

非培养方法解析北京地区甘薯叶际细菌的群落结构

谷立坤^{1,2}, 白志辉^{2,*}, 于影^{2,3}, 赵青², 李祖明⁴, 庄国强², 张洪勋^{2,3}

(1. 中国科学院青岛生物能源与过程研究所, 青岛 266101; 2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 4. 北京联合大学应用文理学院, 北京 100191)

摘要: 利用聚合酶链式反应-变性梯度凝胶电泳 (PCR-DGGE) 技术和磷脂脂肪酸 (PLFA) 分析方法, 比较了北京通州、顺义、昌平、延庆地区甘薯叶际细菌的多样性和生物量, 并调查了通州地区甘薯叶际细菌群落不同生长季节的变化情况。PLFA 分析结果发现所有检测样品中, 革兰氏阳性细菌生物量均高于革兰氏阴性细菌生物量。PCR-DGGE 方法与 PLFA 方法聚类分析结果较一致, 甘薯叶际细菌群落结构受到时空因素、甘薯生理特性等的影响, 不同地点、不同生长季节甘薯叶际细菌群落结构有较大差异, DGGE 条带测序分析表明, *Pseudomonas* sp. 在不同地点的甘薯叶际均为保守菌群, *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Weissella* sp., *Bradyrhizobium* sp., *Enterococcus* sp., *Pantoea* sp. 分别为不同条件下甘薯叶际细菌的优势菌群。

关键词: 甘薯; 叶际细菌群落; PCR-DGGE; PLFA

Investigation of bacterial community structure within the sweet potato phyllosphere using culture-independent techniques

GU Likun^{1,2}, BAI Zhihui^{2,*}, YU Ying^{2,3}, ZHAO Qing², LI Zuming⁴, ZHUANG Guoqiang², ZHANG Hongxun^{2,3}

1 Institute of BioEnergy and Bioprocess Technology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266101, China

2 Research Centre for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

3 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

4 College of Arts and Sciences of Beijing Union University, Beijing 100191, China

Abstract: Investigation of the variations in the bacterial community on sweet potato leaves over multiple time and space scales could provide important information to describe the identity and the ecology of leaf inhabitants. In this study, bacterial flora in the phyllosphere of sweet potato under field conditions was identified using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) and phospholipid fatty acid (PLFA) analysis methods on June 15th, in Shunyi, Tongzhou, Changping and Yanqing, Beijing, China. Furthermore, the bacterial flora in the sweet potato phyllosphere in Tongzhou was investigated during the period of May-August. PLFA assay indicated that bacterial population of the gram-positive bacteria were found to be more than the gram-negative bacteria in all samples. DGGE bands sequencing showed that *Pseudomonas* sp. was a persistent bacterium in all samples from different places; *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp., *Weissella* sp., *Pantoea* sp., *Bradyrhizobium* sp. and *Enterococcus* sp. were also detected as the dominant strains within sweet potato phyllosphere under different conditions.

Key Words: sweet potato; phyllosphere bacteria flora; PCR-DGGE; PLFA

植物地上部分(包括叶、茎、花、果等)的表面和内部存在着大量的各种类型的微生物, 这些存在于叶际的微生物称为叶际微生物^[1]。它们对植物的生长、农药残留的降解、大气中氮的固定等具有重要作用, 并直接参与植物的致病和抗病过程^[2-6]。了解叶际微生物的生态行为, 有助于控制植物病害的发生和发展。叶际微

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30600082; 20777089); 北京市教委资助项目(KM200811417006)

收稿日期: 2009-08-04; **修订日期:** 2009-11-13

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhbai@rcees.ac.cn

生物的群落结构受到当地环境和植物自身生理特点影响会发生一定变化^[6-8],一些菌群作为保守菌群会较长时间或同一时间在一定地域范围内存在^[9]。因此,研究不同时间与植物不同生长期,叶际微生物群落结构的特征,对于理解微生物引起的植物病害及植物病害的生物防治有一定意义。

可培养方法能够直接分离、鉴定叶际微生物,并分析其生理、生化特点^[10-11]。但环境中可培养微生物只有总微生物种类的约 0.1%—10%^[12],大量不可培养的微生物无法用纯培养的方法获得,影响了对微生物群落特征的深入了解。现代微生物分子生态分析方法突破了纯培养瓶颈,能从分子水平上更客观地揭示环境微生物的多样性。PCR-DGGE 方法作为一种成功的分子生态学方法应用于各种环境样品的研究中^[13-14],具有鉴定环境微生物群落结构及种属的能力,同时可以较方便的用来跟踪环境样品微生物群落结构的变化,但不能够对微生物的生物量进行确定^[15-16]。磷脂脂肪酸是活体微生物细胞膜恒定组分,种属差异明显、对环境因素敏感,特征 PLFA 数量及不同脂肪酸间比值可反映微生物菌群结构和相对数量,通过观察 PLFA 的组成及量的变化,可揭示叶际细菌群落结构组成及变化规律^[17-19],磷脂脂肪酸分析方法已经广泛在环境微生物研究领域应用^[20-24]。本文结合应用 PCR-DGGE 与 PLFA 两种方法,既可以较详细地描述叶际细菌的优势种群,又能够对叶际细菌的生物量变化进行监测。

