

软腐猕猴桃果实真菌类病原菌的生物多样性分析

石浩^{1,2,3}, 王仁才^{1,3}, 王芳芳^{1,3}, 庞立^{1,3}, 王琰^{1,4}, 卜范文⁵, 周倩^{1,3}

(1. 湖南农业大学园艺园林学院, 湖南长沙 410128) (2. 湖南应用技术学院农林科技学院, 湖南常德 415100)

(3. 湖南农业大学植物保护学院, 湖南长沙 410128) (4. 湖南农业大学东方科技学院, 湖南长沙 410128)

(5. 湖南省园艺研究所, 湖南长沙 410125)

摘要: 本文对湖南地区主要猕猴桃产区猕猴桃软腐果实真菌类病害的多样性分布规律进行系统分析, 为猕猴桃软腐病原真菌多样性的深入研究提供基础数据和理论依据。采用 Illumina HiSeq 高通量测序技术对 5 处软腐猕猴桃 (A、B、C、D、E), 15 组果实样品中微生物 ITS 扩增子二代测序数据采集, 进行生物信息学分析。5 处软腐猕猴桃果实中真菌种类较为丰富, 真菌丰富度指数和多样性指数较高, 尤其是 A、B、C 处, 相对于 D、E 处存在极显著差异 ($p < 0.01$)。在不同猕猴桃果实中得到了 2 个门的优势微生物。子囊菌门 (Ascomycota) 为最优势菌门, 主要分布在 D 和 E 处, 群类相对丰度为 19.20%, 且远远大于次优势菌门-担子菌门 (Basidiomycota, 6.80%, 主要分布在 A、B、C 处), 表现出非常明显的优势; 间座壳属 *Diaporthe* 相对丰度最高, 达到了 14.00%, 相对于其它属病原菌均具有极显著性差异 ($p < 0.01$), 此菌在 D、E 组含量相对较高, 在本组内达到了 30% 以上, 其余 3 组几乎没有。布勒弹孢酵母属 *Bullera* 相对丰度为 4.90%, 此菌为各组共有的优势菌属, A、B、C 组略高, 在本组内达到了 5.50% 左右, D、E 组则为 3.50% 左右。葡萄座腔菌属 *Neofusicoccum* 相对丰度为 3.20%, 此菌在 E 组含量相对较高, 在本组内达到了 15.00% 以上, 其余 4 组几乎没有。红菇属 *Russula* 相对丰度为 0.60%, 及其它较少的担子菌门菌属 *Tomentella*、*Phialocephala*、*oidiodendron*、*cenococcum* 等, 此外, 具有软腐猕猴桃果实潜力的菌属有茎点霉属 (*homa*)、青霉属 (*penicillium*) 及拟青霉属 (*simplicillium*) 等。实验为猕猴桃软腐病的防治提供了一定理论基础, 今后对猕猴桃果实软腐病防治时可针对性的杀灭间座壳属和葡萄座腔菌属微生物, 以提高果实的耐贮性。

关键词: 软腐猕猴桃; 病原菌; 多样性; 群落结构

文章编号: 1673-9078(2020)04-126-137

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.4.017

Biodiversity Analysis of Fungal Pathogens from Soft-rotting Kiwifruit

SHI Hao^{1,2,3}, WANG Ren-cai^{1,3}, WANG Fang-fang^{1,3}, PANG Li^{1,3}, WANG Yan^{1,4}, BU Fan-wen⁵, ZHOU Qian^{1,3}

(1. Horticulture and Landscape College Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China) (2. College of Agriculture

and Forestry Hunan Applied Technology University, Changde 415100, China) (3. Plant Protection College Hunan

Agricultural University, Changsha 410128, China) (4. Orient Science Technology College Hunan Agricultural University,

Changsha 410128, China) (5. Research Institute of Horticulture in Hunan Province, Changsha 410125, China)

Abstract: In this paper, the diversity distribution of kiwifruit soft rot diseases in main kiwifruit producing areas in Hunan Province was systematically analyzed. It provided basic data and theoretical basis for further study on the diversity of pathogenic fungi of kiwifruit soft rot in Hunan. Illumina HiSeq high-throughput sequencing technology was used to collect the second generation sequencing data of microbial ITS amplifiers from 15 groups of fruit samples of 5 soft-rotting kiwifruit (A, B, C, D, E), and bioinformatics analysis was performed. There were abundant fungi in five soft rotting kiwifruit fruits, and the fungi richness index and diversity index were higher, especially for A, B and C groups, relative to D and E groups, there were significant differences ($p < 0.01$). Two dominant Phylum microorganisms were obtained from different kiwifruit fruits. Ascomycota was the most dominant phylum. It mainly distributed in D and E groups. The relative abundance of Ascomycota

引文格式:

石浩,王仁才,王芳芳,等.软腐猕猴桃果实真菌类病原菌生物多样性分析[J].现代食品科技,2020,36(4):126-137

SHI Hao, WANG Ren-cai, WANG Fang-fang, et al. Biodiversity analysis of fungal pathogens from soft-rotting kiwifruit [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(4): 126-137

收稿日期: 2019-10-17

基金项目: 湖南省科技厅重点研发计划项目 (2017NK2071; 2018NK2013); 湖南省教育厅项目 (19C1353)

作者简介: 石浩 (1988-), 男, 博士, 研究方向: 中药植物资源高值化利用与果实采后贮藏保鲜

通讯作者: 王仁才 (1962-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 中药植物资源高值化利用与果实采后贮藏保鲜

was 19.20%, which was much larger than that of Basidiomycota, 6.80%, which mainly distributed in A, B and C groups. It showed obvious advantages. The relative abundance of *Diaporthe* was the highest, It reached 14.00%, which was significantly different from other pathogens ($p<0.01$). The content of the bacteria was relatively high in groups of D and E, which reached more than 30% in these groups, and almost none in the other three groups. Next, *Bullera* was 4.90%, Groups A, B and C were slightly higher, reaching about 10% in these groups and about 5% in groups of D and E. *Neofusicoccum* was 3.20%, The content of the bacteria in Group E was relatively high, reaching more than 20% in this group, and almost none in the other four groups. *Russula* was 0.60%, and *Tomentella*, *Phialocephala*, *oidiodendron* and *Cenococcum* were few, among them, the genus of *Homa*, *Penicillium* and *Simplicillium* was the potential fungi for soft rotting kiwifruit fruit. The experiment provided a theoretical basis for the control of kiwifruit soft rot. In the future, the control of kiwifruit fruit soft rot disease can be targeted to kill the microorganisms of *Diaporthe* and *Neofusicoccum*.

Key words: soft rotten kiwifruit; pathogens; diversity; community structure

猕猴桃属猕猴桃科 (*Actinidiaceae*) 猕猴桃属 (*Actinidia*) 植物, 因其果实具有独特的营养价值、药用价值和较高的经济价值而深受人们的喜爱^[1,2]。近年来, 猕猴桃产业得到迅速的发展, 尤其是红心猕猴桃已成为当今国内外竞相发展的新兴高档水果^[3]。据统计, 中国目前栽培面积约25.00万公顷, 占世界栽培总面积35.00万公顷的71.40%。在全球猕猴桃273.38万吨的年产量中, 我国年产量约121.67万吨, 占44.50%。猕猴桃产业的发展对于我国农业经济的发展具有重要地位和作用, 但其果实不耐贮运性成为其产业发展的制约因子^[4]。由于猕猴桃属于呼吸跃变型果实, 而且是皮薄多汁的浆果, 猕猴桃果实采后在常温贮藏下极易软化腐烂, 损失率高^[5]。加之我省猕猴桃成熟期多在8月到10月, 正值气温较高的季节, 极易引起果实软腐、熟腐等病害而加快果实腐烂, 期中猕猴桃软腐病是目前对果实采后造成腐败的最主要病害之一, 每年病害果可达10.00%~20.00%^[6,7]。因此, 猕猴桃果实采收后, 迅速采取有效防腐保鲜措施显得十分重要与特别紧迫; 而猕猴桃防腐保鲜的重点在于对果实造成腐败真菌类微生物的防治, 然而在对这些有害微生物进行防治前, 对弄清微生物的种群结构, 以及功能多样性上的研究是非常必要的。猕猴桃软腐病原菌的研究已有相关报道^[8-10], 但对于这块的研究大多为采用传统方法对病原微生物进行分离和鉴定, 往往只能得到

