烟草未知叶斑病叶际真菌分离鉴定及其叶际真菌碳代谢特征

张琴叶[1,2]，蔡翼杨[3]，蔡刘体[2]，汪汉成[2*]，陈丽莉[2]，李 菲[1*]

（1. 贵州师范大学 生命科学学院，贵州 贵阳 550025；2. 贵州省烟草科学研究院，贵州 贵阳 550081；
3. 黔东南州烟草公司镇远分公司，贵州 镇远 557700）

摘 要 为诊断贵州省遵义市道真县烟田的一未知病害，了解其叶际微生态特征，采用组织分离法对其叶际真菌进行分离纯化及分子生物学鉴定，依据柯赫氏法则验证致病菌，采用扩增子测序技术对其叶际微生物群落组成与多样性进行分析，采用 Biolog ECO 微平板法研究其叶际微生物的代谢活性。结果表明，使用组织分离法从感病烟叶组织上共分离到 10 个菌属的 24 株真菌，致病力验证结果表明间座壳属（*Diaporthe*）真菌具有致病性，基于 ITS、HIS 和 TEF1-α 基因序列构建联合系统发育树并结合形态学鉴定结果，揭示引起该烟草叶斑病的病原为榆树间座壳菌（*Diaporthe eres*）。扩增子测序结果显示，健康和感病烟叶叶际优势真菌属均为布勒酵母属（*Bullera*）（相对丰度分别为 22.89%、10.33%）和纖柔菌属（*Abrothallus*）（44.01%、41.21%）。感病烟叶与健康烟叶真菌群落的多样性指数无显著差异，感病烟叶的丰富度指数低于健康烟叶。功能预测结果表明，感病烟叶组织中的植物病原菌类群相对丰度高于健康组织。碳源代谢发现，健康烟叶叶际微生物碳源代谢能力强于感病烟叶，健康烟叶叶际微生物对 28 种碳源具有较强的代谢能力；感病烟叶叶际微生物对 12 种碳源有较高的代谢能力。该烟草未知叶斑病由榆树间座壳菌引起，叶际微生物还包含链格孢属、织球壳属、短梗霉属、棒孢属等致病菌，结果揭示了该未知烟草叶斑病的叶际真菌微生态特征。

关键词 扩增子测序；间座壳属（*Diaporthe*）；致病力；真菌群落；碳源代谢

中图分类号 Q93－331 **文献标识码** A **文章编号** 1005－7021(2026)03－0039－11

doi：10.3969/j.issn.1005－7021.2026.03.004

Isolation and Identification of Phyllosphere Fungi from Tobacco Leaves with an Unknown Spot Disease and Their Carbon Metabolism Characterization

ZHANG Qin-ye[1,2], CAI Yi-yang[3], CAI Liu-ti[2], WANG Han-cheng[2*], CHEN Li-li[2], LI Fei[1*]

(1. *Guizhou Normal University*, *Guiyang* 550025; 2. *Guizhou Academy of Tobacco Science*, *Guiyang* 550081;
3. *Zhenyuan Branch of Qiandongnan Tobacco Company*, *Zhenyuan* 557700)

Abstract To diagnose an unidentified disease affecting tobacco fields at Daozhen County in Zunyi, and to investigate the phyllosphere microecological characteristics associated with the disease, a comprehensive study was conducted. Phyllosphere fungi were isolated and purified using tissue isolation methods, and identified by molecular biology techniques. The pathogenicity of these phyllosphere fungi was assessed based on Koch′s postulates. Amplicon sequencing

基金项目：国家自然科学基金项目（32160522，32460698）；贵州省“百层次”创新型人才项目（黔科合平台人才-GCC[2022]028-1）；贵州省科技创新人才团队项目（黔科合平台人才-CXTD[2023]021）；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）

作者简介：张琴叶 女，硕士研究生。研究方向为植物病原微生物。E-mail：zhangqinye121@163.com

* 通讯作者。李菲，男，副教授，博士，硕士生导师。主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail：lifei2@gznu.edu.cn

汪汉成，男，研究员，博士，博士生导师。主要从事植物病理学研究。Tel：0851-84116913，E-mail：xiaobaiyang126@hotmail.com

收稿日期：2025-10-10

was employed to analyze the microbial community structure and diversity, while Biolog ECO microplate assays were used to evaluate the metabolic activity of the phyllosphere microorganisms. A total of 24 fungal isolates belonging to 10 genera were obtained from symptomatic tobacco leaf tissues through tissue isolation. Pathogenicity tests demonstrated that fungi of the genus *Diaporthe* were pathogenic. Phylogenetic analysis based on ITS, HIS and TEF1-α gene sequences combined with morphological identification revealed that the pathogen responsible for the tobacco leaf spot disease was identified as *Diaporthe eres*. Amplicon sequencing results indicated that the dominant fungal genera in both healthy and diseased tobacco phyllosphere samples were *Bullera* (22.89% in healthy and 10.33% in diseased samples), *Abrothallus* (44.01% and 41.21%). There was no significant difference in fungal diversity index between healthy and diseased tobacco leaves; however, the richness index was lower in diseased samples. Functional prediction suggested that the relative abundance of plant pathogenic fungi was higher in diseased tobacco leaf tissues compared to healthy ones. Carbon substrate utilization assays revealed that the metabolic activity of phyllosphere microorganisms from healthy tobacco leaves was stronger than that of those from diseased leaves. Microorganisms from healthy leaves exhibited high metabolic capability toward 28 carbon sources. In contrast, phyllosphere microorganisms from diseased leaves showed relatively higher metabolic activity toward 12 carbon sources. In conclusion, the previously unknown tobacco leaf spot disease was identified and determined to be caused by *Diaporthe eres*. Additionally, other pathogenic genera such as *Alternaria*, *Abrothallus*, *Aspergillus*, and *Colletotrichum*were also present in the disease-associated phyllosphere. These findings provide insight into the fungal microecological characteristics of the phyllosphere associated with the what so called unknown tobacco leaf spot disease.

