

滋生青苔对柑橘叶际生物多样性的影响

杨 蕾¹, 杨海健¹, 李勋兰¹, 杨波华², 洪 林^{1*}, 张云贵^{1*}

(1. 重庆市农业科学院果树研究所, 重庆 401329; 2. 重庆市农业科学院玉米研究所, 重庆 401329)

摘要 本文利用 Illumina Miseq 高通量测序技术对重庆地区有青苔病症和无病症的柑橘叶际真核生物的群落组成、结构、多样性及差异进行了研究,旨在找到可能的病原物类群,为更好地防治柑橘青苔病奠定基础。结果表明 13 个柑橘叶片样本共检测到 303 个 OTU,多样性较为丰富;优势门为链形植物门 Streptophyta、子囊菌门 Ascomycota、绿藻门 Chlorophyta 等;通过分析发现可能的病原物为不可培养的虚幻球藻属球藻 uncultured *Apatococcus* sp.、黄绿异小球藻 *Heterochlorella luteoviridis*、无柄杯梗孢 *Cyphellophora sessilis*、海南橡胶藻 *Heveochlorella hainangensis*、*Coniochaetales* sp. GMG C4、椭圆球藻 *Chloroidium ellipsoideum*、*Kalinella bambusicola* 等;不同区县表现出青苔病症状的柑橘叶片上疑似病原物的种类和丰度都差异很大。柑橘青苔病可能是由多种藻类及真菌复合侵染造成的,病原物和柑橘叶片间的相互作用有待进一步研究。

关键词 柑橘; 青苔病; 高通量测序; 病原; 多样性

中图分类号: S436.66 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018434

Influence of moss disease on the biodiversity of phyllosphere microbe on citrus leaves

YANG Lei¹, YANG Haijian¹, LI Xunlan¹, YANG Bohua², HONG Lin¹, ZHANG Yungui¹

(1. Fruit Research Institute of Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China;

2. Maize Research Institute of Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 401329, China)

Abstract The eukaryotic diversity of citrus phyllosphere microbe communities after moss infection in Chongqing was analyzed to find the possible pathogens, and to lay the foundation for better controlling citrus moss disease. In this paper, Illumina Miseq high-throughput sequencing technology was used to explore the differences of eukaryotic composition and structure community between having symptoms samples and no symptoms samples in Chongqing. 303 OTU were detected from 13 citrus leaves samples, and the diversity of samples was abundant. The results showed that the advantage phylum were Streptophyta, Ascomycota, and Chlorophyta. The advantage classes were Dothideomycetes, Trebouxiophyceae, Eurotiomycetes, Sordariomycetes. The possible pathogens were uncultured *Apatococcus* sp., *Heterochlorella luteoviridis*, *Cyphellophora sessilis*, *Heveochlorella hainangensis*, *Coniochaetales* sp. GMG C4, *Chloroidium ellipsoideum* and *Kalinella bambusicola* etc. The species and abundance of suspected pathogens varied widely. The occurrence of citrus moss disease may be caused by a variety of algae and fungal complex infection, the interaction between pathogen and citrus leaves remains to be further studied.

Key words citrus; moss disease; high-throughput sequencing; pathogen; diversity

1981 年 Blakeman 首次将寄生在植物叶片表面的微生物定义为叶际微生物^[1-2]。由于叶、茎、花、果等植物地上部分的环境条件一致,人们普遍认为叶际是指维管植物地上部分的表面和内部。地球上植物的叶面面积大概为十亿平方公里^[3],与根际环境

相比,叶际环境的营养物质和水资源相对匮乏,且面临着紫外线照射、温差过大和存在活性氧等不利于微生物生长的严苛条件。即便如此,叶际微生物的组成仍然十分丰富且复杂,不同物种有着不同的微生物群落^[4-5],包括细菌、真菌和原生生物等。叶

收稿日期: 2018-10-09

修订日期: 2018-12-25

基金项目: 重庆市科研院所绩效激励引导专项(cstc2017xjl80013);现代农业(柑橘)产业技术体系(CARS-27);重庆市社会事业与民生保障科技创新专项(cstc2016shms-ztx80002);重庆市现代农业特色产业技术体系(2019-02-01)

* 通信作者 E-mail: 洪林 350971781@qq.com; 张云贵 552114715@qq.com

际微生物在农业生态系统中也扮演着重要角色,叶际微生物之间的互作可以影响植株的健康与生长,以及农作物的产量^[6-7]。然而,农业生态系统中关于非病原微生物的定殖和病原微生物的相互作用以及单个菌株对微生物群落影响等方面的研究较少。目前,在农业生态系统中很少有运用高通量测序技术研究作物-叶际微生物-病原菌相互作用的报道。

重庆地区高温多雨、温暖湿润,有利于柑橘生长的同时也有利于病害的发生;另一方面,柑橘属于常绿树种,通常长势较旺,枝叶繁茂,郁闭度较高,这也为柑橘病害的发生提供了良好的条件。其中柑橘青苔病就是一种受潮湿多雨气候影响甚重的病害。在我国南方的多雨季节,在一些通风不良的柑橘果园,经常能见到树干、枝叶甚至地面上布满青苔,严重阻碍树体光合作用,进而影响果实外观品质。目前国内外学者对柑橘青苔病的研究报道很少,对其病因、病原特性及防治方法等尚未形成系统科学的研究体系。为了探寻不同区域条件下有青苔病症和无病症柑橘叶片叶际真核生物群落多样性和群落结构的差异,分析可能的侵染柑橘的青苔病原种类,我们通过高通量测序的方法对重庆 3 个区县柑橘叶片进行了叶际真核生物多样性分析,以期确定柑橘青苔病的病原,并为柑橘青苔病的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料和采样地点

在重庆奉节、开州、忠县 3 个区县选择管理水平相似、海拔水平相近的 5 个果园采集样品。柑橘品种为‘W·默科特’^[8]。采样方法为:在每个果园东南西北中 5 个方位各选择 1 棵样树,在每棵样树上随机挑选有青苔病症和无青苔病症的叶片各 9 片,即 1 份样品 45 片柑橘叶片。共采集 13 份,样品信息见表 1。

