

广东和广西地区柑橘木虱内生细菌的分离鉴定及多样性分析

宋晓兵, 彭埃天*, 凌金锋, 崔一平, 程保平, 陈霞

广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广东 广州 510640

摘要: 【目的】基于广东和广西地区柑橘木虱内生细菌的分离培养及分子鉴定, 明确柑橘木虱可培养内生细菌的多样性, 为研究内生细菌与柑橘木虱互作、筛选潜在的共生控制候选细菌提供基础。【方法】采用虫体捣碎和涂布平板法分离柑橘木虱内生细菌, 在线 BLAST 分析菌株的 16S rDNA 序列, 鉴定内生细菌的种属, 并构建优势菌群的系统发育进化树和韦恩图。【结果】共获得 114 株柑橘木虱内生细菌, 归为细菌界的 3 个门的 15 个属, 其中芽孢杆菌属 59 株为优势菌群, 占分离细菌总数的 51.75%; 假单胞菌属 14 株, 占分离细菌总数的 12.28%; 泛菌属 10 株, 占分离细菌总数的 8.77%; 其他细菌占分离细菌总数的 27.19%。



开放科学标识码
(OSID 码)

【结论】芽孢杆菌属细菌广泛分布在两广地区的柑橘木虱体内, 值得作为潜在的候选细菌进行共生控制柑橘木虱的研究。

关键词: 柑橘木虱; 内生细菌; 分离鉴定; 多样性; 共生控制

Identification and diversity analysis of endophytic bacteria from citrus psyllids in Guangdong and Guangxi

SONG Xiaobing, PENG Aitian*, LING Jinfeng, CUI Yiping, CHENG Baoping, CHEN Xia

Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640, China

Abstract: 【Aim】 In order to examine the interaction between endophytic bacteria and citrus psyllids and screen for potential symbiotic control candidate bacteria, the citrus psyllids endophytic bacteria were isolated and identified in Guangdong and Guangxi, and the diversity of cultivars that can be cultivated in citrus psyllids was determined. 【Method】 The endophytic bacteria of citrus psyllids were isolated with the method of insect crushing and flat coating. The 16S rDNA sequences of the strains were analyzed with BLAST online, the species of endophytic bacteria were identified, and the phylogenetic tree and venn diagram of the dominant flora were constructed. 【Result】 A total of 114 endophytic bacteria were obtained, which were classified into 15 genera and 3 phyla. Among them, 59 strains of *Bacillus* were classified as the dominant flora, accounting for 51.75% of the total isolated bacteria; 14 strains (12.28% of the total number of isolated bacteria) were from *Pseudomonas* genus and 10 strains of *Pantoea* accounted for 8.77% of total number of isolated bacteria. Other bacteria accounted for 27.19% of the total number of isolated bacteria. 【Conclusion】 *Bacillus* bacteria are widely distributed in citrus psyllids, and they are worth considering as a potential candidate for the symbiotic control of citrus psyllids.

Key words: *Diaphorina citri*; endophytic bacteria; identification; diversity; paratransgenic control

柑橘黄龙病 Citrus Huanglongbing 是一种毁灭性病害, 能侵染各种柑橘类植物, 对我国柑橘产业造成极大的威胁。柑橘木虱 *Diaphorina citri* Kuwayama 不仅是柑橘上的一种重要害虫, 也是柑橘黄龙

病的重要传播虫媒 (牡丹超等, 2011; Cen *et al.*, 2012)。目前对柑橘黄龙病尚缺乏有效的防治药剂和抗病品种 (宋晓兵等, 2016)。加强对柑橘木虱的防治, 对控制柑橘黄龙病的流行, 降低害虫本身对

收稿日期 (Received): 2019-12-28 接受日期 (Accepted): 2020-02-28

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD0201500, 2017YFD0202000); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目 (2019KJ108)

