微生物学通报
Microbiology China
tongbao@im.ac.cn
SEP 20, 2011, 38(9): 1362−1370
© 2011 by Institute of Microbiology, CAS

研究报告

亚洲韧皮杆菌兼性厌氧型伴生细菌鉴定及优势菌群分析

李颜方[1] 殷幼平[1] 王玉玺[2] 李佳[1] 陈世伟[3] 王中康[1*]

(1. 重庆大学 生物工程学院基因工程研究中心 重庆 400030)
(2. 农业部全国农业技术推广服务中心 北京 100126)
(3. 广西利添生物科技发展(合浦)有限公司 广西 北海 536128)

摘 要: 以定向分离培养和基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)方法，分析感黄龙病柑橘与健康柑橘植株不同部位的内生细菌多样性，分离柑橘组织共获得 19 株可培养的兼性厌氧型内生细菌，经形态、生理生化结合 16S rDNA 分子方法鉴定其隶属于 12 个属，其中短小杆菌属 *Curtobacterium* sp. (IF: 29.07%)、芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. (IF: 23.12%)和微杆菌属 *Microbacterium* sp. (IF: 21.09%)为罹病植株的优势菌群，芽孢杆菌属 *Bacillus* sp. (IF: 21.03%)、动性球菌属 *Planococcus* sp. (IF: 20.69%)和假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. (IF: 17.44%)为无症健株的优势菌群。对 DGGE 方法得到的 50 条 16S rDNA 目标条带进行序列比对，共鉴定出 9 个属的细菌，结果表明沙雷氏菌属 *Serrations* sp. (IF: 28%)是优势菌属，泛菌属 *Pantoea* sp. (IF: 14%)是次优势菌属；病果桔络中黄龙病菌含量最高(>1%)，而罹病植株其他部位的黄龙病菌丰度较低。PCR-DGGE 图谱也显示感病和健康柑橘组织的内生细菌存在差异。

关键词: 黄龙病，内生细菌，定向分离培养，16S rRNA 多样性分析

Isolation of facultative anaerobic entophytic bacterial companioned *Ca* Las infected citrus tissues and evaluation of dominant bacterial populations

LI Yan-Fang[1] YIN You-Ping[1] WANG Yu-Xi[2] LI Jia[1] CHEN Shi-Wei[3] WANG Zhong-Kang[1*]

(1. *Bioengineering College*, *Chongqing University*, *Chongqing* 400030, *China*)
(2. *Ministry of Agriculture*, *Agricultural Technique Extension and Service Center*, *Beijing* 100126, *China*)
(3. *Lucky Team Biotech Development* (*Hepu*) *Ltd*., *Co. Hepu*, *Beihai*, *Guangxi* 536128, *China*)

基金项目：国家自然科学基金项目(No. 30971875)；公益性行业(农业)科研专项(No. 201003067)；校企科研合作项目(No. 200706201312)
*通讯作者：Tel/Fax: 86-23-65120489；✉: zkwang646@sina.com
收稿日期：2011-02-20；接受日期：2011-04-06

Abstract: To analysis the entophytic bacterial diversity of citrus and find the companion bacteria populations associated with Huanglongbing pathogen-infected and healthy citrus plant tissues for decipher the co-cultivation of HLB pathogen, we selected varied parts of citrus tissues collected from different locations of citrus planted area. The facultative anaerobic entophytic bacteria were isolated and purified based on bacterial morphology, physiology, biochemistry characteristics and the molecular method of PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) analysis based on the sequence of 16S rRNA V6-V8 fragment gene. By the directional isolation of the facultative anaerobic entophytic bacteria and 16S rDNA amplification, total 12 genera of bacteria were identified from 19 cultivable bacterial populations. The dominant bacterial population in infected citrus plants were *Curtobacterium* sp. (IF: 29.07%), *Bacillus* sp. (IF: 23.12%), *Microbacterium* sp. (IF: 21.09%) while in healthy citrus tissues belonged to *Bacillus* sp. (IF: 21.03%), *Planococcus* sp. (IF: 20.69%), *Pseudomonas* sp. (IF: 17.44%). From 50 target bands obtainded by the DGGE approach, 9 genera of cultivable bacteria were recognized. The dominant bacterium population belonged to *Serratia* sp. (IF: 28%) and *Pantoea* sp. (IF: 14%) followed by it. *Candidatus* Liberibacter asiaticus was only found in tangerine pith of deformed orange fruit, which suggested that the content (>1%) of Huanglongbing was more in diseased fruits and other tissues of citrus had low abundance percentage. The density and species of entophytic bacteria were also observed in remarkable difference between infected and healthy citrus plant from the PCR-DGGE profiles.

