

黄龙病对柑橘叶际微生物组的影响



黄 峰 崔一平 宋晓兵* 彭埃天 凌金锋 陈 霞

(广东省农业科学院植物保护研究所, 农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室,
广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640)

摘要: 为明确柑橘叶际微生物组对黄龙病发生的响应规律, 采用荧光定量PCR技术检测采集柑橘叶片感染黄龙病菌的情况, 通过扩增子测序分析法对PCR检测结果为阴性和阳性叶片的微生物群落进行比较, 并通过相关性分析和网络分析对黄龙病菌和叶际微生物的相关性进行解析。结果显示, 夏季采集的柑橘叶片中黄龙病菌的检出率为7.5%, 而到秋季黄龙病菌的检出率上升到32.3%。黄龙病的发生显著改变了柑橘叶际细菌群落的组成和结构, 对于细菌类群的丰度也有一定影响; 而对叶际真菌群落的组成和结构无显著影响。黄龙病菌与叶际细菌存在普遍的负相关关系, 正相关关系相对较少但相关性更强。黄龙病菌可能通过与厌氧棍状菌 *Anaerotruncus* sp.、梭菌 *Clostridiales* sp.、假单胞菌 *Pseudomonas* sp.、鞘脂单胞菌 *Sphingomonas* sp.、毛螺菌 *Lachnospiraceae* sp. 和链球菌 *Streptococcus* sp. 的负向互作对柑橘叶际整个细菌群落产生负影响。表明黄龙病发生对柑橘叶际真菌和细菌群落的影响规律不同, 同时黄龙病菌可能通过与几种主要细菌的负向互作来实现对叶际微生物组的影响。

关键词: 柑橘黄龙病; 叶际微生物组; 细菌; 真菌; 群落组成; 丰度

The influences of citrus huanglongbing on phyllosphere microbiome

Huang Feng Cui Yiping Song Xiaobing* Peng Aitian Ling Jinfeng Chen Xia

(Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection; Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

Abstract: To determine the influences of citrus huanglongbing to leaf microbiome, citrus leaves were broadly collected and detected without/with the causal agent of huanglongbing with quantitative PCR method. In combination with fungal and bacterial amplicon sequencing, the phyllosphere microbiome of the selected huanglongbing-negative and -positive leaves were compared, and the association between the causal agent of huanglongbing and different microbial groups were analyzed based on the correlation and network analysis. The results showed an obvious increase of the average huanglongbing incidence from 7.5% in summer to 32.3% in autumn in sampled orchards. The occurrence of citrus huanglongbing significantly altered the composition and structure of the phyllosphere bacterial communities, and had a relative strong influence on the relative abundances of bacterial taxa. In comparison, huanglongbing had a minor effect on the phyllosphere fungal communities. Besides, the causal agent of huanglongbing showed general negative correlation to the phyllosphere bacteria, while the positive correlation was less but more significant. The causal agent of huanglongbing might convey its negative in-

基金项目: “十四五”广东省农业科技创新十大主攻方向-柑橘黄龙病综合防控技术(2023SDZG06), 广州市科技计划项目(2023A04J0800), 广东省乡村振兴战略专项资金(农业科技能力提升)(2023TS-1), 广东省农业科学院青年科技人员指导项目(R2020QD-020)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: xbsong@126.com

收稿日期: 2023-06-01

fluences to the whole bacterial community through its negative interactions with multiple bacterial species (*Anaerotruncus* sp., *Clostridiales* sp., *Pseudomonas* sp., *Sphingomonas* sp., *Lachnospiraceae* sp. and *Streptococcus* sp.). This study indicated the different influences of huanglongbing to the phyllosphere fungal and bacterial communities, and the influences of huanglongbing might be achieved by the negative interactions between its causal agent and multiple phyllosphere bacteria.

Key words: citrus huanglongbing; phyllosphere microbiome; bacteria; fungi; community composition; abundance

黄龙病是柑橘生产中最具毁灭性的病害之一。该病害可以侵染几乎所有的栽培柑橘品种,且在我国各大柑橘产区广泛分布(Zhou, 2020; Pandey et al., 2022)。柑橘黄龙病被认为是由寄生于植物韧皮部的候选韧皮部杆菌属细菌 *Candidatus Liberibacter* spp. 引起(Jagoueix et al., 1994; Garnier et al., 2000; Teixeira et al., 2005),其中柑橘黄龙病菌亚洲种 *Candidatus Liberibacter asiaticus* 是我国分布和发生的主要种类(Lou et al., 2018; Bao et al., 2020)。

柑橘黄龙病菌可通过定量PCR等方法进行活体检测,但至今仍无法在实验室条件下进行分离和培养(Zhou, 2020),这极大地阻碍了柑橘黄龙病生物学特性和柑橘黄龙病防控技术的相关研究。近年来,随着扩增子测序技术的不断完善和广泛应用,实现了利用通用引物来扩增非培养条件下植物组织中微生物群落的分类基因高变区或特定功能基因部分序列,并通过高通量测序来检测微生物群落的物种类群、丰度、多样性、组成、结构和分布规律等信息(Caporaso et al., 2010; Liu et al., 2021)。扩增子测序技术在植物病理学上的应用加深了对植物共生菌和腐生菌参与病原菌致病过程(病原组)和植物防卫反应(防卫组)的理解,同时证明在未来的研究中可以通过人工合成植物防卫组微生物群落来提高植物对病原菌的抗、耐性(Bass et al., 2019; Liu et al., 2020)。如黄龙病的发生影响了柑橘根际和叶际的植物-微生物和微生物-微生物之间的互作,从而造成微生物群落内真菌和细菌类群丰度的改变,其中部分植物益生菌可能作为柑橘的防卫组参与了柑橘对黄龙病的耐性(Zhang et al., 2017; Ginnan et al., 2020)。然而,目前关于柑橘微生物组参与黄龙病发生的研究相对较少,而且研究对象比较集中于柑橘根际微生物(Zhang et al., 2021)。因此,扩大采样和研究范围有助于加深对柑橘微生物组参与黄龙病发生的理解,为开发微生物防卫组资源提供理论依据。

贡柑是我国南方优良的柑橘品种,也是广东省主要的栽培柑橘品种之一(吉前华和郭雁君, 2010)。

然而近年来柑橘黄龙病的发生已逐渐成为阻碍广东省贡柑产业发展的最主要因素之一。如在广东省仁化县管理良好的柑橘园,柑橘黄龙病的发生率达到17%,而在管理不善的柑橘园,柑橘黄龙病的发生率甚至能够达到50%以上(陈霞等, 2021)。基于此,本研究在仁化县9个乡镇(街道)贡柑果园中采样并检测黄龙病的发生情况,同时基于黄龙病菌的检测结果,挑选结果为阴性和阳性的叶片微生物DNA样品进行真菌和细菌群落的扩增子测序,分析柑橘叶际微生物组的丰度、多样性、组成和结构以及微生物间的互作对黄龙病菌发生的响应模式,以期为柑橘黄龙病的致病机理研究和防控提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:2020年夏季(7月30日)和秋季(10月21—23日)在广东省韶关市仁化县9个乡镇(街道)的15个贡柑园各采集1次贡柑的叶片样品,每个乡镇(街道)选取1~2个贡柑园;在每个贡柑园中,随机选取10株贡柑树,并从每株树上随机剪取1根约带有10片叶片的枝条作为1份样品,每个贡柑园采集10份样品,总计采集170份。采集的样品放入保鲜袋中,置于冰上保存,运回实验室后进行黄龙病菌检测和叶际微生物组测定。本研究分析的叶际微生物组包括生活在柑橘叶片表面和内部的真菌和细菌群落,因此未采用表面消毒方式清除叶片上的附生菌。