作者简介: 宋晓兵, 男, 副研究员。研究方向: 柑橘病虫害综合防治。E-mail: xbsong@126.com

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: pengait@163.com

柑橘的危害都具有重要意义(宋晓兵等,2018)。

细菌和昆虫之间除了少数属于病原菌与寄主的关系外,存在着广泛的非致病性关系,某些细菌则是寄主生长繁殖所必需的(Brummel *et al.*,2004; Dillon & Charnley,2002)。如昆虫肠道内生细菌在食物消化、营养吸收、繁殖及信息素的合成中发挥重要作用(Campbell,1990; Dillon & Charnley,2002; Tokuda *et al.*,2009)。内生细菌不仅能够为寄主的生长发育提供营养,还能合成多种生物活性物质、调节寄主的免疫、抵御病原生物的入侵和定殖等(魏舸等,2018)。柑橘木虱主要以吸食植物韧皮部汁液为主,其本身没有合成胆固醇、必需氨基酸和维生素的能力,而柑橘木虱体内普遍存在着内生细菌,为其提供生长发育所需的脂类化合物、维生素和必需氨基酸,内生细菌与木虱长期共存、互惠互利、协同进化(徐红星等,2009)。目前,国外已提出一种创新性的病虫害管理策略——共生控制(paratransgenic control),即利用寄主的共生细菌控制昆虫媒介或病原体(Bextine *et al.*,2004; Kolora *et al.*,2015)。如基于胞质不相容性(cytoplasmic incompatibility, CI)的原理,将携带 *Wolbachia* 的雄蚊与不携带或者携带不同 *Wolbachia* 体型的雌蚊交配,雌蚊产的卵将不会孵化(潘晓玲等,2014; 周丽丽等,2010; Dutra *et al.*,2016)。

本研究通过分离培养及鉴定不同地区柑橘木虱内生细菌,一方面明确柑橘木虱可培养内生菌的区域多样性,为研究内生细菌与柑橘木虱之间的互作提供基础;另一方面探讨内生细菌在柑橘木虱生命活动中所起的作用,对利用潜在的候选细菌通过共生控制防治柑橘木虱或黄龙病具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 供试柑橘木虱

柑橘木虱成虫分别采集自广东省广州市白云区钟落潭镇(默科特)、广州市天河区五山大丰街(九里香)、惠州市龙门县永汉镇(沙糖橘)、肇庆市德庆县九市镇(贡柑)、肇庆市高要区新桥镇(贡柑)、阳江市阳西县儒洞镇(马水橘)、河源市紫金县蓝塘镇(春甜橘)和广西桂林市灵川县大圩镇(蜜橘)共 8 个地区,每个地区采集成虫 20 头,重复采集 2 次。采集的柑橘木虱成虫(雌雄随机)连同其寄主嫩梢枝叶置于塑料瓶中带回实验室,室温保存 1~2 d 内进行分离。

1.2 试剂和引物

2×EasyTaq PCR SuperMix、Trans2K DNA Marker 购自全式金生物技术(北京)有限公司;DNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。PCR 引物对 27F/1492R,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 培养基

YEB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母浸出粉 5 g、蔗糖 5 g、氯化钠 5 g、七水硫酸镁 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蒸馏水定容至 1000 mL、pH 为 7.0。

YEB 固体培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母浸出粉 5 g、蔗糖 5 g、氯化钠 5 g、七水硫酸镁 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂粉 15 g、蒸馏水定容至 1000 mL、pH 为 7.0。

1.4 内生细菌的分离

田间采集的柑橘木虱成虫置于无菌离心管中带回实验室,将木虱置于 -20°C 冰箱中冷冻 3~5 min,降低木虱的活动能力,然后分装于 1.5 mL 离心管内,每管 5 头,重复 4 次。在超净工作台上进行分离操作,将木虱置于 70%乙醇中浸泡 30 s,随后用无菌水漂洗 3~4 次,最后一次漂洗液涂平板验证灭菌效果。将柑橘木虱于无菌滤纸上晾干后置于灭菌离心管中,加入 500 μL YEB 液体培养基,然后用一次性组织研磨杵将虫体完全捣碎,分别吸取 100 μL 混合液涂布到 YEB 平板培养基上,每管涂布 5 个平板,28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 2~3 d 后观察菌落形态。根据菌落形态(大小、形状、颜色、表面光泽、透明度和质地等)分别挑取培养基表面不同种类的细菌菌落,在相应培养基平板上纯化,纯化内生细菌接种于 YEB 培养基斜面上,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 内生细菌分子鉴定

1.5.1 DNA 提取 将平板上长出的所有不同形态细菌挑出,并将其进一步纯化,得到单菌落。然后将接种单菌落至 YEB 液体培养基振荡培养 24 h,28 $^{\circ}\text{C}$, $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。取适量菌液于 1.5 mL 离心管中, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 s,弃去上清液,采用 DNA 提取试剂盒提取菌株的总 DNA。

1.5.2 16S rDNA 基因 PCR 扩增 根据 Lane (1991) 的方法,采用引物对 27F/1492R (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'/5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3') 扩增细菌的 16S rDNA 基因 V1~V9 区。PCR 反应体系:模板 1.0 μL ,2×EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μL ,上下游引物各 1.0

μL , ddH₂O 9.5 μL 。扩增程序: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。取 5 μL PCR 产物, 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 检测后剩余的 PCR 产物用于后续实验。

