

## 豇豆枯萎病生防细菌的筛选鉴定及抗病机理初探

谢海鹏<sup>1,2</sup>, 林樱桃<sup>2</sup>, 吴小燕<sup>2</sup>, 林俊旭<sup>2</sup>, 林明智<sup>2</sup>, 麦贤俊<sup>2</sup>, 陈子跃<sup>2</sup>, 谢文<sup>3</sup>, 孔祥义<sup>2\*</sup>

1. 海南大学植物保护学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南海口 570228; 2. 三亚市热带农业科学研究院热带生物技术研究室, 海南三亚 572022; 3. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

**摘要:** 豇豆枯萎病是由尖孢镰刀菌引起的土传真菌病害, 是豇豆最主要的病害之一。利用微生物防治是防控枯萎病的重要手段之一。本研究通过对豇豆-水稻轮作土壤中生防菌的分离、筛选和鉴定, 研究其拮抗机制与促生功能, 并评估其防治和促生效果, 为豇豆枯萎病优良生防菌剂的研制和开发奠定基础。采用平板稀释法分离得到 93 株细菌, 再通过平板对峙法筛选出 11 株对豇豆枯萎病病原菌具有抑制作用的拮抗菌株, 其中拮抗菌株 SD13 抑制率最好 (抑制率达到 82.0%); 结合形态学与 16S rDNA 序列将该菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*); 通过液体共培养方法发现生防菌 SD13 对豇豆枯萎病病原菌的菌丝、孢子均有很强的溶菌作用; 采用检测性培养基检测拮抗菌株 SD13 抑菌胞外酶 (纤维素酶、蛋白酶、几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶) 和促生能力相关功能 (产嗜铁素、固氮、解无机磷、解有机磷、解钾、产 IAA), 明确生防菌 SD13 可以分泌纤维素酶、蛋白酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶 3 种抑菌胞外酶, 且具有产嗜铁素、固氮、解无机磷 3 种与促生能力相关的功能; 采用平板对峙法测定生防菌 SD13 对青瓜枯萎病、辣椒枯萎病等 6 种病原菌的抑制率, 结果表明, 生防菌 SD13 具有广谱抑菌活性, 且抑制率达 66.7%~82.3%; 盆栽实验结果表明, 在生防菌 SD13 的 4 个不同浓度 ( $10^4$ 、 $10^6$ 、 $10^8$ 、 $10^9$  CFU/mL) 处理中,  $10^6$  CFU/mL 的防治效果最好达 62.0%, 而促生效果仅次于  $10^8$  CFU/mL。研究结果表明, 生防菌 SD13 具有较强的生防与促生效果, 并初步明确了其拮抗机制以及与促生能力相关的功能, 在防控枯萎病上具有潜在的应用价值。

**关键词:** 尖孢镰刀菌嗜导管专化型; 贝莱斯芽孢杆菌; 拮抗机制; 促生能力

中图分类号: S436.43 文献标识码: A

## Screening and Identification of Biocontrol Bacteria of Cowpea *Fusarium* Wilt and Preliminary Exploration of Disease Resistance Mechanism

XIE Haipeng<sup>1,2</sup>, LIN Yingtao<sup>2</sup>, WU Xiaoyan<sup>2</sup>, LIN Junxu<sup>2</sup>, LIN Mingzhi<sup>2</sup>, MAI Xianjun<sup>2</sup>, CHEN Ziyue<sup>2</sup>, XIE Wen<sup>3</sup>, KONG Xiangyi<sup>2\*</sup>

1. College of Plant Protection, Hainan University / Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Laboratory of Tropical Bioscience and Biotechnology, Sanya Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572022, China; 3. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

**Abstract:** Cowpea wilt is a soil-borne fungal disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* (FOT), and is one of the most important diseases of cowpea. In our study, several biocontrol bacteria were isolated and evaluated. One of the bacteria which were found the best antagonistic effect to FOT was identified and studied on its antagonistic

收稿日期 2022-08-03; 修回日期 2022-10-29

基金项目 海南省科技计划三亚崖州湾科技城联合项目 (No. 2021JJLH0086); 海南省自然科学基金项目 (No. 321QN377); 海南省重大科技计划项目 (No. ZDKJ2021007)。

作者简介 谢海鹏 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 豇豆枯萎病。\*通信作者 (Corresponding author): 孔祥义 (KONG Xiangyi), E-mail: kongxiangyi20@163.com。

mechanism and growth promoting function, while it was evaluated by the control and growth-promoting effects. This study established the foundation for the research and development of excellent biocontrol agents for cowpea *Fusarium* wilt. 93 strains of bacteria were isolated by plate dilution method, and 11 biocontrol strains, which exhibited good inhibitory effect on the pathogenic bacteria of cowpea wilt, were screened by plate confrontation method, and the antagonistic strain SD13 had the best inhibition rate (the inhibition rate reached 82.0%). SD13 was identified as *Bacillus velezensis* based on Morphology and 16S rDNA sequence. Liquid medium co-culture method showed that SD13 could break down the cell wall of the hyphae, spores, and germinated spores of the FOT. Assay medium test results indicated that SD13 could secrete cellulase, protease and  $\beta$ -1,3-glucanase, and had the function related to the production of siderophore, nitrogen fixation and solubilise inorganic phosphorus. Plate confrontation method showed that SD13 had antagonistic activity against a wide spectrum of pathogenic fungi, with inhibition rate ranging from 66.7% to 82.3%. Pot experiments indicated that in four treatments in concentration of  $10^4$ ,  $10^6$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  CFU/mL, there were the best control effect of SD13 in concentration of  $10^6$  CFU/mL, reaching 62.0%, and the growth promotion effect was the second, lower than that of the concentration of  $10^8$  CFU/mL. This study shows that SD13 has good biocontrol and growth-promoting effects, and is preliminarily clarified the antagonistic mechanism and functions related to growth-promoting ability, which has potential application value for the prevention and control of *Fusarium* wilt.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*; *Bacillus velezensis*; antagonistic mechanism; growth-promoting ability

**DOI:** 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.06.016

豇豆 [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] 是一年生豆科作物, 主要分布在世界干旱、半干旱的热带地区。豇豆起源和驯化于非洲, 现已在全世界 100 多个国家种植<sup>[1]</sup>。世界上主要的豇豆生产区是撒哈拉以南的非洲, 其中, 非洲的尼日利亚、尼日尔和布基纳法索的豇豆产量排名世界前三, 中国豇豆产量位列世界第 16 位<sup>[2]</sup>。在我国, 除高寒地区外各地均有栽培<sup>[3]</sup>。尤其在海南三亚地区, 豇豆种植面积已达 5340 hm<sup>2</sup>, 出岛产量达 15 万 t, 已经成为海南冬季瓜菜南种北运的主要蔬菜之一<sup>[4]</sup>。

