

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2020.04.005

文章编号:2095-6002(2020)04-0037-09

引用格式:刘晓静,林杨,吕卓,等. 桃杏果实内生细菌多样性分析及软腐病原菌的分离与验证[J]. 食品科学技术学报,2020,38(4):37-45.



LIU Xiaojing, LIN Yang, LÜ Zhuo, et al. Diversity of endophytic bacteria in nectarine and apricot and isolation, identification of soft rot pathogen[J]. Journal of Food Science and Technology, 2020,38(4):37-45.

桃杏果实内生细菌多样性分析及软腐病原菌的分离与验证

刘晓静^{1,2}, 林杨^{1,2}, 吕卓^{1,2}, 李亚玲², 何欢²,
李玲², 朱璇^{2,*}, 张志东^{1,2,*}(1. 新疆农业科学院微生物应用研究所/新疆特殊环境微生物实验室,新疆乌鲁木齐 830091;
2. 新疆农业大学食品科学与药学学院,新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:为了解桃和杏采后果实内生细菌群落组成,并对潜在病原细菌进行筛选与验证,为其贮藏保鲜、软腐病害防治等相关研究奠定基础,利用高通量测序技术,对新疆地产油桃和库车小白杏采后果实内生细菌群落组成进行分析;同时,利用微生物传统分离培养,采用16S rDNA序列分析对潜在病原细菌进行分子鉴定,并利用离体接种法和再分离法,对相关菌株的致病能力进行验证。研究表明,油桃和库车小白杏内生细菌共包括128个操作分类单元,涉及9个门117个属,其中变形杆菌门(Proteobacteria)为绝对优势菌门,其次为厚壁菌门(Firmicutes)和拟杆菌门(Bacteroidetes);在属水平上,油桃以泛菌属(*Pantoea*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)等菌属为优势菌群;库车小白杏以葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)、克里斯滕森菌(*Christensenella*)、普氏菌属(*Prevotella*)等菌属为优势菌群。通过分离筛选获得了1株潜在采后致腐病原细菌XAAS-P1,经分子鉴定初步确定其归属于泛菌属(*Pantoea*)。XAAS-P1对采后油桃和库车小白杏均具有较强的致腐能力,并呈现出与自然软腐一致的病状。接种4 d后,XAAS-P1致腐率可达100%,与阴性对照组相比,接种组样品的软腐现象提前了1 d。对接种组病灶中的微生物进行再分离、鉴定,结果显示,菌株XAAS-P1是病灶组织中的绝对优势菌群,证明了菌株XAAS-P1是导致采后油桃和库车小白杏软腐变质的主要病原细菌。研究表明,桃和杏果实中存在丰富多样的内生细菌,其内生泛菌XAAS-P1可导致采后油桃和库车小白杏的软腐变质。

关键词:桃;杏;内生细菌;软腐;病原菌**中图分类号:**TS255.3;Q939.1**文献标志码:**A

新疆日照充足、昼夜温差大,利于瓜果糖分累积,是久负盛名的“瓜果之乡”。桃和杏作为新疆的特色水果,果肉鲜美,富含多种维生素和矿物质,深

受广大群众的喜爱。然而,由于桃和杏的鲜果成熟期较为集中,采后易腐败变质,严重制约了其生产、销售和新疆特色林果业的发展^[1-3]。

收稿日期:2020-05-04

基金项目:新疆维吾尔自治区研究生创新项目(XJ2019G170);新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2018D01A15);国家重点研发计划项目(2018YFC1603400)。

第一作者:刘晓静,女,硕士研究生,研究方向为果蔬贮藏及物流工程。

*通信作者:朱璇,女,教授,博士,主要从事果蔬采后生理与贮藏保鲜方面的研究;
张志东,男,研究员,主要从事特殊环境微生物学方面的研究。

细菌在瓜果腐烂中发挥了不能忽视的作用,多种瓜果腐烂与致病细菌有关^[4]。周胜虎等^[5]发现,腐烂的水果中存在产纤维素的细菌;张大为等^[6]证明了软腐柑橘中的主要细菌为葡糖杆菌属;戴宝玲等^[7]利用高通量测序技术,发现草莓表面存在大量与植物软腐病有关的细菌。此前,桃杏的软腐多认为是外部菌株侵染果实导致^[8-10],而对其内生菌在采后软腐中潜在作用了解较少。植物内生菌广泛存在于各种植物体内,并在植物不同生长时期发挥着重要的功能和作用,且其组成存在一定差异^[11]。

高通量测序技术可更为准确地反映出微生物的真实组成和分布^[12],弥补传统可培养法的不足,已成为微生物研究的热门工具。桃和杏是典型的核果类水果,均存在采后极易软腐变质的问题。本研究拟通过高通量测序技术,分析新疆油桃、库车小白杏采后的主要内生细菌群落组成与多样性;利用传统可培养法对其中的潜在病原细菌进行分离、筛选,并对其致病能力进行验证与分析。希望为进一步从微生物角度阐明桃和杏的贮藏保鲜、软腐病害的防治等相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

