

槟榔黄化病叶际微生物群落结构与多样性

马瑞¹, 王贞霖¹, 芮凯^{2*}

- 1 海南省农业科学院植物保护研究所, 海南省农业科学院农产品质量安全与标准研究中心, 海南省植物病虫害防控重点实验室, 农业农村部海口作物有害生物科学观测实验站, 海南 海口
- 2 海南省农业科学院三亚研究院, 海南 三亚

马瑞, 王贞霖, 芮凯. 槟榔黄化病叶际微生物群落结构与多样性[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3600-3614.

MA Rui, WANG Zhenlin, RUI Kai. Phyllosphere microbial community structure and diversity of *Areca catechu* with yellow leaf disease[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3600-3614.

摘要:【目的】明确叶际微生物对槟榔黄化病 APV1 病毒入侵的响应, 为槟榔叶际微生态的研究、优异生防资源的挖掘及槟榔黄化病的绿色防控提供理论依据和技术支持。【方法】分别采集健康、轻度发病及重度发病槟榔叶片, 通过高通量测序技术和生物信息学方法比较叶际微生物的群落结构与多样性并分析功能差异。【结果】槟榔叶际优势细菌门为放线菌门(*Actinobacteriota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和黏球菌门(*Myxococcota*), 优势真菌门为子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*)。随着发病程度的增加, 槟榔叶际细菌丰富度先升后降, 真菌丰富度先降后升; 细菌和真菌多样性均呈先升后降的趋势。厚壁菌门(*Firmicutes*)和担子菌门(*Basidiomycota*)作为轻度发病槟榔的标志物种, 其相对丰度与 α 多样性变化趋势一致。健康与不同发病程度槟榔叶际微生物功能均发生了不同程度的变化, 其中重度发病槟榔的环境信息处理功能显著高于健康槟榔; 共生营养型(symbiotroph)的相对丰度极显著高于健康槟榔。【结论】槟榔黄化病显著改变了叶际微生物群落结构与多样性, 且在发病初期变化较大, 说明槟榔可能通过招募有益微生物、调控细胞代谢、生化反应、进行自身免疫等方式来抵御 APV1 病毒侵染。

关键词: 槟榔; 黄化病; 叶际微生物; 群落结构; 多样性

资助项目: 海南省自然科学基金(321QN365); 三亚崖州湾科技城科技专项(SCKJ-JYRC-2022-104); 海南省槟榔产业技术体系专项资金(HNARS)

This work was supported by Hainan Provincial Natural Science Foundation (321QN365), the Sanya Yazhou Bay Science and Technology City Project (SCKJ-JYRC-2022-104), and the Earmarked Fund for HNARS.

*Corresponding author. E-mail: kairuihn@163.com

Received: 2025-01-15; Accepted: 2025-03-21; Published online: 2025-06-19

Phyllosphere microbial community structure and diversity of *Areca catechu* with yellow leaf disease

MA Rui¹, WANG Zhenlin¹, RUI Kai^{2*}

¹ Scientific Observation and Experiment Station of Crop Pests in Haikou Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Plant Diseases and Pest Control of Hainan Province, Sciences Research Center of Quality Safety and Standards for Agricultural Products of Hainan Academy of Agricultural Sciences, Institute of Plant Protection, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou, Hainan, China

² Sanya Institute of Hainan Academy of Agricultural Sciences, Sanya, Hainan, China

Abstract: [Objective] To clarify phyllosphere microbial responses to the invasion of areca palm velarivirus 1 (APV1), a virus causing yellow leaf disease of areca (*Areca catechu*), and provide a theoretical basis and technical support for the study of phyllosphere micro-ecology, exploration of excellent biocontrol resources, and green prevention and control of yellow leaf disease of areca. [Methods] We collected healthy leaves, mildly diseased leaves, and severely diseased leaves of areca. The phyllosphere microbial community structure and diversity were compared by high-throughput sequencing and bioinformatics methods. Furthermore, functional differences of phyllosphere microbial communities were analyzed. [Results] The dominant bacterial phyla in the phyllosphere of areca included *Actinobacteriota*, *Proteobacteria*, *Acidobacteriota*, *Firmicutes*, and *Myxococcota*, while the dominant fungal phyla were *Ascomycota* and *Basidiomycota*. As the disease became increasingly severe, bacterial richness initially increased then decreased while fungal richness initially decreased then increased. However, both bacterial diversity and fungal diversity showed a trend of first increasing and then decreasing. *Firmicutes* and *Basidiomycota* served as indicators of mildly diseased areca, with the relative abundance showing consistent trends with alpha diversity. The healthy plants and the diseased plants showed different phyllosphere microbial functions. Specifically, the environmental information processing function was significantly higher in severely diseased areca plants than in healthy ones. Additionally, the relative abundance of symbiotroph fungi in the phyllosphere were significantly higher in severely diseased areca plants than in healthy ones. [Conclusion] The yellow leaf disease significantly alters the phyllosphere microbial community structure and diversity of areca, with greater changes during the early disease stage. This suggests that areca may defend against APV1 infection by recruiting beneficial microorganisms, regulating cellular metabolism and biochemical reactions, and activating autoimmunity.

Keywords: *Areca catechu*; yellow leaf disease; phyllosphere microorganism; community structure; diversity

槟榔(*Areca catechu* L.)属棕榈科多年生常绿乔木, 主要分布在亚洲、非洲、欧洲和中美洲的热带及亚热带边缘地区^[1], 是我国四大南药

(槟榔、益智、砂仁、巴戟)之首^[2], 具有抗疲劳、抗氧化、抗抑郁、抗炎镇痛和利尿等多种功能, 并于 1953 年被列入《中华人民共和国药

典》^[3-5]。我国槟榔主要分布在海南、云南和台湾省，其中海南槟榔种植面积和总产量均占全国的 95% 以上^[6]。目前，槟榔已成为海南 230 多万农民的主要经济来源，在海南实施乡村振兴战略、做强做优热带特色高效农业和建设国家生态文明试验区中发挥着举足轻重的作用^[7]。槟榔黄化病是一种传染性疾病，病害症状开始于树冠中下层叶片，从叶尖逐渐变黄，发病叶片呈叶脉绿色、叶肉黄色的不均匀黄化，黄化与绿色部位交界明显，随后黄化症状扩展到上层叶片，新叶发育不良，冠幅明显减小，出现“束顶”症状，最终导致植株死亡，造成槟榔大面积减产甚至绝产^[8]。研究证实 APV1 病毒感染与海南槟榔黄化病高度相关^[9]，但目前尚缺少针对病毒特异性的有效化学药剂，导致槟榔黄化病传播较快且较广，严重影响了槟榔产业的可持续发展^[10]。

叶际微生物在保护寄主植物免受病原菌感染方面具有至关重要的作用^[11-13]，Vogel 等^[14]对拟南芥叶际 200 多种细菌的植物保护能力进行了系统性分析，发现约 10% 的菌株通过多重相互作用保护拟南芥免受假单胞杆菌侵袭，约 10% 的菌株显示出中等程度的保护作用，其植物保护机制有多种。Ma 等^[15]从烟草叶际分离出了群体感应猝灭细菌，主要包括芽孢杆菌属、不动杆菌属和假单胞菌属等，其中 79% 的菌株都具有降解 N-酰基高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactone, AHL)信号分子的内酯酶活性，可作为潜在的生物防治剂抑制烟草病原菌。Berg 和 Koskella^[16]发现，接种番茄叶际相关微生物群可以影响细菌斑点病丁香假单胞菌的定殖，但不同微生物群落的保护程度不同，且取决于所施用的微生物群接种剂量和植株的无机营养状况。目前，关于槟榔叶际微生物组的研究仍较为有限。为深入探究槟榔黄化病对叶际微生物群落的影响，发掘潜在的优良生防资源，并推进槟榔黄化病的绿色防控策略，本研究采用高通量测序技术系统分析了健康槟榔与不同发病程度

槟榔叶际微生物的群落结构及多样性特征，并进一步探讨了其功能差异及潜在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品采自海南省定安县龙河镇鸭塘村槟榔园(19°23'N, 110°13'E)，槟榔品种为海南本地种，树龄约 10 年，果形为椭圆形，节间 8–15 cm，有效叶片 6–7 片。试验设置 3 组处理，分别为健康槟榔(JK)、轻度发病槟榔(MD)和重度发病槟榔(SD)。健康槟榔是指绿色叶片数大于或等于 5 片，只有最下面 1 片老叶黄化或有病斑的植株；轻度发病槟榔是指绿色叶片数大于或等于 4 片的植株；重度发病槟榔是指绿色叶片数少于或等于 2 片的植株。随机选择长势相近的槟榔植株，使用经乙醇消毒的高枝剪采集树冠中层叶片，观察挑选干净无虫卵的小裂叶放入无菌袋中密封保存，用干冰运输至实验室，冻存于–80 °C 冰箱中备用。每处理 5 个重复，每个重复的叶片均来自于同一株树。