豇豆枯萎病是由尖孢镰刀菌嗜导管专化型 (*Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum*) 引起的维管束病害, 它通过伤口或直接穿透根部, 然后在木质部定植。被侵染的豇豆植株表现为基部茎肿胀、叶片褪绿、变黄、落叶、枯萎、维管变色和死亡。几乎在所有豇豆种植区均有豇豆枯萎病的发生。在澳大利亚西北部、巴西东北部、非洲的尼日利亚、美国东南部和加利福尼亚州的中央谷地均报道过豇豆枯萎病的发生<sup>[5]</sup>。我国主要在广东、福建、广西、海南、江西等地为害较多, 目前已遍布所有豇豆产区, 产量损失可高达 70%<sup>[6]</sup>。近年来, 由于海南三亚市豇豆多年连作, 土壤条件恶化, 三亚市豇豆枯萎病大面积流行, 发生严重地块可减产 70%~80%, 严重影响豇豆生产<sup>[7]</sup>。

目前豇豆枯萎病的防治手段有选育抗病品种、轮作、土壤消毒、控制线虫、化学防治和生

物防治等<sup>[8]</sup>。国内使用最多的防治手段是化学防治, 但是由于豇豆长期使用化学农药, 近年来国内豇豆农药残留超标等问题频繁发生<sup>[9-10]</sup>。利用微生物防治土传病害是近年来的热点。微生物不仅可以生活在土壤中与病原菌形成长期对抗, 降低病害发生, 而且能减少农药的使用量, 预防农药残留的风险发生<sup>[11]</sup>。目前, 用于防治植物病害的微生物主要有真菌、细菌和病毒等, 而细菌因其数量和种类众多, 广泛分布于植物根际和地面上部, 具有对植物生长环境适应性强、繁殖速度快和易培养等特点成为最主要的生防资源之一<sup>[12]</sup>。现已成功应用于植物病害防治的生防细菌主要有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、巴氏杆菌属 (*Pasteuria*) 以及肠杆菌属 (*Enterobacteri*) 等<sup>[13]</sup>。

近年来, 越来越多的学者开展了筛选拮抗细菌防治植物枯萎病的研究并取得成果。李娜等<sup>[14]</sup>从黄瓜枯萎病根际土筛选生防细菌, 获得 1 株对黄瓜枯萎病菌有较强抑制作用的假单胞菌菌株 33-1。周东兴等<sup>[15]</sup>利用梯度稀释涂板法和平板对峙生长法从蚯蚓粪中筛选到 1 株对番茄枯萎病有良好生防作用的细菌, 并通过盆栽试验测定该菌株对番茄枯萎病的防治效果达 59.25%。此外, 郑丽等<sup>[16]</sup>从 8 个不同生境木薯中分离到 298 株细菌, 通过测定其产酶、次生代谢物和拮抗活性优选 11 个菌株进行日光温室大棚盆栽防效测定, 其

中, HWY-3-1 对木薯枯萎病防效为 100%, 其余 10 株防效均在 60% 以上。而国内外有关豇豆枯萎病生防资源的报道较少, 从豇豆-水稻轮作土壤中筛选生防细菌是挖掘豇豆枯萎病生防资源的主要途径之一。

本研究通过分离纯化豇豆-水稻轮作土壤细菌, 采用对峙法评价其生防潜力, 对其中拮抗效果最好的菌株 SD13 通过形态学及分子手段进行鉴定, 初步探究该生防菌的抑菌以及促生机制, 最后通过盆栽实验评估不同浓度的生防菌 SD13 对豇豆枯萎病的防治效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 供试材料 供试豇豆枯萎病病原菌由海南省三亚市热带农业科学研究院提供。供试豇豆种子南豇 1 号。土壤样品采自海南省三亚市崖州区的热水宫路常年发病地块, 采集豇豆-水稻轮作土壤 15 份。盆栽自然土采自海南省三亚市热带农业科学研究院崖州基地种子资源圃。

1.1.2 供试培养基 蛋白质检测培养基<sup>[17]</sup>: 脱脂奶粉 3.0 g、琼脂 4 g、去离子水 200 mL、pH 为 7.0~7.2, 108 °C 高压蒸气灭菌 15 min。

几丁质酶检测培养基<sup>[18]</sup>: 胶体状几丁质 1% (w/V)、磷酸二氢铵 1 g、氯化钾 0.2 g、硫酸镁 0.2 g、琼脂 20 g, 无菌水定容至 1000 mL, pH 为 7。制备胶状几丁质: 20 g 甲壳素溶于 350 mL 浓盐酸, 4 °C 放置 24 h, 玻璃棉过滤, 滤液加入 2 L 冰无水乙醇-20 °C 过夜后, 10 000 r/min 离心 20 min, 沉淀用流动自来水不断冲洗, 直至 pH 呈中性, -20 °C 密封保存。

$\beta$ -1,3-葡聚糖酶检测培养基<sup>[19]</sup>:  $\beta$ -1,3-葡聚糖 2 g、硝酸钠 2 g、磷酸氢二钾 1 g、氯化钾 0.5 g、硫酸镁 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、刚果红 0.05 g、琼脂 20 g, 无菌水定容至 1000 mL, pH 为 7.2。

纤维素酶检测培养基<sup>[18]</sup>: 羧甲基纤维素钠 10 g、蛋白胨 10 g、酵母粉 10 g、氯化钠 5 g、磷酸二氢钾 1 g、琼脂 20 g, 无菌水定容至 1000 mL, pH 为 7.0。

无氮培养基<sup>[20]</sup>: 蔗糖 10 g、氯化钠 0.12 g、硫酸氢二钾 0.5 g、碳酸钙 1 g、硫酸镁 0.2 g、琼脂 20 g, 无菌水定容至 1000 mL, pH 为 7.2。

钾长石培养基<sup>[21]</sup>: 硫酸铵 1.0 g、七水硫酸镁 0.5 g、氯化钠 0.1 g, 硫酸氢二钠 2.0 g, 蔗糖 10 g,

酵母粉 0.5 g, 钾长石粉 10.0 g, 无菌水定容至 1000 mL, pH 为 7.2。

无机磷培养基<sup>[21]</sup>: 硫酸铵 0.5 g、七水硫酸镁 0.5 g、氯化钠 0.2 g、磷酸钙 10.0 g、碳酸钙 0.5 g、葡萄糖 2.0 g、硫酸锰 0.02 g、硫酸亚铁 0.02 g、琼脂 20 g, 无菌水定容至 1000 mL, pH 为 7.2。

有机磷培养基<sup>[21]</sup>: 硫酸铵 0.5 g、碳酸钙 0.5 g、七水硫酸镁 0.5 g、氯化钠 0.2 g、卵磷脂 0.2 g、葡萄糖 2.0 g、硫酸锰 0.02 g、硫酸亚铁 0.02 g、琼脂 20 g, 无菌水定容至 1000 mL, pH 为 7.2。

