

张 艺,张兴红,王 丰,等. 代森锰锌对烟草靶斑病的防效及其叶际微生态的影响[J]. 江苏农业科学,2023,51(17):122-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.17.017

代森锰锌对烟草靶斑病的防效及其叶际微生态的影响

张 艺^{1,2}, 张兴红^{1,2}, 王 丰², 郭沫言³, 孙美丽³, 汪汉成²

(1. 贵州大学农学院, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州省烟草科学研究院, 贵州贵阳 550081; 3. 长江大学农学院, 湖北荆州 434025)

摘要:为探究代森锰锌在防控烟草靶斑病过程中对叶际微生态的影响,通过田间药效试验评价了代森锰锌对烟草靶斑病的防效,并采用 Illumina 高通量测序技术分析了代森锰锌对烟叶叶际真菌和细菌群落结构与多样性的影响。代森锰锌 200 g/667 m² 处理 1、3、9 d 时,防效分别为 65.50%、55.31% 和 45.03%。代森锰锌处理 1、3 d 时,降低了感病部位叶际亡隔菌属等 3 种真菌及假单胞属、鞘脂单胞菌属等 6 种细菌的相对丰度;增加了 *Symmetrospora*、*Sampaiozyma*、茎点霉属等 7 种真菌及甲基杆菌属、*Aureimonas* 2 种细菌的相对丰度。代森锰锌处理 1、3 d 时,降低了健康烟叶叶际亡隔菌属、尾孢属等 5 种真菌及甲基杆菌属、*Aureimonas* 等 4 种细菌的相对丰度;但增加了 *Symmetrospora*、铆钉菇属等 4 种真菌及假单胞属等 4 种细菌的相对丰度。处理 18 d 时,降低了亡隔菌属、尾孢属等 3 种真菌及鞘脂单胞菌属等 5 种细菌的相对丰度;但增加了 *Symmetrospora*、铆钉菇属等 6 种真菌及基杆菌属、*Aureimonas* 等 5 种细菌的相对丰度。烟草靶斑病发生初期,代森锰锌 200 g/667 m² 对烟草靶斑病具有一定的防效,代森锰锌施用对烟叶感病与健康部位烟叶真菌和细菌群落结构与多样性均有影响,且随着时间的延长影响逐渐减弱。

关键词:烟草靶斑病;代森锰锌;叶际微生态;立枯丝核菌;防效

中图分类号:S481⁺.9;S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)17-0122-09

烟草靶斑病(tobacco target spot)是由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)引起的一种真菌性病害,有性世代为瓜亡氏革菌[*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk],属于担子菌亚门(Basidiomycotina),亡革菌属(*Thanatephorus*)^[1]。苗期至大田成熟期均可发生。该病害主要危害烟草叶片,叶片被侵染后常出现圆形水渍状斑点,病斑周围有褪绿晕圈,病斑坏死部位易碎,形成穿孔,条件适宜时极易大面积流行成灾,严重影响烟叶产质量^[2-3]。目前,生产上常用包括代森锰锌在内的多种药剂防控烟草靶斑病^[4]。代森锰锌是一种广谱的硫代氨基甲酸酯类保护性杀菌剂,主要作用于菌体内丙酮酸的氧化,施用后在作物表面形成 1 层保护

膜,通过抑制病原菌孢子萌发来防止病害侵染^[5-6]。

烟草叶斑类病害的发生与叶际微生物密切相关^[7]。烟叶是叶际微生物的栖息地,叶际微生物是植物生态系统的重要组成部分,发挥着重要的生态功能,对植物的生长发育、防御病害、固氮作用等均存在影响^[8-14]。叶际微生物易受基因型、海拔、季节等生物和非生物因素的影响^[15-17]。已有研究发现,烟草感白粉病和赤星病烟叶叶际优势真菌在门水平平均分布于子囊菌门和担子菌门,优势菌属主要有链格孢属、茎点霉属和高氏白粉菌属、曲霉属;感赤星病烟叶叶际优势细菌主要为变形菌门,优势菌属主要为泛菌属、假单胞菌属^[18-20]。相较而言,作为烟草旺长期的主要叶斑类病害烟草靶斑病,人们对其危害期烟叶叶际微生物菌群结构与多样性却缺乏认识。

目前,化学防治是对包括烟草靶斑病在内的植物病害防控的主要方式之一。病害的防控通常注重调查药剂使用后病斑的增加情况,通过病情指数的增长来评价药剂的防控效果,是基于肉眼观察的宏观评价。然而,药剂在应用后对烟叶叶际微生物的微观影响却鲜有关注。本研究通过田间药效试验评价了代森锰锌对烟草靶斑病的防效,并采用高通量测序技术分析了代森锰锌不同施药时间后,健康烟叶与感靶斑病烟叶叶际真菌和细菌的群落结

收稿日期:2022-11-11

项目基金:国家自然科学基金(编号:31960550,32160522);贵州省科技基金项目(编号:黔科合基础-ZK[2021]重点036);中国烟草总公司科技项目[编号:110202001035(LS-04)、110202101048(LS-08)];贵州省“百层次”创新型人才项目(编号:黔科合平台人才-GCC[2022]028-1)。

作者简介:张 艺(1996—),女,贵州遵义人,硕士研究生,主要从事作物栽培学与耕作学研究。E-mail:1158852415@qq.com。

通信作者:王 丰,博士,研究员,主要从事微生物研究,E-mail:yancaowangfeng@163.com;汪汉成,研究员,主要从事烟草植保及微生态研究,E-mail:xiaobaiyang126@hotmail.com。

构与多样性,旨在揭示代森锰锌的持效期及其防控烟草靶斑病的微生态机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试品种为云烟 87,为贵州省烟区的主栽烤烟品种。80%代森锰锌可湿性粉剂(WP),由美国陶氏益农有限公司生产。DNA 抽提试剂盒(Fast DNA[®] Spin Kit for Soil),由 MP Biomedicals 生物学公司生产;GeneJET 胶回收试剂盒和 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒,均由 Thermo Scientific 公司生产。

1.2 代森锰锌对烟草靶斑病的防效研究

田间药剂试验于 2020 年 8 月中旬在贵州省毕节市金沙县烟区进行。选取烟株长势一致的烟田划分小区,随机排列,每小区 20 株烟株,小区设 3 次重复。于烟叶底部叶片零星出现病斑时开始用药,代森锰锌的田间用量为 200 g/667 m²,用水量为 60 L/667 m²,采用多功能喷雾施肥器均匀喷施于叶片表面,直至液滴流失。以喷施等量清水处理为对照,小区间设保护行。在施药前各处理随机选择相同部位、相同成熟度的叶片,分别标记 8 个病斑,测量病斑直径。施药后 1、3、9 d,分别测量各标记病斑直径,计算药剂处理对病害扩展的抑制率^[21]。同时,各小区随机选择 8 株烟株,参照烟草靶斑病病害分级标准调查各处理 1、3、9 d 的病情指数^[22],并计算代森锰锌对烟草靶斑病的防效。

