

健康与感染青枯病烟株根际土壤与茎秆真菌群落结构与多样性

向立刚^{1,2}, 郭华^{3,4}, 周浩^{1,2}, 谢红炼²,
蔡刘体^{2*}, 汪汉成^{2,3*}, 丁伟³, 余知和^{1*}

(1. 长江大学生命科学学院, 荆州 434025; 2. 贵州省烟草科学研究院, 贵阳 550081;
3. 西南大学植物保护学院, 重庆 400715; 4. 贵州省疾病预防控制中心, 贵阳 550004)

摘要 为研究感染青枯病后烟株根际土壤与茎秆真菌群落结构与多样性的变化, 对健康和感染青枯病烟株的根际土壤、病株茎秆发病组织和健康烟株茎秆健康组织等样品中真菌 ITS 区的 rDNA 进行了 PCR 扩增、用 Illumina MiSeq 测序技术对扩增 DNA 片段进行高通量测序, 并分析不同样品的真菌群落组成与多样性。结果表明, 所有烟株根际土壤中优势门为子囊菌门 Ascomycota 和接合菌门 Zygomycota; 所有茎秆样品中优势门为担子菌门 Basidiomycota 和子囊菌门。在属水平, 被孢霉属 *Mortierella*、镰刀菌属 *Fusarium* 和隐球菌属 *Cryptococcus* 为所有土壤中的主要菌属, *Boeremia* 主要存在于发病烟株根际土壤中, 而木霉属 *Trichoderma* 主要存在于健康烟株根际土壤。发病茎秆病害组织中优势属为小画线壳属 *Monographella*、隐球菌属、鬼伞属 *Coprinopsis* 和赤霉属 *Gibberella*; 发病茎秆病健交界处组织中优势属为隐球菌属、红酵母属 *Rhodotorula* 和小画线壳属。健康烟株茎秆组织中优势属为隐球菌属、链格孢属 *Alternaria* 和红酵母属; 健康烟株中与发病茎秆病健交界处组织等高茎秆中优势属为镰刀菌属、隐球菌属、链格孢属和 *Gibellulopsis*。青枯菌侵染烟株后根际土壤、发病茎秆病害组织和发病茎秆病健交界处组织的真菌群落中物种丰富度与多样性均显著提高, 且发病茎秆病害组织与发病茎秆病健交界处组织真菌群落的变化大于根际土壤。研究结果为烟草青枯病的生物防治提供了参考。

关键词 Illumina 高通量测序; 真菌多样性; 群落结构; 烟草青枯病; 茄科劳尔氏菌

中图分类号: S 435.72 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019208

Fungal community structure and diversity of the rhizosphere soil and stems of healthy and diseased tobacco plants infected with bacterial wilt

XIANG Ligang^{1,2}, GUO Hua^{3,4}, ZHOU Hao^{1,2}, XIE Honglian², CAI Liuti^{2*},
WANG Hancheng^{2,3*}, DING Wei³, YU Zhihe^{1*}

(1. College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, China; 2. Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China; 3. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China; 4. Guizhou Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China)

Abstract In order to study the changes of fungal community structure and diversity in the rhizosphere soil and stem tissue of tobacco plants infected with bacterial wilt, we amplified the rDNA of fungal ITS region in the rhizosphere soil, diseased stem tissue and symptomatic-asymptomatic junction stem tissue, as well as the rhizosphere soil and stem tissue of healthy tobacco plants. The amplified fragments were sequenced using Illumina MiSeq sequencing technique. Then the fungal community structure and diversity in different samples of healthy and diseased tobacco plants were analyzed. The results showed that the dominant phyla in rhizosphere soil samples of all the tested tobacco plants were Ascomycota and Zygomycota, and the dominant phyla in stem tissue samples were Basidiomycota and Ascomycota. *Mortierella*, *Fusarium* and *Cryptococcus* were the main fungal genera in all rhi-

收稿日期: 2019-04-23

修订日期: 2019-07-08

基金项目: 中国博士后科学基金(2017M610585); 中国烟草总公司科技项目(110201601025(LS-05), 110201502003); 贵州省科技厅优秀青年人才培养计划(黔科合平台人才[2017]5619); 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(201711, 201714, 2019014)

* 通信作者 E-mail: 蔡刘体 cai-liuti01@163.com; 汪汉成 xiaobaiyang126@hotmail.com; 余知和 zhiheyu@hotmail.com

zosphere soil samples. *Boeremia* mainly existed in the rhizosphere soil of diseased tobacco plants, while *Trichoderma* mainly existed in that of the healthy tobacco plants. *Monographella*, *Cryptococcus*, *Coprinosia* and *Gibberella* were dominant genera in the diseased stem tissues; *Cryptococcus*, *Rhodotorula* and *Monographella* were dominant genera in the symptomatic-asymptomatic junction stem tissue. In the healthy tobacco plants, the dominant genera were *Cryptococcus*, *Alternaria* and *Rhodotorula* in healthy stem tissues, and *Fusarium*, *Cryptococcus*, *Alternaria* and *Gibellulopsis* in the healthy stem tissue at the same height with the symptomatic-asymptomatic junction stem tissue. Fungal richness and diversity in the rhizosphere soil, diseased stem tissue and symptomatic-asymptomatic junction stem tissue increased significantly after bacterial wilt infection. These results provided a reference for biological control of tobacco bacterial wilt.

