

基于高通量测序解析不同品种蓝莓表面菌群结构的多样性

曹森¹, 董立超², 张鹏^{3,4*}, 薛友林², 贾晓昱^{3,4}, 李江阔^{3,4}

¹ 贵阳学院食品与制药工程学院 贵阳 550005

² 辽宁大学轻型产业学院 沈阳 110036

³ 天津市农业科学院农产品保鲜与加工技术研究所 天津 300384

⁴ 国家农产品保鲜工程技术研究中心(天津) 农业农村部农产品贮藏保鲜重点实验室
天津市农产品采后生理与贮藏保鲜重点实验室 天津 300384)

摘要 为了解蓝莓果实表面真菌菌群多样性,明确不同品种蓝莓表面的优势菌群,采用高通量测序技术分析北陆、蓝金、莱克西、奥尼尔蓝莓中 ITS1 区基因序列,比较不同品种蓝莓表面微生物群落结构组成及多样性差异。结果发现:蓝莓主要的优势属为枝孢属、链格孢属;优势种为枝孢菌、链格孢、枝孢霉。由 Simpson 指数可知微生物群落丰度及群落多样性由高至低为莱克西、北陆、奥尼尔、蓝金。不同品种蓝莓表面的菌群结构与品种存在一定的聚类关系:北陆和莱克西群落结构相似度较高,而其它样品间微生物群落差异较大,各品种蓝莓表面的主要菌属相对丰度差异较大,枝孢菌、链格孢、枝孢霉为主要差异菌种。研究初步明确了蓝莓表面菌群结构的多样性,为保证蓝莓贮藏期间的品质安全提供一定的理论支持。

关键词 高通量测序; 蓝莓; 菌群结构; 品种

文章编号 1009-7848(2022)07-0278-09 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.07.028

蓝莓(*Vaccinium* sp.)属于小浆果类,其果实口感十分细腻、鲜嫩、多汁,然而,在生长、采收、装卸和运输过程中极易造成机械损伤,使其受到病菌侵染,进而出现采后的各种病害,使蓝莓的贮藏和货架期缩短,严重影响着蓝莓产业的良性发展^[1]。了解不同品种蓝莓采后的微生物病害发生规律,并制定出具有针对性的有效防治措施显得十分重要。蓝莓采后病害主要是由病原真菌引起,采后病害的出现与不同蓝莓品种自身抗性、贮藏时的温度、湿度及果实采摘时间关系密切。国内外学者在蓝莓病害发生规律及防治方面做了许多研究。1973年, Milholland^[2]在美国东南部北卡罗来纳州的蓝莓中首次发现的链格孢菌(*Alternaria* sp.)是高丛蓝莓采后病害的主要致病菌,并提出使用药剂处理对链格孢菌的防效能力较差,抑制链格孢菌侵染的最佳方法是控制蓝莓采后贮藏温度;

Smith等^[3]发现不同品种的兔眼蓝莓在采后病害中存在抗性差异; Mari等^[4]提出拮抗生防菌可促进采后蓝莓产生拮抗物质,促进蓝莓发生防御反应,从而减少蓝莓采后病害的出现。杨蕾等^[5]在采后腐烂蓝莓中分离鉴定出青霉菌(*Penicillium digitatum*)和枝孢菌(*Cladosporium tenuissimum*),试验发现 BS-3 菌株对两种菌的抑菌效果达 90%以上,有潜在的生防利用价值。

目前国内研究蓝莓采后病害主要集中在蓝莓产地方面,对品种间的差异方面研究较少。在贵州区域,2015年周笑犁等^[6]报道,采后的蓝莓主要是由拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis* sp.)、青霉菌(*Penicillium* sp.)和枝孢霉(*Acremonium* sp.)等致病菌侵染而发生病害;同年,郭晓月等^[7]发现中国云南区域蓝莓贮藏期的致病菌为枝孢霉(*Acremonium* sp.)、链格孢菌(*Alternaria* sp.)和匍柄霉属(*Stemphylium* sp.)真菌。2016年,在辽南地区,戴启东等^[8]从蓝莓病害果实中分离灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)、链格孢菌(*Alternaria* sp.)、青霉菌(*Penicillium* sp.)和粉红单端孢菌(*Trichothecium roseum*)4种致病菌。

长期以来,国内学者对果蔬采后病害方面的研究大多数为微生物的传统纯培养和鉴定。其分

收稿日期: 2021-07-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0401303);天津市农业科学院青年创新项目(2019009);贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2021]一般122)

