



云南两个花魔芋主产区软腐病害植株腐烂球茎中的菌群组成及特征

张绍智¹, 田庆红², 董坤³, 杨丽萍⁴, 殷减清^{3*}, 张仲凯^{1*}

- 1 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南 昆明 650205
- 2 永平县科技统计和成果转化中心, 云南 永平 672600
- 3 云南省农业科学院富源魔芋研究所, 云南 富源 655500
- 4 云南海洋农业开发有限公司, 云南 永平 672600

张绍智, 田庆红, 董坤, 杨丽萍, 殷减清, 张仲凯. 云南两个花魔芋主产区软腐病害植株腐烂球茎中的菌群组成及特征[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2434-2452.

ZHANG Shaozhi, TIAN Qinghong, DONG Kun, YANG Liping, YIN Jianqing, ZHANG Zhongkai. Composition and characteristics of microflora in the corm of *Amorphophallus konjac* K. Koch infected by soft rot in two main konjac production areas in Yunnan[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2434-2452.

摘要:【目的】软腐病是侵染魔芋的主要病害, 其危害性严重, 广泛传播会导致花魔芋绝产, 尚无有效防控措施。魔芋软腐病的发生及爆发性传播与病原菌及其菌群有较大相关性。本研究旨在明确云南 2 个主产区的软腐病害花魔芋球茎及其根际土壤中的主要致病菌和优势微生物种类, 分析其菌群结构特征, 从而为花魔芋软腐病害的防控提供支撑。【方法】研究采集云南富源和永平 2 个产区的花魔芋软腐病样品, 应用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行微生物宏基因组测序和分析。同时采用选择性培养基、多级纯化培养技术以及电镜超微形态解析, 分别对病害腐烂球茎中的致病菌及优势菌类进行分离鉴定和观察验证。【结果】两个花魔芋主产区软腐病害植株球茎及土壤中的微生物都非常丰富, 共检出 107 门 2 502 属 15 721 种微生物。这 2 个产区的花魔芋软腐病害主要致病菌均为胡萝卜软腐坚固杆菌(*Pectobacterium carotovorum*), 此病原菌与嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)的优势生长是 2 个产区软腐病害植株腐烂球茎中菌群的主要特征。此外, 同产区的病害组织与土壤样品之间的菌群组成差异较大, 但这 2 类样品中的优势菌群组成的

资助项目: 曲靖市张仲凯专家工作站; 大理州张仲凯专家工作站; 共建中老特色农林作物种质资源联合实验室 (202103AF140003)

This work was supported by the Expert Workstation of ZHANG Zhongkai in Qujing, the Expert Workstation of ZHANG Zhongkai in Dali, and the Joint Construction of United Laboratory of Chinese and Laos for the Germplasm Resources of Characteristic Agricultural and Forestry Crops (202103AF140003).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Zhongkai, zhongkai99@sina.com; YIN Jianqing, Yjq008@126.com

Received: 2023-12-17; Accepted: 2024-04-07; Published online: 2024-04-10

区域性差异较小。【结论】两个花魔芋主产区软腐病害球茎组织中菌群与该区土壤菌群的相关性较低, 土壤菌群区域性差异比相应的病害组织菌群区域性差异要大。因此, 主要病原菌和共生菌的优势生长突破了产地差异影响, 成为了病害组织菌群的主要特征, 使得2个主产区软腐病害花魔芋球茎中的微生物生态系统具有高度相似性。

关键词: 花魔芋; 宏基因组; 软腐病; 病原菌; 微生物群落

Composition and characteristics of microflora in the corm of *Amorphophallus konjac* K. Koch infected by soft rot in two main konjac production areas in Yunnan

ZHANG Shaozhi¹, TIAN Qinghong², DONG Kun³, YANG Liping⁴, YIN Jianqing^{3*}, ZHANG Zhongkai^{1*}

1 Biotechnology and Germplasm Resources Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan, China

2 Yongping Center of Statistics and Achievements Commercialization of Science and Technology, Yongping 672600, Yunnan, China

3 Fuyuan Research Institute of Konjac, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Fuyuan 655500, Yunnan, China

4 Yunnan Haiping Agricultural Development Co., Ltd., Yongping 672600, Yunnan, China

Abstract: [Objective] Soft rot is the main disease of *Amorphophallus konjac* K. Koch in konjac production areas. Crop failure can be caused by the wide spreading of soft rot, because the serious destructiveness of the disease can not be effectively prevented and controlled at present. The occurrence and explosive spreading of soft rot are closely related to the microflora and pathogenic bacteria in konjac. This study explored the main pathogenic bacteria and dominant microbial species in rotten corms and rhizosphere soil, and analyzed the structural characteristics of microflora in the samples infected by soft rot in two main konjac production areas of Yunnan, aiming to provide theoretical support for the prevention and control of soft rot in konjac production. **[Methods]** The konjac samples infected by soft rot were collected from Fuyuan and Yongping in Yunnan. The Illumina NovaSeq 6000 platform was used for metagenomic sequencing, and the sequencing data were analyzed. Meanwhile, the pathogenic bacteria and dominant microorganisms in the rotten corms were isolated by multistage purification using selective medium, and observed by an electron microscope. **[Results]** Large quantities of microorganisms were detected in the rotten corms of diseased konjac from the two main production areas, including 15 721 species that belonging to 2 502 genera of 107 phyla. *Pectobacterium carotovorum* was the main pathogen in all of the diseased samples infected by soft rot. The main characteristic feature of microflora in rotten corms was that the abundances of pathogen and *Stenotrophomonas maltophilia* were higher than all the other microorganisms. The composition of microflora present great differences between diseased tissue samples and

soil samples, in the same production area, whereas, the microflora composition in the diseased tissue samples or soil samples had slight differences between the two production areas. **[Conclusion]** The microflora composition showed low correlations between the diseased corm and rhizosphere soil, in the two production areas. The regional difference of microflora in soil was larger than that in the diseased tissue. The results showed that the dominant pathogens and saprophytes played a key role in forming the microflora structure by breaking through the regional impact, and resulted in the microbial ecosystems in the konjac corms infected by soft rot were highly similar in two main production areas.

Keywords: *Amorphophallus konjac* K. Koch; metagenomes; soft rot; pathogenic bacteria; microflora

花魔芋(*Amorphophallus konjac* K. Koch)是天南星科魔芋属中一种重要经济作物,在我国云南及周边省区大面积种植^[1]。花魔芋属于稀有的葡甘露聚糖高产植物,其成熟球茎中含有丰富的葡甘露聚糖。以葡甘露聚糖为主要成分的花魔芋凝胶具有良好的胶凝性、增稠作用和成膜效果,已被有效应用于食品、医药、生物技术以及材料科学领域^[2-3]。然而,花魔芋在种植过程中非常容易感染软腐病。软腐病传播速度快且致病性强,侵染形成后会导致魔芋球茎和叶柄在短期内严重腐烂,爆发性传播可使花魔芋感染率达到80%以上,甚至造成绝收,严重制约了云南花魔芋种植生产和产业化发展^[4-5]。

花魔芋软腐病主要致病菌是坚固杆菌属(*Pectobacterium*)细菌^[6]。目前已报道引起魔芋软腐病害的坚固杆菌主要种类有胡萝卜软腐坚固杆菌胡萝卜软腐病亚种(*P. carotovorum*, Pc)、黑腐坚固杆菌(*P. atrosepticum*)、菊花迪克氏菌(*Dickeya chrysanthemi*)及天南星坚固杆菌(*P. aroidearum*)^[7-9]。此外,还有研究报道了镰孢菌属(*Fusarium*)真菌在早期与Pc复合侵染魔芋球茎时共同引发软腐病害^[9]。除了主要致病菌,魔芋腐烂球茎中还存在种类繁多的共生微生物。共生菌是腐烂球茎中重要的环境微生物,它们与病原菌在病害组织中组成一个庞大的微

生物群落,对魔芋软腐病害的发生、传播和破坏力有着重要的影响。致病菌能够通过水流在土壤中产生小范围的区域性扩散和传播,而携带致病菌的种球或病害种球的长距离运输是魔芋软腐病的另一重要传播途径^[10]。尽管长距离传播使得我国西南多省区花魔芋软腐病致病菌的种类较为相似,但云南地理气候条件多样化,东部土地地质特点及环境条件与西部差异大,土壤微生物群落组成也不尽相同,魔芋软腐病害的发生和流行可能随之存在差异。

研究不同产区花魔芋软腐病致病菌的种类,探索潜在的未知病原菌,分析不同产区病害组织中微生物群落组成的差异,以及发掘病原菌的拮抗微生物对花魔芋种植生产和软腐病害的防控有着重要意义。然而,采用常规的方法研究魔芋软腐病致病菌及相关菌群组成存在主观选择性强,分辨水平低,分析种类和数量有限,容易造成遗漏等难题^[11]。基于高通量测序的宏基因组分析方法,通过直接提取病害样本中整个微生物群的总DNA进行测序分析,具有测序通量高、物种信息量大、实验速度快等特点^[12]。研究报道了采用宏基因组高通量测序技术研究魔芋种植生产相关微生物群落的结果:首先是采用宏基因组高通量测序分析揭示了软腐病害的发生提高了魔芋植株根系细菌群

落的丰度和 α 多样性, 以及丰富了根系菌群的组成^[13]; 其次是采用宏基因组高通量测序技术解析了魔芋种子成熟过程中其内生细菌群落组成和多样性的动态变化^[14]; 研究利用宏基因组高通量测序技术证明了增加施用生物肥并降低化学肥料使用量可以提高魔芋根际土壤细菌多样性, 降低有害真菌丰度, 促进魔芋根际土壤向“细菌型”高肥转化, 从而有效提高魔芋产量^[15]。因此, 应用宏基因组高通量测序技术能够获取病害组织中更为完整和丰富的微生物种类信息, 进行更加精准的病原菌发现和益生菌探索, 以及反映样品中微生物群落的整体特征。

