# 基于噬菌体的烟草青枯病防治策略优化与评价

易 克[1#]， 葛 龙[2,3#]， 蔡海林[4]， 陈 武[5]， 门思润[1]， 李 晔[6]，
于凌云[2,3]， 黄彬彬[6*]， 刘清术[6*]

(1. 湖南中烟工业有限责任公司，长沙 410007；2. 北京诺安百特生物技术有限公司，北京 100176；3. 青岛诺安百特生物技术有限公司，青岛 266109；4. 湖南省烟草公司长沙市公司，长沙 410011；5. 湖南农业大学植物保护学院，长沙 410128；6. 湖南省微生物研究所，湖南省农业微生物应用工程技术研究中心，长沙 410000)

**摘要** 为科学、高效利用噬菌体防治烟草青枯病，本研究通过单因素试验法对盆栽烟草青枯病菌的接种浓度，噬菌体的施用策略(时期、浓度、频次)进行探索和优化，构建基于噬菌体的盆栽和田间烟草青枯病防治的施用策略，并对3株噬菌体进行盆栽和田间防效评价。盆栽烟草青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* NX1 的发病模型表明，以10%水土比无创式灌根的最佳青枯菌接种剂量为土壤中终浓度$10^6$ cfu/g，此条件下烟草发病快、周期长，病情发展平稳。噬菌体防控盆栽烟草青枯病的施用策略为：在青枯病菌接种当天(接种后6 h)和接种后第3天，以10%水土比无创式灌根方式各施1次，确保每次施用土壤中终浓度达$10^6$ pfu/g，基于此，3株噬菌体的盆栽防效显著优于生物农药3%中生菌素粉剂，且持效期≥40 d，其中复配组在接种青枯菌后40 d的防效显著高于单剂。田间防控试验表明：以10%水土比无创式灌根方式，分别在烟草旺长期和打顶期施用噬菌体制剂各1次，使土壤噬菌体终浓度达$10^6$ pfu/g的策略防效良好，3株噬菌体的田间防效达50.53%～58.54%，显著优于3%中生菌素粉剂3.75 mg/L的防效(32.54%)，其中3株噬菌体复配施用防效达74.63%，显著优于单剂。综上，本研究建立的噬菌体防控烟草青枯病的施用策略良好，3株噬菌体及其施用策略在盆栽及宁乡烟区青枯病防效评价中防效显著优于中生菌素，本结果将为宁乡地区烟草青枯病害防控及噬菌体资源评价、规模化应用等提供重要参考。

**关键词** 噬菌体； 青枯病； 烟草； 防治策略优化； 防效评价

**中图分类号**： S 435.72 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2024598

# Optimized development and evaluation of bacteriophage-based strategies for controlling tobacco bacterial wilt

YI Ke[1#]， GE Long[2,3#]， CAI Hailin[4]， CHEN Wu[5]， MEN Sirun[1]， LI Ye[6]，
YU Lingyun[2,3]， HUANG Binbin[6*]， LIU Qingshu[6*]

(1. *China Tobacco Hunan Industry Co., Ltd., Changsha* 410007, *China*; 2. *Beijing NABT PhagePharm Co., Ltd., Beijing* 100176, *China*; 3. *Qingdao NABT PhagePharm Co., Ltd., Qingdao* 266109, *China*; 4. *Changsha Tobacco Company of Hunan Province, Changsha* 410011, *China*; 5. *College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha* 410128, *China*; 6. *Hunan Institute of Microbiology, Hunan Provincial Engineering and Technology Research Center for Agricultural Microbiology Application, Changsha* 410000, *China*)

**Abstract** To enable the scientific and efficient use of bacteriophages for controlling tobacco bacterial wilt (BW) caused by *Ralstonia solanacearum*, this study optimized the inoculation concentration of the pathogen and the bacteriophage application strategies (timing, concentration, frequency) using a single-factor experimental design. Based on these results, a practical bacteriophage application strategy for both potted and field-grown tobacco was established, and the control efficacy of three phage strains was evaluated. The disease model of *R. solanacearum* NX1 in potted tobacco indicated that the optimal non-invasive root irrigation dose was a final concentration of

**收稿日期**： 2024-11-15 **修订日期**： 2025-01-14
**基金项目**： 湖南中烟工业有限责任公司科技项目(KY2023YC0009，KY2025JD0004)；湖南省烟草公司长沙市公司科技项目(CS2022KJ02)；湖南省重点研发计划(2025AQ2028)
* 通信作者 E-mail：黄彬彬 1049351830@qq.com；刘清术 liuqingshu2012@126.com
# 为并列第一作者

$10^6$ cfu/g in soil at a 10% soil-water ratio, under which disease onset was rapid, the duration long, and the progression stable. The optimized bacteriophage application strategy for potted tobacco bacterial wilt was as follows: non-invasive root irrigations was conducted twice at a 10% soil-water ratio: once on the day of inoculation (6 h after inoculation) and another time on the 3rd day post-inoculation, each ensuring a final concentration of $10^6$ pfu/g in soil. Under this regime, the three tested phages demonstrated significantly higher control efficacy than the conventional biopesticide zhongshengmycin, with protection lasting ≥40 days, and the combined phage treatment achieved the best performance. Field trials showed that applying bacteriophage formulations twice (once during the vigorous growth stage and once at the topping stage) using non-invasive root irrigation (10% soil-water ratio, final concentration $10^6$ pfu/g) achieved excellent control efficacy. The three bacteriophages provided 50.53%－58.54% control effect, significantly outperforming zhongshengmycin 3% DP 3.75 mg/L (32.54%), with the combined phage treatment showing the highest efficacy (74.63%). Overall, the established bacteriophage-based control strategy showed stable and effective suppression of tobacco BW in both potted and field conditions. The three phages and their combined application exhibited significantly superior efficacy to zhongshengmycin in the Ningxiang tobacco-growing area, providing an important reference for local BW management, bacteriophage resource evaluation, and large-scale application.

**Key words** bacteriophage; bacterial wilt (BW); tobacco; strategy optimization; efficacy evaluation

烟草青枯病是制约烟草生产的重要土传病害，生产中该病害频发，常造成毁灭性危害[1-2]，已成为烟草产业健康发展的较大潜在危害。当前，在青枯病害防治实践中，化学防治、农业防治和生物防治等传统手段均未能取得理想效果[1-4]。青枯病病原青枯雷尔氏菌复合种 *Ralstonia solanacearum* complex species，被列为全球十大植物病原细菌之一，可侵染番茄、茄子、马铃薯、辣椒和烟草等茄科作物，花生等豆科植物，以及生姜等姜科植物，共计 450 余种寄主植物[4-5]。由于该病原菌具有土壤传播特性，其侵染过程隐蔽性强、扩散速度快，加之缺乏高效防控手段，往往造成作物产量严重下降，极端情况下可导致田间绝收，给防治工作带来巨大挑战[6]。

