* I 3 种限制性内切酶分析,得到 20 个不同的操作分类单元(Operational taxonomic units, OTUs),其中沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)为九里香植株中内生细菌的绝对优势菌属。测定了 14 株内生细菌的功能,其中 9 株菌能产生吲哚-3-乙酸(IAA);具有抗生素(*phlD*)合成能力的内生细菌有 4 株;结合 *nifH* 和 *NFb* 固氮培养基确定有 3 株内生细菌具有固氮能力;1 株内生细菌具有 ACC 脱氨酶合成能力;8 株内生细菌具有铁细胞合成能力;3 株内生细菌具有淀粉水解能力;2 株内生细菌显示强阳性的蛋白酶合成能力,4 株内生细菌具有以上 4 种功能。【结论】九里香植株中内生细菌具有丰富的多样性,并且可能对九里香植株生长发育及抗生物和非生物胁迫有着重要的生理功能。

关键词: 九里香, 柑橘黄龙病, 功能性内生细菌, 16S rDNA-RFLP

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30971875); 国家公益性行业(农业)科研专项(No. 201003067)

*通讯作者: Tel: 86-23-65120489; 信箱: zkwang646@sina.com

收稿日期: 2012-01-28; 接受日期: 2012-03-13

Isolation and characterization of endophytic bacteria from huanglongbing's hidden host plant- *Murraya paniculata*

YIN You-Ping¹ LI Jia¹ LIN Ya-Yu¹ CHEN Shi-Wei² WANG Zhong-Kang^{1*}

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

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

Abstract: [Objective] Our goal is to analyze the bacterial endophytic diversity in *Murraya paniculata*, which was huanglongbing's hidden host plant, and find the endophytic bacteria that may have potential to suppress the HLB pathogen. **[Methods]** The endophytic bacteria were isolated from surface-sterilized *M. paniculata* midribs of leaves and phloem of stems by plating and restriction fragment length polymorphism (RFLP). The functions of 14 culturable bacteria had been tested using different substrates and cultural medium. **[Results]** By the artificial anaerobic culture, we obtained 26 strains that were grouped into 9 genus according to GenBank. *Enterobacter* sp. (IF=19.23%) and *Bacillus* sp. (IF=38.46%) were the dominant bacterial population in *M. paniculata*. However, the bacterial colony number of endophytic bacteria in the stems was higher than in the leaves. The endophytic bacteria 16S rDNA library of *M. paniculata* was established. Coverage C of the clone library was 94.97% and the rarefaction curve of the clone library tended to plateau, which indicate that the library are large enough to reflect the bacterial endophytic diversity of the respective samples. 179 positive clones in 16S rRNA gene library were chosen and digested by restriction endonuclease *Hae* III, *Msp* I, *Rsa* I respectively. Twenty OTUs (Operational taxonomic units) were observed based on the similarity of the RFLP banding profiles. In the observed clones, 63.69% of the clones were *Serratia* sp., which means that the *Serratia* sp. was absolute preponderant endophytic bacteria in *M. paniculata*. The functional analysis of the 14 endophytic bacteria showed that 9 isolates can produce IAA and 3 of them had amylolysis activity. The frequency of endophytic bacteria which can produce ACC deaminase, siderophore and protein activity was 1, 8 and 2 respectively. Three of bacteria isolates with N-fixation ability were screened by using N-free medium and *nifH* gene and 4 of endophytic bacteria cansynthesis antibiotic (*phlD*). A total of 4 bacterial isolates was provided with four of mentioned traits. **[Conclusion]** The endophytic bacteria isolated from *M. paniculata* have abundant diversity and genetic characterization, and they may have important functions for the plant development, anti abio-stresses and bio-stresses.

Keywords: *Murraya paniculata*, Huanglongbing, Functional bacterial strains, 16S rDNA-RFLP

柑橘黄龙病(Citrus Huanglongbing, HLB)是世界上一严重的植物病害, 对柑橘生产造成严重的危害。目前, 柑橘黄龙病已遍及亚洲、非洲柑橘产区, 现正在美洲蔓延。该病害是由一种寄

生于韧皮部筛管细胞内的革兰氏阴性细菌所引起, 属 α -变形菌纲(Alphaproteobacteria)难培养原核微生物。根据病原 16S rDNA (16S ribosomal DNAs, 16S rDNA)和 β -操纵子基因的序列特征,