嗜铁素检测培养基: 北京酷来博科技有限公司改良的 CAS 琼脂检测培养基。

### 1.2 方 法

1.2.1 土壤细菌分离 采集未患枯萎病的豇豆-水稻轮作土壤, 采用稀释涂板法<sup>[22]</sup>分离土壤细菌。从 15 份土壤中各称取 10 g 土壤样品, 10 g 土壤样品与 90 mL 无菌水混合, 振荡 30 min, 静置 15 min, 将上清液依次稀释为  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$ , 然后各取 100  $\mu$ L 上清液涂布于 LB 培养基平板上, 于 28 °C 恒温培养 1~2 d, 挑取不同形态的细菌菌落划线纯化, 于 -20 °C 冰箱保存。

1.2.2 拮抗菌的初筛与复筛 以豇豆枯萎病病原菌作为对照菌株, 采用平板对峙法<sup>[23]</sup>对 1.2.1 中保存的菌株进行初筛, 在 PDA 固体培养基平板中央接种 0.5 cm 豇豆枯萎病菌菌饼, 每个培养基平板用十字对称选取 4 个距离中央 2.5 cm 的点, 在 4 个点用牙签点接分离纯化保存的同一菌株, 对具有拮抗效果的菌株用同样的方法进行复筛并保存。采用十字交叉法测量菌落直径。抑制率=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径 $\times$ 100%。

1.2.3 生防菌 SD13 的鉴定 (1) 菌体形态观察。将拮抗菌株 SD13 在 LB 培养基上划线培养, 于 30 °C 恒温培养 24 h 后观察菌落形态, 革兰染色后显微镜观察菌体形态特征。

(2) 分子鉴定。通过北京诺博莱德科技有限公司细菌 DNA 提取试剂盒提取拮抗菌株 SD13 的 DNA, 采用 16S rDNA 细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 对拮抗菌株 SD13 进行 PCR 扩增。50  $\mu$ L 反应体系: DNA 模板 1  $\mu$ L、引物 1492R 和 27F 各 1  $\mu$ L、*Taq* 酶 25  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ L。反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 min, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min,

35 个循环, 最后 72 °C 总延伸 10 min。PCR 扩增产物采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将测序结果通过 Ezbicloud 数据库进行同源序列比对分析, 选取同源性较高的菌株通过 MEGA 6.06 软件使用邻接法构建系统发育树。

**1.2.4 制备  $10^9$  CFU/mL SD13 菌悬液** 将 LB 平板中的 SD13 单菌落接种至 LB 液体培养基中, 29 °C、180 r/min 条件下培养 24 h 得到菌悬液, 以 1% 接种量接种至 LB 培养基中, 于 29 °C、180 r/min 条件下发酵 24 h 后, 将菌悬液稀释成  $OD_{600}=2.3$ , 得到  $10^9$  CFU/mL SD13 菌悬液(菌悬液的  $OD_{600}$  为 2.3 稀释涂板法后, 计算其菌落个数为  $1 \times 10^9 \sim 2.5 \times 10^9$  CFU/mL, 3 次重复)。本研究中制备  $10^9$  CFU/mL SD13 菌悬液均用此方法。

**1.2.5 拮抗菌株 SD13 对豇豆枯萎病原菌菌丝与孢子的抑制效果** 参考林福呈等<sup>[24]</sup>的液体共培养测定方法, 稍加改进, 将病原菌接种于 PDA 液体培养基中, 于 28 °C、200 r/min 条件下培养 7 d, 再用无菌水稀释培养物, 使培养物的孢子数量为  $10^8$  CFU/mL, 培养物中的菌丝无需过滤。然后取 10 mL 培养物接种到 100 mL PDA 液体培养基中, 使孢子总数为  $10^9$  CFU/mL, 再接 1 mL  $10^9$  CFU/mL SD13 菌悬液, 使 SD13 菌量与病原菌孢子数量一致, 置于 28 °C 恒温箱培养, 3 次重复。以 10 mL 病原菌培养物+1 mL LB 作为对照。间隔 12 h 观察一次拮抗菌对孢子和菌丝抑制作用, 并拍照记录。

**1.2.6 生防菌 SD13 菌体和发酵滤液对豇豆枯萎病原菌孢子的抑制能力** 制备病原菌孢子悬浮液: 将病原菌接种于 PDA 液体培养基中, 在 28 °C、200 r/min 条件下培养 7 d, 并用 8 层无菌纱布过滤菌丝。用血球计数板计算孢子数量, 并将孢子数量用无菌水稀释至  $5 \times 10^7$  CFU/mL。

**制备 SD13 菌体悬浮液:** 将制备的  $10^9$  CFU/mL SD13 菌悬液(含发酵液)以 10 000 r/min 离心 15 min, 将菌体与发酵液分开, 再用等体积的无菌水重悬浮菌体, 获得浓度为  $10^9$  CFU/mL 的菌体悬浮液, 备用。

**制备发酵滤液:** 将离心得到的发酵液通过 0.22  $\mu$ m 无菌微孔滤膜过滤 2 次, 备用。

摇匀菌体悬浮液与病原菌孢子悬浮液, 使菌体与孢子在液体中分布均匀, 取 1 mL  $10^9$  CFU/mL 菌体悬浮液和 1 mL  $5 \times 10^7$  CFU/mL 病原菌孢子悬

浮液于 5 mL 无菌试管中, 以 1 mL 无菌水加等量的病原菌孢子悬浮液作为对照。再取 1 mL 无菌发酵液和 1 mL  $5 \times 10^7$  CFU/mL 病原菌孢子悬浮液于另一个 5 mL 无菌离心管中, 以 1 mL LB 液体培养基加等量病原菌孢子悬浮液作为对照。重复 3 次, 28 °C 恒温箱培养。分别于 0、12、24、48 h 用血球计数板观察处理组与对照组的完整孢子数量。

**1.2.7 生防菌 SD13 抑菌胞外酶活性测定** 蛋白酶、几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性测定<sup>[17-19]</sup>: 菌株在 LB 固体培养基划线培养 24 h, 再用灭菌接种针挑取单菌落分别点接于蛋白酶、几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶检测培养基平板上, 28 °C 恒温培养 3~7 d, 观察周围有无透明圈产生并测量菌落直径( $d$ )和透明圈直径( $D$ )。根据培养基上是否产生透明圈判断有无酶活性, 酶活性大小与 HC 值( $D/d$ )呈正相关。

**纤维素酶活性测定<sup>[18]</sup>:** 菌株在 LB 固体培养基划线培养 24 h, 再用灭菌接种针挑取菌落点接于纤维素酶活性检测培养基平板上, 28 °C 恒温培养 3 d, 用 1 mg/mL 刚果红溶液将整个培养皿完全浸没染色, 染液停留 30 min, 倒掉染液, 用 1 mol/L NaCl 溶液洗涤。观察测量方法同上。