试剂和仪器:SteadyPure植物基因组DNA提取试剂盒,湖南艾科瑞生物工程有限公司;Ex Taq预混液(Probe qPCR),大连宝日医生物技术有限公司;Phusion高保真PCR聚合酶预混液,美国New England Biolabs有限公司;AxyPrep DNA凝胶回收试剂盒,杭州爱思进生物技术有限公司;TruSeq®免扩增DNA建库试剂盒,美国Illumina公司;其余试剂均为国产分析纯。Tissuelyser-24L研磨仪,上海净信实业发展有限公司;ABI 7500实时荧光定量PCR仪,美国Applied Biosystems公司;PowerPac™通用电泳

仪,美国Bio-Rad公司;HiSeq 2500测序仪,美国Illumina公司。

1.2 方法

1.2.1 采集样品中黄龙病菌的PCR检测

从采集的每份样品中随机选择6片叶片,使用直径为1 cm的打孔器从每片叶片上随机打取1个叶碟备用。将取得的叶碟样品混合后,用研磨仪进行研磨,利用SteadyPure植物基因组DNA提取试剂盒提取叶际微生物组的DNA,并于-80℃保存备用。采用实时荧光定量PCR方法检测样品中黄龙病菌的含量,黄龙病菌的扩增引物为HLBas(5'-TCGAGCGCGTATGCAATACG-3')/HLBr(5'-GCGTTATCCCGTAGAAAAAGGTAG-3')(Li et al., 2006), PCR反应探针为HLBp(5'-FAM-AGACGGGTGAGTACGCG-BHQ-1-3'), FAM是6-羧基荧光素, BHQ-1是荧光标记多肽,本研究所有引物和探针均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR反应体系: Premix Ex Taq (Probe qPCR) 12 μL、HLBas/HLBr各0.5 μL、HLBp探针1 μL、50 ng/μL DNA 1 μL、ddH₂O 10 μL。PCR反应程序: 95℃预热30 s, 95℃变性5 s, 60℃延伸30 s, 共40个循环。程序运行结束后,读取C_t值(x),按照崔一平等(2020)建立的公式 $y = -0.286x + 11.924$ 计算病原菌的拷贝数(y)。

1.2.2 挑选叶片样品中微生物群落的扩增子测序

根据1.2.1检测结果,选择C_t>34和C_t<30的样品DNA分别作为未检出(阴性)和检出(阳性)黄龙病菌样品进行叶际微生物组的扩增子测序。使用引物对ITS1F(5'-CTTGGTCAATTTAGAGGAAGTAA-3')/ITS2-Fungal-ad(5'-TGCGTTCTTCATCGATGC-3')和335F(5'-CADA CTCTACGGGAGGC-3')/769R(5'-ATCCTGTTTGMTMCCCVCR-3')分别扩增真菌的核糖体转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)和细菌的16S rRNA基因位点部分序列(White et al., 1990; Caporaso et al., 2011)进行PCR扩增。10 μL PCR反应体系: KOD FX Neo Buffer 5 μL、KOD FX Neo 0.2 μL、dNTP 2 μL、上下游引物各0.3 μL、50 ng/μL DNA 1 μL、ddH₂O 1.2 μL;反应程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性45 s, 56℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 共35个循环;最后72℃延伸10 min。对每个样品均扩增3管,扩增结束后混匀,并经2%琼脂糖凝胶电泳,依据条带大小进行区分。割胶回收的条带使用TruSeq®免扩增DNA建库试剂盒参照说明书进行建库,然后利用HiSeq 2500测序仪完成样品的测序。

1.2.3 叶际微生物测序序列分析及多样性指数计算

将1.2.2所得测序序列数据先用Trimmomatic 0.39软件(Bolger et al., 2014)过滤低质量的序列,然后使用Cutadapt 1.9.1软件(Martin, 2011)识别和清除引物序列,得到的序列通过USEARCH 10软件(<http://www.drive5.com/usearch/>)进行拼接,再使用UCHIME 8.1软件(Edgar et al., 2011)去除嵌合体序列,将最终得到的高质量序列再导入QIIME2软件(Bolyen et al., 2019),并使用其中嵌合的dada2程序(Callahan et al., 2016)进行去噪,默认以测序所有序列数的0.005%作为阈值过滤获得扩增子序列变异体及其特征表。真菌的扩增子序列变异体通过比对到UNITE数据库(<https://unite.ut.ee/>)进行物种注释,细菌的扩增子序列变异体通过比对到SILVA138数据库(<http://www.arb-silva.de/>)进行物种注释。基于特征表和物种注释信息,使用QIIME2软件计算每个样本中真菌和细菌群落的α多样性指数,包括物种数、Shannon指数和谱系多样性指数,以及在不同分类单元科、属、种水平上的相对丰度,并绘制稀释曲线和物种累积箱形图。不同组别样品的叶际微生物组成差异采用Bray-Curtis距离进行计算,果园位置和黄龙病菌携带情况对微生物组的组成和结构的影响选择置换多元方差分析法进行分析,结果通过主坐标分析(principal co-ordinate analysis, PCoA)方法产生的前2个主成分PCoA1和PCoA2进行展示。真菌类群在不同比较组别之间并不存在显著差异,因此只对细菌类群进行功能注释,采用BugBase软件(Ward et al., 2017)完成。

1.2.4 黄龙病菌与柑橘叶际细菌的相关性和网络分析

鉴于1.2.3分析结果,仅选择柑橘叶际细菌类群与黄龙病菌含量进行相关性分析,使用Hmisc软件(<https://hbiostat.org/R/Hmisc/>)完成,并对分析结果使用pheatmap软件作热图进行展示(Kolde, 2019)。从黄龙病菌检测结果为阴性和阳性样品中选择总序列数大于1 000条的细菌扩增子序列变异体分别构建一个共发生的网络图,使用SPIEC-EASI(Sparse Inverse covariance estimation for ecological association inference)方法完成网络分析(Kurtz et al., 2015),分析参数按照软件的默认参数进行设置,网络描述性参数的计算、网络图的构建和注释分别使用igraph 1.3.2软件(<https://igraph.org/>)和Gephi 0.10软件(<https://gephi.org/>)完成。

1.3 数据分析

在R 4.0.0平台(<http://www.r-project.org/>)进行

数据分析。针对测序获得的微生物群落多样性指数数据和不同微生物类群的相对丰度数据,先进行方差齐性(bartlett.test)和正态性(shapiro.test)检验。对于黄龙病菌PCR检测结果为阴性和阳性样品两组数据间的比较,使用 t 检验法或者Wilcoxon非参数检验法进行差异显著性检验,对于多个数据间的比较,使用Benjamini-Hochberg法对 P 值进行校正。

2 结果与分析

2.1 仁化县贡柑样品中黄龙病菌的检测情况

夏季采集的40份样品来自3个乡镇(街道)的4个贡柑园,来自大桥镇长坝果园和黄坑镇下营果园的样品中未检出黄龙病菌,来自丹霞街道康溪果园和黄坑镇高塘果园的样品中检出了黄龙病菌,检出率分别为10.0%和20.0%,4个贡柑园的黄龙病菌平均检出率为7.5%。秋季采集的130份样品来自9个乡镇(街道)的14个贡柑园,所有贡柑园采集的样品中

