



烤后不同霉变程度烟叶际真菌群落组成与多样性分析

陈乾丽^{1,2}, 李忠^{1*}, 汪汉成^{2*}, 黄宇^{1,2}, 蔡刘体², 谢红炼³, 周浩⁴

¹ 贵州大学农学院, 贵州 贵阳 550025

² 贵州省烟草科学研究所, 贵州 贵阳 550081

³ 长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025

⁴ 长江大学农学院, 湖北 荆州 434025

摘要:【目的】为了解烤后不同霉变程度烟叶际真菌群落组成与多样性。【方法】基于 Illumina MiSeq 高通量测序平台对烤后烟叶叶柄和叶片叶际样品的真菌群落组成进行了分析。【结果】霉变重烟叶叶片(BQ)、霉变重烟叶叶柄(BZ)、霉变轻烟叶叶片(JQ)、霉变轻烟叶叶柄(JZ) 4类样品真菌分布于子囊菌门(*Ascomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、接合菌门(*Zygomycota*)等7个菌门、27个纲、58个目、104个科、171个属的360个真菌分类单元(OTUs)。不同霉变程度烟叶叶际真菌群落组成、分类单元的相对丰度及优势分类单元皆存在不同程度差异。在属的水平上, 霉变重烟叶叶片(BQ)的优势菌属为 *Aspergillus* (89.64%)、*Myrothecium* (2.54%)、*Rhodotorula* (2.48%)、*Gibberella* (1.49%); 霉变重烟叶叶柄(BZ)的优势菌属为 *Aspergillus* (96.93%)和 *Alternaria* (1.92%); 霉变轻烟叶叶片(JQ)的优势菌属为 *Aspergillus* (40.13%)、*Rhodotorula* (31.81%)、*Alternaria* (16.75%); 霉变轻烟叶叶柄(JZ)的优势菌属为 *Aspergillus* (62.77%)、*Alternaria* (9.74%)、*Rhodotorula* (5.20%)。【结论】霉变轻烟叶叶片样品真菌群落的多样性最高, 霉变轻烟叶叶柄的真菌群落丰富度最高。霉变重烟叶样品的叶片部位的真菌群落丰富度和多样性均高于叶柄。烟叶霉烂为烤房常见病害, 其病原真菌种类多样, 且广泛分布于烟叶和环境中。该研究结果为烤房烟叶霉烂病的防治可根据不同发病程度的不同部位的真菌群落构成特征, 制定相应的防治方案提供了参考依据。

关键词: 霉变烟叶, 真菌多样性, 群落结构, Illumina 高通量测序

基金项目: 贵州省科技支撑计划(黔科合支撑[2018]2356); 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)

*通信作者。Tel: +86-851-84116913; E-mail: 李忠, zhongzhongligzu@163.com, 汪汉成, xiaobaiyang126@hotmail.com

收稿日期: 2019-02-19; 修回日期: 2019-05-13; 网络出版日期: 2019-10-24

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)是以收获叶片为主的重要经济作物,烟叶烘烤特性与烟叶烘烤质量有密切联系^[1]。烟叶烘烤后,其叶片上存在大量的微生物,包括真菌、细菌、放线菌等,它们在烟叶调制、陈化、加工及贮存过程中对烟叶品质通常会形成较大的影响^[2-3]。在环境条件适宜时,烟叶微生物可通过摄取烟叶糖类、蛋白质等营养物质,分解烟草成分,破坏其组织结构,排泄出青、绿、黑色素和霉腐臭气,使烟叶霉变质,丧失商品价值^[4-5],相关研究已多有报道。Nyvall^[6]报道了在烘烤和仓储过程中,广泛分布的病原微生物引起烟叶霉烂。顾刚等^[7]报道了烤房烟叶霉烂病可分为叶基霉烂型和叶片霉烂型。赵文姬^[8]研究报道引起烟叶霉变的霉菌主要有青霉属、曲霉属、根霉属、毛霉属,细菌主要有芽孢杆菌属、乳杆菌属。朱桂宁^[9]发现曲霉是引起广西烟叶霉变的主要微生物类群。Spurr^[10]和 Holdem 等^[11]研究发现 *Pythium aphanidermatum* 和 *Erwinia carotovora* 能在烤房内引起烟叶腐烂。

近些年来,随着我国密集烘烤的发展,贵州局部烟区烘烤烟叶霉烂严重发生,究竟是哪些微生物导致烟叶霉烂,目前并不清楚,相关研究鲜有报道。高通量测序技术有测序通量高、准确度高、性价比高等优点^[12-14],现已应用于医学^[15-16]、食品^[17-18]、环境^[19-20]等多个领域。龚俊等^[21]通过克隆文库法和高通量测序法分析了烟叶表面微生物类群,发现高通量测序能准确地反映烟叶表面微生物群落结构。本文通过高通量测序技术对不同霉变程度烟叶叶柄及叶片样品进行真菌群落组成与多样性分析,以期初步了解引起烟叶霉变的潜在真菌种群,为今后指导烟叶霉烂病的防治提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