几个优势菌种, 并不能完全弄清整个果实中微生物群落结构。基于此, 本研究选取湖南5个地区的不同红阳软腐猕猴桃果实, 利用高通量测序技术对它们果肉中的真菌类微生物进行分析, 以期探明不同地区软腐猕猴桃果肉间真菌多样性和真菌群落结构的变化及真菌功能多样性和群落结构对果实腐败的影响, 对于今后猕猴桃的绿色安全贮藏及其产业化高效生产提供基础数据和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

软化猕猴桃分别来自湖南湘潭市、吉首凤凰县、怀化麻阳县、张家界永定和郴州宜章等5个地点, 采样时间为2018年9~10月, 样品收到后均由泡沫箱贮藏于4℃冰箱。分别编号为A、B、C(红阳猕猴桃正常软化果实, 分别来自湖南湘潭市、吉首凤凰县、怀化麻阳县), D、E(具有病斑软化猕猴桃果实, 分别来自张家界永定红心猕猴桃基地果实、郴州市宜章红心猕猴桃基地果实)。每组猕猴桃分为三组样本, 每组样本来自同一批次5个果实的混合果肉样本。正常软化猕猴桃无病斑, 果肉淡黄色, 感菌软化猕猴桃有病斑, 果肉灰绿色。



图1 a/b 为正常软化猕猴桃, c/d 为感菌软化猕猴桃

Fig1. a/b is normal softening kiwifruit, c/d is bacterial softening kiwifruit

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与荧光定量分析

(1) 微生物组总 DNA 提取。选用微生物组总 DNA 提取方法, 并通过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量, 同时采用紫外分光光度计对 DNA 进行定量。(2) 目标片段 PCR 扩增。通常以微生物核糖体 RNA 等能够反映菌群组成和多样性的目标序列为靶点, 根据序列中的保守区域设计相应引物, 并添加样本特异性 Barcode 序列, 进而对 rRNA 基因可变区或特定基因片段进行 PCR 扩增。(3) 扩增产物回收纯化。PCR 扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并对目标片段进行切胶回收。(4) 扩增产物荧光定量。参照电泳初步定量结果, 将 PCR 扩增回收产物进行荧光定量, 根据荧光定量结果, 按照每个样本的测序量需求, 对各样本按相应比例进行混合。

1.2.2 测序文库的制备

以 Illumina MiSeq 测序为例, 采用 Illumina 公司的 TruSeq Nano DNA LT Library Prep Kit 制备测序文库。首先对上述扩增产物进行序列末端修复, 通过试剂盒中的 End Repair Mix2 切除 DNA 序列 5' 端的突出碱基, 同时添加一个磷酸基团、补齐 3' 端的缺失碱基; 在 DNA 序列的 3' 端添加 A 碱基以防止 DNA 片段自连, 同时保证目标序列能与测序接头相连; 在序列 5' 端添加含有文库特异性标签 (即 Index 序列) 的测序接头, 使 DNA 分子能被固定在 Flow Cell 上; 采用 BECKMAN AMPure XP Beads, 通过磁珠筛选去除接头自连片段, 纯化添加接头后的文库体系; 对上述连上接头的 DNA 片段进行 PCR 扩增, 从而富集测序文库模板, 并采用 BECKMAN AMPure XP Beads 再次纯化文库富集产物; 通过 2% 琼脂糖凝胶电泳, 对文库做最终的片段选择与纯化。

1.2.3 上机进行高通量测序

上机测序前, 需要先对文库在 Agilent Bioanalyzer 上进行质检, 采用 Agilent High Sensitivity DNA Kit。合格的文库有且只有单一的峰, 且无接头。之后, 采用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 在 Promega QuantiFluor 荧光定量系统上对文库进行定量, 合格的文库浓度应在 2 nM 以上。将合格的各上机测序文库 (Index 序列不可重复) 梯度稀释后, 根据所需测序量按相应比例混合, 并经 NaOH 变性为单链进行上机测序; 使用 MiSeq 测序仪进行 2×300 bp 的双端测序, 相应试剂为 MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles)。核糖

体 RNA 含有多个保守区和高度可变区, 利用保守区域设计引物来扩增 rRNA 基因的单个或多个可变区, 然后测序分析微生物多样性。由于 MiSeq 测序读长的限制, 同时也为了保证测序质量, 最佳测序的插入片段范围是 200~450 bp。

1.2.4 Amplicon 测序信息分析流程

首先对高通量测序的原始下机数据根据序列质量进行初步筛查。通过质量初筛的序列按照引物和 Barcode 信息, 识别分配入对应样本, 并去除嵌合体等疑问序列。对获得的序列进行 OTU 归并划分, 每个 OTU 的代表序列用于分类地位鉴定以及系统发育学分析。根据 OTU 在不同样本中的丰度分布, 评估每个样本的多样性水平, 并通过稀疏曲线反映测序深度是否达标。对各样本在不同分类水平的具体组成进行分析 (并检验组间是否具有统计学差异)。通过多种多变量统计学分析工具, 进一步衡量不同样本间的菌群结构差异及与差异相关的物种。根据物种在各样本中的组成分布, 构建互作关联网络。同时根据基因测序结果, 预测各样本的菌群代谢功能。在以上结果的基础上, 使用多种数据可视化和交互式工具, 绘制图表, 全方位、客观地呈现以上分析结果。

1.2.5 数据处理与分析

原始双端测序数据的处理。采用滑动窗口法对 FASTQ 格式的双端序列逐一作质量筛查: 窗口大小为 10 bp, 步长为 1 bp, 从 5' 端第一个碱基位置开始移动, 要求窗口中碱基平均质量 $\geq Q20$ (即碱基平均测序准确率 $\geq 99\%$), 从第一个平均质量值低于 $Q20$ 的窗口处截断序列, 并要求截断后的序列长度 ≥ 150 bp, 且不允许存在模糊碱基 (Ambiguous base) N。随后, 利用 FLASH 软件^[11], 对通过质量初筛的双端序列根据重叠碱基进行配对连接: 要求 Read 1 和 Read 2 两条序列的重叠碱基长度 ≥ 10 bp, 且碱基错配数小于重叠碱基长度的 10%。最后, 根据每个样本所对应的 Index 信息, 将连接后的序列识别分配入对应样本, 从而获得每个样本的有效序列。

疑问序列的剔除及序列数统计。运用 QIIME 软件 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology)^[12] 识别疑问序列。除了要求序列长度 ≥ 160 bp, 且不允许存在模糊碱基 N 之外, 我们还将剔除: (1) 5' 端引物错配碱基数 > 1 的序列; (2) 含有连续相同碱基数 > 8 的序列。随后, 通过 QIIME 软件调用 USEARCH 检查并剔除嵌合体序列。

2 结果与分析

2.1 菌群落稀释曲线以及多样性曲线分析

使用 QIIME 软件, 对 OTU 丰度矩阵中每个样本的序列总数在不同深度下随机抽样, 以每个深度下抽取到的序列数及其对应的 OTU 数绘制稀疏曲线。稀释性曲线^[13] (Rarefaction curve), 横坐标代表每个样本中随机抽取的序列总数; 纵坐标代表在相应深度下观测到的 OTU 数; 12 条不同颜色的线代表 12 个样。

