

解淀粉芽孢杆菌 X60 对烟草叶际微生物拮抗活性及叶际微生态的影响

张琴叶^{1,2}, 蔡刘体², 汪汉成^{2*}, 陈兴江², 陆宁², 李菲¹

1 贵州师范大学 生命科学学院, 贵州 贵阳

2 贵州省烟草科学研究所, 贵州 贵阳

张琴叶, 蔡刘体, 汪汉成, 陈兴江, 陆宁, 李菲. 解淀粉芽孢杆菌 X60 对烟草叶际微生物拮抗活性及叶际微生态的影响[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3580-3596.

ZHANG Qinye, CAI Liuti, WANG Hancheng, CHEN Xingjiang, LU Ning, LI Fei. Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* X60 against tobacco phyllosphere microorganisms and its impact on phyllosphere microbial community structure[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3580-3596.

摘要:【目的】为研究解淀粉芽孢杆菌 X60 对烟草叶际微生物的拮抗活性, 以及施用 X60 菌剂后对叶际微生物菌群的影响。【方法】采用生物活性测定法评价其对叶际 20 种致病真菌、15 种非致病真菌、2 种致病细菌及 15 种非致病细菌的拮抗活性, 利用扩增子测序技术解析施用该菌剂对烟草叶际微生物菌群结构的影响。【结果】解淀粉芽孢杆菌 X60 对米根霉等 13 种致病真菌及哈茨木霉等 12 种非致病真菌的拮抗活性强, 抑制率为 60.00%–80.00%; 对细极链格孢等 7 种致病真菌及小孢梭孢壳等 3 种非致病真菌的拮抗活性较弱(10.00%–59.00%); 对丁香假单胞烟草致病变种、丁香假单胞杆菌角斑专化型 2 种致病细菌及微小杆菌等 7 种非致病细菌的抑菌圈直径均大于 20 mm。X60 菌剂田间施用后对叶斑病的防治效果为 52.35%, 感病组织中优势细菌泛菌的相对丰度升高, 细菌多样性和丰富度先下降后上升; 真菌丰富度下降, 多样性先下降后上升, 植物病原菌类群相对丰度由 44.87% 降至 6.71%。【结论】解淀粉芽孢杆菌 X60 抗菌谱广, 对烟草叶际的 25 种真菌及 9 种细菌具有强拮抗活性, 对烟草叶斑病的田间防治效果为 52.35%, 施用后能有效降低叶际植物病原菌的丰度, 该菌剂具有防控烟草叶斑病的应用潜力。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 拮抗活性; 防治效果; 扩增子测序

资助项目: 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(2024XM06); 国家自然科学基金(32160522, 32460698); 贵州省“百层次”创新型人才项目(黔科合平台人才-GCC[2022]028-2, 黔科合平台人才-GCC[2023]108); 贵州省科技创新人才团队项目(黔科合平台人才-CXTD[2023]021, 黔科合基础-ZK[2022]Key 033)

This work was supported by the Science and Technology Project of Guizhou Provincial Company of China National Tobacco Corporation (2024XM06), the National Natural Science Foundation of China (32160522, 32460698), the “Top-level” Innovative Talents Project of Guizhou Province (Qian Ke He Platform Talents-GCC[2022]028-2, Qian Ke He Platform Talents-GCC[2023]108), and the Science and Technology Innovation Talent Team Project of Guizhou Province (Qian Ke He Platform Talents-CXTD[2023]021, Qian Ke He Foundation-ZK[2022]Key 033).

*Corresponding author. E-mail: xiaobaiyang126@hotmail.com

Received: 2026-01-06; Accepted: 2026-03-13; Published online: 2026-03-31

Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* X60 against tobacco phyllosphere microorganisms and its impact on phyllosphere microbial community structure

ZHANG Qinye^{1,2}, CAI Liuti², WANG Hancheng^{2*}, CHEN Xingjiang², LU Ning², LI Fei¹

1 School of Life Sciences, Guizhou Normal University, Guiyang, Guizhou, China

2 Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang, Guizhou, China

Abstract: [Objective] To investigate the antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* X60 against tobacco phyllosphere microorganisms and its effects on the phyllosphere microbial community of tobacco. [Methods] Bioactivity assays were conducted to evaluate the antagonistic effects of *B. amyloliquefaciens* X60 against 20 species of pathogenic fungi, 15 species of non-pathogenic fungi, 2 specialized forms of pathogenic bacteria, and 15 species of non-pathogenic bacteria. Amplicon sequencing was employed to assess the influence of this strain on the phyllosphere microbial community structure. [Results] *B. amyloliquefaciens* X60 exhibited strong antagonistic activity (inhibition rates of 60.00%–80.00%) against 13 species of pathogenic fungi (e.g., *Rhizopus oryzae*) and 12 species of non-pathogenic fungi (e.g., *Trichoderma harzianum*). Moderate antagonism (inhibition rates of 10.00%–59.00%) was observed against 7 species of pathogenic fungi (e.g., *Alternaria tenuissima*) and 3 species of non-pathogenic fungi (e.g., *Thielavia microspora*). Significant antibacterial activity (inhibition zone diameter >20 mm) was detected against 2 specialized forms of pathogenic bacteria (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and pv. *angulata*) and 7 non-pathogenic bacteria (e.g., *Exiguobacterium*). After application, X60 showed the control efficacy of 52.35% against tobacco leaf spot. Following treatment, the relative abundance of *Pantoea*—a genus of opportunistic bacteria dominating the infected tissue—increased, whereas bacterial diversity and richness initially declined and then recovered. Fungal richness decreased throughout the observation period, while fungal diversity exhibited a transient decrease followed by a rebound. The relative abundance of phytopathogenic fungi declined from 44.87% to 6.71%. [Conclusion] *B. amyloliquefaciens* X60 possesses a broad antimicrobial spectrum and exerts strong antagonistic activity against 25 fungal and 9 bacterial species colonizing the tobacco phyllosphere. Under field conditions, the strain provided 52.35% control of tobacco leaf spot and significantly reduced the abundance of foliar phytopathogens, demonstrating the potential as a biocontrol agent for the management of this disease.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*; antagonistic activity; disease control efficacy; amplicon sequencing

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是芽孢杆菌科革兰氏阳性细菌,可形成芽孢并分泌脂肽类抗生素、蛋白酶和纤维素酶等多种

抑菌物质,具有广谱拮抗活性^[1],其菌剂产品在农业病害防治中应用广泛。已有研究表明,解淀粉芽孢杆菌 XJ-BV2007 对链格孢(*Alternaria*

alternata) H10 的抑制率可达 72.72%^[2], 解淀粉芽孢杆菌 YN201728 对白粉病菌的孢子萌发抑制率达 92.07%^[3], 菌株 KRS005 对灰霉病的抑制率高达 90.3%^[4], 菌株 YZU-SG146 对大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)的菌丝生长和孢子萌发抑制率分别为 89.22% 和 68.20%^[5]。截至目前, 在我国登记的解淀粉芽孢杆菌菌剂产品有解淀粉芽孢杆菌 KN-527 (武汉科诺生物科技股份有限公司, 中国农药信息网)等, 已被用于灰霉病等多种真菌病害的防控。

烟草叶际拥有特殊的微生态环境, 栖息着大量真菌、细菌、病毒、原生动物和线虫等微生物。已有研究表明, 烟草叶际微生态系统中存在多种核心病原真菌类群, 主要包括链格孢(*Alternaria alternata*)^[6]、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)^[7]和多主棒孢霉(*Corynespora cassiicola*)^[8]等。这些病原微生物引发的叶斑类病害在我国各主要烟区普遍发生, 叶斑病的流行规律、致病机制及防控技术已成为植物病理学研究的重要领域; 同时叶际还存在木霉(*Trichoderma* sp.)、节菱孢(*Arthrinium* sp.)等多种非致病菌^[9]。生防菌剂在应用中受关注的重点通常是对靶标病菌的抑菌活性及对病害的防治效果, 而其对靶标病原菌以外的其他叶际微生物的抑菌活性却鲜有研究。为此, 有必要开展生防菌对病原菌及非靶标菌的拮抗活性测定, 并评价其施用后烟草叶际微生态的变化规律。

本实验室前期获得了一株生防菌解淀粉芽孢杆菌 X60 (保藏号 CCTCC No: M 2013375), 该菌株对茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)具有一定的抑制活性^[10], 同时具有广泛的碳氮源利用特性。该菌株在 30–37 °C、pH 6.0–7.0 条件下较为稳定, 活菌浓度可达 1×10^{10} – 1×10^{12} CFU/mL^[11]。为更好地评价解淀粉芽孢杆菌 X60 的应用潜力, 本研究采用室内平板拮抗法测定了其对烟草叶际 20 种致病真菌、15 种非致病真菌、2 种致病细菌及 15 种非致病细菌的拮抗活性, 同时采用

Illumina 扩增子测序技术解析其对叶际真菌和细菌群落的调控规律, 以期了解淀粉芽孢杆菌 X60 菌剂的应用开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

解淀粉芽孢杆菌 X60 由贵州省烟草科学研究院分离鉴定, 保藏号 CCTCC No: M 2013375。各待测菌株见表 1, 所有菌株均由贵州省烟草科学研究院分离保存。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 18.0; NA 培养基(g/L): 牛肉浸膏 3.0, 胰蛋白胨 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0。

