

研究报告

广西赭霉 X22 对苦瓜果的促生防病作用及对叶际细菌群落的影响

覃丽萍^{#1,2,3}, 张艳^{#1,2,3}, 农倩^{1,2,3}, 曾凤花^{1,2,3}, 林珊宇^{1,2,3}, 龙艳艳^{1,2,3}, 谢玲^{*1,2,3}

1 广西作物病虫害生物学重点实验室, 广西 南宁 530007

2 广西壮族自治区农业科学院植物保护研究所, 广西 南宁 530007

3 农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室, 广西 南宁 530007

覃丽萍, 张艳, 农倩, 曾凤花, 林珊宇, 龙艳艳, 谢玲. 广西赭霉 X22 对苦瓜果的促生防病作用及对叶际细菌群落的影响[J]. 微生物学通报, 2024, 51(10): 4104-4117.

QIN Liping, ZHANG Yan, NONG Qian, ZENG Fenghua, LIN Shanyu, LONG Yanyan, XIE Ling. The effects *Ochroconis guangxiensis* X22 on preventing powdery mildew, promoting growth, and regulating phyllosphere bacterial community of *Momordica charantia*[J]. Microbiology China, 2024, 51(10): 4104-4117.

摘要:【背景】深色有隔内生真菌(dark septate endophyte, DSE)是植物共生真菌的典型代表之一, 具有增强植物抗病性和促进植物生长等潜能, 此外, DSE 生态分布广泛、可分离纯培养及定殖无寄主特异性的特点为其在农业生产、环境保护及修复等方面带来广阔的应用前景。【目的】以 7 株菌株为研究对象, 从中筛选对苦瓜果白粉病有良好生防效果的菌株, 探究其对叶际细菌群落结构和多样性的影响。【方法】采用浸种+淋土+灌根接种法通过盆栽试验对 7 株 DSE 菌株防治苦瓜果白粉病的效果进行评价, 通过浸种法测定优良菌株对苦瓜果种子萌发和生长的影响, 并基于 16S rRNA 基因高通量测序结果, 分析苦瓜果接种菌株 X22 后在白粉病发生初期、中期和后期叶际细菌群落结构特征。【结果】筛选获得一株优良生防菌株——广西赭霉(*Ochroconis guangxiensis*) X22, 其对苦瓜果白粉病的室内防治效果达 56.58%, 接种 X22 (O+)的苦瓜果种子发芽率显著提高, 苦瓜果出苗相对较整齐, 苦瓜果苗的叶片数、茎径和叶色值(soil and plant analyzer development, SPAD)分别较对照(O-)提高 3.18%、6.08%和 7.88%, 株高比 O-提高了 22.59%, 差异达显著水平。相较于 O-, O+的叶际细菌 α 多样性在白粉病发生初期、中期和后期均有所提高, 丰度则表现为增-减-增。在白粉病发生

资助项目: 广西作物病虫害生物学重点实验室基金(20-065-30-ST-05, 22-035-31-24ST03); 广西壮族自治区科技计划(桂科 AA22036001); 广西农业科学院基本科研业务专项(桂农科 2023YM79, 桂农科 2024YP061)

*对本文贡献相同

This work was supported by the Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests Foundation (20-065-30-ST-05, 22-035-31-24ST03), the Science and Technology Project of Guangxi Zhuang Autonomous Region (AA22036001), and the Special Fund for Basic Research of Guangxi Academy of Agricultural Sciences (2023YM79, 2024YP061).

#These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: xieling20011@126.com

Received: 2024-01-16; Accepted: 2024-05-20; Published online: 2024-06-13

的各个阶段, O+与 O-这 2 个处理在门水平上优势菌门及其丰度差异不显著; 在属水平上, 初期和中期 2 个处理优势菌属及其相对丰度存在差异, 并且 O+特异富集了参与氮循环的铁氧化菌属 (*Sideroxydans*) 和缺氧反硝化菌属 (*Natronincola*) 及具抑菌作用的放线菌糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*) 等有益菌。【结论】DSE 菌株 X22 对苦瓜白粉病具有较好的防治效果, 同时可促进苦瓜种子萌发和植株生长, 可能是通过调节叶际细菌群落结构维持其多样性和稳定性, 并招募具抑菌活性和固氮能力的有益菌抑制病原菌, 为宿主提供氮源促进宿主生长, 从而提高宿主抗病性。菌株 X22 是一株很有开发应用潜力的生防菌株。

关键词: 深色有隔内生真菌; 苦瓜白粉病; 促生; 高通量测序; 叶际细菌; 群落结构

The effects *Ochroconis guangxiensis* X22 on preventing powdery mildew, promoting growth, and regulating phyllosphere bacterial community of *Momordica charantia*

QIN Liping^{#1,2,3}, ZHANG Yan^{#1,2,3}, NONG Qian^{1,2,3}, ZENG Fenghua^{1,2,3}, LIN Shanyu^{1,2,3}, LONG Yanyan^{1,2,3}, XIE Ling^{*1,2,3}

1 Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Nanning 530007, Guangxi, China

2 Plant Protection Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

3 Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Nanning 530007, Guangxi, China

Abstract: [Background] Dark septate endophytes (DSEs) are representatives of endophytic fungi capable of enhancing the disease resistance and promoting the growth of plants. With wide distribution, culturability, and non-host specificity, DSEs demonstrate broad application prospects in agricultural production as well as environmental protection and restoration. **[Objective]** To screen the DSE strain(s) capable of controlling powdery mildew in bitter melon (*Momordica charantia*) out of seven strains and investigate the effects of the strain(s) screened out on the phyllosphere bacterial community of *M. charantia* plants. **[Methods]** We carried out pot experiments with the seed soaking+soil spraying+root irrigation methods to study the effects of seven DSE strains on powdery mildew of *M. charantia*. The effects of the strain screened out on the seed germination and plant growth of *M. charantia* were studied by the seed soaking method. The 16S rRNA gene high-throughput sequencing was employed to reveal the structure of phyllosphere bacterial community in the early, middle, and late stages of powdery mildew in *M. charantia* inoculated with the strain screened out. **[Results]** The strain X22 (*Ochroconis guangxiensis*) was screened out as a potential biocontrol agent, with the control efficacy of 56.58% on powdery mildew of *M. charantia*. Compared with the non-inoculated control (O-), inoculation with X22 (O+) increased the seed germination rate and led to uniform seedlings. The inoculation increased the leaf number, stem diameter, SPAD, and plant height by 3.18%, 6.08%, 7.88%, and 22.59% ($P<0.05$), respectively. Compared with O-, O+ showcased increased

alpha diversity of phyllosphere bacteria in the early, middle, and late stages of powdery mildew, while the abundance of phyllosphere bacteria in the O+ group presented an increase-decrease-increase trend. In all the stages of powdery mildew, neither the dominant phyla nor their relative abundance there were no significant differences between O- and O+ groups. In the early and middle stages of powdery mildew, the dominant genera and their relative abundance showed significant differences between the two groups. Specifically, beneficial bacterial genera such as *Sideroxydans*, *Saccharomonospora*, and *Natronincola* involved in the nitrogen cycle or with antimicrobial activity were enriched in the O+ group. **[Conclusion]** The DSE strain X22 exhibited good biocontrol effect on powdery mildew and promoted the seed germination and plant growth of *M. charantia*. It may regulate the community structure to maintain the diversity and stability of phyllosphere bacteria. Meanwhile, this strain can recruit beneficial bacteria with antimicrobial activity and nitrogen-fixing ability to inhibit pathogens and provide nitrogen sources for hosts to promote host growth, thereby improving host disease resistance. The strain X22 is a biocontrol agent with great potential for development and application.

