

## 研究报告

## 番石榴不同生长时期内生真菌群落的多样性特征及变化规律

陈亚珍<sup>1</sup>, 陈洪彬<sup>\*1</sup>, 陈小尘<sup>1</sup>, 蒋璇靓<sup>1</sup>, 林育钊<sup>1</sup>, 张红印<sup>\*1,2</sup>

1 泉州师范学院 海洋与食品学院, 福建 泉州 362000

2 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013

陈亚珍, 陈洪彬, 陈小尘, 蒋璇靓, 林育钊, 张红印. 番石榴不同生长时期内生真菌群落的多样性特征及变化规律[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1089-1100.

CHEN Yazhen, CHEN Hongbin, CHEN Xiaochen, JIANG Xuanjing, LIN Yuzhao, ZHANG Hongyin. Diversity characteristics and variations of endophytic fungal communities in *Psidium guajava* during different developmental stages[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1089-1100.

**摘要:**【背景】内生真菌在植物体内的分布受环境变化和生长阶段的影响, 探索不同植物生长和贮藏过程中内生真菌群落的变化并了解其相互作用, 有利于更好地利用真菌群落对植物的积极间接影响。【目的】探究番石榴果实不同生长时期内生真菌群落的特征和变化规律, 为深入研究和利用番石榴内生真菌资源及果实采后防治病害提供科学依据。【方法】利用 ITS 高通量测序技术比较番石榴不同生长时期果实内生真菌群落组成及差异。【结果】共获得高质量内生真菌序列 1 582 892 条, 涉及 566 个 OTU, 分属于 7 门 26 纲 70 目 161 科 281 属。番石榴内生真菌群落的多样性和丰度在果实成熟前随果实的发育而提高, 而后随果实的继续成熟和腐烂而降低。子囊菌门为优势菌门, 在花期、幼果期、膨大期、成熟期和腐烂期中其相对丰度分别为 99.34%、96.35%、91.63%、65.22%和 100.00%。优势菌属按相对丰度高低排序有新拟盘多毛孢属(*Neopestalotiopsis*, 39.34%)、刺盘孢属(*Colletotrichum*, 26.54%)和枝孢属(*Cladosporium*, 18.58%)等真菌。不同生长时期第一优势类群不同, 其中赤霉菌属(*Gibberella*)、枝孢属、新拟盘多毛孢属和亚隔孢壳属(*Didymella*)分别为花期、幼果期、膨大期和成熟期的优势类群, 腐烂期中主要为新拟盘多毛孢属(49.76%)和刺盘孢属(50.00%)。番石榴内生真菌网络的拓扑特征受不同生长时期的影响, 最强的互作发生在膨大期, 最弱在花期, 并且物种之间的互惠关系强于竞争关系。【结论】番石榴果实中蕴含着功能丰富的内生真菌菌群, 在不同生长时期中的组成及其互作差异较大。这些可为番石榴菌群资源的挖掘提供数据参考。

**关键词:** 植物内生真菌; 群落多样性; 番石榴; 子囊菌门; Illumina MiSeq 测序

资助项目: 福建省自然科学基金(2023J01902, 2021J01976)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2023J01902, 2021J01976).

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Hongbin, yummyway@qq.com; ZHANG Hongyin, zhanghongyin126@126.com

Received: 2024-06-16; Accepted: 2024-07-30; Published online: 2024-08-29

## Diversity characteristics and variations of endophytic fungal communities in *Psidium guajava* during different developmental stages

CHEN Yazhen<sup>1</sup>, CHEN Hongbin<sup>\*1</sup>, CHEN Xiaochen<sup>1</sup>, JIANG Xuanjing<sup>1</sup>, LIN Yuzhao<sup>1</sup>, ZHANG Hongyin<sup>\*1,2</sup>

1 College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, Fujian, China

2 School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

**Abstract:** [Background] The distribution of endophytic fungi in plants is affected by environmental changes and growth stages. Investigating the shifts in these fungal communities and understanding their interactions during plant growth and storage enhances our ability to harness the positive effects of fungi on plants. [Objective] To investigate the characteristics and variations of endophytic fungal communities in *Psidium guajava* fruits during different developmental stages, and provide a scientific basis for the in-depth research and utilization of endophytic fungal resources of this plant and the post-harvest control of diseases. [Methods] High-throughput sequencing of ITS was employed to compare the composition of endophytic fungal communities in *P. guajava* fruits during different developmental stages. [Results] A total of 1 582 892 high-quality endophytic fungal sequences were obtained, involving 566 OTUs belonging to 281 genera, 161 families, 70 orders, 26 classes of 7 phyla. The diversity and abundance of endophytic fungi in *P. guajava* fruits increased over time before fruit ripening and then decreased as fruit continued to ripen and decay. *Ascomycota* was the dominant phylum, with the relative abundance being 99.34%, 96.35%, 91.63%, 65.22%, and 100.00% at the flowering, young fruit, fruit expansion, fruit ripening, and fruit decay stages, respectively. The relative abundance of dominant genera was in a descending order of *Neopestalotiopsis* (39.34%), *Colletotrichum* (26.54%), and *Cladosporium* (18.58%). The dominant genera varied among different developmental stages, with *Gibberella*, *Cladosporium*, *Neopestalotiopsis*, and *Didymella* being dominant at the flowering, young fruit, fruit expansion, and fruit ripening stages, respectively, and *Neopestalotiopsis* (49.76%) and *Colletotrichum* (50.00%) being dominant at the decay stage. The topological characteristics of the endophytic fungal network were influenced by different developmental stages. The strongest interaction occurred at the fruit expansion stage and the weakest at the flowering stage. The reciprocal relationship between species was stronger than the competitive one. [Conclusion] *P. guajava* fruits contained a rich endophytic fungal community, whose composition and interactions varied considerably at different developmental stages. The findings provide reference for the excavation of fungal resources in *P. guajava* fruits.

