DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2024.01.006

重庆烟区“K326”烟草品种靶斑病发生的叶际微生态因子分析

肖庆礼[1]，　董晏伶[2]，　彭奎[1]，　袁明[1]，　谭奇忠[1]，
肖庆驹[2]，　刘慧迪[2]，　杨亮[2]

1. 重庆中烟工业有限责任公司，重庆 400060；
2. 西南大学 植物保护学院，重庆 400715

摘　要：为明确烟草靶斑病在重庆烟区“K326”烟草品种上对叶际微生物群落结构的影响，在重庆市酉阳县分别采集移栽 40 d、60 d、80 d 和 100 d 后具有烟草靶斑病与健康的烟叶样品，采用高通量测序方法分析样品中细菌群落结构，并结合烟株生长期气象因子和病害发生情况进行分析. 移栽后 40 d 靶斑病开始发生，且发病率和病情指数呈上升趋势，移栽后 60～80 d 为发病高峰期. 发病叶中叶际细菌优势菌门为变形菌门和厚壁菌门，优势菌属为假单胞菌属、微小杆菌属等. 健康叶叶际细菌的优势菌门分别为蓝藻门、放线菌门、拟杆菌门等，优势菌属为不动杆菌属、微小杆菌属、芽孢杆菌属、泛细菌属等. 健康叶的整体群落丰度大于发病叶，移栽 40 d、60 d 和 100 d 后采集样品的发病叶与健康叶叶际细菌群落结构比较差异具有统计学意义. 靶斑病发生较重情况下，发病叶与健康叶叶际细菌群落结构上差异具有统计学意义，提示靶斑病的发生影响了叶际细菌群落结构.

关　键　词：烟草靶斑病；叶际微生物；高通量测序；群落结构

中图分类号：S432.4　　**文献标志码：**A

文 章 编 号：2097－1354(2024)01－0053－11

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Analysis of the Microecological Factors of Target Leaf Spot of Tobacco Variety ‘K326’ in Chongqing Tobacco Area

XIAO Qingli[1]，　DONG Yanling[2]，　PENG Kui[1]，
YUAN Ming[1]，　TAN Qizhong[1]，　XIAO Qingju[2]，

收稿日期：2023－12－18
基金项目：重庆中烟工业有限责任公司科技项目(YL202203，YL202201).
作者简介：肖庆礼，博士，高级农艺师，主要从事烟草健康栽培等方面的研究.

LIU Huidi[2], YANG Liang[2]

1. China Tobacco Chongqing Industrial Co. Ltd, Chongqing 400060, China;

2. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to determine the key factors and microbial structure of the leaf microenvironment of tobacco target spot disease in 'K326' tobacco variety in Chongqing tobacco region, 'K326' tobacco variety was taken as experimental materials. Samples of diseased and healthy leaves of tobacco plants were collected in Youyang County, Chongqing at 40 d, 60 d, 80 d and 100 d after transplanting. The bacterial community structure in the leaves was analyzed by high-throughput sequencing method, and the climatic factors and disease occurrence during the growth period of tobacco plants were analyzed. At 40 days after transplantation, the onset of target spot disease was observed, exhibiting an upward trend in both disease incidence and severity index, and the period between 60 and 80 days after transplantation was identified as the peak phase of disease incidence. The dominant bacteria in the diseased leaf boundary were Proteobacteria and Thick-walled Bacteria. The dominant bacteria were *Panbacterial*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *etc*. The dominant phyla of the healthy leaf boundary bacteria were: Thickwallida, Cyanophyta, Actinomyceta, Bacteroides, etc. The dominant genera were *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Microbacterium*, *Bacillus*, *Pantobacterium etc*. The overall community richness of healthy leaves was greater than that of diseased leaves. The bacterial community structure of diseased leaves and healthy leaves collected on the 40, 60 and 100 days after transplanting was significant different. In the case of severe target spot disease, there were significant differences in the bacterial community structure between the diseased leaves and the healthy leaves.

Key words: tobacco target spot; foliar microorganisms; high throughput sequencing; community structure

烟草靶斑病(Tobacco Target Spot)是由立枯茄丝核菌 AG-3(*Rhizoctonia solani* AG-3)引起的真菌性病害. 病原菌主要为害烟草叶片，形成褪绿病斑，直至坏死部分穿孔[1]. 该病害侵染发生面积较大，流行快，极大程度地影响烤烟的产量和质量[2]. 烟草靶斑病在世界多个国家和地区均有发生，危害严重且难防难治. 近年来，烟草靶斑病在我国多地均有报道[3]，其中云南、四川和湖南等烟区较为突出[4-6]，给当地烟叶生产带来巨大的经济损失. 研究报道，烟草叶斑类病害的发生与叶际微生物群落结构的稳定性密切相关[7]. 叶际是微生物群落的栖息地，叶际微生物是植物生态系统的重要组成部分. 有益微生物直接作用于病原菌及其他叶际微生物，或者在植物叶际定殖并改变微生物群落结构，起到控制病害的作用[8]. 叶际微生物具有潜在的植物生态系统功能，能够通过拮抗、竞争及诱导植物系统抗性等作用保护宿主免受病原体的侵染，以及产生植物激素促进植物生长. 此外，叶际病原菌的过度生长或微生物多样性的丧失也会导致生态失调致使植株发病[9]. Vorholt[10]的研究发现，植物感病后叶际微生物群落结构与多样性均会发生变化. 刘亭亭等[11]报道了在 3 种不同成熟度烟叶叶际细菌中，未熟烟叶的变形菌门相对丰度最高，且显著高于适熟烟叶. 罗路云等[12]研究发现，3 个不同发病等级的南瓜白粉病叶片在细菌群落结构存在显著差异.

重庆植烟区气候总体特征为温度适宜，降水量偏高[13]，利于靶斑病发生，重庆烟区靶斑病呈逐年加重趋势. 为明确重庆烟区"K326"品种靶斑病发生的叶际微生态因子，本研究采集"K326"品种严重发生的靶斑病样品及健康样品进行微生物测序，从而明确影响重庆烟区

“K326”品种靶斑病发生的叶际微生态关键因子，以为“K326”靶斑病的防控提供科学依据.