DNA 抽提试剂盒(FastDNA[®] Spin kit for Soil),购自 MP Biomedicals 生物医学公司; GeneJET 胶回收试剂盒,购自 Thermofisher 公司。Miseq PE300 高通量测序系统由上海美吉生物医药科技有限公司提供。

1.2 样品采集

于2016年8月在贵州省黔西南州兴义市烟草公司白瓦窑基地,选取烟叶霉变病暴发严重的烤房,随机采集霉变重烟叶叶片、霉变重烟叶叶柄、霉变较轻烟叶叶片、霉变较轻烟叶叶柄4组代表性样品,每组样品2个重复,并依次编号为BQ、BZ、JQ、JZ。样品经灭菌工具采集后,置于无菌采样袋中,迅速带回实验室,于-80℃条件保存。

1.3 样品基因组 DNA 提取

称取各样品0.5g研磨样,采用总DNA提取试剂盒(FastDNA[®] Spin kit for Soil)抽提4组样品微生物基因组总DNA。样品总DNA提取完毕后,浓度和纯度使用NanoDrop2000测定,纯度 A_{260}/A_{280} 值要求在1.8-2.0之间。

1.4 ITS 文库构建及高通量测序

以样品DNA为模板,采用正向引物ITS1F: 5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3' (5 μmol/L)和反向引物ITS2R: 5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3' (5 μmol/L)对样品的ITS区进行PCR扩增。PCR扩增体系为20 μL: 5×FastPfu Buffer, 4 μL; 2.5 mmol/L dNTPs, 2 μL; Forward Primer (5 μmol/L), 0.8 μL; Reverse Primer (5 μmol/L), 0.8 μL; FastPfu Polymerase, 0.4 μg; BSA, 0.2 μL; DNA, 10 ng; ddH₂O 补至20 μL。PCR反应程序参数:95℃ 3 min;

95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测其扩增质量, 使用 GeneJET 胶回收试剂盒纯化产物。将合格的纯化样品送至上海美吉生物医药科技有限公司利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行高通量测序, 并于 I-Sanger 生物信息分析云平台(<http://www.i-sanger.com/project/index.html>)进行数据处理和生物多样性分析。

1.5 测序数据处理与统计分析

1.5.1 原始数据处理: Illumina 高通量测序平台测序得到的序列进行质控, 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(merge)成一条序列, 最小 overlap 长度为 10 bp; 拼接序列的 overlap 区允许的最大错配比率为 0.2, 筛选不符合序列; 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 允许的错配数为 0, 最大引物错配数为 2。软件平台: Trimmomatic、FLASH。

1.5.2 OTU 聚类及注释: 使用 UPARSE 软件 (version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>), 根据 97% 的相似度对序列进行 OTU 聚类, 并在聚类的过程中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, 使用 Unite (Release 6.0 <http://unite.ut.ee/index.php>)真菌数据库进行分类注释。通过对样品的 Alpha 多样性、物种组成、物种差异等评估烤后不同霉变程度烟叶的叶柄和叶片真菌群落结构及多样性; 采用 Coverage 指数计算测序深度。以上分析均在上海美吉生物医药科技有限公司的

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

2 结果和分析

2.1 测序深度分析

稀释曲线(Rarefaction curve)既反映了不同测序数据量下各样品中物种的丰富度, 又可说明样品的测序数据量是否合理。由图 1 稀释性曲线可知, 本次测序样品的稀释曲线在测序深度为 10000 时就趋于平缓, 曲线趋于平缓表明测序已趋于饱和, 增加测序数据无法再找到更多的 OTU。因此, 可以认为测序深度已经覆盖到样品中所有的物种, 测序数据量足以反映样品中的物种多样性。

2.2 测序有效数据分析

原始序列经优化处理后, 4 组烤后烟叶样品中, 霉变重烟叶叶片(BQ)、霉变重烟叶叶柄(BZ)、霉变轻烟叶叶片(JQ)、霉变轻烟叶叶柄(JZ)获得有效序列分别为 78647 条、82431 条、81747 条、82173 条; OTUs 数分别为 107 个、43 个、201 个、