“噬菌体疗法”作为近年来的一种新型细菌病害防治方法，因其高效、绿色、经济的优势，受到了越来越多的关注[7-8]，并已在一些植物细菌性病害防治中取得进展[9-10]。Alvarez 等[11]报道了将青枯病菌的烈性噬菌体通过灌溉水施用，可使番茄青枯病发病率从对照的 95.8% 显著下降到 14.5%；Huang 等[12]报道噬菌体 PQ43W 液体制剂对烟草青枯病的室内盆栽防治效果可达 92.80%，田间防治效果达 78.02%；林志坚等[13]采用创伤接种法接种噬菌体 RPZH6 原液，对盆栽烟草青枯病的防治效果达 53.85%。王佳宁等[14]在番茄开花期（移栽 40 d 后）以灌根的形式每株施用 10 mL 噬菌体混合液（$10^7$ pfu/mL），青枯病的发病率显著降低了 86.21%。Bhunchoth 等[15]的研究表明，采用噬菌体 $J_2$ 进行土壤伴施（病菌提前 1 d 伤根接种处理）可有效防控番茄青枯病，噬菌体施用后的第 10 天防效仍达 100%。

然而，在噬菌体防控作物病害的具体实践中，由于缺乏成熟稳定的室内评价体系或标准，无法进行直接的对比来判断噬菌体资源的防效大小。此外，噬菌体的应用评价又需田间试验，存在评价周期长、标准及效果不一、影响因素多、成本高等问题，不利于优异噬菌体资源的发掘与评价。因而，基于噬菌体的烟草青枯病害防控亟须建立科学合理的室内盆栽及田间防效评价体系，并据此探索和优化噬菌体的施用策略，对推动噬菌体生物农药的应用和产业化发展具有重要意义。

本研究通过单因素试验，筛选室内盆栽烟草青枯病菌的稳定接种发病剂量，建立稳定的温室盆栽烟草青枯病接种发病模型；在此基础上优化噬菌体施用策略，评价 3 株噬菌体的温室盆栽和田间防效，为 3 株青枯菌烈性噬菌体在该地区的推广应用，以及科学、高效利用噬菌体资源防控作物青枯病提供科学指导和参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用烟草青枯菌为高致病力菌株 *Ralstonia solanacearum* NX1，于 2022 年 6 月分离自湖南宁乡市喻家坳乡南岭村烟草青枯病发病严重的烟草病茎，并经科赫氏法则验证，保存于湖南省微生物研究所。

由于青枯雷尔氏菌复合种的复合侵染特性,以及噬菌体的专一性,田间青枯病菌的防控,通常采用多药剂或多措施的复合防控策略防止病菌抗药性提升并提高防效[14,16]。因此,本试验选用了 3 株噬菌体制剂 QDNA01、QDNA02、QDNA03(均为单一的噬菌体产品,青岛诺安百特生物技术有限公司),效价均大于 $10^{10}$ pfu/mL(使用前用含青枯菌 NX1 的双层板测定)。3 株噬菌体侵染 NX1 后均能形成裂解斑。

药剂对照为 3%中生菌素粉剂,福建凯立生物制品有限公司。

### 1.2　烟草室内盆栽及管理

烟草以盆栽方式种植于湖南省长沙市天心区湖南省微生物研究所的植物光照培养室,温度(28±3)℃,相对湿度 60%～90%,光强 6 000 lx,光周期 L//D=14 h//10 h。

烟草播种及移栽:将烟草包衣种子('云烟 87',湖南省烟草科学研究所提供)播种于含育苗基质(湖南湘晖)的育苗盘(120 孔),每孔播种 1 粒,烟苗长至 4 叶期时进行移苗,每钵 1 株烟苗,每个苗钵中装 200 g 育苗基质。每间隔 2～3 d 浇无菌水 10～30 mL/株,确保盆栽基质水分含量在 30%～40%。

### 1.3　噬菌体制剂及药剂的配制与使用

噬菌体制剂均于施用前 24 h 参照 Huang 等[12]的噬菌体效价测定方法,采用含青枯病菌 NX1 的双层板分别进行效价测定。随后以无菌水稀释成不同浓度用于不同试验(现配现用),复合噬菌体为 3 株噬菌体按 1∶1∶1体积比的等效价混合液。3%中生菌素粉剂配制成 800 倍稀释,即 37.5 mg/L(现配现用)。

施用方式为无创伤灌根法。室内盆栽试验施用标准为:每株烟草苗接种 20 mL 相应浓度的药剂/噬菌体制剂(接种前 24 h 停止浇水);田间试验施用标准为:每株烟草接种 1.5 L 对应浓度的药剂或噬菌体制剂;对照组均施用等量无菌水作为空白对照。

### 1.4　烟草青枯病害调查

烟草青枯病病害调查参照 GB 23222-2008 烟草病虫害分级及调查方法[17]。分级标准为:0 级,无病症;1 级,发病侧半数叶片萎蔫或枯死;3 级,茎部出现黑斑但未超过茎高的一半,或发病侧二分之一至三分之二叶片枯死;5 级,茎部黑斑超过茎高一半但未达茎顶端,或发病侧超过三分之二叶片萎蔫;7 级,茎部黑斑延伸至茎顶端,或发病植株所有叶片枯死;9 级,植株完全死亡。

发病率=发病株数/调查总株数×100%;

病情指数=100×∑(各级病株数×各级代表值)/(调查总株数×最高级代表值);

防效=(对照病情指数—处理病情指数)/对照病情指数×100%。

### 1.5　烟草青枯病盆栽接种发病体系构建

#### 1.5.1　最佳青枯病菌接种量筛选

将超低温保存的高致病力青枯菌菌株 NX1 于 NB 固体培养基平板上划线活化,28℃恒温培养 24 h 后挑取单菌落转接至 NB 液体培养基。取 28℃、180 r/min 振荡培养至 $OD_{600}\approx1.0$ 的菌液,通过稀释平板计数法精确测定菌液浓度,随后以无菌水将菌悬液梯度稀释为 $5\times10^6$、$1\times10^7$、$2\times10^7$、$5\times10^7$、$1\times10^8$、$2\times10^8$、$5\times10^8$、$1\times10^9$ cfu/mL(现配现用,2 h 内),接种量分别为 $5\times10^5$、$1\times10^6$、$2\times10^6$、$5\times10^6$、$1\times10^7$、$2\times10^7$、$5\times10^7$ 和 $1\times10^8$ cfu/g(干基质计),接种等量无菌水作为空白对照。每个处理 3 个重复,每重复 15 钵苗,不同处理组和重复间均进行物理隔离,避免病菌跨区扩散与迁移。下同。

#### 1.5.2　发病动态模型构建与检验

##### 1.5.2.1　模型方程构建

烟草青枯病发病进程呈现典型的"S"型曲线特征,符合"慢-快-慢"的病情发展规律。现有研究表明,具有"S"型增长特征的系统采用 logistic 曲线方程拟合可获得理想效果[18-19]。鉴于当前烟草青枯病定量模型研究领域尚存空白,本研究基于 logistic 生长曲线模型进行适应性改进。模型参数拟合采用 R 语言 SSlogis 自启动算法实现,数据可视化处理通过 ggplot2 软件包(v 3.5.2)完成。

标准 logistic 模型公式为:

$$Y=\frac{K}{1+e^{\left(\frac{a-X}{b}\right)}}$$

其中,K 表示曲线渐进线值,在生物学应用中,通常代表环境容纳量或最大可能值,本研究设定为 100(对应发病率及病情指数的最大值);a 为曲线拐点参数,表示生长速率最大时对应的 $X$ 值(即 $Y=K/2$ 时);b 为曲线陡峭度参数,决定增长速率(b 值越小曲线越陡峭)。

