

ISSN 1000-0933  
CN 11-2031/Q

# 生态学报

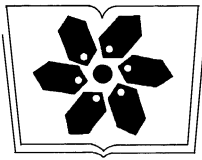
## Acta Ecologica Sinica



第 31 卷 第 24 期 Vol.31 No.24 **2011**

中国生态学学会  
中国科学院生态环境研究中心  
科学出版社

主办  
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

# 生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 31 卷 第 24 期

2011 年 12 月 (半月刊)

## 目 次

|                                                                                   |                           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 柑橘黄龙病株不同部位内生细菌群落结构的多样性·····                                                       | 刘 波,郑雪芳,孙大光,等 (7325)      |
| 小兴安岭红松径向生长对未来气候变化的响应·····                                                         | 尹 红,王 靖,刘洪滨,等 (7343)      |
| 污水地下渗透系统脱氮效果及动力学过程·····                                                           | 李海波,李英华,孙铁珩,等 (7351)      |
| 基于生态系统服务的海南岛自然保护区体系规划·····                                                        | 肖 燧,陈圣宾,张 路,等 (7357)      |
| 羌塘地区草食性野生动物的生态服务价值评估——以藏羚羊为例·····                                                 | 鲁春霞,刘 铭,冯 跃,等 (7370)      |
| 湖北省潜江市生态系统服务功能价值空间特征·····                                                         | 许倍慎,周 勇,徐 理,等 (7379)      |
| 滇西北纳帕海湿地景观格局变化及其对土壤碳库的影响·····                                                     | 李宁云,袁 华,田 昆,等 (7388)      |
| 基于连接性考虑的湿地生态系统保护多预案分析——以黄淮海地区为例·····                                              | 宋晓龙,李晓文,张明祥,等 (7397)      |
| 青藏高原高寒草甸生态系统碳增汇潜力·····                                                            | 韩道瑞,曹广民,郭小伟,等 (7408)      |
| 影响黄土高原地物光谱反射率的非均匀因子及反照率参数化研究·····                                                 | 张 杰,张 强 (7418)            |
| 基于 GIS 的下辽河平原地下水生态敏感性评价·····                                                      | 孙才志,杨 磊,胡冬玲 (7428)        |
| 厦门市土地利用变化下的生态敏感性·····                                                             | 黄 静,崔胜辉,李方一,等 (7441)      |
| 我国保护地生态旅游发展现状调查分析·····                                                            | 钟林生,王 婧 (7450)            |
| 黄腹山鹧鸪稳定的配偶关系限制雄性欺骗者·····                                                          | 褚福印,唐思贤,潘虎君,等 (7458)      |
| 食物蛋白含量和限食对雌性东方田鼠生理特性的影响·····                                                      | 朱俊霞,王 勇,张美文,等 (7464)      |
| 具有捕食正效应的捕食-食饵系统·····                                                              | 祁 君,苏志勇 (7471)            |
| 桑科中 4 种桑天牛寄主植物的挥发物成分研究·····                                                       | 张 琳,WANG Baode,许志春 (7479) |
| 栗山天牛成虫羽化与温湿度的关系·····                                                              | 杨忠岐,王小艺,王 宝,等 (7486)      |
| 人工巢箱条件下杂色山雀的巢位选择及其对繁殖成功率的影响·····                                                  | 李 乐,万冬梅,刘 鹤,等 (7492)      |
| 鸭绿江口湿地鸕鹚类停歇地的生物生态研究·····                                                          | 宋 伦,杨国军,李 爱,等 (7500)      |
| 锡林郭勒草原区气温的时空变化特征·····                                                             | 王海梅,李政海,乌 兰,等 (7511)      |
| UV-B 辐射胁迫对杨桐幼苗生长及光合生理的影响·····                                                     | 兰春剑,江 洪,黄梅玲,等 (7516)      |
| 小麦和玉米叶片光合-蒸腾日变化耦合机理·····                                                          | 赵风华,王秋凤,王建林,等 (7526)      |
| 利用稳定氢氧同位素定量区分白刺水分来源的方法比较·····                                                     | 巩国丽,陈 辉,段德玉 (7533)        |
| 2010 年冬季寒冷天气对闽江口 3 种红树植物幼苗的影响·····                                                | 雍石泉,仝 川,庄晨辉,等 (7542)      |
| 人参皂苷与生态因子的相关性·····                                                                | 谢彩香,索风梅,贾光林,等 (7551)      |
| 芑对黑麦草根茎几种低分子量有机分泌物的影响·····                                                        | 谢晓梅,廖 敏,杨 静 (7564)        |
| 盐碱地柠条根围土中黑曲霉的分离鉴定及解磷能力测定·····                                                     | 张丽珍,樊晶晶,牛 伟,等 (7571)      |
| 不同近地表土壤水文条件下雨滴打击对黑土坡面养分流失的影响·····                                                 | 安 娟,郑粉莉,李桂芳,等 (7579)      |
| 煤电生产系统的能值分析及新指标体系的构建·····                                                         | 楼 波,徐 毅,林振冠 (7591)        |
| <b>专论与综述</b>                                                                      |                           |
| 东南亚高山森林植被变化对流域产水量的影响·····                                                         | 张远东,刘世荣,顾峰雪 (7601)        |
| 干旱荒漠区斑块状植被空间格局及其防沙效应研究进展·····                                                     | 胡广录,赵文智,王 岗 (7609)        |
| 利用农业生物多样性持续控制有害生物·····                                                            | 高 东,何霞红,朱书生 (7617)        |
| <b>研究简报</b>                                                                       |                           |
| 洪湖湿地生态系统土壤有机碳及养分含量特征·····                                                         | 刘 刚,沈守云,闫文德,等 (7625)      |
| 氯氰菊酯和溴氰菊酯对萼花臂尾轮虫生殖的影响·····                                                        | 黄 林,刘昌利,韦传宝,等 (7632)      |
| <b>学术信息与动态</b>                                                                    |                           |
| SCOPE-ZHONGYU 环境论坛(2011)暨环境科学与可持续发展国际会议成功举办·····                                  | (7639)                    |
| 《生态学报》3 篇文章入选 2010 年中国百篇最具影响国内学术论文 等·····                                         | ( I )                     |
| 期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 316 * zh * P * ¥70.00 * 1510 * 36 * 2011-12 |                           |



**封面图说:** 泥炭藓大多生长在多水、寒冷和贫营养的生境,同时有少数的草本、矮小灌木也生长在其中,但优势植物仍然是泥炭藓属植物。泥炭藓植物植株死后逐渐堆积形成泥炭。经过若干年的生长演变,形成了大片的泥炭藓沼泽。这种沼泽地有黑黑的泥炭,绿绿的草甸和亮晶晶的斑块状水面相间相衬,远远看去就像大地铺上了锦绣地毯一样美丽壮观。

**彩图提供:** 陈建伟教授 国家林业局 E-mail: cites.chenjw@163.com



刘波,郑雪芳,孙大光,阮传清,范国成,段永平. 柑橘黄龙病株不同部位内生细菌群落结构的多样性. 生态学报, 2011, 31 (24) : 7325-7342.

Liu B, Zheng X F, Sun D G, Ruan C Q, Fan G C, Duan Y P. The community structure of endophytic bacteria in different parts of huanglongbing-affected citrus plants. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31 (24) : 7325-7342.

## 柑橘黄龙病株不同部位内生细菌群落结构的多样性

刘 波<sup>1,\*</sup>, 郑雪芳<sup>1</sup>, 孙大光<sup>1,2</sup>, 阮传清<sup>1</sup>, 范国成<sup>3</sup>, 段永平<sup>4</sup>

(1. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福州 350003; 2. 福建师范大学生命科学学院, 福州 350003;

3. 福建省农业科学院果树研究所福州, 350003; 4. 美国农业部佛罗里达园艺试验室, 佛罗里达 34945)

**摘要:**采用 PCC (Pearson correlation coefficient)、系统聚类 and 多样性指数研究了柑橘黄龙病 (citrus huanglongbing, HLB) 植株不同部位叶片、枝条及其根部内生细菌的相互关系及其群落结构多样性。结果表明, 从供试柑橘中分离得到 26 株内生细菌 (叶片 10 株, 枝条 14 株, 根部 2 株) 隶属于 10 个属 19 个种。Nested-PCR 结果显示, 柑橘植株不同空间叶片中, 黄龙病病原的阳性检出率为 58.3%。用 LSD 法比较显示, 柑橘内生细菌在不同器官的分布量大小依次为根>叶>枝条。上、中、下不同部位叶片和枝条内生细菌分布量差异不显著, 而东、西、南、北不同方位的叶片和枝条内生细菌分布量差异显著 ( $P<5\%$ )。柑橘内生细菌之间的 PCC 分析表明, *Bacillus pumilus* 和 *Bacillus* sp. 与柑橘黄龙病病原菌呈显著负相关, *Bacillus* sp. 和 *Bacillus pumilus* 与 *Bacillus subtilis* 呈显著正相关。 *Bacillus brevis* 和 *Escherichia hermannii* 与 *Bacillus vesicularis* 存在显著正相关。对柑橘不同器官内生细菌的 PCC 分析表明, 同种器官的内生细菌之间呈正相关, 不同器官的内生细菌之间呈负相关。以内生细菌在各器官的分布量为指标分析不同器官之间的相关性, 结果表明, 叶片与枝条呈正相关, PCC 为 0.55, 叶片与根部、枝条与根部均呈负相关, PCC 分别为 -0.19 和 -0.13。16S rDNA 序列聚类分析表明, 柑橘内生细菌可分为两大类, 第 I 大类为革兰氏阳性菌, 第 II 大类为革兰氏阴性菌。第 I 大类又可以分为芽孢杆菌属和短小杆菌属两个亚类, 第 II 大类也可以分两个亚类。对柑橘黄龙病病原与叶片内生细菌进行聚类分析, 可以分为三类, 第 I 类特征为内生细菌存在所有部位的叶片; 第 II 类特征为内生细菌与黄龙病病原菌存在负相关性; 第 III 类特征为内生细菌只存在特定部位叶片。当马氏距离为 27.23 时, 可将柑橘黄龙病内生细菌群落结构聚为 3 类, 第 I 类特点是在不同部位叶片均有分布, 为完全分布类型, 且分布量较大, 第 II 类特点是在各器官中均为不完全分布类型, 且分布量不均匀, 第 III 类特点是根部分布特性且分布量较大。分析多样性指数表明, SHANNON ( $H_1$ ) 指数在叶片最高, 根部最低。SIMPSON ( $D$ ) 指数在枝条最高, 根部最低。Pielou 指数在根部最高, 枝条最低。

**关键词:** 柑橘黄龙病; 内生细菌; 多样性; 群落结构

## The community structure of endophytic bacteria in different parts of huanglongbing-affected citrus plants

LIU Bo<sup>1,\*</sup>, ZHENG Xuefang<sup>1</sup>, SUN Daguang<sup>1,2</sup>, RUAN Chuanqing<sup>1</sup>, FAN Guocheng<sup>3</sup>, DUAN Yongping<sup>4</sup>

1 Agricultural Bioresource. Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

2 College Of Life Science Fujian Normal University, Fuzhou 350003, China

3 Research Institute. of Pomology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China

4 USDA-ARS-USHRL, Fort Pierce, FL 34945, U. S. A

**Abstract:** The analyses methods of Pearson correlation coefficient (PCC), hierarchical cluster analysis and diversity index were used to study the relevance between citrus huanglongbing (HLB) and the endophytic bacteria in different branches and leaves as well as roots of huanglongbing (HLB)-affected citrus trees. The results showed that 26 isolates (10 isolates from leaves, 14 isolates from branches and 2 isolates from roots) from HLB-affected citrus plants belonged to 19 bacterial species

基金项目: 中美合作项目 (柑橘木虱生防菌与抗虫柑橘品种研究); 福建省财政专项-福建省农业科学院科技创新团队建设基金 (STIF-Y03)

收稿日期: 2011-06-27; 修订日期: 2011-11-10

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: fzliubo@163.com

in 10 Genus. Among the 12 tested leaf samples, 58.3% of them were positive for the HLB pathogen using Nested-PCR. The numbers of endophytic bacteria in the different parts of citrus plants ranked as in citrus root > in leaves > in sticks using statistical LSD (least significant difference). The numbers of endophytic bacteria in leaves with different orientations were significant different but little different were found among upper parts, middle parts and lower parts. Among the bacterial populations, *Bacillus pumilus* and *Bacillus* sp. were significantly negatively correlated to HLB. bacterium; *Bacillus* sp. and *Bacillus pumilus* was positively correlated to *Bacillus subtilis*, while *Bacillus brevis* and *Escherichia hermannii* was positively correlated to *Bacillus vesicularis*. Furthermore, there was no correlation between *Bacillus subtilis* and *Bacillus brevis* based on PCC analysis. The correlations among the bacteria from the same tissue such as the leaves, sticks and roots were significantly positive, while the correlations among the bacteria from the different tissues were negative. The correlation coefficient of endophytic bacteria between the leaves and the sticks was over 0.55 ( $P < 0.05$ ). Based on clustering analysis of 16S rRNA gene sequences, citrus endophytic bacteria was divided into two groups: Gram-positive and Gram-negative. The correlations between HLB bacterium and other bacteria were divided into 3 groups. The bacteria in group I distributed in all leaves; and the bacterias in the group II were negatively corrected to HLB bacterium while in the group III bacterias resided only in certain leaves. When mahalanobis distance was 27.23, the endophytic bacteria were clustered into three groups. The bacterias in group I distributed in all leaves, so called completely distribution, but the bacterias in group II were incompletely distribution, and the bacteria in group III only distributed in the roots. Based on the community diversity indexes of Shannon, Simpson and Pielou, it is concluded that the maximum of SHANNON( $H_1$ ) index was in the leaves, and the minimum was in the roots, however, the maximum of SIMPSON( $D$ ) index was in the sticks, and the minimum was in the roots and the maximum of Pielou index was in the roots while the minimum was in the sticks.