1.3 代森锰锌对烟叶叶际微生态的影响

1.3.1 样品采集 于施药前 0 d 及施药后 1、3、9、18 d 分别对试验小区烟叶取样,用于后续试验。采用消毒剪刀剪取同一张叶片的感靶斑病部位和健康部位烟叶样品,转移至 50 mL 无菌离心管中,重复取样 5 次。将所取样品放入低温保存箱,带回实验室后 -80 ℃ 保存备用。样品编号信息见表 1,因后期部分标记烟叶被采烤,可供采集样品的叶片数量有限,药后 9 d 的感病和健康烟叶样品及药后 18 d 的健康烟叶样品均为混合样品。

1.3.2 代森锰锌对烟叶叶际微生物群落结构与多样性的影响 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取各样本烟叶叶际微生物基因组 DNA,使用 NanoDrop 2 000 测定提取的 DNA 浓度和纯度,纯度 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值需在 1.8 ~ 2.0 之间,经 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 样品进行检测,检测合格后用于构

表 1 样品采集信息

取样部位	样品编号	施药天数(d)				
		0	1	3	9	18
健康组织	样品编号	QJDS11	QJDS21	QJDS31	—	—
		QJDS12	QJDS22	QJDS32	—	—
		QJDS13	QJDS23	QJDS33	—	—
		QJDS14	QJDS24	QJDS34	—	—
		QJDS15	QJDS25	QJDS35	—	—
	分组编号	QJDS1	QJDS2	QJDS3	QJDS4	QJDS5
感病组织	样品编号	QBDS11	QBDS21	QBDS31	—	QBDS51
		QBDS12	QBDS22	QBDS32	—	QBDS52
		QBDS13	QBDS23	QBDS33	—	QBDS53
		QBDS14	QBDS24	QBDS34	—	QBDS54
		QBDS15	QBDS25	QBDS35	—	QBDS55
	分组编号	QBDS1	QBDS2	QBDS3	QBDS4	QBDS5

注:“—”表示未进行单一取样,QJDS4、QBDS4、QJDS5 均为混合样。

建文库。

以上述样品的总 DNA 为模板,以真菌引物 ITS1 - 5F - F(5' - GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG - 3') 和 ITS1 - 1F - R(5' - GCTGCGTTCTTCATCGATGC - 3') 对叶际微生物基因组 DNA ITS1 区域进行 PCR 扩增^[23]。以细菌引物 515F(5' - GTGCCAGCMGCCGCGTAA - 3') 和 806R(5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3') 对样品烟叶叶际微生物基因组 DNA 16S - V4 区域进行 PCR 扩增^[24]。PCR 扩增体系与反应程序参照文献[23 - 24]的方法进行。扩增产物回收后,使用 Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 建库试剂盒进行文库的构建,采用 Illumina 测序平台(Illumina Novaseq 6 000, Illumina 公司, San Diego, CA, 美国)对 PCR 扩增产物进行双端测序分析,以上分析均在北京诺禾致源科技股份有限公司完成。

1.3.3 测序数据处理及统计分析 采用 Excel 2019 对数据进行处理,计算代森锰锌对烟草靶斑病的防效。测序数据通过 Flash 和 Trimmomatic 软件进行过滤优化和双端序列连接。高质量序列使用 UPARSE 软件(version 7.1)对相似度 ≥ 97% 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。真菌和细菌分别通过 Unit(7.2)和 SILVA132 的 SSUrRNA 数据库进行注释。采用 Qime(version 19.1)软件计算 α 多样性指数,运用 DPS 数据处理系统对真菌和细菌的 α 多样性指数进行差异显著性分析。计算 Shannon 指数、Chao1 指数、ACE 指数和 Goods_coverage 指数,分析烟叶叶际微生物群落的多样性、丰富度以及覆盖度。利用 R 语言工具统计并绘制相关性网络分析

图、门属水平相对丰度图、功能预测图,分析样品微生物群落结构与多样性、互作关系等。

2 结果与分析

2.1 代森锰锌对烟草靶斑病的防效

由表 2 可知,代森锰锌 200 g/667 m² 处理降低了烟草靶斑病的严重程度,对烟草靶斑病具有一定的防控效果。基于病斑面积和病情指数调查的防控效果较为一致,随着用药时间的延长,防效均逐渐减弱。基于病斑面积的评价发现,施药 1、3、9 d 后的防效分别为 69.49%、60.79%、53.33%;基于病情指数的评价发现,施药 1、3、9 d 后的防效分别为 65.50%、55.31%、45.03%。

表 2 代森锰锌对烟草靶斑病的田间防效

处理	施药天数 (d)	病斑扩增值	病斑抑制率 (%)	病情指数增值	防效 (%)
对照	1	2.72 ± 0.21a		5.42 ± 3.26a	
	3	4.03 ± 1.27a		7.25 ± 2.38ab	
	9	4.65 ± 0.54a		9.75 ± 7.69a	
代森锰锌	1	0.83 ± 0.36a	69.49	1.87 ± 0.09a	65.50
	3	1.58 ± 1.41b	60.79	3.24 ± 2.47b	55.31
	9	2.17 ± 0.67a	53.33	5.36 ± 1.96a	45.03

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

2.2 代森锰锌对烟草靶斑病叶际微生态的影响

2.2.1 代森锰锌对烟叶微生物 α 多样性的影响

表 3 代森锰锌对烟叶叶际真菌和细菌 α 多样性的影响 (OTU 水平)