1.2 解淀粉芽孢杆菌 X60 对叶际微生物的拮抗活性测定

1.2.1 对真菌的拮抗活性测定

采用对峙培养法^[12]测定供试真菌的抗菌谱。将 PDA 培养基和 NA 培养基按体积 1:1 混合, 倒入直径 90 mm 培养皿中待用。使用无菌打孔器在待测致病真菌菌落边缘打制直径 5 mm 菌碟, 接种于平板中央。采用无菌接种环在菌碟左右两侧对称接种生防菌 X60, 同时在另外两侧对称接种无菌水作为对照。置于 28 °C 条件下黑暗培养 4 d, 分别测量对照菌落及处理菌落直径, 并计算抑制率^[13], 如公式(1)所示。

$$\text{菌落生长抑制率} = \frac{\text{对照菌落直径(mm)} - \text{处理菌落直径(mm)}}{\text{对照菌落直径(mm)}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.2 对细菌的拮抗活性测定

采用喷雾法^[10]测定供试细菌的抗菌谱。将生防菌 X60 接种于平板中央, 28 °C 黑暗培养 2 d。将待测细菌配制成浓度为 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液, 使用喷雾法将其均匀喷施于上述含生防菌平板表面, 以喷施等量无菌水为对照, 28 °C 黑暗培养 24 h 后采用十字交叉法测量抑菌圈大小^[10]。

表1 供试菌株

Table 1 Tested isolates

Strains	Pathogenic strains	Non-pathogenic strains
Fungi	米根霉 <i>Rhizopus oryzae</i>	哈茨木霉 <i>Trichoderma harzianum</i>
	果生炭疽 <i>Colletotrichum fruticicola</i>	暗孢节菱孢 <i>Arthrinium phaeospermum</i>
	葡萄座腔菌 <i>Botryosphaeria dothidea</i>	小新壳梭孢 <i>Neofusicoccum parvum</i>
	球黑孢霉 <i>Nigrospora aurantiaca</i>	荨麻节菱孢 <i>Arthrinium urticae</i>
	禾谷镰孢 <i>Fusarium graminearum</i>	山茶炭疽 <i>Colletotrichum camelliae</i>
	立枯丝核菌 AG-6 <i>Rhizoctonia solani</i> AG-6	白球拟酵母 <i>Torulopsis candida</i>
	立枯丝核菌 AG-5 <i>Rhizoctonia solani</i> AG-5	产黄青霉 <i>Penicillium chrysogenum</i>
	立枯丝核菌 AG-1B <i>Rhizoctonia solani</i> AG-1B	小孢拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis menezesiana</i>
	烟草尾孢菌 <i>Cercospora nicotianae</i>	枯叶格孢腔菌 <i>Pleospora herbarum</i>
	多主棒孢霉 <i>Corynespora cassiicola</i>	里氏木霉 <i>Trichoderma reesei</i>
	高粱拟球菌 <i>Epicoccum sorghinum</i>	拟茎点霉 <i>Diaporthe actinidia</i>
	烟草疫霉 <i>Phytophthora nicotianae</i>	易脆毛霉 <i>Mucor fragilis</i>
	腐皮镰孢 <i>Fusarium solani</i>	小孢梭孢壳 <i>Thielavia microspora</i>
	细极链格孢 <i>Alternaria tenuissima</i>	球状匍柄霉 <i>Stemphylium globuliferum</i>
	木贼镰孢 <i>Fusarium equiseti</i>	盾壳霉 <i>Verruconis panacis</i>
	尖镰孢 <i>Fusarium oxysporum</i>	
	长柄链格孢 <i>Alternaria longipes</i>	
	亚隔孢 <i>Didymella glomerata</i>	
	亚洲镰孢 <i>Fusarium asiaticum</i>	
	链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	
Bacteria	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	微小杆菌 <i>Exiguobacterium</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	红球菌 <i>Rhodococcus</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	类芽孢杆菌 <i>Paenibacillus</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	产碱杆菌 <i>Alcaligenes</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	非脱羧勒克菌 <i>Leclercia adecarboxylata</i>
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	丁香假单胞菌 <i>Pseudomonas syringae</i>
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	恶臭假单胞菌 <i>Pseudomonas putida</i>
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	微杆菌 <i>Microbacterium</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	成团泛菌 <i>Pantoea agglomerans</i>
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	假节杆菌 <i>Pseudarthrobacter</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	戴尔福特菌 <i>Delftia</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	丛毛单胞菌 <i>Comamonas</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	不动杆菌 <i>Acinetobacter</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	驹形氏亮杆菌 <i>Leucobacter</i> sp.
	丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>	欧式杆菌 <i>Erwinia</i> sp.

1.3 解淀粉芽孢杆菌 X60 菌剂田间应用
试验设计及叶际微生物样品采集与检测

1.3.1 生防菌悬液的制备

取发酵罐制备的 X60 发酵液 50 mL，于

4 °C、8 000 r/min 离心 15 min，小心弃去含有培养基成分的上清液。随后使用等体积预冷的无菌磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L, pH 7.2)轻柔重悬菌体沉淀，并重复上述步骤 2 次，以最大限度去

除附着于菌体或混杂于其中的培养基营养物质。最终，将清洗后的菌体沉淀重悬于 50 mL 无菌蒸馏水中，形成 X60 菌体悬液。采用平板涂布计数法测定 X60 菌体悬液与原始发酵液中的活菌浓度，并使用无菌蒸馏水将二者均调整至 1×10^9 CFU/mL。

1.3.2 叶斑病情调查方法及防效计算

于烟叶成熟期选取叶斑病发生的田块进行田间试验，试验时田间除叶斑病外还零星发生赤星病、靶斑病等。将原浓度为 1×10^9 CFU/mL 的 X60 菌悬液用清水稀释成浓度约为 1×10^7 CFU/mL 的菌液，使用农用多功能喷雾器将每 9 L 生防菌液均匀喷施于 30 株烟叶叶片表面，以出现叶面径流为准，并以喷施等量清水作为对照。各处理于施药前及施药后 1 d 和 10 d 分别采集健康烟叶组织与感病烟叶组织各 10 g，并迅速带回实验室 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存、备用，各样品代号如表 2 所示。于施药后 10 d 参照烟草病级调查的国家标准(GB/T 23222—2008)^[14]进行病情指数调查，调查时因田间零星出现多种病害，将其共同归于叶斑类病害进行统计，参考苟剑渝等^[15]的方法计算病情指数及田间防效，计算如公式(2)、(3)、(4)所示。

$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照组病斑直径} - \text{处理组病斑直径}}{\text{对照组病斑直径}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级数值}} \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{相对防效} = \frac{\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}}{\text{对照组病情指数}} \times 100\% \quad (4)$$

表2 叶际微生物群落结构检测样品采集信息
Table 2 Sample collection information for phyllosphere microbial community structure analysis

Sample type	Healthy tissue			Infected tissue		
	0 d	1 d	10 d	0 d	1 d	10 d
Sample number	XJ11	XJ21	XJ31	XB11	XB21	XB31
	XJ12	XJ22	XJ32	XB12	XB22	XB32
	XJ13	XJ23	XJ33	XB13	XB23	XB33
Group number	XJ1	XJ2	XJ3	XB1	XB2	XB3

1.3.3 对烟叶叶际微生态的影响

将田间采集的健康与感病烟叶组织进行前期处理，用无菌剪刀剪取烟叶样品 10 g 放入 500 mL 三角瓶，加入 100 mL 无菌磷酸盐缓冲液(pH 7.0，含 0.1% Tween-80)，170 r/min 振荡 30 min 收集菌悬液，重复以上步骤 3 次。将获得的 150 mL 菌悬液加入无菌收菌瓶， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min 收集叶际微生物后，用无菌水将得到的菌斑洗脱收集至 1.5 mL 离心管。以施用菌剂前的样品作为对照组，施用后 1 d 和 10 d 作为实验组，每个处理设置 3 次重复。于 2025 年 7 月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。

采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法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，用无菌水稀释至浓度为 1 ng/ μL 作为模板，分别使用真菌引物 ITS1-5F-F (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') 和 ITS1-1F-R (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3')、细菌引物 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 对真菌和细菌进行 PCR 扩增。对已扩增完成的产物进行等量混样和纯化后构建基因文库，用 Illumina 平台进行测序分析。参考 Mullis 等^[16]的方法进行多样性测序与分析，以上 PCR 扩增及测序委托北京诺禾致源科技股份有限公司完成，分别从叶际真菌和细菌的微生物群落结构、 α 多样性、 β 多样性、功能预测等角度分析 X60 应用后对叶际微生态的影响。

1.4 数据处理

原始读长序列在 QIIME 2 中处理，使用 cutadapt 插件修剪接头和引物序列。再使用 QIIME 2 软件的 DADA2 插件对数据进行质量过滤、降噪、拼接及去嵌合体，并基于扩增子序列变异(amplicon sequence variants, ASVs)进行序

列聚类。利用 QIIME 软件对不同时间序列样本的微生物群落多样性(香农和辛普森指数)、丰富度(Chao1 指数)、覆盖率指数和 β 多样性进行计算。用 R 语言工具统计并绘制真菌、细菌花瓣图、物种积累箱形图、门属水平相对丰度图, 分析样品微生物群落结构与多样性。真菌使用 UNIT (8.2) 进行注释, 细菌使用 SILVA 132 的 SSU rRNA 数据库进行注释。以上过程在北京诺禾致源科技股份有限公司完成。使用 Excel 2022 对调查数据进行统计分析处理, 计算 X60 对烟草叶斑病的田间防效。采用 Adobe Photoshop CS5 对相关图片进行处理。