**Key Words:** citrus huanglongbing; endophytic bacteria; diversity; community structure

柑橘黄龙病(Citrus huanglongbing,简称 HLB)是世界柑橘生产上最具毁灭性的病害之一<sup>[1]</sup>,严重影响到柑橘产业的发展。柑橘黄龙病病原菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)是一种韧皮部杆菌属类细菌,属于革兰氏阴性细菌<sup>[2]</sup>。对柑橘黄龙病的研究,在黄龙病分子检测<sup>[3]</sup>,传播虫媒,流行规律,病原菌基因组 DNA 序列<sup>[4]</sup>,控制技术等方面已有过许多报道。作者前期研究发现,在感染黄龙病的柑橘植株上,存在着同个器官感染状态不同,如病株一部分叶(茎、根)感染,另一部分无感染;同个部位感染状态不同,如病株上部一部分叶(枝)感染,另一部分无感染。这种病株间不同器官、不同部位病原分布的差异性的原因是什么,是否与植株内生菌的分布有关,这一现象国内外的相关研究未见报道。柑橘内生细菌的研究前人有过报道,Lacava 等从健康柑橘植株体内分离得到的萎蔫短小杆菌(*Curtobacterium flaccumfaciens*),能够明显减弱由苛养木杆菌(*Xylella fastidiosa*)引起的杂色褪绿病(Citrus variegated chlorosis,CVC)的症状<sup>[5-6]</sup>。Araújo 等从幼小柑橘叶片中分离得到很多细菌以及真菌,其中可以引起柑橘黑斑病的病原菌(*Guignardia citricarpa*)所分泌的代谢产物可以抑制一些芽胞杆菌(*Bacillus*)的生长<sup>[6]</sup>。然而,关于柑橘黄龙病植株内生细菌研究报道很少,仅见王爱华等研究了柑橘黄龙病植株和柑橘健康植株内生细菌种类存在一定差异<sup>[7]</sup>,而同一棵柑橘黄龙病植株不同部位内生细菌分布差异的研究未见报道。

植物内生细菌(Endophyte bacterium)被公认的定义是指那些在其生活史的一定阶段或者全部阶段生活于植物的各种组织和器官内部的细菌<sup>[8]</sup>。这样的细菌长期以来生活在植株体内并在某种程度上与植株形成了互利互助的关系。植物内生菌几乎存在于所有目前已研究过的植物中其分布广,种类多。研究表明,感染内生菌的植物宿主往往具有生长快速、抗逆境、抗病害、抗动物危害等优势,比未感染植株更具生存竞争力<sup>[9]</sup>。对于柑橘黄龙病植株,其黄龙病原在病株不同方位和部位的分布是否一致,不同方位、不同部位、不同黄龙病状态的柑橘器官内生细菌分布是否存在差异,这些问题尚不清楚。

本研究拟采用 Nested-PCR 检测方法对柑橘黄龙病植株不同部位叶片进行黄龙病病原的检测,并采用纯

培养的方法对柑橘(红心柚)黄龙病植株不同部位(上、中、下)和不同方位(东、西、南、北)叶片、枝条以及根部内生细菌进行分离、鉴定,统计各类内生细菌的在柑橘黄龙病植株不同部位的分布数量,分析柑橘黄龙病植株不同部位内生细菌分布特性及与黄龙病病原菌分布之间的相关性,为柑橘黄龙病的防治,柑橘内生细菌开发与利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

柑橘样本采集:时间,2010年7月23日;地点,顺昌北门水库边赵氏园艺技术研究所果树基地;经纬度,东经117.8°,北纬26.8°;柑橘品种,红心柚(*Citrus grandis* Osbeck cv. Chandler);采集方法,选择一株具有典型黄龙病病症的红心柚植株,分别从东、西、南、北面取其上部、中部、下部共12个部位叶片、枝条若干份,并记录不同方位叶片症状,同时取其侧根若干段,置于4℃冰箱保存备用。试剂与仪器:牛肉膏-蛋白胨(NA)培养基、CTAB、 $\beta$ -巯基乙醇、异戊醇、氯仿、细菌总体DNA提取试剂盒(Promega公司)、引物(博尚生物工程公司合成)、PCR仪、Bio-Rad电泳仪、UVP凝胶成像系统等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 柑橘内生细菌的分离与鉴定

柑橘内生细菌的分离参照蓝江林等<sup>[10-12]</sup>的方法,略作修改。对采集样品表面进行严格消毒。在无菌条件下,将样品研磨成匀浆,并稀释 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 3个梯度样品悬浮液,分别取200  $\mu$ L涂布在NA平板上,28℃培养24 h,每份样品做3个重复。观察菌落形态、颜色、边缘状态、透明度、表面干湿状态等特征,对菌株进行初步分类,统计菌落数量并挑取各部位具有代表性的单菌落进行纯化,保存备用。柑橘内生细菌的鉴定,参考Raine等<sup>[13]</sup>的报道,扩增柑橘内生细菌16S rDNA。引物序列、扩增程序见表1。将PCR产物送至上海生工生物有限公司进行序列测定。将测得的16S rDNA序列与Genbank中同源性序列进行比对,按16S rDNA序列同源性最大的菌株归于同一物种计<sup>[14]</sup>。将内生细菌16S rDNA序列,用Clustalx 1.83软件进行多序列比对,并用MEGA 4.0软件分析比对的结果,使用邻接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统进化树。

#### 1.2.2 柑橘不同部位叶片黄龙病原的分子检测

采用改良的CTAB法提取叶片的总DNA<sup>[15]</sup>。通过Nested-PCR检测柑橘黄龙病病原,引物序列<sup>[16]</sup>、扩增程序见表1。以本实验室现有柑橘黄龙病叶片DNA做为阳性对照,健康柑橘叶片DNA为阴性对照。25  $\mu$ L的扩增体系中含有1U Taq酶,2.5  $\mu$ L的10 $\times$ PCR Buffer,0.5  $\mu$ L的10 mmol/L的4种dNTP,1  $\mu$ L的10  $\mu$ mol/L的引物和25 ng的DNA模板,每个反应重复3次。先使用外引物进行第一轮扩增,内引物进行第二轮扩增,将第一次扩增的产物稀释100倍作为第二次扩增的模板。扩增产物在电压90 V,1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,使用UVP凝胶成像系统照相。

表1 PCR引物序列及其扩增程序

Table 1 Primer sequence and PCR amplification procedure

| PCR 类型<br>Type of PCR | 引物序列 Sequence of primers                                                  | PCR 反应程序 Program of PCR                                                        |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| Direct PCR            | CG03F:5'-RGGGAAAGATTTTATTGGAG-3';<br>CG05R: 5'-GAAAATAYCATCTCTGATATCGT-3' | 预变性 94℃ 3 min;变性 94℃ 30 s,53℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,40 个循环;72℃ 后延伸 7 min         |
| Nest PCR              | LJ74f:5'-CGGGCGATTAAGTTAGAGGT-3';<br>CG05R:5'-GAAAATAYCATCTCTGATATCGT-3'  | 预变性 94℃ 3 min;变性 94℃ 30 s,53℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环;72℃ 后延伸 7 min         |
| 16SrDNA-PCR           | 27f:5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';<br>1525r:5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3'        | 预变性 94℃ 5 min;变性 94℃ 30 s,退火 50℃ 30 s,延伸 72℃ 1 min30 s,进过 30 循环;72℃ 后变性 10 min |

#### 1.2.3 柑橘黄龙病原菌与内生细菌的相互关系

对采集的12个部位叶片进行黄龙病病原分子检测,将检测结果进行“1,0”数量化,用“1”代表该部位叶片携带黄龙病病原菌为阳性,用“0”代表该部位叶片没有携带黄龙病病原菌为阴性。对不同部位叶片内生细菌

菌进行分离,根据 16S rDNA 鉴定结果对内生细菌进行分类并对其含量进行统计。用皮尔逊相关系数 (Pearson correlation coefficient, PCC) 分析黄龙病病原菌与叶片内生细菌的相互关系,将不同叶片黄龙病病原菌存在与否和不同内生细菌在叶片中的含量构建成矩阵,以柑橘叶片黄龙病病原及其内生细菌为指标,以不同部位叶片为样本。PCC 计算公式如下<sup>[17]</sup>:

$$r = \frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{N}}{\sqrt{(\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N})(\sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N})}} \quad (1)$$

式中,变量  $X$  和  $Y$  分别表示柑橘黄龙病病原  $X$  的存在与否和内生细菌  $Y$  的含量,  $N$  表示样本总数。对黄龙病病原菌与不同叶片内生细菌进行聚类分析,统计带黄龙病病原叶片与不带黄龙病病原叶片内生细菌的数量分布并构建矩阵,以柑橘叶片黄龙病病原菌和内生细菌为指标,以不同部位叶片黄龙病病原和内生细菌为样本,以马氏距离为尺度,采用可变类平均法进行系统聚类分析。

#### 1.2.4 柑橘不同部位叶片内生细菌的相互关系

统计不同部位叶片内生细菌的种类及其含量,利用不同部位叶片及其内生细菌的含量构建矩阵,用最小显著性差异法 (Least significant difference, LSD) 比较不同内生细菌在不同部位叶片中含量差异。(1) 以内生细菌为基础的不同部位叶片相关性分析,以不同种类内生细菌为指标,不同方位柑橘叶片为样本,采用 PCC 分析不同部位叶片之间的相互关系。(2) 以不同部位叶片为基础的内生细菌相关性分析,以不同部位的叶片为指标,不同种类的内生细菌为样本,采用 PCC 分析不同内生细菌在不同叶片分布的相互关系。

#### 1.2.5 柑橘不同部位枝条内生细菌的相互关系

统计不同部位枝条内生细菌的种类及其含量,利用不同部位枝条及其内生细菌的含量构建矩阵,用最小显著性差异法比较不同内生细菌在不同部位枝条中含量的差异。(1) 以内生细菌为基础的不同部位枝条相关性分析,以不同种类内生细菌为指标,不同方位柑橘枝条为样本,采用 PCC 分析不同部位枝条之间的相互关系。(2) 以不同部位枝条为基础的内生细菌相关性分析,以不同部位枝条为指标,不同种类的内生细菌为样本,采用 PCC 分析不同内生细菌在不同枝条分布的相互关系。

#### 1.2.6 柑橘不同器官内生细菌群落结构多样性

柑橘各器官(叶、茎、根)内生细菌种群数量分布相关性分析,对从红心柚黄龙病植株叶片、枝条和根中分离得到的内生细菌种类和数量进行统计分析。利用不同器官与不同种类内生细菌的含量构建矩阵,以不同内生细菌数量为变量,分别以不同器官及其内生细菌为样本,采用 PCC 分析各器官之间的相互关系及其内生细菌之间的相互关系。

柑橘各器官(叶、茎、根)内生细菌种群结构聚类分析,以柑橘不同器官内生细菌含量为指标,以内生细菌为样本,利用不同器官与不同种类内生细菌的含量构建矩阵,以马氏距离为尺度,采用可变类平均法对不同内生细菌之间进行系统聚类分析。

柑橘各器官(叶、茎、根)内生细菌种群多样性指数分析,将不同器官内生细菌含量作为数量测度,引入生态学多样性测度 SIMPSON( $D$ ) 指数、SHANNON( $H_1$ ) 指数、Pielou 指数等方法<sup>[18]</sup>。SIMPSON( $D$ ) 计算公式为:  $D = 1 - \sum P_i$ , 式中  $P_i$  种内生细菌占该试验中总的内生细菌的个数比例。SHANNON( $H_1$ ) 计算公式为:  $H_1 = -\sum P_i \ln P_i$ , 式中  $P_i = N_i/N$ ,  $N_i$  为处理  $i$  的内生细菌个数,  $N$  为该试验中总内生细菌个数。Pielou 指数( $J$ ) 计算公式为:  $J = -\sum P_i \ln P_i / \ln S$ , 式中  $S$  为群落中的内生细菌的总种类数。

### 1.3 数据处理

内生细菌数量分析、相关分析和系统聚类分析所用软件为浙江大学 DPS 7.05 统计软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 柑橘黄龙病株内生细菌分离与鉴定

根据菌落形态的差异,从红心柚黄龙病株不同部位叶片、枝条和根部共分离出 26 株内生细菌,其中叶片



10 株,枝条 14 株,根部 2 株。利用 16S rDNA 鉴定(表 2),结果表明,26 株内生细菌分别属于 10 个属,其中芽胞杆菌属(*Bacillus*) 10 株,短小杆菌属(*Curtobacterium*) 4 株,埃希氏菌属(*Escherichia*) 4 株,肠杆菌属(*Enterobacter*) 2 株,短短芽胞杆菌属(*Brevibacillus*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) 细菌各 1 株。分离的芽胞杆菌属菌株属于 6 个不同的种,包括枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、短小芽胞杆菌(*Bacillus pumilus*)、弯曲芽胞杆菌(*Bacillus flexus*)、高地芽胞杆菌(*Bacillus altitudinis*)及 1 个芽胞杆菌属未确定种(*Bacillus* sp.)。

表 2 红心柚内生细菌 16S rDNA 序列鉴定结果

Table 2 Identification of endophytic bacteria in *Citrus grandis* Osbeck cv. Chandler by 16S rDNA sequencing

| 菌株<br>Isolated strains | 16SrDNA 序列收录号<br>16SrDNA sequence Accession No | 微生物学名<br>scientific name             | 中文名<br>Chinese name |
|------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------|---------------------|
| 1. FJAT-10074          | HQ873726                                       | <i>Bacillus pumilus</i>              | 短小芽胞杆菌              |
| 2. FJAT-10067          | HQ873729                                       | <i>Bacillus</i> sp.                  | 芽胞杆菌属               |
| 3. FJAT-10076          | HQ873722                                       | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>   | 醋酸钙不动杆菌             |
| 4. FJAT-10072          | HQ873730                                       | <i>Escherichia coli</i>              | 大肠杆菌                |
| 5. FJAT-10746          | HQ873716                                       | <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> | 萎蔫短小杆菌              |
| 6. FJAT-10721          | HQ873707                                       | <i>Curtobacterium pusillum</i>       | 极小短小杆菌              |
| 7. FJAT-10747          | HQ873717                                       | <i>Curtobacterium citreum</i>        | 柠檬色短小杆菌             |
| 8. FJAT-10726          | HQ873711                                       | <i>Bacillus subtilis</i>             | 枯草芽胞杆菌              |
| 9. FJAT-10722          | HQ873713                                       | <i>Bacillus flexus</i>               | 弯曲芽胞杆菌              |
| 10. FJAT-10748         | HQ873708                                       | <i>Bacillus cereus</i>               | 蜡状芽胞杆菌              |
| 11. FJAT-10821         | HQ873709                                       | <i>Bacillus altitudinis</i>          | 高地芽胞杆菌              |
| 12. FJAT-10724         | HQ873714                                       | <i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>  | 伪血鞘氨醇单胞菌            |
| 13. FJAT-10720         | HQ873710                                       | <i>Pseudomonas fluorescens</i>       | 荧光假单胞菌              |
| 14. FJAT-10760         | HQ873719                                       | <i>Brevundimonas vesicularis</i>     | 泡囊短波单胞菌             |
| 15. FJAT-10714         | HQ873720                                       | <i>Methylobacterium variabile</i>    | 甲基杆菌属               |
| 16. FJAT-10742         | HQ873712                                       | <i>Escherichia hermannii</i>         | 赫氏埃希菌               |
| 17. FJAT-10752         | HQ873718                                       | <i>Brevibacillus brevis</i>          | 短短芽胞杆菌              |
| 18. FJAT-11906         | HQ873731                                       | <i>Enterobacter amnigenus</i>        | 栖水肠杆菌               |
| 19. FJAT-11266         | HQ873732                                       | <i>Enterobacter asburiae</i>         | 阿氏肠杆菌               |