##### 1.5.2.2　模型检验

依据 logistic 分布的理论特性[20],从以下两方

面验证模型可靠性：

i)参数显著性检验：公式中参数 a，b 的估算需满足 $P \leqslant 0.05$，才具有统计学意义。

ii)模型拟合优度评价：利用残差的标准误(RSE)、收敛容差和决定系数($R^2$)进行模型拟合优度评价，其中 RSE 值越小表明模型预测精度越高，收敛容差趋近于 0 时模型收敛性更佳，$R^2$ 趋近于 1 时拟合模型解释度更强。

### 1.6 噬菌体防控盆栽烟草青枯病的施用策略构建

基于 1.5 节建立的盆栽发病模型，采用单因素正交试验法依次进行施用时期、剂量和频次的三阶段优化。每阶段试验均设阳性对照(CK＋，仅接种病菌)和阴性对照(CK－，无菌处理)。于噬菌体接种后第 21、40 天进行系统性病害调查。

#### 1.6.1 施用时期筛选试验

设置 4 个关键时间节点：接种前 3 d(－3 d)、接种当天(0 d)、接种后 3 d(3 d)和 7 d(7 d)，分别对应田间防治的预防期(病原菌侵入前)、侵染初期(病原菌侵入时)、发病初期(田间初现病株时)和发病扩展期(田间发病率约 10%时)。噬菌体混合液浓度为 $10^{10}$ pfu/mL，每株 20 mL(盆栽土壤终浓度为 $10^9$ pfu/g)。

#### 1.6.2 施用剂量梯度试验

依据 Huang 等[12]和林志坚等[13]前期研究，设置 6 个剂量梯度：$1\times10^8$，$1\times10^7$，$5\times10^6$，$1\times10^6$，$5\times10^5$ 和 $1\times10^5$ pfu/g，同时设置中生菌素 3.75 mg/L 为对照。施用时期选择 1.6.1 的最佳施用时间。

#### 1.6.3 施用频次组合试验

以 1.6.2 节等效中生菌素的最低噬菌体剂量，设计多时期组合的施用频次试验，其中多时期组合按照“最优防效时期”＋“次优防效时期”＋“次次优防效时期”＋“最差防效时期”从左到右依次叠加组合成施用频次为 1、2、3 和 4 次的试验分组。

若 1.6.1 节不同施用时期的防治效果排序为：时期 1＞时期 2＞时期 3＞时期 4，则设置施用 1 次(时期 1)、2 次(时期 1＋时期 2)、3 次(时期 1＋时期 2＋时期 3)、4 次(时期 1＋时期 2＋时期 3＋时期 4)进行防效测定评价，筛选最优施用频次的多时期组合方案。

### 1.7 噬菌体的盆栽防效测定与盆栽施用策略验证

基于 1.5 节的接种发病策略和 1.6 节的噬菌体施用策略，利用 3 株噬菌体(QDNA01、QDNA02、QDNA03)进行防效测定和施用策略评估，以中生菌素处理组为对照。

各处理组的试验方法及病害调查时间、条件完全相同，并与 1.6 节保持一致。

### 1.8 噬菌体防控烟草青枯病的田间防效测定与田间施用策略验证

#### 1.8.1 田间施用策略的构建

噬菌体的田间施用策略参照 1.6 节的盆栽施用策略确定。

药剂施用时期依据宁乡地区田间烟草青枯病流行规律(6 月至 7 月上旬为发病高峰期)、烟草生育期(3 月下旬移栽，7 月中旬采收全部完成)等特征，对盆栽试验中的 4 个用药时间点(接种前 3 d，接种后 0、3、7 d)，分别对应到田间的 4 个时期：1)团棵期(4 月上旬，病原菌入侵前)；2)旺长中期(4 月下旬，病原菌侵入初期)；3)打顶期(5 月下旬，病害始发期)；4)底部叶成熟期(6 月中旬，病害显症期，发病率约 10%)。

田间剂量依据 Huang 等[12]前期研究，按田间烟株根际 15 kg/株土壤计算施用量，噬菌体在土壤中的终浓度与盆栽施用策略一致。

此外，田间施用频次等其他措施与盆栽施用策略保持一致。

#### 1.8.2 田间防效测定与施用策略评价

试验于湖南省宁乡市喻家坳乡(112.27°E，28.19°N)开展，该试验田为多年烟草青枯病高发田(青枯病菌 NX1 分离地)，地势平坦，土壤质地均一，肥力均衡，无旱、涝胁迫，总面积 7 200 $m^2$(120 m×60 m)。采用完全随机区组设计，共设 6 个处理组：单一噬菌体 QDNA01、QDNA02、QDNA03；复合噬菌体(QDNA01＋QDNA02＋QDNA03)；中生菌素(阳性对照)和清水对照(阴性对照)，每组 4 个重复，共 24 个小区(10 m×30 m)，小区间设置双沟覆膜隔离带，防止水肥交叉污染。

供试烟草品种为‘云烟 87’，采用单垄栽培模式，株行距 1.1 m×0.6 m，试验期间遵循常规田间管理措施，禁止使用任何其他土传病害防治药剂。

病害调查统一于 7 月上旬(中部叶采收前)进行。

### 1.9 数据统计与分析

采用 R 语言 stats 包(v 4.3.2)对病害调查的发病率和病情指数进行单因素方差分析($\alpha=0.05$)，多

重比较采用 Duncan 氏新复极差法,通过 agricolae 包(v 1.3.7)实现。数据可视化通过 Excel 软件实现。

## 2　结果与分析

### 2.1　盆栽烟草青枯病接种发病模型的建立与验证

烟草幼苗接种不同浓度青枯病菌 NX1 的室内盆栽试验中,在发病率评价指标方面(表 1),病菌接种量在 $1\times10^6$～$1\times10^8$ cfu/g 接种处理的第 4 天都表现出了发病症状,发病率为 6.67%～75.56%,发病迅速;30 d 后发病率均达到 100%,其中接种量在 $1\times10^6$ cfu/g 时的发病周期最长(发病率从 0～100%,>25 d)。此外,$5\times10^5$ cfu/g 接种处理组在接种后 11 d 才表现出发病症状(2.22%),但与不接病菌组相比差异不显著($P>0.05$);在第 40 天时,发病率(55.56%)与对照组无显著差异($P>0.05$),这可能是因病菌接种量低于发病阈值,不能较好地诱导发病,表现出了发病慢、发病率评价指数偏差大的特征。

病情指数整体变化趋势(表 2)与发病率(表 1)基本一致,同样表现为接种浓度与病情指数呈正相关,且随着盆栽时间的延长病情指数增加;病菌浓度为 $1\times10^6$ cfu/g 处理组的病程周期最长(病情指数为 0～100,>35 d)。同样,$5\times10^5$ cfu/g 接种处理组的发病速度慢,病情指数偏差大,与对照组无显著差异($P>0.05$)。

由表 1 和表 2 可知,病菌接种浓度在 $1\times10^6$ cfu/g 时,盆栽烟草幼苗在接种后第 4 天表现出了明显的病症,直到第 30 天发病率才达到 100%,第 40 天病情指数才达到 100,相比于其他病菌浓度接种处理组,病菌接种浓度 $1\times10^6$ cfu/g 的接种处理组具有发病迅速(<4 d),病程持续周期最长(约 40 d),且整体病情发展具有渐进、平稳的特点。