Keywords: Huanglongbing, Entophytic bacteria, Directional isolation, 16S rRNA diversity analysis

柑橘是世界人均消费量最大的水果，种植面积达 800 多万公顷，年产量约 1.2 亿吨，约占世界水果生产量的 22%。柑橘黄龙病是柑橘生产上最具毁灭性的病害，主要分布于巴西、美国、非洲南部以及东南亚各国、印度洋地区。中国南方 19 个柑橘种植省区中有 11 个省区发生危害，尤其是东南沿海的广东、广西、福建、台湾、江西和浙江等主产省区最为严重，并有向北扩展的趋势。被侵染发病的柑橘植株往往呈现斑驳型叶片或均匀型黄梢，后期则表现出缺 Zn^{2+}、Mn^{2+}的花叶等症状，果树经济寿命短、产量低，果实畸形，给果农及地方财政带来巨大的经济损失。

柑橘黄龙病是由难人工培养的韧皮杆菌属的革兰氏阴性细菌所引起的，目前已报道有 *Candidatus* Liberibacter asiaticus, *Ca*. L. africanus, *Ca*. L. americanus, *Ca*. L. psyllaurous[1−2]，中国的柑橘黄龙病病原菌为亚洲种 *Ca*. L. asiaticus[3]。近年的研究发现感染黄龙病植株内存在与病原菌伴生的内生菌，这些内生菌对病原菌的生长可能起促进或抑制作用[4−5]。Davis[6]利用添加无机盐离子的 PD_2 培养基成功分离得到可能与亚洲韧皮杆菌共生的放线菌门的疮孢丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)。鉴于内生细菌具有丰富而强大的生物学功能：如固氮、促植物生长、增强宿主植物抗逆境和抗病虫害等[7]，近年来国内外对内生细菌的研究越来越多，但关于柑橘内生细菌的报道较少。袁红旭等[8]从不同品种柑橘果实中筛选出 4 株对柑橘炭疽病有较好防治作用具有应用前景的拮抗内生细菌。本研究旨在以柑橘病、健植株不同组织中的内生细菌为研究对象，分析比较柑橘病株与健株内生菌群的差异，期望发现与亚洲韧皮杆菌协同伴生的功能性内生细菌，为亚洲韧皮杆菌与伴生性内生菌之间协同进化、相互作用机理的研究奠定基础。

传统的分析微生物多样性的技术主要通过平板培养方法对细菌进行计数、分离和鉴定。由于培养条件的限制，可培养的微生物只占总微生物资源的 0.1%−10.0%，绝大部分微生物因为目前培养条件的限制难以得到纯菌株，难以客观的反映生态环境中细菌群落的多样性。16S rRNA 是细菌种类鉴定的一个重要指标，特别是利用核糖体 16S rDNA 作为分子标记的 DGGE 为分析不可培养微生物的菌群结构提供了有力的手段。基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE

方法已经广泛地应用到环境微生物和动植物微生物的研究中[9]。本研究采用定向分离培养兼性厌氧型内生细菌和分子生物学手段测序的方法，利用基于16S rRNA 的 PCR-DGGE 宏基因组学方法探索柑橘内生细菌的多样性。

1 材料与方法

1.1 供试植物材料

试验用的柑橘样品采自广东、贵州、福建、云南、浙江、广西等柑橘黄龙病区，包括罹病和健康样品，塑料袋密封保存于 4 °C。所有样品采集后在 2−3 d 内分离。

1.2 主要试剂及用品

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，Axygen；DNA 纯化试剂盒，TaKaRa；*Taq* Plus 酶，TaKaRa；pMD19-T, TaKaRa；微需氧产气包，三菱瓦斯化学株式会社。

1.3 内生细菌的定向分离与培养

以柑橘植株的叶片中脉、根韧皮部、枝条韧皮部、树皮韧皮部、果实橘络作为分离对象。样品首先进行表面灭菌，分别取 1 g 样品用自来水冲洗，75%酒精浸泡 1 min，根据分离样品的部位不同用 2% NaClO 浸泡 1−25 min，最后无菌水冲洗 5−6 次后用无菌滤纸吸干水分。表面灭菌干净的样品用已灭菌的剪刀剪碎置于无菌离心管中，灭菌头尖充分捣碎后加入 10 mL 无菌水，浸泡 1 h。将浸泡液梯度稀释，叶片、果实稀释至 10^{-3}，树皮、枝条稀释至 10^{-4}，根稀释至 10^{-5}。实验用 LB 培养基、TSA 固体培养基，每 100 mL 培养基倒 3 个平板(培养基较厚，营造兼性厌氧环境)。取 100 µL 梯度稀释液与平板中的培养基混合均匀，每个梯度 3 个重复。28 °C 培养 2−3 d (使用微需氧产气包)。最后一次清洗的水涂 TSA 培养基平板检查灭菌效果。

观察细菌的菌落形态(颜色、大小、表面光泽、透明度及湿润度等)和菌体形态(革兰氏染色反应、菌体大小、排列方式和有无芽孢等)，挑取不同类型的细菌平板纯化，纯化后的内生细菌经穿刺培养在LB 半固体培养基上，置于 4 °C 冰箱保存备用。

1.4 优势菌群的鉴定

1.4.1 形态学和生理生化鉴定：根据《伯杰氏细菌鉴定手册》第 9 版[10]和《常见细菌系统鉴定手册》[11]，对得到的优势菌群进行形态和生理生化测定，并按可数性原则对平板上的目标菌落计数，同类型菌落与总菌落数的比例为该菌属的相对丰度。

