

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2018.06.003

烤烟烘烤中细菌群落结构的多样性分析^①

赵敏¹, 徐宸¹, 耿莉娜¹, 程廷才²,
王根洪², 汪代斌¹, 夏庆友²

1. 重庆烟草科学研究所, 重庆 400715; 2. 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

摘要: 为了研究烤烟烘烤过程中细菌群落结构的多样性, 以云烟 87 为材料, 采用 Miseq 高通量测序技术, 分析了不同烤房烘烤过程中细菌群落的结构及其变化. 结果表明, A, B, C 3 个烤房的 OTU (Operational Taxonomic Units) 大部分都是共有, B 烤房独有 OTU 较少, C 烤房独有 OTU 较多. 通过分析各样本中细菌群落组成的相似性和差异性发现, 芽孢杆菌 (*Bacillus*) 为 3 个烤房的优势菌群. 部分细菌在烘烤前后物种群落结构差异较大, 如马赛菌属 (*Massilia*)、根瘤菌属 (*Rhizobium*)、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*) 等. 进一步主成分分析显示, 烘烤前期和后期样本有比较明显的不同, 细菌组成差异较大. 该结果为进一步针对性地利用这些优势细菌以提高烘烤烟叶质量奠定了基础.

关键词: 烤烟; 细菌; 烘烤; 群落结构

中图分类号: S182

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)06-0015-09

植物叶面的微生物群落非常多样化, 包括细菌、真菌、酵母等, 这些微生物中的一些可能对植物有害, 被称为病原体, 而其他的可能因促进植物生长和发育对植物有益. 微生物的活动是影响植物生长发育的关键因素^[1-2]. 其中, 细菌是叶面环境中最主要的微生物类群^[3]. 研究发现, 植物叶面细菌能产生激素促进植物生长、有助于减少化肥和农药投入、轻环境污染、对重金属产生耐受性和抗性, 实现农业的可持续发展^[4-7]. 例如: 解淀粉芽孢杆菌在大田条件下对核盘菌引起的茎干枯萎病起到良好防治作用^[8]; 苏云金芽孢杆菌也是植物叶际附生菌, 可以保护植物免受草食昆虫的侵害^[9]; 菌株 D5/23T 是一种很好的促植物生长菌, 能产生植物生长激素和细胞激动素, 并且能固定大气中的氮气, 促进植物根和茎干生长, 最终使不同的作物增加产量^[10-12].

烟草作为经济作物和模式植物, 叶面存在大量的微生物, 这些菌群影响着烟草整个生育时期及后期的烘烤调制过程, 对烟草品质的形成有着重要作用^[13-15]. 而调制是烤烟生产中的重要环节. 微生物在鲜烟叶调制过程中对烟叶产品的形成及其品质产生了不同的作用. 其中, 细菌作为烤烟调制中的主要微生物

① 收稿日期: 2017-11-17

基金项目: 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2017jcyjAX0334); 重庆市烟草专卖局科技项目(NY20150601070012); 重庆中烟工业有限责任公司科技项目(130580).

作者简介: 赵敏(1981-), 女, 高级农艺师, 博士, 主要从事微生物与烟叶品质等方面的研究.

物,研究者对其在烘烤过程中的作用进行了研究.研究发现,不同部位烟叶烘烤过程中的优势微生物种类不完全相同,优势细菌属 11 种,其中棒杆菌属(*Corynebacterium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Arthrobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)出现频率最高^[16].烟叶在烘烤进程中,细菌种类一直在减少,从烘烤开始到结束,减少 10~100 倍^[17-18].不同烘烤方式和烘烤条件下,细菌总量在烤烟烘烤开始后逐渐增多,到 48 h 时烟叶变黄前后达到最大,细菌种类随烘烤时间的增加而减少^[19].某些微生物在烘烤过程中对烟叶的腐烂和烟叶有害成分含量的消长等方面有重要影响^[16,20-21].微生物在烟草烘烤阶段对烟叶中烟碱含量有一定的降解^[22-24].到目前为止,大多数的研究都是关于发酵过程中的微生物,对于调制过程中的微生物,特别是细菌研究较少.对于调制过程中不同阶段细菌种属的多样性分析,能更好地促进有益细菌的利用,以用于烟草叶片的品质提高.然而前人分析微生物多样性的方法一般采用微生物平板纯培养方法、微平板分析方法、磷脂脂肪酸法以及 DGGE 等分子生物学方法,传统的方法只能分析可培养微生物,且存在误差,操作繁琐.

高通量测序技术对 16S rDNA/18S rDNA/ITS 等序列进行测序,能同时对样品中的优势物种、稀有物种及一些未知的物种进行检测,获得样品中的微生物群落组成以及相对丰度,在植物、土壤、肠道中广泛应用^[25-28].本实验利用高通量测序技术对烘烤中烟叶细菌群落结构的多样性进行分析,旨在准确检测调制不同阶段细菌的种类.