作者简介: 曹森(1988—),男,硕士,教授

通信作者: 张鹏 E-mail: zhangpeng811202@163.com

离鉴定出的致病菌仅为样本中较小的一部分。如今,高通量技术应用于检测土壤多样化^[9-11]、海洋食品^[11-13]、肠道环境^[14-16]、发酵食品^[17-20]等领域的微生物群落。其中,在食品微生物领域通常采用 16S rRNA 高通量测序技术检测微生物群落的多样性。本研究以天津市蓟州区北陆、蓝金、莱克西、奥尼尔蓝莓为研究对象,采用高通量测序技术测序不同品种蓝莓表面菌群的 ITS1 区,明确各品种蓝莓的优势菌群,为蓝莓品种选育、病害研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

北陆、莱克西、奥尼尔、蓝金蓝莓于 2020 年 6 月采自天津市蓟州区海阔家庭农场(117.64°N, 40.09°E),采摘大小均匀、品质良好的果实装入小篮内,采收 6 h 内空调车运至实验室。每个品种随机挑选约 80 g 蓝莓果实,立即液氮速冻,于超低温(-80℃)冰箱保存。每个品种随机取出多颗果实进行测定,混样提取 DNA 分别建库。

台式离心机(Pico-21),赛默飞世尔科技公司;PCR 仪(T100TM Thermal Cycle)、凝胶成像系统(ChemiDoc™MP),美国伯乐公司;电泳仪电源(DYY-6C)、电泳槽(DYCZ-21),北京市六一仪器厂;荧光计(Q32866Qubit®3.),美国英杰生命技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 试材处理 对供试的样本分别进行标记,北陆、莱克西、奥尼尔、蓝金蓝莓分别标注为 A、B、C、D。

1.2.1.1 蓝莓果实基因组 DNA 的提取及 PCR 扩增 果实基因组 DNA 的提取采用十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB),采用 Barcode 的特异引物、Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和酶进行 PCR 扩增。

ITS1 区引物(ITS5-1F-F 和 ITS1-1F-R): ITS1-1F-F:5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'; ITS1-1F-R:5'-GCTGCGTTCCTTCATCGATGC-3'。

1.2.1.2 PCR 产物的检测和建库 使用质量分数为 2%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,蓝莓果实样本

文库采用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 试剂盒进行构建,并经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,最后使用 NovaSeq6000 上机测序。

1.2.2 数据筛选 从下机数据中使用 PCR 扩增引物序列和 Barcode 序列拆分出不同品种蓝莓数据,去除引物序列和 Barcode 后,使用 FLASH^[21]逐个对不同品种蓝莓的 reads 进行拼接,获得原始的 Tags 数据(Raw Tags),并将其过滤处理^[22]得到每个不同样本的高质量 Tags 数据(Clean Tags)。参照 Caporaso 等^[23]的 Tags 质量控制流程进行处理:将 Raw Tags 从连续低质量值(阈值为 ≤19)碱基数达到长度 3 的第 1 个低质量碱基位点截断,随后过滤掉连续高质量碱基长度小于 75%长度的 Tags。经过上述处理后的 Tags 数据通过^[24]与其注释数据库进行比对,并去除嵌合体序列^[25],剩余有效数据(Effective tags)。

1.3 数据处理

1.3.1 OTU 聚类和物种注释 Effective Tag 的聚类采用 Uparse 软件^[26],结果以 97%的序列聚类成为 OTUs(Operational taxonomic units),使用 Qiime 软件中的 blast 方法^[27]与 Unit 数据库^[28]进行物种注释。所有代表序列之间的系统发生关系使用 MUSCLE 软件进行序列比对获得^[29]。

1.3.2 样本复杂度分析(Alpha diversity) 使用 Qiime 软件和 R 软件计算并绘制曲线,以及 Alpha 多样性指数组间差异分析。

1.3.3 多样本比较分析(Beta diversity) 使用 R 软件进行 PCA 分析和 Beta 多样性指数组间差异分析。Metastats 分析使用 R 软件进行组间的置换检验,从而得到 P 值,并且使用 White 等^[30]报道方法对 P 值进行修正,得到 q 值。

2 结果与分析

2.1 注释情况

对 4 个品种的蓝莓 PCR 产物进行 PCR-free 文库构建,并对文库双末端进行测序,经过对 Reads 拼接得到结果如下:平均每个蓝莓品种样品测得 91 177 条原始序列,质控后的蓝莓样品平均得到 90 518 条有效数据,质控有效数据量为 88 559,质控效率为 97.08%。将所得的序列聚类得到 295 个 OTUs。并将 OTUs 序列与 UNITE

