

研究报告

防治西瓜枯萎病合成菌群的简化

郑子薇, 慕雪男, 张越, 王志刚, 徐伟慧*

1 齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

2 黑龙江省农业微生物制剂产业化技术创新中心, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

3 黑龙江省农用生物制剂产业化协同创新中心, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

郑子薇, 慕雪男, 张越, 王志刚, 徐伟慧. 防治西瓜枯萎病合成菌群的简化[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1551-1571.

ZHENG Ziwei, MU Xuenan, ZHANG Yue, WANG Zhigang, XU Weihui. A simplified synthetic community for controlling *Fusarium* wilt in watermelon[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1551-1571.

摘要:【背景】西瓜枯萎病是由西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, Fon)引起的一种严重土传病害, 在世界范围内给西瓜的品质和产量造成严重损失。【目的】确定简单的合成细菌群落是否具有与复杂的合成细菌群落相似的作用, 基于植物和病原菌的选择, 简化防治西瓜枯萎病合成菌群。【方法】采用 16S rRNA 基因测序和实时荧光定量 PCR 技术, 分析施用 SynCom Q 对西瓜根和根际的细菌群落及病原菌丰度的影响; 基于 16S rRNA 基因测序结果明确在根和根际上定殖的细菌成员, 并构建简化的菌群 SynCom R; 分别利用盆栽试验和拮抗试验检测 SynCom R 对西瓜枯萎病的防治效果和 Fon 的拮抗活性; 采用平板定性试验评估 SynCom R 中 4 个细菌的生理生化特性; 利用交叉喂养试验测定 SynCom R 中 4 个细菌对彼此生长的影响。【结果】SynCom Q 处理改变了西瓜根和根际细菌的群落结构, 金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)等在西瓜根和根际富集; 提高了根和根际细菌丰度, 降低了根际 Fon 丰度; 经过植物和病原菌的联合筛选, 确定了路氏肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*) LSQ1、皮氏不动杆菌(*Acinetobacter pittii*) LSQ3、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) LSQ19 和贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) WB 能在西瓜根和根际定殖, 并获得了 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 这 4 个细菌组成的菌群(SynCom R)。相较于单菌和 SynCom Q, SynCom R 能有效抑制 Fon 的生长; 盆栽试验表明, SynCom R 能降低西瓜枯萎病的发病率, 控病效果要显著高于其他菌群; *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 具有产部分胞外酶和其他生理功能的特性; 交叉喂养试验表明, *B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 的代谢物能促进彼此的生长, 其他菌间无显著的抑制或促进作用。【结论】SynCom R 能有效控制西

资助项目: 黑龙江省重点研发计划(GA23B018); 黑龙江省高校基本科研业务费(145209808)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Heilongjiang Province (GA23B018) and the Basic Scientific Research Funds for Universities in Heilongjiang Province (145209808).

*Corresponding author. E-mail: xwh800206@163.com

Received: 2024-07-21; Accepted: 2024-08-30; Published online: 2024-10-08

瓜枯萎病, 具有很好的应用前景。

关键词: 菌群简化; 西瓜枯萎病; 生物防治; 抑菌活性

A simplified synthetic community for controlling *Fusarium* wilt in watermelon

ZHENG Ziwei, MU Xuenan, ZHANG Yue, WANG Zhigang, XU Weihui*

1 College of Life Science and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China

2 Heilongjiang Provincial Technology Innovation Center of Agromicrobial Preparation Industrialization, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China

3 Heilongjiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agrobiological Preparation Industrialization, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] *Fusarium* wilt in watermelon, a serious soil-borne disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon), reduces watermelon quality and yield worldwide. **[Objective]** To determine whether a simple synthetic bacterial community has similar effects as a complex synthetic bacterial community, we assembled a simplified synthetic bacterial community for controlling *Fusarium* wilt in watermelon based on the screening of strains with the plant and pathogen. **[Methods]** The 16S rRNA gene sequencing and real time fluorescence quantitative PCR were employed to analyze the effects of SynCom Q on the abundance of bacteria and Fon in watermelon roots and rhizosphere. Based on the results of 16S rRNA gene sequencing, the bacteria colonizing the roots and rhizosphere were identified, and a simplified synthetic community SynCom R was constructed. Pot experiments and antagonistic experiments were carried out to evaluate the control effect of SynCom R on *Fusarium* wilt in watermelon and the antagonistic activity of SynCom R against Fon, respectively. The physiological and biochemical characteristics of four bacterial species in SynCom R were evaluated by plate qualitative tests. The cross-feeding assay was employed to examine the effects of the four bacterial species in SynCom R on the growth of each other. **[Results]** The application of SynCom Q altered the structures of bacterial communities in watermelon roots and rhizosphere, and *Chryseobacterium*, *Sphingomonas*, and *Rhizobium* were enriched in watermelon roots and rhizosphere. SynCom Q increased the abundance of bacteria in the roots and rhizosphere and decreased the abundance of Fon in the rhizosphere. The joint screening with the plant and pathogen showed that *Enterobacter ludwigii* LSQ1, *Acinetobacter pittii* LSQ3, *Bacillus velezensis* LSQ19, and *Bacillus velezensis* WB could colonize the roots and rhizosphere of watermelon, and thus SynCom R consisting of *E. ludwigii* LSQ1, *A. pittii* LSQ3, *B. velezensis* LSQ19, and *B. velezensis* WB was assembled. Compared with single bacterial species and SynCom Q, SynCom R inhibited the growth of Fon. Pot experiments showed that SynCom R decreased the incidence of watermelon *Fusarium* wilt, with higher disease control effect higher than other bacterial communities. *E. ludwigii* LSQ1, *A. pittii* LSQ3, *B. velezensis* LSQ19, and *B. velezensis* WB were capable of producing extracellular enzymes and had other physiological functions. The cross-feeding assay showed that the metabolites of *B. velezensis* LSQ19 and

B. velezensis WB promoted the growth of each other, while there was no significant inhibitory or promoting effect between other bacteria. **[Conclusion]** SynCom R can effectively control *Fusarium* wilt in watermelon and demonstrates a broad application prospect.

Keywords: community simplification; *Fusarium* wilt in watermelon; biocontrol; antifungal activity

西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, Fon)是西瓜枯萎病的致病菌,其通过根部伤口或根毛顶部的细胞间隙侵入植株,产生破坏细胞和阻塞维管束的毒素,从而影响水分运输并导致植株萎蔫和死亡^[1]。在严重感染的情况下,导致西瓜产量损失高达100%。化学防治是目前最经济有效的防治方法,但其带来了环境污染、土壤微生物多样性破坏、病原菌产生抗药性等一系列问题^[2]。近年来,挖掘利用有益的微生物资源,并应用到植物病害的防治中,已成为广大学者关注和研究的热点^[3]。

生物防治剂可通过抑制植物病原菌的生长,也可通过改变根际土壤微生物群落结构阻止病原菌的入侵,从而保护植物的健康生长^[4-5]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)、绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)、棘孢木霉菌(*Trichoderma asperellum*)等生防治剂已用于西瓜枯萎病的防治^[6-7]。

由于植物根际存在大量且复杂的微生物群落,单一的功能菌株无法有效地在根际定殖和生长,从而限制其生防功能的发挥,造成田间生防效果不稳定^[8]。近年来,多组学测序技术揭示了根际多种有益微生物通过复杂的合作关系共同保护植物免受病原菌感染^[9-10]。合成菌群(synthetic microbial community)是基于生态

学和合成生物学的基本理论,人为地将2个或多个已知分类地位、功能特性等明确的不同微生物在特定条件下以确定的比例进行混合,进而获得效率高、功能强、可控性好、易保存且便于应用的有机群体^[8]。合成菌群被认为是了解微生物与植物相互作用的有效手段,一些研究也为构建合成菌群提供了指导^[11]。然而,构建简化且稳定的合成菌群却很少被考虑^[12-14]。由确定的微生物组成员构建的合成菌群,可以行使对植物的有益功能^[15],但并非所有成员都能以稳定的方式在根和根际定殖^[16],也可能包括不发挥重要作用的可有可无或冗余的成员^[17]。因此,确定引入的合成菌群中哪些成员能够在细菌、植物和病原菌之间的相互作用中存活并有效定殖在植物根际或根内,对于组装具有抗病潜力的合成菌群至关重要^[14]。

本课题组前期利用培养组学并结合宏基因组学构建了由6个细菌组成的SynCom Q,其能有效降低西瓜枯萎病的发病率^[18]。本研究分析其对西瓜植株根际和根内细菌群落的影响,基于16S rRNA基因测序和发病率的评估进行SynCom Q的简化,并初步探讨简化菌群成员间的互作,以期防治西瓜枯萎病合成菌群的功能发挥及应用提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样品

供试土壤:2023年9月份种植西瓜所用土壤采自种植过玉米的大田土壤,其理化性质如下:pH 5.8,电导率 202.0 $\mu\text{S}/\text{cm}$,有机质 35.9 g/kg,

总氮 3.6 g/kg, 有效磷 2.0 mg/kg, 速效钾 213.0 mg/kg。2024 年 3 月份种植西瓜土壤(砂壤土)的理化性质如下: pH 7.2、电导率 110.8 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 、有机质 17.2 g/kg、总氮 1.1 g/kg、有效磷 19.1 mg/kg、速效钾 80.0 mg/kg。

路氏肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*) LSQ1、皮氏不动杆菌(*Acinetobacter pittii*) LSQ3、噬几丁质菌(*Chitinophaga* sp.) LSQ14、农杆菌(*Agrobacterium* sp.) LSQ16、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) LSQ19 分离于健康西瓜的根上^[18], 贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) WB 分离于枯萎病地块的健康植株^[6], 西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, Fon)分离于患病的西瓜植株, 由齐齐哈尔大学微生物生态实验室提供。

供试西瓜品种: ‘超级绿宝’, 齐齐哈尔市国抗种业有限公司。

1.2 培养基

病原真菌培养采用马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基和马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)培养基, 细菌培养采用胰蛋白胨大豆肉汤(tryptone soya broth, TSB)培养基。以上培养基参照张龄尹等^[19]的方法配制。TSB 半固体琼脂培养基是在上述胰蛋白胨大豆肉汤培养基中, 添加 1%的琼脂配制而成。采用 Alexandrov^[20]、阿须贝^[21]和无机磷培养基^[22]观察细菌解钾、固氮和解磷的能力。采用脱脂奶粉^[23]、可溶性淀粉^[24]、几丁质酶^[25]和 β -1,3-葡聚糖酶^[25]检测培养基, 观察细菌产胞外酶的能力。

1.3 主要试剂和仪器

FastDNA Spin Kit, MP Biomedicals 公司; 2 $\times$ Taq Plus Master Mix, 南京诺唯赞生物科技有限公司; PCR 引物, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Fusaric acid, APExBIO 公司。荧光定量

PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 酶标分析仪, 北京普朗新技术有限公司; 荧光显微镜, Olympus 公司; 紫外分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 旋转蒸发仪, 北京莱伯泰科仪器有限公司。

1.4 SynCom Q 的简化

1.4.1 细菌悬液和 Fon 孢子悬浮液的制备

将 Fon 接种到 PDA 培养基上, (28 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d。在培养基中加入 10 mL 无菌水, 用无菌涂布器刮擦表面, 用四层无菌纱布过滤除去菌丝, 制备分生孢子悬浮液并稀释至 1.0×10^7 CFU/mL。供试细菌(*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*Chitinophaga* sp. LSQ14、*Agrobacterium* sp. LSQ16、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB)分别在 TSB 培养基中(28 $\pm$ 1) $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 12 h, 并调节至 OD_{600} 为 1.0, 再稀释至 1.0×10^8 CFU/mL, 并按相同比例混合(体积比), 制备 SynCom Q 的菌悬液。

