

难培养菌的多条带 PCR 产物产生原因分析

许美容 贾奥林 陶阳 邓晓玲*

(华南农业大学资源环境学院 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室 广东 广州 510642)

摘要:【目的】分析严重威胁柑橘产业发展的毁灭性病害——柑橘黄龙病的强致病性病原亚洲种“*Candidatus Liberibacter asiaticus*”的种群多样性研究中出现多条带 PCR 产物的原因,为难培养菌的分子生物学研究提供参考。【方法】通过使用 PCR、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和测序相结合分析“*Ca. L. asiaticus*”基因组上 2 个短串联重复(Short tandem repeats, STR)基因的 PCR 产物。【结果】单个菌株可扩增获得多个 PCR 条带且其扩增产物多态性受寄主品种影响;这 2 个 STR 基因的 PCR 产物在菌株间呈明显的多态性;扩增所获得的序列可来自“*Ca. L. asiaticus*”本身,也可来自其寄主或内生菌。【结论】难培养菌的 STR 基因 PCR 产物多态性产生的主要原因是该基因内部的串联重复序列数目存在差异,但目的菌及外源物种(寄主或内生菌等)基因组的非特异性扩增也是影响其多态性的因素。

关键词: 柑橘黄龙病, 短串联重复, 多态条带, 共生菌, 难培养菌

Analysis on causes of polymorphic PCR bands in nonculturable endophytes amplification

XU Mei-Rong JIA Ao-Lin TAO Yang DENG Xiao-Ling*

(Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: [Objective] This study was to investigate the genetic nature of multiple amplicons from PCR experiments on ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ infected citrus samples and to provide reference for molecular biological studies of fastidious prokaryotes. [Methods] Two short tandem repeats (STR) loci in the ‘*Ca. L. asiaticus*’ genome were amplified by conventional PCR. PCR products were separated by PAGE. Polymorphic bands were collected, cloned, and sequenced. [Results] The primers from the two STR loci generated multiple amplicons from a single ‘*Ca. L. asiaticus*’ infected citrus sample. Sequence analyses showed that these amplicons could be from ‘*Ca. L. asiaticus*’, other bacteria and citrus host. [Conclusion] The main source of amplicon variations was due to changes of STR numbers in the targeted loci. However, amplification of host and endophytic bacterial DNA could also contribute to the multi-band phenomenon.

Keywords: Huanglongbing, Short tandem repeats, Multi-band, Endophytes, Nonculturable

基金项目: 农业部公益性行业(农业)专项项目(No. 201003067); 广东省自然科学基金项目(No. S2012040007627)

*通讯作者: Tel: 86-20-38297495; 信箱: xldeng@scau.edu.cn

收稿日期: 2014-07-25; 接受日期: 2014-11-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-20

柑橘黄龙病是由限制于韧皮部的革兰氏阴性杆菌(“*Candidatus Liberibacter spp.*”, “*Ca. L. spp.*”)引起的^[1]。黄龙病病原菌培养的研究鲜有报道^[2-5]且无法被后人重复。由于病原难以人工培养,无法利用纯的病原核酸进行分子水平的研究。因此,目前对该菌的分子生物学研究应提取含有“*Ca. L. spp.*”的寄主核酸或蛋白为模板,其成分较为复杂。

早期“*Ca. L. spp.*”流行病学研究主要分析 16S rRNA 基因、16S/23S 间隔区、外膜蛋白(Outer membrane protein, *omp*)、 β -操纵子和 *trmU-tufB-secE-nusG-rplKAL-rpoB* 等相对较保守的基因或基因簇的相似率。“*Ca. L. asiaticus*”的 Psy62 株系全基因组序列(CP001677)公布后,其中的短串联重复序列(Short tandem repeats, STR)很快被用于不同来源的菌株多态性分析^[6-10]。2013年,Matos等^[10]对之前报道过的4个STR进行研究后指出,黄龙病存在时间越长的地区,其病原的变异性越大。与“*Ca. L. asiaticus*”相关的原噬菌体 SC1 (HQ377372)、SC2 (HQ377373)、FP2 (JF773396)中的高变异基因也被广泛地用来分析不同国家或地区来源“*Ca. L. asiaticus*”菌株的多样性^[11-15]。以上研究均能获得序列上差异的单条带产物或大小不同的多条带产物。

