

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2025.03.004

烟苗未知病害病际微生物菌群结构与多样性特征

汤梅^{1,2}, 毕朝位¹, 李珍², 孙美丽^{2,3},
汪汉成², 孟建玉², 蔡刘体²

1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400000;

2. 贵州省烟草科学研究所, 贵阳 550081;

3. 长江大学 农学院, 湖北 荆州 434023

摘要: 贵州威宁发现一未知烟草苗期病害, 主要表现为茎基部缢缩与根系脱离, 造成烟苗枯萎死亡。Illumina 扩增子测序表明, 健康烟草和感病烟苗茎基部最优势真菌属均为蓝状菌属(*Talaromyces*)。健康烟苗优势细菌属为沃尔巴克氏属(*Wolbachia*)和肠球菌属(*Enterococcus*); 感病烟苗优势细菌属为拉恩氏菌属(*Rahnella*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)。健康烟苗茎基部真菌和细菌 Shannon 多样性指数均显著高于感病烟苗。Illumina 扩增子测序结果为后续选择性分离感病烟苗中丰度显著提高的拉恩氏菌、假单胞菌、*Cystobasidium*, 以及丰度提高不显著但已有致病报道的蓝状菌属真菌, 并遵循科赫氏法则确认病原菌等工作指明了目标。

关键词: 高通量测序; 菌群结构; 多样性; 烟苗

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

文章编号: 2097-1354(2025)03-0034-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Microbial Community Structure and Diversity
Characteristics with an Unknown Disease of Tobacco SeedlingTANG Mei^{1,2}, BI Chaowei¹, LI Zhen², SUN Meili^{2,3},
WANG Hancheng², MENG Jianyu², CAI Liuti²

1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400000, China;

2. Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China;

3. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China

收稿日期: 2024-09-30

基金项目: 贵州省科技创新人才团队项目(黔科合平台人才-CXTD[2023]021); 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(2024XM06); 国家自然科学基金(32460698)。

作者简介: 汤梅, 硕士研究生, 研究方向为植物病理学。

通信作者: 毕朝位, 博士, 副教授。

Abstract: An unknown tobacco seedling disease was found in Weining, Guizhou, mainly manifested as stem base constriction and root abscission, resulting in tobacco seedling wilting and death. Illumina amplicon sequencing showed that the most dominant fungal genus in the stem base of healthy and infected tobacco seedlings was *Talaromyces*. The dominant bacteria of healthy tobacco seedlings were *Wolbachia* and *Enterococcus*. The dominant bacterial genera of infected tobacco seedlings were *Rahnella* and *Pseudomonas*. The Shannon diversity index of fungi and bacteria in the stem base of healthy tobacco seedlings was significantly higher than that of infected tobacco seedlings. The results of Illumina amplicon sequencing pointed out the goal for the subsequent selective isolation of *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Cystobasidium* with significantly increased abundance from infected tobacco seedlings, as well as *Talaromyces* fungi with insignificant increase in abundance but reported to be pathogenic, and confirmation of pathogens according to the Koch's rule.

Key words: high-throughput sequencing; community structure; diversity; tobacco seedling

我国是世界上最大的烟叶生产国,漂浮育苗是主要的育苗方式。然而,烟草苗期常出现多种病害,给烟叶生产带来严重的风险。迄今,苗期出现重大风险的病害有烟草立枯病、炭疽病、猝倒病、腐霉病、根腐病、靶斑病、灰霉病等^[1]。2023年,贵州毕节烟草产区烟苗出现一未知病害,该病害初期发病症状与烟草立枯病高度相似,后期烟苗茎基部出现严重溢缩,根系断裂,造成烟苗成片枯萎死亡。为进一步明确发病原因并找到对应防控措施,有必要对其病际烟苗病原种类和病际微生态特征进行分析。