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 试剂

AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒(Axygen 公司); QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统(Promega 公司); TruSeq™ DNA Sample Prep Kit, OMEGA-soil DNA Kit(Omega Bio-Tek 公司); agarose gels(bio-west 公司); FastPfu Polymerase(Trans Gen 公司); TruSeq™ DNA Sample Prep Kit(Illumina 公司).

1.1.2 仪器

PCR 仪(ABI GeneAmp® 9700 型); 高速台式冷冻离心机(Eppendorf 公司); 电泳仪(北京市六一仪器厂); MISEQ 测序仪(Illumina 公司); HISEQ 测序仪(Illumina 公司); 酶标仪(Biotek 公司); 微型荧光计(Turner Bio Systems 公司); Covaris M220(Gene Company Limited 公司); 旋涡混合器(海门其林贝尔仪器制造有限公司); 粉碎研磨仪(上海万柏生物科技有限公司).

1.2 方法

1.2.1 烟叶样本采集

在重庆市彭水烟叶基地单元种植云烟 87. 烟叶成熟采收后,选择质量较好、无病害的中部烟叶.选好烟叶后统一编杆,分别放置于不同的 3 个烤房(分别命名 A, B, C 烤房).然后分别在成熟采收(0 h)、变黄阶段的变黄前期(A, B, C 烤房取样时间: 16 h, 18 h, 17 h)、叶片变黄期(A, B, C 烤房取样时间: 33 h, 41 h, 29 h)、支脉变黄期(A, B, C 烤房取样时间: 52 h, 66 h, 41 h)、定色阶段的主脉变黄期(A, B, C 烤房取样时间: 77 h, 77 h, 65 h)、香气物质合成期转火节点(A, B, C 烤房取样时间: 105 h, 94 h, 116 h)取样.

1.2.2 DNA 抽提和 PCR 扩增

根据 E. Z. N. A. ® soil 试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U. S.)说明书进行总 DNA 抽提, DNA 浓

度和纯度利用 NanoDrop2000 进行检测, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量; 用 338F(5'-ACTC-CTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 引物对 V3-V4 可变区进行 PCR 扩增, 扩增程序: 95 °C 预变性 3 min, 27 个循环(95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 最后 72 °C 延伸 10 min (PCR 仪: ABI GeneAmp® 9700 型). 扩增体系为 20 μ L, 4 μ L 5 \times FastPfu 缓冲液, 2 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 0.8 μ L 引物(5 μ mol/L), 0.4 μ L FastPfu 聚合酶; 10 ng DNA 模板.

1.2.3 Illumina Miseq 测序

使用 2% 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物, 利用 AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences, Union City, CA, USA) 进行纯化, Tris-HCl 洗脱, 2% 琼脂糖电泳检测. 利用 QuantiFluor™-ST (Promega, USA) 进行检测定量. 根据 Illumina MiSeq 平台 (Illumina, San Diego, USA) 标准操作规程将纯化后的扩增片段构建 PE 2 \times 300 的文库.

构建文库步骤: 1) 连接“Y”字形接头; 2) 使用磁珠筛选去除接头自连片段; 3) 利用 PCR 扩增进行文库模板的富集; 4) 氢氧化钠变性, 产生单链 DNA 片段. 利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序.

1.2.4 数据处理与分析

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件质控, 使用 FLASH 软件进行拼接:

1) 设置 50 bp 的窗口, 如果窗口内的平均质量值低于 20, 从窗口开始截去后端碱基, 去除质控后长度低于 50 bp 的序列;

2) barcode 需精确匹配, 引物允许 2 个碱基的错配, 去除模糊碱基;

3) 根据重叠碱基 overlap 将两端序列进行拼接, overlap 需大于 10 bp. 去除无法拼接的序列.

使用的 UPARSE 软件 (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>), 根据 97% 的相似度对序列进行 OUT (Operational Taxonomic Units) 聚类; 使用 UCHIME 软件剔除嵌合体. 利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>) 对每条序列进行物种分类注释, 比对 Silva 数据库 (SSU123), 设置比对阈值为 70%.

2 结果与讨论

2.1 物种丰富度和多样性

利用 Miseq 测序, 分析了 A, B, C 3 个烤房, 6 个时间点 (包含 3 个重复, 烘烤前期为取样点 1, 2, 3, 烘烤后期为取样点 4, 5, 6) 共 54 个样本的细菌群落结构. 首先, 我们获得了 3 个烤房取样样本的测序条数 (表 1). 结果显示, 从各个烤房的前、后期来看, 后期 OTU 总量和丰富度指数有增高, 多样性指数也增高.

