

吴小军,汪汉成,刘亭亭,等. 啞菌酯处理后烟叶叶际微生物在不同时期的响应[J]. 江苏农业科学,2023,51(24):123-132.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.24.017

啞菌酯处理后烟叶叶际微生物在不同时期的响应

吴小军^{1,2}, 汪汉成², 刘亭亭³, 蔡刘体², 孟建玉², 彭丽娟¹

(1. 贵州大学烟草学院, 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:为研究烟叶不同部位叶际微生物群落在啞菌酯处理后不同时期的变化规律,采用高通量测序和 Biolog 代谢表型技术分别测定了烟叶不同部位叶际微生物在啞菌酯处理前后不同时期的群落结构、多样性及代谢功能。结果表明,相较于处理前,250 g/L 啞菌酯 SC(0.15 kg a.i./hm²)处理后 0~15 d 内,叶际真菌群落中,感病与健康烟叶叶际优势真菌属种类均增加。感病烟叶叶际链格孢属、壳多孢菌属和茎点霉属相对丰度均先增加后降低;枝孢霉属、亚隔孢壳属和 *Symmetrospora* 则先降低后增加。健康烟叶叶际链格孢属、枝孢霉属、亚隔孢壳属和 *Symmetrospora* 相对丰度均先降低后增加;壳多孢菌属、假丝酵母属、浪梗霉属和蜡壳菌属则先增加,并在处理后 5 d 时成为新的优势菌属。在细菌群落中,感病与健康烟叶叶际泛菌属、马赛菌属和鞘脂单胞菌属相对丰度均持续降低,感病烟叶叶际的假单胞菌属、乳杆菌属、肠杆菌属和甲基杆菌属丰度先增加后降低。感病烟叶叶际真菌群落多样性和丰富度持续增加,细菌群落多样性先增加后降低,丰富度先降低后增加;健康烟叶叶际真菌群落多样性和丰富度先增加后降低,细菌群落多样性先降低后增加,丰富度先增加后降低。啞菌酯处理后 5 d 时对感病烟叶叶际微生物的碳源代谢抑制作用较健康烟叶弱,但 10 d 时则均表现出较强抑制作用。研究结果揭示了啞菌酯施用后 15 d 内烟叶叶际真菌和细菌群落结构、多样性及代谢功能的时序变化规律,为了解啞菌酯防控烟草赤星病的微观作用机制提供参考依据。

关键词:啞菌酯;烟草赤星病;群落结构;代谢功能;微生物多样性

中图分类号:S182;S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)24-0123-10

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)是一种重要的经济作物,烟草赤星病(tobacco brown spot)是国内外烟叶生产中危害较大的真菌性病害,易在上部叶成熟期暴发,病斑呈黄褐色,具明显同心轮纹^[1-2]。该病害病原菌为链格孢属(*Alternaria* sp.)真菌,目前已报道的病原物种类有 *Alternaria alternata*、*A. longipes* 和 *A. tenuissim* 等^[3-4]。当前,甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂啞菌酯(azoxystrobin)在我国部分烟叶产区用于烟草赤星病防治,该药剂主要作用于细胞色素 Bc1

向细胞色素 c 的电子转移,抑制病菌线粒体的呼吸作用,从而达到对病菌的杀灭作用;对子囊菌门、担子菌门和卵菌纲的多种病原菌均有较强的杀菌效果,在防治真菌性病害方面具有较大应用前景^[5-8]。

近年来,国内已有关于啞菌酯及其复配剂防控烟草赤星病的报道。Wang 等研究发现啞菌酯 0.094、0.190、0.280 kg a.i./hm² 施用 3 次后,对烟草赤星病防效可达 86.00%~89.67%^[9]。陈杰等报道 32.5% (苯醚甲环唑+啞菌酯)悬浮剂对烟草赤星病防效可达 83.84%^[10]。烟草叶斑类病害发生与叶际微生物群落结构和代谢功能变化密切相关。刘畅等研究发现,烟草赤星病烟叶叶际优势真菌属为链格孢属^[11],优势细菌属为泛菌属(*Pantoea*)^[12]。Dai 等研究发现,烟叶在感染烟草赤星病后其叶际链格孢属随病情的发展相对丰度增加,微生物群落结构呈复杂的动态变化,且对碳源的利用率降低^[13]。病害防治过程中施用的化学药剂能有效改善植物叶际菌群结构。Qin 等研究发现,喷施生防菌剂可改善烟草叶片微生物群落结构并有效防治烟草野火病^[14]。刘天波等研究发现,拮

收稿日期:2023-03-17

项目基金:中国烟草总公司科技项目[编号:110202101048(LS-08)、110202001035(LS-04)];国家自然科学基金(编号:32160522、31960550);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);贵州省科技基金(编号:黔科合基础-ZK[2021]重点036)。

作者简介:吴小军(1997—),男,贵州思南人,硕士研究生,从事烟草植保研究。E-mail:2939400539@qq.com。

通信作者:汪汉成,博士,研究员,从事植物保护研究,E-mail: xiaobaiyang126@hotmail.com;彭丽娟,博士,教授,从事植物病理研究,E-mail:296430006@qq.com。

抗菌群处理烟叶后其叶际假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和寡氧单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 等菌属相对丰度显著改变,群落多样性增加^[15]。Chen 等研究发现喷施菌核净后烟叶叶际鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*)、寡养单胞菌属和沙雷氏菌属 (*Serratia*) 等细菌相对丰度降低^[16]。当前,噬菌酯防控烟草赤星病的效果多是基于病情指数的宏观评价,缺乏从微观层面分析噬菌酯对叶际微生物的影响,特别是药剂施用后一定时期内烟草叶际微生物群落结构与代谢功能的时序性变化规律缺乏认识。因此,本研究采用高通量测序和 Biolog 代谢表型技术分别测定了噬菌酯药剂施用后不同时期烟叶不同部位叶际微生物的群落结构、多样性及代谢功能,从微观层面揭示噬菌酯施用后烟叶组织微生态的变化规律,以期对烟草赤星病的精准化学防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试烟草品种、药剂及试验器材 供试烟草品种为云烟 105,供试药剂为 250 g/L 噬菌酯悬浮剂 (SC),购自先正达南通作物保护有限公司。DNA 提取试剂盒 (Fast DNA® Spin Kit for Soil),购自 MP Biomedicals 生物学公司;Ion Plus Fragment Library Kit 48 rxns 文库试剂盒 (货号:4471252) 和 GeneJET 胶回收试剂盒 (货号:K0691),均购自 Thermo Fisher Scientific 公司 (美国);Biolog ECO 代谢板 (货号:# 1056),购自 Biolog 公司 (美国,CA, Hayward)。背负式电动喷雾器 (型号:3WBD-20L),购自超农力智慧科技有限公司 (浙江,中国);自动气象站 [由雨量计 (MC-YL)、温度计 (MC-KWS) 和湿度计 (MC-KWS) 等组成],购自北京新红科技有限公司。