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试品种为“K326”烟草品种.

1.2　试验地点

重庆市酉阳县李溪基地单元(108°23′E，29°0′N，海拔 930.4 m)，选取烟草靶斑病发生严重的烟田和健康烟田作为取样地.

1.3　试验方法

1.3.1　取样方法

在酉阳县李溪基地单元设置烟草靶斑病发生地和健康地的取样点，分别于移栽后 40 d，60 d，80 d，100 d 采集发病叶和健康叶. 在大田时期，选取长势一致的烟株进行采样，取中上部叶片，大小一致为佳，所采烟叶叶面和叶背无明显的杂物(泥土、虫)，且避免在雨后或雨天采样，每株采摘 1 片，取 15 株，每 3 片烟叶为 1 个重复，共取 5 个重复，平铺装入无菌均质采样袋中，叶片需平展放置，不能挤压或折叠样品，避免引起损失，影响烟叶保鲜和后期微生物提取，用油性记号笔或标签纸在袋上做好标记，并在记录采样信息后，迅速放入 4～10 ℃冰盒中低温运送或保存时间不宜超过 36 h.

1.3.2　气候因子调查

在重庆市酉阳县李溪基地单元内调查、记录烟草生育期的气候因子，重点调查温度、湿度、降雨情况等气象信息.

1.3.3　病害调查

按照《烟草病虫害分级及调查方法》(GB/T 23222—2008)调查病害发生情况. 结合当地的病害发生特点，主要对靶斑病发病取样地点进行系统调查，调查烟株的发病叶片数及发病级数，并计算发病率. 根据靶斑病的发生情况，在发病初期开始调查，每隔 5 d 调查 1 次，连续调查 5 次以上. 按公式(1)计算发病率，按公式(2)计算病情指数.

$$\text{发病率}(\%)=\text{发病叶数}/\text{调查总叶片数}\times 100\% \quad (1)$$

$$\text{病情指数}=\sum(\text{各级病叶数}\times\text{各级代表值})/(\text{调查总叶数}\times\text{最高级代表值})\times 100 \quad (2)$$

1.3.4　叶际微生态研究

1)烟草叶际微生物分离和提取. 对烟叶样本进行称量，记录烟叶鲜重，若叶片有发黑、发黄、采样袋内有明显有色液体，则该样本视为无效样本，需舍去，每克样本加入 10 mL 磷酸钾缓冲液(PBS)，根据计算结果向无菌均质袋中加入相应 PBS 提取叶际微生物，使 PBS 缓冲液均匀润湿烟叶 1 min，超声洗涤 1 min，来回震荡 30 s，叶面重复 2 次，叶背 1 次，每个样本取 2 个重复，将洗涤液分装至 50 mL 离心管中，13 000 g 离心 10 min，去除上清液，收集沉淀，涡旋沉淀使其重悬，保留 1 mL 微生物菌悬液，将两个重复沉淀混合(2 mL)；离心去上清液(1 mL)，菌悬液液氮速冻后，转移至－80 ℃冰箱保存.

2)叶际微生物基因组 DNA 提取及高通量测序. 提取叶际总 DNA，并采用 DGGE、16S rDNA、ITS 等技术对叶际微生物结构多样性进行检测. 将细菌的 PCR 产物进行 Illumina MiSeq 测序，通过对原始测序数据的拆分、质控拼接、数据优化和降噪处理(序列降噪方法 DADA2/

Deblur)，以获得样本中真实的序列信息 ASV(Amplicon Sequence Variant)，利用 Qiime 2 平台(http://qiime.org/scripts/assign_taxonomy.html)，采用 RDP classifier 贝叶斯算法(Version 2.2，http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/)对 97%相似水平的 ASV 代表序列进行分类学分析，细菌测序数据注释运用 Silva 数据库(Release128，http://www.arb-silva.de)，真菌测序数据注释运用 Unite 数据库(Release 6.0，http://unite.ut.ee/index.php). 基于 ASV 代表序列信息和丰度信息，进行后续的物种分类学分析、群落多样性分析、物种组成分析. 采用 classify-sklearn(Naive Bayes)、classify-consensus-vsearch(Vsearch)、classify-consensus-blast(Blast)或 RDP classifier 贝叶斯算法对 ASV 代表序列进行分类学分析，获得 ASV 在分类水平：Domain(域)，Kingdom(界)，Phylum(门)，Class(纲)，Order(目)，Family(科)，Genus(属)，Species(种)的注释信息. 基于注释的 ASV 代表序列分类信息和用于物种的丰度信息，进行后续的物种分类学分析、群落多样性分析和物种组成分析.

计算 Chao1 指数、Shannon 指数来反应样本 Alpha 多样性，从而确定样本内微生物的物种丰富度；运用 Bray-Curtis 不相似性聚类分析和主坐标分析(PCoA)对样品进行聚类来反应样本 Beta 多样性，从而确定微生物在种类上的差异.

1.4 数据处理与统计学分析

使用 Excel 2016 整理汇总数据，使用 IBM SPSS Statistics 23 进行方差分析以及显著性检验($p<0.05$)，使用 Origin 2017 和 GraphPad Prism 9 绘图.

2 结果与分析

2.1 气候象因子变化特征

重庆市酉阳县气温实时记录情况如图 1 所示，4 月 23 日进行移栽后有持续一周的低温天气，随后一周温度持续上升，一周后又保持 25 ℃以下低温且持续半月之久，在此期间的温度有利于烟草气候斑点病及靶斑病发生，6 月 11 日之后温度持续上升，7 月上旬有降雨情况，气温有所降低，7 月中旬后气温一直处于较高温且延续到 8 月中旬. 烟苗生长前期温度适宜，降水量偏高，利于靶斑病发生，后期持续高温，可一定抑制靶斑病的蔓延.