表 1 3 个烤房烘烤前、后期样本丰富度和多样性指数

样本	ace	chao	shannon	simpson	OTU
A 烤房烘烤前期	66	66	1.60	0.38	41
A 烤房烘烤后期	79	63	2.11	0.24	46
B 烤房烘烤前期	58	48	1.32	0.46	33
B 烤房烘烤后期	56	45	1.85	0.30	36
C 烤房烘烤前期	68	57	1.85	0.33	40
C 烤房烘烤后期	65	62	2.39	0.21	51

稀释曲线主要利用各样本的测序量在不同测序深度时的微生物多样性指数构建曲线, 以此反映各样本

在不同测序数量时的微生物多样性. 选择 97% 相似度的 OTU 或其他分类学水平, 利用 mothur 计算不同随机抽样下的多样性指数, 利用 R 语言工具制作曲线图(图 1), 从稀释曲线可以看出, 按照测序数据量, 已达到平台期, 在此测序量下可以相对真实地反映菌群结构.

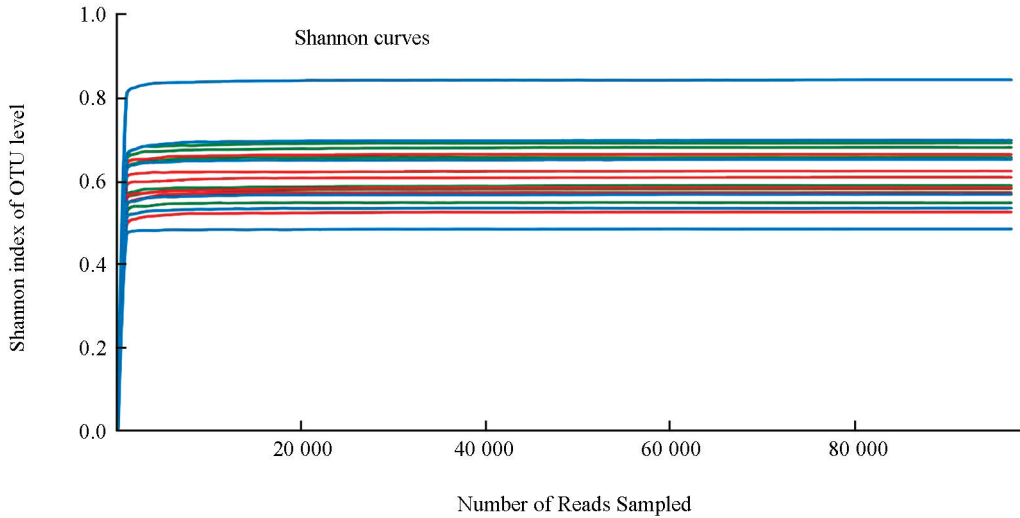


图 1 3 个烤房样本的稀释曲线图

2.2 Venn 图比较

在 OTU 分析的基础上, 选取相似水平为 97% 的 OTU 进一步进行了物种组成分析. 通过利用 Venn 图展现 A, B, C 3 个烤房共有和独有的物种数目, 直观展现不同烤房调制过程中烟叶的物种数目组成相似性及重叠情况. 结果显示, A, B, C 3 个烤房的 OTU 大部分都是共有的, 其中 B 烤房独有 OTU 较少, C 烤房独有 OTU 较多(图 2).

2.3 细菌群落结构比较

根据分类学分析结果, 可以得知 3 个烤房在调制过程中各个烟叶样本在各分类水平上的群落结构组成情况. 根据分析结果, 可以获得各样本

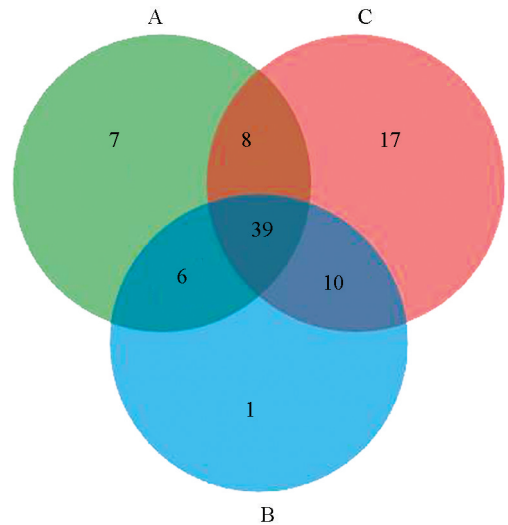


图 2 物种 Venn 图分析

在某一分类学水平上含有何种细菌, 以及烟叶样本中各细菌的相对丰度. 结果显示, 在 3 个烤房中, 主要的属为芽孢杆菌属(*Bacillus*) (占比 50%), 其次为乳球菌属(*Lactococcus*) 和肠杆菌属(*Enterobacter*). 从图 3 中看出优势的物种百分比相差不大, 其中肠杆菌属在 B 烤房样本中比例比另外 2 个高(图 3).

