



研究报告

噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥防控番茄青枯病的效果研究

王佳宁 王玉鑫 侯如娇 杨天杰* 王孝芳 江高飞 韦中 徐阳春 沈其荣

南京农业大学资源与环境科学学院 江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室 江苏省有机固体废弃物资源化协同创新中心 资源节约型肥料教育部工程研究中心 国家有机类肥料工程技术研究中心
江苏 南京 210095

摘要:【背景】前期研究表明,可专性感染青枯菌的噬菌体鸡尾酒(组合)可有效减少番茄青枯病的发生。生物有机肥虽然可降低青枯病发病率,但受田间环境影响,防控效果常不稳定。【目的】为了提高生物有机肥的防控效果,靶向抑制番茄青枯病,探究噬菌体鸡尾酒联合含有解淀粉芽孢杆菌的生物有机肥防控番茄青枯病的田间效果,以及该防控方法对番茄根际细菌群落结构的影响。【方法】将经解淀粉芽孢杆菌 T-5 二次发酵获得的生物有机肥(Bio-Organic Fertilizer, BOF)在春季作为基肥施入番茄大棚,开花期在番茄根部浇灌噬菌体鸡尾酒悬液,统计青枯病的发生情况和番茄根际青枯菌的数量,根据高通量测序结果分析番茄根际细菌群落的结构变化。【结果】与常规施肥相比,生物有机肥配合噬菌体鸡尾酒(BOF+P)可显著降低番茄青枯病的发病率,显著改变根际细菌群落的 β 多样性,提高拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的相对丰度,并降低芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)的相对丰度。【结论】噬菌体鸡尾酒可显著提升生物有机肥防控番茄青枯病的效果,具有良好的应用潜力。

关键词: 噬菌体鸡尾酒, 生物有机肥, 土传青枯病, 生物防控

Biocontrol of phage cocktail combined with bio-organic fertilizer on tomato bacterial wilt

WANG Jianing WANG Yuxin HOU Rujiao YANG Tianjie* WANG Xiaofang
JIANG Gaofei WEI Zhong XU Yangchun SHEN Qirong

College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Jiangsu Provincial Key Laboratory of Organic Solid Waste Utilization, Jiangsu Collaborative Innovation Center for Solid Organic Waste Resource Utilization, Educational Ministry Engineering Center of Resource-Saving Fertilizers, National Engineering Research Center for Organic-Based Fertilizers, Nanjing, Jiangsu 210095, China

Abstract: [Background] Previous studies have shown that phage cocktails (multi phage combinations) specifically infecting *Ralstonia solanacearum* significantly reduce bacterial wilt occurrence. Though bio-organic fertilizer (BOF) can suppress disease incidence of bacterial wilt, its inhibitive effects are not stable due to complex environment in the fields. [Objective] In order to improve biocontrol efficiency of

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (42090064, 42007025); Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20180527, BK20200533)

*Corresponding author: E-mail: tjyang@njau.edu.cn

Received: 31-05-2021; Accepted: 09-08-2021; Published online: 17-08-2021

基金项目: 国家自然科学基金(42090064, 42007025); 江苏省自然科学基金(BK20180527, BK20200533)

*通信作者: E-mail: tjyang@njau.edu.cn

收稿日期: 2021-05-31; 接受日期: 2021-08-09; 网络首发日期: 2021-08-17

BOF and targeted suppress bacterial wilt, we explored the effect of phage cocktail combined with bio-organic fertilizer fermented by *Bacillus amyloliquefaciens* on the biocontrol of tomato bacterial wilt. Meanwhile, impacts of this method on the population of *R. solanacearum* and the bacterial community in the rhizosphere was also investigated. **[Methods]** BOF obtained by the secondary fermentation of *B. amyloliquefaciens* T-5 was applied as a base fertilizer in spring in the greenhouse. Phage cocktail which contained four lytic phages of *R. solanacearum* were soil-drenched during the flowering period of tomato. The incidences of bacterial wilt and the abundance of *R. solanacearum* in tomato rhizosphere were measured. Changes of bacterial communities were analyzed via high-throughput sequencing. **[Results]** Compared with conventional fertilization, the combination of bio-organic fertilizer and phage cocktail (BOF+P) significantly reduce the incidence of tomato bacterial wilt. Beta-diversity was significantly changed after treated with BOF+P, among which relative abundance of *Bacteroidetes* increased but *Gemmatimonadetes* reduced. **[Conclusion]** Phage cocktail combined can improve bio-control efficiency of BOF significantly, which indicates an application potential.

Keywords: phage cocktail, bio-organic fertilizer, soil borne bacterial wilt, biocontrol

植物土传病害是土壤学领域面临的重大难题之一。以土传青枯病为例,其是由茄科劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*, 以下称为青枯菌)引起的一种细菌性维管束病害。青枯菌分布在除南极洲以外的所有大陆,其寄主达 450 余种^[1-2]。物理和化学防控方式虽然见效快,但使用过程中破坏了土壤的生态平衡;还会造成土传病害的再次大规模暴发,不利于农业生产的可持续发展。近年来,将有抑菌功能的有益微生物与有机肥料结合制成生物有机肥,成为一种新型的土传病害防控方式,也逐渐成为研究的热点。有机肥料为功能菌提供营养载体,这为有益菌在根际定殖提供了前提条件,使得功能菌能够与土著微生物有效竞争,并产生抑制病原菌的拮抗物质^[3]。同时有机肥料又能够提升土壤肥力,促进作物生长^[4-5]。但由于田间环境的复杂多变,生物有机肥的防控效果往往并不稳定,联合其他生物防控手段则可提升其生防稳定性^[6]。噬菌体因可靶向防控病原菌并减少病原菌产生抗生素抗性,其应用逐渐成为土传病害防控的关注点^[7-8]。

噬菌体是一种细菌病毒的总称,其中的烈性噬菌体可以靶定宿主特异性受体,将宿主菌裂解。根据这一特性,筛选出能够专性感染病原菌的烈性噬菌体作为生防制剂,可降低病原菌种群数量、降低