**1.2.8 生防菌 SD13 的促生能力相关功能检测** 固氮能力测定: 参考王明欢等<sup>[20]</sup>的方法, 根据菌株是否能在无氮培养基上生长判断有无固氮能力。

**溶磷、解钾能力的测定<sup>[21]</sup>:** 菌株在 LB 平板培养基上活化 24 h, 再用灭菌接种针挑取菌落分别点接于有机磷培养基、无机磷培养基和钾长石培养基上, 28 °C 恒温培养 3~7 d, 观察测量方法同 1.2.7。

**产嗜铁体能力测定:** 菌株在 LB 固体培养基划线培养 24 h, 再用灭菌接种针将单菌落点接于嗜铁素检测培养基平板上, 观察 7~14 d。铬天青(CAS)和溴化十六烷基三甲铵(HDTMA)与铁离子混合后可以形成一种复合物, 呈亮蓝色。当铁离子被试验菌株分泌嗜铁素夺走时, 菌株周围形成橘黄色的透明圈。因此, 可根据平板上菌落周围是否形成橘黄色的透明圈和根据透明圈大小判断产嗜铁素的强弱。

**IAA 定性测定:** 参考万兵兵等<sup>[25]</sup>的方法, 产 IAA 能力可根据白瓷板上溶液颜色是否变红, 如果颜色变色就表示菌株能够产生 IAA。

**1.2.9 生防菌 SD13 广谱抑菌能力测定** 测定拮

抗菌株 SD13 对 6 种生产上重要病害病原菌[青瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、辣椒枯萎病菌 (*F. oxysporum*)、甜瓜枯萎病菌 (*F. oxysporum*)、苦瓜枯萎病菌 (*F. solani*)、豇豆叶斑病菌 (*Alternaria alternata*)、烟草疫霉病菌 (*Phytophthora nicotianae*)]的抑制率。

拮抗菌株 SD13 的菌饼制备: 在 LB 固体培养基平板中加入 200  $\mu$ L  $10^9$  CFU/mL SD13 菌悬液, 均匀涂布, 于 30  $^{\circ}$ C 恒温培养 24 h, 制成菌株平板, 用打孔器取 0.5 cm 的拮抗菌株菌饼, 备用。

采用平板对峙法在 PDA 固体培养基平板中央接种 0.5 cm 病原菌菌饼, 用十字对称选取 4 个距离中央 2.5 cm 的点, 放置 0.5 cm 的 SD13 菌饼, 以只接病原菌菌饼作为对照, 于 28  $^{\circ}$ C 恒温培养 7 d 后采用十字交叉法测量菌落直径, 计算抑制率, 公式同 1.2.2。

1.2.10 SD13 盆栽防效及促生实验 豇豆种子处理: 将豇豆种子用 3%次氯酸钠消毒 10 min, 然后用蒸馏水反复清洗 3~5 遍, 晾干后置于含有椰糠育苗盘中, 在温室大棚培育 2 周后, 原叶完全展开, 取长势优良且一致的幼苗用于实验。土壤处理: 自然土经晒干, 过筛与营养土 2:1 质量比混合, 备用。

生防菌 SD13 无发酵液菌体悬浮液制备: 将制备的  $10^9$  CFU/mL SD13 菌悬液 8000 r/min 离心, 收集菌体, 再用 200 mL 无菌水重悬菌体, 获得浓度为  $10^9$  CFU/mL 的无发酵液菌体悬浮液, 用无菌水配置浓度为  $10^8$ 、 $10^6$ 、 $10^4$  CFU/mL 无发酵液菌体悬浮液, 备用。

豇豆枯萎病病原菌孢子悬浮液制备: 将在 PDA 平板上生长 3 d 的菌落接种至 200 mL 的 PDA 液体培养基中, 在 28  $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养 5 d 后用无菌 8 层纱布过滤, 获得孢子悬浮液, 再用无菌水稀释至  $10^6$  CFU/mL, 备用。

盆栽防效实验中生防菌共设置 4 个浓度:  $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^6$ 、 $10^4$  CFU/mL。取 1 kg 土装至盆钵中, 10 个处理: (1) 病原菌处理+生防菌  $10^4$  CFU/mL (F+ $10^4$ S)、(2) 病原菌处理+生防菌  $10^6$  CFU/mL (F+ $10^6$ S)、(3) 病原菌处理+生防菌  $10^8$  CFU/mL (F+ $10^8$ S)、(4) 病原菌处理+生防菌  $10^9$  CFU/mL (F+ $10^9$ S)、(5) 病原菌对照 (F)、(6) 生防菌  $10^4$  CFU/mL ( $10^4$ S)、(7) 生防菌  $10^6$  CFU/mL ( $10^6$ S)、(8) 生防菌  $10^8$  CFU/mL ( $10^8$ S)、(9) 生防菌  $10^9$  CFU/mL ( $10^9$ S)、(10) 清水对照 (CK)。

其中, 病原菌处理: 取 100 mL 豇豆枯萎病病原菌孢子悬浮液与 200 mL 无菌水混合后拌土, 充分搅拌均匀, 土壤含菌量为  $10^5$  CFU/g。其他处理则用等体积的清水混拌。将豇豆植株的根尖处切除 0.3 cm 进行伤根移植。移植后, 每周对 F 和 CK 处理用 55 mL 清水处理, 其他处理取 5 mL 生防菌与 50 mL 清水混合灌根。每个处理 3 个重复, 每个重复 2 株苗, 3 个平行实验, 观察并记录发病情况, 计算发病率、病情指数、防治效果。豇豆苗期的病情分级标准参照文献[1], 豇豆苗后期到抽蔓期的病情分级标准参照文献[5]。测量其株高、根长、地上鲜重、地下鲜重、地上干重、地下鲜重, 评价其促生作用。发病率=发病株数/总株数 $\times$ 100%; 病情指数= $\Sigma$ (各级病株数 $\times$ 该病级值)/(总株数 $\times$ 最高级值) $\times$ 100; 防治效果=(CK 病情指数-处理病情指数)/CK 病情指数 $\times$ 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤细菌的分离纯化

从海南省三亚市崖州区常年发病严重的 5 块地块采集土壤样本 15 份, 从中分离到 93 株菌, 其中 63 株细菌, 30 株放线菌。

### 2.2 拮抗菌的初筛与复筛

用平板对峙法对分离纯化的菌株进行初筛和复筛, 筛选得到 11 株对豇豆枯萎病有较好抑制作用的菌株(表 1), 其中菌株 SD13 抑制率为 82.0%, 抑制效果最好(图 1A)。