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽孢杆菌 X60 对叶际微生物的拮抗活性

2.1.1 对真菌的拮抗活性

拮抗活性测定结果显示, X60 对米根霉(*Rhizopus oryzae*)、果生炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、球黑孢霉(*Nigrospora aurantiaca*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) AG-6、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) AG-5、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*) AG-1B、烟草尾孢菌(*Cercospora nicotianae*)、多主棒孢霉(*Corynespora cassicola*)、高粱附球菌(*Epicoccum sorghinum*)、烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)、腐皮镰孢(*Fusarium solani*)等 13 种致病真菌具有较强的抑制作用, 抑制率分别为 80.00%、78.75%、77.50%、71.25%、71.25%、68.75%、68.75%、67.50%、66.67%、66.67%、65.38%、63.64% 和 62.50%; 对细极链格孢(*Alternaria tenuissima*)、木贼镰孢(*Fusarium equiset*)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)、长柄链格孢(*Alternaria longipes*)、亚隔孢壳(*Didymella glomerata*)、亚洲镰孢(*Fusarium asiaticum*)、链

格孢(*Alternaria alternata*)等 7 种致病真菌的抑制作用较弱, 抑制率分别为 59.46%、58.00%、56.34%、55.00%、53.85%、53.62% 和 10.00% (图 1A、1B)。

X60 对 15 种非致病真菌表现出不同的拮抗活性, X60 对哈茨木霉菌(*Trichoderma harzianum*)、暗孢节菱孢菌(*Arthrrium phaeospermum*)、小新壳梭孢菌(*Neofusicoccum parvum*)、荨麻节菱孢(*Arthrrium urticae*)、山茶炭疽菌(*Colletotrichum camelliae*)、白球拟酵母(*Torulopsis candida*)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis menezesiana*)、枯叶格孢腔菌(*Pleospora herbarum*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、拟茎点霉菌(*Diaporthe actinidiae*)、易脆毛霉(*Mucor fragilis*)等 12 种非致病真菌具有较强的抑制作用, 抑制率分别为 77.50%、77.50%、75.00%、73.75%、72.97%、72.00%、71.25%、69.09%、68.97%、68.75%、68.00% 和 66.25%; 对小孢梭孢壳(*Thielavia microspora*)、球状匍柄霉(*Stemphylium globuliferum*)、盾壳霉(*Verruconis panacis*) 3 种非致病真菌的抑制作用较弱, 抑制率分别为 54.29%、45.45% 和 37.50% (图 1C、1D)。

2.1.2 对细菌的拮抗活性

X60 对丁香假单胞烟草致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*)、丁香假单胞杆菌角斑专化型(*Pseudomonas syringae* pv. *angulata*) 2 种致病细菌具有强拮抗活性, 抑菌圈分别为 33 mm 和 30 mm。对微小杆菌(*Exiguobacterium*)、红球菌(*Rhodococcus*)、类芽孢杆菌(*Paenibacillus*)、产碱杆菌(*Alcaligenes*)、非脱羧勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*)、假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) 7 种非致病细菌具有强拮抗活性, 抑菌圈分别为 45、32、32、32、27、25、20 mm; 对微杆菌属(*Microbacterium*)、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)、假节杆菌

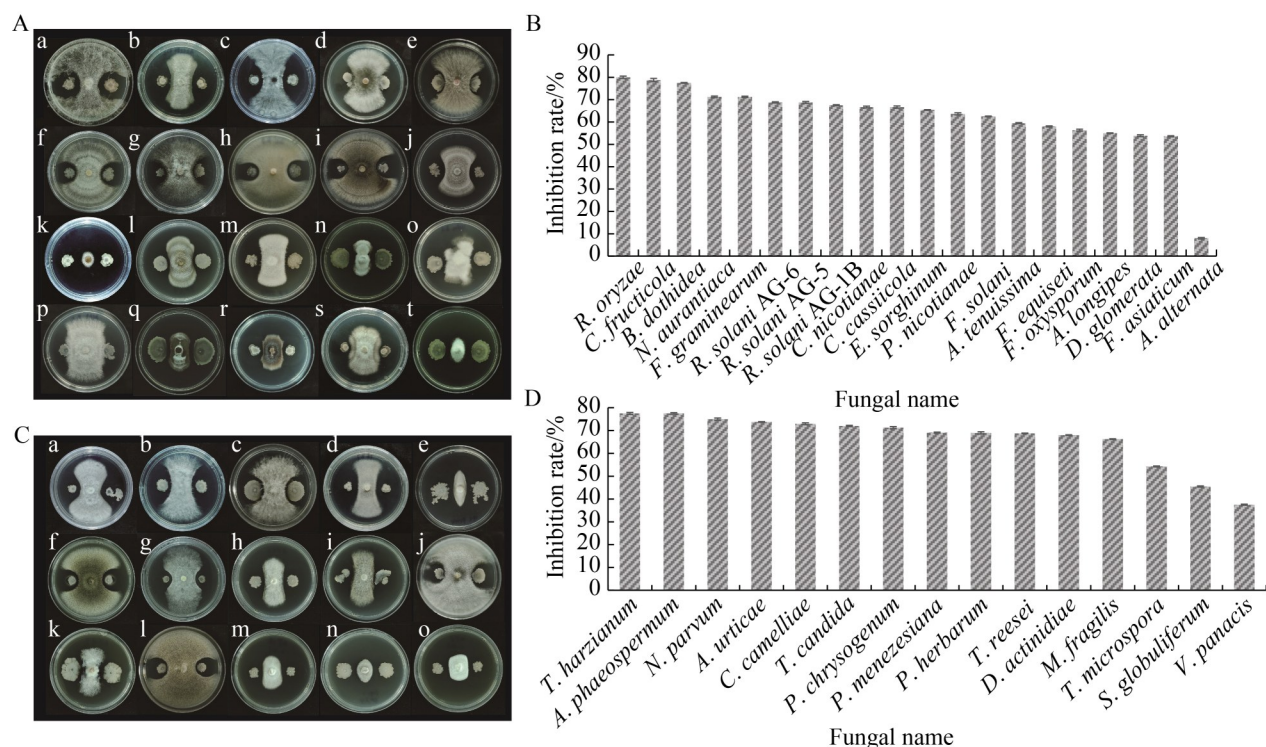


图1 解淀粉芽孢杆菌X60对叶际真菌的拮抗活性

Figure 1 Antagonistic effect of *Bacillus amyloliquefaciens* X60 to phyllosphere fungi. A: Antagonistic activity of *B. amyloliquefaciens* X60 against 20 pathogenic fungi (a: *Rhizopus oryzae*; b: *Colletotrichum fructicola*; c: *Botryosphaeria dothidea*; d: *Nigrospora aurantiaca*; e: *Fusarium graminearum*; f: *Rhizoctonia solani* AG-6; g: *Rhizoctonia solani* AG-5; h: *Rhizoctonia solani* AG-1B; i: *Cercospora nicotianae*; j: *Corynespora cassicola*; k: *Epicoccum sorghinum*; l: *Phytophthora nicotianae*; m: *Fusarium solani*; n: *Alternaria tenuissima*; o: *Fusarium equiseti*; p: *Fusarium oxysporum*; q: *Alternaria longipes*; r: *Didymella glomerata*; s: *Fusarium asiaticum*; t: *Alternaria alternata*); B: Inhibition rates of *B. amyloliquefaciens* X60 against 20 pathogenic fungi; C: Antagonistic activity of *B. amyloliquefaciens* X60 against 15 non-pathogenic fungi (a: *Trichoderma harzianum*; b: *Arthrinium phaeospermum*; c: *Neofusicoccum parvum*; d: *Arthrinium urticae*; e: *Colletotrichum camelliae*; f: *Torulopsis candida*; g: *Penicillium chrysogenum*; h: *Pestalotiopsis menezesiana*; i: *Pleospora herbarum*; j: *Trichoderma reesei*; k: *Diaporthe actinidiae*; l: *Mucor fragilis*; m: *Thielavia microspora*; n: *Stemphylium globuliferum*; o: *Verruconis panacis*); D: Inhibition rates of *B. amyloliquefaciens* X60 against 15 non-pathogenic fungi.

(*Pseudarthrobacter*) 3种非致病细菌具有弱拮抗活性, 抑菌圈分别为18、14、11 mm; 对戴尔福特菌(*Delftia*)、丛毛单胞菌(*Comamonas*)、不动杆菌(*Acinetobacter*)、驹形氏亮杆菌(*Leucobacter*)、欧式杆菌(*Erwinia*) 5种非致病细菌无拮抗活性(图2)。

2.2 解淀粉芽孢杆菌 X60 菌剂对叶斑病的田间防效及烟叶叶际微生态的影响

2.2.1 田间防效

田间防治效果调查结果显示, X60 菌剂施用后 10 d, 对叶斑病的病斑抑制率为 $(35.00 \pm 2.46)\%$, 防治效果为 $(52.35 \pm 1.22)\%$ 。