病害发生率^[9]。但由于细菌具备多种抵抗噬菌体感染机制^[10],使用单一噬菌体在实际应用中的效果可能不稳定。为了克服病原菌对噬菌体产生抗性、延长噬菌体治疗效果,临床和农业病害防治上会同时使用 2 种或 2 种以上的噬菌体,即噬菌体鸡尾酒(组合)^[8]。研究表明,专性感染青枯菌的噬菌体鸡尾酒相较于单独噬菌体,可更好地减少土传青枯病的发生,并降低病原青枯菌对植物根际微生物群落的扰动,使微生物群落基本上恢复到病原菌感染前的水平^[11]。由此表明,专性感染病原菌的噬菌体鸡尾酒在防控土传细菌性病害上发挥着重要作用。此外,室内结果表明与单独有益菌或噬菌体处理相比,专性感染青枯菌的噬菌体联合有益菌解淀粉芽孢杆菌 T-5 可更好且更加持久地抑制青枯菌的生长^[12]。但是噬菌体鸡尾酒是否可以增强有益菌或其相应生防产品(如生物有机肥)在田间防控土传病害的效果还需进一步研究。

为探究噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥防控土传病害的效果,初步探究背后的微生态机制,本试验以番茄土传青枯病为研究对象,研究 4 种专性感染青枯菌的烈性噬菌体组成的噬菌体鸡尾酒提升生物有机肥防控番茄青枯病的田间效果,考察番茄植株的发病率和根际青枯菌数量;结合高通量测序,分析施用噬菌体鸡尾酒对番茄根际微

生物群落的影响,初步解析噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥防控土传青枯病的微生态机制。本研究有助于开发基于专性噬菌体鸡尾酒的土传病害联合防控手段,为利用多生防手段防控土传病害提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和番茄品种

解淀粉芽孢杆菌 T-5 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 该功能菌株具有较强的防控土传青枯病和促进番茄生长的能力^[13]。

本研究所用病原菌为具有强致病能力的青枯菌 QL-Rs1115^[14]。实验室前期分离出 4 株专性侵染青枯菌的烈性噬菌体(NJ-P3、NB-P21、NC-P34、NN-P42),不可侵染解淀粉芽孢杆菌 T-5^[11,15]。

供试番茄品种为 GBS-极品 903。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

PowerSoil 土壤 DNA 提取试剂盒, MoBio Laboratories 公司; SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒, 宝生物工程(大连)有限公司; Rsol_fliC 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; FastPfu DNA 聚合酶, 北京全式金生物技术有限公司; AxyPrep PCR Clean-Up Kit, Axygen 公司; QuantiFluorTM-ST, Promega 公司。NanoDrop 2000 超微量分光光度计, Thermo Scientific 公司; PCR 仪, Applied Biosystems 公司; Illumina MiSeq, 上海凌恩生物科技有限公司。

NA 液体培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 胰蛋白 5.0, 牛肉膏 3.0, 酵母粉 0.5。

NA 固体培养基: NA 液体培养基添加 20 g/L 琼脂。

1.1.3 菌悬液的制备

青枯菌 QL-Rs1115 悬液的制备: 挑取 QL-Rs1115 单菌落转接到 NA 液体培养基中, 30 °C、170 r/min 培养 12 h。

噬菌体鸡尾酒悬液的制备: 将 4 株噬菌体分别

接种到培养过夜的青枯菌悬液中, 30 °C、170 r/min 培养 12 h, 4 °C、10 000×g 离心 10 min, 0.22 μm 无菌滤膜过滤除菌, 得到 4 株噬菌体的悬液; 再以 1:1:1:1 比例混合, 制备成噬菌体鸡尾酒悬液, 用于后续试验。

解淀粉芽孢杆菌 T-5 悬液的制备: 挑取 *B. amyloliquefaciens* T-5 单菌落转接到 NA 液体培养基中, 30 °C、170 r/min 振荡培养 12 h。

1.1.4 生物有机肥的制备

生物有机肥由解淀粉芽孢杆菌 T-5 和鸡粪有机肥二次发酵制成。鸡粪有机肥由南通尔康生物有机肥有限公司生产。二次发酵过程如下: T-5 菌悬液(1×10^9 CFU/mL)按 50 mL/kg 接种至有机肥中, 堆置混合发酵 5 d, 发酵过程中每天定时翻堆 1 次, 保持通气并维持湿度在 60%–65% 范围内, 二次发酵完成后肥料中有益菌含量达到 1×10^8 CFU/g 以上, 获得生物有机肥(Bio-Organic Fertilizer, BOF)。生物有机肥理化性质如下: pH 为 8.76, 全氮含量为 16.61 g/kg, 全钾含量为 53.22 g/kg, 全磷含量为 45.74 g/kg。

1.1.5 田间试验地点

田间试验地点为南京市江宁区麒麟镇后村(118°57'E, 32°03'N), 该地连作番茄多年, 番茄土传青枯病频发。土壤为黄棕壤, 土壤基本理化性质如下: 有机质含量 32.88 g/kg, 总氮含量 1.27 g/kg, 有效磷含量为 145.63 mg/kg, 速效钾含量为 220.15 mg/kg, 土壤 pH 为 6.23。

1.2 方法

1.2.1 噬菌体对青枯菌侵染能力的检测

为了考察单株噬菌体及噬菌体鸡尾酒对青枯菌的抑制效果, 进行了噬菌体与青枯菌的室内共培养试验。试验设置 7 个处理, 具体如下: 只接入青枯菌(无噬菌体)的对照组、青枯菌和噬菌体 NJ-P3 共培养、青枯菌和噬菌体 NB-P21 共培养、青枯菌和噬菌体 NC-P34 共培养、青枯菌和噬菌体 NN-P42 共培养、青枯菌和噬菌体鸡尾酒共培养、只含有培养基的空白对照。将 2 μL 生长至对数期 OD_{600} 约

为 0.7–0.8 的青枯菌悬液接入 194 μL 的 NA 液体培养基中, 按不同处理分别加入 4 μL 浓度为 10^4 PFU/mL 的噬菌体悬液、噬菌体组合悬液和无菌水, 每个处理 8 个重复。将孔板置于 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中, 170 r/min 振荡培养, 分别测定 0、8 和 16 h 的 OD_{600} , 用以表征青枯菌的生长情况。