本研究采用宏基因组测序分析技术, 从物种注释、丰度比较、多样性评估、菌群组成分析等方面深入解析云南省 2 个魔芋主产区(东部的富源县和西部的永平县)软腐病害花魔芋球茎及其根际土壤中微生物种类多样性、分布特点、群落结构特征和区域性差异, 为魔芋软腐

病菌拮抗微生物探索以及病害生防技术开发积累基础。

1 材料与方法

1.1 样品采集

本研究中的软腐病害花魔芋球茎以及相应根际土壤样品, 分别在 2022 年 10 月采集于云南省曲靖市富源县云南省农业科学院富源魔芋研究所示范种植基地以及大理州永平县云南海萍农业开发有限公司生产种植基地。样品详细信息见表 1。

1.2 样品预处理

取 50 g 软腐病害腐烂球茎组织, 用无菌水充分悬浮其中的微生物, 用 100 目尼龙网过滤悬浮液, 去除魔芋组织残渣。滤液在室温条件下 $8\,000\times g$ 离心 10 min, 得到腐烂组织中的总微生物沉淀物。针对土壤样品, 用无菌水将 50 g 土壤充分悬浮, 将悬浮液自然沉淀 1 min, 去除

表 1 软腐病害花魔芋球茎组织和根际土壤样品信息表

Table 1 Information of the samples of konjac corm infected by soft rot and corresponding rhizosphere soil

Sample names	Sample descriptions	Locations of sample	Sampling time
Ct.T.F	Control group of corm	Fuyuan	October 2022
Ct.S.F	Control group of rhizosphere soil	Fuyuan	October 2022
B.T1.F	Rotten corm	Fuyuan	October 2022
B.T2.F	Rotten corm	Fuyuan	October 2022
B.S1.F	Rhizosphere soil of rotten corm	Fuyuan	October 2022
B.S2.F	Rhizosphere soil of rotten corm	Fuyuan	October 2022
Ct.T.Y	Control group of corm	Yongping	October 2022
Ct.S1.Y	Control group of rhizosphere soil	Yongping	October 2022
Ct.S2.Y	Control group of rhizosphere soil	Yongping	October 2022
B.TO1.Y	Surface tissue of rotten corm	Yongping	October 2022
B.TO2.Y	Surface tissue of rotten corm	Yongping	October 2022
B.TO3.Y	Surface tissue of rotten corm	Yongping	October 2022
B.TI1.Y	Interior tissue of rotten corm	Yongping	October 2022
B.TI2.Y	Interior tissue of rotten corm	Yongping	October 2022
B.TI3.Y	Interior tissue of rotten corm	Yongping	October 2022
B.S1.Y	Rhizosphere soil of rotten corm	Yongping	October 2022
B.S2.Y	Rhizosphere soil of rotten corm	Yongping	October 2022
B.S3.Y	Rhizosphere soil of rotten corm	Yongping	October 2022

大部分密度较高的泥沙,再用 100 目尼龙网过滤悬浮液去除大颗粒植物残渣,最后采用以上相同条件离心,得到土壤样品中的总微生物沉淀物。

1.3 总 DNA 提取

参照微生物基因组 DNA 原位提取技术^[11,16],采用 Omega Bio-tek 公司的 E.Z.N.A[®] Mag-Bind Soil DNA Kit,按照试剂盒使用说明书对总微生物分离物进行总 DNA 提取。分别用核酸蛋白浓度快速测定仪和 1%琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 的浓度和完整性。

1.4 DNA 片段化及测序文库构建

采用 ThermoFisher Scientific 公司的 Qubit[™] dsDNA HS Assay Kit 精确定量微生物基因组浓度。用 Covaris 超声波 DNA 破碎仪片段化总基因组 DNA。用上海翊圣生物科技有限公司 DNA 片段浓缩回收分选磁珠(Hieff NGS[®] DNA Selection Beads)浓缩、回收和纯化片段化后的 DNA、DNA 连接产物以及文库扩增产物。用 New England Biolabs 公司的 NEBNext[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit for Illumina[®] 构建测序文库。最后分别采用核酸蛋白浓度快速测定仪和 2%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度和文库大小。

1.5 高通量测序及数据处理分析

微生物宏基因组 DNA 文库的高通量测序由生工生物工程(上海)股份有限公司采用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台完成。针对测序数据结果,分别依次采用 FastQC、Trimmomatic、IDBA-UD、Prodigal 及 CD-HIT 软件对测序数据进行质量评估、净化处理、拼接组装、开放阅读框(open reading frame, ORF)预测和去冗余。用 Bowtie 2 和 SAM tools 软件分析基因丰度信息。再用 Diamond 软件将基因集非冗余蛋白序列与 NCBI 数据库中的微生物源蛋白序列进行同源性对比分析。从而获得物种分类注释

信息及相对丰度。

1.6 微生物分离和鉴定

1.6.1 分离纯化培养

将健康花魔芋球茎组织切成小方块(3 cm×3 cm×3 cm),在超净台洁净条件下用乙醇浸泡消毒 5 min,用无菌水洗 5 次(最后一次浸泡 1 h),然后将消毒球茎块取出置于灭菌小烧杯中。取少量软腐病害花魔芋球茎内部腐烂组织,涂到消毒球茎小块上表面,用灭菌膜封口,28 °C条件下培养 3–5 d,进行致腐微生物的初级筛选培养。当消毒球茎小块发生软化腐烂时,取少量内部腐烂组织,放入 2 mL 离心管中,加 5 倍体积无菌水后适当振荡,充分悬浮组织中的微生物。吸取 10 μL 悬浮液涂布到 PDA 平板上,28 °C条件下培养至有菌落长出。根据长出菌落的大小、色泽和形态,挑取单菌落进行悬浮稀释,并继续在 PDA 平板上划线培养。重复挑取单菌落稀释划线培养,直至初步确认得到单一菌株。最后挑取纯化好的单菌落,用液体 PDA 培养基进行摇瓶培养,当菌液浓度达到 OD_{600} 值大于 2 时进行后续实验。

1.6.2 物种鉴定

采用 CTAB 法^[9]提取所分离纯化到菌株的总 DNA,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性。以总 DNA 为模板,采用正向引物 27F (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3')和反向引物 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')对细菌 16S rRNA 基因的全长 DNA 序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25.00 μL): *Taq* PCR Master Mix (2×, Blue Dye) 12.50 μL, 27F 和 1492R 引物(10 μmol/L)各 1.00 μL, DNA 模板 0.50 μL, ddH₂O 10.00 μL。PCR 反应条件: 94 °C预变性 3 min; 94 °C变性 45 s, 55–62 °C退火 45 s, 72 °C延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C终延伸 10 min。

DNA 产物序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。最后采用 NCBI 在线分析工具 BLAST 对所测定的 16S rRNA 基因进行比对分析和同源性检索, 从而获取所分离到菌株的准确物种分类信息。

1.7 微生物超微形态电镜解析

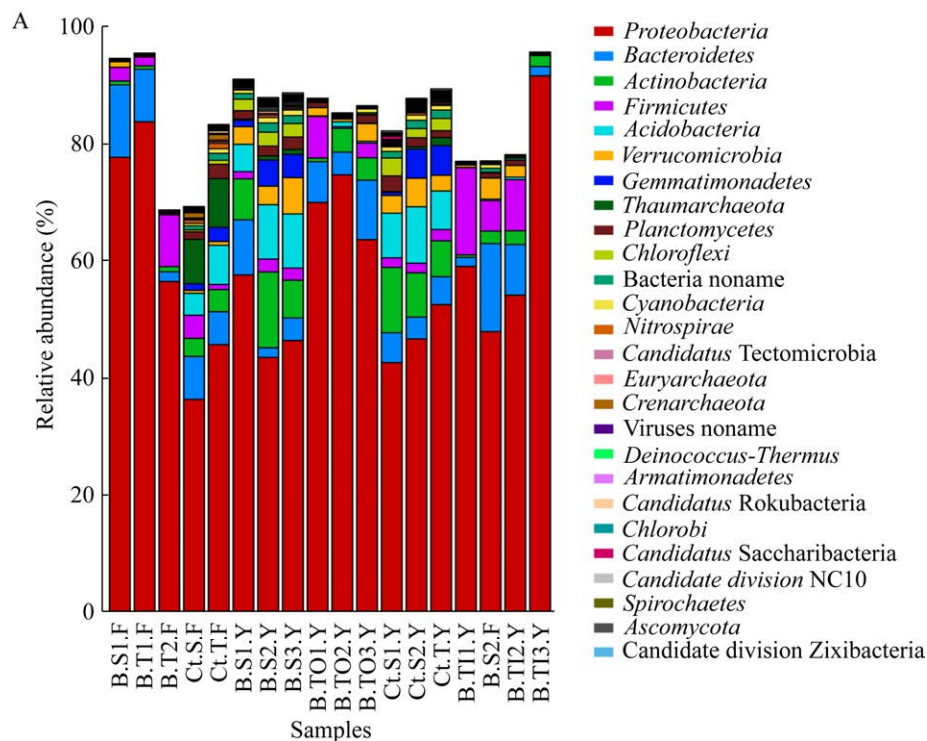
取少量魔芋腐烂球茎组织或菌落, 采用常规方法进行固定、漂洗、脱水、干燥和喷金, 然后用扫描电镜(HITACHI 公司)进行观察解析。针对采用透射电镜观察的样品, 继扫描电镜制样过程中的脱水步骤之后, 用常规方法进行样品渗透、包埋、聚合、切片和染色^[17], 再用透射电镜(FEI 公司)进行观察解析。