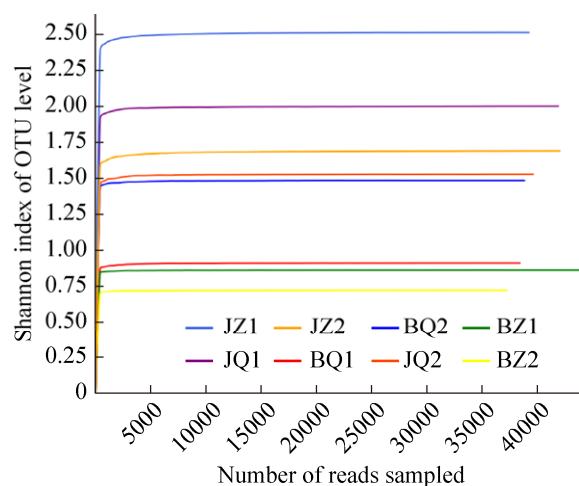


图 1. 稀释曲线(OTU 水平 shannon 指数)

Figure 1. Rarefaction curve (Shannon index of OTU level).

及 294 个。采用 RDP classifier 贝叶斯算法对 97% 相似水平的 OTU 代表序列进行分类学分析,并分别在各个分类学水平对样品序列进行 OTU 聚类,聚类后的 OTU 对应的真菌类群涉及到子囊菌门(*Ascomycota*)、担子菌门(*Basidiomycota*)、接合菌门(*Zygomycota*)等 7 个门和一些未定门的真菌。其中霉变重烟叶叶片(BQ)包括 4 门、14 纲、27 目、38 科、62 个属的 83 种真菌;霉变重烟叶叶柄(BZ)包括 3 门、8 纲、13 目、16 科、26 个属的 37 种真菌;霉变轻烟叶叶片(JQ)包括 6 门、21 纲、41 目、69 科、114 个属的 152 种真菌;霉变轻烟叶叶柄(JZ)包括 6 门、26 纲、53 目、92 科、145 个属的 199 种真菌。

Venn 图分析结果表明,在 OTU 水平下,4 组样本中有 38 个共有的 OTU,霉变重烟叶叶片(BQ)、霉变重烟叶叶柄(BZ)、霉变轻烟叶叶片(JQ)和霉变轻烟叶叶柄(JZ)独有的 OTU 分别为 11 个、1 个、48 个和 130 个(图 2)。

2.3 真菌多样性指数分析

Sobs 指数、ACE 指数、Chao 指数为丰富度指数(richness index),用于表示样品中真菌菌群落丰富度;Shannon 指数、Simpson 指数为多样性指数(diversity index),用于表示样品中真菌群落多样性;Coverage 指数用于表示样品测序的覆盖度。其中,Simpson 指数值越大,说明群落多样性越低;

其余指数值越大,说明其相应的群落丰富度、均匀度和多样性越高。6 个指数如表 1 所示,Shannon 结果表明,霉变轻烟叶叶片(JQ)真菌群落多样性最高;其次为霉变轻烟叶叶柄(JZ);霉变重烟叶叶柄(BZ)真菌群落多样性最低。Sobs 指数表明,霉变轻烟叶叶柄(JZ)真菌群落丰富度最大;霉变重烟叶叶柄(BZ)真菌群落丰富度最小。真菌群落丰富度各样品的覆盖度指数(Coverage index)均到达了 0.999,表明测序结果合理。

2.4 真菌群落组成与结构分析

结果表明,不同霉变程度的叶柄及叶片部位真菌群落组成在各个分类水平上的数量、群落组成和优势分类单元差异明显。在门水平上,霉变重烟叶叶片(BQ)、霉变重烟叶叶柄(BZ)、霉变轻

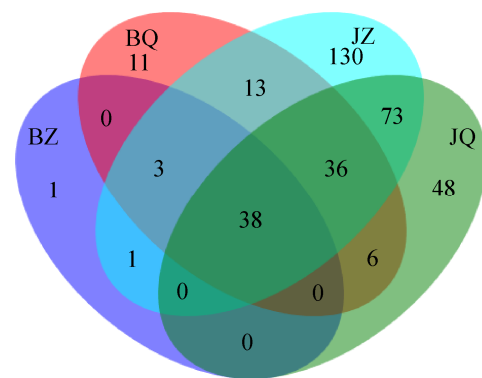


图 2. OTU 分布 Venn 图

Figure 2. Venn diagram showing the unique and shared OTU among the different samples.