数据库进行物种注释,结果显示,共有 103 (34.92%) 个 OTU 注释到属水平。进一步计算 α

多样性与 β 多样性,然后进行组间差异比较,从而揭示不同品种蓝莓的群落结构的差异特征。

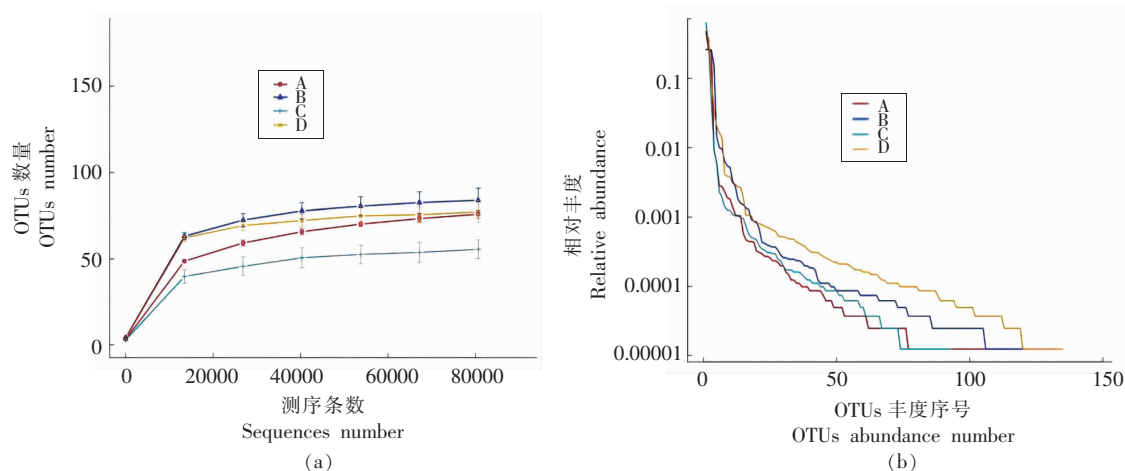


图 1 不同蓝莓品种稀疏曲线(a)和等级分布曲线(b)

Fig.1 Rarefaction curve and Rank Abundance curve of different blueberry varieties

如图 1 所示,得到 OTUs 后,通过绘制稀疏曲线来判断当前每个蓝莓样品的测序深度是否足以反映该群落样本所包含的微生物多样性。在测序样品中,4 个品种蓝莓果实测序样品的稀释曲线,随着测序深度的增加而逐渐趋于平坦,表明测序数据已获得绝大部分样品信息,已经能够反映蓝莓的微生物群落组成。从稀释曲线的 OTU 数量来看,在相同测序深度下,比较不同蓝莓样本中 OTU 数的多少,从而衡量每个样本的多样性高低,由图 1 可以看出,蓝金的表面微生物多样性高于其它 3 种蓝莓的表面微生物多样性。

蓝莓果实样本中物种的均匀度和丰富度可采用等级分布曲线分析。其中,等级分布曲线的宽度反映蓝莓表面微生物物种的丰富度,物种的丰富度与曲线在 X 轴上的跨度相关。而在曲线 Y 轴方向,曲线平滑程度反映蓝莓样品中物种均匀程度^[31]。综上所述,奥尼尔品种蓝莓果实的表面微生物物种分布的均匀程度和丰富度,高于其它 3 个品种微生物的表面微生物均匀程度。

2.2 基于 OTU 的花瓣图分析

如图 2 所示,在北陆表面,共有 134 个 OTUs,北陆特有 39 个 OTUs;蓝金表面,共有 144 个 OTUs,蓝金特有 56 个 OTUs;莱克西表面,共有 115 个 OTUs,莱克西特有 34 个 OTUs;奥尼尔表



图 2 不同蓝莓品种 OTU 花瓣图

Fig.2 OTU petals of different blueberry varieties

表 1 物种注释情况

Table 1 Species annotation situation

项目	占比总数量/%
注释到界水平	70.51
注释到门水平	42.03
注释到纲水平	39.66
注释到目水平	38.64
注释到科水平	37.29
注释到属水平	34.92
注释到种水平	23.39

面,共有 222 个 OTUs,奥尼尔特有 70 个 OTUs。奥尼尔样本序列所得细菌 OTU 数量最多,蓝金其次,莱克西最少,这说明奥尼尔品种含有较丰富的菌群种类,北陆、蓝金、莱克西 3 个品种的蓝莓

核心菌群组成较相似。奥尼尔与其它 3 个品种蓝莓菌群差异较大。

2.3 物种注释概况

通过与数据库 UNITE 比对,进行物种注释并分析发现:蓝莓果实样本共检测出 295 个 OTUs,其中有 208(70.51%)个 OTUs 数目可注释到数据库中。表 1 表明,注释到界水平、门水平、纲水平、目水平、科水平、属水平、种水平的比例分别为 70.51%, 42.03%, 39.66%, 38.64%, 37.29%, 34.92%, 23.39%。

