

猕猴桃花、幼果微生物群落及病害感染途径初步分析

李 勇,陈海江,许 粟,吴文能*

(贵阳学院 食品与制药工程学院,贵州 贵阳 550005)

摘 要:本研究以猕猴桃花、幼果及患病幼果为研究对象,通过高通量测序的方法调查微生物群落结构差异,为揭示猕猴桃致病微生物的分布及感染途径提供参考。测序结果共获得细菌类群 32 个门、72 个纲、152 个目、182 个科和 223 个属,以及真菌类群 3 个门、15 个纲、36 个目、58 个科、81 个属。患病猕猴桃幼果中微生物多样性和丰富度均增加,在真菌群落结构中尤其明显。样品中未发现致病细菌,发现多个致病真菌属。患病猕猴桃果中检测到两种致病真菌互隔链格孢菌 *Alternaria alternata* 和茎点霉菌 *Phoma* sp.,且相对丰度较高,推测患病猕猴桃为真菌致病菌感染。高通量测序可获得大量微生物群落结构信息,为系统分析病原菌的入侵和潜在病害研究提供依据。

关键词:高通量测序;猕猴桃;致病微生物;多样性分析

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A

文章编号:1008-0457(2022)05-0028-07

国际 DOI 编码:10.15958/j.cnki.sdnyswxb.2022.05.005

近年来,贵州省猕猴桃产业规模进入全国前三,随着种植面积增加,由病原微生物引起的猕猴桃病害日益突出,造成重大经济损失。由细菌引起的猕猴桃病害有细菌性溃疡病^[1]、花腐病^[2-3],由真菌引起的有黑斑病、褐斑病、叶斑病^[1]、炭疽病^[4]、根腐病^[5]等。这些致病菌可危害猕猴桃的果实、叶片、根等部位。目前关于猕猴桃微生物的病害集中于病原菌的分离纯化,辅以侵染试验等,缺乏微生物群落对比及感染途径分析^[6-7]。对致病微生物是何时,通过何途径侵染到植株的研究仍然较为欠缺。目前针对微生物群落的调查有多种方法,如传统培养结合微生物形态学鉴定和生理生化鉴定^[8-9],或结合 PCR 手段如限制性片段长度多态性分析(RFLP)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)等。以及一些非培养方法,如变性梯度凝胶电泳(DGGE)、实时荧光 PCR、荧光原位杂交(FISH)等。这些技术均存在耗时、费力、结果可靠性差等缺陷。本研究利用的 Illumina NovaSeq 测序平台,具有测序通量高、周期短、准确率高、成本低等优点,在微生物多样性研究中有显著优势。本研究通过 Illumina NovaSeq 高通量测序平台对猕猴桃花、健康幼果和患病幼果的微生物进行测序,比较样品中群落结构差异,分析微生物群落结构变化,为揭示患腐

烂病猕猴桃的病原菌种类及感染途径提供参考。

1 材料与方 法

1.1 样品采集和命名

本研究猕猴桃品种为贵长,属贵州省自主选育并主要推广品种^[10]。采样地点为贵州省修文县,采集猕猴桃健康无病害的花朵、健康幼果及患病幼果,患病幼果症状为在果柄处开始出现腐烂迹象,并逐渐蔓延。采集后的样品装入样品袋,低温运输到实验室,并在 12 h 内对样品进行处理,无病害的猕猴桃花命名为 MHTH,健康幼果命名为 MHTG-1,患病幼果命名为 MHTG-2。

1.2 基因组 DNA 提取及多样性分析

分别提取各组样品的基因组 DNA,对其进行琼脂糖凝胶电泳以检测 DNA 的纯度和浓度。取适量样本 DNA 稀释浓度至 1 ng/ μ L,根据所选择的测序区域,分别以其为模板,使用带有 Barcode 的特异性引物,以及 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer(New England Biolabs 公司)对细菌的 16S rDNA V3-V4 区及真菌的 ITS1 区进行 PCR。检测 PCR 产物浓度,并根据浓度进行等量混样,通过琼脂糖凝胶电泳的方法检测 PCR 产物,对目的条带使用胶回收试剂盒(QIAGEN 公司)回收

收稿日期:2022-03-18;修回日期:2022-04-05

基金项目:贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2022]086);贵阳学院科研启动金项目(GYU-KY-[2022])

* 通讯作者:吴文能(1983—),男,博士,教授,主要从事植物保护研究,E-mail:wuwenneng123@126.com.