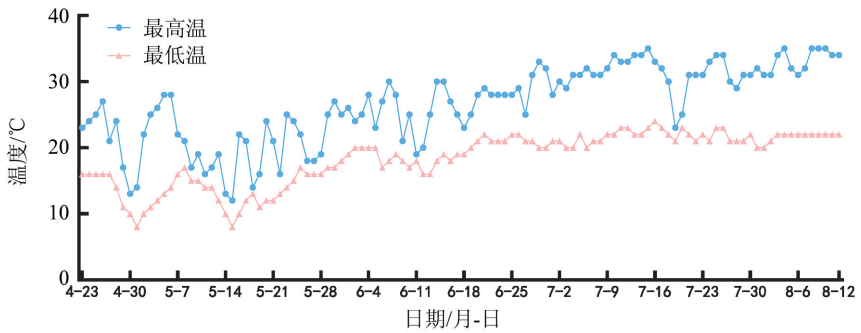


图 1 采样区域气温变化情况

2.2 “K326”烟草品种靶斑病发病情况

在李溪基地单元对“K326”烟草品种靶斑病发生情况进行连续调查，调查结果如图 2 所示，靶斑病在 6 月初开始发病，移栽后 40 d 左右发病率达到 11.73%，病情指数为 1.94，移栽后

60～80 d为发病高峰期，发病率由 18.17%升至 35.54%，病情指数由 2.39 升至 4.70，在移栽后 80～100 d 内靶斑病缓慢上升，移栽后 100 d 发病率为 41.83%，病情指数为 5.56.

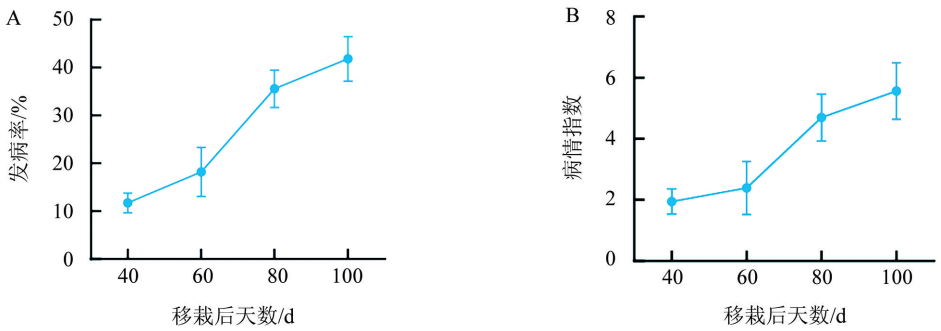
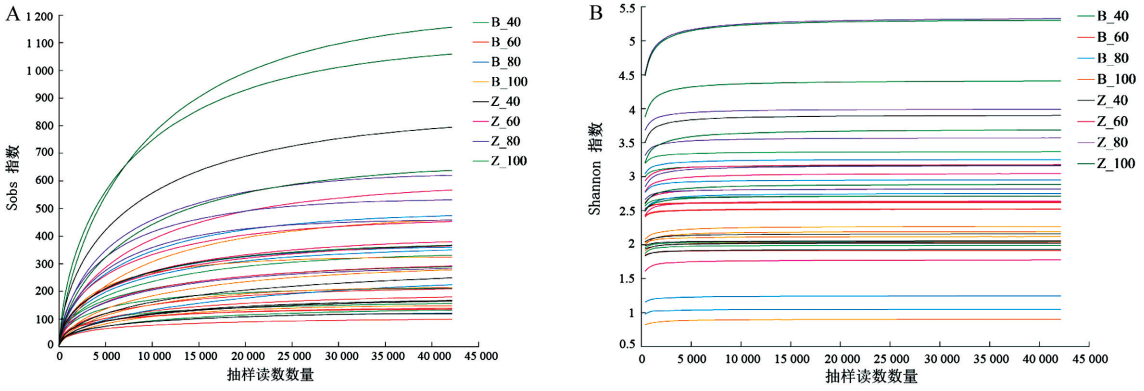


图 2　“K326”烟草品种靶斑病发病情况

2.3　“K326”烟草品种发病叶与健康叶叶际微生物结构变化

2.3.1　发病叶与健康叶叶际细菌稀释曲线分析

发病叶与健康叶样本的稀释曲线如图 3 所示，Sobs 指数和 Shannon 指数的稀释曲线随着测序数据量的增加，稀释曲线趋于平缓，说明本次的测序数据可以反映绝大多数的微生物信息，其深度足以进行后续分析.



A 为 Sobs 指数，B 为 Shannon 指数；B_40、B_60、B_80、B_100 分别代表在移栽后 40 d、60 d 、80 d 和 100 d 采集的发病叶样本编号；Z_40、Z_60、Z_80、Z_100 分别代表在移栽后 40 d、60 d、80 d 和 100 d 采集的健康叶样本编号.

图 3　“K326”烟草品种叶际细菌 ASV 水平稀释曲线

2.3.2　发病叶与健康叶叶际细菌 Alpha 多样性分析

不同时期叶际细菌覆盖度指数均为 1，表明测序数据足以反映出叶际细菌的群落结构. 由试验结果可知，随时间的推移，发病叶的 Sobs 指数、Ace 指数和 Chao1 指数比较稳定，而健康叶的 Sobs 指数、Ace 指数和 Chao1 指数均随呈递增状态，且始终高于发病叶. 其中，移栽后 60 d和 100 d 健康叶的 Sobs 指数、Ace 指数和 Chao1 指数均明显高于发病叶；移栽后 80 d 和 100 d，健康叶的 Shannon 指数明显高于发病叶；移栽后 100 d 健康叶的 Simpson 指数明显低于发病叶，差异均具有统计学意义(表 1).