Keywords: dark septate endophyte; powdery mildew of *Momordica charantia*; growth-promoting; high-throughput sequencing; phyllosphere bacteria; community structure

苦瓜(*Momordica charantia*)是一种重要的瓜类蔬菜,白粉病是苦瓜生产中重要的病害之一,在我国该病害主要由单囊壳白粉菌[*Podosphaera xanthii* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*)]和二孢白粉菌[*Golovinomyces cichoracearum* L.m (syn. *Erysiphe cichoracearum*)]引起^[1],该病在整个生长期均可发生,严重时造成叶片萎蔫、枯黄,光合作用降低或丧失,影响果实生长发育,最终可导致全株早衰死亡,减产严重。目前白粉病以化学药剂防治为主,具有简便、快速、高效的优点,但由此带来的环境污染、农药残留超标及病菌产生抗(耐)药性等问题也相当突出,在化肥、农药双减的大趋势下,发掘利用高效、安全、对环境友好的有益微生物防治病害对实现化肥、农药减量增效的目标具有促进作用。

深色有隔内生真菌(dark septate endophyte, DSE)不是一个科学的分类单元,而是泛指具有较深颜色、明显横隔的菌丝,能够在植物根部定殖但不会引起植物产生明显病害症状的一类真菌^[2-3],其生态学功能多样^[4-6],其中减轻作物

病害的生态功能引起了植保科研工作者的关注,多项研究证实内生真菌对真菌^[7]、细菌^[8]及病毒等病原物引起的多种病害^[9]均有良好的生防作用。关于内生真菌的生防机制存在多种观点,一般认为通过诱导宿主的系统抗性^[10]、诱导宿主产生抗菌物质或其他次生代谢物^[11]、促生作用、竞争作用等机制抑制病原菌,还有研究发现内生真菌对植物根际^[6]、叶际^[12-13]的微生物群落有强烈影响。关于内生真菌防治白粉病和影响叶际微生物群落的研究均分别有报道,如盘双端毛孢属(*Seimatosporium*)内生真菌可提高烟草(*Nicotiana tabacum*)对菊科白粉菌(*Erysiphe cichoracearum*)引起的白粉病的抗性^[14];接种(*Epichloë gansuensis*)可降低小麦白粉病菌(*Blumeria graminis*)在醉马草(*Achnatherum inebrians*)的定殖,接种植株株高、生物量及分蘖数等生长指标也优于未接种植株^[15];香柱菌属(*Epichloë*)内生真菌对黑麦草属(*Lolium*)、羊茅属(*Festuca*)和芨芨草属(*Achnatherum*)等草本植物叶际微生物有明显影响^[12-13,16]。然而,内

生真菌对白粉病的生防作用及其对叶际微生物的调节作用目前少见相关的研究报道。本实验室前期收集、分离获得一批 DSE 菌株并证明其对甘蔗、香蕉等一些作物具有增强抗病性和促进生长的作用^[17-18]，基于前人的研究，笔者猜测 DSE 在提高苦瓜抗白粉病性方面具有潜力，并且很可能与其改善叶际微生物区系有关。为明确 DSE 减轻苦瓜白粉病危害的有效性，本研究对 DSE 菌株防治苦瓜白粉病的能力进行评价，并探究优良菌株对叶际细菌群落结构和多样性的影响，从微生物组的角度解析 DSE 的生防机理，以期利用 DSE 进行苦瓜白粉病的绿色防控、实现药肥双减奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样 品

供试 DSE 菌株广西赭霉 (*Ochroconis guangxiensis*) X22^[19]分离自广西香蕉根围土；枝孢瓶霉 (*Cladophialophora* sp.) MS2^[20]、*Conlarrrium sacchari* LA3、*Conlarrrium sacchari* DX4^[18]及 G17 (未鉴定)分离自广西甘蔗根围土，分离方法参照谢玲^[18]的方法进行；*Meliniomyces variabilis* LtVB3、*Heteroconium chaetospira* H4007 从日本茨城大学农学院微生物生态学研究室引进^[17]，本实验室保存；供试苦瓜品种：碧绿大肉二号苦瓜，南宁赛绿科技有限公司生产；育苗基质的有机质含量+腐植酸 $\geq 55\%$ ，总孔隙度 70%–80%，pH 5.0–7.0，南宁桂裕鑫农业科技有限公司生产，市售。

1.1.2 培养基

采用 50%玉米粉麦芽汁(corn meal malt yeast, CMMY)培养基^[9]活化菌株，以马铃薯葡萄糖液体(potato dextrose broth, PDB)培养基^[9]作为扩繁培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器

FastPfu Buffer 和 *FastPfu* Polymerase, 北京全式金生物技术股份有限公司；BSA, 宝生物工程(大连)有限公司。全温摇瓶柜, 苏州市培英实验设备有限公司；匀浆仪, 江苏天翎仪器有限公司；游标卡尺, 上海美耐特实业有限公司；叶绿素计, 柯尼卡美能达(中国)投资有限公司。

1.2 菌悬液的制备

供试菌株从保存在 4 °C 的 CMMY 斜面上挑取小块菌丝块接种在 CMMY 平板上, 每皿接 3 个点, 28 °C 培养 10 d, 用灭菌手术刀将菌落切成细碎的菌丝块, 接入 PDB 培养基中, 28 °C、120 r/min 条件下振荡培养 12 d, 用双层灭菌纱布过滤收集菌丝体, 再用灭菌水冲洗 3 次后挤掉水(以手挤压不滴水为度), 然后用匀浆仪匀浆 2 min 配制成菌丝体悬浮液(菌丝体:水质量比为 1:30)。

1.3 不同 DSE 菌株对苦瓜白粉病的防治效果

苦瓜种子经清水浸泡 3 h、30 °C 催芽 72 h 后置于菌悬液中浸泡 0.5 h, 播种于内含等量育苗基质的 10 cm×10 cm 的营养杯中, 然后每杯浇 30 mL 菌液, 以灭菌水浸泡 0.5 h 为对照。每杯播 1 粒种子, 4 杯/处理, 待长出 4–5 片真叶时移至 19 cm×17 cm×20 cm 的盆中, 定根后再灌根 1 次, 100 mL/株。各处理打乱随机摆放在网室中, 自然条件下培养。

待对照充分发病(对照每株均出现最高病级叶片)后调查病情级别, 从下到上逐叶调查主蔓上的 15 片叶子, 计算病情指数。病情分级标准如下^[1]: 0 级: 整张叶片无病斑; 1 级: 有少量病斑, 病斑面积占整个叶面积 $< 1/3$; 2 级: 白粉明显, 病斑面积占整个叶面积的 $1/3$ – $2/3$; 3 级: 病斑逐渐连接成片, 面积占叶面积的 $2/3$ 以上; 4 级: 粉斑铺满整张叶片, 触碰叶片, 白粉掉落; 5 级: 粉斑布满整张叶片, 叶片开始黄化,

逐渐枯萎。病情指数和防治效果计算方法:

病情指数= $\sum[(\text{病级代表数值} \times \text{该病级叶数}) / (\text{调查总叶数} \times \text{最高病级代表数值})] \times 100$ (1)

防治效果(%)= $[(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100$ (2)

1.4 菌株 X22 对苦瓜种子萌发的影响

根据 1.3 的结果,选择防治效果最好的菌株 X22,按 1.2 制备菌丝体悬浮液,将苦瓜种子进行如下处理:在菌悬液中(以刚刚没过种子为度)浸泡 1 h(编号 O1+);在菌悬液中浸泡 3 h(编号 O3+)。以苦瓜种子在灭菌水中浸泡相应时间为对照:在灭菌水中浸泡 1 h(编号 O1-);在灭菌水中浸泡后 3 h(编号 O3-)。苦瓜种子浸泡相应时间后倒掉菌液(灭菌水),置于以湿润滤纸铺垫的培养皿中,每皿 10 粒种子,每个处理 3 皿,盖上皿盖,在 30 °C 恒温催芽,定期喷水保湿,72 h 后调查,按公式(3)统计发芽率(以芽与种子等长为标准)。

发芽率(%)= $\text{发芽种子数} / \text{供试种子数} \times 100$ (3)

1.5 菌株 X22 对苦瓜苗生长影响的测定

接种 X22 处理(以 O+表示,下同)按 1.4 的方法处理种子 1 h,空白对照(以 O-表示,下同)用灭菌水代替菌悬液以同样的方法处理种子,取出后播种于内含等量育苗基质的 10 cm×10 cm 的营养杯中,每杯播 1 粒种子,按 1.3 的方法移植及培养,每个处理设 3 个重复,每个重复 3 盆。在播种 35 d 后统计叶片数,用卷尺测量株高(茎基部至生长点的距离),用游标卡尺测量苦瓜地上部 1 cm 处的茎径(十字交叉法),用叶绿素计测定主蔓从基部往上数第 3 张完整叶片的叶色值(soil and plant analyzer development, SPAD)^[21]。

1.6 菌株 X22 对苦瓜叶际细菌群落的影响

试验设 2 个处理:接种 X22 (O+)和空白对照(O-),按 1.5 的方法处理种子、播种及培养。

待白粉病开始发生时进行第一次采样,每处理选取长势比较一致的 6 株,每株采集叶位相同的 2 片叶,共 12 片叶,分成 3 份,分别放入干净的自封袋,置于干冰盒中。共采 3 次样,分别在发病初期、发病中期和发病后期进行。O+和 O-的样品编号分别为:发病初期采样,AX22、CK1;发病中期采样,BX22、CK2;发病后期采样,CX22、CK3。

样品送往上海美吉生物医药科技有限公司进行处理。采用引物 799F (5'-AACMGGATTAG ATACCCKG-3')和 1193R (5'-ACGTCATCCCCA CCTTCC-3')对细菌 16S rRNA 基因的 V5-V7 区进行 PCR 扩增。反应体系(20 μL): 5×FastPfu Buffer 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, Forward Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, Reverse Primer (5 μmol/L) 0.8 μL, FastPfu Polymerase (5 U/μL) 0.4 μL, BSA (20 mg/mL) 0.2 μL, Template DNA (10 ng/μL) 1 μL, ddH₂O 补足 20 μL; PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 13 个循环; 72 °C 10 min。2%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。利用 Illumina 公司的 MiSeq PE300 平台进行测序,获得的数据经拼接、质控、优化,基于优化序列运用 UPARSE v7.0.1090 软件(<http://drive5.com/uparse/>)按照 97%相似性进行 OTU 聚类并去除嵌合体,获得 OTU 丰度表,利用上海美吉生物医药科技有限公司生信云平台(<https://cloud.majorbio.com/>)进行在线数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同菌株对苦瓜白粉病的室内防治效果

试验期间观察发现除了接种菌株 LtVB3 的处理外,其他所有接种 DSE 处理开始发病的时间均比空白对照延后 4 d。苦瓜移栽后 40 d 的调查显示,不同 DSE 菌株对苦瓜白粉病的防治效果不同,在 23.66%–56.58%之间(表 1),

表 1 不同 DSE 菌株对苦瓜白粉病的防治效果
Table 1 Control effect of different DSE strains on powdery mildew of bitter gourd

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect (%)
接种 X22 Inoculated with X22	21.67±2.63cB	56.58±6.30aA
接种 LtVB3 Inoculated with LtVB3	29.67±4.76bcB	42.96±6.22abAB
接种 MS2 Inoculated with MS2	32.33±4.05bcB	36.92±4.26bcAB
接种 LA3 Inoculated with LA3	35.67±5.43bAB	31.30±5.53bcB
接种 DX4 Inoculated with DX4	36.00±5.42bAB	29.92±6.62bcB
接种 G17 Inoculated with G17	38.00±4.16bAB	25.47±5.70bcB
接种 H4007 Inoculated with H4007	38.67±2.18abAB	23.66±2.62cB
空白对照 Control	51.00±4.01aA	—

不同大写字母表示 $P<0.01$, 不同小写字母表示 $P<0.05$, “—”表示未涉及。下同

Data with different capital letters indicated $P<0.01$, lowercase letters indicated $P<0.05$, and “—” indicated not involved. The same below.

其中菌株 X22 盆栽防治效果(56.58%)最佳(图 1), 其次是菌株 LtVB3 (42.96%), 菌株 X22 的防治效果与菌株 LtVB3 的防治效果差异未达显著水平, 但与其他菌株相比, 差异达显著水平 ($P<0.05$)或极显著水平($P<0.01$)。

2.2 菌株 X22 对苦瓜种子萌发影响的结果

催芽 72 h 后 O1+和 O3+的平均发芽率分别为 73.33%和 86.67%, 二者差异不显著; O1-和 O3-的平均发芽率分别为 53.33%和 56.67%, 二者的差异也不显著。而 O1+的发芽率比 O1-的发芽率提高了 20%, 差异达显著水平($P<0.05$); O3+的发芽率比 O3-的发芽率提高了 30%, 差异达极显著水平($P<0.01$), 表明菌株 X22 以浸种方式接种苦瓜可显著促进苦瓜种子快速发芽且发芽整齐(图 2、图 3)。

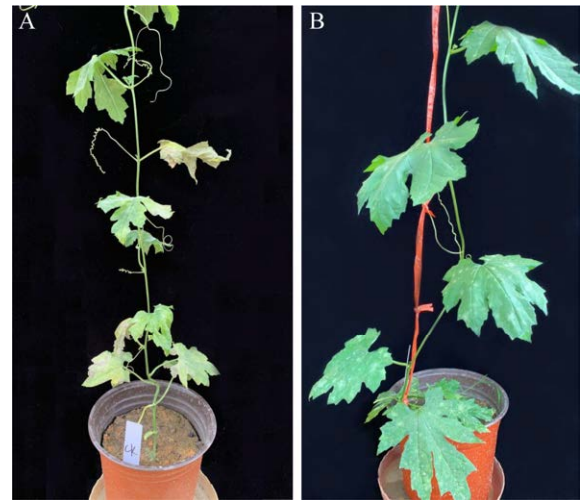


图 1 菌株 X22 防治苦瓜白粉病的盆栽试验
A: 空白对照. B: 接种菌株 X22

Figure 1 Control effect of strain X22 on powdery mildew of bitter gourd in pot culture. A: Non-inoculated control. B: Inoculated with strain X22.