表 1 豇豆枯萎病拮抗菌株筛选

Tab. 1 Screening of cowpea *Fusarium* wilt antagonistic strains

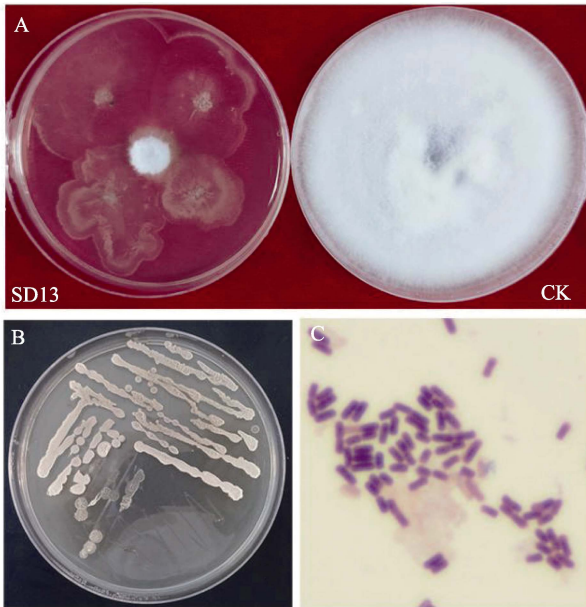
菌株 Strain	菌落直径 Colony diameter/cm	抑制率 Inhibition rate/%
SD19	4.60 $\pm$ 1.61 <sup>cef</sup>	49.0 $\pm$ 18.0 <sup>bce</sup>
SD13	1.60 $\pm$ 0.12 <sup>g</sup>	82.0 $\pm$ 1.0 <sup>a</sup>
SD05	3.93 $\pm$ 0.66 <sup>deg</sup>	56.0 $\pm$ 7.0 <sup>acd</sup>
SD08	3.15 $\pm$ 0.32 <sup>eg</sup>	65.0 $\pm$ 4.0 <sup>ac</sup>
SD20	3.32 $\pm$ 0.16 <sup>eg</sup>	63.0 $\pm$ 2.0 <sup>ac</sup>
SD22	7.22 $\pm$ 2.20 <sup>abc</sup>	20.0 $\pm$ 28.0 <sup>efg</sup>
SD26	2.82 $\pm$ 0.33 <sup>fg</sup>	69.0 $\pm$ 4.0 <sup>ab</sup>
HH06	6.72 $\pm$ 0.55 <sup>abcd</sup>	25.0 $\pm$ 6.0 <sup>defg</sup>
HH06-2	7.72 $\pm$ 1.81 <sup>ab</sup>	14.0 $\pm$ 0.2 <sup>fg</sup>
HH07	5.67 $\pm$ 2.39 <sup>bc</sup>	37.0 $\pm$ 27.0 <sup>cf</sup>
HH09	7.77 $\pm$ 1.74 <sup>ab</sup>	14.0 $\pm$ 19.0 <sup>fg</sup>
CK	9.00 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	0.0 $\pm$ 0.0 <sup>g</sup>

注: 同列不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 生防菌 SD13 的鉴定

2.3.1 形态学鉴定 拮抗菌 SD13 在 LB 培养基培养 24 h 后，呈浅乳白色、近圆形、表面粗糙边缘不规则（图 1A~图 1B）。经革兰氏染色，将 SD13 鉴定为革兰氏阳性菌（图 1C）。



A: 菌株 SD13 与豇豆枯萎病菌的对峙实验；B: 菌株 SD13 的菌落形态；C: 菌株 SD13 革兰氏染色。  
A: The confrontation experiment between SD13 and the pathogenic bacteria of cowpea *Fusarium* wilt; B: SD13 colony morphology; C: SD13 Gram staining results.

图 1 菌株 SD13 形态学观察

Fig. 1 Morphological observation of strain SD13

2.3.2 分子鉴定 测序结果显示，拮抗菌株 SD13 的 16S rDNA 序列长度为 1452 bp，在 Ezbicloud 数据库同源序列对比结果中，菌株 SD13 的 16S rDNA 序列与贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) CR-502 (登录号: AY603658) 相似性为 99.5% (图 2)，从 Ezbicloud 数据库中挑选 12 株具有代表性的序列相似菌株以及 1 株外源菌株 *Paenibacillus selenitireducens* ES3-24 (登录号: KC815539.1) 与 SD13 构建系统发育树，发现菌株 SD13 与 *B. velezensis* CR-502 单独聚为一支。结合形态学，将菌株 SD13 鉴定 *B. velezensis*。

### 2.4 生防菌 SD13 对豇豆枯萎病病原菌菌丝和孢子的抑制效果

液体共培养实验结果表明，菌株 SD13 对尖孢镰刀菌菌丝、孢子均有很强的溶菌作用。图 3 为病原菌菌丝的溶解过程。图 3A 为只添加病原菌的对照处理，病原菌菌丝正常，24 h 后观察到添加 SD13 的处理部分病原菌菌丝发生膨大、畸形、基质外泄（图 3B），120 h 菌丝全部被溶解，仅剩少量无内容物菌丝（图 3C）。图 4 为孢子的溶解状态。

