

# 裂解性噬菌体对烟草青枯雷尔氏菌的控制及对土壤微生物种群多的影响

王凤龙<sup>1</sup>, 高苗<sup>1</sup>, 申莉莉<sup>1</sup>, 钱玉梅<sup>1</sup>, 余广宏<sup>2</sup>, 王耀峰<sup>3</sup>, 杨金广<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>烟草行业烟草病虫害监测与综合治理重点实验室/中国农业科学院烟草研究所, 山东青岛 266101; <sup>2</sup>云南烟草保山香料烟有限责任公司, 云南保山 678000, <sup>3</sup>甘肃省烟草公司庆阳市公司, 甘肃西峰 745000)

**摘要:** 由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 侵染引起的烟草青枯病是烟草上主要的病害之一, 裂解性噬菌体 (*Ralstonia phagy*) RS-1 分自中国农业科学院烟草研究所即墨试验农场烟草青枯病圃土壤, 对 *R.solanacearum* 专性寄生的一类噬菌体, 可侵染 *R.solanacearum*, 引起菌体的裂解, 从而阻止 *R.solanacearum* 分裂和繁殖, 进而控制烟草青枯病的发生流行, 因此, RS-1 具有开发新的抗菌制剂潜力。本文通过盆栽试验, 预先利用 RS-1 溶液 ( $1 \times 10^{10}$  pfu/mL) 灌根, 可限制抑制 *R.solanacearum* 侵染烟草根部, 防止烟草青枯病的发生危害, 其防治效果可达 94.87%, 显著高于农用链霉素的防效。利用宏基因组学方法对噬菌体处理的土壤的细菌种群多样性进行了检测分析, 结果表明, 表明在噬菌体处理组中土壤中 *R.solanacearum* 含量显著低于未处理组, 其他微生物种群影响不显著, 但在噬菌体处理的土壤中, 细菌菌体数量存在降低趋势, 相比较空白对照, 放线菌种群丰度表现为下降趋势, 因此噬菌体 RS-1 处理土壤对土壤细菌种群多样性具有一定的调控作用。

**关键词:** 烟草; 青枯雷尔氏菌; 噬菌体; 抑制; 微生物种群多样性

## Biological Control of *Ralstonia solanacearum* using *Ralstonia phage* and the influence of diversity of soil bacteriums

WANG Feng-long<sup>1</sup>

WANG Feng-long<sup>1</sup>, GAO Miao<sup>1</sup>, QIAN Yumei<sup>1</sup>, SHEN Lili<sup>1</sup>, YU Guanghong<sup>2</sup>, WANG Yaofeng<sup>3</sup>, YANG Jinguang<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Tobacco Pest Monitoring Controlling & Integrated Management / Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong; 2. Baoshan Oriental Tobacco Company Ltd, Baoshan 678000, Yunnan; 3. Qingyang Company, Gansu Provincial Tobacco, Xifeng 745000, Gansu)

**Abstract:** Tobacco bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the main diseases of tobacco. *Ralstonia phagy* RS-1 was isolated from the soil of tobacco bacterial wilt nurseries from experimental fields of the tobacco research institute of CAAS Institute, Jimo District, Qingdao City. RS-1 is obligate parasites of *R.solanacearum*, can infect and lyse *R.solanacearum*, which preventing them from dividing and reproducing, then control the disease pandemic. So RS-1 has real potential as a new microbial inoculants on *R.solanacearum*. We irrigated the tobacco root by the RS-1 culture ( $1 \times 10^{10}$  pfu/mL) before artificial inoculation the *R.solanacearum*. The result showed that a significant decrease in disease severity was observed when co-inoculated with RS-1. The control efficiency of RS-1 against *R.solanacearum* can reach 94.87%, and was higher than control by agricultural streptomycin. The diversity of bacterial community in soil of treated by RS-1 was studied using metagenomic technique. The result showed that the soil *R.solanacearum* content is obviously lower than contrast, and do not have remarkable influence to the other microorganisms. But in the soil

treated by RS-1, the quantity of bacteria showed a descending trend, The quantity of actinomyces showed decreased trend compared to the blank control. So RS-1 has the role of adjust the diversity of soil bacterium.

**Key words :** *Nicotiana tabacum*; *Escherichia coli*; *phages*; *biological properties*

烟草青枯病是由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的危害世界烟草生产的重要病害<sup>[1]</sup>, 是一种毁灭性的土传病害。目前, 对烟草青枯病的防治主要采用化学防治的手段, 但仍不能有效地控制该病发生, 而且化学药剂的使用易产生环境污染, 对人畜安全造成威胁<sup>[2]</sup>, 而噬菌体可以特异性地裂解细菌并使其死亡, 且对环境没有毒性, 不会对环境造成污染; 特异性强, 不会破坏其他正常菌群, 可保持土壤微生物平衡<sup>[3]</sup>。所以分离到高效裂解青枯雷尔氏菌的噬菌体将会为烟草青枯病的防治提供新的思路和手段。

目前, 烟草青枯病的生物防治还处于初步阶段, 迄今为止仍未研发出高效、无公害、便捷的生防菌剂<sup>[4]</sup>。一直以来, 国内的生物防治资源大部分局限在细菌、真菌、放线菌上, 而在国外近年来已经报道过多种青枯雷尔氏菌噬菌体如:  $\Phi$ RSA1、 $\Phi$ RSB1、 $\Phi$ RSL1、 $\Phi$ RSM1、 $\Phi$ RSS1、 $\Phi$ RSX、M\_DS1<sup>[5-10]</sup>等, 研究人员将这些青枯雷尔氏菌噬菌体对烟草青枯病的检测、防治都做了研究, 但还未有适合投入生产使用的药剂开发出来。而在国内对青枯雷尔氏菌噬菌体的研究还鲜有报道, 笔者领导的研究团队早期已经从中国农业科学院烟草研究所即墨试验农场的烟草青枯病病圃土壤中筛选出一株可以裂解青枯雷尔氏菌的噬菌体 *Ralstonia phagy* RS-1。噬菌体 RS-1 对 *R. solanacearum* 潜伏期较短, 裂解能力较强, 具有很好的杀菌效果, 且其裂解活性持续时间长, 并能在不同温度、不同酸碱性的环境内有较强的适应能力, 具有开发为抗青枯雷尔氏菌菌剂的潜力<sup>[11]</sup>。本研究对其防治烟草青枯病的效果进行了研究, 利用宏基因组学测定了该噬菌体对植烟土壤微生物种群多样性的影响进行了检测分析, 为未来该噬菌体的开发利用及烟草青枯病的生物防治提供基础理论数据和数据支撑。

## 1 试验材料

试验于 2013 年 10 月到 2015 年 3 月期间在中国农业科学院烟草研究所人工气候室进行。

### 1.1 菌株和土样

*R. solanacearum* 由中国农业科学院植物保护研究所赵庭昌研究员馈赠; *Ralstonia phagy* RS-1 系本实验室分离纯化于中国农业科学院烟草研究所即墨试验农场烟草青枯病病圃土壤; 土样取自中国农业科学院烟草所即墨试验场。