1.1.2 试验时间及地点 试验于 2020 年 8 月 29 日至 9 月 16 日在贵州省毕节市威宁县黑石头镇烟区进行,选择明显感染烟草赤星病的烟田开展试验。

1.2 试验设计

1.2.1 药剂处理 本试验采取随机区组设计,各小区随机排列,小区内烟株长势一致且烟叶发病情况基本一致。每个小区 80 株烟,小区四周设保护行。噬菌酯制剂的用量为 40 g/666.67 m² (0.15 kg a.i./hm²),用水量为 60 L/666.67 m²,使用背负式喷雾器对烟株正、反叶面进行均匀喷施,以见药液均匀分布至烟叶正反面为准。

1.2.2 环境因子与病情指数的调查 使用自动气象站调查并记录试验点的环境因子 (降水量、温度、空气相对湿度)。同时分别在处理前 (0 d),处理后 5、10、15 d 各小区内随机选取 10 株烟调查烟叶的发病情况,计算病情指数^[17]。

1.2.3 样品采集 于处理前 0 d 及处理后 5、10、15 d,分别在经噬菌酯处理的 3 个小区内随机取样,用经消毒的剪刀剪取中上部烟叶的感病部位与健康部位烟叶样品 (10 g),分别装入 50 mL 无菌离心管中,将从同一小区内采集的感病与健康烟样分别混合作为感病组与健康组中 1 个处理,每个处理 3 次重复,以感病组与健康组之间互为对照。样品采集后放入低温保存箱,并迅速带回实验室,一部分用于代谢功能研究 (5 g),另一部分放置 -80 ℃ 冰箱保存用于扩增子测序,样品编号详情见表 1。

表 1 样品信息

分组	取样小区	编号			
		施药前 0 d	施药后 5 d	施药后 10 d	施药后 15 d
健康组	小区 1	AJJ01	AJJ11	AJJ21	AJJ31
	小区 2	AJJ02	AJJ12	AJJ22	AJJ32
	小区 3	AJJ03	AJJ13	AJJ23	AJJ33
		AJJ0	AJJ1	AJJ2	AJJ3
感病组	小区 1	AJB01	AJB11	AJB21	AJB31
	小区 2	AJB02	AJB12	AJB22	AJB32
	小区 3	AJB03	AJB13	AJB23	AJB33
		AJB0	AJB1	AJB2	AJB3

1.2.4 烟草叶际微生物基因组测序分析 参照 DNA 提取试剂盒说明对不同时期所取烟叶样品中微生物基因组 DNA 进行提取,用琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和浓度。再将提取的 DNA 用无菌水稀释至浓度为 1 ng/μL,并以此为模板,分别使用真菌引物 ITS1-1F-R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') 和 ITS1-5F-F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAAC AAGG-3') 及细菌引物 806R (5'-GGACTACHVGG GTWTCTAAT-3') 和 515F (5'-GTGCCAGCMGCCG CGGTAA-3'),参照 Huang 等的 PCR 扩增体系及程序对所取样品真菌 ITS1 区域与细菌 V4 区域进行扩增^[18]。参照 Dai 等的方法^[13,19]进行测序分析,样品中真菌、细菌分别与 Unit (v7.2) 和 SSUrRNA 数据库比对注释,并且对数据进行均一化处理,分析各样本在门属水平上的群落组成;使用 Qiime 软件计算 α 多样性指数,使用 corr.test 函数计算环境因子与

微生物 α 多样性及物种间的相互变化关系数值并进行 Spearman 分析,此过程在北京诺禾致源科技股份有限公司完成。原始测序数据上传至 GenBank (BioProject ID: PRJNA882617、Biosample accession ID: SUB12086680 和 BioProject ID: PRJNA882598、Biosample accession ID: SUB120 85061)。

1.2.5 烟草叶际微生物碳源代谢功能分析 分别取不同时期感病与健康混合烟样各 2 g,分别置于盛有 100 mL 0.8% 无菌生理盐水的 300 mL 三角瓶中,在 28 ℃、180 r/min 振荡 2 h,将振荡液静置 30 min。用移液枪吸取 100 μ L 上清液加入到 ECO 代谢板的测试孔中,将接完菌的 ECO 代谢板密封并置于 OmniLog 恒温培养箱中 28 ℃ 下培养 7 d。使用 Biolog D5E_OKA_data.exe 软件收集该过程中代谢孔内颜色变化值,使用 HemI 软件根据代谢孔颜色变化值制作热图分析,对不同时期烟叶样品的微生

物代谢功能进行分析。

1.3 数据处理及统计分析

使用 DPS 7.5 与 Excel 2017 软件进行数据处理及统计分析。

2 结果与分析

2.1 环境因子及病情指数

试验开展期间该地区大部分时间有小雨。自动气象站测量结果显示,在处理前 0 d 及处理后 0 ~ 5、5 ~ 10、10 ~ 15 d 的日平均降水量(R)分别为 13.60、19.00、11.3、25.4 mm;日平均气温(T)分别为 18.32、18.97、17.51、16.54 ℃;日平均空气相对湿度分别为 82.49%、83.81%、78.99% 和 90.98%。处理前 0 d 及处理后 5、10、15 d 的病情指数(DI)分别为 44.44、48.14、63.58、70.55;处理后 5、10、15 d 的相对防效分别为 81.75%、53.93% 和 54.95% (表 2)。

表 2 环境因子与病情指数

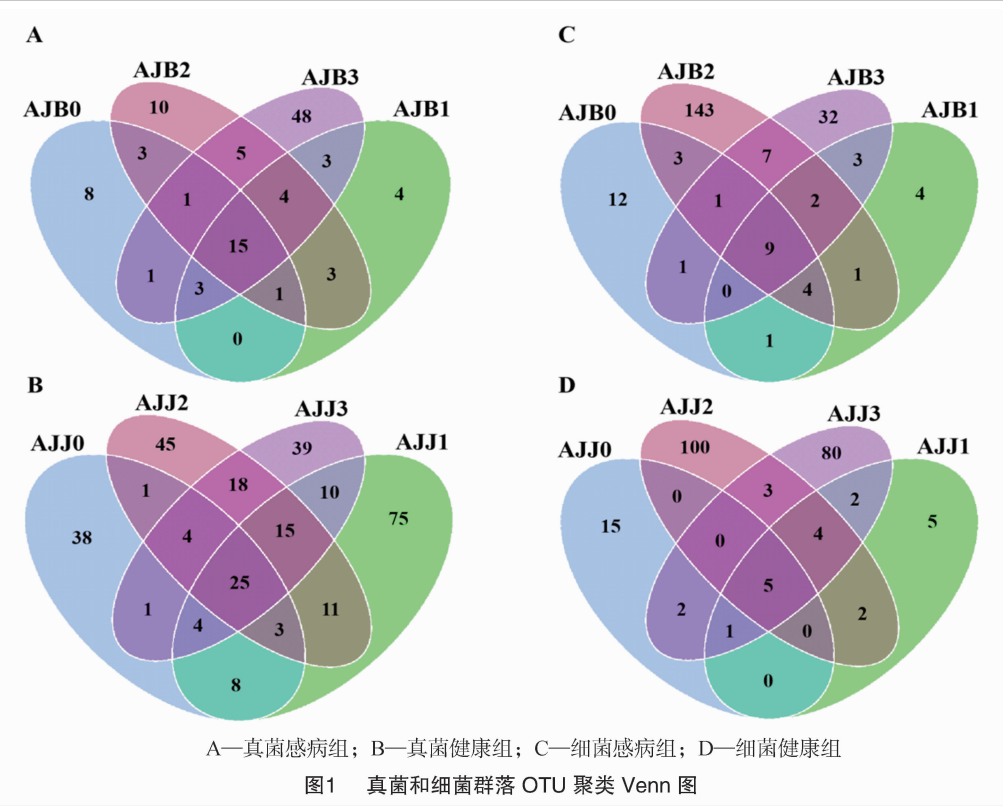
取样时间	日平均降水量 (mm)	日平均气温 (℃)	日平均空气相对湿度 (%)	病情指数	相对防效 (%)
施药前 0 d	13.60	18.32	82.49	44.44	—
施药后 5 d	19.00	18.97	83.81	48.14	81.75
施药后 10 d	11.30	17.51	78.99	63.58	53.93
施药后 15 d	25.40	16.54	90.98	70.55	54.95