基于表 1 和表 2 中病菌接种浓度为 $1\times10^6$ cfu/g 的处理组的时间变量与发病率及病情指数的 logistic 拟合曲线,时间变量与发病率(图 1a)及病情指数(图 1b)均呈现典型的“S”形曲线特征,所有病害调查的观测数据点紧密围绕趋势线分布,且模型拟合效果良好($R^2>0.98$)。

**表 1　烟苗接种不同剂量青枯病菌后在不同时期的发病率[1)]**

**Table 1　Disease incidence of tobacco seedlings at different days after inoculation with different concentrations of *Ralstonia solanacearum***

| 接种浓度/(cfu/g) Inoculation concentration | 第 4 天 The 4th day | 第 7 天 The 7th day | 第 11 天 The 11th day | 第 16 天 The 16th day | 第 21 天 The 21st day | 第 25 天 The 25th day | 第 30 天 The 30th day | 第 35 天 The 35th day | 第 40 天 The 40th day |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $5\times10^5$ | (0.00±0.00)f | (0.00±0.00)f | (2.22±3.85)e | (6.67±6.67)d | (6.67±11.55)c | (15.56±21.43)b | (24.44±26.94)b | (37.78±27.79)b | (55.56±49.14)ab |
| $1\times10^6$ | (6.67±0.00)e | (26.67±0.00)e | (55.56±7.70)d | (75.56±3.85)c | (91.11±3.85)b | (97.78±3.85)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $2\times10^6$ | (11.11±3.85)e | (37.78±3.85)d | (62.22±3.85)d | (84.44±3.85)b | (93.33±6.67)ab | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $5\times10^6$ | (28.89±3.85)d | (48.89±10.18)c | (73.33±0.00)c | (93.33±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $1\times10^7$ | (33.33±0.00)d | (55.56±3.85)c | (80.00±6.67)bc | (93.33±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $2\times10^7$ | (53.33±6.67)c | (77.78±3.85)b | (84.44±3.85)ab | (95.56±3.85)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $5\times10^7$ | (68.89±3.85)b | (86.67±0.00)a | (88.89±3.85)a | (97.78±3.85)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $1\times10^8$ | (75.56±3.85)a | (88.89±7.70)a | (91.11±3.85)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| 0 | (0.00±0.00)f | (0.00±0.00)f | (0.00±0.00)e | (0.00±0.00)d | (0.00±0.00)c | (0.00±0.00)b | (0.00±0.00)b | (0.00±0.00)c | (0.00±0.00)b |

1) 数值为平均值±标准差。同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。下同。
Values are presented as mean±standard deviation. Different lowercase letters in the same column indicate significant differences according to Duncan's new multiple range test ($P<0.05$). The same criterion applies hereinafter.

表 2 烟苗接种不同剂量青枯病菌后在不同时期的病情指数

Table 2 Disease index of tobacco seedlings at different days after inoculation with different concentrations of *Ralstonia solanacearum*

| 接种浓度/(cfu/g) Inoculation concentration | 第 4 天 The 4th day | 第 7 天 The 7th day | 第 11 天 The 11th day | 第 16 天 The 16th day | 第 21 天 The 21st day | 第 25 天 The 25th day | 第 30 天 The 30th day | 第 35 天 The 35th day | 第 40 天 The 40th day |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $5\times10^5$ | (0.00±0.00)e | (0.25±0.43)f | (0.74±1.28)g | (2.72±2.99)e | (3.21±5.56)d | (6.67±10.91)d | (15.06±20.59)c | (27.41±27.79)c | (46.69±39.97)b |
| $1\times10^6$ | (1.73±0.86)e | (8.89±2.57)e | (18.52±2.57)f | (32.59±6.06)d | (56.05±4.08)c | (64.20±4.76)c | (87.65±0.86)b | (95.56±2.57)b | (100.00±0.00)a |
| $2\times10^6$ | (2.72±0.43)e | (14.57±2.26)de | (28.64±1.13)e | (53.83±5.46)c | (64.20±4.82)bc | (79.01±6.03)b | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $5\times10^6$ | (7.16±1.13)d | (19.26±2.67)cd | (36.54±2.14)d | (58.77±6.68)bc | (69.38±5.99)ab | (80.00±4.12)b | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $1\times10^7$ | (9.63±2.57)d | (24.94±2.38)c | (47.41±5.79)c | (59.26±7.41)abc | (74.81±8.25)ab | (88.15±2.96)ab | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $2\times10^7$ | (21.23±1.86)c | (36.3±4.86)b | (51.85±5.59)bc | (61.48±6.06)abc | (76.3±4.44)ab | (92.1±2.26)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $5\times10^7$ | (25.43±1.86)b | (40.25±3.42)ab | (57.28±8.13)ab | (64.69±3.8)ab | (73.83±8.42)a | (94.57±0.86)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| $1\times10^8$ | (30.62±3.34)a | (45.93±6.79)a | (62.47±4.46)a | (69.38±3.08)a | (78.77±2.26)a | (97.04±1.48)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a |
| 0 | (0.00±0.00)e | (0.00±0.00)f | (0.00±0.00)g | (0.00±0.00)e | (0.00±0.00)d | (0.00±0.00)d | (0.00±0.00)c | (0.00±0.00)c | (0.00±0.00)b |

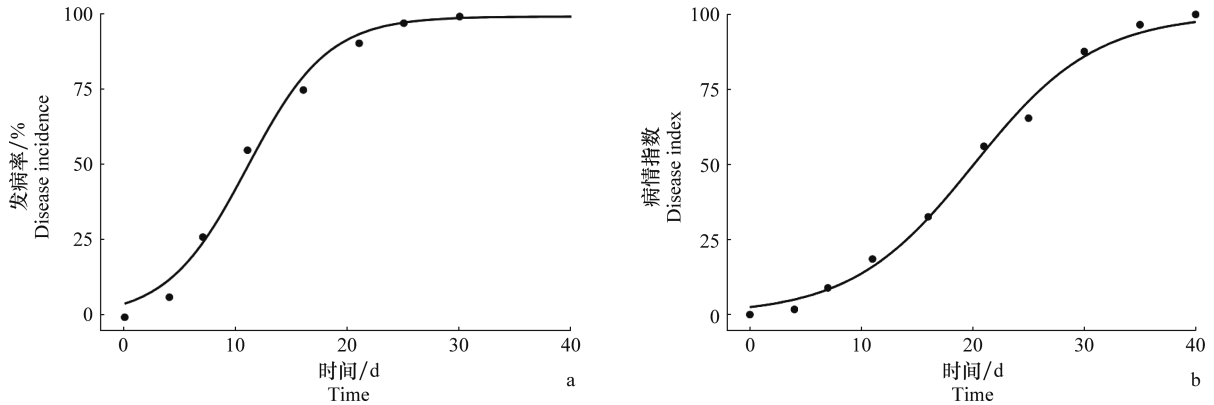


图 1 青枯病菌浓度为 $1\times10^6$ cfu/g 处理组中时间与发病率(a)、病情指数(b)的 logistic 拟合曲线

Fig. 1 Logistic fitting curves of disease incidence (a) and disease index (b) over time in the treatment group of *Ralstonia solanacearum* at $1\times10^6$ cfu/g