以及传病媒介和病原性质,将 HLB 病菌命名为候选韧皮杆菌属(*Candidatus Liberibacter* spp.)。在中国,目前仅有亚洲种 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*, Las)分布,对我国柑橘产业造成极大的威胁^[1-2]。

九里香(*Murraya paniculata*)是一种观赏和药用植物广泛在我国南方种植^[3],同柑橘一样,作为芸香科属的九里香植物也受柑橘木虱传播的柑桔黄龙病菌侵染,但并不产生明显的症状。有关九里香属植物与柑橘黄龙病的关系研究起源于我国。李韬^[4]、邓崇岭^[5]等分别利用 Nest-PCR 和酶切分析技术在危害九里香的柑橘木虱及九里香中检测到了柑桔黄龙病病原,说明九里香不仅是柑橘木虱的寄主,还是柑桔黄龙病病原的隐症寄主。2007 年, Zhou 等^[6]的实验证明 HLB 病原可以在九里香体内持续生存 2 个月以上,且九里香长期不表现明显的柑桔黄龙病病症,这期间 HLB 病原可以通过菟丝子从九里香上传播到甜橙。上个世纪末,邓秀新等^[7]根据九里香抗黄龙病、耐盐碱、抗柑桔线虫病等特性,利用细胞融合技术将九里香的抗黄龙病特性转移至柑桔,其杂合体保持了九里香的抗病性和柑桔的优良农艺性状。Damsteegt 等^[8]利用柑橘木虱传播及回接的方法,证明九里香属植物的 *M. paniculata* 与 *M. exotica* 可以充当柑桔黄龙病菌的短暂寄主, *M. koenigii* 却不能。由此可见,柑桔、木虱及九里香已构成 HLB 传播的循环途径。

利用寄主抗病性防治病害是一种经济且高效的方法,而许多植物的抗病性与植物内生菌有关。20 世纪 90 年代初已获得植物促生菌诱导系统抗性的直接病原学证据^[9],但目前有关柑橘内生菌抗柑桔黄龙病功能的研究未见相关报道。本研究采用细菌传统培养技术与 16S rDNA 分子鉴定法,对九里香(*M. paniculata*)内生细菌进行多样性分析及功能鉴定,期望揭示其内生细菌与黄

龙病的作用关系;并寻找内生细菌的功能代谢特征,为筛选抗黄龙病的相关菌株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试植物材料

九里香枝叶样品采自广西合浦(E108°51'N21°27')柑桔黄龙病疫区周围,样品采集后塑料袋密封保存于 4 °C 备用;所有样品在采集后在 2-3 d 内处理。

1.2 培养基和试剂

培养基:含 2.5 mmol/L 色氨酸的 KingB^[10];肉质胨淀粉培养基^[11];脱脂牛奶培养基^[12];阿斯毕(Ashby)无氮培养基^[13-14];CAS 琼脂培养基^[15];PYG、SMA、SM 培养基^[16]。

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; Taq Plus 酶, Sangon; *E. coli* TransMAX Competent Cell, TransGen。

1.3 九里香可培养内生细菌的分离纯化与培养

样品的消毒灭菌处理:自来水冲洗九里香叶和枝干,滤纸吸干材料表面的水分。先用 75%的无水乙醇浸泡 60 s,随即浸入 2%次氯酸钠分别处理 30 s (叶)、3 min (枝干),最后用无菌水冲洗 5-6 次。收集最后一次冲洗液 100 μ L 在 1% LB 培养基上涂布,28 °C 培养过夜,检验表面消毒是否完全。

内生菌的分离纯化:超净工作台中,叶片取中脉,枝条去除表皮取韧皮部,切成 0.2 cm 长左右的条段;各材料(g)与水(mL)比例为 1:2,加入无菌水浸泡 2-3 h;取浸泡液 10 μ L,按 10 倍梯度稀释至 10^{-3} ,取 100 μ L 菌悬液,分别涂布在 1% TSA 和 1% LB 半固体培养基上每个梯度均设 3 个重复,于 28 °C 细菌培养箱中培养 2-6 d。