**Keywords:** plant endophytic fungi; community diversity; *Psidium guajava*; *Ascomycota*; Illumina MiSeq sequencing

番石榴(*Psidium guajava*), 又名芭乐, 是最具商业价值的热带水果之一, 在世界范围内被广泛接受和消费, 是糖、矿物质、纤维、抗坏血酸、类胡萝卜素及具有抗氧化活性的酚类化合物等不同营养物质的优秀来源<sup>[1-2]</sup>。除此之外, 番石榴 also 具有很高的药用价值, 在抗氧化、抗炎、降压和镇痛等方面都具有一定的作用<sup>[3-5]</sup>。

真菌在营养模式上表现出广泛的变化, 与植物相关的真菌一部分能作为内生菌与植株互利共生, 也有一些作为潜在病原菌在植株中寄生<sup>[6-7]</sup>。番石榴是呼吸跃变型水果, 呼吸速率高, 采后代谢快, 易受病原菌感染, 腐烂快, 储存期短。目前, 对于番石榴的研究主要集中在保鲜方法、活性物质的提取及应用、病虫害防治和病原微生物分离培养<sup>[2,8-9]</sup>, 而对于不同生长时期番石榴果实内生真菌群落多样性的特征和变化规律的研究还尚未见报道。

本实验利用 ITS 区域高通量测序技术, 对不同生长时期的番石榴果实内生真菌群落进行分析, 研究番石榴果实不同生长时期的内生真菌群落的特征和变化规律, 以期为进一步利用番石榴内生真菌资源及果实采后病害防治奠定理论基础, 为提高番石榴的农作价值提供科学依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品

‘西瓜红’番石榴, 采自福建省泉州市洛江区罗溪镇绿益田园农场。采用等距取样法于果园中心位置垂直于田埂方向, 以 1 个田埂为间隔距离, 选取 6 排平行植株, 在每排选取 1 株健壮植株并做好标记, 并在对应生长周期采集花朵、幼果期果实、膨大期果实、成熟期果实和腐烂期果实, 每时期设置 6 个生物学重复, 共计 30 个样品, 编号如表 1 所示。采集的样品放

入无菌自封袋低温保存, 及时运回实验室后立即处理。成熟期果实样品分为 2 份, 其中一份立即处理, 另一份则用聚乙烯薄膜袋包装后置于常温(25±1) °C、相对湿度 85%条件下进行贮藏, 待自然腐败后再行处理。

### 1.2 主要试剂和仪器

FastDNA Spin Kit, MP Biomedicals 公司; ITS1F/ITS2R 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司。球磨仪, 弗尔德(上海)仪器设备有限公司; 琼脂糖电泳仪, Bio-Rad 公司; 荧光仪, Thermo Fisher 公司; MiSeq PE300 测序仪, Illumina 公司; 智能人工气候箱, 宁波赛福实验仪器有限公司; 高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; NanoDrop 2000, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

### 1.3 样品前处理

所有样品均采用相同的表面消毒方法。首先将采集的样品用超纯水冲洗以去除其表面附着物, 然后放入 70%乙醇中浸泡 5 min, 再放入 0.5%次氯酸钠溶液中浸泡 5 min, 之后放入 70%乙醇中浸泡 30 s, 最后用无菌水冲洗 3 次以避免乙醇残留。清洗完成后, 花朵直接使用液氮冷冻, 并放入事先灭菌的球磨仪中研磨 30 s; 果实样品则需用事先灭菌的手术刀切成小块, 再用液氮冷冻后放入球磨仪中研磨 60 s。研磨后的粉末用于后续样品 DNA 的抽提。

### 1.4 样品 DNA 抽提和 PCR 扩增

称取研磨后的粉末 0.5 g, 采用 FastDNA Spin Kit 提取样品总 DNA, 提取步骤根据试剂

表 1 样品类型和编号

Table 1 Sample type and sample number

生长周期 Growth cycle	样品编号 Sample number
花期 Flowering stage	H1-H6
幼果期 Young fruit stage	Y1-Y6
膨大期 Fruit expansion stage	P1-P6
成熟期 Fruit ripening stage	C1-C6
腐烂期 Fruit decay stage	F1-F6

盒说明书进行。采用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的DNA质量,利用NanoDrop 2000测定DNA浓度和纯度。采用引物ITS1F(5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2R(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')对真菌ITS1区进行扩增。PCR反应体系:10×Buffer 5 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 4 μL, 上、下游引物(5 μmol/L)各2 μL、*ExTaq* 酶(5 U/μL) 0.25 μL, 模板DNA(10 ng/μL) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O补足50 μL。PCR反应条件:94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 56.5 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35个循环; 72 °C 7 min。将通过2%琼脂糖电泳检测得到明亮条带的PCR扩增产物委托上海美吉生物医药科技有限公司在MiSeq PE300测序仪上进行高通量测序。

## 1.5 数据处理

将测得的ITS序列经过FLASH v1.2.11和QIIME 2软件进行去杂拼接、去除嵌合体等过滤处理,得到优化序列。通过DADA2模型算法纠正PCR和测序过程中的错误,并将去重复后得到的OTU作为最小分类单元,采用classify-sklearn (naive Bayes)法注释以得到每个OTU对应的物种分类信息。用核糖体数据库项目(ribosomal database project, RDP) classifier v2.13软件对OTU序列进行物种注释分析,对比SILVA数据库(silva138/16s\_bacteria)和UNITE数据库(unite8.0/its\_fungi)进行分类学分析。在OTU水平下,利用Mothur v1.30.2计算不同随机抽样下的 $\alpha$ 多样性指数(包括ACE、Sobs、Shannon、Simpson和Coverage指数),利用SPSS v26.0软件中Kruskal-Wallis秩和检验对微生物 $\alpha$ 多样性指数进行差异性分析。利用QIIME 2软件进行 $\beta$ 多样性的主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)。物种Venn图分析、物种组成分析均由R v4.2.0实现,并通过Origin Pro v2021实现可视化。此

外,使用R语言v4.2.0的vegan和igraph包通过Spearman's相关系数构建物种单因素相关网络,并认为Spearman's相关系数( $\rho$ )>0.6具有统计学意义( $P<0.05$ ),使用Gephi v0.10.1软件实现可视化。所有测序样品序列已传至NCBI SRA数据库(序列号为PRJNA1123402)。

## 2 结果与分析

### 2.1 测序统计及 $\alpha$ 多样性

ITS片段测序获得有效序列1 582 892条,按最小样品序列数抽平。如图1所示,所有样品的稀释曲线在急剧上升后皆变为平缓状态,文库覆盖度大于0.99,说明所有样品的测序深度合理。从花期、幼果期、膨大期、成熟期和腐烂期样品中获得的真菌序列共包含7门26纲70目161科281属和566个OTU。

