



## 研究报告

## 拮抗菌群对烟草野火病的防治效果及叶际微生物群落多样性的影响

刘天波<sup>1,2</sup> 滕凯<sup>3</sup> 周向平<sup>3</sup> 蔡海林<sup>3</sup> 肖志鹏<sup>3</sup> 肖艳松<sup>3</sup> 杨红武<sup>3</sup> 尹华群<sup>4</sup>  
周志成<sup>\*1,2</sup> 易图永<sup>\*1</sup>

1 湖南农业大学植物保护学院 湖南 长沙 410128

2 中国烟草中南农业试验站 湖南 长沙 410004

3 湖南省烟草公司 湖南 长沙 410004

4 中南大学资源加工与生物工程学院 湖南 长沙 410083

**摘要:**【背景】烟草野火病(Tobacco Wild Fire)是烟草上的主要病害之一,利用拮抗菌防治烟草野火病是具有较好前景的防治手段。【目的】分析烟草叶际微生物群落结构组成和多样性,阐释拮抗菌群施用对烟草野火病的防治效果及对叶际微生物群落的影响。【方法】在烟草上施用3种拮抗菌群,采用16S rRNA基因高通量测序及生物信息学手段,分析拮抗菌群对烟草叶际微生物群落结构组成和多样性的影响,研究拮抗菌群在叶片上的定殖。【结果】拮抗菌群对烟草野火病的防治效果达到50.44%–68.58%。与对照相比,3种拮抗菌群处理叶际微生物群落结构和组成都产生了明显的变化,群落多样性显著增高。拮抗菌群处理后,烟草叶际微生物泛菌(*Pantoea*)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)和假单胞菌(*Pseudomonas*)等菌属所占比例发生显著变化,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)和寡养单胞菌属相比对照增加分别达到3.9倍和7.02倍,其丰度与病情指数显著负相关。【结论】拮抗菌群对烟草野火病有较好的防治效果,施用拮抗菌群显著影响叶际微生物群落的组成和多样性,假单胞杆菌和寡养单胞菌等优势菌属能够在烟草叶际定殖,起到防治烟草野火病的作用。

**关键词:** 烟草野火病, 拮抗菌群, 叶际微生物, 群落结构, 多样性

**Foundation item:** Science and Technology Project of Hunan Tobacco Company (HN2020KJ02)

**\*Corresponding authors:** Tel: 86-731-85799294

E-mail: ZHOU Zhicheng: zhouzc@hntobacco.com; YI Tuyong: yituyong@hunau.net

**Received:** 19-08-2020; **Accepted:** 13-12-2020; **Published online:** 15-03-2021

**基金项目:** 湖南省烟草公司科技项目(HN2020KJ02)

**\*通信作者:** Tel: 0731-85799294

E-mail: 周志成: zhouzc@hntobacco.com; 易图永: yituyong@hunau.net

**收稿日期:** 2020-08-19; **接受日期:** 2020-12-13; **网络首发日期:** 2021-03-15

## Effects of antagonistic bacteria on tobacco wild fire and responses of phyllosphere microbiota

LIU Tianbo<sup>1,2</sup> TENG Kai<sup>3</sup> ZHOU Xiangping<sup>3</sup> CAI Hailin<sup>3</sup> XIAO Zhipeng<sup>3</sup>  
XIAO Yansong<sup>3</sup> YANG Hongwu<sup>3</sup> YIN Huaqun<sup>4</sup> ZHOU Zhicheng<sup>\*1,2</sup> YI Tuyong<sup>\*1</sup>

1 College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China

2 Central South Agricultural Experiment Station of China Tobacco, Changsha, Hunan 410004, China

3 Hunan Tobacco Corporation, Changsha, Hunan 410004, China

4 School of Minerals Processing and Bioengineering, Central South University, Changsha, Hunan 410083, China

**Abstract:** [Background] Tobacco wild fire is one of the main diseases on tobacco. It is a promising method to control tobacco wild fire with antagonistic bacteria. [Objective] To analyze the composition and diversity of microbial community in tobacco leaf, and explain the control effect of antagonistic bacteria on tobacco wild fire. [Methods] Three antagonistic groups were applied to tobacco, and the effects of antagonistic groups on the structure and diversity of tobacco leaf microbial community were analyzed by 16S rRNA gene high-throughput sequencing and bioinformatics. [Results] The control effect of antagonistic bacteria on tobacco wild fire reached 50.44%–68.58%. The community structure and composition of antagonistic groups had significant changes, was significantly higher community diversity, compared with the control group. After treatment with antagonistic flora, the proportion of tobacco leaf microflora, such as *Pantoea*, *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas*, changed significantly, *Bacillus* and *Stenotrophomonas* increased by 3.9 and 7.02 times, respectively, compared with the control. The abundance was negatively correlated with disease index. [Conclusion] The antagonistic bacteria had a good control effect on tobacco wild fire. The composition and diversity of the microbial community in the tobacco leaves were significantly affected by the application of antagonistic bacteria. The dominant bacteria such as *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* could colonize in the tobacco leaves and play a role in controlling tobacco wild fire.