根据菌落的颜色及形态,将不同菌种在平板上划线纯化,直到得到该菌株的单菌落。4 °C 冰

箱保存; 同时用 15% 甘油保存菌株, 于 -80°C 超低温冰箱中保存, 备用。

1.4 九里香可培养内生细菌革兰氏染色鉴定及生理生化鉴定

根据《常见细菌系统鉴定手册》^[11]和《伯杰氏细菌鉴定手册》第 9 版^[17], 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株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, 统计九里香不同植株部位菌落的相对丰富度: 内生细菌菌落丰富度(CFU/g 鲜重)=平板菌落数 \times 稀释倍数 $\times 10^2$ 。

1.5 九里香可培养内生细菌分子种属鉴定

试剂盒提取细菌总 DNA, 利用细菌通用引物 27f/1492r (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[18]进行扩增。PCR 反应体系为 50 μL , 反应条件为: 95°C 5 min; 95°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 100 s, 共 30 个循环; 72°C 7 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增片段长度约为 1.5 kb。

将经 PCR 扩增出的基因片段用凝胶纯化试剂盒纯化后与 pMD19-T 载体连接, 转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞中。筛选阳性转化子并送深圳华大基因测序。测序结果 BLAST 比对, 结合形态及生理生化特征判定种类。

1.6 九里香内生细菌的 PCR-RFLP 分析

1.6.1 九里香内生细菌 16S rDNA 扩增及克隆文库的构建: 取经表面消毒过的九里香叶片中脉和枝干韧皮部, 液氮研磨成粉, 利用细菌基因组提取试剂盒提取细菌基因组 DNA。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 (5'-AACMGGATTAGATACCKG-3'/5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3')^[19] 扩增 16S rDNA 的 V5-V9 这 5 个高变区域。PCR 反应体系为 50 μL , 反应条件为: 94°C 4 min; 94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 共 30 个循环; 72°C

10 min。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测, 目的片段约为 730 bp。利用凝胶纯化试剂盒纯化回收目的片段, 与载体 pMD19-T 连接, 转入 *E. coli* TransMAX 高效感受态细胞中。随机挑取克隆子进行 PCR 检测。

1.6.2 九里香内生细菌 RFLP 分析: 提取阳性克隆子质粒, 利用 *Hae* III、*Msp* I、*Rsa* I 3 种限制性内切酶分别对质粒进行限制性片段长度多态性分析(RFLP)。 37°C 恒温培养箱中酶切 4 h, 用 2.0% 琼脂糖凝胶, 130 V 电压下电泳 40 min, 记录酶切图谱类型。

1.7 九里香可培养内生细菌功能鉴定

利用 KingB 液体培养基测定吡啶-3-乙酸(IAA)的合成^[10]; 通过对 *phlD* 基因的扩增测定菌株合成抗生素的能力^[20]; 利用 Ashby 无氮培养基及 *nifH* 基因测定菌株的固氮能力^[13-14]; 以 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)为氮源, 测定菌株的 ACC-脱氨酶合成能力^[16]; 利用 CAS-agar 培养基测定菌株的铁载体合成能力^[15]; 利用肉质胨淀粉培养基^[11]及脱脂牛奶培养基^[12]分别测定菌株的淀粉水解及蛋白酶合成能力。

1.8 数据分析

1.8.1 16S rDNA 克隆文库的评价: 利用 Coverage C 评价克隆文库的覆盖度, 覆盖度以 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表示, 其计算公式如下^[21]: $C=(1-n_1/N)\times 100\%$; N 表示克隆文库中克隆子的数目; n_1 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。同时采用 Analytic Rarefaction 1.3 软件进行 Rarefaction Curve 分析, 检测 16S rDNA 克隆文库的完整性。

1.8.2 序列分析与系统进化树的构建: 在 NCBI 数据库中, 搜索与 16S rDNA 序列相似的序列, 进行序列比对。利用 ClustalX 和 MEGA 4.0 软件估算序列间遗传距离, 采用 N-J (Neighbor-Joining)

法构建系统进化树,分析所测序列与其相似序列的遗传进化关系。

2 结果

2.1 九里香可培养内生细菌的分离鉴定

经 48 次分离培养,共获得 26 株形态不同的菌株,经生理生化及 16S rDNA-PCR 鉴定,分属于 9 个种属(表 1),其中革兰氏阳性菌(14 株)多于革兰氏阴性菌(12 株),菌落丰富度在 1.64×10^5 – 1.76×10^6 CFU/g 鲜重,且 1% LB 与 1% TSA 2 种

半固体培养基上,植株不同部位中的内生细菌数量有显著差异,但菌落形态并没有明显的差异(表 2)。其中肠杆菌(*IF*=19.23%)、芽胞杆菌属(*IF*=38.46%)为九里香内生细菌的优势菌属。