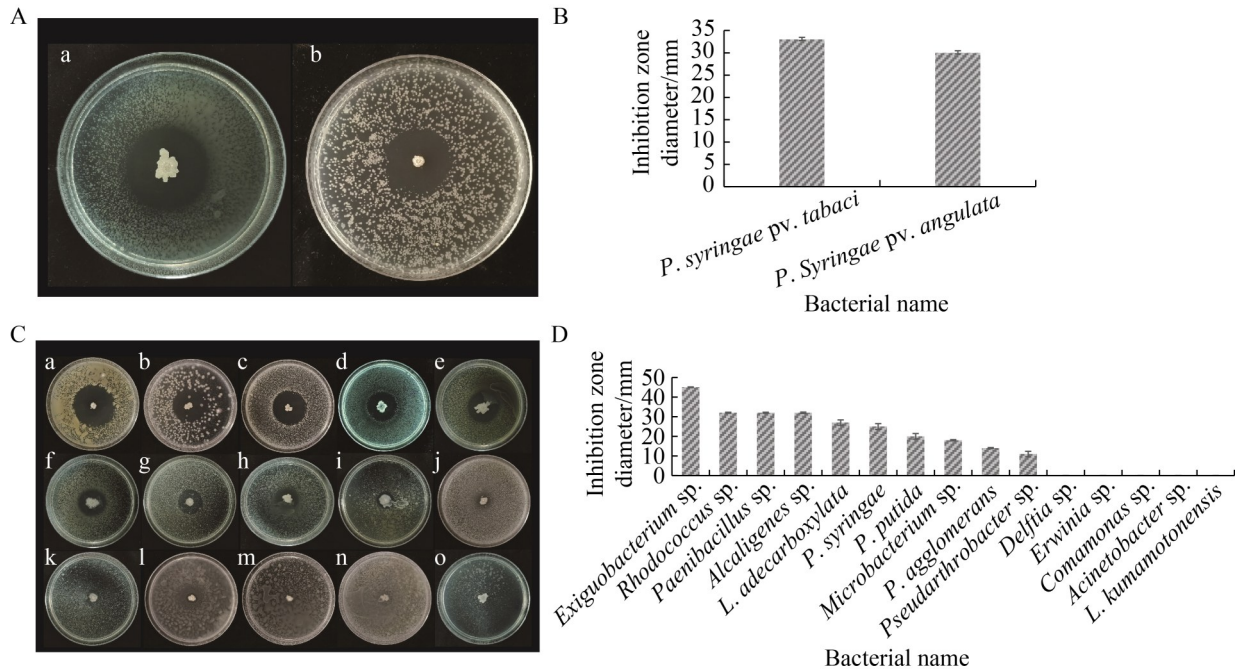


图2 解淀粉芽孢杆菌X60对叶际细菌的拮抗活性

Figure 2 Antagonistic effect of *Bacillus amyloliquefaciens* X60 to phyllosphere bacteria. A: Antagonistic activity of *B. amyloliquefaciens* X60 against 2 pathogenic bacteria (a: *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*; b: *Pseudomonas syringae* pv. *angulata*); B: Inhibition zone diameters of *Bacillus amyloliquefaciens* X60 against 2 pathogenic bacteria; C: Antagonistic activity of *B. amyloliquefaciens* X60 against 15 non-pathogenic bacteria (a: *Exiguobacterium*; b: *Rhodococcus*; c: *Paenibacillus*; d: *Alcaligenes*; e: *Leclercia adecarboxylata*; f: *Pseudomonas syringae*; g: *Pseudomonas putida*; h: *Microbacterium*; i: *Pantoea agglomerans*; j: *Pseudarthrobacter*; k: *Delftia*; l: *Comamonas*; m: *Acinetobacter*; n: *Leucobacter*; o: *Erwinia*); D: Inhibition zone diameters of *Bacillus amyloliquefaciens* X60 against 15 non-pathogenic bacteria.

2.2.2 数据质控

施用解淀粉芽孢杆菌 X60 菌剂前后, 烟叶样品 16S rRNA 基因序列和 ITS 序列经过滤和优化后分别获得 1 499 835 条和 1 398 009 条高质量序列片段, 600 550 067 个和 306 393 637 个碱基, 序列平均长度分别为 426 bp 和 226 bp。原始测序数据已存储于 NCBI 的 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), 细菌与真菌原始测序数据的 GenBank 登录号分别为 PRJNA1414225 和 PRJNA1414174。

2.2.3 叶际微生物群落基本结构特征

经聚类分析, 所有样本共获得 445 个细菌扩增子序列变体(ASVs)和 1 454 个真菌 ASVs。

各处理组样本的 ASVs 数量分布如图 3 所示: 施药前感病(XB1)和健康(XJ1)样本中分别含有 52 个和 8 个细菌 ASVs 以及 229 个和 335 个真菌 ASVs; 施药后 1 d 感病(XB2)和健康(XJ2)样本中分别含有 35 个和 43 个细菌 ASVs 以及 166 个和 216 个真菌 ASVs; 施药后 10 d 感病(XB3)和健康(XJ3)样本中分别含有 99 个和 30 个细菌 ASVs 以及 70 个和 129 个真菌 ASVs。所有 6 个细菌样本组间共有 14 个 ASVs, 占总数的 3.14%; 所有真菌样本组间共有 36 个 ASVs, 占总数的 2.48%。细菌类群中以肠杆菌目(*Enterobacterales*, 33.93%)占比最高, 其次为假单胞菌属(*Pseudomonas*, 11.91%)、泛菌属(*Pantoea*, 7.19%)和鞘氨醇单胞

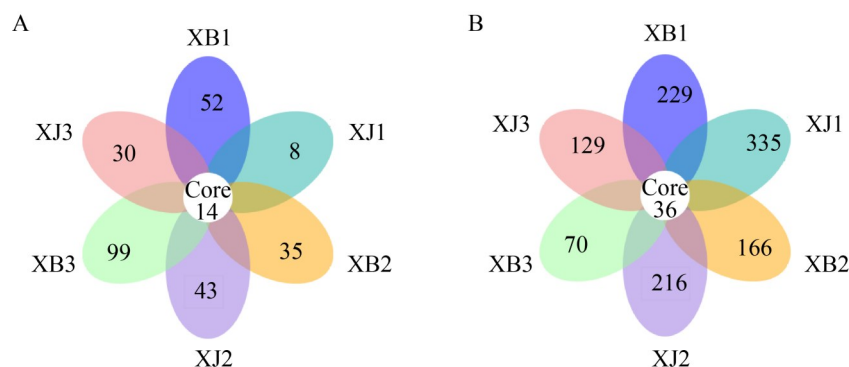


图3 解淀粉芽孢杆菌X60处理后烟叶叶际细菌(A)和真菌(B)花瓣图

Figure 3 Petal plots of bacterial (A) and fungal (B) communities in tobacco phyllosphere after treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* X60. The numbers in the diagram represent the number of unique and shared ASVs among different treatment groups. XB1: Diseased tobacco leaves before application; XJ1: Healthy tobacco leaves before application; XB2: Diseased tobacco leaves 1 day after application; XJ2: Healthy tobacco leaves 1 day after application; XB3: Diseased tobacco leaves 10 days after application; XJ3: Healthy tobacco leaves 10 days after application.

菌属(*Sphingomonas*, 7.19%)。真菌类群则以座囊菌纲(*Dothideomycetes*, 17.02%)、粪壳菌纲(*Sordariomycetes*, 12.60%)和伞菌纲(*Agaricomycetes*, 7.89%)为主要优势类群。

2.2.4 对群落多样性的影响

多样性指数(Shannon、Simpson)和丰富度指数(Chao1)结果如图4所示。施用X60前,感病组织的细菌多样性和丰富度均大于健康组织。施用X60后,感病组织的细菌多样性和丰富度在1 d时下降,在10 d时大幅度上升;健康组织的多样性和丰富度持续上升。施用X60前,感病组织的真菌丰富度显著低于健康组织,多样性指数显著高于健康组织。施用X60后,感病和健康组织的丰富度均持续下降,感病组织的多样性在1 d时显著下降,10 d时显著上升。

主成分分析(principal component analysis, PCA)用于解析感病与健康组织中真、细菌在群落组成上的差异。施用X60后,0、1、10 d导致感病与健康组织细菌组成差异的主因素PC1、PC2分别占全部影响因素的10.90%和9.33%。0 d时健康组织中的细菌不与其他时间点的组织细菌聚集,说明施药前健康组织中细菌组成与其他

时间点的组织细菌组成存在一定差异(图5A)。导致感病与健康组织真菌组成差异的主因素PC1、PC2分别占全部影响因素的21.56%和10.50%。0 d和药后10 d时感病组织的真菌组成与其他时间点的感病与健康组织真菌组成存在较大差异,说明X60的施用影响了感病组织中真菌的群落结构(图5B)。

2.2.5 对烟叶叶际微生物群落结构组成的影响

解淀粉芽孢杆菌菌剂X60施用前及施用后,门水平上的优势细菌均为假单胞菌门(*Pseudomonadota*),属水平上的优势细菌均为泛菌属(*Pantoea*)。施用X60前,该属在感病与健康烟叶中的相对丰度分别为47.08%和78.00%;施用后1 d和10 d,该属在感病与健康烟叶中的相对丰度分别为88.50%、60.68%、54.15%和45.21%。对比可知,施用X60后1 d和10 d时感病组织中泛菌属相对丰度均升高,健康组织中泛菌属相对丰度均降低。第二优势类群为假单胞菌属(*Pseudomonas*),其在0 d时感病与健康烟叶中的相对丰度分别为6.17%和1.53%;施用后1 d,其在感病组织中的相对丰度显著降低(0.01%),在健康组织中的相对丰度显著升高