1.2 真核生物基因组 DNA 的提取及质量检测

柑橘叶表的真核生物基因组 DNA 采用 FastDNA™ SPIN Kit for soil 进行提取,用 Nanodrop 2000 检测基因组 DNA 质量。浓度 ≥ 10 ng/ μ L,总量 ≥ 500 ng,纯度 OD_{260/280}=1.7~2.0 的 DNA 可用于后续试验。取 3 μ L DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性。检测电压为 120 V,电泳时间约为 20 min。

表 1 采自不同果园的柑橘叶片样品信息
Table 1 Sample informations of citrus leaves collected from different orchards

编号 Number	组名 Sample name	地点 Sampling site	有无病症 With or without symptoms
1	A1	奉节康乐镇铁福村	有
2	A2	奉节康乐镇铁福村	无
3	B1-1	开州丰乐镇黄陵村	有
4	B1-2	开州丰乐镇黄陵村	有
5	B2	开州丰乐镇黄陵村	无
6	C1-1	开州竹溪镇白云村	有
7	C1-2	开州竹溪镇白云村	有
8	C2	开州竹溪镇白云村	无
9	D1-1	开州竹溪镇青吉村	有
10	D1-2	开州竹溪镇青吉村	有
11	D2	开州竹溪镇青吉村	无
12	E1	忠县新立镇桂花村	有
13	E2	忠县新立镇桂花村	无

1.3 高通量测序及数据分析

1.3.1 真核生物 DNA 的提取和扩增

以 3 个不同区县采集的 13 份柑橘叶片 DNA 原液作为 PCR 模板,对其 18S rRNA V4 区进行高保真 PCR 扩增,设置 3 个重复试验,同时以标准的真菌/真菌基因组 DNA Mix 作为阳性对照。扩增引物根据选定的检测区域确定,Primer F= Illumina adapter sequence1 + TTGGYRAATGCTTTTCGC, Primer R= Illumina adapter sequence 2 + CGCGG-TAATTCCAGCTCCA。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 20 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,25 个循环;最后在 72℃ 下延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物是否单一和特异。将同一个样本的 3 个平行扩增产物混合,每个样品加入等体积的 Agencourt AMPure XP 核酸纯化磁珠进行纯化。委托上海天昊生物科技有限公司进行 Illumina MiSeq^[9] 高通量测序。

1.3.2 DNA 文库的建立及上机测序

利用带有 Index 序列的引物,通过高保真 PCR 向文库末端引入特异性标签序列。反应采用 8 个循环的 PCR 程序。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,应用核酸纯化磁珠对扩增产物进行纯化,得到一个样本的原始文库。

根据琼脂糖凝胶电泳的初步定量结果,对已经带有各自 Index 标签的样本文库浓度进行适当稀释,再利用 Qubit 对文库进行精确定量,根据不同样品的测序通量要求,按相应比例(摩尔比)混合样品。

对于混样后的文库采用 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测测序文库插入片段的大小,确认在 120~200 bp 之间无非特异性扩增,并准确测定测序文库浓度。采用 Miseq 平台 2×250 bp 的双端测序策略对文库进行测序,最后对测序结果进行生物信息学分析。

1.3.3 OTU 聚类分析及注释

运用 USEARCH 软件合并序列长度和碱基组成完全一致的序列即重复序列,并去除 singleton 序列(只出现一次的序列),提取非重复序列以备后续分析。根据重复序列条数进行排序,使用 UPARSE 聚类方法将经过质控后的序列按序列间 97% 的相似性归并到一个操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)。OTU 是在系统发生学研究或群体遗传学研究中为便于分析而人为设置的分类单元标志,简单地说,OTU 类似于种,是根据高变区序列比对得出的,一般相似度大于 97% 或 95% 的序列称为同一个 OTU^[10]。OTU 聚类时同时去除 Chimera 序列,以备后续 OTU 分类注释。由于每个样本对应的 reads 数量差距较大,为避免因样品数据大小不同而造成分析时的偏差,在样品达到足够测序深度的情况下,需对每个样品进行随机抽平处理,获得统一的基数(一般选择测序样本中最小测序 reads 数为基数),从而准确预测 OTU 的丰度。使用 Mothur^[11] 软件的 classify_seqs 命令,与 SILVA 数据库进行比对,找出与 OTU 序列相似度最高且可信度达 80% 以上的物种信息用于 OTU 的注释。

1.3.4 多样性及群落结构分析

根据 OTU 列表中的供试样品物种丰度,应用软件 Mothur 中的 summary.single 命令,计算种群丰富度指数 Chao 1 指数^[12]和 ACE 指数^[13],计算群落多样性指数 Shannon 指数^[14]、Simpson 指数^[15]、InvSimpson 指数和用来评估样本序列覆盖度的 Coverage 指数^[16]。

1.4 序列数据处理与统计分析

首先使用 FastQC 评估原始数据的质量指标,通过 FASTX-Toolkit 对数据进行质量控制,剔除未识别碱基和低质量序列。然后使用 Flash 程序(version 1.0.0)进行拼接,通过引物 barcode(标记),使用 FASTX-Toolkit 软件进行混合样品的分离。使用 U-Chime (version USEARCH 5.2.32)去除嵌合序列。计算 DNA 矩阵,调用 UPARSE 程序,在 97% 的序列相似度水平下对序列进行 OTU 划分。

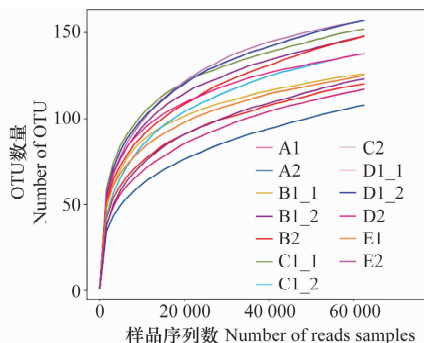
RDP-Classifer 软件分析的置信度参数设置为 50%。用 R 语言 vegan 程序包完成多样性分析。