$\alpha$ 多样性指数中的ACE和Sobs指数反映群落物种丰富度,Shannon和Simpson指数反映群落物种多样性。通过对番石榴不同生长时期内生真菌群落进行多样性指数组间的差异检验(Kruskal-Wallis秩和检验)(图2),发现番石榴从开花到果实腐败的过程中,ACE、Sobs和Shannon指数呈现先上升后降低的趋势,而Simpson指数相反。这说明番石榴内生真菌物种的丰富度和多样性在果实成熟前随果实发育而提高,而在果实成熟和腐败的过程中降低。

### 2.2 主坐标分析

对番石榴不同生长时期内生真菌群落在属水平上分别进行主坐标分析(PCoA),距离算法为Bray-Curtis。结果表明,番石榴不同生长时期内生真菌群落组成有显著差异( $R=0.954\ 5$ ,  $P=0.001$ )。如图3所示,第一和第二轴解释度值分别为40.10%和22.35%,总和为62.45%。不同时期真菌群落的变化大于同一时期不同样本中的变化。花期和幼果期果实的真菌群落组

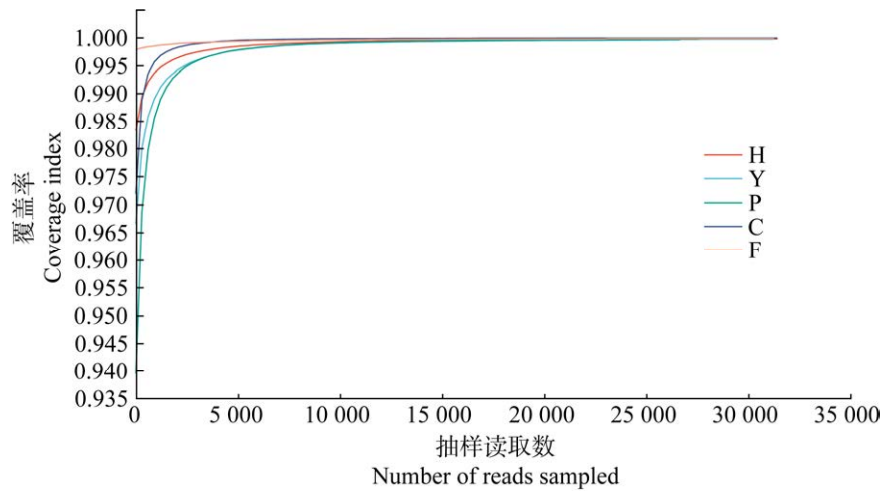


图 1 番石榴不同生长时期内生真菌群落的稀释性曲线 H: 花期; Y: 幼果期; P: 膨大期; C: 成熟期; F: 腐烂期。下同。

Figure 1 Rarefaction curves of endophytic fungal communities in *Psidium guajava* at different developmental stages. H: Flowering stage; Y: Young fruit stage; P: Fruit expansion stage; C: Fruit ripening stage; F: Fruit decay stage. The same below.

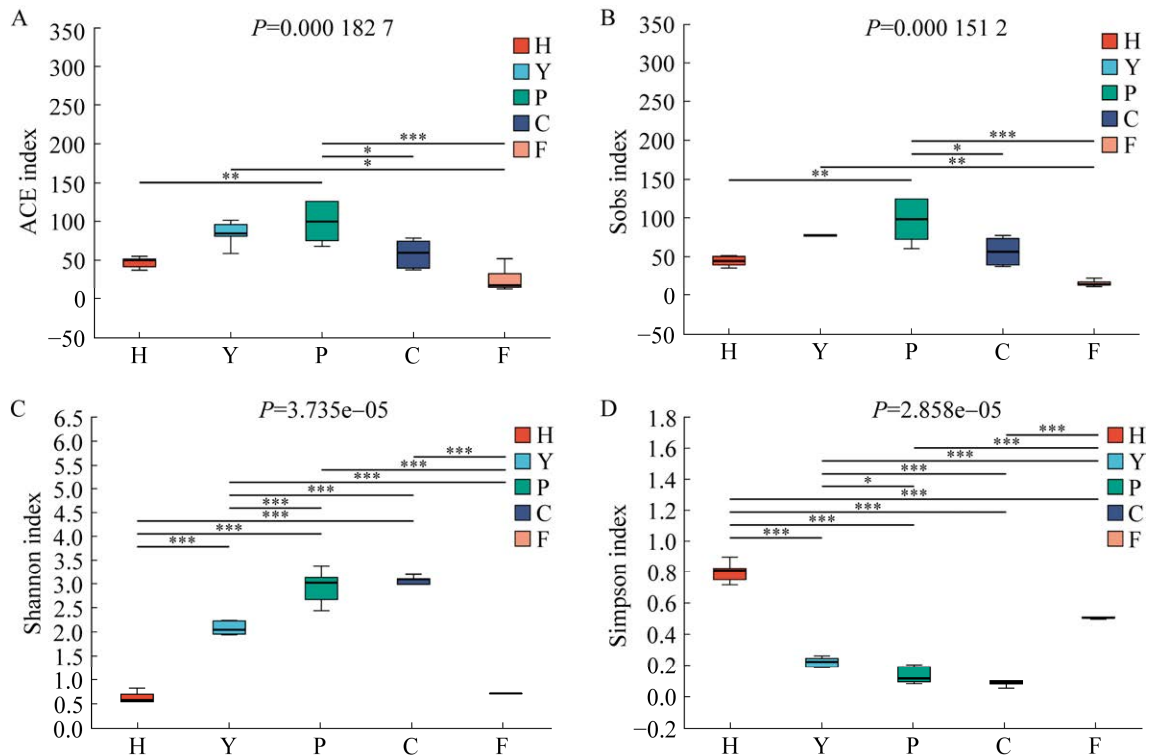


图 2 OTU 水平下番石榴不同生长时期内生真菌群落  $\alpha$  多样性指数比较

Figure 2 Comparison of alpha diversity indices of endophytic fungal communities in different developmental stages of *Psidium guajava* at OTU level. A: ACE index; B: Sobs index; C: Shannon index; D: Simpson index. \*:  $P \leq 0.05$ ; \*\*:  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*:  $P \leq 0.001$ .