26 株内生细菌属于 5 个不同的类群,低 G+C 革兰氏阳性菌(Firmicutes)为主要类群,占内生细菌总数的 50%,其次为变形菌门(Proteobacteria),包括 α 、 γ 2 个类型,分别占 7.7%、30.77%;拟杆菌(Bacteroidetes)占 7.7%;放线细菌(Actinobacteria)占 3.85%(表 1)。

表 1 九里香内生优势菌群序列比对结果						
Table 1 Sequences alinment of 16S rRNA gene in endophytic bacterial from <i>M. paniculata</i>						
分类 Group	菌株代码 Strain code	菌株登录号 Accession No.	长度 Length (bp)	分离频率 <i>IF</i> (%)	比对相关序列 Closest match in NCBI	同源性 Identity (%)
Bacteroidetes	HPMp 02	JN020662	1 349	7.69	<i>Chryseobacterium</i> sp. (EF565935.1)	100
Firmicutes	HPMp 03	JN020663	1 371	7.69	<i>Staphylococcus</i> sp. B3RO05 (HQ015739.1)	100
	HPMp 04	JN020664	1 522	3.85	<i>Bacillus subtilis</i> strain (FJ876834.1)	97
	HPMp 05	JN020666	1 522	3.85	<i>Bacillus</i> sp. TBD1-3 (HQ236073.1)	99
	HPMp 06	JN020665	1 419	15.38	<i>Bacillus megaterium</i> strain P41 (HQ423382.1)	97
	HPMp 07	JN020667	1 523	7.69	<i>Bacillus cereus</i> B4264 (CP001176.1)	99
	HPMp 08	JN020668	1 424	7.69	<i>Bacillus pumilus</i> strain AU MB (HQ122449.1)	100
	HPMp 09	JN020669	1 391	3.85	<i>Paenibacillus</i> sp. (HQ222349.1)	100
γ -Proteobacteria	HPMp 01	JN020661	1 404	19.23	<i>Enterobacter</i> sp. (GU726864.1)	99
	HPMp 11	JN020671	1 259	3.85	<i>Pseudomonas</i> sp. Acj 106 gene (AB480754.1)	100
	HPMp 13	JN020673	1 346	7.69	<i>Stenotrophomonas</i> sp. (FM992758.1)	99
α -Proteobacteria	HPMp 10	JN020670	1 261	3.85	<i>Brevundimonas</i> sp. NCCP-147 gene (AB549434.1)	99
	HPMp 14	JN020674	1 285	3.85	<i>Sphingomonas</i> sp. (DQ207361.1)	99
Actinobacteria	HPMp 12	JN020672	1 372	3.85	<i>Curtobacterium</i> sp. Fek209 (EU741030.1)	97

注: HP: 合浦, 广西; Mp: 九里香; 分离频率(*IF*)=分离菌株数目/菌株总数。
Note: HP: HePu, GuangXi; Mp: *Murraya paniculata*; Isolate frequency (*IF*) = Isolated number of strain / total isolated number of strains.

表 2 九里香内生细菌分布情况				
Table 2 Endophytic bacterial population in <i>M. paniculata</i>				
寄主 Host Plant	1% LB medium		1% TSA medium	
	Stem	Leaf	Stem	Leaf
内生细菌菌落丰富度 Bacterial colony number (CFU/g)	1.76×10^{6b}	1.96×10^{5a}	1.44×10^{6b}	1.64×10^{5a}
内生细菌种类 Species of entophytic bacteria	7	11	6	11

注: 1% LB: 1%溶菌肉汤培养基; 1% TSA: 1%胰蛋白胨大豆培养基; $P<0.05$ 。
Note: 1% LB: 1% Luria bertani; 1% TSA: 1% Tryptic soy agar; $P<0.05$.