其时间变量与发病率及病情指数的拟合 logistic 曲线的方程及参数如下：

$$Y_{发病率}=\frac{100.00}{1+e^{(\frac{10.993\,9-X}{3.602\,5})}}$$

其中：K＝100.00；a＝10.993 9，$P=2.42\times10^{-7}<0.001$；b＝3.602 5，$P=7.40\times10^{-5}<0.001$；残差标准误(RSE)为 4.445($df$＝6)；收敛迭代数为 8；实现收敛容差为 $9.997\times10^{-6}$；$R^2$＝0.989 9。

$$Y_{病情指数}=\frac{100.00}{1+e^{(\frac{20.087\,6-X}{5.468\,6})}}$$

其中：K＝100.00；a＝20.087 6，$P=1.81\times10^{-11}<0.001$；b＝5.468 6，$P=1.96\times10^{-7}<0.001$；RSE 为 3.08($df$＝8)；收敛迭代数为 6；实现收敛容差为 $1.433\times10^{-6}$；$R^2$＝0.994 6。

根据 logistic 分布理论[20-21]，2 个 logistic 回归模型的估计参数 a、b 均达到极显著水平($P\leqslant0.001$)，收敛容差精度高($<10^{-5}$)，拟合曲线 $R^2$ 大($>0.98$)，这表明，基于 $1\times10^6$ cfu/g 病菌接种浓度处理的时间变量与发病率及病情指数的 2 个 logistic 拟合曲线都具有病害流行传播的“S”形典型特征，且拟合优度好，病害发展动态模拟解释力强。但

病情指数的 logistic 回归拟合方程具有更优的估计参数、更低的收敛容差和更大的 $R^2$,因而,拟合曲线优度更高,病害发展动态模拟解释力更准确。

此外,根据 logistic 曲线的拐点参数,发病率和病情指数增长最快时对应的时间分别是 10.993 9 d 和 20.087 6 d,因此,在病害发展早期,采用发病率的 logistic 拟合曲线方程估测病害发展具有更大的尺度,更为适合;采用病情指数的 logistic 拟合曲线方程估测病害发展动态的中后期,具有解释尺度更大更准确的优势。

因此,本研究确立的盆栽烟草青枯病菌接种发病模型的关键要素为:用青枯菌 NX1 以 10%的水土比无创灌根,使土壤中病菌终浓度为 $1\times10^6$ cfu/g。可选用发病率和病情指数作为病害评价的主要指标。

## 2.2　噬菌体盆栽施用策略的构建

为科学评价噬菌体制剂施用对烟草青枯病的防控效果,利用 2.1 节中盆栽烟草青枯病菌接种发病模型,对噬菌体室内盆栽施用策略的时期、浓度和频次,依次进行单因素的要素优化试验,以组合构建最佳的盆栽施用策略。

### 2.2.1　施用时期对防治效果的影响比较

基于 2.1 节盆栽接种发病模型,将 3 株噬菌体按 1∶1∶1体积比等效价复配后以土壤终浓度 $10^9$ pfu/g 进行施用,结合病害发展进程,分别于接种后第 21 天(发病中期)和第 40 天(发病末期)进行病害调查,结果见表 3。病原菌接种后第 21～40 天,4 个不同时期的噬菌体施用处理其青枯病发病率和病情指数均显著降低($P\leqslant0.05$),不同时期施用噬菌体的防效表现为:接种青枯菌后 0 d>接种后 3 d>接种后 7 d=接种前 3 d($P\leqslant0.05$);且随着时间增长,4 个不同时期的施用防效都呈现明显下降趋势。

**表 3　噬菌体不同施用时期对盆栽烟草青枯病的防效[1)]**

**Table 3　Control efficacy of bacteriophages applied at different periods against bacterial wilt in potted tobacco**

| 施用时期 Application period | 处理 Treatment | 第 21 天 The 21st day | | | 第 40 天 The 40th day | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 发病率/% Incidence | 病情指数 Disease index | 防效/% Control efficacy | 发病率/% Incidence | 病情指数 Disease index | 防效/% Control efficacy |
| 接种前 3 d Day 3 before inoculation | 复合噬菌体 $10^9$ pfu/g 盆栽土壤 | (68.89±3.85)b | (41.73±6.30)b | (35.24±9.78)c | (86.67±6.67)b | (68.89±8.54)b | (23.98±9.43)c |
| 接种后 0 d Day 0 after inoculation | | (44.44±3.85)d | (22.72±4.82)d | (64.74±7.48)a | (66.67±6.67)d | (41.98±4.08)d | (53.68±4.50)a |
| 接种后 3 d Day 3 after inoculation | | (54.60±2.20)c | (31.60±3.08)c | (50.95±4.79)b | (77.78±3.85)c | (52.10±1.54)c | (42.51±1.70)b |
| 接种后 7 d Day 7 after inoculation | | (71.11±3.85)b | (41.98±4.70)b | (34.86±7.30)c | (88.89±3.85)b | (67.16±4.08)b | (25.89±4.50)c |
| CK+ | — | (82.22±3.85)a | (64.44±1.96)a | — | (100.00±0.00)a | (90.62±0.86)a | — |
| CK− | — | (0.00±0.00)e | (0.00±0.00)e | — | (0.00±0.00)e | (0.00±0.00)e | — |

1) CK+:只接病原菌;CK−:空白对照。下同。
CK+: Only inoculated with NX1; CK−: Blank control. The same applies below.

### 2.2.2　施用浓度对防治效果的量化分析

根据表 3 结果,选择获得最佳防效的时期(接种青枯菌后 0 d)进行噬菌体不同施用浓度的防效试验,结果表明(表 4):噬菌体施用能有效降低青枯病的发病率和病情指数,且浓度越高防效越好,但随时间延长,防效呈下降趋势。接种噬菌体后 21 d,噬菌体施用浓度在 $5\times10^5$ pfu/g 及以上时的防治效果可等效或优于中生菌素处理;至第 40 天时,噬菌体施用浓度在 $1\times10^6$ pfu/g 以上处理组仍能保持等效或优于中生菌素的防效。因此,选择第 40 天时等效于中生菌素防效的最低噬菌体施用浓度,即 $1\times10^6$ pfu/g 作为后续噬菌体施用策略条件优化的基础参数。

### 2.2.3　施用频次对病害持续控制效果的评价

根据不同噬菌体施用时期的防治效果(表 3),确定对噬菌体的施用频次及时期,组合为:施 1 次(接种青枯菌后 0 d),2 次(接种青枯菌后 0、3 d),3 次(接种青枯菌后 0、3、7 d),3 次(接种青枯菌前 3 d、接种后 0、3 d)和 4 次(接种前 3 d、接种后 0、3、7 d)。结合噬菌体不同施用浓度(表 4)的试验结果,选择

噬菌体施用浓度为$10^6$ pfu/g，开展不同时期组合的施用频次对烟草青枯病的防效评价。

结果(表5)表明：施用1～4次噬菌体制剂在接种病原菌后第21～40天均能显著降低盆栽烟草青枯病的发病率和病情指数($P\leqslant0.05$)，且防效随时间增加，呈现明显的下降趋势；在第21天和40天时，施用2次及以上处理相比施用1次有显著防效优势，而施用2～4次处理组间防效无显著差异($P>0.05$)。