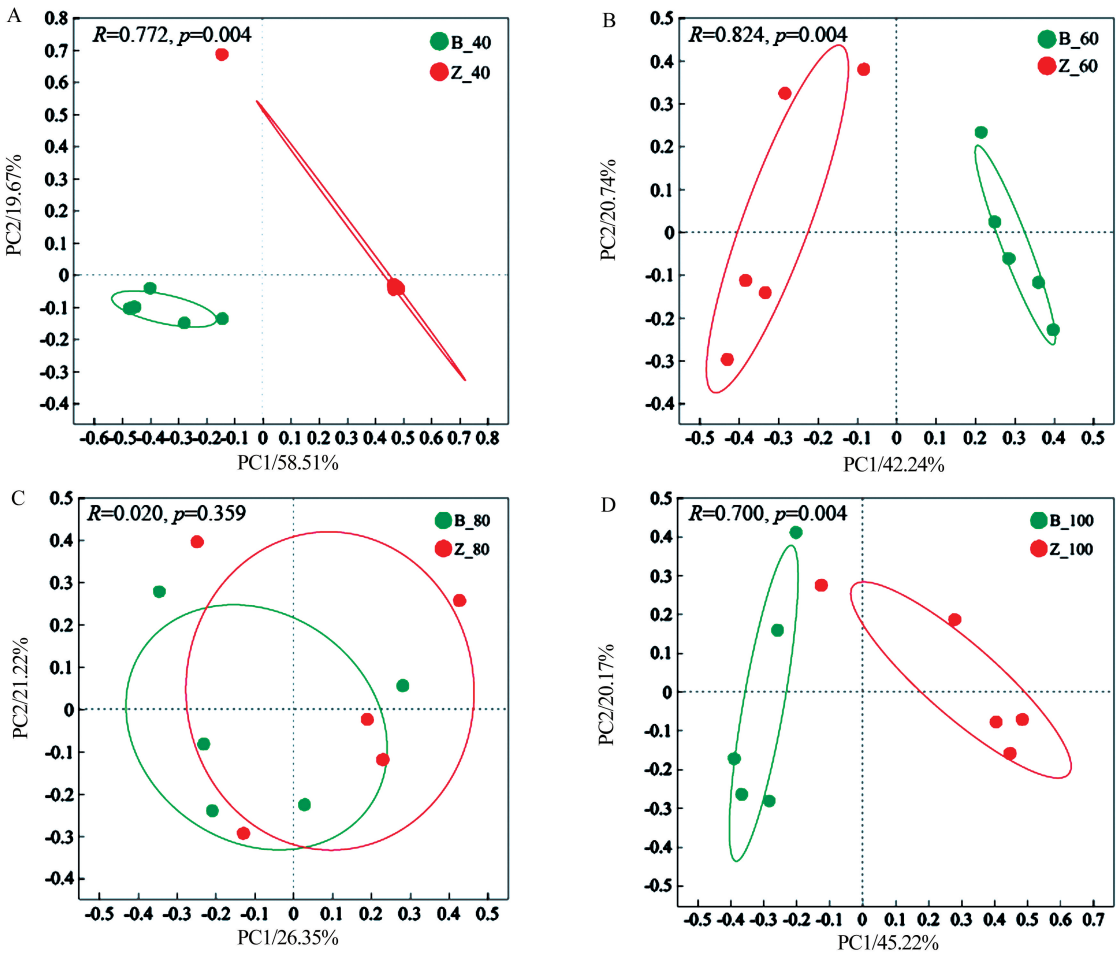
表 1 “K326”烟草品种叶际细菌 Alpha 多样性指数

采集时间	样品类型	Sobs 指数	Ace 指数	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
40 d	健康叶	297.80±125.56a	320.83±133.40a	317.96±131.53a	2.41±0.37a	0.19±0.03a
	发病叶	222.80±38.03a	232.28±39.69a	227.96±38.88a	2.65±0.28a	0.17±0.04a
60 d	健康叶	410.40±46.55b	432.95±48.78b	427.83±49.59b	2.69±0.25a	0.24±0.06a
	发病叶	151.40±19.10a	158.06±20.66a	155.60±20.08a	2.44±0.13a	0.17±0.02a
80 d	健康叶	753.60±286.99a	793.19±317.81a	790.22±317.76a	3.77±0.44b	0.08±0.03a
	发病叶	304.80±60.84a	322.75±60.48a	317.96±60.54a	2.24±0.46a	0.32±0.12a
100 d	健康叶	974.00±221.97b	1 010.13±226.29b	1 002.33±224.89b	3.79±0.48b	0.13±0.04b
	发病叶	283.60±52.75a	294.28±55.65a	289.47±54.38a	1.90±0.25a	0.38±0.09a

注：小写字母不同表示组间数据比较差异具有统计学意义($p<0.05$).

2.3.3 发病叶与健康叶叶际细菌 Beta 多样性分析

发病叶与健康叶不同时期叶际细菌群落结构如图 4 所示，移栽后 40 d、60 d 和 100 d 的发病叶与健康叶的叶际细菌群落结构差异均具有统计学意义(移栽后 40 d：$R=0.772$，$p=0.004$，Adonis；移栽后 60 d：$R=0.824$，$p=0.004$，Adonis；移栽后 100 d：$R=0.700$，$p=0.004$，Adonis).



A 为移栽后 40 d，B 为移栽后 60 d，C 为移栽后 80 d，D 为移栽后 100 d.