2019年6月于新疆阿克苏市库车县乌恰镇(E82.8188°,N41.6781°)果园中采集样品。根据转黄率将果实分为青熟期(着色面积小于20%)、转色期(着色面积40%~60%)和完熟期(着色面积大于80%)三种不同成熟度^[1]。选择果实自然成熟,无明显机械伤痕,无病变,且表皮有光泽,颜色、大小、硬度等表观一致的样品,发泡网包裹,装筐、运输。实验组于室温下贮藏(模拟库车小白杏采后售卖时的温度条件),用于软腐病原细菌的分离。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)、38号培养基(葡萄糖4g,麦芽浸粉3g,酵母粉4g,氯化钠5g,琼脂18g,pH值7.2左右),由北京鼎国生物技术有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的表面消毒

将样品用体积分数为75%的乙醇、3.3%的H₂O₂分别处理5min和3min,无菌水冲洗干净^[13]。

1.2.2 样品的高通量测序

利用十六烷基三甲基溴化铵法^[14]提取油桃、库

车小白杏果的DNA,检验其浓度,达标后利用515F和806R引物进行PCR扩增^[15-16]。回收产物,送往北京诺禾致源生物信息科技有限公司,对样品16S rDNA V4区进行测序。

1.2.3 潜在病原细菌的筛选

样品表面消毒后去皮,利用平板划线法、稀释涂布法(切取病健交界处组织1.0g加入至9.0mL体积分数0.85%的无菌生理盐水中,摇匀,稀释梯度为10⁻³,取100μL于待测培养基中进行涂布),对发生自然软腐的桃、杏样品中的病原细菌进行分离、筛选。模拟采后条件,于室温下进行培养^[17]。观察并记录各细菌的形态特点和数量,对单一菌落进行纯化^[18]。

1.2.4 潜在病原细菌的分子鉴定

利用细菌菌落克隆法,对桃、杏潜在病原细菌的DNA进行PCR扩增^[9]。回收产物,送往北京鼎国生物技术有限公司进行测序。利用EzTaxon数据库进行比对,下载相似性较高的模式菌株序列,构建系统进化树^[19-20]。

1.2.5 潜在病原细菌致病能力的验证

于无菌条件下,采用离体接种法对菌株的致病能力进行测定。使用酒精棉对其表面进行消毒,无菌水冲洗,晾干,用0.1mL无菌针头挑取少量菌体,将其接种于果肉中(接种深度距表皮2mm),采用保鲜膜包裹伤口处,于室温下进行贮藏。以接种无菌水的鲜果作为实验阴性对照组(以上每组样品均设置3组重复实验),观察并记录鲜果的发病情况^[21]。

1.2.6 潜在病原细菌的再分离与比较

利用酒精棉对接种组已发生软腐的鲜果进行表皮擦拭消毒,无菌条件下去皮,并采用划线培养法、稀释涂布法对病灶组织中的微生物进行分离、纯化,经16S rRNA基因序列扩增、测序和序列分析,并与接种菌株进行比较^[21]。

2 结果与分析

2.1 内生细菌群落组成分析

利用高通量测序技术对新疆地产油桃、库车小白杏内生细菌群落组成进行分析,结果如表1。共获得原始序列412105条,过滤掉低质量序列,总数为156466条。所得序列经聚类比对,以相似度低于97%聚类为1个操作分类单元(operational taxonomic units, OUT),并去除植物体内的线粒体、叶绿

体相关序列后,以及序列 reads 低于 200 的低频序列,共获得 128 个 OTU,涉及 9 个门的 117 个属。油桃中共包含 102 个 OTUs,库车小白杏共包含 47 个 OTUs。在所有的 128 个 OTUs 中,21 个 OTUs 均出现在油桃和库车小白杏果实中。

表 1 油桃、库车小白杏微生物菌株测序数据统计结果

Tab. 1 Statistical data of microbial strains in nectarine and Kuqa apricot after sequencing

样品编号	原始序列数	质控序列数	有效序列数	OTU/个
油桃 1	83 622	73 494	73 495	86
油桃 2	84 798	76 869	76 269	56
油桃 3	84 210	75 182	75 174	70
小白杏 1	46 217	45 320	45 316	42
小白杏 2	60 100	58 991	58 970	47
小白杏 3	53 158	52 155	52 143	44
总计	412 105	156 466	381 367	128

对门水平上油桃、库车小白杏主要内生细菌的种群多样性进行分析,结果如图 1。由图 1 可见,油桃和库车小白杏内生细菌以变形杆菌门为绝对优势菌门,其次为厚壁菌门和拟杆菌门。在属分类单元中,油桃与库车小白杏主要内生细菌群落组成如图 2。图 2(a)中,油桃内生细菌以泛菌属(*Pantoea*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、溶杆菌属(*Lysobacter*)、栖粪杆菌属(*Faecalibacterium*)和布劳特氏菌属(*Blautia*)种群最为多样;其中,芽孢杆菌属和泛菌属为优势菌群,分别约占总菌群的 26.20%、23.96%;其次为拟杆菌属、假单胞菌属,分