1.4.2 盆栽试验

盆栽试验在齐齐哈尔大学生命科学与农林学院园艺实验站进行, 温度为 15–30 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 30.0%–75.0%。试验设置 3 个处理: (1) SynCom Q, 在非灭菌土壤中添加 SynCom Q 和 Fon 分生孢子悬浮液; (2) CK, 在非灭菌土壤中添加无菌培养基和 Fon 分生孢子悬浮液; (3) H_2O , 空白对照, 不添加任何菌剂。每个处理有 3 个重复, 每个重复 10 盆, 每盆(10 cm $\times$ 10 cm)含有 1 株西瓜苗。当西瓜幼苗长到两片真叶时, 接种 SynCom Q (1×10^7 CFU/g), 3 d 后接种 Fon (1×10^6 CFU/g), SynCom Q 每周浇灌 1 次。接种 Fon 30 d 后观察发病情况、统计发病率(公式 1)和防治效果(公式 2)^[26]。

$$\text{发病率}(\%) = (\text{枯萎植株数量} / \text{总植株数量}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{防治效果}(\%) = [(\text{对照组发病率} - \text{处理组发病率}) / \text{对照组发病率}] \times 100 \quad (2)$$

1.4.3 样品采集

当西瓜植株发生枯萎症状时收集西瓜根和根际样品。将西瓜苗连根拔起,晃动根系除去疏松土壤,将根周围 1–2 mm 厚的土层定义为根际土壤。用无菌水冲洗与根紧密结合的土壤,10 000 r/min 离心 5 min 收集根际土壤,一部分根际土烘干用于土壤理化性质的测定,另一部分储存在–80 °C 用于 DNA 提取。收集根际土壤后,将剩余根用 75%乙醇表面消毒 1 min,再用 1%次氯酸钠表面消毒 30 s,之后用无菌水冲洗 10 次,将根置于–80 °C 用于后续 DNA 提取。

1.4.4 土壤理化性质分析

土壤全氮(total nitrogen)含量采用凯氏定氮法测定,有效磷(available phosphorus)含量采用钼锑抗比色法测定,速效钾(available potassium)含量采用火焰光度计法测定,具体测试方法参见文献[27]。

1.4.5 16S rRNA 基因扩增子测序和实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)分析

取西瓜根和根际样品,按照试剂盒说明书提取根和根际样品的 DNA。用引物 799F (5'-AA CMGGATTAGATACCKG-3')和 1193R (5'-ACG TCATCCCCACCTTCC-3')扩增细菌 16S rRNA 基因的 V5–V7 区^[28]。纯化的 PCR 产物在上海美吉生物医药科技有限公司的 Illumina NovaSe-PE250 平台上测序。数据经质控、过滤和拼接后,获得扩增子序列变体(amplicon sequence variant, ASV),使用核糖体数据库(ribosomal database project, RDP)对每个 ASV 进行分类。

采用 RT-qPCR 方法,分别以 338F (5'-ACTC CTACGGGAGGCAGCAG-3')和 806R (5'-GGACT ACHVGGGTWTCTAAT-3')^[29]、ITS-Fu-F (5'-CAA CTCCCAAACCCCTGTGA-3')和 ITS-Fu-R (5'-GC

GACGATTACCAGTAACGA-3')^[30]为引物,用于检测根和根际中细菌和 *Fon* 的绝对丰度。PCR 反应体系(20 µL): 2×*Taq* Plus Master Mix 10 µL, Primer F (5 µmol/L) 0.8 µL, Primer R (5 µmol/L) 0.8 µL, DNA 模板 1 µL, ddH₂O 7.4 µL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s; 细菌 58 °C 退火 30 s, *Fon* 于 60 °C 退火 30 s, 35 个循环; 72 °C 终延伸 1 min。所有 RT-qPCR 检测均采用荧光定量 PCR 系统。检测每个物种的特异扩增引物 *C_t* 值,并根据标准曲线计算根和根际中细菌和 *Fon* 的绝对丰度。

1.4.6 SynCom Q 成员的相对丰度分析

经过植物、细菌、*Fon* 之间的相互作用,为了确定 SynCom Q 哪些成员能有效在根或根际中定殖或发挥作用。基于 16S rRNA 基因测序结果,分析 SynCom Q 成员在根和根际上的相对丰度,并以此作为菌群简化(SynCom R, 由 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 组成)的依据之一^[14]。

1.4.7 拮抗 *Fon* 试验

采用平板对峙培养法评价 SynCom R 中的 4 个单菌(*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB)、“一个细菌敲除”(–*E. ludwigii* LSQ1、–*A. pittii* LSQ3、–*B. velezensis* LSQ19、–*B. velezensis* WB)后分别组成的 4 个菌群以及 SynCom R、SynCom Q 对 *Fon* 的拮抗活性^[31]。将 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*Chitinophaga* sp. LSQ14、*Agrobacterium* sp. LSQ16、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 分别在 TSB 培养基中(28±1) °C、180 r/min 培养 12 h,并调节至 OD₆₀₀=0.8,“一个细菌敲除”的菌群、SynCom R 和 SynCom Q 均按相同比例进行混合。将 *Fon* 菌饼(直径 5 mm)置于 PDA 培养基中心,然后将上述单菌或菌群接种到培养皿边缘的 4 个等距点上,以无菌

水为对照, 每个处理重复 3 次。平板置于 $(28\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养箱中培养 7 d, 观察并测量 Fon 菌落直径。按公式(3)计算 Fon 生长抑制率。

生长抑制率(%)=[(对照 Fon 菌落直径-处理 Fon 菌落直径)/对照 Fon 菌落直径] $\times 100$ (3)

1.4.8 Fon 孢子萌发试验

Fon 在 PDA 培养基上 $(28\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 5 d。取直径为 5 mm 的 Fon 菌饼转移到 100 mL PDB 培养基中, $(28\pm 1)^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 72 h。然后将 Fon 培养物通过四层无菌纱布过滤, 获得分生孢子悬浮液, 用血球计数板调至浓度为 1×10^5 CFU/mL。

将 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*Chitinophaga* sp. LSQ14、*Agrobacterium* sp. LSQ16、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 分别接种于 TSB 培养基中, $(28\pm 1)^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 72 h。发酵液在 12 000 r/min 离心 15 min, 上清用 0.22 μm 无菌过滤器过滤, 得到 6 个无细胞上清液。试验分为 7 个处理: SynCom R 中的 4 个单菌(*E. ludwigii* LSQ1, *A. pittii* LSQ3, *B. velezensis* LSQ19, *B. velezensis* WB), SynCom R (*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 这 4 个单菌的上清液按同比例混合), SynCom Q (*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*Chitinophaga* sp. LSQ14、*Agrobacterium* sp. LSQ16、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 这 6 个单菌的上清液按同比例混合), 以及对照。将上述无细胞上清液与 Fon 分生孢子悬浮液以 1:1 混合, 以 TSB 培养基与 Fon 分生孢子悬浮液混合作为对照(CK)。将混合物加入无菌凹载玻片中, $(28\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后用光学显微镜观察孢子萌发情况, 每个处理重复 3 次^[32]。按公式(4)计算孢子萌发抑制率。

孢子萌发抑制率(%)=[(对照组 Fon 孢子萌发数-处理组 Fon 孢子萌发数)/对照组 Fon 孢子萌发数] $\times 100$ (4)

1.4.9 Fon 菌丝毒素含量的测定

将镰刀菌酸标准品溶于乙酸乙酯, 配制浓度为 80、40、20、10、5、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 镰刀菌酸溶液, 绘制标准曲线。利用 1.4.8 的方法培养 6 个细菌, 并获得无细胞上清液, 然后使其与 PDB 培养基按照 1:1 的比例进行混合。以 TSB 培养基与 PDB 培养基 1:1 比例混合的作为对照(CK)。试验分为 7 个处理, 同 1.4.8。在 40 mL 混合培养液中加入 4 个 Fon 菌饼(直径 5 mm), $(28\pm 1)^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 72 h, 四层无菌纱布过滤后收集培养滤液。用 2 mol/L 盐酸将培养滤液酸化至 pH 2.0, 倒入分液漏斗并加入等体积的乙酸乙酯, 剧烈摇晃 1 min 后静置 30 min, 萃取镰刀菌酸, 收集的有机相以 4 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液并干燥。将干燥后的残余物用乙酸乙酯重新溶解至 5 mL。采用紫外分光光度计测量 268 nm 的吸光值, 确定样品中镰刀菌酸的浓度^[33]。

1.4.10 代谢提取物对 Fon 生长抑制的影响

分别将 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*Chitinophaga* sp. LSQ14、*Agrobacterium* sp. LSQ16、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 接种至 300 mL TSB 半固体琼脂培养基中, 并在 $(28\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 5 d。悬浮培养物用超声(冰浴, 超声时间 3 s, 间歇时间 1 s)均质器均质化 5 min, 再用 150 mL 80%丙酮提取过夜。将混合物在 5 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 在旋转蒸发仪中 $(56\pm 1)^\circ\text{C}$ 浓缩 15 min 除去丙酮。将剩余提取物重悬于 50 mL 无菌 ddH₂O 中^[25]。试验分为 7 个处理, 同 1.4.8。将 15 mL PDA 培养基与 0.5 mL 代谢提取物混合, 以评估细菌的代谢提取物对 Fon 的拮抗活性^[34]。在 PDA 平板中心接种 Fon 菌饼(直径 5 mm), 将平板置于 $(28\pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 7 d。以不含提取代谢物的平板作为对照(CK)。按 1.4.7 中的公式(3)计算 Fon

生长抑制率。

1.4.11 SynCom R 的验证简化

再次利用盆栽试验比较简化的 SynCom R 与初始 SynCom Q 的防病效果。参照 1.4.1 和 1.4.2 的方法构建菌群并进行盆栽试验, 试验分为 8 个处理: SynCom Q、SynCom R、“一个细菌敲除”(-*E. ludwigii* LSQ1, -*A. pittii* LSQ3, -*B. velezensis* LSQ19, -*B. velezensis* WB)组成的 4 个菌群、对照(CK)和 H₂O。按照 1.4.3 的方法收集根际土壤并烘干, 按照 1.4.4 的方法测定土壤理化性质。

1.5 四个细菌生理生化特性测定

将 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 这 4 个菌株分别接种到 Alexandrov、阿须贝和无机磷培养基上, (28±1) °C 培养 3–5 d, 观察其是否具有解钾、固氮和解磷的能力。

将 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 这 4 个菌株分别接种到脱脂奶粉、可溶性淀粉、几丁质酶和 β-1,3-葡聚糖酶检测培养基上, (28±1) °C 培养 3–5 d, 观察其是否具有产胞外酶的能力。

1.6 交叉喂养试验

利用交叉喂养试验检测 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 这 4 个细菌之间的相互作用关系。将 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 分别接种在 TSB 培养基中, (28±1) °C、180 r/min 培养 12 h, 并调节 OD₆₀₀ 至 1.0, 7 500 r/min 离心 15 min, 得到 4 个细菌的上清液, 用 0.22 μm 无菌滤器过滤。在 (28±1) °C 的条件下用酶标分析仪分析 96 孔微量滴定板中细菌的生长曲线^[35]。每孔含有 198 μL 的上清液(等体积的 TSB 作为对照)和 2 μL 对数生长期的 TSB 重悬细菌(OD₆₀₀=1.0)。每个处理

进行 10 次重复。

1.7 数据分析

采用 Excel 2021 和 SPSS Statistics 27 软件对数据进行整理和统计分析, 使用 GraphPad Prism 8.0.2 和 OriginPro 2021 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 SynCom Q 对西瓜枯萎病发病率的影响