### 1.2 供试烟草品种

小黄金 1025, 由中国农业科学院烟草研究所植物保护中心保存。

### 1.3 主要试剂

NA 液体培养基: 按常规方法配制, 即葡萄糖 15 g, 酵母粉 1 g, 胰蛋白胨 5 g, 牛肉浸膏 3 g, 加入去离子水 1000 mL, 溶解后于 121 °C 高压灭菌 20 min。NA 固体培养基: NA 液体培养基中加入 1.8% 的琼

脂粉。NA 半固体培养基：NA 液体培养基中加入 0.8%的琼脂粉。SM 悬浮液：取  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.0 g，NaCl 5.8 g，1 mol/L Tris-HCl(pH7.5)50 mL，2%明胶 5 mL，加去离子水，定容至 1000 mL，分装后于 121 高压灭菌 20 min，4 保存，SM 悬浮液用于噬菌体的稀释及保存。DNase I、RNase A、购自宝生物工程（大连）有限公司（TaKaRa）。 $\lambda$ 噬菌体 DNA 提取试剂盒购自北京艾比根生物技术有限公司。氯仿、NaCl、PEG8000、磷钨酸（2%，pH 6.7）等皆为国产分析纯。

## 2 试验方法

### 2.1 青枯菌和噬菌体液的制备<sup>[12-14]</sup>

取经 TTC 培养基检测后有致病性的青枯菌单菌落接入 NA 液体培养基，30℃，120r/min，培养 10h 后备用，并用平板法测菌液浓度。

取青枯菌单菌落接入 NA 液体培养基中，30℃，120r/min，培养 6h 后，按最佳感染复数的比例加入噬菌体原液，摇匀后静置 15min，继续培养 14h 后转入灭菌离心管，4℃，5000 r/min 离心 20 min 后常温保存备用，同时取一部分用平板法测噬菌体液滴度。

### 2.2 青枯菌接菌方法

用高温灭菌过的小刀斜插烟苗根部（注意不能伤到主根）两次后灌根接菌，每株 10mL（ $1 \times 10^8$  pfu/mL）。

### 2.3 试验设计

#### 2.3.1 噬菌体液灌根对烟草青枯病防治效果

在接青枯菌前 24h，处理 1：每株用 20mL 1000 万单位的农用硫酸链霉素 1000×液灌根；处理 2：每株用 20mL 噬菌体液（ $1 \times 10^{10}$  pfu/mL）灌根；处理 3：每株用 20mL 无菌 NA 液体培养基灌根；CK1：每株用 20mL 无菌水灌根。处理和对照每组 15 株烟苗，重复 3 次。

#### 2.3.2 噬菌体液浸根对烟草青枯病防治效果

在烟苗长至 3 片叶以上进行移栽前，先抖去烟根处的土壤，进行浸根处理，处理 I：每株用 50mL 1000 万单位的农用硫酸链霉素 1000×液浸根 30min；处理 II：每株用 50mL 噬菌体液（ $1 \times 10^{10}$  pfu/mL）浸根 30min；处理 III：每株用 50mL 无菌 NA 液体培养基浸根 30min；CK2：每株用 50mL 灭菌水浸根 30min。处理和对照每组 15 株烟苗，重复 3 次。

试验中所用的烟苗在处理前 3 天开始直到试验结束，置于人工气候室中进行培养，培养条件为，a 温度：光照期间 33℃/黑暗期间 30℃；b 光周期：光照/黑暗：14h/10h；c 湿度：75%。

### 2.5 病情调查方法

烟株开始出现发病症状后每天上午调查一次，病情指数分级标准参考郑继法等（2005）的 6-7 片叶烟苗温室接种调查方法。防效和病情指数计算方法参考烟草病害药效试验方法（汪莹，2007）。

病情分级标准：

0 级无症状；

1 级植株开始出现萎蔫症状，茎部出现短条黑斑；

2 级植株 50%的叶片萎蔫，茎部有较大黑斑；

3 级烟株叶片除顶叶 2-3 片叶外，全部萎蔫，茎部黑斑长而宽；

4 级烟株叶片萎蔫，茎部大部分变黑。

病情指数 =  $\sum$  ( 各级症状代表值 × 株数 ) / ( 最高级症状代表值 × 总株数 ) × 100

防效 = [ ( 对照的发病率 - 处理的发病率 ) ] / 对照的发病率 × 100

## 2.6 土壤微生物种群多样性检测样品的制备

取无菌培养的假植烟苗 20 株，用 1.1 中采集的烟田土样栽植，待其长至 5~6 片叶时移入 33 的恒温培养箱，三天后每株接入 10mL (  $1 \times 10^8$  pfu/mL ) 青枯菌，其中：处理组 10 株，在接入青枯菌液前 24 h 每株用 20mL 噬菌体液 (  $1 \times 10^{10}$  pfu/mL ) 进行灌根处理；对照组 10 株，在接入青枯菌液前 24 h 每株用 20mL 灭菌去离子水进行灌根处理。处理组和对照组的其它培养条件一致。待对照组完全发病后，从中选取 3 株发病情况一致的烟苗，分别标记为 CK1、CK2、CK3；同时从处理组中未发病的烟苗中选取 3 株长势一致的烟苗，分别标记为 SJT1、SJT2、SJT3，6 株烟苗分别用高温灭菌过的取样勺去除表层土样后，取 5 g 根际土壤密封在 10 mL 的离心管中，最后将土样送去北京诺禾致源生物信息科技有限公司进行基于 Illumina MiSeq 测序平台的高通量测序分析。

## 2.7 土壤细菌微生物种群多样性分析

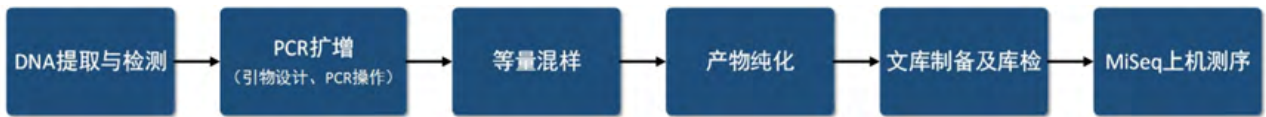
### 2.7.1 实验上机流程

(1) 基因组 DNA 的提取：利用常规提取 DNA 的 CTAB 法提取各土壤样本中的基因组 DNA，并采用琼脂糖凝胶电泳来检测提取到的 DNA 的纯度和浓度，取适量的检测合格的样品放入离心管中，用无菌水进行稀释使样品 DNA 浓度达到 1ng/ $\mu$ L。

(2) PCR 扩增以稀释过后的土样基因组 DNA 为模板，以特定的测序区域为根据，使用带有 Barcode 的特异引物 515F-806R；用 New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效且高保真的酶进行 PCR 扩增，来确保扩增的效率准以及确性。

(3) PCR 产物的混样以及纯化将 PCR 产物在 2%浓度的琼脂糖凝胶中进行电泳检测；并根据 PCR 产物的浓度进行等浓度的混样，充分混匀然后再使用 2 %的琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物的检测，并用 Thermo Scientific 公司生产的 GeneJET 胶回收试剂盒进行产物回收。