随着基因组序列的完善和生物信息学的发展,

一些基于PCR的多态性好、高效、可靠、易于操作的分型方法被广泛地应用于微生物遗传多样性分析:如随机扩增多态性DNA(RAPD),扩增片段长度多态性(AFLP),具体的和随机扩增(SARA),简单串联重复(SSR),序列标记位点(STS)等。以上方法多用于分析单一物种来源的核酸样品。从难培养菌提取的核酸通常混在其寄主组织或细胞的核酸中。本研究通过分析难培养菌“*Ca. L. asiaticus*”的2个STR基因序列,探讨复杂背景生物DNA为模板的PCR多态性条带产生的原因,为该类生物材料分子生物学实验设计提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品的采集及DNA提取

从云南和广东省感染黄龙病的果园中分别采集144个和176个柑橘叶片样品。分别剪取0.1g叶中脉,用试剂盒(OMEGA, D2485-02)提取基因组总DNA。用10g/L的琼脂糖凝胶检测DNA的质量。经柑橘黄龙病病原细菌“*Ca. L. asiaticus*”的特异性引物UP2/DP2^[16]鉴定,筛选出64个具有较高“*Ca. L. asiaticus*”浓度的柠檬、香橼或砂糖橘DNA样品为模板(表1),扩增2个“*Ca. L. asiaticus*”基因(CLIBASIA_01645和CLIBASIA_04555)。同样,根据实验结果,再次筛选“*Ca. L. asiaticus*”阳性和阴性

表1 “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”材料来源
Table 1 Sources of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates

项目 Item	用于扩增 CLIBASIA_01645 和 CLIBASIA_04555 基因的样品 Samples used to amplify CLIBASIA_01645 and CLIBASIA_04555 genes				用于扩增“未知基因”的样品 Samples used to amplify ‘unknown genes’		
省份 Province	云南		广东		广东		
采集地点 Location	瑞丽	建水	德庆	清远	德庆	德庆	广州
寄主 Host	柠檬	香橼	砂糖橘	砂糖橘	砂糖橘	马水橘	长春花
阳性样品数量 Number of positive samples	14	18	22	10	8	8	5
阴性样品数量 Number of negative samples	0	0	0	0	8	8	5

注:其中“未知基因”为 CLIBASIA_01645 和 CLIBASIA_04555 基因扩增产物中与 GenBank 数据库中无同源性的序列。

Note: ‘Unknown genes’ are the amplicons of CLIBASIA_01645 and CLIBASIA_04555 genes with no hits in GenBank.

的砂糖橘、马水橘和长春花样品(表 1), 用于这 2 个基因多态性条带的来源分析。以上 PCR 均以实验室保存的含“*Ca. L. asiaticus*”基因组的黄龙病柑橘 DNA 样品为阳性对照, 以不含“*Ca. L. asiaticus*”基因组的健康柑橘 DNA 样品为阴性对照。

1.2 引物设计

首先从 33 对“*Ca. L. asiaticus*”的不同候选 STR 位点的引物^[16]中选择扩增产物条带清晰且多态性良好的引物 STR13F/R 和 STR32F/R^[16], 用于扩增 2 个“*Ca. L. asiaticus*”基因 (CLIBASIA_01645 和 CLIBASIA_04555); 然后根据引物 STR13F/R、STR32F/R 的扩增产物中未能在 GenBank 中找到同源序列(命名为“未知序列”), 用 Primer Premier 5 软件设计引物(表 2), 以分析这些未知序列的来源。引物在上海英潍捷基贸易有限公司 (Invitrogen Biotechnology Co., Ltd)合成, 并根据说明书稀释至 10 $\mu\text{mol/L}$ 后保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用, 引物储存液稀释 10 倍后用于 PCR。

1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及其 DNA 片段的回收、再扩增

以已筛选到的阳性 DNA 作为模板, 用引物 STR13F/R 和 STR32F/R 进行常规 PCR 扩增。25 μL 的 PCR 体系为: 自制灭菌 ddH₂O 17.6 μL , 10 \times Taq buffer (含 Mg²⁺, TianGen)、dNTPs (2.5 mmol/L, TianGen)分别 2.5 μL , 正反引物混合液(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Taq DNA 聚合酶(2.5 mol/ μL) 0.4 μL , 含

10–20 ng 的 DNA 模板 1 μL ; 用 Bio-Rad 热循环仪 (C1000TM Thermal Cycler)进行 PCR 扩增, 程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。用 1%的琼脂糖凝胶检测 PCR 结果。