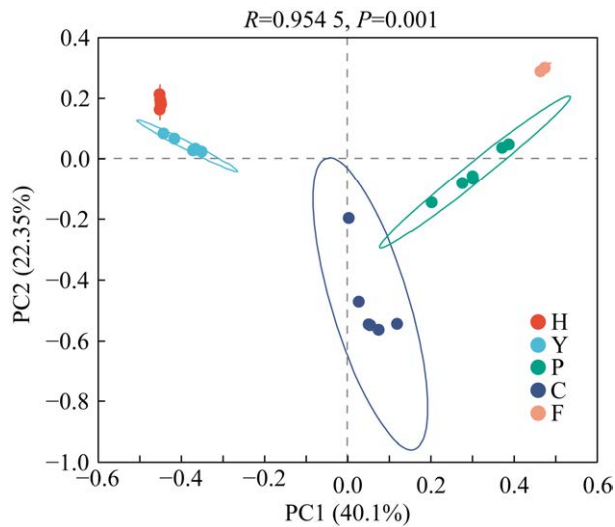


图 3 番石榴不同生长时期内生真菌群落属水平的主坐标分析

Figure 3 Principal coordinate analysis (PCoA) of endophytic fungal communities in different developmental stages of *Psidium guajava* at genus level.

成最为相似，其次它们与膨大期和成熟期果实的菌群种类存在较大差异。

### 2.3 群落结构分析

韦恩图可以直观地体现不同生长时期之间

群落组成的特异性和重叠情况。如图 4A 所示，属水平下，共检测到番石榴不同生长时期内生真菌类群 281 个。花期、幼果期、膨大期、成熟期和腐烂期独有属数量分别为 24 (8.54%)个、33 (11.74%)个、67 (23.84%)个、23 (8.19%)个和 1 (0.36%)个。膨大期与成熟期果实共有属数量最多，为 81 个；花期与腐烂期果实、成熟期与腐烂期果实的共有属数量最少，均为 15 个。五者共有属数量为 10 个。

如图 4B 所示，相对丰度最高的类群为新拟盘多毛孢属(*Neopestalotiopsis*, 39.34%)，其余类群按相对丰度高低排序依次有刺盘孢属(*Colletotrichum*, 26.54%)、枝孢属(*Cladosporium*, 18.58%)、镰孢菌属(*Fusarium*, 5.80%)、座囊菌纲未分类属(*unclassified\_c\_Dothideomycetes*, 5.48%)、轮枝菌属(*Gibellulopsis*, 2.31%)和拟暗球腔菌属(*Phaeosphaeriopsis*, 1.07%)。其中，新拟盘多毛孢属、刺盘孢属和枝孢属共占比 84.46%，说明这 3 个类群为番石榴内生真菌的主要类群。

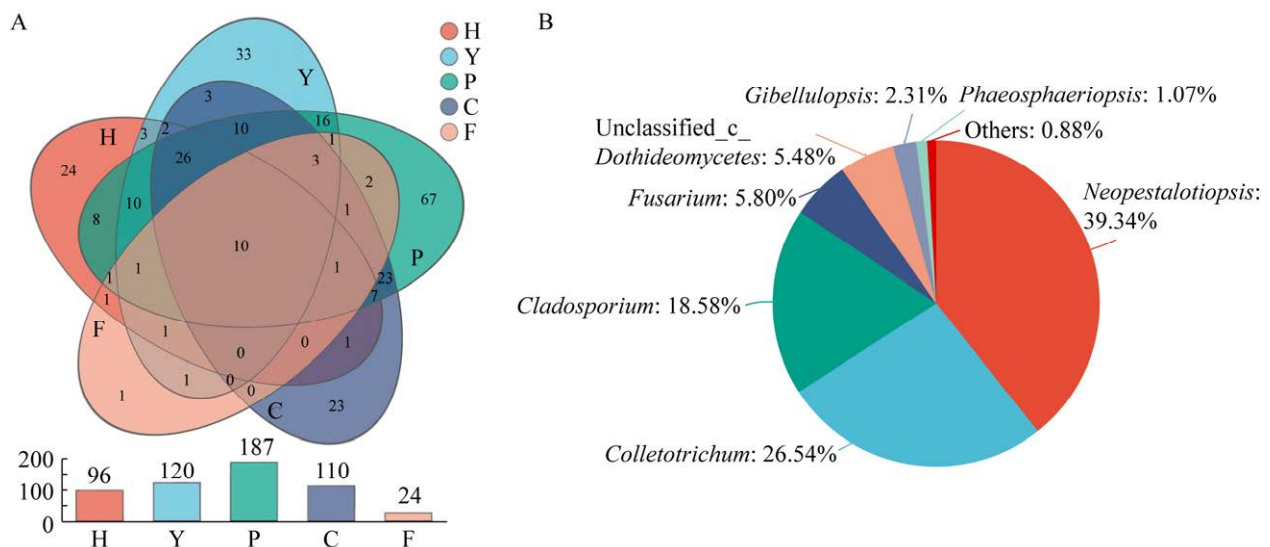


图 4 番石榴不同生长时期内生真菌群落属水平的韦恩图(A)和饼图(B)分析

Figure 4 Venn diagram (A) and pie chart (B) analyses of endophytic fungal communities in different developmental stages of *Psidium guajava* at genus level.

## 2.4 群落组成分析

对真菌群落组成进行分析, 门水平下保留全部物种进行分类, 属水平下保留相对丰度前 15 的物种进行分类, 其余物种归为 others。如图 5A 所示, 门水平下, 共注释到 3 个真菌优势物种。在所有生长时期中, 子囊菌门 (*Ascomycota*) 均为第一优势物种。从花期到成熟期的过程中, 子囊菌门的丰度占比逐渐降低, 到成熟期时降至最低(65.22%), 而腐烂期的果实中仅检测到子囊菌门(100.00%)。相对丰度占比第二和第三的物种为担子菌门 (*Basidiomycota*) 和某未分类真菌门(*unclassified\_k\_Fungi*), 它们的相对丰度从花期到成熟期均逐渐上升, 分别从花期 0.52%、0.09% 上升至成熟期 31.10%、2.95%。

如图 5B 所示, 属水平下, 各生长时期第一优势类群不同。赤霉菌属(*Gibberella*)在花期

时相对丰度达到 89.22%, 幼果期时占比下降至 27.61%, 而在膨大期、成熟期和腐烂期的果实中均未发现。幼果期第一优势类群为枝孢属 (*Cladosporium*, 31.07%), 膨大期为新拟盘多毛孢属 (*Neopestalotiopsis*, 27.41%), 亚隔孢壳属 (*Didymella*, 18.22%) 在成熟期中占比最高。腐烂期果实中主要为新拟盘多毛孢属(49.76%)和刺盘孢属 (*Colletotrichum*, 50.00%), 其余类群含量很少, 说明果实腐烂的过程与新拟盘多毛孢属和刺盘孢属大量增殖密切相关。