(4) 文库构建和上机测序使用 New England Biolabs 公司的 NEB Next® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina 文库试剂盒进行文库的构建，构建好的文库经过 Qubit 定量和文库检测，合格后，使用 MiSeq 进行上机测序。



### 2.7.2 生物信息学分析

测序得到的原始数据(Raw Data)，存在一定比例的干扰数据(Dirty Data)，为了使信息分析的结果更加准确、可靠，首先对原始数据进行拼接、过滤，得到有效数据(Clean Data)。然后将最后得到的有效数据进行 OTUs(Operational Taxonomic Units)的聚类以及物种的分类分析，并通过结合 OTU 和物种注释结果，得到各个样品的 OTUs 以及分类谱系的基本分析结果。再对 OTUs 进行丰度、多样性指数等分析，同时对物种注释在各个分类水平上进行群落结构的统计分析。最后在以上分析的基础上，可以进行一系列的基于 OTUs、物种组成的聚类分析，PCoA 和 PCA、CCA 和 RAD 等统计比较分析，挖掘样品之间的物种组成差异，并结合环境因素进行关联分析。



图 1 土壤细菌种群多样性分析技术体系

## 3 结果

### 3.1 噬菌体对烟草青枯病的防治效果-灌根处理

表 1 噬菌体 RS-1 对烟草青枯病的防治效果

处理	接种后 7 d		接种后 14d		接种后 21d		接种后 28d		接种后 35d	
	病情指数	防效	病情指数	防效	病情指数	防效	病情指数	防效	病情指数	防效

处理 1	0b	100a	15b	53.33b	33.33b	48.72b	42.78b	43.59b	55.00b	37.55b
处理 2	0b	100a	0c	100a	0c	100a	2.78c	94.87a	4.45c	94.87a
处理 3	6.67a	—	32.22a	—	63.33a	—	82.22a	—	91.11a	—
CK1	7.22a	—	33.33a	—	66.66a	—	81.11a	—	88.89a	—

由于试验中噬菌体 RS-1 混合液是由噬菌体 RS-1 和 NA 液体培养基组成的，所以本试验设了 NA 液体培养基处理，以消除 NA 液体培养基对试验结果的影响，从表 1 中可以看出，处理 3 和 CK1 的病情指数和防效数据没有显著差异，说明用 NA 液体培养基和灭菌水处理的烟苗发病情况并无显著差异，所以可以认为在本试验中 NA 液体培养基对烟草青枯病的发病无影响。

由表 1 数据显示，烟苗在接种过青枯菌 7d 后，对照组开始发病，而用噬菌体液和农用硫酸链霉素做过灌根处理的并未发病，说明此时噬菌体液和农用硫酸链霉素都起到了一定的防治效果；在接菌后 14d，农用硫酸链霉素处理组的烟苗开始发病，此时，农用硫酸链霉素的防治效果为 53.33%，而噬菌体液处理组的烟苗没有发病，此时，噬菌体的防治效果为 100%，优于农用硫酸链霉素；在接菌后 28d，噬菌体液处理组也出现了发病症状，此时，噬菌体液和农用硫酸链霉素的防治效果分别为 94.87%和 43.59%；接菌后 35d，噬菌体液处理组没有出现新的发病烟苗，噬菌体防效为 94.87%，此时，农用硫酸链霉素的防治效果为 37.55%。

### 3.2 噬菌体对烟草青枯病的防治效果-浸根处理

表 2 噬菌体对烟草青枯病的防治效果-浸根

处理	接种后 7 d		接种后 14d		接种后 21d		接种后 28d		接种后 35d	
	病指	防效	病指	防效	病指	防效	病指	防效	病指	防效
处理 I	0b	100a	6.11b	48.33a	27.78b	54.04a	60.55b	7.69b	76.67b	7.69b
处理 II	0b	100a	3.89b	49.17a	19.44c	36.87b	36.11c	41.88a	47.78c	41.88a
处理 III	10a	—	41.11a	—	70.55a	—	78.89a	—	90a	—
CK2	8.33a	—	38.89a	—	67.29a	—	77.22a	—	83.89ab	—

从表 2 中数据可以看出，在烟苗移栽时进行浸根处理后，NA 液体培养基和灭菌水对烟草青枯病发病的影响也无显著差异。接菌后 7d，对照组开始出现发病烟苗，而用噬菌体液和农用硫酸链霉素做灌根处理的烟苗均无发病症状，说明在此时，噬菌体和农用硫酸链霉素的浸根处理都有一定的防治效果；接种后 14d，噬菌体液和农用硫酸链霉素处理组均有烟苗出现发病症状，两者防治效果分别为 49.17%和 48.33%，没有显著差异，说明此时噬菌体和农用硫酸链霉素起到的防治作用大致相同；接菌后 28d 和接

菌后 35d，噬菌体液和农用硫酸链霉素的防治效果分别为 41.88%和 7.69%均无变化，噬菌体的防治效果虽然较低仅为 41.88%，但也远高于农用硫酸链霉素的防治效果 7.69%。

### 3.3 OTU 分析和物种注释

#### 3.3.1 OUT 分析

在 OTUs 构建过程中，对不同样品的 Effective Tags 数据，低频数的 Tags 数据和 Tags 注释数据等信息进行初步统计，并利用聚类软件 Uparse 将 6 个样品的所有 Effective Tags 序列聚类，最后得到的 OTUs 数目，统计结果见图 2。从图 2 中可以看出，SJT1 的 OTUs 数目为 1014 个，SJT2 为 745 个，SJT3 为 1006 个，CK1 为 1002 个，CK2 为 1161 个，CK3 为 1117 个，足够用来进行聚类分析，但因为样本检测的 OTU2 总数过多，本文中只分析序列数前 100 的 OUTs。