1.5.3 16S rDNA 基因测序及比对 于琼脂糖凝胶上割取 PCR 产物的目的条带, 利用 Axygen 胶回收试剂盒回收纯化, 然后送至 Invitrogen 公司利用引物 27F/1492R 进行两端测序。利用 DNASTar 软件 (DNASTAR Inc, Madison, USA) 对所获得的目的基因序列进行拼接, 然后利用 BLAST 程序进行序列相似性比对, 从而鉴定所分离的柑橘木虱内生细菌的种属。

1.5.4 系统发育分析 选取所有地区的优势菌株序列, 利用软件 MEGA 6.0 进行聚类分析, 采用邻近相接法 (NJ) 构建系统进化树。对分离优势菌株数量居多的几个地区采用 Venny 2.1 在线软件 ([https:](https://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html)

//bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html) 制作韦恩图。

2 结果与分析

2.1 柑橘木虱内生细菌的分离

对采集自广东、广西 8 个地区的柑橘木虱进行内生细菌的分离培养, 共分离保存形态特征各异的柑橘木虱内生细菌 114 株, 其中, 广州市白云区钟落潭镇 (BY) 17 株, 广州市天河区五山大丰街 (TH) 12 株, 广东省德庆县九市镇 (DQ) 11 株, 广东省高要市新桥镇 (GY) 20 株, 广西省桂林市灵川县大圩镇 (GX) 10 株, 广东省龙门县永汉镇 (LM) 17 株, 广东省阳西县儒洞镇 (YX) 12 株, 广东省紫金县蓝塘镇 (ZJ) 15 株。部分内生细菌的形态如图 1。根据菌落形态 (大小、形状、颜色、表面光泽、透明度和质地等) 分别挑取培养基表面不同种类的细菌菌落, 在相应培养基平板上划线纯化, 接种于 YEB 培养基斜面上, 4 °C 保存。

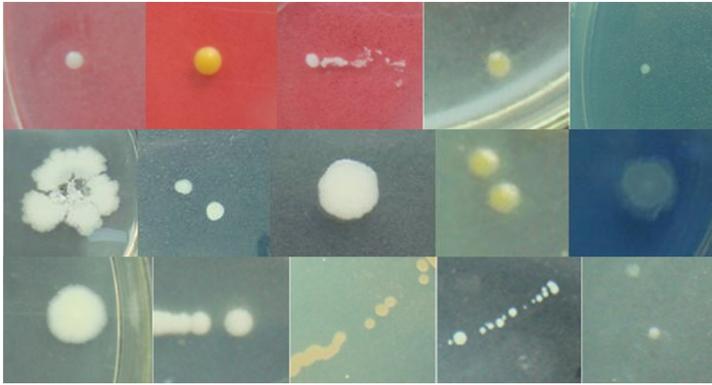


图 1 柑橘木虱部分内生细菌的菌落形态

Fig.1 Colony morphologies of several endophytic bacterial isolates from *D. citri*

2.2 内生细菌 16S rDNA 基因扩增

分别提取柑橘木虱内生细菌的总 DNA, 采用引物对 27F/1492R 扩增细菌的 16S rDNA 基因 V1-V9

区, 产物长度 1500 bp 左右。电泳结果显示, 分离获得的柑橘木虱内生细菌均扩增到明亮条带, 与预期的 PCR 产物长度相同 (图 2、图 3)。

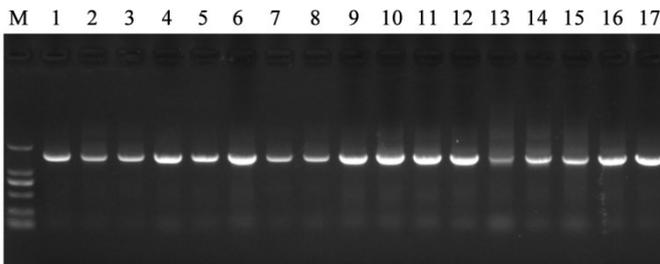


图 2 柑橘木虱 (白云) 内生细菌的 16S rDNA 基因 PCR 扩增分析

Fig.2 PCR amplification of 16S rDNA genes of endophytic bacteria in *D. citri* from Baiyun

M: Trans2K DNA Marker; 1~17: 模板为 17 个内生细菌的基因组 DNA。

M: Trans2K DNA Marker; 1~17: The templates were genomic DNA samples of 17 endophytic bacterial isolates.

