

基于 16S rDNA 序列分析研究根腐病三七根内可培养细菌的多样性

张智慧¹, 张倩茹², 付晓萍², 李凌飞^{2*}

1. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南 昆明 650223

2. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南 昆明 650201

摘要: 目的 分析根腐病三七根内可培养细菌的多样性。方法 用牛肉膏蛋白胨培养基分离根腐病三七根内的细菌, 经细菌通用引物 27F/1492R 扩增 16S rDNA 后, 分别用 Rsa I 和 Hin6 I 限制性内切酶对扩增产物进行酶切, 结合限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析方法和 DNA 测序技术, 对分离自根腐病三七根内的细菌进行初步鉴定。结果 根腐病三七根内的细菌分属于 8 个类群, 依占总菌数的比例分别是芽孢杆菌属 *Bacillus* 22.47%、无色杆菌属 *Achromobacter* 5.62%、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* 5.62%、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus* 4.49%、鞘氨醇杆菌属 *Sphingobacterium* 1.12%、苍白杆菌属 *Ochrobactrum* 1.12%、不动杆菌属 *Acinetobacter* 1.12% 及肠杆菌科的一些属 58.43%。结论 泛菌属和芽孢杆菌属是根腐病三七根中的两大优势细菌类群。

关键词: 三七; 根腐病; 细菌; 限制性片段长度多态性分析; DNA 测序; 16S rDNA; 泛菌属; 芽孢杆菌

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)03-0415-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.021

Cultivable bacterial diversity in rotting roots of *Panax notoginseng* based on 16S rDNA sequence analysis

ZHANG Zhi-hui¹, ZHANG Qian-ru², FU Xiao-ping², LI Ling-fei²

1. Institute of Medicinal Plant, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China

2. College of Food Science and Technology, Yunnan Agriculture University, Kunming 650201, China

Abstract: Objective To analyze the cultivable bacterial diversity in the roots of *Panax notoginseng* with root rot disease. **Methods** Bacterial strains were isolated from the diseased roots of *P. notoginseng* using beef extract-peptone medium. The 16S rDNA was amplified by Primer 27F/1492R, the product was digested by restriction endonuclease Rsa I and Hin6 I, and PCR-RFLP analysis and DNA sequencing technology were used to identify the bacterial strains in the rotting roots of *P. notoginseng*. **Results** The bacteria could be divided into eight groups including *Bacillus* (22.47%), *Achromobacter* (5.62%), *Stenotrophomonas* (5.62%), *Paenibacillus* (4.49%), *Sphingobacterium* (1.12%), *Ochrobactrum* (1.12%), *Acinetobacter* (1.12%), and some bacterial genera Enterobacteriaceae (58.43%). **Conclusion** The dominant groups in the rotting roots of *P. notoginseng* are identified as genera of *Pantoea* and *Bacillus*.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; root rot; bacteria; RFLP analysis; DNA sequencing; 16S rDNA; *Pantoea*; *Bacillus*

三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 为五加科人参属植物, 是驰名中外的名贵中药材。因三七是多年生宿根草本植物, 性喜温暖阴湿, 极易诱发各种病害, 其中以根腐病最为严重, 常年损失达 5%~20%, 严重的损失 70% 以上^[1]。

目前, 已报道的三七根腐病病原菌主要是腐皮镰孢菌 *Fusarium solani*、细链格孢菌 *Alternaria tenuis*、坏损柱孢菌 *Cylindrocarpon destructans* 和黄

腐病菌 *Cylindrocarpon didymum* 等真菌^[2-3]。也有研究证明三七根腐病与病原细菌有密切关系^[3-6], 此类病原细菌主要是假单胞菌 *Pseudomonas* 和一些厌氧细菌, 但未明确指出是哪些厌氧菌, 此外, 难以查阅到相关的文献报道。

传统的细菌分类鉴定主要依靠形态学特征、培养特征、生理生化特征等进行, 但存在着鉴定准确性差、繁琐耗时、耗力等缺点。随着分子生物学技

收稿日期: 2013-04-01

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30900963); 国家科技支撑项目 (2011BAI13B01-02); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目 (2011HB027); 中国科学院“西部之光”人才培养计划项目