Keywords amplicon sequencing; *Diaporthe*; pathogenicity; fungal community; carbon source metabolism

烟草作为我国广泛种植的叶用经济作物,在生长发育过程中常常受到多种病原菌的侵染从而导致病害发生。烟草叶斑类病害是叶部主要病害,常对烟草烟叶生产造成严重影响[1]。常见叶斑类病害包括赤星病[2]、靶斑病[3]、白粉病[4]、角斑病[5]等。烟草叶斑类病害的发生,往往伴随叶际微生物群落结构组成的改变。Xiang 等[6]采用传统分离培养法和柯赫氏法则对烟草叶际微生物及潜在病原菌分析发现,分离出的炭疽菌属(*Colletotrichum*)、炭角菌属(*Xylaria*)、棒孢属(*Corynespora*)、拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)、链格孢属(*Alternaria*)、附球菌属(*Epicoccum*)、茸球壳属(*Byssosphaeria*)、茎点霉属(*Phoma*)和间座壳属(*Diaporthe*)等叶际真菌均可致烟叶发病。叶果等[7]采用组织分离法分离烟草未知叶斑病病原菌,结合形态学观察与多基因序列分析进行病原物鉴定,通过柯赫氏法则验证其致病力,并测定其生物学特性,最终确定病原菌为喀斯特炭疽菌(*Colletotrichum karstii*)。已有研究表明,烟草叶斑类病害的发生与叶际微生物群落结构组成密切相关。刘畅等[8]对烟草赤星病叶际微生物群落结构与多样性的研究发现,感病烟叶叶际主要优势真菌为链格孢属,叶际真菌群落结构与多样性均低于健康烟叶。孙美丽等[9]研究发现,感染靶斑病烟叶叶际优势真菌为亡革菌属(*Thanatephorus*)、*Stagonosporopsis*、链格孢属、亚隔孢壳属(*Didymella*);健康烟叶的优势真菌属为链格孢属、异壳二孢属(*Neoascochyta*)、亚隔孢壳属(*Didymella*)和枝孢属(*Cladosporium*)。叶斑病病原菌的诊断通常采用组织分离培养法,但该方法检测结果的准确性常会受到组织消毒方式、培养介质和培养条件等因素的影响。而扩增子高通量测序技术可从微观层面解析感染叶斑病烟叶与健康烟叶叶际细菌和真菌的菌群结构差异,近年来该技术已被广泛应用于烟草叶斑类病害叶际微生态特征的研究[10]。贵州省烟草科学研究院植物保护团队于2024 年7 月在贵州省遵义市道真县烟田发现一未知叶斑类病害,该病害病斑初始为不规则褐色,发病后期病斑扩大为不规则多边形,外缘呈褐色,向内过渡为白色,中央部分有肉眼可见的黑色孢子。该病斑形态与烟草赤星病、靶斑病等常见烟草叶斑病病斑形态存在显著差异。为了解烟草叶斑类病害的病原菌种类及其叶际微生态特征,本研究对田间采集的感病烟叶进行叶际真菌分离,并对分离菌株进行致病性测定及分子生物学鉴定,同时对烟叶叶际真菌菌群结构和叶际微生物碳源代谢功能进行分析,旨在明确该病害病原菌的种类,进而为其病害灾变规律和防控技术研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 2024 年 7 月从贵州省遵义市道真县种植的云烟 87 烟田中采集 8 份烟草叶斑病标本(图 1)。随机在挑选的发病烟株上,采集健康叶片和典型感病的叶片,用已消毒的剪刀剪取叶片感病与健康部位样品各 1.5 ~3.0 g,装入 50 mL 无菌离心管中,同一处理设置 4 次重复并做好标记。样品编号见表 1。



图 1 烟草叶斑病典型症状

Fig. 1 Typical symptoms of tobacco leaf spot disease

表 1 样品采集信息

Table 1 Sample collection information

组织类型	分组	样品编号
健康叶片组织	DZJ	DZJ1
		DZJ2
		DZJ3
		DZJ4
感病叶片组织	DZB	DZB1
		DZB2
		DZB3
		DZB4

1.1.2 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.1.3 主要试剂与仪器设备 Premix Taq(EX Taq Version 2.0 Plus Dye)、DL2000 DNA Marker、DNA 裂解液 Buffer(宝生物工程有限公司)。PCR 仪(Alpha-SE,美国 ABI 公司);电泳仪(DYY-6C,北京六一仪器厂);Biolog ECO 碳源代谢板及 Biolog GEN Ⅲ OmniLog 全自动微生物鉴定系统(GENIIIOmniLogIIComboPlus,美国 BIOLOG 公司);生化培养箱(SPX-250B-Z,上海博迅实业有限公司医疗设备厂);人工气候箱(LEDR-600,宁波扬辉仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 病原真菌的分离与纯化 从田间采集的 4 份感病烟叶样品中选取少量烟叶组织,将其切成 5 mm ×5 mm 小块,使用无菌镊子将其接种于 PDA 培养基,置于 25 ℃真菌培养箱中黑暗培养。4 d 后用无菌接种针挑取菌落边缘新鲜菌丝进行纯化培养,并将纯化后的分离株接种于 PDA 培养基斜面,4 ℃保存备用。

1.2.2 病原真菌的分子生物学鉴定 挑取生长 3 d 的新鲜菌丝置于盛有 20 μL DNA 裂解液的 1.5 mL无菌离心管中,使用引物 ITS1(5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′)和 ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)对真菌 ITS 序列进行聚合酶链式反应扩增。PCR 扩增体系和程序参照文献[11]的方法。利用 1.5% 的琼脂糖凝胶对扩增后 PCR 产物进行检测,检测合格后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,将测序结果上传至 NCBI 数据库进行 BIAST 比对,确定分离得到的真菌种类。

1.2.3 致病力验证 在各菌属中挑选代表性菌株采用柯赫氏法则进行致病性测定。使用无菌打孔器在待测真菌菌落边缘打取直径 5 mm 的菌碟,用一次性无菌注射器避开叶脉对叶片中上部做刺伤处理,使用无菌接种针将菌碟菌丝面覆盖在刺伤处,以润湿脱脂棉在叶柄基部对叶片进行保湿培养。每株菌株接种 3 张叶片,每张叶片对称接种 2 个菌碟。接种完成后将叶片放入人工气候箱,温度 28 ℃、相对湿度 80%(±5%)、光周期 L∶D = 12 h∶12 h 条件下培养。7 d 后观察并记录叶片的发病情况以评估真菌的致病性。另选取离体叶片上的致病菌进行活体烟株的致病力验证,进一步确认病原菌。重新分离发病叶片的病原菌,对其进行形态学鉴定,使用引物 RPB2-5F(5′-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3′)、RPB2-7CR(5′-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3′)、EF1-728F(5′-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3′)以及 EF1-986R(5′-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3′)扩增 RPB2 和 TEF1-α 区域的基因序列[12],PCR 扩增体系和程序参照文献[13]的方法。采用 MEGA11.0 软件通过邻接法构建系统发育树,以