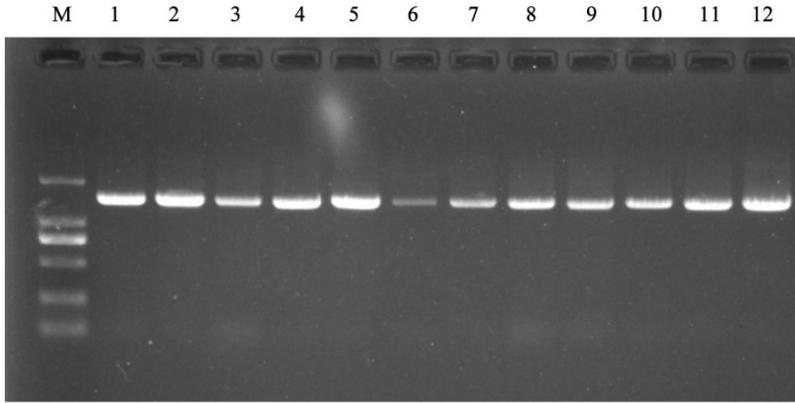


图 3 柑橘木虱(天河)内生细菌的 16S rDNA 基因 PCR 扩增分析

Fig.3 PCR amplification of 16S rDNA genes of endophytic bacteria in *D. citri* from Tianhe

M;Trans2K DNA Marker;1~12;模板为 12 个内生细菌的基因组 DNA。

M; Trans2K DNA Marker; 1-12: The templates were genomic DNA samples of 12 endophytic bacterial isolates.

2.3 柑橘木虱内生细菌多样性分析

对获得的目的基因序列进行拼接,获得 114 个细菌 16S rDNA 序列,利用 BLAST 程序进行序列相似性比对,将所分离的内生细菌归为细菌界的 3 个门的 15 个属,分别为厚壁菌门 Firmicutes 杆菌纲 Bacilli 芽孢杆菌属 *Bacillus*、葡萄球菌属 *Staphylococcus*、乳球菌属 *Lactococcus*、芽孢八叠球菌属 *Sporosarcina* 和喜氨菌属 *Ammoniphilus*;变形菌门 Proteobacteria γ -变形菌纲 Gammaproteobacteria 的假单胞菌属 *Pseudomonas*、泛菌属 *Pantoea*、肠杆菌属 *Enterobacter*, α -变形菌纲 Alphaproteobacteria 的副球菌属 *Paracoccus*、短波单胞菌属 *Brevundimonas* 和赤杆菌属 *Erythrobacter*, β -变形菌纲 Betaproteobacteria 的代尔夫特菌属 *Delftia*;放线菌门 Actinobacteria 微球菌纲 Micrococcales 的微球菌属 *Micrococcus*、考克氏菌

属 *Kocuria* 和短小杆菌属 *Curtobacterium*。选取有代表性的特异性菌株序列 15 个上传到 GenBank 中(表 1)。

在 114 个柑橘木虱可培养内生细菌中,芽孢杆菌属 59 株为优势菌群,占分离细菌总数的 51.75%;假单胞菌属 14 株,占 12.28%;泛菌属 10 株,占 8.77%;其他细菌占 27.19%,在各个地区的柑橘木虱中不稳定存在,仅在某些地区存在的细菌可能来源于自然环境或植物寄主,并未与柑橘木虱之间形成真正的共生关系,属于过路菌群。不同地区柑橘木虱可培养内生细菌种类和数量存在明显差异,其中白云采集的木虱获得的细菌种类最多,归为 8 个属 17 株;阳西采集的木虱获得的细菌种类最少,归为 2 个属 12 株(表 2)。

表 1 15 株代表性柑橘木虱内生细菌的鉴定情况

Table 1 Identification of 15 representative endophytic bacteria of *D. citri*

| 菌株编号 Strain number | 菌株鉴定 Identification of strains | GenBank 登录号 GenBank accession number | 菌株编号 Strain number | 菌株鉴定 Identification of strains | GenBank 登录号 GenBank accession number |
|--------------------------|--------------------------------------|--|--------------------------|--------------------------------------|--|
| BYMS03 | 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> | KU891837 | THMS01 | 副球菌属 <i>Paracoccus</i> | KU891846 |
| BYMS04 | 芽孢八叠球菌属 <i>Sporosarcina</i> | KU891838 | THMS07 | 泛菌属 <i>Pantoea</i> | KU891848 |
| BYMS05 | 芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> | KU891839 | GYMS10 | 考克氏菌属 <i>Kocuria</i> | KX925562 |
| BYMS09 | 葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i> | KU891840 | DFMS03 | 代尔夫特菌属 <i>Delftia</i> | KX925563 |
| BYMS10 | 微球菌属 <i>Micrococcus</i> | KU891841 | GYMS20 | 赤杆菌属 <i>Erythrobacter</i> | KX925564 |
| BYMS16 | 肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> | KU891842 | DQMS04 | 短小杆菌属 <i>Curtobacterium</i> | KX925565 |
| BYMS20 | 短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i> | KU891843 | GYMS19 | 喜氨菌属 <i>Ammoniphilus</i> | KX925566 |
| BYMS21 | 乳球菌属 <i>Lactococcus</i> | KU891844 | | | |