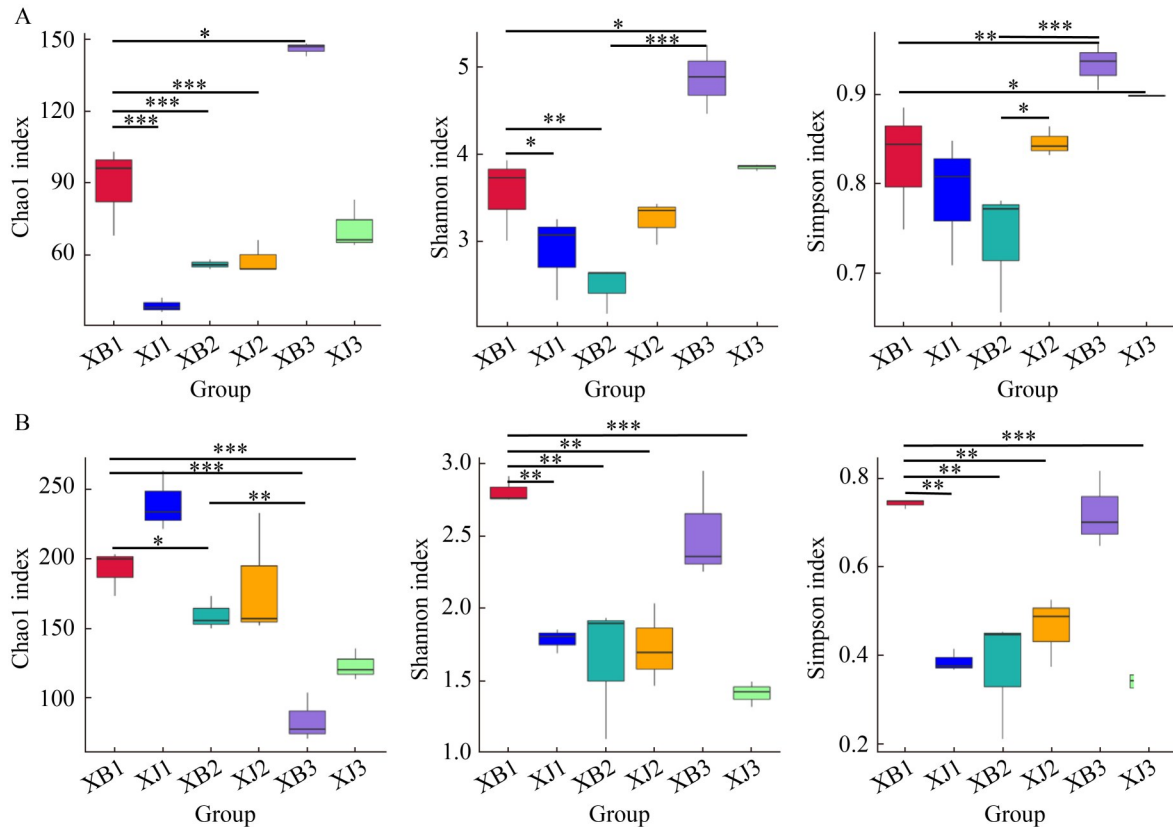


图4 解淀粉芽孢杆菌X60处理后烟叶叶际细菌(A)与真菌(B) α 多样性箱型图

Figure 4 Box plots of alpha diversity of phyllosphere bacteria (A) and fungi (B) in tobacco leaves treated with *Bacillus amyloliquefaciens* X60. ***: $P < 0.001$; **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$.

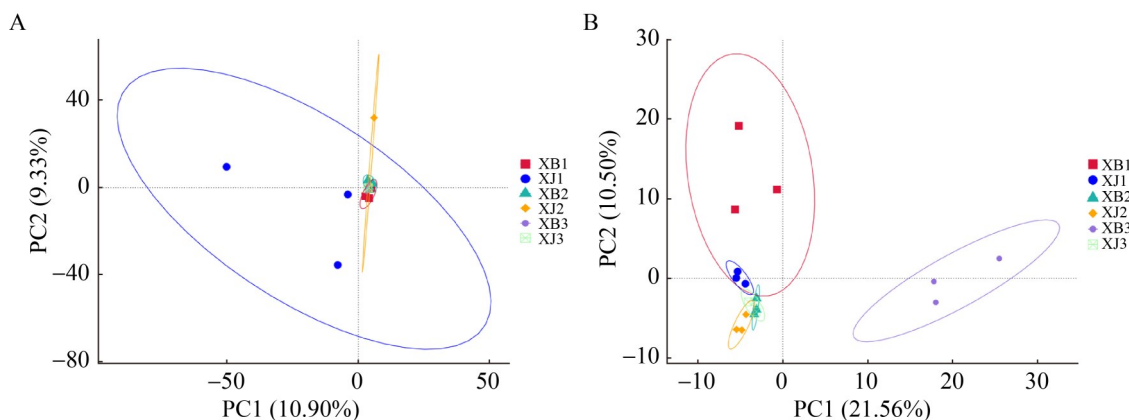


图5 解淀粉芽孢杆菌X60处理后叶际细菌(A)与真菌(B) β 多样性指数

Figure 5 Beta diversity index of bacterial (A) and fungal (B) communities in tobacco leaves after treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* X60.

(19.34%); 施用后 10 d, 假单胞菌属在感病组织中的相对丰度大幅度上升(8.00%)、在健康组织中的相对丰度大幅度下降(3.89%) (图 6A、6B)。

优势真菌分别为担子菌门(*Basidiomycota*)和子囊菌门(*Ascomycota*), 属水平上的优势真菌主要为桑帕约氏酵母属(*Sampaiozyma*), 其在施用

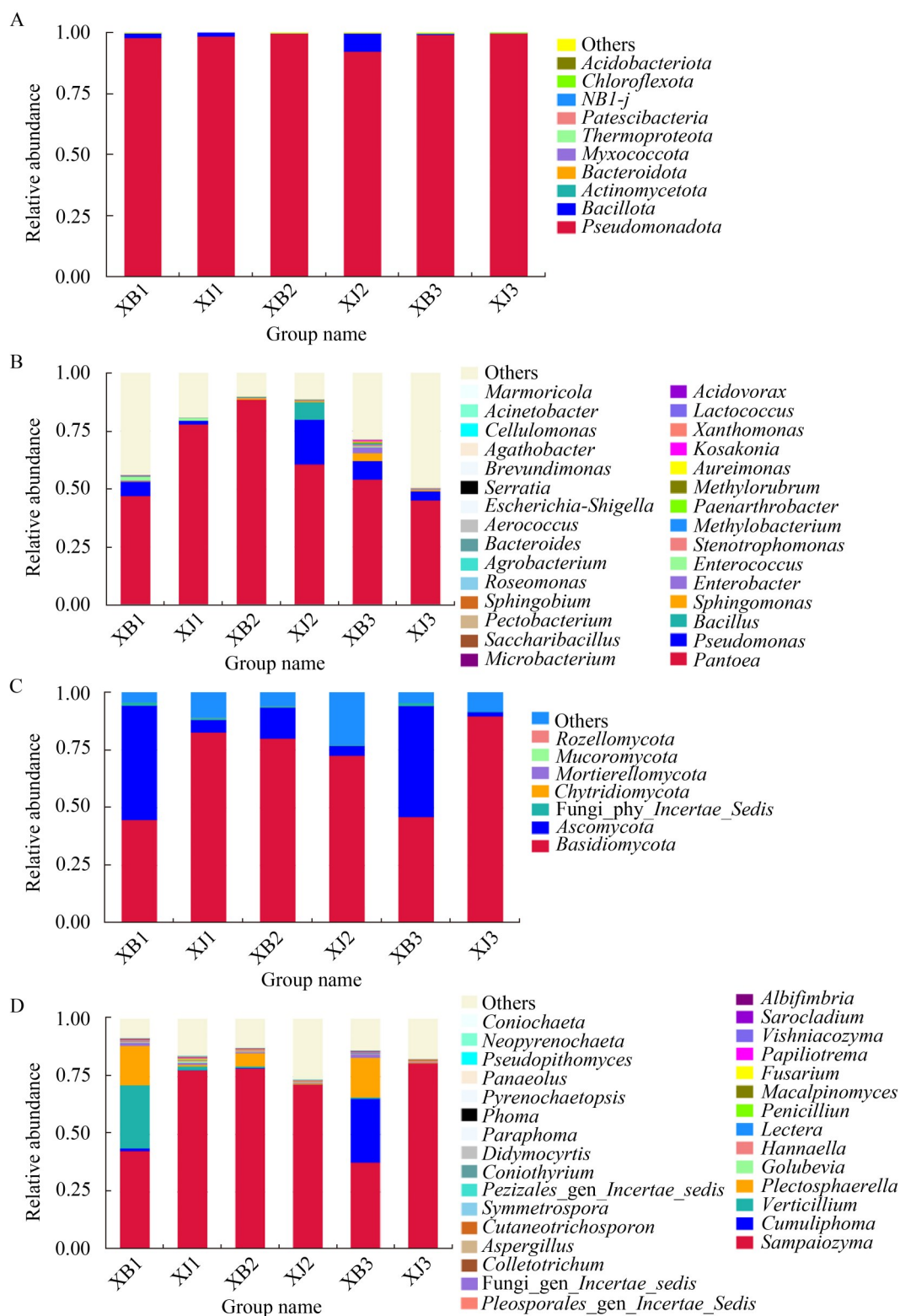


图6 解淀粉芽孢杆菌X60处理后叶际细菌(A、B)、真菌(C、D)门和属水平相对丰度

Figure 6 Relative abundance of phyllosphere bacteria (A, B) and fungi (C, D) at the phylum and genus levels after treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* X60.

