

# 产酶溶杆菌生物有机肥对丹参根腐病的防控效果及微生态机制解析\*

游川, 张驰, 袁若钰, 梅新兰, 王孝芳<sup>†</sup>, 徐阳春, 沈其荣, 韦中

(国家有机类肥料重点实验室/江苏省固体有机废弃物资源化高新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/南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095)

**摘要:** 丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 是我国传统大宗中药材之一, 为多年生草本植物。集约化种植导致丹参土传病害频发, 其中根腐病为典型的丹参土传病害, 严重制约了丹参产量与品质提升。本研究从加拿大一枝黄花 (*Solidago canadensis* L.) 根际分离筛选出 4 株溶杆菌, 并比较了其对于丹参根腐病致病菌 *Fusarium oxysporum* 220 的拮抗能力。为筛选拮抗菌株的高效发酵基质, 选取烟草秸秆、稻草秸秆、高粱秸秆、玉米秸秆和加拿大一枝黄花秸秆进行微生物固体发酵, 并以最优发酵秸秆为基质制备产酶溶杆菌生物有机肥 (BOF)。进一步利用盆栽试验评估 BOF 防控丹参根腐病的能力, 最后基于宏基因组测序, 分析了生物有机肥富集的关键类群和功能基因。结果表明, 产酶溶杆菌 *Lysobacter enzymogenes* Le395 对丹参根腐病致病菌 *Fusarium oxysporum* 220 具有较强拮抗作用。有机肥原料筛选实验发现菌株 Le395 最佳发酵基质为加拿大一枝黄花秸秆。盆栽实验发现施加 BOF 处理对丹参根腐病具有较好的防控效率, 与对照组 (CK) 相比, 发病率降低 50.3%, 病情指数降低 50.2%。同时该生物有机肥具有良好的促生效果, 施加 BOF 的处理地上部分鲜物质量较 CK 增加 163.1%, 地下部分鲜物质量增加 147.0%。结合 qPCR 和宏基因组测序分析发现, 施加 BOF 能够显著降低丹参根际镰刀菌属丰度和尖孢镰刀菌的数量, 提高根际溶杆菌属和产酶溶杆菌的丰度, 同时调控了根际微生物群落结构组成, 提高了根际抗病促生相关功能基因的丰度。相关研究结果为建立以生物有机肥为核心的丹参根腐病生态绿色防控策略提供了理论和技术支撑。

**关键词:** 丹参根腐病; 产酶溶杆菌; 固体发酵; 生物有机肥; 根际微生物群落

中图分类号: S154.37

文献标志码: A

## The Biocontrol Effect and Microecological Mechanism of *Lysobacter enzymogenes* Bio-organic Fertilizer on *Salvia miltiorrhiza* Root Rot

YOU Chuan, ZHANG Chi, YUAN Ruoyu, MEI Xinlan, WANG Xiaofang<sup>†</sup>, XU Yangchun, SHEN Qirong, WEI Zhong

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

\*国家重点研发计划项目 (2022YFC3501501)、国家自然科学基金项目 (42090064, 42377118) 和江苏省自然科学基金项目 (BK20240194) 资助 Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFC3501501), the National Natural Science Foundation of China (Nos. 42090064 and 42377118) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province, China (No. BK20240194)

通讯作者 Corresponding author, E-mail: wangxf@njau.edu.cn

作者简介: 游川 (1997—), 男, 四川内江人, 博士研究生, 主要从事微生态与根际健康研究。E-mail: 2430091989@qq.com

收稿日期: 2024-06-25; 收到修改稿日期: 2024-09-20; 网络首发日期 (www.cnki.net):

**Abstract:** 【Objective】 *Salvia miltiorrhiza* Bunge, commonly known as Danshen, is a perennial herbaceous plant that is a traditional and widely used medicinal herb in China. Intensive cultivation has led to frequent outbreaks of soil-borne diseases, notably root rot, which significantly limits the yield and quality of Danshen. 【Method】 This study compared the antagonistic abilities of four *Lysobacter* strains isolated from the rhizosphere of *Solidago canadensis* against the root rot pathogen *Fusarium oxysporum* 220. To identify the most efficient fermentation substrate for the selected strain, microbial solid-state fermentation was conducted using tobacco stalk, rice straw, sorghum straw, corn straw, and *Solidago canadensis* straw. Based on the optimal fermentation substrate, a bio-organic fertilizer (BOF) was prepared. Subsequently, pot experiments were conducted to evaluate the effectiveness of this BOF in controlling Danshen root rot. Finally, based on metagenomic sequencing, the key microbial groups and functional genes enriched by BOF were analyzed. 【Result】 The results of the study demonstrated that the *Lysobacter enzymogenes* strain Le395 exhibited strong antagonistic effects against the root rot pathogen *F. oxysporum* 220. In the organic fertilizer raw material screening experiment, it was found that the optimal fermentation substrate for strain Le395 was *Solidago canadensis* straw. In the pot experiment, it was observed that the application of the BOF effectively controlled Danshe root rot disease. Compared to the control group (CK), the disease incidence was reduced by 50.3%, and the disease index decreased by 50.2%. Additionally, the BOF showed significant growth-promoting effects. The above-ground fresh biomass of the plants treated with BOF increased by 163.1%, while the below-ground fresh biomass increased by 147.0% compared to the CK group. Finally, qPCR and metagenomics sequencing analyses revealed that the application of Le395 BOF significantly decreased the abundance of *Fusarium* and *F. oxysporum* in the rhizosphere of Danshen. It also increased the abundance of *Lysobacter* and *L. enzymogenes*, while modulating the rhizosphere microbial community structure and enhancing the abundance of disease resistance- and growth promotion-related functional genes in the rhizosphere. 【Conclusion】 These findings provide a theoretical and technical foundation for developing an ecological and sustainable strategy for controlling Danshen root rot using bio-organic fertilizer.

**Key words:** Danshen root rot; *Lysobacter enzymogenes*; Solid-state fermentation; Bio-organic fertilizer; Rhizosphere microbial community

丹参 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 又称红根、红丹参、紫丹参等, 是中国传统中药材之一。丹参根部和茎部是其主要药用部位, 可用于治疗和预防心血管疾病、肝脏疾病和糖尿病等, 具有活血化瘀、保护心肌、抗血栓和抗炎等药理作用<sup>[1]</sup>。中药材生产面临野生药材资源枯竭的难题, 集约化、规模化种植是当前保障中药材供应的主要方式, 但该过程中农药、化肥滥用, 导致农业生态系统退化, 病虫害愈发严重, 严重制约了中药材产量和品质提升。丹参根腐病是由尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 引起的一种典型的真菌性土传病害<sup>[2]</sup>, 这些病原体在潮湿、高温的环境下繁殖迅速, 侵害丹参的根部, 导致根系腐烂、生长受阻, 最终影响药材的生长和品质。