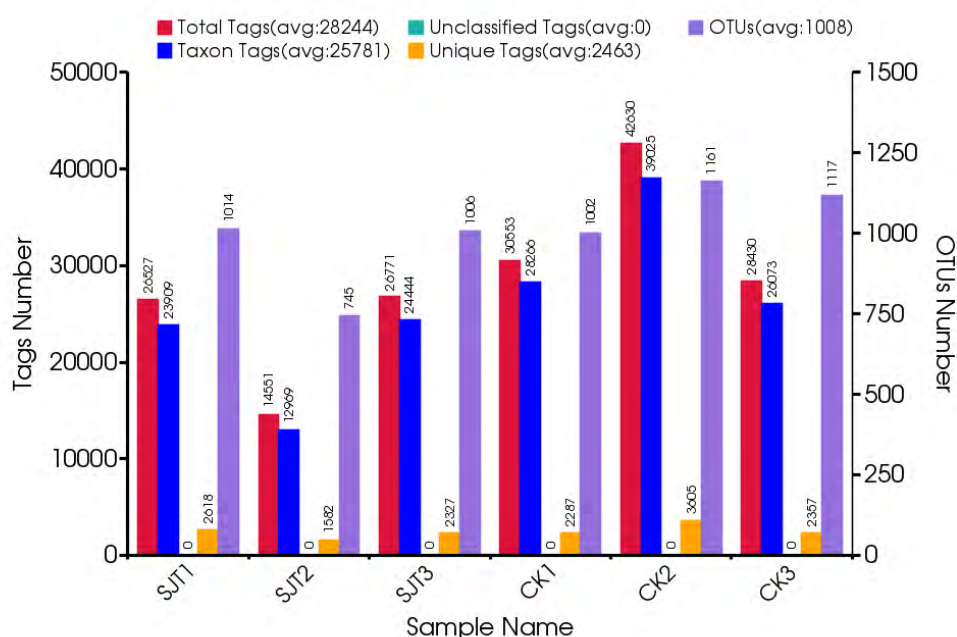


图 2 不同样品的 Tags 和 OTUs 数目统计

横坐标是样品名；第一纵坐标(Tags Number)是 Tags 数目；Total Tags（红色）：指过滤后得到的拼接序列总数；Taxon Tags（蓝色）：指用于构建 OTUs 并且获得分类信息的 Tags 数目；Unclassified Tags（茶绿色）指用于构建 OTUs 但没有获得分类信息的 Tags 数目；Unique Tags（橙色）：指频数为 1，并且无法被聚类到 OTUs 的 Tags 数目；第二纵坐标(OTUs Number)是 OTUs 的数目，OTUs（紫色）：指最终得到的 OTUs 数目。

#### 3.2.2 OUT 分布比较

按所有样品间序列最小值对 OTUs 聚类结果进行标准化处理后，根据 OTUs 聚类分析结果和研究需求，分析不同样品(组)之间的 OTUs 的共有、特有信息，并绘制韦恩图(Venn Graph)，结果见图 3。如图 3 所示 CK 组的特有 OTUs 均为 222 个，SJT 组的特有 OTUs 为 163 个，两组共有的 OTUs 为 978 个，共有



的 OTUs 远远大于各自特有的 OTUs，而且 SJT1、SJT2、SJT3 共有 536 个 OTUs，各自特有 122、60、118 个 OTUs，CK1、CK2、CK3 共有 538 个 OTUs，各自特有 72、137、144 个 OTUs，各自特有和共有的 OTUs 数目并无太大差别。

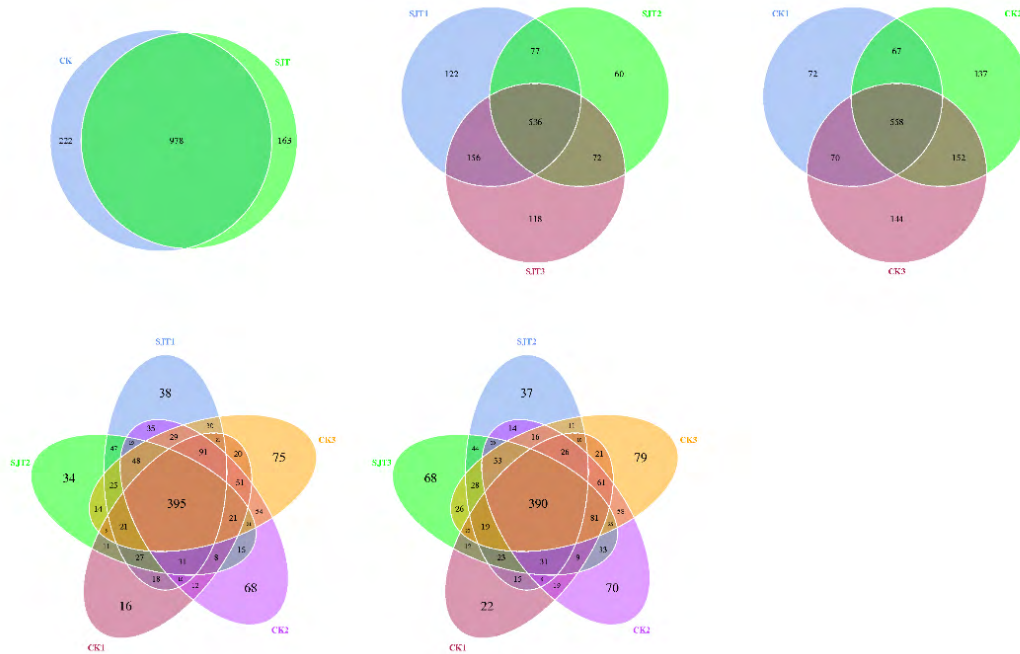


图 3 土壤细菌种群多样性韦恩图

### 3.2.3 各样品群落结构分析

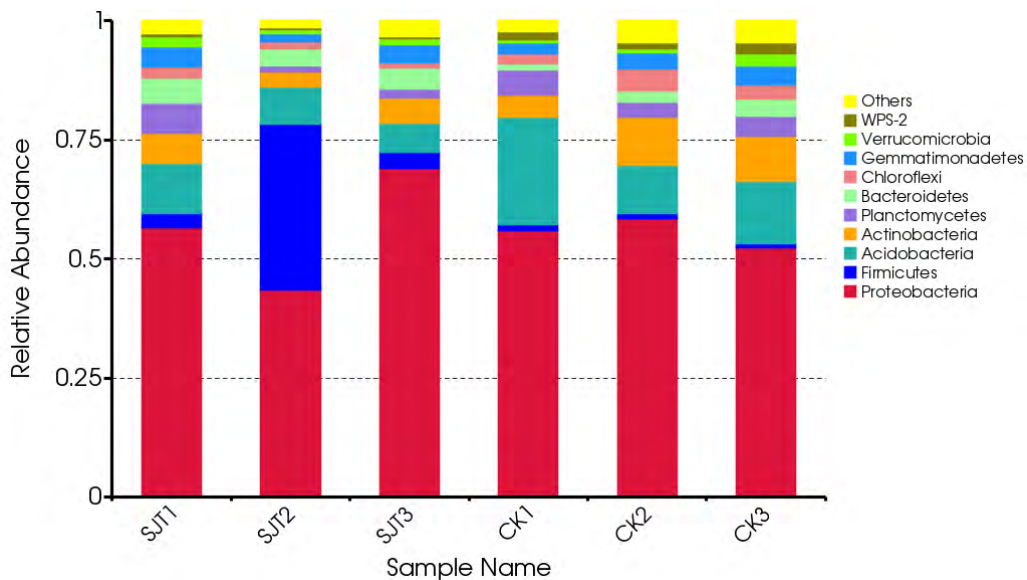


图 4 门水平上的物种相对丰度柱形图

横坐标(Sample Name)是样品名；纵坐标(Relative Abundance)表示相对丰度；Others 表示最大相对丰度(某个门在所有样品中相对丰度的最大值)最高的 10 个门之外的所有门的相对丰度的和。



