

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (8) :868 - 875; 4 August 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.003

柑橘黄龙病罹病植株显症差异组织内生细菌群落结构分析

王芳, 殷幼平, 孙丽琴, 吴晓芳, 王中康*

重庆大学生命科学学院, 重庆市基因功能及调控重点实验室, 重庆 400030

摘要: 【目的】分离鉴定同株罹病柑橘黄龙病植株不同显症状况组织的内生细菌, 寻找与黄龙病菌 ['*Candidatus Liberibacter asiaticus*' (*Ca. Las*)] 相互作用的优势菌株。【方法】利用基于 16S rDNA 的 PCR-DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) 分析同一柑橘黄龙病罹病植株的显症和未显症组织内生细菌多样性, 并用定量 PCR 方法, 对果、枝、叶 3 种组织黄龙病菌、优势菌株及细菌总数进行检测。【结果】结果显示显症和无症组织所带黄龙病菌差异很大, 显症部位病菌量明显高于无症部位。分析显症和无症组织内生细菌 DGGE 图谱显示, 同一组织内生菌群结构基本相同; 对图谱中 17 条明显条带回收克隆测序, 发现其中 8 个条带均属于沙雷氏菌属 (*Serratia*), 占总条带数的 47.06%。序列分析显示这 8 条序列为粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*) 不同的菌株 (序列相似性为 99.63%)。定量分析各差异显症部位单位组织内的粘质沙雷氏菌和细菌总数, 发现相同部位的总细菌量差异不显著, 但粘质沙雷氏菌与黄龙病菌的量呈负相关。【结论】柑橘黄龙病病株中, 各部位所带病菌量不均匀, 是否显症与组织内柑橘黄龙病菌的量呈正相关, 内生菌群总量与显症无相关性, 但粘质沙雷氏菌与黄龙病菌的量呈负相关。粘质沙雷氏菌与黄龙病菌在韧皮部细胞内增殖过程中的相互作用值得深入研究。

关键词: 柑橘黄龙病, 内生细菌, 细菌多样性, 粘质沙雷氏菌

中图分类号: Q939 **文章编号:** 0001-6209(2014)08-0868-08

柑橘黄龙病菌是变形菌门 (Proteobacteria) α -亚纲的革兰氏阴性菌, 分为亚洲种 (*Candidatus Liberibacter asiaticus*)、美洲种 (*Ca. L. americanus*) 和非洲种 (*Ca. L. africanus*)。其中亚洲种基因组大小仅 1.23 Mb, 且缺乏独立生存和植物细胞外增殖的酶^[1], 因此只能寄生于寄主韧皮部。该病菌所引起的病害是国内外柑橘产业的一种毁灭性病害^[2]。对于该病害, 在其分布、危害、检测^[3]和传播途径^[4]等方面均有许多报道, 但至今还没有能使病原细菌连续传代培养的有效方法的报道。

在柑橘植株组织和器官内, 除了病原菌以外, 还生活着大量的内生细菌, 它们共同构成了植物的微生态系统, 并长期与植物共同进化^[5-6], 其中一些内生细菌可以与病原菌互动, 促进或抑制病原菌的侵染和增殖。已有报道, 从柑橘中分离到的萎蔫短小杆菌能明显减弱由木质部难养菌 (CVC) 引起的杂色褪绿病症状, 柑橘黑斑病的病原菌可以抑制某些芽孢杆菌 (*Bacillus*) 的生长^[7-8]。关于黄龙病寄主内生细菌研究也有一些相关报道, 2010 年王爱华等采用分离培养和 RFLP 的方法对柑橘黄龙病的病、

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003067); 国家自然科学基金项目 (30971875)

* 通信作者。Tel /Fax: +86-23-65120489; E-mail: w-zk@163.com

作者简介: 王芳 (1987-), 女, 四川达州人, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源开发与利用。E-mail: 568268773@qq.com

收稿日期: 2013-10-24; 修回日期: 2013-12-13

健植株好氧性内生细菌菌群进行了分离鉴定^[9]; 2011年李颜芳等采用分离培养和 DGGE 分析柑橘黄龙病、健植株兼性厌氧型优势伴生菌群^[10]。但现有研究均是从不同植株出发, 分析罹病(带菌)和健康植株内生菌的差异。由于不同植株的个体差异、所处微环境的不同, 即使同是罹病植株, 其病害程度及黄龙病菌带菌量也有差异, 只能在一定程度上体现内生细菌与柑橘黄龙病菌的关系。