1.2 基因组 DNA 提取

按照张怀文等^[17]的方法检测病原，根据检测结果挑选阴性且无症状的叶片作为健康组(CK)样品，阳性且黄化症状明显的叶片作为感病组(MD/SD)样品进行后续研究。每个重复称取 75 g 槟榔叶片，在超净工作台使用无菌剪刀剪成 3 cm×4 cm 的小块，置于含有 750 mL 无菌水的三角瓶中，并添加一定量的表面活性剂 Silwet L-77^[18]，用灭菌膜封口后在 25 °C、200 r/min 的摇床中振荡 20 min，将微生物细胞从叶片表面分离，然后在无菌环境中使用真空抽滤装置将振荡液中的微生物收集到 0.22 μm 孔径滤膜上^[19]。使用 SPINeasy DNA Kit for Plant (MP Biomedicals 公司)提取槟榔叶际微生物基因组 DNA，保存于–20 °C^[20]。

1.3 PCR 扩增及高通量测序

分别用通用引物 338F (5'-ACTCCTACGGG

AGGCAGCA-3')/806R (5'-GGACTACHVGGGT WTCTAAT-3')和 ITS1F (5'-CTTGGTCATTTAGA GGAAGTAA-3')/ITS2 (5'-GCTGCGTTCTTCATC GATGC-3')对细菌 16S rRNA 基因的 V3-V4 区与真菌 ITS1 区进行扩增^[20]。PCR 反应体系(10 μ L): KOD FX Neo Buffer 5 μ L, dNTPs 2 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.3 μ L, KOD FX Neo (1.0 U/ μ L) 0.2 μ L, DNA 模板 0.5 μ L, ddH₂O 补至 10 μ L。PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 25/30 个循环(细菌/真菌); 72 $^{\circ}$ C 终延伸 7 min。扩增产物经纯化、定量和均一化形成测序文库, 质检合格后用 Illumina NovaSeq 6000 进行测序。

1.4 数据分析

首先使用 Trimmomatic v0.33 软件对原始数据进行质量过滤, 然后使用 Cutadapt 1.9.1 软件进行引物序列的识别与去除, 再使用 QIIME 2 中的 dada2 方法进行去噪, 以获得的最终序列数的 0.005% 作为阈值进行扩增子序列变体 (amplicon sequence variant, ASV) 的划分和聚类, 分别以 Silva.138 和 UNITE 作为细菌和真菌参考数据库, 使用朴素贝叶斯分类器对 ASV 进行分类学注释, 根据注释结果筛除叶绿体和线粒体来源的序列, 以保证分析结果的准确性。使用

QIIME 软件对样品 α 多样性指数进行评估, 包括物种丰富度 (Chao1 指数) 和物种多样性 (Shannon 指数), 基于 Bray Curtis 算法进行 β 多样性分析, 采用非参数统计方法 Kruskal-Wallis 秩和检验进行组间差异显著性分析, 使用 Tax4Fun2 v1.1.5 软件预测细菌功能, Funguild v1.0 软件预测真菌功能, 利用 R 语言工具绘制稀释曲线图、Venn 图、物种组成柱状图、物种功能柱状图等。以上分析均在百迈克云平台 (<https://international.biocloud.net>) 上完成。

2 结果与分析

2.1 测序数据质量评估

细菌原始测序数据质控后共产生 79 732 条高质量序列, 经过去噪、双端序列拼接并去除嵌合体序列后, 最终得到 62 491 条有效序列, 平均为 4 166 条。真菌原始测序数据质控后共产生 514 145 条高质量序列, 经过去噪、双端序列拼接并去除嵌合体序列后, 最终得到 496 870 条有效序列, 平均为 33 125 条。稀释曲线展示了不同样本间多样性的差异, 各样本的稀释曲线趋于平缓, 说明测序深度已经基本覆盖到样本中的所有物种, 测序数据量足以反映样本中的物种多样性(图 1)。

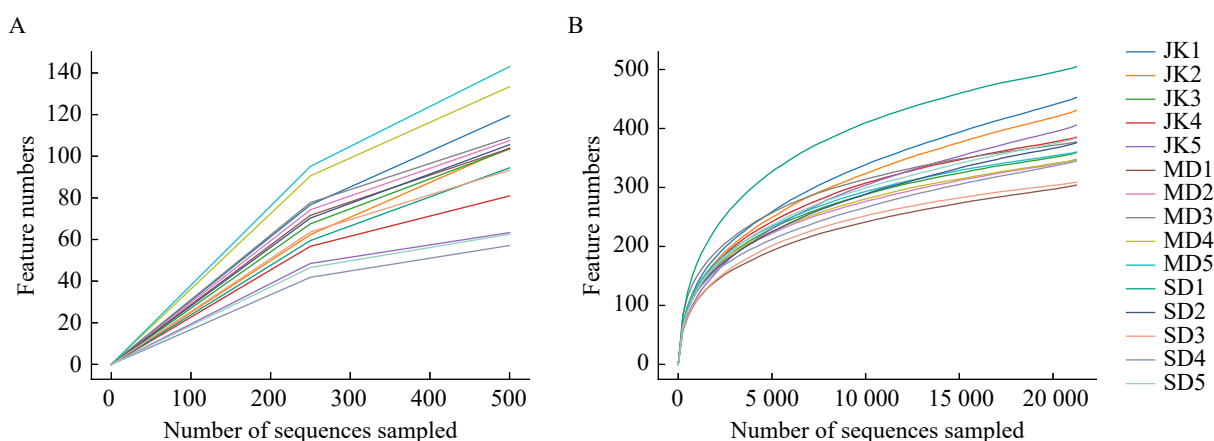


图1 稀释曲线。A: 细菌群落; B: 真菌群落。

Figure 1 Rarefaction curves. A: Bacterial community; B: Fungal community.

2.2 不同发病程度槟榔叶际微生物 ASV 分析

上述序列经聚类后分别得到 1 175 个细菌 ASVs 和 3 614 个真菌 ASVs。不同组间细菌 ASVs 数排序为：MD (474 个)>JK (435 个)>SD (373 个)；真菌 ASVs 数排序为：JK (1 512 个)>SD (1 478 个)>MD (1 349 个)。其中，轻度发病槟榔(MD)含有的细菌 ASVs 总数和独有 ASVs 数均为最多，但真菌 ASVs 总数和独有 ASVs 数均为最少。健康与不同发病程度槟榔样品间共有的细菌 ASVs 和真菌 ASVs 分别为 24 个和 172 个，占各自 ASVs 总数的 2.04% 和 4.76% (图 2)。

2.3 不同发病程度槟榔叶际物种分类

分类学注释结果显示，槟榔叶际细菌归属于 24 门 45 纲 98 目 174 科 324 属；真菌归属于 10 门 34 纲 91 目 213 科 437 属。在门水平上 (图 3)，槟榔叶际细菌主要包括放线菌门 (*Actinobacteriota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和黏球菌门(*Myxococcota*) (相对丰度大于 1.00%)。随着病情等级的增加，放线菌门(*Actinobacteriota*) (27.15%–40.19%)、变形菌门 (*Proteobacteria*) (22.94%–28.94%)、酸杆菌门 (*Acidobacteriota*) (13.67%–20.04%) 和黏球菌门 (*Myxococcota*) (1.15%–10.99%) 的相对丰度呈先降后升的趋势，

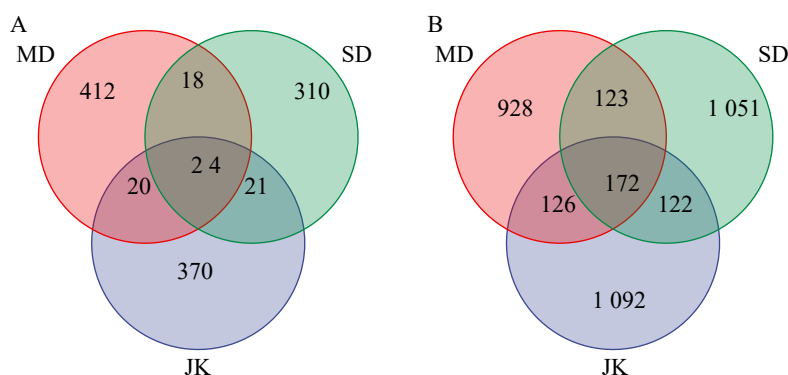


图2 ASV水平下venn图。A：细菌群落；B：真菌群落。

Figure 2 Venn of ASVs level. A: Bacterial community; B: Fungal community.