表 1. 不同组别真菌群落 Alpha 多样性指数(OTU level)

Table 1. Alpha diversity index between different groups (OTU level)

Group	Richness index			Diversity index		Coverage index
	Sobs	ACE	Chao	Shannon	Simpson	
BQ	49±1	82±3	70±8	0.54±0.44	0.81±0.18	0.999±0.001
BZ	21±4	27±2	24±4	0.16±0.08	0.94±0.04	0.999±0.001
JQ	90±1	108±2	99±1	1.48±0.27	0.32±0.09	0.999±0.001
JZ	111±2	121±7	120±7	1.46±0.16	0.44±0.24	0.999±0.001

烟叶叶片(JQ)及霉变轻烟叶叶柄(JZ)优势菌门为子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*)。其中, 子囊菌门(*Ascomycota*)相对丰度分别为 96.33%、99.65%、63.30%、82.51%; 担子菌门(*Basidiomycota*)相对丰度分别为 3.42%、0.30%、32.80%、6.93% (图 3)。在属水平上(图 4, 表 2), 霉变重烟叶叶片(BQ)中获得的 62 个属中, 优势菌属为曲霉属(*Aspergillus*)、漆斑菌属(*Myrothecium*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、赤霉属(*Gibberella*), 相对丰度分别为 89.46%、2.54%、2.48%、1.49%。霉变重烟叶叶柄(BZ)中获得的 26 个属中, 优势菌属为曲霉属(*Aspergillus*)和链格孢属(*Alternaria*), 相对丰度分别为 96.93%和 1.92%。霉变轻烟叶叶片(JQ)中获得的 114 个属中, 优势菌属为曲霉属(*Aspergillus*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、链格孢属(*Alternaria*), 相对丰度分别为 40.13%、31.81%、16.75%。霉变轻烟叶叶柄(JZ)中获得的 145 个属中, 优势菌属为曲霉属(*Aspergillus*)、链格孢属

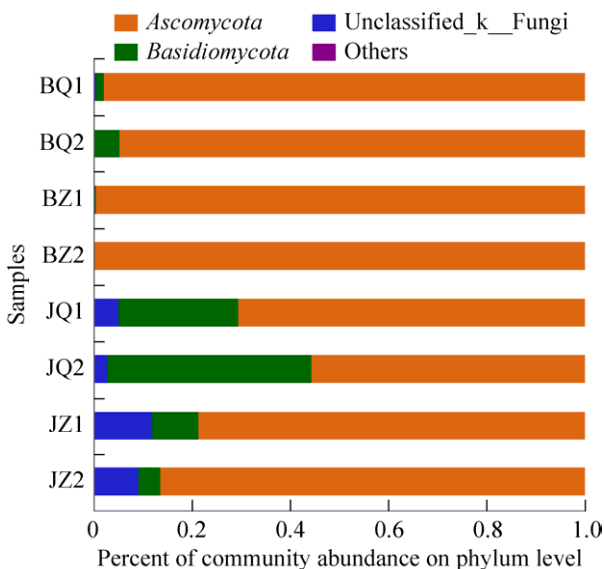


图 3. 不同组别样品门水平上的相对丰度
Figure 3. The relative abundance of different samples at phylum level.

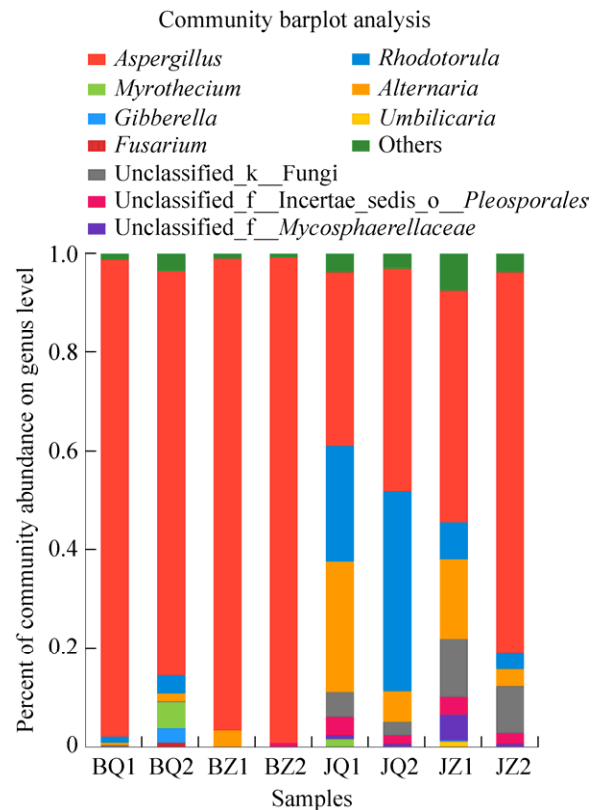


图 4. 不同组别样品属水平上的相对丰度
Figure 4. The relative abundance of different samples at genus level.