表 2 柑橘木虱可培养内生细菌的鉴定分类
Table 2 Identification of endophytic bacterial isolates from *D. citri*

| 属 Genus | 白云 BY | 天河 TH | 德庆 DQ | 高要 GY | 龙门 LM | 阳西 YX | 紫金 ZJ | 广西 GX | 合计 Total |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| 芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> | 6 | 0 | 5 | 14 | 9 | 11 | 6 | 8 | 59 |
| 假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> | 1 | 0 | 4 | 2 | 0 | 0 | 7 | 0 | 14 |
| 泛菌属 <i>Pantoea</i> | 0 | 5 | 0 | 0 | 4 | 0 | 1 | 0 | 10 |
| 葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i> | 2 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 微球菌属 <i>Micrococcus</i> | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 芽孢八叠球菌属 <i>Sporosarcina</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| 乳球菌属 <i>Lactococcus</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 |
| 副球菌属 <i>Paracoccus</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 |
| 考克氏菌属 <i>Kocuria</i> | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 短小杆菌属 <i>Curtobacterium</i> | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| 代尔夫特菌属 <i>Delfiia</i> | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i> | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 赤杆菌属 <i>Erythrobacter</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 喜氨菌属 <i>Ammoniphilus</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 总计 Total | 17 | 12 | 11 | 20 | 17 | 12 | 15 | 10 | 114 |

2.4 优势内生细菌聚类分析

选取所有地区的芽孢杆菌属菌株序列,采用软件 MEGA 6.0 进行聚类分析,构建系统进化树。聚类结果表明,柑橘木虱芽孢杆菌属 59 个菌株,主要为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 21 株、短小芽孢杆菌 *B. pumilus* 19 株、蜡状芽孢杆菌 *B. cereus* 14 株和吉氏芽孢杆菌 *B. gibsonii* 5 株(图 4)。7 个地区芽孢杆菌的聚类结果显示,4 个种类的芽孢杆菌在 7 个地区的分布存在差异,巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌在多数地区(均为 6 个)均有分布,吉氏芽孢杆菌仅在广西、德庆、白云 3 个地区分布(图 4)。对芽孢杆菌属细菌分离数量居多的高要、龙门、阳西和广西 4 个地区,利用 Venny 2.1 在线软件制作韦恩图。结果显示,巨大芽孢杆菌和短小芽孢杆菌是 4 个地区共有的芽孢杆菌属细菌(图 5),说明这 2 种细菌在柑橘木虱体内有更广泛的适用性。

3 讨论与结论

柑橘木虱内生细菌菌群是一个复杂敏感的生物系统,不同的地理区域条件下的内生细菌的菌群结构不尽相同。本研究中源自 8 个地区的柑橘木虱可培养内生细菌 114 株。以柑橘为寄主的 7 个地区采集的木虱上均分离到芽孢杆菌,而天河九里香上采集的柑橘木虱未分离到芽孢杆菌,这可能与寄主差异有关,推测柑橘木虱的内生细菌有一部分来源于寄主植物,可能是柑橘木虱取食寄主汁液,将细菌从寄主植物转移到体内,其种群结构会随着

寄主植物的改变而变化。聚类进化分析表明,优势菌群芽孢杆菌属主要归为 4 个种类,本研究未分离到对昆虫具有致死效果的苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis*。巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌均能产生细菌素(王伟等,2019),芽孢杆菌细菌素具有较高的应用价值,可用于多种作物病虫害的生物防治(李依韦等,2019;杨得强等,2020;张玉栋,2016)。本研究筛选到的芽孢杆菌是否对植物病原菌有抑制效果有待下一步研究。

杨金霞(2013)利用 TSB 培养基添加柞蚕蛹血淋巴分离柑橘木虱培养内生细菌,获得 8 种内生细菌:木糖葡萄球菌 *Staphylococcus xylosus*、葡萄球菌属 *Staphylococcus* sp.、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、肠杆菌属 *Enterobacter* sp.、短小杆菌属的 *Curtobacterium oceanosedimentum*、砖红色微杆菌 *Microbacterium testacyeum*、嗜麦芽寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*、柠檬色短小杆菌 *Curtobacterium cifreum*, 与本研究结果较一致,除嗜麦芽寡养单胞菌外的 7 种内生细菌都能归到本研究所分离的 15 个细菌属中。孙丽琴(2014)对不携带黄龙病菌的柑橘木虱进行分离鉴定,共获得 14 株菌株,分属于芽孢杆菌属、欧文氏菌属 *Erwinia*、克雷伯氏杆菌属 *Klebsiella*、葡萄球菌属、节杆菌属 *Arthrobacter*、泛菌属、果胶杆菌属 *Pectobacterium*、沙门氏菌属 *Salmonella*、链霉菌属 *Streptomyces*、*Massilia brevitalea* 等 10 个细菌属,与本研究所分离的 15 个属存在较大差异,可能是由于地域、寄主差异及分离培养条件不同所致。