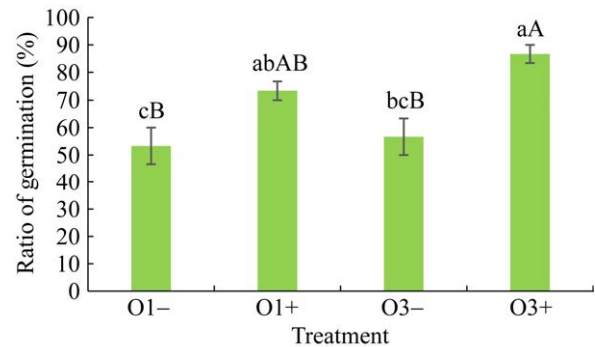


图 2 菌株 X22 对苦瓜种子萌发的影响

Figure 2 Effect of strain X22 on seed germination rate of bitter gourd.

2.3 菌株 X22 对苦瓜出苗及生长的影响

O+处理出苗比对照整齐, 植株相对高、壮(图 4), 播种 35 d 后苦瓜苗的叶片数、茎径和 SPAD 值分别为 7.56 叶、3.26 mm 和 33.87, 与 O-处理(分别为 7.33 叶、3.07 mm 和 31.40)相比差异不显著, 但均比 O-略有提高, 提高幅度分别为 3.18%、6.08%和 7.88%; O+处理的株高(33.72 cm)比 O-处理的株高(27.51 cm)增加了



图3 菌株 X22 菌悬液浸泡苦瓜种子后的发芽情况 A: 灭菌水中浸泡 1 h. B: 菌株 X22 菌悬液中浸泡 1 h. C: 灭菌水中浸泡 3 h. D: 菌株 X22 菌悬液中浸泡 3 h

Figure 3 Sprouting of bitter melon seeds soaked in strain X22 hypha suspension. A: Soaked in sterile water for 1 h. B: Soaked in X22 strain hypha suspension for 1 h. C: Soaked in sterile water for 3 h. D: Soaked in strain X22 hypha suspension for 3 h.

22.59%, 差异达显著水平($P < 0.05$), 表明菌株 X22 对苦瓜的生长具有一定的促进作用(图 4、图 5)。

2.4 菌株 X22 对苦瓜叶际微生物的影响

2.4.1 样品稀释曲线分析

稀释曲线体现样品中物种的丰富度和测序数据量的合理性, 本试验各样品的稀释曲线显示序列数在 18 000 时趋于平坦(图 6), 且样品所得到的序列的覆盖度均高于 99%, 说明测序数据量合理, 已基本覆盖到样品中绝大多数的物种, 更多的数据量只会产生少量新的 OTU。此测序结果可以反映苦瓜叶片样品中绝大多数细菌信息。

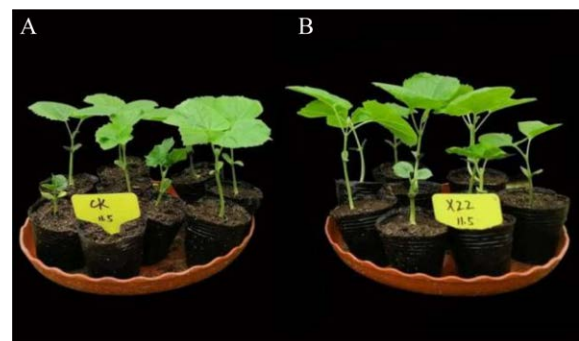


图4 用菌株 X22 菌悬液浸泡的苦瓜种子的出苗情况 A: 空白对照. B: 接种菌株 X22

Figure 4 Seedling emergence of bitter melon seeds soaked in strain X22 hypha suspension. A: Non-inoculated control. B: Inoculated with strain X22.

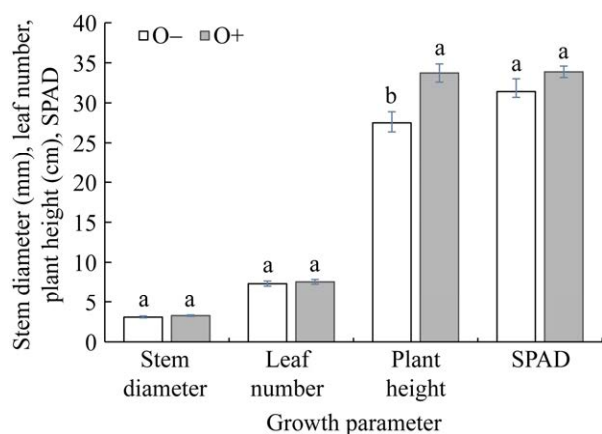


图 5 菌株 X22 菌悬液浸泡的苦瓜种子长出的幼苗生长情况

Figure 5 Growth parameter of bitter gourd seedlings inoculated strain X22.

2.4.2 苦瓜叶际细菌群落基本组成

本研究对 18 个样本的细菌多样性进行了分析, 原始数据经过处理后共获得优化序列 869 104 条, 有效序列 504 162 条。物种注释结

果: 39 门 110 纲 264 目 458 科 938 属 1 571 种 2 457 OTU。门水平 TOP 5 的物种包括变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteriota*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、拟杆菌门(*Bacteroidota*)和绿弯菌门(*Chloroflexi*), 属水平 TOP 5 的物种包括戴尔福特菌属(*Delftia*)、湖沉积杆菌属(*Limnobacter*)、伯克氏菌目未定属(*unclassified_o_Burkholderiales*)、盐生谷氨酸杆菌属(*Glutamicibacter*)和痤疮丙酸杆菌属(*Cutibacterium*)。

2.4.3 叶际细菌的 α 多样性分析

Sobs 指数是表示实际观测到的 OTU 数目; ACE 和 Chao1 指数是分别用不同方法对物种 OUTs 数量的估计; Shannon 和 Simpson 指数可反映物种的多样性, Shannon 值越大, 说明群落多样性越高, 群落越均匀, 而 Simpson 指数越大, 说明群落多样性越低, 具有优势群落; Coverage 指数表示测序对物种的覆盖度。由表 2