(*Alternaria*)、红酵母属(*Rhodotorula*), 相对丰度分别为 62.77%、9.74%、5.20%。非优势真菌所占比例不到总真菌数量的 0.1%, 其在各样品间的含量不存在差异。

2.5 PCoA 分析

PCoA 分析(principal co-ordinates analysis), 即主坐标分析。PcoA 中所选主成分可以充分解释原始数据中的差异。如果样本距离越接近, 表示物种组成结构越相似。由 PCoA 可见第一主成分的贡献率为 66.65%, 第二主成分的贡献率为 20.39%; 霉变轻烟叶叶柄(JZ)与霉变重烟叶叶片(BQ)和霉变重烟叶叶柄(BZ)的真菌群落组成存在显著差异(图 5)。

表 2. BQ、BZ、JQ、JZ 真菌群落中前 8 位优势分类单元及其相对丰度

Table 2. The top 8 dominant taxa and their relative abundance of fungal community of BQ, BZ, JQ and JZ

BQ/Genus	Relative abundance/%	BZ/Genus	Relative abundance/%	JQ/Genus	Relative abundance/%	JZ/Genus	Relative abundance/%
<i>Aspergillus</i>	89.46	<i>Aspergillus</i>	96.93	<i>Aspergillus</i>	40.13	<i>Aspergillus</i>	62.77
<i>Myrothecium</i>	2.54	<i>Alternaria</i>	1.92	<i>Rhodotorula</i>	31.81	<i>Alternaria</i>	9.74
<i>Rhodotorula</i>	2.48	<i>Penicillium</i>	0.16	<i>Alternaria</i>	16.75	<i>Rhodotorula</i>	5.20
<i>Gibberella</i>	1.49	<i>Candida</i>	0.11	<i>Myrothecium</i>	0.86	<i>Umbilicaria</i>	0.57
<i>Alternaria</i>	0.98	<i>Rhizopus</i>	0.04	<i>Periconia</i>	0.41	<i>Acremonium</i>	0.43
<i>Fusarium</i>	0.57	<i>Rhodotorula</i>	0.04	<i>Pseudozyma</i>	0.19	<i>Penicillium</i>	0.37
<i>Pseudozyma</i>	0.52	<i>Curvularia</i>	0.03	<i>Tilletiopsis</i>	0.19	<i>Pseudozyma</i>	0.32
<i>Penicillium</i>	0.34	<i>Golovinomyces</i>	0.02	<i>Gibberella</i>	0.01	<i>Periconia</i>	0.25

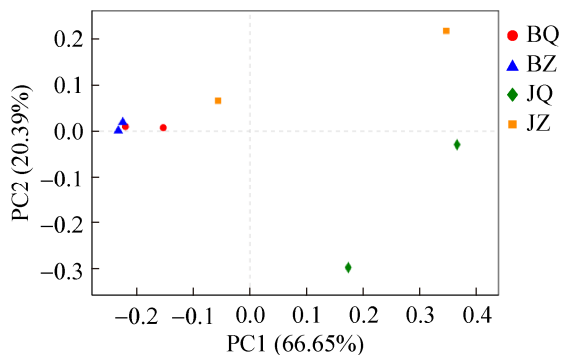


图 5. 不同样品 PCoA 分析图(OTU level)

Figure 5. PCoA analysis diagram of different samples (OTU level).

3 讨论

微生物对烟叶品质的调控起着较大作用，纯培养技术虽能获得部分可培养微生物种类和丰度，但该技术随环境变化的影响较大，对研究群落生态功能及其代谢机制方面存在局限性^[22]。本文采用 Illumina 高通量测序技术，选取不同霉变程度烟叶的叶柄及叶片为研究对象，对烤后不同霉变程度烟叶的叶柄与叶片样品的真菌种群结构和多样性特性开展了系统性研究，获得了霉变烟叶较为全面的真菌群落结构与多样性信息。

本文通过 OTU 数量、Chao、ACE 等指数反映了不同霉变程度烟叶的叶柄及叶片样品的真菌

群落和多样性。丰富度指数表明，霉变轻烟叶叶柄(JZ)真菌群落丰富度最大，霉变重烟叶叶柄(BZ)真菌群落丰富度最小。多样性指数表明，霉变轻烟叶叶片(JQ)的真菌群落多样性最高，霉变重烟叶叶柄(BZ)的真菌群落多样性最低。总体看来，霉烂病感病较重的烟叶群落多样性明显要低于霉变轻的烟叶样品。在同一霉变程度下，叶柄部位的真菌群落多样性均低于叶片部位样品，其原因并不清楚，可能与样品的部位及其所处的环境条件有关，相关差异原因有待下一步深入研究。