在柑橘黄龙病疫区, 我们经常可以看到同一柑橘植株不同组织黄龙病症状有明显差异, 这些症状上的差异产生的原因、不同显症组织内生菌是否存在差异都没有受到关注。因此本研究对柑橘黄龙病同一罹病植株显症及无症状果实、叶、枝条中柑橘黄龙病菌及内生细菌比较研究, 以有效排除植株个体、生活环境及病害程度的差异, 为进一步研究内生细菌与黄龙病的关系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料: 供试柑橘品种为椪柑, 实验所用的椪柑枝条、叶和果实均采自江西信丰(114.94E/25.39N)同一果园同一病树, 分别在上、中、下部位采取显症和不显症的叶、枝条和果实, 每个部位采集3-5个样。样品采集后分别以塑料袋密封保存于4℃冰箱中备用, 并在一周内进行处理。

1.1.2 试剂与主要仪器: 细菌基因组 DNA 提取试剂盒、纯化回收试剂盒 (Axygen); LA Taq 酶 (Bioflux, Japan); 引物合成 (上海生物工程技术公司, 中国); Premix Ex Taq TM^{II} Mix (TaKaRa, Japan); CFX96 实时荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD)。

1.2 黄龙病菌定量检测

表面消毒及总 DNA 的提取: 按照文献对实验材料进行表面消毒处理^[9], 并将最后一次冲洗水 100 μL 涂布于 LB 平板上, 28℃ 培养 72 h, 检查灭菌效果。灭菌后的材料在无菌条件下取叶片中脉和枝条的韧皮部以及果实橘络, 分别以液氮研磨成粉末, 称取等量组织, 利用细菌基因组提取试剂盒提取内生细菌的基因组 DNA。每个部位单独提取总 DNA, 再将同一组织同一显症情况的 DNA 等量混合作为一个样品, 最后总共得到 6 个样品 (1, 不显症果实; 2, 显症果实; 3, 不显症叶; 4, 显症叶; 5, 不显症枝条;

6, 显症枝条)。

qPCR 检测黄龙病菌: 标准曲线构建, 以实验室保存的黄龙病菌基因组的 DNA 为模板, 用引物 CQULA04F (5'-TGGAGGTGTA AAAAGTTGCCAAA-3')/CQULA04R (5'-CCAACGAAAAGATCAGATATTCCTCTA-3')^[11], 50 μL 反应体系扩增黄龙病菌特异序列, 反应条件为 95℃ 5 min; 95℃ 30 s, 59℃ 45 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 7 min。目的片段为 87 bp, 切胶回收该目的片段, 与 pMD 19-T 载体连接、转化, 鉴定阳性克隆后, 将该转化子转接于 2 mL LB 液体培养基中培养 12-16 h, 抽提质粒, 紫外分光光度计测定质粒浓度, 并以此为标准品依据公式 $CN = (M \times N) / (L \times D)$ 算出每 μL 标准品所含的拷贝数 [M 为质量浓度 (g/mL); N 为阿佛加德罗常数 (6.022×10^{23} 分子/摩尔); L 为核酸分子长度 (总长度 = 靶片段 + 载体, 单位 kb); D 为转换因子 (对 dsDNA 为 $6.6 \times 10^5 \text{ gmole}^{-1} \text{ kb}^{-1}$)]^[11]。用已知拷贝数的标准品以无菌双蒸水 10 倍梯度稀释后进行荧光定量 PCR 反应, 制作定量标准曲线。反映采用 25 μL 反应体系, SYBR[®] Premix Ex Taq TM^{II} Mix 12.5 μL, 10 μmol/L 的上、下游引物各 1 μL, ddH₂O 8.5 μL, 模板 2 μL。实时荧光定量 PCR 分析运行程序为: 95℃ 1 min; 95℃ 15 s, 59℃ 15 s, 41 个循环。建立 C_t 值 (达到荧光阈值的循环数) 与拷贝数浓度的对数对应关系的标准曲线。

以提取的内生细菌总 DNA 为模板, 按照标准曲线制定的体系和程序进行荧光定量 PCR 反应, 每个样品做 3 个平行, 每次实验重复 3 次, 每次定量实验均需要同时做标准曲线。根据标准曲线, 计算出单位组织内黄龙病菌的含量。