均检出了黄龙病菌,检出率在10.0%~60.0%之间,平均检出率为32.3%,较夏季样品明显升高(表1)。

2.2 贡柑叶际微生物测序结果及对柑橘黄龙病的响应

根据柑橘黄龙病菌的检测情况,从秋季采集的样品中选择检测结果为阴性($C_i > 34$)和阳性($C_i < 30$)的DNA样品各27份进行真菌ITS和细菌16S rRNA的扩增子测序(表1),下机序列数据进行质控后,从54份样品中总计得到8 069 963条真菌ITS序列和3 881 333条细菌16S rRNA序列。进一步对这些序列进行聚类,并去除代表序列少的扩增子序列变异体,最终分别得到3 837个真菌和21 338个细菌的扩增子序列变异体。比较分析发现,黄龙病菌检测结果为阴性和阳性的样品之间,贡柑叶际真菌和细菌群落的物种数、Shannon指数和谱系多样性指数均无显著差异(图1)。

表1 广东省仁化县贡柑叶片样品采集信息和黄龙病菌检测情况

Table 1 Information of collected Gonggan leaf samples from Renhua County in Guangdong Province and their occurrence of *Candidatus Liberibacter asiaticus*

采样季节 Sample season	镇/街道 Town/street	果园 Orchard	果园面积 Orchard area/hm ²	采样数 No. of samples	检出数($C_i \leq 34$) No. of detected samples ($C_i \leq 34$)	检出率 Detected incidence/%	测序样品数 No. of sequenced samples		
							$C_i > 34$	$C_i \leq 30$	
夏季	大桥镇 Daqiao Town	长坝 Changba	73.3	10	0	0.0	0	0	
Summer	丹霞街道 Danxia Street	康溪 Kangxi	20.0	10	1	10.0	0	0	
	黄坑镇 Huangkeng Town	高塘 Gaotang	6.7	10	2	20.0	0	0	
		下营 Xiaying	8.7	10	0	0.0	0	0	
平均值 Average			27.2	10	0.75	7.5	0	0	
秋季	长江镇 Changjiang Town	里周 Lizhou	3.3	10	5	50.0	5	5	
Autumn	城口镇 Chengkou Town	水淞 Shuisong	0.7	10	2	20.0	2	2	
		恩村 Encun	40.0	10	3	30.0	2	2	
		厚坑 Houkeng	6.7	10	4	40.0	1	1	
	大桥镇 Daqiao Town	长坝 Changba	16.7	10	6	60.0	4	4	
	丹霞街道 Danxia Street	康溪 Kangxi	20.0	5	1	20.0	0	0	
	董塘镇 Dongtang Town	高良 Gaoliang	6.7	10	5	50.0	2	2	
		南湖 Nanhu	6.7	10	4	40.0	4	4	
		扶溪镇 Fuxi Town	扶中 Fuzhong	6.7	10	2	20.0	1	1
	黄坑镇 Huangkeng Town	下营 Xiaying	8.7	5	3	60.0	2	2	
	石塘镇 Shitang Town	京群 Jingqun	13.3	10	2	20.0	0	0	
		下中垌 Xiazhongben	13.3	10	1	10.0	0	0	
		闻韶镇 Wenshao Town	华塘 Huatang	13.3	10	1	10.0	1	1
			石竹 Shizhu	6.7	10	3	30.0	3	3
	平均值 Average			11.6	9.3	3	32.3	1.9	1.9

进一步分析果园地理位置和携带黄龙病菌情况对贡柑叶际真菌、细菌群落组成和结构的影响,发现果园地理位置显著影响样品真菌群落($R^2=0.32, P<0.001$)和细菌群落($R^2=0.14, P<0.001$)的组成和结构(图2-A~B,表2)。黄龙病菌检测结果为阴性和阳

性样品之间真菌群落的组成和结构差异不显著($R^2=0.01, P>0.05$;图2-C,表2),而细菌群落的组成和结构存在显著差异($R^2=0.04, P<0.001$;表2)。PCoA结果显示,黄龙病菌检测结果为阴性和阳性的样品可以通过PCoA 2(方差贡献率为6.1%)进行区分(图2-

D)。上述结果表明柑橘黄龙病的发生对贡柑叶际微生物群落具有显著影响。

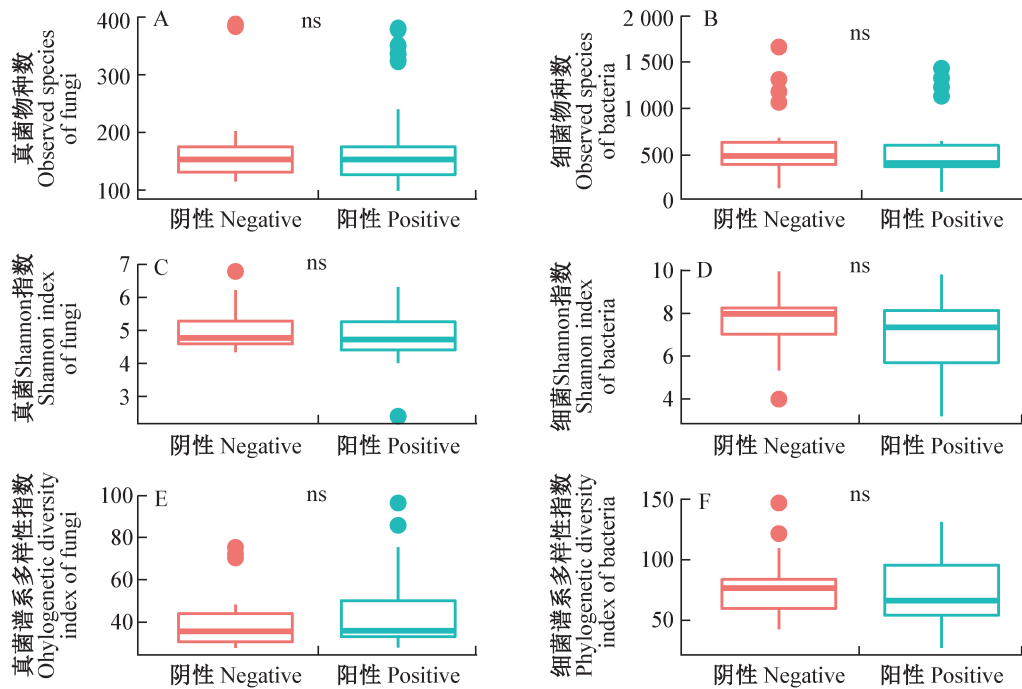


图1 黄龙病菌检测结果为阴性和阳性的贡柑叶际微生物群落的 α 多样性指数比较

Fig. 1 Comparison of the microbial α diversity indices between *Candidatus Liberibacter asiaticus*-negative and -positive Gonggan leaves

箱体外的圆点为处于95%置信区间外的数据。ns表示经Wilcoxon非参数检验法检验差异不显著($P>0.05$)。The dots outside the box are data outside the 95% confidence interval. ns indicates no significant difference by Wilcoxon nonparametric test.

