

基于 PCR-DGGE 技术对库尔勒香梨“黑头病”病变组织生物群落的初步研究

程少波, 杨焱, 郭敏瑞, 江英, 陈国刚*

(石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000)

摘要: 为了解库尔勒香梨“黑头病”病变组织中真菌群落结构特征,应用 PCR-DGGE 技术对库尔勒地区 4 个不同保鲜库中 12 个样品真菌群落结构进行了研究。根据 DGGE 图谱对生物多样性进行了分析。结果表明,所有样品群落结构存在一定的差异,造成差异的原因可能与库尔勒香梨的种植环境有关;不同样品的 9 号条带在整个病变过程中优势度最高,其代表的菌株,可被认为是导致库尔勒香梨“黑头病”的主要致病菌;对 DGGE 的优势条带序列分析,同源性最高的微生物属于链格孢属(*Alternaria*)。该研究初步揭示了库尔勒香梨病变组织中微生物群落的变化规律,为库尔勒香梨“黑头病”的研究提供理论依据。

关键词: PCR-DGGE; 库尔勒香梨; 黑头病; 18S rDNA

中图分类号: Q 938 文章编号: 1673-1689(2019)02-0044-06 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.007

Preliminary Analysis of Microbial Communities in Korla Fragrant Pear Diseased Tissues by PCR-DGGE Technique

CHENG Shaobo, YANG Yan, GUO Minrui, JIANG Ying, CHEN Guogang*

(College of Food, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: To understand the characteristics of fungal community structure in the lesion tissues of Kuerle fragrant pear "Blackhead Disease", the fungal community structure of 12 samples from 4 different fresh-keeping storage in Kuerle area is studied using PCR-DGGE technique. Biodiversity is analyzed by DGGE fingerprint. The results indicate that there are some differences in the community structure of all samples, which may be related to the planting environment. The 9th stripe in different samples has the highest dominance in the whole the lesion process. The representative strains can be considered as the main pathogenic bacteria in Korla pear "blackhead disease". According to the results of sequence analysis of DGGE dominant bands, it is phylogenetically close to *Alternaria*. It preliminarily reveals the variation regular of microbial communities in Korla fragrant pear diseased tissues, which provides a theoretical basis for studies of "Blackhead Disease" in Korla fragrant pear.

Keywords: PCR-DGGE, Korla fragrant pear, blackhead disease, 18S rDNA

收稿日期: 2016-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560468); 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCZX201222)。

* 通信作者: 陈国刚(1977—), 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事果蔬贮藏与加工研究。E-mail: Cgg611@163.com

引用本文: 程少波, 杨焱, 郭敏瑞, 等. 基于 PCR-DGGE 技术对库尔勒香梨“黑头病”病变组织生物群落的初步研究[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(02): 44-49.

库尔勒香梨属新疆梨种(*Pyrus sinkiangensis* Yu),是一个地域性极强的名优特优良品种。皮薄肉细,汁多味甜,酥脆爽口,香味浓郁独特,因其优良的品质而远销国内外,但近年来,在采后贮藏期间出现的“黑头病”严重影响库尔勒香梨的果实品质及其商品价值。

库尔勒香梨“黑头病”症状复杂,其发病初期仅在果实的萼部出现黑斑,病斑下果肉完好,随病变部位不断由果实萼部向果心部蔓延扩大,继而病变部位果皮皱缩、果肉变硬,最终呈现深褐色凹陷状,可以看到明显菌丝。唐文娟^[1]等对“黑头病”病原菌进行分离和形态学鉴定,其结果表明引发“黑头病”的病原菌分别属于枝孢属(*Cladosporium*)、青霉属(*Penicillium*)、链格孢属(*Alternaria*)和曲霉属(*Aspergillus*)。此后,杨焱^[2]等又对该病的病原菌进行了生物学特性研究,确定该病菌最佳生长碳源、氮源、温度以及pH,采用紫外线照射可有效的防治该病的发生。

变性梯度凝胶电泳(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)技术是目前对微生物群落遗传多样性及种群动态性研究的最有效的技术手段,这种技术已经被广泛应用于树木生长环境^[3-4]、动物肠道^[5-6]、海洋^[7-8]、土壤^[9]、工业废水活性污泥^[10]等的检测与分析中。在食品行业中,多数用于发酵食品的检测^[11],例如分析酸菜发酵过程中的优势菌群^[12]以及白酒酿造^[13]过程中的微生物多样性等。但关于此技术在水果微生物病害方面的研究报道甚少,可能由于水果中多酚含量较高,在进行DNA提取时会造成干扰,继而影响DNA的纯度。