1.3 内生细菌 16S rDNA-DGGE 分析

以上述提取的内生细菌总 DNA 为模板, 先用细菌通用引物 799F (5'-AACMGGATTAGATACCCCKG-3')/1492 R (5'-GGCTACCTTGTTACGACTT-3')^[12], 扩增细菌 16S rDNA 中的 V5-V9 5 个高变区。50 μL PCR 反应体系, 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 45 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 7 min。PCR 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 得到大小约 840 bp 和 730 bp 两条带, 切胶回收 730 bp 目的片段。然后再以该片段为模板, 用引物 968F-GC (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3')/1378R (5'-CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACG-3')^[10] 扩增 16S rDNA

的 V6 - V8 3 个高变区。上游引物 968 F 5'端有 40 bp GC 夹 (CGCCCGCCGCGCGCGGGGCGGGGCGGGGACGGGGG)。采用 50 μ L 反应体系降落式 PCR 扩增,PCR 反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s, 69 - 58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,12 个循环,每个循环下降 1 $^{\circ}$ C;然后 94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 60 s,18 个循环;72 $^{\circ}$ 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,直接回收 PCR 产物,用于 DGGE 分析。

PCR-DGGE 分离及条带分析:上述 PCR 产物回收后,采用 DGGE 分析系统进行电泳分离。凝胶为 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 $^{\circ}$ C 恒温,200 V 10 min,80 V 16 h。电泳结束后银染,VersaDoc2000 凝胶成像系统和 Quantity One-1-D 软件分析。标记 DGGE 图谱中清晰的优势

条带后割胶,分别捣碎后加入 20 μ L ddH₂O, -20 $^{\circ}$ C 浸泡过夜,离心取上清作为 PCR 模板进行扩增,PCR 所用引物为 968F-GC 和 1378R,PCR 反应程序同上。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,转化到大肠杆菌 Trans5 α ,检测阳性克隆并委托上海生物工程技术公司测序。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。并将所得序列上传至 GenBank 数据库,获得登录号。

1.4 qPCR 检测 DGGE 优势菌及总细菌

根据 16S rDNA-DGGE 分析结果,筛选出优势菌种类,运用相应的引物及定量程序(表 1),分别构建优势菌和总细菌的标准曲线,并根据标准曲线计算出单位组织内相应的序列拷贝数,以拷贝数表示相应的菌量多少,具体方法同 1.2。

表 1. 粘质沙雷氏菌和总细菌含量的 qPCR 引物及检测程序

Table 1. Primers used for qPCR specific amplification of *Serratia marcescens* and total bacteria and procedure of qPCR

template	target fragment/bp	sequence of primers (5'→3')	procedure of qPCR	origin of primers
<i>Serratia marcescens</i>	142	F:GGTGTAGCGGTGAAATGCCTAGAGA R:GACATCGTTTACAGCGTGGACTACCA	95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 41 cycles; 72 $^{\circ}$ C 7 min	Krediet C. et al [13]
total bacteria count	197	F:ACTCTACGGGAGGCAGCAG R:ATTACCGCGCTGCTGG	95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 41 cycles; 72 $^{\circ}$ C 7 min	Lane D. [14] Muyzer G. et al [15]

2 结果和分析

2.1 不同显症状况及组织中黄龙病菌定量检测

通过标准曲线,分析得 C_t 值与拷贝数 x 之间的曲线方程为: $y = -3.1703x + 37.328$, $R^2 = 0.997$; 并计算出单位组织内黄龙病菌的含量 (copy/g) (图 1)。从图 1 可以看出,在同株柑橘黄龙病病株上,不同部位带菌量差异很大。未显症组织中黄龙病菌处于较低水平,显症组织中黄龙病菌远远高于不显症组织,并且在显症的不同组织间,黄龙病菌也有显著差异,叶脉中的带菌量最高,达到 7.47×10^7 copy/g,其次为橘络,为 4.57×10^7 copy/g,枝条中含量最低。

2.2 内生细菌 16S rDNA-DGGE 图谱分析

对内生细菌进行 DGGE 图谱分析,结果表明 6 个不同样品中包含的细菌类群差异很小(图 2)。将

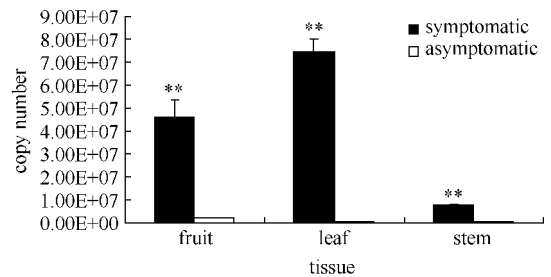


图 1. 单位组织黄龙病菌的量 (copy/g)

Figure 1. The amount of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in different tissues (copy/g).