2.2 九里香内生细菌的 PCR-RFLP 分析

2.2.1 16S rDNA 克隆文库的充分性分析: 随机挑取克隆子 226 个, PCR 检测有 179 个属阳性克隆子。利用 Analytic Rarefaction 1.3 软件进行 Rarefaction Curve 分析(图 1), 当克隆子数为 179 个时, 检测到微生物种群数目增加几率已显著降低; Coverage C 计算得出: 该 16S rDNA 克隆文库中所包含的微生物种类(OTUs)占样品中全部微生物种类的 94.97%。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。

2.2.2 16S rDNA 克隆文库的 RFLP 分析: 提取 179 个阳性克隆的质粒, 分别用 *Hae* III、*Msp* I、*Rsa* I 3 种限制性内切酶进行 RFLP 分析, 根据图 2 的电泳条带, 分别得到 9 条不同的酶切图谱。培养内生细菌最优势菌属。

27 条酶切图谱组合, 每一个不同组合称为一个操作分类单元(OUT)。本研究分析共得 20 个正确的 OTUs (表 3)。179 个阳性克隆中, 不可培养菌占 29.67%; U01、U05 所代表的菌属为优势菌属, 分别占总量的 37.36% 和 24.78%, 表明九里香植株体内存在大量的沙雷氏菌属及难培养菌。

采用 N-J 法对得到的 20 个不同的 OTUs 构建系统进化树, 进行遗传进化研究。经系统发育分析知, 20 个 OTUs 可分为 4 个不同的类群。其中变形菌门(Proteobacteria)为主要类群, 包括 α 、 β

和 γ 3 个类型, 分别占 3.35%、3.91% 和 65.36%。未知细菌(Uncultured bacteria)占 26.81%, 分属于各个不同的分类地位(图 3)。

2.3 九里香可培养内生细菌功能鉴定结果

分离自九里香的 14 株内生细菌进行的生理功能测定结果显示(表 4), 14 株菌株中有 9 株(64.3%)能产生吲哚-3-乙酸(IAA); 具有抗生素(*phlD*)合成能力的内生细菌有 4 株; 结合 *nifH* 和 NFb 固氮培养基确定有 3 株内生细菌具有固氮能力; 1 株内生细菌具有 ACC 脱氨酶合成能力; 8 株内生细菌具有铁细胞合成能力, 在 CAS 培养基上产生橙色晕圈; 3 株内生细菌具有淀粉水解能力; 2 株内生细菌显示强阳性的蛋白酶合成能力。至少具备 4 个功能的菌株为: *Bacillus megaterium* (HPMp

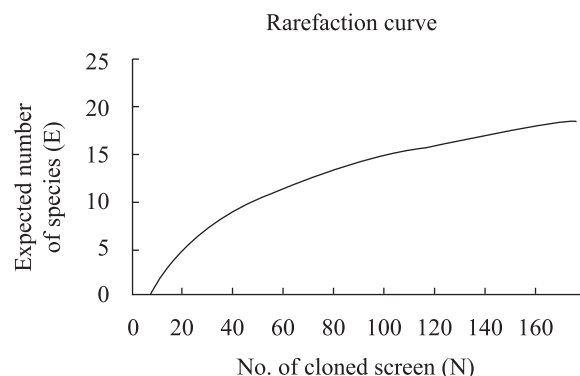


图1 九里香 16S rDNA 克隆文库的 Rarefaction 分析曲线

Fig. 1 Rarefaction curve of endophytic bacterial 16S rDNA clone library of *M. paniculata*

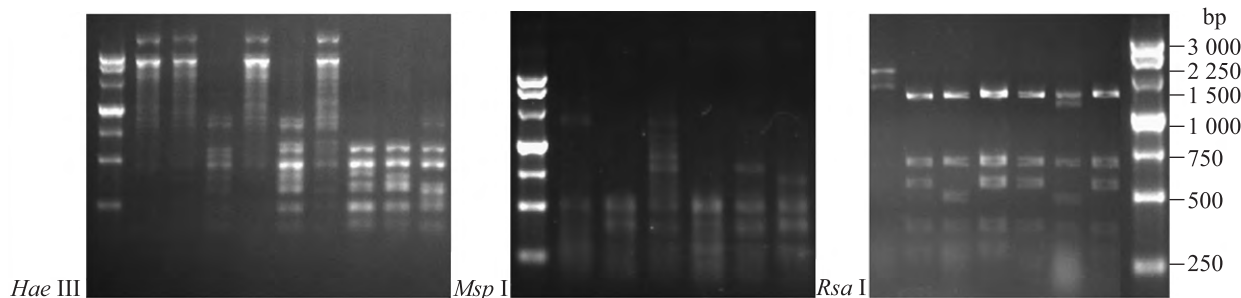


图2 九里香 16S rDNA 克隆文库的 *Hae* III、*Msp* I、*Rsa* I 酶切图谱 (部分)