X60 后 0、1、10 d 的感病和健康组织中的相对丰度分别为 42.95%、77.93%、78.60%、71.69%、37.83% 和 80.83%。施用前的感病组织中, 轮枝菌属 (*Verticillium*)、小不整球壳属 (*Plectosphaerella*) 和积霉属 (*Cumuliphoma*) 均占有较高的相对丰度, 分别为 27.44%、17.04% 和 1.01%; 施用 X60 后 1 d, 感病组织中轮枝菌属、小不整球壳属和积霉属的相对丰度均显著降低, 分别为 0.74%、5.76% 和 0.25%; 施用 X60 后 10 d, 感病组织中积霉属和小不整球壳属的相对丰度均显著升高, 分别为 27.69% 和 17.28%, 轮枝菌属的相对丰度无显著变化(0.53%)。在施用 X60 前及施用后 1 d 和 10 d 的健康组织中, 镰孢属、炭疽菌属、轮枝菌属、小不整球壳属和积霉属的相对丰度均小于 1% (图 6C、6D)。

2.2.6 对差异微生物的影响

如图 7 所示, 通过对叶际微生物群落进行 LEfSe 分析(LDA>4)发现, 解淀粉芽孢杆菌 X60 的施用对感病与健康烟叶的微生物区系产生了差异化影响。细菌群落分析表明, X60 的影响具有状态依赖性与时间动态性。在感病组织中, 处理初期(1 d)仅有肠杆菌目富集; 10 d 时富集类群增多, 包括肠杆菌科、 α -变形杆菌纲、鞘脂单胞菌目、生丝微菌目及根瘤菌科等。此模式提示 X60 可能逐渐改变了感病叶片的微环境, 从而选择了这些在代谢多样性、环境适应或微共生方面具有特定优势的细菌类群。相比之下, 健康组织对 X60 的响应更早, 处理 1 d 后即富集了以假单胞菌目、芽孢杆菌门及芽孢杆菌纲为代表的类群, 这些类群富含已知的生防菌资源, 其快速富集可能意味着 X60 迅速激活或协同了健康叶片固有的有益细菌群落。处理后 10 d, 健康组织中仅 γ -变形杆菌纲与假单胞菌门保持富集, 反映出群落从广泛响应向特定类群稳定定殖的过渡。

真菌群落分析同样揭示了处理前后的显著变化。在感病组织中, 施用 X60 前富集的类群如子囊菌门、粪壳菌纲、轮枝菌属等多包含潜在的病原真菌, 指示了病害发生时的初始群落

状态。施用 X60 后 10 d, 富集类群转变为以链格孢科、座囊菌纲、壳针孢目等为主, 这可能标志着真菌群落的优势从病原相关类群向更常见的腐生或内生类群演替, 暗示了 X60 对病原真菌的抑制或对群落结构的调控作用。在健康组织中, X60 处理 10 d 后富集了担子菌门、微球黑粉菌纲等类群, 其功能多样, 可能有助于增强群落稳定性或引入新的生态功能。

2.2.7 对功能分布的影响

功能预测分析显示, X60 处理后 1 d, 感病组织的细菌功能通路中核苷酸代谢(nucleotide metabolism)、癌症: 代谢(cancer: overview)的相对丰度显著升高, 碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)、萜类化合物和聚酮化合物的代谢(metabolism of terpenoids and polyketides)、能量代谢(energy metabolism)、膜运输(membrane transport)、翻译(translation)、内分泌系统(endocrine system)的相对丰度显著下降; 10 d 时转录(transcription)、免疫疾病(immune disease)、发育与再生(development and regeneration)的相对丰度显著上升, 核苷酸代谢(nucleotide metabolism)、癌症: 代谢(cancer: overview)的相对丰度显著下降(图 8A)。

叶际真菌经 FUNGuild 功能预测分析发现, X60 处理后 1 d, 感病组织中 Animal_Pathogen-Dung_Saprotroph-Endophyte-Plant_Saprotroph-Soil_Saprotroph-Wood_Saprotroph 营养型的相对丰度显著下降, Plant_Pathogen-Soil_Saprotroph-Wood_Saprotroph、Endophyte-Plant_Pathogen、Plant_Pathogen-Wood_Saprotroph 3 个营养型真菌的相对丰度显著上升。10 d 时 Plant_Pathogen 营养型的相对丰度显著上升, Plant_Pathogen-Soil_Saprotroph-Wood_Saprotroph、Endophyte-Plant_Pathogen、Plant_Pathogen-Wood_Saprotroph、Endophyte-Plant_Pathogen-Wood_Saprotroph、Undefined_Saprotroph-Wood_Saprotroph 5 个营养型的相对丰度显著下降(图 8B)。

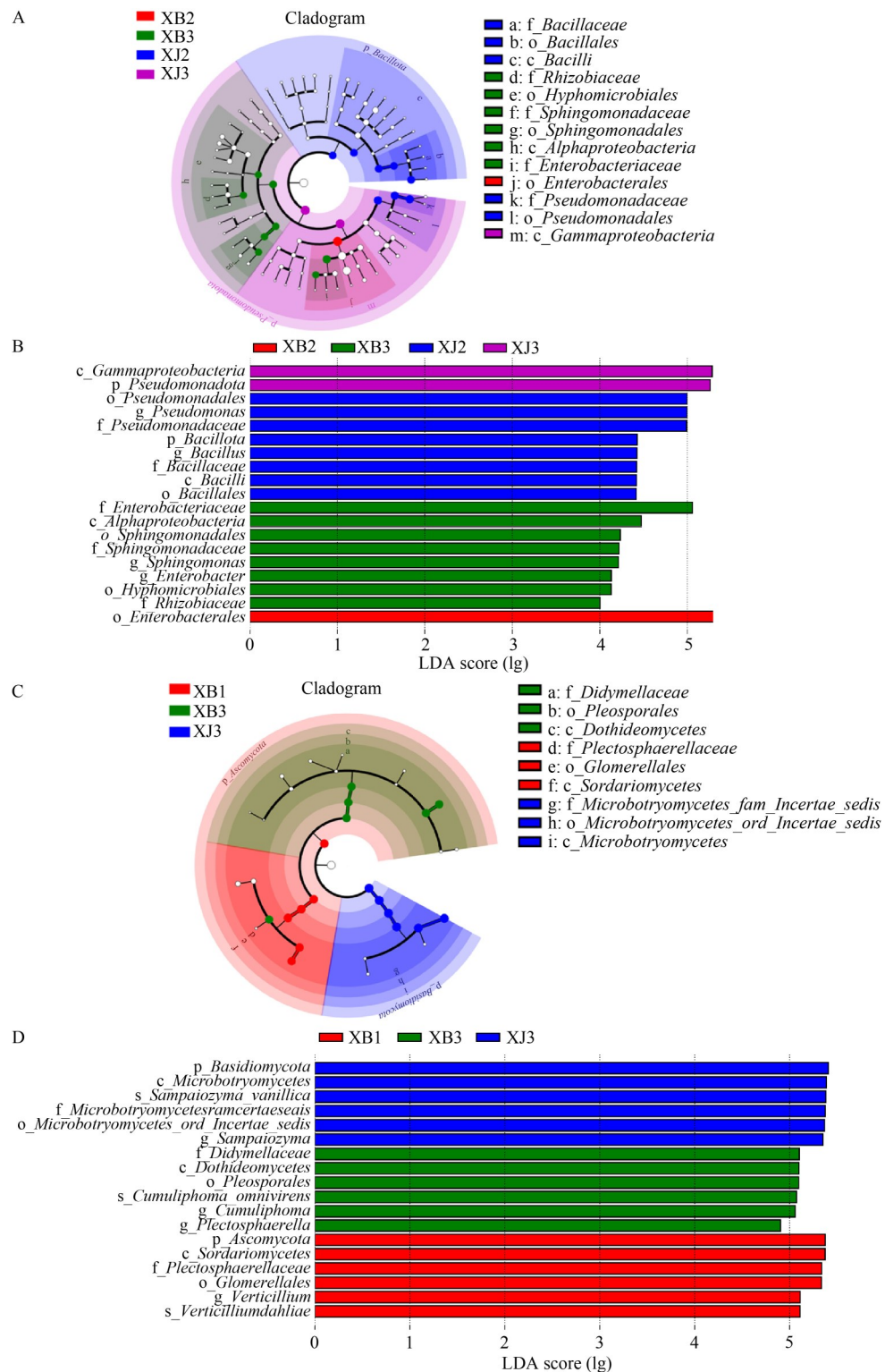


图7 不同处理组间细菌(A、B)与真菌(C、D)群落显著差异类群的LEfSe分析

Figure 7 LefSe analysis of significantly differential taxa in bacterial (A, B) and fungal (C, D) communities among different treatment groups.