中药材土传病害传统防控主要依赖化学农药, 但长期施用化学农药不仅容易诱导病原菌产生耐药性, 还易造成中药材农残超标, 亟需寻找绿色生态、高效稳定的防控策略。生物有机类肥料是特定功能微生物与动植物源固体废弃物经无害化处理、腐熟的有机物料复合而成的一类兼具微生物功能和有机肥效应的肥料。因其具有改善土壤结构、调控根际微生态、提高植物抗逆性等优点, 被广泛用于作物土传病害的防控<sup>[3]</sup>。研究发现, 对由镰刀菌引起西瓜枯萎病的土壤中施加生物有机肥, 能够提高土壤中细菌群落多样性, 降低真菌群落多样性, 促进西瓜根系生长, 从而保持植物的健康<sup>[4]</sup>。唐浩真等<sup>[5]</sup>发现枯草芽孢杆菌与有机肥结合二次发酵制备生物有机肥, 能够降低菠萝心腐病的发生, 防控效率可达 83.5%。因此研究生物有机肥料对农作物生长、病害发生以及土壤生态系统的影响具有重要意义。

溶杆菌属 (*Lysobacter*) 是一类具有滑移性、高 GC (鸟嘌呤和胞嘧啶所占比率) 含量的生防菌, 根际定殖能力强, 且能分泌多种抗生素和胞外水解酶, 对多种病原真菌和细菌均具有溶菌

活性<sup>[6]</sup>。其中产酶溶杆菌 (*Lysobacter enzymogenes*) 作为一类重要的生防细菌, 近年来在微生物防控领域备受关注。早在 1978 年, Christensen 和 Cook<sup>[7]</sup> 在第 23 届国际微生物学大会上首次报告了产酶溶杆菌, 该菌株从黄瓜根际土壤中首次分离出, 并被证实其具有较强的拮抗能力, 可有效抑制包括真菌、细菌和线虫等多种微生物。Yuen 等<sup>[8]</sup> 通过温室试验发现, 以灌根的方式施加产酶溶杆菌 3.1T8 发酵液, 可将黄瓜猝倒病的防控效率提高至 81%。国内的研究中, 南京农业大学植物保护学院鉴定出一株产酶溶杆菌 OH11, 该菌株对油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、甘薯软腐病菌 (*Rhizopus stolonifer*)、辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 和瓜果腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum*) 等多种病原菌的抑制率均超过 80%<sup>[9]</sup>, 为生物防控领域带来了新的希望, 为溶杆菌在农业生产中的应用提供了更多的可能性。

根际是植物根系、土壤、微生物相互作用最活跃的界面, 既是土壤病原菌入侵作物根系的“必经之路”, 也是土壤微生物调控地上部实现其功能的门户枢纽, 对土传病害防控等生态功能的发挥至关重要。根际微生物被誉为植物的“第二基因组”, 在植物生长、养分吸收、抗逆和次生代谢产物合成等过程中发挥着关键作用<sup>[10]</sup>。本研究旨在探究产酶溶杆菌生物有机肥料对丹参根腐病发生以及根际微生物群落结构与功能的影响, 为提高丹参产量和品质提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株与植株品种

从加拿大一枝黄花根际筛选的溶杆菌属菌株中筛选出一株对尖孢镰刀菌具有较强拮抗效果的菌株 395。将测序所得菌株序列在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中进行生物大分子序列比对搜索工具 (BLAST) 同源性对比, 并利用分子进化遗传学分析 5.0 (MEGA5.0) 软件构建系统发育树, 根据相似性比较和系统发育分析, 并通过伯杰氏细菌鉴定手册比较菌株形态学 (具有黄色、光滑的菌落), 最终鉴定该菌株属于产酶溶杆菌 (*Lysobacter enzymogenes*), 将此菌株命名为 Le395 (CGMCC 28570) 用作后续试验。

丹参种子于 2023 年 5 月购于河北安国市中药材推广站。

### 1.2 产酶溶杆菌生物有机肥研制方法

为制备产酶溶杆菌生物有机肥, 首先筛选植物源有机肥基质, 分别选取烟草、水稻、高粱、玉米、加拿大一枝黄花等植物秸秆进行堆肥腐熟, 在防水膜上设置长 × 宽 × 高为 1.2 m × 1.2 m × 1.2 m 的 5 个实验堆, 物料含水率调节至 60% 左右 (用手抓紧秸秆, 指缝刚好挤出水滴为宜), 堆体前三天每天翻堆一次, 增加堆体与空气的接触面积, 堆体快速升温, 第四天开始测量堆体温度, 物料温度在 50~54 °C 维持 11 d 左右后降温至 30~40 °C。在第 15 天按照 2% (质量比) 物料补充尿素进行二次升温发酵, 在第 30 天降至室温后, 堆体的颜色逐渐变深呈黑褐色, 达到腐熟标准, 得到腐熟有机肥 (OF)。每种腐熟有机肥称取 2 g, 对其进行灭菌处理后, 置于 50 mL 灭菌离心管中, 添加 8 mL 无碳源的无机盐培养基调节有机肥的含水率为 80%, 按照有机肥质量的 1% 接种产酶溶杆菌液, 充分振荡混合, 每处理 5 个重复。28 °C 的恒温恒湿培养箱中培养 7 d 后, 加入 18 mL 无菌水, 置于 28 °C 恒温摇床上, 以转速 180 r·min<sup>-1</sup> 振荡 30 min, 静置 30 min, 吸取 200 μL 滤液于 96 孔板中, 酶标仪上测 600 nm 波长下的吸光值 (OD<sub>600</sub>) 表征产酶溶杆菌的生物量, 以不接种产酶溶杆菌的悬液为对照, 消除不同腐熟程度对吸光值的影响。将过滤后的残渣置于 65 °C 烘干 3 d, 称取质量, 测定产酶溶杆菌对腐熟有机肥的降解率。筛选获得高功能菌生物量、高降解率的发酵基质。

利用胰酪大豆胨液体培养基 (TSB) 发酵产酶溶杆菌 Le395, 得到数量达 10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 的种子液。以上述筛选出的最佳有机肥基质为原料制备生物有机肥, 具体方法如下: 以 10% 接种量 (v/w, 按堆肥质量计算) 将种子液添加至有机肥中, 搅拌均匀, 进行二次发酵。最后通过稀释

涂布方法检测生物有机肥中微生物数量,各项检测有机肥指标均按照 NY884—2012<sup>[11]</sup>的要求,即得生物有机肥(BOF)。

### 1.3 盆栽试验设计

盆栽试验在江苏省南京市南京农业大学白马试验基地温室进行,将丹参移栽至 2.5 kg 无丹参种植历史的健康土壤中,将丹参盆栽分为 3 组,分别为对照(CK)、有机肥处理(OF)和生物有机肥处理(BOF),每个处理 12 盆,每盆 1 棵苗。CK:每盆施用土壤总质量 0.1%的复合肥(氮磷钾质量各占比 15%)与盆栽土混合做基肥;OF:每盆施用土壤总质量 1%的有机肥(氮素质量百分比约 1.5%)与盆栽土混合做基肥;BOF:每盆施用土壤总质量 1%的生物有机肥做基肥,常规管理。移栽 7 d 后,采用灌根法将尖孢镰刀菌菌液均匀浇入丹参根部附近土壤中,每盆丹参接入病原菌终浓度为每克土壤  $10^8$  孢子数。在接种病原菌后,定期观察植株生长情况,21 d 后通过破坏性采样观察丹参根部的发病情况,计算根部发病率、病情指数及防控效率。针对丹参根腐病发病程度,将其分为 5 个等级:0 级表示根系健康未发病;1 级表示腐烂仅发生在块根表面,且根系腐烂面积小于 25%,叶片正常;2 级表示叶片变黄,腐烂已扩展至内部,且根系腐烂面积在 25%~50%之间;3 级表示叶片枯萎,腐烂已扩展至内部,须根全部腐烂,且根系腐烂面积在 50%~75%之间,叶片枯萎;4 级表示叶片完全干枯,整个块根完全腐烂,支须根腐烂,且根系腐烂面积处于 75%以上。分别按照下列公式计算丹参根腐病发病率、病情指数和防控效率:发病率/%=处理发病株数/处理重复数 $\times$ 100;病情指数=100 $\times$  $\sum$ (各级病株数 $\times$ 相应病情等级)/(调查总株数 $\times$ 最高病情等级);防控效率%=[(对照病情指数—处理病情指数)/对照病情指数] $\times$ 100。同时每个处理采取 12 棵植株,测定植株地上部鲜物质量和地下部鲜物质量,以评估防控促生效果。