柯赫氏法则^[2]是验证致病菌的经典方法,通过传统分离培养出病原菌,将病原菌进行回接,从而验证是否为致病菌。该方法只适用于病原菌为可培养致病菌的验证,但针对不可培养病原菌侵染所引起的病害,该法则并不适用。目前,基于高通量测序的扩增子测序技术是研究植物病害病际微生态的有效方法,可以了解病际真菌、细菌等微生物的菌群结构与多样性特征,从微生物学的角度揭示病害的潜在病原菌、致病过程^[3],该技术在烟草病害上被广泛应用。已有研究表明,感赤星病烤后烟叶内生及叶际真菌群落多样性低于健康烟叶,感赤星病烤后烟叶链格孢属的相对丰度高于健康烟叶,前二优势属为链格孢属与红酵母属,与 *Alternaria alternata*、*A. longipes*、*A. tenuissima*、*A. yaliinficiens* 和 *A. tabacicola* 等多个链格孢属真菌导致的赤星病结果是一致的^[4]。烟草感靶斑病烟叶亡革菌属(*Thanatephorus*)的相对丰度相对健康烟叶显著提升(71.84% vs 0.21%),而亡革菌属是靶斑病菌立枯丝核菌的有性型^[5]。烟草亚隔孢叶斑病叶中亚隔孢壳属的丰度随病害严重程度的提高而提高^[6]。感染白粉病的烟叶高氏白粉菌属(*Golovinomyces*)相对丰度相对健康烟叶提升显著(99.22% vs 91.86%)^[7]。烟草细菌角斑病叶中假单胞菌属(*Pseudomonas*)的丰度相对健康烟叶提升显著(34.94% vs 8.88%)^[8]。烤后霉变烟叶叶部和叶梗的曲霉属丰度较健康烟叶均提升显著(89.64% vs 40.13%、96.93% vs 62.77%)^[9]。施用拮抗菌群后的烟草芽孢杆菌属(*Bacillus*)和寡养单胞菌属相比于对照分别增加 3.9 倍和 7.02 倍,其丰度与野火病病情指数呈显著负相关^[10]。

针对贵州毕节烟草苗期出现的这一未知病害,本研究采用扩增子测序的方法分析了感病烟苗茎基部真菌和细菌的菌群结构和多样性特征,旨在探究其病害成因,为病害的防控技术研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2023年4月,贵州省毕节市威宁县暴发一未知苗期病害的烟草,在其苗床采集典型发病烟苗,主要表现为茎基部溢缩,后期病苗枯萎死亡(图1)。采用五点取样法^[11]分别随机选取5株感病和健康烟苗,使用75%酒精消毒的剪刀剪取烟苗茎基部的发病部位,同时采集健康烟苗相同部位的组织作为对照。感病组(WNB)5个样本的编号分别为WNB1、WNB2、WNB3、WNB4和WNB5,健康组(WNJ)5个样本的编号分别为WNJ1、WNJ2、WNJ3、WNJ4和WNJ5。



图1 病害烟苗基部的危害症状

1.2 病际真菌和细菌菌群结构与多样性分析

1.2.1 DNA提取及目标片段PCR扩增

采用CTAB试剂盒^[12]方法对基因组DNA进行提取。之后利用1%琼脂糖凝胶电泳检测DNA的纯度和浓度,取适量的样本DNA于离心管中,使用无菌水稀释样本至1 ng/ μ L。细菌使用515F和806R^[13]进行扩增,真菌使用ITS5-1737F和ITS2-2043R^[14]进行扩增。使用建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过Qubit和q-PCR定量,文库构建合格后,使用Nova Seq 6000^[15-17]进行PE250上机测序。

1.2.2 菌群结构分析

下机数据经过Cutadapt软件进行剔除以及过滤低质量序列,UCHIME算法去除嵌合体序列,最终得到有效序列。使用UPARSE软件对clean reads进行OTU聚类,筛选每个OTU的代表性序列,将OTU代表性序列与Unite数据库和Silva 132数据库比对,注释物种分类。利

用 R 语言工具^[18]绘制物种群落柱状图、主成分分析图和 Venn 分析图等。为了评估群落组成的复杂性并比较样本(组)之间的差异,在 QIME2 中,基于加权和非加权距离进行 β 多样性分析。在处理真细菌样本时,可以使用 FunGuild 工具,对主要的营养类型进行分类,研究具体的真菌与细菌功能分类,测序结果数据已上传 NCBI 数据库,真菌和细菌的序列登录号分别为 PRJNA 1175465 和 PRJNA 1177533。

2 结果与分析

2.1 病际真菌和细菌菌群结构与多样性特征

2.1.1 测序深度结果

稀释曲线(Rarefaction Curve)结果表明,真菌样品随机抽取的测序数量达到 15 000 个时,曲线达到平台期(图 2a);细菌样品随机抽取的测序数量达到 10 000 个时,曲线达到平台期(图 2b),表明测序结果真实可靠具有代表性。