**Keywords:** tobacco wild fire, antagonistic bacteria groups, phyllosphere microbial, community structure, diversity

烟草野火病是烟草上主要病害之一,在世界烟区普遍发生,其中中国烟区主要在黑龙江、辽宁、山东等地发生,每年给烟叶生产造成重大损失<sup>[1-2]</sup>。烟草野火病的传统防治方法主要为施用化学药剂<sup>[3]</sup>,而化学农药带来抗药性、生态系统的破坏以及农药残留等问题越来越严重,亟需开发利用有效且环保的生物防治方法防治病害<sup>[4]</sup>。

开发利用有益微生物的生物防治方法具有较好前景,受到人们的普遍关注。微生物菌剂施用已成为目前防治烟草野火病的重要措施<sup>[5]</sup>。近年来,人们从植物和土壤中分离微生物来控制烟草野火病,如从烟草叶片中分离得到一种拮抗菌(枯草芽孢杆菌)<sup>[6]</sup>,对野火病菌有明显的抑制作用,能够有效防治烟草野火病。与单一靶向生防菌相比,生防菌群的适应能力更强,更容易在新环境中定殖,

对植物病害的防控效果更好<sup>[7]</sup>。Liu 等<sup>[8]</sup>利用筛选到的拮抗菌群来防治烟草黑胫病,田间防效达到50%以上。Qin 等<sup>[9]</sup>在烟草叶片上喷洒生防菌剂可以极大地改变叶面微生物群落,能够有效抑制烟草野火病的发生。

叶际是微生物群落的栖息地,叶际微生物是植物生态系统的重要组成部分<sup>[10]</sup>。有益微生物直接作用于病原菌以及其他叶际微生物,或者在植物叶际定殖并改变微生物群落结构,起到控制病害的作用<sup>[11]</sup>。因此,研究有益微生物对叶际微生物群落结构和多样性的影响,明确其在叶际定殖与否,对烟草野火病的防治很有必要。目前大多研究集中在有益微生物对病害的防治效果,而对有益微生物施用后的叶际微生物群落结构和多样性研究鲜有报道。本研究将前期研究获得的对烟草野火病菌有较

好拮抗作用的3种拮抗菌群施用于烟草,采用16S rRNA基因高通量测序技术,分析拮抗菌群对烟草叶际微生物群落组成及多样性的影响,以期对烟草病害的生物防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

本实验室前期通过拮抗试验从健康烟叶中分离出对烟草野火病菌有较好的抑制作用的3种拮抗菌群A、B、C,主要由寡养单胞菌(*Stenotrophomonas*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌(*Bacillus*)等属组成。

### 1.2 主要试剂和仪器

提取细菌DNA试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,北京全式金生物技术有限公司;*rTaq*酶、dNTP、DNA Marker,宝生物工程(大连)有限公司;其他试剂及化学药品为国产分析纯。

小型台式高速离心机, Eppendorf公司;PCR仪,赛默飞世尔科技公司;电泳仪、凝胶成像分析系统, Bio-Rad公司; MiSeq测序仪, Illumina公司。

### 1.3 小区试验设计

2017年5-7月在湖南龙山县试验基地(109°25'E, 29°14'N)进行小区试验,种植品种为‘云烟87’,按当地优质烟叶生产技术要求进行栽培管理。设拮抗菌群A、拮抗菌群B、拮抗菌群C、春雷霉素和空白对照5个处理,每处理3个小区(重复),每个小区30株烟(约20 m<sup>2</sup>),共15个小区。在田间初见烟草野火病零星病斑时开始处理,拮抗菌群浓度1×10<sup>9</sup> CFU/mL,田间按7.5 L/hm<sup>2</sup>施用,春雷霉素(4%可湿性粉剂)按1.8 L/hm<sup>2</sup>,分别兑水7 500 kg/hm<sup>2</sup>施用。每7 d施用1次,正反面均匀喷施叶片,共施3次,田间不施用其他病虫害防治药剂。

### 1.4 病害调查及样品采集

参照国家标准 GB/T 23222-2008 调查每个处理烟草野火病病情指数,统计防治效果。以叶为调查单位,每个小区随机选取10株烟上的全部叶片调查,从第一次施用后14、21和28 d调查,共调

查3次,计算病情指数及防治效果。

从第一次喷施后0、14、28 d随机从每个小区15株烟上采集8个叶片样本,分别装入自封袋放入低温保藏箱后运回实验室。实验室中取叶片25 g放入三角瓶,加入50 mL灭过菌的磷酸盐缓冲液,25 °C、170 r/min振摇30 min,收集菌悬液,重复收集3次后,4 °C、12 000 r/min离心20 min,弃上清液,收集菌液。用无菌水洗脱得到的菌斑,收集至1.5 mL离心管,用于提取细菌DNA。

### 1.5 叶际微生物DNA提取、扩增及测序

按照Xiao等<sup>[12]</sup>方法对收集的细菌提取DNA、16S rRNA基因PCR扩增及测序。提取细菌DNA参照试剂盒的说明书,采用通用引物515F(5'-GTG CCAGCMGCCGCGGTAA-3')和806R(5'-GGACTA CHVGGGTWCTAAT-3')扩增16S rRNA基因<sup>[13]</sup>,PCR反应体系和条件(程序)参照杨红武<sup>[14]</sup>的方法,16S rRNA基因文库构建和测序在Illumina MiSeq测序仪上进行<sup>[15]</sup>,测序数据参照文献<sup>[16-18]</sup>处理。