甘薯是我国重要的粮食作物,本研究应用 PCR-DGGE 方法、PLFA 方法,分析比较了北京顺义、通州、昌平、延庆地区甘薯叶际细菌多样性及细菌群落结构和生物量随时间、地点的变化情况,为甘薯的种植生产以及病虫害防治提供一些基础的微生物学理论依据。

1 材料与方法

1.1 甘薯叶片的采集

供试甘薯叶片于 2007 年 5 月 15 日、6 月 15 日、7 月 15 日和 8 月 15 日采自北京地区通州大田,并于 6 月 15 日采取顺义、昌平、延庆地区甘薯叶片。甘薯种植小区周围设置保护行,采集时随机多点取样,带无菌手套,采集的甘薯叶片立即放入无菌样品袋中,4℃ 保存。所采集甘薯叶片均无病害发生,且未曾施用农用化学品。

1.2 叶际细菌的分离

取回的叶片样品各称量 10 g 无菌条件下转入 100 ml 洗脱液(0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液, pH 7.0), 15℃ 200 r/min 振荡 30 min,超声波清洗仪(Shanghai Kudos Instrument Co., Ltd.)中超声处理 5 min。收集洗脱液, 4℃ 10000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,用作 PLFA 分析和微生物 DNA 提取^[25]。

1.3 磷脂脂肪酸提取及测定

取收集的植物叶际细菌菌体悬浮于 30ml 氯仿、甲醇和磷酸缓冲液的混合液(体积分数 1:2:0.8)中,避光振荡提取 4 h, 7000 r/min 离心 15 min,取上清液,转入分液漏斗中,再加入 10 ml 磷酸缓冲液和 10 ml 氯仿,室温下避光分层(2 h)。使单相提取液分离成两相,收集下层氯仿相,氮气吹干至 1 ml。用硅胶柱(100—200 目硅胶 10 g,用前 100℃ 活化 1 h),分别用 15 ml 氯仿、30 ml 丙酮和 15 ml 甲醇溶剂洗脱,收集甲醇的洗液,用氮气吹干。上步取得的样品加入 1 ml 甲醇: 甲苯(体积分数 1:1)和 1 ml 5.6 g/L KOH 的无水甲醇,将溶液于 37℃ 下反应 40 min。反应液冷却至室温,加入适量乙酸中和,再加入有机溶剂氯仿和正己烷(体积分数 1:4) 2 ml 和 2 ml 超纯水后静置分层,取上清液(正己烷相)氮气吹干, -20℃ 下贮存。上述提取物溶解于含有 3.3 μg/ml 的正 19 烷脂肪酸甲酯(Sigma Aldrich Co., USA)内标物的氯仿: 正己烷(体积分数 1:4)溶剂中。

气相色谱-质谱联用仪采用得是 HP6890 气相色谱-HP5973 质谱联用仪,检测中使用的升温程序如下:进样后在 50℃ 保持 1 min,之后以 12℃/min 的速率升到 180℃,保持 2 min 后,以 6℃/min 的速率上升到 220℃,停留 2 min 后以 15℃/min 的速率上升到 240℃,保持 1 min 后以 15℃/min 的速率达到最终温度 260℃,并在此保持 15 min。气谱与质谱之间得连接温度为 280℃,用高纯氮气(1 ml/min)作载气,质谱仪采用电子电离(EI)方式,电子能量为 70 eV^[26]。

1.4 磷脂脂肪酸分析方法

细菌的生物量可以通过以下 PLFAs 的总量估算:15:0、a15:0、i15:0、i16:0、16:1ω7t、16:1ω9t、17:0、i17:0、

a17:0、cy17:0、18:1 ω 5、18:1 ω 7 和 cy19:0。可以用 16:0 (Me)、17:0 (Me)、18:0 (Me)、15:0、a15:0、i15:0、i16:0、i17:0 和 a17:0 的总量来估算革兰氏阳性菌的含量,16:1 ω 7t、16:1 ω 9t、cy17:0、18:1 ω 5、18:1 ω 7 和 cy19:0 的总量来估算革兰氏阴性菌的生物量,两者之比可代表革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌生物量的比值^[27]。

不同样品的 PLFA 数据,使用 SPSS (version 11.5) 进行聚类分析,聚类方法为 hierarchical cluster analysis,采用 ward 方法^[28]。

1.5 叶际细菌基因组 DNA 的提取

采用改进的化学裂解法直接提取植物叶际基因组 DNA,方法如下:取 0.2 g 上述收集的植物叶际细菌菌体悬浮于 800 μ L 裂解液中,加入 5 μ L 50 mg/ml 的溶菌酶,37℃ 温浴 30 min;加入 5 μ L 20 mg/ml 的蛋白酶 K,37℃ 温浴 30 min;再加入 20% 的 SDS 溶液使其终浓度为 2%,混匀,60℃ 温浴 1 h,温育期间取出震荡 4—5 次;加入等体积的氯仿,混匀,1000 r/min 离心 8 min;上清液加入 0.6 倍体积的异丙醇,常温下静置过夜,12000 r/min 离心 20 min;弃上清,干燥后重悬于 30 μ L TE 缓冲液中。