别约占总菌群的 14.50%、12.90%,其余菌群所占比例均低于 5.00%。图 2(b)中,库车小白杏内生细菌以葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)、瘤胃球菌(*Ruminobacter*)、蟑螂杆状体科未分类属(unidentified *Blattabacteriaceae*)、克里斯滕森菌(*Christensenella*)、普氏菌属(*Prevotella*)种群最为多样;其中,葡糖杆菌属为绝对优势菌群,约占总菌群的 74.09%;其次为泛菌属、克里斯滕森属、普氏菌属、瘤胃杆菌属,分别约占总菌群的 4.17%、3.83%、3.65%、3.31%,其余菌群所占比例均不足 2.00%。

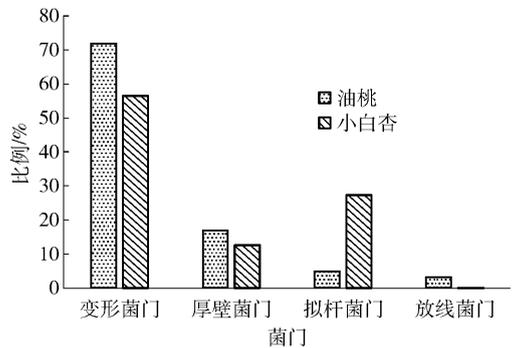


图 1 门水平上主要的内生细菌群落组成

Fig. 1 Main composition of endophytic bacteria communities on phyla level

2.2 潜在病原菌的筛选与鉴定结果

通过对软腐桃和库车小白杏中潜在致病菌的反复分离、纯化、去重,获得了 2 株油桃潜在病原细菌,分子鉴定结果表明为泛菌属(*Pantoea*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*);获得了 3 株库车小白杏潜在病原细菌,分子鉴定结果表明为葡糖杆菌属(*Gluconobacter*)、

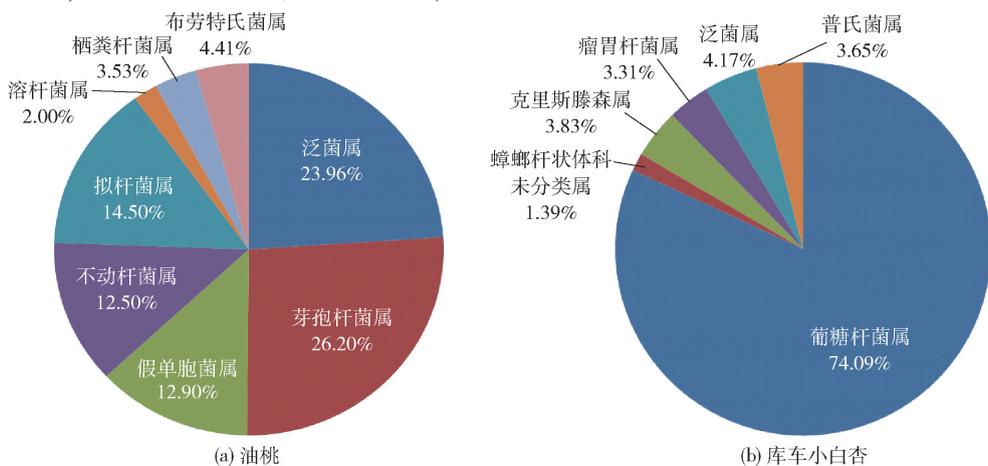


图 2 属水平上主要的内生细菌群落组成

Fig. 2 Main composition of endophytic bacteria communities on genera level

泛菌属(*Pantoea*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)。获得的病原菌中,1株为油桃和库车小白杏共同的潜在病原细菌,结果如图3。图3中的菌落较小(直径约为1.0~1.5 mm)、圆形、略隆起、边缘整齐、黏稠、呈淡黄色,将其命名为XAAS-P1。经PCR扩增和16S rRNA基因序列测序及比对,构建该菌株的系统发育树,如图4。确定菌株XAAS-P1归属于泛菌属(*Pantoea*),其与已知模式菌株*Pantoea breunneri* LMG 5343^T序列相似性为99.49%,与*Pantoea vagans* LMG 24199^T序列相似性为99.13%,暂不能确定其具体分类,有待进一步鉴定。

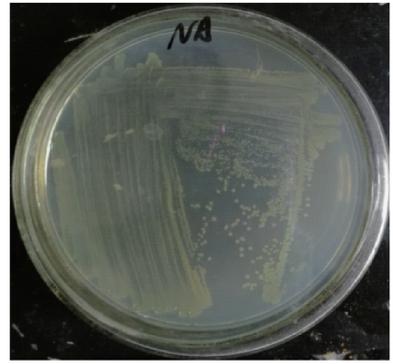


图3 菌株XAAS-P1的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of strain XAAS-P1