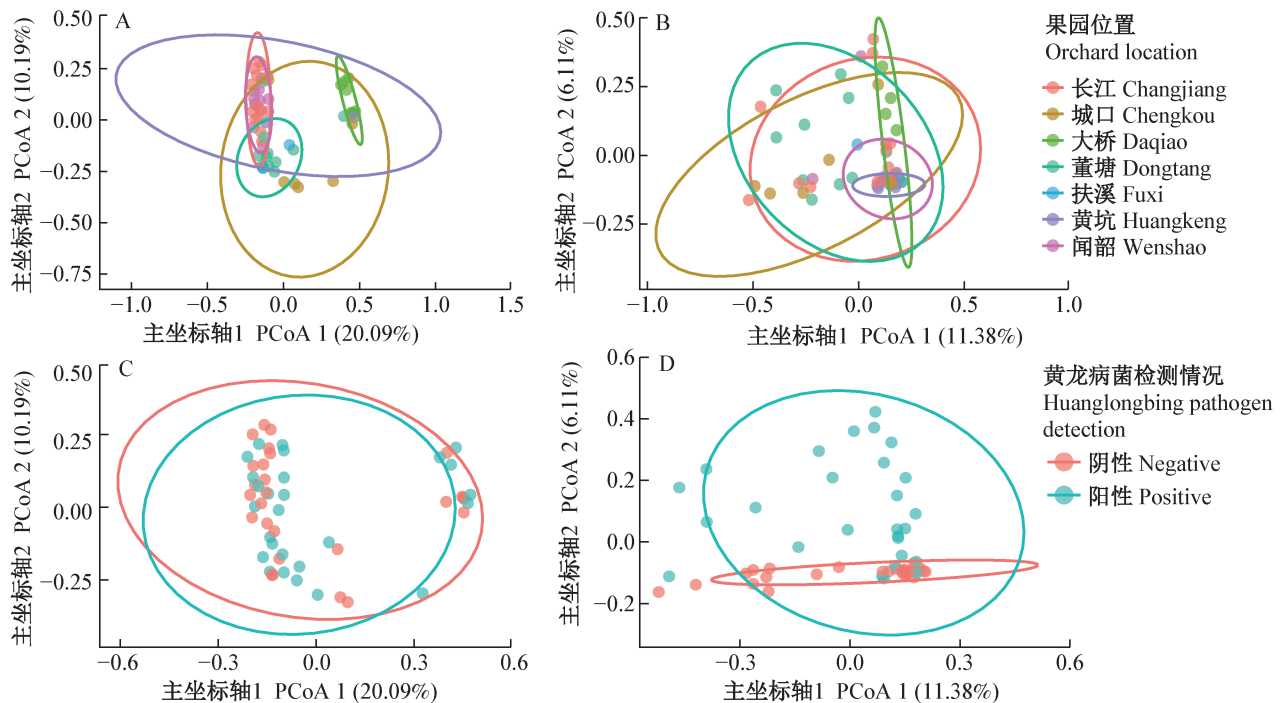


图2 果园地理位置和黄龙病菌携带情况对贡柑叶际真菌(A,C)和细菌(B,D)群落组成和结构的影响

Fig. 2 Effects of orchard location and the occurrence of *Candidatus Liberibacter asiaticus* on fungal (A, C) and bacterial (B, D) composition and structure on Gonggan leaves

聚类圈外的圆点为处于95%置信区间外的数据。The dots outside cluster circle are data outside the 95% confidence interval.

表2 置换多因素方差分析法分析贡柑叶际微生物群落组成和结构的影响因素

Table 2 Permutational multivariate analysis of variance of the factors affecting the microbial composition and structure on Gonggan leaves

项目 Item	真菌群落 Fungal community				细菌群落 Bacteria community			
	df	R ²	F	P	df	R ²	F	P
果园位置 Orchard location	6	0.32	3.72	0.001	6	0.14	1.34	0.000 1
携带黄龙病菌情况 With <i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	1	0.01	0.78	0.750	1	0.04	2.20	0.000 1
果园位置×携带黄龙病菌情况 Orchard location×with <i>C. Liberibacter asiaticus</i>	6	0.09	1.07	0.330	6	0.11	0.99	0.520 0
残差 Residual	40	0.58			40	0.71		

2.3 柑橘黄龙病对贡柑叶际细菌类群丰度的影响

进一步比较黄龙病菌检测结果为阴性和阳性样品之间细菌类群相对丰度的差异,结果表明,在科水平上,2组样品中相对丰度排名前10的科包括拜叶林克氏菌科、鞘脂单胞菌科、毛螺菌科、根瘤菌科、伯克氏菌科、链球菌科、肠杆菌科、红杆菌科、草酸杆菌科和丛毛单胞菌科,累计的相对丰度分别达到0.47和0.54(图3-A)。其中,根瘤菌科细菌的相对丰度

从阴性样品中的0.01显著增加到阳性样品中的0.11($P<0.001$;图3-B),主要归因于该科所辖的柑橘黄龙病菌在2组样品间的差异分布。与之相同,鞘脂单胞菌科、伯克氏菌科和草酸杆菌科的相对丰度在阳性样品中有一定的增加(图3-C~E),但均未达到显著水平;与之相反,拜叶林克氏菌科、毛螺菌科、链球菌科和肠杆菌科的相对丰度在阳性样品中有一定的降低(图3-F~I),但均未达到显著水平。

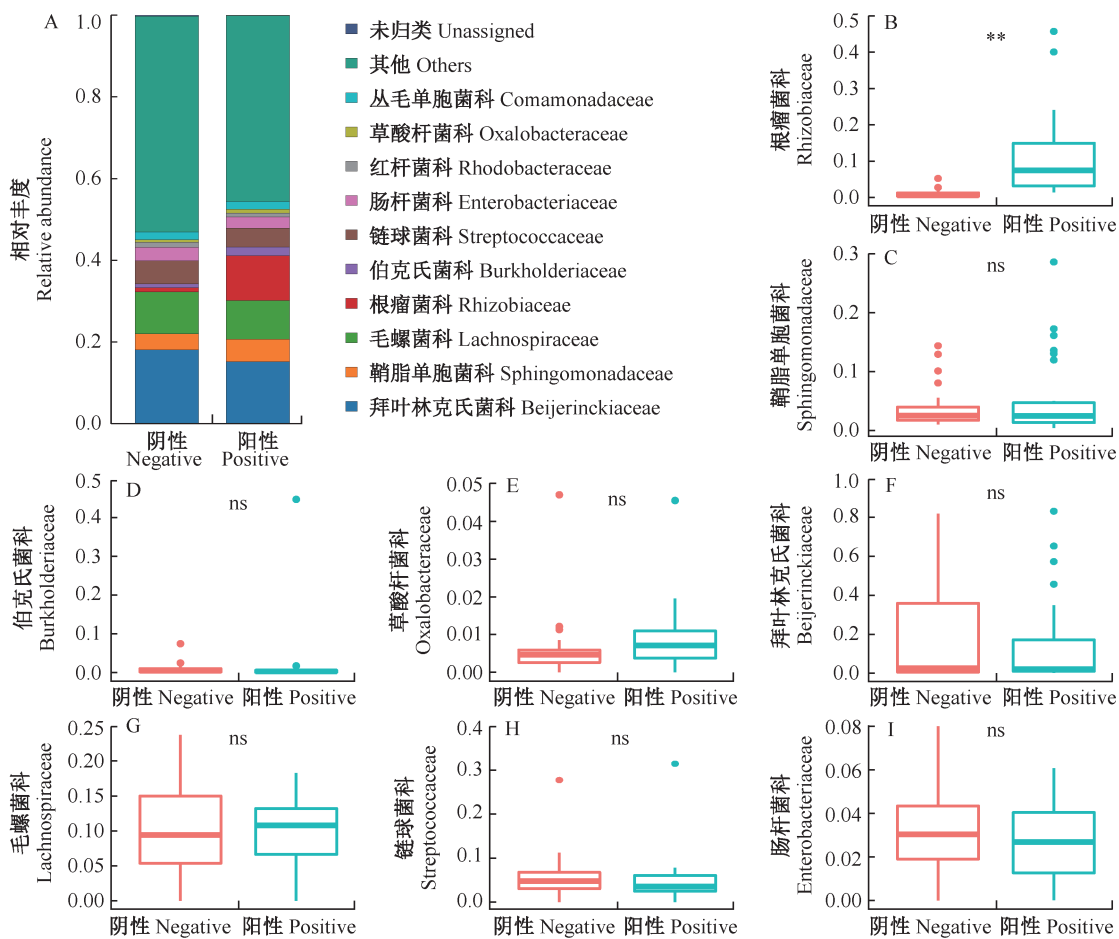


图3 黄龙病菌检测结果为阴性和阳性的贡柑叶际主要细菌类群的差异

Fig. 3 Differences of major bacterial families between *Candidatus Liberibacter asiaticus*-negative and -positive Gonggan leaves