图 4 “K326”烟草品种叶际细菌群落结构 ASV 水平上 PCoA 分析

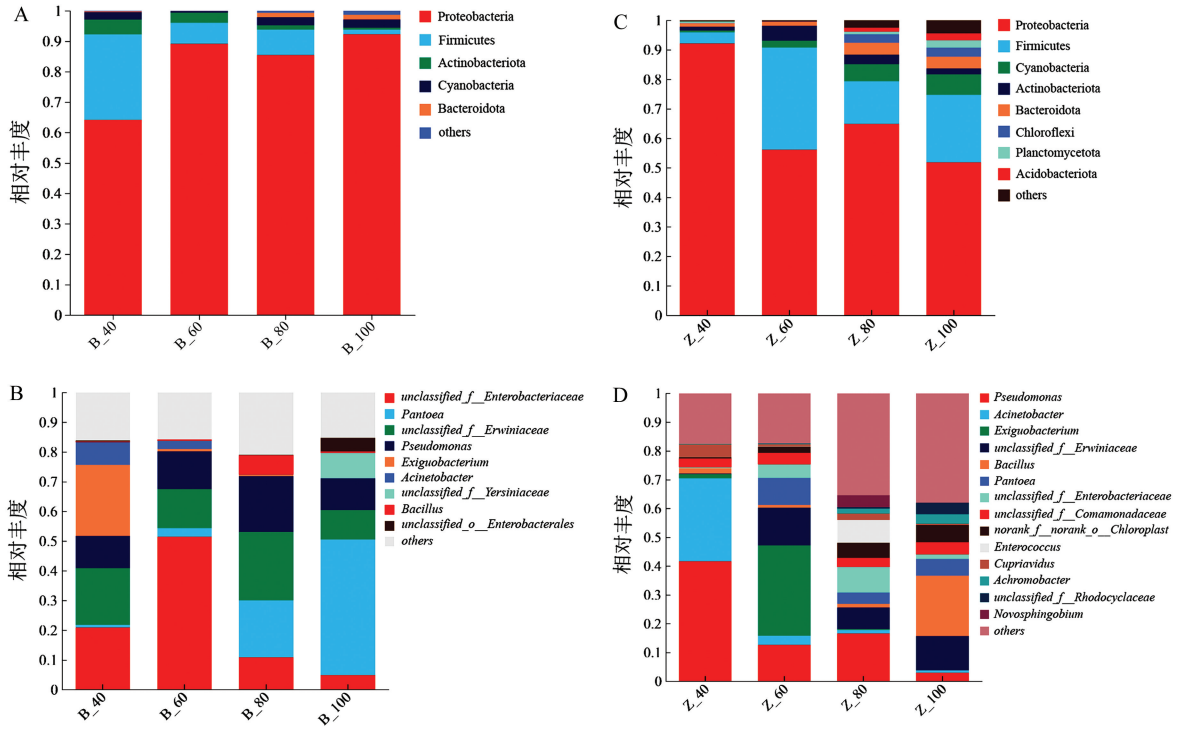
2.3.4　发病叶与健康叶叶际细菌群落组成分析

发病叶不同时期叶际细菌共注释到 3 个域、3 个界、43 个门、111 个纲、234 个目、380 个科、740 个属及 994 个种. 发病叶在门水平的叶际群落组成如图 5A 所示,不同处理细菌群落组成相似,但相对丰度存在差异. 发病叶的优势细菌门分别为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、蓝藻门(Cyanobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota),其中变形菌门的相对丰度最大. 移栽后 40 d、60 d 、80 d 和 100 d,变形菌门的相对丰度分别为 64.14%,89.13%,85.44%和 92.24%,厚壁菌门的相对丰度分别为 28.08%,6.87%,8.32%和 1.51%,放线菌门的相对丰度分别为 4.90%,3.39%,1.50%和 0.71%,蓝藻门的相对丰度分别为 2.36%,0.44%,2.60%和 2.69%,拟杆菌门的相对丰度分别为 0.25%,0.07%,1.42%和 1.46%.

发病叶不同时期在属水平的群落组成如图 5B 所示,在属水平的组成结构较为相似,但相对丰度存在差异. 发病叶的优势菌属主要为 *unclassified_f__Enterobacteriaceae*、泛菌属(*Pantoea*)、*unclassified_f__Erwiniaceae*、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、*unclassified_f__Yersiniaceae*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、*unclassified_f___Enterobacterales*.

健康叶不同时期叶际细菌共注释到 3 个域、3 个界、58 个门、170 个纲、355 个目、589 个科、1 183 个属及 2 044 个种. 健康叶在门水平的叶际群落组成如图 5C 所示,不同处理细菌群落组成相似,但相对丰度存在差异. 健康叶的优势细菌门分别为变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、蓝藻门(Cyanobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidota)、绿弯菌门(Chloroflexi)、浮霉菌门(Planctomycetota)、酸杆菌门(Acidobacteriota),其中变形菌门的相对丰度最大. 移栽后 40 d、60 d 、80 d 和 100 d,变形菌门的相对丰度分别为 92.13%,56.10%,64.83%和 51.80%,厚壁菌门的相对丰度分别为 3.73%,34.62%,14.47%和 22.90%,蓝藻门的相对丰度分别为 0.69%,2.39%,5.82%和 6.99%,放线菌门的相对丰度分别为 1.26%,4.97%,3.18%和 1.97%,拟杆菌门的相对丰度分别为 1.15%,1.30%,4.03%和 3.96%,绿弯菌门的相对丰度分别为 0.10%,0.13%,2.92%和 3.14%,浮霉菌门的相对丰度分别为 0.48%,0.03%,0.88%和 2.52%,酸杆菌门的相对丰度分别为 0.03%,0.03%,1.26%和 2.26%. 整体而言,发病叶叶际细菌群落丰富度低于健康叶,优势菌群也少于健康叶,两者比较差异具有统计学意义.

健康叶不同时期在属水平的群落组成如图 5D 所示,在属水平的组成结构较为相似,但相对丰度存在差异. 不同处理的优势菌属主要为假单胞菌属(*Pseudomonas*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、微小杆菌属(*Exiguobacterium*)、*unclassified_f__Erwiniaceae*、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、泛菌属(*Pantoea*)、*unclassified_f__Enterobacteriaceae*、*unclassified_f__Comamonadaceae*、*norank_f__norank_o__Chloroplast*、肠球菌属(*Enterococcus*)、贪铜菌属(*Cupriavidus*)、*unclassified_f__Rhodocyclaceae*、新鞘氨醇菌属(*Novosphingobium*). 不同时期发病叶与健康叶叶际细菌群落在属水平上差异具有统计学意义.