产物。最后利用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,质量检测合格后使用 NovaSeq6000 平台进行样品的测序工作。

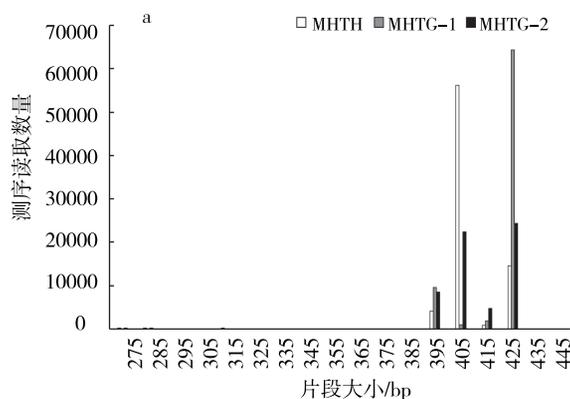
1.3 数据处理

对高通量初始数据进行处理,利用 FLASH (V1.2.7)^[11] 对每个样本的 reads 进行拼接,经过严格过滤处理得到高质量 Tags 数据。然后用 Usearch 软件对所有样品有效序列以 97% 一致性将序列聚类成为 OTU^[12];用 Mothur 和 SILVA 的 SSUrRNA 数据库进行物种注释分析^[13-14],对获得分类学信息分别在各个分类水平统计样本群落组成。使用 Qiime 软件计算 Shannon、Simpson、Chao1、Goods-coverage 指数,使用 R 软件绘制图像和 Alpha 和 Beta 多样性指数差异分析。

2 结果与分析

2.1 序列长度分布

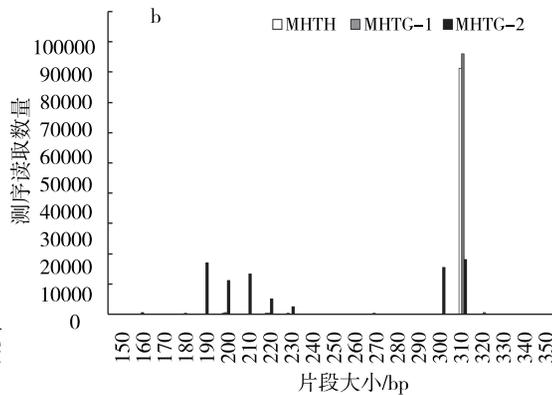
对各样品中细菌 16S rDNA 的 V3-V4 区进行



测序,共获得 266 533 条平均长度为 411 bp 的高质量序列(图 1),基本符合 16S rRNA 基因的 V3-V4 区序列长度(460 bp)。对样品中真菌 18S rDNA 的 ITS1 区域进行测序,共获得 260 919 条平均长度为 274 bp 的高质量序列(图 1),与 ITS1 区域长度(260 bp)基本一致。