箱体外的圆点为处于95%置信区间外的数据。**表示经 Wilcoxon 非参数检验法检验差异显著($P<0.01$), ns则表示差异不显著($P>0.05$)。The dots outside the box are data outside the 95% confidence interval. ** indicates significant difference by Wilcoxon nonparametric test ($P<0.01$), ns indicates no significant difference ($P>0.05$).

细菌群落功能注释结果表明,黄龙病菌对贡柑叶际细菌群落的糖类、氨基酸等代谢途径相关基因的影响不明显,同时也未显著改变群落内好氧细菌、厌氧细菌、革兰氏阳性和阴性细菌的分布情况。但黄龙病菌对贡柑叶际细菌生物膜的形成(图4-A~B)

和可移动基因元件的含量(图4-C~D)具有显著影响($P<0.05$)。韧皮部杆菌属对细菌类群生物膜形成的贡献和对可移动基因元件含量的贡献(以相对丰度表征)均从0增加到了12.6%($P<0.001$;图4-B、D)。

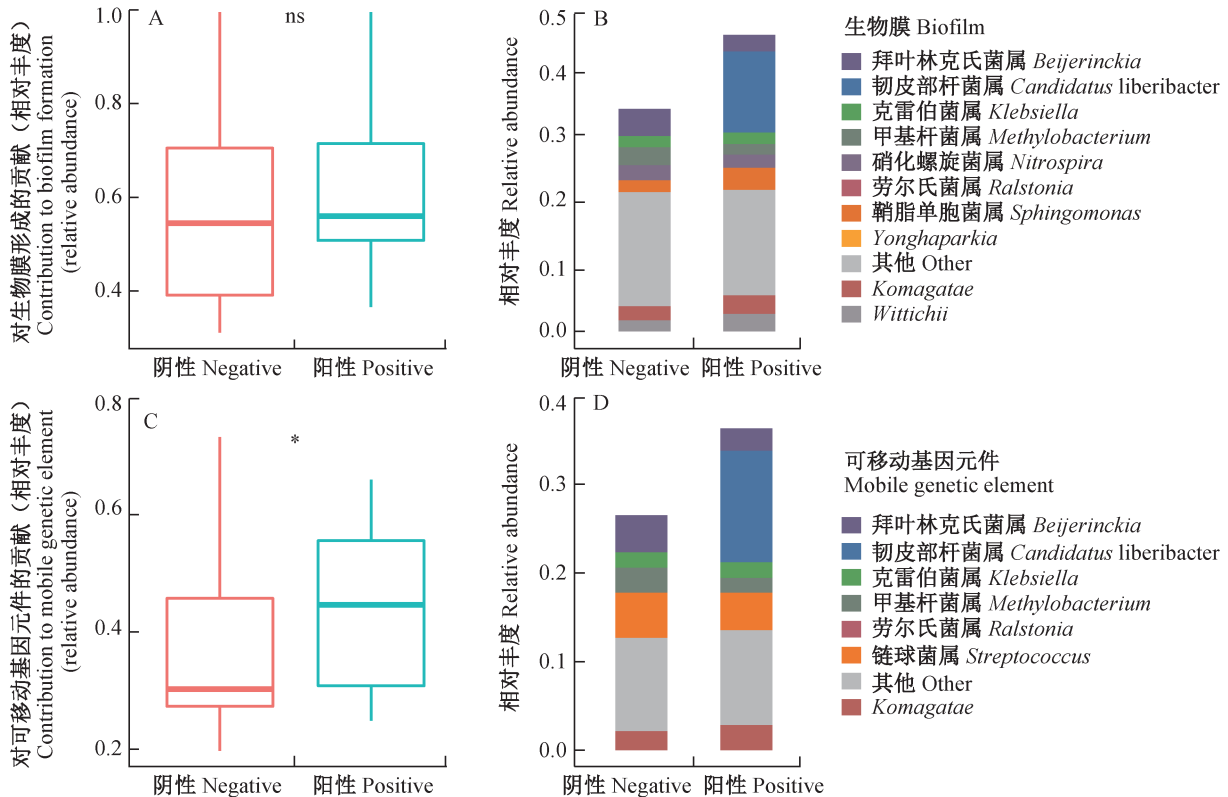


图4 黄龙病菌检测结果为阴性和阳性的贡柑叶际细菌类群预测表型的差异

Fig. 4 Differences of predicted phenotype of major bacteria groups between *Candidatus Liberibacter asiaticus*-negative and -positive Gonggan leaves

箱体外的圆点为处于95%置信区间外的数据。*表示经 Wilcoxon 非参数检验法检验差异显著($P<0.05$), ns 则表示差异不显著($P>0.05$)。The dots outside the box are data outside the 95% confidence interval. * indicates significant difference by Wilcoxon nonparametric test ($P<0.05$), ns indicates no significant difference ($P>0.05$).

进一步分析在科、属、种及扩增子序列变异体水平上不同细菌类群与黄龙病菌含量之间的相关性,结果显示,在科水平上,与黄龙病菌含量呈正相关关系的有23个细菌类群,其中有5个达到显著相关水平,而呈负相关关系的有77个细菌类群,其中有2个达到显著相关水平;在属水平上,与黄龙病菌含量呈正相关关系的有18个细菌类群,其中有4个达到显著相关水平,而呈负相关关系的有82个细菌类群,其中有1个达到显著相关水平;在种水平上,与黄龙病菌含量呈正相关关系的有32个细菌类群,其中有6个达到显著相关水平,而呈负相关关系的有68个细菌类群;在扩增子序列变异体水平上,与黄龙病菌含量呈正相关关系的有28个细菌类群,其中有8个达到显著相关水平,而呈负相关关系的有72个细菌

类群(图5);表明黄龙病菌含量与贡柑叶际细菌类群的负相关性关系更普遍,而正相关关系相对较少但相关性更强。

2.4 柑橘黄龙病菌对贡柑叶际细菌共发生网络的影响

黄龙病菌检测结果为阴性和阳性样品的细菌扩增子序列变异体共发生网络图中,以扩增子序列变异体作为节点,节点数一致,均为256个;以扩增子序列变异体之间的相互作用关系作为边,边的数量分别为563条和556条。2个网络均以细菌扩增子序列变异体间的正向互作关系为主,边的数量分别为479条和476条,占总边数的85.1%和85.6%;而负向互作关系较少,边的数量分别为84条和80条,占总边数的14.9%和14.4%。同时,2个网络在直径(8和9)、密度(均为0.017)和中心性等特性上并没