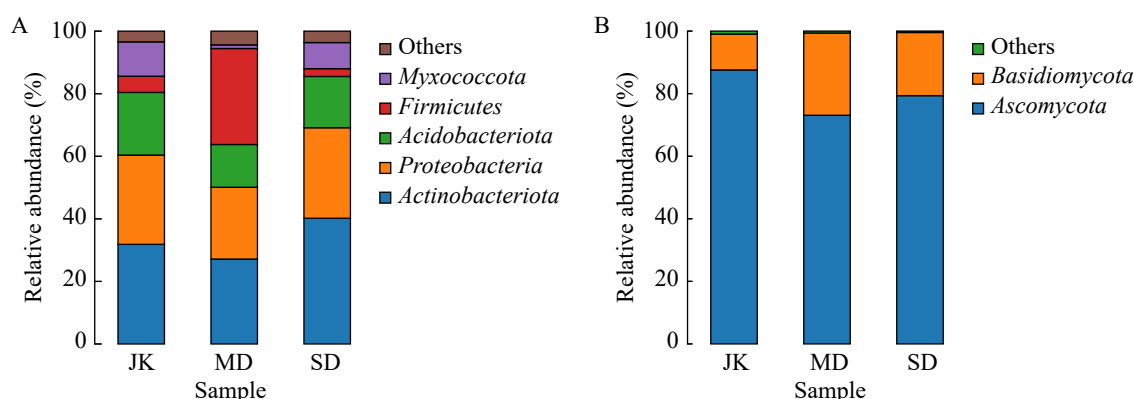


图3 槟榔叶际物种相对丰度图(门水平)。A：细菌群落；B：真菌群落。

Figure 3 Areca phyllosphere microbial relative abundance at phylum level. A: Bacterial community; B: Fungal community.

厚壁菌门(*Firmicutes*) (2.50%–30.69%)呈先升后降的趋势, 虽然菌群的相对丰度发生了不同程度的变化, 但不同组间均无显著差异。槟榔叶际真菌主要包括子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*) (相对丰度大于 1.00%)。随着病情等级的增加, 子囊菌门(*Ascomycota*) (73.08%–87.58%)呈先降后升的趋势, 担子菌门(*Basidiomycota*) (11.44%–26.29%)呈先升后降的趋势。

在属水平上(图 4), 槟榔叶际细菌中 *Bryocella* 和放线孢菌属(*Actinomycetospora*)为共有优势属(相对丰度大于 5.00%)。健康槟榔样品(JK)中 *unclassified_Diplorickettsiaceae*、*P30B_42*、*Edaphobacter*、杀雄菌属(*Arsenophonus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和间孢囊菌科未知分类属(*unclassified_Intrasporangiaceae*)的相对丰度更高; 发病槟榔样品(MD、SD)中放线孢菌属(*Actinomycetospora*)、柄细菌科未知分类属(*unclassified_Caulobacteraceae*)、泛菌属(*Pantoea*)和假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)的相对丰度更

高。槟榔叶际真菌中球腔菌科未知分类属(*unclassified_Mycosphaerellaceae*)和担子菌门未知分类属(*unclassified_Basidiomycota*)为共有优势属(相对丰度大于 5.00%)。健康槟榔样品(JK)中, 球腔菌科未知分类属(*unclassified_Mycosphaerellaceae*)和 *Zasmidium* 的相对丰度更高; 发病槟榔样品(MD、SD)中, 担孢酵母属(*Erythrobasidium*)、座囊菌纲未知分类属(*unclassified_Dothideomycetes*)、担子菌门未知分类属(*unclassified_Basidiomycota*)、子囊菌门未知分类属(*unclassified_Ascomycota*)、畸球腔菌科未知分类属(*unclassified_Teratosphaeriaceae*)、刺盾食目未知分类属(*unclassified_Chaetothyriales*)和 *Letendreaa* 的相对丰度更高。

2.4 不同发病程度槟榔叶际微生物 α 多样性分析

Chao1 指数和 Shannon 指数分别用于衡量物种丰富度和物种多样性。随发病程度的增加, 槟榔叶际细菌群落 Chao1 指数呈先升后降的趋

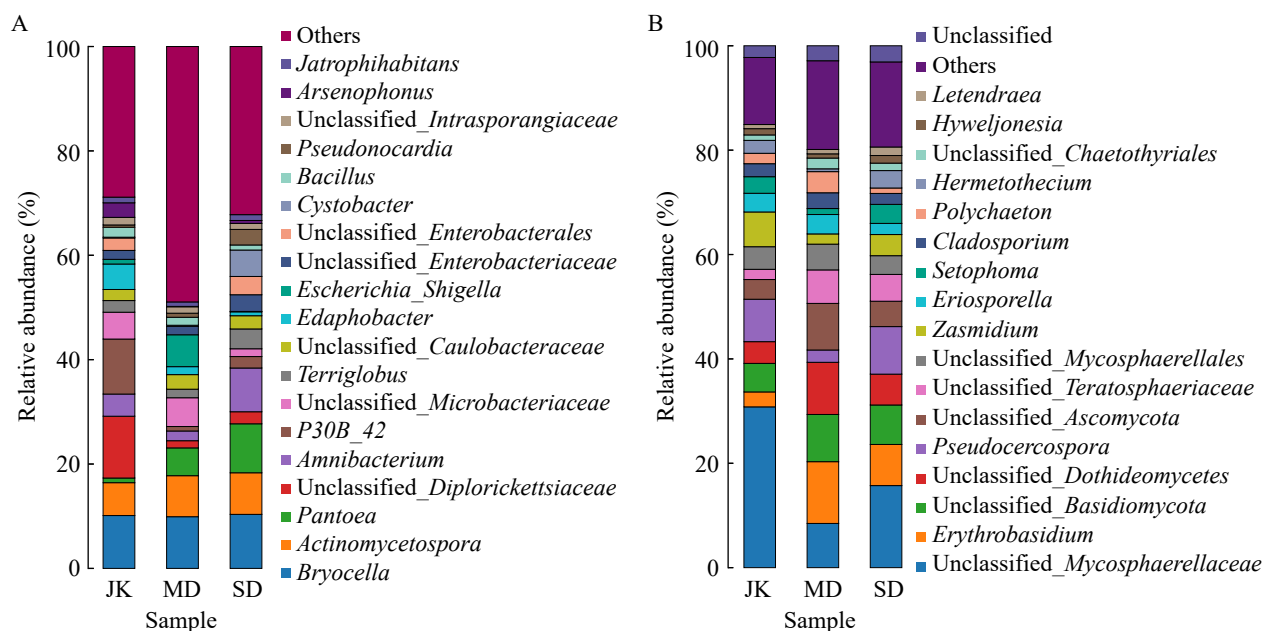


图4 槟榔叶际物种相对丰度图(属水平)。A: 细菌群落; B: 真菌群落。

Figure 4 Areca phyllosphere microbial relative abundance at genus level. A: Bacterial community; B: Fungal community.

势, 但不同组间无显著差异; Shannon 指数也呈先升后降的趋势, 轻度发病槟榔叶际细菌群落多样性最高, 与健康槟榔差异显著, 与重度发病槟榔差异极显著。槟榔叶际真菌群落 Chao1 指数随发病程度的增加呈先降后升的趋势, 而 Shannon 指数呈先升后降的趋势, 健康槟榔与轻度发病槟榔之间的丰富度和多样性均具有显著差异。除此之外, 健康槟榔与重度发病槟榔叶际微生物的丰富度和多样性均无显著差异(图 5)。

2.5 不同发病程度槟榔叶际微生物 β 多样性分析

对健康和不同发病程度的槟榔样本进行基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析(PCoA), 结果显示细菌第一主坐标轴和第二主坐标轴的解释度分别为 16.52% 和 15.19%, 真菌第一主坐标轴和第二主坐标轴的解释度分别为 21.18% 和 16.15% (图 6)。同组样本均能较紧密地结合在一起, 有很高的相似性, 不同组样本可以明显地区分开。进一步用非参数检验法 (analysis of