Key words Illumina high-throughput sequencing; fungal diversity; community structure; tobacco bacterial wilt; *Ralstonia solanacearum*

由茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的烟草青枯病是一种细菌性土传维管束病害^[1]。其病原菌致病力强, 寄主范围广, 能够侵染包括烟草、桑树、番茄、马铃薯等在内的 50 多个科的 450 余种植物^[2]。它主要在土壤和遗落于土壤的植物残体上越冬^[3], 也可在杂草根部或根际土壤中存活, 通过次生根的根冠或根茎伤口进入木质部, 然后迁移至维管束中蔓延^[4-5], 同时分泌大量胞外多糖堵塞导管, 阻碍植物体水分和养分的传输, 最终导致植株萎蔫、枯萎和死亡^[6-7]。近年来, 烟草青枯病分布范围逐渐扩大, 并与根结线虫病、黑胫病等根茎类病害混合发生^[8], 防治难度与日俱增。

关于茄科劳尔氏菌侵染植物后导致植物感病部位微生物群落结构和多样性的变化已有诸多报道。郑雪芳等^[9]报道, 茄科劳尔氏菌的侵染能够使番茄根际土壤微生物(细菌和真菌)总量增加。方树民等^[10]报道烟草青枯病菌在植株根部定殖后能够导致根部腐烂, 加剧腐生菌在植物根部的定殖。施河丽等^[11]报道感染青枯病烟株根际土壤中芽胞杆菌属和链霉菌属等有益菌减少, 而劳尔氏菌属和 *Ru- daea* 等病原菌增加。除青枯菌外, 其他病原菌的侵染同样能够导致发病植株微生物群落结构与多样性发生改变。罗路云等^[12]报道南瓜白粉病菌可以改变南瓜叶际细菌群落结构、影响细菌群落多样性, 随着病情等级的提高, Alpha 多样性呈现先降后升的趋势。刘海洋等^[13]报道自然重病棉田土壤中真菌 OTU 数量、丰度均高于轻病或无病田, 而真菌多样性降低。蒋景龙等^[14]研究表明西洋参根腐病病株与健株根际土壤微生物组成具有显著性差异, 其中红游动菌属 *Rhodoplanes*、*Kaistobacter*、鞘脂菌属 *Sphingobium* 等可能是引起西洋参根腐病发生的关键菌群。赵玉美等^[15]报道云南省 18 个县(市)的感

病核桃枝干上真菌总数和多样性存在较大差异。

茄科劳尔氏菌通常分布于土壤, 但当烟株发病后其迅速向茎秆等地上部位扩散, 从而破坏烟株整体微生态环境的平衡, 加速烟株的衰老与死亡。笔者前期对健康与感染青枯病烟株不同部位细菌群落结构与多样性进行了系统分析; 但细菌仅是生态系统中的一类微生物, 真菌作为生态系统中的主要分解者^[16], 在促进生态系统物质循环等方面具有重要作用, 相比细菌, 其对于土壤环境的变化更为敏感, 因此, 真菌群落结构的动态变化可以指示土壤生态变化规律^[17]。然而有关烟株感染青枯病后地上茎秆部位真菌群落结构和多样性的变化却鲜有报道。高通量测序是目前研究环境微生物多样性的重要手段, 如今已被广泛用于土壤^[18-19]、水体^[20-21]、空气^[22-23]、肠道^[24-25]等微生物生态系统的微生物多样性研究。对健康与感染青枯病烟株根际土壤、发病茎秆病害组织、发病茎秆病健交界处组织以及未发病茎秆组织中真菌群落结构与多样性进行深入分析, 探明青枯病的发生对烟株各部位真菌群落的影响, 以期揭示各部位真菌群落在青枯病发生过程中的微生态作用, 为青枯病生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2016 年 8 月, 于贵州省黔西南州兴义市烟草公司白瓦窑基地(24°57'8"N, 104°53'9"E), 选取烟草青枯病发病严重的烟田(种植品种‘K326’)进行样品采集。随机选取 3 株青枯病发病严重的烟株, 去除地表土壤后, 将烟株连同根部土壤一同拔出, 去掉烟株根部主体土壤, 抖落并收集须根 2 mm 范围的根际土壤, 命名为病株根际土壤组(GT), 编号为 T1、T2 和 T3。用经 75%乙醇消毒的剪刀, 从每个发病

烟株茎秆发病部位剪取病害组织 5 cm 的样品,命名为病株茎秆组(GJ),编号为 J1、J2 和 J3;从每个发病烟株茎秆发病部位剪取病健交界处组织 5 cm 的样品,命名为病株病健交界处茎秆组(GJ2),编号为 J4、J5 和 J6。同样,在该区未发病烟田中随机选取 3 株健康烟株,参照上述方法分别采集根际土壤样品和茎秆样品,分别命名为健株根际土壤组(ZT),编号为 Ta、Tb 和 Tc;健株茎秆组(ZJ),编号为 Ja、Jb 和 Jc;与病健交界处组织样品等高的健株茎秆组(ZJ2),样本编号为 Jd、Je 和 Jf。所有样品置入低温保藏箱,并迅速带回实验室,−80℃冰箱保存、备用。

1.2 样品 DNA 提取、扩增及测序

土壤样品:取充分混匀的土壤 0.50 g,采用土壤样品 DNA 提取试剂盒(Omega Bio-tek, D5625-02)提取样品 DNA。烟株茎秆样品:去除茎秆表皮后取 1 cm 长的茎秆,其中病健交界茎秆组织中发病组织与健康组织各占 0.5 cm,茎秆经剪碎后放入研钵中加入液氮研磨至粉状,采用植物组织 DNA 提取试剂盒(Qiagen, 69104)提取 DNA,具体步骤按照操作说明进行。利用 NanoDrop 2000 检测抽提 DNA 的浓度和纯度, A_{260}/A_{280} 要求在 1.8~2.0 之间。

1.3 ITS 文库构建及高通量测序

以样品 DNA 为模板,采用引物 ITS1F (5'-CT-TGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3') 和 ITS2R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 扩增目标片段的 ITS1-ITS2 区。PCR 扩增体系为 20 μ L: 5 \times FastPfu 缓冲液 4 μ L, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L, 5 μ mol/L 上、下游引物各 0.8 μ L, FastPfu 聚合酶 0.4 μ L, 20 ng/ μ L 模板 DNA 1 μ L, BSA(牛血清白蛋白) 0.2 μ L, 最后用灭菌的 ddH₂O 将反应体系补至 20 μ L。PCR 反应程序参数:95℃预变性 3 min; 95℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,纯化后送至上海美吉生物医药科技有限公司,利用 Illumina 公司 Miseq PE300 平台进行高通量测序。