### 2.5 生防菌 SD13 菌体与发酵滤液对豇豆枯萎病病原菌孢子的抑制能力

研究表明，在菌体处理 0~12 h，豇豆枯萎病病原菌孢子数量下降 64.5%，48 h 时比 0 h 下降 86.6%。发酵滤液处理 0~12 h，豇豆枯萎病

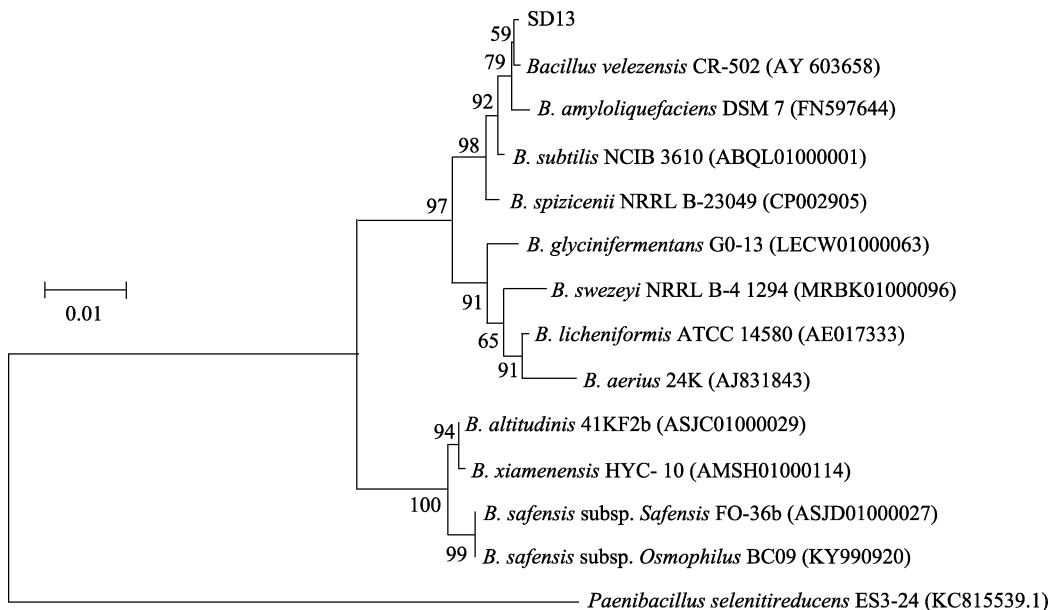
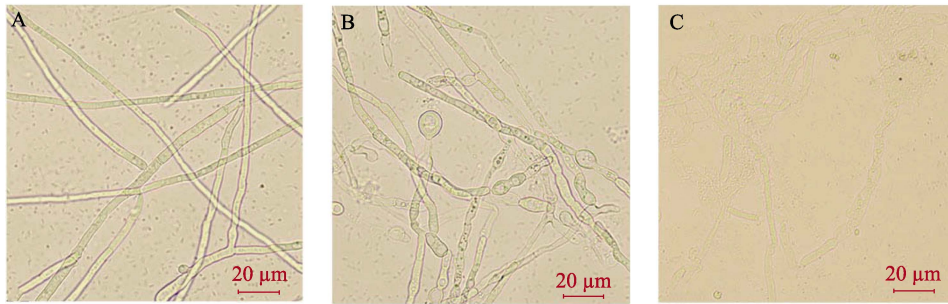


图 2 菌株 SD13 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

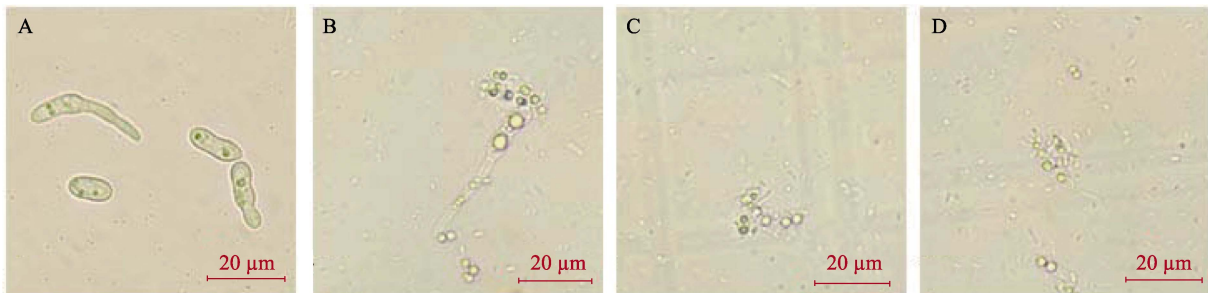
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain SD13 based on 16S rDNA sequence



A: CK; B: 共培养 24 h; C: 共培养 120 h。

A: CK; B: Co-cultivation for 24 h; C: Co-cultivation for 120 h.

图 3 菌株 SD13 对豇豆枯萎病原菌菌丝的抑制作用

Fig. 3 Inhibitory effect of strain SD13 on mycelium of cowpea *Fusarium* wilt pathogen

A: CK, 豇豆枯萎病原菌孢子; B: 因细胞壁被破坏而变透明的孢子; C: 细胞壁被溶解的孢子, 内容物暴露在外; D: 孢子细胞壁完全被溶解。

A: CK, normal spores of cowpea *Fusarium* wilt pathogen; B: Spores that became transparent due to the destruction of the cell wall; C: Cell walls of spores dissolved, and its contents was exposed; D: Cell walls of spores was completely dissolved.

图 4 SD13 菌液对豇豆枯萎病原菌孢子的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of SD13 bacterial solution on spores of cowpea *Fusarium* wilt pathogen

病原菌孢子数量下降 34.4%, 48 h 相对 0 h 下降 27.2% (表 2)。说明生防菌 SD13 菌体与发酵滤液均能溶解豇豆枯萎病原菌孢子, 但 SD13 菌体的溶解能力比 SD13 发酵滤液更强。

表 2 生防菌 SD13 菌体与发酵滤液的孢子抑制能力

Tab. 2 Spore inhibition ability of biocontrol bacteria SD13 cells and its fermentation broth filtrate

处理 Treatment	孢子数量 Number of spores/(10 <sup>6</sup> CFU·mL <sup>-1</sup> )			
	0 h	12 h	24 h	48 h
菌体	20.77±0.82 <sup>a</sup>	7.68±0.71 <sup>b</sup>	5.48±0.17 <sup>c</sup>	2.78±0.90 <sup>d</sup>
无菌水 CK	20.43±0.37 <sup>a</sup>	20.40±0.15 <sup>a</sup>	19.95±0.11 <sup>a</sup>	20.10±0.25 <sup>a</sup>
发酵滤液	20.42±0.19 <sup>a</sup>	13.40±0.25 <sup>b</sup>	13.63±1.07 <sup>b</sup>	14.87±0.57 <sup>b</sup>
LB 培养基 CK	20.75±0.18 <sup>c</sup>	23.93±0.48 <sup>b</sup>	25.37±2.13 <sup>b</sup>	28.43±1.19 <sup>a</sup>

注: 同行不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: Different lowercase letters in the same row indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

## 2.6 生防菌 SD13 的抑菌胞外酶活性检测

检测结果表明 (图 5), 生防菌 SD13 具有产蛋白酶、纤维素酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的能力,  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的 HC 值是蛋白酶、纤维素酶的 4~6 倍 (表 3), 说明 SD13 分泌  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶

活性更高。

## 2.7 SD13 促生因子检测

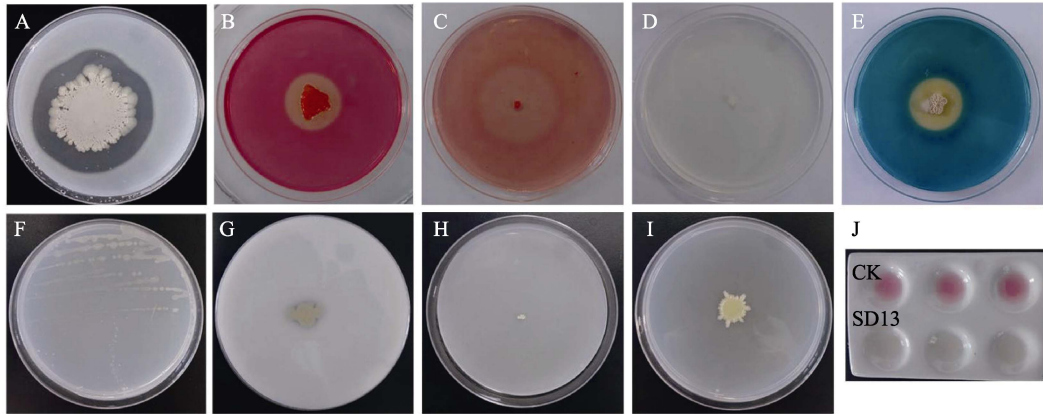
检测结果显示 (图 5, 表 3), SD13 在嗜铁素与解无机磷检测培养基上产生透明圈, 可以在无氮培养基上生长, 说明 SD13 具有产嗜铁素、解无机磷、固氮能力。