2.2 样品复杂度分析

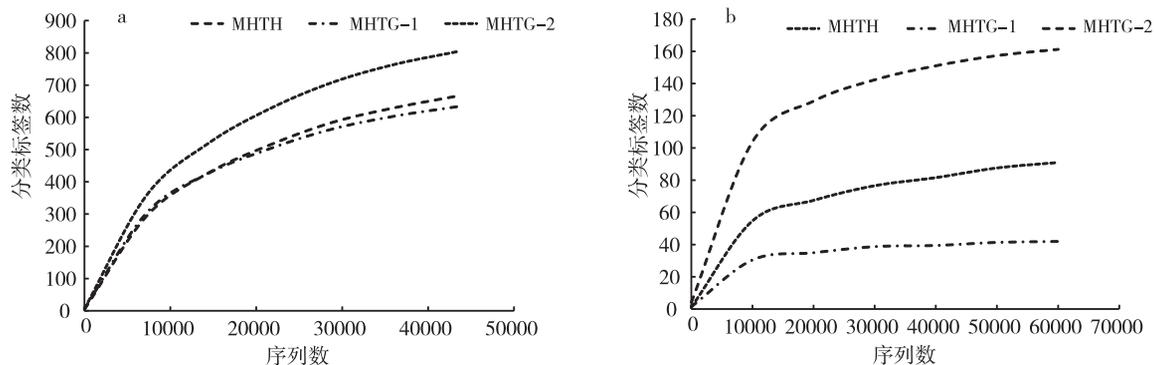
样品中分别针对细菌和真菌测序结果的稀释度曲线如图 2 所示,从图 2 可以看出,随着测序数量的增加,稀释曲线斜率均逐渐降低,趋于平坦。根据曲线最终趋势可以看出,对样品中真菌测序深度较高,增加测序数量也只会产生少量新 OTU。而对细菌继续增加测序数量,可能还会产生新 OTU。由表 1 也可得出同样结论,测序深度指数中 Good's coverage 代表了各样品文库的覆盖率,其数值越高,样品中未被测出序列概率越低,真菌测序的 Good's coverage 均为 1,3 个样品中细菌此数值分别为 0.996、0.996、0.995。Shannon 指数和 Simpson 指数(本文分析使用 Simpson's Index of Diversity,即



注:a 为细菌;b 为真菌。

图 1 序列长度分布

Fig. 1 Distribution of sequence length



注:a 为细菌;b 为真菌。

图 2 稀释度曲线

Fig. 2 Rarefaction curve

表 1 样品中微生物多样性指数

Tab. 1 Microbial diversity index

分类	样品名	多样性指数		丰富度指数		测序深度指数	
		香依指数	辛普森指数	Chao1 指数	ACE 指数	观测到物种数	覆盖度指数
细菌	MHTH	2.897	0.609	747.979	805.876	666	0.996
	MHTG-1	3.990	0.811	725.662	762.076	633	0.996
	MHTG-2	4.688	0.884	912.350	958.754	804	0.995
真菌	MHTH	0.297	0.049	101.688	107.309	91	1
	MHTG-1	0.478	0.097	44.000	45.051	42	1
	MHTG-2	2.700	0.714	171.762	172.406	161	1

1-D)均是用来估算样品中微生物多样性的指数,此二者数值越高,说明样品中微生物群落的多样性越高,样品 MHTG-2 的细菌和真菌多样性均高于其他两个样品,在真菌中更加明显。ACE 指数和 Chao1 指数均是用来估算样品中含有的 OTU 数目,表示群落丰富度,二者算法不同,Chao1 和 ACE 指数越大,说明群落中含有的 OTU 数目越多,样品中物种丰富度越大,对比发现 MHTG-2 的细菌和真菌多样性均高于其他两个样品。

2.3 OTU 聚类分析及维恩图分析

对宏基因组测序后的数据进行分析,所有样品

共获得细菌 Tags (过滤后得到的拼接序列数) 173 338 条,包括 164 970 条可获得分类信息的 Tags,7882 条低频 Tags。共获得真菌 Tags 191 499 条,包括 187 177 条可获得分类信息的 Tags,3354 条低频 Tags。对拼接的数据进行优化,在 97% 相似度下将其进行聚类为用于物种分析的 OTU, MHTH、MHTG-1、MHTG-2 样品获得的细菌 OTU 个数为 805、746 和 895 (图 3),获得的真菌样本分别是 99、43 和 168 (图 4)。比较 3 个样品中检测到的 Tags 数目以及 OTU 数目,健康的猕猴桃幼果 MHTG-1 稍低,但无显著性差异。