综合考量防效与成本，推荐最优施用频次和时期组合方案为病菌接种的第0天(接种后6 h)和第3天各施用1次，可在保障防效的同时又具备成本、人工等优势。

**表4 施用不同浓度噬菌体对盆栽烟草青枯病的防效**

**Table 4 Control efficacy of different bacteriophage concentrations against bacterial wilt in potted tobacco**

| 处理 Treatment | 施用浓度 Application concentration | 第21天 The 21st day | | | 第40天 The 40th day | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 发病率/% Incidence | 病情指数 Disease index | 防效/% Control efficacy | 发病率/% Incidence | 病情指数 Disease index | 防效/% Control efficacy |
| 复合噬菌体 Complex bacteriophages | $1\times10^8$ pfu/g | (53.33±11.55)c | (34.07±6.58)c | (52.58±9.16)a | (85.51±2.76)c | (74.32±4.34)d | (25.68±4.34)a |
| | $1\times10^7$ pfu/g | (64.44±13.88)bc | (42.22±2.22)c | (41.24±3.09)a | (91.63±2.94)b | (84.20±4.93)c | (15.80±4.93)b |
| | $5\times10^6$ pfu/g | (73.33±6.67)b | (58.52±1.96)b | (18.55±2.73)b | (95.69±3.73)bc | (86.91±4.93)bc | (13.09±4.93)bc |
| | $1\times10^6$ pfu/g | (71.11±10.18)b | (59.75±7.49)b | (16.84±10.43)b | (97.78±3.85)a | (91.85±3.23)b | (8.15±3.23)c |
| | $5\times10^5$ pfu/g | (73.33±6.67)b | (59.51±8.90)b | (17.18±12.39)b | (100.00±0.00)a | (98.02±0.86)a | (1.98±0.86)d |
| | $1\times10^5$ pfu/g | (91.11±3.85)a | (71.36±4.93)a | (0.68±6.86)c | (100.00±0.00)a | (99.51±0.86)a | (0.49±0.86)d |
| 中生菌素 zhongshengmycin | 37.5 mg/L | (73.33±0.00)b | (58.52±3.92)b | (18.55±5.46)b | (97.78±3.85)a | (89.88±4.93)bc | (10.12±4.93)bc |
| CK+ | — | (77.78±10.18)ab | (71.85±9.69)a | — | (100.00±0.00)a | (100.00±0.00)a | — |
| CK− | — | (0.00±0.00)d | (0.00±0.00)d | — | (0.00±0.00)d | (0.00±0.00)e | — |

**表5 噬菌体施用不同频次对盆栽烟草青枯病的防效[1)]**

**Table 5 Control efficacy of bacteriophage applications with different frequencies against bacterial wilt in potted tobacco**

| 处理 Treatment | 施用频次(时期) Application (timing) | 第21天 The 21st day | | | 第40天 The 40th day | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 发病率/% Incidence | 病情指数 Disease index | 防效/% Control efficacy | 发病率/% Incidence | 病情指数 Disease index | 防效/% Control efficacy |
| 复合噬菌体 $10^6$ pfu/g Complex bacteriophages $10^6$ pfu/g | 1次(0 d) | (66.01±1.13)b | (54.07±4.12)b | (19.18±6.16)b | (91.11±3.85)b | (70.37±3.23)b | (15.43±3.88)b |
| | 2次(0,3 d) | (46.67±6.67)c | (35.31±2.80)c | (47.23±4.19)a | (84.44±3.85)c | (58.27±6.03)c | (29.97±7.25)a |
| | 3次(0,3,7 d) | (45.69±6.88)c | (32.35±9.14)c | (51.66±13.66)a | (82.22±3.85)c | (52.59±4.86)c | (36.80±5.84)a |
| | 3次(−3,0,3 d) | (46.67±6.67)c | (30.86±7.49)c | (53.87±11.20)a | (82.22±7.70)c | (51.11±4.44)c | (38.58±5.34)a |
| | 4次(−3,0,3,7 d) | (46.67±11.55)c | (31.85±5.19)c | (52.40±7.75)a | (80.00±6.67)c | (51.85±5.79)c | (37.69±6.95)a |
| CK+ | — | (80.56±5.85)a | (66.91±4.34)a | — | (100.00±0.00)a | (85.68±2.26)a | — |
| CK− | — | (0.00±0.00)d | (0.00±0.00)d | — | (0.00±0.00)d | (0.00±0.00)d | — |

1) 噬菌体的施用时期分别设置为接种青枯菌前3 d(−3 d)，接种青枯菌后0、3、7 d。
The phage application were set as 3 days before inoculation with *Ralstonia solanacearum* (−3 d), and 0, 3 and 7 days after inoculation with *R. solanacearum*, respectively.

### 2.2.4 噬菌体盆栽施用策略的确立

综上，基于盆栽青枯病菌接种模型下的3次噬菌体施用要素的独立试验，优化并确立噬菌体防控盆栽烟草青枯病的施用策略为：以10%的水土比无创灌根方式，在病原菌接种后第0天(接种后6 h)和第3天分两次施用，确保每次施用后土壤噬菌体终浓度达$10^6$ pfu/g，对盆栽烟草青枯病有显著防效，且持效期≥40 d(表5)。

### 2.3 噬菌体的盆栽防效评价与盆栽施用策略验证

基于室内盆栽烟草青枯病接种发病模型和噬菌体室内盆栽施用策略，对3株噬菌体(QDNA01～QDNA03)进行室内盆栽烟草青枯病的防效评价及噬菌体的室内盆栽施用策略验证，结果如表6所示：接种后第21天，噬菌体处理组的发病率和病情指数均显著低于中生菌素对照组($P\leqslant0.05$)，防效48.35%～58.61%，显著优于中生菌素处理组的30.41%($P\leqslant0.05$)；至第40天时，各处理组发病率与病情指数均加重，但噬菌体组的防治优势持续存在，且3株噬菌体的复合施用处理组防效(48.44%)＞单一噬菌体组防效(35.33%～39.60%)＞中生菌素对照组防效(23.65%)($P\leqslant0.05$)。表明建立的盆栽施用策略科学、高效、可

行,其防效优于传统生物药剂中生菌素,持效期≥40 d。

### 2.4　噬菌体的田间施用策略与防效评价

#### 2.4.1　田间施用策略的构建

参照噬菌体室内盆栽施用策略,对噬菌体的田间施用策略确立为:在 4 月下旬(旺长期,模拟病菌侵入初期)和 5 月下旬(开花期,模拟田间病株初现期),以 10%的水土比无创灌根的方式,分别施用 2 次,每次按每株烟 15 kg 根际土壤计,施用土壤噬菌体终浓度达 $10^6$ pfu/g。

#### 2.4.2　田间防效评价及施用策略验证

基于 2.4.1 节噬菌体田间施用策略,3 株噬菌体田间防效评价结果见表 7。3 株噬菌体对烟草青枯病均具有显著防治效果,噬菌体施用组的发病率和病情指数均显著低于中生菌素对照组($P\leqslant 0.05$),且噬菌体施用组的防效均超过 50%,显著优于中生菌素处理组 32.54%的防效($P\leqslant 0.05$);其中,复合噬菌体处理组(QDNA01,02,03 混合施用)的发病率和病情指数最低,防效达 74.63%。表明:本文构建的噬菌体田间施用策略(2.4.1 节)对基于噬菌体的科学防控本地区(宁乡)的田间烟草青枯病策略高效、可行,其相对防效优势(相比生物药剂中生菌素)可持续到烟叶采收尾期(7 月上旬,烟株中部叶采收前)。