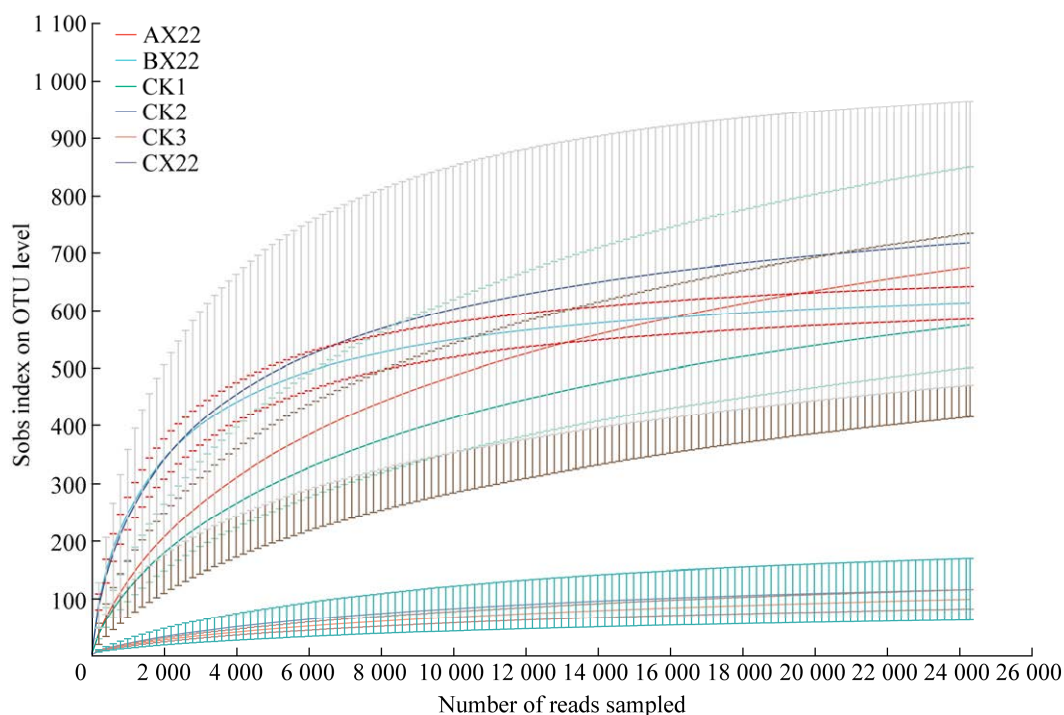


图 6 基于 Sobs 指数不同苦瓜样品的细菌稀释曲线

Figure 6 Rarefaction curves for different samples based on Sobs index.

表 2 叶际细菌群落多样性指数分析

Table 2 Diversity index of phyllosphere bacterial communities

样品 Sample	Sobs 指数 Sobs index	丰富度		多样性		覆盖率 Coverage rate (%)
		Community richness		Community diversity		
		ACE index	Chao1 index	Shannon index	Simpson index	
AX22	705.67aA	883.17aA	874.65aA	2.17bB	0.41bB	99.28cD
CK1	599.67aA	759.78aA	750.66aA	1.97bB	0.48bB	99.37cCD
BX22	620.67aA	642.00aA	653.88aA	4.62aA	0.06cC	99.82aAB
CK2	736.33aA	821.20aA	824.98aA	4.43aA	0.07cC	99.61bBC
CX22	123.67bB	156.51bB	147.99bB	0.56cC	0.79aA	99.87aA
CK3	108.67bB	144.21bB	136.34bB	0.47cC	0.83aA	99.8 7aA

可知, O+处理的苦瓜叶际细菌 Sobs 指数、ACE 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数在白粉病发生初期比 O-处理的高, 增幅分别为 17.68%、16.24%、16.52%和 10.15%; 在白粉病发生中期, Sobs 指数、ACE 指数和 Chao1 指数均下降, 且低于 O-, 分别降低了 15.71%、21.82%和 20.74%, 而 Shannon 指数则比 O-提高了 4.29%; 在白粉病发生后期, Sobs 指数、ACE 指数、Chao1 指数和 Shannon 指数继续下降, 但都比 O-高, 增幅分别为 13.80%、8.53%、8.54%和 19.15%。同时, O+的苦瓜叶际细菌 Simpson 指数在各个时期均略低于 O-。总体来看, 与 O-相比, 在苦瓜白粉病发生的不同阶段, O+的苦瓜叶际细菌的物种丰富度呈“升-降-升”的变化趋势, 物种多样性则始终上升, 差异未达显著水平。

2.4.4 基于门水平的叶际细菌群落结构分析

白粉病发生初期和中期, 变形菌门 (*Proteobacteria*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*) 均为 O+和 O-的优势菌门 (平均相对丰度 $\geq 1.0\%$), 它们的相对丰度在 2 个处理间的差异不显著; 2 个处理均检出拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*)、绿弯菌门 (*Chloroflexi*) 和脱硫菌门 (*Desulfobacterota*), 这些菌门的相对丰度在 2 个处理间的差异均不显著。白粉病发生后期, O+和 O-均只检出变形菌门 (*Proteobacteria*) 这 1 个优势菌门, 相对丰度分别为 98.70%和 99.01%,

差异不显著。由此来看, 在门分类水平上 O+和 O-在白粉病发生的各个阶段的主要细菌物种类别及其相对丰度无明显差异 (图 7)。

2.4.5 基于属水平的叶际细菌群落结构分析

发病初期, O+的苦瓜叶际细菌主要菌属 (平均相对丰度 $\geq 1.0\%$) 有戴尔福特菌属 (*Delftia*, 60.85%)、湖沉积杆菌属 (*Limnobacter*, 14.03%)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*, 2.60%), 独有属 72 个, 其中 TOP 3 的菌属为 *Candidatus Uzinura* (30.22%)、*Latescibacterota* (8.55%) 和铁氧化菌属 (*Sideroxydans*, 8.15%); O-的主要菌属有戴尔福特菌属 (*Delftia*, 67.24%)、湖沉积杆菌属 (*Limnobacter*, 8.61%)、类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*, 2.46%)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*, 1.30%), 独有属 31 个, 其中 TOP 3 的菌属为移杆菌属 (*Motilibacter*, 22.02%)、奈瑟氏球菌科未定属 (*Neisseriaceae*, 15.60%) 和氢化杆菌属 (*Hydrogenobacter*, 6.42%)。发病中期, O+的苦瓜叶际细菌主要菌属有 17 个, 独有属有 59 个, 其中 TOP 3 的菌属为糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*, 5.47%)、缺氧反硝化菌属 (*Natronincola*, 4.60%); O-的苦瓜叶际细菌主要菌属有 15 个, 独有属 79 个, 其中 TOP 3 的菌属为海洋芽孢杆菌属 (*Oceanobacillus*, 9.10%)、嗜热纤维梭菌属 (*Thermoclostridium*, 5.01%)。发病后期, O+的主要菌属为戴尔福特菌属 (*Delftia*,

88.22%), 独有属有 12 个, 其中 TOP 3 的菌属为泰泽雷拉菌属(*Tyzzarella*, 15.38%)、丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*, 11.54%)和真杆菌属(*Eubacterium_brachy_group*, 11.54%); O-的主要菌属也是戴尔

福特菌属(*Delftia*, 91.15%), 独有属有 2 个, 为硫假单胞菌属(*Thiopseudomonas*, 66.67%)和 *Candidatus Riegeria* (33.33%) (图 8、图 9)。表明在苦瓜白粉病发生的初期和中期, O+的物种组

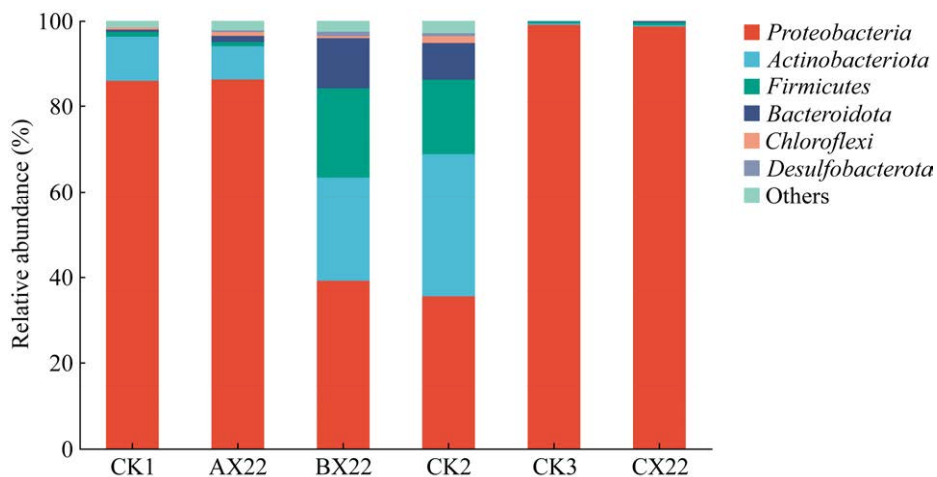


图 7 平均相对丰度至少在一个样品中 $\geq 1.0\%$ 的门水平细菌菌群结构

Figure 7 Bacterial community structure with an average relative abundance $\geq 1.0\%$ at least in one sample at phylum level.