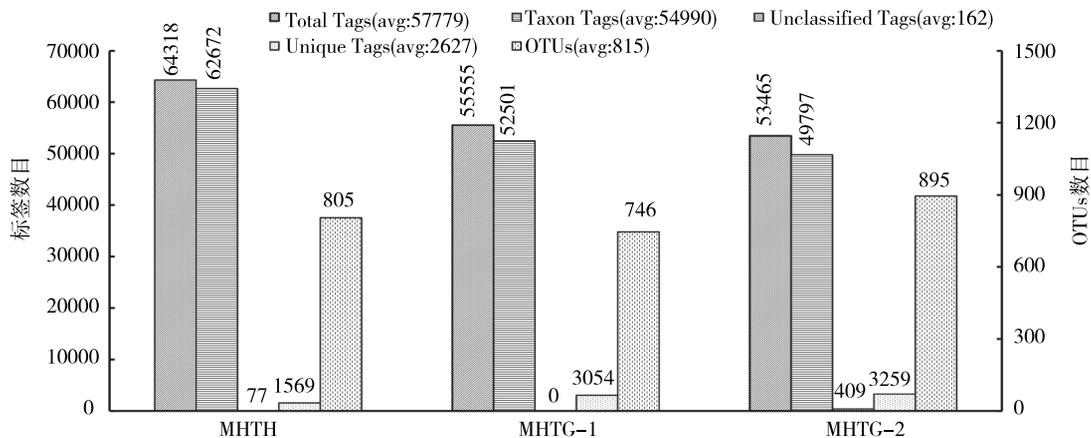


图 3 样品中的细菌 Tags 和 OTUs 数目统计

Fig. 3 Statistics of the bacterial numbers of tags and OTUs in samples

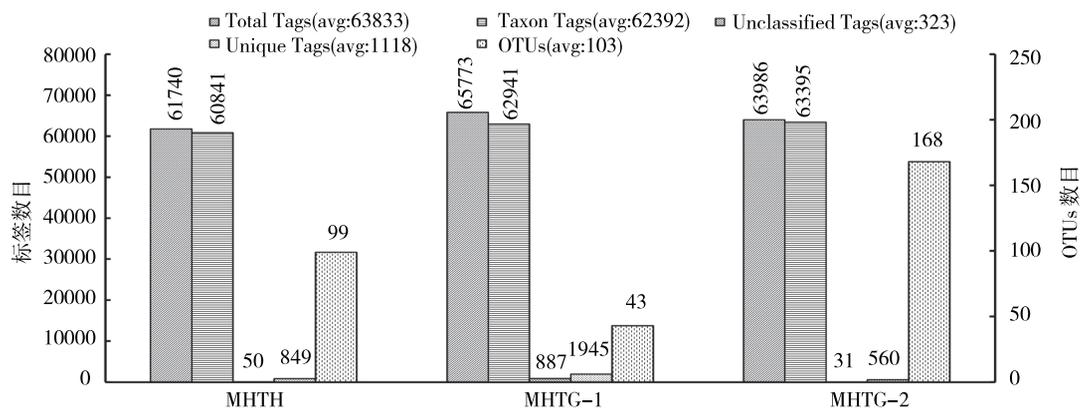


图 4 样品中的真菌 Tags 和 OTUs 数目统计

Fig. 4 Statistics of the fungal numbers of tags and OTUs in samples

3 组样品的细菌、真菌韦恩图如图 5 所示, MHTF、MHTG-1、MHTG-2 分别独有 212、140、238 个细菌 OTU, 以及 40、7、83 个真菌 OTU。3 组样品分别共有 374 和 26 个细菌和真菌 OTU, 样品 MHTG-2 中无论是细菌还是真菌类群独有 OTU 都是最多的。

样品中的测序数据可以注释到细菌门平均 28 个, 细菌属平均 212 个, 以及真菌门平均 3 个, 真菌属平均 53 个(表 2)。3 个样品中细菌类群较为接近, 样品 MHTG-2 中真菌在纲、目、科、属水平上均为最高。