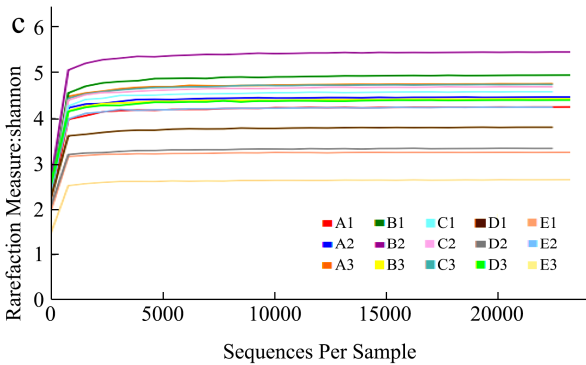
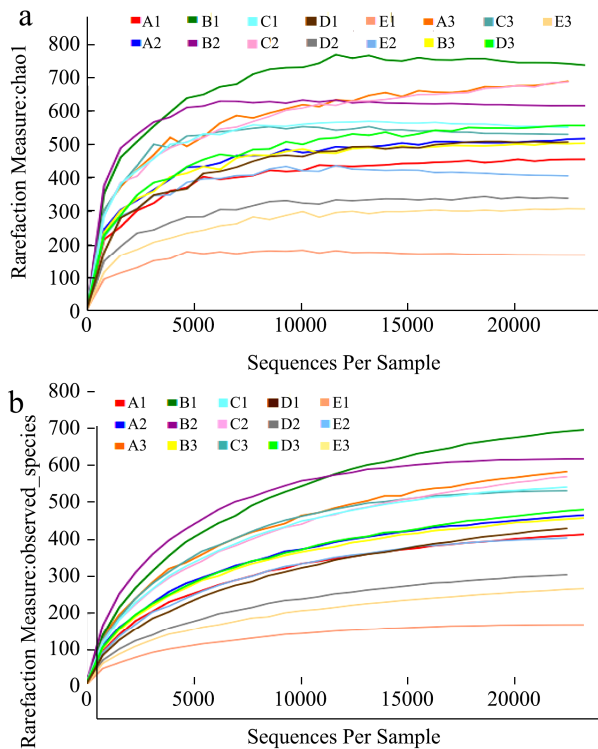


图 2 OTU 数的稀疏曲线图

Fig.2 Sparse curve of OTU number

曲线的长短反映了样本测序量的高低, 曲线越长, 测序深度越高, 观测到更高多样性的可能性更大。曲线的平缓程度反映了测序深度对于观测样本多样性的影响大小, 曲线越平缓, 表明测序结果已足够反映当前样本所包含的多样性, 继续增加测序深度已无法检测到大量的尚未发现的新 OTU; 反之, 则表明多样性尚未接近饱和, 继续增加测序深度将有助于观测到更多的新 OTU。

由图 2 可知, 随着测序量的增大 3 条稀释曲线逐渐趋于平坦, 其中 B 组值相对较大、E 组相对降低, 说明 B 组真菌类微生物最丰富, E 组较简单; 曲线趋向平坦时, 说明测序趋于饱和。说明各个样品得到的测序数据量能够反映各个样品内的物种分类信息的全面的整体状况, 表明本次研究有足够的测序数据数量可以满足下面对猕猴桃真菌类微生物多样性的分析。

2.2 菌群落 Alpha 多样性分析

表 1 菌群真菌类微生物多样性指数表

Table 1 Microbial Diversity Index Table

样品	Seq-num	多样性		丰度	
		Simpson	Chao1	ACE	Shannon
A	36693	0.87±0.06 ^A	555.39±99.30 ^C	559.21±95.70 ^C	4.49±0.21 ^A
B	35408	0.89±0.15 ^A	620.14±95.20 ^A	636.24±109.10 ^A	4.94±0.42 ^A
C	32566	0.88±0.04 ^A	592.67±73.10 ^B	594.90±66.80 ^B	4.67±0.06 ^A
D	37643	0.80±0.05 ^A	468.61±91.80 ^D	484.96±93.20 ^D	3.85±0.43 ^A
E	32536	0.74±0.12 ^A	294.22±97.20 ^E	301.64±100.90 ^E	3.39±0.65 ^A

注: 表中第一列为样本名, 之后各列分别对应每个样本在相同测序深度下的 Chao1、ACE、Shannon、Simpson 等多样性指数计算结果。表中不同大写字母表示各处理间同一指标下的差异极显著 ($p<0.01$), 下同。

对 OTU 丰度矩阵中的全体样本在 90.00% 的最低测序深度水平, 统一进行随机重抽样, 从而校正测序深度引起的多样性差异。随后, 使用 QIIME 软件分别对每个样本计算以下四种多样性指数。

对于微生物群落而言, 有多种指数来反映其 Alpha 多样性。不同的指数对于衡量群落多样性的侧

重点各不相同, 有些更侧重于体现群落的丰富度 (即群落中微生物成员如 OTU 的数量), 有些更倾向于反映群落的均匀度 (即各成员间的丰度差异大小), 也有一些多样性指数则综合考虑了以上两方面的因素^[14]。Chao1 指数和 ACE 指数侧重于体现群落丰富度, 由表 1 可知 A、B、C 组 Chao1 和 ACE 的指数值非常

高,达到了 550 以上,说明这 3 组真菌群落的丰富度较高,而 D、E 组群落的丰富度则相对较低,相对于其它 3 组均显著性降低 ($p<0.01$),这与图 2 所表现出的趋势结果一致。Shannon 多样性指数 (Shannon diversity index, 或称为 Shannon-Wiener、Shannon-Weaver 指数) 综合考虑了群落的丰富度和均匀度。Shannon 指数值越高,表明群落的多样性越高。Simpson 多样性指数 (The Simpson index, 1) 也是评价群落多样性的常用指数之一,由 Edward Hugh Simpson 提出^[15]。Simpson 指数值越高,表明群落多样性越高。一般而言,Shannon 指数对群落的丰富度以及稀有 OTU 更敏感,而 Simpson 指数对均匀度和群落中的优势 OTU 更敏感。由表 1 可知,同样除 D、E 组 Shannon、Simpson 值相对较低外,其余三组均较高。说明 D、E 组的种类相对较少。

2.3 OTU 划分和分类地位鉴定

2.3.1 OTU 分类鉴定结果分析

将丰度值低于全体样本测序总量 0.001% (十万分之一) 的 OTU (operational taxonomic unit) 去除^[16],并将去除了稀有 OTU 的此丰度矩阵用于后续的一系列分析。首先进行 OTU 划分并对分类地位鉴定结果进行统计,使用 R 软件将上述表中各样本在各分类水平的鉴定结果绘制成柱状图,可直观地比较不同样本

的 OTU 数和分类地位鉴定结果的差异,如下图 3、表 2 所示。B 组猕猴桃门“Phylum”、纲“Class”、目“Order”、科“Family”、属“Genus”、种“Species”, OTU 值均最高,平均总和达到了 2000 以上,说明 B 组猕猴桃真菌类微生物群落最为丰富,相对于其它 4 组均表现出极显著性差异 ($p<0.01$)。A、C 组猕猴桃真菌类微生物群落较为丰富,OTU 值仅次于 B 组。D、E 微生物群落则相对较为简单,尤其是 E 组,OTU 值最低,平均总和仅在 1000 以内,相对于其它 4 组均表现出极显著性降低 ($p<0.01$),说明 E 组微生物群落较为简单。实验与菌群落多样性指数的结果规律基本一致。

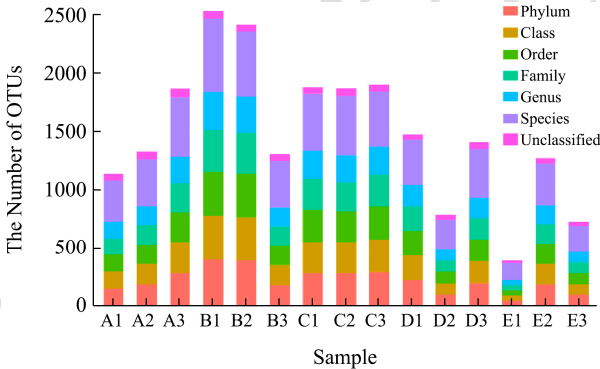


图 3 OTU 划分和分类地位鉴定结果统计图

Fig.3 Statistical chart of OTU classification and classification status appraisal results

表 2 OTU 划分和分类结果统计表

Table 2 Statistical table of OTU partition and classification results

样品	门	纲	目	科	属	种
A	204±56.80 ^C	196±51.40 ^C	192±48.50 ^C	187±45.40 ^C	177±35.20 ^C	425±65.10 ^C
B	320±102.30 ^A	312±97.80 ^A	306±95.00 ^A	291±88.60 ^A	267±74.50 ^A	530±95.60 ^A
C	282±5.65 ^B	277±5.35 ^B	275±6.55 ^B	263±9.170 ^B	237±4.96 ^B	490±14.69 ^B
D	171±53.08 ^D	168±51.08 ^D	166±50.10 ^D	163±48.70 ^C	152±40.30 ^C	356±67.30 ^D
E	106±56.70 ^E	105±55.40 ^E	105±54.90 ^E	103±52.70 ^D	99±48.60 ^D	243±86.30 ^E