内生菌菌落丰富度(CFU/g 鲜重)=平板菌落数×稀释倍数×10^2

1.4.2 优势菌 16S rDNA 的扩增与鉴定：以优势菌单菌落的菌悬液为 PCR 扩增模板，以细菌 16S rDNA 的通用引物进行菌落 PCR 扩增。正向引物 27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和反向引物 1492R (5′-TACGGTTACCTGTTACGACTT-3′)[12]。采用 50 µL 的 PCR 反应体系, PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 7 min。扩增结束后琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物，回收并与载体 pMD19-T 连接，转化到 *E. coli* JM109 中，筛选阳性克隆并送深圳华大生物技术公司进行测序。

1.5 柑橘内生细菌 16S rDNA-DGGE 分析

1.5.1 总 DNA 的提取：首先对来自广西合浦县的病、健柑橘植株的叶片中脉、根韧皮部、枝条韧皮部、树皮韧皮部、果实橘络等部位进行表面灭菌，然后用无菌研钵加入液氮研磨成粉末，利用细菌基因组提取试剂盒提取内生细菌的基因组 DNA。

1.5.2 PCR 扩增 16S rDNA V6−V8 区：PCR-DGGE 研究植物内生细菌群落时，应避免植物的线粒体与叶绿体 DNA 干扰，并且 PCR 产物长度要适合，因此采用巢氏 PCR 方法扩增 16S rDNA V6−V8 区[12]，以提取的柑橘不同组织的内生细菌总 DNA 为模板。先用细菌通用引物 799F (5′-AACMGGATTAGATACCCKG-3′)和 1492R (5′-GGCTACCTTGTTACGACTT-3′)，扩增细菌 16S rDNA 中的 V5−V9 高变区。50 µL 的 PCR 反应体系，反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 7 min。然后再用 968F-GC (5′-AACGCGAAGAACCTTAC-3′)和 1378R (5′-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3′)为引物，扩增 16S rDNA 的 V6−V8 高

变区。上游引物 968F 5′端有 40 bp GC 夹(CGCCCG CCGCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGG GGG)。采用 50 μL 反应体系降落式 PCR 扩增，PCR 反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 69 °C−58 °C 45 s, 72 °C 60 s, 12 个循环，每个循环降 1 °C; 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 45 s, 72 °C 60 s, 18 个循环; 72 °C 7 min。所得产物于 2%的琼脂糖凝胶上电泳。所有样品均扩增出大小约 450 bp 的 DNA 片段，此 PCR 产物用于 DGGE 分析。

1.5.3 PCR-DGGE 分离及条带分析: 上述 PCR 产物浓缩后，采用 DGGE 分析系统进行电泳分离，8% (*W/V*)的聚丙烯酰胺(37.5:1.0, *W/W*)，变性剂尿素与甲酰胺线性梯度范围为 30%−45%。电泳条件为 60 °C 恒温，80 V 16 h，电泳结束后 EB 染色 15−25 min，VersaDoc2000 凝胶成像系统分析拍照，标记 DGGE 图谱中清晰的优势条带后割胶，分别捣碎后加入 20 μL Sterilized ddH$_2$O, −20 °C 浸泡过夜，离心取上清作为 PCR 的模板进行扩增，PCR 所用引物为 968FGC 和 1378R，PCR 反应程序同 1.5.2 所述。得到的 PCR 扩增产物再以 DGGE 分离，二次 PCR 产物用凝胶纯化试剂盒纯化后与载体 pMD19-T 连接，转化到 *E. coli* JM109 中，用菌落 PCR 方法检测阳性克隆并委托深圳华大生物技术公司测序。测序结果于 NCBI 数据库上进行 BLAST 比对分析，寻找同源性最高的序列。使用软件 Quantity One-1-D 分析柑橘内生细菌 DGGE 分离图像。

1.5.4 多样性分析: 因为 DGGE 分离得到的条带的亮度与 DNA 含量呈正比关系，所以利用每个条带的亮度值对该列所有条带平均亮度值的比值(P_i)计算 *Shannon-Weaver* 多样性指数(H)[13]。