表 2 细菌、真菌分类数目

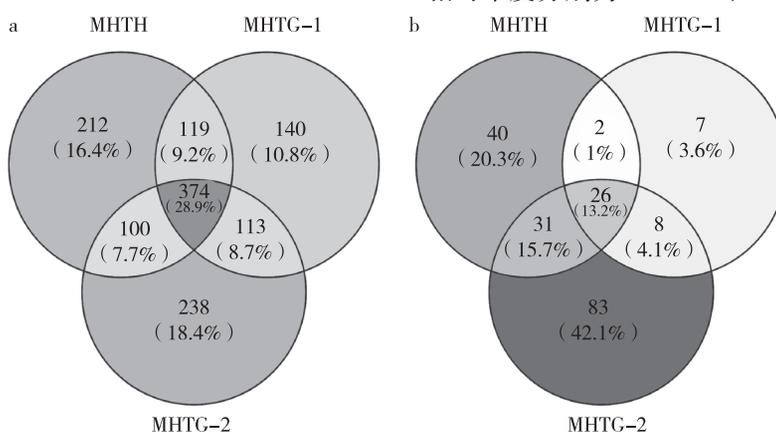
Tab.2 Number of bacteria and fungi classification level

样品	门	纲	目	科	属	
细菌	MHTH	32	72	152	181	203
	MHTG-1	27	60	142	173	209
	MHTG-2	26	62	145	182	223
真菌	MHTH	3	8	26	43	57
	MHTG-1	2	6	15	19	20
	MHTG-2	3	15	36	58	81

2.4 细菌物种多样性分析

图 6 列出了细菌门和属分类水平上物种丰度排名前十的分布状况, 结果表明, 3 个样品中细菌的主要门类为变形菌门 Proteobacteria、拟杆菌门 Bacteroidota、放线菌门 Actinobacteria、unidentified Bacteria 和厚壁菌门 Firmicutes, 其余门类的相对丰度均小于 1%, 优势菌均为变形菌门 Proteobacteria (74.98% 以上)。在属分类水平上, 各组的优势属类为寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* (8.14% ~ 44.48%)、假单胞菌属 *Pseudomonas* (12.86% ~ 16.85%)、*Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium* 属 (3.96% ~ 12.79%)、泛菌属 *Pantoea* (3.55% ~ 9.06%), 此四者均为变形菌门 Proteobacteria。

根据猕猴桃生长阶段和患病状况不同进行对比分析, 在门分类水平上 MHTH 及 MHTG-1 群落结构较为简单, 优势菌为变形菌门 Proteobacteria, 相对丰度分别为 88.43% 和 94.79%, 患病猕猴桃



注: a 为细菌; b 为真菌。

图 5 细菌和真菌韦恩图

Fig.5 Venn graphs of bacteria and fungi

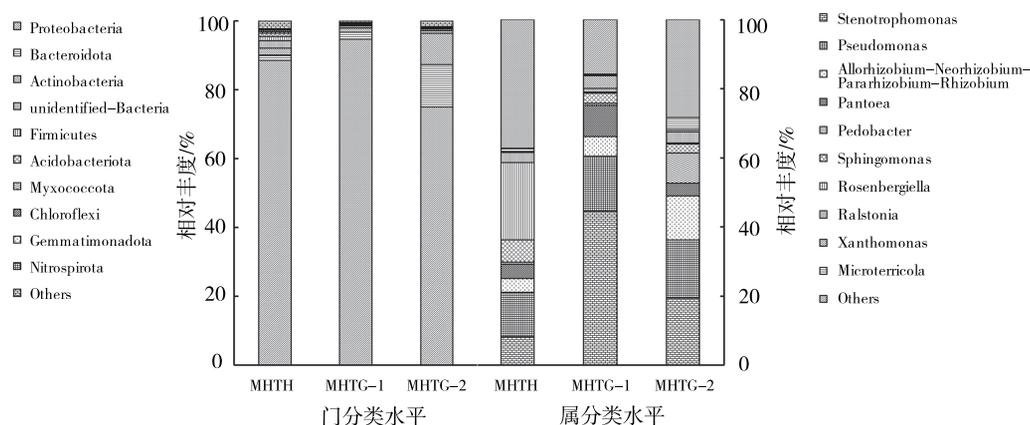


图 6 细菌门和属分类水平相对丰度排名前十的物种分布

Fig.6 Abundance (top 10) of bacteria in samples at phylum and genera level

MHTG-2 除变形菌门 *Proteobacteria* 外,拟杆菌门 *Bacteroidota*、放线菌门 *Actinobacteria* 相对丰度也较高,均为 10% 左右。在属分类水平上,除假单胞菌属 *Pseudomonas* 相对丰度均较高外,其他属微生物相对丰度变化较大。样品 MHTH 中占比最高的为 *Rosenbergiella*,相对丰度为 22.33%,样品 MHTG-1 和 MHTG-2 中占比最高的均为寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*,相对丰度分别为 44.48% 和 19.34%。