确定病原菌种类。

1.2.4 叶际微生物 DNA 提取及扩增子测序 将田间取样获得的健康与感病烟叶组织于 -80 ℃冰箱中保存,2024 年 7 月使用干冰将样品送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行叶际微生物 DNA 提取及扩增子高通量测序。采用 CTAB (Cetyltrimethylammonium Bromide)法[14]进行烟叶叶际微生物基因组 DNA 的提取,用琼脂糖凝胶电泳检测样品 DNA 的纯度。将提取的 DNA 置于离心管中,用无菌水稀释至 1 ng/μL,以此为模板,使用引物 ITS1-5F-F(5′-GGAAGTAAAAGTCG-TAACAAGG-3′)和 ITS1-1F-R(5′-CTTGGTCATT-TAGA-GGAAGTAA-3′)对真菌进行聚合酶链式反应扩增;参考文献[15]的方法进行多样性测序与分析,以上过程均由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。对扩增产物进行等量混样和纯化后,构建 ITS 基因文库,利用 IonS5TMXL 平台进行测序分析。

1.2.5 烟叶叶际微生物碳源代谢功能 分别从烟叶样品中剪取健康与感病烟叶各 1 g,将其分别加入盛有 50 mL 0.85% 无菌生理盐水的锥形瓶中,180 r/min 振荡培养 120 min。静置 15 min 后取上清液加入 Biolog ECO 碳源代谢板中,每孔 100 μL,并以稀释 10 倍后上清液作为对照。将接种的 Biolog ECO 碳源代谢板置于 OmniLog 培养箱中 25 ℃孵育 5 d,每隔 15 min 由 Omnilog 系统读数 1 次。OmnilLog 读数的大小反映微生物群落代谢能力的强弱。Biolog ECO 板含有 31 种碳源,按其代谢特征和化学结构可分为 6 大类:碳水化合物类(7 种)、氨基酸类(6 种)、醇类(3 种)、胺类(3 种)、酸类(8 种)和酯类(4 种)。调查记录 0 ~ 168 h 烟叶叶际微生物在 Biolog ECO 平板上的代谢读数[16]。

1.2.6 数据处理与统计分析 采用 IBM SPSS Statistics v. 21 进行单因素方差分析,利用 Office 2010 Excel 进行数据分析处理,利用 Heml 1.0 构建叶际微生物碳源代谢热图。

2 结果与分析

2.1 病际真菌的分离鉴定和致病性

从感病烟叶组织中共分离到 10 个菌属的 24 株真菌,其中部分真菌的菌落形态如图 2 所示。通过分子生物学鉴定,共获得木霉属(*Trichoderma*)真菌 12 株(占比 50.00%)、间座壳属真菌 3 株(12.5%)、镰刀菌属(*Fusarium*)真菌 2 株(8.33%)、曲霉属(*Aspergillus*)真菌 1 株(4.17%)、葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)真菌 1 株(4.17%)、隔孢球壳属(*Didymosphaeria*)真菌 1 株(4.17%)、耙齿菌属(*Irpex*)真菌 1 株(4.17%)、盘菌科(Pezizaceae)真菌 1 株(4.17%)、拟茎点霉属(*Phomopsis*)真菌 1 株(4.17%)、栓菌属(*Trametes*)真菌 1 株(4.17%)(表 2)。

表 2 分离培养菌株

Table 2 Isolated and gltured strains

菌株名称	所属科属	菌株数量/株	菌株编号及序列号
Aspergillus sp.	曲霉属(*Aspergillus*)	1	DZ22(PQ460038)
Botryosphaeria sp.	葡萄座腔菌属(*Botryosphaeria*)	1	DZ20(PQ460036)
Diaporthe sp.	间座壳属(*Diaporthe*)	3	DZ6(PQ460027)、DZ11(PQ460030)、DZ15-B(PQ559809)
Didymosphaeria sp.	隔孢球壳属(*Didymosphaeria*)	1	DZ24(PQ460040)
Fusarium sp.	镰刀菌属(*Fusarium*)	2	DZ16(PQ460033)、DZ33(PQ460043)
Irpex sp.	耙齿菌属(*Irpex*)	1	DZ31(PQ460042)
Pezizaceae sp.	盘菌科(Pezizaceae)	1	DZ23(PQ460039)
Phomopsis sp.	拟茎点霉属(*Phomopsis*)	1	DZ15(PQ460032)
Trichoderma sp.	木霉属(*Trichoderma*)	12	DZ1(PQ460023)、DZ2(PQ460024)、DZ4(PQ460025)、DZ5(PQ460026)、DZ7(PQ460028)、DZ9(PQ460029)、DZ18(PQ460034)、DZ21(PQ460037)、DZ30(PQ460041)、DZ8-B(PQ559807)、DZ13(PQ559808)、DZ19(PQ559810)
Trametes sp.	栓菌属(*Trametes*)	1	DZ14(PQ460031)

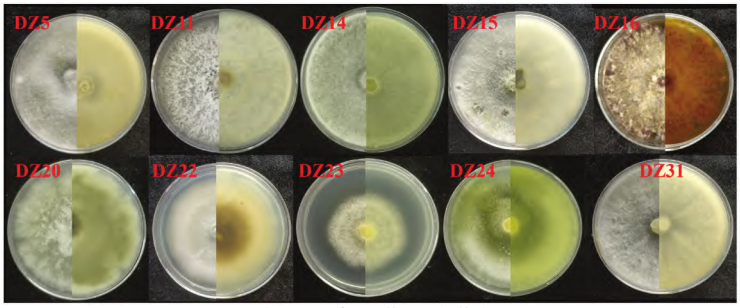


图 2　部分代表性菌株的菌落形态

Fig. 2　Colonial morphology of selected representative strains

DZ5：木霉属；DZ11：间座壳属；DZ14：栓菌属；DZ15：拟茎点霉；DZ16：镰刀菌属；DZ20：葡萄座腔菌属；DZ22：曲霉属；DZ23：盘菌科；DZ24：隔孢球壳属；DZ31：耙齿菌属；图 3 同

DZ5：*Trichoderma* sp.；DZ11：*Diaporthe* sp.；DZ14：*Trametes* sp.；DZ15：*Phomopsis* sp.；DZ16：*Fusarium* sp.；DZ20：*Botryosphaeria* sp.；DZ22：*Aspergillus* sp.；DZ23：*Pezizaceae* sp.；DZ24：*Didymosphaeria* sp.；DZ31：*Irpex* sp.；same as figure 3

离体叶片致病力测定结果表明（图 3），接种菌株 DZ11（间座壳属）的叶片有明显发病症状；DZ31（耙齿菌属）接菌叶片表现出轻微发病症状，接菌部位出现黄褐色不规则病斑，病斑周围叶片发黄；接种菌株 DZ5（木霉属）、DZ14（栓菌属）、DZ15（拟茎点霉）、DZ16（镰刀菌属）、DZ20（葡萄座腔菌属）、DZ22（曲霉属）、DZ23（盘菌科）、DZ24（隔孢球壳属）的叶片均未出现发病症状。接种过菌株 DZ11 的烟叶再次分离到与原接种物形态学特征一致的病原菌，经分子鉴定与原接种物一致，且其他烟叶未分离到。