## 2.5 群落相关性网络分析

在属水平上构建了花期、幼果期、膨大期和成熟期内生真菌群落相关性网络, 如图 6 所示, 腐烂果中真菌群落结构简单, 所以未构建相关性网络。图中每个节点代表一个属, 节点的颜色表示不同的门。节点大小以中心度排名, 节点中心度的大小与其连接边的数量成正

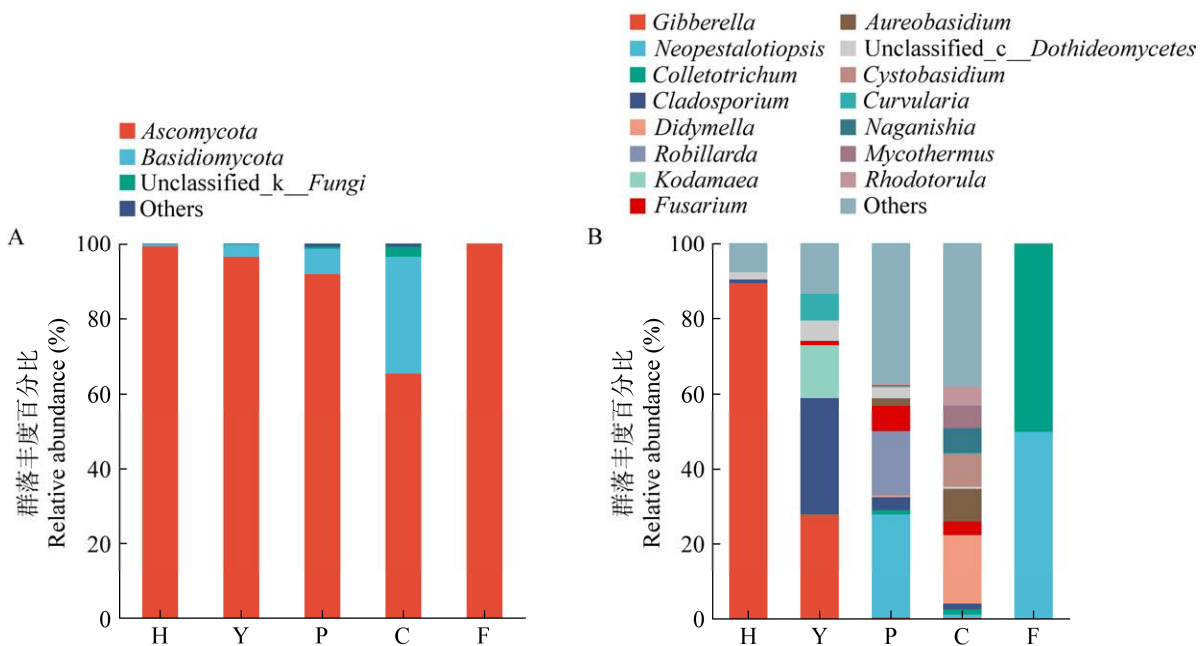


图 5 番石榴不同生长时期内生真菌群落的优势真菌门水平(A)和属水平(B)分布

Figure 5 Distribution of dominant endophytic fungal communities in different developmental stages of *Psidium guajava* at phylum (A) and genus (B) levels.

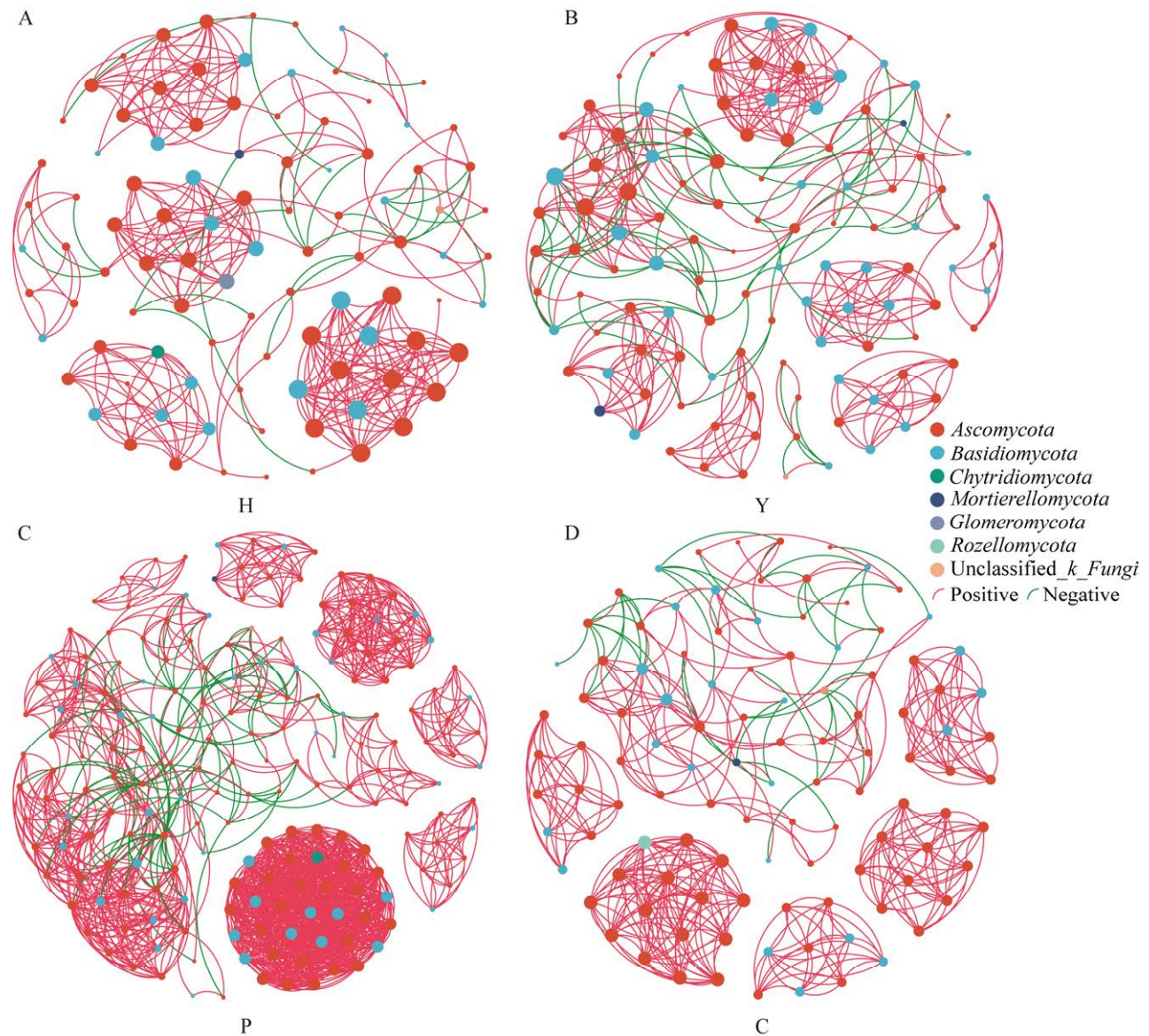


图 6 属水平下番石榴不同生长时期内生真菌群落的相关性网络分析

Figure 6 Correlation network analysis of endophytic fungal communities in different developmental stages of *Psidium guajava* at genus level.

