

高通量测序法分析感杨树灰斑病前后 叶围微生物多样性¹⁾

邓世林 申东晨 潘理 刘思远 郑浩楠 沈嘉乙 董爱荣

(东北林业大学 哈尔滨, 150040)

摘要 采用高通量测序法探究小黑杨(*Populus simonii*×*P. nigra*)灰斑病(*Coryneum populinum* Bres.)病叶与健康叶之间共生细菌和真菌群落结构的差异。结果表明:小黑杨叶片感病前后细菌与真菌的OTU变化巨大,2组样品共有的细菌种类有27个,仅占细菌总数的5.49%,共有真菌种类有22个,仅占真菌总数的0.71%。2组样品中菌落结构基本相同,但相对丰度差异较大,在门水平下,变形菌门(Proteobacteria)是优势细菌,子囊菌门(Ascomycota)是优势真菌。在属水平下,鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)是健康叶中的优势细菌,假单胞菌属(*Pseudomonas*)是病叶中的优势细菌;枝孢属(*Cladosporium*)是健康叶中的优势真菌,镰刀菌属(*Fusarium*)是病叶中的优势真菌,其次是棒盘孢属(*Coryneum*)。

关键词 高通量测序法; 杨树灰斑病; 菌群差异
分类号 S763.1

Leaf Microbial Diversity before and after *Phyllosticta populea* Sacc by High-throughput Sequencing // Deng Shilin, Shen Dongchen, Pan Li, Liu Siyuan, Zheng Haonan, Shen Jiayi, Dong Airong (Northeast Forestry University, Harbin 150040, P. R. China) // Journal of Northeast Forestry University 2020, 48(5): 104-106, 132.

The high-throughput sequencing was used to investigate the differences in symbiotic bacterial and fungal community structures between *Phyllosticta populea* Sacc leaf spot disease and healthy leaves. The bacterial and fungal OTUs of *P. populea* leaves changed greatly before and after susceptibility to disease. The two samples shared 27 bacterial species, accounting for only 5.49% of the total bacteria, and 22 fungal species, accounting for only 0.71%. Two substantially identical sample colonies structures, but large differences in relative abundance. At the phylum level, Proteobacteria is the dominant bacterium, and Ascomycota is the dominant fungus. At the genus level, *Sphingomonas* is the dominant bacteria in healthy leaves, and *Pseudomonas* is the dominant bacteria in diseased leaves; *Cladosporium* is the predominant fungus in healthy leaves, *Fusarium* is the predominant fungus in diseased leaves, followed by *Coryneum*.

Keywords High-throughput sequencing; *Phyllosticta populea* Sacc; Flora difference

DOI:10.13759/j.cnki.dlxb.2020.05.020

杨树(*Populus* spp.)在我国主要用于防护林、用材林、水土保持林、农田防护林和四旁绿化。杨树灰斑病(*Coryneum populinum* Bres.)是发生在杨树(小苗到大树)上的一种主要叶部病害。该病能使叶片提早脱落,嫩梢枯死或造成多顶苗^[1]。目前,对杨树灰斑病的防治主要以化学药剂防治为主^[2-3],但化学杀菌剂常常带来许多负面影响,如对环境的污染、对人畜的毒副作用等,因此必须寻找新的防治途径克服农药残留和病菌抗药性的问题。近年来,运用生物防治措施控制病害已成为病害防治的必然趋势,这也是国际上目前在病害防治方面的重点研究领域,运用拮抗微生物来防治灰斑病无疑是一种行之有效的方法^[4-5]。获得拮抗微生物的传统方法是

人工富集培养,然而,有研究表明自然界中存活的微生物只有0.1%~10.0%可以通过人工方法获得纯培养^[6],大量的微生物因无法获得纯培养而对其性质及其在自然界中的生态功能知之极少。相比较而言,高通量测序法更为准确快捷^[7],同时有利于探究在实验室培养条件下会忽略的低丰度菌群种类^[8]。本研究基于高通量测序法分析杨树感灰斑病前后叶围微生物多样性和群落结构的变化,探知优势微生物的分布,从而指导筛选杨树叶围优势的灰斑病拮抗菌。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康小黑杨(*Populus simonii*×*P. nigra*)、发病小黑杨叶片均采自黑龙江省肇东市五站林木种子园。2019年7月24日,采用“S”形十点采样法,分别剪取10棵2年生根3年生干健康及感灰斑病杨树枝叶。健康样品用A1表示,感病样品用A2表示。