所得数据用平均值和标准误表示,采用 IBM SPSS Statics 20 软件对所测数据进行单因素方差分析,并应用 Duncan 氏新复极差法对不同处理间的差异显著性进行检验, P 值小于 0.05 被认为具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 柑橘叶际真核生物群落基本组成

13 份柑橘叶片样品经处理后共获得 1 546 363 条高质量序列片段,总碱基数为 533 739 196 个,平均长度为 345.16 bp,共检测到 303 个 OTU。在生物多样性和群落调查中,稀释曲线(Rarefaction curve)被广泛用于判断样品量是否充分,并用以估计物种丰富度。从图 1 可以看出,13 份样品对应的稀释曲线均基本趋于平缓,说明取样基本合理,实际环境中真核生物群落结构的置信度较高,能够比较真实地反映出样品的群落组成情况。从物种注释统计表(表 2)可以看出,通过计算不同分类水平上的类型,样品 C2 组鉴定到的真核生物类型最多,有 133 个门,118 个纲和 98 个目,66 个科,81 个属,70 个种。虽然其他组的物种类型没有 C2 组丰富,但均维持在丰富度较高的水平。



A1~A2: 奉节康乐镇铁福村有病症组和无病症组; B1-1~B1-2: 开州丰乐镇黄陵村有病症组; B2: 开州丰乐镇黄陵村无病症组; C1-1~C1-2: 开州竹溪镇白云村有病症组; C2: 开州竹溪镇白云村无病症组; D1-1~D1-2: 开州竹溪镇青吉村有病症组; D2: 开州竹溪镇青吉村无病症组; E1~E2: 忠县新立镇桂花村有病症组和无病症组。下同
A1 and A2: Sample groups with and without symptoms from Tiefu village, Kangle town, Fengjie county; B1-1 and B1-2: Sample groups with symptoms from Huangling village, Fengle town, Kaizhou district; B2: Asymptomatic sample group from Huangling village, Fengle town, Kaizhou district; C1-1 and C1-2: Sample groups with symptoms from Baiyun village, Zhuxi town, Kaizhou district; C2: Asymptomatic sample group from Baiyun village, Zhuxi town, Kaizhou district; D1-1 and D1-2: Sample groups with symptoms from Qingji village, Zhuxi town, Kaizhou district; D2: Asymptomatic sample group of Qingji village, Zhuxi town, Kaizhou district; E1 and E2: Sample groups with and without symptoms from Guihua village, Xinli town, Zhongxian county. The same below

图 1 不同来源的柑橘叶片样品中物种稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of different sample along the number of sequences from citrus leaves

表 2 柑橘叶片样品中物种注释统计表¹⁾

Table 2 Classified phylotypes and numbers of microbe from citrus leave samples at different taxa

分类单元 Taxon	各分类单元数量/个 Numbers of different taxa												
	A1	A2	B1-1	B1-2	B2	C1-1	C1-2	C2	D1-1	D1-2	D2	E1	E2
界 Kingdom	117	108	126	148	120	152	138	157	148	157	138	125	123
门 Phylum	98	96	106	126	108	127	114	133	123	119	117	112	110
纲 Class	91	84	90	109	98	108	98	118	105	104	104	93	97
目 Order	84	73	75	91	86	95	91	98	90	95	91	77	84
科 Family	53	44	44	57	54	63	60	66	55	63	59	47	58
属 Genus	62	54	54	73	64	72	69	81	66	72	74	57	71
种 Species	49	42	48	59	50	60	56	70	55	62	59	46	61

1) A1~A2: 奉节康乐镇铁福村有病症组和无病症组; B1-1~B1-2: 开州丰乐镇黄陵村有病症组; B2: 开州丰乐镇黄陵村无病症组; C1-1~C1-2: 开州竹溪镇白云村有病症组; C2: 开州竹溪镇白云村无病症组; D1-1~D1-2: 开州竹溪镇青吉村有病症组; D2: 开州竹溪镇青吉村无病症组; E1~E2: 忠县新立镇桂花村有病症组和无病症组。下同。
A1 and A2: Sample groups with and without symptoms from Tiefu village, Kangle town, Fengjie county; B1-1 and B1-2: Sample groups with symptoms from Huangling village, Fengle town, Kaizhou district; B2: Asymptomatic sample group from Huangling village, Fengle town, Kaizhou district; C1-1 and C1-2: Sample groups with symptoms from Baiyun village, Zhuxi town, Kaizhou district; C2: Asymptomatic sample group from Baiyun village, Zhuxi town, Kaizhou district; D1-1 and D1-2: Sample groups with symptoms from Qingji village, Zhuxi town, Kaizhou district; D2: Asymptomatic sample group of Qingji village, Zhuxi town, Kaizhou district; E1 and E2: Sample groups with and without symptoms from Guihua village, Xinli town, Zhongxian county. The same below.

2.2 柑橘叶际真核生物群落结构

通过柑橘叶际微生物样本物种组成图(图 2)可以看出不同分类水平上的优势物种。优势门:链形植物门 Streptophyta、子囊菌门 Ascomycota、绿藻门 Chlorophyta 和担子菌门 Basidiomycota;优势纲:座囊菌纲 Dothideomycetes、共球藻纲 Trebouxio-phyceae、散囊菌纲 Eurotiomycetes、子囊菌纲 Sor-dariomycetes 等;优势目:煤炱目 Capnodiales、格孢菌目 Pleosporales、刺盾炱目 Chaetothyriales、小丛壳目 Glomerellales、小球藻目 Chlorellales 等;优势

科:Cladosporiaceae、Phaeosphaeriaceae、Trichomer-iaceae、刺壳菌科 Chaetothyriaceae、小丛壳科 Glomerellaceae 等;优势属:枝孢属 *Cladosporium*、*Parastagonospora*、*Knufia*、弯梗孢属 *Camptophora*、异小球藻属 *Heterochlorella* 等;优势种:多主枝孢 *Cladosporium herbarum*、不可培养的虚幻球藻属球藻 uncultured *Apatococcus* sp.、*Parastagonospora ve-nae*、*Knufia petricola*、*Camptophora hylomeconis*、黄绿异小球藻 *Heterochlorella luteoviridis*、胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 等。