进行离体叶片致病力验证后，初步确认病原菌来自间座壳属和耙齿菌属。为了进一步确认病原菌，本研究选取了室内盆栽试验进行活体致病力验证，结果如图 4 所示。与清水处理相比，间座壳属 DZ11 和 DZ15-B 处理的叶片上出现明显的黄色晕圈，同属的 DZ6 处理叶片仅轻微泛黄，耙齿菌属 DZ31 在活体叶片上未表现出发病痕迹。活体致病力结果进一步证实本研究中的未知叶斑病是由间座壳属真菌感染引起。



图 3　真菌的离体叶片致病性验证

Fig. 3　*In vitro* leaf pathogenicity assay for fungi

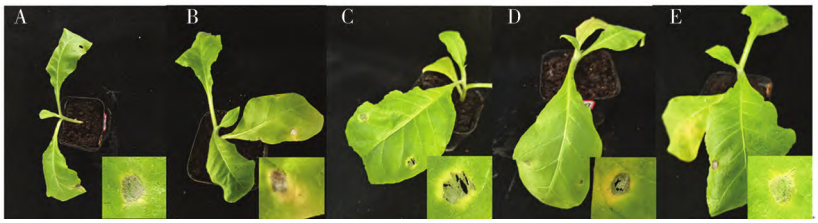


图 4　真菌的活体烟株致病力验证

Fig. 4　*In vivo* pathogenicity assay of fungi on tobacco plants

A：对照处理；B：间座壳属 DZ11；C：间座壳属 DZ6；D：间座壳属 DZ15-B；E：耙齿菌属 DZ31

A：CK；B：*Diaporthe* sp. DZ11；B：*Diaporthe* sp. DZ6；E：*Diaporthe* sp. DZ15-B；E：*Irpex* sp. DZ31

间座壳属 DZ11 在 PDA 上生长良好，菌落呈白色的规则圆形，菌丝生长茂密，随着培养时间延长，分泌出果蔬腐烂性气味。菌丝在光学显微镜下呈透明状态，无隔膜，有分枝，菌丝直径约为 5～8 μm（图 5A）。在光学显微镜（10×40）下观察菌落分生孢子形态，α 型孢子为椭圆形（图

5B),两端钝圆,大小约为(4.35 ±0.98) μm × (1.72 ±0.62) μm。β 型孢子无色透明(图 5C),线状无隔膜,尾端弯曲呈勾状,大小约为(26.63 ±3.25) μm × (1.45 ±0.21) μm。基于 ITS、HIS 和 TEF 1-α基因构建联合系统发育树,结果显示,DZ11 与 *Diaporthe eres* 聚为一支,结合形态学鉴定结果,确定引起该烟草叶斑病的病原菌为榆树间座壳菌(*Diaporthe eres*)(图 6)。

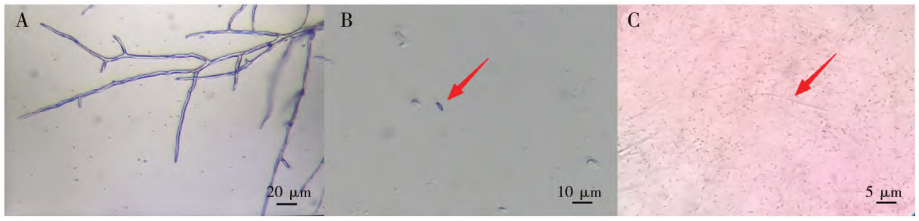


图 5 菌株 DZ11 菌丝及孢子形态学特征

Fig. 5 Morphological characteristics of mycelia and spores of strain DZ11

A:菌丝形态;B:α 型孢子;C:β 型孢子

A:Mycelial morphology;B:α-type spores;C:β-type spores

2.2 烟草叶际真菌菌群结构

2.2.1 测序深度分析 4 份健康烟叶样品(DZJ1、DZJ2、DZJ3、DZJ4)ITS 序列经过滤和优化后,共得到 260 825 条高质量序列片段,79 792 955 个碱基,序列平均长度 306 bp;4 份感病烟叶样品(DZB1、DZB2、DZB3、DZB4)ITS 序列经过滤和优化后,共得到 321 434 条高质量序列片段,82 468 852个碱基,序列平均长度 258 bp。当测序深度达到 200 时,所有样品的稀释曲线趋于平缓(图 7A),说明样品数量足够且合格。以 97% 的一致性将数据库聚类为扩增子序列变体(ASVs)并与 SSUrRNA 数据库比对,8 份烟叶样品共得到 337 个 ASVs,健康与感病叶际共有的 ASVs 为 45 个,其中占比较高的是炭角菌目(Xylariales)(11.12%)、*Phomatosporaceae*(8.89%)、隔孢球壳属(*Didymosphaeria*)(6.67%)、扁孔腔菌属(*Lophiostomataceae*)(6.67%),健康烟叶叶际特有 134 个 ASVs,其中相对丰度最高的为炭角菌目(Xylariales)(24.45%)和隔孢腔菌目(Pleosporales)(13.34%);感病烟叶叶际特有 113 个 ASVs,其中相对丰度最高的为炭角菌目(24.45%)、暗球腔菌属(*Phaeosphaeriaceae*)(13.34%)和柔膜菌目(Helotiales)(11.12%)(图 7B)。

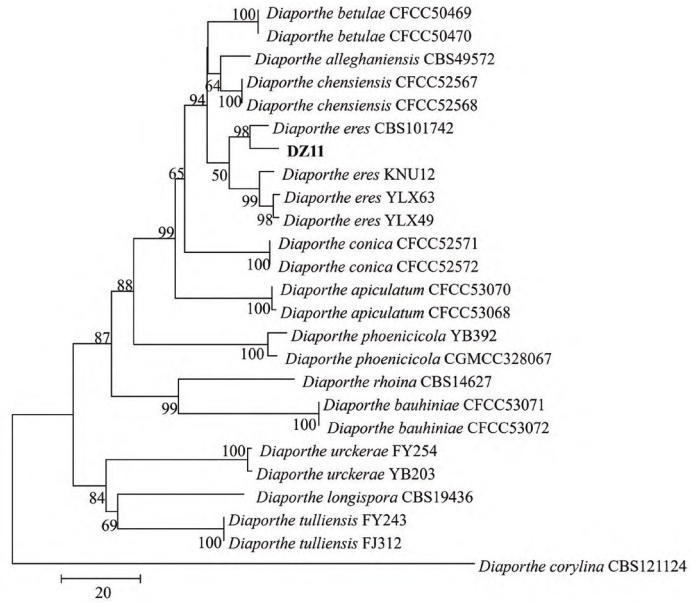


图 6 基于 ITS、TEF1-α 和 HIS 基因构建的菌株 DZ11 与相关间座壳属真菌的邻接法系统发育树

Fig. 6 Neighbor-joining phylogenetic tree of strain DZ11 and related *Diaporthe* species based on combined ITS, TEF1-α, and HIS gene sequences