根据物种或样本间丰度的相似性进行聚类, 并将结果呈现在群落 heatmap 图上(图 4), 可使高丰度和低丰度的物种分块聚集, 通过颜色变化与相似程度来反映不同样本在各分类水平上群落组成的相似性和差异性. 通过分析发现, 样本分成 3 类, 如图 4 上绿色框所示, 一个框为一类; 主要有两类, 一类包含的是前期的 3 个烤房样本, 一类是后期的 3 个烤房样本; 前期、后期主要在红色框中物种差异较大, 如马赛菌属(*Massilia*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*) 等.

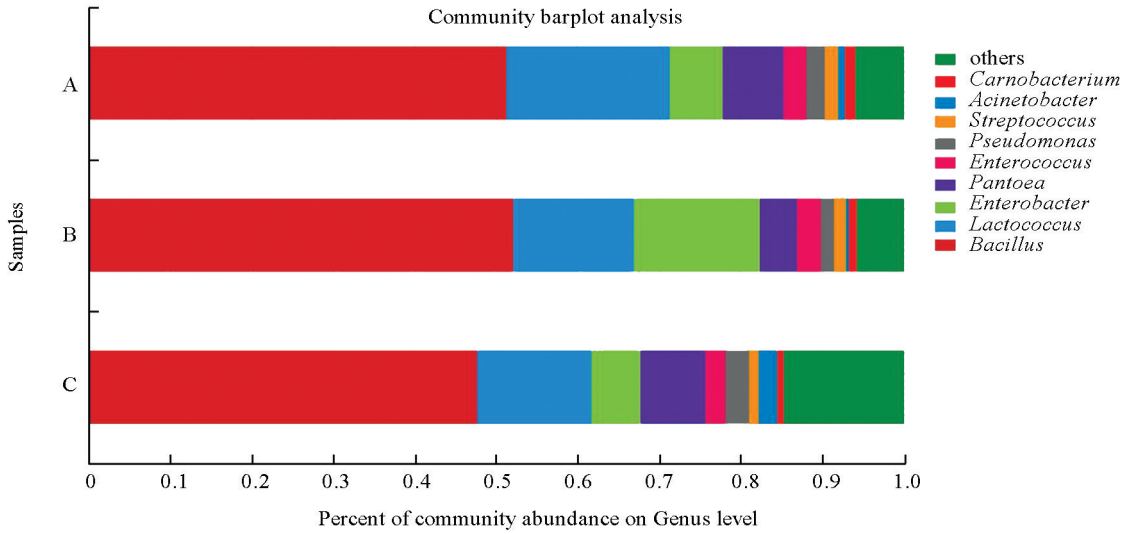
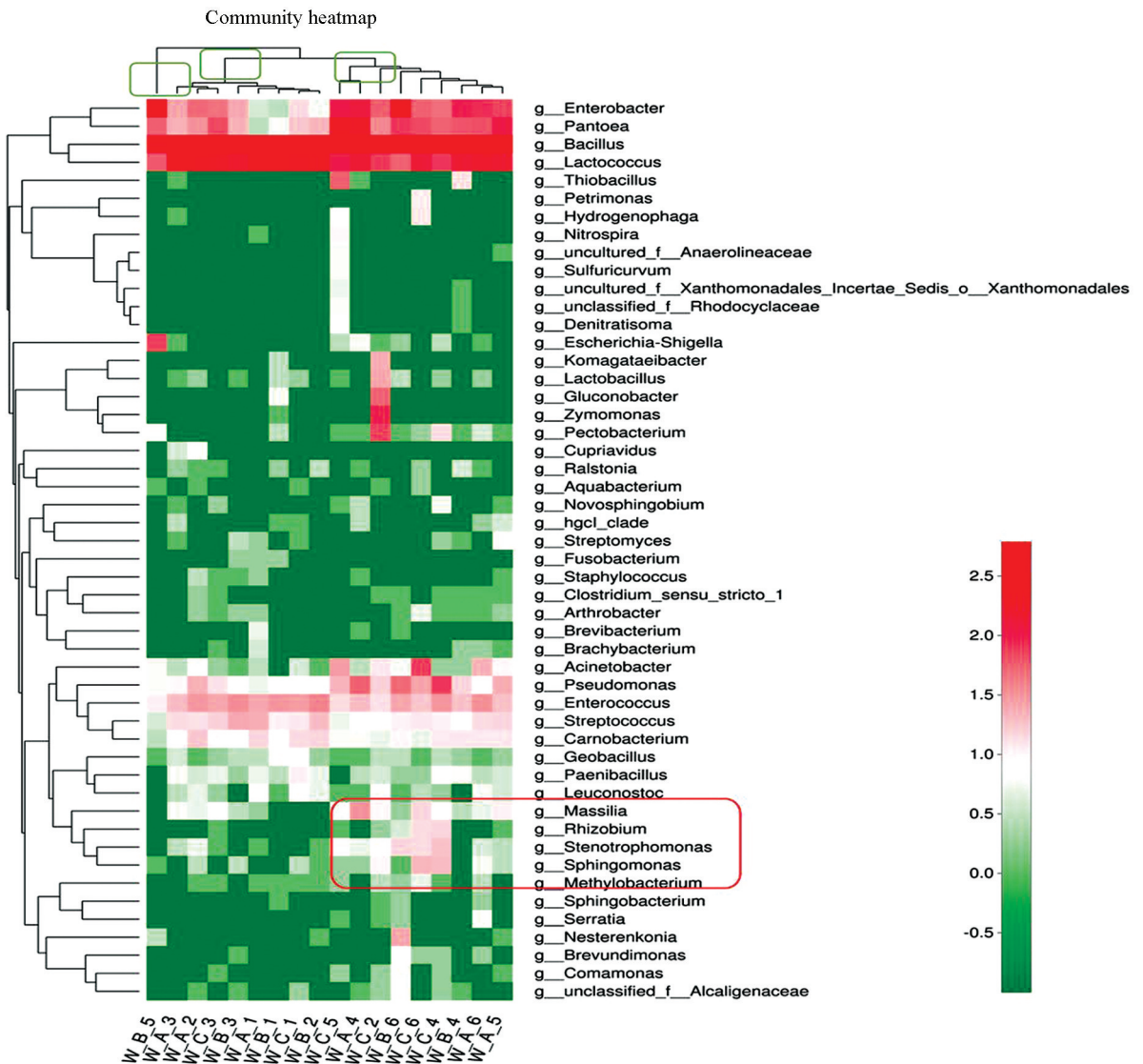