物种群落组成结果表明，在门水平上，霉变重烟叶叶片(BQ)、霉变重烟叶叶柄(BZ)、霉变轻烟叶叶片(JQ)、霉变轻烟叶叶柄(JZ)优势菌门均为子囊菌门(*Ascomycota*)，随后为担子菌门(*Basidiomycota*)和接合菌门(*Zygomycota*)。结果与陈善义等^[23]研究报道的烟叶真菌群落组成的结论相似。

在属水平上，霉变重烟叶叶柄及叶片样品与霉变轻烟叶叶柄及叶片样品之间存在较大差异。霉变轻烟叶叶柄(JZ)丰富度和多样性高于霉变重烟叶叶柄(BZ)、霉变重烟叶叶片(BQ)和霉变轻烟叶叶片(JQ)。4 组样品共有属均为曲霉属(*Aspergillus*)、红酵母属(*Rhodotorula*)、赤霉属(*Gibberella*)和链格

孢属(*Alternaria*), 且曲霉属(*Aspergillus*) 在 4 组样品中丰度均最高。本文结果与吴阔等^[24]和 Gayed^[25]所报道的霉变烟叶中引起霉变的真菌类群等结论相似, 均发现曲霉属(*Aspergillus*) 的含量与霉变程度正相关, 红酵母属(*Rhodotorula*) 的含量与霉变程度负相关, 赤霉属(*Gibberella*) 的含量与霉变程度不相关。本文霉变轻烟叶叶片及叶柄样品的黑团孢属(*Periconia*) 含量均高于霉变重烟叶叶片及叶柄样品, 4 组样品中霉变重烟叶叶柄(BZ)的根曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)、念珠菌属(*Candida*) 含量均高于霉变重烟叶叶片(BQ)、霉变轻烟叶叶片(JQ)、霉变轻烟叶叶柄(JZ)。研究结果与曾婷英等和 Wang 等^[26-28] 研究报道结果一致。此外, 彭清云等^[29]对烟叶霉烂分析中发现, 曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*) 均是影响烟叶霉烂的主要病原菌, 相关发现与本文基本一致。

本文发现的不同霉变程度烤烟烟叶不同部位的微生物种类和丰度为烘烤期和仓储期烟叶霉烂病的防治提供了科学依据。本文仅分析了烘烤后霉烂烟叶的真菌群落结构与多样性, 然而, 烟草霉变通常是微生物、环境、寄主等多因素互作的结果, 下一步有待完善烟叶霉变过程中细菌的群落结构与多样性研究, 同时还应开展仓储过程中烟叶微生物的群落结构与多样性研究, 进而为烟叶霉变的系统性防治提供理论基础。

参 考 文 献

- [1] Li HY, Chen JJ, Zhou C, Zhong JZ, Wen GY. Evaluation of curing characteristics of flue-cured tobacco and its traits screening. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31(8): 1746–1750. (in Chinese)
李淮源, 陈建军, 周诚, 钟俊周, 文国宇. 烤烟烘烤特性评价及其指标筛选. *西南农业学报*, 2018, 31(8): 1746–1750.
- [2] Morin A, Porter A, Joly J, Ratavicius A. Evolution of tobacco-specific nitrosamines and microbial populations during flue-curing of tobacco under direct and indirect heating. *Contributions to Tobacco Research*, 2004, 21(1): 40–46.
- [3] Zhu ML. Advances in microbes during tobacco curing. *Microbiology*, 2008, 35(8): 1278–1281. (in Chinese)
祝明亮. 烟草调制期间微生物研究进展. *微生物学通报*, 2008, 35(8): 1278–1281.
- [4] Yang SX. Research progress in tobacco baking principle and technology. *Crop Research*, 2018, 32(6): 541–544. (in Chinese)
杨树勋. 烟叶烘烤原理及技术研究进展. *作物研究*, 2018, 32(6): 541–544.
- [5] Yang CY, Geng CA, Huang XY, Wang H, Xu HB, Liang WJ, Ma YB, Zhang XM, Zhou J, Chen JJ. Noreudesmane sesquiterpenoids from the leaves of *Nicotiana tabacum*. *Fitoterapia*, 2014, 96: 81–87.
- [6] Nyvall RF. Diseases of tobacco: *Nicotiana tabacum* L. // Nyvall RF. *Field Crop Diseases Handbook*. Boston: Springer, 1989: 661–707.
- [7] Gu G, Xiao S, Zhou T, Liu GK, Wang SL, Zhang SS. Development and prospect of research in tobacco leaf mildew rot during flue-curing. *Acta Tabacaria Sinica*, 2018, 24(5): 112–116. (in Chinese)
顾钢, 肖顺, 周挺, 刘国坤, 王胜雷, 张绍升. 烘烤期烟叶霉烂病的研究进展与展望. *中国烟草学报*, 2018, 24(5): 112–116.
- [8] 赵文姬. 云南仓储烟叶霉变及其生物防治研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2004.
- [9] 朱桂宁. 广西烟仓主要霉变生物的鉴定、生物学特性及防治研究. 广西大学硕士学位论文, 2005.
- [10] Spurr HW. Bacterial barn rot of flue-cured tobacco in North Carolina. *Plant Disease*, 1980, 64(11): 1020–1022.
- [11] Holdeman QL, Burkholder WH. The identity of barn rots of flue-cured tobacco in South Carolina. *Phytopathology*, 1956, 46: 69–72.
- [12] Zhang YJ, Skaar I, Sulyok M, Liu XZ, Rao MY, Taylor JW. The microbiome and metabolites in fermented Pu-erh tea as revealed by high-throughput sequencing and quantitative multiplex metabolite analysis. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157847.
- [13] Du S, Yang T, Zhao YJ. Application of high-throughput sequencing in environmental microbiology. *Science & Technology Vision*, 2015, (23): 131. (in Chinese)
杜姗, 杨唐, 赵英杰. 高通量测序在环境微生物学中的应用. *科技视界*, 2015, (23): 131.
- [14] Song WF, Li MC, Gao Z. Research progress on *in situ*