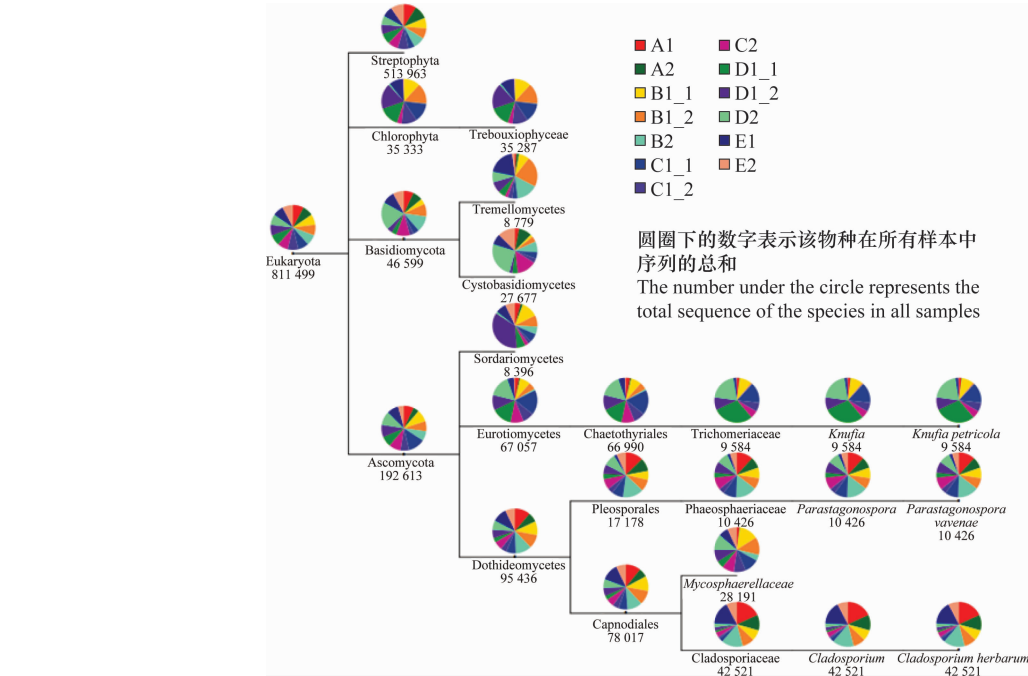


图 2 柑橘叶样的物种组成树状图
Fig. 2 Community composition dendrogram of microbe on citrus leaves from different area

经 OTU 物种注释,13 个样品中的物种很丰富,为便于直观地观测到所有样本间物种组成差异,选择相对丰度大于 1% 的物种进行对比分析(图 3)。在种水平上,除去柑橘、其他种和未知种外,共有 13 个种

的相对丰度较高,其中相对丰度最高的 3 个种为 *Cladosporium herbarum* (5.24%)、uncultured *Apatococcus* sp. (2.69%)、*Parastagonospora venae* (1.28%)。

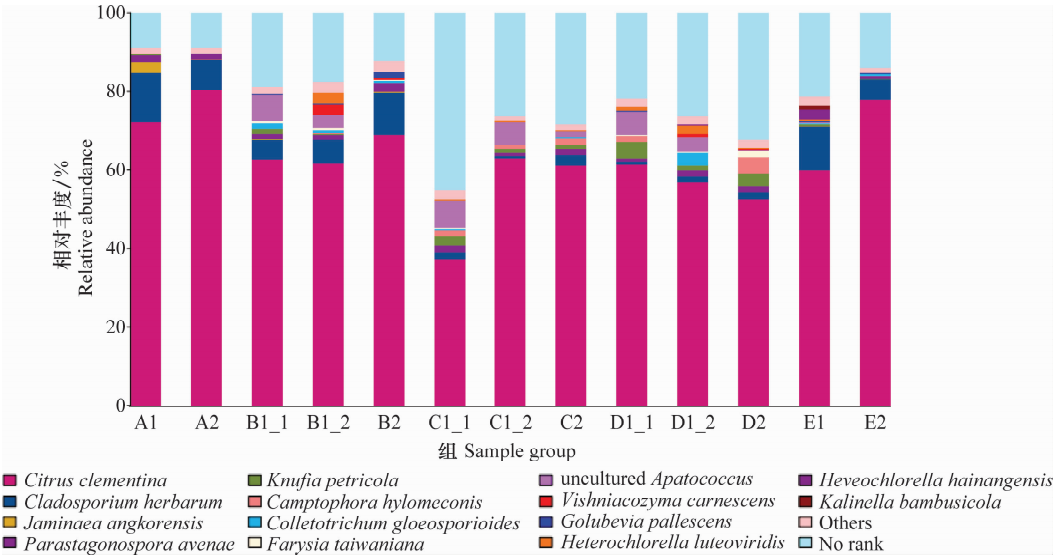


图 3 柑橘叶样品在种水平上的相对丰度

Fig. 3 Relative abundance of microbe on different citrus leaves samples at species level

2.3 柑橘叶表真核生物多样性分析

2.3.1 Alpha 多样性分析

从表 3 可以看出,各处理组真菌的 Coverage 指数都超过了 90%,说明在该水平上的测序结果能够反映出所测样本中生物的真实情况。Chao1 指数、Shannon 指数和 Simpson 指数是常用的描述群落物种多样性的 Alpha 多样性指数,这些指数可以对群落物种组成的丰富度和均匀度进行综合评价,而 Shannon 指数对物种丰富度更敏感。Chao1 数值越高表明群落物种的丰富度越高,Shannon 值越大说

明群落多样性越高,Simpson 指数值越大群落多样性越低^[17]。从这些指数可以看出,柑橘叶片真核生物的多样性较为丰富,其中 Chao1 指数最高和最低的分别是 D1-1 和 A1,Shannon 指数最高和最低的分别是 C1-1 和 A2,Simpson 指数最高和最低的分别是 A2 和 C1-1。综合这些指数的特征,在 13 组样品中真核生物丰富度最高的是 C1-1 组。经方差分析发现,13 组样品间的真核生物丰富度及多样性差异显著($P<0.05$),说明不同区域有病症和无病症柑橘叶表真核生物的丰富度都较高,且多样性差异明显。