1.4 测序数据处理与统计分析

原始测序序列使用 Trimmomatic 软件进行质控:首先过滤 reads 尾部质量值在 20 以下的碱基,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,过滤质控后 50 bp 以下的 reads,去除含 N 碱基的 reads;然后根据 PE

reads 之间的 overlap 关系,将成对 reads 拼接成一条序列,overlap 最小长度为 10 bp;拼接序列的 overlap 区允许最大错配比率为 0.2,删除不符合序列;最后根据序列首尾两端的 barcode 和引物区分样品,并调整序列方向,barcode 允许错配数为 0,最大引物错配数为 2。使用 FLASH 软件进行拼接。使用 UPARSE 软件(version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>),根据 97% 相似度对序列进行 OTU (operational taxonomic units) 聚类,并在聚类过程去除单序列和嵌合体。利用 RDP classifier (<http://rdp.cme.msu.edu/>)对每条序列进行物种分类注释,比对 Unite(Release 6.0 <http://unite.ut.ee/index.php>) 真菌数据库,设置置信度阈值为 70%。

通过 Alpha 多样性分析,可以反映微生物群落中物种的丰富度与多样性。反映样本真菌群落物种丰富度的指数包括 S_{obs} 指数、Chao1 指数。 S_{obs} 指数为实际观测到的 OTU 数,Chao1 指数是利用 Chao1 算法估计样本中所含 OTU 数目的指数, S_{obs} 指数、Chao1 指数越大群落物种丰富度越高。Shannon 指数越大或 Simpson 指数越小则群落物种多样性越高。Shannoneven 指数、Simpson even 指数是基于 Shannon、Simpson 指数来计算样本真菌群落物种结构的均匀度,其值越大群落物种均匀度越高。Coverage 指数表示测序的覆盖度,其值越高样品中序列被测出的概率越高,测序结果的真实性越高。Alpha 多样性指数采用软件 Mothur (version v. 1.30.1) 计算。

$$(1) S_{Chao1} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

S_{obs} = 实际观测到的 OTU 数; n_1 = 只含有一条序列的 OTU 数目; n_2 = 只含有两条序列的 OTU 数目。

$$(2) H_{Shannon} = - \sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

S_{obs} = 实际观测到的 OTU 数目; n_i = 第 i 个 OTU 所含的序列数; N = 所有的序列数。

$$(3) D_{Simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

S_{obs} = 实际观测到的 OTU 数目; n_i = 第 i 个 OTU 所含的序列数; N = 所有的序列数。

$$(4) C = 1 - \frac{n_1}{N}$$

C = Coverage(覆盖度), n_1 = 只含有一条序列的

OTU 数目; N = 抽样中出现的总序列数目。

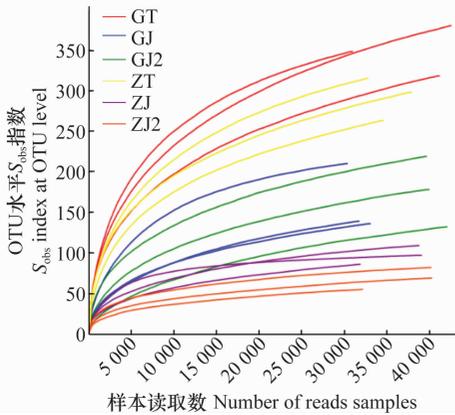
Venn 图用于统计多组样本中共有和独有的属和 OTU 数目, 表示土壤与茎秆样本的属和 OTU 数目组成相似性及重叠情况。群落 Bar 图中可以直观呈现两方面信息: 1) 各样本在门、属上含有何种真菌; 2) 样本中各真菌的相对丰度。Heatmap 图是以颜色梯度来表征二维矩阵中的数据大小, 并呈现群落物种组成信息。根据样本间丰度的相似性进行聚类, 可使高丰度和低丰度的物种分块聚集, 通过颜色变化与相似程度来反映不同分组(或样本)在各分类水平上群落组成的相似性和差异性, 所用工具为 R 语言 vegan 包。以上分析均在上海美吉生物医药科

技有限公司 I-Sanger 生信云网站平台 (<http://www.i-sanger.com/project/index.html>) 完成。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列测序深度分析

稀释曲线 (rarefaction curve) 用来检查测序结果是否合理, 测序深度是否覆盖了试验样品中所有测序对象。本试验中 6 组共 18 个样品在测序深度为 25 000 时曲线就趋于平缓(图 1), 说明测序深度已经足够, 测序结果中包含了大多数真菌类群, 基本可以反映样品中绝大多数的真菌多样性信息, 进一步测序对新 OTU 的产生贡献不大。



GT: 病株根际土壤组; GJ: 病株发病茎秆组; GJ2: 病株病健交界处茎秆组; ZT: 健康根际土壤组; ZJ: 健康茎秆组; ZJ2: 健康与病健交界处茎秆等高的健康茎秆组
 GT: Rhizosphere soil group of tobacco plants infected with bacterial wilt; GJ: Stem tissue group of tobacco plants infected with bacterial wilt; GJ2: Symptomatic-asymptomatic junction stem tissue group; ZT: Rhizosphere soil group of healthy tobacco plants; ZJ: Stem tissue group of healthy tobacco plants; ZJ2: Stem tissue group of healthy plants at the equal height with symptomatic-asymptomatic junction stem tissue

图 1 稀释曲线 (OTU 水平 S_{obs} 指数)

Fig. 1 Rarefaction curve (S_{obs} index at OTU level)

2.2 数据质控

原始序列经优化处理后, 发病组中 9 个样本共得到 331 974 条高质量序列片段, 82 433 020 个碱基, 单一样本序列数在 30 332~42 899 条之间, 序列平均长度为 249 bp; 健康烟株组中 9 个样品共得到 327 898 条高质量序列片段, 83 599 289 个碱基, 单一样品序列数在 31 756~40 333 条之间, 序列平均长度为 254 bp。