西瓜幼苗接种 30 d 后, 西瓜植株表现出枯萎症状, 枯萎病的发病情况如图 1 所示, SynCom Q 处理西瓜枯萎病的发病率较对照组(CK)低。对照组(CK)表现出明显的发病症状, 发病率达到 36.7%, 而 SynCom Q 的处理组发病率只有 10.0%, 防治效果达到 72.8%。说明 SynCom Q 能有效防治西瓜枯萎病。

2.2 SynCom Q 对西瓜根际土壤养分含量的影响

土壤理化性质在植物生长和土壤健康中起着关键作用, 是化学和生物过程的基础。西瓜展现枯萎症状时收集根际土壤进行土壤理化性质分析, 结果如图 2 所示, 相较于对照组(CK), SynCom Q 处理提高了西瓜根际土壤全氮(图 2A)和速效钾(图 2C)的含量。

2.3 SynCom Q 对西瓜根和根际细菌群落结构的影响

基于 Bray-Curtis 的主坐标分析(principal co-ordinates analysis, PCoA)显示, SynCom Q 处理组和对照组的西瓜根和根际细菌群落结构存在显著分离(根: $R=0.62$, $P=0.004$; 根际: $R=0.52$, $P=0.004$) (图 3A、3B)。前 28 个属的热图显示(图 3C), 施加 SynCom Q 后根和根际细菌属的相对丰度存在差异, 说明 SynCom Q 处理对西瓜根和根际细菌群落结构产生了影响。为了进一步研究 SynCom Q 的施用对西瓜根和

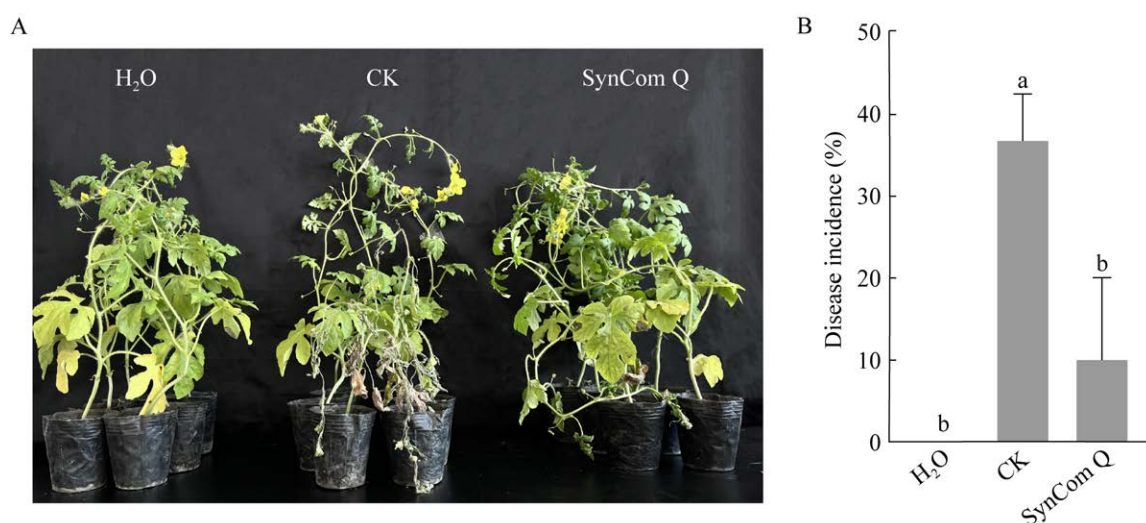


图 1 西瓜枯萎病的发病症状(A)和发病率(B) 不同的小写字母表示处理之间存在显著差异 ($P<0.05$), 下同。

Figure 1 Symptoms (A) and disease incidence (B) of *Fusarium* wilt in watermelon. Different lowercase letters indicate significant differences between treatments ($P<0.05$), the same as below.

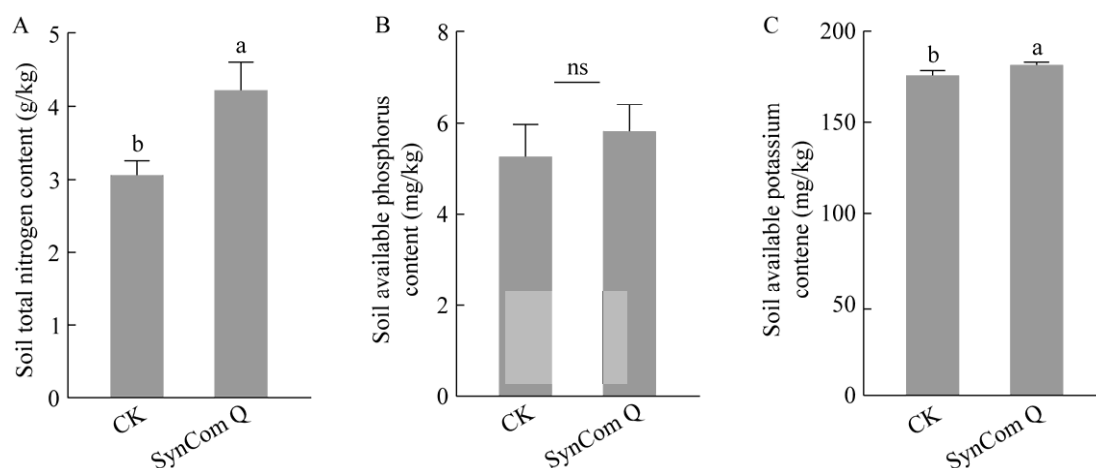
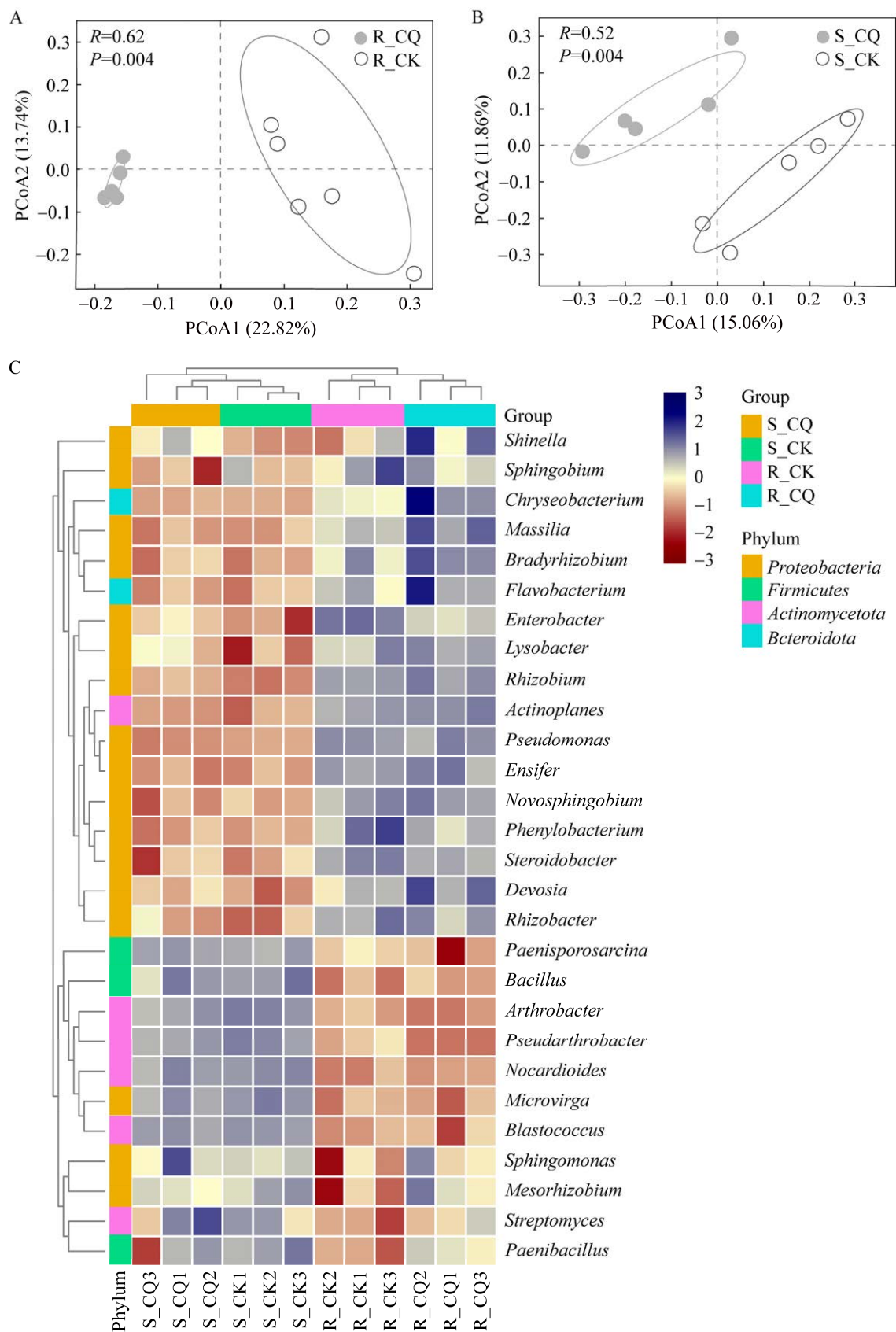


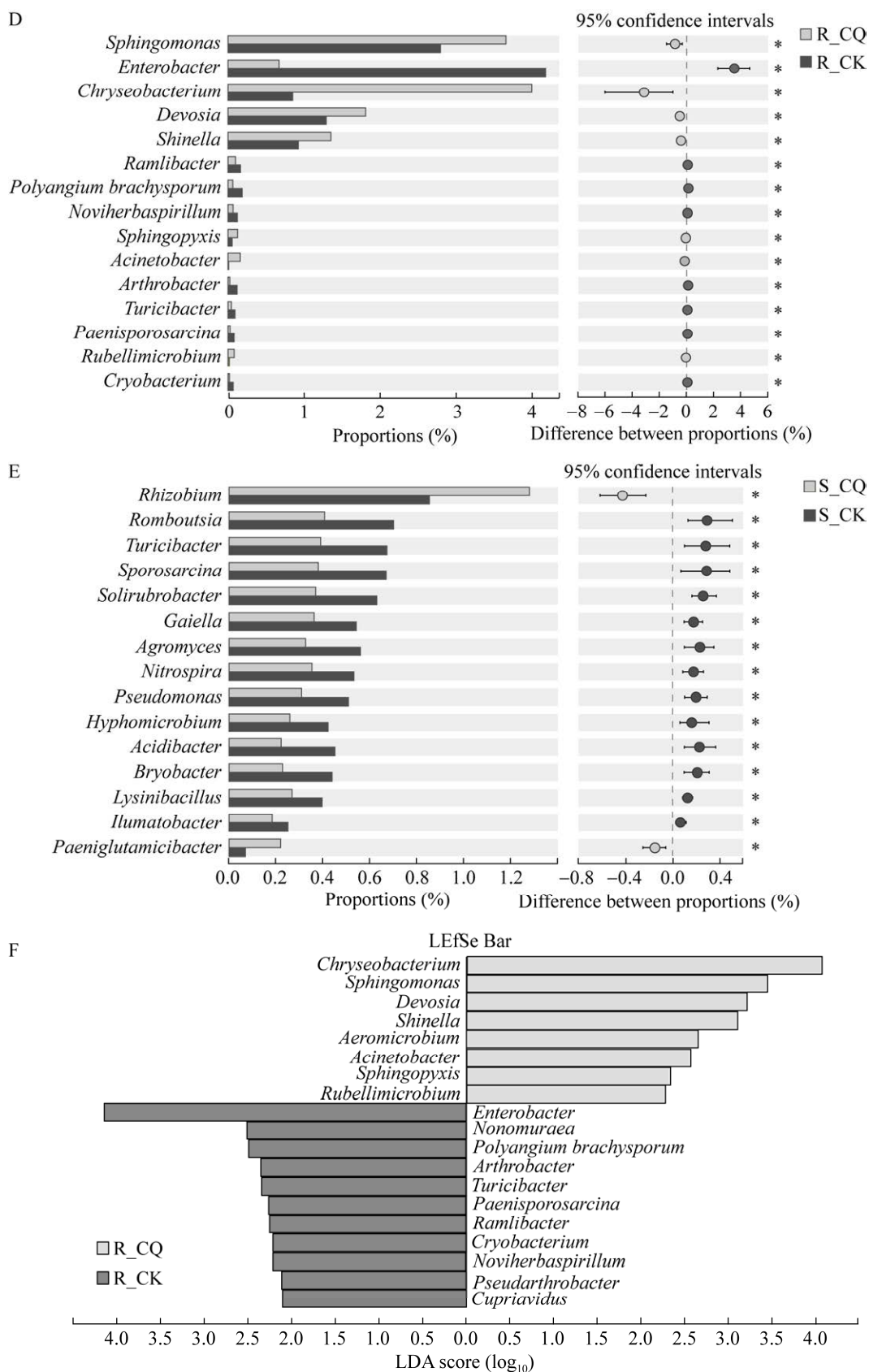
图 2 西瓜根际土壤养分含量 A: 全氮含量; B: 有效磷含量; C: 速效钾含量。Student's t 检验, ns: $P>0.05$, 下同。