1.6 叶际细菌的 PCR-DGGE

16S rRNA 基因 V3 区的扩增:将纯化后 DNA 作为聚合酶链反应(PCR)的模板,采用对大多数细菌的 16S rRNA 基因 V3 区具有特异性的引物对:F338GC (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GCG GCA CGG GGG GACTCCTACGGAGGCAGCAG -3') 和 R518 (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')。PCR 反应体系:50 μ L 的 PCR 反应体系组成如下:50 ng 的模板、15 pmol 每种引物、100 μ mol/L dNTPs (每种 10 mmol/L)、5 μ L 的 10 $\times$ PCR buffer (without MgCl₂)、1.5 mmol/L 的 MgCl₂、2 U 的 DNA 聚合酶、适量的双蒸水补足 50 μ L。预变性条件为 95℃ 5 min,30 个循环为 95℃ 1 min, 55℃ 1 min 和 72℃ 2 min,最后在 72℃ 下延伸 10 min。PCR 反应的产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。采用 Bio-Rad 公司 Dcode 的基因突变检测系统对 PCR 反应产物进行电泳分离。制备含有变性剂(尿素和甲酰胺的混合物)的 10% 的聚丙烯酰胺凝胶,其中变性剂的浓度从 30% 到 60% (100% 的变性剂为 7 mol/L 的尿素和 30% 的去离子甲酰胺),在每个加样孔加入 PCR 产物浓缩样品 30 μ L。在 100 V 的电压下,60℃ 电泳 8 h。电泳完毕后,将凝胶在 EB 中染色 15 min,然后放入纯水中,脱色摇床 50 r/min 脱色 10 min。将脱色后的凝胶置于 YLN-2000 凝胶影像分析系统下观察并拍照,得到 DGGE 图谱,将 DGGE 电泳图谱中亮度大的条带切胶,并保存在 -20℃ 冰箱内。

1.7 PCR-DGGE 结果的分析方法

上述切割的胶条无菌超纯水冻融两次后重新 PCR 再 DGGE 分离,直至在 DGGE 中出现单一条带。然后重新切胶回收 DNA,用不带 GC 发卡的 F338 和 R518 扩增出目的片段。用 PCR 产物回收试剂盒(OMEGA)回收上面的 PCR 产物,酶联入 Promega 公司的 pGEM-T 载体。蓝白斑筛选后送交上海生工生物技术有限公司测序。将所得序列输入 NCBI 网站,用 Blast 程序与库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行比对,下载同源性最高的序列序列作为参考。采用软件 Bioedit 7.0.0 及 Mega 4.0 以 N-J 法进行系统发育分析(采样量 1000 次),构建系统发育树。

DGGE 图片采用 Quantity One (version 1.12, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 进行聚类分析,分析时先去除底色,标准化后采用 UPGMA 方法进行聚类分析^[26]。

DGGE 图片采用 Quantity One (version 1.12, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 进行条带检测,采用下列公式计算甘薯叶际细菌多样性:

$$S = - \sum_{i=1}^n P_i \cdot \ln P_i$$

式中, S 为 Shannon-Weaver 多样指数, P_i 为条带波峰面积占该样本所有条带波峰总面积的比例, n 为该样本 DGGE 所检测到的条带总数。

2 结果与分析

2.1 甘薯叶际细菌的种类与数量

共检测到 11 种磷脂脂肪酸,其中 i14:0、i15:0、i16:0、i17:0 四种革兰氏阳性菌磷脂脂肪酸,16:1 ω 9c、cy17:0

两种革兰氏阴性菌磷脂脂肪酸,在所有检测样品中,i16:0 的检测值均为最大。结果表明:采自北京平谷、顺义、延庆及通州不同时间的甘薯叶际细菌样品中革兰氏阳性菌数量(Gram-positive bacteria)均明显多于阴性菌(Gram-negative bacteria),实验数据中未检测到真菌特征磷脂脂肪酸,这可能是微生物中真菌数量较少,低于检测限。

2.2 甘薯叶际细菌 16S rDNA 片段的 DGGE 分离

如图所示,将所得 16S rDNA 片段通过 DGGE 分析,可以看到分离为若干条带,采自同一地区同一时间的叶际细菌样品所出现的条带较相似,不同时间或地区的样品差异较大。

如图 1a 所示,不同地区的叶际细菌样品中,DGGE 的条带数量和分布具有一定的差异性,DGGE 图谱表现出的微生物种群结构具有较大差别。P7,P8,P9 经过测序验证为同一细菌,其在不同地点的叶际细菌样