从内生细菌 16S rDNA 系统进化树(图 1)可以看出,柑橘黄龙病植株内生细菌分为两大类,第 I 大类为革兰氏阳性菌,第 II 大类为革兰氏阴性菌。第 I 大类又可以分为芽胞杆菌属和短小杆菌属两个亚类,其中第 I 亚类特点均为低 G+C% 细菌;第 II 亚类特点均为高 G+C% 细菌。第 II 大类也可分为两个亚类,第 I 亚类包括泡囊短波单胞菌(*B. vesicularis*)、伪血鞘氨醇单胞菌(*S. pseudosanguinis*)、甲基杆菌属(*M. variabile*),其特点是均属于  $\alpha$ -变形菌纲细菌;第 II 亚类包括大肠杆菌(*E. coli*)、赫氏埃希菌(*E. hermannii*)、栖水肠杆菌(*E. amnigenus*)、阿氏肠杆菌(*E. asburiae*)、醋酸钙不动杆菌(*A. calcoaceticus*)、荧光假单胞菌(*P. fluorescens*),其特点是均属于  $\gamma$ -变形菌纲。

## 2.2 柑橘不同部位叶片黄龙病病原分子检测

红心柚黄龙病株不同部位叶片表型特征及其黄龙病病原检测结果见表 3,图 2。携带黄龙病原的叶片组织和阳性对照均扩增出一条 440 bp 的特异性条带,而健康叶片组织 DNA 和阴性对照未扩增出相同条带。检测结果表明,12 份样品中有 7 份携带黄龙病原,阳性检出率为 58.3%,其中显性性状有 4 个,分别为东面上部、东面中部、西面下部、和北面下部叶片;隐性性状有 3 个,分别为西面上部、西面中部和北面中部叶片。

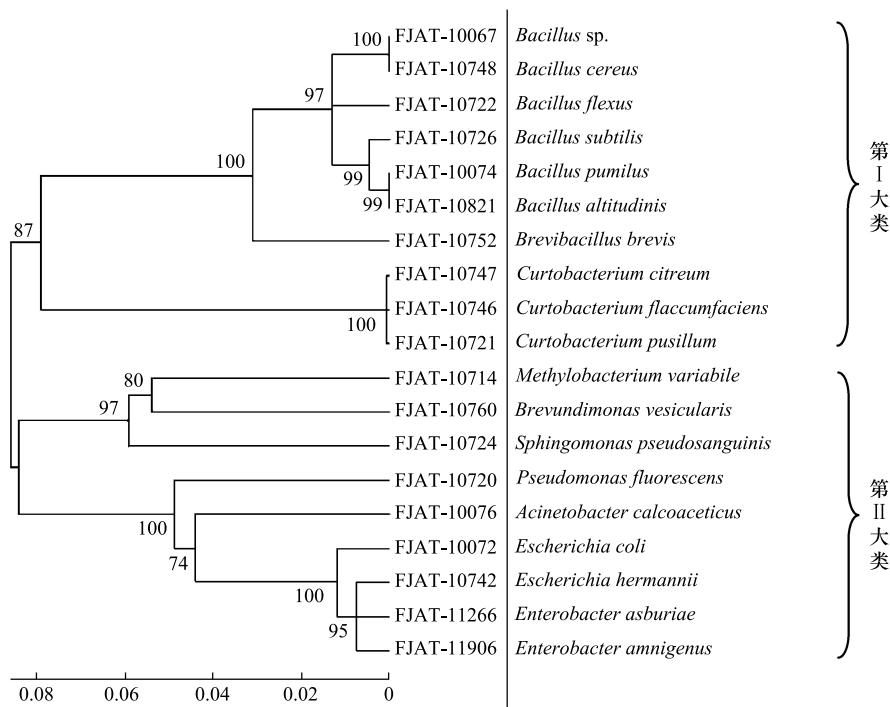


图 1 红心柚内生细菌系统进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of endophytic bacteria in *Citrus grandis* Osbeck cv Chandler  
Bootstrap value 依据 1000 次重复计算

表 3 不同部位叶片黄龙病病症表型及其黄龙病病原检测结果

Table 3 Detection of citrus huanglongbing bacterium from the HLB-affected leaves at different parts

| 部位<br>Position | 东面 East         |                 | 南面 South        |                 | 西面 West         |                 | 北面 North        |                 |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                | 表型<br>Phenotype | 病原菌<br>Pathogen | 表型<br>Phenotype | 病原菌<br>Pathogen | 表型<br>Phenotype | 病原菌<br>Pathogen | 表型<br>Phenotype | 病原菌<br>Pathogen |
| 上部 Upside      | 黄化              | +               | 正常              | -               | 正常              | +               | 正常              | -               |
| 中部 Middle      | 斑驳              | +               | 正常              | -               | 正常              | +               | 正常              | +               |
| 下部 Downside    | 正常              | -               | 正常              | -               | 黄化              | +               | 黄化              | +               |

“+”代表检测出黄龙病病原,“-”代表没有检测出黄龙病病原

2.3 柑橘黄龙病原菌与内生细菌的相互关系

(1)柑橘不同部位叶片黄龙病原菌存在情况及其内生细菌数量分布见表 4,内生细菌 *E. hermannii* 和 *E. coli* 在叶片中分布量少,而内生细菌 *B. subtilis*、*B. cereus*、*B. pumilus* 和 *Bacillus* sp. 存在于所有叶片之中。*B. subtilis*、*B. cereus*、*B. pumilus* 和 *Bacillus* sp. 的含量在携带有黄龙病病原菌叶片中低于在没有携带黄龙病病原菌叶片。如 *B. subtilis* 在携带有黄龙病病原菌叶片中的平均含量为  $6.93 \times 10^3$  cfu/g,而在没有携带黄龙病病原菌叶片中的含量  $8.48 \times 10^3$  cfu/g。

(2)不同部位叶片内生细菌与黄龙病病原菌的 PCC 见表 5,内生细菌 *B. cereus* 和 *A. calcoaceticus* 与黄龙病病原菌正相关不显著,其 PCC 较低分别为 0.23 和

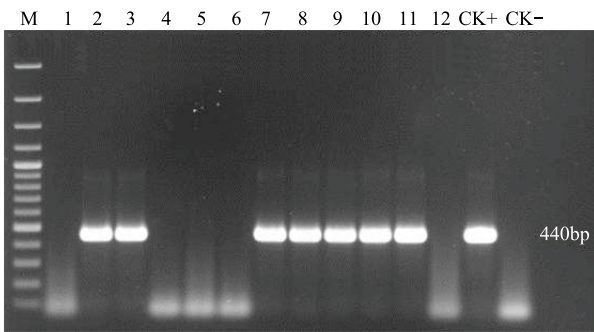


图 2 Nested-PCR 检测不同部位叶片黄龙病病原电泳图  
Fig. 2 Nested-PCR detection of huanglongbing bacteria in different leaves of *Citrus grandis* Osbeck cv  
M: marker 分子量标准 (3000bp、2000bp、1500bp、1200bp、1031bp、900bp、800bp、700bp、600bp、500bp、400bp、300bp、200bp、100bp), 1—12: 依次为北边上部、中部、下部,南边上部、中部、下部,西边上部、中部、下部,东边上部、中部、下部叶片,CK+: 阳性对照,CK-: 阴性对照;1.5% 琼脂糖凝胶,90V 电泳,1h



0.19。*B. pumilus* 和 *Bacillus* sp. 与黄龙病病原菌呈显著负相关,其相关系数分别为-0.83 和-0.78。其他内生细菌与黄龙病病原菌之间存在负相关,但相关性不显著,如 *E. coli* 与黄龙病病原菌的 PCC 仅-0.11。

表 4 红心柚不同部位的叶片所带黄龙病病原情况及内生细菌含量

Table 4 Numbers of endophytic bacteria in different leaves from different orientations of the HLB- affected citrus trees

| 菌株<br>Strain                                      | 东 East<br>/( $\times 10^3$ cfu/g) |         |         | 南 South<br>/( $\times 10^3$ cfu/g) |         |         | 西 West<br>/( $\times 10^3$ cfu/g) |         |         | 北 North<br>/( $\times 10^3$ cfu/g) |         |         |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------|---------|---------|------------------------------------|---------|---------|-----------------------------------|---------|---------|------------------------------------|---------|---------|
|                                                   | 上部<br>U                           | 中部<br>M | 下部<br>D | 上部<br>U                            | 中部<br>M | 下部<br>D | 上部<br>U                           | 中部<br>M | 下部<br>D | 上部<br>U                            | 中部<br>M | 下部<br>D |
|                                                   | 1                                 | 1       | 0       | 0                                  | 0       | 0       | 1                                 | 1       | 1       | 0                                  | 1       | 1       |
| HLB Pathogen                                      |                                   |         |         |                                    |         |         |                                   |         |         |                                    |         |         |
| FJAT-10078 ( <i>Bacillus subtilis</i> )           | 6.9                               | 6.7     | 7.9     | 8.5                                | 6.7     | 9.8     | 6.4                               | 9       | 5.4     | 9.5                                | 7.9     | 7.3     |
| FJAT-10060 ( <i>Bacillus cereus</i> )             | 7.6                               | 8.4     | 9.5     | 7.2                                | 5.8     | 6.1     | 8.8                               | 7.9     | 6.4     | 6.7                                | 5.9     | 8.3     |
| FJAT-10074 ( <i>Bacillus pumilus</i> )            | 7.3                               | 7.4     | 8.9     | 7.3                                | 8.5     | 9.9     | 6.5                               | 5.7     | 6.1     | 8.7                                | 5.8     | 6.6     |
| FJAT-10067 ( <i>Bacillus</i> sp.)                 | 7.2                               | 8.1     | 9.6     | 8.3                                | 7.9     | 10.2    | 7.4                               | 6.9     | 5.4     | 9.2                                | 6.4     | 5.1     |
| FJAT-10076 ( <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ) | 1.2                               | 2.4     | 0       | 2.5                                | 1.7     | 0       | 3.1                               | 2.5     | 0       | 2.3                                | 3.1     | 0       |
| FJAT-10064 ( <i>Escherichia hermannii</i> )       | 0.4                               | 0       | 0       | 0                                  | 0.9     | 0       | 0                                 | 0       | 0       | 0                                  | 0       | 0.5     |
| FJAT-10071 ( <i>Escherichia coli</i> )            | 1.7                               | 0       | 0       | 2.1                                | 0       | 0       | 0                                 | 0       | 0       | 0                                  | 0       | 0.1     |

U 代表上部, M 代表中部, D 代表下部; “1” 代表该部位含有黄龙病病原, “0” 代表该部位不含黄龙病病原

表 5 不同部位叶片内生细菌与黄龙病病原菌的 PCC

Table 5 The correlation index between endophytic bacteria and citrus huanglongbing bacterium in different leaves

|                                                        | PCC      | X1    | X2    | X3    | X4    | X5    | X6   | X7   | X8 |
|--------------------------------------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|----|
| HLB Pathogen (X1)                                      | 1.00     |       |       |       |       |       |      |      |    |
| FJAT-10078 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) (X2)           | -0.53    | 1.00  |       |       |       |       |      |      |    |
| FJAT-10060 ( <i>Bacillus cereus</i> ) (X3)             | 0.23     | -0.16 | 1.00  |       |       |       |      |      |    |
| FJAT-10074 ( <i>Bacillus pumilus</i> ) (X4)            | -0.83 ** | 0.44  | -0.10 | 1.00  |       |       |      |      |    |
| FJAT-10067 ( <i>Bacillus</i> sp.) (X5)                 | -0.78 ** | 0.60  | 0.03  | 0.86  | 1.00  |       |      |      |    |
| FJAT-10076 ( <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ) (X6) | 0.19     | 0.08  | -0.05 | -0.39 | -0.01 | 1.00  |      |      |    |
| FJAT-10064 ( <i>Escherichia hermannii</i> ) (X7)       | -0.09    | -0.31 | -0.22 | 0.13  | -0.24 | -0.20 | 1.00 |      |    |
| FJAT-10071 ( <i>Escherichia coli</i> ) (X8)            | -0.11    | 0.04  | 0.01  | -0.04 | 0.03  | 0.11  | 0.06 | 1.00 |    |

\*  $P < 0.05$  在 0.05 水平显著相关, \*\*  $P < 0.01$  在 0.01 水平显著相关

(3) 不同部位叶片黄龙病病原及其内生细菌的聚类分析, 对表 4 数据进行规格化, 以马氏距离为尺度, 采用可变类平均法, 对黄龙病病原菌和叶片内生细菌进行聚类分析 (图 3), 当马氏距离为 6.18 时, 可以分为 3 类。第 I 类特征为内生细菌存在所有部位的叶片, *B. subtilis* 和 *B. cereus* 与黄龙病病原菌之间的相关性较小; 第 II 类特征为内生细菌与黄龙病病原菌存在负相关性; 第 III 类特征为内生细菌只存在特定部位叶片, 包括了 3 种内生细菌 *A. calcoaceticus*、*E. hermannii* 和 *E. coli* 不存在于所有方位的叶片之中。