2.3 OTU 聚类分析

在 97% 的相似度水平对样品序列进行 OTU 聚类, 感染青枯病的烟株 3 个不同部位样品共鉴定得出真菌 7 个门, 25 个纲, 66 个目, 124 个科, 237 个属, 346 个种, 738 个 OTU; 健康烟株 3 个不同部位样品共鉴定得出真菌 7 个门, 25 个纲, 61 个目, 113 个科, 215 个属, 312 个种, 582 个 OTU(表 1)。

表 1 健康烟株与发病烟株根际土壤与茎秆样品中真菌群落各级别分类群的数量

Table 1 Numbers of different taxonomic groups in the fungal communities in rhizosphere soil and stem samples of the healthy tobacco plants and the tobacco plants infected with bacterial wilt

样品组 Sample group	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	操作分类 单元 OTU	样品组 Sample group	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	操作分类 单元 OTU
ZT	7	24	61	110	185	258	469	GT	7	24	61	109	205	290	591
ZJ	4	17	32	52	84	114	180	GJ	5	19	45	80	127	169	314
ZJ2	4	17	29	46	66	83	122	GJ2	7	23	56	100	185	258	469
总计 Total	7	25	61	113	215	312	582	总计 Total	7	25	66	124	237	346	738

2.4 真菌群落中物种多样性指数分析

如表 2 所示,所有组别样本的覆盖度指数均在 0.99 以上,表明样本中序列被检测出的概率高,测序结果能够表示样本中实际的真菌群落结构。健康烟株根际土壤与茎秆样品中真菌群落 S_{obs} 指数和 Chao1 指数均低于发病烟株对应部位,表明烟株发病后各个

部位真菌物种丰富度增加;多样性指数显示,感病后烟株根际土壤与茎秆较健康烟株 Shannon 指数升高, Simpson 指数降低,因此青枯病导致烟株真菌物种多样性增加;群落物种均匀度方面,烟株感染青枯病后根际土壤与发病茎秆组织中真菌物种均匀度增加,而病健交界处茎秆组织真菌物种均匀度降低。

表 2 不同样品组真菌群落中 OTU 的 Alpha 多样性指数

Table 2 Alpha diversity index of OTUs in the fungal communities of different sample groups

样品组 Sample group	丰富度指数 Richness index		均匀度指数 Evenness index		多样性指数 Diversity index		覆盖度指数 Coverage index
	S_{obs}	Chao1	Shannoneven	Simpsoneven	Shannon	Simpson	Coverage
ZT	292±27	387±23	0.452±0.025	0.019±0.003	2.57±0.18	0.181±0.033	0.998±0.001
ZJ	97±12	137±25	0.287±0.054	0.025±0.007	1.31±0.26	0.433±0.143	0.999±0.001
ZJ2	69±14	92±11	0.337±0.047	0.044±0.005	1.43±0.26	0.343±0.076	0.999±0.001
GT	349±31	445±33	0.476±0.035	0.022±0.008	2.78±0.16	0.142±0.037	0.997±0.001
GJ	162±42	209±34	0.322±0.023	0.019±0.007	1.63±0.15	0.352±0.086	0.999±0.001
GJ2	176±44	238±58	0.307±0.141	0.018±0.006	1.61±0.79	0.386±0.255	0.999±0.001

2.5 真菌群落基本组成和结构分析

如图 2 所示,在门水平,发病烟株与健康烟株根际土壤中的主要真菌为子囊菌门 Ascomycota、接合菌门 Zygomycota 和担子菌门 Basidiomycota,所有

茎秆组织样品中的主要真菌为子囊菌门和担子菌门。真菌种类上健康烟株与发病烟株各部位无显著性差异,二者的差异主要集中于优势菌门的相对丰度,不同组间各优势菌门相对丰度差异较大。

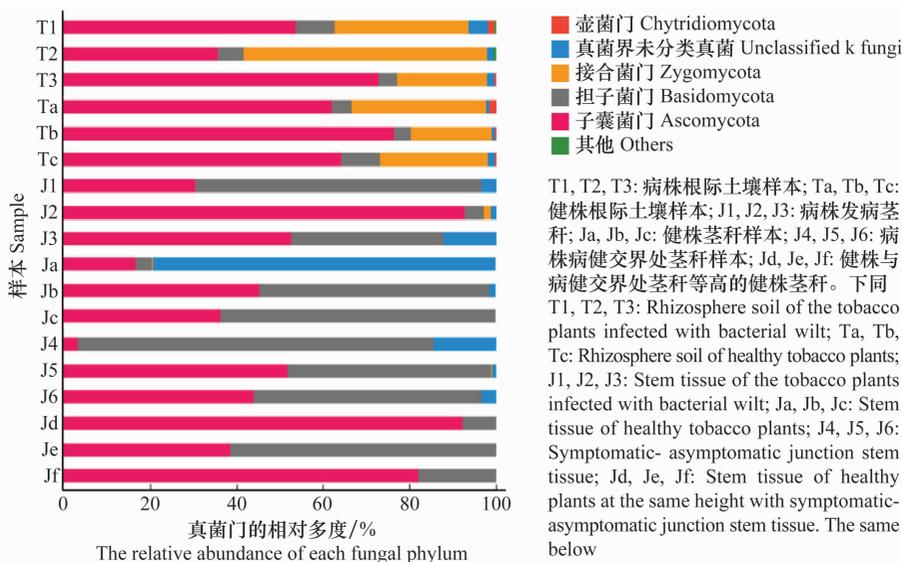


图 2 不同样品中各真菌门的相对丰度

Fig. 2 The relative abundance of each fungal phylum in different samples

在属水平(图 3),发病烟株根际土壤中的主要真菌为被孢霉属 *Hirsutella*、镰刀菌属 *Fusarium*、*Boeremia*、隐球菌属 *Cryptococcus*、小画线壳属 *Monographella*、链格孢属 *Alternaria*,相对丰度分别为 28.61%、24.38%、6.34%、4.28%、3.20%、2.10%;发病烟株发病茎秆中的主要真菌为小画线壳属、隐球菌属、*Coprinopsis*、镰刀菌属,相对丰度分别为