1.2 小黑杨叶围微生物基因组DNA提取

称取10.0g来自于不同枝条上的小黑杨叶片,用无菌的剪刀剪碎后,放入10mL离心管中,加入适

1) 国家自然科学基金项目(31670494);东北林业大学大学生创新训练项目(201910225046)。

第一作者简介:邓世林,男,1995年6月生,东北林业大学林学院,硕士研究生。E-mail: 981626053@qq.com。

申东晨,男,1998年1月生,东北林业大学林学院,本科生。E-mail: 1780805794@qq.com。

通信作者:董爱荣,东北林业大学林学院,副教授。E-mail: darlmy@163.com。

收稿日期:2020年1月3日。

责任编辑:程红。

量钢珠和裂解液,在破碎仪上进行破碎,参照 OMEGA 试剂盒 E.Z.N.ATM Mag-Bind Soil DNA Kit 的使用说明书,提取样品 DNA。利用 Tris 盐酸缓冲液 (pH=8.0) 洗脱 DNA 并置于 -20 °C 条件下冻存,送至生工生物工程(上海)股份有限公司完成扩增子测序。

1.3 数据分析

细菌 16S rRNA 选择 341F 和 805R 作为引物,引物序列分别为 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' 和 5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'; 真菌 ITS 选择 ITS4F 和 ITS3R 作为引物,分别为 5'-CCCTACAC-GACGCTCTTCCGATCTN-3' 和 5'-GTGACTGGAGTTC-CTTGGCACCCGAGAATTCCA-3', 利用 Illumina Mi Seq 平台进行测序和分析。下机数据经过 QIIME (v1.8.0) 软件过滤、拼接、去除嵌合体,去除各样本中 reads 尾部质量值在 20 以下的碱基、切除 reads 中含 N 部分序列,并去除数据中的短序列(长度阈值 200 bp) 随后再对低复杂度的序列进行过滤。

采用 Usearch(v7.1) 软件进行数据处理,物种比对注释使用 RDP classifier 软件,保留置信区间大于 0.8 的注释结果。利用 Mothur 软件进行 Chao1 指数、香农指数(Shannon) 计算分析,并在各分类水平上进行群落结构的统计分析,得到微生物群落结构组成。

2 结果与分析

2.1 感病前后样品的细菌和真菌多样性

由表 1 可知,感病前后分别检测到 395、97 个细菌 OTU, 2 144、954 个真菌 OTU, 感病后样品 A2 的 OTU 数、Shannon 指数和 Chao1 指数明显下降,说明感病后,病原菌占绝对优势,且对其他微生物产生一定的抑制作用,细菌、真菌多样性及物种总数显著下降。

表 1 感病前后小黑杨样品的细菌和真菌多样性指数

微生物类型	样品	OTU/个	Shannon 指数	Chao1 指数
细菌	A1	395	3.41	4 470.00
	A2	97	2.89	274.50
真菌	A1	2 144	1.93	17 938.78
	A2	954	1.21	11 146.00

由图 1 可知,感病前后样品共含有 492 个细菌 OTU, 2 组样品共有的细菌种类仅有 27 个,占细菌总数的 5.49%,说明杨树感染灰斑病菌前后,叶围细菌发生了较大改变。感病前后样品共含有 3 098 个真菌 OTU, 2 组样品共有的真菌种类仅有 22 个,占真菌总数的 0.71%,说明杨树感染灰斑病菌前后,叶围真菌发生了巨大的变化。这与表 1 的结果基本吻合。

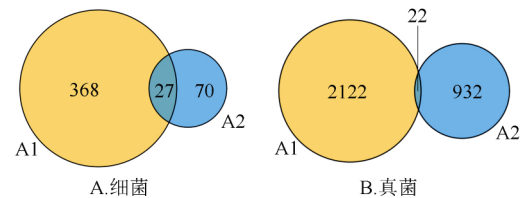


图 1 感病前后小黑杨样品真菌和细菌 OTU 分布韦恩图

2.2 感病前后样品的细菌群落结构差异性

由表 2 可知,从细菌分类门的水平看,2 个样品主要含有 5 个门的细菌,包括:变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、广古菌门(Euryarchaeota)和拟杆菌门(Bacteroidetes)。