1.2.2 田间试验设计

试验设置 3 个处理, 具体如下: 农户习惯施肥 (Chemical Fertilizer, CF)、生物有机肥 (Bio-Organic Fertilizer, BOF)、生物有机肥协同噬菌体鸡尾酒 (Bio-Organic Fertilizer+Phage, BOF+P)。生物有机肥在春季作为基肥施入 ($8\ 000\ \text{kg}/\text{hm}^2$), 番茄开花期 (移栽 40 d 后) 以灌根的形式施入噬菌体物处理。噬菌体混合液以 10^7 PFU/mL 浓度施用, 每株番茄 10 mL。所有农艺措施均同农户常规操作。试验地其他田间管理均保持一致。每个处理 3 个重复 (3 个小区), 共计 12 个小区, 采用随机区组排列。每个小区面积 $12\ \text{m}^2$, 每小区种植 48 株苗。

1.2.3 青枯病发病情况的统计

移栽 72 d 后番茄开始发病, 每 5 d 记录发病情况直至病情稳定。选取最后一次记录表征番茄发病率。发病率计算公式: 发病率 (%) = 小区发病植株数 / 小区总植株数 $\times 100$ 。根据青枯病发病开始到病情稳定时期的发病趋势计算病程线下面积^[16], 表征番茄青枯病的严重程度。

1.2.4 土样采集

于番茄收获期采集番茄根际土。各小区随机选择 4 株健康番茄, 轻摇掉番茄根部的土体土。将植物根系放入锥形瓶中, 经超声波振荡, 分离下来的土壤为根际土壤, 保存于 $-80\ ^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。

1.2.5 根际土 DNA 提取及高通量测序

称取 0.3 g 番茄根际土, 采用 PowerSoil 土壤 DNA 提取试剂盒提取土壤 DNA。详细的操作步骤按 DNA 提取试剂盒说明书进行, 提取后的 DNA 用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测浓度, 并于 $-20\ ^{\circ}\text{C}$ 保存备用。土壤微生物群落高通量测序使用细菌 16S rRNA 基因 (V4 区) 通用引物 515F

(5'-GTGCCAGCMGCCGCGG-3') 和 806R (5'-GGA CTACHVGGGTWTCTAAT-3'), 送至上海凌恩生物公司进行 16S rRNA 基因扩增子测序。

1.2.6 青枯菌数量的定量检测

采用荧光定量 qPCR 方法进行番茄根际青枯菌数量定量分析, 青枯菌定量采用引物 Rsol_fliC 进行检测, 引物序列为 *fliC* F: 5'-GAACGCCA ACGGTGCGAACT-3', *fliC* R: 5'-GGCGGCCTTC AGGGAGGTC-3'^[17], 使用 SYBR Premix *Ex Taq*TM 试剂盒进行 PCR。PCR 反应体系 (20 μL): SYBR Premix *Ex Taq* 10 μL , ROX Reference Dye 0.4 μL , 引物 (5 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 0.4 μL , DNA 模板 2 μL , ddH₂O 6.8 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环。扩增产物先用 AxyPrep PCR Clean-Up Kit 纯化, 然后进行琼脂糖凝胶电泳。纯化后的扩增产物用 QuantiFluorTM-ST 进行相对定量。

1.2.7 数据统计与分析

试验数据采用 Microsoft Excel 2016、IBM SPSS Statistics 25 和 R (3.6.3) 进行处理与分析, 采用 ANOVA 单因素方差分析法进行方差分析, 邓肯 (Duncan) 多重检验法检验处理间的差异显著性 ($P \leq 0.05$)。土壤微生物高通量测序数据利用 R (3.6.3) 中 Vegan 包进行多样性和组间差异分析, 在相关性分析中, 以 Chao1 指数表示 α 多样性, 以 NMDS1 指数表示 β 多样性; 物种相对丰度与发病率之间的相关性进行 Spearman 相关性分析, 相关性系数绝对值大于 0.8 ($r > 0.8$ 或 $r < -0.8$) 表示显著相关。

2 结果与分析

2.1 噬菌体鸡尾酒对青枯菌种群生物量的影响

为了探究噬菌体鸡尾酒的抑菌效果, 本研究首先在实验室条件下进行了青枯菌-噬菌体共培养试验, 以比较添加噬菌体鸡尾酒与单一噬菌体对青枯菌种群生物量的影响。结果发现青枯菌-噬菌体共培养 8 h 时 (图 1), 与对照 (无噬菌体) 相比,

单独添加 NJ-P3、NB-P21、NC-P34 和 NN-P42 的处理均显著降低了青枯菌的生物量,分别降低了 22.6%、5.45%、5.79%和 12.2%,由 4 种噬菌体制成的噬菌体鸡尾酒与对照相比青枯菌数量降低了 38.83%。

当青枯菌-噬菌体共培养 16 h 时(图 1),与对照(无噬菌体)相比,3 株噬菌体(NJ-P3、NC-P34 和 NN-P42)单独与青枯菌培养时都能显著降低青枯菌的生物量,分别降低了 10.9%、10.68%和 13.06%。由 4 种噬菌体制成的噬菌体鸡尾酒处理中青枯菌种群数量最低,相比对照青枯菌的种群生物量降低 27.93%,这与 8 h 的结果趋势一致。以上结果表明,噬菌体鸡尾酒处理相较于单独的噬菌体能更好地抑制青枯菌数量。

2.2 噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥防控青枯病的田间效果

为了探究噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥防控青枯病的实际应用效果,本研究进行了田间试验。相较于农户习惯施肥(CF)(平均发病率 37.5%),施用生物有机肥(BOF)与噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)都显著降低了番茄青枯病的发病率(图 2A),其中噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)处理中番茄发病率最低,比农户习惯施肥(CF)处理发病率降低了 92.59%,比只施用生物有机肥(BOF)降低了 86.21%。不同施肥处理的病程线下面积结果也显示了类似的趋势(图 2B),表明噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)能有效降低番茄青枯病发病程度。