- detection methods of microorganisms. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(10): 26–32. (in Chinese)
- 宋伟凤, 李明聪, 高峥. 环境中微生物原位检测方法研究进展. *生物技术通报*, 2017, 33(10): 26–32.
- [15] Li Y, Feng YW, Yu Y, Ren D, Ye Y, Li MQ. A bioinformatics study on the application of high-throughput sequencing technology to pathogen detection in patients with sepsis. *Journal of Medical Imaging and Health Informatics*, 2018, 8(2): 344–350.
- [16] Mboowa G, Sserwadda I, Amujal M, Namatovu N. Human genomic loci important in common infectious diseases: role of high-throughput sequencing and genome-wide association studies. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2018, 2018: 1875217.
- [17] Speranskaya AS, Krinitsina AA, Shipulin GA, Khafizov KF, Logacheva MD. High-throughput sequencing for the authentication of food products: problems and perspectives. *Russian Journal of Genetics*, 2018, 54(9): 1003–1012.
- [18] Ercolini D. High-throughput sequencing and metagenomics: moving forward in the culture-independent analysis of food microbial ecology. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(10): 3148–3155.
- [19] Xue YG, Jiang XD, Sun M, Liu F, Teng JQ, Geng JJ, Xie WL, Zhang H. Structure and diversity profiles of planktonic and sediment bacteria communities in the Zhushan bay of Lake Taihu in winter based on high-throughput sequencing. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2017, 33(11): 992–1000. (in Chinese)
- 薛银刚, 江晓栋, 孙萌, 刘菲, 滕加泉, 耿金菊, 谢文理, 张皓. 基于高通量测序的冬季太湖竺山湾浮游细菌和沉积物细菌群落结构和多样性研究. *生态与农村环境学报*, 2017, 33(11): 992–1000.
- [20] Acosta M, Galleguillos PA, Guajardo M, Demergasso C. Microbial survey on industrial bioleaching heap by high-throughput 16S sequencing and metagenomics analysis. *Solid State Phenomena*, 2017, 262: 219–223.
- [21] Gong J, Liu YP, Li YY. Comparative analysis of microbial communities on tobacco leaves between clone library and high-throughput sequencing. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*, 2016, (3): 92–101. (in Chinese)
- 龚俊, 刘玉配, 李媛媛. 烟叶表面微生物类群两种检测方法的比较研究. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2016, (3): 92–101.
- [22] Liu KL, Wang JQ, Bu DP, Li D, Yu P, Zhao SG. Current progress in approaches to the study of structure and function diversities of environmental microbial communities. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(4): 1074–1080. (in Chinese)
- 刘开朗, 王加启, 卜登攀, 李旦, 于萍, 赵圣国. 环境微生物群落结构与功能多样性研究方法. *生态学报*, 2010, 30(4): 1074–1080.
- [23] Chen SY, Li JJ, Lin J, Bao KX, Fan JQ, Zhang RQ, Chen YQ, Chen SB, He W. High-throughput sequencing fungal community structures in aging tobacco strips from different growing areas and stalk positions. *Tobacco Science & Technology*, 2018, 51(4): 12–19. (in Chinese)
- 陈善义, 李菁菁, 林俭, 包可翔, 范坚强, 张瑞强, 陈义强, 陈少滨, 何伟. 基于高通量测序的不同产地和部位自然醇化片烟真菌群落结构分析. *烟草科技*, 2018, 51(4): 12–19.
- [24] Wu K, Luo HY, Lin K, Li ZY, Zhu HB, Rao Z, Dong SF, Chen C, Hou ZG, Nie X, Zhu FL. Fungi species in mildew tobacco leaves identified based on rDNA-ITS. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2014, 42(6): 98–100. (in Chinese)
- 吴阔, 罗华元, 林昆, 李枝桦, 朱海滨, 饶智, 董石飞, 陈初, 侯占高, 聂鑫, 朱法亮. 基于 rDNA-ITS 法鉴定的霉变烟叶真菌种类. *贵州农业科学*, 2014, 42(6): 98–100.
- [25] Gayed SK. *Rhizopus arrhizus* causing pole rot of flue-cured tobacco in Ontario. *Canadian Journal of Plant Science*, 1972, 52(1): 103–106.
- [26] Zeng TY, Gu G, Zhang SS. Identification of tobacco mildew pathogen which causes leaf rot during flue-curing. *Acta Tabacaria Sinica*, 2014, 20(4): 65–68. (in Chinese)
- 曾婷英, 顾钢, 张绍升. 烘烤期烟叶霉烂病的病原鉴定. *中国烟草学报*, 2014, 20(4): 65–68.
- [27] Wang HC, Huang YF, Tang XG, Cai LT, Chen QY, Wang MS, Shang SH. Leaf and stem rot of tobacco (*Nicotiana tabacum*) caused by *Rhizopus oryzae* in closed curing barns in Guizhou province of China. *Plant Disease*, 2016, 100(2): 536.
- [28] 王永栋. 烘烤期烟草霉烂病的病因与防治. 福建农林大学硕士学位论文, 2016.
- [29] Peng QY, Yi TY. Analysis of tobacco mildew and its control measures. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(11): 146–150. (in Chinese)
- 彭清云, 易图永. 烟叶霉变的原因及其防治研究进展. *中国农学通报*, 2007, 23(11): 146–150.