### 1.6 微生物多样性分析

在R统计平台(V3.6.1)上进行微生物群落的统计分析<sup>[19]</sup>。采用香农指数、均匀度指数和辛普森指数分析微生物群落的多样性<sup>[20]</sup>,用非度量多维尺度(Nonmetric Multidimensional Scaling, NMDS)、去趋势对应分析(Detrended Correspondence Analysis, DCA)比较不同细菌群落结构差异,通过单因素方差分析不同组分之间的差异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌群对野火病的防效

田间小区试验烟草野火病发生情况调查结果表明(表1),随着时间延长,烟草野火病的病情指数逐渐升高,拮抗菌群处理病情指数比对照显著较低。拮抗菌群处理后14 d,防治效果为19.37%~40.84%;处理后28 d,防治效果达到最高,3种拮抗菌群的防治效果均在50%以上,其中拮抗菌群C的防治效果最好,达到68.58%,且防治效果优于化学药剂。

表 1 不同处理对烟草野火病的防治效果  
Table 1 Control effect of antagonistic bacteria on tobacco wild fire

处理 Treatment	14 d		21 d		28 d	
	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect (%)	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect (%)	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect (%)
拮抗菌群 A Antagonistic microflora A	1.45±0.02b	24.08±1.34b	1.13±0.03bc	40.21±1.45ab	3.36±0.04b	50.44±1.45c
拮抗菌群 B Antagonistic microflora B	1.54±0.05ab	19.37±1.07c	1.28±0.08b	32.28±1.76b	3.25±0.05b	52.06±1.56bc
拮抗菌群 C Antagonistic microflora C	1.13±0.04c	40.84±1.87ab	1.07±0.02c	43.39±1.87a	2.13±0.03c	68.58±1.68a
4%春雷霉素 4% chunleimycin	1.09±0.04c	42.93±1.26a	1.09±0.03c	42.33±1.08a	3.16±0.05bc	53.39±1.53b
对照 Control	1.91±0.03a		1.89±0.05a		6.78±0.06a	

注：不同小写字母表示差异达到显著( $P<0.05$ )水平  
Note: Different lowercase letters indicate that the difference reaches a significant ( $P<0.05$ ) level

2.2 拮抗菌群群落组成

在属水平上对原始拮抗菌群和施用拮抗菌群 28 d 后的烟草叶际细菌的群落组成(细菌群落的物种构成成分)进行分析, 结果表明, 寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)和短杆菌属(*Brevibacterium*)为原始拮抗菌群的主要组成, 丰度占菌群的 49.4%–99.1%, 这 3 个属可能为发挥拮抗作用的主要菌属(图 1A); 施用拮抗菌群 28 d 后(图 1B), 与空白对照相比, 细菌群落组成发生了一定程度的改变, 拮抗菌群处理的细菌群落主要组成均为泛菌属(*Pantoea*)、寡养单胞菌属和假单胞菌属(*Pseudomonas*), 但不同属所占比例差异显著, 其中施用拮抗菌群 B 的群落组成差异最大, 说明加入拮抗菌群对原始微生物群落的组成会造成不同程度的影响。

2.3 多样性分析

2.3.1 多样性指数分析

利用多样性指数分析叶际微生物的多样性(表 2), 结果显示, 对照组喷施前(0 d)和喷施后 28 d 相比, 多样性指数显著降低, 说明随着病情的发展, 细菌群落多样性变得单一, 群落均一度降低。

与对照相比, 28 d 后拮抗菌群 A 和拮抗菌群 C 处理的群落香农指数、均匀度指数和辛普森指数变化不显著, 而拮抗菌群 B 处理显著增加, 表明施用拮抗菌群 A 和拮抗菌群 C 改变叶际细菌的多样性和均匀度不明显, 而拮抗菌群 B 可以显著增加群落多样性和均匀度。

2.3.2 DCA 分析

DCA 分析结果显示(图 2), 不同处理之间分开聚类, 拮抗菌群 A 处理与对照区分不明显, 拮抗菌群 B、C 处理群落组成与对照区分明显, 说明拮抗菌群 B、C 处理的叶际细菌群落结构与对照存在显著差异。

2.3.3 NMDS 分析

NMDS 分析结果显示(图 3), 在 NMDS 图上拮抗菌群 A 与对照距离较近且存在部分重叠, 表明拮抗菌群 A 处理与对照的群落相似度最高; 拮抗菌群 B 和拮抗菌群 C 处理的微生物群落距离与对照相距较远, 说明群落相似度降低, 即拮抗菌群 B、C 处理的群落组成与对照组发生更为显著的变化, NMDS 分析结果与 DCA 分析结果相似。