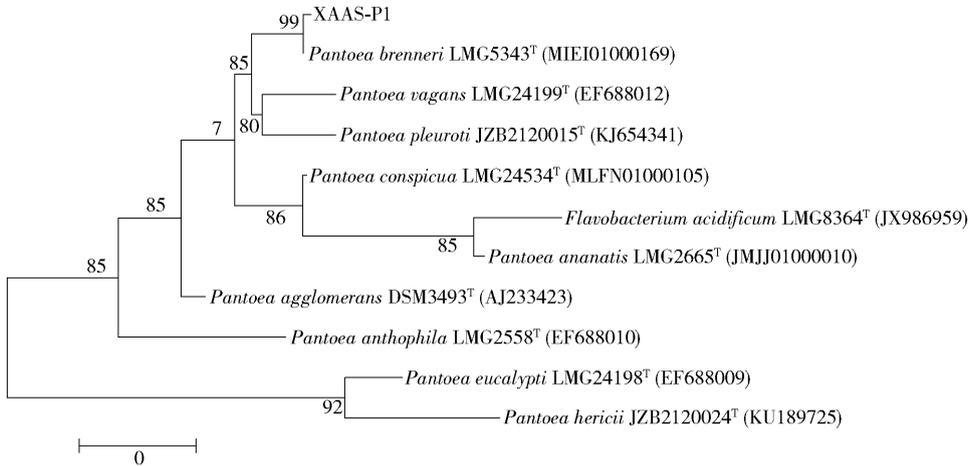


图4 菌株XAAS-P1的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain XAAS-P1

2.3 潜在病原菌致病能力分析

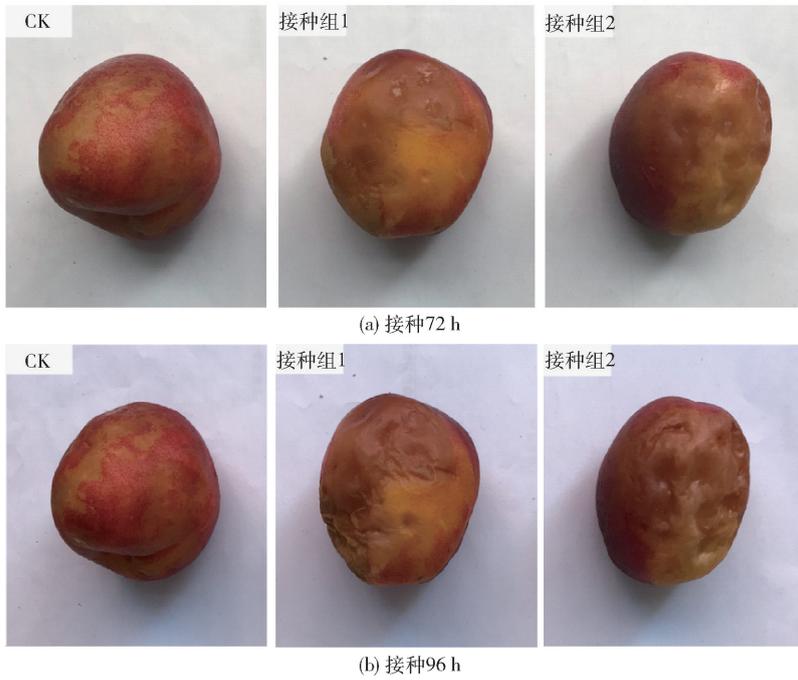
进一步利用离体接种法对油桃和库车小白杏共同的潜在病原细菌XAAS-P1的致病能力进行验证,结果如图5。图5显示,菌株XAAS-P1对采后油桃表现出了较强的致病能力。由图5(a)可知,接种72 h时,油桃出现明显的褐色病斑,并出现失水现象,致病率为60%;由图5(b)可知,接种96 h时,病斑颜色进一步加深,失水现象明显加重,致病率达100%。在阴性对照组中,放置96 h时,油桃未观察到明显的病斑和失水现象;且与阴性对照组相比,接种菌株XAAS-P1的油桃提前出现了明显的软腐现象。

研究发现,菌株XAAS-P1对采后不同成熟度的库车小白杏也表现出了较强的致病能力,实验结果如图6。接种72 h时,不同成熟度的库车小白杏均出现了浅棕色病斑,转色期和完熟期出现轻微的失水现象,致病率为50%;接种96 h时,青熟期、转色

期、完熟期的库车小白杏由浅棕色病斑转为深褐色病斑,致病率达100%。在阴性对照组中,放置96 h时,库车小白杏仅个别果实出现了轻微的软腐现象,但未观察到明显的失水现象;且与阴性对照组相比,接种菌株XAAS-P1的库车小白杏提前出现了明显的软腐现象,致病率高达100%。

2.4 潜在病原菌的再分离验证结果

为进一步证实菌株XAAS-P1是否是引发油桃和库车小白杏软腐变质的病原细菌之一,分别对接种组中出现软腐部分的果肉、另一侧未接种但出现软腐的果肉、自然软腐果肉中的微生物进行了分离、纯化,实验结果如图7。对所获菌株的16S rRNA基因序列进行测序和比对分析,结果如表2。由图7和表2可知,菌株XAAS-P1大量分布于3组样品中,且均为3组样品中的绝对优势菌群;因此,实验证明了菌株XAAS-P1是导致采后油桃和库车小白杏软腐病的主要病原细菌。