Fungal composition and diversity of tobacco phyllosphere from cured tobacco leaves

Qianli Chen^{1,2}, Zhong Li^{1*}, Hancheng Wang^{2*}, Yu Huang^{1,2}, Liuti Cai², Honglian Xie³, Hao Zhou⁴

¹ College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhong Province, China

² Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, Guizhong Province, China

³ College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei Province, China

⁴ College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] To know the fungal community composition and diversity of tobacco phyllosphere with different degrees of tobacco pole rot. **[Methods]** The fungal community composition of both petiole and leaf samples from flue-cured tobacco leaves was analyzed based on Illumina MiSeq high-throughput sequencing platform. **[Results]** The fungi from severe infected leaf samples (BQ), severe infected petiole samples (BZ), light infected leaf samples (JQ) and light infected petiole samples (JZ), were distributed in 7 phyla (*Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zygomycota*), 27 classes, 58 orders, 104 families, 171 genera and 360 fungal taxa (OTUs). The fungal community composition, relative abundance and dominant fungal taxon of each sample with different pole rot level were all different. When at genus level for sample BQ, the dominant genus was *Aspergillus* (89.64%), *Myrothecium* (2.54%), *Rhodotorula* (2.48%), *Gibberella* (1.49%). For sample BZ, dominant genus was *Aspergillus* (96.93%) and *Alternaria* (1.92%). For sample JQ, dominant genus was *Aspergillus* (40.13%), *Rhodotorula* (31.81%), *Alternaria* (16.75%). For sample JZ, the dominant genus was *Aspergillus* (62.77%), *Alternaria* (9.74%), *Rhodotorula* (5.20%). The diversity of fungal communities is the highest for sample JQ, richness of fungal communities is the highest for sample JZ. The richness and diversity of BQ fungal community were higher than those of BZ. Tobacco pole rot is a common disease in curing barn. This pathogenic fungus is various and widely distributed in tobacco leaf and environment. **[Conclusion]** The results provided a reference for the prevention and control of tobacco pole rot in flue-cured barn according to the characteristics of fungal community composition in different parts of the disease severity.

Keywords: tobacco pole rot, fungal diversity, community structure, Illumina high throughput sequencing

(本文责编: 李磊)

Supported by the Guizhou Science and Technology Support Plan (Guizhou Science and Technology Support [2018] 2356), by the Guizhou Provincial Department of Science and Technology Excellent YOUTH Talents Training Program (Qian Kehe Platform Talents [2017] 5619) and by the China National Tobacco Corporation Guizhou Provincial Company Science and Technology Project (201711, 201714)

*Corresponding author. Tel: +86-851-84116913; E-mail: Zhong Li, zhongzhongligzu@163.com, Hancheng Wang, xiaobaiyang126@hotmail.com

Received: 19 February 2019; Revised: 13 May 2019; Published online: 24 October 2019