明显的 DGGE 条带分别割胶回收测序,获得 17 条不同序列,登录号见表 2。经比对发现,17 条序列分属 9 个属 17 个不同的细菌类群,其中 8 条属于沙雷氏菌属,占总条带数的 47.06%。DNAMAN 软件比对所有沙雷氏菌属序列,其相似度达到 99.63%,表明所有的沙雷氏菌菌株均属于粘质沙雷氏菌,该类细菌为罹病柑橘组织中的绝对优势种。

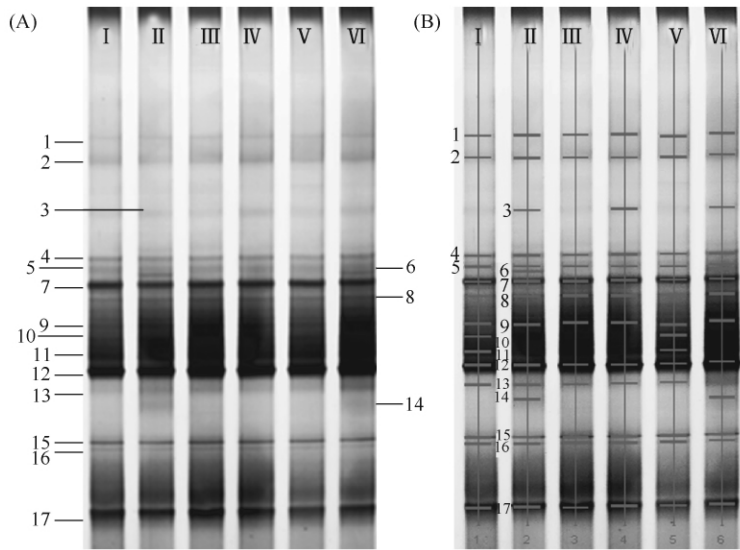


图 2. 内生细菌 16S rDNA V6-V8 高变区 DGGE 图谱

Figure 2. PCR-DGGE analysis of the sequence of 16S rDNA V6-V8 fragment gene of endophytic bacteria. A: Original DGGE profile; B: Original profile labeled by Quantity One-4-D software (gray bands were excised from the gels for sequenced). I: asymptomatic fruit; II: symptomatic fruit; III: asymptomatic leaf; IV: symptomatic leaf; V: asymptomatic stem; VI: symptomatic stem.

表 2. 内生细菌 16S rDNA 登录号及序列比对结果

Table 2. The accession NO. of endophytic bacteria and best match bacteria

band number	endophytic bacteria (accession NO.)	best match bacteria in NCBI	identity / %
1	KF703933	Uncultured <i>Enterobacter</i> sp. isolate BF33 (DQ839334. 1)	99
2	KF703934	<i>Serratia</i> sp. W9 (KC853176. 1)	99
3	KF703935	Uncultured bacterium clone C15 (HM060214. 1)	99
4	KF703936	Uncultured <i>Achromobacter</i> sp. clone PAS-47 (JN582275. 1)	99
5	KF703937	<i>Pseudomonas</i> sp. J16 (EU099381. 1)	99
6	KF703938	<i>Serratia nematodiphila</i> strain DR186 (JQ002568. 1)	99
7	KF703939	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain M9 (JX273769. 1)	99
8	KF703940	<i>Serratia marcescens</i> strain RRO clone c4 (JX872284. 1)	99
9	KF703941	Uncultured <i>Serratia</i> sp. clone XYX_048R (JN426717. 1)	99
10	KF703942	<i>Serratia marcescens</i> WW4 strain WW4 (NR_102509. 1)	99
11	KF703943	<i>Serratia marcescens</i> strain T237 (KC764987. 1)	99
12	KF703944	<i>Serratia marcescens</i> strain SL22 (KC558557. 1)	100
13	KF703945	Uncultured organism clone ELU0029-T142-S-NIPCRA MgANa_000604 (HQ750795. 1)	99
14	KF703946	Uncultured <i>Serratia</i> sp. clone XYE_006R (JN426484. 1)	99
15	KF703947	Uncultured bacterium clone 2G1_27 (JN583533. 1)	100
16	KF703948	<i>Methylobacterium</i> sp. 3R-6 (JX678929. 1)	99
17	KF703949	Uncultured <i>Pantoea</i> sp. clone WCFC47 (KC283053. 1)	100