CK: 自然对照组。

图 5 油桃接种菌株 XAAS-P1 的致病力分析

Fig. 5 Pathogenicity analysis of nectarine inoculated strain XAAS-P1



图 6 不同成熟期库车小白杏接种 XAAS-P1 菌后的变化情况

Fig. 6 Decay incidence of Kuqa apricot inoculated with strain XAAS-P1 in different maturation stages

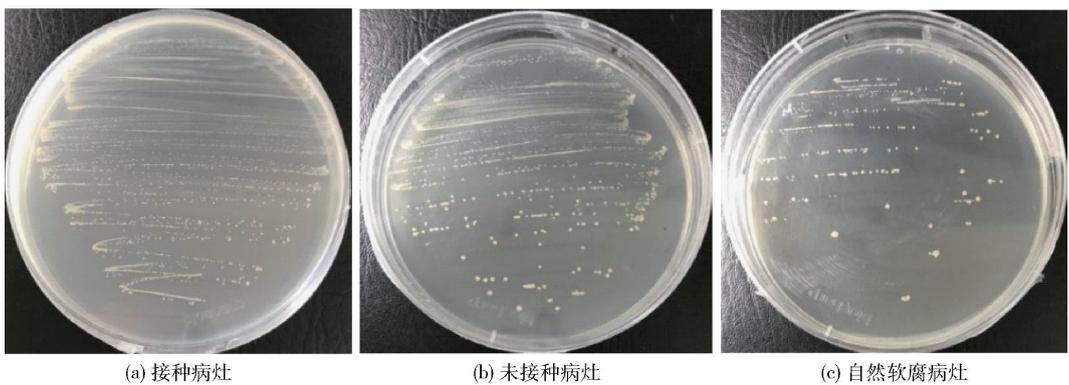


图 7 接种组病灶组织划线菌落形态

Fig. 7 Colony morphology of bacteria from lesion by streaking on PDA

表2 菌株XAAS-P1分子鉴定结果

Tab.2 Molecular identification of strain XAAS-P1

菌株	最近模式菌株	相似性/%
XAAS-P1	<i>Pantoea brenneri</i> LMG5343 (T)	99.49
接种组病灶菌株	<i>Pantoea brenneri</i> LMG5343 (T)	99.49
另一侧未接种病灶菌株	<i>Pantoea brenneri</i> LMG5343 (T)	99.49
自然软腐菌株	<i>Pantoea brenneri</i> LMG5343 (T)	99.49

3 结论

高通量测序技术目前已成为研究微生物群落组成与分布的重要手段,被广泛用于肠道^[22]、植物^[23]、土壤^[24]等的微生物研究中,也成为内生菌研究的重要方法^[25]。近年来,相关研究已从食用玫瑰花瓣^[26]、诺尼果^[27]、柑橘、番茄^[28]、哈密瓜^[29]等瓜果的果实和种子中发现存在大量内生细菌,其中,假单胞属、芽孢杆菌属、肠杆菌属、泛菌属、欧文氏菌属、乳酸杆菌属等为主要组成菌群。研究表明,泛菌如成团泛菌、菠萝泛菌、分散泛菌等易引起黄桃罐头^[30]、台湾青枣等植物或瓜果的腐烂、变质^[31],但有关桃、杏果实中腐败病原细菌的研究较为有限。李昱佳等^[32]从桃树枝条中分离得到了泛菌10DM4-1;冯晓师^[33]从采后桃果中分离到了菠萝泛菌,猜测其与桃果实褐变有关。现有研究表明,菠萝泛菌可引起多肉植物发生褐腐病^[34]、玉米发生细菌性病害^[35]。王建辉等^[36]也证实,带蓬鲜莲在4℃贮藏条件下的优势腐败菌主要为分散泛菌、成团泛菌和葡萄球菌类菌群,其随贮藏时间的延长呈增长趋势。

本研究采用高通量测序技术证明了新疆地产油桃和库车小白杏果实中存在丰富的内生细菌资源,且假单胞菌属、肠杆菌属、泛菌属、欧文氏菌属、芽孢杆菌属、葡萄球菌属等优势菌群的分布比例在健康果实和软腐果实中存在明显差异,以泛菌属类菌群差异最为明显;同时,采用可培养筛选法对腐烂油桃、库车小白杏中的主要微生物进行了分离。从腐烂油桃中分离获得了泛菌属和芽孢杆菌属的分离株,从腐烂库车小白杏中分离获得了葡糖杆菌属、泛菌属和芽孢杆菌属的分离株,并对所获菌株的致病能力进行了验证。结果表明,葡糖杆菌属对油桃的致病能力不明显,但对库车小白杏的致病能力较强;芽孢杆菌属对油桃和库车小白杏的致病能力均不明显;而泛菌属对油桃和库车小白杏的致病能力均较