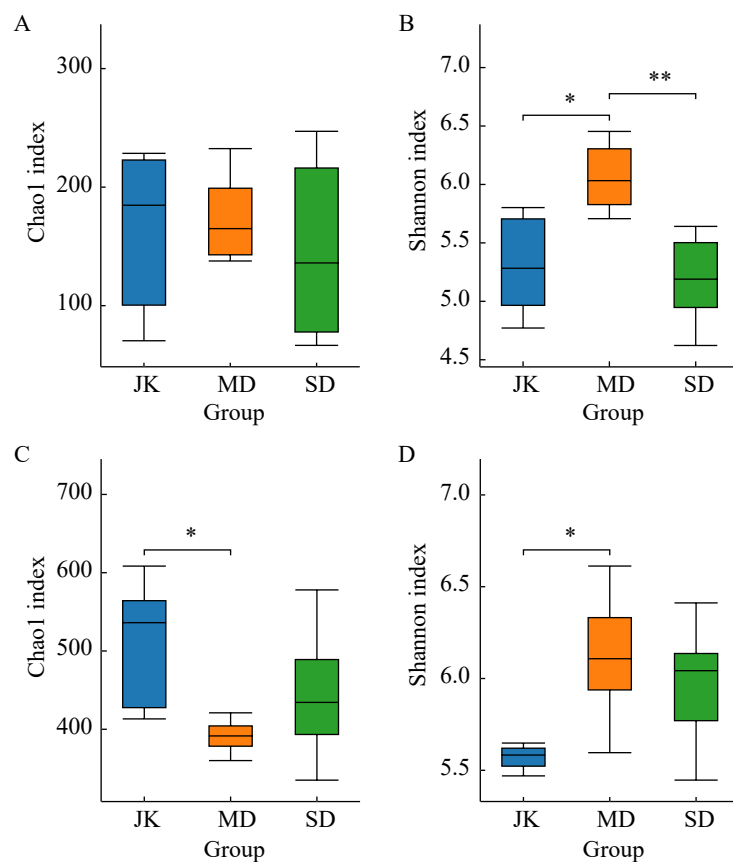


图5 槟榔叶际微生物群落的 α 多样性指数比较。A: 细菌群落Chao1指数; B: 细菌群落Shannon指数; C: 真菌群落Chao1指数; D: 真菌群落Shannon指数。*与**分别代表相关性达到显著($P<0.05$)和极显著水平($P<0.01$)。

Figure 5 Alpha diversity index comparison of areca phyllosphere microbial community. A: Chao1 index of bacterial community; B: Shannon index of bacterial community; C: Chao1 index of fungal community; D: Shannon index of fungal community. * and ** respectively represent significant ($P<0.05$) and extremely significant ($P<0.01$) levels of correlation.

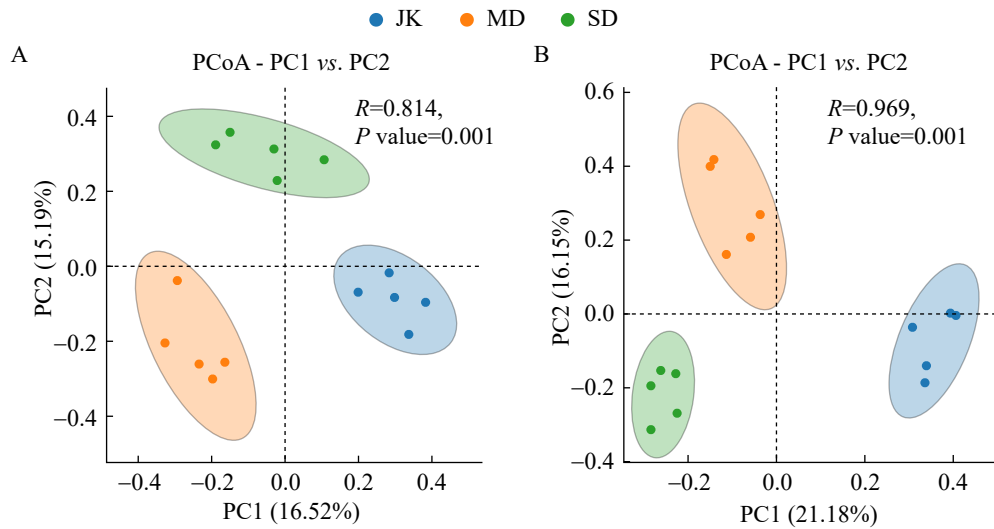


图6 基于Bray-Curtis算法的主坐标分析(PCoA)。A: 细菌群落; B: 真菌群落。

Figure 6 Principal coordinates analysis based on Bray-Curtis algorithm. A: Bacterial community; B: Fungal community.

similarities, ANOISM) 分析得 $P < 0.01$ 。UPGMA 聚类分析结果与 PCoA 结果一致(图 7)。说明槟榔叶际微生物群落在 3 个不同组间均具有极显著差异。

2.6 不同发病程度槟榔叶际物种组成差异分析

线性判别分析(linear discriminant analysis

effect size, LEfSe)揭示了健康和不同发病程度槟榔叶际的特有生物标记物, 即特有的丰富物种(图 8、图 9)。在属水平上, 健康槟榔(JK)叶际的细菌生物标记物为 *unclassified_Diplorickettsiaceae* 和 *Edaphobacter*, 真菌的生物标记物为球腔菌科未知分类属(*unclassified_Mycosphaerellaceae*)和 *Leptoxylum*; 轻度发病槟榔(MD)叶际细菌的生

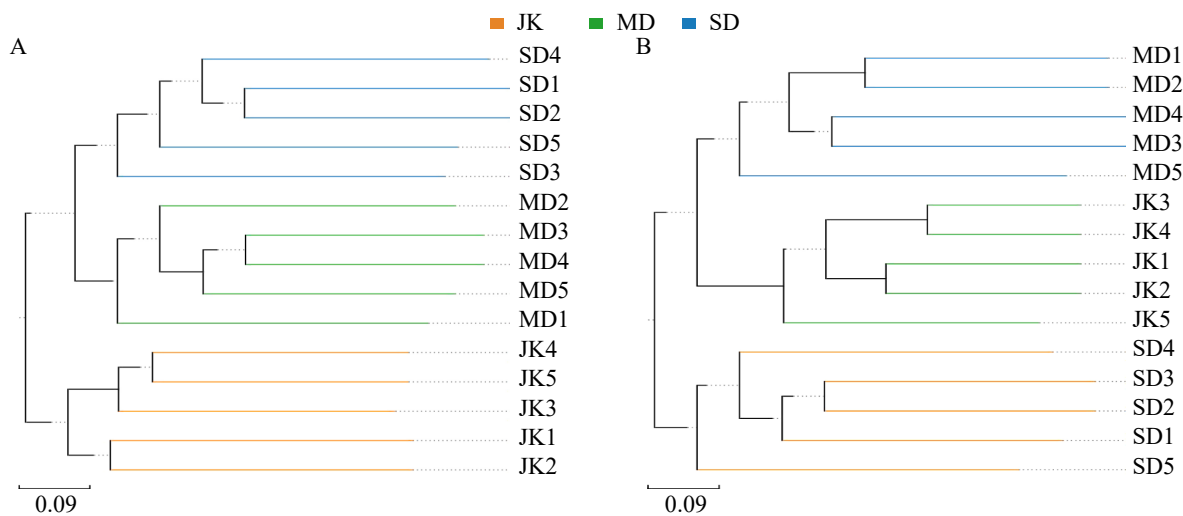


图7 UPGMA聚类分析。A: 细菌群落; B: 真菌群落。

Figure 7 UPGMA clustering analysis. A: Bacterial community; B: Fungal community.