表 3 柑橘叶片样品物种丰富度及多样性指数表¹⁾

Table 3 Diversity index from eucaryon of different citrus leaves samples							
样品组 Sample group	观测值 Observed	Chao 氏指数 Chao1	ACE 指数 ACE	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	反辛普森指数 InvSimpson	覆盖度 Coverage
A1	117 i	148.00 l	150.90 k	1.23 k	0.54 c	0.46 h	1.00
A2	108 j	157.60 g	145.68 l	0.96 m	0.65 a	0.35 j	1.00
B1_1	126 e	154.11 i	145.67 l	1.68 h	0.41 e	0.59 f	1.00
B1_2	148 c	183.43 c	177.51 d	1.82 e	0.39 f	0.61 e	1.00
B2	120 h	151.23 k	152.91 i	1.45 j	0.49 d	0.51 g	1.00
C1_1	152 b	174.56 d	180.10 c	2.35 a	0.19 j	0.81 a	1.00
C1_2	138 d	156.00 h	163.56 g	1.61 i	0.41 e	0.59 f	1.00
C2	157 a	170.04 e	172.47 e	1.79 f	0.39 f	0.61 e	1.00
D1_1	148 c	200.00 a	194.90 a	1.74 g	0.39 f	0.61 e	1.00
D1_2	157 a	192.20 b	187.71 b	1.98 c	0.34 h	0.66 c	1.00
D2	138 d	165.00 f	164.33 f	2.04 b	0.30 i	0.70 b	1.00
E1	125 f	152.08 j	151.17 j	1.83 d	0.38 g	0.62 d	1.00
E2	123 g	152.18 j	162.95 h	1.10 l	0.61 b	0.39 i	1.00

1) 同一列数据后不同字母表示差异显著($P<0.05$)。
The different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

2.3.2 Beta 多样性分析

Beta 多样性指标用来比较多组样品之间的差异。根据不同的采样地点将样品分为了 5 组。Venn 图可以统计 OTU 水平中多组样本中共有或独有的物种数目,可以反映各个环境样品在物种组成上的相似性及重叠情况^[17]。共同含有的 OTU 数量越多说明样品间的生物群落组成相似度越高。通过 Venn 图(图 4)可以看出,不同区组柑橘叶表包含共有的真核生物 OTU 是 85 个,含有特异 OTU 个数最多的是 E 组。

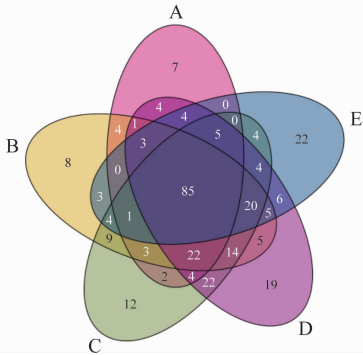


图 4 5 个不同区域采集的柑橘叶样 Venn 图
Fig. 4 Venn diagram of citrus leaves samples from five areas

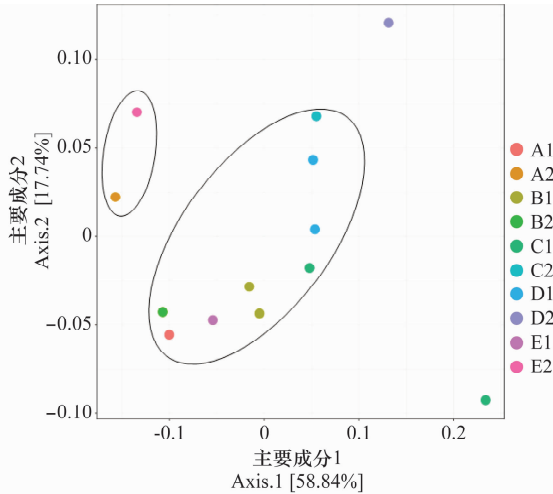
2.3.3 主坐标分析

主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA),是一种基于距离评估数据相似性或差异性的可视化方法,通过对特征值和特征向量进行排序,选择排在前几位的特征值通过 PCoA 可以观察个体或群体间的差异^[18]。在 PCoA 图中,空间较近的(距离较近的)样本显示样本间的差异较少,反之,若样本间距离较大则样本间的差异性较大。将 B1-1、B1-2 合并为 B1,C1-1、C1-2 合并为 C1,D1-1、D1-2 合并为 D1 进行分析。从图 5 可以看出,采集自奉节和无病症组 A2 和 E2 叶片的生物类型较为相似,距离近差异小;A1、B1、B2、C2、D1 和 E1 的距离较近,样品物种组成差异小;C1、D2 与上述明显聚在一起的两类的距离较远,与它们的差异都较大。

2.4 有病症组和无病症组之间生物组成和结构的差异

2.4.1 有病症组和无病症组组成差异分析

将 13 份样品分为有病症组和无病症组两个组别。除柑橘和无记录的物种外,选择在种水平上相对丰度在前 20 位的物种绘制柱状图(图 6)。各样品群落结构柱状图包含两方面信息:样本所含各分类水平物种和物种的相对丰度。



A1~A2: 奉节康乐镇铁福村有病症组和无病症组; B1~B2: 开州丰乐镇黄陵村有病症组和无病症组; C1~C2: 开州竹溪镇白云村有病症组和无病症组; D1~D2: 开州竹溪镇青吉村有病症组和无病症组; E1~E2: 忠县新立镇桂花村有病症组和无病症组
A1 and A2: Sample groups with and without symptoms from Tiefu village, Kangle town, Fengjie county; B1 and B2: Sample groups with and without symptoms from Huangling village, Fengle town, Kaizhou district; C1 and C2: Sample groups with and without symptoms from Baiyun village, Zhuxi town, Kaizhou district; D1 and D2: Sample groups with and without symptoms from Qingji village, Zhuxi town, Kaizhou district; E1 and E2: Sample groups with and without symptoms from Guihua village, Xinli town, Zhongxian county