从图 4 中可以看出，样品中细菌种群的 OTUs 主要分布在 10 个不同的门中，6 个样品的细菌种群文库在门水平上的分布表现出类似的情况，主要是变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicates*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、浮霉菌门 (*Flanctomycetes*)、拟杆菌门 (*Bacterodetes*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*) 等。*R.solanacearu* 所属的 *Proteobacteria* 在各样品中分布的丰度均最高，约占 50% 以上，但 CK 组和 SJT 组间丰度等量近似，差异不显著。而 *Acidobacteria* 和 *Actinobacteria* 在 SJT 处理组和 CK 对照组存在一定的差异显著性，SJT 处理组显著低于 CK 对照组。*Bacterodetes* 表现出与 *Acidobacteria* 和 *Actinobacteria* 不同的趋势，SJT 处理组显著高于 CK 对照组。

### 3.2.4 OTUs 丰度聚类分析

选取最大相对丰度排名前 10 个属所对应的 OTUs 的系统发生关系数据，以及它们对应的 OTUs 的相对丰度信息，实现 OTUs 水平上的样品聚类（纵向聚类），以此考察不同样品间的相似或差异性，结果见图 5。从图 5 中上方的样品聚类树可以看出样品 SJT1、SJT2、SJT3 相似性较高，样品 CK1、CK2、CK3 相似性较高，说明 SJT 组和 CK 组各自的三个重复相似性较高，重复性较好。

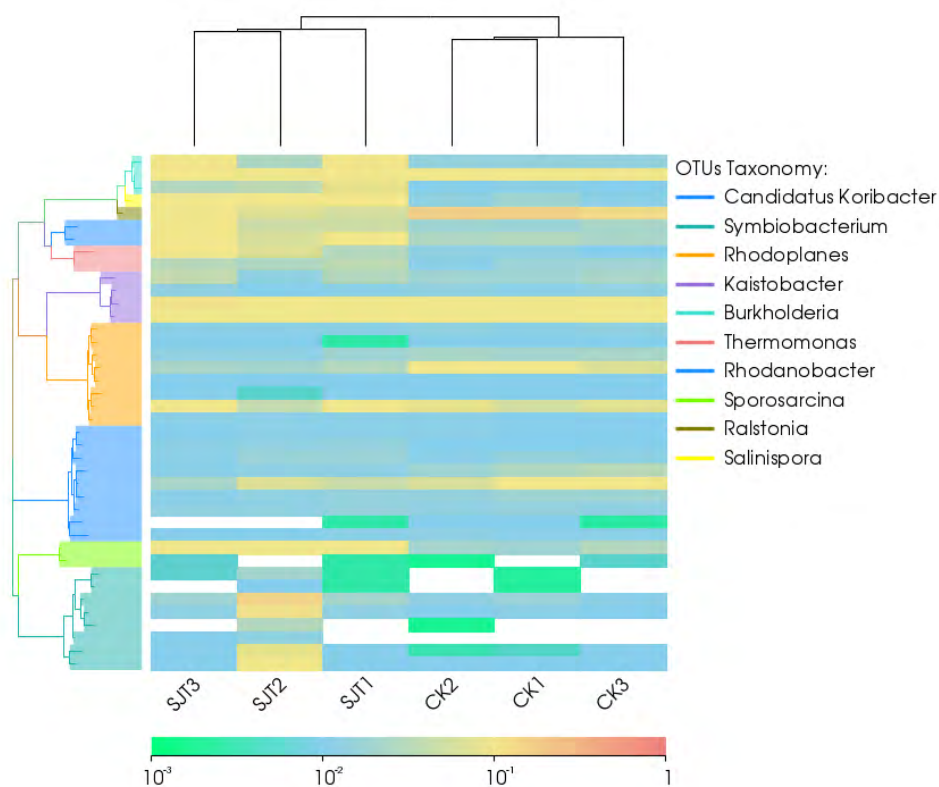


图 5 OTUs 丰度聚类图

横向为样品信息，纵向为 OTUs ID，图中左侧的聚类树为 OTUs 的系统发生关系及其物种注释，分支的颜色表示 OTUs 所在的属(右边的图例)；上方的聚类树为样品聚类树；中间的热图是 OTUs 的相对丰度热图，颜色与相对丰度的关系见图下方的刻度尺。

### 3.2.5 各样品群落结构分析

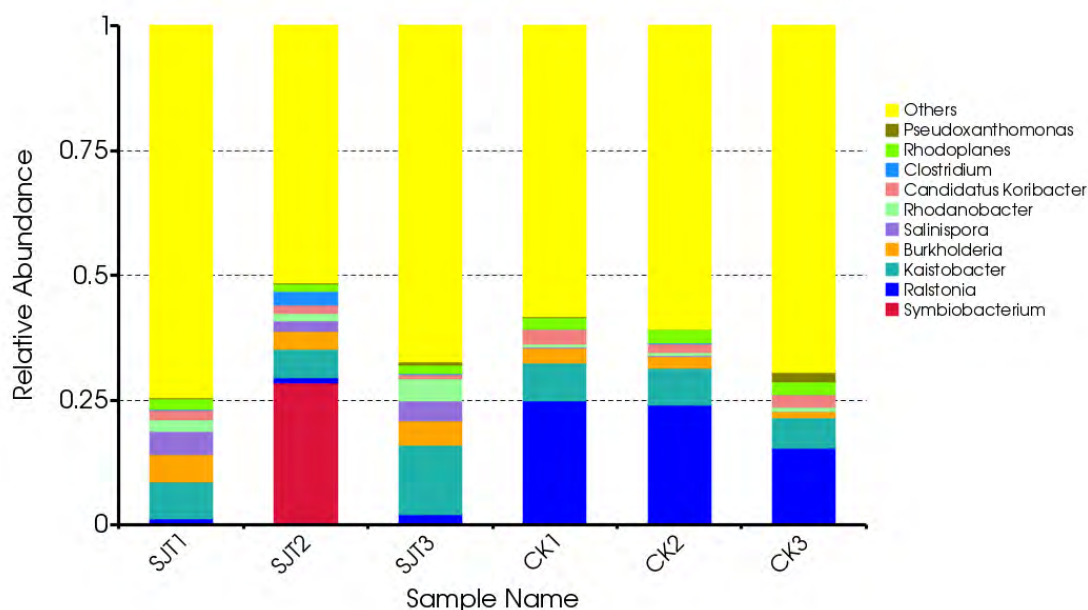


图 6 不同处理组在属水平上的物种相对丰度柱形图

横坐标(Sample Name)是样品名；纵坐标(Relative Abundance)表示相对丰度；Others 表示最大相对丰度(某个门在所有样品中相对丰度的最大值)最高的 10 个门之外的所有门的相对丰度的和。