### 1.4 盆栽根际土壤样品采集与病原菌定量

将丹参从盆栽中整株取出,轻轻抖动根部,最后附着于根系的土壤视为根际土。每个处理组随机将两棵植株根际土混合为 1 个样本,共获得 6 个样本。利用土壤 DNA 快速提取试剂盒提取根际土样本中的 DNA,并在分光光度计(岛津 UV2401PC,日本岛津公司)上检测 DNA 浓度。荧光定量 PCR 引物采用 FaeF2 和 FaeR2 (FaeF2: 5'-GGCATTACTCCGCCACTTG-3'; FaeR2: 5'-AGCTCAGCGGCTTCC TATTG-3'),以质粒各梯度拷贝数的对数为横坐标,以各梯度阈值循环数(Ct 值)为纵坐标,构建病原真菌 *F. oxysporum* 的实时荧光定量 PCR 标准曲线<sup>[12]</sup>,定量检测丹参不同处理根际土壤中 *F. oxysporum* 的拷贝数。在实时荧光定量 PCR 仪(CFX Connect<sup>TM</sup>, BIO-RAD 公司)上设置相应扩增程序,定量体系为 20  $\mu$ L:绿色荧光染料(TB green) 10  $\mu$ L, FaeF2 0.8  $\mu$ L, FaeR2 0.8  $\mu$ L, DNA 1  $\mu$ L, dye2 0.4  $\mu$ L, dd H<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L, 扩增条件为:50  $^{\circ}$ C 2 min, 95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 95  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 64  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 37 个循环。

### 1.5 微生物群落分析

将提取后的 DNA 样品送至上海凌恩生物科技有限公司,按照每样本 10G 的测序深度进行宏基因组测序,1  $\mu$ g 基因组 DNA 经由聚焦超声波剪切仪(Covaris S220,马萨诸塞州沃本市,美国)剪切,测序文库的片段长度约为 450 bp。所有样本均在 Illumina HiSeq X 仪器上以双端 150bp (PE150)模式进行测序。原始序列读取经过 Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/uploads/supplementary/Trimmomatic>) 进行质量修剪后去除接头污染物和低质量读取。经过质量控制的读取,然后通过短序列比对的算法工具(BWA mem)算法(<http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>)去除宿主基因组污染和低质量数据获得高质量碱基序列读长(reads),并用于进一步微生物群落分析。通过 Kraken2 数据库将所有 reads 分类至七个系统发育水平(域、门、纲、目、科、属、种)或未分类,然后再使用贝叶斯丰度估算(Bracken)评估各个分类水平物种的相对丰度<sup>[13]</sup>。使用 MegaHit 和“-min-contig-len 500”参数为每个样本的 reads 组装成碱基重叠群(contigs)。预测了组装 contigs 中的开放阅读框(ORFs),使用 Prodigal (v2.6.3)进行聚类后,所有 ORFs 生成了一组唯一的基因。每个簇中最长的序列被视为唯一基因集中每个基因的代表序列,然后使用

salmon 软件以获取每个基因的读取数。最后,根据每个样本中的基因长度和总读取数计算基因丰度。进一步使用 BLASTX 将唯一基因集与京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库进行比对,识别蛋白质并检索其功能注释。根据样本的 KEGG 同源基因数据库 (KO) 结果,利用 KEGG 基因通路 (KEGG Pathway) 数据库中注释基因映射的通路,获取每个样本的特定功能和通路。然后将预测的基因转换为氨基酸序列,并且使用 DIAMOND 与 Carbohydrate—Active Enzymes (CAZy) 数据库和 eggNOG 数据库进行比较。利用 R 语言中的 QIIME 软件包执行  $\alpha$  多样性指数香农指数 (Shannon) 分析,评估内部菌群的丰富度和多样性。根据样品序列间进化信息的距离,绘制揭示样本间差异的主坐标分析 (PCoA) 图。

## 1.6 数据统计与分析

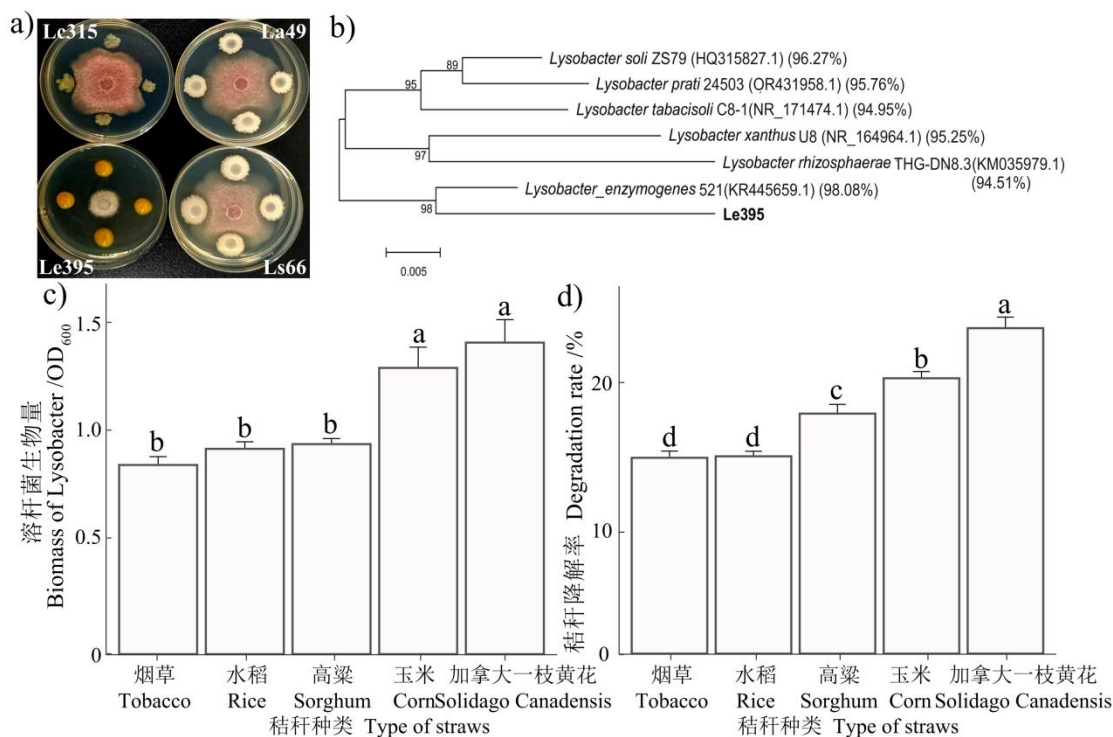
试验数据通过 SPSS 26.0 和 R 语言 4.2.2 (R 包: vegan、picante、ggbiplot、ggsci、psych、igraph、ggplot2) 进行处理和统计分析。基于归一化的 species\_taxa\_table 的置换多元方差分析 (PERMANOVA),利用 R 平台采用软件包 vegan 进行 Adonis 分析,邓肯 (Duncan) 多重检验法检验处理间的差异显著性 ( $P < 0.05$ )。