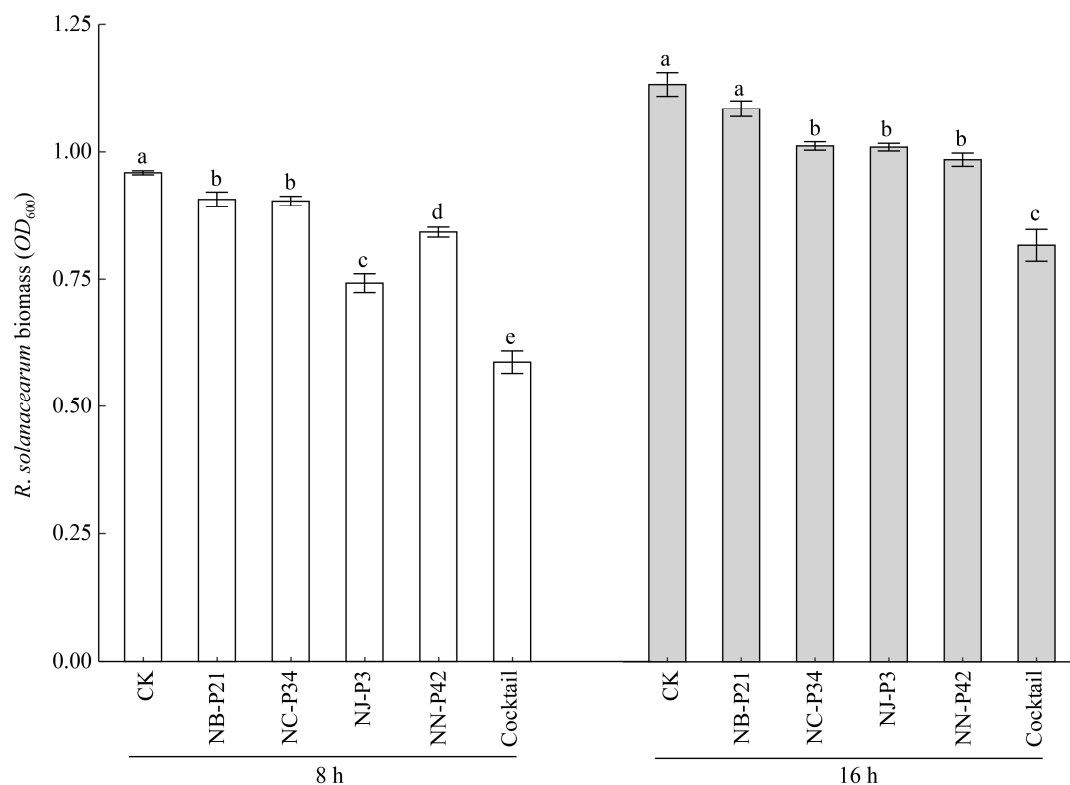


图 1 单一噬菌体和噬菌体鸡尾酒对青枯菌生物量的影响

Figure 1 Comparison of the effects of phage cocktail and single phage on growth of *R. solanacearum*

注: 图中小写字母代表 $P \leq 0.05$ 差异显著性水平; CK 表示只接入青枯菌(无噬菌体)的对照处理; Cocktail 表示噬菌体鸡尾酒处理
Note: The lowercase letters in figures indicate significant difference level of 0.05; CK represents control treatment only inoculating *Ralstonia solanacearum* (without phage); Cocktail represents phage cocktail treatment

根际青枯菌数量的结果表明,与农户习惯施肥相比,噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)可显著减少根际青枯菌数量(图 2C, $P<0.05$),但与只施生物有机肥相比并无显著差异。

2.3 噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥对番茄根际微生物群落的影响

为了探究噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥防控土传青枯病的微生态机制,本研究利用高通量测序技术分析比较了不同处理对番茄根际细菌群落的影响。如图 3A 所示,与农户习惯施肥(CF)相比,生物有机肥及噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)的施用并未显著影响番茄根际细菌群落的 α 多样性(图 3A)。NMDS 结果表明,与农户习惯施肥处理(CF)相比,噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)可显著改变根际细菌群落的 β 多样性(图 3B, Stress=0.046)。

进一步分析噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥对根际不同种类细菌相对丰度的影响,发现不同施肥处理下细菌 OTU 主要属于 10 个门,细菌在门水平上的相对丰度存在差异。与农户习惯施肥(CF)相比,噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)和

生物有机肥(BOF)都可显著降低芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)的相对丰度(图 3C, (BOF+P): $F_{1,4}=31.44$, $P=0.005$, BOF: $F_{1,4}=28.1$, $P=0.0061$)。与只施用生物有机肥的处理不同,联合噬菌体鸡尾酒的处理显著增加了拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的相对丰度(图 3C, $F_{1,4}=9.64$, $P=0.036$),但对放线菌门(*Actinobacteria*)相对丰度的降低效果不显著。

通过 LEfSe 分析更进一步比较了只施用生物有机肥和添加噬菌体鸡尾酒处理中根际细菌属水平的差异。结果显示(图 3D),噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)和单独的生物有机肥(BOF)处理间在细菌属水平上有显著差异的菌共 38 种。其中噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)处理比单独的生物有机肥处理显著提高了 25 种属水平的细菌相对丰度,包括拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的 *Arenibacter* 和 *Taeseokella*, 变形菌门(*Proteobacteria*)的 *Rhodanobacter*、*Devosia*、*Pseudaminobacter*、*Afipia*、*Thiobacillus*、*Rhodopseudomonas*、*Hyphomicrobium*、*Legionella*、*Herminiimonas*、*Geminicoccus* 和 *Thioalkalispira*,