2 结果与分析

2.1 不同分类水平微生物群落的分布、多样性及丰度

采用宏基因组测序从 2 个主产区软腐病害

花魔芋球茎及根际土壤中检测到的微生物多达 107 门 199 纲 381 目 750 科 2 502 属。如图 1 所示, 2 个产区各类型样品中的微生物组成在门、纲和目 3 个分类水平上具有较高相似度。变形菌门(*Proteobacteria*)是门分类水平丰度最高的微生物, 占比在 36.30%–91.70%之间。拟杆菌门(*Bacteroidetes*)是分布范围和丰度仅次于变形菌门的第二大菌门(图 1A)。伽玛变形菌纲(*Gammaproteobacteria*)、阿尔法变形菌纲(*Alphaproteobacteria*)及贝塔变形菌纲(*Betaproteobacteria*)是纲分类水平丰度较为显著的主要三大纲微生物, 它们的生物量总丰度占比高达 50.00%–90.00% (图 1B)。从目分类水平开始, 样品中的微生物分布差异开始变大, 较显著的特征为伯克霍尔德氏菌目(*Burkholderiales*)大量分布于所有样品中。肠杆菌目(*Enterobacterales*)、根瘤菌目(*Rhizobiales*)和黄单胞菌目(*Xanthomonadales*)是分布于大部分



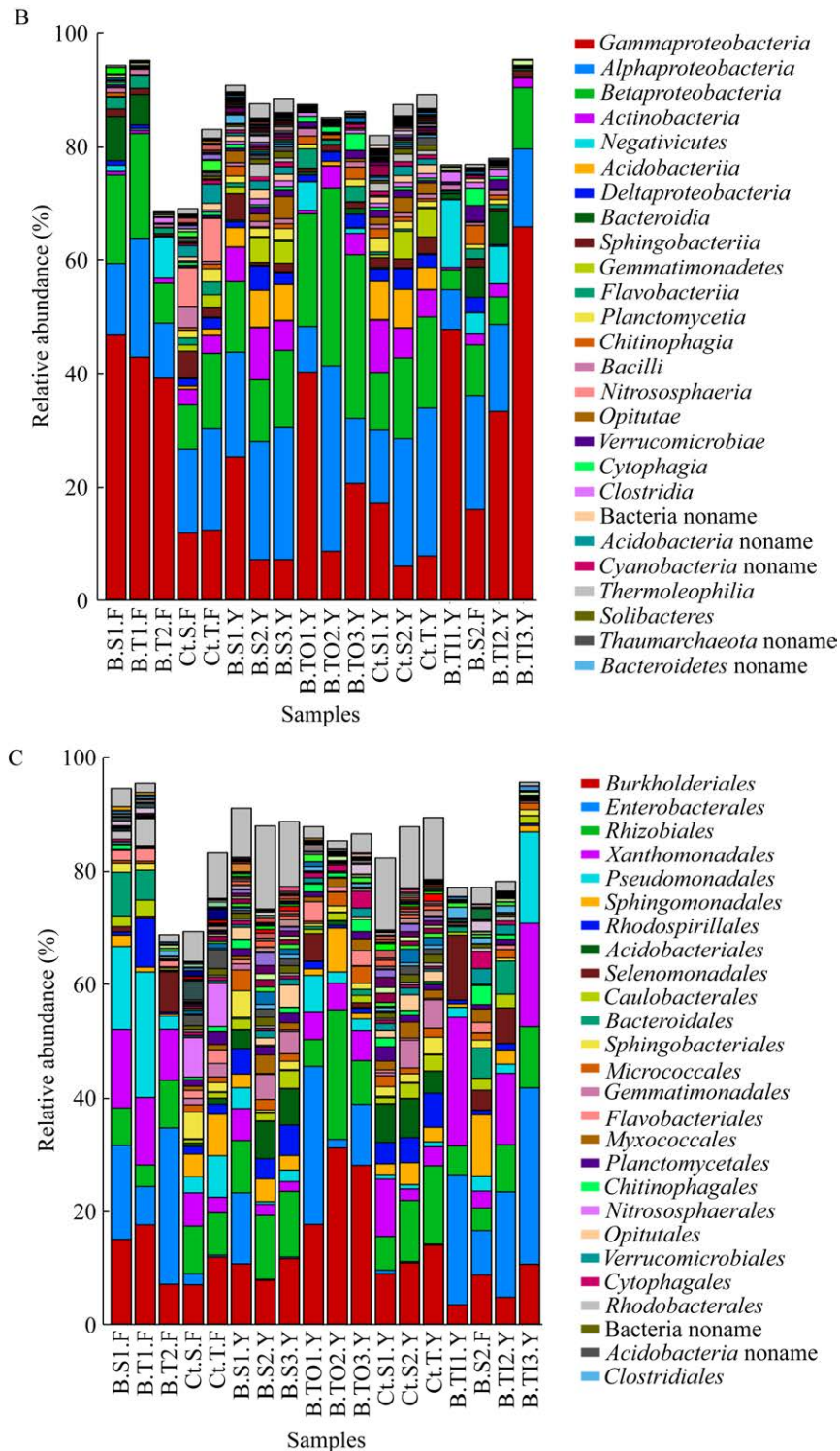


图 1 样品中微生物群丰度比较分析 A: 门分类水平. B: 纲分类水平. C: 目分类水平

Figure 1 Comparative analysis for the abundance of microflora in samples. A: Phylum level. B: Class level. C: Order level.

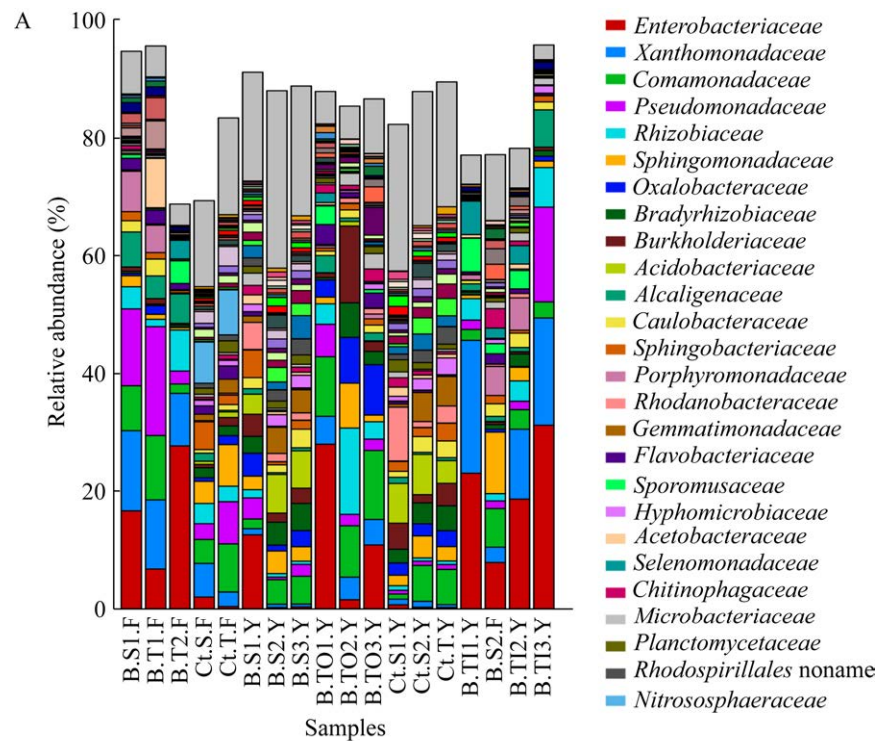
样品中且丰度较高的菌目。此外, 另一个差异较明显的微生物分布特点是假单胞菌目 (*Pseudomonadales*) 大量存在于少数病害球茎及其土壤样品中(图 1C)。

不同产区的病害球茎及其土壤样品中菌群组成和丰度在科、属和种分类水平的差异逐级变得更显著(图 2)。肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 是分布最广且丰度最高的菌群, 黄单胞菌科 (*Xanthomonadaceae*) 和丛毛单胞菌科 (*Comamonadaceae*) 次之。其他科微生物在大部分样品中分布不均且丰度相对较低, 无明显的规律和特征(图 2A)。在属分类水平, 坚固杆菌属、寡养单胞菌属 (*Stenotrophomonas*) 及假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 微生物在病害魔芋腐烂球茎及少数根系土壤中分布量较大, 丰度分别高达 20.70%、19.50% 和 18.20%。此外, 在腐烂组织中分布显著的菌群还有假双斧状菌属 (*Pseudolabrys*)、营发酵单胞菌属 (*Dysgonomonas*)、

土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、酸杆菌属 (*Acidobacterium*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 等。*Gemmatirosa*、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomona*) 和慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 则在根际土壤中分布量较大(图 2B)。

2.2 主要微生物种类及致病菌

宏基因组测序从 2 个主产区的软腐病害花魔芋球茎组织中检测到的微生物种类多达 15 721 种。病害组织菌群最为显著的特征为 Pc 是所有样品中分布量最高的菌株, 其在腐烂球茎样品 (B.TI3.Y) 中的丰度高达 19.28%, 同时也大量存在于少数根际土壤 (B.S1.F 和 B.S1.Y) 中, 属于生物量最大的优势菌(图 2C、图 3)。许多研究报道 Pc 是多种魔芋软腐病害的主要致病菌之一^[7-9]。本研究在花魔芋腐烂球茎组织中还检测到了其他种坚固杆菌, 包括黑腐坚固杆菌、天南星坚固杆菌、微管束坚固杆菌 (*P. betavasculorum*) 以及山嵛菜坚固杆菌 (*P. wasabiae*)。然而, 这些坚