类型	样品	多样性指数 (Shannon)	丰富度指数		覆盖度指数
			ACE	Chao1	
真菌	QBDS1	0.60 ± 0.61d	19.08 ± 5.34b	32.29 ± 8.99a	0.99 ± 0.00a
	QBDS2	1.61 ± 1.67bcd	37.64 ± 22.49ab	48.23 ± 30.55a	0.98 ± 0.01a
	QBDS3	1.41 ± 0.71cd	31.28 ± 22.85ab	32.94 ± 26.35a	0.96 ± 0.01a
	QJDS1	0.60 ± 0.61d	19.08 ± 5.34b	32.29 ± 8.99a	0.99 ± 0.00a
	QJDS2	3.43 ± 0.20a	53.14 ± 27.923a	53.92 ± 29.01a	0.98 ± 0.02a
	QJDS3	2.48 ± 0.72abc	38.20 ± 4.57ab	46.63 ± 6.30a	0.98 ± 0.00a
	QJDS5	3.03 ± 0.94ab	38.57 ± 5.74ab	45.30 ± 9.77a	0.98 ± 0.00a
细菌	QBDS1	1.82 ± 1.11ab	53.37 ± 21.16abc	55.74 ± 22.16bc	0.99 ± 0.00ab
	QBDS2	2.16 ± 0.74a	83.52 ± 34.76ab	82.76 ± 27.36ab	0.99 ± 0.00bc
	QBDS3	2.05 ± 0.82a	88.11 ± 20.95a	93.87 ± 15.55a	0.99 ± 0.00c
	QJDS1	0.85 ± 0.26ab	46.51 ± 22.77c	48.87 ± 27.26c	0.99 ± 0.00ab
	QJDS2	0.87 ± 0.51ab	45.22 ± 3.25c	47.55 ± 0.81c	0.99 ± 0.00ab
	QJDS3	0.52 ± 0.07b	37.50 ± 10.40c	36.79 ± 2.22c	0.99 ± 0.00a
	QJDS5	1.17 ± 1.05ab	49.58 ± 6.25bc	51.41 ± 4.53bc	0.99 ± 0.00ab

2.2.2 代森锰锌对烟叶微生物群落结构的影响

由图 1 和表 4 可知,真菌群落在门水平上,代森锰锌

由表 3 可知,真菌群落中,代森锰锌处理前后的感病烟叶与健康烟叶的覆盖度指数在 0.96 及以上;细菌群落中,代森锰锌处理前后感靶斑病烟叶样品组与健康烟叶样品组的覆盖度指数在 0.99 以上,二者均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和细菌群落结构。对烟叶微生物多样性进行评估可知,真菌群落中,施药前的感病烟叶与健康烟叶的丰富度和多样性指数相同,无差异显著。感病烟叶,代森锰锌处理 1、3 d 时,Shannon、Chao1 和 ACE 指数均比施药前高;Shannon 指数、Chao1 指数、ACE 指数与施药前无显著性差异。健康烟叶,代森锰锌处理 1、3、18 d 时,Shannon、Chao1 和 ACE 指数均比施药前高;Shannon 指数与施药前存在显著性差异,Chao1 指数与施药前无显著性差异。

细菌群落中,代森锰锌处理前的感病烟叶的多样性和丰富度均高于施药前的健康烟叶,二者在多样性上无差异显著。代森锰锌处理感病烟叶 1、3 d 时,Shannon、Chao1 和 ACE 指数均比施药前高,代森锰锌处理健康烟叶 1、18 d 时,Shannon 指数比施药前高,而施药 3 d Shannon 指数低于施药前,均无显著性差异;代森锰锌处理 1 和 3 d 的 Chao1 指数和 ACE 指数比施药前低,18 d 时高于施药前,均无显著性差异。

处理前后,感靶斑病烟叶与健康烟叶的优势菌群均为担子菌门 (Basidiomycota) 和子囊菌门

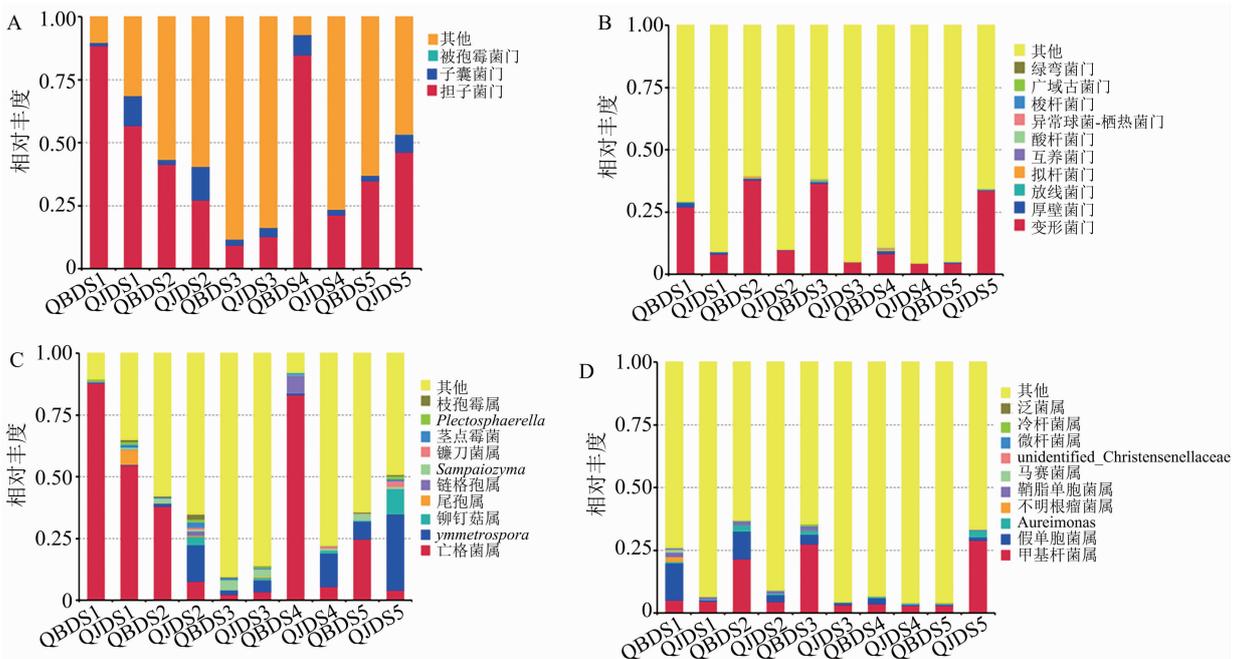
(Ascomycota), 健康烟叶还有被孢霉门(Mortierellomycota)。施药前感靶斑病烟叶中担子菌门相对丰度(88.50%)高于健康烟叶(56.71%)。代森锰锌处理感靶斑病烟叶 1、3 d 时,担子菌门相对丰度降低,分别降低 47.0、79.1 百分点。代森锰锌处理健康烟叶 1、3、18 d 时,担子菌门相对丰度均降低,分别降低 29.56、44.09、10.39 百分点。