Fig. 2 Restriction patterns of 16S rDNA clone library with *Hae* III、*Msp* I、*Rsa* I (part of the experiment)

表 3 16S rDNA-RFLP 分析鉴定结果
Table 3 Results of RFLP analyses for 16S rDNA in *M. paniculata*

分类 Groups	分类 单元 OTUs	登录号 Accession No.	克隆 子数 Num- ber of clones	所占 比例 Total clones %	NCBI 中相似的序列 Closest NCBI match	同源性 Identity (%)
γ -Proteobacteria 65.36%	U01	JN020675	68	37.99	<i>Serratia</i> sp. JG05 (EU798943.1)	99
	U05	JN020680	45	25.14	<i>Serratia nematodiphila</i> strain P36 (FJ662869.1)	100
	U12	JN020683	2	1.12	<i>Xanthomonas</i> sp. TE9 (GQ381284.1)	100
						(待续)
						(续表 3)
	U13	JN020684	1	0.56	<i>Stenotrophomonas</i> sp. p22(2011) (HQ652605.1)	99
	U15	JN020686	1	0.56	<i>Serratia</i> sp. JG05 (EU798943.1)	99
	U04	JN020679	2	1.12	<i>Brevundimonas terrae</i> strain RCPS-6 (HM172503.1)	100
α -Proteobacteria 3.35%	U08	JN020694	2	1.12	Uncultured <i>alpha</i> proteobacterium clone (FJ517741.1)	99
	U19	JN020691	2	1.12	<i>Sphingomonas</i> sp. DC2a-27 (AB552856.1)	99
	U09	JN020676	1	0.56	Uncultured <i>beta</i> proteobacterium clone D8W_30 (HM057713.1)	99
β -Proteobacteria 3.91%	U10	JN020681	1	0.56	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain M66 (HQ676601.1)	99
	U11	JN020682	3	1.68	Uncultured <i>Achromobacter</i> sp. clone CHINA46 (GU563751.1)	99
	U16	JN020688	1	0.56	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> strain M66 (HQ676601.1)	100
Uncultured bacteria 26.81%	U17	JN020689	1	0.56	Uncultured <i>beta</i> proteobacterium clone D8W_30 (HM057713.1)	99
	U02	JN020677	1	0.56	Uncultured <i>Kordia</i> sp.(FJ387769.1)	99
	U03	JN020678	34	19.0	Uncultured bacterium clone FPURT1-H0(GU166632.1)	97
	U06	JN020685	7	3.91	Uncultured bacterium clone CHINA11 (GU563744.1)	98
	U07	JN020687	1	0.56	Uncultured bacterium clone C08 (HM060207.1)	99
	U14	JN020692	1	0.56	Uncultured bacterium clone JSC7-1 (DQ532202.1)	99
	U18	JN020690	3	1.68	Uncultured bacterium clone yf4clone56 (HQ610742.1)	99
	U20	JN020693	2	1.12	Uncultured bacterium clone B24 (GQ422766.1)	99

06)、*Bacillus pumilus* (HPMp 08)、*Paenibacillus* sp. (HPMp 09)和 *Sphingomonas* sp. (HPMp 14)。

3 讨论

本研究中所用的 2 种半固体培养基(1% LB 与 1% TSA)对九里香内生细菌的分离能力没有显著差异。但植株不同部位的内生细菌菌落丰富度存在显著差异,枝干中的菌落丰富度高于叶片

内; 9 个属的可培养内生细菌中的革兰氏阳性菌与阴性菌数目几乎相同, 根据遗传进化关系, 可分为 5 个不同的类群, 各类群在九里香植株中的丰度差异较大, 说明九里香植株中的内生细菌不仅种类丰富且含量也各不相同。其中包括常见的内生细菌, 如 *Bacillus* sp.、*Enterobacter* sp.、*Paenibacillus* sp.等; 也分离到了 *Sphingomonas* sp. 和 *Curtobacterium* sp. 两个不常见的植物内生细菌。