用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 STR13F/R 和 STR32F/R 的 PCR 产物, 银染法染色后, 清水洗涤、拍照。切取图 1 所示的聚丙烯酰胺凝胶中的差异性条带并用改良法回收^[17]。以回收的微量 DNA 为模板, 用对应的原引物配制 25 μL PCR 体系(参照上述体系)进行重复扩增以扩大产物浓度, 用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物。

1.4 PCR 产物回收、克隆、测序及序列分析与验证

对于 STR13F/R 和 STR32F/R 的二次扩增产物, 用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (AxyGen biosciences, Lot #05313KB1)回收琼脂糖凝胶中目的 DNA 的条带; 用 pEASY-T1 Cloning Kit 试剂盒 (Transgen, Lot #H10104)将回收产物直接与 T-载体连接并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。每个 PCR 产物配制 1 管连接体系, 转化后涂布 1 个含氨苄霉素的 LB 平板。从每个过夜培养的转化子平板上挑选 5 个单菌落到液体 LB 培养基中过夜培养; 用目的基因引物和 T 载体通用引物分别以 1 μL 菌液为模板, PCR 检测连接效果; 选取 2 个经 PCR 检测为阳性的样品送上海生工生物工程有限公司测序。

表 2 引物的信息
Table 2 Information of primers

引物编号 Primer code	基因编号 Gene code	正向引物 Forward primer (5'→3')	反向引物 Reverse primer (5'→3')
STR13F/R	CLIBASIA_01645	GTAGGAGTCCCCGAAAT	GCCTGTACGAGGTTTGA
STR32F/R	CLIBASIA_04555	TGATAACAAGCACCTCT	CTAATCTGAACCCAAAC
STR13-22F/R	UN1	ACCGTTTGTCTGAG	ACTTTTGCTTTTCT
STR13-31F/R	UN2	TTTGACTTGGGGTAA	TTCTATTGGTTGCTT
STR32-12F/R	UN3	AAGTACCCAGCAACC	TCATCCCCCTATCAT
UP2/DP2	16S rRNA	ATGTTGTGGTAGATCAGGTGACGGT	GCAAAAGGCATAATCATTAAACCAA

注: 其中“UN”代表该目的基因序列与 GenBank 数据库中无同源性。

Note: 'UN' means the gene sequence has no hit in GenBank.

测序所得序列经去除载体污染后用BLASTn和BLASTp 软件分析 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。根据比对结果,对在 GenBank 中未找到匹配的序列(未知序列)作进一步分析:以引物 UP2/DP2 筛选出的分别 8 个阴性和阳性的砂糖橘、马水橘及分别 5 个阴性和阳性长春花 DNA 为模板;以 STR13-22F/R、STR13-31F/R、STR32-30F/R 为引物做 PCR;PCR 的体系和程序参照引物特性设定;用 1%的琼脂糖凝胶检测 PCR 结果。

2 结果与分析

2.1 两对 STR 引物扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳多态性条带

引物 STR13F/R 和 STR32F/R 分别扩增 64 个含“*Ca. L. asiaticus*”菌株的云南和广东样品,均能获得多态性谱带(图 1)。引物 STR13F/R 扩增产物的多态性较 STR32F/R 扩增产物丰富:扩增 32 个云南或广东省“*Ca. L. asiaticus*”菌株均获得多于 20 种类型(按条带数目和片段大小划分)的谱带(图 1A、C),