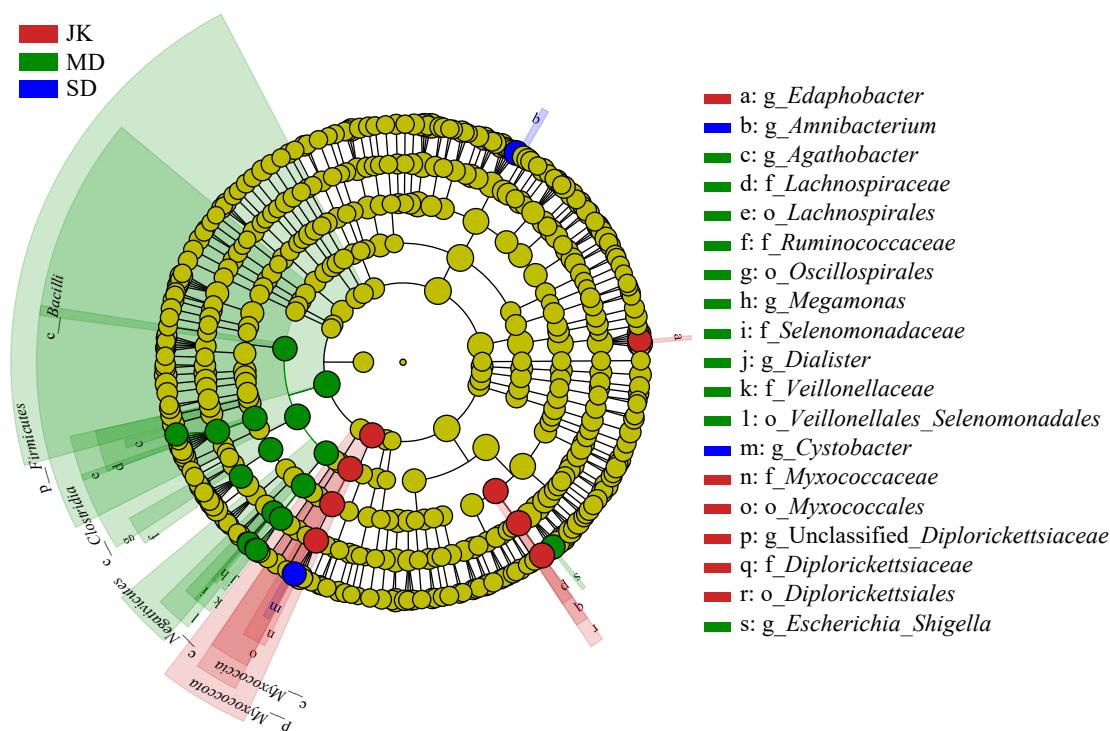


图8 槟榔叶际细菌群落LEfSe分析(LDA>4)

Figure 8 LefSe analysis of areca phyllosphere bacterial community (LDA>4).

物标记物为埃氏菌属-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、*Agathobacter*、巨单胞菌属(*Megamonas*)和小杆菌属(*Dialister*)，真菌的生物标记物为 *Bimuria*、*Kockovaella* 和虫草科未知分类属(*unclassified_Cordycipitaceae*)；重度发病槟榔(SD)叶际细菌的生物标记物为 *Amnibacterium* 和孢囊杆菌属(*Cystobacter*)，真菌的生物标记物为假尾孢属(*Pseudocercospora*)、*Hermetothecium*、多孔菌目未知分类属(*unclassified_Polyporales*)、*Pyrenochaetopsis*、*Letendreaa* 和 *Neoacrodontiella*。

2.7 不同发病程度槟榔叶际微生物功能预测

基于 KEGG 数据库对槟榔叶际微生物的基因进行功能注释，在一级功能层级上，槟榔叶际细菌主要分布于 6 类功能通路，分别为代谢(metabolism) (76.01%–78.43%)、环境信息处理 (environmental information processing)

(9.23%–10.47%)、细胞过程(cellular processes) (4.79%–5.73%)、遗传信息处理 (genetic information processing) (3.72%–4.33%)、人类疾病(human diseases) (2.13%–2.54%)和有机系统(organismal systems) (1.44%–1.62%)，其中重度发病槟榔(SD)的环境信息处理功能显著高于健康槟榔(JK) (图 10)。进一步对二级功能进行分析，结果表明健康槟榔(JK)与重度发病槟榔(SD)在全局和概述图谱(global and overview maps)、氨基酸代谢(amino acid metabolism)上存在显著差异，在信号传导(signal transduction)上存在极显著差异；轻度发病槟榔(MD)与重度发病槟榔(SD)在信号传导(signal transduction)上存在显著差异，在碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)上存在极显著差异(图 11)。除上述提到的功能外，其他功能均无显著差异。

FunGuild 真菌功能预测结果(图 12)表明，槟榔叶际真菌主要分布于 3 类功能类群，分别

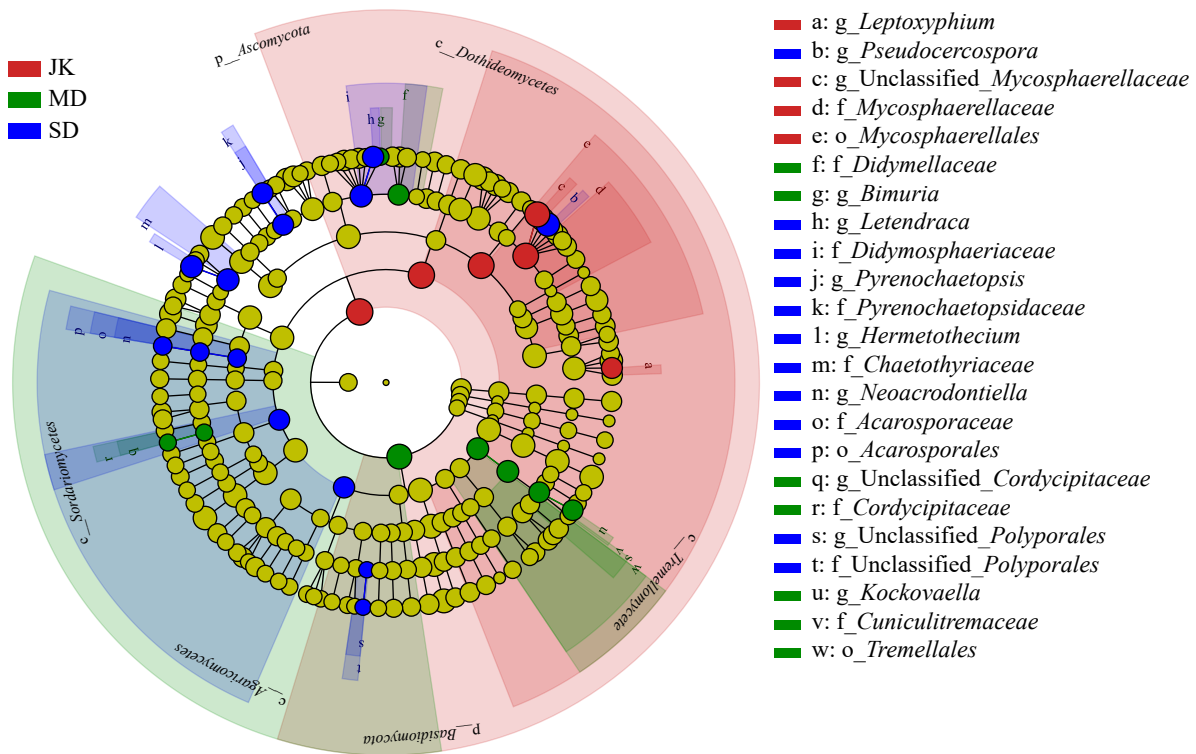


图9 槟榔叶际真菌群落LEfSe分析(LDA>3.5)

Figure 9 LefSe analysis of areca phyllosphere fungal community (LDA>3.5).

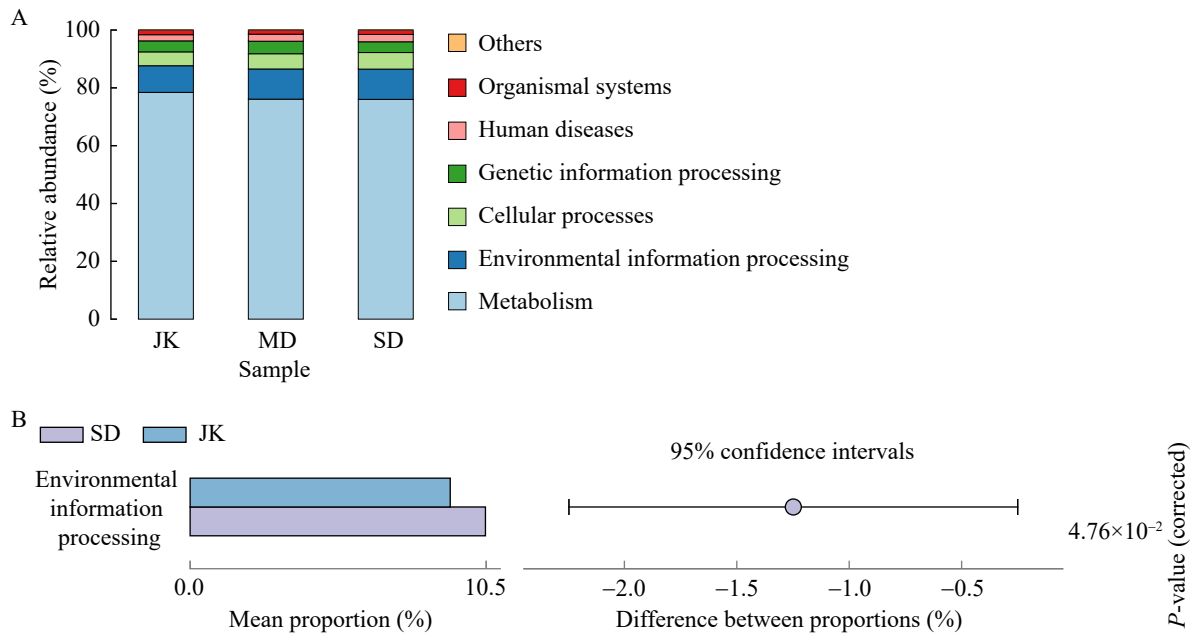


图10 槟榔叶际细菌的KEGG一级功能预测。A: 一级功能组成; B: 一级功能差异(SD和JK)。

Figure 10 KEGG primary functional prediction of areca phyllosphere bacteria. A: Primary functional composition; B: Primary functional differences (SD vs. JK).