本试验采用改良CTAB法(添加PVP;病变果实中含有酚类,需添加PVP去除多酚类物质对DNA纯度的影响)对库尔勒香梨果实“黑头病”组织提取DNA,并进行DGGE分析,为库尔勒香梨“黑头病”的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本试验所用库尔勒香梨病梨采自库尔勒及阿克苏地区的冷藏库和气调库。

PVP:上海蓝季科技发展有限公司;β-巯基乙醇:Scientific Research Specia;溶菌酶、Tris:Biopopped公司;CTAB:索莱宝生物科技有限公司;

RNase:TIANGEN;HCl、NaOH、NaCl、三氯甲烷、异戊醇、无水乙醇、过硫酸铵、甘油、尿素、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、EDTA、EDTA-Na₂均购于天津市致远化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

DGGE仪:美国Bio-Rad公司;PCR仪:TECHNE;冷冻离心机:Centrifuge 541712;电泳仪DYY-8C型:北京市六一仪器厂;高压灭菌锅:上海申安医疗器械厂;移液枪:Genex Beta。

1.3 方法

1.3.1 库尔勒香梨“黑头病”病害组织总DNA的提取 病害组织的基因组的DNA的提取在文献[14]的方法上加以改进,在研磨后的样品中加入等体积的TE缓冲溶液和PVP(K30),混合均匀。提取后将DNA溶解于10 μL RNA酶溶液和50 μL TE缓冲液,置于-20℃保存备用。

1.3.2 PCR扩增及DNA检测 选择真菌18S-rDNA基因的PCR引物^[15],上游引物:FR15'-AICCATTCATCGCTAIT-3',下游引物:F F3905'-CGATAACGAACGAGACCT-3',扩增片段大约为390 bp。PCR反应体系(25 μL)^[16]:12.5 μL Mix,2 μL DNA模板,引物各1 μL,ddH₂O 7.5 μL。PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,57℃退火1 min,72℃延伸1 min 30 s,35个循环;72℃最终延伸10 min。PCR产物经过1%的琼脂糖凝胶电泳检测,其中染色剂为Gold View,采用凝胶成像系统成像。

1.3.3 巢式PCR扩增及DGGE分析

1)检测完成后,上游引物:FR1-GC5'-CGCCCGGGCGCGCCCCGGGCGGGCGGGGCACGGGGGGAICCATTCATCGCTAIT-3';下游引物:FF3905'-CGATAACGAACGAGACCT-3'。采用与1.2.2节相同的扩增条件及体系对总DNA进行巢式PCR扩增。

2)PCR产物变性凝胶电泳(DGGE)分析:对病原菌的PCR扩增产物进行DGGE分析,研究微生物的生物群落构成。操作步骤为:配制6%的聚丙烯酰胺凝胶,变性梯度为35%~55%。取相应比例的凝胶,加入1%过硫酸铵和TEMED,进行灌胶。待胶完全凝固(大约5 h),将PCR产物25 μL垂直点入点样孔中,电泳缓冲液为0.5×TAE溶液(60℃),200 V电压下预跑10 min,在60℃、80 V电压下电泳16 h。电泳结束后用EB染色,于凝胶成像系统中观

察并拍照。

1.3.4 PCR-DGGE 电泳图谱分析 群落生态学是以群落为研究对象,群落(即生物群落,Biotic community)是指特定时间内,分布在同一区域的许多同种生物个体自然组成的生物系统。群落中物种多样性的测量方法有多种,本文中主要采用丰度(S)、优势度、Shannon-Wiener 指数(H)以及样品之间相似性聚类分析(UPGMA)进行比较样品的多样性。所得的图像通过美国 Bio-Rad 公司的 Quantity one 4.6.2 软件及 Bio-Dap 软件进行分析。

1) 丰度。采用 PCR-DGGE 图谱中条带的数量来表示。

2) 优势度。应用某一特定条带的峰面积占样品中总的峰面积的百分比来表示。

3) Shannon-Wiener 指数。

$$H(\%) = -\sum_{i=1}^r (P_i \ln P_i) \quad (1)$$

式中: P_i 为第 i 物种所占的百分比,即第 i 物种的个数占中物种总个数的百分比; r 为样品中含有的不同物种的总数量,即样品中 PCR-DGGE 图谱的条带数。