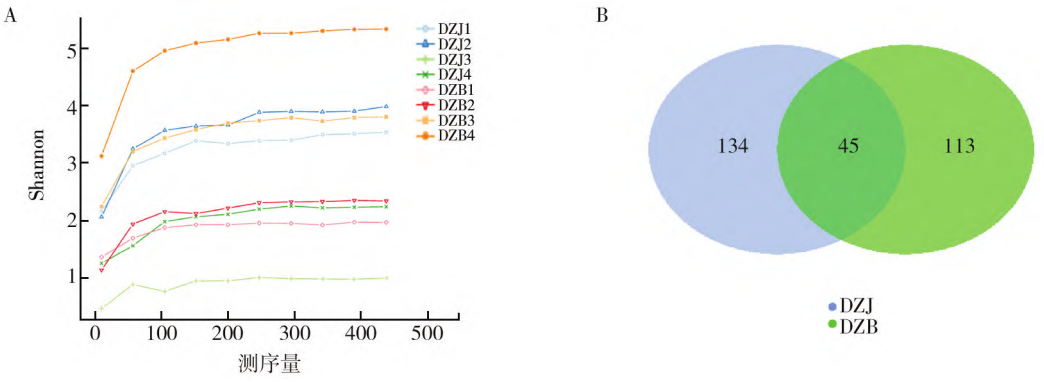


图 7　烟叶样品真菌稀释曲线(A)和韦恩图(B)

Fig. 7　Fungal rarefaction curve (A) and venn diagram (B) of fungi in tobacco leaf samples

2.2.2　健康与感病烟叶叶际真菌菌群结构组成

图 8 结果表明,在门水平上,健康和感病组织的优势真菌均为子囊菌门(Ascomycota)(相对丰度分别为 66.90% 和 75.23%)和担子菌门(Basidiomycota)(27.91%、16.78%)。在属水平上,健康和感病烟叶叶际优势真菌属均为布勒酵母属(*Bullera*)(相对丰度分别为 22.89% 和 10.33%)、纤细柔菌属(44.01%、41.21%)和链格孢属(3.88%、1.31%)。除上述三种共有优势真菌外,感病烟叶组织中还特有几类真菌,分别为织球壳属(*Plectosphaerella*)(4.97%)、短梗霉属(*Aureobasidium*)(3.08%)、棒孢属(*Corynespora*)(1.71%)。健康烟叶组织特有真菌属为 *Symmetrospora*,相对丰度为 2.45%。

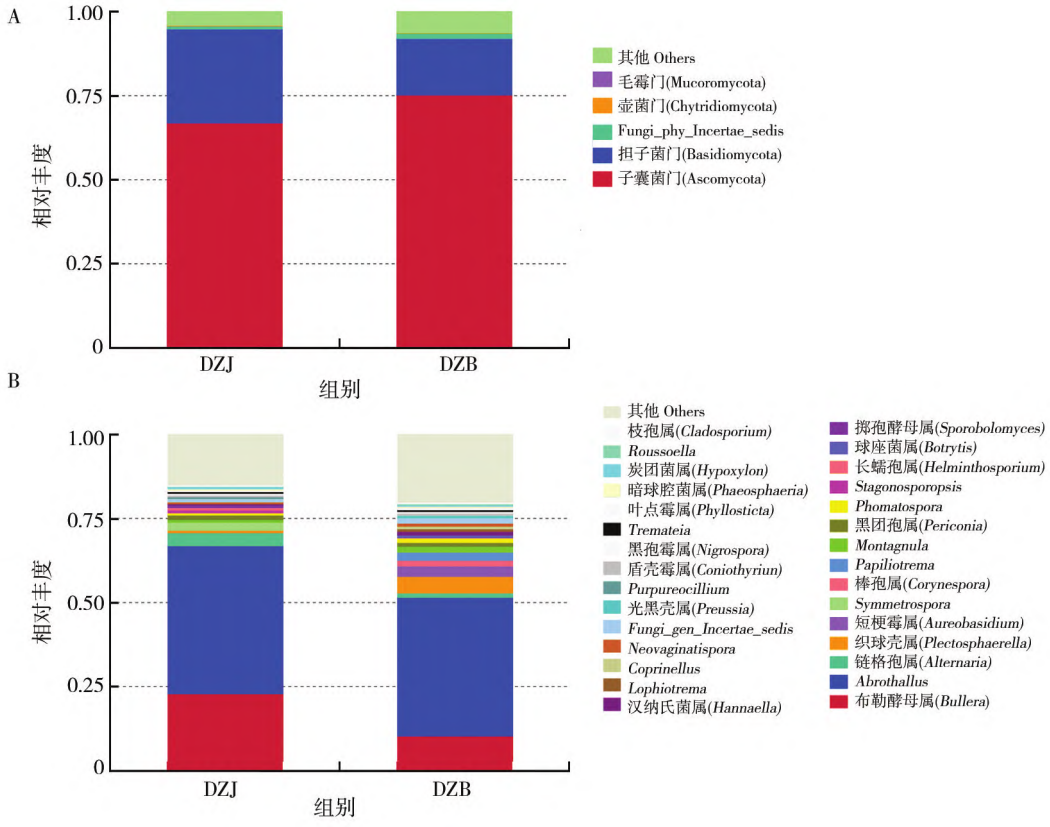


图 8　健康与感病烟叶叶际真菌门(A)和属(B)的相对丰度

Fig. 8　Relative abundance of phyllosphere fungi at the phylum (A) and genus (B) levels in healthy and infected tobacco leaves

2.2.3 健康与感病烟叶叶际微生物群落 Alpha 多样性 所有样品的覆盖度指数(Goods_coverage)均大于0.99(表3),表明本次测序的数据合理。真菌多样性结果表明,健康烟叶的多样性指数(Shannon、Simpson)、丰富度指数(Chao1、ACE)和覆盖度指数(Goods_coverage)分别为1.88、0.61、123.74、99.75和0.99。感病烟叶的多样性指数(1.92、0.64)与健康烟叶相比无显著差别,但感病烟叶的丰富度指数(60.87、56.00)显著低于健康烟叶。

表3 不同烟叶样品组真菌群落的 Alpha 多样性

Table 3 Alpha diversity indices of fungal communities in different sample groups

样品组别	多样性指数		丰富度指数		覆盖度
	Shannon	Simpson	Chao1	ACE	Goods_coverage
DZJ	1.88 ±0.24	0.61 ±0.06	123.74 ±43.01	99.75 ±35.98	0.99
DZB	1.92 ±0.43	0.64 ±0.10	60.87 ±24.57	56.00 ±26.09	0.99