## 2 结果

### 2.1 菌株筛选及生物有机肥原料选择与制备

以丹参根腐病致病菌尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 220 为对象,采用平板对峙法对从加拿大一枝黄花根际土壤中分离的 4 株溶杆菌菌株进行抑菌效果评估 (图 1a),筛选到一株对尖孢镰刀菌具有较强拮抗效果的菌株 395。将测序所得菌株序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 同源性对比,并利用 MEGA5.0 软件构建系统发育树,根据相似性比较和系统发育分析,鉴定该菌株属于 *Lysobacter enzymogenes* 分支 (图 1b),将此菌株命名为 Le395 (CGMCC 28570) 用作后续试验。

由于产酶溶杆菌 *Lysobacter enzymogenes* Le395 分离自植物根际,推测其对植物秸秆具有更好的亲和性。因此选取烟草秸秆、水稻秸秆、高粱秸秆、玉米秸秆、加拿大一枝黄花秸秆为原料,堆肥腐熟获得有机肥,按照有机肥质量的 1% 接种产酶溶杆菌种子液,秸秆发酵 7 d 后,测定细菌生物量 ( $OD_{600}$ )。相较于烟草秸秆、水稻、高粱秸秆等原料秸秆,玉米秸秆与加拿大一枝黄花秸秆中菌株 Le395 的生长效果更为显著, $OD_{600}$  值分别为 1.3、1.4 (图 1c)。产酶溶杆菌 Le395 对加拿大一枝黄花秸秆腐熟有机肥的降解率最高,达到 24.6%,显著高于其他秸秆降解率 (图 1d)。综合微生物生物量和秸秆降解效率,最终选择加拿大一枝黄花秸秆作为产酶溶杆菌 Le395 的发酵原料基质。



注: Lc315: 溶杆菌 315, La49: 溶杆菌 49, Lc395: 溶杆菌 395, Ls66: 溶杆菌 66; 小写字母表示不同处理在  $P < 0.05$  的水平上有显著差异。下同。Note: Lc315: *Lysobacter* 315, La49: *Lysobacter* 49, Lc395: *Lysobacter* 395, Ls66: *Lysobacter* 66. Lowercase letters indicate statistical differences between treatments at  $P < 0.05$  levels. The same as below.

图 1 溶杆菌菌株及其有机肥原料的筛选 (a. 溶杆菌对 *F. oxysporum* 的平板拮抗活性; b. 菌株 Le395 系统发育树; c. 菌株 Le395 在不同秸秆有机肥中的生长情况; d. 菌株 Le395 对不同秸秆有机肥的降解率)  
Fig. 1 Screening of *Lysobacter* strains and organic fertilizer carriers (a. Antagonistic activity of *Lysobacter* against *F. oxysporum*; b. Phylogenetic tree for strain Le395; c. Growth of strain Le395 with different straw substrates. d. The degradation rate of strain Le395 on different straw substrates)

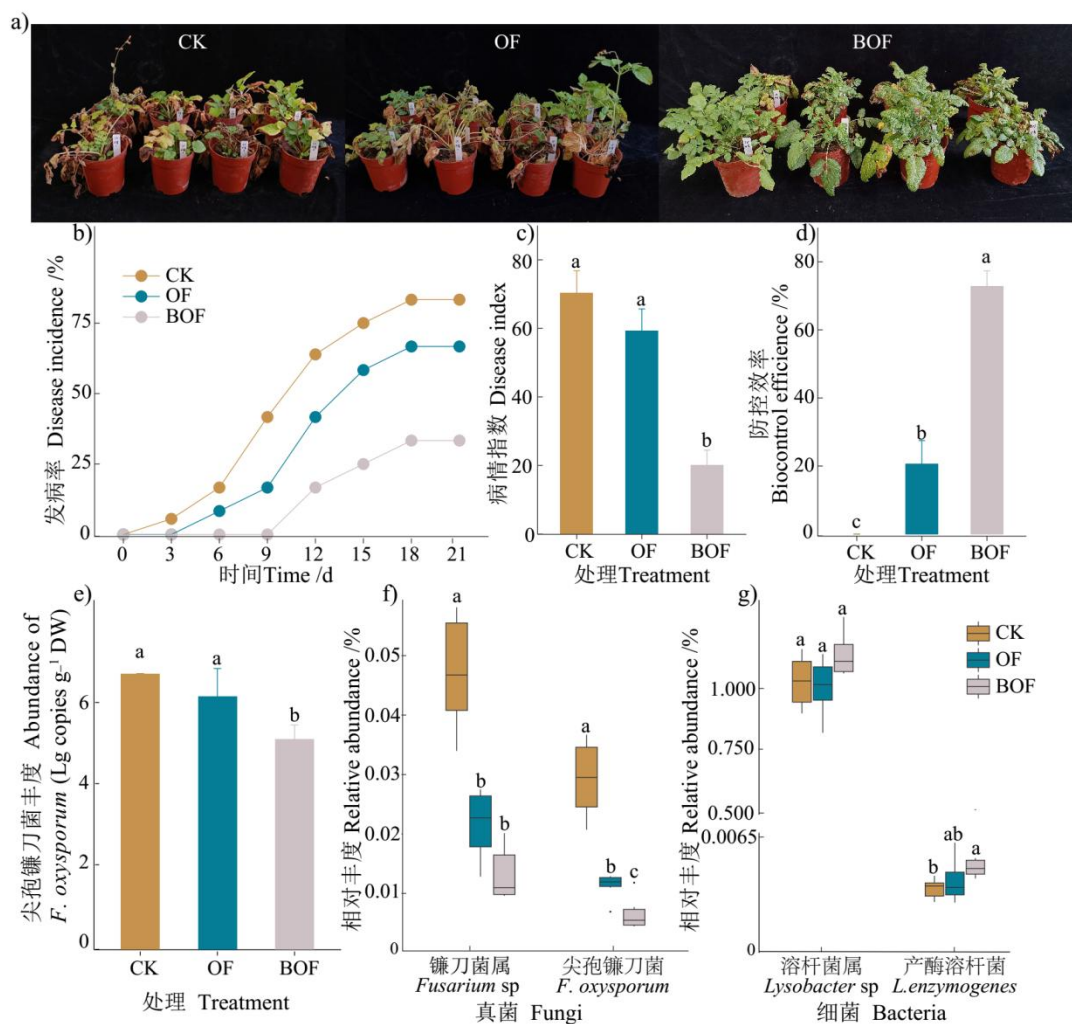
## 2.2 不同施肥处理对丹参根腐病的防控效果

基于产酶溶杆菌对不同秸秆有机肥的降解率和发酵生物量,选择加拿大一枝黄花秸秆作为有机肥基质,复配产酶溶杆菌进行二次发酵制备生物有机肥。进一步利用盆栽试验比较对照、单独施加有机肥和施加生物有机肥三种处理对丹参根腐病发生的影响。试验结果显示,施加产酶溶杆菌生物有机肥对丹参根腐病具有较好的防控效果(图 2a),与对照组(CK)相比,有机肥组(OF)与生物有机肥组(BOF)均呈现出抑制根腐病发病的趋势(图 2b),BOF 处理组效果更显著,CK 组发病率为 83.3%,OF 组发病率为 66.7%,而 BOF 组发病率为 33.3%,显著低于对照组(CK)。施加生物有机肥组病情指数显著降低且表现出更好的防控效果,其防控效率到了 72.9%,高于施加有机肥组(防控效率 50.2%,图 2c,图 2d)。此外,施加生物有机肥处理及有机肥处理对丹参的地上部分和根系生长产生了显著的促进作用,丹参地上部分鲜物质量分别增加了 163.1%和 65.8%,根鲜物质量分别增加了 147.0%和 38.1%(表 1)。这表明施加生物有机肥和有机肥对丹参根腐病的降低及生长状况具有明显的促进作用,且施加生物有机肥对丹参生长促进效果更显著。