2.5 真菌物种多样性分析

图 7 列出了真菌门和属分类水平上物种丰度排名前十的分布情况,由图可知,3 个样品中真菌的主要门类为子囊菌门 *Ascomycota* (95.90% ~

99.20%),相对丰度占绝对优势。在 MHTG-2 中担子菌门 *Basidiomycota* 含量也较高,相对丰度为 3.22%。其余门类的相对丰度均小于 1%。

在属分类水平上,样品 MHTH 和 MHTG-1 中微孢子属 *Microidium* 为优势菌群,相对丰度分别为 98.24% 和 96.37%,其余属相对丰度均小于 1%。样品 MHTG-2 中相对丰度较高的有微孢子属 *Microidium*、枝孢菌属 *Cladosporium*、小双腔菌属 *Didymella*、不整小球囊菌属 *Plectosphaerella*、镰孢菌属 *Fusarium*、格孢菌属 *Alternaria*、附球菌属 *Epicoccum*、unidentified、维希尼克氏属 *Vishniacozyma*、*Boeremia*,相对丰度分别为 39.28%、18.47%、15.06%、8.68%、3.22%、3.18%、1.67%、1.65%、1.39%、1.11%。

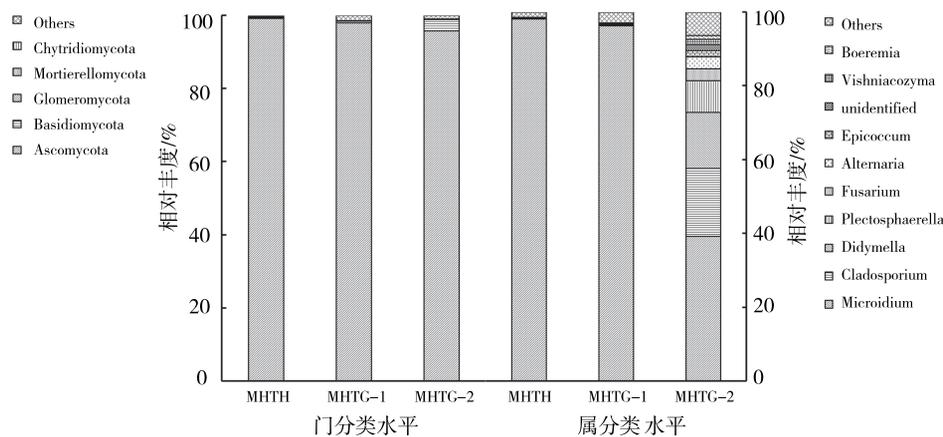


图 7 真菌门和属分类水平相对丰度排名前十的物种分布

Fig. 7 Abundance (top 10) of fungi in samples at phylum and genera level

3 结论与讨论

本研究利用高通量测序的方法对不同生长期、不同健康状况样品中微生物群落进行分析。发现 3 个样品中细菌类群微生物群落结构相差较小,丰度较高的属均为寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* 和假单胞菌属 *Pseudomonas*。寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas* 是一类革兰氏阴性菌,广泛分布于自然界,该属未发现有关植物致病菌存在。假单胞菌属 *Pseudomonas* 已知有 191 个种,多为植物致病菌,如浅绿黄假单胞菌 *P. viridiflava*^[15]、沙氏极毛杆菌 *P. savastanoi*^[16]、荧光假单胞菌 *P. fluorescens*、丁香假单胞菌的致病变株丁香致病变种 *P. syringae* pv. *Syringae* 及丁香假单胞菌猕猴桃致病变种 *P. syringae* pv. *Actinidiae*^[17] 均为猕猴桃致病菌,但几种微生物均未在本次测序结果中发现。