$$H = -\sum p_i \ln p_i$$

数据分析采用 DPSv3.01 软件数据处理系统，显著性分析采用 Duncan 新复极差法。

2 结果与分析

2.1 柑橘内生细菌可培养优势菌群的分离鉴定

2.1.1 柑橘不同组织内生细菌的分离结果: 将健康及感病样品植株的叶片、根、枝条、树皮及果实表面消毒后定向分离内生菌。在 LB 和 TSA 培养基平板上均有较大数量的细菌菌落，菌落形态存在明显差异，说明柑橘组织存在丰富的兼性厌氧型内生细菌。分离得到的内生细菌经过纯化和镜检，根据菌落形态和菌体差异最终获得 19 株可培养的内生细菌。通过对平板上的菌落计数，不同样品之间内生细菌的菌落数量范围为 2.19×10^4 CFU/g 鲜重至 1.33×10^6 CFU/g 鲜重。由表 1 可知，内生细菌在柑橘不同组织的菌落数和种群数量均有差异，其中以病根中内生细菌类群最多，种群密度也最大，多达 1.33×10^6 CFU/g 鲜重。不同组织器官内生细菌数量丰度大小依次为病根>病树皮>病果>病茎>健根>健树皮>病叶>健茎>健叶>健果。感病柑橘植株内生细菌菌落数量大于健康植株组织。样品的内生细菌菌落丰富度与细菌种类之间并没有必然的联系，有的样品分离得到的内生细菌种类不多，但菌落丰富度较高，有的恰恰相反，菌落丰富度较低却种类丰富。

表 1 内生细菌在感黄龙病及健康柑橘植株内的分布情况
Table 1 Distribution of entophytic bacteria in the healthy and Huanglongbing pathogen-infected citrus

样品 Sample	内生细菌菌落数 Bacterial colony No. (CFU/g)		内生细菌种类 Species of entophytic bacteria	
	病株 Infected	健株 Healthy	病株 Infected	健株 Healthy
中脉 Midrib	2.76×10^5	8.12×10^4	16	14
树根 Root	2.76×10^5	2.11×10^5	18	15
枝条 Stem	6.79×10^5	2.19×10^4	14	12
树皮 Bark	8.33×10^5	2.33×10^4	15	14
果实 Fruit	8.19×10^5	1.07×10^5	16	13

2.1.2 兼性厌氧型内生细菌的鉴定: 通过基于16S rDNA 的分子鉴定并结合常规的生理生化鉴定对分离培养获得的19株细菌进行分析, 结果表明其属于12个属。菌株GX21、GX34是克吕沃尔氏属 *Kluyvera* sp.; 菌株GX22、GX24、GX35、GX36是芽孢杆菌属 *Bacillus* sp.; 菌株GX23是短芽孢杆菌属 *Brevibacillus shida*; GX25为动性球菌属 *Planococcus* sp.; GX26为刺黄色假杆菌属 *Pseudoclavibacter helvolus*; GX27为微杆菌属 *Microbacterium* sp.; GX28为塔特姆菌属 *Tatumella* sp.; GX29、GX39为假单胞菌属 *Pseudomonas* sp.; GX30、GX31、GX33为短小杆菌属 *Curtobacterium* sp.; GX32为泛菌属 *Pantoea punctata*; GX37为克雷伯菌属 *Klebsiella* sp.; GX38为肠杆菌 *Enterobacter* sp.。

2.1.3 内生细菌优势种群在感病和健康植株中的分离频率: 对56份来自不同省区的柑橘样品组织经共计250次分离培养, 对分离到的内生细菌纯化后进行分类, 计算不同类型菌群的分离频率(图1), 病株中 *Curtobacterium* sp. (IF: 29.07%)、*Bacillus* sp. (IF: 23.12%)、*Microbacterium* sp. (IF: 21.09%)分离频率高, *Curtobacterium* sp.是病株中的优势菌群。健株中 *Bacillus* sp. (IF: 21.03%)、*Planococcus* sp. (IF: 20.69%)和 *Pseudomonas* sp. (IF: 17.44%)分离频率比较高。值得注意的是芽孢杆菌 *Bacillus* sp.在病健植株组织中不但种类丰富, 而且出现频率都比较高, 是柑橘内生细菌的优势菌群; 此外短小杆菌属 *Curtobacterium* sp.在黄龙病罹病植株中的数量明显增加, 而假单胞菌 *Pseudomonas* sp.在健康植株内生细菌中所占的比例大于病株, 可能是因为亚洲韧皮杆菌对寄主植株的内生菌群组成及优势菌群都有不同程度的影响。

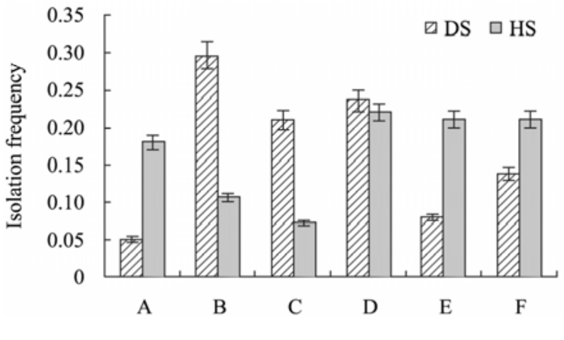

图1 内生细菌优势菌株在病健柑橘植株中的分离频率

Fig. 1 IF of dominant entophytic bacteria in healthy and *Ca* Las infected citrus tree

注: A: 假单胞菌属; B: 短小杆菌属; C: 微杆菌属; D: 芽孢杆菌属; E: 动性球菌属; F: 其他; DS: 感病植株; HS: 健康植株.

Note: A: *Pseudomonas* sp.; B: *Curtobacterium* sp.; C: *Microbacterium* sp.; D: *Bacillus* sp.; E: *Planococcus* sp.; F: Others; DS: Diseased samples; HS: Healthy samples.