4) 采用 UPGAMA 算法进行聚类分析,形成相似性分析图。

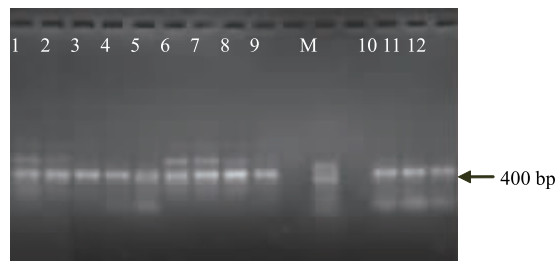
2 结果与分析

2.1 DNA 的提取及 PCR 扩增检测

采用真菌通用引物 FR1/FF390 将提取到的库尔勒香梨“黑头病”病变组织总 DNA 进行扩增,扩增结果如图 1 所示。得到的基因片段为 390 bp。

2.2 香梨“黑头病”病变组织 PCR-DGGE 图谱

按照上述的方法对库尔勒香梨“黑头病”18S rDNA 区间微生物进行 DGGE 图谱分析,如图 2 所示。不同条带代表病梨样品中不同菌株类群 18S rDNA 基因片段,根据图 2 可知,A 库样品可识别的条带分别为 6 条、7 条、9 条,B 库样品可识别的条带分别为 4 条、5 条、6 条,C 库样品可识别的条带分别为 7 条、8 条、9 条,D 库样品可识别条带分别为 6 条、6 条、6 条。所有样品的优势条带较清晰,说明在聚丙烯酰胺的变性(变性范围 35%~55%)条件下,各个样品可以得到较好的分析。



注:其中 M 为 Marker 150~1 500 bp,1~12 分别为采自不同保鲜库的病梨,其中 1~3 号样品、4~6 号样品、7~9 号样品、10~12 号样品分别采自 A、B、C、D 4 个库中。

图 1 样品 FR1/FF390 引物 PCR 扩增结果

Fig. 1 DNA of PCR amplification results agarose gel electrophoresis of pathogen

2.3 PCR-DGGE 图谱中条带丰度变化

库尔勒香梨“黑头病”致病菌 DGGE 图谱条带的丰度变化规律结果如表 1 所示。1~12 号样品是从企业保鲜库中随机抽取的发病库尔勒香梨。1~3 号样品、4~6 号样品、7~9 号样品、10~12 号样品分别采自 A、B、C、D 4 个库中,各库样品病变程度均为逐渐增加。由表 1 可知,不同样品的丰度存在一定的差异,其中 1 号与 10~12 号丰度相同,2 号与 9 号丰度相同,5 号、7 号、8 号丰度相同,3 号样品的丰度最高,4 号样品的丰度最低。第 9 号条带在所有样品中均可检出,并且该条带优势度最高,表明该条带代表的菌株类群是库尔勒香梨“黑头病”病变组织中共有的一类特征性菌株类群;第 4、5、6 号条带所代表的菌株类群分别在 A 库和 D 库样品中检出,这 6 个样品的腐烂程度不同,但整体病变程度略大于其他样品;第 3 号条带所代表的菌株类群在 A 库中检出,2 号条带所代表的菌株类群在 C 库中检出,第 1、7 号条带所代表的菌株类群仅在个别样品中检出。

本试验分析了库尔勒香梨“黑头病”病变组织 DGGE 图谱的丰度,结果表明:不同保鲜库、不同样品因病变程度不同,图谱条带数存在一定差异,优势条带在 3~9 条之间,这些优势条带既有所有样品共有的条带,也有个别样品的特异性条带。样品可检出条带的丰度随样品的病变程度的变化而变化。可能的原因是:不同保鲜库中的库尔勒香梨来源不同,内生菌存在差异;也可能是因为病变程度不同或者其他菌株共同作用的结果。总体而言,库尔勒香梨“黑头病”病变组织中真菌结构分布较丰富。