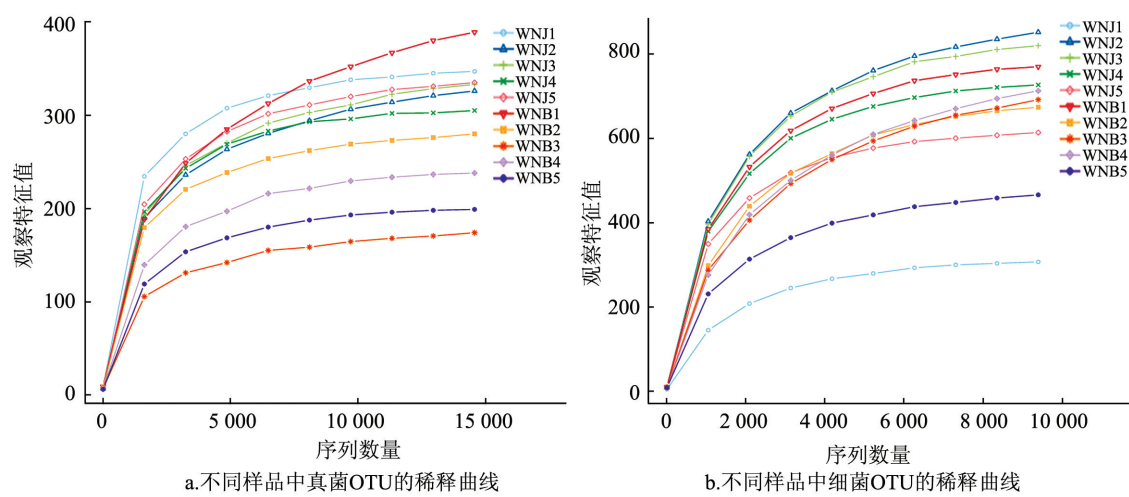


图 2 不同样品中真菌与细菌 OTU 的稀释曲线

健康烟苗与感病烟苗的微生物群落差异分析 Venn 图(图 3)表明:在健康烟苗茎基部真菌群落中特有 OTUs 572 个,细菌群落中特有 OTUs 1 785 个;感病烟苗茎基部真菌群落中特有 OTUs 734 个,细菌群落中特有 OTUs 1 756 个。健康烟苗和感病烟苗茎基部真菌群落共有 OTUs 305 个,细菌群落共有 OTUs 661 个。

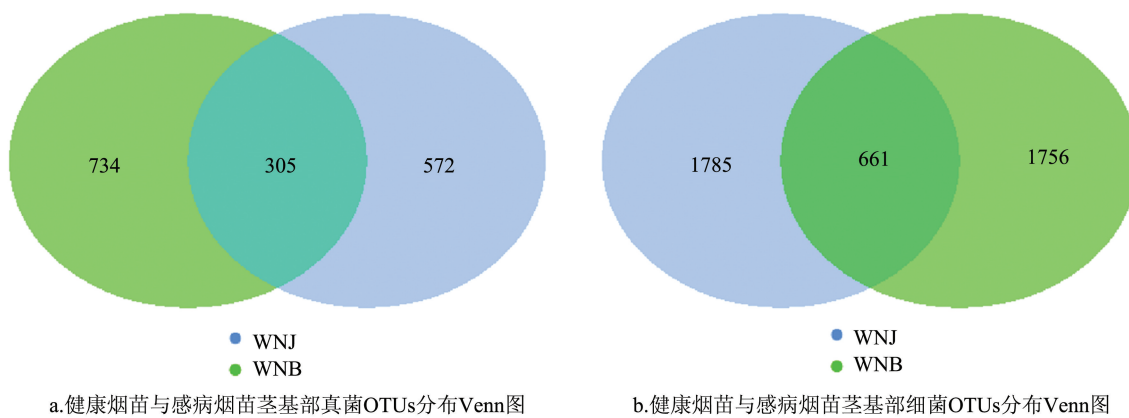


图 3 感病烟苗与健康烟苗茎基部真菌与细菌 OTUs 分布 Venn 图

2.1.2 健康烟苗与感病烟苗真菌与细菌群落 α 多样性

由图4可知,测序的细菌与真菌样品组间的覆盖率均达到98.4%以上,表明测序结果真实合理。健康烟苗细菌的Shannon指数和Chao 1指数均高于感病烟苗,健康烟苗茎基部真菌Shannon指数显著高于感病烟苗($p < 0.05$)。