2.1.4 不同地区样品柑橘植株内生细菌数量的差异: 本研究分离了来自于广东、贵州、福建、云南、浙江、广西等柑橘黄龙病区的56份柑橘样品, 经共计250次分离, 对各地区分离到的内生细菌菌群计数, 发现不同地方来源的样品其内生细菌多样性存在差异, 并且同一地区同一品种不同部位所分离的细菌数量也有差别。表2反映了不同地区样品不同组织间内生细菌数量的差异, 其中广东和广西的样品细菌种群数量比较大; 不同组织中内生细菌比较发现, 病根的内生细菌数量远大于其他部位。这可能是由于土壤是微生物的栖息场所, 植物根系生长在土壤中, 柑橘植株根围的微生态环境更适合微生物的生长。

2.2 柑橘内生细菌的变性梯度凝胶电泳(DGGE)图谱分析

对柑橘内生细菌进行DGGE图谱分析(图2), 结果表明, 感病和健康柑橘植株不同组织包含的不可培养细菌类群存在较大差异。DGGE 分析的不同样品的条带数较少, 这可能是用 EB 染色灵敏度较低所致。将各组织样品中50条明显的条带分别割胶回收测序, 经比对发现, 50个序列中包含9个属15种不同的细菌类群, 包括沙雷氏菌属 *Serratia* sp. (28%)、泛菌属 *Pantoea* sp. (14%)、不动杆菌属 *Acinetobacter* sp. (10%)、诺卡氏菌属 *Nocardia* sp. (10%)、黄单胞菌属 *Xanthomonas* sp. (10%)、节杆菌属 *Arthrobacter* sp. (8%)、假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. (8%)、*Pectobacterium betavasculorum* (6%)、*Candidatus* Liberibacter asiaticus (2%)和 Uncultured Bacterium clone (4%)。目标条带4和条带8在感病和健康柑橘图谱中均稳定存在, 种类鉴定结果表明二者分别是 *Nocardia* sp.和 *Arthrobacter* sp.。条带11和12分别代表 *Xanthomonas* sp.和 *Pseudomonas* sp., 只在病株的图谱中存在。条带13在病果中出现, 序

表 2　不同地区柑橘样品的内生细菌数量差异

Table 2　Total count of citrus entophytic bacteria isolation from different citrus-growing areas

样品来源 Sample sources	样本数 No. of sample	采样时间 Sampling time	生长年限 Growing years	病叶中脉 Infected midrib	病树侧根 Infected root	病树树枝 Infected stem	病树树皮 Infected bark	病树果实 Infected fruit
GD01−02	2	2009.05.08	10	310	1 325	−	−	−
GD 03−06	4	2009.12.27	10	349	1 485	736	780	868
GZ 01−03	3	2009.11.15	5	229	1 278	573	715	−
ZJ 01−03	3	2009.12.03	3	187	−	421	−	425
FJ 01−03	3	2009.11.25	10−40	344	−	622	856	−
YN 01−03	3	2009.12.20	5	189	−	635	734	−
GX 01−03	3	2009.05.11	10	234	1 376	618	703	−
GX 04−05	2	2009.06.19	10	245	−	586	−	−
GX 06−07	2	2009.07.18	10	302	1 417	712	827	882
GX 07−17	10	2009.09.26	10	332	1 513	764	859	913
GX 18−30	12	2009.10.25	10	350	1 541	736	849	924
GX 31−35	5	2009.11.28	10	293	1 472	651	747	850
GX 37−39	2	2009.12.30	10	332	1 378	589	767	825
GX 40−41	2	2010.03.08	10	189	1 224	498	723	795

注: GD: 广东阳春; GZ: 贵州从江; ZJ: 浙江台州; FJ: 福建永春; YN: 云南瑞丽; GX: 广西合浦; −: 该地区无此样品.

Note: GD: Yangchun, Guangdong province; GZ: Congjiang, Guizhou province; ZJ: Taizhou, Zhejiang province; FJ: Yongchun, Fujian province; YN: Ruili, Yunnan province; GX: Hepu, Guangxi municipality; −: No samples.