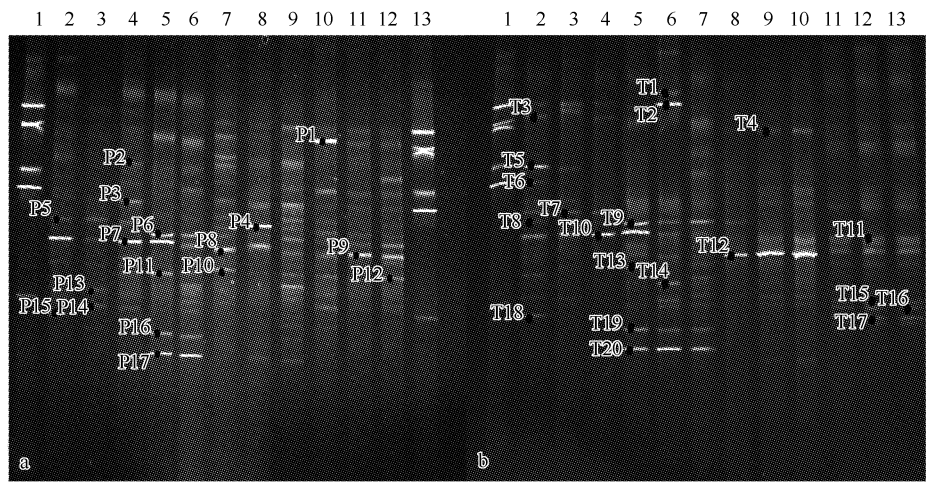


图 1 甘薯叶际细菌 DGGE 指纹图谱

Fig. 1 Composite 16S rRNA gene directed PCR-DGGE: banding profiles of sweet potato bacteria

a 图:1,13: marker;2,3,4: 采自顺义的 3 个平行样;5,6: 采自通州的 2 个平行样;7,8,9: 采自昌平的 3 个平行样;10,11,12: 采自延庆的 3 个平行样;b 图:1: marker;2,3,4: 5 月 15 日采集的 3 个平行样,5,6,7: 6 月 15 日采集的 3 个平行样,8,9,10: 7 月 15 日采集的 3 个平行样,11,12,13: 8 月 15 日采集的 3 个平行样

表 1 北京地区甘薯叶际细菌 PLFAs 含量/(ng/g 叶片)

Table 1 Contents of PLFAs/(ng/g leaves) from sweet potato phyllosphere microbes in Beijing

地点 Place	革兰氏阳性菌 GP Bacteria	革兰氏阴性菌 GN Bacteria	革兰氏阳性菌/ 革兰氏阴性菌 GP Bacteria/ GN Bacteria	细菌 Total Bacteria	地点 Place	革兰氏阳性菌 GP Bacteria	革兰氏阴性菌 GN Bacteria	革兰氏阳性菌/ 革兰氏阴性菌 GP Bacteria/ GN Bacteria	细菌 Total Bacteria
S1	50.76	0.57	89.19	51.33	S2	54.27	0.68	80.25	54.95
S3	60.30	0.70	82.47	61.10	T1	50.56	1.06	47.62	51.62
T2	54.52	1.20	45.39	55.72	T3	52.25	1.27	41.20	53.51
C1	58.78	1.02	57.84	59.80	C2	38.58	3.86	10.00	42.43
C3	66.46	0.84	78.83	67.30	Y1	65.15	0.98	66.43	66.13
Y2	58.87	0.83	71.29	59.70	Y3	61.59	1.12	54.84	62.72
M1	58.25	1.67	34.82	59.93	M2	32.89	1.20	27.38	34.09
M3	53.38	0.79	67.32	54.17	U1	88.94	2.42	36.71	91.37
U2	131.98	1.94	68.01	133.92	U3	112.8	2.19	51.43	114.99
A1	65.53	0.98	66.90	66.51	A2	102.02	1.43	71.45	103.45
A3	98.77	1.40	70.43	100.17					

注:S1, S2, S3: 6 月 15 日采自顺义的 3 个平行样;T1, T2, T3: 6 月 15 日采自通州的 3 个平行样;C1, C2, C3: 6 月 15 日采自昌平的 3 个平行样;Y1, Y2, Y3: 6 月 15 日采自延庆的 3 个平行样,M1, M2, M3: 5 月 15 日采自通州的 3 个平行样;U1, U2, U3: 7 月 15 日采自通州的 3 个平行样;A1, A2, A3: 8 月 15 日采自通州的 3 个平行样

品中均存在,是一保守种群。P3, P5, P6 在不止一个地点存在,是较为保守的种群。也有类似于 P16 和 P17 的只存在于某个地区叶际细菌样品中的特殊种群。如图 1b 所示,甘薯不同生理发育时期的叶际细菌样品中,条带 T2、T3、T7、T10、T9、T12、T15、T17、T19、T20 代表的菌群分别为优势菌群。

2.3 DGGE 分离 16S rDNA 片段测序

选择图谱中普遍存在或特有的不同叶际细菌条带进行条带切割,PCR 再扩增后经过 DGGE 分离,重新确定位置后连入载体送交测序,将测序序列输入 NCBI 数据库中进行比对,比对信息如表 3 所示。