2.2.4 健康与感病烟叶叶际微生物群落 Beta 多样性分析 主坐标(PCA)分析用于确定真菌群落的空间分布,群落结构相似度越高的样本距离越近,群落差异很大的样本会分开。在真菌群落中,感病烟叶的3份样本与健康烟叶的3份样本聚集在一起,感病与健康部位组内分别各有1个样品不与其他样品聚集,表明健康与感病烟叶的真菌群落结构在组内存在一定差异(图9)。

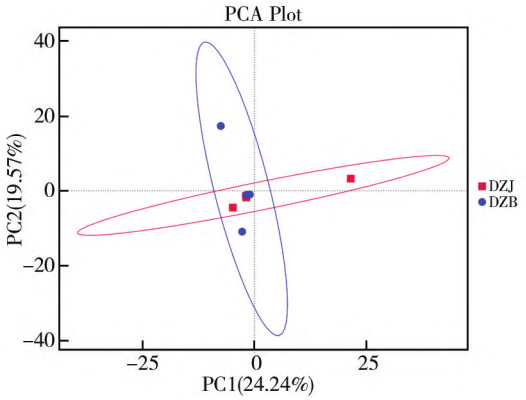


图9 健康与感病烟叶样品真菌 PCA 分析

Fig. 9 PCA analysis of fungi in healthy and infected tobacco leaf samples

2.2.5 烟叶叶际真菌和细菌群落功能 烟叶叶际真菌经 FUNGuild 功能预测分析发现,健康烟叶叶际真菌分布主要为地衣寄生菌(Lichen Parasite,占比44.01%)、真菌寄生虫-未定义腐生菌(Fungal_Parasite-Undefined_Saprotroph,占比23.29%)、未定义腐生菌(Undefined_Saprotroph,占比4.91%)、植物病原菌(Plant_Pathogen,占比3.03%)、动物病原菌-内生菌-植物病原菌-木质腐生菌(Animal_Pathogen-Endophyte-Plant_Pathogen-Wood_Saprotroph,占比3.88%)、内生菌-植物病原菌-木质腐生菌(Endophyte-Plant_Pathogen-Wood_Saprotrooh,占比1.77%)、排泄物腐生菌(Dung Saprotroph,占比0.74%)7类。感病烟叶叶际真菌主要为地衣寄生菌(Lichen Parasite,占比41.21%)、真菌寄生虫-未定义腐生菌(Fungal_Parasite-Undefined_Saprotroph,占比13.87%)、未定义腐生菌(Undefined_Saprotroph,占比9.59%)、植物病原菌(Plant_Pathogen,占比6.45%)、动物病原菌-内生菌-植物病原菌-木质腐生菌(Animal_Pathogen-Endophyte-Plant_Pathogen-Wood_Saprotroph,占比1.31%)、动物病原体-内生菌-植物病原体-未定义腐生菌(Animal_Pathogen-Eadophyte-Epiphyte-Plant_Pathogen-Undefined_Saprotroph,占比3.08%)、内生菌-植物病原菌-木质腐生菌(Endophyte-Plant_Pathogen-Wood_Saprotrooh,占比2.00%)、排泄物腐生菌(Dung Saprotroph,占比1.48%)8类(图10)。

2.3 健康与感病烟叶叶际微生物的碳源代谢功能

碳源代谢结果显示(图11),健康烟叶对多种碳源的代谢能力均高于感病烟叶。健康烟叶叶际微生物群落对31种碳源均可代谢,对糖类、氨基酸类、酯类、醇类、胺类等28种碳源代谢能力均较强,对2-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸和α-丁酮酸三种碳源的代谢能力较弱;健康烟叶叶际微生物稀释10倍后(JY10)的微生物群落对碳源的代谢能力显著下降,仅对D-半乳糖醛酸、D-苹果酸和衣康酸等7种碳源还保持较强的代谢能力,对2-羟基苯甲酸、α-丁酮酸和苯乙基胺3种碳源丧失代谢能力,对L-苏氨酸、D-纤维二糖、甘氨酰-L-谷氨酸和α-D-乳糖等多种碳源代谢能力较弱。感病

烟叶叶际微生物群落对 N-乙酰-D-葡萄糖胺、Y-羟基丁酸等 12 种碳源有较强的代谢能力，对 2-羟基苯甲酸、4-羟基苯甲酸和 α-丁酮酸等 3 种碳源几乎不能代谢；感病烟叶叶际微生物稀释 10 倍后（BY10）的微生物群落对各碳源代谢能力显著降低，仅对 β-甲基-D-葡萄糖苷、D-半乳糖酸内酯、L-丝氨酸和 N-乙酰-D-葡萄糖胺 4 种碳源有较强的代谢能力，对 2-羟基苯甲酸、L-苯基丙氨酸、α-丁酮酸和苯乙基胺 4 种碳源完全不能代谢，对其他多种碳源的代谢能力也较弱。