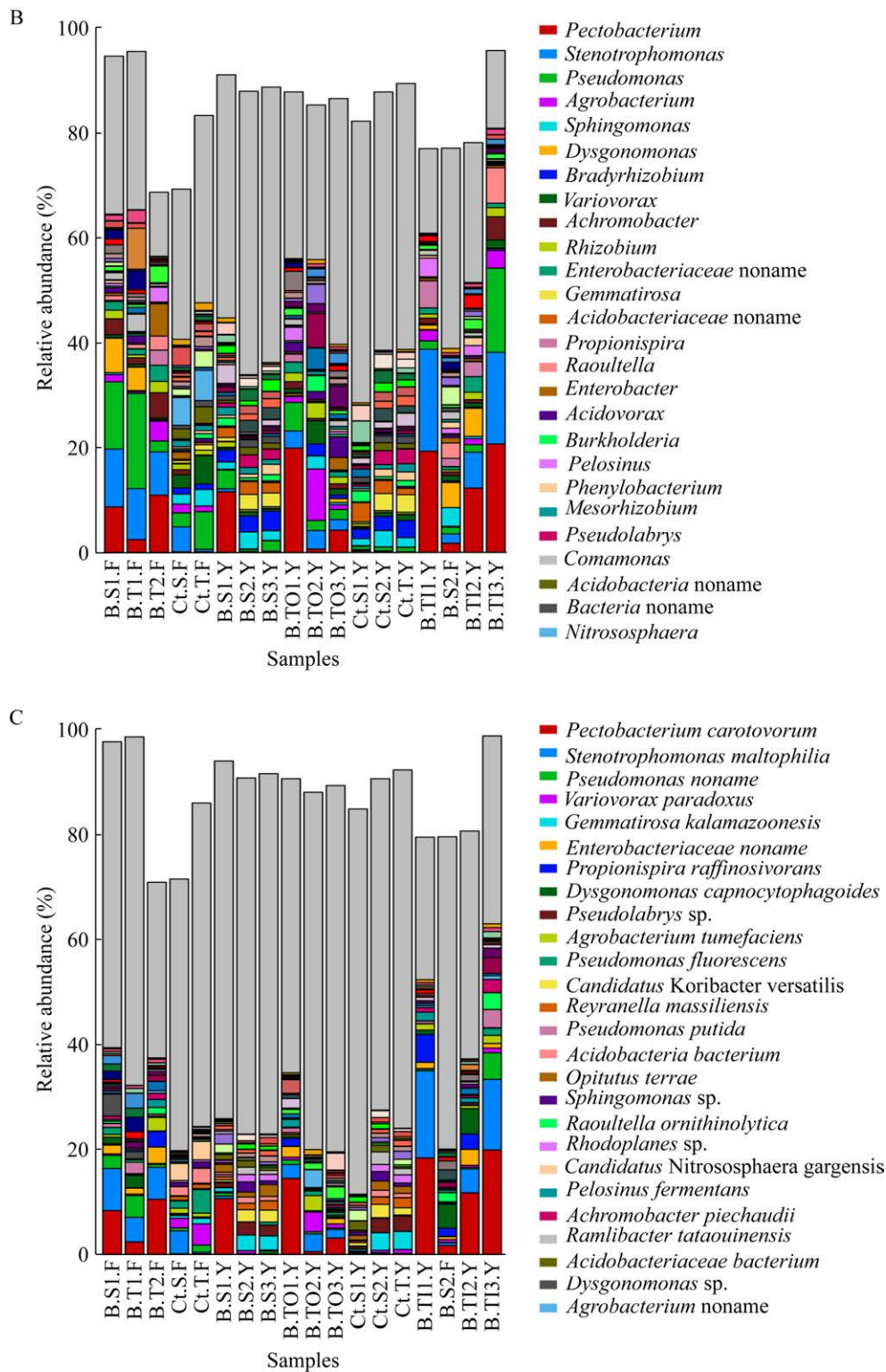


图 2 样品中微生物及群落丰度比较分析 A: 科分类水平. B: 属分类水平. C: 种分类水平

Figure 2 Comparative analysis for the abundance of microflora and microorganisms in samples. A: Family level. B: Genus level. C: Species level.

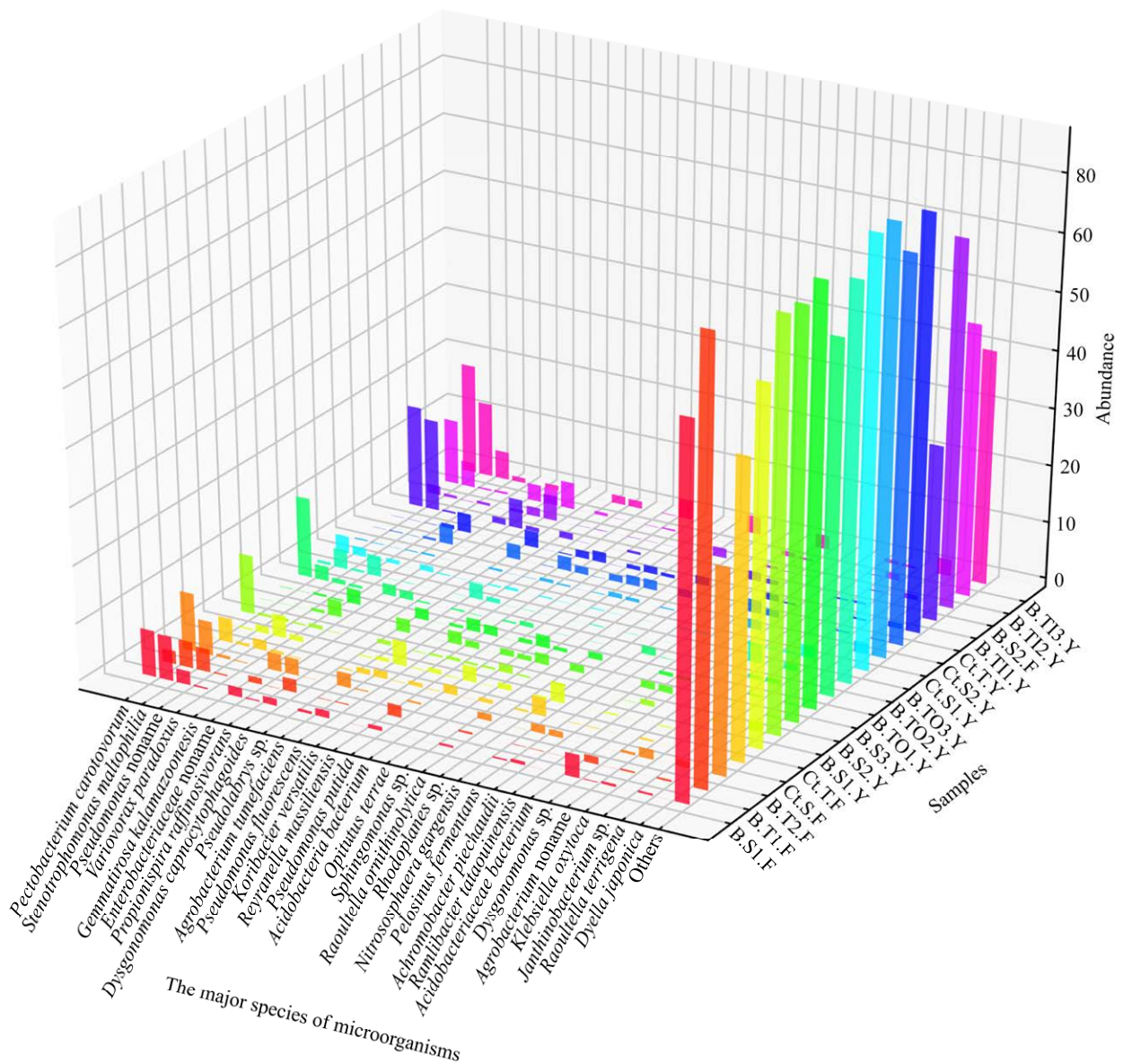


图3 软腐病害花魔芋球茎及根际土壤中主要微生物种类及分布

Figure 3 The major species of microorganisms and their distributions in the rotten corm and rhizosphere soil of konjac.

固杆菌在腐烂球茎样品中的分布量都很少,丰度较高种的占比未达到1.00%,而且微管束坚固杆菌和山萐菜坚固杆菌在关于魔芋软腐病害方面的报道很少。值得关注的是嗜麦芽寡养单胞菌(*S. maltophilia*, Sm)是另一种大量存于腐烂球茎中的菌株,其在腐烂球茎样品(B.T11.Y)中的丰

度高达16.07%,生物量占比仅次于Pc(图2C、图3)。可见,Sm与致病菌共同大量存在于软腐病害花魔芋腐烂球茎组织中,但尚未有关于该菌株的魔芋致病性研究报道。

深入的对比分析进一步证实变形菌门、酸杆菌门和拟杆菌门是所有腐烂组织样品中分布

总量最大的几个微生物门(图 4A)。这些门所包含微生物也是所有样品中总分布量最高的种类,其中 Pc 和 Sm 不仅是某一单个腐烂组织样品中分布量最大的 2 种菌,而且它们还是所有样品中生物量总和最大的菌类(图 4B)。2 种细菌在大部分病害组织和根际土壤样品中的丰度相近,都是典型的优势菌。在花魔芋腐烂球茎中分布相对明显的菌株还有假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、肠杆菌(*Enterobacteriaceae* sp.)及食棉子糖丙酸螺菌(*Propionispira raffinovorans*) (表 2)。此外,类二氧化碳营发酵单胞菌(*D. capnocytophagoides*)还大量存在于少数病害组织及其根际土壤中。

可见,少数种优势菌和多种共生菌以不同生物量共同生长和分布于软腐病害花魔芋腐烂球茎组织中,共同组成了一个庞大的微生物生态系统。另一方面,在花魔芋根际土壤中的优势菌类主要有 *Gemmatirosa kalamazoonesis*、假双斧状菌以及 *Koribacter versatilis*。然而,相对于同一个样品中的非优势菌类,它们的占比丰度显著性并不高,并且这些菌在腐烂球茎样品中的分布量极少。因此,大部分土壤样品中优势菌的生物量占比相对于非优势菌的显著性较低。其他许多非优势菌之间丰度差异的显著性也很低,几乎都维持在一个相近的低水平。相对于