根据上述叶际细菌的 DGGE 片段序列,在 NCBI 上下载其最相近的基因序列进行系统发育分析,不同样品在细菌 16S rDNA 进化树上的距离如图 2 所示。通过进化树分析,可以了解 DGGE 检测到的优势菌群与已知微生物亲缘关系的远近,从而在进行叶际细菌的可培养研究中,推测培养条件及培养基中营养物质的种类与比例,从而提供技术依据。

2.3 甘薯叶际细菌聚类分析

以 Quantity One 软件对不同地点、不同时间甘薯叶际细菌 DGGE 所表现出的微生物种群结构进行聚类分析,结果如图 3 所示。不同地点甘薯叶际细菌 DGGE 图共分为二个族群,对照 marker 为一个族群,通州、顺义甘薯叶际细菌为一个族群,延庆、昌平甘薯叶际细菌为一个族群。不同时间甘薯叶际细菌 DGGE 图共分为二个族群,对照 marker 为一个族群,6 月和 7 月中旬甘薯叶际细菌为一个族群,8 月和 9 月中旬甘薯叶际细菌为一个族群。通过聚类图可以看出,在不同的地理位置,不同时间所取的甘薯叶际细菌样本聚在了不同的族群里,说明地理位置、取样时间导致的环境与甘薯生理时期差异,对甘薯叶际细菌群落结构产生了较大影响。

以 SPSS 软件对不同地点、不同时间甘薯叶际细菌样品 PLFA 数据进行聚类分析,结果如图 4 所示,采自不同时间的甘薯叶际细菌 PLFA 聚类结果与 DGGE 聚类分析结果一致,不同地点的样品中,采自顺义、通州、昌平的甘薯叶际细菌 PLFA 组成相似,采自延庆的甘薯叶际细菌 PLFA 组成与上述 3 个地区样品差异较大。

从图 5 可以看到,在 6 月份不同地点的采样中,甘薯叶际细菌多样性稳定在 1.93—2.55,不同地区变化较小,5、6 月份通州地区甘薯叶际细菌 Shannon 多样性指数较为稳定在 1.94—2.55,7 月份 Shannon 多样性指数变小至 0.67—1.58,8 月份 Shannon 多样性指数又升高到 2.38—2.76,表明细菌群落的变化与甘薯的生长季节有很大的关系。

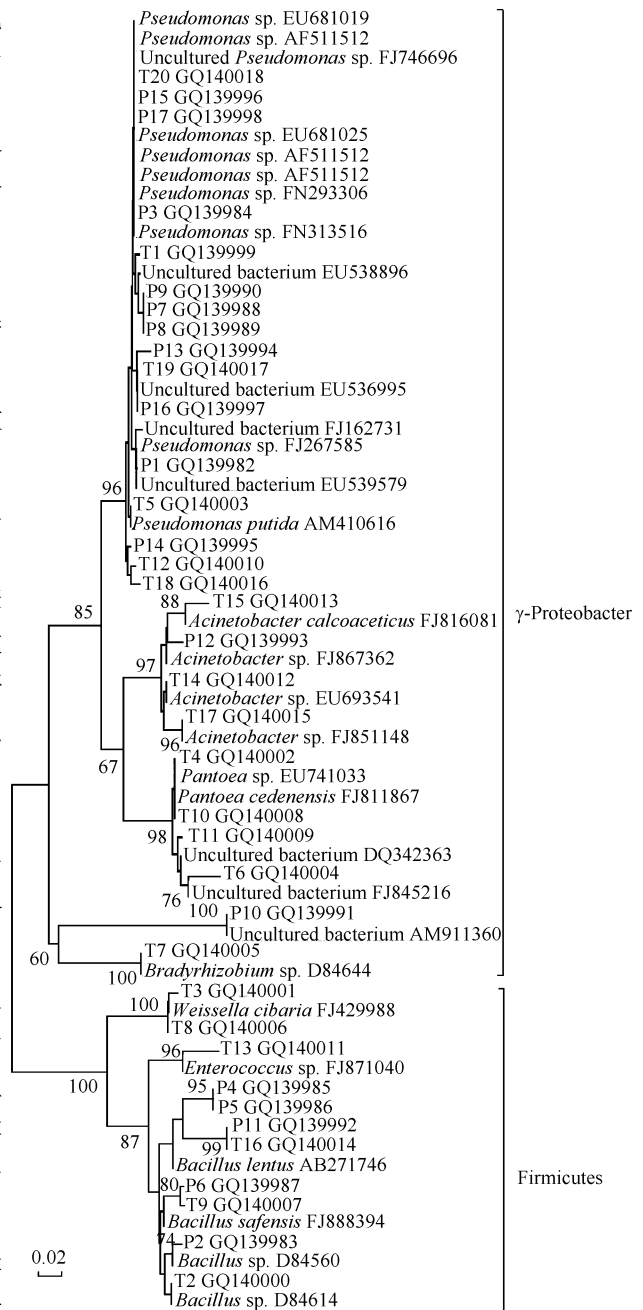


图 2 采用 NJ 方法对甘薯叶际细菌 37 个克隆的 16S rDNA 进行系统进化树分析

Fig. 2 Neighbor-joining analysis showing the phylogenetic relationship of 37 clone 16S rDNA sequences to other related organisms