在门水平下,感病前后样品中的细菌群落结构组成不尽相同,A1 样品主要含有变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes) 3 个门,丰度分别为 89.05%、7.13% 和 3.25%,三者合计高达 99.43%,其他门以及未鉴定的细菌丰度均在 0.27% 以下。A2 样品主要含有变形菌门、厚壁菌门、广古菌门、放线菌门和拟杆菌门 5 个门,丰度分别为 82.48%、5.84%、5.11%、2.19% 和 1.09%,其他门以及未鉴定的细菌丰度均在 0.73% 以下。结果表明:杨树感染灰斑病菌后,细菌群落结构组成发生了较大的变化,变形菌门、放线菌门和拟杆菌门丰度均不同程度下降,而其他细菌门丰度均呈不同程度上升。

根据物种分类结果,由于样品中所检测出的细菌种类繁多,许多物种含量十分少,因此筛选出优势物种,对细菌平均丰度前 15 的物种进行分类统计。从细菌分类属水平看,2 个样品丰度前 15 个属的细菌,包括:鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)、马赛菌属(*Massilia*)、短波单胞菌属(*Brevundimonas*)、*Fronidhabitans*、根瘤菌属(*Rhizobium*)、*Methanoculleus*、泛菌属(*Pantoea*)、*Hymenobacter*、*Aureimonas*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、氮单胞菌属(*Azomonas*)、贪噬菌属(*Variovorax*) 和不动杆菌属(*Acinetobacter*)。

在属水平下,2 组样品中的细菌群落结构组成也不尽相同,且差异较大的是相对丰度。A1 中鞘氨醇单胞菌属、甲基杆菌属、马赛菌属、*Fronidhabitans*、根瘤菌属、*Hymenobacter* 和 *Aureimonas* 丰度高于 A2 组,其中 *Hymenobacter*、*Aureimonas* 仅存在于 A1 组中;而 A2 中假单胞菌属、短波单胞菌属、*Methanoculleus*、泛菌属(*Pantoea*)、芽孢杆菌属、氮单胞菌属、不动杆菌属丰度高于 A1 组,其中,芽孢杆菌属仅存在于 A2 组中。

表 2 感病前后小黑杨样品细菌群落结构分布

细菌类别	相对丰度 /%	
	A1	A2
门		
变形菌门(Proteobacteria)	89.05	82.48
放线菌门(Actinobacteria)	7.13	2.19
厚壁菌门(Firmicutes)	0.10	5.84
拟杆菌门(Bacteroidetes)	3.25	1.09
广古菌门(Euryarchaeota)	0.03	5.11
芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)	0.03	0.73
Tenericutes	0	0.73
酸杆菌门(Acidobacteria)	0.02	0.36
浮霉菌门(Planctomycetes)	0	0.36
Ignavibacteriae	0	0.36
未分类	0.27	0.73
其他	0.12	0.02
属		
鞘氨醇单胞菌属(<i>Sphingomonas</i>)	47.67	9.85
假单胞菌属(<i>Pseudomonas</i>)	10.27	42.26
甲基杆菌属(<i>Methylobacterium</i>)	11.6	0.73
马赛菌属(<i>Massilia</i>)	6.55	2.19
短波单胞菌属(<i>Brevundimonas</i>)	0.05	5.84
<i>Frontrhabitans</i>	5.28	0.36
根瘤菌属(<i>Rhizobium</i>)	3.68	0.73
<i>Methanoculleus</i>	0.03	4.01
泛菌属(<i>Pantoea</i>)	0.77	2.92
<i>Hymenobacter</i>	2.75	0
<i>Aureimonas</i>	2.15	0
芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)	0	1.46
氮单胞菌属(<i>Azomonas</i>)	0.38	0.73
贪噬菌属(<i>Variovorax</i>)	0.53	0.36
不动杆菌属(<i>Acinetobacter</i>)	0.05	0.73
拉氏杆菌属(<i>Rathayibacter</i>)	0.77	0
肠杆菌属(<i>Enterobacter</i>)	0.03	0.73
芽单胞菌属(<i>Gemmatimonas</i>)	0.03	0.73

2.3 感病前后样品的真菌群落结构差异性

由表 3 可知,从真菌分类门水平看,2 组样品主要含有 3 个门的细菌,即:子囊菌门(Ascomycota)、担子菌门(Basidiomycota)、接合菌门(Zygomycota)。