2.2 烟草叶际真菌和细菌群落结构

2.2.1 OTU 聚类 Venn 图分析结果表明,在 OTU 水平,感病与健康烟叶叶际真菌群落共有的 OTU 数分别为 15、25 种(图 1 - A、图 1 - B),叶际细菌群落共有的 OTU 数分别为 9、5 种(图 1 - C、图 1 - D)。感病与健康烟叶叶际共有的真菌属为链格孢属、亚隔孢壳属(*Didymella*)、枝孢霉属(*Cladosporium*)和附球菌属(*Epicoccum*)等,而健康烟叶叶际特有的真菌属为尾孢属(*Cercospora*)、盘菌属(*Botryotinia*)和黑团孢属(*Periconia*)等,感病与健康烟叶叶际共有的细菌属为泛菌属,感病烟叶特有的细菌属为假单胞菌属、鞘脂单胞菌属和肠杆菌属(*Enterobacter*)等。在处理前 0 d 和处理后 5、10、15 d,感病烟叶叶际真菌群落特有的 OTU 数分别为 8、4、10、48 种;细菌群落特有的 OTU 数分别为 12、4、143、32 种。健康烟叶叶际真菌特有的 OTU 数分别为 38、75、45、39 种;细菌群落特有的 OTU 数分别为 15、5、100、80 种。以上结果表明,感病烟叶叶际真菌群落共有 OTU 数低于健康烟叶;细菌群落共有 OTU 数高于健康烟

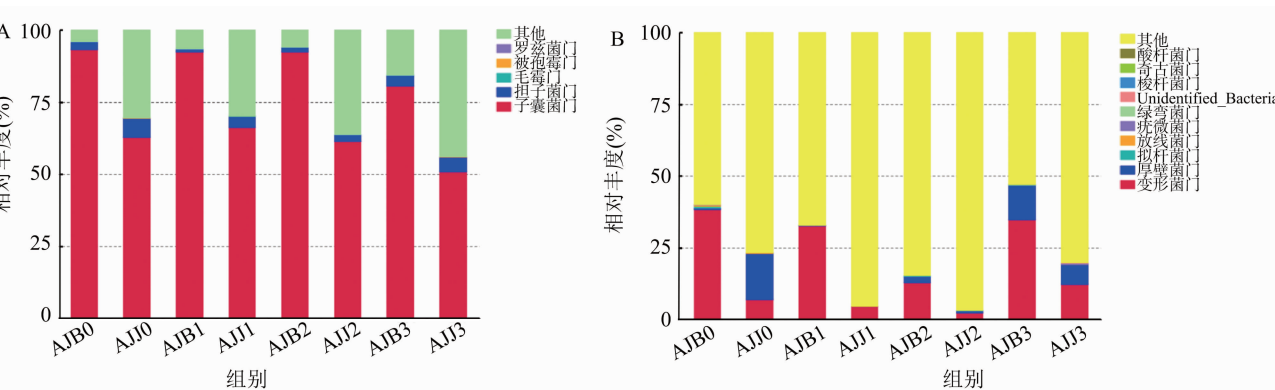
叶。噻菌酯处理后感病烟叶叶际真菌群落特有 OTU 数均呈先降低后增加趋势;健康烟叶叶际真菌群落特有 OTU 数呈先增加后降低趋势,感病与健康烟叶叶际细菌群落特有 OTU 数均呈先降低后增加再降低趋势。

2.2.2 烟草叶际真菌和细菌门水平群落结构 在真菌群落门水平上,处理前 0 d,感病(AJB0)与健康(AJJ0)烟叶叶际优势真菌门均为子囊菌门(Ascomycota, 93.38% 和 62.84%)和担子菌门(Basidiomycota, 2.63% 和 6.74%)。在处理后 5、10、15 d,感病烟叶叶际子囊菌门和担子菌门相对丰度分别为 92.52% 和 1.04%、92.43% 和 1.75%、80.61% 和 3.83%;健康烟叶叶际子囊菌门和担子菌门相对丰度分别为 66.27% 和 3.74%、61.55% 和 2.24%、50.86% 和 5.21%。其中,在处理前,感病烟叶叶际担子菌门相对丰度均明显低于健康烟叶,而在处理前后不同时期,感病烟叶叶际子囊菌门相对丰度均明显高于健康烟叶(图 2 - A)。



在细菌群落门水平上,处理前 0 d,感病 (AJB0) 烟叶叶际优势细菌为变形菌门 (Proteobacteria, 38.38%);健康 (AJJ0) 烟叶叶际优势细菌为变形菌门 (6.96%) 和厚壁菌门 (Firmicutes, 16.05%), 其中,感病烟叶叶际变形菌门相对丰度显著高于健康烟叶。在处理 5、10、15 d,感病烟叶叶际变形菌门相对丰度分别为 32.66%、12.79% 和 34.90%;健康

烟叶叶际变形菌门和厚壁菌门相对丰度分别为 4.60% 和 0.11%、2.24% 和 0.79%、12.35% 和 6.85%;感病烟叶叶际厚壁菌门 (2.24%) 在处理 10 d 增加成为优势细菌门,其在处理后 15 d 相对丰度为 12.01%。处理前 0 d 和处理 5、10 d,感病烟叶叶际变形菌门相对丰度显著高于健康烟叶 (图 2 - B)。



2.2.3 烟草叶际真菌和细菌属水平群落结构 在真菌群落属水平,在处理前 0 d 和处理 5、10、15 d,感病烟叶叶际优势真菌及相对丰度分别为链格孢属 (84.10%、86.61%、67.80% 和 73.84%)、枝孢霉属 (6.62%、2.21%、1.07% 和 2.21%)、壳多孢