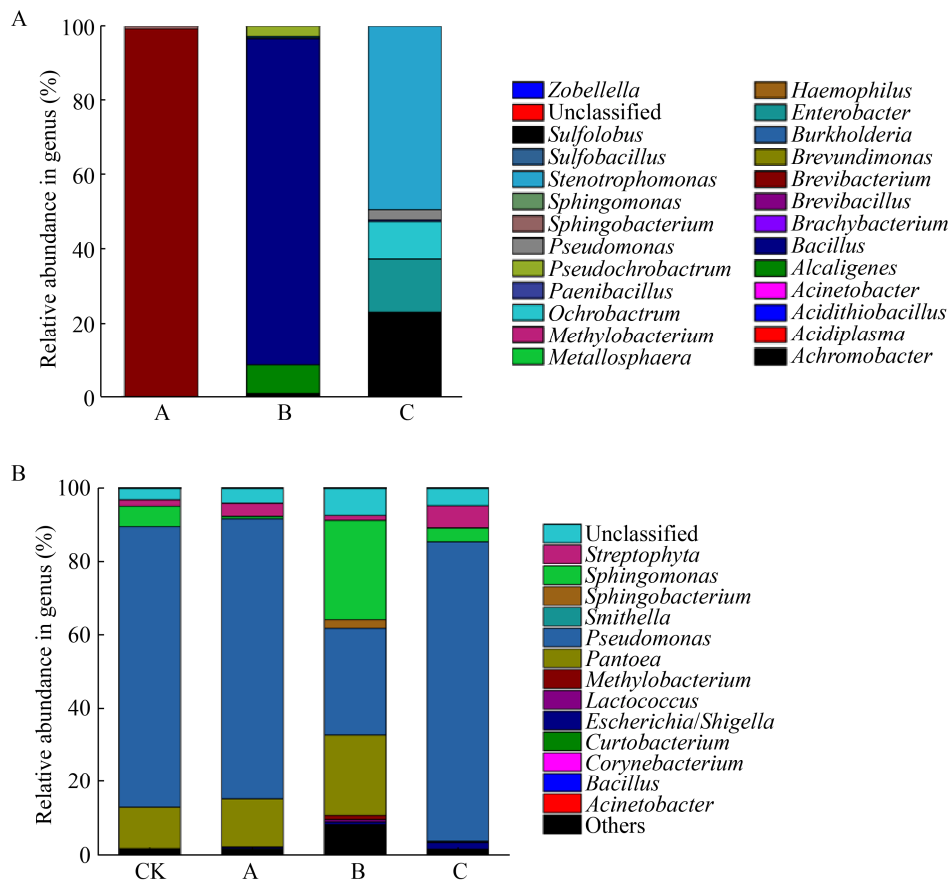


图 1 原始拮抗菌群(A)和施用拮抗菌群 28 d 后(B)细菌群落在属水平上的相对丰度  
Figure 1 The relative abundance of original antagonistic microflora (A) and 28 days after application (B) at the genus level

表 2 多样性指数分析  
Table 2 Diversity index analysis

处理时间 Time (d)	处理 Treatment	香农指数 Shannon index ( <i>H</i> )	均匀度指数 Pielou evenness ( <i>J</i> )	辛普森指数 Simpson index ( <i>1/D</i> )
0	对照 Control	1.947±0.146	0.372±0.029	3.408±0.376
14	对照 Control	3.085±0.431a	0.508±0.066a	12.945±3.914a
	拮抗菌群 Antagonistic microflora A	3.065±0.358a	0.536±0.045a	13.403±3.722a
	拮抗菌群 Antagonistic microflora B	2.085±0.072a	0.473±0.007a	5.465±0.394a
	拮抗菌群 Antagonistic microflora C	2.394±0.121a	0.517±0.013a	5.954±0.449a
28	对照 Control	0.819±0.311b	0.183±0.062b	2.030±0.579b
	拮抗菌群 Antagonistic microflora A	0.846±0.336b	0.164±0.053b	2.082±0.617b
	拮抗菌群 Antagonistic microflora B	2.361±0.134a	0.425±0.018a	4.573±0.321a
	拮抗菌群 Antagonistic microflora C	1.126±0.101b	0.221±0.012b	1.621±0.062b

注：不同小写字母表示差异达到显著( $P<0.05$ )水平  
Note: Different lowercase letters indicate that the difference reaches a significant ( $P<0.05$ ) level

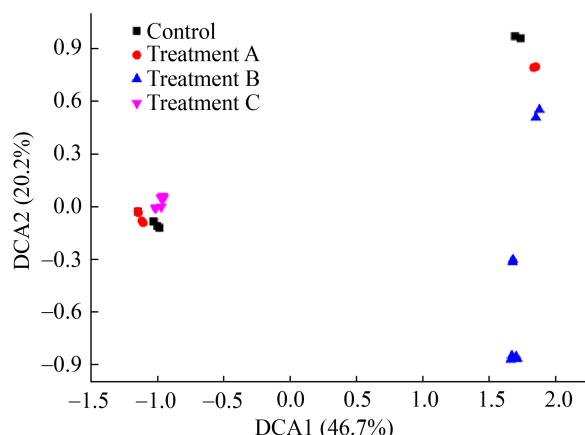


图2 不同处理之间 DCA 分析

Figure 2 Detrended correspondence analysis (DCA) between different treatments

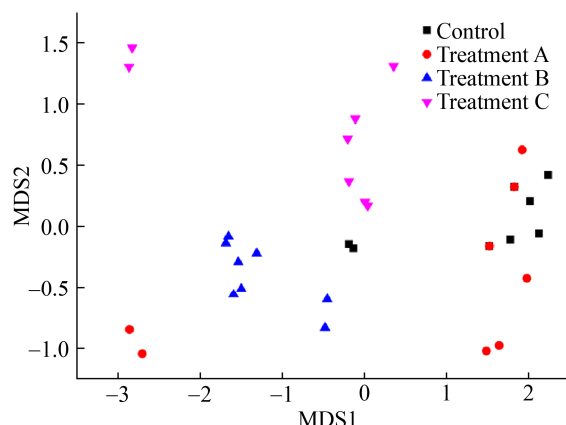


图3 不同处理间 NMDS 分析

Figure 3 Nonmetric multidimensional scaling (NMDS) analysis between different treatments