强。重点对泛菌属的致病能力进行了验证与分析,结果表明:菌株 *Pantoea sp.* XAAS-P1 为采后油桃、库车小白杏软腐病灶的优势菌群(约占病灶中微生物菌落分离数的90%左右),且具有较强的致病能力;接种4d后,该菌株致病率可达100%,并呈现出与自然软腐一致的病状。此外,前期对库车小白杏的研究表明,青熟期和完熟期的库车小白杏中均存在泛菌属,且随着库车小白杏的成熟,其所占比例呈倍数增长,最高可增加416倍^[13]。本研究证实了泛菌属类菌群是导致油桃和库车小白杏软腐变质的主要病原细菌之一。

实验也发现尽管桃杏中存在丰富的内生菌资源,但分离获得微生物种类较为有限。实际上,不仅在内生菌资源挖掘方面存在这类问题,在环境微生物分离筛选中也普遍存在类似的问题,这已成为微生物资源挖掘的瓶颈问题。一般认为,人工培养基营养浓度过高,原有生态关系被破坏,生长缓慢的微生物被忽视,单纯地将待分离样品涂布在分离培养基中,是致使多数微生物表现为不可培养,分离的微生物种类有限的主要原因^[37-38]。“不可(未)培养微生物”并不意味着绝对不能被培养,只是其某些生长需求尚不清楚,暂时未能获得纯培养物。微生物培养组学概念的提出,为环境微生物的无漏分离筛选提供了理论依据。近年来,采用高通量测序技术,结合大量筛选与多种筛选培养方法,获得了大量“不可培养”微生物,也有效纠正了相关高通量测序实验的偏差^[39]。根据本研究的桃杏内生菌高通量测序结果,进一步开发相关内生菌微生物培养组学,从而挖掘更多的微生物资源,并进一步校正相关群落组成等,有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 杨婷婷. 不同采收成熟度对杏果品质劣变影响的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2015.
YANG T T. Study on the effect of different harvest maturity on the quality deterioration of apricot[D]. Urumqi:

- Xinjiang Agricultural University, 2015.
- [2] ABBASI N A, ALI I, HAFIZ I A, et al. Effects of putrescine application on peach during storage[J]. Sustainability, 2019, 11(7): 2013.
- [3] LI Q L, GUO D T, WEI Z F, et al. Effect of different concentrations of methyl-jasmonate on fruit quality of Chunmi peach[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2018, 30(6): 985-991.
- [4] LIU Q, ZHOU D D, TU S Y, et al. Quantitative visualization of fungal contamination in peach fruit using hyperspectral imaging[J]. Food Analytical Methods, 2020, 13: 1262-1270.
- [5] 周胜虎, 薛齐佳, 刘传凤, 等. 细菌纤维素高产菌株的筛选和初步鉴定[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(15): 3514-3517.
- ZHOU S H, XUE Q J, LIU C F, et al. Screening and identification of bacterial cellulose producing strains[J]. Hubei Agricultural Science, 2013, 52(15): 3514-3517.
- [6] 张大为, 张洁, 李猛. 分离引起柑橘腐烂、霉变的微生物及生物防治[J]. 生物加工过程, 2011, 9(4): 54-57.
- ZHANG D W, ZHANG J, LI M. Isolation of microorganisms causing citrus decay and mildew and biological control[J]. Bioprocessing Process, 2011, 9(4): 54-57.
- [7] 戴宝玲, 肖英平, 戴贤君, 等. 基于 Illumina 高通量测序技术分析草莓表面微生物结构[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(20): 33-36.
- DAI B L, XIAO Y P, DAI X J, et al. Analysis of microbial structure on strawberry surface based on Illumina high throughput sequencing technology[J]. Jiangsu Agricultural Science, 2018, 46(20): 33-36.
- [8] LI G K. The interaction between peach/kiwifruit hosts and fungal pathogens[C]. Haikou: Chinese Society for Plant Pathology, 2015: 506.
- [9] ZEYNEP Ö E, ADALET M, AYZIN B K. The cross-breeding performances of some peach varieties[J]. Yuzuncu Yil University Journal of Agricultural Sciences, 2016, 26(1): 89-97.
- [10] KOU J Y, WEI Y Y, HE X X, et al. Infection of post-harvest peaches by monilinia fructicola accelerates sucrose decomposition and stimulates the Embden-Meyerhof-Parnas pathway[J]. Nature Publishing Group UK, 2018, 5(1): 5-46.
- [11] FENG Y J, SHEN D L, SONG W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(5): 938-945.
- [12] HOU Q H, FANG Z, ZHU Q M, et al. Microbial diversity in Huguangyan Maar Lake of China revealed by high-throughput sequencing[J]. Journal of Oceanology and Limnology, 2019, 37(4): 1245-1257.
- [13] 刘晓静, 朱静, 楚敏, 等. 库车小白杏采后内生细菌群落代谢特征及结构组成的变化[J]. 食品科学, 2018, 39(22): 141-146.
- LIU X J, ZHU J, CHU M, et al. Changes in carbon metabolism characteristics and community composition of endophytic bacteria in postharvest Kuqa apricot[J]. Food Science, 2018, 39(22): 141-146.
- [14] YANG Y L, LI J X, DING X, et al. Extraction and quality detection of total DNA from different tissues of red dragon fruit by modified CTAB method[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2019(7): 36-38.
- [15] HUGERTH L W, WEFER H A, LUNDIN S, et al. DegePrime, a program for degenerate primer design for broad-taxonomic-range PCR in microbial ecology studies[J]. Applied & Environmental Microbiology, 80(16): 5116-5123.
- [16] 张志东, 顾美英, 王玮, 等. 基于高通量测序的辐射污染区细菌群落特征分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1218-1226.
- ZHANG Z D, GU M Y, WANG W, et al. Analysis of bacterial community characteristics in radiation contaminated areas based on high throughput sequencing[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1218-1226.
- [17] 马荣琴, 曹毅, 周俊雄, 等. 番茄根内生假单胞菌的分离与鉴定[J]. 生物技术, 2015, 25(6): 564-568.
- MA R Q, CAO Y, ZHOU J X, et al. Isolation and identification of endophytic *Pseudomonas* in tomato roots[J]. Biotechnology, 2015, 25(6): 564-568.
- [18] 木尼热木·阿力木江, 楚敏, 唐琦勇, 等. 辐射污染区盐爪爪根际可培养细菌群落组成及功能特性[J]. 微生物学通报, 2018, 45(7): 23-32.
- MUNIREMU A, CHU M, TANG Q Y, et al. Community composition and functional characteristics of bacteria in the rhizosphere of *Kalidium foliatum* from the radiation polluted area[J]. Microbiology China, 2018, 45(7): 23-32.
- [19] FELSENSTEIN J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach[J]. Journal of Molecular Evolution, 1981, 17: 368-376.
- [20] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.
- [21] 罗来鑫, 李健强, HASAN B. 番茄细菌性溃疡病苗期接种新方法的研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35