采用定量 PCR 技术测定丹参根际土壤中尖孢镰刀菌的数量,结果如图 2e 显示,对照组中尖孢镰刀菌的数量为  $1.0 \times 10^7$  copies·g<sup>-1</sup> 土,有机肥组(OF)中尖孢镰刀菌的数量为  $2.0 \times 10^6$  copies·g<sup>-1</sup> 土,生物有机肥(BOF)组中的尖孢镰刀菌数量为  $2.0 \times 10^5$  copies·g<sup>-1</sup> 土,生物有机肥(BOF)组根际尖孢镰刀菌数量显著低于其他处理。通过对根际微生物的宏基因组 reads 物种注释属和种水平的相对丰度分析发现,生物有机肥处理组(BOF)中根际镰刀菌属水平和种水平(尖孢镰刀



菌) 丰度显著降低, 根际溶杆菌属水平及种水平(产酶溶杆菌) 丰度显著增加(图 2f, 图 2g), 说明施加生物有机肥可显著降低丹参根际病原菌的数量, 同时增强有益菌的根际定殖, 最终降低丹参根腐病的发生。



注: CK: 对照; OF: 有机肥; BOF: 产酶溶杆菌生物有机肥。小写字母表示不同处理间显著差异( $P < 0.05$ )。下同。Note: CK: control; OF: organic fertilizer; BOF: *Lysobacter* bio-organic fertilizer. Lowercase letters represent significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ). The same as below.

图 2 不同处理对丹参根腐病的防控效率 (a. 丹参生长和健康状况; b. 发病率曲线; c. 病情指数; d. 防控效率; e. 根际的尖孢镰刀菌丰度; f. 根际的镰刀菌属和尖孢镰刀菌种的相对丰度; g. 根际土的溶杆菌属和产酶溶杆菌种的相对丰度)

Fig. 2 The control effect of different treatment groups on Danshen root rot disease (a. Growth and health status of Danshen; b. Disease incidence curves; c. Disease index; d. Biocontrol efficiency; e. Quantity of *F. oxysporum* gene in the rhizosphere soil; f. The relative abundance of *Fusarium* and *F. oxysporum* in the rhizosphere soil; g. The relative abundance of *Lysobacter* and *L. enzymogenes* in the rhizosphere soil)

表 1 温室盆栽试验产酶溶杆菌生物有机肥对丹参的促生效果

**Table 1** Greenhouse pot experiment on the growth enhancement of *Salvia miltiorrhiza* with *Lysobacter* bioorganic fertilizer

处理 Treatment	地上部鲜物质量 Fresh biomass of above ground/(g·plant <sup>-1</sup> )	根鲜物质量 Fresh biomass of root/(g·plant <sup>-1</sup> )
CK	19.6±2.4c	35.9±2.8c
OF	32.5±5.8b	49.6±4.3b
BOF	50.6±7.1a	88.7±11.2a

注：同列不同小写字母表示不同处理间显著差异( $P < 0.05$ )。Note: Lowercase letters in the same column represent the significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 溶杆菌生物有机肥对丹参根际微生物群落结构的影响

基于对不同处理根际微生物的宏基因组物种注释结果,对根际细菌和真菌群落进行主坐标分析(PcoA),如图 3a 和图 3b 所示,有机肥和生物有机肥处理均显著改变了细菌(adonis 检验:  $R^2 = 0.23$ ,  $P = 0.009$ )和真菌(adonis 检验:  $R^2 = 0.30$ ,  $P = 0.007$ )群落结构。采用香农(Shannon)指数作为  $\alpha$  多样性分析指标,结果如图 3c 所示,与 CK 组相比,BOF 组细菌的 Shannon 指数显著增加,真菌的 Shannon 指数显著降低,这表明产酶溶杆菌生物有机肥的施加提高了根际细菌群落的多样性,同时降低了根际真菌群落的多样性。选取细菌和真菌丰度前五的门水平物种进行分析(图 3d, 图 3e),结果发现与对照组(CK)相比,生物有机肥组(BOF)显著富集了细菌群落中的变形菌门(Proteobacteria)、假单胞菌门(Pseudomonas)和拟杆菌门(Bacteroidota)以及真菌群落中的担子菌门(Basidiomycota)和芽枝霉门(Blastocladiomycota)。如图 3f 所示,病原真菌尖孢镰刀菌的丰度与固氮菌属(*Azotobacter*)、蛭弧菌属(*Vicinus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas*)呈显著负相关关系,表明这些物种可能在防控丹参根腐病的过程中发挥重要作用。