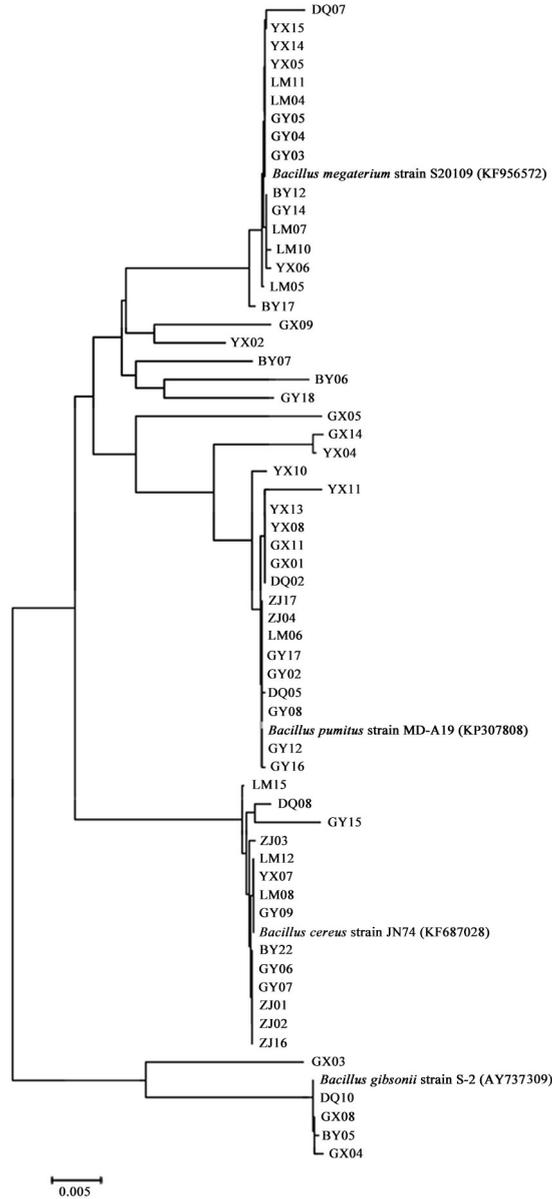


图 4 柑橘木虱优势内生细菌多样性聚类

Fig.4 Cluster analysis of dominant endophytic bacterial species of *D. citri*

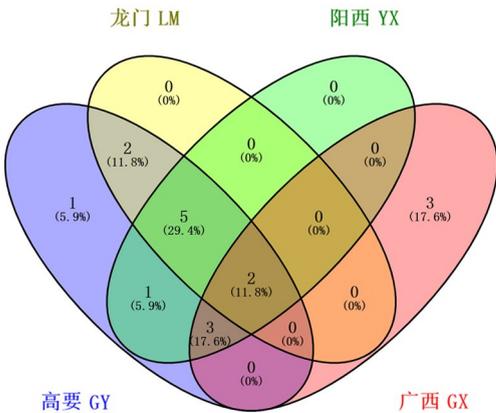


图 5 基于 4 个地区芽孢杆菌属细菌的韦恩图
Fig.5 Venn diagram of *Bacillus* bacteria in 4 regions

王爱华等(2010)采用常规方法分离培养柑橘内生细菌,共获得 21 株可培养内生细菌,分别归为芽孢杆菌属、假单胞菌属 *Pseudomonas* 和葡萄球菌属等,其中芽孢杆菌属细菌为优势菌属,共有 11 株,与本研究分离到的优势菌属相一致。殷幼平等(2011)从柑橘木虱中发现了大量的条件致病菌成团泛菌 *Pantoea agglomerans*,已有研究报道成团泛生菌属和木糖氧化产碱菌属 *Alcaligenes xylooxidans* 细菌被认为是共生控制的候选细菌(Blake *et al.*, 2004; Riehle *et al.*, 2007),成团泛菌与柑橘木虱的相互作用值得深入研究。Kolora *et al.* (2015)采用标准分离方法培养柑橘木虱内生细菌,分离出短小