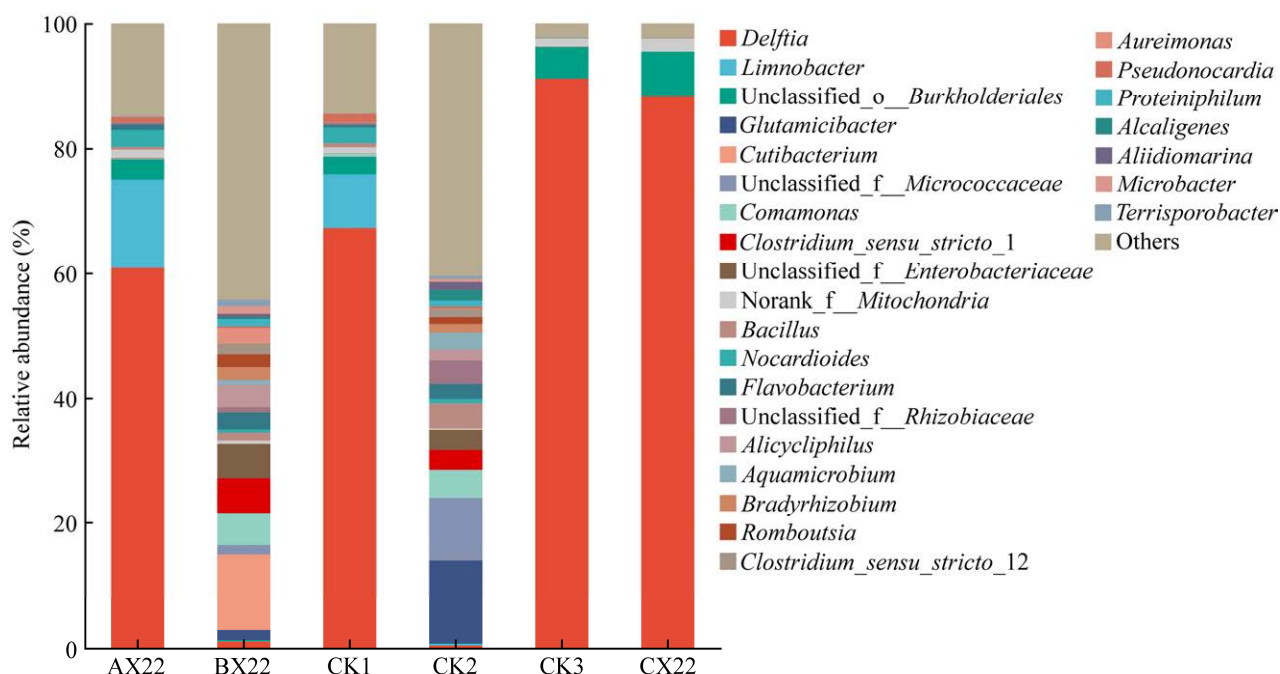


图 8 平均相对丰度至少在一个样品中 $\geq 1.0\%$ 的属水平细菌菌群结构

Figure 8 Bacterial community structure with an average relative abundance $\geq 1.0\%$ at least in one sample at genus level.

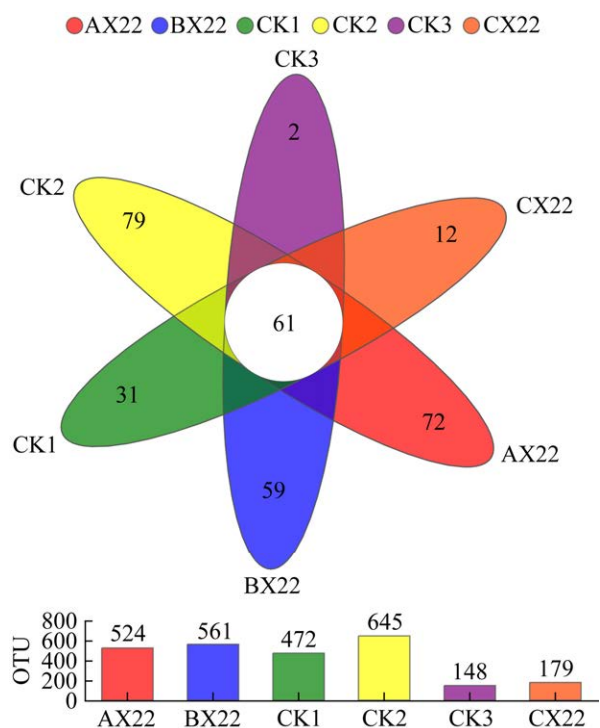


图9 基于属水平的 Venn 图

Figure 9 Venn diagram of bacteria communities at genus level in each sample.

成较 O-丰富,尤其是中期,主要细菌物种类别及相对丰度有较明显的差异,且 O+特异富集具固氮、抗菌功能微生物,而后期 2 个处理的物种组成都简单。

3 讨论与结论

关于 DSE 的研究历史已经有几十年,人们对其生防能力开展了广泛研究,防治对象以由镰刀菌(*Fusarium*)引起的枯萎病等土传性病害居多^[22-24],以气传、水传性叶部病害为防治对象的相关研究则甚少。Su 等开展了稻镰状瓶霉(*Harpophora oryzae*)对水稻稻瘟病和白叶枯病的生物防治研究^[8,25],发现稻镰状瓶霉在水稻根部定殖后能够诱导水稻产生系统抗病性,提高水稻叶片对稻瘟病菌侵染的抵御能力,降低水稻白叶枯病的危害,防治效果达 80.75%。苦瓜

白粉病也是一种叶部病害,本研究以该病为防治对象,测试 7 株 DSE 菌株的生防效果,结果显示供试菌株对苦瓜白粉病均有不同程度的防治作用,证实了 DSE 防治苦瓜白粉病的有效性。菌株 X22 是 Chen 等^[19]发现的一个新种,前期研究发现菌株 X22 及其多糖和寡聚糖提取物可提高香蕉对枯萎病的抗性并促进香蕉苗的生长^[26],在本研究中菌株 X22 在延迟、减轻白粉病的发生和危害方面表现俱佳,同时还对苦瓜种子萌发具有良好的促进作用,这对解决苦瓜因种皮厚而坚硬,透水透气性差而发芽迟缓、发芽率低、出苗不整齐的问题大有裨益。这说明菌株 X22 是一株相对较为广谱的防病促生潜力菌株,具有开发价值和应用前景。