菌属 (*Stagonosporopsis*, 0.43%、0.86%、10.60% 和 0.55%)、茎点霉属 (*Phoma*, 0.00%、0.46%、6.10% 和 0.06%) 和 *Symmetrospora* (2.27%、1.04%、1.16% 和 3.58%),健康烟叶叶际优势真菌及相对丰度分别为链格孢属 (35.66%、25.92%、49.30% 和

39.49%)、枝孢霉属(14.83%、10.05%、2.76%和2.27%)、亚隔孢壳属(*Didymella*, 2.67%、1.04%、1.32%和0.89%)、壳多孢菌属(0.55%、2.94%、2.33%和0.52%)、假丝酵母属(*Candida*, 0.00%、0.77%、1.99%和11.12%)、浪梗霉属(*Polythrincium*, 0.00%、6.99%、0.00%和0.00%)、*Symmetrospora*(5.61%、1.56%、2.02%和4.69%)、蜡壳菌属(*Sebacina*, 0.00%、1.10%、0.00%和0.00%)和*Diutina*(0.00%、0.15%、0.31%和1.38%)(图3-A)。其中,在处理前后各个时期,感病烟叶叶际链格孢属相对丰度均明显高于健康烟叶;在处理后5 d,健康烟叶叶际假丝酵母属、浪梗霉属和蜡壳菌属相对丰度显著高于感病烟叶以及其他各个取样时期的健康烟叶;在处理前0 d,健康烟叶叶际亚隔孢壳属和枝孢霉属相对丰度明显高于感病烟叶以及处理后10、15 d的感病烟叶。

在细菌群落属水平,在处理前0 d和处理后5、10、15 d,感病烟叶叶际优势细菌及相对丰度分别为泛菌属(22.78%、5.95%、3.59%和10.77%)、假单

胞菌属(5.61%、20.76%、1.57%和0.56%)、鞘脂单胞菌属(6.17%、1.57%、0.67%和0.11%)和马赛菌属(*Massilia*, 2.13%、1.35%、0.56%和0.00%)、甲基杆菌属(*Methylobacterium*, 0.00%、0.00%、3.14%和0.11%)、乳球菌属(*Lactococcus*, 0.00%、0.00%、1.57%和11.56%)和肠杆菌属(*Enterobacter*, 0.22%、0.79%、1.01%和6.06%)、健康烟叶叶际优势细菌属为泛菌属(6.73%、0.56%、0.45%和3.37%)、魏斯氏菌属(*Weissella*, 15.38%、0.00%、0.00%和0.00%)、乳球菌属(0.00%、0.00%、0.45%和5.16%)和肠杆菌属(0.00%、0.22%、0.45%和3.82%)(图3-B)。其中,处理前0 d,健康烟叶叶际魏斯氏菌属明显高于健康烟叶以及其他各个取样时期的健康烟叶;处理后5 d感病烟叶叶际假单胞菌属明显高于健康烟叶以及其他各个取样时期的感病烟叶。

2.3 烟草叶际真菌和细菌 α 多样性

本研究所测感病与健康烟叶样品中叶际真菌和细菌的覆盖度指数均大于0.82,表明本次样品的

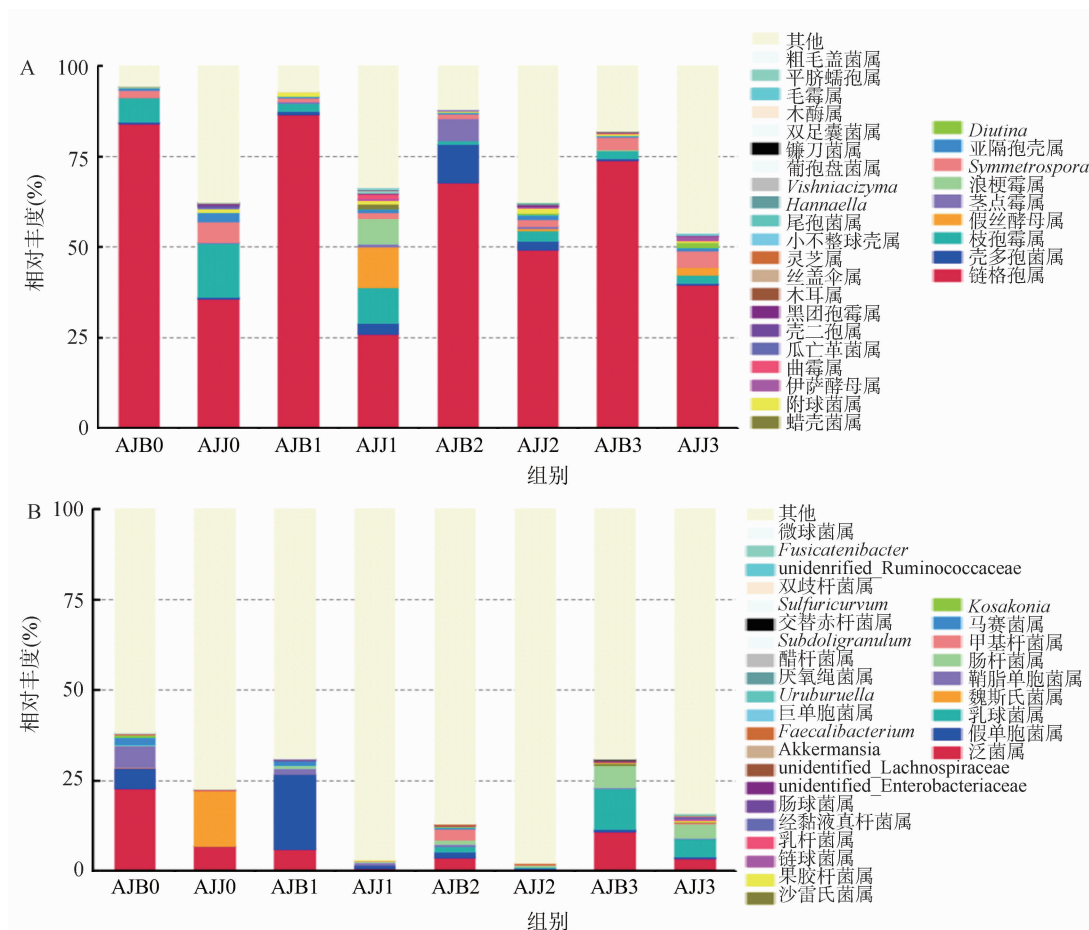


图3 真菌(A)和细菌(B)属水平相对丰度分布图

测序结果能够合理反映其叶际微生物的多样性。 密菌酯处理后,感病与健康烟叶叶际微生物多样性(香浓指数)与丰富度(Chao1 与 ACE 指数)指数均不同程度发生改变(表 3)。于真菌方面,在处理前 0 d,感病(AJB0)烟叶叶际真菌多样性和丰富度指数均显著低于健康烟叶(AJJ0)($P < 0.05$,下同)。 在处理后 0~15 d,感病(AJB)烟叶叶际真菌多样性指数呈先降低后增加趋势,丰富度指数呈持续增加趋势;健康(AJJ)烟叶叶际真菌多样性指数呈先增加后降低再增加趋势,丰富度指数呈先增加后降低趋势。其中,在处理后 5、10、15 d,感病烟叶叶际真菌群落多样性指数均显著低于健康烟叶;在处理后 5、10 d,感病烟叶叶际真菌丰富度指数均显著低于