2.3 不同组织中优势菌及总细菌的定量

通过相应的标准曲线, 分析得 C_i 值与拷贝数 x 之间的曲线方程分别为: 粘质沙雷氏菌,

$y = -3.5579x + 39.759$, $R^2 = 0.9983$; 总细菌,

$y = -3.6254x + 38.674$, $R^2 = 0.9992$ 。

定量分析结果显示: 在 3 种显症组织中, 沙雷氏

菌含量具有显著差异,枝条中含量最高,而橘络中含量最低;在不显症组织中,果实中沙雷氏菌含量最低而枝叶中差异不显著;但在果实及枝条中,显症及不显症样品中沙雷氏菌没有显著差异,只在叶脉显症样品中沙雷氏菌显著低于不显症样品(图3)。在6个样品中,细菌总数与是否显症没有相关性,但不同组织细菌总数不同,橘络中总细菌数量最低,而枝条和叶脉中细菌总量没有显著差异(图4)。

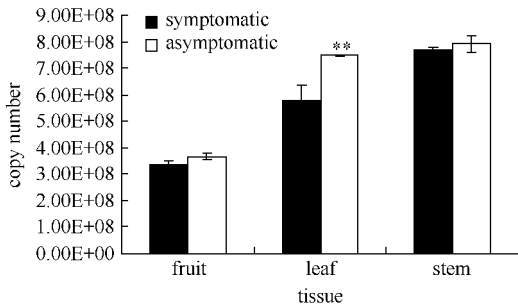


图3. 单位组织内粘质沙雷氏菌的量(copy/g)

Figure 3. The amount of *Serratia marcescens* in different tissues (copy/g).

表3. 柑橘黄龙病罹病植株不同组织单位质量内生细菌的量

Table 3. The amount of endophytic bacteria in HLB-affected citrus plant at different tissues

part	mottling/ asymptomatic	the amount of bacteria in per gram tissue (copy/g)				
		A/ <i>Candidatus</i>	B/ <i>Serratia</i>	C/Total	A/C	B/C
		<i>Liberibacter asiaticus</i>	<i>marcescens</i>	bacteria count		
fruit	symptomatic	$4.57 \times 10^7 \pm 7.94 \times 10^6$ b	$3.35 \times 10^8 \pm 1.50 \times 10^7$ c	$4.76 \times 10^9 \pm 1.07 \times 10^8$ b	9.60×10^{-3}	7.04×10^{-2}
	asymptomatic	$2.41 \times 10^6 \pm 4.97 \times 10^5$ c	$3.67 \times 10^8 \pm 1.31 \times 10^7$ c	$4.63 \times 10^9 \pm 2.69 \times 10^8$ b	5.21×10^{-4}	7.93×10^{-2}
leaf	symptomatic	$7.47 \times 10^7 \pm 5.25 \times 10^6$ a	$5.79 \times 10^8 \pm 6.01 \times 10^7$ b	$1.08 \times 10^{11} \pm 3.21 \times 10^9$ a	6.90×10^{-4}	5.34×10^{-3}
	asymptomatic	$4.01 \times 10^5 \pm 6.72 \times 10^4$ c	$7.48 \times 10^8 \pm 3.06 \times 10^6$ a	$1.11 \times 10^{11} \pm 3.06 \times 10^9$ a	3.60×10^{-6}	6.72×10^{-3}
stem	symptomatic	$7.86 \times 10^6 \pm 4.42 \times 10^5$ c	$7.69 \times 10^8 \pm 7.02 \times 10^6$ a	$1.10 \times 10^{11} \pm 8.74 \times 10^9$ a	7.17×10^{-5}	7.02×10^{-3}
	asymptomatic	$5.92 \times 10^5 \pm 9.84 \times 10^4$ c	$7.91 \times 10^8 \pm 3.00 \times 10^7$ a	$1.12 \times 10^{11} \pm 8.08 \times 10^9$ a	5.28×10^{-6}	7.06×10^{-3}

The letters after standard error values indicate significant difference ($P < 0.05$) in same columns.