有表现出较大的差异。然而,在黄龙病菌检测结果为阳性样品的网络中,预测的网络模块数要比阴性样品多1个,阴性样品中的网络模块分别被标记为I和II(图6-A);阳性样品的网络中依然保留模块I,然而原先的模块II被分裂为2个模块,分别被标记为IIA和IIB(图6-B)。柑橘黄龙病菌扩增子序列变异体ASV3077处于模块IIA中,并与厌氧棍状菌 *Anaerotruncus* sp.、梭菌 *Clostridiales* sp.、假单胞菌

Pseudomonas sp.、鞘脂单胞菌 *Sphingomonas* sp.、毛螺菌 *Lachnospiraceae* sp. 和链球菌 *Streptococcus* sp. 的扩增子序列变异体存在直接互作。另外,柑橘黄龙病菌与上述6个细菌的扩增子序列变异体皆表现为负向互作,而这6个扩增子序列变异体与网络中其他细菌的扩增子序列变异体的互作以正向互作为主,占有互作数量的95.7%,因而推测柑橘黄龙病菌对贡柑叶际细菌群落的共发生存在负向的影响。

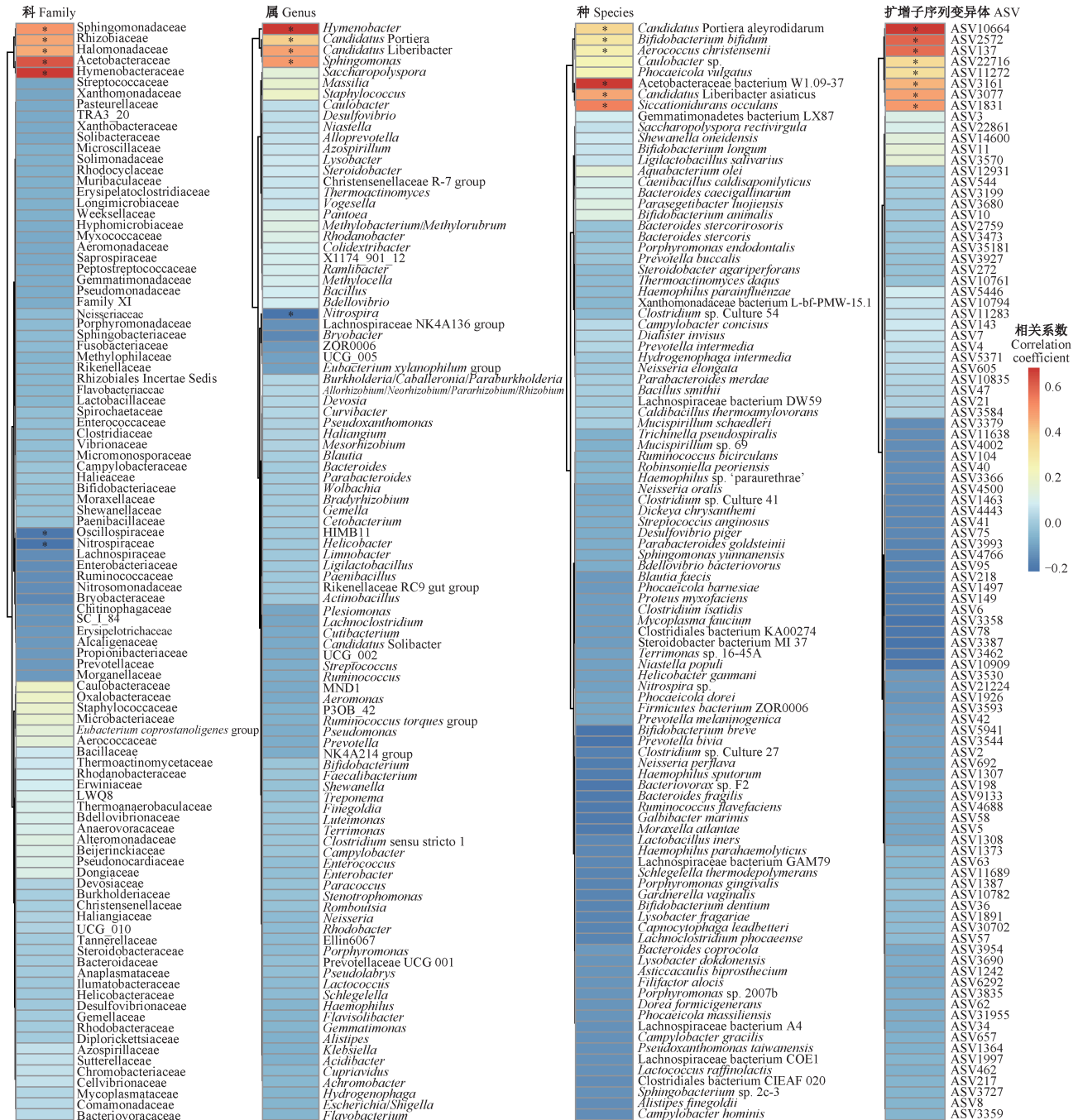


图5 贡柑叶际细菌类群与黄龙病菌含量的相关性

Fig. 5 Correlation between the Gonggan leaf bacterial groups and detected content of *Candidatus Liberibacter asiaticus*

*表示相关性显著 ($P < 0.05$). * indicates significant correlation ($P < 0.05$).