在属水平上,图 3 显示每个品种蓝莓相对丰度前 10 的物种名称及相对丰度,优势物种为平均长度 64.01%的枝孢属(*Cladosporium*)、23.3%的链格孢属(*Alternaria*),不同品种蓝莓中的主要优势菌群基本相同,而相对丰度差异较大,即北陆和莱克西中枝孢属的相对丰度分别为 72.53%和 92.2%,而蓝金的枝孢属相对丰度只有 41.46%;奥尼尔中枝孢属的相对丰度为 49.84%。说明在属水平下,不同品种蓝莓中真菌群落结构组成相同,存在差异的是各物种的组成比例,由图 3 可知,枝孢属是不同品种蓝莓中的优势菌群。

从图 4 可以发现,不同样品中优势菌在种水平上有较大差异。北陆和奥尼尔样品间细菌群落组成相似:北陆、蓝金、莱克西、奥尼尔 4 种样品中优势种为枝孢菌(46.87%, 25.21%, 62.68%, 38.39%)、链格孢(24.39%, 25.72%, 4.55%, 38.52%)以及枝孢霉(24.73%, 15.6%, 28.89%, 9.36%)。上述链格孢更多地与采后蓝莓贮藏初期发生暗白色霉变,老后变暗有关,其在蓝莓表面的相对丰度大小也反映其耐贮性^[32]。链格孢在莱克西中的相对丰度显著低于其它 3 个样本($P < 0.05$),北陆和蓝金不显著,奥尼尔显著高于其它 3 个品种($P < 0.05$)。枝孢霉、枝孢菌在各品种间均差异显著($P < 0.05$)。因此在蓝莓贮藏中,对于该链格孢菌的认识值得深入研究。

2.4 多样品比较分析(Beta diversity)

根据 OTU 的丰度数据,通过绘制属水平上的数据热图,可以将不同的 OTU 分块聚类,根据热图中不同颜色的梯度,反映出不同蓝莓样品表面的微生物群落相似性、差异性及物种聚类关系。图 5 可以直观地显示不同品种样品中微生物的差

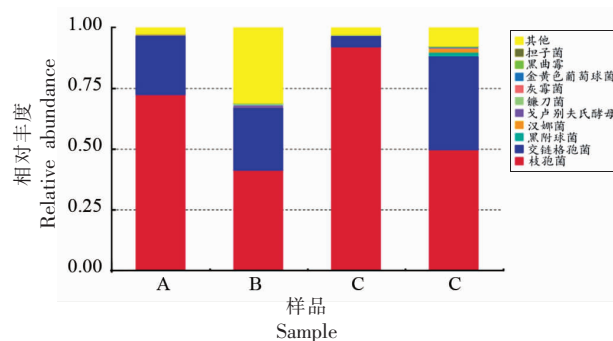


图 3 不同蓝莓品种在属水平上的物种相对丰度柱形图

Fig.3 Column chart of relative abundance of different blueberry varieties at the genus level

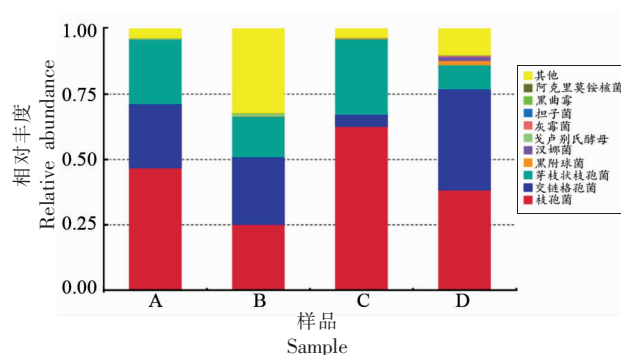


图 4 不同蓝莓品种在种水平上的物种相对丰度柱形图

Fig.4 Column chart of relative abundance of different blueberry varieties at species level

异。图 5a 为 OTU 聚类树,左侧为不同品种蓝莓样品聚类树,不同地区的 4 种蓝莓可分为 3 个聚类:北陆和莱克西聚为一类,蓝金聚为一类,奥尼尔聚为一类,说明不同样品间微生物群落存在一定的差异性,北陆和莱克西群落结构相似度较高,而其它样品两两之间微生物群落差异较大。

主成分分析 (Principal component analysis, PCA) 结果(图 5b)表明,样品北陆、莱克西距离较近,而北陆、蓝金、奥尼尔,蓝金、莱克西、奥尼尔这两组距离较远,可以推断出北陆和莱克西群落结构相似度较高,而其它样品两两之间微生物群落差异较大。

2.5 样品复杂度分析(Alpha diversity)