2.3.2 共有 OTU 分析

对样本之间 OTUs 聚类分析结果进行比较,依照其共有的 OTU 信息,以相似水平为 97% 的 OTU 样本利用 R 语言工具绘制分组间的维恩图 (Venn Diagram)。每个椭圆代表一个样本,椭圆间的重叠区域表明样本间的共有 OTU,每个区块的数字表明该区块所包含的样本的共有或独有 OTU 数量。

由图 4, Venn 图可知,共有的 OTU 数目为 318,说明这 5 组猕猴桃果实中真菌类微生物相似种类较多。A、B、C、D、E 独有的 OTU 数目分别为 71、89、49、24、41。

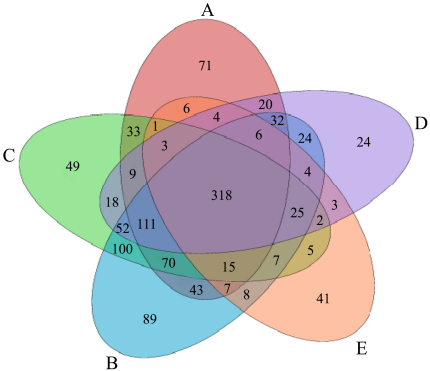


图 4 组间微生物 OUT 的 Venn 图

Fig.4 Venn map of OUT of microorganisms in kiwifruit groups

2.4 菌多样性及其丰度分析

2.4.1 菌群落在门 Phylum/纲 Class 水平的结构分布以及动态变化

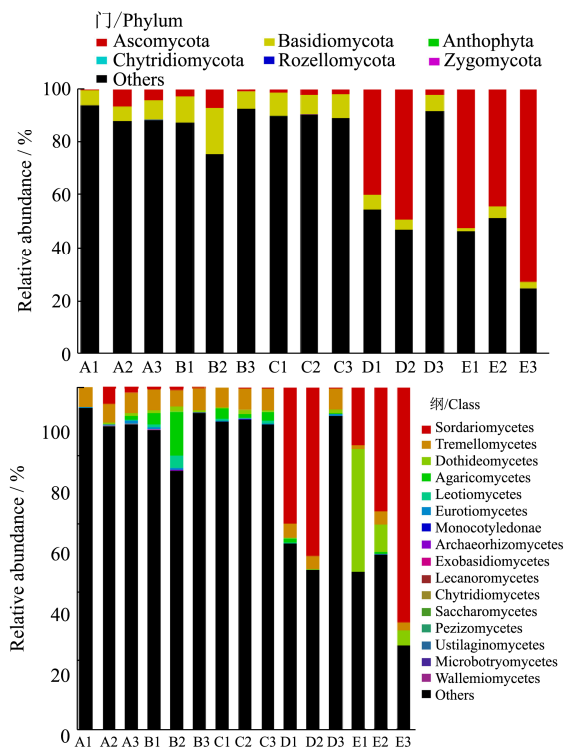


图5 菌落多样性在门、纲水平的分布

Fig.5 Distribution of colony diversity at the level of phylum and class level

使用 QIIME 软件, 获取各样本在门、纲、目、科、属五个分类水平上的组成和丰度分布表, 并通过柱状图呈现分析结果。由图 5、6 可知, 共确定 2 个主要门类的真菌类微生物, 子囊菌门 Ascomycota 含量最高, 占总体数量的 19.20%, 相对丰度达到了 15000 以上, 主要分布在 D、E 组, 据相关研究表明^[17], 为害植物的子囊菌多引起根腐、茎腐、果(穗)腐、枝枯和叶斑等症状。担子菌门 Basidiomycota 含量其次, 占总体数量的 6.80%, 对丰度达到了 4000 以上, 主要分布在 B 组, 有些担子菌能引起森林和园林植物的病害, 许多大型的腐生真菌能引起木材腐烂。极少量(相对丰度达 30 以下)的植物门 Anthophyta, 壶菌门 Chytridiomycota、接合菌门 Zygomycota、隐真菌门 Rozellomycota。由纲水平图可知, 共确定 4 个纲类的主要真菌类微生物, 粪壳菌纲 Sordariomycetes 含量最高, 占总体数量的 14.70%, 主要分布在 D、E 组; 银耳纲 Tremellomycetes 含量其次, 各组均有分布, 占总体数量的 5.00%, 座囊菌纲 Dothideomycetes 占总体数量的 3.70%, 主要分布在 E 组, 伞菌纲 Agaricomycetes 占总体数量的 1.80%, 和少数的

Leotiomyces、Eurotiomyces。

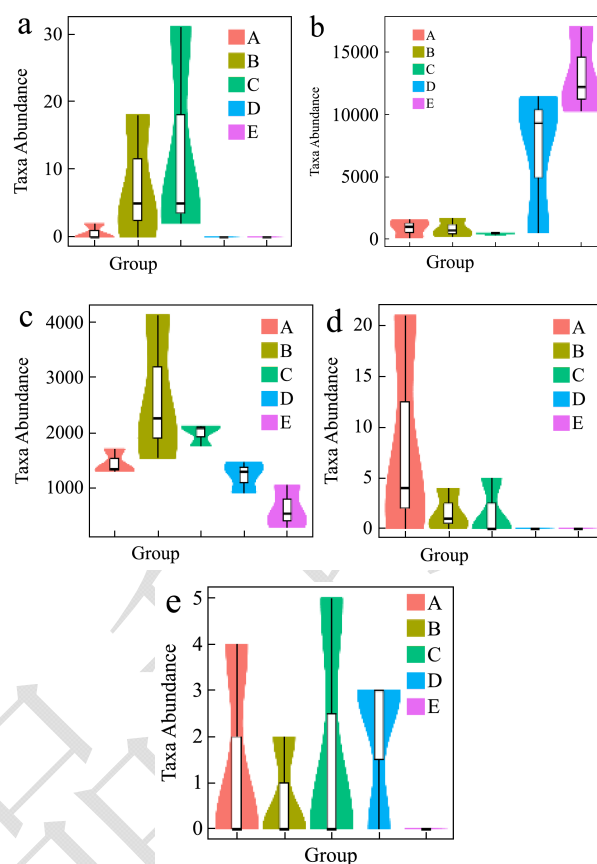


图6 门水平显著差异分类丰度图

Fig.6 Classification abundance map of significant phylum level differences

注: a: Anthophyta; b: Ascomycota; c: Basidiomycota; d: Chytridiomycota; e: Rozellomycota。

2.4.2 目 Orde/科 Family 水平菌群落的结构分布

菌群落在目和科水平的结构分布以及动态变化结果如图 7 可知。共确定 5 个主要的目类, 座壳目 Diaporthales 含量最高, 占总体数量的 14.10%, 银耳目 Tremellales 含量其次, 占总体数量的 5.00%, 葡萄座腔菌目 Botryosphaerales 占总体数量的 3.20%, 红菇目 Russulales 占总体数量的 0.70%, 革菌目 Thelephorales 占总体数量的 0.50%, 和少数的 Hypocreales、Helotiales、Pleosporales。

共确定 4 个主要的种类, 间座壳科 Diaporthaceae 占总体数量的 14.10%, 葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae 占总体数量的 3.20%, 红菇科 Russulaceae 占总体数量的 0.70%, 革菌科 Thelephoraceae 占总体数量的 0.50%, 另外有少数的水盘菌科 Vibrissaceae、蜡壳耳科 Sebacinaceae 等。目、科水平在各组间的分布与门、纲水平上的分布基本一致。