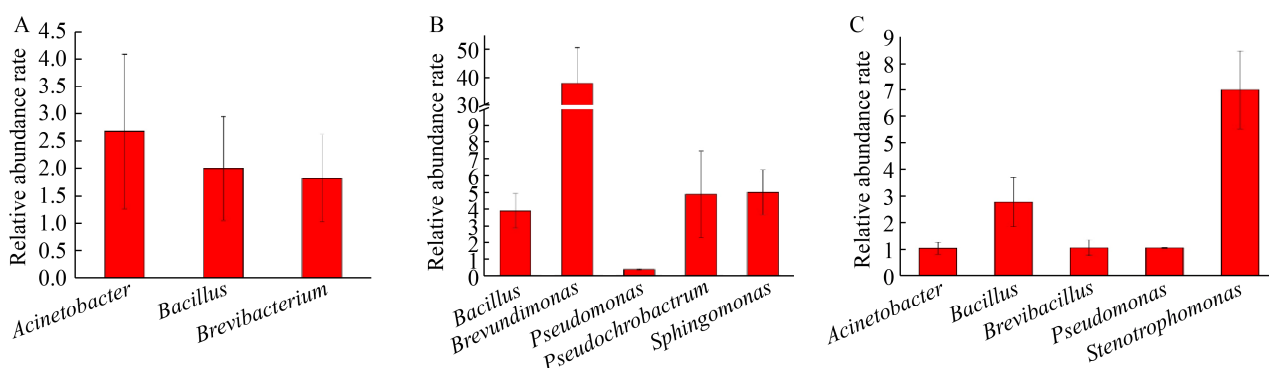


图4 施用拮抗菌群 A (A)、B (B)、C (C) 28 d 后各处理与空白对照的优势菌属相对丰度比

Figure 4 The relative abundance ratio of dominant bacteria between the treatment group and the control group after 28 d of application of antagonistic microflora A (A), B (B) and C (C)

## 2.4 拮抗菌群优势菌属在叶片上的定殖分析

对比施用拮抗菌群 28 d 后 3 个拮抗菌群处理与空白处理的优势菌属相对丰度比值, 结果表明, 施用拮抗菌群 A 后, 相比空白处理不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和短芽孢杆菌属 (*Brevibacillus*) 这 3 个属相对丰度显著增加, 其中不动杆菌属、芽孢杆菌属的相对丰度增加最为明显, 分别是对照的 2.68 和 1.95 倍 (图 4A); 施用拮抗菌群 B 后, 假苍白杆菌 (*Pseudochrobactrum*)、鞘脂单胞菌、芽孢杆菌和单胞菌 (*Brevundimonas*) 等菌属相比空白处理增加, 假苍白杆菌属、鞘脂单胞菌属和芽孢杆菌属比值达到 4 倍以上, 单胞菌属增加最大, 其相对丰度是对照的 38.6 倍 (图 4B); 施用拮抗菌群 C 后, 寡养单胞菌属、芽孢杆菌属、不动杆菌属、短芽孢杆菌属和假单胞菌属相比空白处理有所增加, 其中寡养单胞菌属和芽孢杆菌属增加比值较大, 分别达到 7.02 倍和 2.9 倍 (图 4C)。从以上结果可知, 在施用 3 种拮抗菌群 28 d 后, 与对照相比, 寡养单胞菌属、苍白杆菌属、假单胞和芽孢杆菌属等优势菌属均能增殖 (相对丰度比值大于 1), 表明 3 种拮抗菌群均能在叶片较好地定殖。

拮抗菌剂施用后其中的功能微生物在烟草叶际微生物群落中定殖, 导致其对应的细菌相对丰度发生显著增加 (图 5)。拮抗菌群 A 群落的优势物种是短杆菌属 (*Brevibacterium*) 的 OTU\_7 (相对丰度

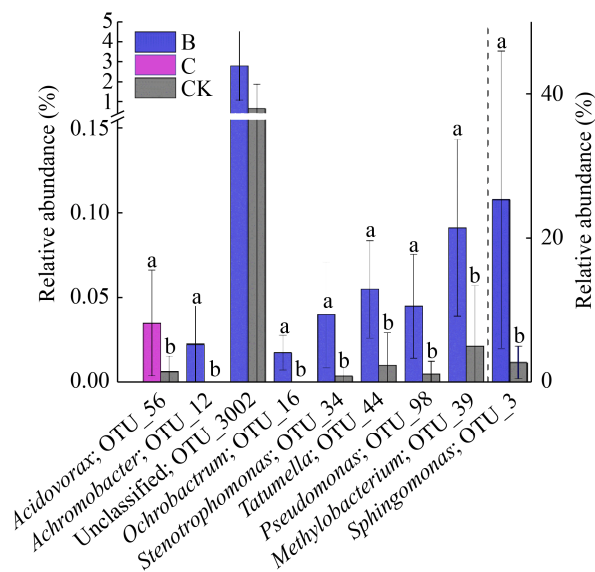


图5 烟草叶际微生物群落中的菌剂功能微生物相对丰度变化

Figure 5 The relative abundance of bacteria from biocontrol agents in phyllosphere microbial communities