由表 2 可以看出所有结果 Coverage 指数均为 1,说明蓝莓样品文库种序列基本都被测出,未被测到的概率极低,测序结果可以反映被测蓝莓样品的真实情况。其中,Shannon 指数可反映蓝莓果

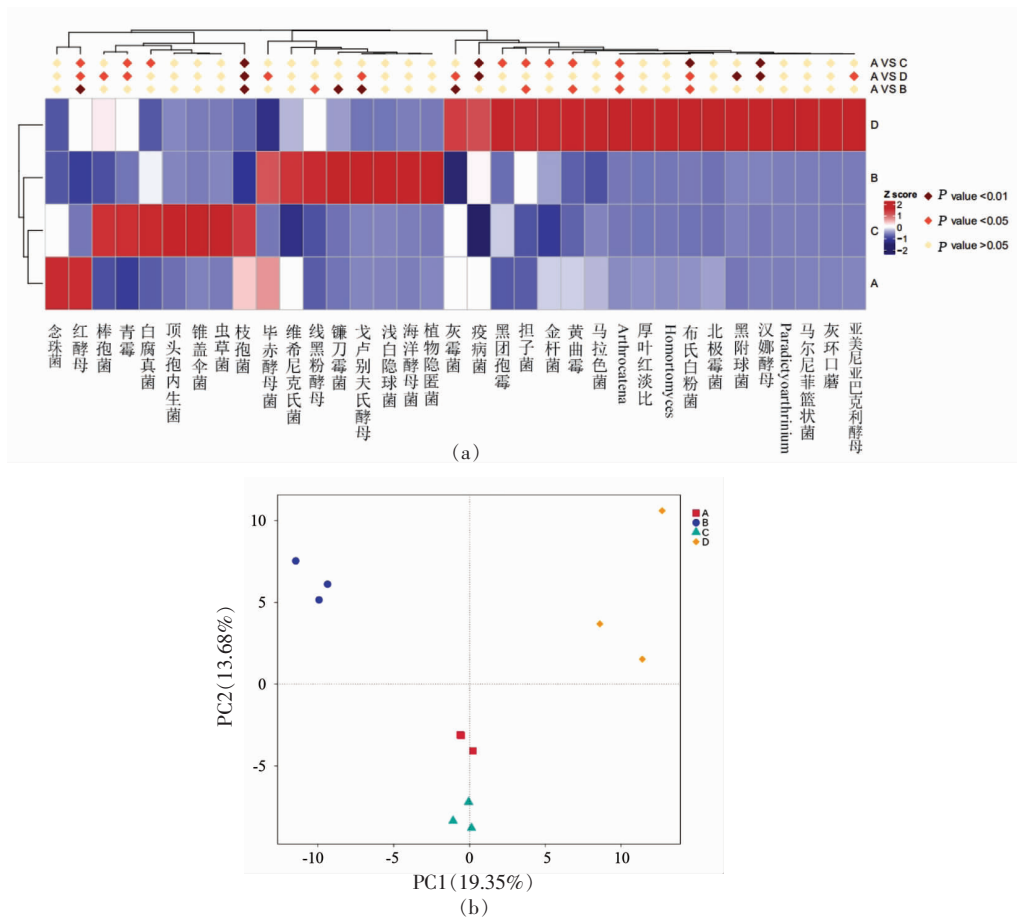


图 5 不同蓝莓品种的多样品比较分析

Fig.5 Comparative analysis of multiple samples of different blueberry varieties

实群落多样性和物种的分布情况。Simpson 指数表征群落内物种分布的多样性和均匀度，其指数越大代表不同品种的蓝莓果实微生物群落多样性越低。Chao1 表征蓝莓果实物种总数，ACE 指数可反映不同品种蓝莓果实微生物群落中 OTU 数目。由

表 2 可知，根据 Simpson 指数显示微生物群落丰度及群落多样性由高至低为莱克西、北陆、奥尼尔、蓝金。根据 Shannon 指数，分类总数由高至低为蓝金、奥尼尔、北陆、莱克西。