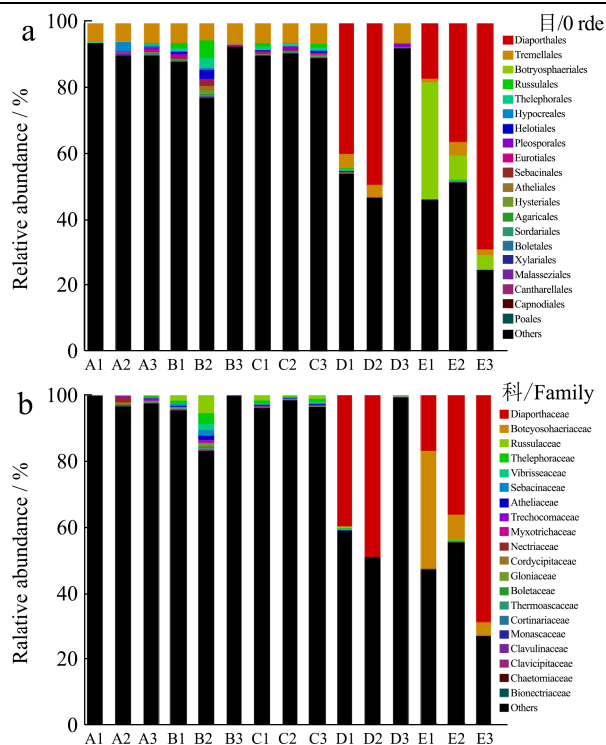


图7 菌落多样性在目、科水平中上的分布

Fig.7 Distribution of colony diversity at the level of order and family

2.4.3 菌群落在属 Genus 水平的结构分布以及动态变化

菌群落在属水平的结构分布以及动态变化结果如图8可知。共确定4个主要的属类,间座壳属 *Diaporthe*

含量最高, 占总体数量的 14.00%, 其中 D、E 组含量相对较高, 在本组内达到了 30% 以上, 其余 3 组几乎没有。布勒弹孢酵母属 *Bullera* 含量其次, 占总体数量的 4.90%, 此菌在每组均具有一定的含量, A、B、C 组略高, 在本组内达到了 5.50% 左右, D、E 组则为 3.50% 左右。葡萄座腔菌属 *Neofusicoccum* 占总体数量的 3.20%, 其中 E 组含量相对较高, 在本组内达到了 15.00% 以上, 其余 4 组几乎没有。红菇属 *Russula* 占总体数量的 0.60%、少数的 *Tomentella*、*Phialocephala* 等。使用 Mothur 软件, 调用 Metastats^[18] 的统计学算法, 对属水平的各个分类单元在样本之间的序列量差异进行两两比较检验。从图9可以看出丰度最大的为间座壳属 *Diaporthe*, 达到了 15000 以上。