33.25%、22.12%、11.82%、9.64%;发病烟株病健交界茎秆的主要真菌为隐球菌属、红酵母属 *Rhodotorula*、小画线壳属、镰刀菌属、链格孢属,相对丰度分别为 33.09%、25.50%、15.97%、4.32%、2.74%。健康烟株根际土壤中的主要真菌为镰刀菌属、被孢霉属、隐球菌属、链格孢属、小画线壳属,相对丰度分别为 42.05%、24.70%、3.13%、2.31%、

1.15%；健康烟株茎秆中主要的真菌为隐球菌属、链格孢属、红酵母属、小画线壳属，相对丰度分别为33.52%、24.43%、4.81%、1.15%；与发病烟株病健

交界等高的健康烟株茎秆主要的真菌为镰刀菌属、隐球菌属、链格孢属、红酵母属，相对丰度分别为45.43%、23.86%、19.93%、2.29%。

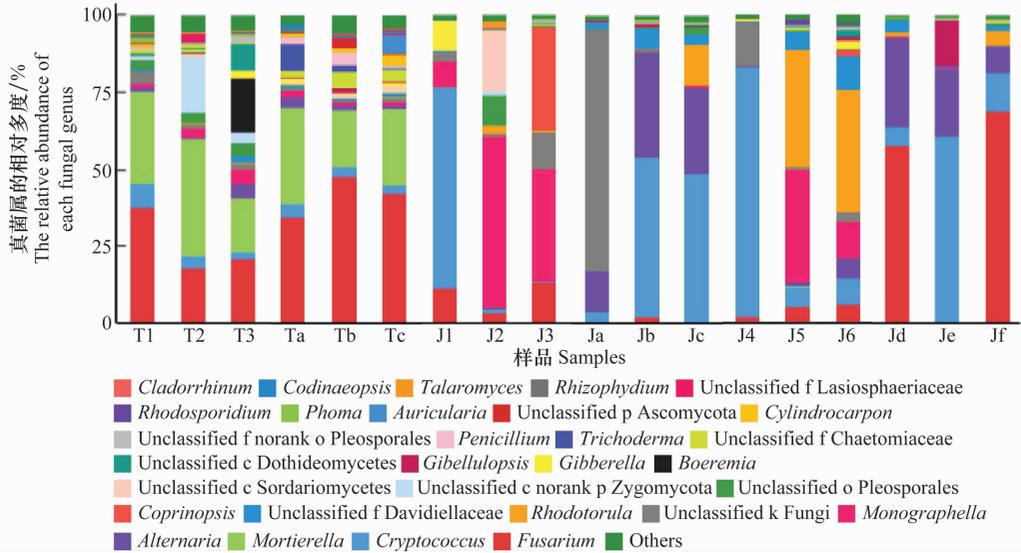


图3 不同样品中各真菌属的相对多度

Fig. 3 The relative abundance of each fungal genus in different samples

如图4所示，发病烟株根际土壤中独有的属共61个，主要有：节担菌属 *Wallemia*、光盖伞属 *Psilocybe*、*Wardomyopsis*、子囊壳属 *Coniochaeta*、被毛孢属和壳二孢属 *Ascochyta* 等；健康烟株根际土壤独有的属为41个，主要有：*Trechispora*、单端孢属 *Trichothecium*、*Sarocladium*、*Conlarium*、拟青霉属 *Paecilomyces* 和 *Cladorrhinum*；二者共有的属共144个，主要有：镰刀菌属、隐球菌属、*Boeremia*、*Cladophialophora*、*Pseudozyma* 和 *Arniium* 等。发病烟株茎秆组织独有的属共68个，主要有：鬼伞属 *Coprinopsis*、*Cladophialophora*、*Cercophora*、*Codinaeopsis*、*Rhizopagus* 和 *Cystofilobasidium* 等；健康烟株茎秆组织独有的属有25个，主要包含：*Cordyceps*、盾壳霉属

Coniothyrium、枝孢属 *Cladosporium*、*Gymnopus*、*Bipolaris* 和匍柄霉属 *Stemphylium* 等；二者共有的属为59个，包括：小画线壳属、隐球菌属、赤霉属 *Gibberella*、红冬孢酵母属 *Rhodosporeidium*、红酵母属和链格孢属等。发病烟株病健交界处组织独有的属为节担菌属、*Ilyonectria*、*Wardomyopsis*、*Cladophialophora*、*Rhizopagus* 和 *Cystofilobasidium* 等80个属；健康烟株与发病茎秆处组织等高部位茎秆独有的属为 *Kernia*、枝孢属、平脐蠕孢属 *Bipolaris*、可可毛色二孢 *Lasiodiplodia*、*Zasmidium* 和假丝酵母属 *Candida* 等9个属；二者共有的真菌属为：隐球菌属、红酵母属、小画线壳属、镰刀菌属、曲霉属 *Aspergillus* 和木霉属 *Trichoderma* 等57个属。