作者简介: 张智慧 (1980—), 女, 助理研究员, 主要从事药用植物资源研究。E-mail: ynzhangzhihui@126.com

*通信作者 李凌飞 Tel: (0871)65228661 E-mail: lilingfei1006@gmail.com

术的发展, 16S rDNA 基因的同源性分析已经成为细菌种属鉴定的标准方法, 在细菌的分类研究中起着重要的作用。细菌 16S rDNA 基因大小适中, 既含有高度保守序列, 又具有相当的变异, 其限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析能较好地反映出属、种和亲缘关系较近的菌株间的差异, 因此, 基于 16S rDNA 的 PCR-RFLP 方法已广泛应用到环境微生物和动植物微生物的研究中^[7]。本研究通过 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析, 结合 DNA 测序技术, 可以克服传统细菌鉴定方法的限制, 快速、简便地对根腐病三七根内细菌的多样性进行研究, 以期深入了解三七根腐病原细菌种类, 研究三七根腐病综合防治技术奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

于 2011 年 8 月三七根腐病发病的高峰期, 从云南省文山州文山市和砚山县采集人工种植的两年生和三年生的根腐病三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 根样品, 所有样品经云南省农业科学院药用植物研究所张金渝研究员鉴定。取样时选取植株地下部分局部腐烂的块根。所采集的样品置于已灭菌的自封袋中, 4 °C 冰箱保存, 并于 2 d 内处理完。

1.2 主要仪器

T100 型 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国)、DYY-6C 电泳仪 (北京六一仪器厂, 中国)、GelDoc XR 凝胶成像系统 (Bio-Rad, 美国), 3700 型 DNA 测序仪 (ABI 公司, 美国)。

2 方法

2.1 根腐病三七根内细菌的分离和纯化

将局部腐烂的三七主根去除表面土壤后, 用无菌水清洗干净, 再用 70%乙醇表面消毒 1 min, 无菌水清洗 3 次。剖开根部, 切取病健交界的中间组织块, 涂布于牛肉膏蛋白胨培养基上 37 °C 培养。待长出菌落后重新于牛肉膏蛋白胨培养基平板上划线纯化。纯化的细菌接种于牛肉膏蛋白胨培养基斜面上, 4 °C 保存备用。共分离到 89 株细菌, 对分离菌株进行统一编号, 记为 SQB1~SQB89。

2.2 根腐病三七根内细菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析

2.2.1 DNA 制备 用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京三博远志生物技术有限责任公司) 提取细菌基因组 DNA, 方法参见试剂盒说明书。

2.2.2 PCR 扩增 采用细菌 16S rDNA 通用引物

27F/1492R 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 10×PCR 缓冲液 (含 Mg^{2+}) 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, 上下游引物 (10 pmol/μL) 各 1 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.5 μL (PCR 反应所用试剂均购自 TaKaRa 公司), DNA 模板 1 μL, 再用无菌去离子水补至 50 μL 反应总体积。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 后延伸 10 min。

2.2.3 RFLP 分析 分别用 2 种限制性内切酶 (Rsa I 和 Hin6 I) 进行 RFLP 分析。酶切体系为: 10×反应缓冲液 2 μL, PCR 产物 10 μL, 限制性内切酶 10 U, 无菌去离子水补足至 20 μL。37 °C 反应 3 h 后, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用紫外凝胶成像系统观察并拍照, 分析酶切图谱类型。

2.3 代表菌株 16S rDNA 序列分析

根据酶切分析结果, 每一酶切类型选取一个代表菌株分别用引物对 27F (5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 进行双向测序。所获得的 DNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行比对分析。采用 Mega 4.0 软件构建系统发育树。

2.4 根腐病三七根内细菌群落组成分析

利用 SPSS 19.0 统计软件, 通过 2 个相关样本的非参数检验分别对两年生和三年生、以及文山和砚山产地间的根腐病三七根内的细菌群落组成进行分析。

3 结果与分析

3.1 根腐病三七根内细菌的分离结果

对局部腐烂的三七块根内的细菌进行分离, 结果发现培养基上长出大量菌落, 经过纯化及镜检, 根据菌落形态和菌体形态差异, 从中选择 89 株代表菌株进行后续分析。

3.2 根腐病三七根内细菌 16S rDNA 的系统发育

利用限制性内切酶 Rsa I 和 Hin6 I 分别对 89 个菌株的扩增片段进行 RFLP 分析。共获得 30 种酶切类型, 每一酶切类型选择一个代表菌株进行测序。将所获得的细菌 DNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行比对, 选择一些与测定序列同源性较高的已知种序列作为参考序列, 构建系统发育树 (图 1)。系统发育分析表明, 根腐病三七根内的细菌分属于 8 个类群, 即芽孢杆菌属 *Bacillus*、无色杆菌属 *Achromobacter*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、鞘