98.74%), 在菌群 A 处理过的烟草叶际微生物群落中没有有效定殖, 其他相对丰度较低的物种在叶际微生物群落中也没有发生显著性变化; 拮抗菌群 B 群落中的优势物种鞘脂单胞菌属的 OTU\_3 和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)的 OTU\_3002, 在拮抗菌群 B 处理后的烟草叶际微生物群落中, 甲基杆菌属(*Methylobacterium*)的 OTU\_39、寡养单胞菌属的 OTU\_34、塔特姆氏菌属(*Tatumella*)的 OTU\_44 和

假单胞菌属的 OTU\_98 等这些菌属相对丰度较低, 但增加显著, 而且检测到了无色杆菌属(*Achromobacter*)的 OTU\_12 和苍白杆菌属的 OTU\_16; 嗜酸菌属(*Acidovorax*) OTU\_56 在拮抗菌剂 C 处理过的烟草叶际微生物群落中显著增加。

## 2.5 微生物丰度与烟草野火病病情指数的相关性

对施用拮抗菌群 28 d 后的烟草叶际微生物优势菌属和病情指数进行相关性分析(图 6), 结果显示, 叶际微生物中芽孢杆菌属和寡养单胞菌属的相对丰度越高, 则病情指数越低, 表明此 2 个优势菌属的相对丰度与病情指数呈负相关, 而且相关性达到显著( $P < 0.05$ )。表明多次施用拮抗菌群后, 芽孢杆菌属和寡养单胞菌属可以在烟草叶际定殖, 对烟草野火病的发生起到较好的抑制作用。

## 3 讨论与结论

利用生物菌剂是防治植物病害的有效措施之一, 研究应用也越来越多。本研究发现田间施用 3 个拮抗菌群后, 能够降低田间烟草野火病的病情指数, 对烟草野火病有较好的防治效果, 其中拮抗菌群 C 防治效果好于化学农药, 防治效果达到 50% 以上。这与王娜娜<sup>[21]</sup>通过盆栽和大田试验证明芽孢杆菌对烟草野火病有明显的控制效果结论相一致, 效果好于韩欣宇等<sup>[22]</sup>筛选出多种枯草芽孢杆菌及发酵液的代谢产物对烟草野火病的防治效果。

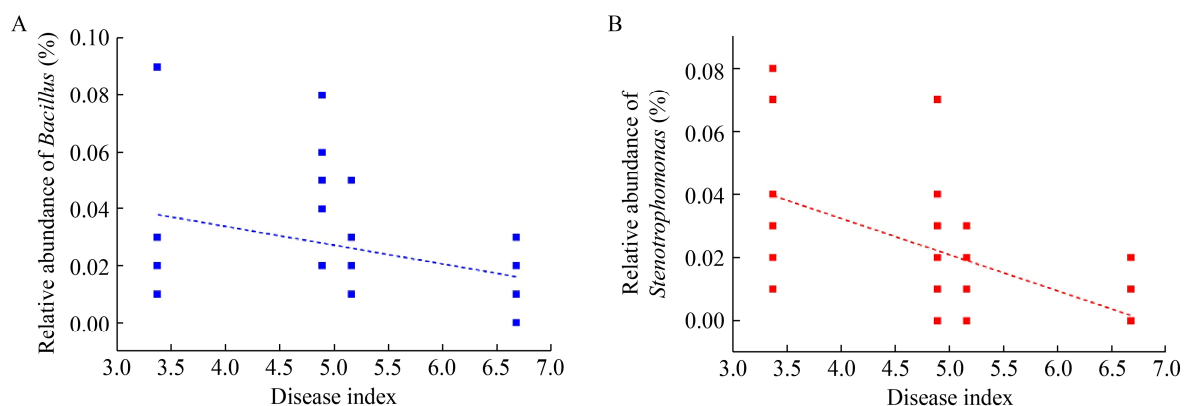


图6 优势菌芽孢杆菌属(A)和寡养单胞菌属(B)相对丰度与烟草野火病病情指数的相关性

Figure 6 The correlation between the abundance of *Bacillus* (A) and *Stenotrophomonas* (B) and the disease index of tobacco wild fire



细菌群落与植物病害的关系是微生物生态学和植物病害生物防治的重要课题<sup>[23]</sup>。以往在生物防治方面的研究主要集中在细菌群落在植物病害发生中的重要作用,很少有研究涉及拮抗菌群、叶际微生物群落与植物病害之间的潜在相互作用<sup>[24]</sup>。微生物菌剂可通过激活植物微生物群落,即改变植物叶际或根际微生物的种群丰度或群落结构,发挥防治病害的作用<sup>[25]</sup>。本研究分析了拮抗菌群对烟草叶际微生物群落结构组成的影响,拮抗菌群处理的细菌群落中假单胞菌属、鞘氨醇单胞菌属和泛菌属所占比例较对照差异显著,说明施用拮抗菌群显著改变了叶际微生物群落组成。假单胞菌属可以作为一种拮抗菌,用于防治植物细菌和真菌病害;鞘氨醇单胞菌属是一种有益微生物,可以通过竞争保护植物免受病原菌侵害;泛菌属可作为生防菌剂或植物生长促进剂。本研究结果显示在施用拮抗菌群后,假单胞菌属、鞘脂单胞菌属和泛菌属作为优势菌属在叶际微生物群落中发生了显著改变,表明这些菌属在抑制病害方面起了重要作用,与万秀清等<sup>[26]</sup>和 Innerebner 等<sup>[27]</sup>研究结果一致。