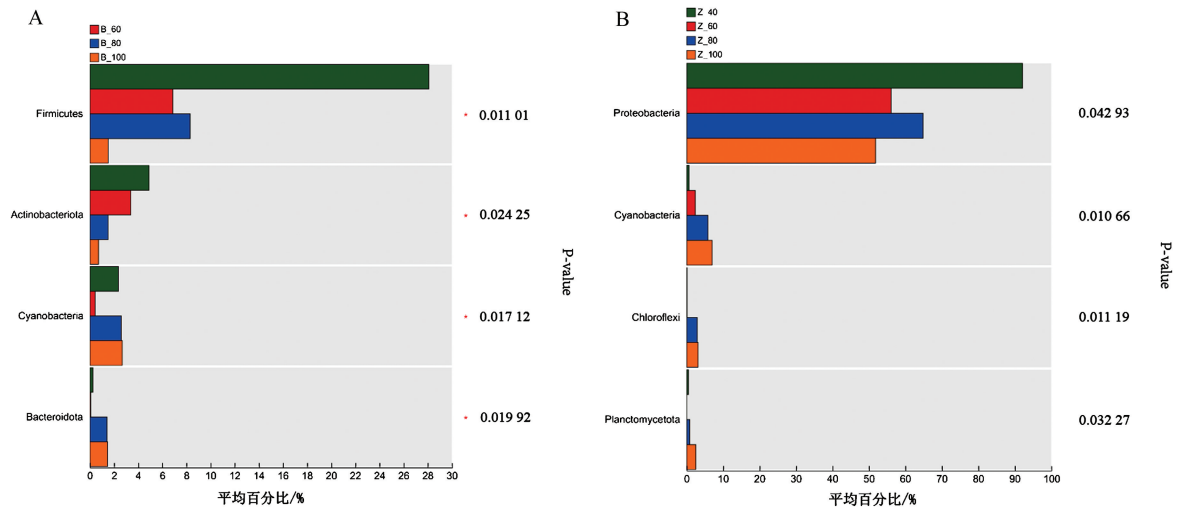


A、B 为发病叶门、属水平相对丰度，C、D 为健康叶门、属水平相对丰度.

图 5 “K326”烟草品种叶际细菌相对丰度

2.3.5 发病叶与健康叶叶际细菌群落结构差异性分析

发病叶与健康叶在不同时期叶际细菌群落门水平结构差异如图 6 所示，发病叶不同时期叶际细菌群落结构中厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)蓝藻门(Cyanobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidota)等含量比较差异均具有统计学意义，健康叶在不同时期叶际细菌群落结构中变形菌门(Proteobacteria)和蓝藻门(Cyanobacteria)、绿弯菌门(Chloroflexi)和浮霉菌门(Planctomycetota)等含量比较差异具有统计学意义.

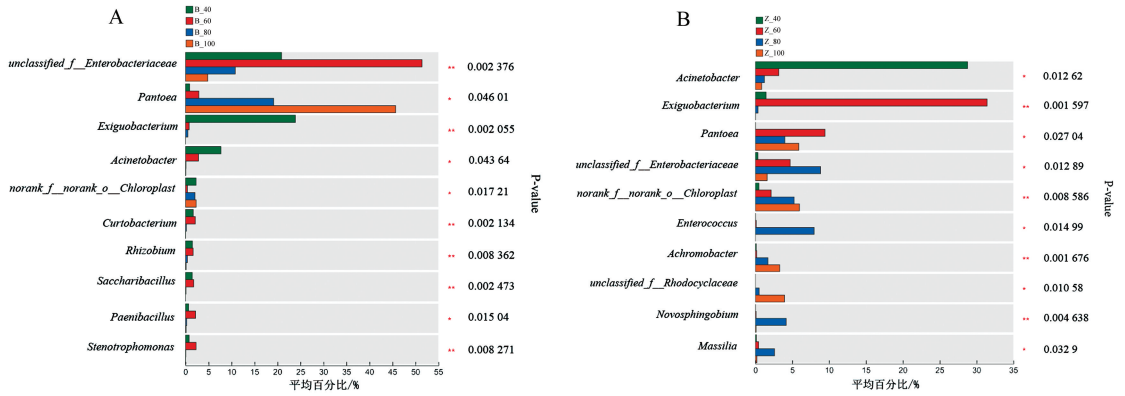


A 为发病叶；B 为健康叶.

图 6 “K326”烟草品种不同时期叶际细菌群落门水平结构差异

发病叶与健康叶在不同时期叶际细菌群落属水平结构差异如图 7 所示，发病叶(图 7A)在不同时期叶际细菌群落结构中 *unclassified_f__Enterobacteriaceae*、泛菌属(*Pantoea*)、微小杆

菌属（*Exiguobacterium*）、无色杆菌属（*Achromobacter*）、*norank_f__norank_o__Chloroplast* 等含量比较差异具有统计学意义，健康叶（图 7B）不同时期叶际细菌群落结构中无色杆菌属（*Achromobacter*）、微小杆菌属（*Exiguobacterium*）、泛菌属（*Pantoea*）、*unclassified_f__Enterobacteriaceae*、*norank_f__norank_o__Chloroplast* 等含量比较差异具有统计学意义. 在不同时期发病叶与健康叶叶际细菌群落中主要含量比较差异具有统计学意义的菌属基本一致，但菌属含量存在一定差异.



A 为发病叶；B 为健康叶.