2.4 DGGE 图谱条带优势度变化规律

DGGE 图谱中条带的优势度反映的是该条带的

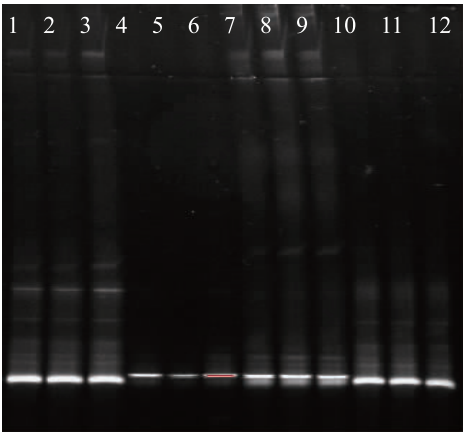


图 2 DGGE 指纹图谱及识别图

Fig. 2 DGGE fingerprinting and recognition

量在整个样品群落中所占比例,即表示样品群落中各条带所代表的菌落种类处于何种优势或者劣势状态的群落测定度。对优势度的分析,一定程度上反应了香梨“黑头病”病变组织中真菌群落的变化情况;对条带之间优势度变化规律的比较,可以反映优势菌之间的关系。本实验对病变组织真菌 PCR-DGGE 图谱优势度的分析如表 1 所示,不同样品相同位置的条带,优势度存在较大变化,第 9 号条带在所有样品中均可检出,根据该条带优势度数据显示可知:不同保鲜库、不同病变程度的该类群微生物出现相对差异,其优势度变化规律均呈逐渐减低的趋势。并且该条带在不同样品中优势度变化规律相似,相对其他条带优势度和变化程度均较

大,说明该条带所代表的真菌可能在香梨“黑头病”病变组织的微生物系统中起主要作用。

2.5 DGGE 图谱多样性指数变化规律

Shannon-Wiener 多样性指数(即 H 值)反映的是群落种类和均匀度的混合参数:种类数目越多,样品多样性就越多;种类个体之间的均匀性增加,样品多样性也增加。本试验对香梨“黑头病”病变组织的真菌多样性进行研究,由图 3 可知,库尔勒香梨“黑头病”病变组织中真菌 DGGE 图谱 Shannon-Wiener 多样性指数都在 1.10~2.20 之间。各保鲜库中样品真菌群落多样性指数因病变程度不同而不同:A 库中样品多样性指数普遍高于其他库,其中 3 号样品的多样性指数最大,病变最为严重;B 库样品

表 1 库尔勒香梨“黑头病”病变组织 DGGE 的丰度及优势度

Table 1 Abundance and dominance of DGGE diagram of the blackhead disease of Korla Fragrant Pear %

样品	丰度	优势度/%								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
A 库	1 号	—	—	2.64	10.56	2.40	7.40	—	13.00	64.27
	2 号	—	1.27	2.28	10.51	2.16	6.39	—	13.47	64.05
	3 号	6.14	4.48	9.69	16.32	4.73	9.99	4.76	6.43	37.46
B 库	4 号	—	—	—	—	—	—	7.71	10.30	81.99
	5 号	6.01	11.45	4.85	—	—	—	—	8.22	69.46
	6 号	—	—	—	6.10	—	8.14	—	24.71	61.05
C 库	7 号	—	6.57	—	—	—	12.69	8.24	9.86	62.64
	8 号	16.60	8.26	—	—	—	6.53	10.10	—	58.52
	9 号	8.40	8.09	—	6.35	4.03	8.77	—	9.60	54.76
D 库	10 号	—	4.23	—	19.08	5.09	11.07	—	14.43	54.63
	11 号	1.90	—	—	16.72	5.52	7.04	—	15.10	48.12
	12 号	3.44	—	—	16.70	5.47	7.41	—	12.34	46.05