图 3 A,B,C 3 个烤房调制中烟叶细菌群落的相对丰度



物种聚类方式为 average; 样本间聚类方式为 complete; 丰度前 50 的属进行作图。

图 4 群落 Heatmap 图

2.4 主成分分析

在物种组成分析的基础上,可以利用主成分分析(PCA 分析)来比较确定影响细菌差异的因素,样本物种组成越相似,反映在 PCA 图中的距离越近.通过分组,将烘烤前期分为一组,烘烤后期分为一组.分析结果显示,烘烤前期样本聚集在一起,烘烤后期样本聚集在一起,有比较明显的区分,前期和后期细菌组成差异明显(图 5).

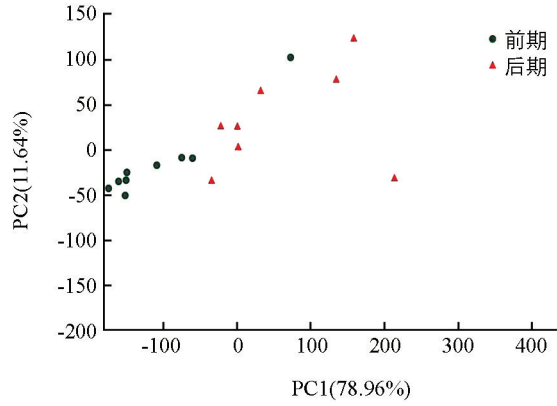


图 5 PCA 分析结果图

利用组间比较分析,根据 PCA 得出的结果,分析在主要影响因素下的差异物种.对前、后期两组进行 wilcoxon 秩和检验差异分析门和属水平,10 个门中差异有统计学意义的为硬壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria),且后期 Firmicutes 下降,Proteobacteria 上升.丰度前 15 的属中差异显著的为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)等(图 6,图 7).