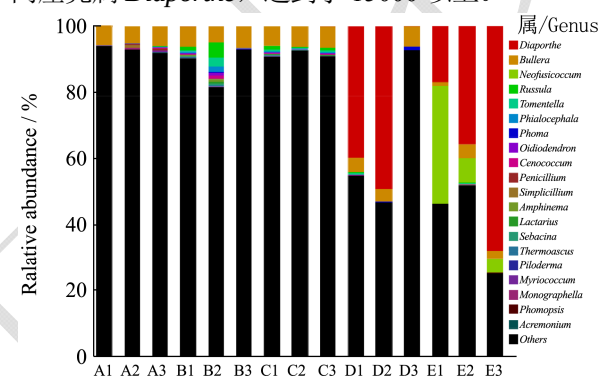


图8 菌落多样性在属水平中上的分布

Fig.8 Distribution of colony diversity at genus level

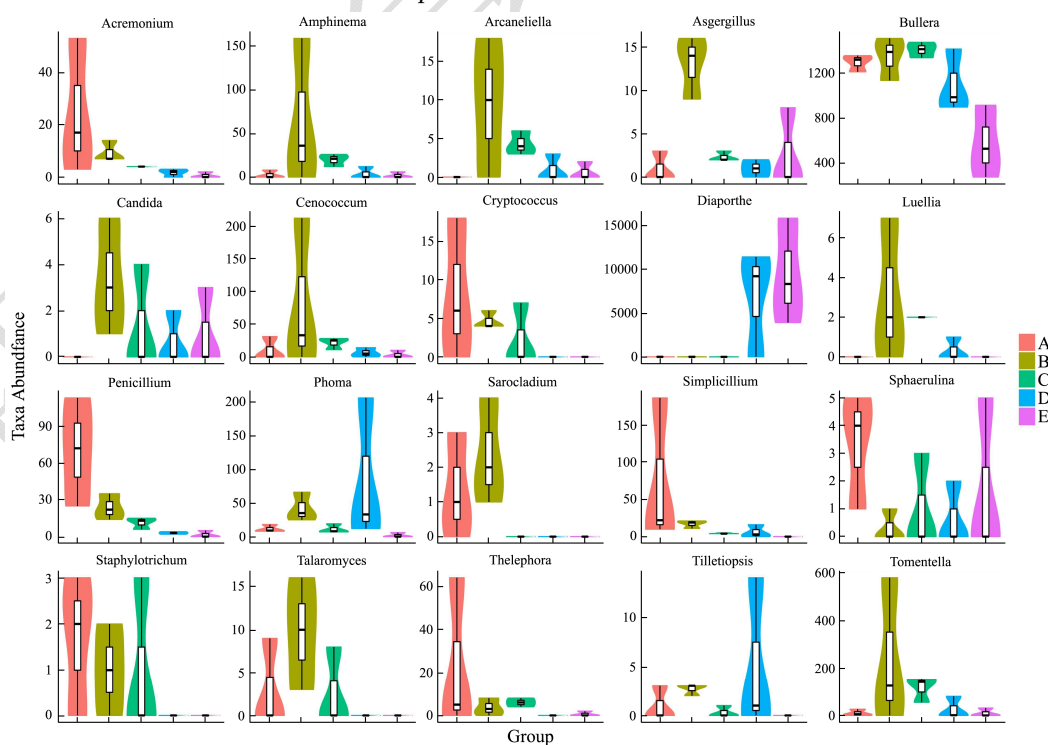


图9 属水平显著差异分类丰度图

Fig.9 Classification abundance map with significant genus level differences

2.5 样本间真菌组成差异分析

2.5.1 物种热图分析

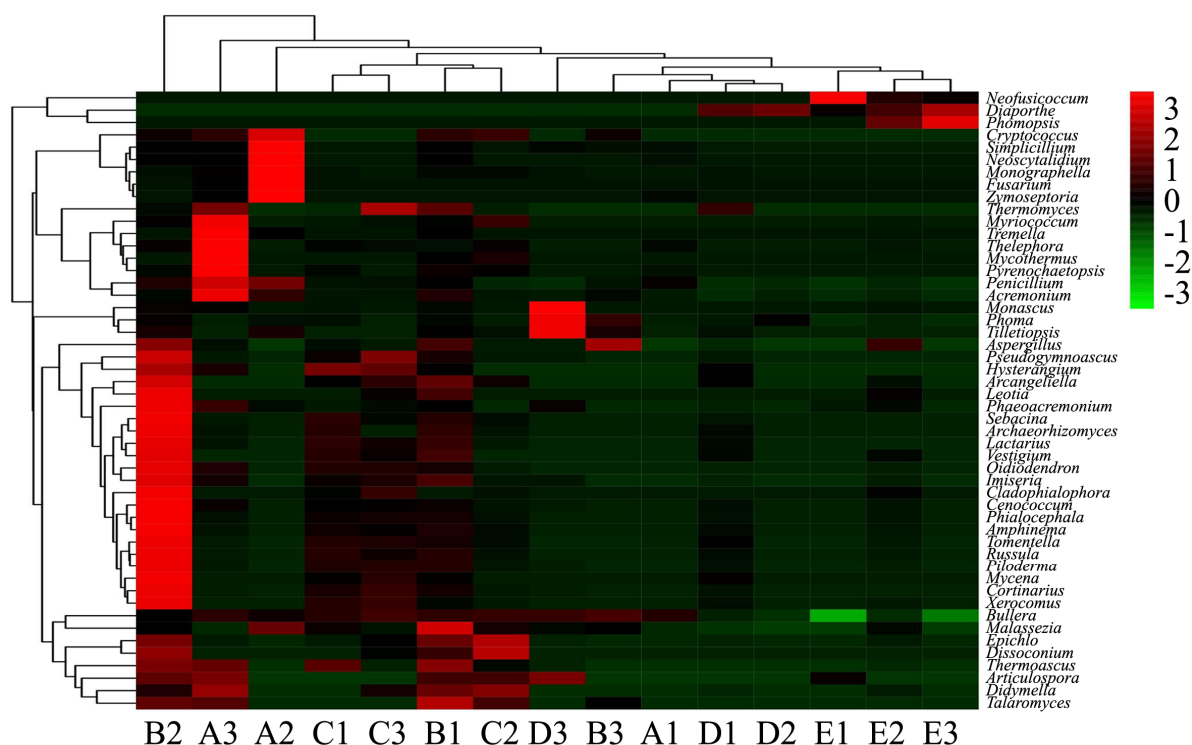


图 10 Genus 水平物种丰度热图

Fig.10 Abundance thermogram of genus-level

使用 R 软件, 对丰度前 50 位的属进行聚类分析并绘制热图。Heatmap 是以颜色梯度来代表数据矩阵中数值的大小并能根据物种或样品丰度相似性进行聚类的一种图形展示方式, 可以直接反映样品间群落组成的相似性和差异性。本分析内容在属的分类等级进行 heatmap 聚类分析。纵向聚类表示所有物种在不同样品间表达的相似情况, 横向聚类表示该物种在各样品丰度相似情况。可以通过颜色梯度及相似程度来反应多个样品分类水平上群落组成的相似性和差异性, 红色代表的群落组成丰度高, 绿色代表的丰度低。由图 10 可知, E1、E2 和 E3 中主要的是 *Neofusicoccum*、*Diaporthe*、*phomopsis*, 同时这 3 种真菌类病原菌聚类在一起, 进化关系较为紧密。D1、D2 中主要是 *Diaporthe*, 这 5 组真菌的差异较小且微生物种类少, 纯度高, 相互聚类在一起, 它们同属于子囊菌门微生物。其余组真菌种类多而杂, 尤其是 B、C 组, 再者 A 组, 这与上述菌群微生物多样性指数分析结果基本一致。

2.5.2 基于分类等级树的组间差异分析

通过 FastTree 工具构建了 OTU 代表序列的系统发育树^[19]。LDA Effect Size 分析(LEfSe)作为一种新型的元基因组学分析方法, 目前大量适用于高维生物标识筛选, 其不仅可以实现多个分组之间的比较, 还可

以在分组比较的内部进行亚组比较分析, 从而找到组间在丰度上有显著差异的物种; 本文采用其分析在门、纲、目、科、属各个分类学水平分析 A、B、C、D、E 组中真菌类微生物群落组成及其各成分的丰度差异大小。由 LEfSe 得出各组微生物群落结构差异的分支图(图 11), 可以看出各样品内微生物群落落在各个分类学水平都有比较大的差异。A 组(青霉属 *Penicillium*、发菌科 *Trichocomaceae*、散囊菌目 *Eurotiales*、拟青霉属 *Simplicillium*、枝顶孢属 *Acremonium*), 前三类微生物丰度较高, B 组(-), C 组(糙孢孔目 *Trechisporales*)微生物丰度较高, D 组(拟茎点霉属 *Phoma*)微生物丰度较高, E 组(葡萄座腔菌科 *Botryosphaeriaceae*、葡萄座腔菌目 *Botryosphaeriales*、间座壳属 *Diaporthe*、间座壳科 *Diaporthaceae*、间座壳目 *Diaporthales*)微生物丰度均较高。实验结果相对于传统病原菌鉴定所得结果有相同之处, 例如陆训等^[20], 通过对翠玉软腐猕猴桃病原菌的分离鉴定实验结果得出大豆拟茎点种腐病菌 *Phomopsis longicolla* 为其主要病害微生物。王小洁等^[21], 在红阳软腐猕猴桃果实中分离得到主要病害微生物葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*。Koh^[22]和 Auger^[23]等人认为 *Diaporthe actinidiae* 为猕猴桃果实采后软腐病害的主要病害微生物。同时结合于热图知, E、D 组微生物种类不是很多但每一种的含量非常高,

相对于其他组具有显著性差异,可能是对猕猴桃造成软腐病的主要真菌类微生物。B、C 组微生物群落种类非常多,但含量不高,不具有明显差异性,说明这些微生物不能造成软腐病。A 组微生物群落中青霉菌 *Penicillium*、发菌科 *Trichocomaceae* 有可能对猕猴桃造成软腐病,也有可能是被外界感染。

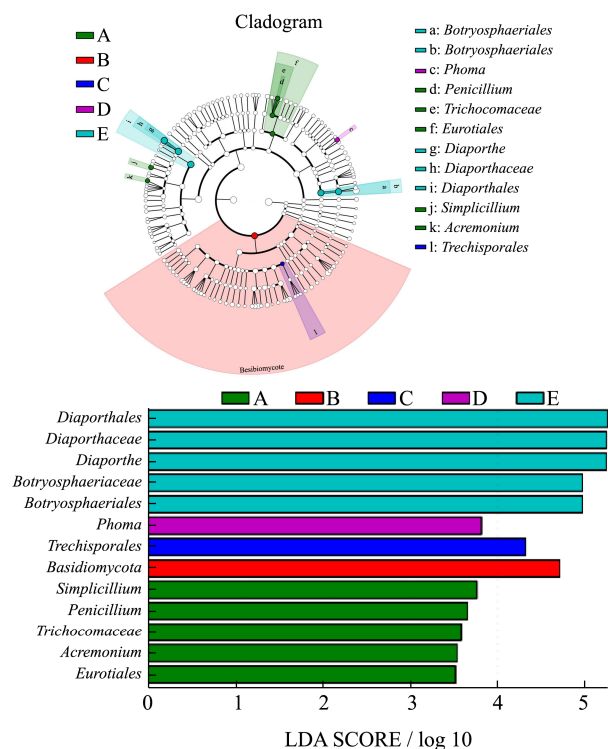


图 11 样本总体在各分类水平的构建树和组间显著差异分类图

Fig.11 Classification map of significant differences between sample trees in each level of construction tree and groups

2.5.3 基于分类等级树的总体差异分析

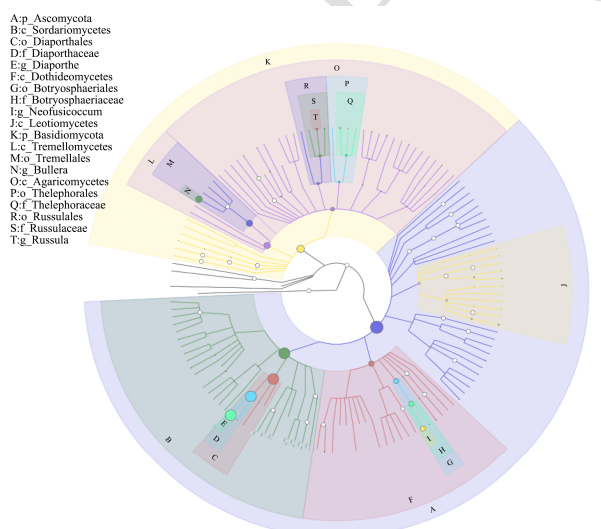


图 12 基于 GraPhlAn 的样本总体分类等级树图

Fig.12 GraPhlAn-based sample general classification hierarchical tree map

使用 GraPhlAn 可视化工具,对样本总体在各分

类水平的组成构建等级树^[24]。分类等级树展示了样本总体中,从门到属(从内圈到外圈依次排列)所有分类单元的等级关系,节点大小对应于该分类单元的平均相对丰度,相对丰度前 20 位的分类单元还将在图中以字母标识(从门到属按照从外层到内层依次排列)。由图 12 可知,总体样本共得到 2 个门,分别为囊菌门 Ascomycota 和担子菌门 Basidiomycota。其中囊菌门分别包括粪壳菌纲 Sordariomycetes、座囊菌纲 Dothideomycetes、锤舌菌纲 Leotiomyces;担子菌门分别包括银耳纲 Tremellomycetes、伞菌纲 Agaricomycetes,这 2 类微生物一般对果实不具有腐败作用,可能是被感染的外源微生物。其中粪壳菌纲主要微生物属于间座壳目 Diaporthales,座囊菌纲主要微生物属于葡萄座腔菌目 Botryosphaeriales。其中间座壳目的节点最大,意味着该分类单元的相对丰度最高,葡萄座腔菌目节点其次,意其相对丰度其次,同时这两类微生物对果实和蔬菜均具有很强的腐败作用^[25-27]。锤舌菌纲 Leotiomyces 类微生物含量最少,可忽略不计。其结果与上述真菌多样性及其丰度分析大相一致。