真菌群落在属水平上,代森锰锌处理前后,感靶斑病烟叶与健康烟叶的主要菌属有亡隔菌属(*Thanatephorus*)、*Symmetrospora*、铆钉菇属(*Gomphidius*)、尾孢属(*Cercospora*)、链格孢属(*Alternaria*)、*Sampaiozyma*、镰刀菌属(*Fusarium*)、茎点霉属(*Phoma*)、*Plectosphaerella*、枝孢霉属(*Cladosporium*)。代森锰锌处理前,感靶斑病烟叶与健康烟叶的优势菌属均为亡隔菌属,施药前感靶斑病烟叶中亡隔菌属相对丰度(88.13%)高于健康烟叶(54.67%)。代森锰锌处理感靶斑病烟叶 1、3 d 时,亡隔菌属相对丰度均降低,分别降低了 50.1、85.84 百分点。代森锰锌处理健康烟叶 1、3 d 时,亡隔菌属相对丰度也降低了 47.13、51.33 百分点,感病烟叶施药 1 d 时亡隔菌属与表 4 中其他 9 个菌属的相对丰度存在显著性差异,健康烟叶施药 1、3 d 时亡隔菌属与其他菌属不存在显著性差异。此外,*Symmetrospora*、*Sampaiozyma*、铆钉菇属、尾孢属、茎点霉属也是叶际微生物群落的重要组成部分。代

森锰锌处理感靶斑病烟叶 1、3 d 时,*Plectosphaerella* 相对丰度降低,而 *Sampaiozyma*、*Symmetrospora*、茎点霉属、铆钉菇属相对丰度升高。代森锰锌处理健康烟叶 1、3、18 d 时,*Symmetrospora*、铆钉菇属相对丰度升高,亡隔菌属和尾孢属相对丰度降低。*Sampaiozyma*、茎点霉属相对丰度在施药 3 d 时先降低,18 d 时再升高(图 1、表 4)。

细菌群落在门水平上,代森锰锌处理前后感靶斑病烟叶与健康烟叶的主要菌群有变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、互养菌门(Synergistetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)、异常球菌-栖热菌门(Deinococcus-Thermus)、广域古菌门(Euryarchaeota),健康烟叶中独有的菌群有绿弯菌门(Chloroflexi)。施药前感靶斑病烟叶与健康烟叶的优势菌门均为变形菌门,施药前感靶斑病烟叶中变形菌门相对丰度(26.99%)高于健康烟叶(8.07%),其余菌群相对丰度较小。代森锰锌处理感病烟叶 1、3 d 时,变形菌门相对丰度升高,分别升高了 10.81%、9.44%。代森锰锌处理健康烟叶 1、18 d 时,变形菌门相对丰度也升高,分别升高了 1.62%、25.66%。施药 3 d 时,相对丰度降低,比施药前降低了 3.18%(图 1、表 4)。