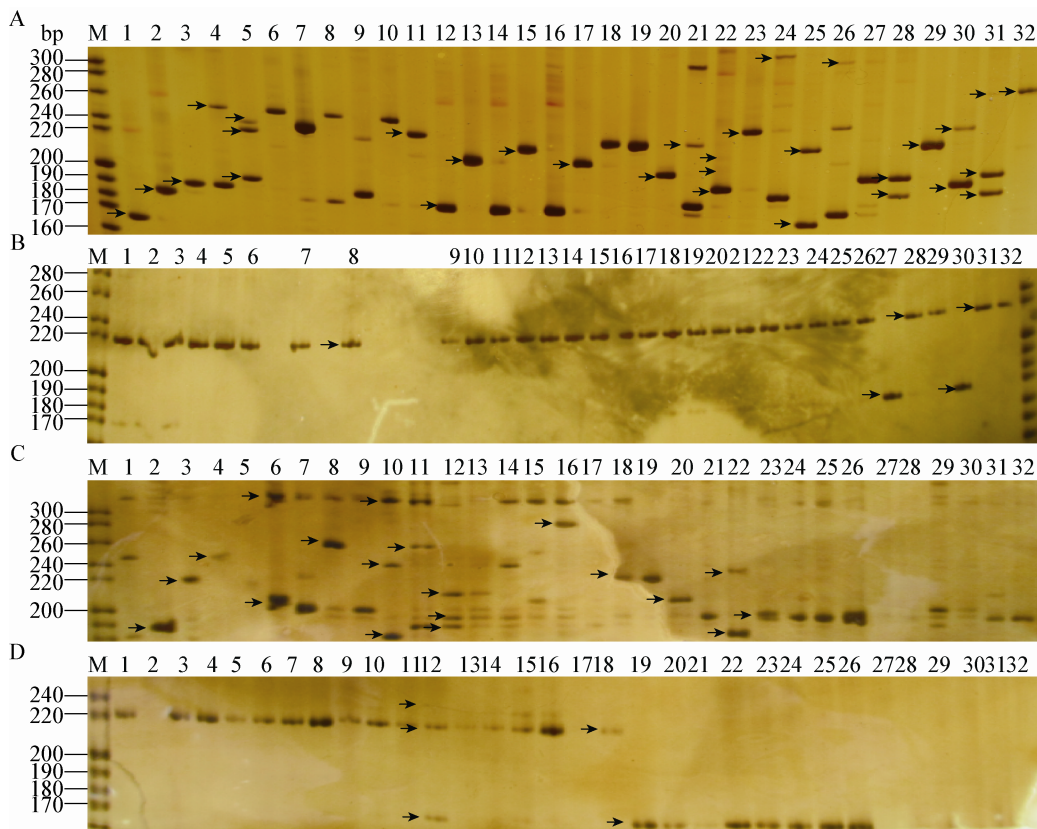


图 1 引物 STR13F/R 和 STR32F/R 的 PCR 产物聚丙烯酰胺凝胶电泳谱带

Figure 1 PAGE profile amplified by STR13F/R and STR32F/R

注: A: 引物 STR13F/R 对 32 个来自广东样品的扩增结果; B: 引物 STR32F/R 对 32 个来自广东样品的扩增结果; C: 引物 STR13F/R 对 32 个来自云南样品的扩增结果; D: 引物 STR32F/R 对 32 个来自云南样品的扩增结果。M 为分子量标准(DSBIO, M1011); 1-32: 黄龙病材料的编号; 箭头所示为回收并测序的条带。

Note: A: PCR result of 32 samples from Guangdong using STR13F/R as primers; B: PCR result of 32 samples from Guangdong using STR32F/R as primers; C: PCR result of 32 samples from Yunnan using STR13F/R as primers; D: PCR result of 32 samples from Yunnan using STR32F/R as primers. M: DNA ladder (DSBIO, M1011); 1-32: Sample codes; Arrows were pointed to the bands further cloned and sequenced.

而 STR32F/R 对 64 个样品的扩增仅获得 4 种类型的谱带(图 1B、D); 引物 STR13F/R 扩增产物的条带数目为 1-7 个, 而引物 STR32F/R 的扩增产物条带数目为 1-4 个(表 3)。

2.2 两对 STR 引物扩增产物的主要来源

随机选取 STR13F/R 引物的 50 个扩增条带和 STR32F/R 的 10 个扩增条带进行回收、再扩增、克隆和测序。分别有 42 个(84%)和 9 个(90%)序列为目的基因 CLIBASIA_01645 和 CLIBASIA_04555 的序列。这些目的产物的序列差异性主要是由其短串联重复数目的不同造成的: 42 个 CLIBASIA_01645 基因的扩增产物中含 1-5 个、5-10 个和 10-20 个短串联重复(TGTGTCT)的序列分别有 6 个、25 个和 11 个; 9 个 CLIBASIA_04555 基因目的片段的序列中, 分别有 4 个序列含有 2

个拷贝非串联重复序列(GTGAGATCGATATTGCA ATAGAAAACCTGCCTGAT), 另 5 个扩增产物片段则含有 3 个该重复序列。且 STR32F/R 引物对采自云南香橼样品扩增的条带多含 3 个拷贝重复序列, 而采自云南柠檬的样品多扩增出 2 个拷贝的该重复。STR13F/R 引物对来自 2 省的 4 个品种扩增结果无明显的品种特异性。