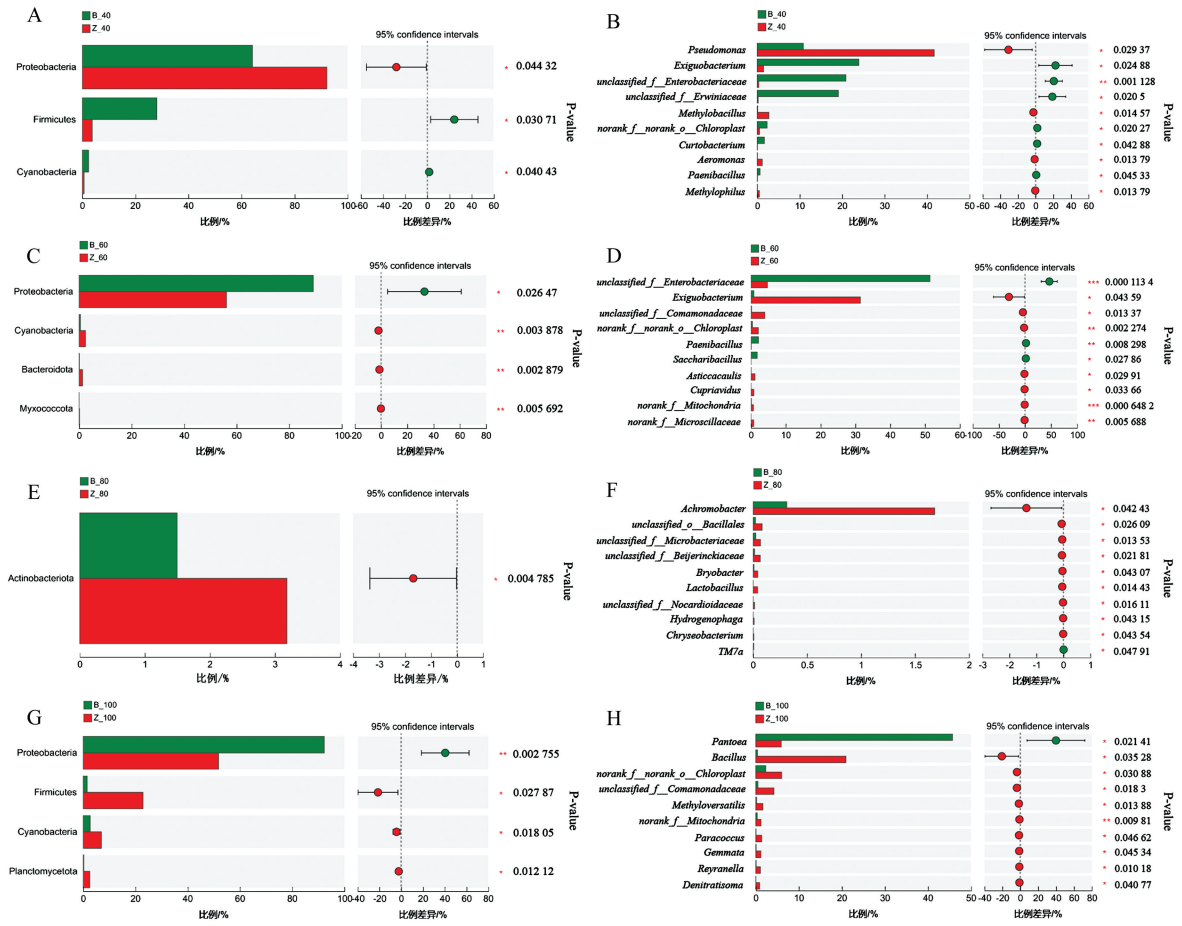
图 7　“K326”烟草品种不同时期叶际细菌群落属水平结构差异

移栽后 40 d 发病叶与健康叶叶际细菌群落结构差异在门水平上如图 8A 所示，变形菌门（Proteobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）和蓝藻门（Cyanobacteria）含量比较差异均具有统计学意义. 在属水平上（图 8B），健康叶中假单胞菌属（*Pseudomonas*）、甲基菌属（*Methylobacillus*）和温和气单胞菌属（*Aeromonas*）等含量明显高于发病叶，且微小杆菌属（*Exiguobacterium*）、*unclassified_f__Enterobacteriaceae*、*unclassified_f__Enterobacteriaceae*、*norank_f__norank_o__Chloroplast*、短小杆菌属（*Curtobacterium*）和类芽孢杆菌属（*Paenibacillus*）等含量比较差异均具有统计学意义.

移栽后 60 d 发病叶与健康叶叶际细菌群落门水平结构差异如图 8C 所示，变形菌门（Proteobacteria）、蓝藻门（Cyanobacteria）、拟杆菌门（Bacteroidota）和粘菌门（Myxococcota）含量比较差异均具有统计学意义. 在属水平上（图 8D），健康叶中微小杆菌（*Exiguobacterium*）、*unclassified_f__Comamonadaceae* 和 *norank_f__norank_o__Chloroplast* 等均高于发病叶，*unclassified_f__Enterobacteriaceae*、类芽孢杆菌（*Paenibacillus*）、糖芽孢杆菌菌属（*Saccharibacillus*）等含量比较差异均具有统计学意义.

移栽后 80 d 发病叶与健康叶叶际细菌群落门水平结构差异如图 8E 所示，酸杆菌门（Acidobacteriota）含量比较差异具有统计学意义. 在属水平上（图 8F），无色杆菌属（*Achromobacter*）、*unclassified_o__Bacillales*、*unclassified_f__Microbacteriaceae*、*unclassified_f__Beijerinckiaceae* 等含量与其他细菌群落比较差异具有统计学意义，且以上菌属健康叶中含量均高于发病叶.

移栽后 100 d 发病叶与健康叶叶际细菌群落门结构差异如图 8G 所示，变形菌门（Proteobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）、蓝藻门（Cyanobacteria）和浮霉菌门（Planctomycetota）含量比较差异具有统计学意义. 在属水平上（图 8H），泛菌属（*Pantoea*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、*norank_f__norank_o__Chloroplast*、*unclassified_f__Comamonadaceae* 和 *norank_f__Mitochondria* 等含量比较差异均具有统计学意义，以上菌属除泛菌属（*Pantoea*）外其余菌属在健康叶中含量也均高于发病叶中.



A、C、E、G 分别为移栽后 40 d、60 d、80 d、100 d 门水平；B、D、F、H 分别为移栽后 40 d、60 d、80 d、100 d 属水平.

图 8 “K326”烟草品种移栽后不同时期发病叶与健康叶叶际细菌群落结构差异

3 讨论与结论

植物能够招募有益微生物来增强自身抵御病原体的能力[14]. 近年来，叶际微生物逐渐被人们所关注，并被应用于植物病害防治研究[15]. 本研究发现，健康烟叶叶际的细菌多样性与丰富度均高于发病烟叶. 健康烟叶叶际差异细菌属为微小杆菌属、短小杆菌属、类芽孢杆菌属、泛菌属和芽孢杆菌属等，与孙美丽等[16]报道感染靶斑病的烟叶叶际细菌多样性指数高于健康烟叶，而丰富度指数低于健康烟叶，同时健康烟叶叶际优势细菌属为假单胞菌属、泛菌属、肠杆菌属等结果基本一致. 烟草叶际感染靶斑病后会降低细菌多样性和丰富度，而健康烟叶能有效抵御以立枯丝核菌为主的病原菌的侵染，叶际细菌多样化和群落结构稳定等发挥着重要作用，叶际微生物组对植物病原物入侵响应及在群落水平的变化和作用还有待进一步研究.