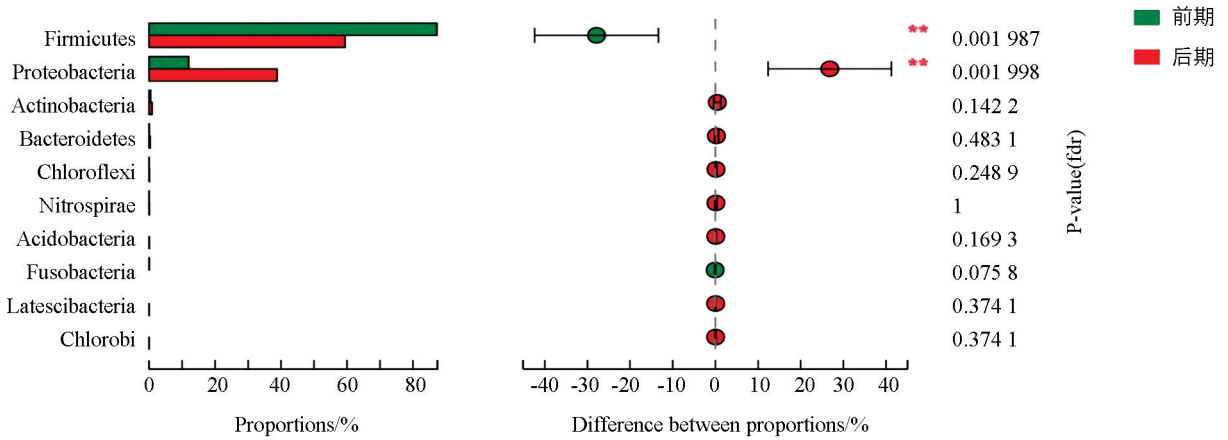


图 6 组间差异物种门水平分析

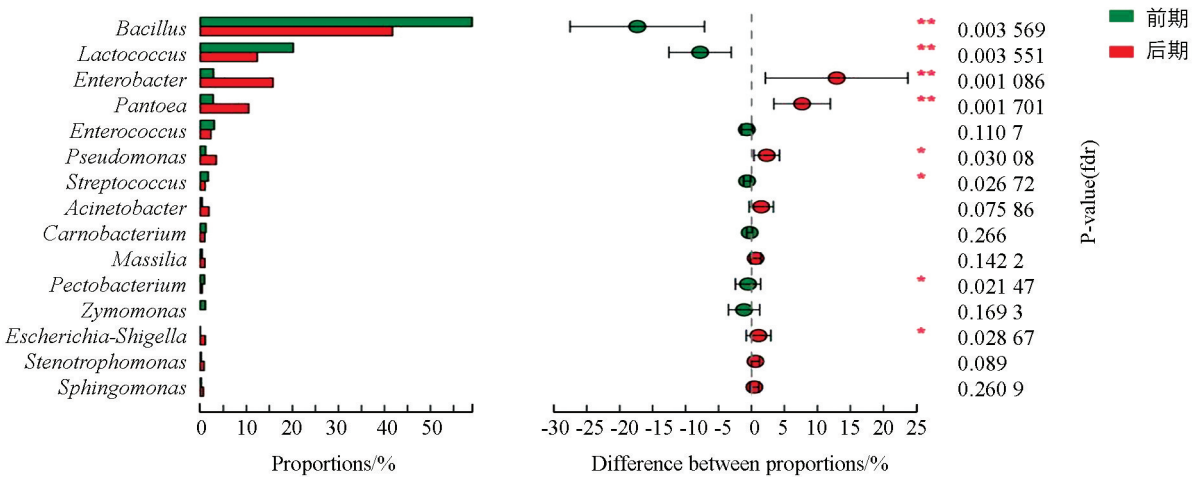


图 7 组间差异物种属水平分析

3 小 结

植物叶片上生存着大量不同性质的微生物,包括有益和有害微生物,它们与植物长期共同生存,组成了独特的微生物群落,形成植物微生物生态体系.许多研究证实,植物体内外的大量微生物与植物生长发育、植物抗性密切相关^[4-6].前人关于微生物的鉴定分析多采用传统培养方法^[29].近年来,高通量测序在微生物多样性分析上得到了广泛的应用^[25-28].该技术相较于传统的纯培养方法及以16S rDNA为基础的非培养方法,能够产生覆盖深度更大的数据量,检测到纯培养和非纯培养技术未能发现的低丰度植物细菌种类,为丰富植物微生态学理论及基因工程菌的研究奠定基础^[30].

烟草是我国重要的经济作物和模式植物,在烟叶生长过程中,环境中的微生物与烟草形成了植物-微生物共生体系^[1].调制是烤烟生产中的重要环节,其中烟叶细菌的活动对烤烟调制过程和烟叶品质的形成有重要影响^[19].为了快速、准确地分析烘烤过程中优势或致病细菌种群,本研究采用高通量测序,分析烘烤过程烟叶中细菌的群落结构.分析结果显示,在3个烤房中,芽孢杆菌属(*Bacillus*)占绝对优势.已有研究表明,芽孢杆菌是一种较为理想的生防微生物,易从土壤和植株中分离得到.目前,用于防治植物病害的芽孢杆菌主要有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、侧孢芽孢杆菌(*B. laterosporus*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)^[31, 32]等.进一步分析发现,烘烤前期和烘烤后期细菌组成差异明显,根瘤菌(*Rhizobium*)主要跟植物病害生物防治相关^[33],而寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)与植物的联系也非常密切,能降解有机农药和高分子有机污染物^[34-35],鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)还能在根际分泌糖类营养物供植物吸收^[36],接种该菌可提高植株高度,增强果实干质量,进而促进植物生长^[37].这些菌群的变化可能是由于烟叶在烘烤过程中,烘烤后期较前期内部物质发生了剧烈的变化而引起的.本研究利用高通量测序,全面分析了调制过程中烟叶细菌的群落结构,为进一步针对性地利用这些优势细菌以提高烘烤烟叶质量奠定了基础.