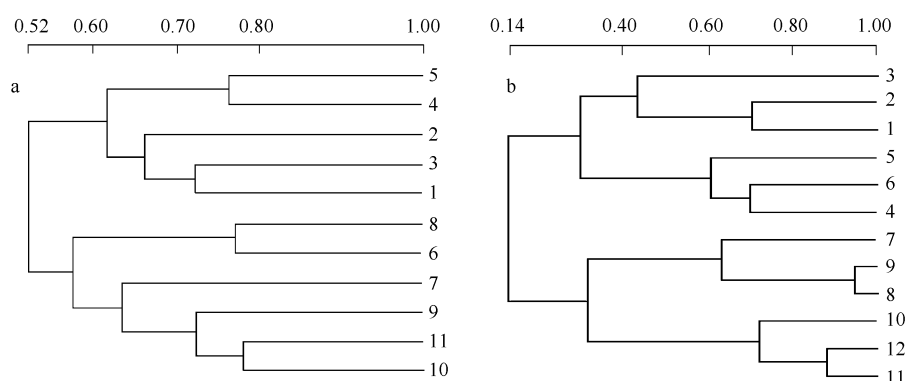


图3 甘薯不同地点(a),不同时间(b)微生物群落 DGGE 条带聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of DGGE bands from different samples

a 图:1,2,3: 6月15日采自顺义的3个平行样;4,5: 6月15日采自通州的2个平行样;6,7,8: 6月15日采自昌平的3个平行样;9,10,11: 6月15日采自延庆的3个平行样;b 图:1,2,3: 5月15日通州采集的3个平行样,4,5,6: 6月15日通州采集的3个平行样,7,8,9: 7月15日通州采集的3个平行样,10,11,12: 8月15日通州采集的3个平行样

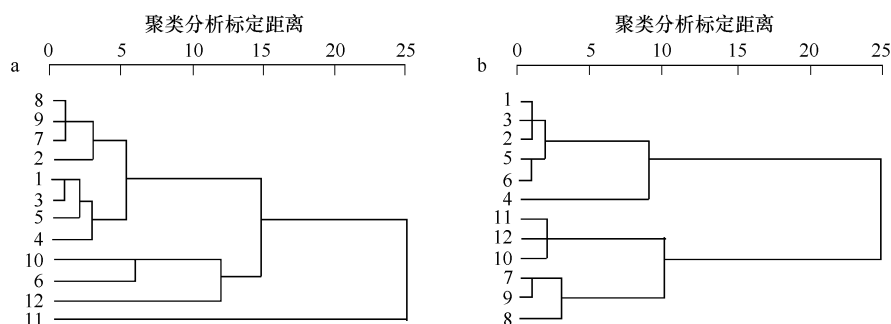


图4 不同地点(a)、不同时间(b)甘薯叶际细菌 PLFA 数据聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of PLFA Data from different samples

a 图: 1,2,3: 采自顺义的3个平行样;4,5,6: 采自昌平的3个平行样;7,8,9: 采自通州的3个平行样;10,11,12: 采自延庆的3个平行样;b 图:1,2,3: 5月15日采集的3个平行样,4,5,6: 6月15日采集的3个平行样,7,8,9: 7月15日采集的3个平行样,10,11,12: 8月15日采集的3个平行样

3 讨论

3.1 甘薯叶际细菌的种类

PCR-DGGE 作为一种不依赖于培养的微生物分子生态学方法,用于叶际细菌研究方面,能反映叶际细菌中的优势种群及其变化情况。目前,甘薯叶际细菌群落的研究鲜见报道,不同地点甘薯的叶际细菌菌群中,DGGE 条带切割后测序结果表明 P7,P8,P9 序列相同,存在于4个地区的微生物群落中,为保守细菌,系统发育树分析表明它更接近于 *Pseudomonas* sp.。不同发育时期的叶际细菌菌群中,T2、T4、T7、T8、T10、T12、T15、T16、T17、T19、T20 分别为保守菌群,其 DGGE 条带切割后测序表明最接近 *Bacillus* sp.,*Pseudomonas* sp.,*Acinetobacter* sp.,*Weissella* sp.,*Pantoea* sp.,*Bradyrhizobium* sp.,*Enterococcus* sp. 等属的细菌。已有文献报道 *Bacillus* sp.,*Pantoea* sp.,*Enterococcus* sp. 对某些植物具有促生作用,或参与了植物病害的防治^[10, 29-30]。*Acinetobacter* sp.,*Weissella* sp. 虽然已经在某些植物叶际细菌群落结构中检测到^[8, 24, 31],但其具体的生态功能及其与周围环境的互作情况尚未见文献报道。本试验中 T7 条带测序结果与慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium* sp.) 匹配度 100%,该菌是常见的根际固氮菌^[32];目前未见在叶际细菌群落中发现 *Bradyrhizobium* sp. 的文献报道。