注:—表示未检出

多样性指数略低,4号样品的多样性指数最小,病变程度最低;C库样品随病变程度的增加多样性指数增加;D库样品随病变程度的增加多样性指数持平。

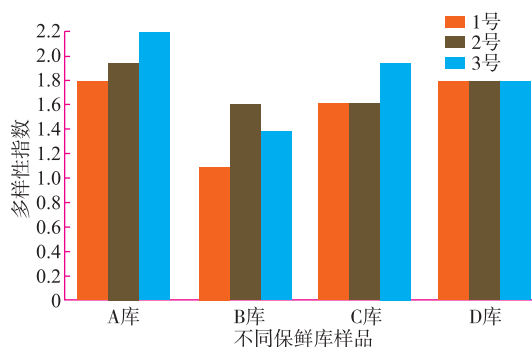


图3 库尔勒香梨真菌群落多样性指数变化规律

Fig. 3 Diversity index of fungi in non-nuclear Korla Fragrant Pear

2.6 DGGE 图谱相似性指数

采用聚类分析法对不同保鲜库中不同样品真菌微生物 18S rDNA PCR-DGGE 图谱相似性(如图4所示)进行分析。

所有样品可聚为两大类,其相似度均在 0.7 以上,即库尔勒香梨“黑头病”病变组织中的真菌类群相似度较高。可能所有菌株均为引起库尔勒香梨“黑头病”的致病菌,但因不同菌株的可培养条件不同,在进行体外培养时,有些菌株无法通过体外培养基培养得到。其中相似性系数最高的是 A 库中 1 号和 2 号样品,相似度为 0.96;D 库中的 11 号和 12 号样品的相似度为 0.95;A 库和 D 库中的样品相似度为 0.87,其病变程度也比较相似。C 库中 9 号和 8 号样品的相似度为 0.86,B 库和 C 库中样品的病变程度相似。

2.7 优势条带序列的系统发育分析

根据各保鲜库中香梨“黑头病”病变组织样品的 PCR-DGGE 指纹图谱,对优势条带进行切胶回收,对条带进行序列测定,将测得的基因序列提交 NCBI 中检索,在 Gen Bank 数据库中通过 BLAST 工具进行同源性比对。结果表示 9 号条带(命名为 YLB-1)与 *Alternaria* sp. 基因序列的同源性为 100% (如图5所示),因此确定造成香梨“黑头病”的主要菌株属于真菌界(Fungi)半知菌亚门(Deuteromycotina)丝孢纲(Hyphomycetes)丝孢目(Hyphomycetales)暗色孢科(Dematiaceae)链格孢属(*Alternaria*)。

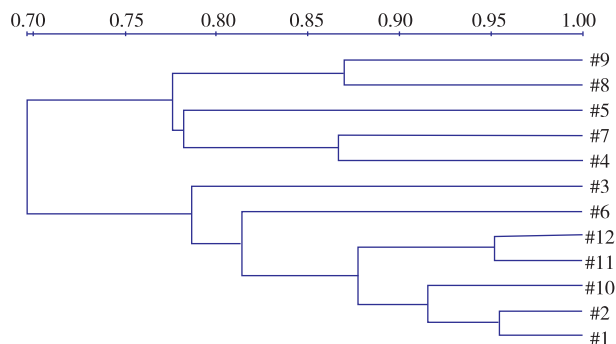


图4 库尔勒香梨群落 UPGMA 聚类分析

Fig. 4 Dendrogram of the population of Korla Fragrant Pear based on genetic using UPGMA

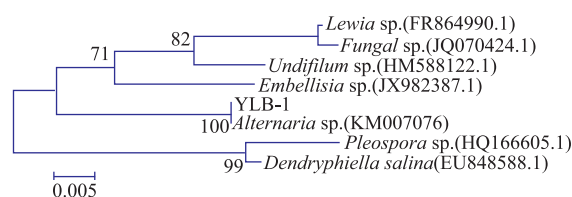


图5 DGGE 切胶条带系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the sequences from DGGE bands

3 结 语

香梨“黑头病”是库尔勒香梨贮藏期间的一种新型病症,多发生在贮藏期半年以上的香梨中,由于“黑头病”发病后导致库尔勒香梨组织衰退,其内生菌结束潜伏作用开始生长所致,目前还未得到有效的防治,研究表明造成该病症的菌种错综复杂,目前发现的有链格孢属、枝孢属、青霉属和曲霉属,采用传统的分离方法研究其群落结构过程复杂,而且容易导致物种多样性的缺失,本文利用 PCR-DGGE 技术对库尔勒香梨“黑头病”病变组织中真菌群落的研究,从不同保鲜库样品的 DGGE 图谱可以看出,所有样品群落结构存在一定的差异,造成差异的原因可能与库尔勒香梨的种植环境有关,不同生长环境库尔勒香梨的内生菌有所不同。不同保鲜库样品的 9 号条带在整个病变过程中优势度最高,其代表的菌株,可被认为是导致库尔勒香梨“黑头病”的主要致病菌,通过对优势条带进行测序,确定其属于链格孢属(*Alternaria*),这类菌 95% 以上的种类兼性寄生于植物上,引起多种植物病害,如小麦叶枯病,葱紫斑病,玉米大斑病,茄子早疫病等都是链格孢菌侵害所造成的,进一步了解这类菌侵害植