Figure 2 Nutrient content of rhizosphere soil of watermelon. A: Total nitrogen content; B: Available phosphorus content; C: Available potassium content. Student's t test, ns: $P>0.05$, the same below.

根际组间差异菌属的影响, 对根和根际细菌群落进行了差异丰度分析和线性判别分析 (Linear discriminant analysis, LDA)。差异丰度分析显示, 鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、金黄杆菌属 (*Chryseobacterium*)、德沃斯氏菌

属 (*Devosia*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 等在 SynCom Q 处理的西瓜根内显著富集 (图 3D); 根瘤菌属 (*Rhizobium*)、类谷氨酸杆菌属 (*Paeniglutamicibacter*) 在 SynCom Q 处理的西瓜根际显著富集 (图 3E)。线性判别分析表明, 根





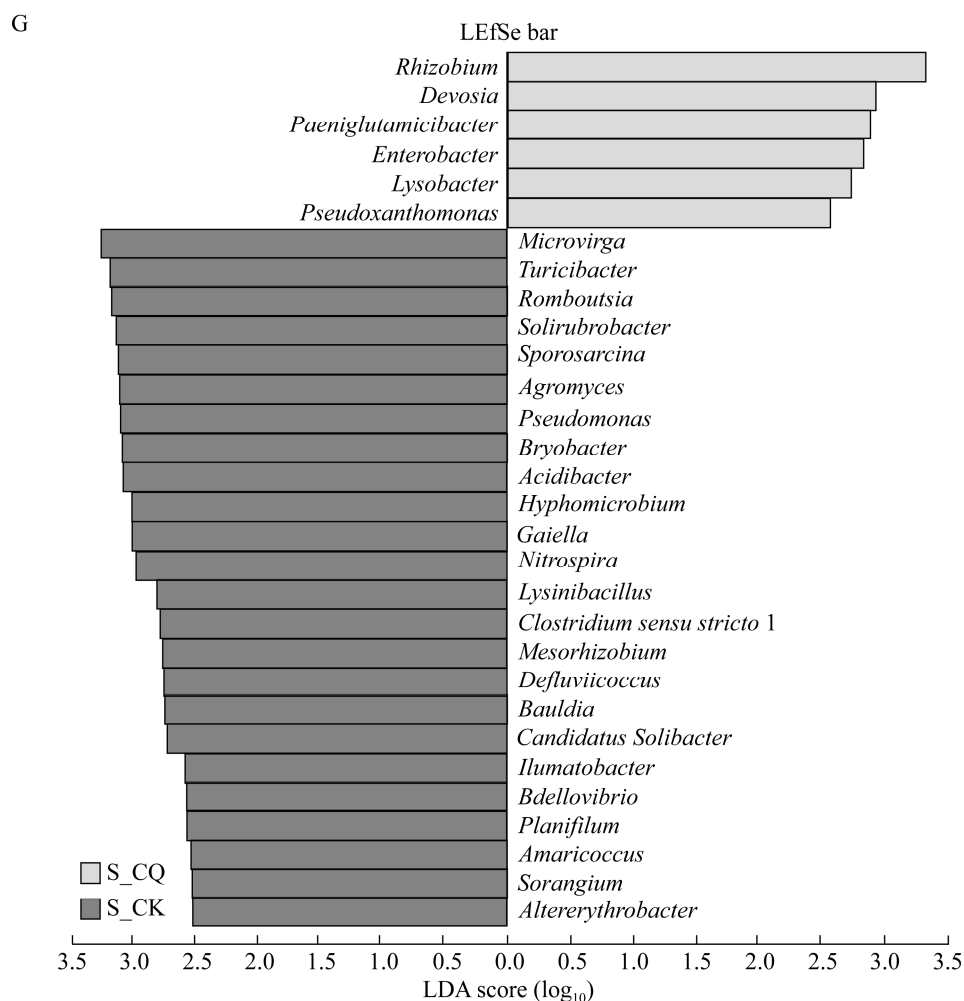


图3 不同处理中西瓜植株根和根际细菌群落组成和丰度差异分析 A: 基于 Bray-Curtis 距离的根内细菌群落的主坐标分析; B: 基于 Bray-Curtis 距离的根际细菌群落的主坐标分析; C: 聚类分析热图; D: 不同处理中根内细菌属水平的丰度差异分析; E: 不同处理中根际细菌属水平的丰度差异分析; F: 不同处理中根内细菌属水平的线性判别分析; G: 不同处理中根际细菌属水平的线性判别分析。R_CK: 对照组的根; R_CQ: SynCom Q 处理组的根; S_CK: 对照组的根际; S_CQ: SynCom Q 处理组的根际。

Figure 3 Composition of bacterial communities in the watermelon root and rhizosphere in different treatments. A: Principal co-ordinates analysis (PCoA) of bacterial communities in the watermelon root endophytic based on Bray-Curtis distance; B: PCoA of bacterial communities in the watermelon rhizosphere based on Bray-Curtis distance; C: Heat map of cluster analysis of bacterial genera in different treatments; D: Analysis of differential abundance root endophytic bacteria at genus level in different treatments (*: $P < 0.05$); E: Analysis of differential abundance rhizosphere bacteria at genus level in different treatments (*: $P < 0.05$); F: Linear discriminant analysis of root endophytic bacteria at genus level in different treatments; G: Linear discriminant analysis of rhizosphere bacteria at genus level in different treatments. R_CK: Root in the control group; R_CQ: Root in the SynCom Q treatment group; S_CK: Rhizosphere in the control group; S_CQ: Rhizosphere in the SynCom Q treatment group.

中金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)等8个属在SynCom Q处理组中的LDA值高于对照组(图3F, $LDA > 2$); 根际中根瘤菌属(*Rhizobium*)、溶杆菌属(*Lysobacter*)、类谷氨酸杆菌属(*Paeniglutamicibacter*)、假黄单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)等6个属在SynCom Q处理组中的LDA值高于对照组(图3G, $LDA > 2.5$)。

2.4 西瓜根、根际细菌和Fon的RT-qPCR分析

采用RT-qPCR技术分析了不同处理组中根、根际细菌和Fon的绝对丰度, 结果表明, 相较于对照组, 施用SynCom Q增加了西瓜根和根际中细菌的绝对丰度(图4A、4B), 对根内Fon的丰度无影响(图4C), 降低了根际Fon的绝对丰度(图4D)。此外, 在对照组和处理组的样品中, 单变量线性回归分析显示, 根内细菌绝对丰度与根内Fon绝对丰度不相关(图5A), 西瓜枯萎病的发病率与根内Fon丰度不相关(图5B),

与根内细菌丰度呈负相关(图5C); 西瓜枯萎病的发病率与根际中Fon丰度呈正相关(图5D)、与根际细菌丰度呈负相关(图5E), 并且根际中的细菌丰度与Fon丰度呈负相关(图5F), 说明SynCom Q处理发病率的降低与西瓜根和根际中细菌的丰度增加有关。

2.5 SynCom Q的成员在西瓜根和根际的相对丰度

如图6所示, 在西瓜根和根际中肠杆菌属(*Enterobacter*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)的相对丰度较高, 而*Chitinophaga*和*Agrobacterium*在根和根际中检测不到。由此推测, SynCom Q成员中的*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB经过植物和环境的选择, 在根和根际中定殖的几率较大。因此, 用*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB这4个菌构建了简化的菌群(SynCom R)。

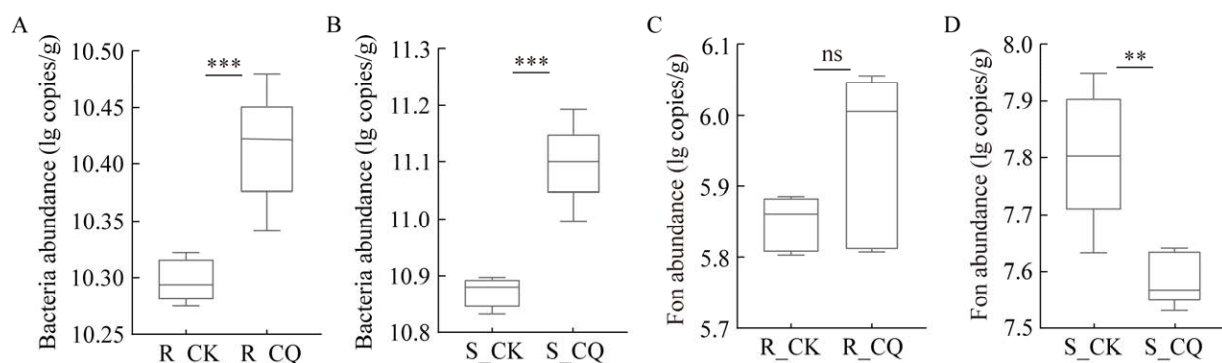


图4 西瓜根、根际细菌和西瓜专化型尖孢镰刀菌的绝对丰度 A: 不同处理中根内细菌的绝对丰度; B: 不同处理中根际细菌的绝对丰度; C: 不同处理中根内西瓜专化型尖孢镰刀菌的绝对丰度; D: 不同处理组中根际西瓜专化型尖孢镰刀菌的绝对丰度。

Figure 4 Absolute abundances of bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon) in watermelon root and rhizosphere. A: Absolute abundance of bacteria in the watermelon root endophytic in different treatments; B: Absolute abundance of bacteria in the watermelon rhizosphere in different treatments; C: Absolute abundance of Fon in the watermelon root endophytic in different treatments; D: Absolute abundance of Fon in the watermelon rhizosphere in different treatments. Student's *t* test, ns: No significance; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$. The same below.