薛子可等^[27]的研究发现,DSE 菌液浸泡玉米种子能够显著促进玉米苗生长并提高叶片叶绿素的含量,促生效果因菌液浓度、浸种时间不同而异,但前者与后二者不呈正相关。本研究测试的菌株 X22 菌悬液仅有一个浓度,分别浸种 1 h 和 3 h,二者的发芽率从统计学上差异不显著,但浸种 3 h 的发芽率还是较浸种 1 h 的高,说明在一定的时间范围内,菌株 X22 对苦瓜种子萌发的促进作用随着浸种时间的增加而增强,这与薛子可等的研究结果不甚相同。由于本研究所设菌液浓度、浸种时间的处理数有限,关于浸种时间和浓度对菌株 X22 防病促生效果的影响等情况尚不了解,还有待进一步探究。

叶际微生物指栖息在植物叶、茎、花、果等地上部分表面和内部的微生物群体^[28],叶际微生物区系失衡会导致病害发生^[29],保持其高水平丰度和多样性对减少病原菌侵染寄主植物具有重要作用。本研究中,菌株 X22 接种于苦瓜后对苦瓜叶际细菌群落的结构和组成产生了影响。 α 多样性分析发现,接种菌株 X22 处理在苦瓜白粉病发生的不同阶段其叶际细菌物

种多样性均高于对照；物种丰富度在中期和后期均持续下降，但降幅较对照的小，后期对照的丰富度指数更是呈断崖式下降。物种组成分析结果表明接种菌株 X22 和不接种对照 2 个处理在门分类水平上的优势菌门差异不显著，在属分类水平上的优势菌属及其相对丰度在白粉病发生初期和中期存在差异，而后期 2 个处理的优势菌属及其相对丰度则无差异；在白粉病发生初期和中期，接种菌株 X22 处理特异富集了 *Sideroxydans*、*Saccharomonospora*、*Natronincola*，其中 *Sideroxydans* 是内生固氮菌^[30]，与 *Natronincola* 都是参与氮循环的功能微生物^[31-32]，*Saccharomonospora* 则是具有抑菌活性的放线菌^[33]。因此，我们推测菌株 X22 的定殖一方面招募了一些有益菌属，给宿主提供有效氮源，促进生长，起到强身健体的作用，另一方面改善苦瓜叶际细菌区系及维持其稳定性来增强苦瓜对白粉病的抵御能力，但随着苦瓜植株的衰老和白粉病的加重，其对叶际细菌区系的调节作用大大减弱。

REFERENCES

- [1] 王齐旭. 广西苦瓜白粉病菌生理小种鉴定与抗白粉病 SNP 分子标记的开发[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2018.
WANG QX. Identification of physiological races of powdery mildew of bitter gourd in Guangxi and SNP molecular marker for powdery mildew resistance development[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2018 (in Chinese).
- [2] JUMPPONEN A. Dark septate endophytes-are they mycorrhizal?[J]. Mycorrhiza, 2001, 11(4): 207-211.
- [3] JUMPPONEN A, TRAPPE JM. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi[J]. The New Phytologist, 1998, 140(2): 295-310.
- [4] 覃丽萍, 苏琴, 张雯龙, 谢玲, 农倩, 张艳, 陈艳露. 甘蔗优良 DSE 促生菌株的筛选及田间接种效果[J]. 热带作物学报, 2015, 36(10): 1861-1865.
QIN LP, SU Q, ZHANG WL, XIE L, NONG Q, ZHANG Y, CHEN YL. Selection of excellent sugarcane growth-promoting DSE strains and their inoculation effects in fields[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(10): 1861-1865 (in Chinese).
- [5] 代梦雪, 张光群, 范旭杪, 李博, 湛方栋, 何永美. 胁迫生境深色有隔内生真菌生态分布与功能研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2020, 26(3): 722-729.
DAI MX, ZHANG GQ, FAN XM, LI B, ZHAN FD, HE YM. Research progress regarding the ecological distribution and function of dark septate endophytes in stressful environments[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2020, 26(3): 722-729 (in Chinese).
- [6] HE C, WANG WQ, HOU JL. Plant growth and soil microbial impacts of enhancing licorice with inoculating dark septate endophytes under drought stress[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 2277.
- [7] MARIAN M, TAKASHIMA Y, HARSONOWATI W, MUROTA H, NARISAWA K. Biocontrol of *Pythium* root rot on lisianthus using a new dark septate endophytic fungus *Hyaloscypha variabilis* J1PC1[J]. European Journal of Plant Pathology, 2022, 163(1): 97-112.
- [8] 苏珍珠, 冯晓晓, 汪彦欣, 刘小红, 章初龙, 林福呈. 稻镰状瓶霉对水稻白叶枯病的生物防治[J]. 菌物学报, 2019, 38(6): 802-810.
SU ZZ, FENG XX, WANG YX, LIU XH, ZHANG CL, LIN FC. Biocontrol effects of *Falciophora oryzae* resistant to rice bacterial blight[J]. Mycosystema, 2019, 38(6): 802-810 (in Chinese).
- [9] ZHANG Y, QIN BX, NARISAWA K, NONG Q, QIN LP, XIE L. The dark septate endophyte, *Phialocephala fortinii* J2PC4, mitigates southern rice black-streaked dwarf disease and impacts the mortality of white back planthopper[J]. Biological Control, 2022, 170: 104911.
- [10] MORITA S, AZUMA M, AOBA T, SATOU H, NARISAWA K, HASHIBA T. Induced systemic resistance of Chinese cabbage to bacterial leaf spot and *Alternaria* leaf spot by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*[J]. Journal of General Plant Pathology, 2003, 69(1): 71-75.
- [11] SANTOS M, CESANELLI I, DIÁNEZ F, SÁNCHEZ-MONTESINOS B, MORENO-GAVÍRA A. Advances in the role of dark septate endophytes in the plant resistance to abiotic and biotic stresses[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(11): 939.
- [12] NISSINEN R, HELANDER M, KUMAR M, SAIKKONEN K. Heritable *Epichloë* symbiosis shapes