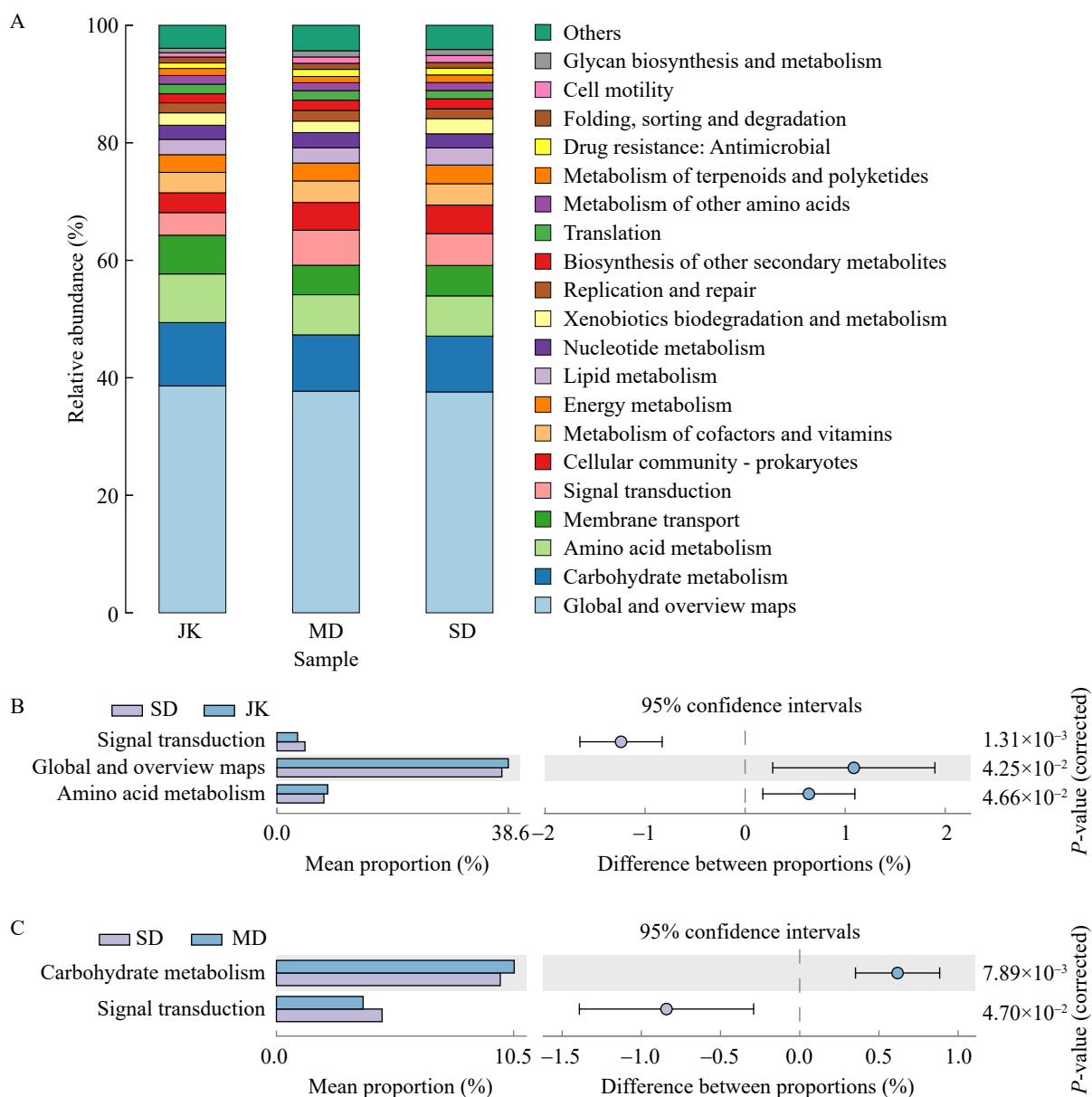


图11 槟榔叶际细菌的KEGG二级功能预测。A：二级功能组成；B：二级功能差异(SD和JK)；C：二级功能差异(SD和MD)。

Figure 11 KEGG secondary functional prediction of areca phyllosphere bacteria. A: Secondary functional composition; B: Secondary functional differences (SD vs. JK); C: Secondary functional differences (SD vs. MD).

为病理营养型(pathotroph) (44.53%–51.02%)、腐生营养型(saprotroph) (45.56%–52.07%)和共生营养型(symbiotroph) (1.18%–3.42%)。其中重度发病槟榔(SD)叶际共生营养型(symbiotroph)的相对丰度极显著高于健康槟榔(JK)，病理营养型

(pathotroph)的相对丰度显著高于轻度发病槟榔(MD)，而腐生营养型(saprotroph)的相对丰度显著低于轻度发病槟榔(MD)。进一步细分为若干 guilds 后，随发病程度的增加，内生菌(endophyte)、地衣寄生菌(lichen parasite)、木质