图 5 柑橘叶样物种相似度主坐标分析
Fig. 5 Principal coordinate analysis (PCoA) of species from different citrus leaves samples

有病症组中丰度是无病症组的 7 倍以上的物种有:不可培养的虚幻球藻属球藻 *uncultured Apato-coccus* sp.、黄绿异小球藻 *Heterochlorella luteoviridis*、无柄杯梗孢 *Cyphellophora sessilis*、海南橡胶藻 *Heveochlorella hainangensis*、*Coniochaetales* sp. GMG C4、椭圆球藻 *Chloroidium ellipsoideum*、*Kalinella bambusicola*;有病症组中丰度是无病症组的 1~3 倍物种有:胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、*Vishniacozyma carnescens*、*Jaminaea angkorensis*。由此推测,柑橘青苔病可能的病原为以上 10 个物种中的一个或多个。在无病症组中的丰度是有病症组 3 倍以上的物种有:*Camptophora hylomeconis*、*Farysia taiwaniana*、*Golubevia pall-escens*、*Papiliotrema aurea*,这些菌可能是潜在的生防菌株,或是在真核生物与柑橘寄主的互动关系中可发挥重要作用的菌株。

2.4.2 不同区域有病症组病原物组成差异

不同区县有青苔病症状的柑橘叶片上疑似病原物的种类和丰度都差异很大(图 7)。在奉节主要的病原为 *Jaminaea angkorensis* 和 *Coniochaetales* sp. GMG

C4,其中 *Jaminaea angkorensis* 所占比例高达 91.76%,而黄绿异小球藻 *Heterochlorella luteoviridis*、海南橡胶藻 *Heveochlorella hainangensis* 和 *Kalinella bambusicola* 这 3 种可能的病原菌并不包含在奉节采集的有病症柑橘叶片中;与之形成鲜明对比的是采集自忠县的有病症叶片,其病原主要为海南橡胶藻 *H. hainangensis*,其所占比例为 35.50%,其次为 *K. bambusicola*、椭圆球藻 *C. ellipsoideum* 和无

柄杯梗孢 *C. sessilis*,它们所占比例均在 10%以上,而 *J. angkorensis* 和 *Coniochaetales* sp. GMG C4 所占比例均为 0;采集自开州不同乡镇的有病症柑橘叶片可能病原物的组成较为相似,主要为 uncultured *Apatococcus* sp.、黄绿异小球藻 *H. luteoviridis* 和胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 这 3 种,但是这些优势种所占的比例有很大的不同。

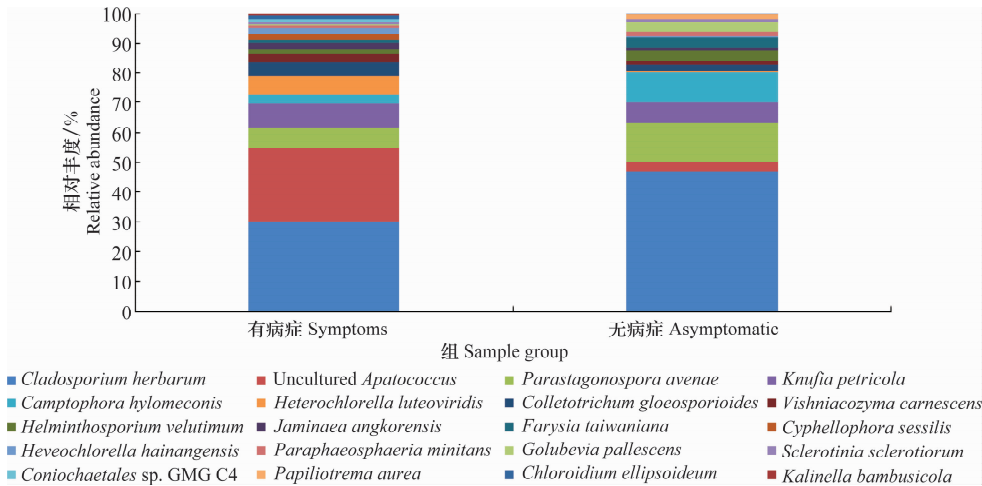


图 6 柑橘叶样有病症组和无病症组物种组成图

Fig. 6 Difference of species composition between symptoms samples and asymptomatic citrus leaves samples

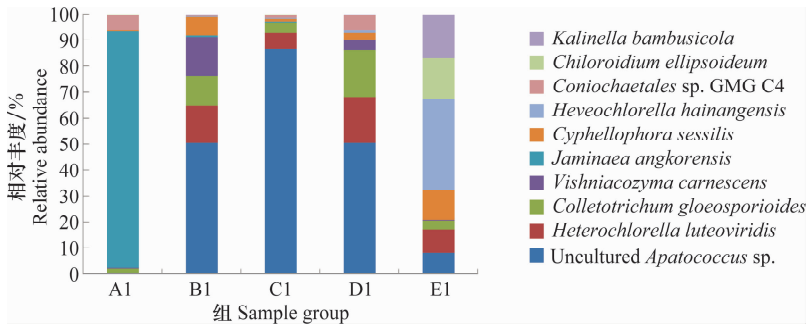


图 7 不同区域柑橘叶片样品有病症组病原物组成图

Fig. 7 Species composition of eucaryon in citrus leaves samples with symptoms from different areas

3 讨论

本研究应用高通量技术对采自重庆不同区县有青苔病症和无病症的 13 份柑橘叶样的真核生物物种进行了检测。结果表明,链形植物门 Streptophyta、子囊菌门 Ascomycota、绿藻门 Chlorophyta 和担子菌门 Basidiomycota 是 13 份样品中真核生物的优势门。通过 Alpha 多样性分析发现 13 份样品中真核生物物种的多样性差异不大。说明所选择的采样点虽然生境不同,但柑橘叶际真核生物的种类较为