细菌群落在属水平上,代森锰锌处理前后感靶斑病烟叶与健康烟叶的主要菌群有甲基杆菌属



A、C 分别为真菌门水平和属水平; B、D 分别为细菌门水平和属水平

图1 代森锰锌对烟叶真菌和细菌门和属水平群落组成的影响

表 4 不同样品的门属水平相对丰度

群落结构		相对丰度 (%)						
		QBDS1	QBDS2	QBDS3	QJDS1	QJDS2	QJDS3	QJDS5
真菌	门							
	担子菌门	88.50 ± 15.10a	41.50 ± 38.63ab	9.40 ± 3.00b	56.71 ± 40.26a	27.15 ± 26.94ab	12.62 ± 7.90b	46.32 ± 33.63a
	子囊菌门	1.18 ± 1.11b	1.79 ± 1.86b	2.23 ± 0.49c	12.00 ± 18.09ab	13.30 ± 3.13b	3.71 ± 0.19c	6.93 ± 2.09ab
	被孢霉菌门	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b	0.06 ± 0.11b	0.00 ± 0.00bc	0.12 ± 0.21b
	其他	10.33 ± 14.03b	56.71 ± 37.39a	88.37 ± 3.19a	31.29 ± 22.72ab	59.49 ± 30.14a	83.67 ± 7.26a	46.63 ± 35.11a
	属							
	亡格菌属	88.13 ± 0.16a	38.03 ± 41.19a	2.29 ± 1.37bc	54.67 ± 41.86b	7.54 ± 6.88b	3.34 ± 4.24b	3.96 ± 4.30c
	<i>Symmetrospora</i>	0.06 ± 0.11b	1.24 ± 1.68b	1.67 ± 2.14cd	0.19 ± 0.32b	14.84 ± 24.10b	4.70 ± 2.91b	30.98 ± 24.49b
	铆钉菇属	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	0.31 ± 0.54cd	0.00 ± 0.00b	3.40 ± 5.89b	0.99 ± 1.09b	9.96 ± 13.72bc
	尾孢属	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00d	6.12 ± 10.28b	0.31 ± 0.28b	0.43 ± 0.43b	0.00 ± 0.00c
	链格孢属	0.00 ± 0.00b	0.06 ± 0.11b	0.06 ± 0.11d	0.19 ± 0.32b	2.04 ± 3.05b	0.12 ± 0.21b	0.31 ± 0.28c
	<i>Sampaiozyma</i>	0.31 ± 0.39b	1.86 ± 1.22b	3.83 ± 1.39b	0.74 ± 0.37b	0.56 ± 0.32b	2.78 ± 1.30b	0.93 ± 0.81c
	镰刀菌属	0.00 ± 0.00b	0.12 ± 0.11b	0.12 ± 0.11d	0.00 ± 0.00b	0.80 ± 1.24b	0.31 ± 0.54b	2.23 ± 2.50c
	茎点霉属	0.25 ± 0.11b	2.23 ± 1.83b	0.74 ± 0.64cd	0.74 ± 0.64b	0.43 ± 0.43b	0.37 ± 1.19b	0.87 ± 1.19c
<i>Plectosphaerella</i>	0.56 ± 0.96b	0.12 ± 0.21b	0.12 ± 0.11d	1.05 ± 1.34b	0.99 ± 0.21b	0.49 ± 0.01b	1.05 ± 0.65c	
枝孢霉属	0.25 ± 0.11b	0.37 ± 0.37b	0.43 ± 0.21cd	0.80 ± 1.24b	2.10 ± 0.54b	0.49 ± 0.39b	0.68 ± 0.11c	
其他	10.45 ± 14.09b	57.76 ± 38.30a	90.41 ± 2.85a	35.00 ± 26.93a	65.18 ± 28.64a	85.96 ± 7.54a	49.04 ± 36.39a	
细菌	门							
	变形菌门	26.99 ± 18.83b	37.80 ± 13.50b	36.43 ± 26.12b	8.07 ± 12.80b	9.69 ± 0.0801b	4.89 ± 0.66b	33.73 ± 51.59b
	厚壁菌门	1.69 ± 1.72c	0.54 ± 0.43c	0.57 ± 0.56c	0.82 ± 0.89c	0.15 ± 0.08c	0.01 ± 0.02c	0.10 ± 0.08b
	放线菌门	0.49 ± 0.74c	0.35 ± 0.12c	0.61 ± 0.30c	0.11 ± 0.12c	0.07 ± 0.04c	0.06 ± 0.02c	0.37 ± 0.44b
	拟杆菌门	0.25 ± 0.34c	0.54 ± 0.31c	0.33 ± 0.27c	0.11 ± 0.2c	0.07 ± 0.04c	0.02 ± 0.03c	0.00 ± 0.00b
	互养菌门	0.00 ± 0.00c	0.17 ± 0.06c	0.09 ± 0.08c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.01 ± 0.02b
	酸杆菌门	0.00 ± 0.00c	0.04 ± 0.06c	0.08 ± 0.11c	0.00 ± 0.00c	0.02 ± 0.02c	0.00 ± 0.00c	0.15 ± 0.11b
	异常球菌- 栖热菌门	0.03 ± 0.00c	0.05 ± 0.07c	0.00 ± 0.00c	0.04 ± 0.06c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.01 ± 0.02b
	梭杆菌门	0.00 ± 0.00c	0.04 ± 0.04c	0.04 ± 0.00c	0.01 ± 0.02c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b
	广域古菌门	0.00 ± 0.00c	0.01 ± 0.02c	0.00 ± 0.00c	0.02 ± 0.03c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00b
	绿弯菌门	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.02 ± 0.00b
	其他	70.55 ± 0.21a	61.85 ± 26.96a	61.85 ± 26.96a	90.83 ± 2.56a	90.83 ± 25.60a	95.02 ± 0.63a	65.62 ± 51.90a
	属							
	甲基杆菌属	5.01 ± 7.02bc	21.52 ± 11.5b	27.40 ± 0.25b	4.63 ± 1.13b	4.53 ± 4.88b	3.19 ± 0.41b	28.89 ± 45.47b
	假单胞属	14.95 ± 14.56b	10.92 ± 9.21bc	3.92 ± 0.76c	0.48 ± 0.34cd	2.69 ± 1.31b	0.79 ± 0.72c	1.36 ± 1.64b
	<i>Aureimonas</i>	0.56 ± 0.73c	2.67 ± 2.35c	1.58 ± 0.15c	0.32 ± 0.20cd	0.65 ± 0.78b	0.00 ± 0.18d	2.60 ± 4.16b
	不明根瘤菌属	1.77 ± 2.91c	0.04 ± 0.04c	0.08 ± 0.07c	0.03 ± 0.01d	0.00 ± 0.00b	0.01 ± 0.02d	0.00 ± 0.00b
	鞘脂单胞菌属	1.94 ± 2.10c	1.55 ± 1.37c	1.80 ± 1.36c	1.07 ± 0.42c	1.10 ± 1.15b	0.11 ± 0.05d	0.41 ± 0.46b
	马赛菌属	0.97 ± 1.44c	0.02 ± 0.02c	0.07 ± 0.01c	0.07 ± 0.12d	0.05 ± 0.05b	0.01 ± 0.02d	0.05 ± 0.90b
unidentified_ Christensenellaceae	0.39 ± 0.68c	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0.01 ± 0.02d	0.00 ± 0.00b	0.00 ± 0.00d	0.00 ± 0.00b	
微杆菌属	0.30 ± 0.47c	0.13 ± 0.09c	0.07 ± 0.12c	0.00 ± 0.00d	0.01 ± 0.02b	0.01 ± 0.02d	0.07 ± 0.07b	
冷杆菌属	0.04 ± 0.06c	0.07 ± 0.02c	0.27 ± 0.26c	0.01 ± 0.02d	0.04 ± 0.05b	0.01 ± 0.02d	0.08 ± 0.14b	
泛菌属	0.15 ± 0.26c	0.08 ± 0.09c	0.28 ± 0.12c	0.02 ± 0.03d	0.08 ± 0.03b	0.03 ± 0.03d	0.01 ± 0.02b	
其他	73.92 ± 19.25a	64.53 ± 25.57a	64.53 ± 25.57a	93.37 ± 1.33a	90.85 ± 7.93a	95.50 ± 0.53a	66.53 ± 51.95a	

(*Methylobacterium*)、假单胞属 (*Pseudomonas*)、*Aureimonas*、不明根瘤菌属 (Unidentified _ Rhizobiaceae)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*)、马赛菌属 (*Massilia*)、Unidentified_Christensenellaceae、微杆菌属 (*Microbacterium*)、冷杆菌属 (*Frigoribacterium*)、泛菌属 (*Pantoea*)。施药前感靶

斑病烟叶与健康烟叶的优势菌属均为甲基杆菌属,施药前感病烟叶中甲基杆菌属的相对丰度(5.01%)高于健康烟叶(4.63%)。代森锰锌处理感靶斑病烟叶1、3 d时,甲基杆菌属相对丰度升高,分别升高了16.51%、22.39%。施药1 d时,除假单胞属以外,甲基杆菌属与其他8个菌属的相对丰度

存在显著性差异,施药 3 d 时,甲基杆菌属与其他 9 个菌属之间均存在显著性差异。代森锰锌处理健康烟叶 1、3 d 时,甲基杆菌属相对丰度降低,分别降低了 0.10 百分点、1.44 百分点;施药 18 d 时,相对丰度升高,比施药前升高了 24.26 百分点。此外,代森锰锌处理感靶斑病烟叶 1、3 d 时,假单胞属、不明根瘤菌属、鞘脂单胞菌属、马赛菌属、微杆菌属、冷杆菌属相对丰度下降,而 *Aureimonas* 相对丰度升高。施药后健康烟叶主要菌属的相对丰度变化为:假单胞属在施药 1、3、18 d 时升高,*Aureimonas* 在施药 1、18 d 时升高,3 d 时降低;马赛菌属在施药 1、3、18 d 时的相对丰度均减少。健康烟叶施药前和施药后 3 d,甲基杆菌属与表 4 中其他 9 个菌属的相对丰度存在显著性差异,而施药 1、18 d 时,甲基杆菌属与其他菌属之间不存在显著性差异(图 1、表 4)。

2.2.3 代森锰锌对烟叶微生物生态相关性的影响 本研究对真菌和细菌属水平 top100 的物种数据进行分析。由图 2 可知,施药前后在真菌群落中,担子菌门和子囊菌门中的菌属较多,占据主要位置,担子菌门中的 *Symmetrospora* 与亡隔菌属之间呈正相关($P < 0.05, R > 0.1$),亡隔菌属与子囊菌门中的镰刀菌属之间呈正相关,镰刀菌属与铆钉菇属之间呈正相关,其余菌属之间均呈负相关。在细菌群落中,变形菌门中的菌属高于其他菌门,占据主要位置,所有菌属之间均呈负相关,其中厚壁菌门中的肠球菌属仅与酸杆菌门中的 *Candidatus_Solibacter*, 变形菌门中的 *Alealigenes* 仅与萨特氏菌属之间呈负相关。