表 2 不同品种蓝莓 α 多样性

Table 2 α-Diversity of different blueberry varieties

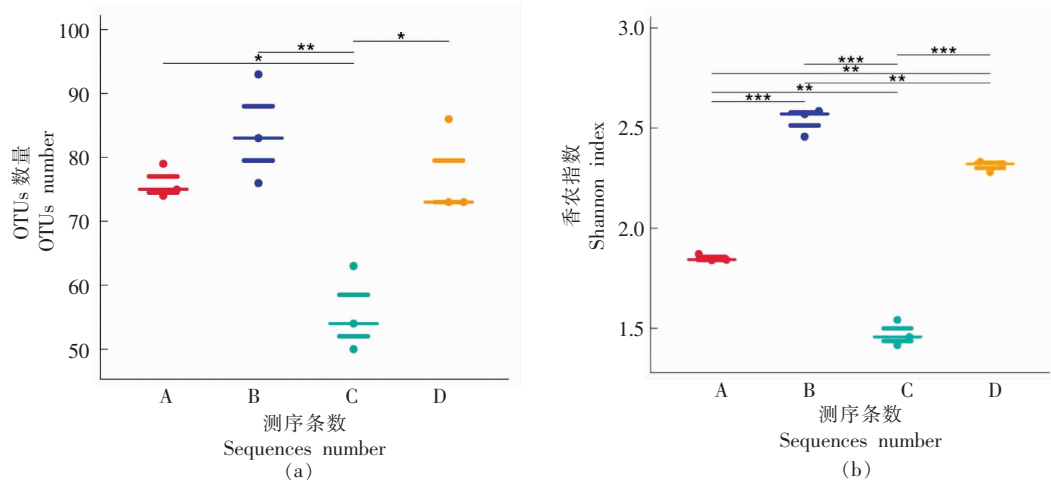
样品	物种数目	Shannon 指数	Simpson 指数	Chao1 指数	ACE 指数	Coverage 指数
A	82.67	1.86	0.66	95.84	97.11	1.00
B	89.33	2.54	0.78	98.56	93.67	1.00
C	61.33	1.48	0.52	65.34	68.69	1.00
D	84.00	2.32	0.69	87.05	87.14	1.00

在属水平上，通过 α 组间差异分析可初步判断不同品种的蓝莓果实之间的微生物群落的相似性。根据样本所属的类别进行分析和讨论。如图 6

所示，通过 Wilcoxon 秩和检验，发现测得的物种数在蓝金-莱克西、北陆-莱克西、莱克西-奥尼尔两组间有显著差异 ($P < 0.05$)，其显著性 P 值为 0.0029，

0.0224,0.0387。测得的物种数在蓝金-奥尼尔、北陆-蓝金、北陆-奥尼尔两组间不具有明显的差异($P>0.05$), P 值为0.1157,0.1958,0.7333。Shannon

指数在蓝金-莱克西、北陆-蓝金、莱克西-奥尼尔等两组间具有明显的差异($P<0.05$),显著性 P 值为0.0000,0.0001,0.0001。



注:“*”表示两组间差异显著($P<0.05$),“**”表示两组间差异极显著($P<0.01$),“***”表示两组间差异极显著($P<0.001$)。

图6 不同蓝莓品种样品的复杂度分析

Fig.6 Analysis of the complexity of different blueberry varieties

3 结论

对不同品种蓝莓进行多样品比较分析发现,北陆和莱克西群落结构相似度较高,且其微生物群落丰度高,群落多样性丰富。通过对比不同样本的物种相对丰度柱形图可以发现,在属水平上的优势物种为枝孢属(*Cladosporium*)、链格孢属(*Alternaria*);在种水平上的优势物种为枝孢菌(*Cladosporium_chasmanthicola*)、链格孢(*Alternaria_alternata*)、枝孢霉(*Cladosporium_cladosporioides*)。品种差异对蓝莓表面微生物多样性及其群落结构组成具有一定影响,品种差异主要影响枝孢菌、链格孢、枝孢霉等真菌的相对丰度。

参 考 文 献

- [1] 王虹虹,倪晓宇,李维林,等. 蓝莓机械采收技术研究现状及发展趋势[J]. 林业机械与木工设备, 2020, 48(7): 4-8.
WANG H H, NI X Y, LI W L, et al. Research status and development trend of blueberry harvesting technology[J]. Forestry Machinery and Woodworking Equipment, 2020, 48(7): 4-8.
- [2] MILHOLLAND R D. A leaf spot disease of highbush blueberry caused by *Alternaria tenuissima* [J]. Phytopathology, 1973, 63: 1395-1397.
- [3] SMITH B J, MAGEE J B, GUPTON C L. Susceptibility of rabbiteye blueberry cultivars to post-harvest diseases[J]. Plant Disease, 1996, 80: 215-218.
- [4] MARI M, GUIZZARDI M. The postharvest phase: Emerging technologies for the control of fungal diseases[J]. Phytoparasitica, 1998, 26(1): 59-66.
- [5] 杨蕾,伍建榕,邓佳,等. 蓝莓采后病害病原菌分离鉴定及其拮抗菌筛选[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2019, 48(2): 143-147.
YANG L, WU J R, DENG J, et al. Pathogen identification of rotten blueberry fruit in post-harvest and screening of antagonistic bacteria[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2019, 48(2): 143-147.
- [6] 周笑犁,王瑞,雷霖卿. 蓝莓采后病原真菌分离及其生物学鉴定[J]. 食品科技, 2015, 40(9): 283-293.
ZHOU X L, WANG R, LEI J Q. Separation and biological identification of pathogenic fungi on postharvest blueberry[J]. Food Science and Technology, 2015, 40(9): 283-293.
- [7] 郭晓月,丁雅迪,邓佳. 蓝莓贮藏期病原真菌的分