在门水平下,感病前后样品中的真菌群落结构组成基本相同,差异较大的是相对丰度。这说明 2 组样品中群落结构未发生根本改变。子囊菌门是样品中的优势真菌,其中,A1 样品的丰度为 56.81%,略大于 A2 样品的丰度(46.50%)。其次是担子菌门和接合菌门,其他和未鉴定的真菌平均丰度分别为 40.60%和 51.35%。

根据物种分类结果,由于样品中所检测出的真菌种类繁多,许多物种含量十分少,因此筛选出优势物种,只对真菌丰度前 15 的物种进行分类统计。从真菌分类属水平看,2 组样品平均丰度前 15 个属的真菌包括:部分无法确定的子囊菌(unclassified_Ascomycota)、镰刀菌属(*Fusarium*)、枝孢属(*Cladosporium*)、棒盘孢属(*Coryneum*)、尖座壳属(*Diaporthe*)、炭疽菌属(*Colletotrichum*)、短梗霉属(*Aureobasidium*)、壳二孢属(*Ascochyta*)、尾孢属(*Cercospora*)、*Plectosphaerella*、青霉属(*Peni-*

cillium)、黄曲霉属(*Aspergillus*)、*Sydowia*、短梗蠕孢属(*Trichocladium*)和链格孢属(*Alternaria*)。

表 3 感病前后小黑杨样品真菌群落结构分布

真菌类别	相对丰度 /%	
	A1	A2
门		
子囊菌门(Ascomycota)	56.81	46.50
接合菌门(Basidiomycota)	1.12	0.54
担子菌门(Zygomycota)	0.50	0.40
未分类	40.60	51.35
其他	0.97	1.21
属		
部分无法确定的子囊菌	23.01	1.30
镰刀菌属(<i>Fusarium</i>)	0.40	12.50
枝孢属(<i>Cladosporium</i>)	11.19	1.05
棒盘孢属(<i>Coryneum</i>)	0.10	10.10
尖座壳属(<i>Diaporthe</i>)	0	8.46
炭疽菌属(<i>Colletotrichum</i>)	0	6
短梗霉属(<i>Aureobasidium</i>)	5.25	0
壳二孢属(<i>Ascochyta</i>)	4.06	0.02
尾孢属(<i>Cercospora</i>)	0	1.77
<i>Plectosphaerella</i>	0.01	1.71
青霉属(<i>Penicillium</i>)	1.13	1.02
黄曲霉属(<i>Aspergillus</i>)	1.35	0.28
<i>Sydowia</i>	1.60	0
短梗蠕孢属(<i>Trichocladium</i>)	1.04	0.03
链格孢属(<i>Alternaria</i>)	0.48	0.29
未分类	40.60	51.35
其他	9.78	4.12

在属水平下,2 组样品中的真菌群落结构组成基本相同,差异较大的是相对丰度。A1 中部分无法确定的子囊菌、枝孢属、短梗霉属、壳二孢属、青霉属、黄曲霉属、*Sydowia*、短梗蠕孢属、链格孢属丰度高于 A2 组,其中短梗霉属和 *Sydowia* 仅存在于 A1 组中;而 A2 中镰刀菌属、棒盘孢属、尖座壳属、炭疽菌属、尾孢属、*Plectosphaerella* 丰度相较于 A1 组高,其中尖座壳属、炭疽菌属和尾孢属仅存在于 A2 组中。

3 结束语

本研究表明,小黑杨感灰斑病后,病叶上微生物物种数量较健康叶变化明显,但在门及属水平上差异不显著。在门水平下,变形菌门是 2 组样品中的优势细菌,子囊菌门是 2 组样品的优势真菌。在属水平下,鞘氨醇单胞菌属是健康叶中的优势细菌,假单胞菌属是病叶中的优势细菌;枝孢属是健康叶中的优势真菌,镰刀菌属是病叶中的优势真菌,其次是棒盘孢属。

参 考 文 献

- [1] 鞠国柱,徐素琴,张连寿,等.杨树灰斑病的研究[J].林业科学,1965,10(4):325-330.
- [2] 刘莹.5 种药用植物提取液对杨树灰斑病抑菌活性研究[J].辽宁林业科技,2012(3):5-7,51.
- [3] 蔡有柱.杨树灰斑病的防治试验[J].青海农林科技,2012(3):67-68.