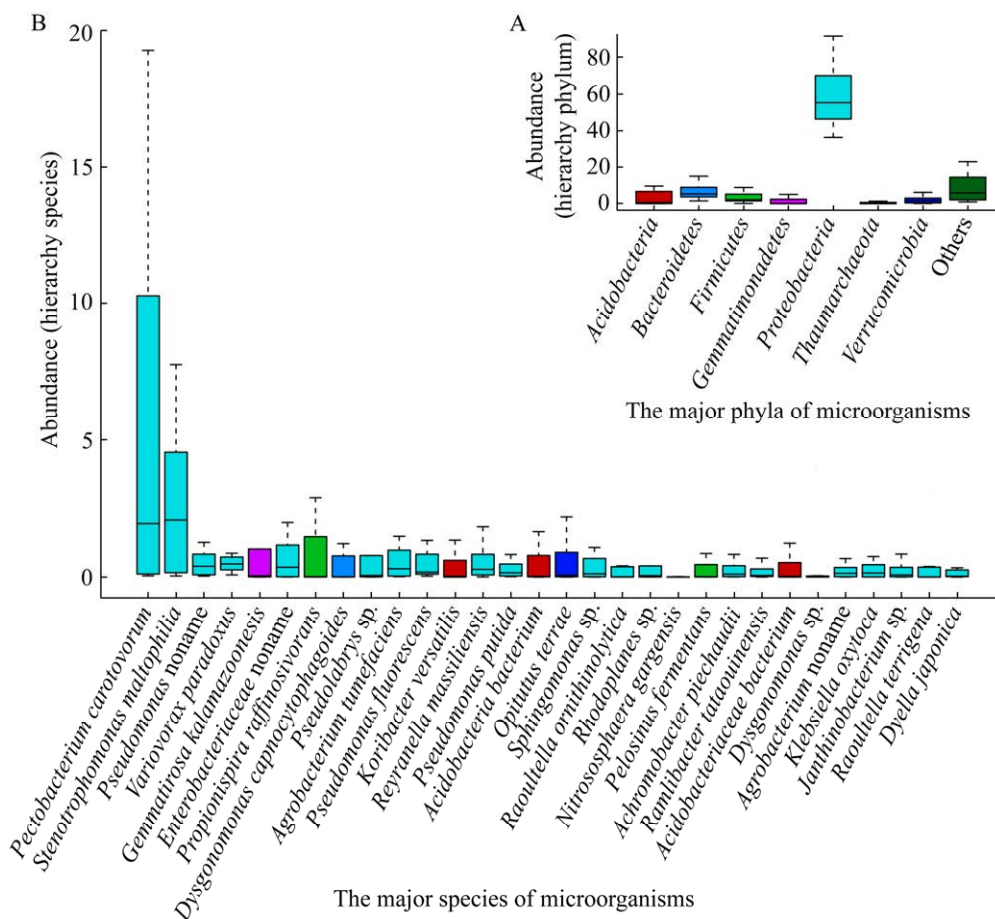


图 4 主要微生物在病害球茎及根际土壤样品中分布总量的比较分析

Figure 4 Comparative analysis for the total distribution of major microorganisms in diseased corm and rhizosphere soil of konjac. A: Major phyla. B: Major species.

表 2 从病害魔芋球茎组织及土壤中检测和分离到的主要微生物种类

Table 2 Major microorganisms detected and separated from soft rot corm and rhizosphere soil of konjac

Major phylum	Major detected species	Separated species	
Proteobacteria	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Pectobacterium aroidearum</i>	
	<i>Lelliottia amnigena</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>Pseudomonas putida</i>	
	<i>Bordetella petrii</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	
	<i>Kerstersia gyiorum</i>	<i>Pseudomonas qingdaonensis</i>	
	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Raoultella terrigena</i>	
	<i>Achromobacter piechaudii</i>	<i>Klebsiella michiganensis</i>	
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	<i>Cedecea lapagei</i>	
	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Morganella morganii</i>	
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	
	Bacteroidetes	<i>Dysgonomonas capnocytophagoides</i>	<i>Myroides marinus</i>
		<i>Dysgonomonas</i> sp.	
<i>Dysgonomonas gadei</i>			
<i>Myroides marinus</i>			
Acidobacteria	<i>Acidobacteria bacterium</i>	<i>Acidobacteria bacterium</i>	
Firmicutes	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	
	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>	
	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>		
Ascomycota	<i>Barnettozyma californica</i>	<i>Barnettozyma californica</i>	
	<i>Cyberlindnera saturnus</i>	<i>Cyberlindnera saturnus</i>	
	<i>Pichia kudriavzevii</i>		

病害腐烂组织中的微生物，土壤中的优势菌和非优势菌的生物量都较低。

2.3 菌群组成的主要特征

两个主产区软腐病害魔芋样品中微生物群落从门分类水平到种分类水平的相应特征为(图 1、图 2): 变形菌门是所有样品中的优势菌门, 该菌门的丰度占比保持在菌群总生物量的 50.00%以上。 γ 变形菌纲是大部分腐烂球茎样品中的优势菌纲, α 变形菌纲和 β 变形菌纲是少数组织和土壤样品中的优势菌纲。伯克霍尔德氏菌目大量分布于所有样品, 肠杆菌目、根瘤菌目和黄单胞菌目在大部分样品中分布量都高, 而假单胞菌目仅大量存在于少部分样品(B.S1.F、B.T1.F、B.TI3.Y)中。样品中的菌群组

成在科分类水平出现较大差异, 分布较广且丰度最高的是肠杆菌科微生物, 而黄单胞菌科、丛毛单胞菌科和假单胞菌科微生物则在少部分样品中分布较高, 其他科微生物在大部分样品中分布无典型的规律。随着样品类型和特点的不同, 菌群分布差异从属分类水平开始变大, 并明显呈现出相应的特征。坚固杆菌属、寡养单胞菌属和假单胞菌属在腐烂球茎中生物量最高, *Gemmatirosa*、鞘氨醇单胞菌属和慢生根瘤菌属在根际土壤中分布量较高, 其他属微生物在样品中无典型的分布特征。

菌群分布在种分类水平最为显著的特征是病害腐烂组织中大量分布 Pc 和 Sm。这 2 种细菌的丰度在大部分腐烂组织中显著高于其他种

类, 少部分病害样品(B.T1.F 和 B.T11.Y)中 Sm 的生物量接近或稍高于 Pc 的水平(图 5)。柱状图数据分析结果显示, 腐烂球茎(B.T1.Y、B.TO.Y、B.T.F)中 Pc 和 Sm 的丰度较高, 接近群落微生物总量的 50.00%。此外, 这些样品菌群中生物量相对较高的菌株还包括恶臭假单胞菌、肠杆菌、食棉子糖丙酸螺菌、类二氧化碳营发酵单胞菌、解鸟氨酸柔武氏菌(*Raoultella ornithinolytica*)等菌株, 但它们的丰度均不超过菌群总量的 10.00%。尽管在某一个样品中这些菌株的单一生物量比主要优势菌要小很多, 但它们群体生物总量的占比却很高。不同的是, 在少部分软腐病害株根际土壤(B.S1.F、B.S1.Y、Ct.S.F)中同样大量存在 Pc 和 Sm, 原因可能是腐烂球茎组织

中的微生物随土壤水流发生了迁移和扩散, 所以这类土壤样品中的优势菌组成与病害腐烂组织优势菌种类具有较高的相似性。其他大部分土壤样品中优势微生物主要为争论贪噬菌(*Variovorax paradoxus*)、*G. kalamazoonesis*、假双斧状菌、*K. versatilis* 以及马赛莱朗杆菌(*Reyranella massiliensis*), 并且以这些菌为优势微生物的病害株根际土壤的微生物群落组成与同产区健康对照根际土壤的微生物群落组成无明显差别。