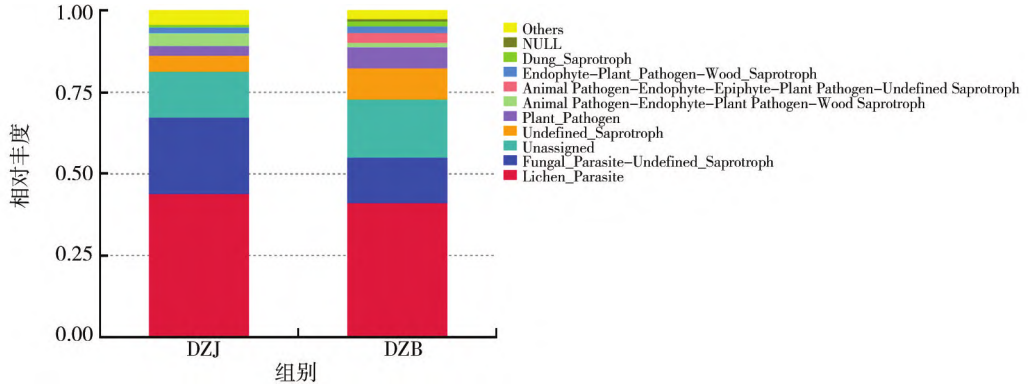


图 10　叶际真菌功能预测结果

Fig. 10　Functional prediction results of phyllosphere fungi

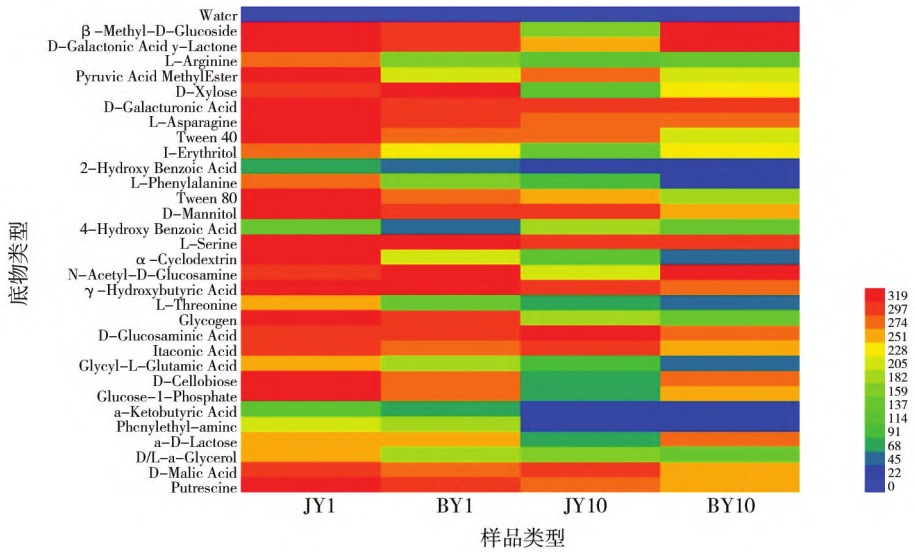


图 11　烟叶叶际微生物的碳源代谢功能热图

Fig. 11　Heatmap of carbon source metabolic functions of tobacco phyllosphere microorganisms

颜色值分别代表微生物代谢碳源的程度，122～192 为代谢程度低，192～262 为代谢程度一般，262 以上为代谢程度高

The color values represent the extent of microbial carbon source metabolism, with values ranging from 122 to 192 indicating low metabolic activity, 192 to 262 indicating moderate metabolic activity, and values above 262 indicating high metabolic activity

3　讨　论

本研究采用传统组织分离法从感病烟叶叶片中分离得到 24 株真菌，其中木霉属占比最高。木霉属分布范围广泛，能够在多种基质上快速生长[17]。木霉属真菌对其他真菌具有显著的抑制作用[18]，这可能是其成为优势菌群的主要原因。植物病原菌有葡萄座腔菌属、间座壳属、镰刀菌属、拟茎点霉属，离体叶片致病力检测结果显示，仅间座壳属成功侵染了烟叶，并出现褐色外缘的病斑。该病斑与田间观察到的病斑症状存在一定差异，这种差异是否受到温度、湿度等环境因子影响，或田间烟叶叶片病斑由多种病菌复合侵染引起有待进一步研究验证。已有研究表明，间座壳属会导致玫瑰[19]、苹果[20-21]以及芒果[13]等多种植物的茎叶发生病害，因此推测道真县烟田的烟

草叶斑病是由间座壳菌导致。本研究中感病烟叶病原菌的分离培养只使用了 PDA 培养基,鉴于部分病原菌可能无法在 PDA 培养基上生长或者无法进行离体培养,若同时使用其他培养基,比如甘油培养基(AEA)等,可能会发现其他更多的真菌物种。

Illumina 高通量测序结果显示,本研究中感病与健康两组样品的优势真菌属均为布勒酵母属,其在凤梨[22]等多种植物中存在,但是不具有致病性,某些 *Bullera* 属真菌对灰霉病等植物病害还具有一定的防治效果[23]。本研究发现高丰度的布勒酵母属真菌与以往对烟草叶际微生物群落结构研究结果存在一定差异[24],说明该属真菌不是烟叶叶际习居菌,这可能与取样烟叶所处的环境以及采样时间不同有关。链格孢属作为烟草叶际习居真菌,在健康和感病烟叶中相对丰度分别为3.88%、1.31%,链格孢属引起的赤星病发病症状为黄褐色小斑点,随后逐渐发展为圆形或近圆形,病斑表面呈深褐色或赤褐色同心轮纹,与本研究中未知叶斑病病斑症状不符,故排除链格孢属作为该叶斑病的病原菌[25],但可能随着病情的发展导致赤星病伴随发生。除了上述共有优势真菌以外,还存在几种在感病与健康烟叶中丰度差异较大的真菌,织球壳属在感病组织中相对丰度为4.97%,在健康组织中相对丰度为 0.74%,研究表明织球壳属的某些种有可能导致植物枯萎病[26-27];短梗霉属在感病组织中的相对丰度为3.08%,而在健康组织中未检测到。Xie 等[28]的研究显示,亚洲梨感染短梗霉菌会缩短梨花的寿命并减少坐果率,但尚未有研究证实以上两种真菌属是否能感染烟草植株引起烟草叶斑病。棒孢属(*Corynespora*)仅在感病组织中被检测到,相对丰度为 1.71%,该真菌寄主范围广泛,能够侵染草莓[29]、丹参[30]等多种植物,感染烟草叶片引起的棒孢霉叶斑病是烟草主要叶斑类病害之一[31]。受培养基种类、培养条件等多种因素限制,使用传统组织分离法并未分离到上述几种真菌。越来越多的研究表明,一种症状的病害往往由多种病原菌导致[32],作为感病组织中特有的三种真菌(相对丰度≥1%),其均有可能是该未知叶斑病的潜在病原菌。

Alpha 多样性结果显示,健康与感病烟叶叶际真菌多样性无显著差异,健康烟叶叶际真菌 Chao 1 和 ACE 指数均高于感病烟叶。结果与向立刚等[33]对未知叶斑病的烟叶叶际微生物的研究结果一致,进一步说明了病害的发生会降低叶际真菌的多样性。功能预测结果显示,植物病原菌类群在感病烟叶中占比为 6.45%,在健康烟叶中占比为 3.03%,该结果与郭涛等[34]研究的烟草野火病叶际病原菌类群一致,表明病原菌富集只是病害发生的前提条件,当病原菌富集到一定程度,打破健康叶片上的微生物平衡,致使叶际微生物多样性及丰富度水平降低,无法抵御病原菌的入侵时,植株才会真正发病。

Biolog ECO 技术是一种高效高通量的功能性定义细胞代谢活动的技术,主要应用于微生物的代谢表型分析。本研究发现健康与感病烟叶叶际微生物对 2-羟基苯甲酸的代谢能力均较弱。研究显示 2-羟基苯甲酸可诱导植株抗病基因表达,进而提高植物抗逆能力[35],是否可以通过使用 2-羟基苯甲酸来调节叶际微生物进而对该病害进行防治有待进一步研究。健康烟叶叶际微生物可高效代谢 28 种碳源,感病烟叶叶际微生物可高效代谢 12 种碳源,说明健康烟叶叶际微生物的生物活性高于感病烟叶叶际微生物,该结果与张艺等[36]的研究结果一致。将感病与健康烟叶叶际微生物分别稀释 10 倍后,其对 31 种碳源的代谢能力均显著降低,说明微生物种群密度也会直接影响其对碳源的代谢能力。