芽孢杆菌属 *Lysinibacillus*、类芽孢杆菌属 *Paenibacillus*、蜡状芽孢杆菌属 *Bacillus cereus*、腐生葡萄球菌属 *Staphylococcus saprophyticus*、链霉菌属、肠杆菌属、成团泛生菌属、恶臭假单胞菌属 *Pseudomonas putida*、木糖氧化产碱菌属和无色杆菌属 *Chryseomonas luteola*, 与本研究所分离的内生细菌的种类大致相同。综上, 芽孢杆菌目的细菌广泛分布在各地柑橘木虱体内, 值得作为潜在的候选细菌进行共生控制柑橘木虱的研究。

内生细菌与宿主的免疫系统、外来病原、环境变化、营养摄入, 甚至内生细菌种群之间都相互影响与相互适应, 形成复杂的互作关系(魏舸等, 2018)。在昆虫内生细菌的功能研究中, 分析微生物的生物群落及多样性必不可少, 分离、培养、鉴定是研究昆虫内生细菌的经典方法。然而, 昆虫体内的复杂环境难以在体外模拟, 多数昆虫共生细菌都无法在体外进行培养。因此, 长期以来有关昆虫共生细菌的多样性及互作研究进展缓慢。本研究仅采用了 YEB 培养基进行柑橘木虱内生细菌的分离培养, 对于一些难培养细菌可能存在没有分离出来的情况, 如柑橘木虱内共生菌 *Wolbachia*、*Carsonella*、*Oscillospira*、*Arsenophonus*、*Proffittella* 等(李翌菡, 2016; 殷幼平等, 2011; Blake *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2019; Subandiyah *et al.*, 2000), 下一步需要通过高通量测序技术对柑橘木虱体内细菌组成及菌群多样性进行分析, 以进行柑橘木虱内生细菌的多样性以及功能研究。

利用转基因技术改造昆虫内生细菌, 用于共生控制人类病害、害虫及植物病虫害媒等具有广阔的应用前景。如: 通过改造猎蝽共生菌 *Rhodococcus rhodnii* 表达 cecropin A, 对引起美洲锥虫病的克氏锥虫 *Trypanosoma cruzi* Chagas 有良好的抑制效果(Beard *et al.*, 1992); 通过改造按蚊共生细菌 *Serratia AS1* 分泌表达多种抗疟活性蛋白, 从而在按蚊体内能高效特异杀灭恶性疟原虫(Wang *et al.*, 2017); 通过改造叶蝉共生菌 *Alcaligenes sp.* 有效控制葡萄皮尔斯病的传播(Bextine *et al.*, 2004)。本研究对于今后利用柑橘木虱内生细菌自身的特性, 抑或通过转基因技术改造内生细菌, 在控制柑橘黄龙病和阻断虫媒的传播上具有重要借鉴意义。

参考文献

- 杜丹超, 鹿连明, 张利平, 胡秀荣, 黄振东, 陈国庆, 2011. 柑橘木虱的防治技术研究进展. 中国农学通报, 27(25): 178-181.
- 李依韦, 尹萌萌, 袁琴, 2019. 苏云金芽孢杆菌毒性研究. 安徽农业科学, 47(20): 159-161.
- 李翌菡, 2016. 柑橘木虱内共生菌检测与取食时间对其获毒效率的影响. 硕士学位论文. 广州: 华南农业大学.
- 潘晓玲, 刘起勇, 奚志勇, 2014. 基于昆虫共生菌沃尔巴克氏体的蚊媒和蚊媒病控制研究进展. 中国媒介生物学及控制杂志, 25(1): 1-7.
- 宋晓兵, 彭埃天, 程保平, 陈霞, 凌金锋, 张炼辉, 2016. 利用虫生真菌生物防治柑橘木虱的研究进展. 生物安全学报, 25(4): 255-260.
- 宋晓兵, 彭埃天, 凌金锋, 崔一平, 程保平, 张炼辉, 2018. 宛氏拟青霉与球孢白僵菌对柑橘木虱的致病力分析. 应用昆虫学报, 55(4): 629-635.
- 孙丽琴, 2014. 携带黄龙病菌的柑桔木虱内生细菌菌群多样性分析及功能验证. 硕士学位论文. 重庆: 重庆大学.
- 王爱华, 殷幼平, 熊红利, 李颜方, 李佳, 贤家旭, 王中康, 2010. 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, 43(23): 4823-4833.
- 王伟, 陶乐仁, 迟海, 2019. 芽孢杆菌细菌素的研究进展及应用. 食品与发酵科技, 55(5): 68-74, 87.
- 魏舸, 白亮, 曲爽, 王四宝, 2018. 昆虫共生微生物在病虫害和疾病控制上的应用前景. 微生物学报, 58(6): 1090-1102.
- 魏晓莹, 郭晨亮, 褚栋, 2019. 昆虫体内微生物多样性的影响因素研究进展. 生物安全学报, 28(3): 170-176.
- 徐红星, 郑许松, 吕仲贤, 2009. 昆虫体内共生菌在其适应寄主植物过程中的作用//中国植物保护学会. 中国植物保护学会 2009 年学术年会论文集. 武汉: 545-548.
- 杨得强, 周春发, 黄龙伟, 张晓旭, 王龙飞, 刘佳, 张文静, 连培康, 2020. 内生芽孢杆菌对植物生长发育及病害防治的研究进展. 安徽农业科学, 48(4): 11-14.
- 杨金霞, 2013. 柑橘木虱内生细菌种类多样性. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学.
- 殷幼平, 刘婷婷, 田圣超, 胡修峰, 吴东, 王中康, 2011. 基于 16S rDNA 序列的柑橘木虱体内共生菌多样性研究. 昆虫学报, 54(6): 664-674.
- 张玉栋, 2016. 芽孢杆菌对山东临沂地区花生和生姜常见病害的防效研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学.
- 周丽丽, 张开军, 宋子伟, 洪晓月, 2010. 灰飞虱体内 WO 噬菌体和 *Wolbachia* 的侵染关系. 昆虫学报, 53(9): 978-984.
- BEARD C B, MASON P W, AKSOY S, TESH R B, RICH-