- fungal but not bacterial communities of plant leaves[J]. Scientific Reports, 2019, 9: 5253.
- [13] 刘博文. 内生真菌对醉马草叶际微生物及叶片代谢物的影响[D]. 兰州: 兰州大学硕士学位论文, 2022.
LIU BW. The effect of *Epichloë* endophyte on phyllosphere microbes and leaf metabolites in *Achnatherum inebrians*[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Lanzhou University, 2022 (in Chinese).
- [14] ZHAO Y, JI XL, SHEN T, TANG WT, LI SS, ZHU ZQ, KUMAR J, LI HY. Fungal endophytic communities of two wild *Rosa* varieties and the role of an endophytic *Seimatosporium* sp. in enhancing host plant powdery mildew resistance[J]. Plant and Soil, 2020, 447(1): 553-564.
- [15] XIA C, ZHANG XX, CHRISTENSEN MJ, NAN ZB, LI CJ. *Epichloë* endophyte affects the ability of powdery mildew (*Blumeria graminis*) to colonise drunken horse grass (*Achnatherum inebrians*)[J]. Fungal Ecology, 2015, 16: 26-33.
- [16] KÖNIG J, GUERREIRO MA, PERŠOH D, BEGEROW D, KRAUSS J. Knowing your neighbourhood-the effects of *Epichloë* endophytes on foliar fungal assemblages in perennial ryegrass in dependence of season and land-use intensity[J]. PeerJ, 2018, 6: e4660.
- [17] 谢玲, 张雯龙, 覃丽萍, 蓝桃菊, 成泽才彦, 李松, 邓心, 廖仕同. 深色有隔内生真菌(DSE)对甘蔗苗生长影响初探[J]. 南方农业学报, 2013, 44(11): 1827-1830.
XIE L, ZHANG WL, QIN LP, LAN TJ, NARISAWA Kazuhiko, LI S, DENG X, LIAO ST. Effects of dark septate endophytes (DSE) on sugarcane seedling growth[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(11): 1827-1830 (in Chinese).
- [18] 谢玲. 广西两种生境深色有隔内生真菌多样性与生态功能研究[D]. 南宁: 广西大学博士学位论文, 2018.
XIE L. The species diversity and ecological function of dark septate endophytes in two ecosystems of Guangxi[D]. Nanning: Doctoral Dissertation of Guangxi University, 2018 (in Chinese).
- [19] CHEN YL, XIE L, LONG YY, ZHANG Y, QIN BX, LIAO ST, SU Q, LIU B. A new species and two new Chinese records of *Ochroconis* from sugarcane and banana rhizosphere in Guangxi, China[J]. Mycoscience, 2020, 61(6): 307-314.
- [20] 覃丽萍, 陈艳露, 谢玲, 张艳, 农倩, 龙艳艳, 曾凤花. 枝孢瓶霉菌株 MS2 及其应用: ZL202011239027.8[P]. 2023-03-14.
QIN LP, CHEN YL, XIE L, ZHANG Y, NONG Q, LONG YY. *Cladosporium* sp. MS2 and its application: ZL202011239027.8[P]. 2023-03-14 (in Chinese).
- [21] 秦健, 黄如葵, 梁家作, 刘杏连, 黄玉辉, 陈小凤, 黄熊娟, 冯诚诚, 琚茜茜. 枯草芽孢杆菌对苦瓜生长、产量和矿质元素吸收的影响[J]. 中国瓜菜, 2019, 32(2): 36-39.
QIN J, HUANG RK, LIANG JZ, LIU XL, HUANG YH, CHEN XF, HUANG XJ, FENG CC, JU QQ. Effects of *Bacillus subtilis* on growth, yield and mineral element absorption of bitter melon[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2019, 32(2): 36-39 (in Chinese).
- [22] 苏琴, 谢玲, 陈艳露, 廖仕同, 张艳, 农倩. 香蕉枯萎病生防菌绿头枝孢菌 LS1 的筛选鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(12): 3248-3256.
SU Q, XIE L, CHEN YL, LIAO ST, ZHANG Y, NONG Q. Screen and identification of biocontrol strain *Cladosporium chlorocephalum* LS1 against banana *Fusarium* wilt[J]. Microbiology China, 2019, 46(12): 3248-3256 (in Chinese).
- [23] 陈思杰, 张涛, 贾宝森, 杜娟, 闫思远, 顾沛雯. 深色有隔内生真菌对枸杞根腐病菌抑菌活性[J]. 园艺学报, 2022, 49(7): 1519-1531.
CHEN SJ, ZHANG T, JIA BS, DU J, YAN SY, GU PW. Study on antibacterial activity of dark septate endophytes against *Fusarium oxysporum* in Chinese wolfberry[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(7): 1519-1531 (in Chinese).
- [24] HARSONOWATI W, MARIAN M, Surono, NARISAWA K. The effectiveness of a dark septate endophytic fungus, *Cladophialophora chaetospora* SK51, to mitigate strawberry *Fusarium* wilt disease and with growth promotion activities[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 585.
- [25] SU ZZ, MAO LJ, LI N, FENG XX, YUAN ZL, WANG LW, LIN FC, ZHANG CL. Evidence for biotrophic lifestyle and biocontrol potential of dark septate endophyte *Harpophora oryzae* to rice blast disease[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e61332.
- [26] 邱美莎, 张艳, 曾凤花, 林珊宇, 龙艳艳, 孙正祥, 谢玲. 深色有隔内生真菌 *Ochroconis guangxiensis* X22 诱导子对香蕉的促生和抗枯萎病效果[J]. 南方农业学报, 2022, 53(10): 2928-2936.
QIU MS, ZHANG Y, ZENG FH, LIN SY, LONG YY, SUN ZX, XIE L. Effects of dark septate endophyte *Ochroconis guangxiensis* X22 elicitor on banana growth promotion and *Fusarium* wilt resistance[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(10): 2928-2936 (in Chinese).

- [27] 薛子可, 毕银丽, 王义. 不同浓度深色有隔内生真菌浸种对玉米幼苗生长的影响[J]. 种子, 2022, 41(6): 23-26.
XUE ZK, BI YL, WANG Y. Effects of seed soaking with different concentrations of dark septate endophytic fungi on seedling growth and development of plant[J]. Seed, 2022, 41(6): 23-26 (in Chinese).
- [28] 刘宇星, 董醇波, 邵秋雨, 张芝元, 韩燕峰, 梁宗琦. 叶际微生物与植物健康研究进展[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(2): 88-98.
LIU YX, DONG CB, SHAO QY, ZHANG ZY, HAN YF, LIANG ZQ. Advances on phyllosphere microorganisms and their association with plant health[J]. Journal of Microbiology, 2022, 42(2): 88-98 (in Chinese).
- [29] CHEN T, NOMURA K, WANG XL, SOHRABI R, XU J, YAO LY, PAASCH BC, MA L, KREMER J, CHENG YT, ZHANG L, WANG N, WANG ET, XIN XF, HE SY. A plant genetic network for preventing dysbiosis in the phyllosphere[J]. Nature, 2020, 580: 653-657.
- [30] 童帅. 水稻、小麦内生固氮菌固氮酶 *nifH* 基因多样性及其活性研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2020.
TONG S. Diversity and activity of nitrogenase *nifH* gene from endophytic diazotrophs in rice and wheat[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 (in Chinese).
- [31] 陈小锋, 王润竹, 朱诗雅, 陈静. 太湖沉积物硝酸盐依赖亚铁氧化性能研究[J]. 中国环境科学, 2023, 43(9): 4868-4875.
CHEN XF, WANG RZ, ZHU SY, CHEN J. Nitrate dependent ferrous oxidation in the sediments of Lake Taihu[J]. China Environmental Science, 2023, 43(9): 4868-4875 (in Chinese).
- [32] 潘章磊. 基于异养硝化—好氧反硝化的餐厨垃圾发酵废水脱氮技术研究[D]. 重庆: 重庆大学硕士学位论文, 2020.
PAN ZL. Study on kitchen waste fermentation wastewater nitrogen removal treatment based on heterotrophic nitrification-aerobic denitrification[D]. Chongqing: Master's Thesis of Chongqing University, 2020 (in Chinese).
- [33] 梁光杰, 车程川, 曹利, 巩志金, 刘金锋, 姜曰水, 孙萍, 刘宝晴, 杨革. 日照海岸线可培养放线菌的抑菌活性及其多样性研究[J]. 中国酿造, 2019, 38(1): 118-124.
LIANG GJ, CHE CC, CAO L, GONG ZJ, LIU JF, JIANG YS, SUN P, LIU BQ, YANG G. Antibacterial activity and diversity of culturable Actinobacteria in the Rizhao coastline[J]. China Brewing, 2019, 38(1): 118-124 (in Chinese).