## 2.8 生防菌 SD13 的广谱抑菌活性测定

平板对峙实验结果表明, 菌株 SD13 对 6 种病原菌的抑制率在 66.7~82.3% 之间 (表 4, 图 6)。说明菌株 SD13 具有广谱抑菌活性, 且抑菌能力较强。

## 2.9 不同浓度生防菌 SD13 的促生及防治效果

盆栽实验结果表明 (表 5, 图 7), SD13 的各浓度处理对豇豆植株均具有较强的促生能力, 能加快植株生长, 表现为植株增高, 叶片增大 (图 7A)。由表 5 可知, 10<sup>8</sup>S 处理的促生能力最好, 与其他处理具有较强显著差异。10<sup>9</sup>S 处理的促生效果较差, 处理植株在幼苗期间生长缓慢, 植株矮小, 茎根细小, 植株进入抽蔓期后恢复促生生长, 35 d 后植株各生长指标相对 CK 较高。



A: 蛋白酶; B: 纤维素酶; C: β-1,3-葡聚糖酶; D: 丁质酶; E: 产嗜铁素能力; F: 固氮能力; G: 解无机磷能力; H: 解有机磷能力; I: 解钾能力; J: 产 IAA 能力。

A: Protease; B: Cellulase; C: β-1,3-glucanase; D: Chitinase; E: Siderophore-producing ability; F: Nitrogen-fixing ability; G: Inorganic phosphorus-solubilizing ability; H: Organic phosphorus-solubilizing ability; I: Potassium solubilizing ability; J: IAA-producing ability.

图 5 生防菌 SD13 的抑菌胞外酶活性以及与促生能力相关功能检测

Fig. 5 Biocontrol bacteria SD13 antibacterial extracellular enzyme activity and function detection related to growth-promoting ability

表 3 生防菌 SD13 的抑菌胞外酶活性以及促生能力相关因子检测

Tab. 3 Biocontrol bacteria SD13 antibacterial extracellular enzyme activity and growth-promoting factors

项目 Item	透明圈直径 Transparent circle diameter/mm	菌落直径 Colony diameter/mm	HC 值 HC value	项目 Item	透明圈直径 Transparent circle diameter/mm	菌落直径 Colony diameter/mm	HC 值 HC value
蛋白酶	45.83±5.04	42.5±1.47	1.42±0.06	嗜铁素	19.67±0.85	7.83±0.47	2.44±0.11
纤维素酶	28.67±0.47	15.33±0.24	1.87±0.05	解无机磷	16.67±0.62	15.5±0.82	1.10±0.04
β-1,3-葡聚糖酶	62.33±4.25	5.67±1.70	8.63±1.91				

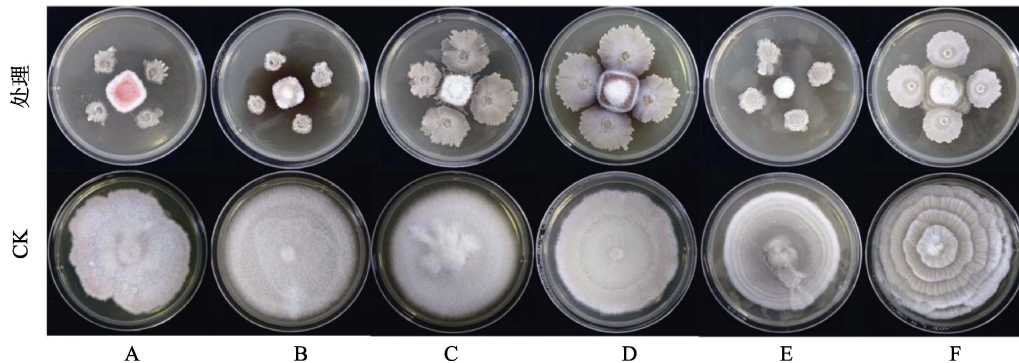
表 4 生防菌 SD13 对 6 种病原菌的抑制率

Tab. 4 Inhibition rate of biocontrol bacteria SD13 against six pathogenic bacteria

病害名称 Disease name	病原菌 Pathogen	处理菌落直径 Colony diameter of treatment/cm	对照菌落直径 Colony diameter of control/cm	抑制率 Inhibition rate/%
青瓜枯萎病	<i>Fusarium oxysporum</i>	2.58±0.65 <sup>a</sup>	7.78±0.08 <sup>b</sup>	66.7±8.6 <sup>c</sup>
辣椒枯萎病	<i>F. oxysporum</i>	1.46±0.12 <sup>b</sup>	8.26±0.19 <sup>a</sup>	82.3±1.1 <sup>ab</sup>
甜瓜枯萎病	<i>F. oxysporum</i>	2.01±0.12 <sup>ab</sup>	7.51±0.02 <sup>b</sup>	73.2±1.7 <sup>bc</sup>
苦瓜枯萎病	<i>F. solani</i>	2.16±0.09 <sup>ab</sup>	7.73±0.09 <sup>b</sup>	72.0±1.6 <sup>c</sup>
豇豆叶斑病	<i>Alternaria alternata</i>	1.18±0.12 <sup>c</sup>	7.16±0.13 <sup>c</sup>	82.3±1.2 <sup>a</sup>
烟草疫霉病	<i>Phytophthora nicotianae</i>	2.13±0.19 <sup>ab</sup>	8.26±0.19 <sup>a</sup>	74.2±1.9 <sup>abc</sup>

注：同列不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference (P<0.05).



A: 青瓜枯萎病菌; B: 辣椒枯萎病菌; C: 甜瓜枯萎病菌; D: 苦瓜枯萎病菌; E: 豇豆叶斑病菌; F: 烟草疫霉病菌。

A: *F. oxysporum*; B: *F. oxysporum*; C: *F. oxysporum*; D: *F. solani*; E: *A. alternata*; F: *P. nicotianae*.