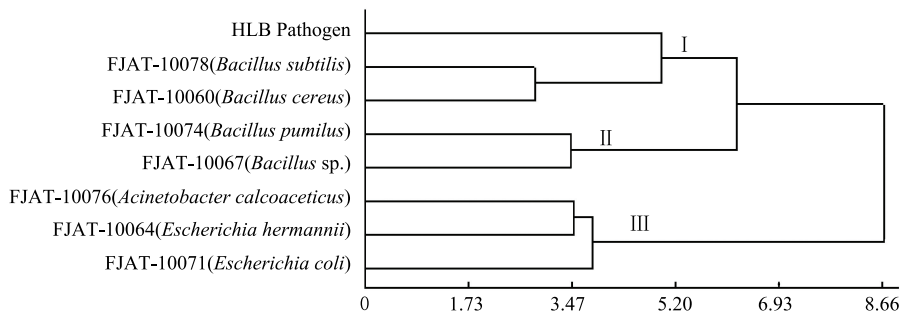


图 3 不同部位叶片内生细菌与黄龙病病原菌之间聚类分析图

Fig. 3 Cluster analysis for endophytic bacteria and huanglongbing pathogen

2.4 柑橘不同部位叶片内生细菌的相互关系

(1)不同方位叶片中内生菌的分布量不同。由表 6 可知,内生细菌在不同方位叶片中的分布具有多态性,可分为完全分布和不完全分布。*B. subtilis*、*B. cereus*、*B. pumilus* 和 *Bacillus* sp. 存在于所有部位的叶片之中,为完全分布,而 *A. calcoaceticus*、*E. hermannii*、*E. coli* 只在特定部位叶片中有分布,为不完全分布。*B. subtilis*、*B. cereus*、*B. pumilus* 和 *Bacillus* sp. 在各部位叶片的平均含量差异不显著,但与 *A. calcoaceticus*、*E. hermannii* 和 *E. coli* 3 种菌在各部位叶片的平均含量存在显著差异(表 7)。内生细菌的平均含量在上、中、下不同高度叶片差异不明显(表 8),在东、西、南、北不同朝向叶片存在显著差异(表 9)。

表 6 红心柚黄龙病株不同部位叶片内生细菌含量  
Table 6 Numbers of endophytic bacteria in citrus leaves of different parts

| 叶片部位<br>Leaf site |    | 内生细菌含量/(×10 <sup>3</sup> cfu/g) |                            |                             |                         |                                        |                                  |                             |
|-------------------|----|---------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|
|                   |    | FJAT-10078                      | FJAT-10060                 | FJAT-10074                  | FJAT-10067              | FJAT-10076                             | FJAT-10064                       | FJAT-10071                  |
|                   |    | ( <i>Bacillus subtilis</i> )    | ( <i>Bacillus cereus</i> ) | ( <i>Bacillus pumilus</i> ) | ( <i>Bacillus</i> sp. ) | ( <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ) | ( <i>Escherichia hermannii</i> ) | ( <i>Escherichia coli</i> ) |
|                   |    | X1                              | X2                         | X3                          | X4                      | X5                                     | X6                               | X7                          |
| 东                 | 上部 | 6.9                             | 7.6                        | 7.3                         | 7.2                     | 1.2                                    | 0.4                              | 1.7                         |
|                   | 中部 | 6.7                             | 8.4                        | 7.4                         | 8.1                     | 2.4                                    | 0                                | 0                           |
|                   | 下部 | 7.9                             | 9.5                        | 8.9                         | 9.6                     | 0                                      | 0                                | 0                           |
| 南                 | 上部 | 8.5                             | 7.2                        | 7.3                         | 8.3                     | 2.5                                    | 0                                | 2.1                         |
|                   | 中部 | 6.7                             | 5.8                        | 8.5                         | 7.9                     | 1.7                                    | 0.9                              | 0                           |
|                   | 下部 | 9.8                             | 6.1                        | 9.9                         | 10.2                    | 0                                      | 0                                | 0                           |
| 西                 | 上部 | 6.4                             | 8.8                        | 6.5                         | 7.4                     | 3.1                                    | 0                                | 0                           |
|                   | 中部 | 9                               | 7.9                        | 5.7                         | 6.9                     | 2.5                                    | 0                                | 0                           |
|                   | 下部 | 5.4                             | 6.4                        | 6.1                         | 5.4                     | 0                                      | 0                                | 0                           |
| 北                 | 上部 | 9.5                             | 6.7                        | 8.7                         | 9.2                     | 2.3                                    | 0                                | 0                           |
|                   | 中部 | 7.9                             | 5.9                        | 5.8                         | 6.4                     | 3.1                                    | 0                                | 0                           |
|                   | 下部 | 7.3                             | 8.3                        | 6.6                         | 5.1                     | 0                                      | 0.5                              | 0.1                         |

表 7 红心柚不同内生细菌在叶片中的含量统计  
Table 7 Numbers of endophytic bacteria in citrus leaves

| 菌株名称<br>Strain                                    | 含量均值/(×10 <sup>3</sup> cfu/g)<br>Mean content | 5% 显著水平<br>5% Significant level |
|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------|
| FJAT-10078 ( <i>Bacillus subtilis</i> )           | 7.6667                                        | a                               |
| FJAT-10067 ( <i>Bacillus</i> sp. )                | 7.6417                                        | a                               |
| FJAT-10074 ( <i>Bacillus pumilus</i> )            | 7.3917                                        | a                               |
| FJAT-10060 ( <i>Bacillus cereus</i> )             | 7.3833                                        | a                               |
| FJAT-10076 ( <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ) | 1.5667                                        | b                               |
| FJAT-10071 ( <i>Escherichia coli</i> )            | 0.3250                                        | c                               |
| FJAT-10064 ( <i>Escherichia hermannii</i> )       | 0.1500                                        | c                               |

同一列中不同字母表示在 5 % 水平上差异显著 (Fisher's LSD test)

表 8 红心柚内生细菌在不同水平叶片中的含量统计  
Table 8 Numbers of endophytic bacteria in citrus leaves of different height

| 叶片水平<br>Leaf height | 含量均值/(×10 <sup>3</sup> cfu/g)<br>Mean content | 5% 显著水平<br>5% Significant level |
|---------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------|
| 上部                  | 4.8857                                        | a                               |
| 中部                  | 4.4857                                        | a                               |
| 下部                  | 4.3964                                        | a                               |

同一列中不同字母表示在 5 % 水平上差异显著 (Fisher's LSD test)

表 9 红心柚内生细菌在不同方向叶片中的含量统计

Table 9 Numbers of endophytic bacteria in citrus leaves of different orientations

| 叶片方向<br>Leaf orientations | 含量均值/( $\times 10^3$ cfu/g)<br>Mean content | 5% 显著水平<br>5% Significant level |
|---------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|
| 南面                        | 4.9238                                      | a                               |
| 东面                        | 4.8190                                      | ab                              |
| 北面                        | 4.4476                                      | ab                              |
| 西面                        | 4.1667                                      | b                               |

同一列中不同字母表示在 5 % 水平上差异显著 (Fisher's LSD test)

(2)对柑橘不同部位叶片进行 PCC 分析,结果见表 10。不同部位叶片之间的相关性很高,且都是在 0.01 水平达到显著正相关,其中东面上部与东面下部、东面上部与西面下部、东面中部与西面上部、东面下部与西面下部叶片之间的相关系数最高达 0.99。南面下部与北面下部叶片之间的相关系数最低为 0.87。

表 10 红心柚不同部位叶片之间的 PCC

Table 10 The correlation index of leaves in different parts

| PCC      | X1      | X2      | X3      | X4      | X5      | X6      | X7      | X8      | X9      | X10     | X11     | X12  |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|
| 东面上部 X1  | 1.00    |         |         |         |         |         |         |         |         |         |         |      |
| 东面中部 X2  | 0.97 ** | 1.00    |         |         |         |         |         |         |         |         |         |      |
| 东面下部 X3  | 0.99 ** | 0.98 ** | 1.00    |         |         |         |         |         |         |         |         |      |
| 南面上部 X4  | 0.97 ** | 0.95 ** | 0.95 ** | 1.00    |         |         |         |         |         |         |         |      |
| 南面中部 X5  | 0.90 ** | 0.95 ** | 0.96 ** | 0.93 ** | 1.00    |         |         |         |         |         |         |      |
| 南面下部 X6  | 0.94 ** | 0.91 ** | 0.94 ** | 0.95 ** | 0.98 ** | 1.00    |         |         |         |         |         |      |
| 西面上部 X7  | 0.94 ** | 0.99 ** | 0.94 ** | 0.93 ** | 0.89 ** | 0.84 ** | 1.00    |         |         |         |         |      |
| 西面中部 X8  | 0.93 ** | 0.94 ** | 0.92 ** | 0.95 ** | 0.88 ** | 0.88 ** | 0.95 ** | 1.00    |         |         |         |      |
| 西面下部 X9  | 0.99 ** | 0.97 ** | 0.99 ** | 0.94 ** | 0.95 ** | 0.93 ** | 0.94 ** | 0.92 ** | 1.00    |         |         |      |
| 北面上部 X10 | 0.94 ** | 0.95 ** | 0.94 ** | 0.98 ** | 0.98 ** | 0.98 ** | 0.91 ** | 0.94 ** | 0.93 ** | 1.00    |         |      |
| 北面中部 X11 | 0.91 ** | 0.94 ** | 0.89 ** | 0.96 ** | 0.91 ** | 0.91 ** | 0.93 ** | 0.98 ** | 0.90 ** | 0.97 ** | 1.00    |      |
| 北面下部 X12 | 0.96 ** | 0.93 ** | 0.95 ** | 0.91 ** | 0.88 ** | 0.87 ** | 0.91 ** | 0.93 ** | 0.98 ** | 0.89 ** | 0.88 ** | 1.00 |

\*  $P < 0.05$  在 0.05 水平显著相关, \*\*  $P < 0.01$  在 0.01 水平显著相关

(3)对不同部位柑橘叶片内生细菌进行 PCC 分析,结果见表 11。不同内生细菌之间相关性不同,有些表现为正相关性,如 *B. pumilus* 与 *Bacillus* sp. 为正相关,且相关系数最大为 0.8564,有些表现为负相关,如 *Bacillus pumilus* 与 *Acinetobacter calcoaceticus* 为负相关,且负相关系数最大为-0.3913。

表 11 不同部位叶片内生细菌之间的 PCC

Table 11 The correlation index of endophytic bacteria in citrus leaves of different parts

|                                                        | PCC      | X1      | X2        | X3      | X4      | X5     | X6   | X7 |
|--------------------------------------------------------|----------|---------|-----------|---------|---------|--------|------|----|
| FJAT-10078 ( <i>Bacillus subtilis</i> ) (X1)           | 1.00     |         |           |         |         |        |      |    |
| FJAT-10060 ( <i>Bacillus cereus</i> ) (X2)             | -0.1563  | 1.00    |           |         |         |        |      |    |
| FJAT-10074 ( <i>Bacillus pumilus</i> ) (X3)            | 0.4386   | -0.1047 | 1.00      |         |         |        |      |    |
| FJAT-10067 ( <i>Bacillus</i> sp.) (X4)                 | 0.6015 * | 0.0296  | 0.8564 ** | 1.00    |         |        |      |    |
| FJAT-10076 ( <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ) (X5) | 0.0827   | -0.0549 | -0.3913   | -0.0097 | 1.00    |        |      |    |
| FJAT-10064 ( <i>Escherichia hermannii</i> ) (X6)       | -0.3134  | -0.2223 | 0.1296    | -0.2384 | -0.1978 | 1.00   |      |    |
| FJAT-10071 ( <i>Escherichia coli</i> ) (X7)            | 0.0375   | 0.0075  | -0.0389   | 0.0294  | 0.1143  | 0.0605 | 1.00 |    |

\*  $P < 0.05$  在 0.05 水平显著相关, \*\*  $P < 0.01$  在 0.01 水平显著相关

## 2.5 柑橘不同部位枝条内生细菌的相互关系

(1)不同部位枝条内生细菌的分布量不同,结果见表 12。内生细菌 *B. subtilis* 在各个部位枝条中均有分布,为完全分布,其他的内生细菌只存在于特定部位枝条中,如 *C. pusillum* 仅存在于东面中部的枝条,为不完



全分布。枝条内生细菌 *C. citreum*、*C. flaccumfaciens*、*B. flexus*、*E. hermannii*、*M. variable*、*B. brevis*、*P. fluorescens*、*C. pusillum*、*S. pseudosanguinis*、*B. altitudinis* 和 *B. vesicularis* 在不同部位枝条的平均含量差异不明显,但它们与 *B. subtilis* 和 *B. cereus* 的平均含量存在显著差异(表 13)。枝条内生菌在上、中、下 3 个不同高度枝条中平均含量差异不明显(表 14),但在东、西、南、北 4 个不同朝向枝条平均含量差异显著(表 15)。

表 12 不同部位的枝条内生细菌种类和含量

Table 12 Types and numbers of endophytic bacteria in different parts of sticks

| 菌株<br>Strain                                        | 东 East<br>( $\times 10^3$ cfu/g) |      |      | 南 South<br>( $\times 10^3$ cfu/g) |      |      | 西 West<br>( $\times 10^3$ cfu/g) |      |      | 北 North<br>( $\times 10^3$ cfu/g) |      |      |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------|------|------|-----------------------------------|------|------|----------------------------------|------|------|-----------------------------------|------|------|
|                                                     | 上部                               | 中部   | 下部   | 上部                                | 中部   | 下部   | 上部                               | 中部   | 下部   | 上部                                | 中部   | 下部   |
|                                                     | U                                | M    | D    | U                                 | M    | D    | U                                | M    | D    | U                                 | M    | D    |
| FJAT-10726 ( <i>Bacillus subtilis</i> )             | 1.41                             | 1.63 | 1.43 | 1.42                              | 1.72 | 1.44 | 1.38                             | 1.49 | 1.47 | 1.5                               | 1.46 | 1.36 |
| FJAT-10748 ( <i>Bacillus cereus</i> )               | 0.45                             | 0.12 | 0.21 | 0                                 | 0.87 | 0.71 | 0.59                             | 0.43 | 0    | 0.81                              | 0.55 | 0.71 |
| FJAT-10722 ( <i>Bacillus flexus</i> )               | 0                                | 0.12 | 0.31 | 0                                 | 0    | 0.11 | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0.16 |
| FJAT-10821 ( <i>Bacillus altitudinis</i> )          | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0.09 | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0.25 |
| FJAT-10750 ( <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ) | 0.43                             | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0    | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0.39 | 0    |
| FJAT-10721 ( <i>Curtobacterium pusillum</i> )       | 0                                | 0.47 | 0    | 0                                 | 0    | 0    | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0    |
| FJAT-10747 ( <i>Curtobacterium citreum</i> )        | 0                                | 0    | 0.44 | 0                                 | 0.51 | 0    | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0    |
| FJAT-10742 ( <i>Escherichia hermannii</i> )         | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0.23 | 0    | 0                                | 0    | 0    | 0.39                              | 0    | 0    |
| FJAT-10720 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )       | 0                                | 0    | 0.18 | 0                                 | 0    | 0    | 0.13                             | 0    | 0    | 0.12                              | 0    | 0.09 |
| FJAT-10724 ( <i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> )  | 0.12                             | 0    | 0    | 0.13                              | 0    | 0    | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0.14 |
| FJAT-10752 ( <i>Brevibacillus brevis</i> )          | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0.21 | 0                                | 0    | 0    | 0.33                              | 0    | 0    |
| FJAT-10760 ( <i>Brevundimonas vesicularis</i> )     | 0                                | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0.18 | 0                                | 0    | 0    | 0.06                              | 0    | 0    |
| FJAT-10714 ( <i>Methylobacterium variable</i> )     | 0.21                             | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0.19 | 0.16                             | 0    | 0    | 0                                 | 0    | 0    |