比。相关性网络反映了群落中各个物种的互作关系，如表 2 所示，从花期到膨大期，相关性网络的平均连接度逐渐上升，而模块性相反。这表明随着果实发育，真菌群落的复杂程度上升而稳定性下降。果实成熟后，相关性网络的平均连接度降低，平均聚类系数和模块性增加。这说明果实从膨大期向成熟期发育的过程中真

菌群落的复杂性降低，稳定性提高。不同生长时期的网络图中，子囊菌门(*Ascomycota*)均提供了超过 50% 的节点，其次是担子菌门(*Basidiomycota*)，其余物种占比很低。不同生长时期的网络图中，节点之间的正相互作用均强于负相互作用。花期相关网络有 286 个正相关和 25 个负相关，幼果期有 314 个正相关和 72 个



表 2 属水平下番石榴不同生长时期内生真菌群落相关性网络的拓扑特征

Table 2 Topological characterization of endophytic fungal community correlation networks in different developmental stages of *Psidium guajava* at genus level

样品 Sample	总节点数 Total nodes	总边数 Total links	正相关边数 Positive links	负相关边数 Negative links	平均连接度 Average connectivity	平均聚类系数 Average clustering coefficient	模块性 Modularity
花期 Flowering stage	97	311	286	25	6.412	0.775	0.813
幼果期 Young fruit stage	114	386	314	72	6.722	0.713	0.795
膨大期 Fruit expansion stage	190	1 451	1 347	104	15.274	0.785	0.692
成熟期 Fruit ripening stage	108	420	378	42	7.778	0.797	0.818

负相关, 膨大期有 1 347 个正相关和 104 个负相关, 成熟期有 378 个正相关和 42 个负相关。因此, 从总边数来看, 不同真菌物种在膨大期互作关系最强, 在花期最弱。此外, 从正、负相关边数占总边数的比值来看, 真菌物种之间的互惠关系强于竞争关系, 其中幼果期竞争关系最强, 膨大期最弱。

### 3 讨论

内生真菌是植物真菌生物多样性中一个重要的、可量化的组成部分, 对植物微生物群落的多样性和结构有重要影响<sup>[10-12]</sup>。研究发现, 内生真菌一方面能为宿主植物提供许多益处, 如产生生物活性次生代谢物、促进生长、诱导宿主耐受生物和非生物胁迫<sup>[13-16]</sup>。另一方面, 某些内生真菌也可能发展为致病菌, 从而引起宿主植物病害的发生<sup>[17-18]</sup>。一项关于草莓的不同管理方法的研究中就表明了水果天然微生物组中致病真菌群落的存在<sup>[19]</sup>。由此可知, 内生真菌与宿主植物间的相互作用非常复杂, 包括导致病原微生物主动或潜伏感染的拮抗作用, 以及共生或互生作用<sup>[20]</sup>。更重要的是, 内生真菌群落具有植物物种和基因型特异性, 可通过种子和果实转移到下一代植物<sup>[21]</sup>。因此, 探索

不同植物生长和贮藏过程中内生真菌群落的变化并了解其相互作用, 有利于更好地利用真菌群落对植物的积极间接影响。

内生真菌在植物体内的分布受环境、生长阶段变化的影响<sup>[22-23]</sup>。高通量测序结果表明, 番石榴不同生长时期内生真菌群落多样性、组成及相对丰度差异明显, 具有阶段特异性。从  $\alpha$  多样性指数结果可知, 番石榴内生真菌的物种多样性和相对丰度在果实成熟前随果实的发育而提高, 而后随果实的成熟和腐烂而降低。从物种属水平上的主坐标分析也可发现, 番石榴果实成熟前期(花期和幼果期)的真菌群落组成相似, 而成熟后期(膨大期、成熟期和腐烂期)的真菌群落组成与之差异较大。这都说明了番石榴不同生长时期内生真菌群落的组成主要分为 2 个阶段, 从果实的发育到成熟, 其群落组成趋向多样化, 而从成熟到腐烂, 其组成趋于单一化。这可能与果实生长过程中营养物质的变化有关。果实作为繁衍传播种子的器官, 在发育过程中逐步积累大量的营养物质及活性成分, 这为内生真菌的繁殖提供了丰富的营养条件, 而随果实衰老过程中这些物质的损耗, 内生真菌的繁殖受到抑制。研究报道, 内生真菌在桉树不同发育阶段的不同分布可能与植物宿

主的年龄和环境条件有关<sup>[24]</sup>。苹果果实的发育、成熟和衰老经历一系列生化变化,包括可溶性糖积累、宿主防御反应下降、乙烯产生、呼吸增加等,所有这些变化都可能影响果实内生真菌群的动态<sup>[25]</sup>。