参考文献:

- [1] 雷丽萍,郭荣君,缪作清,等.微生物在烟草生产中应用研究进展[J].中国烟草学报,2006,12(4):47-51.
- [2] 白洋,钱景美,周俭民,等.农作物微生物组:跨越转化临界点的现代生物技术[J].中国科学院院刊,2017,32(3):260-265.
- [3] 厉昌坤.自然陈化过程中烤烟叶面微生物变化及应用研究[D].北京:中国农业科学院,2008.
- [4] OMER Z S, TOMBOLINI R, GERHARDSON B. Plant Colonization by Pink-Pigmented Facultative Methylophilic Bacteria (PPFMs) [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 47(3): 319-326.
- [5] SANDHU A, HALVERSON L J, BEATTIE G A. Bacterial Degradation of Airborne Phenol in the Phyllosphere [J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(2): 383-392.
- [6] 潘建刚,呼庆,齐鸿雁,等.叶际微生物研究进展[J].生态学报,2011,31(2):583-592.
- [7] 江春玉.植物促生细菌提高植物对铅、镉的耐受性及富集效应研究[D].南京:南京农业大学,2008.
- [8] FERNANDO W G D, NAKKEERAN S, ZHANG Y, et al. Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on Canola Petals [J]. Crop Protection, 2007, 26(2): 100-107.
- [9] SMITH R A, COUCHE G A. The Phylloplane as a Source of *Bacillus thuringiensis* Variants [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1991, 57(1): 311-315.
- [10] RUPPEL S, HECHT-BUCHHOLZ C, REMUS R, et al. Settlement of the Diazotrophic, Phytoeffective Bacterial Strain

- Pantoea Agglomerans on and Within Winter Wheat: An Investigation Using ELISA and Transmission Electron Microscopy [J]. *Plant and Soil*, 1992, 145(2): 261–273.
- [11] RUPPEL S, MERBACH W. Effect of Ammonium and Nitrate on $^{15}\text{N}_2$ -Fixation of *Azospirillum* spp. and *Pantoea Agglomerans* in Association with Wheat Plants [J]. *Microbiological Research*, 1997, 152(4): 377–383.
- [12] SCHOLZ C, REMUS, R, ZLELKE, R. Development of DAS-ELISA for Some Selected Bacteria from the Rhizosphere [J]. *Zbl Mikrobiol*, 1991, 146: 197–207.
- [13] 李梅云. 微生物改善烟叶品质研究进展 [J]. *工业微生物*, 2006, 36(3): 43–48.
- [14] 周芳芳, 周丽娟, 詹 军, 等. 烟草功能菌的研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2013, 42(12): 6–10, 15.
- [15] 刘建军. 微生物肥料对烟叶品质的影响 [J]. *重庆与世界*, 2016(11): 32–34, 51.
- [16] 宫长荣, 程 龙, 宋朝鹏, 等. 烤烟烘烤过程中微生物的动态变化 [J]. *中国烟草科学*, 2010, 31(1): 44–46, 52.
- [17] MORIN A, PORTER A, RATAVICIUS A, et al. Evolution of Tobacco-Specific Nitrosamines and Microbial Populations During Flue-Curing of Tobacco Under Direct and Indirect Heating [J]. *Beiträge Zur Tabakforschung*, 2004, 21(1): 40–46.
- [18] 姚 恒. 烘烤对烟叶微生物种群的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(29): 16166–16168.
- [19] 张树堂, 祝明亮, 杨雪彪. 烘烤方式及烘烤条件对烤烟烘烤中细菌变化的影响 [J]. *烟草科技*, 2001(4): 42–43.
- [20] 祝明亮. 烟草调制期间微生物研究进展 [J]. *微生物学通报*, 2008, 35(8): 1278–1281.
- [21] WIERNIK A, CHRISTAKOPOULOS A, JOHANSSON L, et al. Effect of Air-Curing on the Chemical Composition of Tobacco [J]. *Recent Advances in Tobacco Science*, 1995(21): 39–80.
- [22] 张彦东, 罗昌荣, 王辉龙, 等. 微生物降解烟碱研究应用进展 [J]. *烟草科技*, 2003(12): 3–7.
- [23] GEISS V L, GREGORY C F, NEWTON R P, et al. Process for Reduction of Nicotine Content of Tobacco by Microbial Treatment: 4140136 [P]. United States Patent, 1979.
- [24] ENGLISH C F, BELL E J, BERGER A J. Isolation of Thermophiles from Broadleaf Tobacco and Effect of Pure Culture Inoculation on Cigar Aroma and Mildness [J]. *Applied Microbiology*, 1967, 15(1): 117–119.
- [25] LI L, SU Q, XIE B, et al. Gut Microbes in Correlation with Mood: Case Study in a Closed Experimental Human Life Support System [J]. *Neurogastroenterology and Motility*, 2016, 28(8): 1233–1240.
- [26] CAI Zhi-qiang, MA Jiang-tao, WANG Jing, et al. Impact of the Novel Neonicotinoid Insecticide Paichongding on Bacterial Communities in Yellow Loam and Huangshi Soils [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(6): 5134–5142.
- [27] ZHU Ying, LV Guang-chao, CHEN Ying-long, et al. Inoculation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi with Plastic Mulching in Rainfed Wheat: A Promising Farming Strategy [J]. *Field Crops Research*, 2017, 204: 229–241.
- [28] WANG Yao-yue, CAO Ping-hua, WANG Lei, et al. Bacterial Community Diversity Associated with Different Levels of Dietary Nutrition in the Rumen of Sheep [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(9): 3717–3728.
- [29] 徐淑霞, 靳 赛, 吴 坤, 等. 小麦表面微生物多样性研究 [J]. *粮食储藏*, 2004, 33(6): 41–43.
- [30] 陈泽斌, 李 冰, 王定康, 等. Illumina MiSeq 高通量测序分析核桃内生细菌多样性 [J]. *江苏农业学报*, 2015, 31(5): 1129–1133.
- [31] WICHITRA L, PUNPEN H, SAMERCHAI C. Growth Inhibitory Properties of *Bacillus subtilis* Strains and Their Metabolites Against the Green Mold Pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of Citrus Fruit [J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, 48(1): 113–121.
- [32] SWAIN M R, RAY R C. Biocontrol and other Beneficial Activities of *Bacillus subtilis* Isolated from Cowdung Microflora [J]. *Microbiological Research*, 2009, 164(2): 121–130.