U 代表上部, M 代表中部, D 代表下部

表 13 红心柚不同内生细菌在枝条中的含量统计

Table 13 Numbers of endophytic bacteria in different sticks

| 菌株<br>Strain                                        | 含量均值/ ( $\times 10^3$ cfu/g)<br>Mean content | 5% 显著水平<br>5% Significant level |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|
| FJAT-10726 ( <i>Bacillus subtilis</i> )             | 1.4758                                       | a                               |
| FJAT-10748 ( <i>Bacillus cereus</i> )               | 0.4542                                       | b                               |
| FJAT-10747 ( <i>Curtobacterium citreum</i> )        | 0.0792                                       | c                               |
| FJAT-10750 ( <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ) | 0.0683                                       | c                               |
| FJAT-10722 ( <i>Bacillus flexus</i> )               | 0.0583                                       | c                               |
| FJAT-10742 ( <i>Escherichia hermannii</i> )         | 0.0517                                       | c                               |
| FJAT-10714 ( <i>Methylobacterium variable</i> )     | 0.0467                                       | c                               |
| FJAT-10752 ( <i>Brevibacillus brevis</i> )          | 0.045                                        | c                               |
| FJAT-10720 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )       | 0.0433                                       | c                               |
| FJAT-10721 ( <i>Curtobacterium pusillum</i> )       | 0.0392                                       | c                               |
| FJAT-10724 ( <i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> )  | 0.0325                                       | c                               |
| FJAT-10821 ( <i>Bacillus altitudinis</i> )          | 0.0283                                       | c                               |
| FJAT-10760 ( <i>Brevundimonas vesicularis</i> )     | 0.02                                         | c                               |

同一列中不同字母表示在 5% 水平上差异显著 (Fisher's LSD test)

表 14 红心柚内生细菌在不同高度枝条中的含量统计

Table 14 Numbers of endophytic bacteria in citrus sticks of different height

| 枝条高度<br>Branch height | 含量均值/ ( $\times 10^3$ cfu/g)<br>Mean content | 5% 显著水平<br>5% Significant level |
|-----------------------|----------------------------------------------|---------------------------------|
| 上部 Up                 | 0.1962                                       | a                               |
| 中部 Middle             | 0.1823                                       | a                               |
| 下部 Down               | 0.1800                                       | a                               |

同一列中不同字母表示在 5% 水平上差异显著 (Fisher's LSD test)

表 15 红心柚内生细菌在不同方向枝条中的含量统计

Table 15 Numbers of endophytic bacteria in citrus sticks of different orientations

| 枝条方向<br>Branch direction | 含量均值/( $\times 10^3$ cfu/g)<br>Mean content | 5% 显著水平<br>5% Significant level |
|--------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|
| 北面                       | 0.2133                                      | a                               |
| 西面                       | 0.2003                                      | ab                              |
| 东面                       | 0.1931                                      | ab                              |
| 南面                       | 0.1449                                      | b                               |

同一列中不同字母表示在 5 % 水平上差异显著 (Fisher's LSD test)

(2) 对不同部位枝条进行 PCC 分析, 结果见表 16, 不同部位枝条之间在 0.01 水平存在显著正相关, 其中南面上部和西面下部枝条之间相关系数为 1, 为完全正相关。东面下部与北面上部枝条之间的相关系数最小为 0.8。

表 16 不同部位的枝条 PCC

Table 16 The correlation index of different sticks

| PCC      | X1      | X2      | X3      | X4      | X5      | X6      | X7      | X8      | X9      | X10     | X11    | X12    |
|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|
| 东面上部 X1  | 1.0000  |         |         |         |         |         |         |         |         |         |        |        |
| 东面中部 X2  | 0.86 ** | 1.0000  |         |         |         |         |         |         |         |         |        |        |
| 东面下部 X3  | 0.84 ** | 0.89 ** | 1.0000  |         |         |         |         |         |         |         |        |        |
| 南面上部 X4  | 0.91 ** | 0.95 ** | 0.92 ** | 1.0000  |         |         |         |         |         |         |        |        |
| 南面中部 X5  | 0.87 ** | 0.82 ** | 0.90 ** | 0.84 ** | 1.0000  |         |         |         |         |         |        |        |
| 南面下部 X6  | 0.91 ** | 0.85 ** | 0.84 ** | 0.87 ** | 0.92 ** | 1.0000  |         |         |         |         |        |        |
| 西面上部 X7  | 0.94 ** | 0.88 ** | 0.88 ** | 0.90 ** | 0.94 ** | 0.98 ** | 1.0000  |         |         |         |        |        |
| 西面中部 X8  | 0.95 ** | 0.93 ** | 0.92 ** | 0.95 ** | 0.94 ** | 0.97 ** | 0.98 ** | 1.0000  |         |         |        |        |
| 西面下部 X9  | 0.91 ** | 0.96 ** | 0.93 ** | 1.00 ** | 0.86 ** | 0.88 ** | 0.91 ** | 0.96 ** | 1.0000  |         |        |        |
| 北面上部 X10 | 0.86 ** | 0.81 ** | 0.80 ** | 0.83 ** | 0.93 ** | 0.94 ** | 0.94 ** | 0.94 ** | 0.84 ** | 1.0000  |        |        |
| 北面中部 X11 | 0.98 ** | 0.87 ** | 0.86 ** | 0.90 ** | 0.91 ** | 0.93 ** | 0.95 ** | 0.96 ** | 0.91 ** | 0.90 ** | 1.0000 |        |
| 北面下部 X12 | 0.90 ** | 0.84 ** | 0.85 ** | 0.87 ** | 0.92 ** | 0.96 ** | 0.96 ** | 0.96 ** | 0.87 ** | 0.92 ** | 0.93:  | 1.0000 |

\*  $P < 0.05$  在 0.05 水平显著相关, \*\*  $P < 0.01$  在 0.01 水平显著相关

(3) 柑橘不同部位枝条内生细菌间相关系数见表 17, 除 *B. brevis* 和 *B. vesicularis* 的相关系数为 0.74, 呈极显著正相关, *E. hermannii* 与 *B. brevis* 的相关系数为 0.68, 呈显著正相关, 其余内生细菌之间的相关性不明显。

表 17 不同部位的枝条内生细菌含量相关系数

Table 17 The correlation index of the endophytic bacteria in sticks

|                                      | PCC | X1    | X2    | X3    | X4    | X5    | X6    | X7    | X8     | X9    | X10   | X11     | X12  | X13 |
|--------------------------------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|---------|------|-----|
| <i>Bacillus subtilis</i>             | X1  | 1     |       |       |       |       |       |       |        |       |       |         |      |     |
| <i>Bacillus cereus</i>               | X2  | 0.13  | 1     |       |       |       |       |       |        |       |       |         |      |     |
| <i>Bacillus flexus</i>               | X3  | -0.16 | -0.14 | 1     |       |       |       |       |        |       |       |         |      |     |
| <i>Bacillus altitudinis</i>          | X4  | -0.38 | 0.35  | 0.37  | 1     |       |       |       |        |       |       |         |      |     |
| <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> | X5  | -0.19 | 0.07  | -0.28 | -0.18 | 1     |       |       |        |       |       |         |      |     |
| <i>Curtobacterium pusillum</i>       | X6  | 0.47  | -0.34 | 0.2   | -0.12 | -0.13 | 1     |       |        |       |       |         |      |     |
| <i>Curtobacterium citreum</i>        | X7  | 0.49  | 0.17  | 0.4   | -0.18 | -0.2  | -0.13 | 1     |        |       |       |         |      |     |
| <i>Escherichia hermannii</i>         | X8  | 0.46  | 0.55  | -0.27 | -0.17 | -0.19 | -0.13 | 0.27  | 1      |       |       |         |      |     |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>       | X9  | -0.37 | 0.17  | 0.55  | 0.14  | -0.3  | -0.2  | 0.28  | 0.22   | 1     |       |         |      |     |
| <i>Sphingomonas pseudosanguinis</i>  | X10 | -0.47 | -0.12 | -0.01 | 0.5   | 0.24  | -0.17 | -0.26 | -0.25  | -0.1  | 1     |         |      |     |
| <i>Brevibacillus brevis</i>          | X11 | 0     | 0.47  | -0.07 | 0.04  | -0.19 | -0.13 | -0.19 | 0.68 * | 0.2   | -0.25 | 1       |      |     |
| <i>Brevundimonas vesicularis</i>     | X12 | -0.08 | 0.37  | 0.1   | 0.22  | -0.18 | -0.12 | -0.17 | 0.15   | -0.08 | -0.23 | 0.74 ** | 1    |     |
| <i>Methylobacterium variabile</i>    | X13 | -0.37 | 0.24  | -0.13 | 0.02  | 0.35  | -0.17 | -0.26 | -0.25  | -0.06 | 0.13  | 0.15    | 0.46 | 1   |

\*  $P < 0.05$  在 0.05 水平显著相关, \*\*  $P < 0.01$  在 0.01 水平显著相关

## 2.6 柑橘黄龙病株不同器官内生细菌群落结构多样性

(1) 柑橘内生细菌种群数量分布特性 不同内生细菌在红心柚黄龙病植株不同器官的分布及其含量不同(表 18)。*E. amnigenus* 和 *E. asburiae* 仅在根部分布, *B. brevis*、*M. variable*、*B. vesicularis*、*P. fluorescens*、*S. pseudosanguinis*、*B. altitudinis*、*B. flexus*、*C. citreum*、*C. pusillum* 和 *C. flaccumfaciens* 仅在枝条分布, *E. coli*、*A. calcoaceticus*、*Bacillus* sp. 和 *B. pumilus* 仅在叶片分布, *B. subtilis*、*B. cereus* 和 *E. hermannii* 在根部和叶片均有分布。各内生细菌在根部和叶片分布总量相当, 分别为  $3.5 \times 10^4$  cfu/g 和  $3.21 \times 10^4$  cfu/g, 枝条分布总量较小为  $2.32 \times 10^4$  cfu/g。

表 18 内生细菌在红心柚内部的数量分布

Table 18 Numbers of endophytic bacteria in *Citrus grandis* Osbeck cv Chandler

| 菌株<br>Isolate strain                                     | 根<br>Root/( $\times 10^3$ cfu/g) | 枝条<br>Stick/( $\times 10^3$ cfu/g) | 叶<br>Leaf/( $\times 10^3$ cfu/g) |
|----------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| FJAT-10726; FJAT-10078 ( <i>Bacillus subtilis</i> )      | 0                                | 1.480                              | 7.6667                           |
| FJAT-10748; FJAT-10060 ( <i>Bacillus cereus</i> )        | 0                                | 0.450                              | 7.383                            |
| FJAT-10074 ( <i>Bacillus pumilus</i> )                   | 0                                | 0                                  | 7.391                            |
| FJAT-10067 ( <i>Bacillus</i> sp.)                        | 0                                | 0                                  | 7.6417                           |
| FJAT-10076 ( <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> )        | 0                                | 0                                  | 1.566                            |
| FJAT-10064 ; FJAT-10064 ( <i>Escherichia hermannii</i> ) | 0                                | 0.052                              | 0.150                            |
| FJAT-10071 ( <i>Escherichia coli</i> )                   | 0                                | 0                                  | 0.325                            |
| FJAT-10750 ( <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> )      | 0                                | 0.068                              | 0                                |
| FJAT-10721 ( <i>Curtobacterium pusillum</i> )            | 0                                | 0.039                              | 0                                |
| FJAT-10747 ( <i>Curtobacterium citreum</i> )             | 0                                | 0.079                              | 0                                |
| FJAT-10722 ( <i>Bacillus flexus</i> )                    | 0                                | 0.058                              | 0                                |
| FJAT-10821 ( <i>Bacillus altitudinis</i> )               | 0                                | 0.028                              | 0                                |
| FJAT-10724 ( <i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> )       | 0                                | 0.033                              | 0                                |
| FJAT-10720 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> )            | 0                                | 0.043                              | 0                                |
| FJAT-10760 ( <i>Brevundimonas vesicularis</i> )          | 0                                | 0.020                              | 0                                |
| FJAT-10714 ( <i>Methylobacterium variable</i> )          | 0                                | 0.047                              | 0                                |
| FJAT-10752 ( <i>Brevibacillus brevis</i> )               | 0                                | 0.045                              | 0                                |
| FJAT-11906 ( <i>Enterobacter amnigenus</i> )             | 21.7                             | 0                                  | 0                                |
| FJAT-11266 ( <i>Enterobacter asburiae</i> )              | 13.3                             | 0                                  | 0                                |
| 合计 Total                                                 | 35                               | 2.442                              | 32.1251                          |

(2) 柑橘黄龙病植株不同器官的 PCC 分析 结果如表 19 所示, 叶片与枝条之间的相关系数为 0.55, 在 0.05 水平呈现显著正相关。根部与枝条, 根部与叶片之间的相关性不显著, 相关系数分别为 -0.1300 和 -0.1900 呈现负相关性。