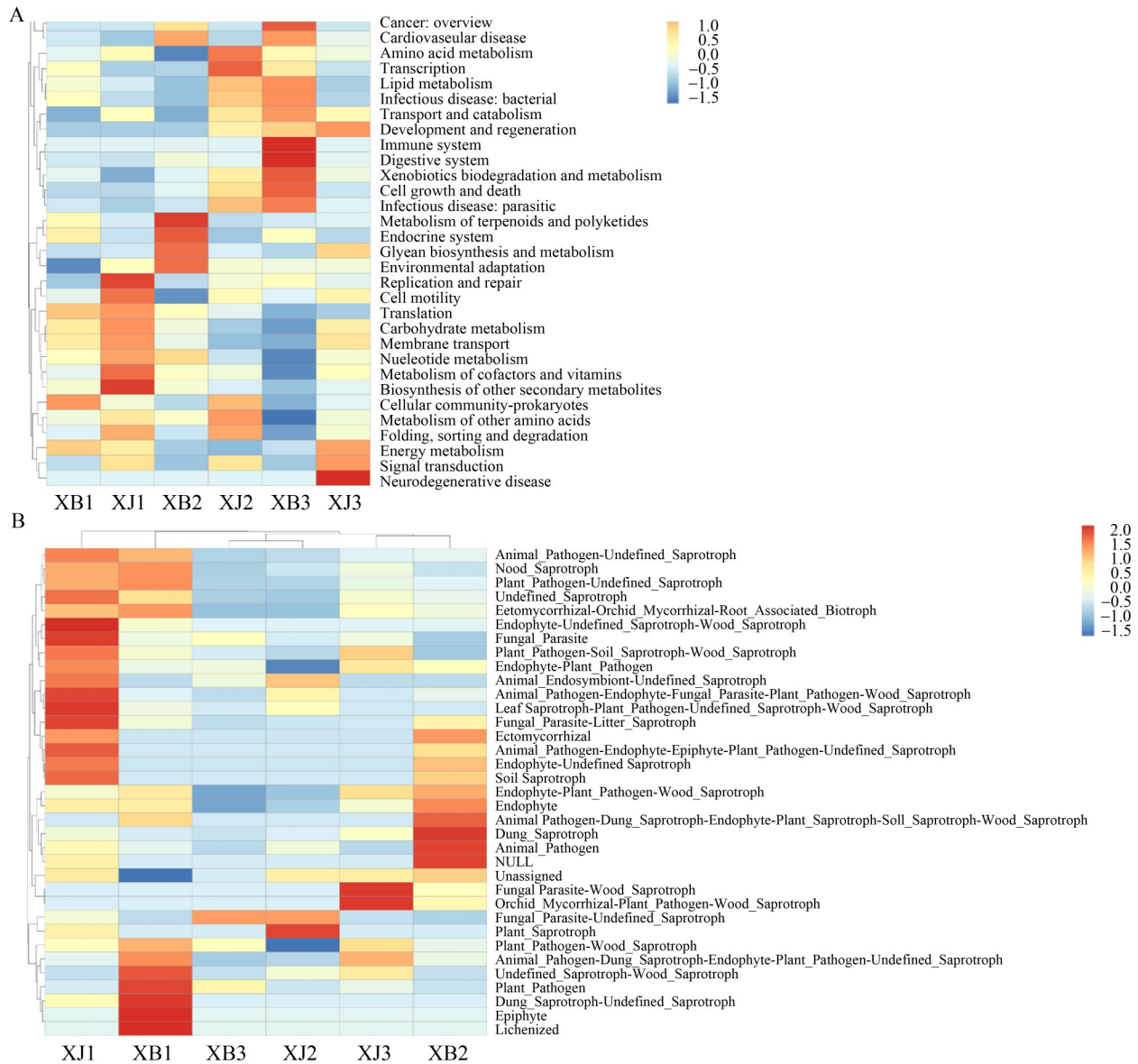


图8 解淀粉芽孢杆菌X60处理后烟叶叶际细菌(A)、真菌(B)功能预测热图

Figure 8 Functional prediction heatmap of phyllosphere bacteria (A) and fungi (B) in tobacco leaves after treatment with *Bacillus amyloliquefaciens* X60.

3 讨论

解淀粉芽孢杆菌常作为生防菌使用^[17], 已有研究表明其可影响宿主植株的次生代谢产物生物合成、植物激素信号转导等生物学功能^[18], 并被证明对包括细菌、真菌、线虫和原生动物在内的多种微生物具有活性^[19-22]。解淀粉芽孢

杆菌 D5-ARV 可分泌十五烷酸和己二酸双(2-乙基己基)酯 2 种抗菌物质, 对尖镰孢菌、禾谷镰孢、灰葡萄孢菌等多种真菌均具有抑制效果^[23]。解淀粉芽孢杆菌 JDF630 中含有伊枯草菌素和表面活性素 2 种抗菌肽, 对极细链格孢菌等引起的病害具有良好的防治效果^[24]。本研究, 解淀粉芽孢杆菌 X60 对 13 种致病真菌和 12 种非

致病真菌的拮抗活性较强,抑制率为 60.00%–80.00%;对 2 种致病细菌和 7 种非致病细菌的拮抗活性极强,抑菌圈直径均大于 20 mm。该结果与 Wang 等^[25]研究的贝莱斯芽孢杆菌 WL-23 对 5 种猕猴桃病原真菌和 2 种病原细菌的抑制效果相似,进一步证实了解淀粉芽孢杆菌 X60 抑菌活性的广谱性,对烟叶叶部多种真菌性和细菌性病原均具有抑菌活性。田间试验结果显示,解淀粉芽孢杆菌 X60 施用后 10 d,对叶斑病的病斑抑制率为 $(35.00\pm 2.46)\%$,病情防治效果为 $(52.35\pm 1.22)\%$,该结果与其他解淀粉芽孢杆菌对植物病害的防治效果相当^[26-27],进一步证实了其在植物病害防控上的应用潜力。

高通量测序分析揭示了 X60 对不同生态位致病菌的差异化调控机制。针对潜在致病菌轮枝菌属, X60 表现出强效且持久的压制能力。感病组织中轮枝菌属的相对丰度由施药前的 27.44% 骤降至施药后 1 d 的 0.74%,且在施药后 10 d 持续维持在 0.53% 的水平,表明 X60 定殖后能有效阻断轮枝菌属的次级侵染循环。此外,叶际常见的广谱性病原菌镰孢属和炭疽菌属在试验期间的相对丰度始终维持在 0.20% 以下,证实了 X60 抑菌谱的广度及其预防多病原复合侵染的潜力。施用 X60 后 1 d,感病组织的真菌 α 多样性指数(Shannon、Simpson)及丰富度指数(Chao1)均显著降低,该现象与施用 12% 苯甲氟酰胺悬浮剂后的叶际微生态演替规律高度一致^[28]。这表明高浓度外源生防菌在定殖初期通过强烈的生态位竞争与抑菌物质分泌,对包括非靶标菌在内的叶际微生物产生广谱压制。

叶际优势病原菌的演替现象揭示了生物防治中潜在的生态位竞争风险。小不整球壳属的相对丰度在 X60 施用后 1 d 由 17.04% 显著降至 5.76%,但在 10 d 后回升至 17.28%;积霉属的相对丰度在施药初期由 1.01% 被压制至 0.25%,却在 10 d 后呈爆发式增长至 27.69%,取代轮枝菌属成为感病组织中的绝对优势真菌。推测这是由于优势竞争者(如轮枝菌属)被清除后释放的

生态位真空,加之试验后期高温高湿的环境条件有利于积霉属等机会致病菌的快速增殖^[29]。这种现象在化学农药应用中也有报道,如菌核净(*Dimetachlone*)对靶斑病菌的特异性清除通常伴随非靶标真菌群落结构的重组^[30]。泛菌属作为烟草叶际的绝对优势细菌类群,其相对丰度在 X60 施用后 1 d 因竞争压力缓解而显著上升,随后在 10 d 回落至稳态,这与刘畅等^[31]关于泛菌属为烟草叶际核心种群的结论相符。与此同时,桑帕约氏酵母属作为核心功能真菌,在各处理时期均维持较高的相对丰度,表明 X60 的施入在有效打击靶标病原菌的同时具有良好的环境兼容性,未对叶际核心微生态结构造成破坏性干扰^[32]。

4 结论

本研究证实,解淀粉芽孢杆菌 X60 是一株具有广谱抑菌活性与良好田间防效的生防菌株。其对多种叶部致病真菌和细菌均表现出显著拮抗作用,田间施用对烟草叶斑病的防治效果达 52.35%,具备实际应用潜力。高通量测序进一步揭示, X60 能够快速、持续地压制轮枝菌属等关键靶标病原菌,并显著降低叶际真菌群落的多样性,其微生态演替规律与化学防治效果相似。生防菌施用后存在抑制病原菌的关键时间窗口,能有效占据其生态位。建议将 X60 施用间隔缩短至 7 d,以缩短防治间歇期从而预防次要病原菌滋生。X60 的施用并未破坏叶际核心微生物类群(如泛菌属和桑帕约氏酵母属)的稳定性,显示出较好的环境兼容性。该结果为优化生防使用策略及构建生物-化学协同防治体系提供了微生态理论依据。