2.3 非目的基因扩增产物的来源

BLAST 分析表明 STR13F/R 引物扩增的 50 条序列中, 有 6 条来源于柑橘基因组。其中 GD-31 样品的大小为 313 bp 的扩增条带与脐橙叶绿体基因 (*Citrus sinensis* chloroplast) 序列相似率为 94%; 该条带的第 9 至 303 位碱基序列与脐橙叶绿体基因序列相似率为 99% (图 1 和表 4), 与其余多个植物物种的核糖体蛋白 L2 (Ribosomal protein L2, rpl2) 基因

表 3 引物 STR13F/R 和 STR32F/R 对 64 个样品的不同扩增条带数产物所占比率
Table 3 Rate of amplicons with different bands amplified by STR13F/R and STR32F/R on 64 samples

引物名称 Primer	样品采集地 Origin	扩增产物的条带数目所占比率 Rate of different PCR band numbers (%)						
		1	2	3	4	5	6	7
STR13F/R	Guangdong	25.00	40.60	15.60	9.38	6.25	3.13	0
	Yunnan	6.25	9.38	31.30	9.38	18.80	15.70	9.38
STR32F/R	Guangdong	90.60	9.38	0	0	0	0	0
	Yunnan	75.00	0	21.90	3.13	0	0	0

表 4 引物 STR13F/R 和 STR32F/R 的部分多条带扩增产物的序列特征
Table 4 Characteristic of some STR13F/R and STR32F/R amplicons with multiple bands

样品编号 Sample code	症状 Symptom	引物 Primer	条带号 Band code	片段大小 Size (bp)	短串联重复数目 TRNs	是否是“ <i>Ca. L. asiaticus</i> ”序列 Hit in ' <i>Ca. L. asiaticus</i> ' genome
GD-22	均匀黄化	STR13F/R	1	188	6	是
			2	181	5	是
			3	147	-	否
YN-12	典型斑驳	STR32F/R	1	492	-	否
			2	229	3	是
GD-31	均匀黄化	STR13F/R	1	313	-	否
			2	211	9	是
			3-1	169	3	是
			3-2	166	-	否

注: TRNs: 串联重复序列数目; -: 无串联重复序列。

Note: TRNs: Tandem repeat numbers; -: No TRNs.

的相似率也在 95%以上, 推测为柑橘基因组上的扩增。STR13F/R 引物扩增的广东省 22 号和 31 号样品均获得多个 PAGE 条带, 对其中最小条带的克隆和测序均获得 1 个在 GenBank 中搜索到匹配序列的未知序列(图 1A, 表 4)。STR32F/R 引物的 10 个扩增产物中有 1 个(图 1D 中 12 的最大片段)为在 GenBank 中无匹配的未知序列(图 1 和表 4)。

2.4 未知序列的来源

根据以上实验结果, 用以“未知序列”为模板设计的引物 STR13-22F/R、STR13-31F/R、STR32-12F/R 分别选取阳性和阴性的砂糖橘、马水

橘及长春花 DNA 为模板进一步扩增; 琼脂糖凝胶电泳结果(图 2)可见, 对于 STR13-22F/R 引物, 所有来自 3 种植物材料的“*Ca. L. asiaticus*”阳性或阴性的样品中均未能扩增到 147 bp 的目的条带, 证明该序列来自样品 GD-22 的内生菌; 同理, STR13-31F/R 的扩增结果可见该目的序列来自 GD-31 样品的内生菌; STR32-12F/R 则能从柑橘(砂糖橘和马水橘)来源样品扩增到 458 bp 的条带, 而长春花中为阴性, 可见该片段是柑橘基因组上的序列。综上表明, 内生菌是造成 PCR 条带多样性的原因之一, “*Ca. L. asiaticus*”的不同寄主可引起 PCR 条带多样性。