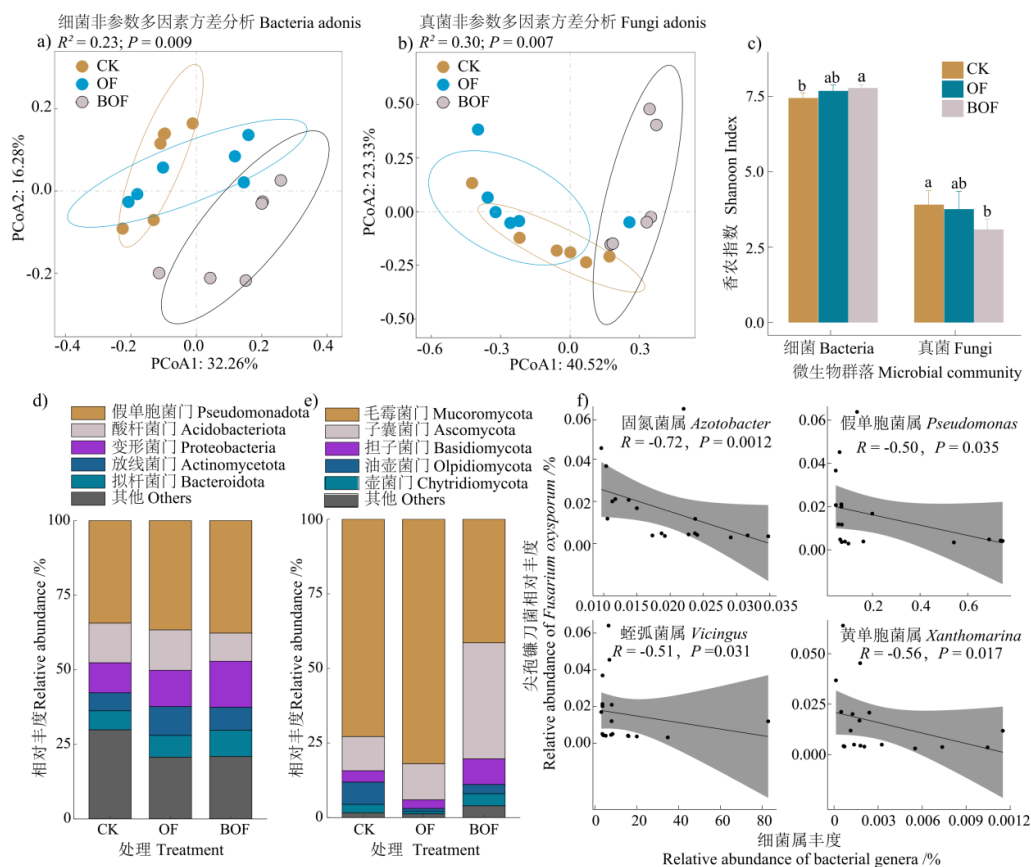


图3 不同处理对丹参根际微生物群落的影响 (a. 细菌群落的主坐标分析 (PCoA); b. 真菌群落的主坐标分析; c. 细菌和真菌群落的香农指数; d. 根际细菌门水平 (前5) 的相对丰度; e. 根际真菌门水平 (前5) 的相对丰度; f. 与尖孢镰刀菌丰度显著负相关的根际细菌属)

Fig. 3 The effect of different treatments on Danshen rhizosphere microbiome (a. Principal Co-ordinates analysis (PCoA) of rhizosphere bacterial community; b. Principal coordinates analysis (PCoA) of rhizosphere fungal community; c. Shannon index of rhizosphere bacterial and fungal community; d. Relative abundance of rhizosphere bacteria at the phylum level (top5); e. Relative abundance of rhizosphere fungi at the phylum level (top5); f. Relative abundance of rhizosphere bacterial genera significantly negatively correlated with the abundance of *F. oxysporum* in rhizosphere)

#### 2.4 溶杆菌生物有机肥对丹参根际微生物功能基因表达的影响

进一步基于宏基因组数据的 KEGG 功能注释分析根际微生物群落功能, 发现施加了产酶溶杆菌生物有机肥后的抑菌物质和抗病促生相关基因: 黄酮类生物合成 (Flavonoid biosynthesis)、四环素生物合成 (Tetracycline biosynthesis)、II 型聚酮骨架的生物合成 (Biosynthesis of type II polyketide backbone)、吲哚类生物碱生物合成 (Indole alkaloid biosynthesis)、脂多糖生物合成 (Polyketide sugar unit biosynthesis)、黄酮类和黄酮醇生物合成 (Flavone and flavonol biosynthesis) 功能基因丰度较对照组 (CK) 显著增高 (图 4a~图 4f)。而施加有机肥 (OF) 处理组相较对照组 (CK) 功能基因表达变化不显著。通过病原真菌与功能基因相关性分析 (图 4g, 图 4 h) 发现, 病原真菌尖孢镰刀菌的丰度与生物膜的形成 (Biofilm formation)、矿物质的吸收 (Mineral absorption) 等功能基因呈显著负相关关系。

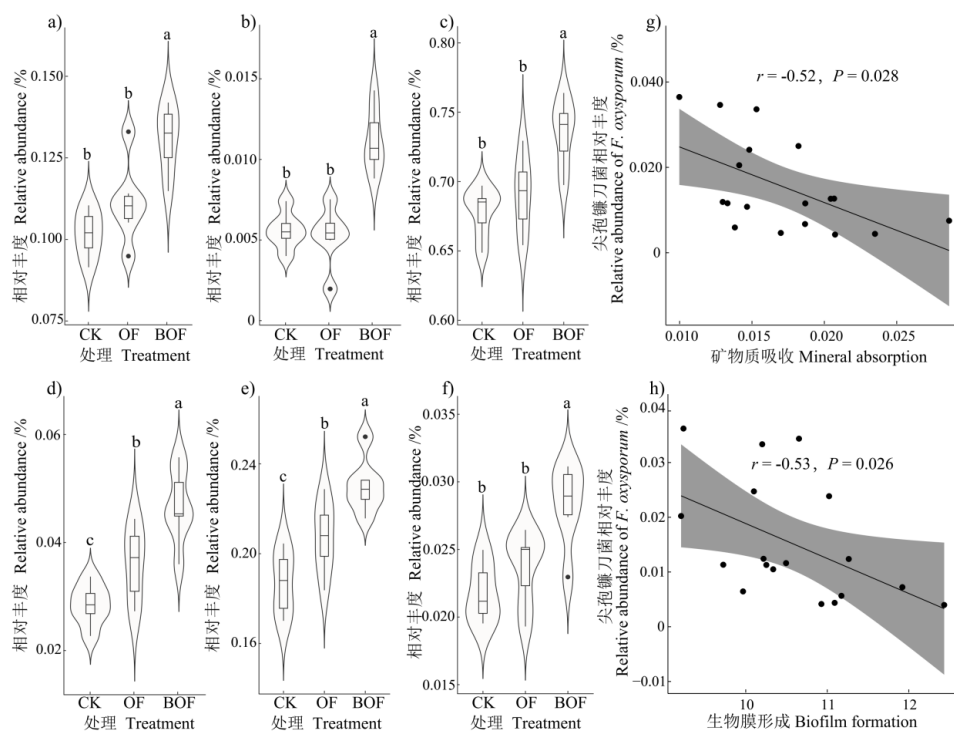


图 4 不同处理对丹参根际微生物功能基因表达的影响 (a. 黄酮生物合成; b. 聚酮骨架生物合成; c. 脂多糖生物合成; d. 四环素生物合成; e. 吲哚生物碱生物合成; f. 黄酮类生物合成; g. 尖孢镰刀菌丰度与矿物质吸收功能基因显著负相关; h. 尖孢镰刀菌丰度与生物膜形成功能基因显著负相关)

Fig. 4 The effect of different treatments on Danshen rhizosphere microbial functional gene expression ( a. Flavonoid biosynthesis; b. Type polyketide backbone biosynthesis; c. Polyketide sugar unit biosynthesis; d. Tetracycline biosynthesis; e. Indole alkaloid biosynthesis; f. Flavone and flavonol biosynthesis; g. Relative abundance of microbial functional genes related to mineral adsorption function significantly negatively correlated with the abundance of *F. oxysporum*; h. Relative abundance of microbial functional genes related to biofilm formation function significantly negatively correlated with the abundance of *F. oxysporum*)