3 讨论

现有关于柑橘黄龙病菌菌量与病害症状的关系都是基于不同罹病状况的植株检测所得,但是不同植株个体、生活环境及病害程度的差异都能影响症状的显现。本研究通过 qPCR 检测同一病树同一时期不同显症状况样品中的黄龙病菌,结果表明在排除了其他因素的影响后,一定量的黄龙病菌是寄主显症的一个关键因素。

黄龙病菌在罹病植株的不同部位分布是不均匀,前人的研究也发现此规律^[11,16]。这可能是由于

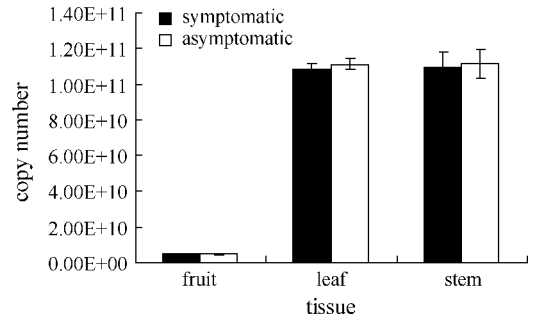


图4. 单位组织内总细菌的量(copy/g)

Figure 4. The amount of total bacteria count in different tissues (copy/g).

2.4 黄龙病菌、粘质沙雷氏菌和总细菌间的相关性

根据 2.1、2.3 计算出的单位组织内黄龙病菌(A)、粘质沙雷氏菌(B)和总细菌(C)的量,分别计算黄龙病菌和粘质沙雷氏菌在总细菌中所占比例(表3)。表3显示,在3种组织中,黄龙病菌与粘质沙雷氏菌在果实内生菌中所占比例最高,其中粘质沙雷氏菌已超过总菌量的7%,为橘络中的绝对优势种;黄龙病菌与沙雷氏菌的量呈负相关。

带菌木虱吸食柑橘嫩芽,将黄龙病菌传播至此,然后从其韧皮部筛管细胞从上往下扩展蔓延到其他组织或临近部位,从而导致黄龙病菌分布不均匀;各组织营养成分有差异,黄龙病菌增殖速率不同也可能是导致病菌分布不均的原因。胡浩^[17]报道黄龙病菌含量在柑橘体内的分布为:叶片中脉 \approx 枝条 $>$ 橘络,本研究结果与其有一定出入,可能是选取枝条的位置有差异。两者都得出叶片中脉含病菌量最高,为黄龙病分子检测的样品采集提供了试验依据。

16S rDNA 的 PCR-DGGE 图谱显示,同一病株韧皮部中内生菌群种类几乎相同;对每种组织中的总细菌定量结果表明,显症和无症同一组织中总细

菌的量无明显差异。这与 Sagaram US^[12] 和李佳^[18] 分别研究病健柑橘和长春花内生菌多样性, 提出的病株中内生菌多样性少于健株有不同。这可能是因为本研究采取的是同一植株, 而同株植物枝条韧皮部和叶脉中的内生细菌可能在植株中移动所致。

在所研究罹病柑橘植株中, 沙雷氏菌属为内生菌的绝对优势种(条带占总条带数将近一半), 并且均为粘质沙雷氏菌。Gyaneshwar 等报道过大量的沙雷氏菌存在于植物组织内^[19]。殷幼平等也发现沙雷氏菌属为九里香组织内的绝对优势种^[20]。李颜芳^[10] 采用 DGGE 技术分析全国六省病健柑橘植株内生细菌, 分离出的沙雷氏菌属占 28%, 在所分菌群中所占比例最高。条带 3 和 14 只在显症组织中出现, 而条带 10 只在不显症组织中出现, 这说明不同显症状况下, 粘质沙雷氏菌菌株的组成有一定差异。王爱华^[9] 在采用 RFLP-PCR 分子鉴定技术分析柑橘病、健植株内生菌时发现健株中粘质沙雷氏菌克隆数所占比例高于病株, 本研究定量分析该菌在单位组织内的量所得出的结论与其相似。已经有报道证明, 粘质沙雷氏菌产生灵菌红素 (prodigiosins), 该类色素均具有一定的免疫活性, 如抑制细菌、真菌和霉菌等功效, 且具有一定的抗肿瘤作用^[21]。2008 年, Prischmann DA^[22] 发现从玉米根中分离的粘质沙雷氏菌 DAP30 对病原菌具有拮抗作用。Trivedi 等通过共培养发现, 普成沙雷氏菌 (*Serratia plymutila*) 能够抑制黄龙病菌的增殖^[23]。本研究发现粘质沙雷氏菌与柑橘寄主组织中的黄龙病菌的种群数量呈负相关关系, 其是否对柑橘黄龙病菌具有拮抗作用, 抑或竞争性抑制作用还有待进一步证实。

在显症的柑橘组织中, 虽然粘质沙雷氏菌的绝对数量比黄龙病菌多 1-3 个数量级, 但是在总细菌中的比例仍小于 8%。说明柑橘内部存在许多没有被挖掘的内生菌种类, 需要采用其他有效方法, 尽可能挖掘出与黄龙病菌互作的功能性内生菌。

参考文献

[1] Duan YP, Zhou LJ, Hall DG, Li WB, Doddapaneni H, Lin H, Liu L, Vahling CM, Gabriel DW, Williams KP, Dickerman A, Sun YJ, Gottwald T. Complete genome sequence of citrus huanglongbing bacterium 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' obtained through metagenomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22 (8):

1011-1020.