从图 6 中可以看出，样品中细菌种群的 OTUs 主要分布在 10 个不同的属中，6 个样品的细菌种群文库在属水平上的分布表现出类似的情况，主要是假黄单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas*)、红游动菌属 (*Rhodoplanes*)、梭菌属 (*Clostridium*)、酸杆菌门的 (*Candidatus Koribacter*)、产黄杆菌属 (*Rhodanobacter*)、盐孢菌属 (*Salinispora*)、伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、鞘脂单胞菌目中不产氧的光合细菌 (*Kaistobacter*)、雷尔氏菌属 (*Ralstonia*)、希万氏菌科的 (*Symbiobacterium*)，结合表 4.2、4.3 可以看出，样品 SJT2 中的 *Symbiobacterium* 在 6 个样品中丰度最高，在 SJT 组中丰度整体要高于 CK 组；雷尔氏菌属 (*Ralstonia*) 在 CK 组中的丰度明显高于 SJT 组；*Kaistobacter* 在两组中差异不明显，但在 SJT3 中丰度最高；伯克氏菌属 (*Burkholderia*)、盐孢菌属 (*Salinispora*)、产黄杆菌属 (*Rhodanobacter*)、梭菌属 (*Clostridium*)、假黄单胞菌属 (*Pseudoxanthomonas*) 在 SJT 组的丰度均高于 CK 组；*Candidatus Koribacter*、*Rhodoplanes* 在 CK 组的丰度稍高于 SJT 组。

表 3 属水平上的物种相对丰度 OUT 数据表

Taxonomy	<i>Symbiobacterium</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Kaistobacter</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>Salinispora</i>
SJT1	0.004977	0.007779	0.074449	0.054289	0.045506
SJT2	0.285835	0.00879	0.059064	0.034544	0.020588
SJT3	0.005236	0.015628	0.140607	0.047128	0.039723
CK1	0.003609	0.246232	0.075356	0.029505	0.002689
CK2	0.001999	0.238642	0.07508	0.022012	0.001486
CK3	0.001266	0.152763	0.061635	0.012158	0.000882

表 4 属水平上的物种相对丰度 OUT 数据表

Taxonomy	<i>Rhodanobacter</i>	<i>Candidatus Koribacter</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Rhodoplanes</i>	<i>Pseudoxanthomonas</i>	Others
SJT1	0.024468	0.017901	0.003346	0.021749	0.002008	0.743528
SJT2	0.015576	0.01758	0.027604	0.013494	0.002853	0.514072
SJT3	0.045328	0.009041	0.001677	0.017305	0.005441	0.672885
CK1	0.006793	0.028055	0.001203	0.023173	0.000672	0.582714
CK2	0.007072	0.017835	0.000589	0.027162	0.000564	0.607559
CK3	0.007287	0.026119	0.000307	0.024892	0.01887	0.693821

### 3.2.6 特定物种分类树

基于每个样品的物种分类结果，筛选在属水平上每个分类中各样品最大相对丰度前 10 的分类进行物种分类树统计，多个样品的物种分类树见图 7。从图中可以看出，6 个样品在酸杆菌门 (*Acidobacteria*) 的相对丰度比例随着分类水平接近属开始变得越来越均匀，SJT 组和 CK 组之间在属的水平上的相对丰度基本一致；而在厚壁菌门 (*Firmicutes*) 的相对丰度中，SJT2 样品占了主要部分，其次是 SJT1 和 SJT3，CK 组在其中的相对丰度所占比例则较小；在变形菌门 (*Proteobacteria*) 的水平上，CK 组所占相对丰度比例稍大。

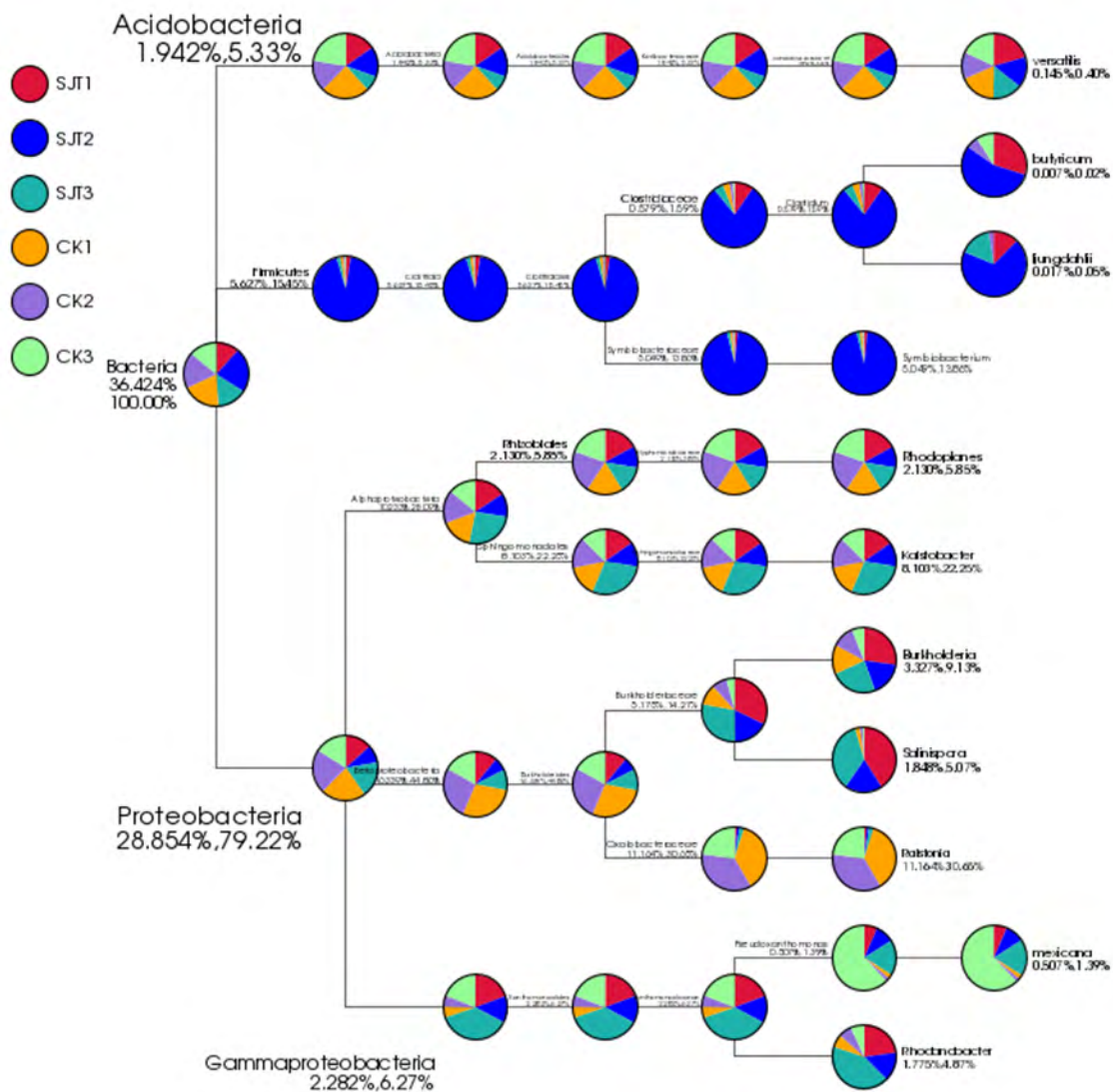


图 7 多样品中特定物种分类树

圆圈中不同颜色的扇形表示不同的样品，扇形的大小表示样品在该分类上相对丰度的比例大小；分类名下方的数字表示所有样品在该分类上的平均相对丰度百分率，有两个数字，前者表示占有物种的百分率，后者表示占所选取物种的百分率。