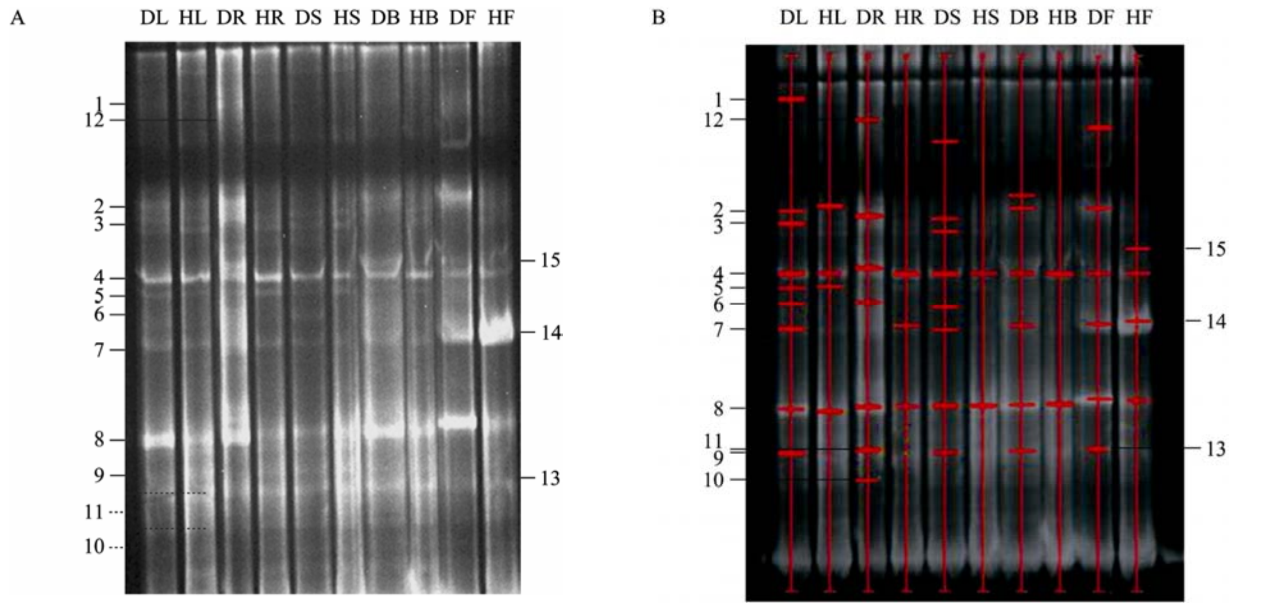

图 2　柑橘不同部位内生细菌 PCR-DGGE 分离图谱

Fig. 2　PCR-DGGE analysis of 16S rDNA fragments of different citrus plant samples

注: A: 柑橘内生细菌 DGGE 图谱; B: 利用 Quantity One-1-D 软件处理的 DGGE 图谱, 图中红线代表割胶测序的条带; DL: 病株叶脉; HL: 健株叶脉; DR: 病树树根; HR: 健树树根; DS: 病树枝条; HS: 健树枝条; DB: 病树树皮; HB: 健树树皮; DF: 病果橘络; HF: 健果橘络.

Note: A: Original DGGE profile of citrus plant entophytic bacteria; B: Original profile labeled by Quantity One-1-D software and red bands were excised from the gels for sequenced; DL: Leaf vein of diseased samples; HL: Leaf vein of healthy samples; DR: Root of diseased samples; HR: Root of healthy samples; DS: Stem of diseased samples; HS: Stem of healthy samples; DB: Bark of diseased samples; HB: Bark of healthy samples; DF: Fruit of diseased samples; HF: Fruit of healthy samples.

列测定显示为柑橘黄龙病菌亚洲韧皮杆菌 *Candidatus* Liberibacter asiaticus。鉴于 PCR-DGGE 图谱中只有占样品菌群总量 1%以上的细菌才能出现条带[14]，可以推断罹病植株的病果中亚洲韧皮杆菌含量最高，较病株根部、叶片中脉和树皮韧皮部等组织中的带菌量大。

PCR-DGGE 图谱中条带的数目能够比较直观的反映出柑橘组织内生细菌群落的多样性差异，但多样性指数作为研究群落物种数和个体数及其分布均匀度的指标更具客观性和权威性。Shannon-Weaver 多样性指数分析各组织中细菌多样性可知，病根中细菌的多样性最高达到2.498，健果的细菌多样性最低为 1.904，表明病根的内生细菌菌群比较丰富($P<0.05$)(图 3)。PCR-DGGE 图谱分析的内生细菌菌群的多样性与定向分离得到的不同组织内生细菌丰富度结果一致。

3 讨论

柑橘黄龙病菌是一种限于韧皮部内寄生的革兰氏阴性细菌[15]，属于兼性厌氧细菌，本实验采用三菱瓦斯化学株式会社的微需氧产气包(容器中氧气浓度为 8%−9%，二氧化碳浓度为 7%−8%)营造适合韧皮部内生细菌生长的兼性厌氧环境，期望获得更多与黄龙病伴生的细菌。对分离得到的细菌进行需氧性测定，利用半固体培养基进行穿刺培养，如果菌株在试管内培养基表面和穿刺线内部都能够生长良好，表明细菌为兼性厌氧菌。

通过分离广东、广西、福建、浙江、云南和贵州六省市的柑橘样品发现，广东、广西的样品中内生细菌类型最丰富，种群密度也比较大。可能由于广东、广西的样品多来自十年生老柑橘树，而老柑橘树中内生细菌的丰度相对更高，并且广东、广西是我国柑橘黄龙病的高发区，气候温暖，生物多样性更为丰富。对广西的柑橘黄龙病区定点连续取样，分离感病柑橘组织的内生细菌，结果表明病株组织中的内生细菌种群密度随季节变化比较明显，秋季的内生菌种群最丰富，种群密度更大，可能由于秋季温度、光照等环境条件适宜，柑橘韧皮部组织内营养比较丰富，Wang ZK[1]的研究结果也证实了这一点。