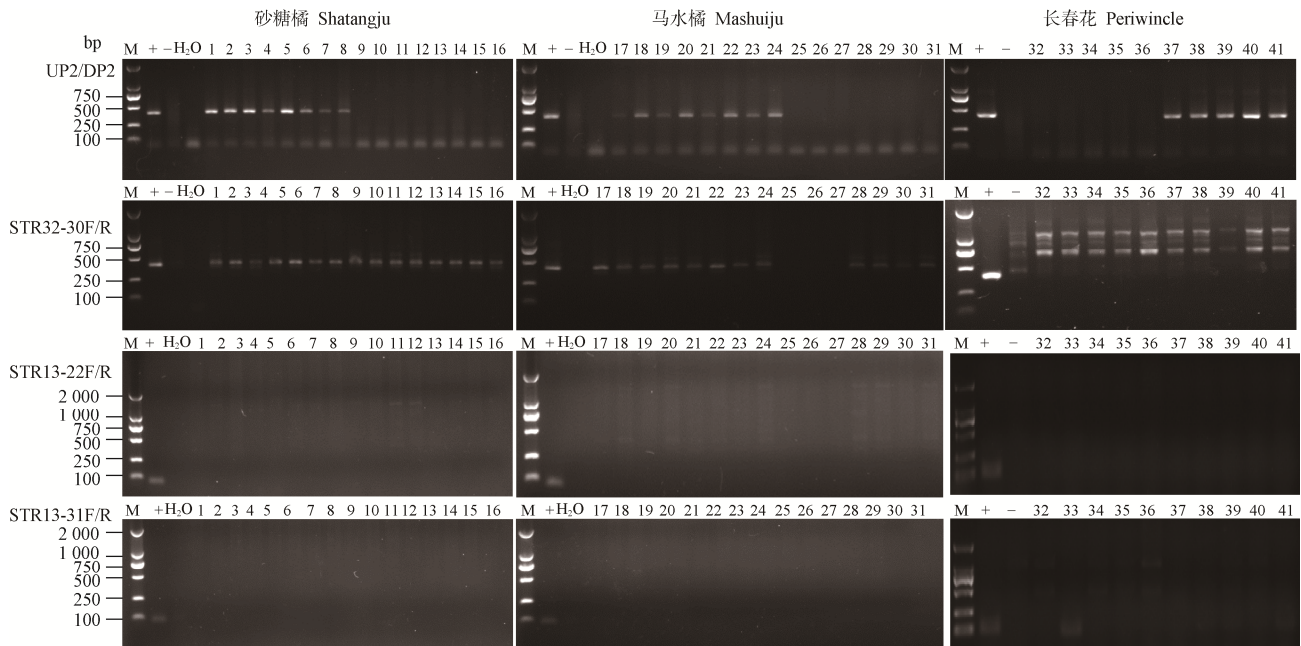


图 2 来源于不同寄主的黄龙病菌 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Figure 2 Conventional PCR detection of '*Ca. L. asiaticus*' DNA samples collected from different host

注: M: Marker 2000 (DSBIO, Lot 082); +: 阳性对照; -: 阴性对照; H₂O: 空白对照; 1-8: “*Ca. L. asiaticus*”阳性的砂糖橘样品; 9-16: “*Ca. L. asiaticus*”阴性的砂糖橘样品; 17-24: “*Ca. L. asiaticus*”阳性的马水橘样品; 25-31: “*Ca. L. asiaticus*”阴性的马水橘样品; 32-36: “*Ca. L. asiaticus*”阳性的长春花样品; 37-41: “*Ca. L. asiaticus*”阳性的长春花样品。

Note: M: Marker 2000 (DSBIO, Lot 082); +: Positive control; -: Negative control; H₂O: Blank; 1-8: '*Ca. L. asiaticus*' positive Shatangju DNA samples; 9-16: '*Ca. L. asiaticus*' negtive Shatangju DNA samples; 17-24: '*Ca. L. asiaticus*' positive Chuntianju DNA samples; 25-31: '*Ca. L. asiaticus*' negtive Shatangju DNA samples; 32-36: '*Ca. L. asiaticus*' positive periwinkle DNA samples; 37-41: '*Ca. L. asiaticus*' negtive periwinkle DNA samples.

3 讨论

PCR 结合变性梯度凝胶电泳 (Denatured gradient gel electrophoresis, DGGE) 的方法被普遍应用于微生物种群研究, 该方法的分辨率更高, 但易出现不同序列的 DNA 共同迁移的现象^[18]。陈章宝等^[19]分析 PCR-DGGE 在鸡肠道微生物种群研究中的多条带, 指出即使胶上肉眼可见的单一一条带都可能是几种微生物菌株的 DNA 基因片段。Ma 等^[20]用普通 PCR 分析“*Ca. L. asiaticus*”上的一个 STR 基因的扩增产物, 提出该菌的 STR 基因多样性现象。可见 PCR 产物的来源并非单一的。为消除宿主背景造成的非特异性扩增的影响, 实验中应设置合适的阴性对照。通常做不同宿主来源样品的 PCR 时, 人们习惯选择一个不含有目的基因的样品为阴性对照。本实验证明, 应采用所有背景材料的阴性 DNA 作为对照的扩增结果才更可信。