表 19 红心柚不同器官 PCC

Table 19 The correlation index of different citrus tissues

| 器官 Tissues | X1      | X2       | X3     |
|------------|---------|----------|--------|
| 根 X1       | 1.0000  |          |        |
| 枝条 X2      | -0.1300 | 1.0000   |        |
| 叶片 X3      | -0.1900 | 0.5500 * | 1.0000 |

\*  $P < 0.05$  在 0.05 水平显著相关, \*\*  $P < 0.01$  在 0.01 水平显著相关

(3) 柑橘黄龙病株内生细菌的 PCC 分析 结果如表 20 表明所示, 相同器官的内生细菌之间在 0.01 水平呈显著正相关, 如叶片上的两株内生细菌 *B. pumilus* 与 *Bacillus* sp. 之间的相关系数为 1。不同器官内生细菌之间呈负相关, 但相关性不显著, 如叶片内生细菌 *B. cereus* 与枝条内生细菌 *C. flaccumfaciens* 之间的相关系数为 -0.45。

表 20 红心柚黄龙病株内生细菌 PCC

Table 20 The correlation index of endophytic bacteria in *Citrus grandis* Osbeck cv Chandler

| 种类 Species                                                   | X1      | X2      | X3      | X4      | X5      | X6      | X7    | X8      | X9      | X10     |
|--------------------------------------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|---------|---------|---------|
| FJAT-10726;FJAT-10078<br>( <i>Bacillus subtilis</i> ) X1     | 1.00    |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10748;FJAT-10060<br>( <i>Bacillus cereus</i> ) X2       | 0.99 ** | 1.00    |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10074 ( <i>Bacillus pumilus</i> ) X3                    | 0.98 *  | 1.00 ** | 1.00    |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10067 ( <i>Bacillus</i> sp.) X4                         | 0.98 *  | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00    |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10076 ( <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ) X5         | 0.98 *  | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00    |         |       |         |         |         |
| FJAT-10064;FJAT-10064<br>( <i>Escherichia hermannii</i> ) X6 | 0.99 *  | 0.96 *  | 0.94    | 0.94    | 0.94    | 1.00    |       |         |         |         |
| FJAT-10071 ( <i>Escherichia coli</i> ) X7                    | 0.98 *  | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 0.94    | 1.00  |         |         |         |
| FJAT-10750<br>( <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ) X8    | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00    |         |         |
| FJAT-10721 ( <i>Curtobacterium pusillum</i> ) X9             | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00    |         |
| FJAT-10747 ( <i>Curtobacterium citreum</i> ) X10             | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00    |
| FJAT-10722 ( <i>Bacillus flexus</i> ) X11                    | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** |
| FJAT-10821 ( <i>Bacillus altitudinis</i> ) X12               | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** |
| FJAT-10724<br>( <i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> ) X13    | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** |
| FJAT-10720 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> ) X14            | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** |
| FJAT-10760 ( <i>Brevundimonas vesicularis</i> ) X15          | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** |
| FJAT-10714 ( <i>Methylobacterium variabile</i> ) X16         | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** |
| FJAT-10752 ( <i>Brevibacillus brevis</i> ) X17               | -0.33   | -0.45   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.17   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** |
| FJAT-11906 ( <i>Enterobacter amnigenus</i> ) X18             | -0.65   | -0.55   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.77   | -0.5  | -0.50   | -0.50   | -0.50   |
| FJAT-11266 ( <i>Enterobacter asburiae</i> ) X19              | -0.65   | -0.55   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.77   | -0.50 | -0.50   | -0.50   | -0.50   |
| 种类 Species                                                   | X11     | X12     | X13     | X14     | X15     | X16     | X17   | X18     | X19     |         |
| FJAT-10726;FJAT-10078<br>( <i>Bacillus subtilis</i> ) X1     |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10748;FJAT-10060 ( <i>Bacillus cereus</i> ) X2          |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10074 ( <i>Bacillus pumilus</i> ) X3                    |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10067 ( <i>Bacillus</i> sp.) X4                         |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10076 ( <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ) X5         |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10064;FJAT-10064<br>( <i>Escherichia hermannii</i> ) X6 |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10071 ( <i>Escherichia coli</i> ) X7                    |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10750<br>( <i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> ) X8    |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10721<br>( <i>Curtobacterium pusillum</i> ) X9          |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10747<br>( <i>Curtobacterium citreum</i> ) X10          |         |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10722 ( <i>Bacillus flexus</i> ) X11                    | 1.00    |         |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10821 ( <i>Bacillus altitudinis</i> ) X12               | 1.00 ** | 1.00    |         |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10724<br>( <i>Sphingomonas pseudosanguinis</i> ) X13    | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00    |         |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10720 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> ) X14            | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00    |         |         |       |         |         |         |
| FJAT-10760 ( <i>Brevundimonas vesicularis</i> ) X15          | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00    |         |       |         |         |         |
| FJAT-10714 ( <i>Methylobacterium variabile</i> ) X16         | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00    |       |         |         |         |
| FJAT-10752 ( <i>Brevibacillus brevis</i> ) X17               | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00 ** | 1.00  |         |         |         |
| FJAT-11906 ( <i>Enterobacter amnigenus</i> ) X18             | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.50 | 1.00    |         |         |
| FJAT-11266 ( <i>Enterobacter asburiae</i> ) X19              | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.50   | -0.50 | 1.00 ** | 1.00    |         |

\*  $P < 0.05$  在 0.05 水平显著相关, \* \*  $P < 0.01$  在 0.01 水平显著相关



(4)柑橘内生细菌群落结构聚类分析 以马氏距离为尺度,采用可变类平均法,对红心柚黄龙病株内生细菌进行聚类分析,当马氏距离为 27.23 时,柑橘黄龙病株内生细菌可以分为 3 大类(图 4):

第 I 大类 包括 *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus* 和 *Bacillus* sp. 4 种芽胞杆菌,其特征是在不同部位叶片均有分布,为完全分布类型,且分布量较大。第 I 大类又可分为两个亚类,第 I 亚类包括 *B. subtilis* 和 *B. cereus*,其特征为枝条和叶片分布特性,即在不同部位的枝条和叶片均有分布;第 II 亚类包括 *B. pumilus* 和 *Bacillus* sp.,其特征为叶片分布特性。

第 II 大类 包括 *A. calcoaceticus*, *E. hermannii*, *E. coli*, *C. flaccumfaciens*, *C. pusillum*, *C. citreum*, *B. flexus*, *B. altitudinis*, *S. pseudosanguinis*, *P. fluorescens*, *B. vesicularis*, *M. variable* 和 *B. brevis*,其特征是在各器官中均为不完全分布类型,且分布量不均匀,在有些部位分布量较大,有些部位分布量小或不分布。第 II 大类又可分为两个亚类,第 I 亚类包括 *A. calcoaceticus*, *E. hermannii*, *E. coli*, *C. flaccumfaciens* 和 *C. citreum* 其特征是这类内生细菌在不同器官、不同部位分布量不均匀,且平均含量中等。第 II 亚类包括 *C. pusillum*, *B. flexus*, *B. altitudinis*, *S. pseudosanguinis*, *P. fluorescens*, *B. vesicularis*, *M. variable* 和 *B. brevis*,其特征是枝条分布特性,即这类内生细菌只存在于枝条之中,且平均含量较小。

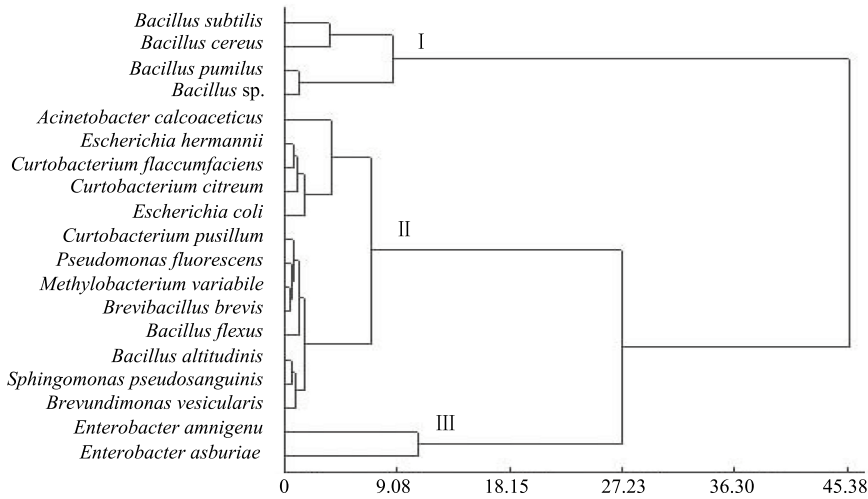


图 4 红心柚黄龙病株内生细菌聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis for endophytic bacteria in Citrus grandis Osbeck cv Chandler

第 III 大类 包括 *E. amnigenus* 和 *E. asburiae*,其特点是根部分布特性,即这类内生细菌仅存在于根部且其含量较大。

(5)柑橘内生细菌群落结构的多样性分析 柑橘不同器官内生细菌的多样性指数不同,枝条的 SIMPSON (*D*)指数最高为 1.0063,其次是叶片为 0.8032,根部最低为 0.4851;叶片的 SHANNON ( $H_1$ ) 指数最高为 2.2771,其次是枝条为 2.0663,根部最低为 0.9580;均匀度 Pielou 指数最高值出现在根部为 0.9580,其次是叶片为 0.8111,枝条最低为 0.5584。

表 21 不同器官内生细菌的多样性指数

Table 21 Diversity index of endophytic bacteria in different tissues

| 植物器官 Tissues | SIMPSON ( <i>D</i> ) | SHANNON ( $H_1$ ) | Pielou ( <i>J</i> ) |
|--------------|----------------------|-------------------|---------------------|
| 根 Root       | 0.4851               | 0.9580            | 0.9580              |
| 枝条 Stick     | 1.0063               | 2.0663            | 0.5584              |
| 叶片 Leaf      | 0.8032               | 2.2771            | 0.8111              |

3 讨论

研究植物内生细菌群落多样性可以选择多种指标,如磷脂脂肪酸 (PLFA)<sup>[11]</sup>、变性梯度凝胶电泳

(DGGE)<sup>[19]</sup>、物理芯片(PhyloChip Arrays)和16S rRNA序列<sup>[20]</sup>等,作者选用16S rRNA方法鉴定分离的柑橘黄龙病内生细菌,得到10个属19个种的柑橘内生细菌。王爱华等<sup>[7]</sup>根据细菌16SrDNA序列对柑橘黄龙病株叶脉内生细菌的多样性进行了研究,其分离到的包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)等9个属的内生细菌,其中6个属的细菌与本研究的不同。本研究分离的柑橘植株内生细菌大多为土壤微生物种类,其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)为最常见的属<sup>[21]</sup>。甲基杆菌属(*Methylobacterium*)<sup>[22]</sup>、短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)<sup>[23]</sup>、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)<sup>[24]</sup>、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)<sup>[25]</sup>,这些细菌已经从很多植物体内分离的到,而且部分菌属存在于柑橘植株内,其中大部分属的生理特性都已经有了了一定程度的研究。本研究分离得到的柑橘黄龙病株内生细菌中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)的种类和数量在叶片和枝条中都占有绝对的优势。这一结果与张铎等<sup>[26]</sup>从棉花、卢云等<sup>[27]</sup>从哈密瓜、高增贵等<sup>[28]</sup>从玉米中分离得到植物内生菌的优势菌株为芽孢杆菌(*Bacillus*)相一致。因为芽孢杆菌属(*Bacillus*)等可以分泌一些激素<sup>[29]</sup>、抗生素<sup>[30]</sup>等生长因子,对植物本身生长和病害防御有很重要的作用。根部内生细菌的种类单一,仅仅只有肠杆菌属(*Enterobacter*)。这种情况可能是由于肠杆菌属(*Enterobacter*)细菌本身含有很多产激素和抗菌物质的基因<sup>[31]</sup>,在保护植物的同时对其他根内生细菌具有抑制作用。

关于柑橘黄龙病的检测,可以采用田间诊断与指示植物鉴定<sup>[32]</sup>、血清学实验<sup>[33]</sup>、电镜检测<sup>[34]</sup>等是初期检测柑橘黄龙病的传统方法,然而这些方法有很多弊端,并会造成检测的不准确<sup>[35]</sup>。随着分子检测技术提高,常规PCR、Nested-PCR和RT-PCR已经应用到柑橘黄龙病的检测工作中。其中Nested-PCR技术在检测灵敏度上远高于常规PCR<sup>[36]</sup>,RT-PCR能够定量的检测柑橘黄龙病病原,这为柑橘黄龙病的检测提供了准确、灵敏的方法<sup>[37]</sup>。近年来,Hong lin等建立了一种STDP(single closed tube dual primer)-Taqman PCR<sup>[38]</sup>,这种方法将Nested-PCR和RT-PCR结合起来。本研究采用Nested-PCR对柑橘不同部位叶脉进行柑橘黄龙病病原检测,结果表明柑橘黄龙病发病状态的异质性,也即同一株柑桔黄龙病株在不同器官(叶、茎、根)、不同部位(上、中、下)、不同方位(东、西、南、北)感染黄龙病与否的状态不同,如在病株中部分叶(茎、根)是健康的,部分叶(茎、根)是染毒的;在西面上部和中部叶片及北面下部叶片中可以检测出柑橘黄龙病病原,但其并不会表现出柑橘黄龙病病症,由于黄龙病的潜伏期为6—18个月<sup>[39]</sup>,故有些不表现出黄化症状的叶片中含有黄龙病病原。关于不同部位柑橘叶片黄龙病病原携带状态异质性的研究未见报道。