(下转 132 页)

(区)为负增长。2013—2018年,各地区全要素生产率整体增长较快地区主要是黑龙江、重庆、内蒙古、青海。增加区域间的林下经济产业发展的经验交流,借鉴4个省(区)林下经济发展的先进经验,从当地实际出发,学习林区发展林下经济的产业结构、经济政策,以提升其他省(区)林下经济效率水平,带动全国综合效率水平的上升,最终实现优势互补。如江西依托林区依山傍水、空气宜人、生态良好的自然优势,将森林景观、自然文化环境及当地林下无公害产品综合开发利用,形成森林人家、森林庄园等蕴涵观光旅游、休闲度假、生态疗养多种形式和多种项目于一体的精品旅游景区。

(6)完善日常监督管理机制。强化日常监管,建立健全林下经济政策监督机制与促进林下经济效率水平持续提升的长效机制。河北、吉林、新疆等10个省(区)的纯技术效率处于负增长,10个省(区)有不同的地质特征,所以各个省(区)应在生态承载能力之内,适量、适度、合理发展林下经济,加强对林下经济抚育、补助政策、资金落实状况的监督与评估,确保资金到位充分,项目有效实施。规范林下经济产业标准,完善林下经济产品标准和检测体系,提升林下经济发展质量,促进林下经济效率持续提升。

(上接106页)

- [4] 张靖宜,张倩茹,项文化,等.一株拮抗立枯丝核菌的放线菌筛选、鉴定及生理特性[J].生态学杂志,2014,33(2):394-399.
- [5] 纪丽莲,张强华,崔桂友.芦竹内生真菌 F0238 对植物病原菌的拮抗作用[J].微生物学通报,2004,31(2):82-86.
- [6] 康捷,章淑艳,韩韬,等.麻山药不同生长时期根际土壤微生物多样性及群落结构特征[J].生物技术通报,2019,35(9):99-

参 考 文 献

- [1] 朱震锋,曹玉昆.苇河林业局全面停伐及经济社会转型发展调研报告[J].林业经济,2016,38(10):18-21,32.
- [2] 李微,骆晓雪.黑龙江森工林区林下经济产业结构关联分析[J].林业经济,2018,40(5):55-59.
- [3] 胡艳英,曹玉昆.基于利润共享契约的林下经济产品供应链协调管理设计:以黑龙江省国有林区为例[J].林业科学,2018,54(8):165-172.
- [4] 朱请云.国有林场林下经济发展现状与对策[J].现代经济信息,2019(20):326.
- [5] 吴恒,朱丽艳,王海亮,等.新时期林下经济的内涵和发展模式思考[J].林业经济,2019,41(7):78-81.
- [6] 孙立涓.延边国有林区林下经济发展问题研究[D].延吉:延边大学,2019.
- [7] 徐蕊,韦淑英,王岩.黑龙江国有林区应对停伐政策的路径选择[J].中国林业经济,2018(1):1-4.
- [8] 王梓,张平,全良.黑龙江省林下经济产业集群发展影响因素研究[J].林业经济,2018,40(8):61-67.
- [9] 徐玮,包庆丰.国有林区职工家庭参与林下经济产业发展的意愿及其影响因素研究[J].干旱区资源与环境,2017,31(7):38-43.
- [10] 吕洁华,刘艳迪,付思琦,等.黑龙江省林下经济优势产业的选择分析:基于偏离-份额分析法[J].林业经济问题,2018,38(4):72-77,109.
- [11] 王蕾,于成成,王敏,等.我国农业生产效率的政策效应及时空差异研究:基于三阶段 DEA 模型的实证分析[J].软科学,2019,33(9):33-39.
- [12] 王海力,韩光中,谢贤健.基于 DEA 模型的西南地区耕地利用效率时空格局演变及影响因素分析[J].长江流域资源与环境,2018,27(12):2784-2795.
- [13] 杜钰玮,万志芳.基于 DEA-Malmquist 指数的林业产业转型效率评价:以黑龙江省国有林区为例[J].林业经济,2019,41(5):32-37.
- [14] 董娅楠,缪东玲,程宝栋.FDI 对中国林业全要素生产率的影响分析:基于 DEA-Malmquist 指数法[J].林业经济,2018,40(4):39-45.
- [7] 李妍,徐兴祥.高通量测序技术的研究进展[J].中国医学工程,2019,27(3):32-37.
- [8] YOU Y M, WANG J, HUANG X M, et al. Relating microbial community structure to functioning in forest soil organic carbon transformation and turnover[J]. Ecology and Evolution,2014,4(5):633-647.