### 3 讨论

#### 3.1 产酶溶杆菌生物有机肥对丹参根腐病的防控

溶杆菌属在自然界中广泛分布, 为腐生性, 目前对溶杆菌土壤生态功能了解甚少。研究<sup>[8]</sup>发现溶杆菌属细菌对真菌、细菌和线虫等均具有突出的拮抗作用, 其中产酶溶杆菌在防控病害方面尤其突出。捕食性细菌是以其他微生物为食, 在塑造群落结构和营养循环等方面发挥重要作用<sup>[14]</sup>, 而产酶溶杆菌作为捕食性细菌成员, 主要通过外泌扩散型抗真菌、卵菌活性物质热稳定抗真菌因子 (HSAF) 和接触型杀菌系统——VI 型分泌系统的协同工作, 在土壤中依靠捕食病原真菌和卵菌来获取生存所需的营养<sup>[15]</sup>。相较于传统有机肥, 生物有机肥对土传病害的生防效果更显著, 可有效降低病害的发生。本研究中施用的产酶溶杆菌生物有机肥能够显著降低丹参根腐病的发生及根际病原真菌的数量: 与对照组相比, 施用生物有机肥的处理组发病率降低了 50% (图 2b), 施用生物有机肥与有机肥处理的防控效率分别为 72.9%、20.6% (图 2c), 丹参根际中 *F. oxysporum* 的数量显著降低 (图 2e), 说明该生物有机肥的施用可能通过产酶溶杆菌捕食尖孢镰刀菌, 降低病原真菌对丹参根系的侵染, 最终减少根腐病的发生。进一步基于宏基因组测序发现, 施入产酶溶杆菌生物有机肥后根际溶杆菌属和产酶溶杆菌种的丰度显著增加 (图 2g), 而镰刀菌属和尖孢镰刀菌种的丰度显著降低 (图 2f)。说明利用腐熟秸秆资源制备的有机肥有助于增强溶杆菌在根际的定殖能力, 从而持续发挥更好的生防作用。此外, 本研究还发现施用产酶溶杆

菌生物有机肥对丹参生长具有显著的促生效果,施用生物有机肥的植株生物量与对照植株相比显著提高,地上部生物量与地下部生物量分别增加了 163.1%和 147.0%;与单独施加有机肥的植株相比也显著提高,地上部生物量与地下部生物量分别增加了 55.7%和 78.8% (表 1),这进一步突出了生物有机肥相比有机肥的优越性。

### 3.2 生物有机肥重塑丹参根际微生物群落结构

研究<sup>[16-17]</sup>发现,生物有机肥可通过引入功能型微生物显著强化土壤对镰刀菌枯萎病的抑病能力,生物有机肥携带的“将军型”功能微生物不仅可直接抑制病原真菌,降低其生存能力,同时能够重塑根际土壤细菌群落,激发土著有益菌群,并与其协同增强抑病能力。功能微生物与特定的根际土著微生物能够协同增强多物种的根系定殖,最终成为一种能够有效抵御病原菌侵染植物的益生“菌团”<sup>[16]</sup>。土壤抑病能力的增强与施用生物有机肥对土著微生物群落的重塑有关,大量研究<sup>[18-21]</sup>证实了生物有机肥的施用能够提高香蕉、黄瓜等作物根际细菌的多样性,增加根际有益细菌的丰度,从而对土壤微生物群落抑病性产生积极影响。此外,田间施用生物有机肥能够显著改变土壤微生物类群的群落结构组成,其中富营养型微生物类群,如变形菌门、厚壁菌门、拟杆菌门等在施用生物有机肥后显著增加<sup>[21-22]</sup>,上述结果表明生物有机肥在优化提升土壤微生物群落结构上的重要作用。本研究发现施加生物有机肥能够显著改变丹参根际细菌和真菌群落结构和组成,与对照组相比,生物有机肥处理后变形菌门(Proteobacteria)、假单胞菌(Pseudomonas)和拟杆菌门(Bacteroidota)、放线菌门(Acidobacteriota)等细菌以及担子菌门(Basidiomycota)和芽枝霉门(Blastocladiomycota)等真菌的相对丰度显著增加(图 3d, 图 3e)。此外,施加生物有机肥后显著富集的包括固氮菌属(*Azotobacter*)、蛭弧菌属(*Vicinus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)和黄单胞菌属(*Xanthomonas*)等有益细菌,与尖孢镰刀菌的丰度呈显著负相关(图 3f)。其中,固氮菌属能将空气中的氮转化为植物可利用的铵盐,为植物生长发育提供必需的养分<sup>[23]</sup>;蛭弧菌属是专性捕食性细菌,可分泌多种拮抗植物病原菌的代谢产物<sup>[24]</sup>;而假单胞菌属是土壤中分布最广泛的植物有益菌,能够保护植物抵抗多种真菌或线虫病害<sup>[25]</sup>。综上推测,溶杆菌生物有机肥可通过调控丹参根际土壤微生物的群落结构和物种组成,富集有益微生物,进而抑制丹参根腐病的发生。

### 3.3 生物有机肥改变丹参根际微生物群落功能

许多研究表明,生物有机肥的施加会对微生物相关功能基因产生影响<sup>[26-27]</sup>。向熏蒸后的土壤中添加生物有机肥后发现,根际微生物群落中 13 种次级代谢产物合成相关代谢功能基因丰度显著提高,进而促进土壤健康<sup>[28]</sup>。本研究通过 KEGG 功能基因分析,发现施加产酶溶杆菌生物有机肥后,植物中包括黄酮类生物合成、四环素生物合成、II 型聚酮骨架的生物合成、吡啶类生物碱生物合成以及脂多糖生物合成等次级代谢物生物合成相关功能基因的表达水平显著增加(图 4a~图 4f)。黄酮类化合物参与植物体内的多种生物活性,可以保护植物免受不同生物(植物寄生线虫、真菌和细菌)和非生物胁迫(盐胁迫、干旱胁迫、紫外线、高温和低温)的侵害<sup>[29]</sup>。II 型聚酮化合物是小分子抗生素如阿霉素、光神霉素和四环素等的重要来源<sup>[30]</sup>。而脂多糖是革兰氏阴性菌外膜上最主要的脂质成分,是革兰氏阴性菌固有免疫的重要组成部分,与细菌的阻渗、有机溶剂耐受性、疏水性抗生素耐受性、膜通透性等功能相关<sup>[31]</sup>。因此,推测黄酮类生物合成和 II 型聚酮骨架的生物合成相关基因的上调可能与溶杆菌生物有机肥促进根际微生物抵抗病原菌胁迫的作用机制密切相关。本研究中还发现矿物质吸收和生物膜合成基因的丰度与尖孢镰刀菌的丰度呈显著负相关(图 4g, 图 4h)。许多研究表明生物膜可增加微生物对外界环境胁迫的耐受性以及包括合作、竞争、信号分子的传递、水平基因转移等微生物之间的相互作用<sup>[32]</sup>。因此,产酶溶杆菌生物有机肥可能通过促进根际拮抗微生物(益生“菌团”)的生物膜合成从而有效抵御病原菌的侵染。因此推测,生物有机肥可能通过促进益生“菌团”生长和丹参根际营养吸收功能(矿物质吸收),从而提高了丹参对尖孢镰刀菌的防御能力。总而言之,产酶溶杆菌生物有机肥可能通过促进根际土壤中黄酮类化合物、II 型聚酮化合物以及脂多糖等的代谢,加强有益菌的拮抗作用以及丹参对病原菌的抵御能力,从而减少丹参根腐病的发生。

## 4 结论

本研究通过联合生物有机肥研制、盆栽试验、qPCR 和宏基因组测序等技术研究发现,与对照相比,以加拿大一枝黄花秸秆为原料制备的产酶溶杆菌生物有机肥不仅可显著降低丹参根腐病的发生和根际病原真菌尖孢镰刀菌的定殖数量,并且可增加丹参植株地上部分和地下部分的鲜物质量。进一步探究发现产酶溶杆菌生物有机肥的施用显著增加根际细菌群落多样性,改善群落物种组成,诱导相关抗病促生基因表达丰度显著提高。综上所述,施加产酶溶杆菌生物有机肥有助于改变根际微生态环境,增加有益细菌的定殖,从而实现对丹参根腐病的生态绿色防控。