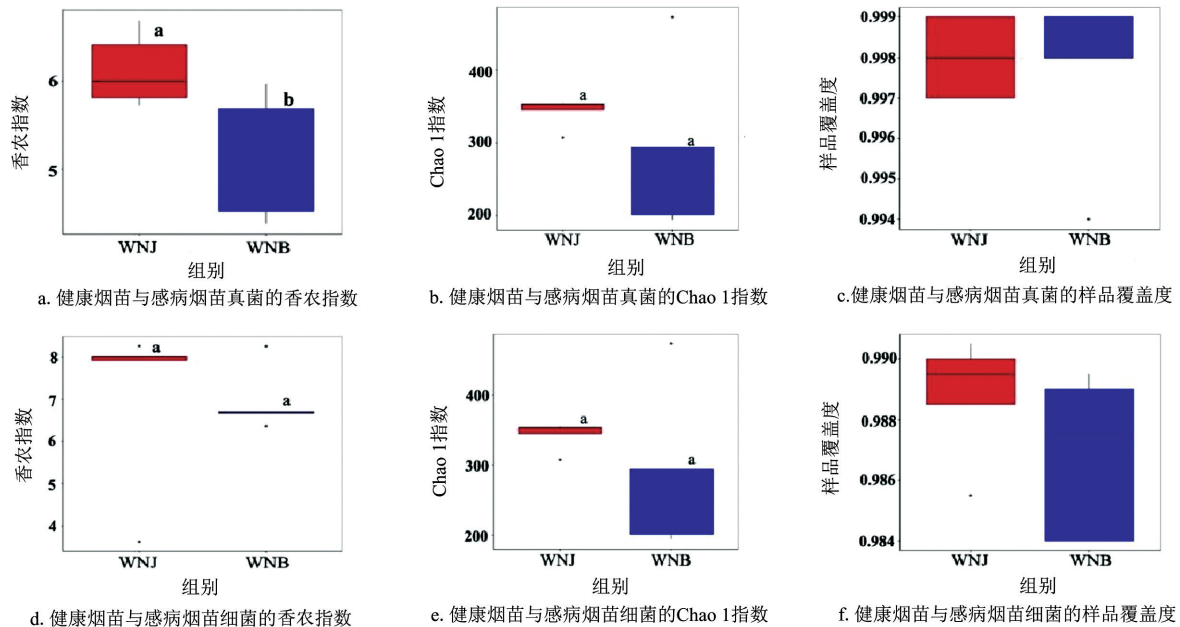


图4 感病烟苗与健康烟苗茎基部真菌与细菌 α 多样性指数

2.1.3 健康烟苗与感病烟苗真菌与细菌群落结构

在真菌群落门水平上,感病烟苗与健康烟苗茎基部优势真菌门种类一致,其中子囊菌门(Ascomycota),相对丰度分别为47.49%与57.78%;担子菌门(Basidiomycota),相对丰度分别为38.57%与22.80%;毛霉门(Mucoromycota),相对丰度分别为1.52%与7.19%;球囊菌门(Glomeromycota),相对丰度分别为1.27%与2.14%(图5a)。在细菌群落门水平上,感病烟苗与健康烟苗茎基部优势门水平种类一致,但其相对丰度具有差异性。其中,感病烟苗与健康烟苗茎基部均存在的优势细菌门为变形菌门(Proteobacteria, 62.12%和62.40%)、厚壁菌门(Firmicutes, 12.54%和7.68%)、拟杆菌门(Bacteroidota, 5.40%和10.04%)与放线菌门(Actinobacteriota, 9.23%和6.34%)。其中,健康烟苗变形菌门和拟杆菌门的相对丰度高于感病烟苗,感病烟苗厚壁菌门和放线菌门的相对丰度高于健康烟苗(图5b)。

在真菌群落属水平上,感病烟苗与健康烟苗茎基部真菌的种类和相对丰度均有差异。其中,健康烟苗优势真菌属为蓝状菌属(*Talaromyces*, 相对丰度为13.06%)、毛霉属(*Mucor*, 相对丰度为6.00%)、枝孢菌属(*Cladosporium*, 相对丰度为5.37%)、链格孢属(*Alternaria*, 相对丰度为5.32%)和须腹菌属(*Rhizopogon*, 相对丰度为3.85%)。感病烟苗优势真菌属为蓝状菌属(*Talaromyces*, 相对丰度为14.58%)、囊担菌属(*Cystobasidium*, 相对丰度为15.25%)、枝孢菌属(*Cladosporium*, 相对丰度为7.92%)、红酵母属(*Rhodotorula*, 相对丰度为6.45%)和链格孢属(*Alternaria*, 相对丰度为5.05%)(图5c)。在细菌群落属水平上,感病烟苗与健康烟苗茎基部优势真菌种类与相对丰度均存在差异。健康烟苗优势细菌属为沃尔巴克氏体属(*Wolbachia*, 相对丰度为16.29%)、肠球菌属(*Enterococcus*, 相对丰度为2.60%)、沙雷氏菌属(*Serratia*, 相对丰度为1.94%)、独岛杆菌属(*Dokdonella*, 相对丰度为1.92%)和假单胞菌属(*Pseudomonas*, 相对丰度为1.55%);感病烟苗优势细菌属为拉恩氏菌属(*Rahnella*, 相对丰度为