健康烟叶。

细菌方面,在处理前 0 d,感病烟叶叶际细菌多样性和丰富度指数均高于健康烟叶,但差异不显著。 在处理后 0~15 d,感病烟叶叶际细菌多样性指数呈先增加后降低趋势,丰富度指数呈先降低后增加再降低趋势;健康烟叶叶际细菌多样性指数呈先降低后增加趋势,丰富度指数呈先增加后降低趋势。其中,在处理后 5、10、15 d,感病烟叶叶际细菌多样性指数均高于健康烟叶,在处理后 5、10 d,感病烟叶叶际细菌丰富度指数均高于健康烟叶,在处理后 15 d,感病烟叶叶际细菌丰富度指数低于健康烟叶,但差异均不显著。

表 3 真菌和细菌 α 多样性指数

类别	取样天数 (d)	组别	多样性指数	丰富度指数		覆盖度指数
			香浓指数	Chao1 指数	ACE 指数	
真菌	0	AJB0	1.01 ± 0.75b	26.06 ± 3.08d	26.84 ± 6.17d	0.994 ± 0.000 6a
		AJJ0	3.13 ± 0.34a	73.98 ± 29.41bc	79.49 ± 29.02bc	0.983 ± 0.005 7abc
	5	AJB1	0.99 ± 0.38b	28.94 ± 23.52cd	28.45 ± 20.10d	0.994 ± 0.005 3a
		AJJ1	3.63 ± 0.51a	131.76 ± 10.96a	144.89 ± 20.74a	0.967 ± 0.005 7d
	10	AJB2	1.63 ± 0.36b	41.08 ± 28.51cd	38.25 ± 21.18cd	0.991 ± 0.005 2ab
		AJJ2	3.01 ± 0.96a	108.54 ± 39.10ab	114.51 ± 41.11ab	0.974 ± 0.009 9cd
	15	AJB3	1.79 ± 0.94b	65.92 ± 38.49bcd	68.62 ± 40.63bcd	0.983 ± 0.009 6abc
		AJJ3	3.33 ± 0.31a	74.92 ± 24.53bc	81.05 ± 22.76bc	0.981 ± 0.008 1bc
细菌	0	AJB0	1.27 ± 0.95bc	25.33 ± 18.93b	39.30 ± 28.95ab	0.974 ± 0.016 3a
		AJJ0	1.12 ± 0.17bc	14.75 ± 4.26b	18.89 ± 6.97b	0.982 ± 0.007 2a
	5	AJB1	1.76 ± 0.42abc	18.67 ± 2.08b	19.98 ± 1.72b	0.985 ± 0.004 0a
		AJJ1	0.61 ± 0.08c	16.53 ± 2.00b	18.32 ± 2.96b	0.980 ± 0.003 5a
	10	AJB2	2.82 ± 1.15a	243.85 ± 218.32a	277.24 ± 265.86a	0.828 ± 0.121 2b
		AJJ2	1.59 ± 1.15abc	182.83 ± 132.53ab	225.72 ± 163.75ab	0.878 ± 0.094 0ab
	15	AJB3	2.17 ± 0.58ab	60.28 ± 29.95ab	82.16 ± 42.35ab	0.945 ± 0.018 2a
		AJJ3	2.10 ± 0.72ab	176.48 ± 224.87ab	200.91 ± 252.39ab	0.901 ± 0.093 4ab

注:同栏同列数据后不同字母表示采用 DPS 中的新复极差法(Duncan's)检验数值间差异显著($P < 0.05$)。

2.4 Spearman 相关性

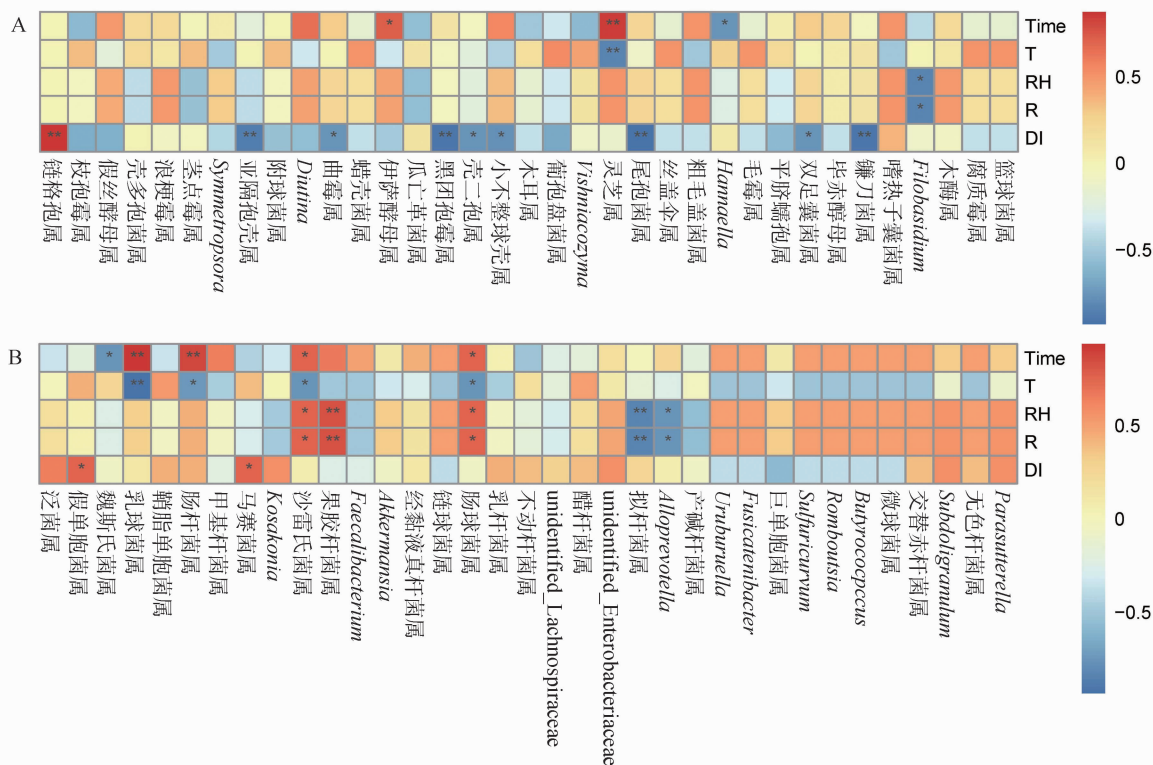
本研究对样品的取样时间、环境因子(平均温度、相对湿度、降水量)及病情指数与其叶际 top50 的菌属进行 Spearman 相关分析,来研究环境因子与微生物 α 多样性和物种之间的相互变化关系。 结果表明,在真菌属水平,取样时间与伊萨酵母属(*Issatchenkia*)相对丰度呈显著正相关,与灵芝属(*Ganoderma*)相对丰度呈极显著正相关,与 *Hannaella* 相对丰度呈显著负相关。降水量与 *Filobasidium* 相对丰度呈显著负相关。温度与灵芝属相对丰度呈极显著负相关。病情指数与链格孢