### 3.2.7 不同处理组 Beta 多样性指数

$\beta$ 多样性研究中，选用 Weighted Unifrac 距离和 Unweighted Unifrac 两个指标进行两个样品间的相异系数衡量，它的值越小，就表示这两个样品的物种多样性方面所存在的差异越小。以 Weighted Unifrac 和 Unweighted Unifrac 距离绘制的 Heatmap 结果见图 8。





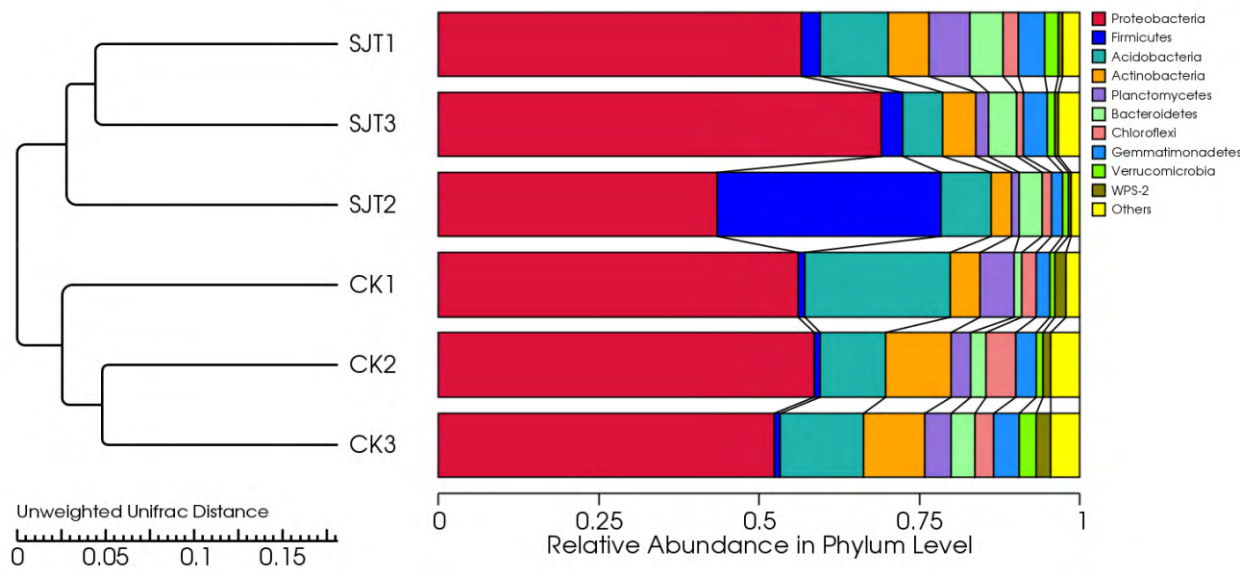


图 9 基于 Unweighted Unifrac 距离的 UPGMA 聚类树

左侧是 UPGMA 聚类树结构，右侧的是各样品在门水平上的物种相对丰度分布图。

如图 9 所示，SJT 组中，SJT1 和 SJT3 之间相似性最高，并在下一个分支点同 SJT2 聚在一起；而 CK 组中，CK2 和 CK3 之间相似性最高，并在之后同 CK1 聚在一起，CK 组和 SJT 组也都能聚在一起，说明他们之间存在相似性。

#### 4 讨论

青枯雷尔氏菌可以侵染 50 多个科 450 余种植物(包括烟草、辣椒、番茄、茄子、花生、马铃薯、甘薯等许多重要的经济作物)<sup>[1, 17-19]</sup>，寄主被侵染后引起的青枯病在世界各地均有发生,其中茄科植物受害最为严重<sup>[1, 17-19]</sup>，尽管通过化学药剂使用、生物防治、种植抗病品种、调整土壤微生物和调整烟苗移栽，以及合理轮作等综合措施加以防治能在一定程度上能减少烟草青枯病危害引起的损失，但仍无法有效控制该病的发生<sup>[20]</sup>。

噬菌体最早是在 1915 年由英国的 Edward Twort 发现的<sup>[21]</sup>，1917 年法国 Felixd'd Herele 再次发现了这种能裂解细菌的生物类群，并将其命名为“bacteriophage”，简称“phage”<sup>[22,23]</sup>。1921 年 Bruynoghe 和 Maisin 就将它用于治疗皮肤葡萄球菌感染<sup>[24]</sup>，1934 年美国科学家报道噬菌体疗法抗肠球菌感染的成功率可达 80%<sup>[25]</sup>，但随着抗生素的出现，噬菌体抗菌作用的研究逐渐减少<sup>[26]</sup>，直到上世纪末，细菌病害耐药菌株和药物残留等问题日益严重，新抗生素研发的速度又远低于耐药菌产生的速度<sup>[27]</sup>，鉴于噬菌体对细菌裂解的特异性和高效性，人们开始重新关注噬菌体在细菌性感染疾病中的作用<sup>[28]</sup>。

本研究通过总结前人的研究方法并加以改进，成功筛选出一株青枯雷尔氏菌噬菌体，并通过分离、纯化、电镜观察形态、测定其滴度、最佳感染复数、一步生长曲线、热稳定性、酸碱耐受力、紫外线敏感性、氯仿敏感性等系统地研究了其生物学特性。根据裂解性噬菌体可在固体培养基上形成透明斑即噬菌斑的特点可以确定其属于裂解性噬菌体，噬菌斑为圆形，边缘光滑，清晰、透亮，直径为 1~2mm 左



右。目前已知肌尾噬菌体科的特征<sup>[29]</sup>为头部呈二十面体，有尾，头部直径 60~145nm，尾部为 (16~20) nm×(80~455) nm，核酸类型为双链 DNA，本研究中分离到的 RS-1 噬菌体核酸类型为 DNA，头部为二十面体，直径大约为 94nm，尾部有收缩尾鞘，大约为 27×100nm，按照国际病毒分类委员会分类标准，其属于肌尾噬菌体科的烈性噬菌体。将该噬菌体与青枯雷尔氏菌共培养后，当感染复数为 0.01 时，子代噬菌体滴度最高，这表明该噬菌体比较高效，在较低浓度时就能起到良好的杀菌效果。而且从测定的一步生长曲线中可以看出，该噬菌体的潜伏期为 30min，裂解期为 80min，这说明其可以在短时间内侵入宿主菌完成自身的繁殖并裂解杀灭宿主菌，并且可以将杀菌效果持续较长时间。本研究还测定了该噬菌体对温度、pH 值、紫外线、氯仿的敏感性，发现其对温度和 pH 值的耐受力都较强，这对实际应用环境中温度、pH 值的不可掌控性来说是很好的应对机制，而且大部分噬菌体因为对紫外线非常敏感，若在大田使用中遇到强光则会对防效造成不可逆转的消极影响，本试验中分离的噬菌体在紫外线强处理 21min 后才出现明显失活，对紫外线有比较强的抵抗力。综合其各项生物学特性可知其有非常大的潜力可以应用到抗青枯雷尔氏菌制剂的研发中来。