2.2.4 代森锰锌对烟叶微生物群落 FUNGuild 与 PICRUSt 功能预测 真菌群落 FUNGuild 功能预测结果(图 3 - A)表明,施药前感靶斑病烟叶的 OTU 中,优势功能群是植物病原类群。施药前健康烟叶的 OTU 中,优势功能群是未定义类群。感靶斑病烟叶施药 1、3、9、18 d 后植物病原类群占比均小于施药前,而未定义类群占比高于施药前。健康烟叶施药 1、3 d 后,未定义类群占比小于施药前,而植物病原类群占比大于施药前;9、18 d 后未定义类群占比大于施药前,而植物病原类型占比小于施药前。此外,感靶斑病烟叶的 OTU 中,动物病原内生菌、植物病原木材腐生菌类群、植物病原木材腐生菌类型、内生植物病原、寄生真菌 - 未定义的腐生菌、未定义的腐生生物类型、外生菌根寄生真菌类群、植物病原类群占比次之,其他菌群占比较少,但也有不可忽视的作用。健康烟叶 OTU 中,外生菌根寄生

真菌类型、植物病原木材腐生菌类型、内生植物病原类型占比次之,其他菌群占比较小。

利用 KEGG Orthology(KO)数据库和 COG 数据库比对感靶斑病烟叶与健康烟叶细菌 OTU 对应的基因,进行 PICRUSt 基因预测。由图 3 - B 可知,感靶斑病烟叶与健康烟叶施药前后共获得 6 类生物代谢通路功能类群,其中包括代谢类群、遗传信息处理类群、环境信息处理类群、细胞过程类群、人类疾病类群、有机系统类群。其中,代谢、遗传信息处理和环境信息处理类群为主要类群。

3 结论与讨论

本研究基于病斑面积与病情指数的评价发现,代森锰锌施药后 9 d 的防效分别为 55.33% 和 45.03%,且防效随间隔时间的增加而逐渐降低,均低于 70%,表明烟草靶斑病发生初期,代森锰锌在 200 g/667 m² 使用剂量下 1 次使用时的防控效果并不理想。为此,其在防控烟草靶斑病时应考虑增加药剂剂量或增加药剂使用次数,间隔期宜 < 9 d。

叶际微生物是一个庞大且多样性丰富的群体^[25],烟草叶部病害与叶际微生物群落结构密切相关,不同叶部病害发生时其叶际优势菌群间存在差异。已有研究发现,烟草亚隔孢叶斑病危害期其叶际优势真菌有 *Boeremia*、*Meyerozyma*、茎点霉属和链格孢属,优势细菌有假单胞菌属和泛菌属^[26];烟草赤星病危害期其叶际优势真菌有链格孢属和茎点霉属,优势细菌有泛菌属和假单胞菌属^[19-20]。烟叶霉烂病危害期其叶际优势真菌有曲霉属、链格孢属、尾孢属和茎点霉属,优势细菌有假单胞菌属和泛菌属^[27]。本研究发现,靶斑病感病烟叶与健康烟叶的优势真菌属均为亡隔菌属,占比较多的真菌还有 *Symmetrospora*、*Sampaiozyma*、铆钉菇属、尾孢属、茎点霉属;镰刀菌属、*Plectosphaerella* 和链格孢属占比较少。结果与前人研究的优势菌属均为其致病菌的结果^[28]一致,同时赤星病、亚格孢壳属、白粉病烟叶上均未检测到亡隔菌属真菌,推测亡隔菌属并不是烟叶叶际习居菌,烟草靶斑病的初始侵染源可能来自于其他寄主或者环境。

代森锰锌在当地未作为防治烟草叶斑病类病害的主要药剂,因此病原菌对于该药剂的抗药性较低。该药剂的使用对所有叶际真菌和细菌菌属均产生了影响。感病烟叶施药后叶际真菌亡隔菌属、*Plectosphaerella* 的相对丰度降低;*Symmetrospora*、茎