拮抗菌发挥生防作用的关键是其能够在叶际定殖<sup>[28]</sup>。本研究对 3 个拮抗菌群处理后群落组成与对照组进行比较分析,发现施用 3 种拮抗菌群后,拮抗菌群中含有寡养单胞菌属、假单胞菌和芽孢杆菌属等优势菌属在处理组群落中均能显著增加,而且拮抗菌群中的物种(OTU)在对应处理组叶际微生物群落中的相对丰度显著增加,表明拮抗菌群已较好地定殖。同时,将定殖芽孢杆菌属和寡养单胞菌属和病情指数进行相关性分析,发现它们的相对丰度与烟草野火病的病情指数负相关,再次证明拮抗菌群能够较好地定殖,对病害发生的严重程度发挥了抑制作用。以上定殖分析结果仅为初步推断,下一步将分离优势功能菌属中起关键作用的微生物,并研究微生物之间的相互作用,以及它们在防治病害的潜在不同作用和分工,进一步揭示拮抗菌群防治病害的作用机理。

微生物群落多样性的增强能够抑制植物病害发生<sup>[29]</sup>。微生物群落多样性可以通过 Shannon、Pielou 和 Simpson 等多样性指数评价<sup>[30]</sup>。游偲等<sup>[31]</sup>用枯草芽孢杆菌处理烟草,显著提高了烟草根际土壤的细菌多样性。本研究发现拮抗菌群处理和对照的叶际微生物多样性指标(Shannon、Pielou 和 Simpson 指数)具有显著差异,DCA 和 NMDS 分析也显示 3 次施用拮抗菌群后各处理与对照组细菌群落差异显著,表明拮抗菌群处理显著改变了叶际微生物群落多样性,这些结果与黄阔等<sup>[32]</sup>研究结果一致。

本研究结果表明拮抗菌群对烟草野火病有较好的防治效果,施用拮抗菌群对叶际微生物群落的组成会造成显著影响,拮抗菌群能够在烟草叶际有效定殖,拮抗菌群施用改变了叶际微生物群落多样性。本文仅通过 16S rRNA 基因高通量测序分析了拮抗菌群对叶际微生物群落结构与多样性,下一步将进行拮抗菌群对烟草叶际微生物真菌的群落结构与多样性研究,探求相互作用关系,为揭示拮抗菌群的作用机理提供更充足的理论支撑。

## REFERENCES

- [1] Ramegowda V, Senthil-Kumar M, Ishiga Y, Kaundal A, Udayakumar M, Mysore KS. Drought stress acclimation imparts tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Pseudomonas syringae* in *Nicotiana benthamiana*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(5): 9497-9513
- [2] Wang ZG, Ding W. Research progress in tobacco wild fire disease's occurrence and control[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2012, 18(2): 101-106 (in Chinese)  
王振国, 丁伟. 烟草野火病发生与防治的研究进展[J]. 中国烟草学报, 2012, 18(2): 101-106
- [3] Tang M, Xie B, Cheng ZM, Xiang JY, Rao ZS, Cai Y, Huang S, Yang P, Yang YD, Yang Y, et al. Pathogenicity differentiation and biological characteristics of *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* and effective bactericide screening in Yibin tobacco planting areas[J]. Tobacco Science & Technology, 2016, 49(10): 9-14 (in Chinese)  
唐明, 谢冰, 程智敏, 向金友, 饶在生, 蔡毅, 黄胜, 杨苹, 杨懿德, 杨洋, 等. 宜宾烟区烤烟野火病的致病力分化、