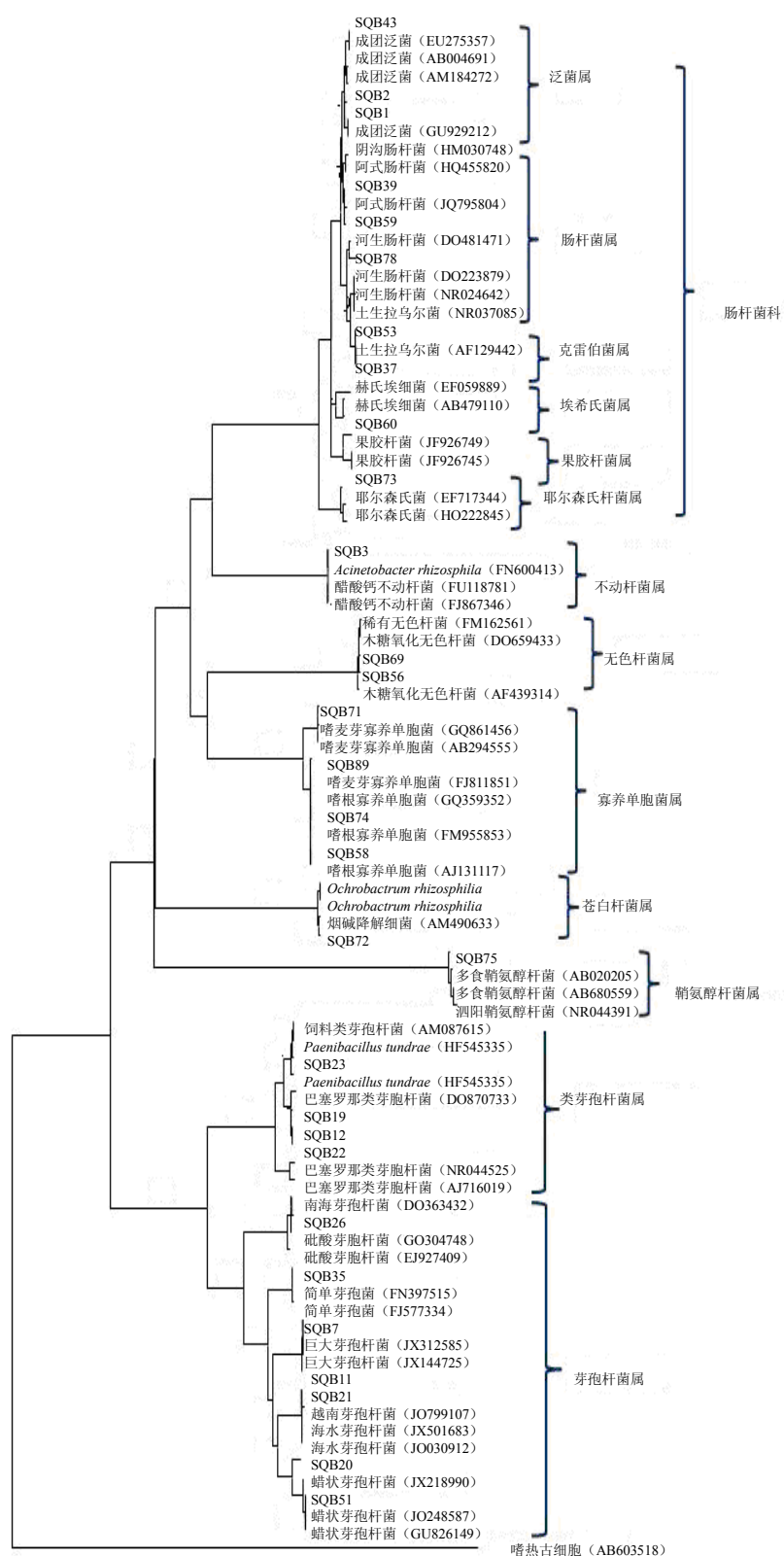


图 1 根腐病三七根内细菌的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 16S rDNA phylogenetic tree of bacteria in *P. notoginseng* with root rot disease