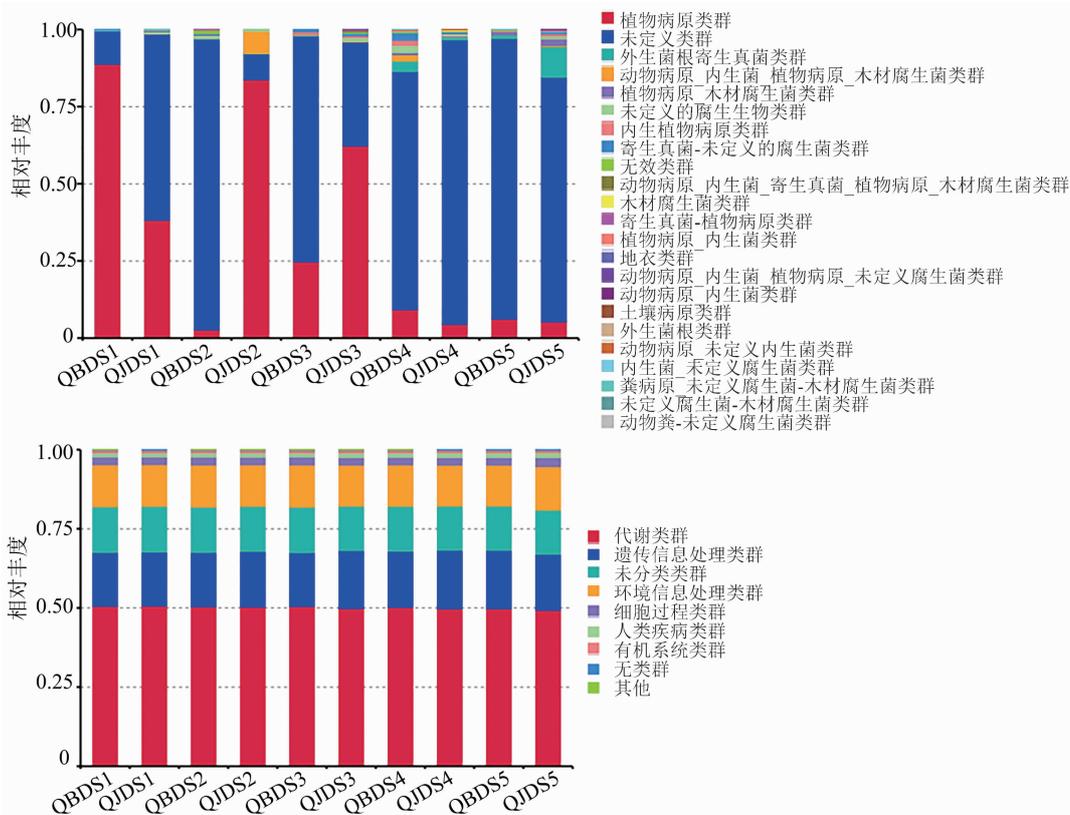


图3 代森锰锌处理后烟叶真菌(A)、细菌(B)功能预测

的优势细菌菌属均为甲基杆菌属和假单胞属,占比
较少的细菌菌属有 *Aureimonas*、不明根瘤菌属、鞘脂
单胞菌属、马赛菌属、Unidentified _
Christensenellaceae、微杆菌属、冷杆菌属、泛菌属。
推测甲基杆菌属为烟叶叶际优势习居菌。施用代
森锰锌后各细菌菌群相对丰度均发生变化。感病
烟叶施药后假单胞属、不明根瘤菌属、鞘脂单胞
菌属、马赛菌属、微杆菌属、冷杆菌属的相对丰度均降
低;甲基杆菌属、*Aureimonas* 的相对丰度均升高。健康
烟叶施药后甲基杆菌属、马赛菌属、*Aureimonas* 的
相对丰度均降低;假单胞属、冷杆菌属相对丰度均
升高。为此,本研究发现代森锰锌会影响烟叶包括
亡隔菌属在内的多种病原菌及包括假单胞属在内
的多种非致病菌菌群结构的变化,进一步验证了代
森锰锌的广谱性。已有研究发现,药剂的使用会改
变烟叶叶际微生物群落结构,Chen 等研究发现,施
用菌核净会使烟叶叶际细菌中鞘脂单胞菌属、黄色
杆菌属和沙雷氏菌属的相对丰度降低^[29]。以上研
究结果均与本研究结果类似。除靶标病原菌外,本
研究发现烟叶叶际部分真菌与细菌的菌属相对丰
度也有所降低,说明代森锰锌对靶斑病外的其他病
害也具有一定的抑制作用;同时,发现部分菌属的

相对丰度升高,推测这些菌属也参与了烟草靶斑病
的发生或危害,代森锰锌对这些菌属的抑制活性较
弱。烟草感靶斑病烟叶与健康烟叶叶际微生物群
落结构与自然环境条件关系密切,目前环境因子对
叶际微生物的影响也缺乏一定的认识,试验下一步
将从环境因子(温度、湿度、降水量等)和病情指数
等方面对烟草感靶斑病烟叶和健康烟叶叶际生态
的影响进行分析验证。

菌群相关性结果表明,在真菌门水平下,担子
菌门和子囊菌门的菌属占比较大;在细菌门水平
下,变形菌门的菌属占比较大,进一步验证了高通
量测序结果。真菌群落中的菌属之间主要呈负相
关,仅有少部分菌属之间呈正相关,其中,担子菌门
中的 *Symmetrospora* 菌属与亡隔菌属之间呈正相关,
亡隔菌属与子囊菌门中的镰刀菌属之间呈正相关,
镰刀菌属与柳钉菇属之间呈正相关,推测它们之间
存在互利共生关系,或它们有相同的营养所需,其
余菌属以及细菌各菌属之间呈负相关。前人研究
表明,真菌和细菌各属之间对资源存在着潜在的竞
争^[30],本研究结果发现施药前后大量菌属之间呈
现负相关,推测由于药剂的使用增加了各菌属之
间的潜在竞争。

定植于烟叶叶际的微生物通常都具有一定的

生物功能^[31-33],前人研究发现,烟叶霉烂病发生期叶际真菌主要为植物病原类^[27];亚隔孢壳属叶斑病发生期叶际真菌主要为植物病原菌和植物病原菌-未定义的腐生菌类群,叶际细菌代谢通路功能主要为代谢、遗传信息处理和环境信息处理类群^[26],本研究发现烟草靶斑病烟叶真菌群落在施药前后优势菌群均分布于植物病原类,代森锰锌施用后可显著降低该功能类群的丰度,随着施药时间的增加,其丰度降低;相较而言,健康烟叶施药前的叶际优势真菌主要分布于未定义类群,代森锰锌施药降低了其相对丰度,同时也降低了叶际植物病原类的丰度,随着施药时间的增加,其相对丰度在施药 1、3 d 时增加,随后降低,可能是由于一开始其他功能类群对该药剂较敏感,抑制了其他功能类群生长,从而病原菌获得了更多资源。也有可能是感病烟叶叶际病原菌已经降落到健康烟叶上,药剂无法短时间将其消除。叶际细菌群落在施药前后优势菌群均分布于代谢类,代森锰锌施用后可降低该功能群的丰度,随着施药时间的增加,其丰度降低,但遗传信息处理类及环境信息处理类的相对丰度增加。综上,推测代森锰锌能有效影响烟叶叶际真菌与细菌功能的持效期均在 9 d 左右。因此,建议使用代森锰锌防控烟草靶斑病时,其间隔期宜 < 9 d。

参考文献:

[1] 吴元华,王左斌,刘志恒,等. 我国烟草新病害——靶斑病[J]. 中国烟草学报,2006,12(6):22.

[2] 吴元华,赵艳琴,赵秀香,等. 烟草靶斑病原鉴定及生物学特性研究[J]. 沈阳农业大学学报,2012,43(5):521-527.

[3] 伏颖,吴元华,穆凌霄,等. 烟草靶斑病室内药剂筛选[J]. 江苏农业科学,2011,39(3):153-155.

[4] 王左斌,吴元华,赵秀香,等. “噬肽菌净”对烟草靶斑病的抑菌作用及田间药效试验[J]. 烟草科技,2007,40(9):61-64.

[5] Graham S L, Hansen W H, Davis K J, et al. Effects of one-year administration of ethylenethiourea upon the thyroid of the rat[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1973, 21(3):324-329.

[6] Lindow S E, Brandl M T. Microbiology of the phyllosphere[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(4):1875-1883.

[7] Huang Z D, Wang P, Pu Z X, et al. Effects of mancozeb on citrus rhizosphere bacterial community[J]. Microbial Pathogenesis, 2021, 154:104845.

[8] Vorholt J A. Microbial life in the phyllosphere[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(12):828-840.

[9] Leveau J, Lindow S E. Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere[J]. PNAS, 2001, 98(6):3446-3453.

[10] Pati B R, Sengupta S, Chandra A K. Role of nitrogen fixing bacteria

on the phyllosphere of wheat seedlings[J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 1995, 42(4):427-433.