10.86%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*, 相对丰度为 9.81%)、沙雷氏菌属(*Serratia*, 相对丰度为 5.27%)、短小杆菌属(*Curtobacterium*, 相对丰度为 2.97%)和酸球菌属(*Acidisoma*, 相对丰度为 2.45%)(图 5d)。

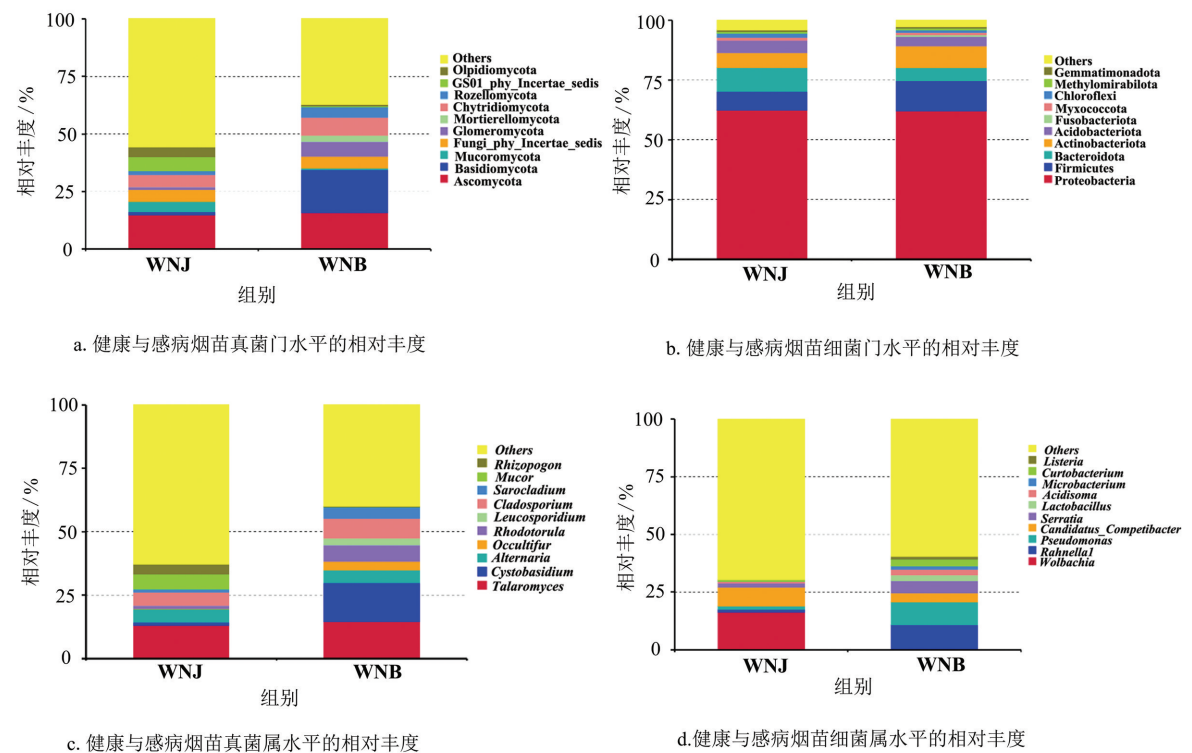


图 5 感病烟苗与健康烟苗真菌和细菌的门水平、属水平相对丰度

2.1.4 健康烟苗和感病烟苗真菌与细菌群落主成分分析

利用 PCA 图揭示了真菌和细菌群落的空间分布, 样本距离越接近, 表示物种组成结构越相似。因此, 群落结构相似度高的样本倾向于聚集在一起, 群落差异很大的样本则会距离较远。在真菌群落中, 除 WNB1 外, 其他 4 个感病样品倾向于聚集在一起, 健康样品群落彼此分离(图 6a)。在细菌群落中, 所有感病样品彼此聚集, 健康样品彼此分离(图 6b)。分析表明, 在真菌群落中感病组除了 WNB1, 其他样品彼此聚合, 相似度较高, 健康样本无论是真菌还是细菌都彼此分离, 证明健康烟苗的各个样本相似度都不高。