对番石榴不同生长时期内生真菌群落结构和组成的分析表明,不同生长时期间的物种组成存在一定特异和重叠。膨大期与成熟期共有物种数量最多,说明这2个时期真菌群落组成最为相似。内生真菌群落组成中相对丰度最高的属为新拟盘多毛孢属,其次是刺盘孢属、枝孢属和镰孢菌属等。属水平上,不同生长时期第一优势属不同,其中赤霉菌属、枝孢属、新拟盘多毛孢属和亚隔孢壳属分别为花期、幼果期、膨大期和成熟期的优势类群。这说明番石榴果实的发育过程中存在内生真菌群落的演替,并且从属水平的群落构成发现,果实的发育和成熟前期内生真菌群落趋向多样和复杂,而后随着果实的成熟和腐烂,趋向单一和稳定,其中新拟盘多毛孢属和刺盘孢属为腐烂期主要类群构成。由此也表明番石榴果实的病害和腐烂的过程与内生真菌群落演替为新拟盘多毛孢属和刺盘孢属密切相关。Yeh等<sup>[26]</sup>和 Solarte等<sup>[27]</sup>均报道过新拟盘多毛孢属真菌引起番石榴果实腐烂病。刺盘孢属真菌寄主范围和发生的基质极其广泛,同时还是重要的植物病原菌,可侵染草莓、茶树、油橄榄等30多种植物,严重损害植物品质<sup>[28]</sup>。尽管在番石榴果实的各个阶段都看到了内生真菌群落的演替,但从门水平的构成可以发现,子囊菌门为所有生长时期的第一优势类群。可知,子囊菌门组成了核心演替真菌类群,其丰度相对于其他类群占主导地位,并在番石榴的发育、成熟和腐烂阶段持续存在。此外,赤霉菌属、新拟盘多毛孢属和亚隔孢壳属均属于子囊菌门,建议在今后研究中优先考

虑这些核心真菌类群。

在番石榴各个生长时期,从所有样本中生成一个共现网络,以研究内生真菌间相互作用的动态,来揭示几个单独的真菌分类群之间存在的显著正向或反向共现(图6)。这种网络方法可能不足以解释类群之间的相互作用,也不能表明因果关系<sup>[29]</sup>。然而,通过共现网络识别这些相关性和枢纽群落,可为后续构建合成群落以操纵番石榴微生物组的研究提供一个有用起点。本研究发现番石榴内生真菌群落的演替是由果实生长不同时期的更替推动的,并且内生真菌网络的拓扑特征受不同生长时期的影响。随果实发育(花期到膨大期),真菌群落的复杂程度上升而稳定性下降,而后随果实的继续成熟和腐烂(膨大期到腐烂期),其复杂性降低,稳定性提高。最强的互作关系发生在膨大期,最弱在花期,这可能与真菌类群在膨大期较为丰富,在花期较为单一有关。此外,群落之间的互惠关系强于竞争关系。这种受植物发育阶段所驱动的微生物群落的演替也在苹果果实<sup>[25]</sup>、高粱<sup>[30]</sup>以及柳菀属植物(*Baccharis linearis*)<sup>[31]</sup>中报道过。其次,通过探究不同内生真菌群落网络模型中模块枢纽和连接节点发现,子囊菌门是果实不同生长时期网络的重要节点,说明这类真菌是维持整个内生真菌群落的核心类群,这与上述关于群落结构和组成的分析结果相一致。

## 4 结论

本研究通过高通量测序技术对番石榴果实不同生长时期内生真菌群落的组成进行分析。结果表明,番石榴内生真菌群落的多样性、组成和相对丰度在不同生长期有显著差异,并具有阶段特异性。从属水平的群落构成发现,番石榴果实的发育和成熟前期,内生真菌群落趋向多样和复杂,随着果实的成熟和腐烂,趋向

单一和稳定, 其中新拟盘多毛孢属和刺盘孢属为腐烂期主要类群构成; 从门水平的构成发现, 子囊菌门组成了核心演替真菌类群, 并且为所有生长时期的第一优势菌门。相关网络分析显示, 番石榴内生真菌网络的拓扑特征受不同生长时期的影响, 膨大期的互作关系最强, 而花期最弱, 并且物种间的互惠关系强于竞争关系。番石榴含有丰富的内生真菌种群, 其在不同生长时期的特征和变化规律, 可为番石榴内生真菌资源的深入研究和利用以及采后病害的防治提供科学依据。

## REFERENCES

- [1] 陈洪彬, 王慧玲, 蒋璇靓, 陈彩萍, 程永强.  $\gamma$ -氨基丁酸处理对冷藏番石榴果实品质和耐冷性的影响[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(14): 130-136.  
CHEN HB, WANG HL, JIANG XJ, CHEN CP, CHENG YQ. Effects of  $\gamma$ -aminobutyric acid treatment on the quality properties and chilling tolerance of guava fruit during cold storage[J]. Food and Fermentation Industries, 2021, 47(14): 130-136 (in Chinese).
- [2] CHEN HB, LIN HT, JIANG XJ, LIN MS, FAN ZQ. Amelioration of chilling injury and enhancement of quality maintenance in cold-stored guava fruit by melatonin treatment[J]. Food Chemistry: X, 2022, 14: 100297.
- [3] 王正贤. 广西玉林市番石榴果实病害的病原菌鉴定及黑斑病菌的生物学特性研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2021.  
WANG ZX. Identification of pathogens of guava fruit diseases in Yulin City, Guangxi Province and study on biological characteristics of black spot pathogen[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2021 (in Chinese).
- [4] 庄远杯, 魏爱红, 陈堪彬, 张超, 刘付薇, 梁淑荷, 张声源. 番石榴不同部位乙醇提取物的抗氧化、降血糖及酪氨酸酶抑制活性[J]. 食品工业科技, 2022, 43(8): 365-371.  
ZHUANG YH, WEI AH, CHEN KB, ZHANG C, LIU FW, LIANG SH, ZHANG SY. Antioxidant, hypoglycemic activities and inhibitory effect on tyrosinase of ethanol extracts of different parts from *Psidium guajava* L.[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(8): 365-371 (in Chinese).
- [5] 吕冰冰, 谢笔钧, 孙智达. 红肉番石榴果胶的理化特性及其体外降脂作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(20): 51-60.  
LÜ BB, XIE BJ, SUN ZD. Physical and chemical properties of red-flesh guava pectin and its lipid-lowering effect *in vitro*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(20): 51-60 (in Chinese).
- [6] 毕悦, 代红洋, 张兴开, 曹冠华, 贺森. 内生真菌与宿主植物协同调控砷胁迫作用机制研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(6): 2369-2384.  
BI Y, DAI HY, ZHANG XK, CAO GH, HE S. Synergistic mechanism of endophytic fungi and host plants against arsenic stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(6): 2369-2384 (in Chinese).
- [7] SANTOS RMD, DESOIGNIES N, RIGOBELLO EC. The bacterial world inside the plant[J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2022, 6: 83019.
- [8] 郝宝燕, 刘庆旭, 孙敬勇. 番石榴果实的化学成分及药理活性研究进展[J]. 食品与药品, 2022, 24(6): 596-599.  
HAO BY, LIU QX, SUN JY. Advances in chemical constituents and pharmacological activities of *Psidium Guava* fruit[J]. Food and Drug, 2022, 24(6): 596-599 (in Chinese).
- [9] 刘荟娟, 张作军. 番石榴叶活性成分(TFPGL 和 TTPGL)对肥胖和血脂调节的影响[J]. 分子植物育种, 2023, 21(18): 6159-6163.  
LIU HJ, ZHANG ZJ. Effects of guava leaf active ingredients (TFPGL and TTPGL) on obesity and lipid regulation[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(18): 6159-6163 (in Chinese).
- [10] JUMPPONEN A, JONES KL. Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere[J]. New Phytologist, 2009, 184: 438-448.
- [11] PORRAS-ALFARO A, BAYMAN P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes[J]. Annual Review of Phytopathology, 2011, 49: 291-315.
- [12] SURYANARAYANAN TS. The need to study the holobiome for gainful uses of endophytes[J]. Fungal Biology Reviews, 2020, 34(3): 144-150.
- [13] HARTLEY SE, ESCHEN R, HORWOOD JM, GANGE AC, HILL EM. Infection by a foliar endophyte elicits novel arabidopsid-based plant defence reactions in its host, *Cirsium arvense*[J]. New Phytologist, 2015, 205(2): 816-827.
- [14] AMIN N. Endophytic fungi to control of cocoa pod borer (*Conopomorpha cramerella*) on cocoa plantation[J]. Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences, 2016, 7(6): 1496-1501.
- [15] PATHAK P, RAI VK, CAN H, SINGH SK, KUMAR D, BHARDWAJ N, ROYCHOWDHURY R, DE AZEVEDO LCB, KAUSHALENDRA, VERMA H, KUMAR A. Plant-endophyte interaction during biotic stress management[J]. Plants (Basel), 2022, 11(17): 2203.
- [16] LI ZG, XIONG KY, WEN WE, LI L, XU DL. Functional endophytes regulating plant secondary metabolism: current status, prospects and applications[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(2): 1153.
- [17] MIGUEL PSB, MIGUEL FB, MOREIRA BC, DE OLIVEIRA MNV, DELVAUX JC, FREITAS FDS, BORGES AC, COSTA MD. Diversity of the endophytic filamentous fungal leaf community at different development stages of eucalyptus[J]. Journal of Forestry Research, 2018, 30(3): 1093-1103.
- [18] RAI N, KUMARI KESHRI P, VERMA A, KAMBLE SC, MISHRA P, BARIK S, SINGH SK, GAUTAM V. Plant associated fungal endophytes as a source of