烟草叶际微生物的群落结构与病害发生密切相关，不同病害叶际微生物的优势菌群存在差异. 近年来，烟草叶部病害如赤星病、角斑病、靶斑病、白粉病等发病叶与健康叶的叶际微生态研究均取得了一定的进展[17-19]. 烟草赤星病、烟草角斑病和烟草靶斑病的叶际优势细菌有泛菌属、假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属等，其他菌属略有不同[16-18]. 本研究发现，烟草靶斑病的叶际优势细菌包括泛菌属、假单胞菌属、微小杆菌属等，健康烟叶的叶际优势细菌主要包括假单胞菌属、不动杆菌属、微小杆菌属、芽孢杆菌属、泛菌属等，与刘畅等[17]对感染赤星病烟叶细菌的多样性分析及吴小军等[18]对烟草角斑病叶际微生物群落结构与多样性分析的研究结果基本一致. 由此可见，泛菌属和假单胞菌属等可能是烟草叶际的优势定殖细菌. 同时，本项研究重点明确了不同时期烟草靶斑病发生的叶际微生态特征，健康烟叶叶际细菌的多样性指数和丰富度

指数均随着移栽时间逐渐递增，而感病烟叶的多样性指数和丰富度指数呈现先降低后升高的规律，移栽后 40 d、60 d、80 d 和 100 d 烟草靶斑病发生的叶际微生物群落组成存在差异，对烟草靶斑病绿色防控技术的施药时期选择具有一定的指导意义.

烟草靶斑病发生与气候条件和叶际微生物组成密切相关，高温高湿容易导致烟草靶斑病的暴发. 烟草靶斑病的发病与健康烟叶叶际细菌优势菌属均为泛菌属、假单胞菌属、微小杆菌属，健康烟叶叶际细菌特定的优势菌属有类芽孢杆菌属、芽孢杆菌属等，同时健康烟叶叶际细菌的多样性指数和丰富度指数均随着移栽时间逐渐递增，明显高于感病烟叶.

参考文献：

[1] 周建全，张忠光，董雪，等. 不同药剂对烟草靶斑病的抑菌作用及田间药效研究[J]. 安徽农业科学，2015，43(25)：96-97，99.

[2] 陈丹阳，甘勇，张万金等. 烟草靶斑病拮抗菌的筛选鉴定及抗逆性研究[J/OL]. 四川农业大学学报，1-13 [2024-02-27]. https：//doi.org/10.16036/j.issn.1000-2650.202108044.

[3] 刘斯泓，纪明山. 防治烟草靶斑病的复配药剂配方筛选及田间药效试验[J]. 江苏农业科学，2014，42(6)：140-143.

[4] 侯慧慧，孙剑萍，刘子仪，等. 云南烟草靶斑病(*Rhizoctonia solani Kühn*)病原鉴定及其融合群研究[J]. 沈阳农业大学学报，2018，49(2)：203-208.

[5] XIA B，XU C T，XU J K，et al. First Report of Target Leaf Spot on Flue-Cured Tobacco by Rhizoctonia Solani AG-3 in Sichuan，China[J]. Plant Disease，2019，103(3)：581.

[6] 徐传涛，张崇，张明金，等. 四川省烟草靶斑病病原鉴定及生物防治研究[J]. 湖北农业科学，2021，60(8)：87-90.

[7] LINDOW S E，BRANDL M T. Microbiology of the Phyllosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology，2003，69(4)：1875-1883.

[8] 刘天波，滕凯，周向平，等. 拮抗菌群对烟草野火病的防治效果及叶际微生物群落多样性的影响[J]. 微生物学通报，2021，48(8)：2643-2652.

[9] 刘宇星，董醇波，邵秋雨，等. 叶际微生物与植物健康研究进展[J]. 微生物学杂志，2022，42(2)：88-98.

[10] VORHOLT J A. Microbial Life in the Phyllosphere[J]. Nature Reviews Microbiology，2012，10：828-840.

[11] 刘亭亭，曾陨涛，汪汉成，等. 赤星病发生期不同成熟度烟叶叶际微生物代谢与群落结构[J]. 中国烟草科学，2021，42(6)：22-29.

[12] 罗路云，张卓，金德才，等. 南瓜白粉病不同病情等级下叶际细菌群落结构和多样性[J]. 植物病理学报，2017，47(5)：688-695.

[13] 杨超. 重庆烟区主要生态因子特征及其对烤烟产质量的影响[D]. 重庆：西南大学，2015.

[14] LI PD，ZHU ZR，ZHANG Y，et al. The Phyllosphere Microbiome Shifts Toward Combating Melanose Pathogen [J]. Microbiome，2022，10(1)：1-17.

[15] 刘畅，汪汉成，谢红炼，等. 感赤星病烟叶的真菌群落结构分析[J]. 贵州农业科学，2019，47(7)：54-59.

[16] 孙美丽，史彩华，肖本青，等. 烟草靶斑病叶际微生物群落结构与多样性分析[J]. 烟草科技，2023，56(4)：1-9.

[17] 刘畅，汪汉成，谢红炼，等. 感染赤星病烟草叶际细菌的多样性分析[J]. 烟草科技，2020，53(2)：8-14.

[18] 吴小军，汪汉成，孙美丽，等. 烟草角斑病叶际微生物群落结构与多样性分析 [J]. 烟草科技，56(10)：1-10.

[19] 黄宇，汪汉成，陈乾丽，等. 感染白粉病烟株典型病级叶际真菌群落结构与多样性分析[J]. 烟草科技，2021，54(4)：8-14.

责任编辑　苏荣艳