植物内生菌是植物微生态系统中的重要组成部分,在长期的协同进化中,与植物形成了互惠互利的关系。一方面宿主植物产生的光和产物可为提供其生长所需的营养,另一方面内生菌产生的代谢产物常包含一些促生或抗菌的活性物质,能促进植物的生长发育,提高植物抗逆境、抗胁迫和抗病害的能力<sup>[40]</sup>。Clay等<sup>[41]</sup>发现有内生真菌的草遭受真菌病害影响的程度远低于没有内生菌的。王万能和肖崇刚<sup>[42]</sup>从烟草根部分离出能防治烟草黑胫病的内生细菌。石晶盈等<sup>[43]</sup>研究发现有些内生菌能产生抗生素类物质对病菌有拮抗作用。然而柑橘黄龙病病原与柑橘内生细菌之间的相关性还未见报道,本文通过PCC分析得出叶片黄龙病病原存在与否与*B. pumilus*和*Bacillus* sp.的之间呈显著负相关,这说明这两种细菌对黄龙病病原菌的存在可能会有抑制作用。其中*B. pumilus*已有研究报道可以产生一些生防物质并抑制一些病原菌的生长<sup>[44]</sup>,Trivedi等<sup>[45]</sup>从柑橘根部分离得到的内生细菌中,有6株内生细菌对叶片中黄龙病病原菌(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)的生长有明显的抑制作用。其中的内生细菌*Bacillus licheniformis*与本研究得到的部分内生细菌同为芽孢杆菌属。

柑橘内生细菌的分布量与其生长环境关系密切,柑橘不同器官其内生细菌分布量不同,根部分布量最大,其次是叶片,枝条分布量最小,与黎起秦等研究番茄内生菌分布特性的结果一致,他认为番茄根系是内生细菌进入植物的入口,此处有较多植物次生根,机械损伤及病虫害会造成伤口,因此聚集的内生细菌较多<sup>[46]</sup>。在自然界中微生物与微生物之间存在着复杂相互关系,植物内生细菌之间的相互关系也不列外<sup>[47]</sup>。本文通过PCC分析了柑橘不同器官(叶、茎、根)、不同部位(上、中、下)和不同方位(东、西、南、北)的内生细菌之间的相关性,结果发现:在不同器官之间、叶片与枝条相互之间存在显著正相关,而叶片与根部、枝条与根部之间

关系不显著;不同部位叶片、枝条之间的内生细菌差异不显著,而不同方位叶片、枝条之间的内生细菌含量差异显著,这可能与柑橘种植的朝向生态因子的差异有关。

有大量研究表明植物内生细菌群落结构与自身生长环境,营养条件,遗传背景有关<sup>[48]</sup>。多样性指数可做度量微生物群落多样性高低的指标。Maguran<sup>[49]</sup>指出 SHANNON( $H_1$ ) 指数反映群落物种多样性,指数越高表明物种的数量越多,且在采样单位中分布越均匀;SIMPSON( $D$ ) 指数反映群落中物种的优势度,指数越高表明物种在样品中的集中度越高;Pielou 指数反映群落物种分布的均匀程度。本研究发现柑橘不同器官的内生细菌群落多样性不同,SHANNON( $H_1$ ) 指数最大值出现在叶片,最低在根部,表明柑橘黄龙病植株叶片分布的内生细菌分布量最大,且在各部位(上、中、下及东、西、南、北)分布较均匀,根部内生细菌分布量最少;SIMPSON( $D$ ) 指数最大值出现在枝条,最低在根部,表明柑橘黄龙病植株枝条中分离内生细菌种类最集中,根部内生细菌种类最少;Pielou 指数最大值出现在根部,最低在枝条,表明根部内生细菌分布均匀度最高,枝条内生细菌在各部位(上、中、下及东、西、南、北)分布最不均匀。柑橘内生菌这种分布的异质性对于认识柑橘生长的生态环境和黄龙病的发生具有重要意义。

## References:

- [1] Fan G C, Liu B, Wu R J, Li T, Cai Z J, Ke C. Thirty years of research on citrus huanglongbing in China. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 24(2): 183-190.
- [2] Kong W W, Deng X L, Liang Z H, Tang W W. Cloning and sequencing of the citrus Huanglongbing pathogen DNA. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2000, 30(1): 71-75.
- [3] Ding F, Hong N, Zhong Y, Yi G J, Wang G P. Studies on 16S rDNA sequence of citrus huanglongbing bacteria in China. *Acta Horticulturae Sinica*, 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] Lacava P T, Araújo W L, Marcon J, Maccheroni W Jr, Azevedo J L. 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.
- [6] Lacava P T, Li W, Araújo W L, Azevedo J L, Hartung J S. The endophyte *Curtobacterium flaccumfaciens* reduces symptoms caused by *Xylella fastidiosa* in *Catharanthus roseus*. *Journal of Microbiology*, 2007, 45(5): 388-393.
- [7] Wang A H, Yin Y P, Xiong H L, Li Y F, Li J, Xian J X, Wang Z K. Endophytic bacterial diversity analysis of huanglongbing pathogen-infected citrus phloem tissue in Guangxi. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(23): 4823-4833.
- [8] Hu G P, Zheng X F, You M S, Liu B. Recent advances in research on endophytes. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 25(2): 226-234.
- [9] Zou W X, Tan R X. Recent advances on endophyte research. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(9): 881-892.
- [10] Yuan J, Sun F, Tian H, Cui L, Zhao T C. Isolation and screening of beneficial endophytic bacteria to control bacterial ring rot of potato. *Acta Microbiologica Sinica*, 2002, 42(3): 270-274.
- [11] Lan J L, Liu B, Chen L, Xiao R F, Shi H, Su M X. Characteristics of PLFA biomarkers for the endophytic bacteria inside Musa plants. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(10): 2045-2055.
- [12] Lan J L, Liu B, Zhu Y J, Tang Q R, Lin K M, Su M X, Shi H. Community and diversity of endophytic bacteria inside eggplant. *Ecology and Environment*, 2009, 18(4): 1433-1442.
- [13] Rainey F A, Ward-Rainey N, Kroppenstedt R M, Stackebrandt E. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(4): 1088.
- [14] Huang J F, Li J, Liu Q, Wang Q. Screening, identification and antibiotic effect of a strain of bacillus. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2008, 36(6): 2321-2322, 2326-2326.
- [15] Huang X, Gao M L, Zhang Y Y, Xu Z Q. An optimum method of extracting plant genomic DNA. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2004, 24(6): 1103-1106.
- [16] Benyon L S, Zhou L J, Duan Y P, Powell C A, Gottwald T R. Improved detection of low-titer, non-lethal, seed transmitted *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus, periwinkle and dodder using nested PCR. *International Research Conference on Huanglongbing*, 2008: 121-121.
- [17] Pan H X, Cheng Z M, Mu S Y, Qi X L, Bao Q. Distribution of Rhizosphere soil microbes of fritillaria pallidiflora and their correlation with imperialine Content. *Microbiology*, 2010, 37(8): 1253-1257.
- [18] Yang N, Zou D S, Li J G. Study on Numerical classification and species diversity of plant community in a sloping-land with purple soils in Hengyang basin. *Research of Agricultural Modernization*, 2009, 30(5): 615-619.
- [19] Garbeva P, van Overbeek L S, van Vuurde J W L, van Elsas J D. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing

- gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. *Microbial Ecology*, 2001, 41(4): 369-383.
- [20] Sagaram U S, Deangelis K M, Trivedi P, Andersen G L, Lu S E, 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): 1566-1574.
- [21] Mcinroy J A, Kloepper J W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 1995, 173(2): 337-342.
- [22] Araújo W L, Marcon J, Maccheroni W Jr, van Elsas J D, van Vuurde J W L, Azevedo J L. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(10): 4906-4914.
- [23] Cui L, Sun Z, Sun F Z, Yuan J, Tian H X, Wang L D, Xu H Y. Isolation of endophytic bacteria from potato and selection of antagonistic bacteria to potato ring rot disease. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33(4): 353-358.
- [24] Ulrich K, Ulrich A, Ewald D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(2): 169-180.
- [25] Che J M, Liu B, Zhang Y, Hu G P, Huang Q L, Chen Z D, Weng B Q. Distribution characteristics of endophytic bacteria isolated from forage grasses. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(3): 124-131.
- [26] Zhang D, Xie L, Zhang L, Zhang L P, Zhao B H. Screening identification and characterization of the antifungal substance of antagonistic endophytic bacteria against *Vorticillium dahliae*. *Journal of Hebei Normal University (Natural Science Edition)*, 2008, 32(5): 673-678.
- [27] Lu Y, Luo M. Isolation of endophytic bacteria from Hami melon and screening of antagonistic bacteria. *Journal of Shihezi University (Natural Science)*, 2004, 22(Z1): 104-109.
- [28] Gao Z G, Zhuang J H, Chen J, Liu X, Tang S G. Population of entophytic bacteria in maize roots and its dynamic analysis. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(8): 1344-1348.
- [29] Ali B, Sabri A N, Ljung K, Hasnain S. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(3): 519-526.
- [30] Tabbene O, Ben Slimene I, Mangoni M L, Urdaci M C, Limam F, Bouabdallah F. Production of anti-methicillin-resistant *Staphylococcus* activity from *Bacillus subtilis* sp. strain B38 newly isolated from soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 157(3): 407-419.
- [31] Taghavi S, Lelie D, Hoffman A, Zhang Y B, Walla M D, Vangronsveld J, Newman L, Monchy S. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *Plos Genetics*, 2010, 6(5): 808-811.
- [32] Zou M, Zhou C Y. Advances in pathogen research and detection technique of huanglongbing. *Plant Protection*, 2005, 31(3): 10-14.
- [33] Li D W, Tang W W, Fan H Z. Preliminary studies on the methods of rapid serological detection and diagnosis of the BLO associated with citrus shoot-yellowing. *J South China Agricultural Univrsy*, 1992, 13(2): 16-22.
- [34] Liu L H, Yao J A, Wang M Z, Chen Y M, Zhong Z W. Review and prospect of citrus huanglongbing research. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2006, 21(4): 317-320.
- [35] Liao X L, Liu K Y, Zhao Z Y. Early detection of citrus huanglongbing pathogen in shoot-tip grafting plant. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(9): 2578-2578.
- [36] Ding F, Yi G J, Wang G P. Research on the PCR and Nested-PCR detection of citrus huanglongbing pathogen. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31(6): 803-806.
- [37] Hu H, Yin Y P, Zhang L P, Zhao Y, Xia Y X, Wang Z K, Tan J. Detection of citrus huanglongbing by conventional and two fluorescence quantitative PCR assays. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(12): 2491-2497.
- [38] Lin H, Chen C, Doddapaneni H. A new diagnostic system for ultra-sensitive and specific detection and quantification of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, the bacterium associated with citrus huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 81(1): 17-25.
- [39] Xie Z C, Li J, Shi Q, Xie W L, Yang J R, Chen Y F, Zhong L S. Damage and epidemics of citrus huanglongbing in Fujian province. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(11): 3888-3897.
- [40] Wang J, Diao Z M, Xu G, Xiao Q Q, Zeng Z K. Study and application on endophyt. *Qinghai Prataculture*, 2008, 17(1): 24-28.
- [41] Clay K, Cheplick G P, Wray S M. Impact of the fungus *Balansin henningsinn* on the grass *Panicum agrostoides*; frequency of infection, plant growth and reproduction and resistance to pests. *Oecologia*, 1989, 80: 374-380.
- [42] Wang W N, Xiao C G. A study of the mechanisms of controlling tobacco black shank (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) with endophytic bacterium strain 118. *Journal of Southwest Agricultural University*, 2003, 25(1): 28-31.
- [43] Shi J Y, Liu A Y, Feng S J, Li X P, Chen W X. Identification and biocontrol effect of endophytic bacterial strain MG-Y2 isolated from papaya. *Journal of Fruit Science*, 2007, 24(6): 810-814.
- [44] Leifert C, Li H, Chidburee S, Hampson S, Workman S, Sigee D, Epton H A S, Harbour A. Antibiotic production and biocontrol activity by *bacillus subtilis* CI27 and *bacillus pumilus* CI45. *Journal of Applied Microbiology*, 1995, 78(2): 97-108.
- [45] Trivedi P, Spann T, Wang N. Isolation and characterization of beneficial bacteria associated with citrus roots in Florida. *Microbial Ecology*, 2011, 62(2): 1-13.
- [46] Li Q Q, Xie Y L, Lin W, Wei J G, Luo K. Distribution and diversity of endophytic bacteria in tomato plants from Guangxi. *Biodiversity Science*, 2006, 14(6): 534-540.
- [47] Zeng S R, Ke Y, Fang B Y, Zhang L Q. Diversity and correlation of endophytic fungi and rhizosphere fungi isolated from *Diphylleia sinensis*. *Journal of Zhuzhou Institute of Technology*, 2005, 19(1): 25-27.



- [48] Hu G P, You M S, Liu B, Zhu Y Q, Zheng X F, Lin Y Z. Relationship between the stem endophytic and rhizosphere bacteria and the variety characteristics of *Oryza sativa*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31(6): 1026-1030.
- [49] Maguran A E. *Ecological Diversity and Its Measurement*. Princeton: Princeton University Press, 1998: 141-162.