### 参考文献 (References)

- [1] Wang B Q. *Salvia miltiorrhiza*: Chemical and pharmacological review of a medicinal plant[J]. Journal of Medicinal Plants Research, 2010, 4(25): 2813-2820.
- [2] Yang J, Wang F, Wen Y, et al. First report of *Fusarium proliferatum* causing root rot disease in *Salvia miltiorrhiza* in China[J]. Plant Disease, 2020, 105(4): 1210.
- [3] Yu Y, Zhang Q, Kang J, et al. Effects of organic fertilizers on plant growth and the rhizosphere microbiome[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2024, 90(2): e0171923.
- [4] Xue C, Shen Z Z, Hao Y W, et al. Fumigation coupled with bio-organic fertilizer for the suppression of watermelon Fusarium wilt disease re-shapes the soil microbiome[J]. Applied Soil Ecology, 2019, 140: 49-56.
- [5] Tang H Z, Hu Y H, Ren Z G, et al. Effect of different biological organic fertilizers on the growth of pineapple under continuous cropping and the heart rot[J]. Microbiology China, 2021, 48(11): 4156-4166. [唐浩真, 胡英宏, 任泽广, 等. 不同生物有机肥对连作菠萝生长及防控心腐病效果[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4156-4166.]
- [6] Ji G H. Advances in the study on *Lysobacter* spp. bacteria and their effects on biological control of plant diseases[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2011, 26(1): 124-130. [姬广海. 溶杆菌属及其在植物病害防治中的研究进展[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2011, 26(1): 124-130.]
- [7] Christensen P, Cook F D. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1978, 28(3): 367-93.
- [8] Yuen G Y, Steadman J R, Lindgren D T, et al. Bean rust biological control using bacterial agents[J]. Crop Protection, 2001, 20(5): 395-402.
- [9] Lin L, Shao X L, Yang Y C, et al. *Lysobacter enzymogenes*: A fully armed biocontrol warrior1[J/OL]. Journal of Integrative Agriculture, 2024, <https://doi.org/10.1016/j.jia.2024.02.021>.
- [10] Yang K L, Zheng Y P, Sun K M, et al. Rhizosphere microbial markers (micro-markers): A new physical examination indicator for traditional Chinese medicines[J]. Chinese Herbal Medicines, 2024, 16(2): 180-189.
- [11] 农业农村部微生物肥料和食用菌菌种质量监督检验测试中心、中国农业科学院农业资源与农业区划研究所.生物有机肥: NY 884-2012[S], 北京: 中华人民共和国农业部种植业管理司, 2012. <http://ynforestry-tec.com/> [Ministry of Agriculture and Rural Affairs Microbial Fertilizer and Edible Fungi Strain Quality Supervision and Testing Center, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Sciences. Biological Organic Fertilizer: NY 884-2012[S], Beijing: Department of Crop Management, Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. 2012. <http://ynforestry-tec.com/>]
- [12] Zhao L M, Zhao L, Tian H L, et al. Establishment and application of real-time quantitative PCR detection system for the pathogenic *Fusarium oxysporum* causing *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* root rot[J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2024, 32(3): 720-729. [赵丽梅, 赵利, 田洪岭, 等. 黄芪根腐致病尖孢镰刀菌实时荧光定量 PCR 检测体系的建立及应用[J]. 农业生物技术学报, 2024, 32(3): 720-729.]
- [13] Wood D E, Salzberg S L. *Kraken*: Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments[J]. Genome Biology, 2014, 15(3): R46.

- [14] Zhang L, Guo L Y, Cui Z L, et al. Exploiting predatory bacteria as biocontrol agents across ecosystems[J]. Trends in Microbiology, 2024, 32(4): 398-409.
- [15] Fulano A M, Shen D, Kinoshita M, et al. The homologous components of flagellar type III protein apparatus have acquired a novel function to control twitching motility in a non-flagellated biocontrol bacterium[J]. Biomolecules, 2020, 10(5): E733.
- [16] Deng X, Zhang N, Li Y, et al. Bio-organic soil amendment promotes the suppression of *Ralstonia solanacearum* by inducing changes in the functionality and composition of rhizosphere bacterial communities[J]. New Phytologist, 2022, 235(4): 1558-1574.
- [17] Tao C Y, Li R, Xiong W, et al. Bio-organic fertilizers stimulate indigenous soil *Pseudomonas* populations to enhance plant disease suppression[J]. Microbiome, 2020, 8(1): 137.
- [18] Zhao J, Liu J, Liang H, et al. Manipulation of the rhizosphere microbial community through application of a new bio-organic fertilizer improves watermelon quality and health[J]. PLoS One, 2018, 13(2): e0192967.
- [19] Shen Z Z, Ruan Y Z, Chao X, et al. Rhizosphere microbial community manipulated by 2 years of consecutive biofertilizer application associated with banana *Fusarium* wilt disease suppression[J]. Biology and Fertility of Soils, 2015, 51: 553-562.
- [20] Qiu M, Zhang R, Xue C, et al. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil[J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48: 807-816.
- [21] Xun W, Zhao J, Xue C, et al. Significant alteration of soil bacterial communities and organic carbon decomposition by different long-term fertilization management conditions of extremely low-productivity arable soil in South China[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(6): 1907-1917.
- [22] Wang L, Li J, Yang F, et al. Application of bioorganic fertilizer significantly increased apple yields and shaped bacterial community structure in orchard soil[J]. Microbial Ecology, 2017, 73(2): 404-416.
- [23] Aasfar A, Bargaz A, Yaakoubi K, et al. Nitrogen fixing *Azotobacter* species as potential soil biological enhancers for crop nutrition and yield stability[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 628379.
- [24] Jurkevitch E, Minz D, Ramati B, et al. Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(6): 2365-2371.
- [25] Świątczak J, Kalwasińska A, Brzezinska M S. Plant growth-promoting rhizobacteria: *Peribacillus frigiditolerans* 2RO30 and *Pseudomonas sivasensis* 2RO45 for their effect on canola growth under controlled as well as natural conditions[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1233237.
- [26] Liu X, Tiquia S M, Holguin G, et al. Molecular diversity of denitrifying genes in continental margin sediments within the oxygen-deficient zone off the Pacific coast of Mexico[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3549-3560.
- [27] Huang B, Chen Y, Pei Z, et al. Application of microbial organic fertilizers promotes the utilization of nutrients and restoration of microbial community structure and function in rhizosphere soils after dazomet fumigation[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 1122611.
- [28] Li Z D, Jiao Y Q, Yin J, et al. Productivity and quality of banana in response to chemical fertilizer reduction with bio-organic fertilizer: Insight into soil properties and microbial ecology[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2021, 322: 107659.
- [29] Samanta A, Das G, Das S K. Roles of flavonoids in plants[J]. Carbon, 2011, 100(6): 12-35.
- [30] Zhang Z, Pan H X, Tang G L. New insights into bacterial type II polyketide biosynthesis[J]. F1000Research, 2017, 6: 172.
- [31] Zhang G E, Meredith T C, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria[J]. Current Opinion in Microbiology, 2013, 16(6): 779-785.
- [32] Lories B, Roberfroid S, Dieltjens L, et al. Biofilm bacteria use stress responses to detect and respond to competitors[J]. Current Biology, 2020, 30(7): 1231-1244.e4.

( 责任编辑 : 陈荣府 )