植物内生菌是植物微生态系统组成部分, 在“*Ca. L. asiaticus*”的寄主植物中普遍存在。除了柑橘属植物外, “*Ca. L. asiaticus*”还可以在九里香中存活, 也可以通过菟丝子或嫁接等方式传播到长春花上。殷幼平等^[21]用 RFLP 的方法分析九里香中的细菌种群, 发现该寄主中可培养的细菌就有 26 株。类似地, 长春花中也存在与“*Ca. L. asiaticus*”相关的内生菌群^[22-23]。郑雪芳等^[24]用磷脂脂肪酸 (PLFAs) 生物标记法证明带有黄龙病原叶片内生菌 PLFAs 含量比健康植株叶片更大。用常规分离与分子鉴定方法, 王爱华等^[25]也从奥林达夏橙中获得 10 个属细菌类群, 同样得出感染黄龙病的材料中内生菌种群更为丰富的结论。更有甚者, 内生菌的种类和数量可能影响植物病害症状的显现^[26]和病原菌的浓度^[27-28]。可见, 普遍存在的内生菌不仅是难培养菌的人工培养影响因素^[29], 还是难培养菌分子生物学研究中应考虑潜在的干扰因素。

参考文献

[1] Jagoueix S, Bové JM, Garnier M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the α subdivision of the *Proteobacteria*[J]. *International Journal of Systematic*

- Bacteriology*, 1994, 44(3): 397-386
- [2] Zhao HY, Zhou YZ, Ge ZM, et al. Culture and characteristics of bacterium-like organism (BLO) from citrus yellow shoot[J]. *Journal of Hunan University (Natural Science Edition)*, 1990, 12(1): 6-20 (in Chinese)
- 赵鸿燕, 周咏芝, 葛宗民, 等. 柑橘黄龙病原类细菌 (Bacterium-like organism, BLO) 的培养与性质[J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 1990, 12(1): 6-20
- [3] Zhang JN, Liu ZJ, Cheng WW, et al. Studies on isolation culture and pathogenicity of yellow shoot disease of citrus of bacterium-like organism[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1994, 27(2): 7-12 (in Chinese)
- 张景宁, 刘仲健, 程伟文, 等. 柑橘黄龙病原类细菌分离培养及其感病性研究[J]. *中国农业科学*, 1994, 27(2): 7-12
- [4] Davis MJ, Mondal SN, Chen H, et al. Co-cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ with actinobacteria from citrus with Huanglongbing[J]. *Plant Disease*, 2008, 92: 1547-1550
- [5] Sechler A, Schuenzel EL, Cooke P, et al. Cultivation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’, ‘*Ca. L. africanus*’, and ‘*Ca. L. americanus*’ associated with Huanglongbing[J]. *Phytopathology*, 2009, 99(5): 480-486
- [6] Chen J, Deng X, Sun X, et al. Guangdong and Florida populations of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ distinguished by a genomic locus with short tandem repeats[J]. *Phytopathology*, 2010, 100(6): 567-572
- [7] Katoh H, Subandiyah S, Tomimura K, et al. Differentiation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates by variable-number tandem-repeat analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1910-1917
- [8] Katoh H, Davis R, Smith MW, et al. Differentiation of Indian, East Timorese, Papuan and Floridian ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates on the basis of simple sequence repeat and single nucleotide polymorphism profiles at 25 loci[J]. *Annals of Applied Biology*, 2012, 160(3): 291-297
- [9] Islam MS, Glynn JM, Bai Y, et al. Multilocus microsatellite analysis of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with citrus Huanglongbing worldwide[J]. *BMC Microbiology*, 2012(12): 39
- [10] Matos LA, Hilf ME, Chen J, et al. Validation of ‘Variable Number of Tandem Repeat’-based approach for examination of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ diversity and its applications for the analysis of the pathogen populations in the areas of recent introduction[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e78994
- [11] Liu R, Zhang P, Pu X, et al. Analysis of a prophage gene frequency revealed population variation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ from two citrus-growing provinces in China[J]. *Plant Disease*, 2011(95): 431-435
- [12] Wang X, Zhou C, Deng X, et al. Molecular characterization of a mosaic locus in the genome of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’[J]. *BMC Microbiology*, 2012(12): 18
- [13] Zhou L, Powell CA, Hoffman MT, et al. Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen and insect symbiont ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(18): 6663-6673
- [14] Wang X, Tan J, Bai Z, et al. Detection and characterization of miniature inverted-repeat transposable elements in ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’[J]. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(17): 3979-3986
- [15] Tan J, Wang XF, Su HN, et al. Genetic diversity of two hypervariable genes from prophage regions of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(18): 3784-3792 (in Chinese)