- [33] 王媛媛, 段玉玺, 陈立杰. 根瘤菌在植物病害生物防治中的作用 [C]. 中国植物病理学会 2007 年学术年会论文集, 2007: 398—403.
- [34] 王昀璐, 花日茂, 唐欣昀. 寡养单胞菌在环境保护中的应用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(28): 15796—15797, 15800.
- [35] 胡 杰, 何晓红, 李大平, 等. 鞘氨醇单胞菌研究进展 [J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(3): 431—437.
- [36] TAKEUCHI M, SAKANE T, YANAGI M, et al. Taxonomic Study of Bacteria Isolated from Plants: Proposal of *Sphingomonas rosa* sp. nov., *Sphingomonas pruni* sp. nov., and *Sphingomonas mali* sp. nov [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(2): 334—341.
- [37] ADHIKARI T B, JOSEPH C M, YANG G, et al. Evaluation of Bacteria Isolated from Rice for Plant Growth Promotion and Biological Control of Seedling Disease of Rice [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(10): 916—924.

Diversity Analysis of Bacterial Community Structure in the Curing Process of Flue-Cured Tobacco

ZHAO Min¹, XU Chen¹, GENG Li-na¹, CHENG Ting-cai²,
WANG Gen-hong², WANG Dai-bin¹, XIA Qing-you²

1. Chongqing Tobacco Science Research Institute, Chongqing 400715, China;

2. State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to study the diversity of bacterial community structure in the curing process of flue-cured tobacco, Miseq high-throughput sequencing was performed on the tobacco variety Yunyan 87. The results showed that most of the OUT (operational taxonomic units) in flue-curing rooms A, B and C shared similar characteristics. Of the three flue-curing rooms, flue-curing room B had the fewest unique OTU, while flue-curing room C had the most. Analysis of the similarities and differences among the bacterial population in various samples revealed that *Bacillus* was the dominant bacteria in flue-curing rooms A, B and C. Some bacteria, such as *Marseille* sp., *Rhizobium*, *Stenotrophomonas* and *Sphingomonas*, showed considerable differences in their community structure during the early and the late curing stages. Principal component analysis showed that the bacterial composition of the samples in the early and the late stages was obviously different. The above results have laid a foundation for improving the quality of flue cured tobacco leaves with these dominant bacteria.

Key words: flue-cured tobacco; bacteria; flue-cure; community structure