真菌群落的研究中,样品 MHTH 和 MHTG-1

在属分类水平上群落结构相似,与患病样品 MHTG-2 群落结构相差较大。前二者微孢子属 *Microidium* 占绝对优势,该属研究较少^[18],有些种可引起植物干粉病^[19],但未见有关猕猴桃致病菌的报道。MHTG-2 除微孢子属 *Microidium* 外,枝孢菌属 *Cladosporium*、小双腔菌属 *Didymella*、不整小球囊菌属 *Plectosphaerella*、镰孢菌属 *Fusarium*、格孢菌属 *Alternaria*、附球菌属 *Epicoccum*、unidentified、维希尼克氏属 *Vishniacozyma*、*Boeremia* 相对丰度也较高,可见患病猕猴桃中真菌群落结构较复杂,并可初步得出,患病猕猴桃属于真菌性致病菌感染。

可导致猕猴桃患病的真菌性致病菌种类较多,如 *Fusarium* 属就有尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*^[20]、层出镰刀菌 *F. proliferatum*^[21] 和三线镰刀菌 *F. tricinctum*,三者均可导致猕猴桃软腐病^[22];亚隔孢壳属 *Didymella* 属 *D. glomerata* 可导致猕猴桃

患黑斑病^[23]。本研究发现,在样品 MHTG-2 中发现互隔链格孢菌 *A. alternata* 和茎点霉菌 *Phoma* sp. 相对丰度较高,分别为 3.18% 和 1.03%,这两种微生物并未在样品 MHTH 和 MHTG-1 中发现。互隔链格孢菌 *A. alternata* 是一种常见的猕猴桃致病菌,可导致猕猴桃患黑斑病^[4] 和贮藏期软腐病^[24-25],茎点霉菌 *Phoma* sp. 同样可导致猕猴桃软腐病^[26]。

猕猴桃软腐病常见于贮藏期,通常果实外表无明显症状,但随着储存时间增长,猕猴桃内部开始腐烂。通过本研究发现,虽然猕猴桃花和健康的幼果中没有发现相关致病菌,但幼果可被感染并且发病,推断果园环境中存在相关致病微生物,可感染

幼果或成熟果,待条件合适时大肆繁殖,导致发病,发病时期可在生长期,或在贮藏期。下一步可对猕猴桃环境中的样品采样并进行高通量分析,以对本研究推测进行确认。同时指导种植户在猕猴桃种植园区喷施真菌杀菌剂,防范猕猴桃在生长、采摘、运输过程中的感染。

病原菌的入侵使微生物的多样性和丰富度均增加,在真菌群落结构中尤其明显。样品中未发现致病细菌,发现多种致病真菌,推断由果园环境感染。高通量测序获得大量微生物群落结构信息,为系统分析病原菌的入侵和潜在病害研究提供可靠依据。

(责任编辑:胡吉凤)

参 考 文 献:

- [1] 任春光,刘曼,李安定,等. 贵州猕猴桃病害的种类调查及防治建议[J]. 中国森林病虫,2015,34(1):23-25.
- [2] 胡方平,方敦煌,谢联辉. 中国猕猴桃细菌性花腐病菌的鉴定[J]. 植物病理学报,1998,28(2):80-86.
- [3] 张竹竹,龙友华,杨森,等. 猕猴桃花腐病的发生规律及防治措施[J]. 中国南方果树,2019,48(2):159-164.
- [4] 张国辉,李荣玉,李明,等. 黔东南州猕猴桃真菌病害种类和病原鉴定[J]. 中国森林病虫,2021,40(1):11-18.
- [5] Huang Y. Studies on the cause of root rot of kiwifruit in Guangdong Province[J]. Journal of South China Agricultural University,1998,19(4):19-22.
- [6] 李诚,蒋军喜,冷建华,等. 6种杀菌剂对猕猴桃主要腐烂病菌的室内毒力测定[J]. 中国南方果树,2012,41(1):3.
- [7] 梁英梅,张星耀,田呈明,等. 陕西省猕猴桃枝干溃疡病原菌鉴定[J]. 西北林学院学报,2000,15(1):37-39.
- [8] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.
- [9] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [10] 周红伟,叶旭,安华明. 贵长猕猴桃果实生长发育及矿质养分积累规律[J]. 山地农业生物学报,2021,40(2):67-70.
- [11] Magoc T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics,2011,27(21):2957-2963.
- [12] Haas B J, Gevers D, Earl A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons[J]. Genome Research,2011,21(3):494-504.
- [13] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nature Methods,2013,10(10):996-998.
- [14] Wang Q. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology,2007,73(16):5261-5267.
- [15] Young J M. Bacterial blight of kiwifruit in New Zealand[J]. EPPO Bulletin,1988,18(1):131-140.
- [16] Young J M, Gardan L, Ren X Z, et al. Genomic and phenotypic characterization of the bacterium causing blight of kiwifruit in New Zealand[J]. Plant Pathology,1997,46(6):857-864.
- [17] Lee Y, Han H, Kim G, et al. Causal agents of blossom blight of kiwifruit in Korea[J]. The Plant Pathology Journal,2009,25(3):220-224.
- [18] To-anun C, Kom-un S, Sunawan A, et al. A new subgenus, microidium, of oidium (Erysiphaceae) on phyllanthus spp. [J]. Mycoscience,2005,46(1):1-8.