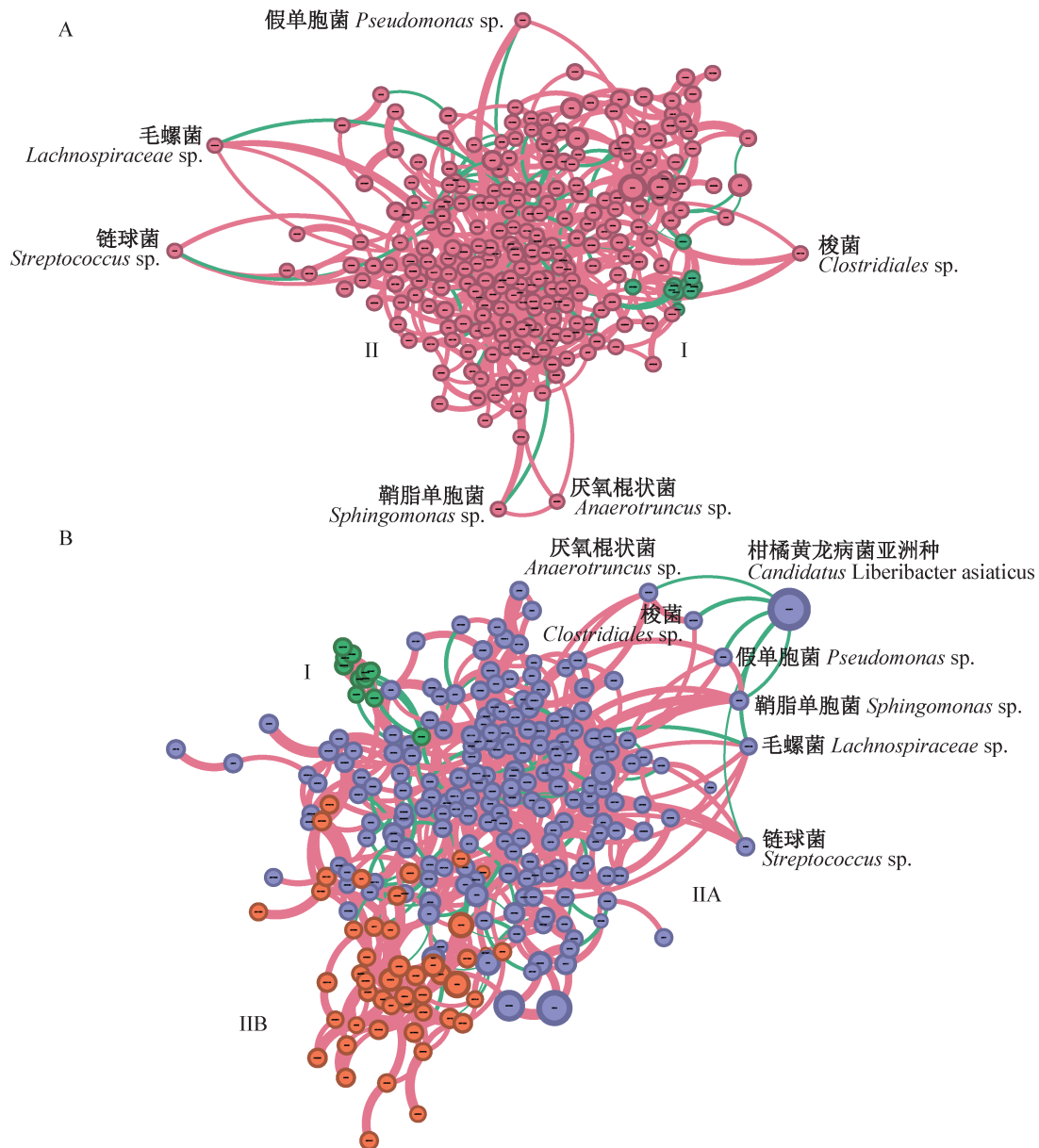


图6 黄龙病菌检测结果为阴性(A)和阳性(B)的贡柑叶际细菌类群的共发生网络图

Fig. 6 Co-occurrence bacterial networks of *Candidatus Liberibacter asiaticus*-negative (A) and -positive (B) Gonggan leaves

3 讨论

本研究于夏季和秋季分别从仁化县进行贡柑叶片样品采集,通过实时荧光定量PCR技术检测发现采集样品中黄龙病菌的平均检出率从7.5%上升到32.3%。陈霞等(2021)研究同样发现,在黄坑镇黄坑村果园,柑橘黄龙病菌的检出率从2019年4月的18.2%上升到10月的87.5%。由于管理不善,导致柑橘黄龙病菌的媒介昆虫柑橘木虱 *Diaphorina citri* 大量发生,这可能是导致柑橘黄龙病从夏季到秋季暴发的原因之一(刘丹等,2021;杜一民等,2023)。另外,进入10月后感染柑橘黄龙病的贡柑树已经表现出黄化不转绿的症状,因此可能干扰采样的选择,这

可能也是导致仁化县贡柑园黄龙病菌检出率偏高的人为因素之一。整体来说,仁化县的贡柑园亟需加强管理,尽早清除病残体,避免成为黄龙病的侵染源。

本研究结果显示,黄龙病的发生并没有显著改变叶际真菌和细菌群落的 α 多样性指标、真菌群落的组成和结构,以及主要真菌和细菌类群的相对丰度。这可能与黄龙病的发生严重程度有关。如Ginnan et al.(2020)将黄龙病树分为5个等级,在柑橘树发生严重衰退(等级4)和死亡(等级5)的情况下,叶际真菌群落的多样性和一些主要微生物类群的丰度才发生显著改变。再结合其他可参考的研究结果(Blaustein et al., 2017; 刘晓菲等, 2020; Yan et al., 2021),推测黄龙病的发生对柑橘叶际真菌和细菌群

落的影响较小,可能因为黄龙病菌的生长被限制在柑橘叶脉的韧皮部组织中,而大多数叶际微生物的生长被隔离在不同的叶片空间里(Pandey et al.,2022)。

虽然黄龙病的发生对于叶际真菌和细菌群落的影响较小,但该病害对叶际细菌群落的组成和结构具有显著影响。由于黄龙病菌的存在,细菌群落内根瘤菌科的相对丰度显著增加,其他主要的细菌类群受影响较小,与其他研究结果(Blaustein et al., 2017; 刘晓菲等, 2020; Yan et al., 2021)一致,仅表现出在平均值水平上的变化。在相关性分析中,本研究发现黄龙病菌与薄层菌属 *Hymenobacter* 和鞘脂单胞菌属 *Sphingomonas* 存在显著正相关关系,而与硝化螺旋菌属 *Nitrospira* 存在显著负相关关系。在不同的研究中,均发现薄层菌属和鞘脂单胞菌属细菌容易受到黄龙病发生的影响,然而具体是受到黄龙病发生的促进或抑制作用并没有统一结论(Trivedi et al., 2012; Blaustein et al., 2017; 刘晓菲等, 2020)。基于此,参考 Ginnan et al. (2020) 的模型,推测黄龙病发生早期能够促进柑橘上益生菌的富集,特别是具有抑制病原菌生长功能的鞘脂单胞菌属细菌(Li et al., 2022);而在柑橘树严重衰退和死亡期间,益生菌类群由于被常见的腐生菌所替代,表现出随着病害发展而被抑制的现象(Ginnan et al., 2020)。

本研究结果表明,在共发生网络分析中,黄龙病菌通过厌氧棍状菌、梭菌、假单胞菌、鞘脂单胞菌、毛螺菌和链球菌多个细菌对柑橘叶际细菌群落产生负面影响。这和 Blaustein et al. (2017) 预测的结果相似,该研究认为黄龙病菌可以通过对伯克氏菌科、微单胞菌科和黄单胞菌科细菌的抑制作用来对整个细菌群落产生负面影响。在这些细菌中,假单胞菌属和鞘脂单胞菌属包含许多在不同植物叶际广泛存在的共生菌,它们具有促进植物生长和提高植物抗病性的功能(Srivastava et al., 2022)。在柑橘中来自这2个属的细菌也可能参与了寄主植物的生长和抗病过程(Li et al., 2022; Penyalver et al., 2022)。在共生菌参与植物抗病的机制中,主要由于共生菌所组成的群落与病原菌存在生长竞争关系,如对铁元素吸收的竞争能够导致叶际和根际微生物组对病原菌产生清除作用(Gu et al., 2020; Li et al., 2022)。因此,推测假单胞菌和鞘脂单胞菌在黄龙病菌存在的微生物群落中也行使相似的功能;其他4种细菌在目前的相关研究中并不常见,可能是地区性发生的微生物类群。鉴于黄龙病菌目前还不能在实验室条件下进行培养,因此分离和研究与黄龙病菌相关的及共发生的细菌类群与柑橘的互作模式和机理,也许能够为

柑橘黄龙病的致病机理研究和防控提供新思路。

参 考 文 献 (References)