属相对丰度呈极显著正相关,与亚隔孢壳属、黑团孢霉属(*Periconia*)、尾孢菌属、镰刀菌属(*Fusarium*)相对丰度呈极显著负相关,与曲霉属(*Aspergillus*)、壳二孢属(*Ascochyta*)、小不整球壳属(*Plectosphaerella*)及双足囊菌属(*Dipodascus*)相对丰度呈显著负相关(图 4-A)。

在细菌属水平,取样时间与乳球菌属和肠杆菌属相对丰度呈极显著正相关,与肠球菌属(*Enterococcus*)和 *Serratia* 相对丰度呈显著正相关,与魏斯氏菌属相对丰度呈显著负相关。降水量和空气相对湿度均与果胶杆菌属(*Pectobacterium*)相对

丰度极显著正相关,与肠球菌属和 *Serratia* 相对丰度呈显著正相关,与拟杆菌属 (*Bacteroides*) 相对丰度呈极显著负相关,与 *Alloprevotella* 相对丰度呈显著负相关。温度与乳球菌属相对丰度呈极显著负

相关,与肠杆菌属、*Serratia* 和肠球菌属相对丰度呈显著负相关。病情指数与马赛菌属和假单胞菌属相对丰度呈显著正相关(图 4-B)。



Time 为取样时间; T 为日平均温度; RH 为日平均相对湿度; R 为日平均降水量; DI 为病情指数; 红色表示正相关; 蓝色表示负相关; * 和 ** 分别表示相关性显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$)

图4 真菌(A)和细菌(B)与环境因子互作 Spearman 相关性分析热图

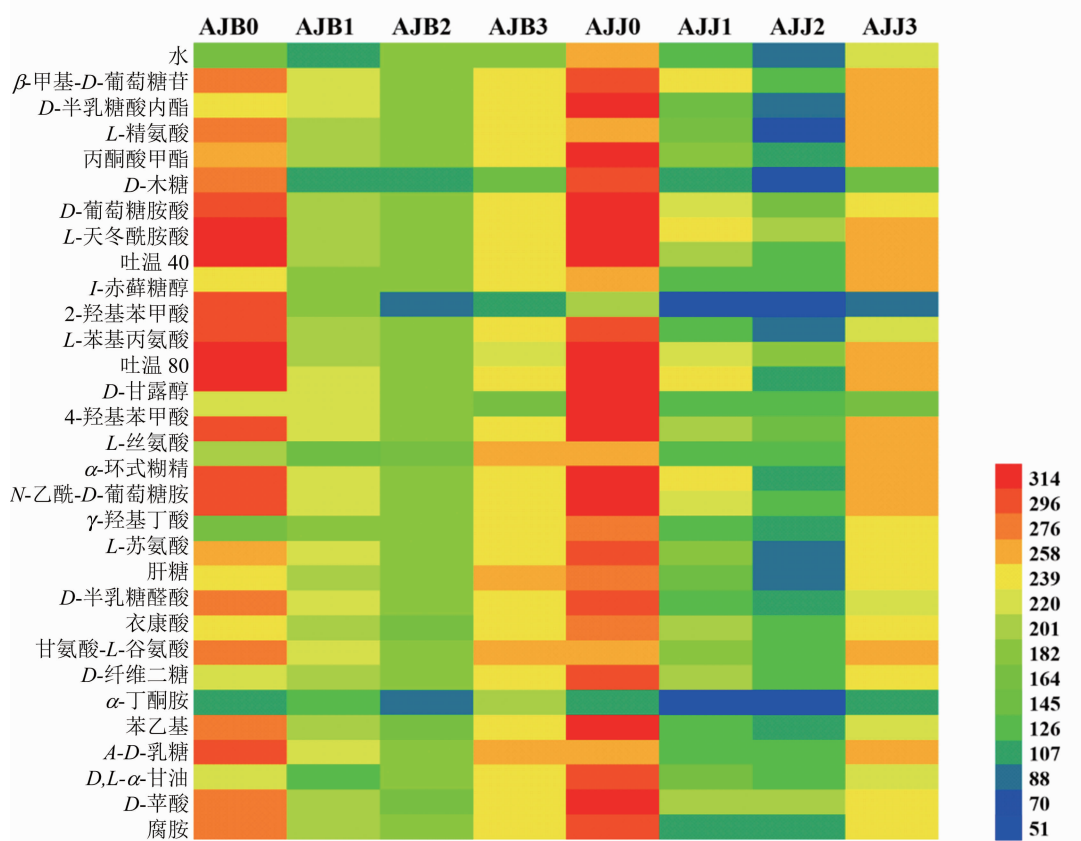
2.5 烟草叶际微生物碳源代谢

Biolog ECO 代谢板中含有可供自然界中大部分微生物利用的碳源物质,其中包括氨基酸、有糖类和羧酸类等共 31 种碳源。嗜菌酯对感染烟草赤星病烟叶叶际微生物代谢功能的影响如图 5 所示,在处理前,感病 (AJB0) 烟叶叶际微生物可高效代谢 (颜色值变化值 > 200) 除 α -丁酮酸 (α -ketobutyric acid) 及 L -苏氨酸 (L -threonine) 外的 29 种碳源,健康 (AJJ0) 烟叶叶际微生物可高效代谢除 α -丁酮酸外的 30 种碳源。

在嗜菌酯处理后的 5、10、15 d 内,感病与健康烟叶叶际微生物对 31 种碳源代谢均受到不同程度抑制。在感病烟叶叶际微生物代谢方面,处理后 5 d,其叶际微生物 (AJB1) 可高效代谢 26 种碳源,主要包括 N -乙酰- D -葡萄糖胺 (N -acetyl- D -Glucosamine)、 D -葡萄糖胺酸 (D -galacturonic acid) 和 L -苯基丙氨酸 (L -phenylalanine) 等,5 种碳源代谢受到抑制,包括 D -木糖 (D -xylose)、

α -丁酮酸和 I -赤藓糖醇 (I -erythritol) 等;处理后 10 d,其叶际微生物 (AJB2) 的代谢功能进一步受到抑制,无可高效代谢的碳源;处理后 15 d,其叶际微生物 (AJB3) 的大部分代谢功能恢复,可高效代谢 28 种碳源,包括 D -半乳糖酸内酯 (D -galactonic acid lactone)、4-羟基苯甲酸 (4-hydroxy benzoic acid) 和 L -天冬酰胺酸 (L -asparagine) 等,代谢仍受到抑制的碳源有 D -木糖、2-羟基苯甲酸 (2-hydroxy benzoic acid) 及 4-羟基苯甲酸。