2.6 Beta 多样性分析

2.6.1 PCA 主成分分析

通过 R 软件,对属水平的群落组成结构进行 PCA 分析。PCA 分析通过线性变换,将原始的高维数据(如菌群 OTU 丰度矩阵)通过线性变换组合,投影到维度较低的空间坐标系中,从而达到降维、简化数据结构的目的,展现样本的自然分布^[28]。PCA 分析能够从原始数据中提取样本间最主要的差异特征,并根据这些差异特征将样本在新的低维坐标系中依次排序,使得样本在新坐标系中的距离远近能在最大程度上还原样本间的实际差异。在这排序过程中,每一坐标轴对原始数据中样本差异的解释比例依次下降。因此,通过对 PCA 分析得到的前二维数据作图,可以得知群落样本的主要分布特征,从而量化样本间的差异和相似度。由图 13,PCA 分析图可知,横坐标表示第一主成分 PC1(89.44%);纵坐标表示第二主成分 PC2(9.65%),两个主因子的累计方差贡献率达到了 99.00%以上,几乎能够解释所有病原菌的种类主成分对样品差异的贡献值十分显著。第一主成分将 A、B、C 与 D、E 分开,说明 A、B、C 组含有较多类似的病原菌。D、E 很有较多类似的病原菌,这与上述热图的分析结果基本一致。同时由于 D、E 所占有的比重较大,说明影响猕猴桃果实发生软腐的主要病害来自 D、E 组,这两组的主要病害就是间座壳目 Diaporthales 和葡萄座腔菌

目 Botryosphaeriales。B2 单独一块, B2 组含有较多异类的微生物,通过属间差异结果发现其红菇属 *Russula* 含量最高,可能是 B2 受到环境污染,亦可能是软腐病原菌,后期有待进一步研究。

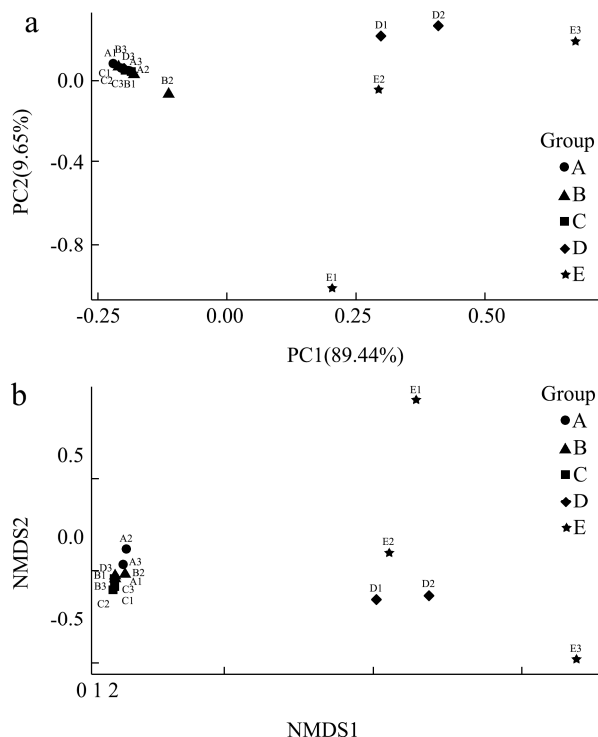


图 13 PCA 分析图、NMDS 分析图

Fig.13 PCA analysis chart and NMDS analysis chart

2.6.2 NMDS 非度量多维尺度分析

使用 R 软件对 Weighted 的 UniFrac 距离矩阵分别进行 NMDS 分析,通过二维排序图描述群落样本的结构分布^[29]。(Nonmetric Multidimensional Scaling, NMDS)展示了 5 组, 15 个样本的非度量多维尺度分析,与 PcoA 分析不同, NMDS 分析不依赖于特征根和特征向量的计算,而是通过对样本距离进行等级排序,使样本在低维空间中的排序尽可能符合彼此之间的距离远近关系。因此, NMDS 分析不受样本距离的数值影响,仅考虑彼此之间的大小关系,对于结构复杂的数据,排序结果可能更稳定。在此图中,样本相互之间越聚集,则其微生物群落相似度越高。由图 13, NMDS 分析图可知, E1 和 E2 聚集在一起,结合热图分析主要影响相似微生物为葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae,且所占的比重最大, D1、D2 和 E3 聚集在一起,主要影响相似微生物为间座壳科 Diaporthaceae,且所占的比重排第二, A2 和 A3 聚集在一起,主要影响相似微生物为肉座菌目 Hypocreales,其所占的比重排第三。D3、A1、C 和 B 聚集在一起,其所占的比重较小,其含有共同的种类较多,量较少的其它微生物菌种,以布勒掷孢酵母属

Bullera 为主。

2.6.3 基于 UniFrac 距离的样本聚类分析

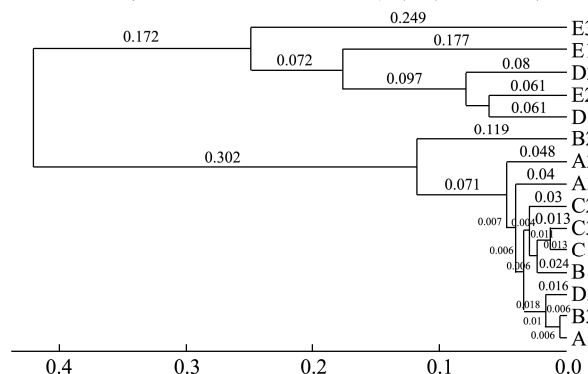


图 14 基于 Weighted UniFrac 距离矩阵的 UPGMA 聚类分析图

Fig.14 UPGMA clustering analysis graph based on weighted unifrac distance matrix

使用 QIIME 软件,对 Weighted 的 UniFrac 距离矩阵分别进行 UPGMA 聚类分析,并使用 R 软件进行可视化。层次聚类(Hierarchical Clustering)是一种通过计算不同类别数据点间的相似度来创建具有层次的嵌套聚类树的聚类算法,而样本层次聚类树能通过树枝结构去描述和比较多个样本间的相似性和差异关系^[30]。根据 beta 多样性距离矩阵进行层次聚类分析,使用非加权组平均法 UPGMA(Unweighted pair group method with arithmetic mean)算法构建树状结构,得到树状关系形式用于可视化分析,可以反映多个样本间的相似和差异关系,其中树枝长度代表样本间的距离。UPGMA 聚类分析结果见图 14, 5 组分为 15 个样品,具有相似性的群体会聚在一起,其中品种 D 和 E 组同源性较好, A、B、C 组源性较好。这与上述 PCA 主成分分析结果和热图分析结果大相一致。

2.7 偏最小二乘法 PLS-DA 分析

使用 R 软件,根据物种丰度矩阵和样本分组数据构建 PLS-DA 判别模型。PLS-DA(Partial Least Squares Discriminant Analysis)分析是以偏最小二乘回归模型为基础,作为一种有监督的模式识别方法,根据给定的样本分布、分组信息,对群落结构数据进行判别分析^[31]。PLS-DA 通过寻找物种丰度矩阵和给定的样本分布信息的最大协方差,从而在新的低维坐标系中对样本重新排序。PLS-DA 可以减少变量间多重共线性产生的影响,因此,比较适合用于微生物群落数据的研究。使用 R 软件,根据物种丰度矩阵和样本分组数据构建 PLS-DA 判别模型。并计算每个物种的 VIP(Variable importance in projection)系数。图中每个字母代表一个样本,颜色相同的字母属于同一分组,相同分组的字母以椭圆标出。由图 15 可知, D、E 组

椭圆非常小,且各样本紧密的挨在一起,说明D、E组的微生物种群结构非常相似,且组内微生物种类差异也较少。C组椭圆较大,且各样本相隔较远,说明这组微生物种群结构相差较大,A、B组椭圆非常大,说明组内微生物含量多且差异大。A、B、C、D、E组有交集是因有共同的微生物布勒掷孢酵母属 *Bullera*,它可能是猕猴桃无害的内生菌,在今后的研究中可对刚采摘所得好果实进行微生物多样性分析,看是否有同样的此微生物,亦可对此微生物进行其它方面的研究,例如猕猴桃在无其它软化微生物存在的条件下,是否可自身软化并产生酒味,探究此微生物是否起到了催化软化的作用,亦可研究此微生物是否对其它猕猴桃病害微生物有拮抗作用等。