[11] Nair J R, Singh G, Sekar V. Isolation and characterization of a novel *Bacillus* strain from coffee phyllosphere showing antifungal activity[J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 93(5):772-780.

[12] Krechel A, Faupel A, Hallmann J, et al. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(9):772-786.

[13] Azevedo J, Maccheroni W, Pereira J, et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2000, 3(1):15-16.

[14] Sandhu A, Halverson L J, Beattie G A. Bacterial degradation of airborne phenol in the phyllosphere[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(2):383-392.

[15] Sapkota R, Knorr K, Jørgensen L N, et al. Host genotype is an important determinant of the cereal phyllosphere mycobiome[J]. New Phytologist, 2015, 207(4):1134-1144.

[16] Zhang Y G, Cong J, Lu H, et al. Soil bacterial diversity patterns and drivers along an elevational gradient on Shennongjia Mountain, China[J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(4):739-746.

[17] Copeland J K, Yuan L J, Layeghifard M, et al. Seasonal community succession of the phyllosphere microbiome[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(3):274-285.

[18] 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.

[19] 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.

[20] 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.

[21] 谭舒心. 蜘蛛兰褐斑病及其病原菌鉴定与病害的药剂控制试验[D]. 重庆:西南大学, 2009.

[22] 周健全,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.

[23] Mboowa G, Sserwadda I, Amujal M, et al. Human genomic loci important in common infectious diseases: role of high-throughput sequencing and genome-wide association studies[J]. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology, 2018, 2018(6010):1-9.

[24] 谢红炼,汪汉成,蔡刘体,等. 烟草种子内生细菌群落结构与多样性[J]. 微生物学报, 2020, 60(3):601-616.

[25] Stone B W G, Weingarten E A, Jackson C R. The role of the phyllosphere microbiome in plant health and function[J]. Annual Plant Reviews Online, 2018, 1(2):533-556.

[26] 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.

曹鹏飞,吴华芬,陈银华. 抗桃树细菌性穿孔病植物内生菌的筛选及其抑菌机制研究[J]. 江苏农业科学,2023,51(17):131-137.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.17.018

抗桃树细菌性穿孔病植物内生菌的筛选 及其抑菌机制研究

曹鹏飞,吴华芬,陈银华

(丽水市农林科学研究院,浙江丽水 323000)

摘要:桃树细菌性穿孔病发生普遍,严重制约了桃产业的发展。为研究植物内生菌对桃树细菌性穿孔病原菌的抑制作用,从健康桃树、博落回、金银花、板栗等健康植物材料中分离筛选出优势拮抗内生菌株,并测定其胞外代谢产物对病原菌细胞膜与细胞壁通透性、纤维素酶活性、胞外多糖(EPS)含量、呼吸代谢、核酸含量的影响。结果表明,分离得到的45株内生菌中,从金银花植株中分离的曲霉属JYY-3菌株抑菌效果最好,其最小抑菌浓度(MIC)、最低杀菌浓度(MBC)分别为50、200 mg/mL。经该菌株胞外代谢产物处理后,桃树细菌穿孔病病原菌核酸泄漏量、AKP活性和电导率显著提高,且浓度越高效果越明显。此外,JYY-3菌株胞外代谢产物能显著降低病原菌纤维素酶活性、EPS含量、DNA和RNA含量,抑制其琥珀酸脱氢酶(SDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)活性,且浓度越高作用越强,经2.0MIC菌株JYY-3代谢产物处理12 h后,桃树细菌穿孔病病原菌的SDH、MDH活性较对照组分别降低107.644、13.729 U/mg。可见,金银花内生菌株JYY-3对桃树细菌性穿孔病病原菌有显著的抑制作用,可通过抑制纤维素酶活性及EPS合成以减弱病原菌入侵植物能力,增大细胞壁和细胞膜通透性使内容物外泄,抑制核酸合成以及呼吸酶活性等途径抑制病原菌的繁殖。本研究结果为植物内生菌防治桃树细菌性穿孔病的进一步研究奠定了理论基础。

关键词:桃树细菌性穿孔病;植物内生菌;抑菌活性;抑菌机制;胞外代谢产物

中图分类号:S436.621.1⁺9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)17-0131-07

桃树细菌性穿孔病是由黄单胞杆菌属甘蓝黑腐黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *pruni*)侵染造成的劣性病害^[1]。该病害在全国各地普遍发生,发病时间多在4—5月中旬,8月为发病盛期。若该病防治不及时,常造成大量落叶,营养累积减少,花芽形成异常,最终导致树势衰落,严重制约桃产业

的发展。目前针对桃树细菌性穿孔病的防治主要以传统防治和化学防治为主,常用的化学农药主要有叶枯唑可湿性粉剂、二氯异氰酸钠、波尔多液及噻菌铜等^[2]。这些化学农药主要在植株发病初期使用才能达到较好的防效,但随着病害的大面积暴发,防效会明显降低。同时,随着化学农药的反复使用常造成农药残留、环境污染等一系列问题。因此,寻找低毒、高效的防治手段迫在眉睫。

植物内生菌(endophyte)是存活于健康植物组织内部、不引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物类群,是其微生态系统的重要组成部分^[3-4]。据研究表明,许多内生菌能产生抗生素、水解酶类、

收稿日期:2022-10-08

基金项目:浙江省丽水市重大科技计划(编号:2019ZDYF01)。

作者简介:曹鹏飞(1978—),男,陕西旬邑人,副研究员,从事园艺植物病理研究工作。E-mail:297473247@qq.com。

通信作者:吴华芬,高级农艺师,从事植物资源研究推广工作。E-mail:631154131@qq.com。

[27]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.

[28]Sun M L, Shi C H, Wang H C, et al. Effect of disease severity on the structure and diversity of the phyllosphere microbial community in tobacco[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 13:1081576.

[29]Chen Q L, Cai L, Wang H C, et al. Fungal composition and diversity of the tobacco leaf phyllosphere during curing of leaves[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11:554051.

[30]Leopold D R, Busby P E. Host genotype and colonist arrival order

jointly govern plant microbiome composition and function[J]. *Current Biology*, 2020, 30(16):3260-3266.

[31]梁宗琦,韩燕峰,梁建东,等. 从细胞内共生到多尺度共生:回顾与展望[J]. 菌物学报,2020,39(12):2202-2217.

[32]Liang Z Q, Han Y F, Liang J D, et al. From intracellular symbiosis to multiscale symbiosis: review and prospect[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(12):2202-2217.

[33]Scharnagl K. The scale of symbiosis[J]. *Symbiosis*, 2019, 78(1):7-17.