在健康烟叶叶际微生物代谢方面,处理后 5 d,其叶际微生物 (AJJ1) 可高效代谢 11 种碳源,包括 β -甲基- D -葡萄糖苷 (β -methyl- D -glucoside)、 D -葡萄糖胺酸和 γ -羟基丁酸 (γ -hydroxybutyric acid) 等,对 20 种碳源代谢受到抑制,包括丙酮酸甲酯、2-羟基苯甲酸和 α -丁酮酸等;处理后 10 d,其叶际微生物 (AJJ2) 的代谢功能进一步受到抑制,仅可高效代谢 L -天冬酰胺酸和 D -苹果酸 (D -malic acid) 2 种碳源,29 种碳源代



颜色值分别代表微生物代谢碳源的程度；0~100 为代谢程度低，100~200 为代谢程度一般，200 以上为代谢程度高

图5 烟叶叶际微生物代谢功能的聚类热图

谢受到抑制;处理后 15 d,其叶际微生物(AJJ3)代谢功能大部分恢复,可高效代谢除 α -丁酮胺、4-羟基苯甲酸、D-木糖、2-羟基苯甲酸 4 种碳源外的 27 种碳源。

3 讨论与结论

烟草叶斑类病害的发生与其叶际微生物群落结构密切相关,烟叶发病后其叶际菌群落结构随之发生改变^[20]。本研究发现,噻菌酯处理前,感病与健康烟叶叶际优势真菌均为链格孢属、枝孢霉属和 *Symmetrospora* 等,优势细菌均为泛菌属。结果与刘畅等关于烟草赤星病烟叶叶际优势真菌和细菌报道结果类似^[11-12],进一步验证链格孢属为感赤星病烟叶叶际绝对优势菌属。本研究发现烟叶叶际还存在另一种叶斑病病原菌亚隔孢壳属^[18]。噻菌酯处理后 0~15 d 内,感病烟叶叶际链格孢属、壳多孢菌属和茎点霉属相对丰度先增加后降低,枝孢霉属、亚隔孢壳属和 *Symmetrospora* 相对丰度先降低后增加,健康烟叶叶际链格孢属、枝孢霉属、亚隔孢壳属和 *Symmetrospora* 相对丰度均先降低后增加,壳多

孢菌属、假丝酵母属、浪梗霉属和蜡壳菌属相对丰度先增加后降低。此结果与何涛等报道施用烯酰吗啉后葡萄叶际白粉菌属和赤霉属等真菌属丰度上升,枝孢属和链格孢属等真菌属丰度下降类似^[21]。化学药剂的使用是植物叶际微生物群落结构改变的一个重要影响因素^[22]。本研究中,噻菌酯处理后烟叶叶际致病菌链格孢属和亚隔孢壳属等多个病原菌属较长时间内处于较低丰度,表明该药剂对多种烟草叶斑病害均有较好防效,同时也进一步说明了该药剂的广谱性和持效性^[23-24]。此外,本研究还发现在处理后 5 d 烟叶叶际壳多孢菌属、假丝酵母属、浪梗霉属和蜡壳菌属相对丰度显著增加。有研究报道,自然界有部分特殊微生物能够降解农药并利用农药作为营养物质进行生长^[25]。微生物群落生物量增加后可通过拮抗和竞争等作用机制抑制病菌生长^[22]。推测噻菌酯抑制了部分病原菌的生长,同时为壳多孢菌属、假丝酵母属、浪梗霉属和蜡壳菌属等增殖创造了条件,但上述菌属是否能降解并利用噻菌酯作为营养物质还有待进一步研究。

微生物作为叶际微生态的重要组成部分^[26],在长期的自然选择下,真菌和细菌分别适应烟叶叶际环境形成了一个复杂的微生态系统^[22]。研究表明,烟叶真菌性病害发生后,其叶际真菌丰富度和多样性均降低,而细菌性病害则相反^[27-29]。本研究发现,处理前感病烟叶叶际真菌丰富度和多样性指数均低于健康烟叶,感病烟叶叶际细菌丰富度和多样性指数则高于健康烟叶,结果与前人研究基本一致,进一步验证了烟叶感病后丰富度和多样性的变化规律。噬菌酯处理后,感病与健康烟叶叶际真菌群落丰富度和多样性增加,细菌群落丰富度和多样性短时间内降低后随时间延长迅速增加。噬菌酯被报道主要用于真菌性病害和卵菌病害的防治,其对叶际细菌微生态的改变,可能是由于其影响了叶际真菌菌群结构,进而细菌群落结构也随之变化,已有的研究发现噬菌酯能够通过抑制与蓝藻存在竞争关系的绿藻促进蓝藻的竞争优势,改变水体环境中微生物群落结构^[30]。因此,噬菌酯是否也对烟草叶际细菌具有抑菌活性有待下一步通过敏感性测定进行验证。

植物叶际菌群结构与所处环境密切相关,温度、紫外线、降雨等环境因子均影响着叶际微生物的群落结构,植物叶际真菌和细菌复杂的时空分布是各种环境因子与寄主植物相互作用的结果^[20]。本文发现,病情指数与真菌群落中的链格孢属及细菌群落中的马赛菌属和假单胞菌属相对丰度呈极显著正相关,取样时间与真菌群落中的灵芝属及细菌群落中的乳杆菌属和肠杆菌属相对丰度呈显著正相关。推测随着烟叶病情的发展,病原菌链格孢属与亚隔孢壳属和镰孢菌属间存在某种复杂的竞争关系。微生物在植物叶际定殖存在优先效益^[31]。已有的研究发现假单胞菌属为叶际初级定殖菌,可保护次级定殖菌抵御环境胁迫^[32]。该发现与本文中取样时间与各菌属之间的相关性基本符合。表明烟草叶际菌群演替过程还受到微生物优先效益影响。此外,本研究还发现温度与真菌群落中的灵芝属及细菌群落中的乳杆菌属相对丰度呈极显著负相关,这与韩秋影等报道假单胞菌属和 *Thalassospira* 等细菌属随温度升高数量急剧降低类似^[33],进一步说明了本研究噬菌酯对叶际微生物菌群结构的影响中,环境因子也起到了一定影响。

碳源是微生物生长代谢所必需的基本物质,

Biolog ECO 代谢板内含有自然界大部分微生物所能代谢的 31 种常见碳源^[34]。本研究测定了感赤星病烟叶处理前及处理后不同时期感病与健康烟叶叶际微生物对糖类、羧酸类、氨基酸、聚合物类、胺类和酚类等 6 类共 31 种碳源代谢活性,发现处理前,感病与健康烟叶均可高效代谢除 α -丁酮酸和 *L*-苏氨酸外的 29 种碳源。结果与刘亭亭等发现感病与健康烟叶叶际微生物均较弱代谢 2-羟基苯甲酸和 *L*-苯基丙氨酸等碳源结果类似^[35]。因此,是否可以通过使用 α -丁酮酸和 *L*-苏氨酸来调控烟叶叶际环境进而防控烟草赤星病,有待下一步验证。在噬菌酯处理后,感病与健康烟叶叶际微生物碳源代谢活性差异较大,在 5 d 时对感病烟叶叶际微生物的碳源代谢活性抑制作用较弱,但随着时间的延长,在 10 d 时对感病与健康烟叶叶际微生物的碳源代谢活性均表现出较强的抑制作用,结果与刘亭亭等报道的波尔多液处理可抑制烟草叶际微生物碳源代谢结果类似^[36],表明该药剂发挥作用所需较长时间且具有持效性,适合发病初期使用。