柑橘植株中存在丰富的内生细菌，感病及健康柑橘内生细菌和同种样品的不同组织中内生细菌的数量、种类及优势属都存在差异。菌群丰富度的不同体现在：病根>病树皮>病果>病枝条>健根>健树

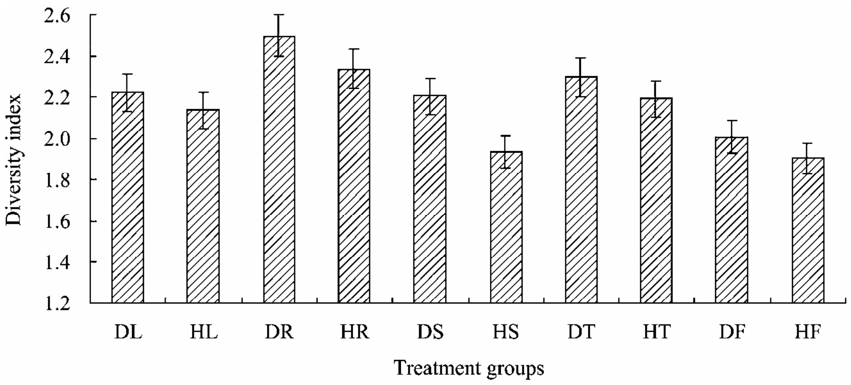

图 3 不同样品的多样性指数

Fig. 3 Shannon-Weaver of different samples

注: DL: 病株叶脉; HL: 健株叶脉; DR: 病树树根; HR: 健树树根; DS: 病树枝条; HS: 健树枝条; DB: 病树树皮; HB: 健树树皮; DF: 病果橘络; HF: 健果橘络. ($P<0.05$).

Note: DL: Leaf vein of diseased samples; HL: Leaf vein of healthy samples; DR: Root of diseased samples; HR: Root of healthy samples; DS: Stem of diseased samples; HS: Stem of healthy samples; DB: Bark of diseased samples; HB: Bark of healthy samples; DF: Fruit of diseased samples; HF: Fruit of healthy samples. ($P<0.05$).

皮>病叶>健枝条>健叶>健果。病根的内生细菌菌落丰富度远大于其他组织部位。这可能是由于土壤是微生物聚集地，植物根系生长在土壤中，根围有更适合微生物生长的环境。总体来说，感病柑橘植株内生细菌菌落丰富度大于健康植株，可能是由于黄龙病菌的侵染，引发了与之有互作关系的菌量增加。类似互作现象在柑橘木质部细菌病害——柑橘杂色褪绿病(Citrus Variegated Chlorosis, CVC)相关研究中也有报道。Lacava 等[16]利用实时荧光定量 PCR 检测技术研究柑橘内生细菌，发现嗜中温甲基杆菌 *Methylobacterium mesophilicum* 与柑橘木质部难养菌 *Xylella fastidiosa* 存在相互作用关系，将内生细菌人工针刺接种马达加斯加长春花后可以促进病菌生长和病害发生。

内生细菌既可以产生促生物质直接促进植物生长也可以通过与病原菌竞争空间或产生拮抗物质从而间接起促生作用[7]。Araújo[12]等在研究柑橘杂色褪绿病与内生细菌相互作用时发现，萎焉短小杆菌 *Curtobacterium flaccumfaciens* 能抑制木质部难养菌 *Xylella fastidiosa* 的生长，从而减轻由 *X. fastidiosa* 引发的 CVC 症状。崔林等[17]从马铃薯中分离到短小杆菌 *Curtobacterium* sp. 用于拮抗马铃薯环腐病，起到很好的拮抗效果。*Bacillus* sp.的一些细菌能够产生多种抗生素间接影响植物的生长。关雄[18]从辣椒中分离得到的 1 株内生枯草芽孢杆菌可以通过分泌抗菌肽对植物炭疽病菌和青枯病菌起到抑制作用。

本研究中发现黄龙病病株中短小杆菌 *Curtobacterium* sp.和微杆菌 *Microbacterium* sp.等内生性细菌种群数量明显增加，其中尤以短小杆菌增加最大。*Bacillus* sp.在柑橘病、健植株中为优势菌属。基于前人关于 *Curtobacterium* sp.、*Bacillus* sp. 对植物病害有拮抗作用的报道，可以作为伴生细菌用于建立与亚洲韧皮杆菌的模拟原生态共培养体系，为获得稳定的韧皮杆菌培养物、最终解决柑橘黄龙病韧皮杆菌难培养的共性关键技术难题奠定基础，研究结果将有助于深入研究亚洲韧皮杆菌与伴生性内生细菌之间协同进化、相互作用的机理。

参 考 文 献

[1] Wang ZK, Yin YP, Hu H, et al. Development and application of molecular-based diagnosis for “*Candidatus* Liberibacter asiaticus”, the causal pathogen of citrus Huanglongbing[J]. Plant Pathology, 2006, 55(5): 630−638.