相似。对比分析有病症组和无病症组柑橘叶片生物种类和占比发现两者之间的差异显著,从有病症组中的物种丰度显著高于无病症组的真核生物种类可以推测出可能的病原物为不可培养的球藻 uncultured *Apatococcus* sp.、黄绿异小球藻 *Heterochlorella luteoviridis*、无柄杯梗孢 *Cyphellophora sessilis*、海南橡胶藻 *Heveochlorella hainangensis*、*Coniochaetales* sp. GMG C4、椭圆球藻 *Chloroidium ellipsoideum*、*Kalinella bambusicola* 等。在无病症组中的丰度显著高于有病症组的菌种可能是一些有重

要功能的内生菌或附生菌。内共生菌能够通过自身的代谢活动增强寄主植物对病虫害的抗性^[19]。

病害的发生流行除病原因素外还需具备适宜的环境条件^[20]。通过对比不同区域有病症组可能的病原物组成和占比发现,不同区域间的差异很大,由此可以推测不同区域内引起柑橘青苔病的病原物不尽相同,这可能是不同区域光照、降雨量、相对湿度、温度等气候因子有较大差异造成的。颜学海、Kemp 等学者研究表明病原菌多样性与地理区域分布呈现一定相关性^[21-22]。这与本研究的结果较为一致。

本研究发现柑橘青苔病可能的病原物为不可培养的球藻 uncultured *Apatococcus* sp.、黄绿异小球藻 *H. luteoviridis*、无柄杯梗孢 *C. sessilis*、海南橡胶藻 *H. hainangensis*、*Coniochaetales* sp. GMG C4、椭圆球藻 *C. ellipsoideum*、*K. bambusicola*、胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 等。王大平等研究认为柑橘青苔病是由绿藻门虚幻球藻属虚幻球藻 *Apatococcus lobatus* 所致^[23],在其后期的研究中又发现该病原是虚幻球藻和胶孢炭疽菌^[24]。而本研究的结果与前人的结论有很大的不同。本研究结果表明柑橘青苔病的病原物大部分属于藻类,其中含量最高的为 uncultured *Apatococcus* sp.,但从高通量测序结果中并未发现虚幻球藻这种球藻。胶孢炭疽菌的相对丰富虽然较高,但与其他病原藻类相比存在的比例仍然较低。此外,胶孢炭疽菌作为柑橘炭疽病的病原菌在柑橘叶际较为普遍,本研究不可排除柑橘既感染柑橘炭疽病又滋生青苔的可能。因此,不能确定胶孢炭疽菌是柑橘青苔病的病原。

为了从柑橘品种相同、品种管理水平相似的果园中采取叶片样本,本试验选择了重庆奉节、开州、忠县 3 个区县的‘W·默科特’柑橘叶片,共采集样品 13 份。由本次的试验结果可以推测不同品种和不同区域内柑橘叶际生物的种类都会有较大的差异,后续的研究中可以进行相关的探索。此外,健康及患病柑橘叶片间的相互作用有待进一步研究,对于处于不同病情等级下柑橘叶表的生物多样性也值得探索。

参考文献

- [1] BLAKEMAN J P. Microbial ecology of the phylloplane [M]. New York: Academic Press Inc, 1981:1-5.
- [2] LEVEAU J H. Life of microbes on aerial plant parts [M]. Springer; Principles of Plant-Microbe Interactions, 2015: 17-24.
- [3] LINDOW S E, BANDL M T. Microbiology of the phyllosphere [J].

Applied Environment Microbiology, 2003, 69(4): 1875-1883.

- [4] WHIPPS J M, HAND P, PINK D, et al. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype [J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(6): 1744-1755.
- [5] YADAV R K P, PAPATHEODOROU E M, KARAMANOLI K, et al. Abundance and diversity of the phyllosphere bacterial communities of Mediterranean perennial plants that differ in leaf chemistry [J]. Chemoecology, 2008, 18(4): 217-226.
- [6] NEWTON A C, GRAVOUIL C, FOUNTAINE J M. Managing the ecology of foliar pathogens: ecological tolerance in crops [J]. Annals of Applied Biology, 2010, 157(3): 343-359.
- [7] BERLEC A. Novel techniques and findings in the study of plant microbiota: search for plant probiotics [J]. Plant Science, 2012, 193/194(3): 96-102.
- [8] 邓秀新. 世界柑橘品种改良的进展 [J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1140-1146.
- [9] FOUTS D E, SZPAKOWSKI S, PURUSHE J, et al. Next generation sequencing to define prokaryotic and fungal diversity in the bovine rumen [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e48289.
- [10] CARON D A, COUNTWAY P D, SAVAI P, et al. Defining DNA-based operational taxonomic units for microbial-eukaryote ecology [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(18): 5797-5808.
- [11] SCHLOSS P D, WESTCOTT S L, RYABIN T, et al. Introducing mothur: open-source, platform independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [12] CHAO A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population [J]. Scandinavian Journal of Statistics, 1984, 11(4): 265-270.
- [13] CHAO A, LEE S M. Estimating the number of classes via sample coverage [J]. Journal of the American Statistical Association, 1992, 87(417): 210-217.
- [14] HILL M O. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences [J]. Ecology, 1973, 54(2): 427-432.
- [15] SIMPSON E H. Measurement of diversity [J]. Nature, 1949, 163(4148): 688.
- [16] ESTY W W. The efficiency of good's nonparametric coverage estimator [J]. The Annals of Statistics, 1986, 14(3): 1257-1260.
- [17] MAUGHAN H, WANG P W, CABALLERO J D, et al. Analysis of the cystic fibrosis lung microbiota via serial Illumina sequencing of bacterial 16S rRNA hypervariable regions [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(10): e45791.
- [18] JIANG Xiaotao, PENG Xin, DENG Guanhua, et al. Illumina Sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland [J]. Microbiology Ecology, 2013, 66(1): 96-104.
- [19] 陈露, 谷少华, 王雄雅, 等. 烟粉虱抗、感杀虫剂品系内生菌群落的差异分析 [J]. 植物保护, 2018, 44(1): 59-66.

参考文献

[1] ZHU Youyong, CHEN Hairu, FAN Jinghua, et al. Genetic diversity and disease control in rice [J]. Nature, 2000, 406 (6797): 718.

[2] 朱有勇. 农业生物多样性控制作物病虫害的效应原理与方法 [M]. 北京:中国农业大学出版社, 2012: 305.