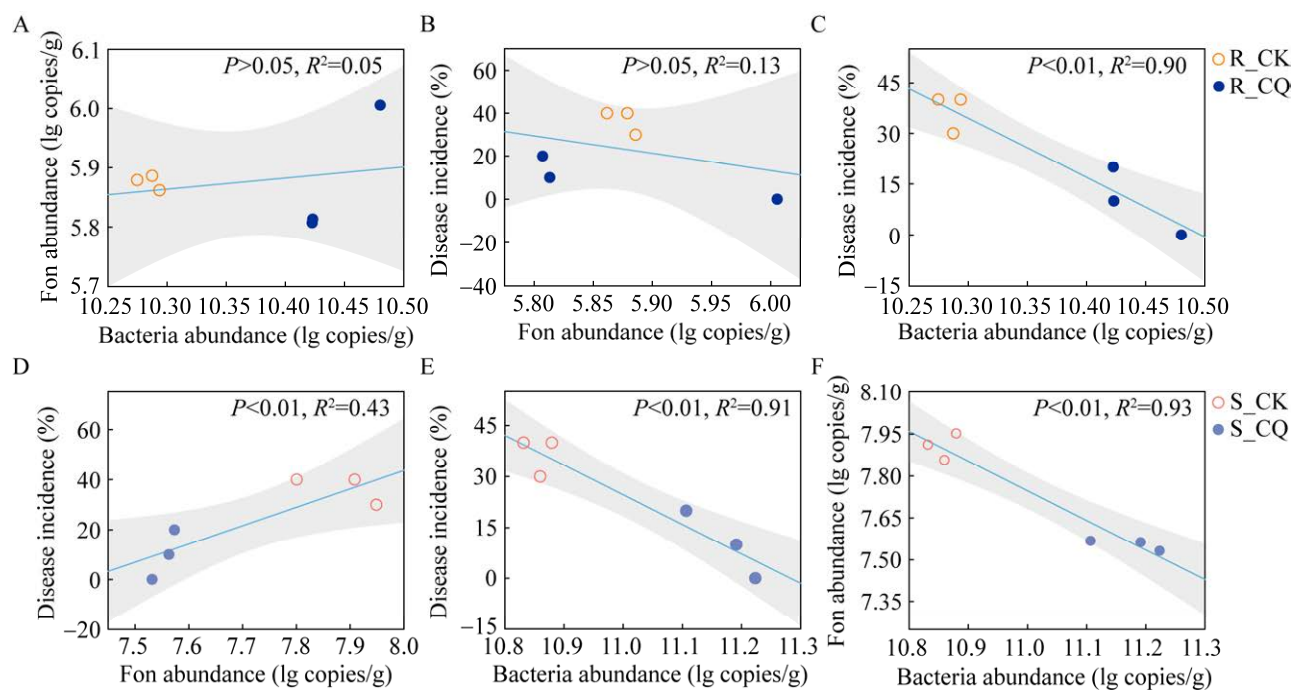


图 5 根、根际中细菌、Fon 与发病率之间的线性回归分析 A: 根内细菌绝对丰度与根内 Fon 绝对丰度的线性回归关系; B-E: 根内 Fon 绝对丰度、根内细菌绝对丰度、根际 Fon 绝对丰度和根际细菌绝对丰度与发病率的线性回归关系; F: 根际细菌绝对丰度与根际 Fon 绝对丰度的线性回归关系。

Figure 5 Linear regression analysis of bacteria, Fon in the watermelon root and rhizosphere and disease incidence. A: Linear regression relationship between absolute abundance of root endophytic bacteria and absolute abundance of root endophytic Fon; B-E: Linear regression relationship between absolute abundance of root endophytic Fon, absolute abundance of root endophytic bacteria, absolute abundance of rhizosphere Fon and absolute abundance of rhizosphere bacteria and disease incidence; F: Linear regression relationship between absolute abundance of rhizosphere bacteria with absolute abundance of rhizosphere Fon.

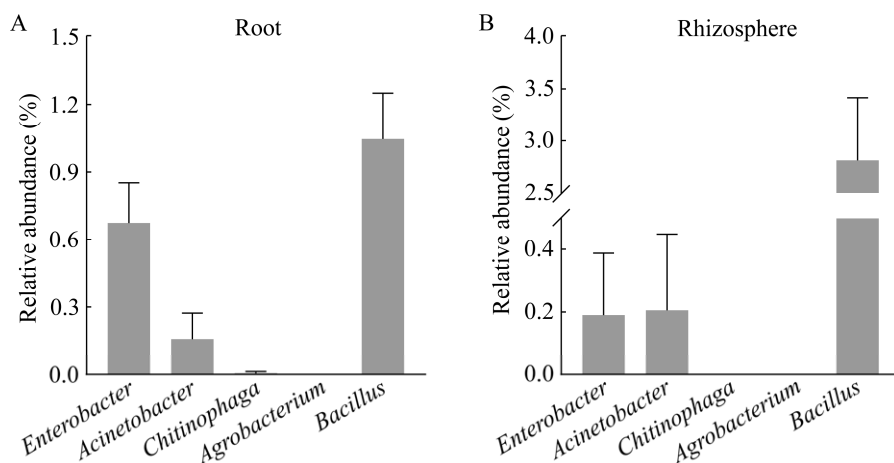


图 6 五种细菌在西瓜根(A)和根际(B)中的相对丰度

Figure 6 Relative abundance of the 5 bacteria in the watermelon root (A) and rhizosphere (B).

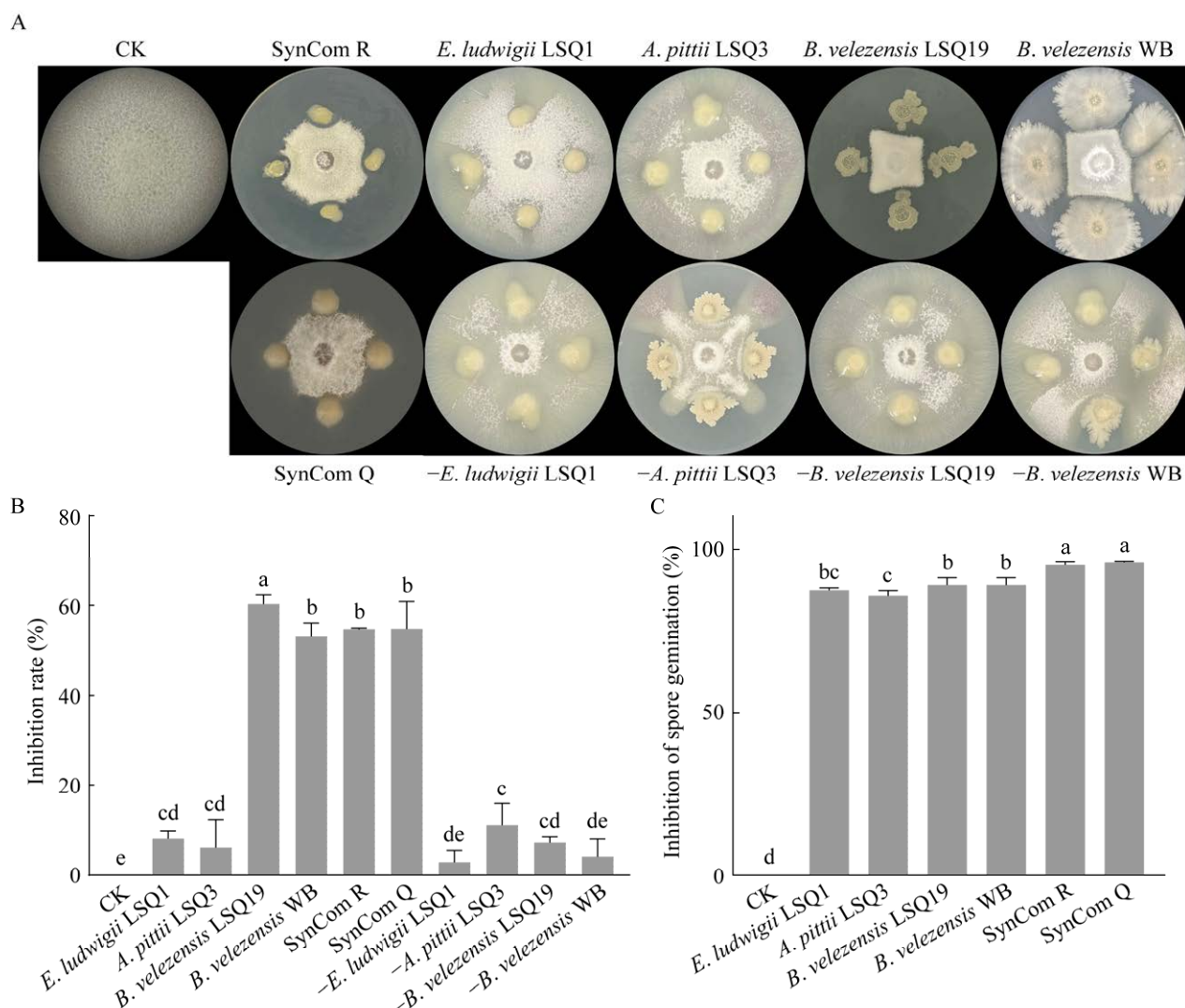
2.6 SynCom R、SynCom Q及SynCom R 成员对 *Fon* 生长的影响

采用平板对峙法,检测了 SynCom R、SynCom Q、SynCom R 中 4 个单菌(*E. ludwigii* LSQ1, *A. pittii* LSQ3, *B. velezensis* LSQ19, *B. velezensis* WB), 以及 SynCom R 分别去掉一个细菌(-*E. ludwigii* LSQ1, -*A. pittii* LSQ3, -*B. velezensis* LSQ19, -*B. velezensis* WB)对 *Fon* 生长的影响。结果如图 7A、7B 所示,处理组的菌丝直径均不同程度小于对照组,表现出一定的抑制作用。如图 7C 所示, SynCom R、SynCom Q 及 SynCom R 中 4 个单菌的无细胞上清液均

能抑制 *Fon* 孢子萌发。

SynCom R、SynCom Q 及 SynCom R 中 4 个单菌的无细胞上清液,显著抑制 *Fon* 菌丝中致病毒素镰刀菌酸的浓度。SynCom R、SynCom Q、*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 的无细胞上清液使镰刀菌酸浓度分别降低 71.9%、67.21%、69.5%、56.4%、21.4%和 61.9% (图 7D)。说明细菌分泌的次级代谢物会降低 *Fon* 的毒力。

研究了 SynCom R、SynCom Q 及 SynCom R 中 4 个单菌的代谢粗提物对 *Fon* 生长的抑制作用。结果发现, SynCom R、SynCom Q、



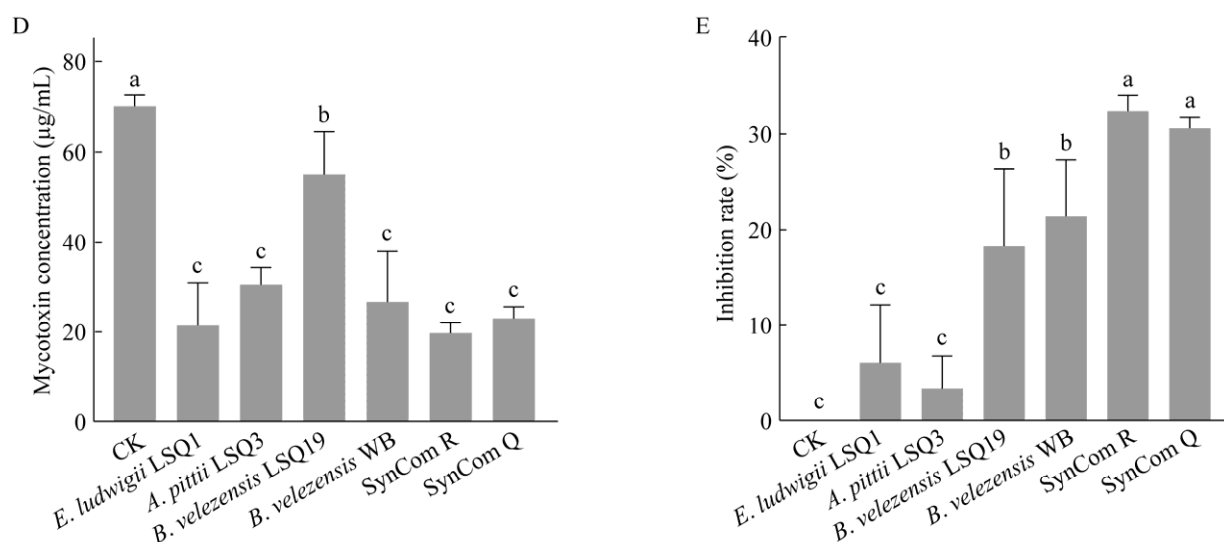


图 7 抑菌综合能力分析 A、B: 对峙试验中 *Fon* 菌丝生长的抑制率; C: 无细胞上清液对 *Fon* 孢子萌发的抑制率; D: 无细胞上清液对 *Fon* 菌丝中镰刀菌酸浓度的影响; E: 代谢提取物对 *Fon* 菌丝生长的抑制率。
Figure 7 Analysis of comprehensive antifungal ability. A, B: Inhibition rate of *Fon* mycelia growth in confrontation experiments; C: Inhibition rate of cell-free supernatants on *Fon* spore germination; D: Effect of cell-free supernatants on fusarium acid concentration in *Fon* mycelia; E: Inhibition rate of metabolite extracts on *Fon* mycelia growth.