通过将原始下机数据经过 reads 拼接、Tags 过滤、去嵌合体后得到的有效数据满足高通量测序的要求，说明试验取样比较合理。将 OUT 进行聚类 and 过滤后进行 OUT 分析和物种注释研究样品中物种组成多样性，发现所取的烟田土中主要分布的细菌属于变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、酸杆菌门 (*Acidobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteria*)、浮霉菌门 (*Flanctomycetes*)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*)、芽单胞菌门 (*Gemmatimonadetes*) 等，且在 CK 组和 SJT 组中，群落组成无明显差别，说明在盆栽试验中用噬菌体防治烟草青枯病时对土壤中细菌种群多样性没有显著的影响。通过 $\alpha$ -多样性分析即样品复杂度分析发现试验中所取样本内包括的物种数量足够、物种的丰富程度高和群落多样性大，能够很好的反映出土壤细菌群落的组成结构，代表了土壤细菌种群多样性的变化情况。通过多样品比较分析发现 CK 组和 SJT 组之间有一定的差异性，这正是土壤中微生物种群数量大，物种丰富的反映，由于盆栽试验有各自的小环境，这种差异性的存在是合理的，而且在最后两组能够聚类到一起，说明它们还有着很大的相似性，即两组之间的细菌种群多样性有很大的相似性。土壤微生物在整个土壤生态系统中占着非常重要的位置，如果防治烟草青枯病的代价是打破整个土壤生态系统的平衡，将是得不偿失的事情，本试验中筛选到的噬菌体在防治烟草青枯病的同时对土壤中的其它细菌的种群多样性没有影响，这说明它的使用是安全的，没有危害的，这为进一步进行生物制剂的研究提供了很好的保障。

## 参考文献

- [1] 周训军, 王静, 杨玉文, 等. 烟草青枯病研究进展[J]. 微生物学通报. 2012(10): 1479-1486.
- [2] 陆铮铮, 彭丽娟, 丁海霞, 等. 烟草青枯菌拮抗放线菌的筛选及鉴定[J]. 中国烟草科学. 2013, 34(2): 54-58.

- [3] 胡重怡, 蔡刘体. 噬菌体治疗作物细菌性病害的研究进展[J]. 贵州农业科学. 2011, 39(3): 101-103.
- [4] 刘先良. 接种丛枝菌根真菌对烟草生长及烟草青枯病的影响[D]. 西南大学, 2014.
- [5] Yamada T, Satoh S, Ishikawa H, et al. A jumbo phage infecting the phytopathogen *Ralstonia solanacearum* defines a new lineage of the Myoviridae family[J]. Virology. 2010, 398(1): 135-147.
- [6] Kutin R K, Alvarez A, Jenkins D M. Detection of *Ralstonia solanacearum* in natural substrates using phage amplification integrated with real-time PCR assay[J]. Journal of Microbiological Methods. 2009, 76(3): 241-246.
- [7] Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. Nature. 2002, 415(6871): 497-502.
- [8] Fujiwara A, Kawasaki T, Usami S, et al. Genomic Characterization of *Ralstonia solanacearum* Phage RSA1 and Its Related Prophage (RSX) in Strain GMI1000[J]. Journal of Bacteriology. 2007, 190(1): 143-156.
- [9] Kawasaki T, Shimizu M, Satsuma H, et al. Genomic Characterization of *Ralstonia solanacearum* Phage RSB1, a T7-Like Wide-Host-Range Phage[J]. Journal of Bacteriology. 2008, 191(1): 422-427.
- [10] Kawasaki T, Nagata S, Fujiwara A, et al. Genomic Characterization of the Filamentous Integrative Bacteriophages RSS1 and RSM1, Which Infect *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Bacteriology. 2007, 189(16): 5792-5802.
- [11] 路荣. NDM-1肺炎克雷伯菌裂解性噬菌体的分离鉴定及其对小鼠菌血症的治疗研究[D]. 吉林大学, 2013.
- [12] 余静丹. 鲍曼不动杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性的研究[D]. 吉林大学, 2013.
- [13] 王丹. 阴沟肠杆菌噬菌体的分离鉴定及生物学特性的初步研究[D]. 吉林大学, 2013.
- [14] 南南, 曹放, 沈俊涛, 等. 一株产1,3-丙二醇的克雷伯氏菌的噬菌体生物学特性[J]. 微生物学报. 2013(09): 943-949.
- [15] Lu Z, Breidt F, Fleming H P, et al. Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage,  $\Phi$ JL-1, from a cucumber fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology. 2003, 84(2): 225-235.
- [16] 代保英. 大肠杆菌K88噬菌体的分离、分类初步鉴定和生物学特性的测定[D]. 扬州大学, 2009.
- [17] Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudu R, et al. *Ralstonia solanacearum* Strains from Martinique (French West Indies) Exhibiting a New Pathogenic Potential[J]. Applied and Environmental Microbiology. 2007, 73(21): 6790-6801.
- [18] 郑世燕. 矿质营养Mo对烟草抗青枯病的影响及生理生化机理[D]. 西南大学, 2014.
- [19] 韩菲菲, 贺鸣, 杨松, 等. 细菌分泌系统与茄科雷尔氏菌致病机理的关系研究进展[J]. 农药学学报. 2012, 14(2): 115-124.
- [20] 蔡刘体, 汪汉成, 袁赛飞, 等. 青枯菌特异性噬菌体的研究进展与应用[J]. 生物技术通讯. 2012(06): 887-890.
- [21] Twort F W. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. The Lancet, 1915, 186 (4814): 1241-1243.
- [22] D Herelle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. CR Acad. Sci. Paris, 1917, 165: 373-375.
- [23] Duckworth D H. History and basic properties of bacterial viruses. Phage ecology. John Wiley & Sons, Inc.,

New York, NY, 1987: 1-43.

[24] Payne R J, Phil D, Jansen V A. Phage therapy: the peculiar kinetics of self-replicating pharmaceuticals. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, 68(3): 225-230.

[25] 姜焕焕, 安小平, 米志强, 等. 噬菌体治疗细菌性感染的进展[J]. 中国生物工程杂志. 2010(12): 116-122.

[26] 赵晨, 王轲. 噬菌体治疗——旧概念, 新阶段. *微生物学通报*, 2011, 38(11): 1698-1704.

[27] Merrill C R, Scholl D, Adhya S L. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2(6): 489-497.

[28] 徐花, 余静丹, 王丹, 温剑平, 孙延波. 粘质沙雷菌裂解性噬菌体ΦSM9-3Y的分离和鉴定. *微生物学免疫学进展*, 2013, 41(2): 1-6.

[29] 冯焯, 刘军, 孙洋, 等. 噬菌体最新分类与命名[J]. *中国兽医学报*. 2013(12): 1954-1958.