- 离与鉴定[J]. 北方园艺, 2015(24): 104-108.
- GUO X Y, DING Y D, DENG J. Separation and identification of pathogenic fungi in blueberry storage period[J]. Northern Horticulture, 2015(24): 104-108.
- [8] 戴启东, 李广旭, 杨华, 等. 蓝莓采后病害的病原鉴定及发生规律研究[J]. 果树学报, 2016, 33(10): 1299-1306.
- DAI Q D, LI G X, YANG H, et al. Research on the pathogen and infection regularity of blueberry disease while in storage[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(10): 1299-1306.
- [9] 王艳, 郭良栋, 程虎印, 等. 不同生境重楼内生真菌及土壤真菌多样性比较[J]. 微生物学通报, 2020, 47(9): 2867-2876.
- WANG Y, GUO L D, CHENG H Y, et al. Comparison of endophytic and soil fungi of *Paris polyphylla* diversity from different habitat [J]. Microbiology China, 2020, 47(9): 2867-2876.
- [10] 张萌, 侯怡铃, 钱叶, 等. 不同年龄段银杏树雌株根系土壤细菌群落演替特征分析[J]. 土壤通报, 2019, 50(6): 1343-1351.
- ZHANG M, HOU Y L, QIAN Y, et al. Evolution of bacterial characteristics in rhizospheric soil of different ages of female ginkgo biloba L.[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2019, 50(6): 1343-1351.
- [11] 成敏玲. 基于高通量测序的东湖不同富营养化区域细菌群落结构研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2017.
- CHENG M L. Bacterial community structure in different eutrophic areas of Donghu lake on high throughput sequencing[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2017.
- [12] 马肖肖, 赵利. 高通量测序分析酒糟鱼中微生物群落多样性[J]. 河北农机, 2020(8): 67-70.
- MA X X, ZHAO L. Analysis of microbial community diversity in distiller's grain fish by high-throughput sequencing [J]. Hebei Farm Machinery, 2020(8): 67-70.
- [13] 孙丕海, 钱坤, 李晓丽, 等. 基于高通量测序分析海带表面细菌群落结构[J]. 大连海洋大学学报, 2017, 32(1): 7-12.
- SUN P H, QIAN K, LI X L, et al. Characterization of bacterial community structure on surface of kelp *Saccharina japonica* by high-throughput sequencing[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2017, 32(1): 7-12.
- [14] 杨宏. 不同性别大熊猫肠道微生物群落结构研究[D]. 南充: 西华师范大学, 2019.
- YANG H. The gut microflora structure of giant pandas viewed across gender [D]. Nanchong: West China Normal University, 2019.
- [15] ZHANG Y, ZHANG Z, MA J Z, et al. High-throughput sequencing analysis of the regulation of intestinal flora in giant pandas with indigestion using a probiotic agent LyPB [J]. Journal of Forestry Research, 2020, 31(6): 2589-2595.
- [16] CHEN L, ZHOU W, ZHOU Y, et al. Analysis of the effects of nanosilver on bacterial community in the intestinal fluid of silkworms using high-throughput sequencing [J]. Bulletin of Entomological Research, 2020, 110(3): 309-320.
- [17] 徐琼, 刘洋, 曲勤凤, 等. 高通量测序分析不同地区红腐乳细菌多样性[J]. 食品科学, 2020, 41(10): 110-116.
- XU Q, LIU Y, QU Q F, et al. High-throughput sequencing analysis of bacterial diversity in red Sufu from different regions [J]. Food Science, 2020, 41(10): 110-116.
- [18] 宁明, 赵馨馨, 董蕴, 等. 基于 Illumina MiSeq 测序技术不同地区辣椒酱细菌多样性分析[J]. 中国调味品, 2020, 45(2): 58-63.
- NING M, ZHAO X X, DONG Y, et al. Analysis of bacterial diversity of chili sauce in different areas based on Illumina MiSeq sequencing technology [J]. China Condiment, 2020, 45(2): 58-63.
- [19] 郭倩倩, 卢彪. 基于高通量测序不同生产工艺晴隆酸菜细菌多样性分析[J]. 中国酿造, 2019, 38(8): 73-76.
- GUO Q Q, LU B. Bacterial diversity of Qinglong sauerkraut with different production processes based on high-throughput sequencing [J]. China Brewing, 2019, 38(8): 73-76.
- [20] 罗方雯, 黄永光, 涂华彬, 等. 基于高通量测序技术对茅台镇酱香白酒主酿区域酵母菌群结构多样性的解析[J]. 食品科学, 2020, 41(20): 127-133.
- LUO F W, HUANG Y G, TU H B, et al. Analysis of the structure and diversity of yeast community in main Chinese Maotai-flavor liquor-producing areas of Maotai town using high-throughput sequencing [J]. Food Science, 2020, 41(20): 127-133.
- [21] MAGO T, SALZBERG S L. FLASH: Fast length

- adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957–2963.
- [22] BOKULICH N A, SUBRAMANIAN S, FAITH J J, et al. Quality –filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing [J]. *Nature Methods: Techniques for Life Scientists and Chemists*, 2013, 10(1): 57–59.
- [23] CAPORASO J G, KUCZYNSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high –throughput community sequencing data [J]. *Nature Methods: Techniques for Life Scientists and Chemists*, 2010, 7(5): 335–336.
- [24] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics[J]. *PeerJ*, 2016, 4: 2584.
- [25] HAAS B J, GEVERS D, EARL A M, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454 –pyrosequenced PCR amplicons [J]. *Genome Research*, 2011, 21 (3): 494–504.
- [26] EDGAR R C. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996–998.
- [27] ALTSCHUL S F, GISH W, MILLER W, et al. Basic local alignment search tool [J]. *Academic Press*, 1990, 215(3): 403–410.
- [28] KÖLJALG U, NILSSON R H, ABARENKOV K, et al. Towards a unified paradigm for sequence –based identification of fungi[J]. *Molecular Ecology*, 2013, 22(21): 5271–5277.
- [29] EDGAR R C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5): 1792–1797.
- [30] WHITE J R, NAGARAJAN N, POP M. Statistical methods for detecting differentially abundant features in clinical metagenomic samples[J]. *PLOS Computational Biology*, 2009, 5(4): e1000352.
- [31] 毛俊龙, 祁雪儿, 张宾, 等. 基于高通量测序的大黄鱼表面微生物群落组成及变化分析[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(12): 27–35, 167.
- MAO J L, QI X E, ZHANG B, et al. Analysis microbial community on the surface of large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) based on high –throughput sequencing [J]. *Modern Food Science & Technology*, 2020, 36(12): 27–35, 167.
- [32] 周倩, 冯肖, 纪淑娟, 等. 蓝莓果实常温贮藏过程中表面病原真菌的分离与鉴定[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(2): 271–279.
- ZHOU Q, FNEG X, JI S J, et al. Isolation and identification of surface pathogenic fungi for blueberry during storage at room temperature [J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2020, 20(2): 271–279.

Analysis of Fungal Flora Structural Diversity on the Surface of Different Varieties of Blueberry Based on High–throughput Sequencing

Cao Sen¹, Dong Lichao², Zhang Peng^{3,4*}, Xue Youlin², Jia Xiaoyu^{3,4}, Li Jiangkuo^{3,4}

¹School of Food and Pharmaceutical Engineering, Guiyang University, Guiyang 550005

²College of Light Industry, Liaoning University, Shenyang 110036

³Institute of Agricultural Products Preservation and Processing Technology, Tianjin Academy of Agricultural Sciences, Tianjin 300384

⁴Tianjin Key Laboratory of Postharvest Physiology and Storage of Agricultural Products, Key Laboratory of Storage of Agricultural Products, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Engineering and Technology Research Center for Preservation of Agricultural Products (Tianjin), Tianjin 300384

Abstract In order to understand the diversity of fungal flora in different varieties of blueberries and clarify their respective dominant bacterial groups, this paper used high –throughput sequencing technology to analyze the gene sequences of ITS1 region in Hokuriku, Lanjin, Lexie, O’Neill blueberries, and compared the differences in microbial community structure and diversity from the surface of different blueberries. The results showed that the main dominant genus of blueberry were *Cladosporium* and *Alternaria*; and the dominant species were *Cladosporium_chasmanthicola*,

Alternaria_alternata, *Cladosporium_cladosporioides*. The Simpson index showed that the abundance and diversity of the microbial community from high to low were Lexie, Hokuriku, O'Neill, and Blue Gold. There was a certain clustering relationship between the microbial community structure and varieties on the surface of different blueberries; Hokuriku and Lexie community structures were relatively similar, while the microbial communities of the other samples were quite different, and the relative abundance of the main colonies was significantly different, *Cladosporium*, *Alternaria*, and *Cladosporium* were the main different species. This study preliminarily defined the diversity of fungal flora in different varieties of blueberries, and provided certain theoretical support for ensuring the quality and safety of blueberries during storage.

Keywords high-throughput sequencing; blueberry; fungal flora structure; variety