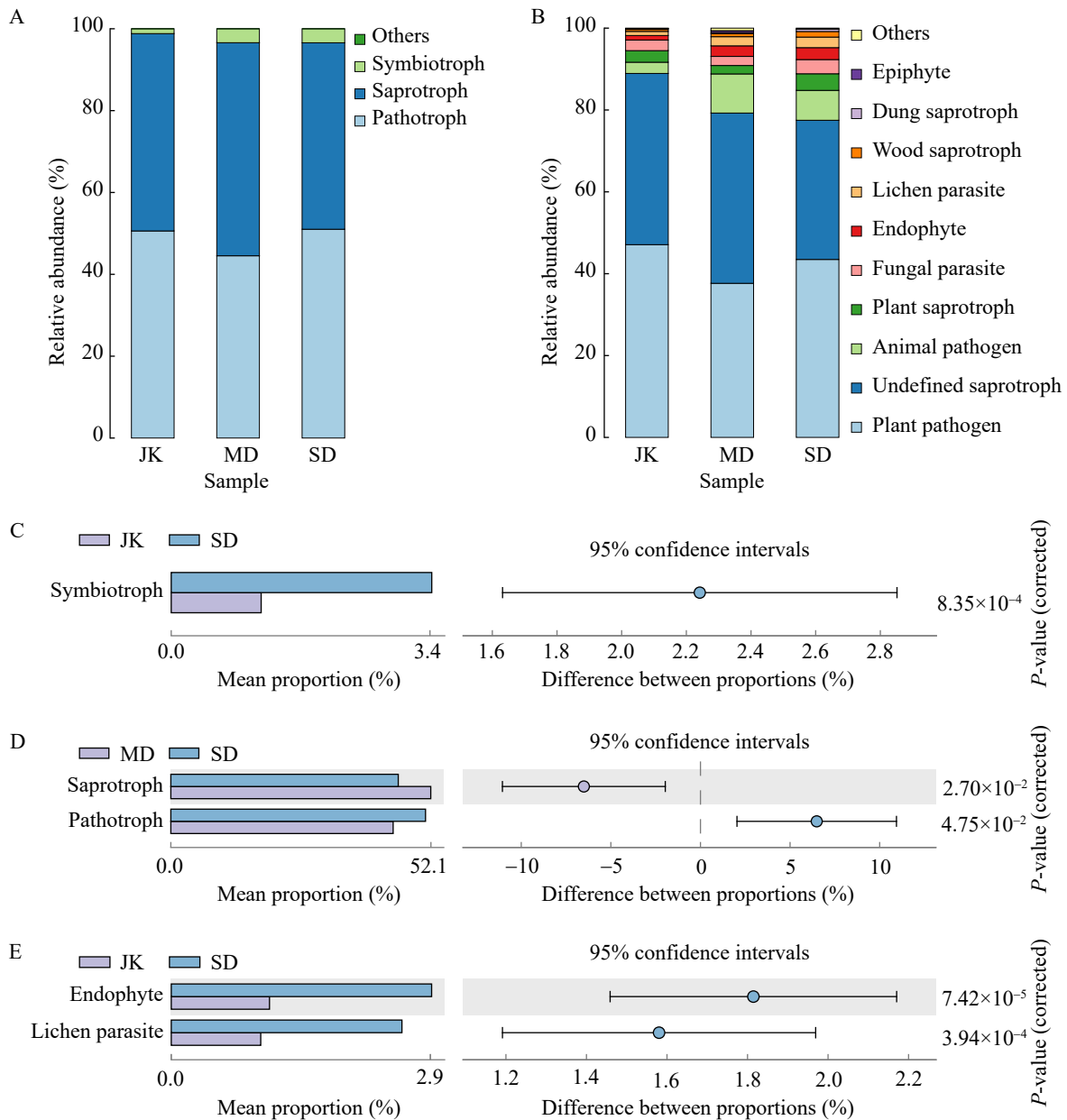


图12 槟榔叶际真菌功能预测。A: Trophic功能组成; B: Guild功能组成; C: Trophic功能差异(JK和SD); D: Trophic功能差异(MD和SD); E: Guild功能差异(JK和SD)。

Figure 12 Functional prediction of areca phyllosphere fungus. A: Trophic functional composition; B: Guild functional composition; C: Trophic functional differences (JK vs. SD); D: Trophic functional differences (MD vs. SD); E: Guild functional differences (JK vs. SD).

腐生菌(wood saprotroph)和排泄物腐生菌(dung saprotroph)的相对丰度逐渐上升。重度发病槟榔(SD)中内生菌(endophyte)和地衣寄生菌(lichen parasite)的相对丰度极显著高于健康槟榔(JK)。

3 讨论

植物叶际中含有大量的微生物, 这些微生物为植物提供了必要的营养物质, 影响植物的

生长发育和代谢活动。叶际微生物可以通过激素刺激或改善营养物质获取直接促进植物生长,也可以通过竞争、拮抗以及诱导植物系统抗性平衡叶际菌群,间接保护宿主抵御病原体的侵染^[21-22]。本研究基于高通量测序技术,从微观层面解析了健康槟榔与感染黄化病槟榔叶际微生物的异同,并揭示了不同发病程度槟榔叶际微生物的群落结构与多样性。由于槟榔黄化病的进程非常缓慢,从感病初期到重病期通常需要几年的时间,研究同一株槟榔不同发病期的叶际微生物差异需耗费大量时间,且田间采样环境等因素难以控制,因此本研究以发病程度的轻重代表发病时期的不同阶段。

相对丰度分析表明,槟榔叶际优势细菌门为放线菌门(*Actinobacteriota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和黏球菌门(*Myxococcota*),优势真菌门为子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*),这与前人对烟草、葡萄、南瓜等叶际微生物的研究结论相似^[23-25]。在槟榔黄化病发生初期,槟榔叶际细菌丰富度逐渐增加,真菌丰富度逐渐下降,细菌和真菌多样性均逐渐增加,且轻度发病槟榔的 Shannon 指数显著高于健康槟榔;当病害发展到后期,叶际微生物丰富度和多样性又逐渐下降。整个发病过程中,叶际细菌和真菌多样性均呈先升后降的趋势,但丰富度的变化却不一致。基于 Bray-Curtis 距离的主坐标分析(PCoA)和 UPGMA 聚类分析表明健康与不同发病程度槟榔叶际微生物存在极显著差异。在门水平上,厚壁菌门(*Firmicutes*)和担子菌门(*Basidiomycota*)与 α 多样性变化趋势一致,随着病情发展在轻度发病槟榔中相对丰度上升至最高,在重度发病槟榔中相对丰度又有所下降。LEfSe 分析也表明轻度发病槟榔的标志物包括厚壁菌门(*Firmicutes*)和担子菌门(*Basidiomycota*)。不同属的相对丰度随病情的发展均发生了不同程度的变化,但由于数据库注释信息有限,仍然有较多的物种未被识

别到。上述结果与 Zhang 等^[26]综合微生物组学和代谢组学研究槟榔叶片褪绿的生理机制有所不同,因其未进行病原检测,不能证实是由 APV1 病毒侵染造成的槟榔黄化病,可能是由于生理性原因导致槟榔植株自身分泌的次生代谢物质发生改变,进而影响了定殖在叶际的微生物群落组成和结构。

研究表明,植物微生物组的变化不仅是植物的被动反应,而是作为共同进化的结果,当植物经历生物或非生物胁迫时,可能会采用“呼救”策略从环境中招募有益的微生物,主动寻求与微生物的合作以缓解胁迫,这种植物与微生物的相互作用被认为是维持植物健康的关键^[27-28]。由此推测在槟榔黄化病发生初期叶际微生物会迅速对 APV1 病毒的入侵作出响应,通过招募大量厚壁菌门(*Firmicutes*)或担子菌门(*Basidiomycota*)的有益微生物定殖来抵抗病原菌。在这个过程中叶际微生物的多样性增加,微生态平衡被破坏,丰富度会出现波动。随着发病程度越来越严重,叶片上有限的营养物质和生存空间不断降低,微生物间的竞争加剧,最终导致微生物丰富度降低。

叶际微生物在定殖积累过程中常发挥自身特定的生理功能,与其群落组成及结构息息相关^[29-30]。本研究中细菌功能预测发现感病槟榔的信号传导功能(signal transduction)大于健康槟榔,且在发病初期达到最大,说明槟榔在发病初期就开始通过多种信号传导通路将细胞外的分子信号传递到细胞内,并引发一系列的生化反应,从而实现细胞对外界病原菌入侵的响应和调节。真菌功能预测发现病理营养型(pathotroph)真菌在轻度发病槟榔中有所下降,在重度发病槟榔中又显著升高;腐生营养型(saprotroph)真菌呈先升后降的趋势,共生营养型(symbiotroph)真菌持续上升,说明病害刚开始发生时死亡的宿主细胞大量增加,通过降解死亡细胞获取营养的腐生营养型(saprotroph)真菌也随之上升。同时,槟榔通过“呼救”策略招募有益

微生物来对抗病原菌,使病理营养型(pathotroph)真菌短暂下降。随着病情进一步发展,后期可能会合并其他病害,导致病理营养型(pathotroph)真菌再次升高。通过与宿主细胞交换资源来获取营养的共生营养型(symbiotroph)真菌也不断上升。

综上所述,槟榔叶际微生物在黄化病发病初期就作出了多种反应来抵抗病原菌的入侵,包括招募有益微生物、调控细胞代谢、引发生化反应、进行自身免疫等,这也说明了防控槟榔黄化病的最佳时期是未发病时至发病前期,通过调节叶际微生物群落的特定组成以拮抗病原体感染可能成为防控槟榔黄化病的新策略。

4 结论

本研究发现由 APV1 病毒引起的槟榔黄化病会影响叶际微生物的组成结构和功能,且健康和不同发病程度槟榔叶际微生物存在极显著差异。槟榔叶际微生物中优势细菌门为放线菌门(*Actinobacteriota*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteriota*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)和黏球菌门(*Myxococcota*),优势真菌门为子囊菌门(*Ascomycota*)和担子菌门(*Basidiomycota*)。随着发病程度的增加,厚壁菌门(*Firmicutes*)和担子菌门(*Basidiomycota*)的相对丰度均呈先升后降的趋势,与 α 多样性变化趋势一致。健康和不同发病程度槟榔叶际均有特定的生物标记物,细菌和真菌功能也发生了不同程度的变化。进一步说明了槟榔叶际可以通过招募有益微生物来抵抗病原菌的侵染,为槟榔黄化病的防控提供了新思路。