- natural bioactive compounds[J]. *Mycology*, 2021, 12(3): 139-159.
- [19] ABDELFATTAH A, WISNIEWSKI M, LI DESTRI NICOSIA MG, CACCIOLA SO, SCHENA L. Metagenomic analysis of fungal diversity on strawberry plants and the effect of management practices on the fungal community structure of aerial organs[J]. *PLoS One*, 2016, 11(8): e0160470.
- [20] POTSHANGBAM M, DEVI SI, SAHOO D, Strobel GA. Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 325.
- [21] BERGNA A, CERNAVA T, RÄNDLER-KLEINE M, GROSCH R, ZACHOW C, BERG G. Tomato seeds preferably transmit plant beneficial endophytes[J]. *Phytobiomes Journal*, 2018, 2(4): 183-193.
- [22] 王景仪, 李梦秋, 李艳茹, 徐玲霞, 曹小迎, 蒋继宏. 药用植物内生真菌的多样性及生物功能研究进展[J]. *生物资源*, 2020, 42(2): 164-172.
- WANG JY, LI MQ, LI YR, XU LX, CAO XY, JIANG JH. Research progress on diversity and biological function of endophytic fungi in medicinal plant[J]. *Biotic Resources*, 2020, 42(2): 164-172 (in Chinese).
- [23] QIN XY, XU J, AN XL, YANG J, WANG Y, DOU MJ, WANG MG, HUANG J, FU YJ. Insight of endophytic fungi promoting the growth and development of woody plants[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2024, 44(1): 78-99.
- [24] JIA M, CHEN L, XIN HL, ZHENG CJ, RAHMAN K, HAN T, QIN LP. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 906.
- [25] ZHIMO VY, KUMAR A, BIASI A, ABDELFATTAH A, SHARMA VK, SALIM S, FEYGENBERG O, BARTUV R, FREILICH S, WHITEHEAD SR. Assembly and dynamics of the apple carposphere microbiome during fruit development and storage[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 928888.
- [26] YE H S, SHIESH CC. The investigation and occurrence of guava disease in central part of Taiwan[C]. *International Symposium on GA3 Tropical Fruit (Guava, Wax Apple, Pineapple and Sugar Apple)*. Kaohsiung, Taiwan, China: 2017: 115-123.
- [27] SOLARTE F, MUÑOZ CG, MAHARACHCHIKUMBURA SSN, ÁLVAREZ E. Diversity of *Neopestalotiopsis* and *Pestalotiopsis* spp., causal agents of guava scab in Colombia[J]. *Plant Disease*, 2018, 102(1): 49-59.
- [28] 郭海霞, 黄雯澜, 王谢, 李谨宵, 王锐, 杨育林, 向成华, 张建华. 炭疽病对油橄榄果实真菌群落结构的影响[J]. *西南农业学报*, 2023, 36(12): 2718-2728.
- GUO HX, HUANG WL, WANG X, LI JX, WANG R, YANG YL, XIANG CH, ZHANG JH. Effects of *Colletotrichum* sp. infection on fungi community of olive fruit[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2023, 36(12): 2718-2728 (in Chinese).
- [29] RÖTTJERS L, FAUST K. From hairballs to hypotheses-biological insights from microbial networks[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2018, 42(6): 761-780.
- [30] GAO C, MONTOYA L, XU L, MADERA M, HOLLINGSWORTH J, PURDOM E, SINGAN V, VOGEL J, HUTMACHER RB, DAHLBERG JA, COLEMAN-DERR D, LEMAUX PG, TAYLOR JW. Fungal community assembly in drought-stressed sorghum shows stochasticity, selection, and universal ecological dynamics[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 34.
- [31] GAZITÚA M C, MORGANTE V, POUPIN M J, LEDGER T, RODRÍGUEZ-VALDECANTOS G, HERRERA C, GONZÁLEZ-CHÁVEZ MDC, GINOCCHIO R, GONZÁLEZ B. The microbial community from the early-plant colonizer (*Baccharis linearis*) is required for plant establishment on copper mine tailings[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 10448.