- [2] Bové JM. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 2006, 88 (1): 7-37.
- [3] Ding F, Hong N, Zhong Y, Yi GJ, Wang GP. Studies on 16S rDNA Sequence of Citrus Huanglongbing Bacteria in China. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35 (5): 649-654. (in Chinese)
丁芳, 洪霓, 钟云, 易干军, 王国平. 中国柑橘黄龙病病原 16S rDNA 序列研究. 园艺学报, 2008, 35 (5): 649-654.
- [4] Subandiyah S, Iwanami T, Tsuyumu S, Ieki H. Comparison of 16S rDNA and 16S /23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia. *Plant Disease*, 2000, 84 (1): 15-18.
- [5] Sun QK, Ding AY. Advances of study on endophytic bacteria as biological control agents. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science)*. 2001, 32 (2): 256-260. (in Chinese)
孙庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展. 山东农业大学学报(自然科学版), 2001, 32 (2): 256-260.
- [6] Yang HL, Sun XL, Song W. Current development on induced resistance by plant growth promoting and endophytic bacteria. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2000, 30 (2): 106-109. (in Chinese)
杨海莲, 孙晓璐, 宋未. 植物根际促生细菌和内生细菌的诱导抗病性的研究进展. 植物病理学报, 2000, 30 (2): 106-109.
- [7] Lacava PT, Araújo WL, Marcon J, Jr WM, Azevedo JL. Interaction between endophytic bacteria from citrus plants and the phytopathogenic bacteria *Xylella fastidiosa* causal agent of citrus variegated chlorosis. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39 (1): 55-59.
- [8] Lacava PT, Li W, Araújo WL, Azevedo JL, Hartung JS. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *catharanthus roseus*. *Journal of Microbiology*, 2007, 45 (5): 388-393.
- [9] Wang AH, Yin YP, Xiong HL, Li YF, Li J, Xian JX, Wang ZK. Endophytic bacterial diversity analysis of Huanglongbing pathogen-infected citrus phloem tissue in Guangxi. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43 (23): 4823-4833. (in Chinese)
王爱华, 殷幼平, 熊红利, 李颜方, 李佳, 贤家旭, 王中康. 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, 2010, 43 (23): 4823-4833.