本研究利用扩增子测序技术检测到的优势真菌种类包括布勒酵母属、纖柔菌属以及链格孢属。在相对丰度排名前 30 的真菌序列中,未发现木霉属和间座壳属,这表明通过组织分离法得到的优势菌株并不一定代表叶际的优势菌株。此外,部分通过组织分离法得到的真菌在扩增子测序中未被检测到,这可能是由于它们的相对丰度较低或其他未知因素所致。因此,结合扩增子测序与传统组织分离法可能会更全面地揭示叶际微生物群落的组成。基于对烟草病斑的初步观察,本研究推测该病害为真菌性病害,故仅对真菌群落进行了分析,后续研究将进一步确认病害的病原菌,可能涉及对细菌群落的分析。

参考文献：

[1] 陈瑞泰，朱贤朝，王智发，等. 全国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J]. 中国烟草科学，1997 (4)：3-9.

[2] 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.

[3] 孙美丽，汪汉成，郭沫言，等. 4 种杀菌剂对烟草靶斑病菌的抑菌活性[J]. 贵州农业科学，2022，50(9)：62-68.

[4] 邢荷荷，梁晨，于静，等. 青岛地区烟草白粉病病原[J]. 菌物学报，2015，34 (1)：159-163.

[5] 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.

[6] Xiang LG，Wang HC，Wang F，et al. Analysis of phyllosphere microorganisms and potential pathogens of tobacco leaves[J]. Frontiers in Microbiology，2022，13：843389.

[7] 叶果，汪汉成，蔡刘体，等. 烟草一未知叶斑病病原菌的鉴定及其生物学特性[J]. 中国烟草学报，2024，30(5)：119-124.

[8] 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.

[9] 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.

[10] Sun ML，Shi CH，Huang Y，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.

[11] 汪汉成，黄宇，黄洋，等. 烟草叶斑病病原菌的鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报，2023，50(3)：757-766.

[12] Gomes RR，Glienke C，Videira SIR，et al. *Diaporthe*：A genus of endophytic，saprobic and plant pathogenic fungi[J]. Persoonia，2013，31(1)：1-41.

[13] 王睿，张玉杰，孙文秀，等. 我国主要芒果产区间座壳属真菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 微生物学杂志，2025，45(1)：76-84.

[14] Cao H，Bi PX，Shao PZ. Methodological studies on genomic DNA extraction and purification from plant drug materials[J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences，1998，07 (3)：18-25.

[15] Mullis K，Faloona F，Scharf S，et al. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*：The polymerase chain reaction[J]. Biotechnology Series，1992，51(1)：263-273.

[16] Chaiboonchoe A，Dohai B，Cai HH，et al. Microalgal metabolic network model refinement through high-throughput functional metabolic profiling[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology，2014，02：68.

[17] Woo SL，Hermosa R，Lorito M，et al. *Trichoderma*：A multipurpose，plant-beneficial microorganism for eco-sustainable agriculture[J]. Nature Reviews Microbiology，2022，21 (5)：312-326.

[18] 杨春林，席亚东，胡强，等. 哈茨木霉 UN-2β-葡聚糖酶诱导及对水稻纹枯病的抑菌防病作用[J]. 西南农业学报，2024，37 (1)：119-127.

[19] Caio P，Ferreira B，Carlos AP，et al. *Diaporthe rosiphthora* sp. nov.：Yet another rose dieback fungus[J]. Crop Protection，2021，139：105365.

[20] Ali S，Renderos W，Bevis E，et al. *Diaporthe eres* causes stem cankers and death of young apple rootstocks in Canada[J]. Canadian Journal of Plant Pathology，2019 ，42 (2)：218-227.

[21] 莫艳芳，普特，罗强，等. 甜樱间座壳菌(*Diaporthe eres*)引起苹果根颈腐烂病研究简报[J]. 植物病理学报，2024，54(5)：1036-1041.

[22] Landell MF，Brandão LR，Safar SVB，et al. *Bullera vrieseae* sp. nov.，a tremellaceous yeast species isolated from bromeliads[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2015，65(8)：2466-2471.

[23] 童庭，李珍，胡静荣，等. 烟草野火病叶际微生物群落结构多样性与碳源代谢表征[J]. 烟草科技，2025，58(3)：49-59.

[24] Yu XY，Zhang K，Liu JY，et al. Identification and evaluation of an endophytic antagonistic yeast for the control of gray mold (*Botrytis cinerea*) in apple and mechanisms of action[J]. Food Microbiology，2024，123：104583.

[25] 杨涛，黎妍妍，郑露，等. 湖北烟区烤烟赤星病病原鉴定[J]. 中国烟草科学，2017，38(5)：32-38.

[26] Yang LJ，Gao W，Zhang CX，et al. Identification of strawberry wilt caused by *Plectosphaerella cucumerina* in China[J]. Plant Disease，2023，107(10)：3290.

[27] Cui YP，Huang F，Guo B，et al. First report of coptis wilt caused by *Plectosphaerella cucumerina* in China[J]. Plant Disease，2024，108 (8)：2580.

[28] Xie YY，Li F，Mao XQ，et al. First report of *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* causing spot blight of pear (*Pyrus pyrifolia*) in Zhejiang Province of China [J]. Plant Disease，2022，106 (8)：2259.

[29] 薛彩英，武海燕，马庆周，等. 河南省草莓棒孢叶斑病病原菌鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报，2023，50(2)：402-412.

[30] 王飞，李雪梦，高素霞，等. 河南丹参棒孢霉叶斑病病原菌的鉴定[J]. 植物病理学报，2023，53(2)：317-320.

[31] Feng RC，Wang HC，Zhang XG，et al. Characteristics of *Corynespora cassiicola*，the causal agent of tobacco *Corynespora* leaf spot，revealed by genomic and metabolic phenomic analysis [J]. Scientific Reports，2024，14 (1)：18326.

[32] 郭建伟，杨春莲，余泽云，等. 柬埔寨龙血树褐斑病的病原鉴定及其培养条件分析[J]. 山西农业大学学报(自然科学版)，2024，44(5)：29-39.

[33] 向立刚，汪汉成，郑苹，等. 一种未知真菌性叶斑病发病烟叶真菌群落分析[J]. 中国烟草科学，2021，42 (1)：40-46.

[34] 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.

[35] 程小龙. 外源水杨酸诱导烟草抗青枯病的作用及机理研究[D]. 重庆：西南大学，2014.

[36] 张艺，王丰，蔡刘体，等. 感赤星病与健康烟叶在腈菌唑应用后的叶际微生态[J]. 浙江农业学报，2024，36(1)：156-167.