2.4 微生物分离纯化及超微形态解析

为进一步验证宏基因组测序检测到的主要花魔芋软腐病致病菌以及病害腐烂组织中微生物的多样性。实验采用常规培养和选择性培养

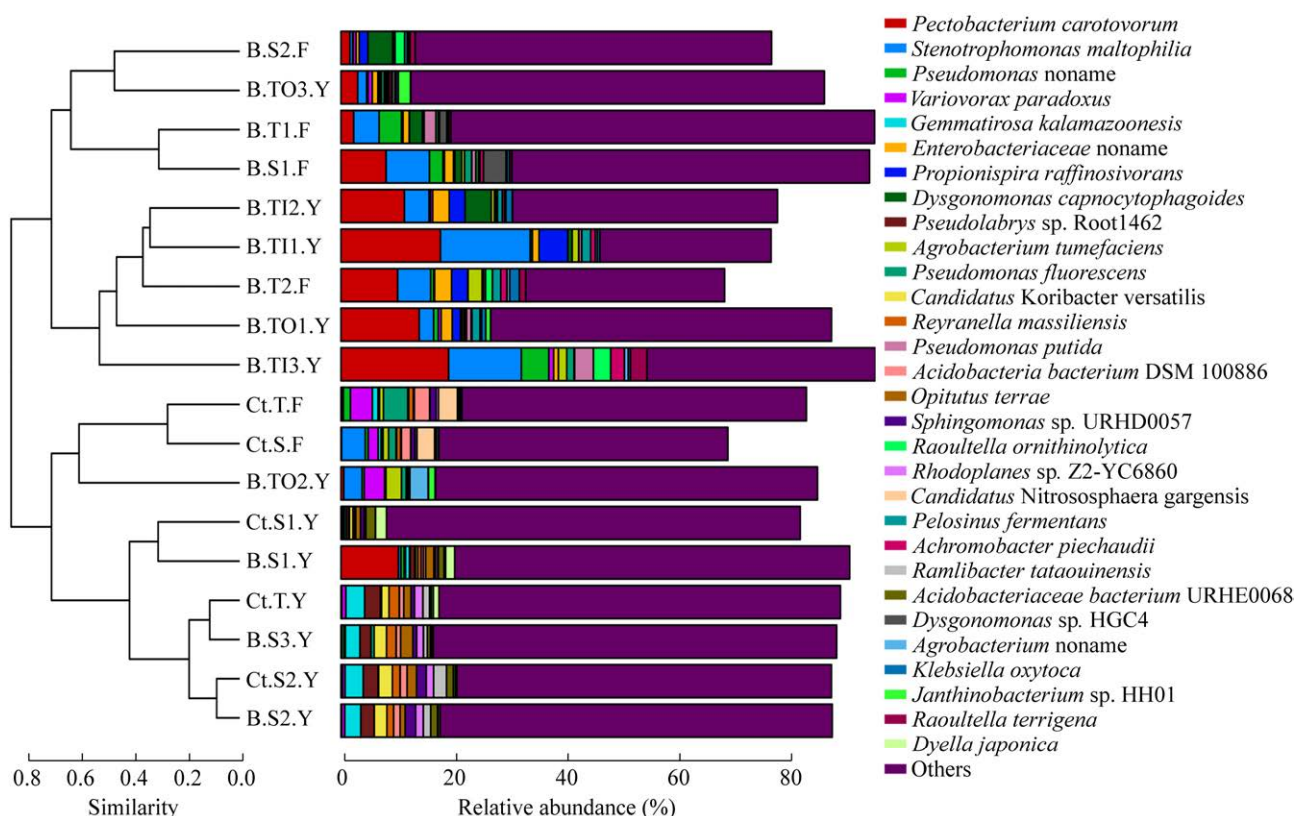


图 5 主要微生物组成与群落相似性的聚类树比较分析

Figure 5 Comparative analysis for the major species of microorganisms and the similarity of microflora in samples.

结合的方法分离培养了病害球茎中的微生物。在常规方法初级分离培养过程中, 平板培养基上长出了许多颜色不同和形状各异的菌落, 这直接反映了腐烂组织中微生物分布种类的繁多(图 6A)。经选择性纯化培养分离到的魔芋软腐病致病菌有 Pc 和天南星坚固杆菌。常规方法培养分离到的其他微生物主要还有 Sm、假单胞、多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)、海洋类香味菌(*Myroides marinus*)等 10 余种细菌, 以及少量霉

菌(表 2)。然而, 常规纯化培养和分析鉴定相对于宏基因组测序检测具有较大的局限性, 未能分离到测序检测获得的一些分布量较大的类似争论贪噬菌、食棉子糖丙酸螺菌、*G. kalamazoonesis* 等少数优势生长菌类。

利用扫描电镜观察病害花魔芋腐烂球茎组织发现, 淀粉粒及葡甘露聚糖聚集体已大部分被分解利用, 只剩下少数纤维状组织。纤维组织上面附着有大量菌株, 这些菌高度聚集, 以杆状为主, 少数为球状和卵形(图 6B)。采用超薄切片

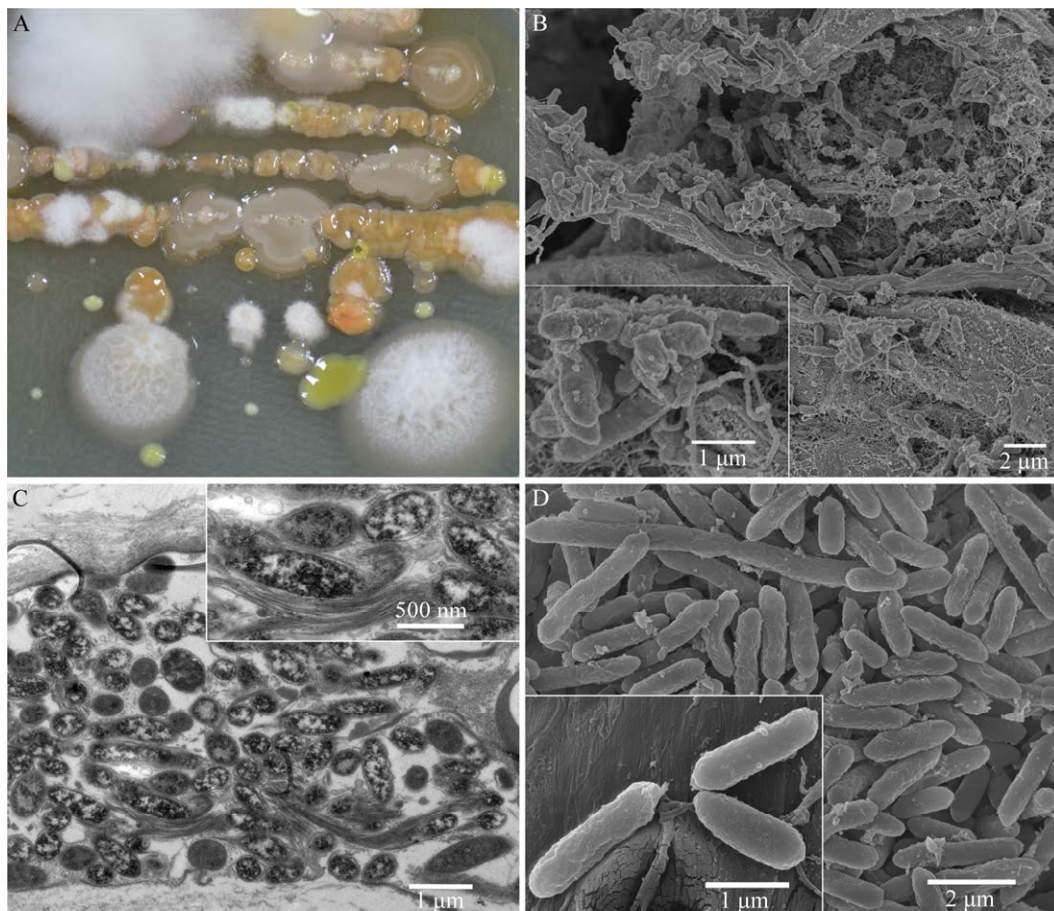


图 6 微生物菌落及致病菌形态特征 A: 初培养过程中微生物菌落. B: 组织中微生物的扫描电镜观察. C: 微生物的透射电镜观察. D: 致病菌超微形态的扫描电镜观察

Figure 6 Morphological characteristics of the microfloras and pathogenic bacterium. A: Bacterial colony in agar plate medium. B: Microorganisms in soft rot corm checked by scanning electron microscope. C: Ultrastructures of microorganisms checked by transmission electron microscope. D: Ultrastructures of pathogenic bacterium checked by scanning electron microscope.

透射电镜观察腐烂组织中的微生物发现, 微生物大小和形状的差异很大, 大部分杆状优势生长菌株外表长有许多鞭毛(图 6C)。结合其他研究报道分析, 长有鞭毛的优势生长菌株为 Pc 和 Sm 的可能性最大^[18-19]。进一步利用扫描电镜对分离纯化后的 Pc 进行观察, 此菌株直径约为 0.3–0.6 μm , 长度约为 2.0–4.0 μm , 属于典型的杆菌(图 6D)。不同的是, 由于样品制作过程非常容易使菌株的鞭毛脱落丢失, 在用扫描电镜观察的过程中未能看到病原菌和腐生菌的鞭毛。

3 讨论

3.1 两个主产区病害球茎组织微生物群落的差异

微环境中的微生物群落组成直接受土壤养分、温度、含水量和 pH 值的影响^[20-22]。此外, 其他类似微环境氨氮、有效氮、碳氮比等因素同样能够有效影响微生物群落结构和特征^[23-24]。宏基因组测序分析的方法能够深入了解微环境中微生物的多样性和群落结构, 也能为花魔芋软腐病害的防控提供更准确的环境微生物信息。云南地理状况和气候条件多样化, 东部和西部差异明显, 对 2 个花魔芋主产区种植地块的土壤微生物组成差异的解析具有重要意义。测序分析结果说明, 2 个主产区软腐病害花魔芋腐烂球茎中的微生物组成在门、纲和目分类水平非常相似, 只有少数样品显示出较小的差异, 并且 3 个分类水平的多数微生物群在 2 个产区的同类型样品中的丰度水平相近(图 1)。2 个产区样品微生物群落在科分类水平同样无明显差异, 其中肠杆菌科和黄单胞菌科是丰度最高的 2 个科, 假单胞菌科和丛毛单胞菌科在少数样品中也大量存在。2 个产区微生物群落在属分类水平和种分类水平的最大相似之处是坚固杆

菌属、寡养单胞菌属及假单胞菌属是优势生长菌群。较小的差别在于富源产区病害花魔芋腐烂球茎中 Pc 的丰度要低于永平产区, 该菌在富源产区病害样品中最高丰度只有 10.16%, 而在永平产区样品中丰度可高达 19.30% (图 2)。

另一方面, 物种相似性分析结果证明富源产区软腐病害花魔芋球茎微生物群落(B.T2.F), 与永平产区同类样品中的微生物群落(B.T1.Y、B.TO.Y)有着较高的相似性, 相关性系数分别高达 0.89 和 0.84。同样地, 样品 B.T1.F 与 B.T1.Y 中微生物群落相关性系数可达到 0.57, 具有明显的相似性(图 7)。这些相似相关性较高的菌群都分布于 2 个产区的病害魔芋腐烂球茎组织中。可见, 魔芋球茎中的物质组成及感染软腐病后物质转化的产物在很大程度上影响并决定了其中的微生物组成, 此研究结果与其他研究报道具有较高的相似性^[25-26]。因此, 本研究中的主要病原菌和腐生菌的优势生长突破了地域性差异, 主导了软腐病害花魔芋腐烂组织中微生物群落的主要特征, 这使得不同产区花魔芋球茎感染软腐病后所形成的微生物生态系统具有高度相似性。