- 谭锦, 王雪峰, 苏华楠, 等. 中国柑橘黄龙病病原菌两个原噬菌体超变异基因遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2013, 46(18): 3784-3792
- [16] Xu M, Zheng Z, Li X, et al. Intraspecific genetic diversity analysis of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' by short tandem repeats and PAGE[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44(6): 609-619
- [17] Xu MR, Jia AL, Zheng Z, et al. Improving method in recovering and reamplifying the polymorphic PAGE band[J]. Journal of South China Agricultural University, 2015, 36(2): 117-120 (in Chinese)
- 许美容, 贾奥琳, 郑正, 等. 聚丙烯酰胺电泳条带中微量DNA片段的回收与再扩增方法的改进[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(2): 117-120
- [18] Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food[J]. Journal of Microbiology Methods, 2004, 56(3): 297-314
- [19] Chen ZB, Xiang SN, Jiang ZX, et al. Analysis on causes of multi-bands in researching on microbe populations by PCR-DGGE[J]. Microbiology China, 2010, 37(1): 147-154 (in Chinese)
- 陈章宝, 向少能, 江震献, 等. PCR-DGGE 研究微生物种群中多条带产生原因分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 147-154
- [20] Ma W, Liang M, Guan L, et al. Population structures of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in southern China[J]. Phytopathology, 2014, 104(2): 158-162
- [21] Yin YP, Li J, Lin YY, et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from huanglongbing's hidden host plant—*Murraya paniculata*[J]. Microbiology China, 2012, 39(10): 1418-1427 (in Chinese)
- 殷幼平, 李佳, 林亚玉, 等. 柑橘黄龙病隐症寄主九里香内生细菌分离及功能鉴定[J]. 微生物学通报, 2012, 39(10): 1418-1427
- [22] Li J. Isolation and characterization of endophytic bacteria from Huanglongbing's host plant—*Murraya paniculata* and *Catharanthus roseus*[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University, 2012 (in Chinese)
- 李佳. 柑橘黄龙病寄主植物内生细菌多样性分析及相关性研究[D]. 重庆: 重庆大学硕士学位论文, 2012
- [23] Li J, Yin YP, Zheng LP, et al. Isolation, identification and basic function analysis of plant associated bacteria from huanglongbing's host plant—*Catharanthus roseus*[J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 862-870 (in Chinese)
- 李佳, 殷幼平, 郑莉萍, 等. 柑橘黄龙病寄主长春花内生细菌的分离及功能鉴定[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 862-870
- [24] Zheng XF, Liu B, Sun DG, et al. Plant endophyte PLFAs polymorphism in Huanglongbing-affected red pomelo plant[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2012, 20(7): 932-944 (in Chinese)
- 郑雪芳, 刘波, 孙大光, 等. 柑橘黄龙病植株内生菌 PLFAs 多态性研究[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(7): 932-944
- [25] Wang AH, Yin YP, Xiong HL, et al. Endophytic bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected citrus phloem tissue in Guangxi[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(23):4823-4833 (in Chinese)
- 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
- [26] Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W Jr, 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
- [27] 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
- [28] Sun DG. The polymorphism of endophytic bacteria community structure in Huanglongbing pathogen-infected citrus[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Normal University, 2012 (in Chinese)
- 孙大光. 柑橘黄龙病植株内生细菌群落结构多样性的研究[D]. 福州: 福建师范大学硕士学位论文, 2012
- [29] Shi LJ, Xu LJ, Liu RJ. Recent advances in the study of culture-difficult fungi associated with plants and their cultural characteristics[J]. Microbiology China, 2011, 38(1): 110-117 (in Chinese)
- 史立君, 徐丽娟, 刘润进. 与植物共生的难培养菌物及其培养特性研究进展[J]. 微生物学通报, 2011, 38(1): 110-117