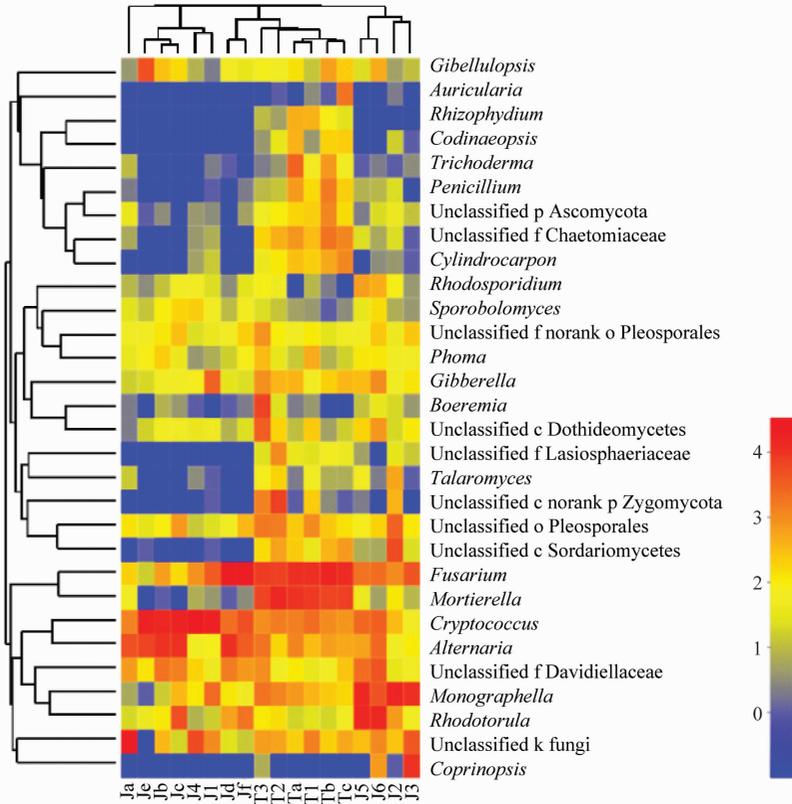
GT: 病株根际土壤组; GJ: 病株发病茎秆; GJ2: 病株病健交界处茎秆组; ZT: 健株根际土壤组; ZJ: 健株茎秆组; ZJ2: 健株与病健交界处茎秆等高的健株茎秆组
 GT: Rhizosphere soil group of the tobacco plants infected with bacterial wilt; GJ: Stem tissue group of the tobacco plants infected with bacterial wilt; GJ2: Symptomatic-asymptomatic junction stem tissue group; ZT: Rhizosphere soil group of healthy tobacco plants; ZJ: Stem tissue group of healthy tobacco plants; ZJ2: Stem tissue group of healthy plants at the equal height with symptomatic-asymptomatic junction stem tissue

图4 发病烟株与健康烟株不同部位真菌群落 Venn 图

Fig. 4 Venn diagrams of fungal communities in different parts of the healthy tobacco plants and the tobacco plants infected with bacterial wilt

各样品前 30 个属相对丰度热图如图 5 所示,通过颜色的变化能直观表示出属相对丰度的高低。热图上部样本层级聚类树表明,根际土壤与茎秆中真菌群落结构与多样性存在显著性差异。本次试验的 18 个样本共聚集为 4 大类:健康烟株茎秆样本 Ja 与其余样本间差异最大,因此单独聚为一类;Je、Jb、Jc、J4 和 J1 共 5 个样本聚集为一类;Jd、Jf、T3、T2、Ta、T1、Tb 和 Tc 共 8 个样本聚集为一类;J5、J6、J2

和 J3 共 4 个样本聚集为一类。健康烟株与发病烟株根际土壤样本间无明显差异,表明发病对根际土壤真菌群落结构的影响较小。健康烟株与发病烟株茎秆样本间存在显著差异,发病茎秆(J1 除外)与健康茎秆间的样本距离差异显著,病健交界茎秆(J4 除外)与健康茎秆间样本距离相差明显。因此青枯病感染烟株后主要影响茎秆部位真菌群落结构及多样性,而对于根际土壤真菌的影响程度较小。



T1, T2, T3: 病株根际土壤样本; J1, J2, J3: 病株发病茎秆; J4, J5, J6: 病株病健交界处茎秆样本; Ta, Tb, Tc: 健康烟株根际土壤样本; Ja, Jb, Jc: 健康茎秆样本; Jd, Je, Jf: 健康与病健交界处茎秆等高的健康茎秆

T1, T2, T3: Rhizosphere soil of the tobacco plants infected with bacterial wilt; J1, J2, J3: Stem tissue of the tobacco plants infected with bacterial wilt; J4, J5, J6: Symptomatic-asymptomatic junction stem tissue; Ta, Tb, Tc: Rhizosphere soil of healthy tobacco plants; Ja, Jb, Jc: Stem tissue of healthy tobacco plants; Jd, Je, Jf: Stem tissue of healthy plants at the same height with symptomatic-asymptomatic junction stem tissue

图 5 不同样品中各真菌属的相对多度热图

Fig. 5 Heat map of the relative abundance of each fungal genus in different samples

3 讨论

本文数据质控分析中,发病组 9 个样品获得高质量序列片段数目高于健康烟株组 9 个样品,表明发病后烟株根际土壤和茎秆中真菌的数目大于健康烟株对应部位。所有扩增样品产物长度为 249~254 bp,略高于 ITS1-ITS2 区域的实际长度。病害的发生与植株各部位微生物群落结构密切相关,微生物群落结构健康稳定,即病原菌少,有益菌多,微生物多样性高,能够一定程度上阻止或延缓病害的侵袭^[26]。此结论往往是基于健康的环境或植物体

而言。本研究所用部分样品取自发病严重的烟株,因此 OTU 聚类分析中发病后烟株根际土壤、发病茎秆组织及病健交界处茎秆组织 3 个部位真菌种类及数量均明显增加,其中茎秆病健交界处组织真菌种类增加最多,其次为发病茎秆组织,根际土壤中真菌种类增加最少。Alpha 多样性分析表明,发病烟株各部位样品真菌丰富度、均匀度和多样性均高于健康烟株对应部位样品。与真菌种类增加趋势相同,真菌群落中物种多样性同样为病健交界茎秆的增幅最大而根际土壤增幅最小。造成这种结果的原因可能为,劳尔氏菌的侵染可能破坏烟株各部位的