**表 6　噬菌体对烟草青枯病的室内盆栽防效评价[1)]**

**Table 6　Evaluation of bacteriophage control efficacy against bacterial wilt in indoor potted tobacco**

| 噬菌体或药剂 Bacteriophage or pesticide | 第 21 天 The 21st day | | | 第 40 天 The 40th day | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 发病率/% Incidence | 病情指数 Disease index | 防效/% Control efficacy | 发病率/% Incidence | 病情指数 Disease index | 防效/% Control efficacy |
| 噬菌体 QDNA01 Bacteriophage QDNA01 | (46.67±6.67)c | (34.81±4.63)c | (48.35±6.86)a | (82.64±3.54)bc | (53.83±1.13)c | (37.89±1.31)b |
| 噬菌体 QDNA02 Bacteriophage QDNA02 | (48.89±7.70)c | (32.10±8.68)c | (52.38±12.88)a | (84.44±3.85)bc | (52.35±5.04)c | (39.60±5.82)b |
| 噬菌体 QDNA03 Bacteriophage QDNA03 | (46.81±3.13)c | (28.89±10.37)c | (57.14±15.38)a | (82.22±3.85)bc | (56.05±2.60)c | (35.33±3.00)b |
| 复合噬菌体 Combined bacteriophage treatment | (42.22±10.18)c | (27.90±6.88)c | (58.61±10.21)a | (77.78±3.85)c | (44.69±2.99)d | (48.44±3.45)a |
| 中生菌素 zhongshengmycin | (66.87±4.47)b | (46.91±1.71)b | (30.41±2.54)b | (88.89±7.70)b | (66.17±7.60)b | (23.65±8.77)c |
| CK+ | (82.22±3.85)a | (67.41±1.96)a | — | (100.00±0.00)a | (86.67±2.96)a | — |
| CK− | (0.00±0.00)d | (0.00±0.00)d | — | (0.00±0.00)d | (0.00±0.00)d | — |

1) 噬菌体菌体或药剂的盆栽施用策略按 2.2.4 节执行。
The application strategies for bacteriophages or agents are conducted according to section 2.2.4.

**表 7　噬菌体对田间烟草青枯病的防效评价[1)]**

**Table 7　Evaluation of bacteriophage control efficacy against tobacco bacterial wilt in field experiments**

| 噬菌体或药剂 Bacteriophage or pesticide | 发病率/% Incidence | 病情指数 Disease index | 防效/% Control efficacy |
|---|---|---|---|
| 噬菌体 QDNA01　Bacteriophage QDNA01 | (29.50±1.73)d | (13.28±1.10)c | (58.54±3.42)b |
| 噬菌体 QDNA02　Bacteriophage QDNA02 | (31.50±1.91)cd | (13.48±1.59)c | (57.91±4.96)b |
| 噬菌体 QDNA03　Bacteriophage QDNA03 | (34.75±2.50)c | (15.84±2.26)c | (50.53±7.07)b |
| 复合噬菌体　Combined bacteriophage treatment | (27.50±1.91)d | (8.12±1.44)d | (74.63±4.50)a |
| 中生菌素　zhongshengmycin | (45.25±3.59)b | (21.60±2.10)b | (32.54±6.55)c |
| 对照组(CK−) | (70.25±3.30)a | (32.02±1.27)a | — |

1) 噬菌体或药剂的施用策略参照 2.4.1 节执行。
The application strategies for bacteriophages or agents are conducted according to section 2.4.1.

## 3 结论与讨论

本研究所建立的室内盆栽烟草青枯病发病模型采用无创灌根法接种，相较于传统有创式接种[13]，更贴近自然发病条件，为盆栽及田间试验的药剂评价等提供了重要参考。方树民等[22]的研究表明，大蒜烤烟轮作时土壤青枯菌浓度达 $1.21\times10^6$ cfu/g 时，烟苗开始发病，与本研究中确立的盆栽接种发病模型的 $1.0\times10^6$ cfu/g 浓度高度吻合（图 1）。彭怀俊等[23]发现土壤菌量激增会导致病情急剧加重，本研究接种高浓度病原菌时病情快速发展的结果与之一致。值得注意的是，$5\times10^5$ cfu/g 的病菌接种浓度处理组的发病率和病情指数呈现标准差大于或接近均值的过离散现象，这与低浓度接种时发病随机性高的特性相符，属于高变异场景的正常表现，表明该浓度下的模型拟合价值有限，不适用于病害发展动态模拟。本研究确立的室内盆栽烟草青枯病接种发病模型的核心技术要素：采用青枯菌 NX1 菌株，按 10%水土比、无创式灌根接种，确保病菌在土壤终浓度达 $1\times10^6$ cfu/g；其发病动态符合病害流行发展的 logistic 曲线增长特征，具有发病迅速（<4 d），病情发展平稳，病程周期长（约 40 d）等特点，可用于室内盆栽青枯病害流行发展的动态模拟。

在噬菌体制剂的施用时期研究中，病菌接种后 6 h 时施用的防效最优，接种后第 3 天施用防效次之。这种防效差异可能与噬菌体的裂解动力学特征相关：早期施用可充分利用其指数级增殖能力，在病原菌出现在植株根际且尚未侵入植株时，快速降低植株根际病菌种群密度以降低发病率[12-13,24]。值得注意的是，噬菌体作为非自主复制生物，其环境适应性显著弱于生防菌，受土壤 pH、紫外线辐射及温度波动等因素影响明显[8,25]，这限制了其通过提前定殖抢占生态位以实现提前预防的可能性。接种青枯菌后第 3 天施用可达到相对高的防效，可能与此时病原菌在根际处于初期聚集阶段，噬菌体可高效识别并裂解游离病原菌。而延迟至接种青枯菌后第 7 天施用防效下降，推测可能是部分病原菌已侵入植株根部完成定殖，并开始快速增殖[26-27]。此时施用的噬菌体难以快速高效地接触到根内病原菌并将其裂解，因而该时期施药防效较差，不能有效遏制病害。这一结果揭示了噬菌体防控青枯病需精准把握病原菌侵染的窗口期，过早或过晚施用都会降低防控效果。

噬菌体制剂的施用剂量研究表明，噬菌体施用剂量与防控效果呈显著正相关，剂量递增可有效提升病害防控率，该结论与 Huang 等[12]利用噬菌体 PQ43W 防治青枯病的研究结果具有一致性。进一步分析施用频次的影响发现，在 2～4 次施用范围内防效未显著提升，这可能与防控时机存在强关联性：在病原菌侵入烟草根系阶段（接种后 0 d）及烟苗显症初期（接种后 3 d）施用噬菌体干预，可有效阻断病害发展，而在此时间窗口外增加施用频次对防效的改善作用有限。基于浓度效应，建议后续可通过提高单次施用浓度来优化噬菌体的防控策略。