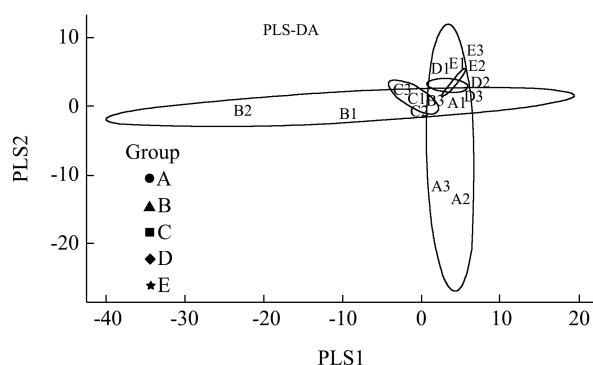


图 15 PLS-DA 判别分析图

Fig.15 PLS-DA discriminant analysis diagram

3 结论

实验对湖南 5 个地区软化猕猴桃进行微生物多样性分析。发现软化猕猴桃果实中蕴含了较丰富的微生物群落,通过全文数据分析可知,A、B、C 组正常软化猕猴桃微生物群落丰富,但缺少某一种主要优势微生物群落,D、E 组有明显病斑果实微生物群落相对稀少,但拥有明显的优势微生物群落(间座壳属 *Diaporthe*、葡萄座腔菌科 *Botryosphaeriaceae*)。同时通过实验结果及相关文献可知,影响猕猴桃软腐疾病的主要微生物是囊菌门的间座壳属 *diaporthe*、葡萄座腔菌科 *Botryosphaeriaceae*,有可能是茎点霉菌 *Phoma*、拟青霉属 *simplicillium*、青霉属 *penicillium* 以及担子菌门微生物的布勒掷孢酵母属 *Bullera* 和红茹属 *Russula*,今后在对猕猴桃果实软腐病防治时可针对性的杀灭间座壳属和葡萄座腔菌属等微生物,以提高果实的耐贮性。

参考文献

[1] Richardson D P, Ansell J, Drummond L N. The nutritional and health attributes of kiwifruit: A review [J]. European

Journal of Nutrition, 2018, 57(8): 1-18

- [2] Sivakumaran S, Huffman L, Sivakumaran S, et al. The nutritional composition of Zespri® SunGold kiwifruit and Zespri® sweet green kiwifruit [J]. Food Chemistry, 2016, 238: 195-199
- [3] Henwood R J T, Wargent J J, Black M, et al. Environmental and management factors contributing to variability in flesh colour of a red kiwifruit cultivar in New Zealand [J]. Scientia Horticulturae, 2018, 235: 21-31
- [4] 王仁才,熊兴耀,庞立.湖南猕猴桃产业发展的现状及建议[J].湖南农业科学,2015,5:124-127
WANG Ren-cai, XIONG Xing-yao, PANG Li. Problems and solutions of kiwifruit industry development in Hunan province [J]. Hunan Agricultural Sciences, 2015, 5: 124-127
- [5] Han T, Li L, Zhang H. Progress of research on postharvest physiology of kiwifruit in China [J]. Acta Horticulturae, 2003, 610: 307-315
- [6] Li L, Pan H, Chen M, et al. Isolation and identification of pathogenic fungi causing postharvest fruit rot of kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in China [J]. Journal of Phytopathology, 2017, 165(11-12): 782-790
- [7] 李诚,王禄,蒋军喜,等.猕猴桃果实熟腐病菌生物学特性及其寄主抗病性鉴定研究[J].江西农业大学学报,2014,5: 1061-1065
LI Cheng, WANG Lu, JIANG Jun-xi, et al. Biological characteristics of the main pathogenic fungi causing fruit rot of kiwifruit and disease resistance of kiwifruit cultivars [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2014, 5: 1061-1065
- [8] Li L, Pan H, Liu W, et al. First report of *Diaporthe actinidiae* causing stem-end rot of kiwifruit during post-harvest in China [J]. Plant Disease, 2017, 6(6): 1054-1055
- [9] Díaz G A, Latorre B A, Jara S, et al. First report of *Diaporthe novem* causing postharvest rot of kiwifruit during controlled atmosphere storage in Chile [J]. Plant Disease, 2014, 98(98): 1274-1278
- [10] Bourbos V A, Skoudridakis M T. Outbreaks and new records. Greece. Soft rot of kiwifruit caused by *Bipolaris spicifera*, anamorph of *Cochliobolus spicifer* [J]. Fao Plant Protection Bulletin, 1992: 1-6
- [11] Magoc T, Salzberg S L. Flash: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27: 2957-2963
- [12] Caporaso J G, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing

- data [J]. Nat Methods, 2010, 7: 335-336
- [13] Bach E M, Williams R J, Hargreaves S K, et al. Greatest soil microbial diversity found in microhabitats [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2018, 118: 217-226
- [14] Chao A, Shen T J. Nonparametric prediction in species sampling [J]. J Agric Biol Environ Stat, 2004, 9: 253-269
- [15] Simpson E H. Measurement of diversity [J]. Nature 1949, 163: 688
- [16] Bokulich N A, Subramanian S, Faith J J, et al. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from illumina amplicon sequencing [J]. Nat Methods, 2013, 10(1): 55-57
- [17] 刘程斐. 中国部分地区腐生子囊菌种类与分布的初步研究 [D]. 青岛: 青岛农业大学, 2010
- LIU Cheng-fei. Preliminary studies on species and distribution of saprophytic ascomycetes in some areas of China [D]. Qingdao: Qingdao Agricultural University, 2010
- [18] White J R, Nagarajan N, Pop M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples [J]. PLoS Comput Biol, 2009, 5(4): 4-24
- [19] Price M N, Dehal P S, Arkin A P. FastTree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix [J]. Mol Biol Evol, 2009, 26: 1641-1650
- [20] 陆训, 潘显婷, 庞立, 等. 猕猴桃采后腐烂病原的鉴定 [J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2017, 43(2): 171-175
- LU Xu, PAN Xian-ting, PANG Li, et al. Identification of the pathogen associated with postharvest fruit rot of kiwifruit [J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2017, 43(2): 171-175
- [21] 王小洁, 李士瑶, 李亚巍, 等. 猕猴桃软腐病原菌的分离鉴定及其防治药剂筛选 [J]. 植物保护学报, 2017, 5: 125-131
- WANG Xiao-jie, LI Shi-yao, LI Ya-wei, et al. Pathogen identification of kiwifruit soft rot and fungicide screening for control of the disease [J]. Journal of Plant Protection, 2017, 5: 125-131
- [22] Auger J, I Pérez, Esterio M. *Diaporthe ambigua* associated with post-harvest fruit rot of kiwifruit in Chile [J]. Plant Disease, 2013, 97(6): 843-843
- [23] Koh Y J, Jung J S. Postharvest fruit rots of kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) in Korea [J]. New Zealand Journal of Experimental Agriculture, 2005, 33(3): 303-310
- [24] Asnicar F, Weingart G, Tickle T L, et al. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn [J]. PeerJ, 2015, 3: 22-27
- [25] Auger J, Pérez I, Esterio M. *Diaporthe ambigua* associated with post-harvest fruit rot of kiwifruit in Chile [J]. Plant Disease, 2013, 97(6): 843-849
- [26] Luongo L, Santori A, Riccioni L, et al. *Phomopsis* sp. associated with post-harvest fruit rot of kiwifruit in Italy [J]. Journal of Plant Pathology, 2011, 93(1): 205-209
- [27] Caccioni D R, Guizzardi M, Biondi D M, et al. Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* [J]. International Journal of Food Microbiology, 1998, 43(1-2): 73-79
- [28] Ramette, A. Multivariate analyses in microbial ecology [J]. FEMS Microbiol Ecol 2007, 62: 142-160
- [29] Tardy V, Spor A, Mathieu O, et al. Shifts in microbial diversity through land use intensity as drivers of carbon mineralization in soil [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2015, 90: 204-213
- [30] Zhao Y, Karypis G, Fayyad U. Hierarchical clustering algorithms for document datasets [J]. Data Mining and Knowledge Discovery, 2005, 10(2): 141-168
- [31] Chevallier S, Bertrand D, Kohler A, et al. Application of PLS-DA in multivariate image analysis [J]. Journal of Chemometrics, 2010, 20(5): 221-229