[3] WANG Ying, REN Zhong, ZHENG Xiaobo, et al. Detection of *Phytophthora melonis* in samples of soil, water, and plant tissue with polymerase chain reaction [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2007, 29(2): 172–181.

[4] 张存英. 黄瓜疫病及防治[J]. 北方园艺, 2006(5): 131.

[5] SCHOOF A, ENTZ M H, VAN A R C, et al. Agronomic performance of pesticide free production under two crop rotations [J]. Renewable Agriculture & Food Systems, 2005, 20 (2): 91–100.

[6] 梁春启, 甄文超, 张承胤, 等. 玉米秸秆腐解液中酚酸的检测及对小麦土传病原菌的化感作用[J]. 中国农学通报, 2009, 25 (2): 210–213.

[7] ICIEK M, KWIECIEŃ I, WŁODEK L. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds [J]. Environmental & Molecular Mutagenesis, 2010, 50(3): 247–265.

[8] 钊有聪, 张立猛, 焦永鸽, 等. 大蒜与烤烟轮作对烟草黑胫病的防治效果及作用机理初探[J]. 中国烟草学报, 2016, 22(5): 55–62.

[9] 张敬德, 周丽娟. 蔬菜病虫害防治技术[J]. 吉林农业, 2009(19): 32–33.

[10] 张百俊, 王广印, 陈英照. 大蒜浸提液对西葫芦种子活力及幼苗生长的影响[J]. 河南农业大学学报, 2005, 39(1): 63–65.

[11] DONG L L, HAO Z P, ZUO Y M, et al. Effects of garlic bulb aqueous extract on cucumber seedlings, soil microbial counts, and enzyme activities[J]. Communications in Soil Science & Plant Analysis, 2012, 43(22): 2888–2896.

[12] 周艳丽, 程智慧, 孟焕文. 大蒜根系分泌物对不同受体蔬菜的化感作用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 81–86.

[13] 周艳丽, 程智慧, 孟焕文, 等. 大蒜根系水浸液及根系分泌物的化感作用评价[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(10): 87–92.

[14] 程智慧, 佟飞, 金瑞. 大蒜秸秆水浸液的抑菌作用和抑菌成分初步分析[J]. 西北植物学报, 2008, 28(2): 324–330.

[15] 王春会, 程智慧, 牛青, 等. 大蒜植株超声波浸提液对不同受体蔬菜的化感作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(7): 103–109.

[16] HAN Xu, CHENG Zhihui, MENG Huanwen. Soil properties, nutrient dynamics, and soil enzyme activities associated with garlic stalk decomposition under various conditions [J/OL]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e50868.

[17] HAN Xu, CHENG Zhihui, MENG Huanwen. Growth of wheat and lettuce and enzyme activities of soils under garlic stalk decomposition for different durations [J]. Journal of the Science of Food & Agriculture, 2017, 97(9): 2727–2735.

[18] 赖荣泉, 曾文龙, 江桂花, 等. 大蒜乙醇提取物对烟草青枯病及普通花叶病的控制作用初报[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2011, 26(2): 284–287.

[19] 金扬秀, 谢关林, 孙祥良, 等. 大蒜轮作与瓜类枯萎病发病的关系[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2003, 21(1): 9–12.

[20] 陈志杰, 张锋, 张淑莲, 等. 温室黄瓜根结线虫病非化学防治技术研究初报[J]. 中国农学通报, 2008, 24(1): 367–370.

[21] KRUPINSKY J M, BAILEY K L, MCMULLEN M P, et al. Managing plant disease risk in diversified cropping systems [J]. Agronomy Journal, 2002, 94(2): 198.

[22] ERIC BLOCK. 神奇的葱蒜——传说与科学[M]. 唐岑, 译. 北京: 化学工业出版社, 2017: 343.

[23] HANSEN Z R, KEINATH A P. Increased pepper yields following incorporation of biofumigation cover crops and the effects on soilborne pathogen populations and pepper diseases [J]. Applied Soil Ecology, 2013, 63(1): 67–77.

[24] 宋兴舜, 宋凤杰, 于广建. 大蒜素对番茄三种真菌病害的影响[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(4): 395–398.

[25] 林辰壹, 郑成锐, 程智慧. 大蒜鳞茎提取液对黄瓜 2 种种传病害的抑制及化感作用研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2009, 37(10): 140–144.

[26] 佟飞, 程智慧, 金瑞, 等. 大蒜植株水浸液醇溶成分的化感作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(6): 119–124.

[27] 周清, 李保同, 汤丽梅. 大蒜素对辣椒炭疽病和辣椒疫病病菌的室内抑制活性测定及田间防效研究[J]. 草业学报, 2014, 23 (3): 262–268.

[28] 廖静静, 刘屹湘, 杨敏, 等. 大蒜挥发物和浸提液对辣椒疫霉菌的抑菌活性分析[J]. 云南农业大学学报, 2014, 29(3): 337–346.

[29] 董林林, 李振东, 王倩. 大蒜鳞茎浸提液对黄瓜幼苗的化感作用[J]. 华北农学报, 2008, 23(S2): 47–50.

[30] 刘素慧, 徐金强, 刘庆涛, 等. 大蒜秸秆水浸液化感作用的研究[J]. 北方园艺, 2015(9): 10–13.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 105 页)

[20] 秦虎强, 高小宁, 韩青梅, 等. 油菜菌核病发生流行与菌源量、气候因子关系分析及病情预测模型的建立[J]. 植物保护学报, 2018, 45(3): 496–502.

[21] 颜学海, 邓元宝, 韩冬, 等. 西南地区稻瘟病菌群体遗传多样性分析[J]. 植物保护学报, 2016, 43(4): 537–543.

[22] KEMP P F, ALLER J Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us [J].

FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(1): 161–177.

[23] 王大平, 李道高. 夏橙绿斑病的病原鉴定及其生长特性研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(6): 288–291.

[24] 王大平, 叶宝兴. 夏橙绿斑病病理机制的解剖学研究[J]. 西南农业学报, 2015, 28(5): 2090–2095.

(责任编辑: 杨明丽)