作者贡献声明

张琴叶:数据收集、处理和论文撰写;蔡刘体:提供技术支持;汪汉成:研究构思和设计以及论文修改;陈兴江:参与论文讨论;陆宁:协助实验操作;李菲:参与论文讨论。

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] 金伟伟, 贾振华, 宋水山. 芽胞杆菌产生的脂肽类抗生素的结构和应用[J]. 微生物学杂志, 2017, 37(3): 122-127.
Jin WW, Jia ZH, Song SS. Structure and the application of lipopeptides antibiotics from *Bacillus*[J]. Journal of Microbiology, 2017, 37(3): 122-127 (in Chinese).
- [2] Jia QL, Fan YY, Duan SS, Qin QM, Ding Y, Yang M, Wang Y, Liu FJ, Wang C. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* XJ-BV2007 on growth of *Alternaria alternata* and production of tenuazonic acid[J]. Toxins, 2023, 15(1): 53.
- [3] 焦蓉, 刘迎龙, 赵静, 刘科新, 王军伟, 徐荣. 解淀粉芽孢杆菌 YN201728 对烟草白粉病的盆栽防效及对防御酶活性的影响[J]. 烟草科技, 2024, 57(8): 58-66.
Jiao R, Liu YL, Zhao J, Liu KX, Wang JW, Xu R. Control effect on tobacco powdery mildew in pot experiment and influences on activities of defense enzymes of *Bacillus amyloliquefaciens* YN201728[J]. Tobacco Science & Technology, 2024, 57(8): 58-66 (in Chinese).
- [4] Qi HY, Wang D, Han DF, Song J, Ali M, Dai XF, Zhang XJ, Chen JY. Unlocking antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* KRS005 to control gray mold[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1189354.
- [5] Liu L, Galileya Medison R, Zheng TW, Meng XJ, Sun ZX, Zhou Y. Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* YZU-SG146 from *Fraxinus hupehensis* against *Verticillium* wilt of cotton[J]. Biological Control, 2023, 183: 105246.
- [6] 刘畅, 汪汉成, 谢红炼, 陈乾丽, 余知和, 孙光军. 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.
Liu C, Wang HC, Xie HL, Chen QL, Yu ZH, Sun GJ. Fungal community structure analysis of tobacco leaf infected with brown spot disease[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2019, 47(7): 54-59 (in Chinese).
- [7] 孙美丽, 史彩华, 肖本青, 汪汉成, 蔡刘体, 罗飞, 王丰. 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.
Sun ML, Shi CH, Xiao BQ, Wang HC, Cai LT, Luo F, Wang F. Composition and diversity of phyllospheric microbial community in tobacco leaves infected by tobacco target spot disease[J]. Tobacco Science & Technology, 2023, 56(4): 1-9 (in Chinese).
- [8] Feng RC, Wang HC, Zhang XH, Li T, Huang CY, Zhang SB, Sun ML, Shi CH, Hu JR, Gou JY. Characteristics of *Corynespora cassiicola*, the causal agent of tobacco *Corynespora* leaf spot, revealed by genomic and metabolic phenomic analysis[J]. Scientific Reports, 2024, 14: 18326.
- [9] 张艺, 王丰, 蔡刘体, 汪汉成, 熊晶, 陈兴江. 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.
Zhang Y, Wang F, Cai LT, Wang HC, Xiong J, Chen XJ. Phyllosphere microecology of brown spot and healthy tobacco leaves after application of myclobutanil[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2024, 36(1): 156-167 (in Chinese).
- [10] 汪汉成, 王茂胜, 黄艳飞, 王进, 商胜华, 张长青. 烟草青枯病拮抗菌株 X-60 的分离鉴定及其表型组学分析[J]. 植物病理学报, 2016, 46(3): 409-419.
Wang HC, Wang MS, Huang YF, Wang J, Shang SH, Zhang CQ. Isolation, identification and phenotype microarrays analysis of an antagonistic bacterial strain X-60 against tobacco bacterial wilt[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2016, 46(3): 409-419 (in Chinese).
- [11] 汪汉成, 李文红, 蔡刘体, 孟建玉, 李珍, 陆宁, 张艺, 张兴红, 孙美丽, 冯瑞超. 一种解淀粉芽孢杆菌及其用途, CN117660240A[P]. 2024-03-08.
Wang HC, Li WH, Cai LT, Meng JY, Li Z, Lu N, Zhang Y, Zhang XH, Sun ML, Feng RC. A *Bacillus amyloliquefaciens* strain and uses thereof, CN117660240 A[P]. 2024-03-08.
- [12] Pastrana AM, Basallote-Ureba MJ, Aguado A, Akdi K, Capote N. Biological control of strawberry soil-borne pathogens *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium solani*, using *Trichoderma asperellum* and *Bacillus* spp.[J]. Phytopathologia Mediterranea, 2016, 55(1): 109-120.
- [13] 张恒, 成娟丽, 朱旭飞, 张嵩林, 闫靓文, 林金水. 拮抗植物病原真菌链霉菌菌株 ZH-356 的鉴定及其生防评价[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3421-3436.
Zhang H, Cheng JL, Zhu XF, Zhang SL, Yan LW, Lin JS. Identification and biocontrol evaluation of *Streptomyces* sp. strain ZH-356 antagonistic to plant pathogenic fungi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3421-3436 (in Chinese).
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 烟草病虫害分级及调查方法: GB/T 23222—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of China. Grade and investigation method of tobacco diseases and insect pests: GB/T 23222—2008[S]. Beijing: Beijing: Standards Press of China, 2008 (in Chinese).
- [15] 苟剑渝, 王浩强, 杨相, 温明霞, 龙星黔, 余传兴, 黄纯杨, 王依非, 龚治乾, 周红江. 贝莱斯芽孢杆菌与化学药剂协同防治烟草棒孢霉叶斑病[J]. 中国烟草科学, 2025, 46(1): 56-63, 69.
Gou JY, Wang HQ, Yang X, Wen MX, Long XQ, Yu CX, Huang CY, Wang YF, Gong ZQ, Zhou HJ. Control effect of *Bacillus velezensis* combined with chemical fungicide on tobacco leaf spot caused by *Corynespora cassiicola*[J]. Chinese Tobacco Science, 2025, 46(1): 56-63, 69 (in Chinese).
- [16] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction[J]. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1986, 51: 263-273.
- [17] Keshmirshekan A, de Souza Mesquita LM, Ventura SPM. Biocontrol manufacturing and agricultural applications of

- Bacillus velezensis*[J]. Trends in Biotechnology, 2024, 42(8): 986-1001.
- [18] Jiao R, Ahmed A, He PF, Munir S, Wu YX, Wang JW, He PB, Wang G, Yang HW, Zhao J, Lu CH, Cai YZ, He YQ. *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance in tobacco against powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2023, 42(10): 6636-6651.
- [19] Yanti Y, Habazar T, Reflinaldon R, Nasution CR, Felia S. Indigenous *Bacillus* spp. ability to growth promoting activities and control bacterial wilt disease (*Ralstonia solanacearum*)[J]. Journal of Biological Diversity, 2017, 18(4): 1562-1567.
- [20] Malik MS, Haider S, Rehman A, Rehman SU, Jamil M, Naz I, Anees M. Biological control of fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon esculentum*) by chitinolytic bacterial strains[J]. Journal of Basic Microbiology, 2022, 62(1): 48-62.
- [21] Antil S, Kumar R, Pathak DV, Kumar A, Panwar A, Kumari A. Plant growth-promoting rhizobacteria-*Bacillus cereus* KMT-5 and *B. megaterium* KMT-8 effectively suppressed *Meloidogyne javanica* infection[J]. Applied Soil Ecology, 2022, 174: 104419.
- [22] Arif S, Liaquat F, Yang SL, Shah IH, Zhao LN, Xiong X, Garcia D, Zhang YD. Exogenous inoculation of endophytic bacterium *Bacillus cereus* suppresses clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) occurrence in pak choi (*Brassica campestris* sp. *chinensis* L.)[J]. Planta, 2021, 253(2): 25.
- [23] Karličić V, Jovičić -Petrović J, Kljujev I, Lalević B, Hamidović S, Nikolić M, Raičević V. Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* D5 ARV metabolites[J]. Acta Agriculturae Serbica, 2024, 29(58): 27-33.
- [24] 许子怡, 宋小飞, 赵文义, 王华玲, 曾健勇, 李会平. 解淀粉芽孢杆菌 JDF630 脂肽抑制菌活性与成分鉴定[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2630-2638.
- Xu ZY, Song XF, Zhao WY, Wang HL, Zeng JY, Li HP. Antifungal activity and components of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* JDF630[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2630-2638 (in Chinese).
- [25] Wang BC, Guo YS, Chen XT, Ma JL, Lei X, Wang WZ, Long YH. Assessment of the Biocontrol Potential of *Bacillus velezensis* WL-23 against Kiwifruit Canker Caused by *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*[J]. International journal of molecular sciences, 2023, 24 (14): 11541.
- [26] 朱録媛, 崔国兵, 孙文达, 尹凯, 毕新萍, 邓懿祯. 甘蔗内生解淀粉芽孢杆菌 CGB15 的分离、鉴定及生防活性[J]. 微生物学报, 2022, 62(5): 1698-1710.
- Zhu LY, Cui GB, Sun WD, Yin K, Bi XP, Deng YZ. Isolation, identification, and biocontrol activity of an endophytic strain *Bacillus amyloliquefaciens* CGB15 from sugarcane[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(5): 1698-1710 (in Chinese).
- [27] Li B, He XX, Guo SY, Li DX, Wang YN, Meng XL, Dai PB, Hu TL, Cao KQ, Wang ST. Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* BA-4 and its biocontrol potential against *Fusarium*-related apple replant disease[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1370440.
- [28] Li T, Wang HC, Ye G, Wang Q, Brice NN, Wang F, Cai LT, Feng RC, Zhang SB. Variations of phyllosphere microorganisms in asymptomatic and tobacco brown spot leaves before and after spraying 12% difenoconazole+ fluxapyroxad SC[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2024, 26(5): 932-948.
- [29] 安宣鲜, 桑维钧, 张得平, 李昊熙, 杨江敏, 雷雪梅, 王五权, 杨茂发. 烟草叶斑病菌 *Cumuliphoma indica* 的生物学特性及室内药剂筛选[J]. 热带作物学报, 2024, 45(4): 847-854.
- An XX, Sang WJ, Zhang DP, Li HX, Yang JM, Lei XM, Wang WQ, Yang MF. Biological characteristics of tobacco leaf spot pathogen and laboratory screening of fungicides[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(4): 847-854 (in Chinese).
- [30] 郭沫言, 熊晶, 汪汉成, 张艺, 蔡刘体, 陈兴江, 史彩华. 菌核净对烟草靶斑病菌的抑制作用及对烟叶叶际微生物群落结构的影响[J]. 农药学学报, 2023, 25(4): 858-869.
- Guo MY, Xiong J, Wang HC, Zhang Y, Cai LT, Chen XJ, Shi CH. Inhibitory effect of dimetachlone on tobacco target spot pathogens and the effect on the structure of phyllosphere microbial community in tobacco[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2023, 25(4): 858-869 (in Chinese).
- [31] 刘畅, 汪汉成, 谢红炼, 向立刚, 黄宇, 陈乾丽, 余知和, 邹光进. 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.
- Liu C, Wang HC, Xie HL, Xiang LG, Huang Y, Chen QL, Yu ZH, Zou GJ. Biodiversity analysis of phyllosphere bacterial genus from tobacco leaves infected by brown spot disease[J]. Tobacco Science & Technology, 2020, 53(2): 8-14 (in Chinese).
- [32] 成渝, 刘京, 高英明, 周家喜, 苟剑渝, 管景强, 邹晓. 初烤和复烤对烟叶真菌群落结构的影响[J]. 烟草科技, 2022, 55(5): 9-16.
- Cheng Y, Liu J, Gao YM, Zhou JX, Gou JY, Guan JQ, Zou X. Effects of flue-curing and redrying on fungal community structure of tobacco leaves[J]. Tobacco Science & Technology, 2022, 55(5): 9-16 (in Chinese).