噬菌体盆栽施用策略试验表明，不同浓度、时期、频次的施用策略对烟草青枯病的防控效果有显著差异。最优实施方案为：采用无创灌根方式，按 10%水土比，在人工接种青枯病菌后 6 h 及第 3 天，分 2 次将噬菌体制剂施用于土壤，使其土壤终浓度达 $10^6$ pfu/g。该施用方案结果表明（表 6），与传统生物药剂中生菌素防效相比，噬菌体单剂施用即能取得更优的防治效果，而采用多株噬菌体复配的施用效果更优。田间试验进一步验证了噬菌体田间施用策略的可行性，在烟草旺长期和打顶期，按每株 15 kg 土壤的标准进行无创灌根施用，确保每次土壤噬菌体终浓度达 $10^6$ pfu/g，可有效防控烟草青枯病。3 株噬菌体 QDNA01、QDNA02 和 QDNA03 的混配施用防效显著优于单一噬菌体制剂及中生菌素，噬菌体“鸡尾酒疗法”的协同增效作用已获学者认可[14,28-29]，本试验结果进一步支持该技术路线作为未来噬菌体防控细菌病害的重要发展方向。

Alvarez 等[11]的研究证实，通过灌溉水添加噬菌体可显著降低作物青枯病发病率（从 95.8%降至 14.5%），本试验采用 10% 水土比灌根施用策略，推测可能是适宜的土壤湿度促进了噬菌体迁移扩散，这可能是本试验取得良好防效的关键。

由于噬菌体疗法已被广泛认为是绿色高效的细菌病害防控方案[12-13,16,29]，但由于宿主特异性强、环境适应性有限、易受田间环境干扰且存在施药时间与剂量难以精准把控等因素[8,25]，当前噬菌体在作物病害防控中尚未实现大规模推广。3 株噬菌体采用本研究构建的施用策略在盆栽和田间试验中，对烟草青枯病的防效均显著优于传统生物农药中生菌素，这一结果不仅验证了本研究构建的噬菌体施用策略的科学性和有效性，更为优异噬菌体资源的高

效快速筛选评价体系建立及田间规模化应用奠定了基础。

## 参考文献


[1] LI X, LIU Y, CAI L, et al. Factors affecting the virulence of *Ralstonia solanacearum* and its colonization on tobacco roots [J]. Plant Pathology, 2017, 66(8): 1345 - 1356.

[2] 和国优,郭建伟,孔垂思. 生防菌对烟草青枯病控制的研究进展[J]. 江苏农业科学,2023,51(23):9 - 16.

[3] 祝倩,李秋丰,田海艳,等. 基于文献计量学的烟草青枯病杀菌剂研究动态[J]. 世界农药,2025,47(2):46 - 56.

[4] MANSFIELD J, GENIN S, MAGORI S, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 614 - 629.

[5] JIANG Gaofei, WEI Zhong, XU Jin, et al. Bacterial wilt in China: History, current status, and future perspectives [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1549. DOI: 10.3389/fpls.2017.01549.

[6] 龚姝. 烟草青枯病防治研究进展[J]. 热带农业科技, 2023, 46(3): 68 - 72.

[7] ÁLVAREZ B, BIOSCA E G. Bacteriophage-based bacterial wilt biocontrol for an environmentally sustainable agriculture [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1218. DOI: 10.3389/fpls.2017.01218.

[8] 刘帅康, 黎听, 丰慧, 等. 青枯病生物防治研究进展[J]. 植物医学, 2023, 2(4): 39 - 46.

[9] JONES J B, JACKSON L E, BALOGH B, et al. Bacteriophages for plant disease control [J]. Annual Review of Phytopathology, 2007, 45: 245 - 262.

[10] 杨红武, 张胜, 符昌武, 等. 青枯雷尔氏菌噬菌体的研究与应用进展[J]. 生物灾害科学, 2022, 45(3): 283 - 291.

[11] ÁLVAREZ B, LÓPEZ M M, BIOSCA E G. Biocontrol of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum* in irrigation water and host plants by novel waterborne lytic bacteriophages [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2813. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02813.

[12] HUANG Binbin, GE Long, XIANG Dong, et al. Isolation, characterization, and genomic analysis of a lytic bacteriophage, PQ43W, with the potential of controlling bacterial wilt [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1396213. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1396213.

[13] 林志坚, 陈长江, 周挺, 等. 青枯菌噬菌体 RPZH6 株系对烟草青枯病的生防效果及全基因组测序分析[J]. 中国农业科技导报, 2022, 24(10): 133 - 142.

[14] 王佳宁, 王玉鑫, 侯如娇, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2021, 48(9): 3194 - 3204.

[15] BHUNCHOTH A, PHIRONRIT N, LEKSOMBOON C, et al. Isolation of *Ralstonia solanacearum*-infecting bacteriophages from tomato fields in Chiang Mai, Thailand, and their experimental use as biocontrol agents [J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(4): 1023 - 1033.

[16] WANG Xiaofang, WEI Zhong, YANG Keming, et al. Phage combination therapies for bacterial wilt disease in tomato [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(12): 1513 - 1520.

[17] 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, 2009.

[18] 刘斌, 黄英. 逻辑斯蒂曲线与蚕业发展预测[J]. 蚕学通讯, 1990(4):30 - 33.

[19] 孙桂秋, 凌高宏, 黄爱武, 等. 逻辑斯谛曲线的五个阶段[J]. 数理医药学杂志,2012,25(3):269 - 270.

[20] 陈小方,丁曼青,周长发. 种群逻辑斯谛增长模型中各参数的解析[J]. 生物学通报,2024,59(4):92 - 94.

[21] KRZYWINSKJ M, ALTMAN N. Logistic regression [J]. Nature Methods, 2016, 13: 541 - 542.

[22] 方树民, 唐莉娜, 陈顺辉, 等. 作物轮作对土壤中烟草青枯菌数量及发病的影响[J]. 中国生态农业学报, 2011, 19(2): 377 - 382.

[23] 彭怀俊, 顾钢, 纪成灿, 等. 烤烟根系土壤中青枯病菌动态与田间病害发生发展的关系[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2005, 31(4): 384 - 387.

[24] ADDY H S, AHMAD A A, HUANG Q. Molecular and biological characterization of Ralstonia phage RsoM1USA, a new species of *P2virus*, isolated in the United States [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 267. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00267.

[25] VILLALPANDO-AGUILAR J L, MATOS-PECH G, LÓPEZ-ROSAS I, et al. Phage therapy for crops: Concepts, experimental and bioinformatics approaches to direct its application [J/OL]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 24(1): 325. DOI: 10.3390/ijms24010325.

[26] XUE Hao, LOZANO-DURÁN R, MACHO A P. Insights into the root invasion by the plant pathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum* [J/OL]. Plants, 2020, 9(4): 516. DOI: 10.3390/plants9040516.

[27] RIVERA-ZUGA K, HILES R, BARUA P, et al. Getting to the root of *Ralstonia* invasion [J]. Seminars in Cell and Developmental Biology, 2023(148/149): 3 - 12.

[28] LIU Na, LEWIS C, ZHENG Wenming, et al. Phage cocktail therapy: Multiple ways to suppress pathogenicity [J]. Trends in Plant Science, 2020, 25(4): 315 - 317.

[29] KIM H, KIM M, JEE S N, et al. Development of a bacteriophage cocktail against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and its effects on *Pectobacterium* virulence [J/OL]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(19): 0076122. DOI: 10.1128/aem.00761 - 22.


(责任编辑:杨明丽)