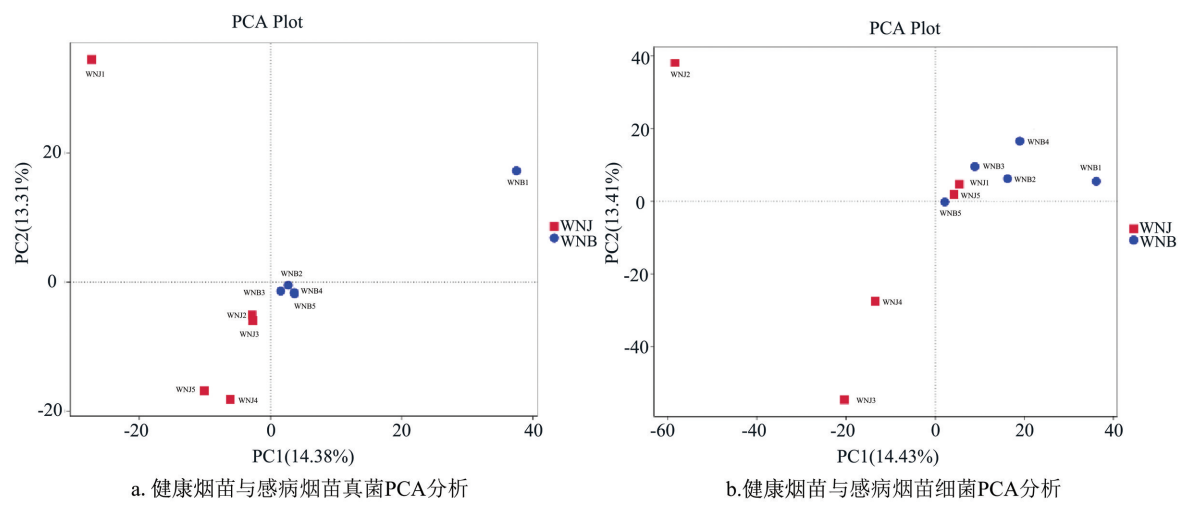


图 6 健康烟苗与感病烟苗真菌和细菌 PCA 分析

2.1.5 健康烟苗和感病烟苗真菌与细菌功能预测

烟苗真菌群落功能预测柱形图(图 7a)表明,感病烟苗与健康烟苗茎基部真菌生态功能类群均主要分布于 11 个生态功能类群。健康烟苗茎基部真菌主要分布于外生菌根(11.44%)、内生植物病原菌(5.39%)和动物病原体-植物病原体-木材病原体-木腐生菌(5.32%),感病烟苗真菌主要分布于真菌寄生虫(15.35%)、内生植物病原体(7.97%)和未定义动物内生菌-腐生菌(6.45%)。

烟苗细菌群落功能预测柱形图(图 7b)表明,健康烟苗和感病烟苗茎基部细菌生态功能类群相似,均主要分布于 11 个生态功能类群,相对丰度最高的均为膜运输(10.64%和 11.01%),其次主要分布于能量代谢(9.82%和 9.66%)、氨基酸代谢(8.40%和 8.48%)、碳水化合物代谢(8.26%和 8.40%)和复制与修复(8.41%和 8.17%)。