- [10] Li YF, Yin YP, Wang YX, Li J, Chen SW, Wang ZK. Isolation of facultative anaerobic entophytic bacterial companioned *Ca. Las* infected citrus tissues and evaluation of dominant bacterial populations. *Microbiology China*, 2011, 38 (9) : 1362-1370. (in Chinese)
李颜方, 殷幼平, 王玉玺, 李佳, 陈世伟, 王中康. 亚洲韧皮杆菌兼性厌氧型伴生细菌鉴定及优势菌群分析. *微生物学通报*, 2011, 38 (9) : 1362-1370.
- [11] Wang ZK, Yin YP, Hu H, Yuan Q, Peng GX, Xia YX. Development and application of molecular based diagnosis for ' *Candidatus Liberibacter asiaticus* ', the causal pathogen of citrus huanglongbing. *Plant Pathology*, 2006, 55: 630-638.
- [12] Sagaram US, DeAngelis KM, Trivedi P, Andersen GL, Lu SE, Wang N. Bacterial Diversity Analysis of Huanglongbing Pathogen-Infected Citrus, Using PhyloChip Arrays and 16S rRNA Gene Clone Library Sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75 (6) : 1566-1577.
- [13] Krediet CJ, Carpinone EM, Ritchie KB, Teplitski M. Characterization of the *gacA*-dependent surface and coral Mucus colonization by an opportunistic coral pathogen *Serratia marcescens* PDL100. *FEMS Microbiology Ecology*, 2013 (84) : 290-301.
- [14] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, 1991:115-175.
- [15] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59: 695-700.
- [16] Tatinen S, Sagaram US, Gowda S, Robertson CJ, Dawson WO, Wanami TI, Wang N. In plant distribution of ' *Candidatus Liberibacter asiaticus* ' as revealed by polymerase chain reaction (PCR) and realtime PCR. *Phytopathology*, 2008, 98 (5) :592-599.
- [17] 胡浩. 应用荧光定量 PCR 技术研究亚洲韧皮部杆菌在寄主体内的动态变化及分布. 重庆大学学位论文, 2007.
- [18] Li J, Wang ZK, Xie P, Wu D, Yin YP. Endophytic bacterial community analysis of *Catharanthus roseus* and its association with huanglongbing pathogen. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (4) : 489-497. (in Chinese)
李佳, 王中康, 谢攀, 吴东, 殷幼平. 长春花内生细菌多样性与柑橘黄龙病菌的相关性. *微生物学报*, 2012, 52 (4) :489-497.
- [19] Gyaneshwar P, James EK, Mathan N, Reddy PM, Hurek BR, Ladha JK. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183 (8) : 2634-2645.
- [20] Yin YP, Li J, Lin YY, Chen SW, Wang ZK. Isolation and characterization of endophytic bacteria from huanglongbing' s hidden host plant-*Murraya paniculata*. *Microbiology China*, 2012, 39 (10) : 1418-1427. (in Chinese)
殷幼平, 李佳, 林亚玉, 陈世伟, 王中康. 柑橘黄龙病隐症寄主九里香内生细菌分离及功能鉴定. *微生物学通报*, 2012, 39 (10) : 1418-1427.
- [21] Nakamura A, Nagai K, Ando K, Tamura G. Selective suppression by prodigiosin of the mitogenic response of routine splenocytes. *Journal of Antibiotics*, 1986, 8 (1) : 1155-1159.
- [22] Prischmann DA, Lehman RM, Christie AA, Dashiell KE. Characterization of bacteria isolated from maize roots: Emphasis on *Serratia* and infestation with corn rootworms (Chrysomelidae: Diabrotica). *Applied Soil Ecology*, 2008, 40: 417-431.
- [23] Trivedi P, Spann T, Wang N. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. *Microbiology Ecology*, 2011, 62 (2) : 324-336.

Endophytic bacterial community in the symptoms and symptomless tissues of HLB-affected citrus plant

Fang Wang, Youping Yin, Liqin Sun, Xiaofang Wu, Zhongkang Wang*

School of Life Sciences of Chongqing University, Key Laboratory of Genetic Function and Regulation in Chongqing, Chongqing 400030, China

Abstract: [Objective] To analyze the endophytic bacteria in symptoms and symptomless tissues, reveal dominant bacterial population which may interact with *Ca. Las*. [Method] The population structure and diversity of endophytic bacteria in symptoms and symptomless tissues of single HLB-affected citrus plant were studied based on 16S rDNA sequences analyzed by PCR-DGGE (PCR-denaturing gradient gel electrophoresis). Quantitative analysis of *Ca. Las*, dominant bacteria and total amount of bacterial population in symptoms and symptomless tissues of branches, leaves and fruits was done by quantitative PCR. [Result] The amount of *Ca. Las* is significantly different in symptoms and symptomless tissues; bacterial population in symptoms citrus tissues was significantly higher than in symptomless tissues. PCR-DGGE analysis result shows that endophytic bacterial structures are basically the same in symptoms and symptomless tissues. Extraction, cloning and sequencing of 17 obvious bands in DGGE electrophoretogram reveal that 8 of 17 bands belonged to the genus *Serratia*, which accounted for 47.06%. Sequence alignment shows that they belonged to different strains of *Serratia marcescens* with the 99.63% similarity. Quantitative analysis of the total bacteria and *Serratia marcescens* shows that there is no significant difference in total bacterial count between symptoms and symptomless tissues whereas the amount of *Serratia marcescens* was negatively correlated with the amount of *Las*. [Conclusion] The *Ca. Las* is heterogeneously distributed among various tissues of HLB-affected citrus plant. The amount of *Ca. Las* was negatively correlated with *Serratia marcescens* and total amount of endophytic bacteria have no relevance with symptom of HLB disease. How the interaction of *Serratia marcescens* and *Ca. Las* in tissue of citrus needs further study.

Keywords: Citrus Huanglongbing, endophytic bacteria, bacterial diversity, *Serratia marcescens*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (201003067) and by the National Natural Science Foundation of China (30971875)

* Corresponding author. Tel / Fax: + 86-23-65120489; E-mail: w-zk@163.com

Received: 24 October 2013 / Revised: 13 December 2013