3.2 根际土壤与病害球茎中微生物群落的相似相关性

作物根际微生物的组成和多样性反映了土壤生态系统的现状和潜在的发展趋势, 并直接影响着作物的健康和生长状况^[26]。本研究中 2 个主产区的花魔芋根际土壤与病害球茎中微生物群落的差异在门、纲和目分类水平差异较小, 相似相关性相对较高。菌群在科、属和种分类水平显示出较明显的差异, 相似相关性随之较低。2 个产区腐烂球茎中的菌群差异很小, 例如肠杆菌科微生物在 2 个产区的腐烂球茎组织中都是分布丰度最高的菌群。根际土壤菌群组成在科分类水平差异也较小, 仅少数科微生

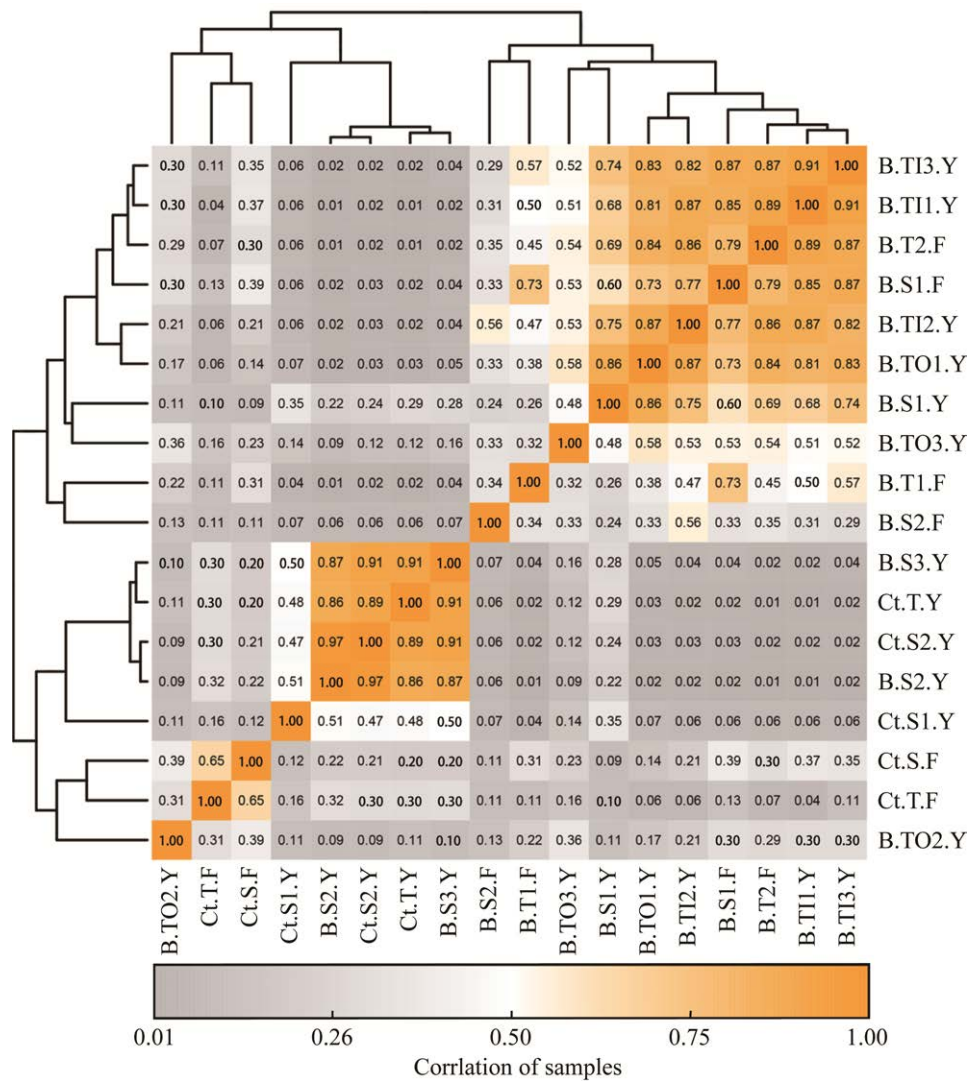


图 7 病害球茎及根际土壤中微生物种群相似相关性的热图(heatmap)比较分析

Figure 7 Comparative analysis for the correlation of microflora using heatmap, in the rotten corm and rhizosphere soil of konjac.

物在某一产区样品中的丰度表现得稍显著,例如假单胞菌科和鞘脂单胞菌科在富源的健康对照土壤中(Ct.S.F)丰度较高,酸杆菌科在永平土壤样品中(Ct.S.Y、B.S.Y)丰度较高(图 2A)。这在一定程度上说明了土壤菌群区域性差异比相应的腐烂魔芋球茎中菌群的差异要大。这些菌群结构特征及变化类似于其他研究报道^[27-28],主要原因为环境因子和优势菌群是决定微环境中微

生物群落平衡的重要因素,它们在一定程度上主导了该区域微生物群落的组成和结构特征^[27]。

此外,2个产区根际土壤微生物在属和种分类水平的差异表现为大部分土壤样品中的致病菌和优势生长腐生菌的丰度显著低于病害组织。研究发现气候环境因素对微生物群落影响很大,特别是温度可以通过影响微生物的功能基因多样性而调节微生物的代谢速率,进一步

影响不同种群间的竞争关系,从而决定微生物的群落结构^[29-30]。本研究采用热图法对宏基因组测序结果进行了物种相似相关性分析,结果显示只有少数土壤菌群与同产区病害组织菌群有较高的相似相关性(图 7)。例如 B.S1.F 样品菌群与 B.T1.F 和 B.T2.F 样品菌群的相似相关性稍高,以及 B.S1.Y 样品菌群与 B.TO1.Y、B.TI1.Y、B.TI2.Y 和 B.TI3.Y 样品菌群的相似相关性较明显。少数病害植株根际土壤(B.S1.F、B.S1.Y)中的菌群与腐烂球茎组织菌群极为相似,特别是致病菌丰度很高,近似于腐烂球茎中的水平。这是因为组织中的菌群随雨水在土壤中流动扩散,从而使得病害组织优势菌群在一定程度上影响了土壤微生物群落的原始结构(图 2C、图 5)。其他大部分土壤菌群与病害组织菌群的相似相关性都保持较低水平。因此,尽管 2 个花魔芋主产区软腐病害组织中微生物种类非常丰富,包括病原菌在内的优势生长细菌种类很多,但这些菌群与相应的根际土壤菌群相似相关性较低。

4 结论

本研究采用宏基因组测序、微生物分离纯化和电镜观察联合解析的策略阐述了云南东部和西部 2 个主产区软腐病害花魔芋球茎中的微生物极其丰富,共有 107 门 2 502 属 15 721 种微生物。其中 Pc 和 Sm 是分布范围最广且丰度最高的 2 种微生物,它们大量存在于病害球茎组织和少数根际土壤中。2 种菌显著的优势生长是这 2 个主产区腐烂魔芋球茎中微生物群落的主要特征。2 个产区病害组织中的微生物种类丰富,但都与相应根际土壤菌群相似相关性较低。土壤菌群区域性差异比相应的病害组织菌群区域性差异要大。这说明了 2 个主产区主要病原菌和腐生菌的优势生长突破了地域性差

异的影响而成为病害组织中微生物群落的主要特征,使得不同产区花魔芋球茎感染软腐病后所形成的微生物生态系统具有高度相似性。本研究深入考察了云南东部和西部 2 个主产区软腐病害花魔芋球茎组织和土壤中的主要病原菌、共生菌、菌群结构特征以及它们的地域性差异,为花魔芋软腐病害的绿色防控增添理论支撑。

参考文献

- [1] 段玉云,董坤,王片吉,谢勇,李萍仙,卢俊,李胜,曾黎琼,潘开华. 富源花魔芋对不同硝酸钾施用量的吸收利用[J]. 西南农业学报, 2015, 28(4): 1697-1701.
DUAN YY, DONG K, WANG PJ, XIE Y, LI PX, LU J, LI S, ZENG LQ, PAN KH. Uptake and utilization of different amounts of potassium nitrate with *Amorphophallus konjac* Fuyuan[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2015, 28(4): 1697-1701 (in Chinese).
- [2] 谭熙蕾,徐燕,周才琼. 魔芋葡甘露聚糖的功能特性及应用研究进展[J]. 食品研究与开发, 2021, 42(20): 214-219.
TAN XL, XU Y, ZHOU CQ. Research progress on the functional properties and application of konjac glucomannan[J]. Food Research and Development, 2021, 42(20): 214-219 (in Chinese).
- [3] DEVARAJ RD, REDDY CK, XU BJ. Health-promoting effects of konjac glucomannan and its practical applications: a critical review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 273-281.
- [4] 何斐,田孝威,雷雨俊,邵永春,毛洁,卢谢敏,王莹,段园鹏,刘富强. 连作花魔芋软腐病株与健株根域丛枝菌根真菌群落多样性[J]. 微生物学报, 2022, 62(8): 3092-3108.
HE F, TIAN XW, LEI YJ, SHAO YC, MAO J, LU XM, WANG Y, DUAN YP, LIU FQ. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in the root zone of *Amorphophallus konjac* with and without soft rot under continuous cropping[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(8): 3092-3108 (in Chinese).
- [5] 修建华,姬广海,王敏,杨云亮,李成云. 魔芋软腐