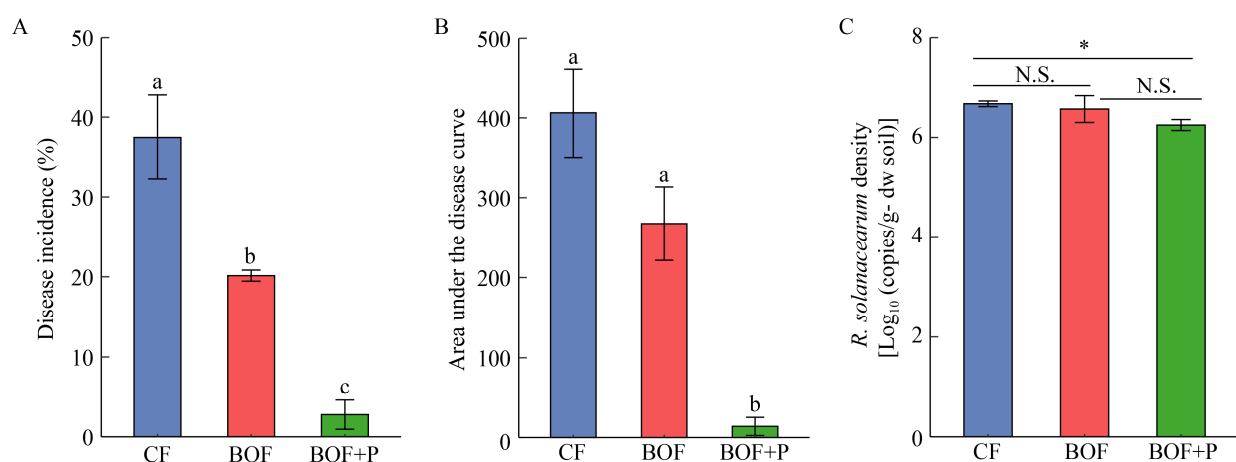


图 2 噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥防控番茄土传青枯病的效果(A 和 B)及根际青枯菌数量(C)

Figure 2 Effects of the combination of phages cocktail and bio-organic fertilizer on soil-borne bacterial wilt (A and B) and density of *R. solanacearum* (C) in the rhizosphere

注: 图中小写字母代表 $P\leq 0.05$ 差异显著性水平。N.S.代表处理间无显著差异。星号代表显著差异($P\leq 0.05$)

Note: The lowercase letters in figures indicate significant difference on the level of 0.05. N.S. indicates that there is no significant difference among treatments. Asterisk indicate significant difference on the level of 0.05

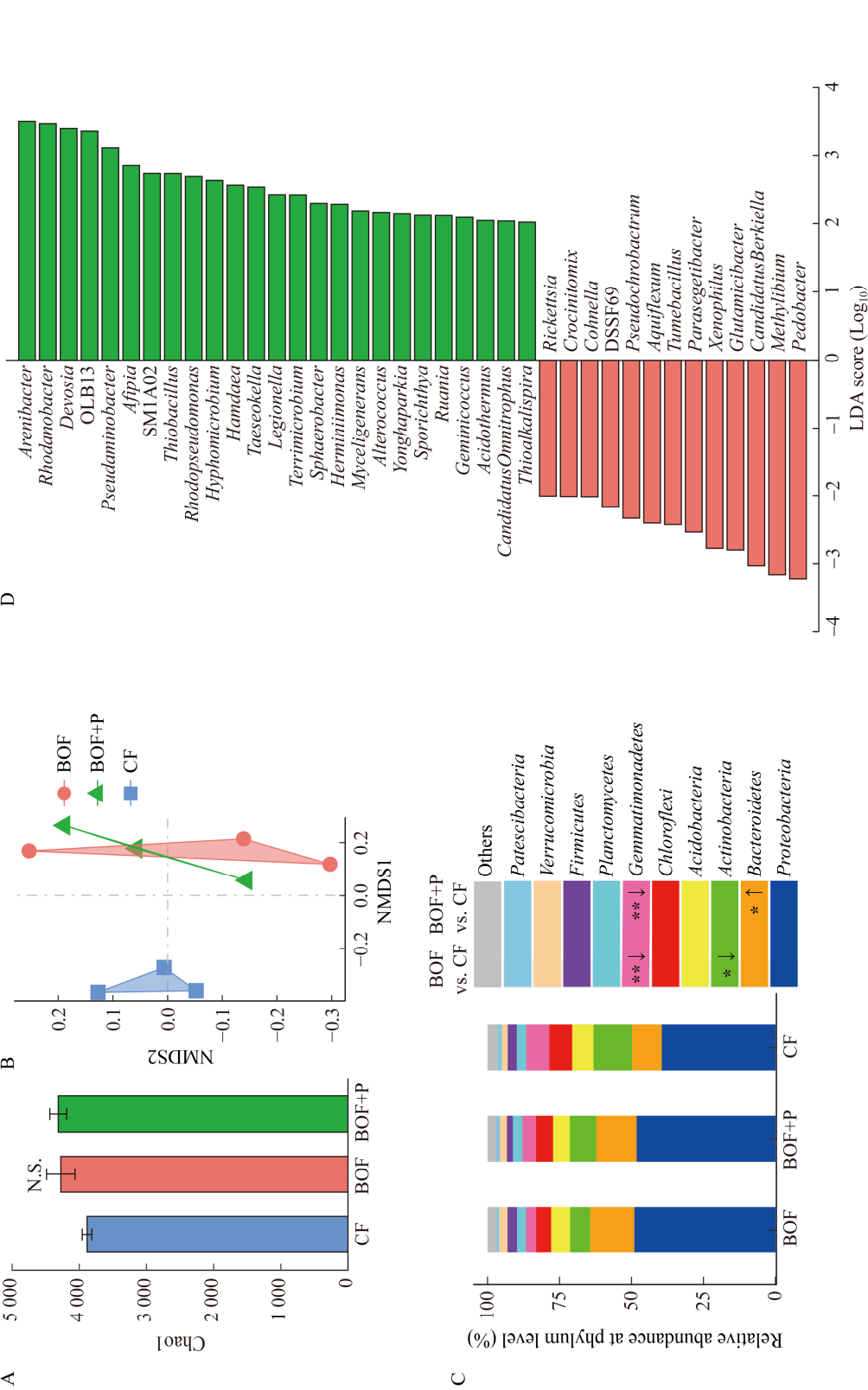


图 3 噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥施用对番茄根际细菌群落的影响

Figure 3 Effects of combination of phage cocktail with bio-organic fertilizer on bacterial community in tomato rhizosphere