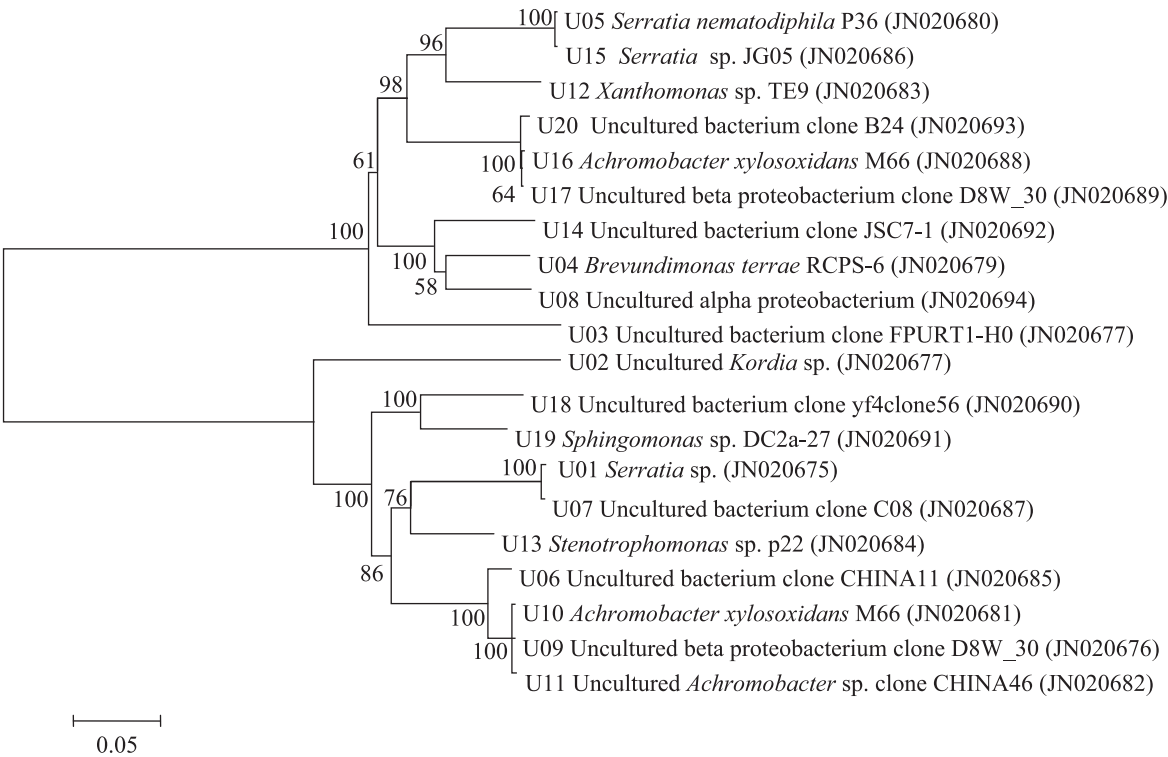


图 3 基于 16S rDNA 序列的九里香内生细菌系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of *M. paniculata* based on the 16S rDNA sequences

Note: Sequences were obtained from GenBank, and the accession numbers are in parentheses. The nodes are supported by 1,000 bootstrap replications. Bootstrap values above 50% and the genetic distance scale are shown.

表 4 九里香内生细菌功能分析								
Table 4 The functional analysis of endophytic bacteria isolated from <i>M. paniculata</i>								
菌株 Strains	Production of IAA	<i>phlD</i>	<i>nifH</i>	N-fixation	ACC deaminase	Siderophore	Amylolysis activity	Protein activity
HPMp 01	+	—	—	—	—	+	—	—
HPMp 02	—	+	—	—	—	+	+	—
HPMp 03	+	—	—	—	—	+	—	—
HPMp 04	+	+	—	—	—	+	—	—
HPMp 05	—	+	—	—	—	—	—	—
HPMp 06	+	+	+	—	—	+	—	—
HPMp 07	+	—	—	—	—	+	—	+
HPMp 08	+	—	+	—	—	—	+	+
HPMp 09	+	—	+	+	—	+	+	—
HPMp 10	—	—	—	+	—	+	—	—
HPMp 11	+	—	+	—	—	—	+	—
HPMp 12	—	—	+	—	—	—	—	—
HPMp 13	—	—	+	+	—	—	—	—
HPMp 14	+	—	+	+	+	—	—	—

注: +: 阳性; —: 阴性.

Note: +: Positive; —: Negative.