- (2): 123 - 128.
- LUO L X, LI J Q, HASAN B. Study on the new inoculation method of tomato bacterial canker in seedling stage [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2005, 35 (2): 123 - 128.
- [22] WANG F H, HUANG X Y, CHEN Y Y, et al. Study on the effect of capsaicin on the intestinal flora through high-throughput sequencing [J]. *ACS Omega*, 2020, 5 (2): 1246 - 1253.
- [23] BAO L J, GU L K, SUN B, et al. Seasonal variation of epiphytic bacteria in the phyllosphere of *Ginkgo biloba*, *Pinus bungeana* and *Sabina chinensis* [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2020, 96(3): 17.
- [24] XU X H, ZHANG Z, HU S L, et al. Response of soil bacterial communities to lead and zinc pollution revealed by Illumina MiSeq sequencing investigation [J]. *Environmental Science & Pollution Research International*, 2016, 24(1): 1 - 10.
- [25] SHI Y, YANG H, ZHANG T, et al. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(14): 6375 - 6385.
- [26] 陈泽斌, 陈兴位, 夏体渊, 等. 食用玫瑰花瓣可培养内生细菌的分离及多样性分析 [J]. *西南农业学报*, 2016, 29(6): 1408 - 1413.
- CHEN Z B, CHEN X W, XIA T Y, et al. Isolation and diversity analysis of culturable endophytic bacteria from edible rose petals [J]. *Journal of South Agriculture*, 2016, 29 (6): 1408 - 1413.
- [27] 曹艳花, 刘谦, 姚粟, 等. 西沙野生诺尼内生细菌群落多样性初步研究 [J]. *食品科学技术学报*, 2014, 32(2): 39 - 45.
- CAO Y H, LIU Q, YAO L, et al. Communities diversity of endophytic bacteria from fruit of *Morinda citrifolia* (noni) [J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, 32(2): 39 - 45.
- [28] HASSAN J A, CHAU-LY I J, LEWIS J D. High-throughput identification of resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato in tomato using seedling flood assay [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2020, 157: 1 - 4.
- [29] SHEFALI D, ZHANG G D, DHIRAJ G, et al. Uneven distribution of microorganisms on the surface of field-grown cantaloupes [J]. *Food Control*, 2015, 47: 185 - 189.
- [30] 许美玲, 张鑫, 杨娟, 等. 糖水水果罐头中主要腐败微生物的分离纯化及鉴定研究 [J]. *食品研究与开发*, 2013(23): 107 - 110.
- XU M L, ZHANG X, YANG J, et al. Isolation, purification and identification of main spoilage microorganisms in canned fruits with syrup [J]. *Food Research and Development*, 2013 (23): 107 - 110.
- [31] 赵丹丹, 王云, 付晓萍, 等. 台湾青枣致腐微生物的分离鉴定及其抑制研究 [J]. *西南农业学报*, 2016, 29(2): 178 - 183.
- ZHAO D D, WANG Y, FU X P, et al. Isolation, identification and inhibition of saprophytic microorganisms from *Zizyphus jujube* [J]. *Journal of Southwest Agriculture*, 2016, 29(2): 178 - 183.
- [32] 李昱佳, 李茜, 张志想, 等. 拮抗根癌土壤杆菌的桃内生细菌的筛选鉴定 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- LI Y J, LI Q, ZHANG Z X, et al. Screening and identification of endophytic bacteria against *Agrobacterium tumefaciens* [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
- [33] 冯晓师. 肥城桃褐变相关因子分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.
- FENG X S. Analysis of the factors related to the browning of Feicheng peach [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2015.
- [34] 厉艳, 王英超, 宋涛, 等. 进境多肉植物细菌性褐腐病的病原分离与鉴定 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2017(11): 63 - 66.
- LI Y, WANG Y C, SONG T, et al. Isolation and identification of pathogen of bacterial brown rot of imported succulent plants [J]. *Journal of Food Safety and Quality Inspection*, 2017(11): 63 - 66.
- [35] 顾沁, 张昊, 黄海, 等. 一种玉米新型细菌性褐腐病的病原鉴定 [J]. *植物保护*, 2016, 242(3): 92 - 95.
- GU Q, ZHANG H, HUANG H, et al. Pathogen identification of a new type of bacterial brown rot of maize [J]. *Plant Protection*, 2016, 242(3): 92 - 95.
- [36] 王建辉, 王秀, 王发祥, 等. 冷藏条件下带蓬鲜莲优势腐败菌鉴定及其消长规律研究 [J]. *食品与机械*, 2016(32): 109.
- WANG J H, WANG X, WANG F X, et al. Identification of dominant putrefactive bacteria of fresh lotus in cold storage and their growth and decline [J]. *Food and Machinery*, 2016 (32): 109.
- [37] 邢磊, 赵圣国, 郑楠, 等. 未培养微生物分离培养技术研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2017, 44 (12): 3053 - 3066.
- XING L, ZHAO S G, ZHENG N, et al. Research progress in the separation and culture of uncultured microorganisms [J]. *Microbiology China*, 2017, 44 (12): 3053 - 3066.