物的原理及发病机制,对微生物学的发展以和果蔬贮藏保鲜等方面的应用具有重要的意义。

参考文献:

- [1] TANG Wenjuan, CHEN Guogang, JIANG Ying, et al. Isolation and identification the pathogens of blackhead disease of Kuerle paer[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2011(3):366-369. (in Chinese)
- [2] YANG Yan, CHEN Guogang. Biological characteristics of "black disease" pathogen during *Pyrus bretschneideri* Rehd storage[J]. **China Brewing**, 2014, 11:101-105. (in Chinese)
- [3] CHEN Falin, ZHANG Kai, TU Naimei, et al. Analyzing the effect of mixed decomposition of conifer and broadleaf litters on soil microbial communities by using PCR DGGE [J]. **Chinese Journal of Applied & Environmental Biology**, 2011, 17(2):145-151. (in Chinese)
- [4] LIU Huijie, YANG Caiyun, ZHENG Tianlin, et al. Analysis of microbial community structure in mangrove sediments by PCR-DGGE technique[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2010, 50(7):923-930. (in Chinese)
- [5] FENG Xia, YIN Youping, WANG Zhongkang. Application of molecular biological techniques in research of microbial diversity in animal intestines[J]. **Chinese Journal of Applied and Environmental Biology**, 2005, 11(3):381-387. (in Chinese)
- [6] ZHANG Jie, RONG Ting, CHEN Zhuang, et al. Comparative analysis of rDNA of the gastrointestinal mucosa-associated microbiota between two pure lines chicken by PCR-DGGE [J]. **Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences**, 2013, 44(2):204-210. (in Chinese)
- [7] ZHANG Zhendong, WANG Shufen, CAO Yufeng. DGGE technique and its application in study on microbial diversity in marine environment[J]. **Marine Environmental Science**, 2008, 27(3):297-300. (in Chinese)
- [8] LIU Min, ZHU Kailing, XIAO Tian, et al. Bacterial community composition of the Yellow Sea cold water mass studied by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis[J]. **Environmental Science**, 2008, 29(4):1082-1091. (in Chinese)
- [9] GU Yunfu, ZHANG Xiaoping, TU Shihua. Application of denaturing gradient gel electrophoresis to the study of soil microbial diversity[J]. **Soils**, 2008, 40(3):344-350. (in Chinese)
- [10] BOON N, DE WINDT W, VERSTRAETE W, et al. Evaluation of nested PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) with group-specific 16S rRNA primers for the analysis of bacterial communities from different wastewater treatment plants[J]. **FEMS Microbiology Ecology**, 2002, 39(2):101-112.
- [11] ERCOLINI D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food [J]. **Journal of Microbiological Methods**, 2004, 56(3):297-314.
- [12] WU Junrui, YUE Xiqing, WU Rina, et al. Diversity of lactic acid bacteria involved in suan-cai using PCR- DGGE [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014(2):127-130. (in Chinese)
- [13] SHAN Qimuge, LIANG Huizhen, LI Changwen, et al. Changes of microbial diversity in stacked fermentation for the production of moutai flavor liquor[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016(3):330-335. (in Chinese)
- [14] BARRA M, SALAZAR E, BELTRAN M, et al. Simple and robust DNA extraction method for the large-scale analysis of genotypes containing high polyphenolic content, such as landraces of *Solanum tuberosum* and *Zea mays* [J]. **Plant Breeding, Genetic and Genetic Resources. Cien Inv Agr**, 2012, 39(3):593-601.
- [15] HOU Xiaojie, CUI Jianzhou, RAN Longxian, et al. Diversity analysis of microbial community from the fruit of jujube fruit shrink disease by PCR-DGGE[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, 2010, 10(4):260-266. (in Chinese)
- [16] LI Chungu, LI Xiaoming, WANG Jingguo. Effect of soybean continuous cropping on bulk and rhizosphere soil microbial community function[J]. **Acta Ecologica Sinica**, 2006(4):1144-1150. (in Chinese)
- [17] HUANG Zhiguo, ZHEN Pan, LUO Huibo. Research on archaea community in Luzhou-Flavor liquor pits [J]. **Journal of Southwest University (Natural Science Edition)**, 2010, 32(12):91-96. (in Chinese)