RFLP 分析中, 20 个 OTUs 中, *γ-Proteobacteria* 类群的比例为 65.36%, Araújo 等^[22]曾提到处于热带和温带地域的植物内生细菌, 比例最大的类群为 *γ-Proteobacteria*, *Xanthomonas* sp.、*Enterobacter* sp.等在这类环境中分布广泛, 本研究的分析结果与此结论一致。Gyaneshwar 等^[23]曾报道植物体内存在大量的沙雷氏菌属, P. Trivedi 等^[20]发现普成沙雷氏菌(*Serratia plymurtica*)具有明显减少柑橘黄龙病菌的含量的作用。九里香体内 *Serratia* sp.为绝对优势菌属, 其是否对柑桔黄龙病菌有抑制作用还有待进一步研究。

本研究对文库中 179 个克隆进行的测序结果显示, 随着克隆子数目的增加, Rarefaction 曲线仍是在缓慢地增加, 说明该克隆文库并不是完整的, 只是相对充分的。其原因可能由于 PCR 的偏好性、不同基因 DNA 的拷贝数不同且在克隆过程中也存偏好性等原因所致^[24]。

另外, 对九里香内生细菌的测序分析和系统进化分析可以看出, 九里香植株内含有大量的未知细菌, 他们分别隶属于不同分类阶元, 表明九里香植株中含有大量的尚不被人们所知的细菌, 可能这些不可培养细菌正是柑橘黄龙病菌能在九里香上生存但不能大量增殖的原因, 值得我们深入研究。

内生菌生活于植物体内, 与植物协同进化。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。内生细菌的吲哚-3-乙酸(IAA)合成能力、抗生素合成能力、固氮能力、ACC-脱氨酶合成能力、铁载体合成能力和淀粉水解及蛋白酶合成能力是衡量内生细菌对宿主植物作用机制的标准。P. Trivedi 等^[25]已证实柑橘根部中的 *Paenibacillus* sp.对柑橘黄龙病菌的生长具有抑制作用。本研究筛选得到 *Bacillus megaterium*、*Bacillus pumilus*、

Paenibacillus sp.和 *Sphingomonas* sp. 4 株功能性植物内生细菌, 它们的共同特点是都能产生吲哚-3-乙酸(IAA), 但其与柑橘黄龙病菌之间的关系还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Bové JM. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 2006, 88(1): 7–37.
- [2] Hocquellet A, Toorawa P, Bové JM, et al. Detection and identification of the two *Candidatus Liberobacter* species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of the β operon[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 1999, 13(5): 373–379.
- [3] 汤秋玲, 卢远倩, 骆焱平. 九里香属植物的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(24): 11523–11525.
- [4] 李韬, 柯冲. 应用 Nested PCR 技术检测柑桔木虱及其寄主九里香的柑桔黄龙病带菌率[J]. *植物保护学报*, 2002, 29(1): 31–35.
- [5] 邓崇岭, 陈传武, 赵小龙, 等. 用 Nested-PCR 检测广西黄皮与九里香黄龙病病原[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(17): 273–276.
- [6] Zhou LJ, Gabriel DW, Duan YP, et al. First report of dodder transmission of Huanglongbing from naturally infected *Murraya paniculata* to citrus. *Plant Disease*, 2007, 91(2): 227.
- [7] 郭文武, 邓秀新. 柑桔黄龙病及其抗性育种研究(综述)[J]. *农业生物技术学报*, 1998(1): 37–41.
- [8] Damsteegt VD, Postnikova EN, Stone AL, et al. *Murraya paniculata* and related species as potential hosts and inoculum reservoirs of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, causal agent of Huanglongbing[J]. *Plant Disease* May, 2010, 94(5): 528–533.
- [9] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, 43(10): 895–914.

- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] John GH, Nobel RK, Peter HA. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Press, 1994: 39–138.
- [18] 王爱华, 殷幼平, 熊红利, 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.
- [19] Sagaram US, DeAngelis K M, 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.
- [20] 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.
- [21] Lei S, Qiu FB, Zhang XX, et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis[J]. Microbial Ecology, 2008, 55(3): 415–424.
- [22] Araújo WL, Maccheroni W Jr, Aquilar-Vildoso CI, et al. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(3): 229–236.
- [23] Gyaneshwar P, James KK, Mathan N, et al. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(8): 2634–2645.
- [24] Kemp PF, Aller JY. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(2): 161–177.
- [25] Trivedi P, He ZL, van Nostrand J D, et al. Huanglongbing alters the structure and functional diversity of microbial communities associated with citrus rhizosphere[J]. International Society for Microbial Ecology, 2012, 6(2): 363–383.