- ARDS F F, 1992. Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46(2): 195–200.
- BEXTINE B, LAUZON C, POTTER S, LAMPE D, MILLER T A, 2004. Delivery of a genetically marked *Alcaligenes* sp. to the glassy-winged sharpshooter for use in a paratransgenic control strategy. *Current Microbiology*, 48(5): 327–331.
- BRUMMEL T, CHING A, SEROUDE L, SIMON A F, BENZERS, 2004. *Drosophila* lifespan enhancement by exogenous bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 12974–12979.
- CAMPBELL B C, 1990. On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects. *Insect-Plant Interactions*, 1: 1–44.
- CEN Y, ZHANG L, XIA Y, GUO J, DENG X, ZHOU W, SEQUEIRA R, GAO J, WANG Z, YUE J, GAO Y, 2012. Detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in *Cacopsylla (Psylla) citrisuga* (Hemiptera: Psyllidae). *Florida Entomologist*, 95(2): 304–311.
- DILLON R, CHARNLEY K, 2002. Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Research in Microbiology*, 153(8): 503–509.
- DUTRA H L C, ROCHA M N, DIAS F B S, MANSUR S B, CARAGATA E P, MOREIRA L A, 2016. Wolbachia blocks currently circulating Zika virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host & Microbe*, 19(6): 771–774.
- KOLORA L D, POWELL C M, HUNTER W, BEXTINE B, LAUZON C R, 2015. Internal extracellular bacteria of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae), the Asian citrus psyllid. *Current Microbiology*, 70(5): 710–715.
- LANE D J, 1991. 16S/23S rRNA sequencing // STACKE-BRANDT E, GOODFELLOW M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley & Sons Ltd.: 115–175.
- RIEHLE M A, MOREIRA C K, LAMPE D, LAUZONC, JACOBS-LORENA M, 2007. Using bacteria to express and display anti-*Plasmodium* molecules in the mosquito midgut. *International Journal for Parasitology*, 37(6): 595–603.
- SONG X B, PENG A T, LING J F, CUI Y P, CHENG B P, ZHANG L H, 2019. Composition and change in the microbiome of *Diaphorina citri* infected with candidatus liberibacter asiaticus in China. *International Journal of Tropical Insect Science*, 39(4): 283–290.
- SUBANDIYAH S, NIKOH N, TSUYUMU S, SOMOWIYARJO S, FUKATSU T, 2000. Complex endosymbiotic microbiota of the citrus psyllid *Diaphorina citri* (Homoptera: Psylloidea). *Zoological Science*, 17(7): 983–989.
- TOKUDA G, WATANABE H, MATSUMOTO T, NODA H, 2009. Cellulose digestion in the wood-eating higher termite, *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki): distribution of cellulases and properties of endo-beta-1, 4-glucanase. *Zoological Science*, 14(1): 83–97.
- WANG S B, DOS-SANTOS A L A, HUANG W, LIU K C, OSHAGHI M A, WEI G, AGRE P, JACOBS-LORENA M, 2017. Driving mosquito refractoriness to *Plasmodium falciparum* with engineered symbiotic bacteria. *Science*, 357: 1399–1402.

(责任编辑:郭莹)