B. velezensis LSQ19 和 *B. velezensis* WB 的代谢提取物显著抑制了 *Fon* 的生长, 抑制率分别为 32.3%、30.6%、18.3%、21.5% (图 7E)。

2.7 SynCom R 的防治效果评估

比较 SynCom R、SynCom Q 以及 SynCom R 分别去掉一个细菌组成的菌群对西瓜枯萎病发病率的影响。盆栽试验表明, SynCom R 也能降低西瓜枯萎病的发病率, 并且发病率显著低于 SynCom Q、-*E. ludwigii* LSQ1、-*A. pittii* LSQ3、-*B. velezensis* LSQ19、-*B. velezensis* WB (图 8), 防治效果达到 58.4%。说明简化的 SynCom R 的防效优于 SynCom Q。

2.8 合成菌群对西瓜根际土壤养分含量的影响

西瓜展现枯萎症状时收集根际土壤进行土壤理化性质分析, 结果如图 9 所示, 相较于 SynCom Q, SynCom R 处理的土壤全氮(图 9A)

含量无显著差异, 显著提高了西瓜根际土壤有效磷(图 9B)和速效钾(图 9C)的含量。

2.9 SynCom R 成员细菌的生理生化特性分析

如图 10 所示, *E. ludwigii* LSQ1 和 *B. velezensis* WB 具有解钾的能力, 在 Alexandrov 培养基上产生黄色圈; *A. pittii* LSQ3 和 *B. velezensis* WB 具有固氮的能力, 在阿须贝培养基上产生透明圈; *E. ludwigii* LSQ1、*B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 具有解磷的能力, 在无机磷培养基上产生透明圈; *B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 具有产蛋白酶、淀粉酶和 β -1,3-葡聚糖酶的能力, 在脱脂奶粉、可溶性淀粉、 β -1,3-葡聚糖酶检测培养基上产生透明圈; *A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 具有产几丁质酶的能力, 在几丁质酶检测培养基上产生紫色圈。

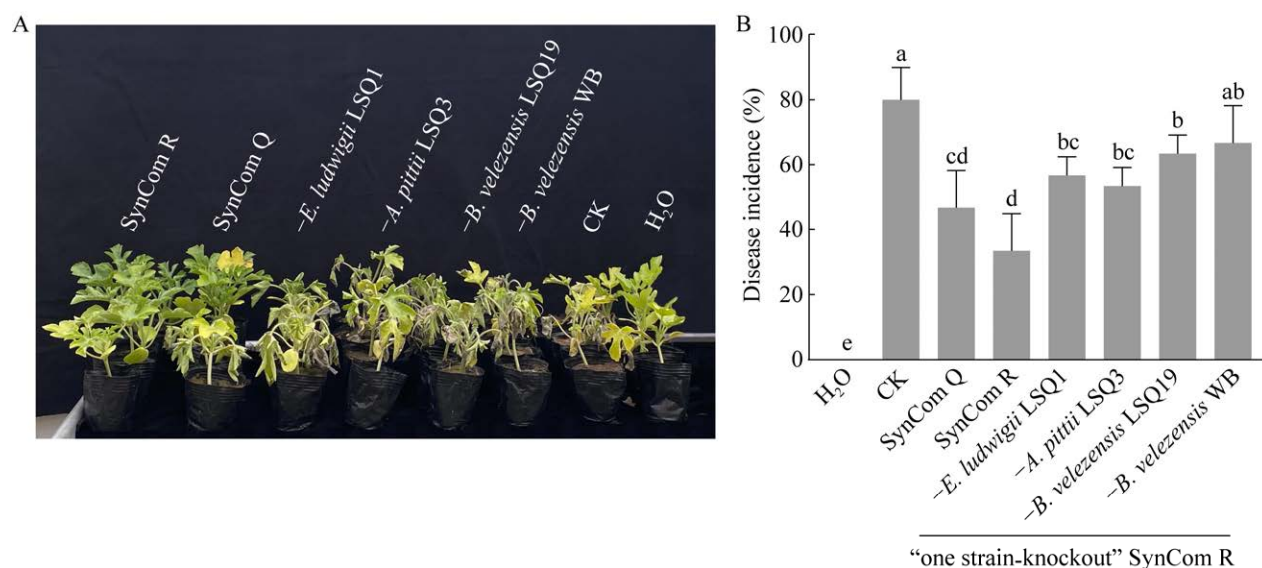


图 8 不同合成菌群处理西瓜枯萎病的发病症状(A)和发病率(B)

Figure 8 Symptoms (A) and disease incidence (B) of *Fusarium* wilt in watermelon in different synthetic communities treatments.

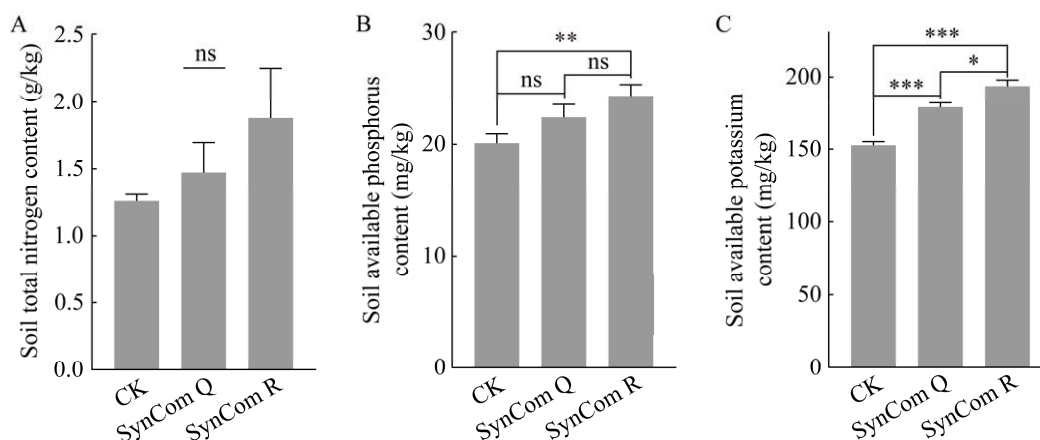


图 9 西瓜根际土壤养分含量 A: 全氮含量; B: 有效磷含量; C: 速效钾含量。Tukey 检验。

Figure 9 Nutrient content in the watermelon rhizosphere soil. A: Total nitrogen content; B: Available phosphorus content; C: Available potassium content. Tukey test. *: $P < 0.05$.

2.10 SynCom R 成员间的互作关系

为了阐明 SynCom R 成员间的互作关系,进行了 SynCom R 中 4 个细菌代谢物的交叉喂养试验。结果表明,其他细菌之间并未表现出明显的抑制或促进关系(图 11A、11B), *B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 促进了彼此的生长

(图 11C、11D), 说明二者间有协同互作关系。

3 讨论

西瓜枯萎病已成为制约全球西瓜产业的主要病害^[36]。应用生物防治剂是治理西瓜枯萎病的一种可持续防治方法^[37]。使用生物防治剂具

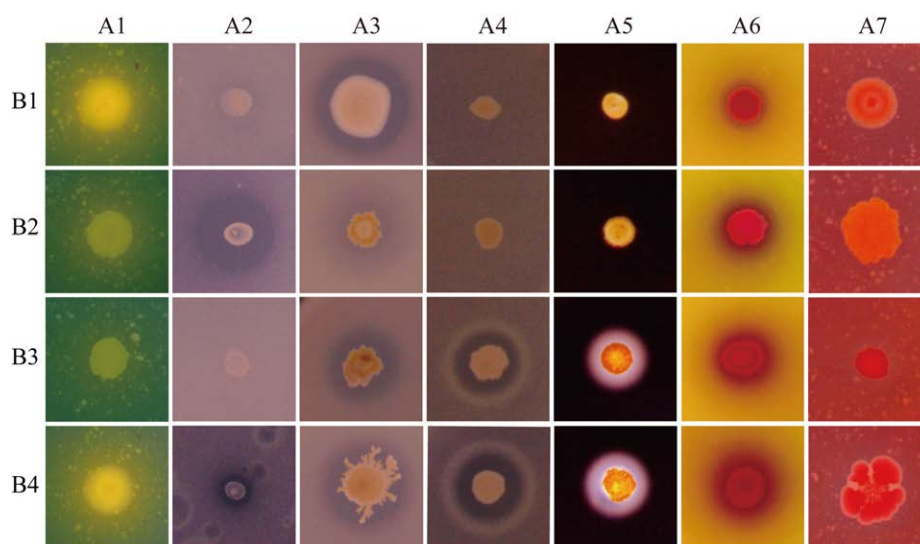


图 10 四个菌株的生理生化特性分析 A1: 解钾; A2: 固氮; A3: 解磷; A4: 蛋白酶; A5: 淀粉酶; A6: 几丁质酶; A7: β -1,3-葡聚糖酶; B1: *E. ludwigii* LSQ1; B2: *A. pittii* LSQ3; B3: *B. velezensis* LSQ19; B4: *B. velezensis* WB。

Figure 10 Physiological and biochemical characteristics analysis of 4 bacteria from SynCom R. A1: Potassium resolving; A2: Nitrogen fixation; A3: Phosphate resolving; A4: Protease; A5: Amylase; A6: Chitinase; A7: β -1,3-glucanase; B1: *E. ludwigii* LSQ1; B2: *A. pittii* LSQ3; B3: *B. velezensis* LSQ19; B4: *B. velezensis* WB.