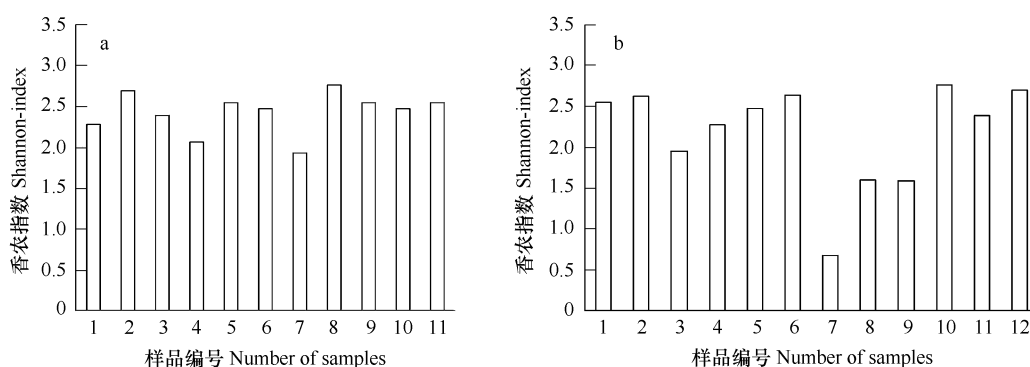


图5 甘薯叶际细菌 shannon 多样性指数

Fig. 5 Shannon diversity index of sweet potato phyllosphere bacteria

a 图:1,2,3: 6月15日采自顺义的3个平行样;4,5: 6月15日采自通州的2个平行样;6,7,8: 6月15日采自昌平的3个平行样;9,10,11: 6月15日采自延庆的3个平行样;b 图:1,2,3: 5月15日通州采集的3个平行样;4,5,6: 6月15日通州采集的3个平行样;7,8,9: 7月15日通州采集的3个平行样;10,11,12: 8月15日通州采集的3个平行样

3.2 甘薯叶际细菌群落结构受时空因素、甘薯生长季节的影响

DGGE 聚类分析、PLFA 聚类分析结果较为一致,通州、顺义甘薯叶际细菌群落较为相似,延庆、昌平甘薯叶际细菌群落较为相似。在不同取样时间的检测中,甘薯叶际细菌群落中6月和7月中旬甘薯叶际细菌为一个族群,8月和9月中旬甘薯叶际细菌为一个族群。表明甘薯叶际细菌群落结构受到时空因素、甘薯生长季节的影响。在试验中,*Pseudomonas* sp. (band 7)能够在不同地区的甘薯叶际定殖,表明其受到空间因素影响的可能性较小,需要进一步探讨其定殖规律。*Pseudomonas* sp. 已经在松树、小麦等叶片表面监测到,也有文献报道某些 *Pseudomonas* sp. 菌株是植物的病原菌,引起植物病害^[1]。本实验中,由于 DGGE 条带 P7 检测为 *Pseudomonas* sp. 依靠的是 16S r DNA V3 区 200bp 左右序列的测序比对,需要进一步实验支持,如采用分离培养方法、克隆文库技术等。叶际可培养微生物的纯培养及其与植物的互作关系,也是叶际微生物生态学研究的重点内容之一。

致谢:澳大利亚阿德莱德大学(The University of Adelaide)Bo Jin 博士润色英文摘要,特此致谢。

References:

- [1] Lindow S E, Brandl M T. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69: 1875-1883.
- [2] Zhang B G, Tang L, Li Z M, Wang H L, Xu W T, Zhang H X, Zhuang G Q, Bai Z H. Effect of abamectin insecticide on the microbial community in broccoli phyllosphere. *Environmental Science*, 2009, 30(5): 1292-1297.
- [3] Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka E A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 4951-4959.
- [4] Wilson M, Hirano S S, Lindow S E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65: 1435-1443.
- [5] Elad Y. Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. *European Journal of Plant Pathology*, 1996, 102: 719-732.
- [6] Perez J L, French J V, Summy K R, Baines A D, Little C R. Fungal phyllosphere communities are altered by indirect interactions among trophic levels. *Microbial Ecology*, 2009, 57: 766-774.
- [7] Wang S, Chang L Y, Wang Y J, Wang Q, Yang C H, Mei R H. Nanoparticles affect the survival of bacteria on leaf surfaces. *FEMS Microbiology Ecology*, 2009, 68: 182-191.
- [8] Zhang B G, Bai Z H, Hoefel D, Tang L, Wang X Y, Li B J, Li Z M, Zhuang G Q. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. *Science of the Total Environment*, 2009, 407: 1915-1922.
- [9] Hirano S S, Upper C D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*- a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64: 624-637.
- [10] Sandhu A, Halverson L, Beattie G. Identification and Genetic Characterization of Phenol-Degrading Bacteria from Leaf Microbial Communities.