作者贡献声明

马瑞:数据分析与可视化呈现、论文撰写和修改;王贞霖:样品采集与实验操作、数据收集和处理、写作初稿与修改;芮凯:调查研究、提供资源、指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] SRINIVASA RAO NK, SHIVASHANKARA KS, LAXMAN RH. Abiotic Stress Physiology of Horticultural Crops[M]. New Delhi: Springer India, 2016.
- [2] 李小婷, 庞玉新, 杨全, 王丹, 范佐旺, 马青松. 四大南药资源开发利用现状分析[J]. 中国现代中药, 2015, 17(2): 99-104.
LI XT, PANG YX, YANG Q, WANG D, FAN ZW, MA QS. Analysis on the resources and current situation of exploitation and utilization of four Southern herbal medicines[J]. Modern Chinese Medicine, 2015, 17(2): 99-104 (in Chinese).
- [3] PENG W, LIU YJ, WU N, SUN T, HE XY, GAO YX, WU CJ. *Areca catechu* L. (Arecaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2015, 164: 340-356.
- [4] SAHOO AK, DANDAPAT J, DASH UC, KANHAR S. Features and outcomes of drugs for combination therapy as multi-targets strategy to combat Alzheimer's disease[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2018, 215: 42-73.
- [5] CHEN XX, HE YZ, DENG YR. Chemical composition, pharmacological, and toxicological effects of betel nut[J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2021, 2021: 1808081.
- [6] 杨连珍, 刘小香, 李增平. 世界槟榔生产现状及生产技术研究[J]. 世界农业, 2018(7): 121-128.
YANG LZ, LIU XX, LI ZP. Production and planting techniques of areca nut[J]. World Agriculture, 2018(7): 121-128 (in Chinese).
- [7] 芮凯, 吕朝军, 吴朝波, 李培征. 槟榔主要有害生物绿色防控[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021.
RUI K, LÜ CJ, WU CB, LI PZ. Green Prevention and Control of Mainly Harmful Organisms on Areca[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2021 (in Chinese).
- [8] 王洪星. 海南槟榔黄化相关病原筛选鉴定研究[D]. 海口: 海南大学博士学位论文, 2020.
WANG HX. Screening and identification of the casual pathogen causing leaf yellowing disease of *Areca catechu* in Hainan[D]. Haikou: Doctoral Dissertation of Hainan University, 2020 (in Chinese).
- [9] WANG HX, ZHAO RB, ZHANG HW, CAO XM, LI ZT, ZHANG Z, ZHAI JL, HUANG X. Prevalence of yellow leaf disease (YLD) and its associated areca palm velarivirus 1 (APV1) in betel palm (*Areca catechu*) plantations in Hainan, China[J]. Plant Disease, 2020, 104(10): 2556-2562.
- [10] 张丛, 翟金玲. 槟榔苗对 APV1 病毒的生理响应[J]. 分子植物育种, 2023, 21(19): 6516-6522.

- ZHANG C, ZHAI JL. Physiological response of *Areca catechu* seedlings to APV1 virus[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(19): 6516-6522 (in Chinese).
- [11] SOHRABI R, PAASCH BC, LIBER JA, HE SY. Phyllosphere microbiome[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2023, 74: 539-568.
- [12] HAWKES CV, KJØLLER R, RAAIJMAKERS JM, RIBER L, CHRISTENSEN S, RASMUSSEN S, CHRISTENSEN JH, DAHL AB, WESTERGAARD JC, NIELSEN M, BROWN-GUEDIRA G, HESTBJERG HANSEN L. Extension of plant phenotypes by the foliar microbiome[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2021, 72: 823-846.
- [13] LIU HW, BRETTELL LE, SINGH B. Linking the phyllosphere microbiome to plant health[J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(9): 841-844.
- [14] VOGEL CM, POTTHOFF DB, SCHÄFER M, BARANDUN N, VORHOLT JA. Protective role of the *Arabidopsis* leaf microbiota against a bacterial pathogen[J]. *Nature Microbiology*, 2021, 6(12): 1537-1548.
- [15] MA AZ, LV D, ZHUANG XL, ZHUANG GQ. Quorum quenching in culturable phyllosphere bacteria from tobacco[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(7): 14607-14619.
- [16] BERG M, KOSKELLA B. Nutrient- and dose-dependent microbiome-mediated protection against a plant pathogen[J]. *Current Biology*, 2018, 28(15): 2487-2492.e3.
- [17] 张怀文, 赵雪, 王颖, 王洪星, 黄惜. 应用免疫捕获 RT-PCR 检测槟榔 APV1 病毒[J]. *分子植物育种*, 2023, 21(15): 5037-5042.
- ZHANG HW, ZHAO X, WANG H, WANG HX, HUANG X. Detection of APV1(areca palm velarivirus 1) using immunocapture RT-PCR[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2023, 21(15): 5037-5042 (in Chinese).
- [18] 徐芮, 马瑞, 芮凯, 王贞霖, 杨顺义, 王宝. 槟榔叶表微生物富集及基因组 DNA 提取方法优化[J/OL]. *分子植物育种*, 2024: 1-14. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240226.1237.006.html>.
- XU R, MA R, RUI K, WANG ZL, YANG SY, WANG B. Microbial enrichment on areca leaf surface and optimization of DNA extraction method[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2024: 1-14. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240226.1237.006.html> (in Chinese).
- [19] 王贞霖, 马瑞, 徐芮, 杨顺义, 芮凯. 槟榔叶表微生物前处理方式对基因组 DNA 提取效果的影响[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(13): 4341-4346.
- WANG ZL, MA R, XU R, YANG SY, RUI K. Effects of genomic DNA extraction on microbial pretreatment from *Areca* leaf[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(13): 4341-4346 (in Chinese).
- [20] 马瑞, 王贞霖, 芮凯, 徐芮, 白蓓蓓, 杨顺义. 槟榔叶表微生物基因组 DNA 提取方法的比较[J]. *分子植物育种*, 2024, 22(23): 7744-7749.
- MA R, WANG ZL, RUI K, XU R, BAI BB, YANG SY. Comparison of microbial genomic DNA extraction methods from *Areca catechu* leaf surface[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(23): 7744-7749 (in Chinese).
- [21] 杨宽, 王慧玲, 叶坤浩, 王佩, 孟广云, 罗成, 郭力维. 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.
- YANG K, WANG HL, YE KH, WANG P, MENG GY, LUO C, GUO LW. Advances in research on phyllosphere microorganisms and their interaction with plants[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2021, 36(1): 155-164 (in Chinese).
- [22] 刘宇星, 董醇波, 邵秋雨, 张芝元, 韩燕峰, 梁宗琦. 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.
- LIU YX, DONG CB, SHAO QY, ZHANG ZY, HAN YF, LIANG ZQ. Advances on phyllosphere microorganisms and their association with plant health[J]. *Journal of Microbiology*, 2022, 42(2): 88-98 (in Chinese).
- [23] 郭涛, 汪汉成, 余知和, 蔡刘体, 王丰, 陈兴江. 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.
- GUO T, WANG HC, YU ZH, CAI LT, WANG F, CHEN XJ. Microbial community structure and diversity of leaf phyllosphere in tobacco plants infected with wildfire disease[J]. *Guihaia*, 2024, 44(10): 1894-1904 (in Chinese).
- [24] 何涛, 杜鸿燕, 孙家秀, 陈吉越, 邓维萍, 朱书生, 何霞红, 杜飞. 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.
- HE T, DU HY, SUN JX, CHEN JY, DENG WP, ZHU SS, HE XH, DU F. Effects of dimethomorph on the microflora of grape leaf[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2022, 52(3): 443-458 (in Chinese).
- [25] 罗路云, 张卓, 金德才, 谭新球, 张德咏, 田云, 卢向阳, 刘勇. 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.
- LUO LY, ZHANG Z, JIN DC, TAN XQ, ZHANG DY, TIAN Y, LU XY, LIU Y. Phyllosphere bacterial diversities and community structures on pumpkin with different severities of powdery mildew[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2017, 47(5): 688-695 (in Chinese).
- [26] ZHANG L, YIN XJ, ZHANG JC, WEI YX, HUO DX, MA CC, CHANG HB, CAI K, SHI HT. Comprehensive microbiome and metabolome analyses reveal the physiological mechanism of chlorotic *Areca* leaves[J]. *Tree Physiology*, 2021, 41(1): 147-161.
- [27] LI PD, ZHU ZR, ZHANG YZ, XU JP, WANG HK, WANG ZY, LI HY. The phyllosphere microbiome shifts toward combating melanose pathogen[J]. *Microbiome*, 2022, 10(1): 56.
- [28] LIU HW, BRETTELL LE, QIU ZG, SINGH BK. Microbiome-mediated stress resistance in plants[J]. *Trends in Plant Science*, 2020, 25(8): 733-743.
- [29] GONG TY, XIN XF. Phyllosphere microbiota: community dynamics and its interaction with plant hosts[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(2): 297-304.
- [30] ZHU YG, XIONG C, WEI Z, CHEN QL, MA B, ZHOU SYD, TAN JQ, ZHANG LM, CUI HL, DUAN GL. Impacts of global change on the phyllosphere microbiome[J]. *New Phytologist*, 2022, 234(6): 1977-1986.