- Bao ML, Zheng Z, Sun XA, Chen JC, Deng XL. 2020. Enhancing PCR capacity to detect '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' utilizing whole genome sequence information. *Plant Disease*, 104(2): 527–532
- Bass D, Stentiford GD, Wang HC, Koskella B, Tyler CR. 2019. The pathobiome in animal and plant diseases. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(11): 996–1008
- Blaustein R, Lorca G, Meyer JL, Gonzalez CF, Teplitski M. 2017. Defining the core citrus leaf- and root-associated microbiota: factors associated with community structure and implications for managing huanglongbing (citrus greening) disease. 83(11): e00210-17
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114–2120
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, et al. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8): 852–857
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. 2016. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7): 581–583
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7(5): 335–336
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, Fierer N, Knight R. 2011. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(S1): 4516–4522
- Chen X, Cui YP, Peng AT, Song XB, Cheng BP, Ling JF. 2021. Investigation and detection of main diseases of Gonggan in Renhua County. *Guangdong Agricultural Sciences*, 48(2): 92–99 (in Chinese) [陈霞, 崔一平, 彭埃天, 宋晓兵, 程保平, 凌金锋. 2021. 仁化县贡柑主要病害的调查与检测. *广东农业科学*, 48(2): 92–99]
- Cui YP, Peng AT, Song XB, Cheng BP, Ling JF, Chen X. 2020. Investigation on occurrence of citrus huanglongbing and virus diseases, and prophage genetic diversity of huanglongbing pathogen in Meizhou, Guangdong. *Scientia Agricultura Sinica*, 53(8): 1572–1582 (in Chinese) [崔一平, 彭埃天, 宋晓兵, 程保平, 凌金锋, 陈霞. 2020. 广东梅州柑橘黄龙病和病毒病的发生调查及其黄龙病菌原噬菌体多样性. *中国农业科学*, 53(8): 1572–1582]
- Du YM, Chen HX, Cheng GQ, Ouyang ZG, Yu HZ, Lu ZJ. 2023. Functional response and prey preference of beautiful lacewing *Chrysopa formosa* to adult of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*. *Journal of Plant Protection*, 50(4): 1025–1032 (in Chinese) [杜一民, 陈晗馨, 程高祺, 欧阳智刚, 余海中, 卢占军. 2023. 丽草蛉对柑橘木虱成虫的捕食功能反应及捕食偏好. *植物保护学报*,

- 50(4): 1025–1032]
- Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 27(16): 2194–2200
- Garnier M, Jagoueix-Eveillard S, Cronje PR, Le Roux HF, Bové JM. 2000. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the Western Cape Province of South Africa: proposal of '*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. *capensis*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(Pt6): 2119–2125
- Ginnan NA, Dang T, Bodaghi S, Ruegger PM, McCollum G, England G, Vidalakis G, Borneman J, Rolshausen PE, Roper MC. 2020. Disease-induced microbial shifts in citrus indicate microbiome-derived responses to huanglongbing across the disease severity spectrum. *Phytobiomes Journal*, 4(4): 375–387
- Gu SH, Wei Z, Shao ZY, Friman VP, Cao KH, Yang TJ, Kramer J, Wang XF, Li M, Mei XL, et al. 2020. Competition for iron drives phytopathogen control by natural rhizosphere microbiomes. *Nature Microbiology*, 5(8): 1002–1010
- Jagoueix S, Bove JM, Garnier M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the *Proteobacteria*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3): 379–386
- Ji QH, Guo YJ. 2010. Study on classification of Gonggan. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 22(11): 11–14 (in Chinese) [吉前华, 郭雁君. 2010. 贡柑分类地位的研究. *江西农业学报*, 22(11): 11–14]
- Kolde R. 2019. pheatmap: pretty heatmaps. R package version 1.0.12, <https://cran.r-project.org/package=pheatmap>
- Kurtz ZD, Müller CL, Miraldi ER, Littman DR, Blaser MJ, Bonneau RA. 2015. Sparse and compositionally robust inference of microbial ecological networks. *PLoS Computational Biology*, 11(5): e1004226
- Li PD, Zhu ZR, Zhang YZ, Xu JP, Wang HK, Wang ZY, Li HY. 2022. The phyllosphere microbiome shifts toward combating melanose pathogen. *Microbiome*, 10(1): 56
- Li WB, Hartung JS, Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 66(1): 104–115
- Liu D, Yao JM, Yu YW, Duan LC, Cai Z. 2021. Suitable distribution changes of Asian citrus psyllid *Diaphorina citri* in China under global warming. *Journal of Plant Protection*, 48(4): 872–881 (in Chinese) [刘丹, 姚俊萌, 余焰文, 段里成, 蔡哲. 2021. 气候变暖背景下柑橘木虱在中国的适生区变化. *植物保护学报*, 48(4): 872–881]
- Liu HW, Brettell LE, Qiu ZG, Singh BK. 2020. Microbiome-mediated stress resistance in plants. *Trends in Plant Science*, 25(8): 733–743
- Liu XF, Gan Y, Liu LH, Zhao JW, Huang JC, Zheng Y. 2020. High-throughput sequencing analysis on diversity of bacterial and fungal endophytes on huanglongbing-infected citrus plants. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 35(1): 59–66 (in Chinese) [刘晓菲, 甘芸, 刘利华, 赵建伟, 黄建成, 郑宇. 2020. 黄龙病罹病柑橘叶片内生细菌和内生真菌群落结构多样性分析. *福建农业学报*, 35(1): 59–66]
- Liu YX, Qin Y, Chen T, Lu MP, Qian XB, Guo XX, Bai Y. 2021. A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein & Cell*, 12(5): 315–330
- Lou BH, Song YQ, RoyChowdhury M, Deng CL, Niu Y, Fan QJ, Tang Y, Zhou CY. 2018. Development of a tandem repeat-based polymerase chain displacement reaction method for highly sensitive detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*'. *Phytopathology*, 108(2): 292–298
- Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, 17(1): 10
- Pandey SS, Hendrich C, Andrade MO, Wang N. 2022. *Candidatus Liberibacter*: from movement, host responses, to symptom development of citrus huanglongbing. *Phytopathology*, 112(1): 55–68
- Penyalver R, Roesch LFW, Piquer-Salcedo JE, Forner-Giner MA, del M Alguacil M. 2022. From the bacterial citrus microbiome to the selection of potentially host-beneficial microbes. *New Biotechnology*, 70: 116–128
- Srivastava AK, Das AK, Jagannadham PTK, Bora P, Ansari FA, Bhate R. 2022. Bioprospecting microbiome for soil and plant health management amidst huanglongbing threat in citrus: a review. *Frontiers in Plant Science*, 13: 858842
- Teixeira DC, Saillard C, Eveillard S, Danet JL, da Costa PI, Ayres AJ, Bové J. 2005. '*Candidatus Liberibacter americanus*', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5): 1857–1862
- Trivedi P, He ZL, Van Nostrand JD, Albrigo G, Zhou JZ, Wang N. 2012. Huanglongbing alters the structure and functional diversity of microbial communities associated with citrus rhizosphere. *The ISME Journal*, 6(2): 363–383
- Ward T, Larson J, Meulemans J, Hillmann B, Lynch J, Sidiropoulos D, Spear JR, Caporaso G, Blekhman R, Knight R, et al. 2017. Bug-Base predicts organism-level microbiome phenotypes. *bioRxiv*, DOI: 10.1101/133462
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.//In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR protocols: a guide to methods and applications. London: Academic Press, pp. 315–322
- Yan HX, Zhou BR, Jiang B, Lv YD, Moniruzzaman MD, Zhong GY, Zhong Y. 2021. Comparative analysis of bacterial and fungal endophytes responses to *Candidatus Liberibacter asiaticus* infection in leaf midribs of *Citrus reticulata* cv. Shatangju. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113: 101590
- Zhang YZ, Trivedi P, Xu J, Roper MC, Wang NA. 2021. The citrus microbiome: from structure and function to microbiome engineering and beyond. *Phytobiomes Journal*, 5(3): 249–262
- Zhang YZ, Xu J, Riera N, Jin T, Li JY, Wang N. 2017. Huanglongbing impairs the rhizosphere-to-rhizoplane enrichment process of the citrus root-associated microbiome. *Microbiome*, 5(1): 97
- Zhou CY. 2020. The status of citrus huanglongbing in China. *Tropical Plant Pathology*, 45(3): 279–284