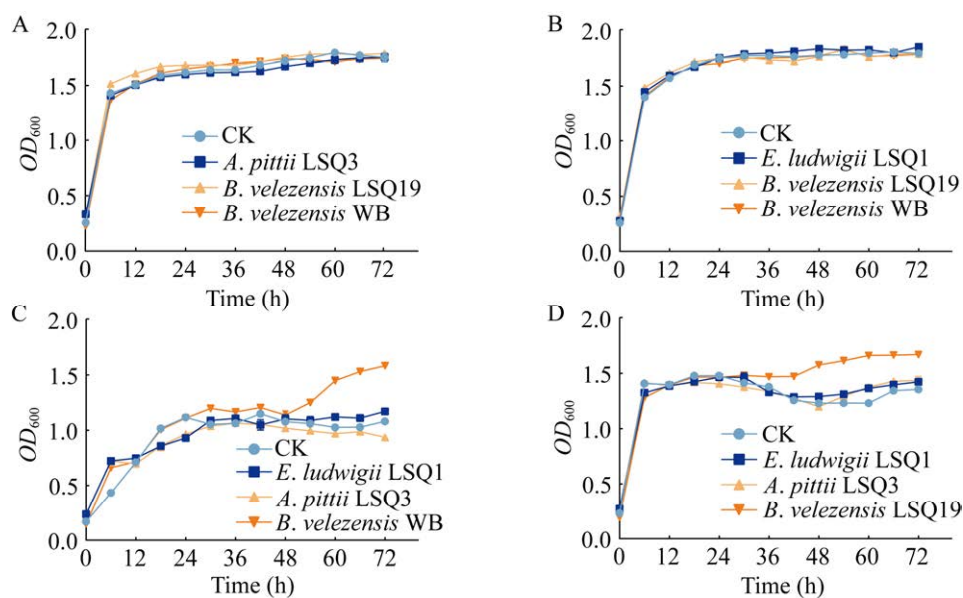


图 11 四个细菌无细胞上清液对彼此生长的影响 A: *E. ludwigii* LSQ1 生长曲线; B: *A. pittii* LSQ3 生长曲线; C: *B. velezensis* LSQ19 生长曲线; D: *B. velezensis* WB 生长曲线。

Figure 11 Effect of cell-free supernatants from the four bacteria on growth of each other. A: *E. ludwigii* LSQ1 growth curve; B: *A. pittii* LSQ3 growth curve; C: *B. velezensis* LSQ19 growth curve; D: *B. velezensis* WB growth curve.

有多种优势,包括减少病原菌、环境友好、促进植物生长、丰富有益微生物群落、提高作物抗性、增强土壤肥力、提高肥料效率和减轻栽培障碍^[38]。因此,有必要不断筛选和发现高效防治土传疾病的有益微生物,进一步研究这些微生物的促生和生防特性,将有助于其作为微生物农药或肥料的开发^[26]。

植物根系是植物、微生物病原菌和根际微生物群落相互作用的关键场所,植物病害的发生与根际微生物群落结构和多样性密切相关^[39]。根际微生物是植物的第二基因组,在维持植物健康方面发挥着重要作用^[40]。施用生物有机肥,可以抑制香蕉枯萎病相关的细菌群落^[41]。微生物多样性被认为是预防疾病的关键因素,可作为植物保护策略中的生物标志物^[42]。在本研究中,施用 SynCom Q 后,金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)、申氏菌属(*Shinella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)等在西瓜根和根际富集(图 3)。据报道,金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)^[35]、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)^[43]、根瘤菌属(*Rhizobium*)^[14]、德沃斯氏菌属(*Devosia*)^[44]、申氏菌属(*Shinella*)^[45]等对植物生长和土壤健康产生积极的影响,说明施用 SynCom Q 可以招募一些有益菌属在西瓜根和根际富集,从而降低西瓜枯萎病的发病率(图 1)。

菌株有效定殖是促进植物生长、促进植物与微生物相互作用、抑制植物病原菌传播的关键因素^[46]。合成菌群成员在根或根际定殖是其行使特定功能的关键^[47]。一个由 13 个细菌组成的抗黄萎根腐病菌群,利用能够在根或根际定殖的菌株进一步简化为由寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)、根瘤菌(*Rhizobium* sp.)、苍白杆菌(*Ochrobactrum* sp.)和小陌生菌

(*Advenella* sp.)这 4 个细菌组成的合成菌群;另外,由 4 个细菌构建的简单菌群和 13 个细菌构建的菌群对根腐病的防治效果相似^[14]。拟南芥被霜霉病病原菌(*Hyaloperonospora arabidopsidis*)入侵时,黄单胞菌(*Xanthomonas* sp.)、寡养单胞菌(*Stenotrophomonas* sp.)和微杆菌(*Microbacterium* sp.)会在感染的拟南芥根际大量富集,并且后续实验表明在霜霉病感染的拟南芥根际接种这 3 株细菌,可以协同控制拟南芥霜霉病^[48]。在本研究中,经过植株和病原菌的联合筛选, SynCom Q 中的 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 在西瓜根和根际中的相对丰度较高(图 6),推测这 4 个菌株在西瓜根和根际的定殖能力较强。依据 *E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 在西瓜根和根际中的相对丰度,构建了简化的菌群 SynCom R。有益微生物通常产生具有生物活性的次级代谢物,诱导植物防御反应或直接抑制植物病原菌的繁殖^[49]。在本研究中,进一步比较了 SynCom R 与 SynCom Q、*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 以及剔除一菌的菌群对 Fon 生长的影响。结果表明, SynCom R、SynCom Q、*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 及剔除一菌的菌群对 Fon 的生长均产生抑制作用,并且 SynCom R 对 Fon 生长的抑制要高于 SynCom Q、4 个单菌及一菌剔除的菌群(图 7)。同时,对防病效果进行了验证,结果表明, SynCom R 处理组的西瓜枯萎病的发病率低于 SynCom Q 和“一个细菌敲除”的菌群(图 8),综上,在抑制病原菌生长和防病效果上, SynCom R 是一个更优的菌群。

生物防治剂具有独特的生理生化特性,对植物和病原菌产生影响,如产生激素、铁载

体、胞外酶和抗菌化合物,使其在逆境胁迫下调节植物的生长^[50]。本研究表明,*B. velezensis* LSQ19、*B. velezensis* WB 能分泌多种胞外酶,包括蛋白酶、淀粉酶、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶(图 10),这些酶可以降解真菌细胞壁中的几丁质和葡聚糖等聚合物,导致细胞结构变形和细胞内容物渗漏,从而阻碍真菌病原菌的传播^[51]。细菌代谢提取物能抑制 *Fon* 的生长,说明病原菌的抑制是由抗菌活性的代谢物介导的^[52]。相关代谢物可能包括抗生素类物质、氰化物、铁螯合剂和细胞壁降解酶,如几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶^[53-54]。细菌可以分泌活性物质,激活植物防御系统,增强作物的免疫力与抗病性,减轻或消除病原菌对植物的危害。*SynCom R* 的成员之间还存在代谢产物交叉喂养现象,但菌群成员之间如何协作,其协作的机制是什么,还需进一步地深入研究。

综上所述,在构建合成菌群时应注重菌株的最佳组合,而不是更多的菌株组合。因此,以植物招募的细菌为基础组装的合成菌群,更有利于寄主植物抵抗逆境胁迫^[48,55]。

4 结论

施用 *SynCom Q* 改变了西瓜根和根际细菌群落的结构,提高了金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、根瘤菌属(*Rhizobium*)、德沃斯氏菌属(*Devosia*)的相对丰度,降低了根际 *Fon* 的密度。经过植物和病原菌的联合筛选,*E. ludwigii* LSQ1、*A. pittii* LSQ3、*B. velezensis* LSQ19 和 *B. velezensis* WB 能在根和根际上定殖,因此,把 6 个细菌组成的 *SynCom Q* 简化为由 4 个细菌组成的 *SynCom R*。*SynCom R* 既能有效地抑制 *Fon* 的生长,也能有效地防治西瓜枯萎病。

REFERENCES

- [1] LI W, HU XY, ZHU CS, GUO SX, LI M. Control effect of root exudates from mycorrhizal watermelon seedlings on *Fusarium* wilt and the bacterial community in continuously cropped soil[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1225897.
- [2] DONG XM, LIAN QG, CHEN J, JIA RM, ZONG ZF, MA Q, WANG Y. The improved biocontrol agent, F1-35, protects watermelon against *Fusarium* wilt by triggering jasmonic acid and ethylene pathways[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(9): 1710.
- [3] BUSTAMANTE MI, EL FAR K, ESKALEN A. Evaluation of the antifungal activity of endophytic and rhizospheric bacteria against grapevine trunk pathogens[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(10): 2035.
- [4] SAMARAS A, ROUMELIOTIS E, NTASIOU P, KARAOGLANIDIS G. *Bacillus subtilis* MBI600 promotes growth of tomato plants and induces systemic resistance contributing to the control of soilborne pathogens[J]. *Plants*, 2021, 10(6): 1113.
- [5] XUE C, SHEN ZZ, HAO YW, YU ST, LI YC, HUANG WJ, CHONG Y, RAN W, LI R, SHEN QR. 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.
- [6] XU WH, WANG KX, WANG HX, LIU ZP, SHI YR, GAO Z, WANG ZG. Evaluation of the biocontrol potential of *Bacillus* sp. WB against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. *Biological Control*, 2020, 147: 104288.
- [7] ZHANG Y, XIAO JL, YANG K, WANG YQ, TIAN Y, LIANG ZH. Transcriptomic and metabonomic insights into the biocontrol mechanism of *Trichoderma asperellum* M45a against watermelon *Fusarium* wilt[J]. *PLoS One*, 2022, 17(8): e0272702.
- [8] 韦中, 杨天杰, 任鹏, 胡洁, 李梅, 徐阳春, 沈其荣. 合成菌群在根际免疫研究中的现状与未来[J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44(4): 597-603.
- [9] WEI Z, YANG TJ, REN P, HU J, LI M, XU YC, SHEN QR. Advances and perspectives on synthetic microbial community in the study of rhizosphere immunity[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2021, 44(4): 597-603 (in Chinese).
- [10] RITPITAKPHONG U, FALQUET L, VIMOLTUST A, BERGER A, MÉTRAUX JP, L'HARIDON F. The microbiome of the leaf surface of *Arabidopsis* protects against a fungal pathogen[J]. *New Phytologist*, 2016, 210(3): 1033-1043.
- [11] JACK ALH, NELSON EB. A seed-recruited microbiome protects developing seedlings from disease by altering homing responses of *Pythium aphanidermatum* zoospores[J]. *Plant and Soil*, 2018, 422(1): 209-222.
- [12] GROBKOPF T, SOYER OS. Synthetic microbial communities[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2014, 18: 72-77.
- [13] NIU B, PAULSON JN, ZHENG XQ, KOLTER R. Simplified and representative bacterial community of maize roots[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(12): E2450-E2459.