正常组织,从而降低了烟株对真菌的防御能力,使更多外界环境中的真菌侵入烟株。因此,发病后烟株各部位外来真菌多样性逐渐增加。

青枯病的发生导致烟株根际土壤子囊菌门相对丰度显著降低,接合菌门和担子菌门相对丰度显著增加;发病茎秆组织子囊菌门相对丰度增加,担子菌门相对丰富降低,而病健交界处茎秆组织样品的子囊菌门降低,担子菌门增加。宋旭红等发现感染根腐病后黄连根际土壤中子囊菌门、担子菌门和壶菌门的相对丰度显著高于健康土壤^[27],而本研究则是子囊菌门相对丰度降低而担子菌门相对丰度增加,这可能与研究对象及致病菌的差异有关。属水平上,烟草根际土壤的优势真菌为镰刀菌属和被孢霉属,该结果与武俊男等^[28]对长期不同施肥处理的黑土真菌群落研究的结果存在差异。发病后烟株根际土壤中除镰刀菌属外其余主要菌属相对丰度均有增加,其中 *Boeremia* 在健康烟株根际土壤中相对丰度小于 1%,而发病后相对丰度增加到 6.34%。文朝慧等^[29]进行甘肃省马铃薯坏疽病病原鉴定后首次发现 *Boeremia foveata* 可引起马铃薯坏疽病,因此推测 *Boeremia* 可能为烟草上的真菌致病菌,其致病性有待进一步研究。发病茎秆中镰刀菌属、小画线壳属和 *Coprinopsis* 显著增加,隐球菌属和链格孢属相对丰度显著降低。病健交界茎秆中镰刀菌属、链格孢属相对丰度显著降低,隐球菌属、红酵母属和小画线壳属相对丰度显著增加。青枯病的侵染对烟株各部位真菌群落组成的影响不尽相同,可能由于各部位的抗性差异,致使外源真菌对发病烟株不同部位的侵染出现差异。

本研究的结果显示,同一样品组的 3 个样品间真菌群落结构与多样性差异较大,个别组样品的组内差异甚至大于组间的差异。微生物群落结构与多样性受多种因素影响,包括气候条件、土壤类型、人类活动以及营养条件等^[30-31]。本研究所取样品均来自大田,即使同一块田地每株烟的生长环境不尽相同,因此导致本研究中同类样本组内差异较大。虽然同组样本存在一定差异,但发病烟株各部位真菌群落的总体变化趋势一致,能够反映田间感染青枯病烟株不同部位真菌群落结构及多样性的变化情况。笔者前期研究健康与感染青枯病烟株不同部位细菌群落结构与多样性时发现,烟株感染青枯病后根际土壤细菌群落结构的变化大于发病茎秆组织和病健交界处茎秆组织,而本文根际土壤真菌群落变化小于茎秆样本。为何真菌与细菌对于青枯病的侵

染在不同部位表现出截然相反的变化趋势,相关问题有待进一步研究。

参考文献

- [1] 霍沁建,张深,王若焱. 烟草青枯病研究进展[J]. 中国农学通报, 2007(8): 364 - 368.
- [2] WICKER E, GRASSART L, CORANSON-BEAUDU R, et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6790 - 6801.
- [3] 浙江农业大学. 农业植物病理学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1978.
- [4] SIKIROU R, BEED F, EZIN V, et al. Distribution, pathological and biochemical characterization of *Ralstonia solanacearum* in Benin [J]. Annals of Agricultural Sciences, 2017, 62(1): 83 - 88.
- [5] WANG Hancheng, WANG Maosheng, XIA Haiqian, et al. First report of *Fusarium* wilt of tobacco caused by *Fusarium kyushuense* in China [J]. Plant Disease, 2013, 97(3): 424.
- [6] 刘臻真. 烟草青枯菌生理多态性研究及流式细胞术应用初探[D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2012.
- [7] HUSAIN A, KELMAN K A. Relation of slime production to mechanism of wilting and pathogenicity of *Pseudomonas solanacearum* [J]. Phytopathology, 1958, 48: 155 - 165.
- [8] 王新,吴新儒,王卫锋,等. 烟草抗青枯病突变体的室内接种鉴定[J]. 分子植物育种, 2018, 16(19): 6468 - 6475.
- [9] 郑雪芳,刘波,朱育菁. 青枯病植物疫苗对番茄根系土壤微生物群落结构的影响[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 385 - 393.
- [10] 方树民,顾颖,陈玉森,等. 烟草青枯菌在杂草根部的定殖和传病作用[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(5): 72 - 81.
- [11] 施河丽,向必坤,谭军,等. 烟草青枯病发病烟株根际土壤细菌群落分析[J]. 中国烟草学报, 2018, 24(5): 57 - 65.
- [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] 刘海洋,王伟,张仁福,等. 黄萎病不同发生程度棉田土壤中的真菌群落特征分析[J]. 中国农业科学, 2019, 52(3): 455 - 465.
- [14] 蒋景龙,余妙,李丽,等. 西洋参根腐病发生与根际土壤细菌群落结构变化关系研究[J]. 中草药, 2018, 49(18): 4399 - 4407.
- [15] 赵玉美,赵宁,冯小飞,等. 云南核桃感病枝干真菌多样性初步研究[J]. 中国森林病虫, 2017, 36(4): 11 - 16.
- [16] 李刚,范宝莉,文都日乐,等. 呼伦贝尔针茅草原土壤真菌群落结构分析[J]. 土壤学报, 2011, 48(5): 1096 - 1102.
- [17] BAI G, BAO Yuying, DU Guoxin, et al. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with vegetation and soil parameters under rest grazing management in a desert steppe ecosystem [J]. Mycorrhiza, 2013, 23(4): 289 - 301.
- [18] 马懿毓. 民勤退耕区次生草地土壤微生物多样性研究及优势植物根际促生菌资源筛选[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [19] 许艳蕊,方志军,卢晓平,等. 基于高通量测序技术分析使它隆对玉米土壤细菌多样性的影响[J]. 微生物学报, 2017, 57(7): 985 - 993.

2016, 84: 145 - 224.