- [19] Pan Y, Wu H, Di R. First report of powdery mildew caused by microidium phyllanthi on chamberbitter (*Phyllanthus urinaria*) in China[J]. *Plant Disease*, 2020, 104(8):2288.
- [20] 冯丽, 魏洪, 黄亚励, 等. 贵长猕猴桃腐烂菌的侵染途径及分离鉴定[J]. *中国酿造*, 2018, 37(2):66-70.
- [21] 左盼盼, 付苏, 彭丽桃, 等. 猕猴桃采后软腐病病原菌鉴定及香芹酚对其控制效果[J]. *华中农业大学学报*, 2020, 39(6):15-22.
- [22] 张美芳, 何玲, 张美丽, 等. ‘秦美’猕猴桃贮藏期病原真菌的鉴定[J]. *西北农业学报*, 2015, 24(6):132-137.
- [23] Pan H, Chen M Y, Deng L, et al. First report of *Didymella glomerata* causing black spot disease of kiwifruit in China[J]. *Plant Disease*, 2018, 102(12):2654.
- [24] Li L, Pan H, Liu W, et al. First report of *Alternaria alternata* causing postharvest rot of kiwifruit in China[J]. *Plant Disease*, 2017, 101(6):1046.
- [25] 段爱莉, 雷玉山, 孙翔宇, 等. 猕猴桃果实贮藏期主要真菌病害的 rDNA-ITS 鉴定及序列分析[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(4):810-818.
- [26] 龙明秀, 王辉, 蒋纬, 等. 固载 ClO₂ 保鲜剂对米良猕猴桃腐败菌的抑菌活性[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(4):342-346.

Preliminary Analysis of Disease Infection and Microbial Communities in Kiwifruit Flowers and Young Fruits

Li Yong, Chen Haijiang, Xu Su, Wu Wenneng*

(School of Food and Pharmaceutical Engineering, Guiyang University, Guiyang, Guizhou 550005, China)

Abstract: In this study, we investigated the differences in microbial community structure by high-throughput sequencing of kiwifruit flowers, young fruits, and diseased young fruits to provide a reference for revealing the distribution and infection pathways of pathogenic microorganisms in kiwifruit. A total of 32 phyla, 72 classes, 152 orders, 182 families, and 223 genera of bacteria and 3 phyla, 15 classes, 36 orders, 58 families and 81 genera of fungi were obtained from the sequencing results. The results showed that microbial diversity and abundance of samples increased in the diseased young kiwifruit, particularly in the fungal community structure. No pathogenic bacteria were found in the samples, and several pathogenic fungal genera were identified. Two pathogenic fungi, *Alternaria alternata* and *Phoma* sp. were detected with high relative abundance in diseased young fruits, and the diseased kiwifruit was presumed to be infected by fungal pathogenic. High-throughput sequencing can obtain a large amount of microbial community structure information, which can provide a basis for systematic analysis of pathogenic invasion and potential disease research.

Keywords: high-throughput sequencing; kiwifruit; pathogenic microbes; diversity analysis