氨醇杆菌属 *Sphingobacterium*、苍白杆菌属 *Ochrobactrum*、不动杆菌属 *Acinetobacter* 及肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)。其中肠杆菌科占总菌株数的 58.43%，主要是泛菌属 *Pantoea*，占总菌株数的 39.33%，此外还有肠杆菌属 *Enterobacter*，以及少量的克雷伯菌属 *Raoultella*、埃希氏菌属 *Escherichia*、果胶杆菌属 *Pectobacterium*、耶尔森氏菌属 *Yersinia* 等。芽孢杆菌属在根腐病三七根中的分离频率也比较高，占总菌株数的 22.47%。因此泛菌属和芽孢杆菌属是根腐病三七根中的两大优势细菌类群。

3.3 根腐病三七根内细菌群落组成差异分析

两年生和三年生、文山和砚山两产地间根腐病三七根内的细菌各类群的菌株数见表 1。两个相关样本的非参数检验结果表明，两年生和三年生根腐病三七根内的细菌群落组成没有显著差异 ($P>0.05$)。并且砚山和文山两产地间根腐病三七根内细菌群落组成也没有显著差异 ($P>0.05$)。

表 1 根腐病三七根内的细菌各类群的菌株数

Table 1 Number of bacterial strains in roots of *P. notoginseng* with root rot disease

类群	菌株数			
	两年生	三年生	砚山	文山
肠杆菌科	27	25	29	23
芽孢杆菌属	0	1	0	1
无色杆菌属	1	3	4	0
寡养单胞菌属	10	10	19	1
类芽孢杆菌属	4	1	0	5
鞘氨醇杆菌属	1	0	0	1
苍白杆菌属	2	3	0	5
不动杆菌属	1	0	1	0

4 讨论

本研究首次基于 16S rDNA 序列分析对根腐病三七根内可培养细菌进行了研究，从 2 个三七主产区已发生根腐病的三七根内分离到了大量细菌。通过 2 种限制性内切酶的 RFLP 分析和系统发育分析，发现根腐病三七根内的细菌主要是泛菌属 (39.33%) 和芽孢杆菌属 (22.47%)。泛菌属的一些种类能对许多重要经济农作物造成广泛危害，本实验分离到的 SQB1、SQB43 等菌株与成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 的 16S rDNA 序列相似性为 100%。研究表明，成团泛菌是造成棉花细菌性烂铃病、玉米细菌干茎腐病、香蕉叶鞘腐败病的主要病

原菌^[8-10]。芽孢杆菌属细菌也是哈密瓜、烟草、玉米等植物中的优势细菌种群^[11-13]。这可能与该属细菌抗逆性强有关，容易通过偶然途径进入植物内部并定殖，但目前尚未见其作为植物病原菌的报道。

本实验中分离到的 SQB39 和 SQB60 菌株与阴沟肠杆菌 *E. cloacae* 和胡萝卜软腐果胶杆菌 *P. carotovorum* 的相似性均达到 99%，它们是报道较多 2 种植物病原菌，可以引起洋葱、生姜、半夏、朝鲜蓟等作物的茎腐病和软腐病^[14-22]。三七与人参同属，均为喜阴植物，Jeon 等^[23-24]研究发现类芽孢杆菌属中的多粘类芽孢杆菌 *P. polymyxa* 在人参根部达到一定的定殖密度，会失去生防作用引起人参根腐病。本研究在根腐病的三七根内也分离到了该属细菌，但其分离频率比较低，仅为 4.49%。

罗文富等^[3-4]研究三七根腐病复合侵染时，发现假单胞杆菌 *Pseudomonas* 是该病初始病原，真菌腐皮镰孢和细链格孢为继入病原（后期还有小杆线虫参与）加速腐烂的复合侵染病害，因此细菌在三七根腐病的发生发展中起了主要作用。盆栽试验表明，经人工接种发病症状与田间症状相似，发病率达 90% 以上。然而，在本实验中没有分离到该属细菌。本研究的统计分析结果表明，不同生长年限（两年生和三年生）、不同采样地点（砚山和文山）的根腐病三七根中可培养细菌群落组成没有显著差异，说明根腐病三七根内的可培养细菌类群不受三七生长年限和生境的影响。

当然，本研究中根腐病三七根内的细菌分离方法存在一定的局限性。由于采用了离体培养的方法先分离和纯化根内细菌，这可能会使某些厌氧类群，以及不适宜在牛肉膏蛋白胨培养基中培养类群无法生长，从而使得分离到的细菌种类偏少，因而不能全面地代表根腐病三七根内细菌的群落结构。在今后的研究中，可考虑将传统分离培养方法与免培养方法结合起来，以更全面地反映三七根内细菌的多样性。