注：A：微生物群落α多样性；B：微生物群落β多样性；C：微生物群落组成；D：BOF (红色)与BOF+P (绿色)处理的LEfSe分析。N.S.代表处理间无显著差异；**：P≤0.01差异显著性水平；*：P≤0.05差异显著性水平。向上和向下箭头分别表示增加和减少。LEfSe分析中只保留了LDA score>2的物种

Note: A: Alpha-diversity of microbial community. B: Beta-diversity of microbial community. C: Composition of microbial community. D: LEfSe between BOF (red) and BOF+P (green). N.S. indicates that there is no significant difference among treatments. N.S. indicates no significant difference among treatments. ** and * indicate significant difference on the level of 0.01 and 0.05, respectively. The up and down arrows indicate increase and decrease, respectively. Only bacterial groups with a linear discriminant analysis (LDA) score>2 were displayed

绿湾菌门(*Chloroflexi*)的 OLB13 属和 *Sphaerobacter*, 扁平菌门(*Planctomycetes*)的 SM1A02, 放线菌门(*Actinobacteria*)的 *Hamadaea*、*Myceligenans*、*Yonghaparkia*、*Sporichthya*、*Ruania* 和 *Acidotherrmus*, 以及疣微菌门(*Verrucomicrobia*)的 *Terrimicrobium* 和 *Alterococcus*。

2.4 番茄根际微生物群落与青枯病发病率相关性

本研究进一步分析了微生物群落多样性、根际微生物物种(属水平)与青枯病发病率的相关性。结果表明, 根际细菌群落 α 多样性和 β 多样性与番茄植株发病率无显著相关。基于图 3 中 LEfSe 分析结果, 进一步分析了噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥(BOF+P)处理与生物有机肥(BOF)处理差异物种与发病率的相关性, 发现 3 个属的菌株与青枯病发病率显著相关; 其中菌株 SM1A02 和 *Thiobacillus* 与青枯病发病呈显著负相关, 而菌株 *Crocinitomix*

与发病率呈正相关(图 4)。

3 讨论与结论

本研究比较了噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥对番茄青枯病防控效果的影响, 并初步探究了其微生态机制。结果表明, 与农户习惯施肥相比, 单独的生物有机肥处理和噬菌体联合生物有机肥处理均能显著降低青枯病的发病率, 其中噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥的处理对青枯病的防控效果最佳。分析根际青枯菌丰度和细菌群落结构后发现, 噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥处理显著改变了番茄根际微生物群落的 β 多样性和群落结构。

研究表明, 噬菌体鸡尾酒相较单一噬菌体能更高效地抑制病原菌的种群数量^[18-20], 这与本试验中噬菌体与青枯菌共培养的室内试验结果一致。我们发现相较于单一噬菌体, 噬菌体鸡尾酒可显著

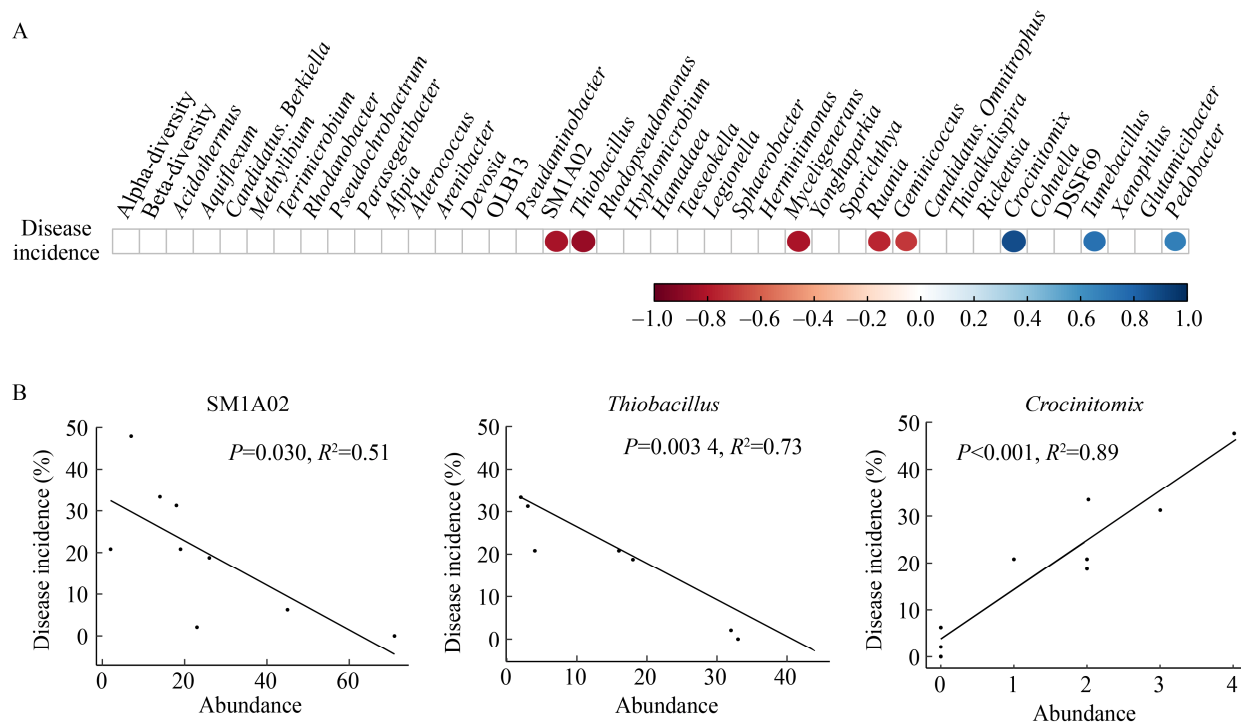


图 4 不同处理根际细菌群落结构(属水平)与番茄青枯病发病率的相关性

Figure 4 Correlations between composition of rhizosphere bacteria (at genus level) and tomato wilt disease incidence

注: 彩色柱子表示相关性系数(R^2); 红色表示负相关, 蓝色表示正相关

Note: Color bar indicates for correlation coefficient (R^2). Red indicates negative correlation and blue indicates positive correlation