- 生物学特性及抑菌药剂筛选[J]. 烟草科技, 2016, 49(10): 9-14
- [4] Stumbriene K, Gudiukaite R, Semaskiene R, Svegzda P, Jonaviciene A, Suproniene S. Screening of new bacterial isolates with antifungal activity and application of selected *Bacillus* sp. cultures for biocontrol of *Fusarium graminearum* under field conditions[J]. Crop Protection, 2018, 113: 22-28
- [5] Santhanam R, Luu VT, Weinhold A, Goldberg J, Oh Y, Baldwin IT. Native root-associated bacteria rescue a plant from a sudden-wilt disease that emerged during continuous cropping[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015, 112(36): E5013-E5020
- [6] Sun HW, Yuan Y, Yang XM, Sun JP. Screening, identification and application of antagonistic bacteria against tobacco wild fire disease[J]. Tobacco Science & Technology, 2012, 45(8): 84-88 (in Chinese)  
孙宏伟, 元野, 杨晓敏, 孙剑萍. 烟草野火病拮抗生防菌的筛选、鉴定与应用[J]. 烟草科技, 2012, 45(8): 84-88
- [7] Delgado-Baquerizo M, Maestre FT, Reich PB, Jeffries TC, Gaitan JJ, Encinar D, Berdugo M, Campbell CD, Singh BK. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems[J]. Nature Communications, 2016, 7: 10541
- [8] Liu TB, Xiao YH, Yin J, Yi TY, Zhou ZC, Hsiang T, Tang QJ, Chen W. Effects of cultured root and soil microbial communities on the disease of *Nicotiana tabacum* caused by *Phytophthora nicotianae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 929
- [9] Qin C, Tao JM, Liu TB, Liu YJ, Xiao NW, Li TM, Gu YB, Yin HQ, Meng DL. Responses of phyllosphere microbiota and plant health to application of two different biocontrol agents[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 1-13
- [10] Vorholt JA. Microbial life in the phyllosphere[J]. Nature Reviews Microbiology, 2012, 10(12): 828-840
- [11] Gu LK, Bai ZH, Jin B, Hu Q, Wang HL, Zhuang GQ, Zhang HX. Assessing the impact of fungicide enostroburin application on bacterial community in wheat phyllosphere[J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(1): 134-141
- [12] Xiao YH, Liu XD, Meng DL, Tao JM, Gu YB, Yin HQ, Li J. The role of soil bacterial community during winter fallow period in the incidence of tobacco bacterial wilt disease[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(5): 2399-2412
- [13] Gregory Caporaso J, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms[J]. The ISME Journal, 2012, 6(8): 1621-1624
- [14] Yang HW. Relationship between three tobacco diseases and the microbial communities in soil under different farming system and phyllosphere[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan Agricultural University, 2018 (in Chinese)  
杨红武. 不同耕作制土壤和叶面微生物群落与三种烟草病害的关系[D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2018
- [15] Langille MGI, Zaneveld J, Gregory Caporaso J, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepile DE, Vega Thurber RL, Knight R, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. Nature Biotechnology, 2013, 31(9): 814-821
- [16] Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection[J]. Bioinformatics, 2011, 27(16): 2194-2200
- [17] Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461
- [18] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267
- [19] Tao JM, Meng DL, Qin C, Liu XD, Liang YL, Xiao YH, Liu ZH, Gu YB, Li J, Yin HQ. Integrated network analysis reveals the importance of microbial interactions for maize growth[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(8): 3805-3818
- [20] Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology[J]. Journal of Vegetation Science, 2003, 14(6): 927-930
- [21] Wang NN. Screening, identification and evaluation of resistance to tobacco wild fire in resources of antagonistic strains[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2012 (in Chinese)  
王娜娜. 烟草野火病菌拮抗菌的筛选、鉴定及控病研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2012
- [22] Han XY, Chen ZH, Luo DQ, Lin Y, Zhang CS. Study on antimicrobial activity and stability of bioactive metabolite produced by Tpb55 strain fermentation[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2012, 28(27): 260-264 (in Chinese)  
韩欣宇, 陈志厚, 罗定棋, 林勇, 张成省. Tpb55 菌株发酵液中活性代谢产物的抑菌作用及稳定性测定[J]. 中国农学通报, 2012, 28(27): 260-264
- [23] Wang R, Zhang HC, Sun LG, Qi GF, Chen S, Zhao XY. Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 343
- [24] Yang HW, Li J, Xiao YH, Gu YB, Liu HW, Liang YL, Liu XD, Hu J, Meng DL, Yin HQ. An integrated insight into the relationship between soil microbial community and tobacco bacterial wilt disease[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2179
- [25] Podolich O, Ardanov P, Zaets I, Pirttilä AM, Kozyrovska N. Reviving of the endophytic bacterial community as a

- putative mechanism of plant resistance[J]. *Plant and Soil*, 2015, 388(1/2): 367-377
- [26] Wan XQ, Guo ZK, Qiao C, Li LJ, Ren WH, Yang L, Mou WF. Inhibition and field control effects of *Pseudomonas fluorescens* PF7-5 against *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2009, 42(10): 58-60 (in Chinese)  
万秀清, 郭兆奎, 乔婵, 李丽杰, 任文宏, 杨林, 牟伟峰. PF7-5 对烟草野火病的抑制及田间防治效果[J]. *烟草科技*, 2009, 42(10): 58-60
- [27] Innerebner G, Knief C, Vorholt JA. Protection of *Arabidopsis thaliana* against leaf-pathogenic *Pseudomonas syringae* by *Sphingomonas* strains in a controlled model system[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(10): 3202-3210
- [28] Rastogi G, Sbodio A, Tech JJ, Suslow TV, Coaker GL, Leveau JHJ. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce[J]. *The ISME Journal*, 2012, 6(10): 1812-1822
- [29] Mazzola M, Freilich S. Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes[J]. *Phytopathology*®, 2017, 107(3): 256-263
- [30] Gregory Caporaso J, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [31] You C, Zhang LM, Ji SG, Gao JM, Zhang CS, Kong FY. Impact of biocontrol agent *Bacillus subtilis* on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2014, 25(11): 3323-3330 (in Chinese)  
游僊, 张立猛, 计思贵, 高加明, 张成省, 孔凡玉. 枯草芽孢杆菌菌剂对烟草根际土壤细菌群落的影响[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(11): 3323-3330
- [32] Huang K, Jiang QP, Yao XY, Wang Y, Jiang LQ, Ding W, Zhang YQ. Effects of microbial agents on tobacco root-knot nematode and diversity of rhizosphere microbial communities[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2019, 40(5): 36-43 (in Chinese)  
黄阔, 江其鹏, 姚晓远, 王勇, 江连强, 丁伟, 张永强. 微生物菌剂对烟草根结线虫及根际微生物群落多样性的影响[J]. *中国烟草科学*, 2019, 40(5): 36-43