- 病菌分子鉴定与遗传多样性[J]. 微生物学报, 2006, 46(4): 522-525.
- XIU JH, JI GH, WANG M, YANG YL, LI CY. Molecular identification and genetic diversity in konnyaku's soft rot bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(4): 522-525 (in Chinese).
- [6] ZHU L, XIE H, CHEN SF, MA RC. Rapid Isolation, Identification and phylogenetic analysis of *Pectobacterium carotovorum* ssp.[J]. Journal of plant pathology, 2010, 92(2): 469-473.
- [7] 李梦飞, 陈田雨, 向凌月, 王红莹, 李刚, 史银连, 祝伟. 巨大芽孢杆菌 ZX001 的分离鉴定及其与魔芋软腐病发生的关系[J]. 中国农学通报, 2019, 35(21): 103-109.
- LI MF, CHEN TY, XIANG LY, WANG HY, LI G, SHI YL, ZHU W. *Bacillus megaterium* strain ZX001: isolation and identification and its relationship with konjac soft rot disease[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2019, 35(21): 103-109 (in Chinese).
- [8] 崔双, 陈昌龙, 冯佳豪, 曹颖, 寇晓敏, 付璐, 张荣萍, 谢华. 魔芋软腐病致病菌 *Pectobacterium aroidearum* 的特征及贝莱斯芽孢杆菌的生防效果[J]. 中国蔬菜, 2021(3): 83-93.
- CUI S, CHEN CL, FENG JH, CAO Y, KOU XM, FU L, ZHANG RP, XIE H. Characterization of *Pectobacterium aroidearum* causing konjac soft rot and biocontrol effect of *Bacillus velezensis*[J]. China Vegetables, 2021(3): 83-93 (in Chinese).
- [9] 何斐, 张忠良, 崔鸣, 薛泉宏. 魔芋根域优势真菌鉴定和化感作用及其生防放线菌的筛选[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(4): 157-167.
- HE F, ZHANG ZL, CUI M, XUE QH. Identification and allelopathic effect of dominant fungi in root-zone of *Amorphophallus konjac* and screening of the bio-control actinomycetes[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2016, 44(4): 157-167 (in Chinese).
- [10] 彭磊, 卢俊, 邓春英, 何云松, 张瑜瑜, 高祥武. 魔芋软腐病病原传播途径及无公害防治方法[J]. 中国生物防治, 2006, 22(S1): 201-202.
- PENG L, LU J, DENG CY, HE YS, ZHANG YY, GAO XW. Transmission route of konjac soft rot pathogen and pollution-free control methods[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(S1): 201-202 (in Chinese).
- [11] 张起畅, 张文飞, 殷浩能, 李媛宏, 吴红萍, 金映虹, 王锐萍. 宏基因组测序分析东寨港红树林淤泥和水体微生物的多样性[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(1): 116-122.
- ZHANG QC, ZHANG WF, YIN HN, LI YH, WU HP, JIN YH, WANG RP. Revealing microorganism diversity of silt and water in Dongzhaigang mangroves by metagenome sequencing[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(1): 116-122 (in Chinese).
- [12] SUAREZ C, DALCIN MARTINS P, JETTEN MSM, KARAČIĆ S, WILÉN BM, MODIN O, HAGELIA P, HERMANSSON M, PERSON F. Metagenomic evidence of a novel family of anammox bacteria in a subsea environment[J]. Environmental Microbiology, 2022, 24(5): 2348-2360.
- [13] HE F. Response of root-associated bacterial communities to different degrees of soft rot damage in *Amorphophallus konjac* under a *Robinia pseudoacacia* plantation[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 652758.
- [14] YANG M, QIY, LIU J, WU Z, GAO P, CHEN Z, HUANG F, YU L. Dynamic changes in the endophytic bacterial community during maturation of *Amorphophallus muelleri* seeds[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 996854.
- [15] HOMG YZ, FAN ZW, XU SG, PAN CM, ZHANG XH, LIN L, ZHANG JW. Effect of reduced chemical fertilizers with biochar application on microbial community in rhizosphere soil of *Amorphophallus konjac*[J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2023, 17(2): 176-185.
- [16] ZHOU JZ, BRUNS MA, TIEDJE JM. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 316-322.
- [17] 王田田, 魏治镭, 熊智琦, 吴阔, 周凤, 董金金, 贾强强, 朱若萌, 张仲凯. 莴笋感染番茄斑萎病毒(TSWV): 病毒粒子分布与亚细胞病变特征[J]. 电子显微学报, 2023, 42(1): 53-61.
- WANG TT, WEI ZL, XIONG ZQ, WU K, ZHOU F, TONG JJ, JIA QQ, ZHU RM, ZHANG ZK. *Asparagus lettuce* infected with TSWV: the characteristic of virions distribution and subcellular pathological changes[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2023, 42(1): 53-61 (in Chinese).
- [18] 徐炜, 王婷婷, 刘列平, 王晓兵, 韦革宏. 陕西岚皋县魔芋软腐病原菌的分离与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(11): 97-102.
- XU W, WANG TT, LIU LP, WANG XB, WEI GH. Isolation and identification of *Amorphophallus* bacterial soft rot in Langao County, Shaanxi Province[J]. Journal of Northwest A&F University

- (Natural Science Edition), 2011, 39(11): 97-102 (in Chinese).
- [19] 邓阳, 姜竹鸣, 张玉琴. 寡养单胞菌属细菌的研究进展[J]. 生物资源, 2021, 43(1): 1-9.
DENG Y, JIANG ZM, ZHANG YQ. Research progress on the genus *Stenotrophomonas*[J]. Biotic Resources, 2021, 43(1): 1-9 (in Chinese).
- [20] 于天赫, 张乃莉, 于爽, 曲来叶. 北京城市公园常见乔木土壤真菌群落特征及影响因素[J]. 生态学报, 2021, 41(5): 1835-1845.
YU TH, ZHANG NL, YU S, QU LY. The characteristics of soil fungal community and effect factors under common tree species in urban parks of Beijing[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41(5): 1835-1845 (in Chinese).
- [21] 韩世忠, 高人, 李爱萍, 马红亮, 尹云锋, 司友涛, 陈仕东, 郑群瑞. 中亚热带地区两种森林植被类型土壤微生物群落结构[J]. 应用生态学报, 2015, 26(7): 2151-2158.
HAN SZ, GAO R, LI AP, MA HL, YIN YF, SI YT, CHEN SD, ZHENG QR. Soil microbial community structure of two types of forests in the mid-subtropics of China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(7): 2151-2158 (in Chinese).
- [22] 赵雯, 王丹丹, 热依拉·木民, 黄开钊, 刘顺, 崔宝凯. 阿尔山地区兴安落叶松林土壤微生物群落结构[J]. 生物多样性, 2023, 31(2): 151-162.
ZHAO W, WANG DD, MUMIN RYL, HUANG KC, LIU S, CUI BK. Soil microbial community structure of *Larix gmelinii* forest in the Aershan area[J]. *Biodiversity Science*, 2023, 31(2): 151-162.
- [23] LIU SS, WANG F, XUE K, SUN B, ZHANG YG, HE ZL, VAN NOSTRAND JD, ZHOU JZ, YANG YF. The interactive effects of soil transplant into colder regions and cropping on soil microbiology and biogeochemistry[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(3): 566-576.
- [24] 姜雪薇, 马大龙, 臧淑英, 张冬有, 孙弘哲. 高通量测序分析大兴安岭典型森林土壤细菌和真菌群落特征[J]. 微生物学通报, 2021, 48(4): 1093-1105.
JIANG XW, MA DL, ZANG SY, ZHANG DY, SUN HZ. Characteristics of soil bacterial and fungal community of typical forest in the Greater Khingan Mountains based on high-throughput sequencing[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(4): 1093-1105 (in Chinese).
- [25] 张雪, 陈婷, 牛艳慧, 李杨, 胡文革. Illumina 高通量测序揭示艾比湖湿地 6 种盐生植物根际土壤真菌群落组成及多样性[J]. 微生物学报, 2021, 61(12): 3965-3976.
ZHANG X, CHEN T, NIU YH, LI Y, HU WG. Research on diversity of fungi community in rhizosphere soil of six halophytes in Ebinur Lake Wetland[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 3965-3976 (in Chinese).
- [26] 姜懿珊, 孙迎韬, 张干, 罗春玲. 中国不同气候类型森林土壤微生物群落结构及其影响因素[J]. 生态环境学报, 2023, 32(8): 1355-1364.
JIANG YS, SUN YT, ZHANG G, LUO CL. Pattern and influencing factors of forest soil microbial communities in different climate types in China[J]. *Ecology and Environmental Sciences*, 2023, 32(8): 1355-1364 (in Chinese).
- [27] 马进鹏, 庞丹波, 陈林, 万红云, 陈高路, 李学斌. 贺兰山不同海拔植被下土壤微生物群落结构特征[J]. 生态学报, 2022, 42(2): 667-676.
MA JP, PANG DB, CHEN L, WAN HY, CHEN GL, LI XB. Characteristics of soil microbial community structure under vegetation at different altitudes in Helan Mountains[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, 42(2): 667-676 (in Chinese).
- [28] WASENDORF C, SCHMITZ-ESSER S, EISCHEID CJ, LEYHE MJ, NELSON EN, RAHIC-SEGGERMAN FM, SULLIVAN KE, PETERS NT. Genome analysis of *Erwinia persicina* reveals implications for soft rot pathogenicity in plants[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 1001139.
- [29] ZHAO MX, XUE K, WANG F, LIU SS, BAI SJ, SUN B, ZHOU JZ, YANG YF. Microbial mediation of biogeochemical cycles revealed by simulation of global changes with soil transplant and cropping[J]. *The ISME Journal*, 2014, 8(10): 2045-2055.
- [30] LIANG YT, JIANG YJ, WANG F, WEN CQ, DENG Y, XUE K, QIN YJ, YANG YF, WU LY, ZHOU JZ, SUN B. Long-term soil transplant simulating climate change with latitude significantly alters microbial temporal turnover[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(12): 2561-2572.