#### 参考文献:

- [1] 范国成, 刘波, 吴如健, 李韬, 蔡子坚, 柯冲. 中国柑橘黄龙病研究 30 年. *福建农业学报*, 2009, 24(2): 183-190.
- [2] 孔维文, 邓晓玲, 梁志慧, 唐伟文. 柑桔黄龙病病原 DNA 片段的克隆及序列分析. *植物病理学报*, 2000, 30(1): 71-75.
- [3] 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.
- [7] 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.
- [8] 胡桂萍, 郑雪芳, 尤民生, 刘波. 植物内生菌的研究进展. *福建农业学报*, 2010, 25(2): 226-234.
- [9] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展. *植物学报*, 2001, 43(9): 881-892.
- [10] 袁军, 孙福在, 田宏先, 崔林, 赵廷昌. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选. *微生物学报*, 2002, 42(3): 270-274.
- [11] 蓝江林, 刘波, 陈璐, 肖荣凤, 史怀, 苏明星. 芭蕉属植物内生细菌磷脂脂肪酸 (PLFA) 生物标记特性研究. *中国农业科学*, 2010, 43(10): 2045-2055.
- [12] 蓝江林, 刘波, 朱育菁, 唐秋榕, 林抗美, 苏明星, 史怀. 茄子植物内生细菌群落结构与多样性. *生态环境学报*, 2009, 18(4): 1433-1442.
- [14] 黄剑飞, 李健, 刘淇, 王群. 一株芽孢杆菌的分离、鉴定及其抗菌效果研究. *安徽农业科学*, 1993, 36(6): 2321-2322, 2326-2326.
- [15] 黄莹, 高丽美, 张永彦, 徐子勤. 一种优化的植物总 DNA 提取方法. *西北植物学报*, 2004, 24(6): 1103-1106.
- [17] 潘惠霞, 程争鸣, 牟书勇, 齐晓玲, 包群. 伊贝根际微生物分布与西贝素的相关性. *微生物学通报*, 2010, 37(8): 1253-1257.
- [18] 杨宁, 邹冬生, 李建国. 衡阳盆地紫色土丘陵坡地植物群落数量分类及物种多样性研究. *农业现代化研究*, 2009, 30(5): 615-619.
- [23] 崔林, 孙振, 孙福在, 袁军, 田宏先, 王利琴, 徐惠云. 马铃薯内生细菌的分离及环腐病拮抗菌的筛选鉴定. *植物病理学报*, 2003, 33(4): 353-358.
- [25] 车建美, 刘波, 张彦, 袁军, 田宏先, 王利琴, 徐惠云. 几种禾本科牧草内生细菌的分布特性. *草业学报*, 2010, 19(3): 124-131.
- [26] 张铎, 谢莉, 张蕾, 张丽萍, 赵宝华. 棉花黄萎病拮抗内生菌的筛选鉴定及抗菌物质研究. *河北师范大学学报(自然科学版)*, 2008, 32(5): 673-678.
- [27] 芦云, 罗明. 哈密瓜内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2004, 22(Z1): 104-109.
- [28] 高增贵, 庄敬华, 陈捷, 刘限, 唐树戈. 玉米根系内生细菌种群及动态分析. *应用生态学报*, 2004, 15(8): 1344-1348.
- [32] 邹敏, 周常勇. 柑桔黄龙病病原和检测方法研究进展. *植物保护*, 2005, 31(3): 10-14.
- [33] 李德望, 唐伟文, 范怀忠. 柑桔黄龙病的血清学检测与诊断方法的初步研究. *华南农业大学学报*, 1992, 13(2): 16-22.
- [34] 刘利华, 姚锦爱, 王茂珠, 陈玉妹, 种藏文. 柑桔黄龙病研究的回顾与展望. *福建农业学报*, 2006, 21(4): 317-320.
- [35] 廖祥六, 刘魁英, 赵宗芸. 柑桔微芽嫁接苗黄龙病的早期检测. *安徽农业科学*, 2007, 35(9): 2578-2578.
- [36] 丁芳, 易干军, 王国平. 应用 PCR 及 Nested-PCR 技术检测柑桔黄龙病病原研究. *园艺学报*, 2004, 31(6): 803-806.
- [37] 胡浩, 殷幼平, 张利平, 赵云, 夏玉先, 王中康, 覃健. 柑桔黄龙病的常规 PCR 及荧光定量 PCR 检测. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2491-2497.
- [39] 谢钟琛, 李健, 施清, 谢文龙, 杨建榕, 陈跃飞, 钟连生. 福建省柑橘黄龙病危害及其流行规律研究. *中国农业科学*, 2009, 42(11): 3888-3897.
- [40] 王坚, 刁治民, 徐广, 肖前青, 曾智科. 植物内生菌的研究概况及其应用. *青海草业*, 2008, 17(1): 24-28.
- [42] 王万能, 肖崇刚. 烟草内生细菌 118 防治黑胫病的机理研究. *西南农业大学学报*, 2003, 25(1): 28-31.
- [43] 石晶盈, 刘爱媛, 冯淑杰, 李雪萍, 陈维信. 番木瓜内生细菌 MG-Y2 的鉴定及其生防作用. *果树学报*, 2007, 24(6): 810-814.
- [46] 黎起秦, 谢义灵, 林伟, 韦继光, 罗宽. 广西番茄内生细菌的多样性和数量动态. *生物多样性*, 2006, 14(6): 534-540.
- [47] 曾松荣, 柯野, 方白玉, 张玲琪. 南方山荷叶内生真菌与根际真菌的多样性及相关性探讨. *株洲工学院学报*, 2005, 19(1): 25-27.
- [48] 胡桂萍, 尤民生, 刘波, 朱育菁, 郑雪芳, 林营志. 水稻茎部内生细菌及根际细菌与水稻品种特性的相关性. *热带作物学报*, 2010, 31(6): 1026-1030.

CONTENTS

|                                                                                                                                                                    |                                                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| The community structure of endophytic bacteria in different parts of huanglongbing-affected citrus plants .....                                                    | LIU Bo, ZHENG Xuefang, SUN Daguang, et al (7325)         |
| A research on the response of the radial growth of <i>Pinus koraiensis</i> to future climate change in the XiaoXing'AnLing .....                                   | YIN Hong, WANG Jing, LIU Hongbin, et al (7343)           |
| Efficiency and kinetic process of nitrogen removal in a subsurface wastewater infiltration system (SWIS) .....                                                     | LI Haibo, LI Yinghua, SUN Tieheng, et al (7351)          |
| Designing nature reserve systems based on ecosystem services in Hainan Island .....                                                                                | XIAO Yi, CHEN Shengbin, ZHANG Lu, et al (7357)           |
| Assessing ecological services value of herbivorous wild animals in Changtang grassland: a case study of Tibetan antelope .....                                     | LU Chunxia, LIU Ming, FENG Yue, et al (7370)             |
| Spatial characteristics analysis of ecological system service value in QianJiang City of Hubei Province .....                                                      | XU Beishen, ZHOU Yong, XU Li, et al (7379)               |
| Landscape pattern change and its influence on soil carbon pool in Napahai wetland of Northwestern Yunnan .....                                                     | LI Ningyun, YUAN Hua, TIAN Kun, et al (7388)             |
| Multi-scenarios analysis for wetlands ecosystem conservation based on connectivity: a case study on HuangHuaiHai Region, China ...                                 | SONG Xiaolong, LI Xiaowen, ZHANG Mingxiang, et al (7397) |
| The potential of carbon sink in alpine meadow ecosystem on the Qinghai-Tibetan Plateau .....                                                                       | HAN Daorui, CAO Guangmin, GUO Xiaowei, et al (7408)      |
| The relations of spectrum reflectance with inhomogeneous factors and albedo parameterization ...                                                                   | ZHANG Jie, ZHANG Qiang (7418)                            |
| Groundwater ecological sensitivity assessment in the lower Liaohe River Plain based on GIS technique .....                                                         | SUN Caizhi, YANG Lei, HU Dongling (7428)                 |
| Ecological sensitivity of Xiamen City to land use changes .....                                                                                                    | HUANG Jing, CUI Shenghui, LI Fangyi, et al (7441)        |
| Investigation and analysis on situation of ecotourism development in protected areas of China .....                                                                | ZHONG Linsheng, WANG Jing (7450)                         |
| Handicapping male-cheaters by stable mate relationship in yellow-bellied prinia, <i>Prinia flaviiventris</i> .....                                                 | CHU Fuyin, TANG Sixian, PAN Hujun, et al (7458)          |
| Effects of dietary protein content and food restriction on the physiological characteristics of female <i>Microtus fortis</i> .....                                | ZHU Junxia, WANG Yong, ZHANG Meiwen, et al (7464)        |
| Predator-prey system with positive effect for prey .....                                                                                                           | QI Jun, SU Zhiyong (7471)                                |
| Volatile constituents of four moraceous host plants of <i>Apriona germari</i> .....                                                                                | ZHANG Lin, WANG Baode, XU Zhichun (7479)                 |
| Relationship between adult emergence of <i>Massicus raddei</i> (Coleoptera: Cerambycidae) and temperature and relative humidity .....                              | YANG Zhongqi, WANG Xiaoyi, WANG Bao, et al (7486)        |
| Nest site selection and reproductive success of <i>Parus varius</i> in man-made nest boxes .....                                                                   | LI Le, WAN Dongmei, LIU He, et al (7492)                 |
| A study on bio-ecology of the stopover site of waders within China's Yalu River estuary wetlands .....                                                             | SONG Lun, YANG Guojun, LI Ai, et al (7500)               |
| The spatial-temporal change variations of temperature in Xilinguole steppe zone .....                                                                              | WANG Haimei, LI Zhenghai, WU Lan, et al (7511)           |
| The growth and photosynthetic responses of <i>Cleyera japonica</i> Thunb. seedlings to UV-B radiation stress .....                                                 | LAN Chunjian, JIANG Hong, HUANG Meiling, et al (7516)    |
| Photosynthesis-transpiration coupling mechanism of wheat and maize during daily variation .....                                                                    | ZHAO Fenghua, WANG Qiufeng, WANG Jianlin, et al (7526)   |
| Comparison of the methods using stable hydrogen and oxygen isotope to distinguish the water source of <i>Nitratia Tangutorum</i> .....                             | GONG Guoli, CHEN Hui, DUAN Deyu (7533)                   |
| Effects of cold weather on seedlings of three mangrove species planted in the Min River estuary during the 2010 winter .....                                       | YONG Shiquan, TONG Chuan, ZHUANG Chenhui, et al (7542)   |
| Correlation between ecological factors and ginsenosides .....                                                                                                      | XIE Caixiang, SUO Fengmei, JIA Guanglin, et al (7551)    |
| Effects of pyrene on low molecule weight organic compounds in the root exudates of ryegrass ( <i>Lolium perenne</i> L.) .....                                      | XIE Xiaomei, LIAO Min, YANG Jing (7564)                  |
| Isolation of phosphate solubilizing fungus ( <i>Aspergillus niger</i> ) from <i>Caragana</i> rhizosphere and its potential for phosphate solubili-<br>zation ..... | ZHANG Lizhen, FAN Jingjing, NIU Wei, et al (7571)        |
| Effect of raindrop impact on nutrient losses under different near -surface soil hydraulic conditions on black soil slope .....                                     | AN Juan, ZHENG Fenli, LI Guifang, et al (7579)           |
| Emergy analysis of coal-fired power generation system and construction of new emergy indices .....                                                                 | LOU Bo, XU Yi, LIN Zhenguan (7591)                       |
| <b>Review and Monograph</b>                                                                                                                                        |                                                          |
| The impact of forest vegetation change on water yield in the subalpine region of southwestern China .....                                                          | ZHANG Yuandong, LIU Shirong, et al (7601)                |
| Reviews on spatial pattern and sand-binding effect of patch vegetation in arid desert area .....                                                                   | HU Guanglu, ZHAO Wenzhi, WANG Gang (7609)                |
| Sustainable management on pests by agro-biodiversity .....                                                                                                         | GAO Dong, HE Xiahong, ZHU Shusheng (7617)                |
| <b>Scientific Note</b>                                                                                                                                             |                                                          |
| Characteristics of organic carbon and nutrient content in five soil types in Honghu wetland ecosystems .....                                                       | LIU Gang, SHEN Shouyun, YAN Wende, et al (7625)          |
| Effects of cypermethrin and deltamethrin on reproduction of <i>Brachionus calyciflorus</i> .....                                                                   | HUANG Lin, LIU Changli, WEI Chuanbao, et al (7632)       |

# 《生态学报》2012 年征订启事

《生态学报》是中国生态学学会主办的自然科学高级学术期刊,创刊于 1981 年。主要报道生态学研究原始创新性科研成果,特别欢迎能反映现代生态学发展方向的优秀综述性文章;研究简报;生态学新理论、新方法、新技术介绍;新书评介和学术、科研动态及开放实验室介绍等。

《生态学报》为半月刊,大 16 开本,280 页,国内定价 70 元/册,全年定价 1680 元。

国内邮发代号:82-7 国外邮发代号:M670 标准刊号:ISSN 1000-0933 CN 11-2031/Q

全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系购买。欢迎广大科技工作者、科研单位、高等院校、图书馆等订阅。

通讯地址:100085 北京海淀区双清路 18 号 电 话:(010)62941099; 62843362

E-mail: shengtaixuebao@rcees.ac.cn 网 址: www.ecologica.cn

编辑部主任 孔红梅 执行编辑 刘天星 段 靖

生 态 学 报  
(SHENGTAI XUEBAO)  
(半月刊 1981 年 3 月创刊)  
第 31 卷 第 24 期 (2011 年 12 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA  
(Semimonthly, Started in 1981)  
Vol. 31 No. 24 2011

|               |                                                                                                                    |                 |                                                                                                                                                                                 |
|---------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 编 辑           | 《生态学报》编辑部<br>地址:北京海淀区双清路 18 号<br>邮政编码:100085<br>电话:(010)62941099<br>www.ecologica.cn<br>shengtaixuebao@rcees.ac.cn | Edited by       | Editorial board of<br>ACTA ECOLOGICA SINICA<br>Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China<br>Tel:(010)62941099<br>www.ecologica.cn<br>Shengtaixuebao@rcees.ac.cn |
| 主 编           | 冯宗炜                                                                                                                | Editor-in-chief | FENG Zong-Wei                                                                                                                                                                   |
| 主 管           | 中国科学技术协会                                                                                                           | Supervised by   | China Association for Science and Technology                                                                                                                                    |
| 主 办           | 中国生态学学会<br>中国科学院生态环境研究中心<br>地址:北京海淀区双清路 18 号<br>邮政编码:100085                                                        | Sponsored by    | Ecological Society of China<br>Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS<br>Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China                                 |
| 出 版           | 科 学 出 版 社<br>地址:北京东黄城根北街 16 号<br>邮政编码:100717                                                                       | Published by    | Science Press<br>Add:16 Donghuangchenggen North Street,<br>Beijing 100717, China                                                                                                |
| 印 刷           | 北京北林印刷厂                                                                                                            | Printed by      | Beijing Bei Lin Printing House,<br>Beijing 100083, China                                                                                                                        |
| 发 行           | 科 学 出 版 社<br>地址:东黄城根北街 16 号<br>邮政编码:100717<br>电话:(010)64034563<br>E-mail:journal@cspg.net                          | Distributed by  | Science Press<br>Add:16 Donghuangchenggen North<br>Street, Beijing 100717, China<br>Tel:(010)64034563<br>E-mail:journal@cspg.net                                                |
| 订 购           | 全国各地邮局                                                                                                             | Domestic        | All Local Post Offices in China                                                                                                                                                 |
| 国外发行          | 中国国际图书贸易总公司<br>地址:北京 399 信箱<br>邮政编码:100044                                                                         | Foreign         | China International Book Trading<br>Corporation<br>Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China                                                                                      |
| 广告经营<br>许 可 证 | 京海工商广字第 8013 号                                                                                                     |                 |                                                                                                                                                                                 |



ISSN 1000-0933  
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元