[2] Hansen AK, Trumble JT, Stouthamer R, et al. A new Huanglongbing species, “*Candidatus* Liberibacter psyllaurous,” found to infect tomato and potato, is vectored by the psyllid *Bactericera cockerelli* (Sulc)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(18): 5862−5865.

[3] 王中康，周彬彬，田圣超，等. 中国不同地区亚洲韧皮杆菌遗传多样性分析[J]. 植物病理学报，2009, 39(6): 593−599.

[4] Sechler A, Schuenzel EL, Schaad NW. et al. Cultivation of ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’, ‘*Ca*. L. africanus’, and ‘*Ca*. L. americanus’ associated with Huanglongbing[J]. Phytopathology, 2009, 99(5): 480−486.

[5] Bové JM, Garnier M. Phloem-and xylem-restricted plant pathogenic bacteria[J]. Plant Science, 2002, 163: 1083−1098.

[6] Davis MJ, Mondal SN, Chen HQ, et al. Co-cultivation of ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ with Actinobacteria from citrus with Huanglongbing[J]. Plant Disease, 2008, 92(11): 1547–1550.

[7] 何红，邱思鑫，胡方平，等. 植物内生细菌生物学作用研究进展[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(3): 40−45.

[8] 袁红旭，陈勇明，何财能，等. 拮抗炭疽病的柑橘内生细菌的分离与筛选[J]. 果树学报, 2005, 2(5): 510−513.

[9] Reeson AF, Jankovic T, Kasper ML, et al. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica*[J]. Insect Molecular Biology, 2003, 12(1): 85−91.

[10] John GH, Nobel RK, Peter HA, et al. Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology[M]. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Press, 1994: 39−138.

[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: 49−289.

[12] Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(10): 4906−4914.

[13] 穆冬冬，王中康，殷幼平. 饲喂肉杆菌 Hg4-03 对贡嘎蝠蛾幼虫肠菌生物多样性的影响[J]. 微生物学报，2010, 50(2): 251−255.

[14] 马俊孝, 季明杰, 孔健. PCR-DGGE 技术在微生物物种多样性研究中的局限性及其解决措施[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 493−497.

[15] 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]. Can J Microbiol, 2001, 47(3): 229−236.

[16] Lacava PT, Li WB, Araújo WL, et al. Rapid, specific and quantitative assays for the detection of the endophytic bacterium *Methylobacterium mesophilicum* in plants[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65(3): 535−541.

[17] 崔林, 孙振, 孙福在, 等. 马铃薯内生细菌的分离及环腐病拮抗菌的筛选鉴定[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 353−358.

[18] 何红, 蔡学清, 关雄, 等. 内生菌 BS-2 菌株的抗菌蛋白及其防病作用[J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 373−376.

[19] Tatineni S, Sagaram US, Gowda S. In planta distribution of ‘*Candidatus* Liberibacter asiaticus’ as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and real-time PCR[J]. Phytopathology, 2008, 98(5): 592−599.

征订启事

欢迎订阅 2011 年《植物保护》杂志

《植物保护》创刊于 1963 年, 由中国植物保护学会和中国农业科学院植物保护研究所主办, 为全国中文核心期刊、中国科技核心期刊、“中国期刊方阵”双百期刊, 曾荣获中国科协优秀科技期刊奖、全国优秀科技期刊奖, 北京市全优期刊奖、国家期刊奖提名奖等多个奖项。收录的数据库有英国《CABI 文献数据库》、《Agrindex (FAO)》、美国《化学文摘》(CA)、《中国科学引文数据库》、《中文科技期刊数据库》、《生物学文摘》、《万方数据—数字化期刊群》、《中国农业文摘数据库》、《中国科技论文与引文数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》。本刊主要刊登有关植物病理、农林业昆虫、杂草及鼠害等农作物有害生物、植物检疫、农药等植物保护学科各领域原始研究性论文和具有创新性、实用性技术成果文章。设有专论与综述、研究报告、调查研究、基础知识、实验技术、国外植保、争鸣、应用与交流、病虫新动态、学会动态与信息、新书新产品介绍等栏目。

竭诚欢迎全国各地科研院所研究人员、大专院校教师及研究生、各级植保科技工作者等踊跃订阅。欢迎广大作者踊跃投稿! 并欢迎咨询洽谈广告业务!

本刊为双月刊, 大 16 开, 160 页, 铜版纸印刷。每期定价 25.00 元, 全年 150.00 元。邮发代号: 2-483, 全国各地邮局均可订阅。直接在本刊编辑部订阅, 可享受 9 折优惠价, 全年 135 元, 若需挂号, 每期另加 3 元。

联系地址: 北京圆明园西路 2 号中国农科院植保所《植物保护》编辑部　　邮编: 100193

电话: 010-62819059, 62815914　　传真: 010-62815914

E-mail: zwbh1963@263.net　　网址: www.plantprotection.ac.cn

联系人: 王音　高洪荣