本研究发现感赤星病烟叶与健康烟叶叶际微生物的群落结构、多样性和代谢功能在噬菌酯施用后不同时期的变化规律存在共性与差异。在噬菌酯处理后 0~15 d 内,感病与健康烟叶叶际优势真菌属种类均增加,感病烟叶叶际链格孢属、壳多孢菌属和茎点霉属相对丰度均先增加后降低;枝孢霉属、亚隔孢壳属和 *Symmetrospora* 则先降低后增加。健康烟叶叶际链格孢属、枝孢霉属、亚隔孢壳属和 *Symmetrospora* 相对丰度均先降低后增加;壳多孢菌属、假丝酵母属、浪梗霉属和蜡壳菌属则先增加,并在处理后第 5 d 时成为新的优势菌属。感病与健康烟叶叶际泛菌属、马赛菌属和鞘脂单胞菌属相对丰度均持续降低;感病烟叶叶际的假单胞菌属、乳杆菌属、肠杆菌属和甲基杆菌属丰度先增加后降低。感病烟叶叶际真菌群落多样性和丰富度持续增加,细菌群落多样性先增加后降低,丰富度先降低后增加;健康烟叶叶际真菌群落多样性和丰富度先增加后降低,细菌群落多样性先降低后增加,丰富度先增加后降低。噬菌酯处理后 5 d 时对感病烟叶叶际微生物的碳源代谢抑制作用较健康烟叶弱,但 10 d 时则均表现出较强抑制作用。本文从微观层面揭示了噬菌酯施用后感病与健康烟叶叶际微生物在不同时期变化规律的差异,为烟草赤星病的精准化学防控提供一定理论参考。

参考文献:

- [1] 牛俊轲, 卢宝慧, 刘丽萍, 等. 吉林省和黑龙江省烟草赤星病病原鉴定[J]. 中国烟草科学, 2019, 40(5): 52–59.
- [2] 杨 涛, 黎妍妍, 郑 露, 等. 湖北省烟草赤星病长柄链格孢遗传多样性分析[J]. 中国烟草学报, 2018, 24(6): 93–99.
- [3] Feng Z H, Li Y X, Ma X Y, et al. Draft genome sequence of *Alternaria longipes* causing tobacco brown spot[J]. Plant Disease, 2022, 106(2): 734–736.
- [4] Jing C L, Zhao J, Han X B, et al. Essential oil of *Syringa oblata* Lindl. as a potential biocontrol agent against tobacco brown spot caused by *Alternaria alternata*[J]. Crop Protection, 2018, 104: 41–46.
- [5] 初炳瑶, 龚凯悦, 谷医林, 等. 应用 real-time PCR 评价三种杀菌剂对小麦条锈病的防治效果[J]. 植物病理学报, 2017, 47(4): 532–540.
- [6] 张尚卿, 韩晓清, 吴志会, 等. 根施阿米西达防治番茄叶霉病效果及对番茄生长的影响[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(6): 137–139.
- [7] Rodrigues E T, Lopes I, Pardal M Â. Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: a review [J]. Environment International, 2013, 53: 18–28.
- [8] Ma Z H, Felts D, Michailides T J. Resistance to azoxystrobin in *Alternaria isolates* from pistachio in California [J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2003, 77(2): 66–74.
- [9] Wang H C, Huang Y F, Wang J, et al. Activities of azoxystrobin and difenoconazole against *Alternaria alternata* and their control efficacy [J]. Crop Protection, 2016, 90: 54–58.
- [10] 陈 杰, 李六英, 高 敏, 等. 烟草赤星病室内防治药剂筛选及田间防治效果[J]. 中国烟草科学, 2017, 38(1): 73–77.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Dai Y F, Wu X M, Wang H C, et al. Spatio-temporal variation in the phyllospheric microbial biodiversity of *Alternaria alternata* – infected tobacco foliage [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 920109.
- [14] Qin C, Tao J M, Liu T B, et al. Responses of phyllosphere microbiota and plant health to application of two different biocontrol agents[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 42.
- [15] 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.
- [16] Chen X Y L, Wicaksono W A, Berg G, et al. Bacterial communities in the plant phyllosphere harbour distinct responders to a broad-spectrum pesticide[J]. Science of the Total Environment, 2021, 751: 141799.
- [17] 史广亮, 岳德成, 柳建伟, 等. 几种杀菌剂对苹果黑星病的田间防效评价[J]. 农药, 2021, 60(10): 771–774, 777.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] 何 涛, 杜鸿燕, 孙家秀, 等. 烯酰吗啉对葡萄叶际微生物区系影响研究[J]. 植物病理学报, 2022, 52(3): 443–458.
- [22] 杨 宽, 王慧玲, 叶坤浩, 等. 叶际微生物及与植物互作的研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2021, 36(1): 155–164.
- [23] 曾雅婷, 熊 桃, 柏自琴, 等. 柑橘黑点病菌种群对噬菌酯敏感性基线的建立[J]. 植物保护, 2022, 48(4): 138–142.
- [24] 张钟凯, 应彩娇, 程志强, 等. 噬菌酯/聚丙烯腈微球的制备及缓释性能[J]. 农药学报, 2022, 24(3): 643–648.
- [25] 李 娜. 乌头叶面微生物区系与乌头霜霉病的相关性研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2017.
- [26] 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.
- [27] 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.
- [28] 向立刚, 汪汉成, 郭珍妮, 等. 黑胫病感染对烟草茎秆及根际土壤真菌群落结构的影响[J]. 菌物学报, 2019, 38(12): 2099–2111.
- [29] 高卫锴, 李茂森, 李 超, 等. 不同海拔条件下烤烟成熟期根际土壤真菌群落结构及生态特征分析[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(8): 221–227.
- [30] Lu T, Zhang Q, Lavoie M, et al. The fungicide azoxystrobin promotes freshwater cyanobacterial dominance through altering competition [J]. Microbiome, 2019, 7(1): 1–13.
- [31] 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, e5.
- [32] Poza-Carrion C, Suslow T, Lindow S. Resident bacteria on leaves enhance survival of immigrant cells of *Salmonella enterica* [J]. Phytopathology, 2013, 103(4): 341–351.
- [33] 韩秋影, 张泽玉, 刘红霞, 等. 温度胁迫对日本鳶草 (*Zostera japonica*) 叶际可培养细菌的影响[J]. 生态学杂志, 2017, 36(9): 2564–2571.
- [34] 肖 怡, 李 峥, 黄 容, 等. 有机物料还田对稻田土壤 DOM 碳源代谢能力的影响[J]. 环境科学, 2022, 43(7): 3884–3894.
- [35] 刘亭亭, 曾隽涛, 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.
- [36] 刘亭亭, 汪汉成, 孙美丽, 等. 波尔多液对烟草叶际微生物群落结构与代谢功能的影响[J]. 农药学报, 2022, 24(6): 1446–1455.