- [13] SCHMITZ L, YAN ZC, SCHNEIJDERBERG M, de ROIJ M, PIJNENBURG R, ZHENG Q, FRANKEN C, DECHESNE A, TRINDADE LM, van VELZEN R, BISSELING T, GEURTS R, CHENG X. Synthetic bacterial community derived from a desert rhizosphere confers salt stress resilience to tomato in the presence of a soil microbiome[J]. The ISME Journal, 2022, 16(8): 1907-1920.
- [14] LI ZF, BAI XL, JIAO S, LI YM, LI PR, YANG Y, ZHANG H, WEI GH. A simplified synthetic community rescues *Astragalus mongholicus* from root rot disease by activating plant-induced systemic resistance[J]. Microbiome, 2021, 9(1): 217.
- [15] ZHANG JY, LIU YX, ZHANG N, HU B, JIN T, XU HR, QIN Y, YAN PX, ZHANG XN, GUO XX, HUI J, CAO SY, WANG X, WANG C, WANG H, QU BY, FAN GY, YUAN LX, GARRIDO-OTER R, CHU CC, BAI Y. NRT1.1B is associated with root microbiota composition and nitrogen use in field-grown rice[J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(6): 676-684.
- [16] LEBEIS SL, PAREDES SH, LUNDBERG DS, BREAKFIELD N, GEHRING J, McDONALD M, MALFATTI S, del RIO TG, JONES CD, TRINGE SG, DANGL JL. PLANT MICROBIOME. Salicylic acid modulates colonization of the root microbiome by specific bacterial taxa[J]. Science, 2015, 349(6250): 860-864.
- [17] BANERJEE S, SCHLAEPPI K, van der HEIJDEN MGA. Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning[J]. Nature Reviews Microbiology, 2018, 16(9): 567-576.
- [18] LUO SQ, WANG ZG, XU WH. *Bacillus velezensis* WB invokes soil suppression of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by inducing particular taxa[J]. Annals of Agricultural Sciences, 2023, 68(2): 159-170.
- [19] 张龄尹, 刘珊珊, 魏文哲, 徐谓, 操一凡, 刘红军, 沈宗专, 李荣, 沈其荣. 香蕉枯萎病抑病菌群的构建及其生防效果研究[J]. 南京农业大学学报, 2024, 47(5): 898-906.
- [20] ZHANG LY, LIU SS, WEI WZ, XU X, CAO YF, LIU HJ, SHEN ZZ, LI R, SHEN QR. Construction of synthetic microbiota against banana *Fusarium* wilt and its biocontrol effects[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(5): 898-906 (in Chinese).
- [21] RAJAWAT MVS, SINGH S, TYAGI SP, SAXENA AK. A modified plate assay for rapid screening of potassium-solubilizing bacteria[J]. Pedosphere, 2016, 26(5): 768-773.
- [22] 冯美茹. 白花曼陀罗内生真菌多样性及抗菌与促生特性研究[D]. 广州: 广东药科大学硕士学位论文, 2021.
- [23] FENG MR. Diversity, antimicrobial activities and the growth promoting characteristics of endophytic fungi from *Datura metel* L.[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Guangdong Pharmaceutical University, 2021 (in Chinese).
- [24] 孙亚钦, 张书红, 张影, 刘星, 吴大付, 刘永卓, 王菲. 玉米根际解磷解钾细菌的筛选、鉴定及其生态适应性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2023, 51(12): 111-119, 142.
- [25] SUN YQ, ZHANG SH, ZHANG Y, LIU X, WU DF, LIU YZ, WANG F. Isolation, identification and ecological adaptability of phosphate- and potassium-solubilizing bacteria in maize rhizosphere[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2023, 51(12): 111-119, 142 (in Chinese).
- [26] 覃诗扬, 陆凌晨, 谢学文, 石延霞, 柴阿丽, 王远宏, 李宝聚, 李磊. 生防菌 ZF510 的分离鉴定及其对白菜细菌性软腐病的防治效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(1): 146-156.
- [27] TAN SY, LU LC, XIE XW, SHI YX, CHAI AL, WANG YH, LI BJ, LI L. Isolation, identification and control effect of strain ZF510 on bacterial soft rot of Chinese cabbage[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2024, 40(1): 146-156 (in Chinese).
- [28] 王楠, 廖永琴, 施竹凤, 申云鑫, 杨童雨, 冯路遥, 矣小鹏, 唐加菜, 陈齐斌, 杨佩文. 三株无量山森林土壤芽孢杆菌鉴定及其生物活性挖掘[J]. 生物技术通报, 2024, 40(2): 277-288.
- [29] WANG N, LIAO YQ, SHI ZF, SHEN YX, YANG TY, FENG LY, YI XP, TANG JC, CHEN QB, YANG PW. Identification of three strains of *Bacillus* from the forest soil of Wuliang Mountain and mining of their bioactivities[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(2): 277-288 (in Chinese).
- [30] WIN TT, BO B, MALEC P, FU P. The effect of a consortium of *Penicillium* sp. and *Bacillus* spp. in suppressing banana fungal diseases caused by *Fusarium* sp. and *Alternaria* sp.[J]. Journal of Applied Microbiology, 2021, 131(4): 1890-1908.
- [31] 余红凤, 张琳, 毕钰, 王志刚, 徐伟慧, 黄欣冉, 郭嘉仪. 一株西瓜枯萎病生防菌 *Bacillus methylotrophicus* 的筛选、鉴定及抑菌物质分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 534-553.
- [32] YU HF, ZHANG L, BI Y, WANG ZG, XU WH, HUANG XR, GUO JY. Screening, identification and antifungal substances of an antagonistic strain *Bacillus methylotrophicus* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 534-553 (in Chinese).
- [33] 张韞. 土壤·水·植物理化分析教程[M]. 北京: 中国林业出版社, 2011.
- [34] ZHANG Y. Course of Soil, Water and Plant Physical and Chemical Analysis[M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2011 (in Chinese).
- [35] 周佳新, 刘悦, 徐伟慧, 王志刚, 陈文晶, 胡云龙. 合成菌群对大豆根际和根内微生物群落的影响[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2024, 32(4): 571-581.
- [36] ZHOU JX, LIU Y, XU WH, WANG ZG, CHEN WJ, HU YL. Effect of synthetic microbial communities on rhizosphere and root-endophytic microbiota of soybean[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2024, 32(4): 571-581 (in Chinese).
- [37] 刘明艳, 马嘉晗, 李瑜, 刘文霞, 秦鸿娟, 高配科. 16S rRNA 基因高变区 V4 和 V3-V4 及测序深度对油藏细菌菌群分析的影响[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 440-449.
- [38] LIU MY, MA JH, LI Y, LIU WX, QIN HJ, GAO PK. Influence of 16S rRNA gene V4 and V3-V4 sequencing and sequencing depth on unraveling bacterial communities inhabiting oil reservoirs[J]. Microbiology China, 2020, 47(2): 440-449 (in Chinese).
- [39] SAMACO MA, DELA CUEVA FM. Molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with sugarcane pokkah boeng from the Philippines using

- partial translation elongation factor-1 α (*TEF-1 α*) gene sequences[J]. *Sugar Tech*, 2019, 21(4): 619-630.
- [31] LI ZY, LI JJ, YU M, QUANDAHOR P, TIAN T, SHEN T. *Bacillus velezensis* FX-6 suppresses the infection of *Botrytis cinerea* and increases the biomass of tomato plants[J]. *PLoS One*, 2023, 18(6): e0286971.
- [32] LI ZY, MA JX, LI JJ, CHEN YL, XIE ZH, TIAN YQ, SU X, TIAN T, SHEN T. A biocontrol strain of *Serratia plymuthica* MM promotes growth and controls *Fusarium* wilt in watermelon[J]. *Agronomy*, 2023, 13(9): 2437.
- [33] WANG KX, WANG ZG, XU WH. Induced oxidative equilibrium damage and reduced toxin synthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by secondary metabolites from *Bacillus velezensis* WB[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2022, 98(8): fiac080.
- [34] KUMAR H, BAJPAI VK, DUBEY RC, MAHESHWARI DK, KANG SC. Wilt disease management and enhancement of growth and yield of *Cajanus cajan* (L) var. Manak by bacterial combinations amended with chemical fertilizer[J]. *Crop Protection*, 2010, 29(6): 591-598.
- [35] XUN WB, REN Y, YAN H, MA AY, LIU ZH, WANG LL, ZHANG N, XU ZH, MIAO YZ, FENG HC, SHEN QR, ZHANG RF. Sustained inhibition of maize seed-borne *Fusarium* using a *Bacillus*-dominated rhizospheric stable core microbiota with unique cooperative patterns[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(5): e2205215.
- [36] MARTYN R. *Fusarium* wilt of watermelon: 120 years of research[J]. *Horticultural Reviews*, 2014, 42: 349-442.
- [37] GE BB, LIU BH, NWET TT, ZHAO WJ, SHI LM, ZHANG KC. *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from Changbai Mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent[J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166079.
- [38] HARTMANN A, PROENÇA DN. Biological control of phytopathogens: mechanisms and applications[J]. *Pathogens*, 2023, 12(6): 783.
- [39] WEN T, YUAN J, HE XM, LIN Y, HUANG QW, SHEN QR. Enrichment of beneficial cucumber rhizosphere microbes mediated by organic acid secretion[J]. *Horticulture Research*, 2020, 7: 154.
- [40] BERENDSEN RL, PIETERSE CMJ, BAKKER PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 478-486.
- [41] SHEN ZZ, WANG DS, RUAN YZ, XUE C, ZHANG J, LI R, SHEN QR. Deep 16S rRNA pyrosequencing reveals a bacterial community associated with Banana *Fusarium* Wilt disease suppression induced by bio-organic fertilizer application[J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98420.
- [42] BERG G, KÖBERL M, RYBAKOVA D, MÜLLER H, GROSCH R, SMALLA K. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2017. DOI: 10.1093/femsec/fix050.
- [43] YUAN J, ZHAO J, WEN T, ZHAO ML, LI R, GOOSSENS P, HUANG QW, BAI Y, VIVANCO JM, KOWALCHUK GA, BERENDSEN RL, SHEN QR. Root exudates drive the soil-borne legacy of aboveground pathogen infection[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 156.
- [44] HE WJ, ZHANG TT, ZHENG MR, TABL KM, HUANG T, LIAO YC, WU AB, ZHANG JB. Utilization of a novel soil-isolated strain *Devosia insulae* FS10-7 for deoxynivalenol degradation and biocontrol of *Fusarium* crown rot in wheat[J]. *Phytopathology*, 2024, 114(5): 1057-1067.
- [45] SHAHRAJABIAN MH, SUN WL, CHENG Q. The importance of *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Herbaspirillum*, *Sinorhizobium* in sustainable agricultural production[J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2021, 49(3): 12183.
- [46] DONG XY, TU C, XIE ZH, LUO YM, ZHANG L, LI ZY. The genome of *Bacillus velezensis* SC60 provides evidence for its plant probiotic effects[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(4): 767.
- [47] MAURER K, ZACHOW C, SEEFELDER S, BERG G. Initial steps towards biocontrol in hops: successful colonization and plant growth promotion by four bacterial biocontrol agents[J]. *Agronomy*, 2013, 3(4): 583-594.
- [48] BERENDSEN RL, VISMANS G, YU K, SONG Y, de JONGE R, BURGMAN WP, BURMÖLLE M, HERSCHEND J, BAKKER PAHM, PIETERSE CMJ. Disease-induced assemblage of a plant-beneficial bacterial consortium[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(6): 1496-1507.
- [49] ABDELKHALEK A, ASEEL DG, KIRÁLY L, KÜNSTLER A, MOAWAD H, AL-ASKAR AA. Induction of systemic resistance to *Tobacco mosaic virus* in tomato through foliar application of *Bacillus amyloliquefaciens* strain TBorg1 culture filtrate[J]. *Viruses*, 2022, 14(8): 1830.
- [50] AL-MUTAR DMK, ALZAWAR NSA, NOMAN M, Azizullah, LI DY, SONG FM. Suppression of *Fusarium* wilt in watermelon by *Bacillus amyloliquefaciens* DHA55 through extracellular production of antifungal lipopeptides[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(3): 336.
- [51] LI ZK, YE XF, LIU MX, XIA CY, ZHANG L, LUO X, WANG T, CHEN Y, ZHAO YQ, QIAO Y, HUANG Y, CAO H, GU XY, FAN JQ, CUI ZL, ZHANG ZG. A novel outer membrane β -1,6-glucanase is deployed in the predation of fungi by myxobacteria[J]. *The ISME Journal*, 2019, 13(9): 2223-2235.
- [52] KÖHL J, KOLNAAR R, RAVENSBERG WJ. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: relevance beyond efficacy[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 845.
- [53] MARKOVICH NA, KONONOVA GL. Lytic enzymes of *Trichoderma* and their role in plant defense from fungal diseases: a review[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2003, 39(4): 341-351.
- [54] HEYDARI A, PESSARAKLI M. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists[J]. *Journal of Biological Sciences*, 2010, 10(4): 273-290.
- [55] RUDRAPPA T, CZYMMEK KJ, PARÉ PW, BAIS HP. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(3): 1547-1556.