- [7] BRINK JV D, FACUN K, VRIES M, et al. Thermophilic growth and enzymatic thermostability are polyphyletic traits within Chaetomiaceae [J]. *Fungal Biology*, 2015, 119(12): 1255 - 1266.
- [8] SUN Guangyu, TAN Youjiu, ZHANG Rong. The family Chaetomiaceae from China I. Species of the genus *Chaetomium* [J]. *菌物学报*, 2004, 23(3): 333 - 337.
- [9] MANOLIU A, ANTOHE L, CREANGA DE, et al. The influence of the petroleum ferrofluids upon the cellulolytic fungi *Cheatomium globosum* [J]. *Journal of Magnetism & Magnetic Materials*, 1999, 201(1): 446 - 448.
- [10] SONI R, SANDHU D K, SONI S K. Localisation and optimization of cellulase production in *Chaetomium erraticum* [J]. *Journal of Biotechnology*, 1999, 73(1): 43 - 51.
- [11] SOVTONG K. Application of a new broad spectrum biological fungicide for environmental plant protection [C]// 哈尔滨: 植物病虫害生物防治国际会议论文集, 2000: 8 - 26.
- [12] 马婉琴, 蔡苏, 钱永生, 等. 球毛壳菌引起杭白菊叶枯病的首次报道[J]. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 14(4): 390 - 393.
- [13] 贾艳梅, 同金侠, 杨锦萍, 等. 球毛壳菌对樟子松的侵染规律研究[J]. *陕西林业科技*, 2003(3): 47 - 50.
- [14] 余进, 赵邑, 杨淑霞, 等. 少见致病性毛壳菌形态学及分子生物学特性研究[J]. *临床皮肤科杂志*, 2005, 34(8): 504 - 506.
- [15] 陈利军, 史洪中, 陈月华. 油菜内生球毛壳菌抑菌作用初步测定[J]. *河南农业科学*, 2005(7): 54 - 56.
- [16] 兰楠, 祁高富, 喻子牛, 等. 油菜内生真菌的分离、鉴定及抑菌作用[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(3): 270 - 275.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 188 页)

- [15] ZHANG Y X, ZHANG Z Q, CHEN C P, et al. *Amblyseius cucumeris* (Acari: Phytoseiidae) as a biocontrol agent against *Panonychus citri* (Acari: Tetranychidae) on citrus in China [J]. *Systematic & Applied Acarology*, 2001, 6(1): 35 - 44.
- [16] KAKKAR G, KUMAR V, SEAL D R, et al. Predation by *Neoseiulus cucumeris* and *Amblyseius swirskii* on *Thrips palmi* and *Frankliniella schultzei* on cucumber [J]. *Biological Control*, 2016, 92: 85 - 91.
- [17] 陈霞, 张艳璇, 季洁, 等. 截形叶螨对胡瓜钝绥螨的吸引作用[J]. *蛛形学报*, 2006, 15(2): 98 - 101.
- [18] 蒋洪丽, 王恩东, 吕佳乐, 等. 加州新小绥螨对朱砂叶螨不同螨态的捕食选择性及与拟长毛钝绥螨功能反应比较[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(1): 8 - 13.
- [19] HASSELL M P, ROGERS D J. Insect parasite responses in the development of population model [J]. *Journal of Animal Ecology*, 1972, 41: 661 - 667.
- [20] 徐汝梅. 昆虫种群生态学[M]. 第 2 版. 北京: 北京师范大学出版社, 1990.
- [21] 尚素琴, 郑开福, 张新虎. 巴氏钝绥螨对二斑叶螨的捕食功能反应[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(3): 316 - 320.
- [22] 李美, 符悦冠. 胡瓜钝绥螨室内种群生命表研究[J]. *植物保护*, 2007, 33(2): 84 - 87.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 196 页)

- [20] 张欣, 刘静, 沈国平, 等. 基于高通量测序研究青藏高原茶卡盐湖微生物多样性[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(8): 1834 - 1846.
- [21] 刘强, 赵本宣, 李汝伟, 等. 舟山群岛不同功能区划海域细菌群落结构分析[J]. *微生物学报*, 2018, 58(2): 247 - 263.
- [22] 王丹丹, 林青, 欧提库尔·玛合木提, 等. 塔克拉玛干沙尘暴源区空气细菌群落多样性[J]. *微生物学报*, 2018, 58(8): 1420 - 1430.
- [23] 甄泉, 王雅晴, 洗超凡, 等. 沙尘暴对北京市空气细菌多样性特征的影响[J]. *生态学报*, 2019, 39(2): 717 - 725.
- [24] 黄丽丽, 张艳, 周红, 等. 基于 16S rRNA 高通量测序方法比较新疆冷水鱼肠道中微生物多样性[J]. *食品科学*, 2018, 39(10): 138 - 144.
- [25] 张超. 基于高通量测序研究肉桂精油对肠炎小鼠肠道菌群的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2017.
- [26] 贺纪正, 李晶, 郑袁明. 土壤生态系统微生物多样性-稳定性关系的思考[J]. *生物多样性*, 2013, 21(4): 412 - 421.
- [27] 宋旭红, 谭均, 李隆云, 等. Illumina 高通量测序揭示黄连根腐病根际土壤真菌群落组成及多样性[J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5396 - 5403.
- [28] 武俊男, 刘昱辛, 周雪, 等. 基于 Illumina MiSeq 测序平台分析长期不同施肥处理对黑土真菌群落的影响[J]. *微生物学报*, 2018, 58(9): 1658 - 1671.
- [29] 文朝慧, 何苏琴, 荆卓琼. 甘肃省马铃薯坏疽病原菌鉴定[J]. *植物保护*, 2012, 38(5): 40 - 45.
- [30] 杨瑞红, 赵成义, 王新军, 等. 梭梭和柽柳土壤微生物多样性初步分析[J]. *土壤*, 2016, 48(6): 1120 - 1130.
- [31] FIERER N, LAUBER C L, RAMIREZ K S, et al. Comparative metagenomic, phylogenetic and physiological analyses of soil microbial communities across nitrogen gradients [J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(5): 1007.

(责任编辑: 田 喆)