参考文献

- [1] 李忠义, 贺承福, 王朝梁, 等. 三七根腐病的防治研究 [J]. 中药材, 1998, 21(4): 163-166.
- [2] 缪作清, 李世东, 刘杏忠, 等. 三七根腐病病原研究 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1371-1378.
- [3] 罗文富, 喻盛甫, 贺承福, 等. 三七根腐病病原及复合侵染的研究 [J]. 植物病理学报, 1997, 27(1): 85-91.
- [4] 罗文富, 喻盛甫, 黄 琼, 等. 三七根腐病复合侵染中

- 病原细菌的研究 [J]. 云南农业大学学报, 1999, 14(2): 123-127.
- [5] 官会林, 陈昱君, 朱海春, 等. 三七病株根际土壤微生物特征研究 [J]. 农业与技术, 2005, 25(6): 56-58.
- [6] 官会林, 杨建忠, 陈煜君, 等. 三七设施栽培根际微生物菌群变化及其与三七根腐病的相关性研究 [J]. 土壤, 2010, 42(3): 378-384.
- [7] 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.
- [8] 刘雅琴, 任毓忠, 李国英, 等. 新疆棉花细菌性烂铃病病原菌鉴定 [J]. 植物病理学报, 2008, 38(3): 238-243.
- [9] 曹慧英, 李洪杰, 朱振东, 等. 玉米细菌干茎腐病菌成团泛菌的种子传播 [J]. 植物保护学报, 2011, 38(1): 31-36.
- [10] 严玉宁, 何红, 叶艺俊, 等. 香蕉叶鞘腐败病病原鉴定 [J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 124-130.
- [11] 罗明, 卢云, 陈金焕, 等. 哈密瓜内生细菌菌群密度及分布动态 [J]. 干旱区研究, 2007, 24(1): 28-33.
- [12] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 烟草可培养内生细菌的分离及多样性分析 [J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1347-1354.
- [13] 高增贵, 陈捷, 刘限, 等. 玉米品种遗传多态性与根系内生细菌种群的相互关系 [J]. 生态学报, 2006, 26(6): 1920-1925.
- [14] Bishop A L, Davis R M. Internal decay of onions caused by *Enterobacter cloacae* [J]. *Plant Disease*, 1990, 74(9): 692-694.
- [15] Nishijima K A, Alvarez A M, Hepperly P R, *et al.* Association of *Enterobacter cloacae* with rhizome root of edible ginger in Hawaii [J]. *Plant Disease*, 2004, 88(12): 1318-1327.
- [16] Nedaenia R, Fassihiani A. Host range and distribution of *Pectobacterium betavascularum*, the causal agent of bacterial vascular necrosis and root rot of sugarbeet in Fars province [J]. *Iran J Plant Path*, 2011, 47(2): 47-48.
- [17] Marquez-Villavicencio M P, Groves R L, Charkowski A O. Soft rot disease severity is affected by potato physiology and *Pectobacterium* taxa [J]. *Plant Disease*, 2011, 95(3): 232-241.
- [18] Pitman A R, Harrow S A, Visnovsky S B. Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2010, 126: 423-435.
- [19] 何煜波, 胡秀芳, 陈海敏, 等. 半夏细菌性软腐病原菌的分离及鉴定 [J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 337-342.
- [20] 徐炜, 王婷婷, 刘列平, 等. 陕西岚皋县魔芋软腐病原菌的分离与鉴定 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(11): 97-102.
- [21] 王晓丽, 夏花, 张平喜, 等. 朝鲜蓟细菌性根茎腐烂病病原的分离与鉴定 [J]. 植物病理学报, 2012, 42(3): 236-241.
- [22] Shi S M, Liu Y Z, Tai W, *et al.* Smashing tissue extraction and HPLC determination of active saponins from different parts of *Panax notoginseng* [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(4): 341-345.
- [23] Jeon Y H, Sung P C, Hwang I, *et al.* Involvement of growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* in root rot of stored Korean ginseng [J]. *J Microbiol Biol*, 2003, 13(6): 881-891.
- [24] Jeon Y H, Kim S G, Hwang I, *et al.* Effects of initial inoculation density of *Paenibacillus polymyxa* on colony formation and starch-hydrolytic activity in relation to root rot in ginseng [J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 109(2): 461-470.