降低青枯菌生物量。噬菌体鸡尾酒的侵染能力强于单一噬菌体,基于抵抗-生存权衡(Defense-Growth Trade-off)假说,青枯菌为了抵抗更强的侵染,其生存能力下降,如竞争能力减弱、生长缓慢等^[6]。生物有机肥虽然可有效减缓土传病害的发生^[21],但效果常不稳定;前期研究表明噬菌体鸡尾酒可显著抑制土传青枯病的发生^[11]。本研究发现,噬菌体鸡尾酒的添加可显著提升生物有机肥田间防控番茄土传青枯病的效果,说明噬菌体鸡尾酒可联合生物有机肥中的有益菌共同抑制土传青枯病。这可能是由于在多重生存胁迫(噬菌体鸡尾酒和有益菌)下的青枯菌将能量更多地用于维持种群数量,但导致其致病能力下降^[22]。类似地,有益菌(本研究中的 T-5)增强了青枯菌的抗性(对有益菌或噬菌体),但可能会造成青枯菌吸收养分进行生长、分泌致病毒素等基因或功能的丢失^[23-24]。因此,在资源有限的根际条件下,青枯菌种群会优先选择维持种群的增殖,而非增强其致病能力^[25]。综上,噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥可能通过增加青枯菌抵抗噬菌体的能力、耐受有益菌产生的拮抗物质的能力,从而维持自身种群的繁殖,但其致病能力减弱,番茄发病率降低。

前期研究表明,噬菌体鸡尾酒可调控根际微生物群落,使群落恢复至未被青枯菌侵染的状态^[11]。本研究利用高通量测序技术,分析了不同施肥处理对番茄根际细菌群落结构的影响,发现噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥处理显著改变了番茄根际细菌群落的 β 多样性。进一步比较不同处理间根际细菌结构,发现相较于农户惯用施肥处理,噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥处理显著增加了番茄根际细菌群落中拟杆菌门(*Bacteroidetes*)的相对丰度。研究表明,拟杆菌门细菌在发病率低或抑病型土壤中都有较高的相对丰度,该类菌也被证明是有抑制病原菌致病性、促进植物生长一类功能的微生物^[26-27]。此外,相较于单独的生物有机肥处理,噬菌体鸡尾酒的施用显著提高了番茄根际 25 个属的

细菌相对丰度,其中 SM1A02 和 *Thiobacillus* 属与青枯菌发病率具有负相关关系。菌株 SM1A02 被报道具有氨氧化功能^[28], *Thiobacillus* 属菌株具有反硝化作用^[29],均参与氮素循环,而青枯病的致病性与氮素养分密切相关^[30-31],这 2 个属的菌株可能通过调控根际氮素养分进而影响青枯病的发生。后续可以通过转录组或荧光定量 PCR 等手段,考察青枯菌毒力相关功能基因(如运动^[32]、毒力蛋白及其分泌系统^[33-34]等)的表达情况,探究番茄噬菌体鸡尾酒、根际微生物群落或以上 2 个关键微生物对青枯菌致病性的影响。此外,仍需通过菌株定向筛选及特性检测,说明以上 2 个属的细菌是否具备抑制青枯菌生长或致病性的功能。

噬菌体疗法虽然在临床和畜禽养殖业领域已有了较成熟的应用研究,但在植物病害防治领域还未得到大范围推广应用。本研究发现噬菌体鸡尾酒联合生物有机肥可显著提升生物有机肥防控土传青枯病的防控效果。该结果为将噬菌体鸡尾酒作为配合生物有机肥的生防手段,提高土传细菌性植物病害的田间防控效果提供了技术支撑,丰富了建立稳定防控病害发生体系的生防策略,有助于相关应用产品的开发和优化。

REFERENCES

- [1] Hayward AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29(1): 65-87
- [2] Izadiyan M, Taghavi SM. Host range variation and genetic diversity of Iranian isolates of *Ralstonia solanacearum* from potato and tomato with RAPD and (GTG)₅-PCR[J]. Journal of Plant Pathology, 2013, 95(1): 87-97
- [3] Li QK, Zhang YC, Yang QF, Yang ZY, Li Y. The concept, mechanism, affecting factors and prospect of applying bio-organic fertilizer[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2003, 11(2): 78-80 (in Chinese)
李庆康, 张永春, 杨其飞, 杨卓亚, 李延. 生物有机肥肥效机理及应用前景展望[J]. 中国生态农业学报, 2003, 11(2): 78-80
- [4] Wu K, Fang ZY, Wang LL, Yuan SF, Guo R, Shen B, Shen QR. Biological potential of bioorganic fertilizer fortified with bacterial antagonist for the control of tomato bacterial wilt and the promotion of crop yields[J]. Journal of

- Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(10): 1755-1764
- [5] Zhang N, Pan RH, Shen YF, Yuan J, Wang L, Luo X, Raza W, Ling N, Huang QW, Shen QR. Development of a novel bio-organic fertilizer for plant growth promotion and suppression of rhizome rot in ginger[J]. Biological Control, 2017, 114: 97-105
- [6] Liu SS, Hu XR, Wang YZ, Li CY, Tao CY, Li R, Shen QR. Effects of lime and ammonium carbonate fumigation coupled with bio-organic fertilizer application on banana fungal community[J]. Chinese Journal of Applied Environmental Biology, 2020. DOI: 10.19675/j.cnki.1006-687x.2020.04037
刘珊珊, 胡夏茹, 王云舟, 李春雨, 陶成圆, 李荣, 沈其荣. 石灰碳铵熏蒸联合生物有机肥施用对香蕉土壤真菌群落的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2020. DOI: 10.19675/j.cnki.1006-687x.2020.04037
- [7] Buttner C, McAuliffe O, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, Coffey A. Bacteriophages and bacterial plant diseases[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 34-1
- [8] Jones JB, Jackson LE, Balogh B, Obradovic A, Iriarte FB, Momol MT. Bacteriophages for plant disease control[J]. Annual Review of Phytopathology, 2007, 45: 245-262
- [9] Levin BR, Bull JJ. Population and evolutionary dynamics of phage therapy[J]. Nature Reviews Microbiology, 2004, 2(2): 166-173
- [10] Azam AH, Tanji Y. Bacteriophage-host arm race: an update on the mechanism of phage resistance in bacteria and revenge of the phage with the perspective for phage therapy[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(5): 2121-2131
- [11] Wang XF, Wei Z, Yang KM, Wang JN, Jousset A, Xu YC, Shen QR, Friman VP. Phage combination therapies for bacterial wilt disease in tomato[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(12): 1513-1520
- [12] Wang XF, Wei Z, Li M, Wang XQ, Shan AQ, Mei XL, Jousset A, Shen QR, Xu YC, Friman VP. Parasites and competitors suppress bacterial pathogen synergistically due to evolutionary trade-offs[J]. Evolution; International Journal of Organic Evolution, 2017, 71(3): 733-746
- [13] Tan SY. Effects and mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* strain T-5 on suppression of bacterial wilt of tomato[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese)
谭石勇. 解淀粉芽孢杆菌 T-5 防控番茄土传青枯病的效果及机理研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2013
- [14] Wei Z. Effects and mechanisms of bio-organic fertilizers on suppression of bacterial wilt of tomato[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)
韦中. 生物有机肥防控土传番茄青枯病的效果及其机制研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2012
- [15] Hou YG. Selection of *Ralstonia solanacearum*-specific bacteriophages and their effects on control of tomato bacterial wilt[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2018 (in Chinese)
侯玉刚. 青枯菌专性噬菌体的筛选及其防控番茄土传青枯病的效果研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2018
- [16] Mehari ZH, Elad Y, Rav-David D, Graber ER, Meller Harel Y. Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling[J]. Plant and Soil, 2015, 395(1/2): 31-44
- [17] Schönfeld J, Gelsomino A, Van Overbeek LS, Gorissen A, Smalla K, Van Elsas JD. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(1): 63-74
- [18] Wei CH, Liu JL, Maina AN, Mwaura FB, Yu JP, Yan CH, Zhang RF, Wei HP. Developing a bacteriophage cocktail for biocontrol of potato bacterial wilt[J]. Virologica Sinica, 2017, 32(6): 476-484
- [19] Hall AR, De Vos D, Friman VP, Pirnay JP, Buckling A. Effects of sequential and simultaneous applications of bacteriophages on populations of *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and in wax moth larvae[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5646-5652
- [20] Yu L, Wang S, Guo ZM, Liu HT, Sun DG, Yan GM, Hu DL, Du CT, Feng X, Han W, et al. A guard-killer phage cocktail effectively lyses the host and inhibits the development of phage-resistant strains of *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(2): 971-983
- [21] Tao CY, Li R, Xiong W, Shen ZZ, Liu SS, Wang BB, Ruan YZ, Geisen S, Shen QR, Kowalchuk GA. Bio-organic fertilizers stimulate indigenous soil *Pseudomonas* populations to enhance plant disease suppression[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 137
- [22] Peyraud R, Cottret L, Marmiesse L, Gouzy J, Genin S. A resource allocation trade-off between virulence and proliferation drives metabolic versatility in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. PLoS Pathogens, 2016, 12(10): e1005939
- [23] Taylor VL, Fitzpatrick AD, Islam Z, Maxwell KL. The diverse impacts of phage morons on bacterial fitness and virulence[J]. Advances in Virus Research, 2019, 103: 1-31
- [24] Amna, Xia Y, Farooq MA, Javed MT, Kamran MA, Mukhtar T, Ali J, Tabassum T, Rehman SU, Hussain Munis MF, et al. Multi-stress tolerant PGPR *Bacillus xiamenensis* PM₄ activating sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) red rot disease resistance[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2020, 151: 640-649
- [25] Wei Z, Wang JN, Jiang GF, Wang XF, Xu YC, Shen QR.

- Survival-virulence Trade-off of Soil-borne Pathogenic Bacteria[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2021. DOI: 10.11766/trxb202008310399 (in Chinese)
- 韦中, 王佳宁, 江高飞, 王孝芳, 徐阳春, 沈其荣. 土传病原细菌的生存与致病权衡[J]. *土壤学报*, 2021. DOI: 10.11766/trxb202008310399
- [26] Gao Y, Lu Y, Lin WP, Tian JH, Cai KZ. Biochar suppresses bacterial wilt of tomato by improving soil chemical properties and shifting soil microbial community[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(12): 676
- [27] Ali A, Ghani MI, Ding HY, Iqbal M, Cheng ZH, Cai ZC. Garlic substrate induces cucumber growth development and decreases *Fusarium* wilt through regulation of soil microbial community structure and diversity in replanted disturbed soil[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6008
- [28] Fan ZW, Zeng W, Wang BG, Chang S, Peng YZ. Analysis of microbial community in a continuous flow process at gene and transcription level to enhance biological nutrients removal from municipal wastewater[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 286: 121374
- [29] Gao S, Li ZL, Hou YN, Nan J, Wang AJ, Liu Q, Huang C. Rapid start of high-concentration denitrification and desulfurization reactors by heterotrophic denitrification sulphur-oxidising bacteria[J]. *Environmental Research*, 2021: 111826
- [30] Dalsing BL, Allen C. Nitrate assimilation contributes to *Ralstonia solanacearum* root attachment, stem colonization, and virulence[J]. *Journal of Bacteriology*, 2014, 196(5): 949-960
- [31] De Pedro-Jové R, Puigvert M, Sebastià P, Macho AP, Monteiro JS, Coll NS, Setúbal JC, Valls M. Dynamic expression of *Ralstonia solanacearum* virulence factors and metabolism-controlling genes during plant infection[J]. *BMC Genomics*, 2021, 22(1): 170
- [32] Addy HS, Askora A, Kawasaki T, Fujie M, Yamada T. Loss of virulence of the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* through infection by ϕ RSM filamentous phages[J]. *Phytopathology*, 2012, 102(5): 469-477
- [33] Lowe-Power TM, Khokhani D, Allen C. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(11): 929-942
- [34] Genin S, Brito B, Denny TP, Boucher C. Control of the *Ralstonia solanacearum* type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(10): 2077-2081