- Microbial Ecology, 2009, 57: 276-285.
- [11] Ali B, Sabri A N, Ljung K, Hasnain S. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2009, 25: 519-526.
- [12] Muyze G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiology, 1999, 2: 317-322.
- [13] Kowalchuk G A, Bodelier P L E, Heilig G H J, Stephen J R, Laanbroek H J. Community analysis of ammonia-oxidising bacteria, in relation to oxygen availability in soils and root-oxygenated sediments, using PCR, DGGE and oligonucleotide probe hybridisation. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 27: 339-350.
- [14] Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 5113-5121.
- [15] Boon N, De Windt W, Verstraete W, Top E M. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants. FEMS Microbiology Ecology, 2002, 39: 101-112.
- [16] Favier C F, Vaughan E E, De Vos W M, Akkermans A D L. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68: 219-226.
- [17] Joergensen R G, Emmerling C. Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 2006, 169: 295-309.
- [18] Kaur A, Chaudhary A, Choudhary R, Choudhary R, Kaushik R. Phospholipid fatty acid — A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. Current Science, 2005, 89: 1103-1112.
- [19] Zhang B G, Bai, Z H, Hoefel D, Tang L, Yang Z G, Zhuang G Q, Yang J Z, Zhang H X. Assessing the impact of the biological control agent *Bacillus thuringiensis* on the indigenous microbial community within the pepper plant phyllosphere. FEMS Microbiology Letters, 2008, 284: 102-108.
- [20] Qi H Y, Xue K, Zhang H X. Phospholipid fatty acid analysis and its applications in microbial ecology. Acta Ecologica Sinica, 2003, 23(8): 1576-1582.
- [21] Frostegard A, Baath E. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. Biology and Fertility of Soils, 1996, 22: 59-65.
- [22] Unger I M, Kennedy A C, Muzika R M. Flooding effects on soil microbial communities. Applied Soil Ecology, 2009, 42: 1-8.
- [23] Liu Y, Yao H, Huang C. Assessing the effect of air-drying and storage on microbial biomass and community structure in paddy soils. Plant and Soil, 2009, 317: 213-221.
- [24] Joergensen R G, Wichern F. Quantitative assessment of the fungal contribution to microbial tissue in soil. Soil Biology & Biochemistry, 2008, 40: 2977-2991.
- [25] Zhang B G, Zhang H X, Jin B, Tang L, Yang J Z, Li B J, Zhuang G Q, Bai Z H. Effect of cypermethrin insecticide on the microbial community in cucumber phyllosphere. Journal of Environmental Sciences-China, 2008, 20: 1356-1362.
- [26] Waldrop M P, Firestone M K. Microbial community utilization of recalcitrant and simple carbon compounds: impact of oak-woodland plant communities. Oecologia, 2004, 138: 275-284.
- [27] Grayston S J, Prescott C E. Microbial communities in forest floors under four tree species in coastal British Columbia. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37: 1157-1167.
- [28] Xue D, Yao H Y, Ge, D Y. Soil microbial community structure in diverse land use systems: A comparative study using biolog, DGGE, and PLFA analyses. Pedosphere, 2008, 18: 653-663.
- [29] Enya J, Koitabashi M, Shinohara H, Yoshida S, Tsukiboshi T, Negishi H, Suyama K, Tsushima S. Phylogenetic diversities of dominant culturable *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Pantoea* species on tomato leaves and their possibility as biological control agents. Journal of Phytopathology, 2007, 155: 446-453.
- [30] Ott E-M, Mller T, Mller M, Franz C M A P, Ulrich A, Gabel M, Seyfarth W. Population dynamics and antagonistic potential of enterococci colonizing the phyllosphere of grasses. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91: 54-66.
- [31] Kadivar H, Stapleton A E. Ultraviolet radiation alters maize phyllosphere bacterial diversity. Microbial Ecology, 2003, 45: 353-361.
- [32] Giraud E, Moulin L, Vallenet D, Barbe V, Cytryn E, Avarre J C, Jaubert M, Simon D, Cartieaux F, Prin Y, Bena G, Hannibal L, Fardoux J, Kojadinovic M, Vuillet L, Lajus A, Cruveiller S, Rouy Z, Mangenot S, Segurens B, Dossat C, Franck W L, Chang W S, Saunders E, Bruce D, Richardson P, Normand P, Dreyfus B, Pignol D, Stacey G, Emerich D, Vermiglio A, Medigue C, Sadowsky M. Legumes symbioses: absence of nod genes in photosynthetic Bradyrhizobia. Science, 2007, 316: 1307-1312.

参考文献:

- [2] 张保国,唐玲,李祖明,王会利,许雯婷,张洪勋,庄国强,白志辉. 阿维菌素杀虫剂对甘蓝叶际微生物群落结构的影响. 环境科学, 2009, 30(5): 1292-1297.
- [20] 齐鸿雁,薛凯,张洪勋. 磷脂脂肪酸谱图分析方法及其在微生物生态学领域的应用. 生态学报, 2003, 23(8): 1576-1582.