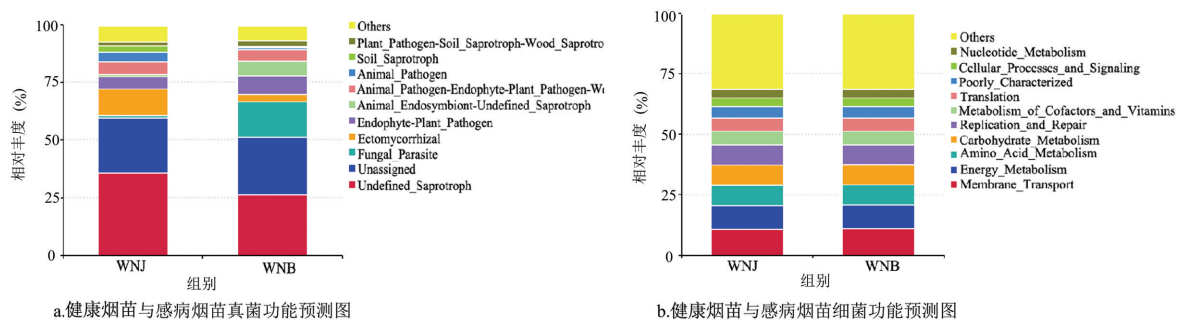


图7 感病烟苗与健康烟苗真菌与细菌群落功能预测

3 讨论与结论

微生物群落结构改变、多样性改变、病原菌富集,是造成田间病害的主要原因。植株与微生物之间存在相互影响的关系,当部分微生物丰度增加时,植株就会表现出患病状态,而当某一些病原物增加时,部分微生物也会产生增多或减少的变化,对微生物群落多样性产生影响^[19]。张笑宇等^[20]的研究发现,成熟期易感青枯烟田中可培养真菌数量显著高于健康烟田。孙美丽等^[5]的研究发现,感烟草靶斑病的植株亡格菌属的丰度显著高于健康植株;郭涛等^[21]的研究发现,假单胞菌在感中度野火病的病株中的丰度要高于轻度和高度感野火病的植株中的丰度。本研究发现,感病烟苗茎基部 *Talaromyces*、*Cystobasidium* 与假单胞菌的相对丰度相较于健康烟叶有增加的趋势,同时感病烟苗真菌和细菌的多样性相较于健康烟苗都有降低的趋势,并且感病烟苗真菌的 shannon 指数与健康烟苗存在显著差异,这与刘亭亭等^[22]的研究结果一致,进一步证实了真菌性病害发生时病际组织的真菌多样性低于健康组织这一普遍规律。

本研究中,感病烟苗中 *Talaromyces* 与 *Cystobasidium* 含量相较于健康烟苗有所增加。虽然 *Talaromyces* 是一种研究较少的病原菌,但仍有研究表明 *Talaromyces* 可引起多种植物病害。Stošić等^[23-24]发现, *T. minioluteus* 与 *T. rugulosus* 可引起梨、洋葱、番茄和橙子的腐烂;Liu等^[25]的研究发现, *T. funiculosus* 可引起玉米穗腐病,从而降低玉米品质与产量。感病样本中拉恩氏菌属(*Rahnella*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、*Cystobasidium* 含量显著增加。据报道, *Rahnella aquatilis* 会导致鲫鱼病害^[26], *Rahnella* sp. 会引起伊朗黑杨溃疡病^[27],假单胞属能引起烟草细菌性角斑病、野火病^[5,10]。目前尚未有 *Cystobasidium* 致病的报道。考虑到以往

研究中病害组织相对健康组织丰度显著提高的属均有病原菌种被报道,因此,下一步需要选择性分离拉恩氏菌属、假单胞菌、*Cystobasidium* 和蓝状菌属,并遵循科赫氏法则进行回接试验以确认病原菌。

感病烟苗相对于健康烟苗的假单胞菌丰度呈增加趋势。有研究报道,假单胞菌既可作为病原菌危害植物健康,如烟草野火病^[28],也可作为有益菌诱导寄主植株产生抗性^[29]。假单胞菌在未知真菌侵染植物的过程中所起的作用还有待下一步验证。

参考文献:

- [1] 徐新利. 烟草苗期病害类型及防治[J]. 河南农业, 2004(4): 29.
- [2] HOU D W, LIAN T X, GUO G Y, et al. Integration of Microbiome and Koch's Postulates to Reveal Multiple Bacterial Pathogens of Whitish Muscle Syndrome in Mud Crab, *Scylla Paramamosain*[J]. Microbiome, 2023, 11(1): 155.
- [3] GUO J J, MOHAMAD O A A, WANG X L, et al. Editorial: Microbiome Associated with Plant Pathogens, Pathogenesis, and Their Applications in Developing Sustainable Agriculture[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1423961.
- [4] 向立刚, 汪汉成, 郑苹, 等. 赤星病烤后烟叶内生及叶际真菌分析[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(4): 93-100.
- [5] 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.
- [6] HUANG Y, WANG H C, CAI L T, et al. Phyllospheric Microbial Composition and Diversity of the Tobacco Leaves Infected by *Didymella segeticola*[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 699699.
- [7] 黄宇, 汪汉成, 陈乾丽, 等. 感染白粉病烟株叶片真菌的群落结构与多样性[J]. 贵州农业科学, 2020, 48(5): 54-58, 2.
- [8] 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, 2023, 56(10): 1-10.
- [9] 陈乾丽, 李忠, 汪汉成, 等. 烤后不同霉变程度烟叶际真菌群落组成与多样性分析[J]. 微生物学报, 2019, 59(12): 2401-2409.
- [10] 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.
- [11] 曹原, 韩善捷, 李捷, 等. 花期杭白菊植株引诱菊小长管蚜的嗅觉和视觉线索及应用[J]. 生态学报, 2024, 44(6): 2609-2620.
- [12] CHAKRABORTY S, SAHA A, NEELAVAR ANANTHRAM A. Comparison of DNA Extraction Methods for Non-Marine Molluscs: Is Modified CTAB DNA Extraction Method More Efficient than DNA Extraction Kits? [J]. 3 Biotech, 2020, 10(2): 69.
- [13] ZHOU X, LIU X Y, LIU M Y, et al. Comparative Evaluation of 16S rRNA Primer Pairs in Identifying Nitrifying Guilds in Soils under Long-Term Organic Fertilization and Water Management[J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1424795.
- [14] MAN B Y, WANG H M, YUN Y, et al. Diversity of Fungal Communities in Heshang Cave of Central China Revealed by Mycobiome-Sequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1400.
- [15] LUOC, TSEMENTZI D, KYRPIDES N, et al. Direct comparisons of Illumina vs. Roche 454 sequencing technologies on the same microbial community DNA sample[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30087.
- [15] LUO C W, TSEMENTZI D, KYRPIDES N, et al. Direct Comparisons of Illumina Vs. Roche 454 Sequencing Technologies on the Same Microbial Community DNA Sample[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30087.

- [16] MCARDLE B H, ANDERSON M J. Fitting Multivariate Models to Community Data: a Comment on distance-Based Redundancy Analysis[J]. Ecology, 2001, 82(1): 290-297.
- [17] MINCHIN P R. An Evaluation of the Relative Robustness of Techniques for Ecological Ordination[J]. Vegetatio, 1987, 69(1): 89-107.
- [18] 李健, 王小蒙. 基于 R 语言的数据挖掘工具的设计[J]. 内蒙古科技与经济, 2017(24): 58-59.
- [19] 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.
- [20] 张笑宇, 段宏群, 芦阿虔, 等. 健康烟田与易感黑胫病烟田烟株不同生长时期根际土壤微生物区系变化规律[J]. 河南农业科学, 2018, 47(3): 63-69.
- [21] 郭涛, 汪汉成, 余知和, 等. 烟草野火病叶际微生物群落结构与多样性[J]. 广西植物, 2024, 44(10): 1894-1904.
- [22] 刘亭亭, 李文红, 汪汉成, 等. 烤烟感病苗与健康苗根围基质微生物群落结构及其多样性[J]. 贵州农业科学, 2022, 50(4): 86-96.
- [23] STOŠIĆ S, RISTIĆ D, SAVKOVIĆŽ, et al. *Penicillium* and *Talaromyces* Species as Postharvest Pathogens of Pear Fruit (*Pyrus communis*) in Serbia[J]. Plant Disease, 2021, 105(11): 3510-3521.
- [24] STOŠIĆ S, RISTIĆ D, GAŠIĆ K, et al. *Talaromyces minioluteus*: New Postharvest Fungal Pathogen in Serbia[J]. Plant Disease, 2020, 104(3): 656-667.
- [25] LIU S S, WANG J H, GUO N, et al. *Talaromyces Funiculosus*, a Novel Causal Agent of Maize Ear Rot and Its Sensitivity to Fungicides[J]. Plant Disease, 2021, 105(12): 3978-3984.
- [26] LÜ A J, WANG R X, HU X C, et al. First Report of *Rahnella Aquatilis* Infection in Crucian Carp *Carassius Auratus* in China[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2017, 123(3): 205-212.
- [27] MORADI-AMIRABAD Y, KHODAKARAMIAN G. First Report of Bleeding Canker Caused by *Rahnella* sp. on *Populus nigra* in Iran[J]. New Disease Reports, 2020, 41(1): 37.
- [28] 姜军, 汪汉成, 蔡刘体, 等. 7.2 亿 CFU/g 噬泰多抗复合微生物菌剂对烟草靶斑病和野火病的防效研究[J]. 现代农业科技, 2023(5): 113-115, 119.
- [29] DE MEYER G, HÖFTE M. Salicylic Acid Produced by the *Rhizobacterium Pseudomonas Aeruginosa* 7NSK2 Induces Resistance to Leaf Infection by *Botrytis Cinerea* on Bean[J]. Phytopathology, 1997, 87(6): 588-593.

责任编辑 杨光明