- [38] ALAIN K, QUERELLOU J. Cultivating the uncultured; limits, advances and future challenges [J]. *Extremophiles*, 2009, 13(4):583–594.
- [39] LAGIER J C, KHELAIPIA S, ALOU M T, et al. Culture of previously uncultured members of the human gut microbiota by culturomics [J]. *Nature Microbiology*, 2016, 119(2):179.

Diversity of Endophytic Bacteria in Nectarine and Apricot and Isolation, Identification of Soft Rot Pathogen

LIU Xiaojing^{1,2}, LIN Yang^{1,2}, LÜ Zhuo^{1,2}, LI Yaling², HE Huan², LI Ling²,
ZHU Xuan^{2,*}, ZHANG Zhidong^{1,2,*}

(1. *Institute of Applied Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences/Xinjiang Laboratory of Special Environmental Microbiology, Urumqi 830091, China*;

2. *College of Food Sciences and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China*)

Abstract: In order to reveal the main composition of endophytic bacterial communities in nectarine and Kuqa apricot, and screen and verify the potential pathogenic bacteria, then provide the foundation for the research of storage, freshness, and prevention of soft rot disease, the endophytic bacterial communities in postharvest nectarine and Kuqa apricot in Xinjiang were analyzed by high-throughput sequencing. The pathogenic bacteria were screened by traditional isolation and culture methods, then identified based on 16S rDNA sequences analysis. The pathogenicity of strains was tested and identified by *in vitro* inoculation method and re-isolation method. The results showed that endophytic bacterial communities in nectarine and Kuqa apricot contained 128 operational taxonomic units (OTUs), involving 117 genera of 9 phylums. Proteobacteria was absolute dominant phyla followed by Firmicutes and Bacteroides. At the genus level, *Pantoea*, *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Bacteroides* were the dominant microflora in nectarine, while *Gluconobacter*, *Pantoea*, *Christensenella* and *Prevotella* were the dominant population in Kuqa apricot. A potential pathogenic bacteria named XAAS-P1 related to soft rot disease was obtained, which was classified in *Pantoea* by phylogenetic tree construction of 16S rDNA sequence. It exerted the ability to cause the postharvest decay of nectarine and Kuqa apricot, which had consistent symptoms with natural soft rot. After 4 days inoculation, the incidence of decay was 100%, and the decay appeared 1 days earlier compared with the negative control group. Results of re-isolation and identification showed that strain XAAS-P1 was the absolutely dominant bacteria in lesion, which proved that strain XAAS-P1 was the pathogenic bacteria caused the postharvest decay of nectarine and Kuqa apricot. The study indicated that diversity of endophytic bacteria in nectarine and Kuqa apricot was rich, and the endophytic bacterium, *Pantoea* sp. XAAS-P1 could lead to the postharvest decay of nectarine and Kuqa apricot.

Keywords: nectarine; apricot; endophytic bacteria; soft rot; pathogenic bacteria

(责任编辑:叶红波)