图 6 生防菌 SD13 对 6 种病原菌的抑制效果

Fig. 6 Inhibitory effect of biocontrol bacteria SD13 against six pathogenic bacteria

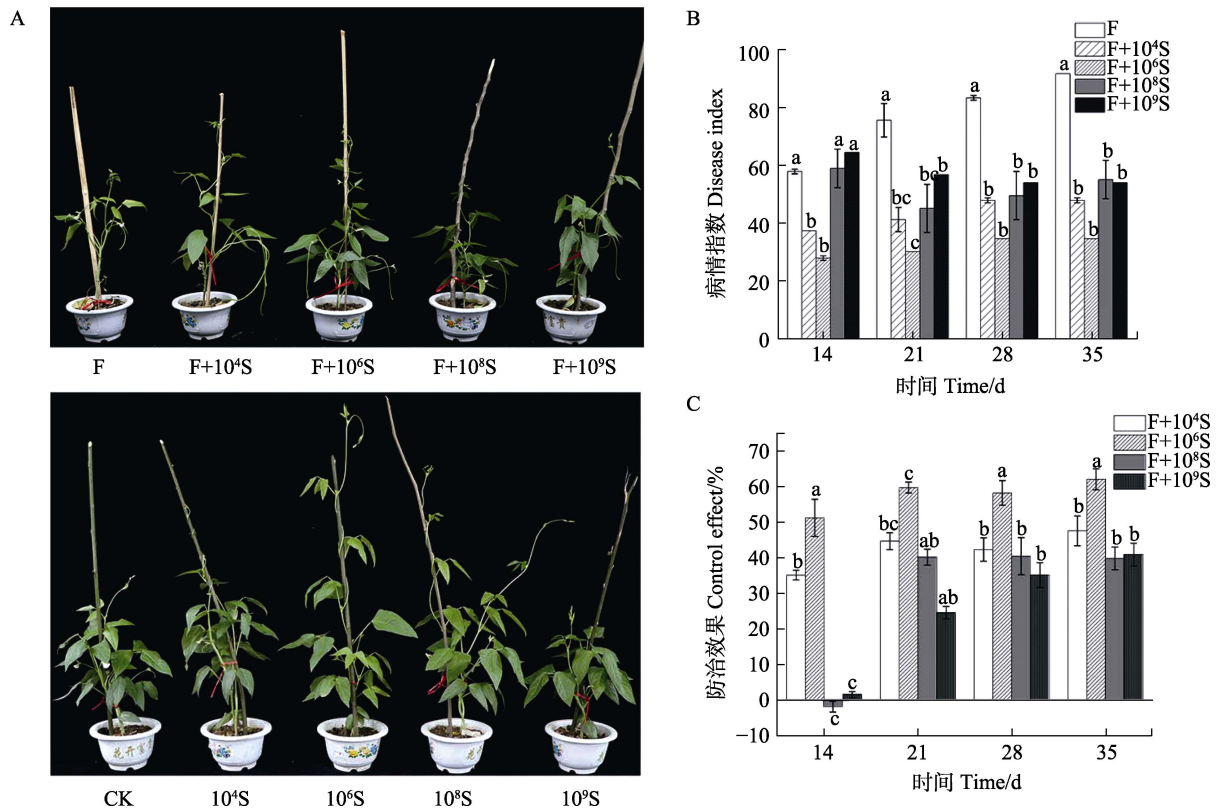
表 5 不同浓度生防菌 SD13 对豇豆的盆栽促生效果

Tab. 5 Potted growth-promoting effects of different concentrations of biocontrol bacteria SD13 on cowpea

处理 Treatment	株高 Plant height/cm	根长 Root length/cm	地上鲜重 Fresh weight above ground/g	地下鲜重 Underground fresh weight/g	地上干重 Dry weight above ground/g	地下干重 Underground dry weight/g
F+10 <sup>4</sup> S	43.11±0.96 <sup>bc</sup>	1.33±0.39 <sup>e</sup>	16.8±0.50 <sup>cd</sup>	13.17±2.66 <sup>bcd</sup>	2.87±0.27 <sup>a</sup>	0.18±0.01 <sup>e</sup>
F+10 <sup>6</sup> S	41.56±1.57 <sup>bc</sup>	1.60±0.15 <sup>de</sup>	15.88±1.29 <sup>d</sup>	13.17±2.05 <sup>cd</sup>	2.03±0.12 <sup>de</sup>	0.19±0.00 <sup>e</sup>
F+10 <sup>8</sup> S	44.67±7.14 <sup>b</sup>	2.28±0.33 <sup>de</sup>	15.07±1.33 <sup>d</sup>	12.83±1.18 <sup>cd</sup>	1.65±0.29 <sup>f</sup>	0.28±0.01 <sup>b</sup>
F+10 <sup>9</sup> S	50.17±10.52 <sup>a</sup>	2.29±0.3 <sup>de</sup>	20.23±0.39 <sup>b</sup>	14.33±1.03 <sup>bcd</sup>	2.05±0.09 <sup>cde</sup>	0.26±0.01 <sup>bc</sup>
F	26.00±0.82 <sup>d</sup>	2.19±0.25 <sup>bc</sup>	10.32±0.35 <sup>e</sup>	10.83±2.25 <sup>d</sup>	0.16±0.03 <sup>g</sup>	0.27±0.01 <sup>b</sup>
10 <sup>4</sup> S	42.11±0.42 <sup>bc</sup>	1.87±0.17 <sup>bcd</sup>	21.49±0.30 <sup>b</sup>	14.44±0.16 <sup>bc</sup>	2.42±0.06 <sup>bc</sup>	0.28±0.01 <sup>b</sup>
10 <sup>6</sup> S	42.33±0.82 <sup>bc</sup>	1.83±0.13 <sup>bcd</sup>	21.99±0.60 <sup>b</sup>	16.61±0.28 <sup>ab</sup>	2.29±0.16 <sup>cd</sup>	0.28±0.02 <sup>b</sup>
10 <sup>8</sup> S	56.78±4.43 <sup>a</sup>	2.81±0.07 <sup>a</sup>	5.64±0.89 <sup>a</sup>	18.33±1.19 <sup>a</sup>	2.68±0.06 <sup>ab</sup>	0.32±0.00 <sup>a</sup>
10 <sup>9</sup> S	33.89±4.37 <sup>bcd</sup>	2.14±0.10 <sup>bcd</sup>	17.82±0.17 <sup>c</sup>	15.44±0.42 <sup>abc</sup>	2.00±0.13 <sup>def</sup>	0.25±0.01 <sup>cd</sup>
CK	32.00±1.19 <sup>cd</sup>	1.70±0.03 <sup>cde</sup>	16.38±0.17 <sup>cd</sup>	14.44±0.21 <sup>bc</sup>	1.88±0.04 <sup>ef</sup>	0.24±0.01 <sup>cd</sup>

注：同列不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ( $P<0.05$ ).



A: 盆栽实验的植株生长状态; B: 不同浓度 SD13 处理不同时间的病情指数; C: 不同浓度 SD13 处理不同时间的防治效果。

不同小写字母表示差异显著 ( $P<0.05$ )。

A: Plant growth state diagram of pot experiment; B: Disease index of different concentrations of SD13 treatment at different time; C: Control effect of different concentrations of SD13 treatment at different time. Different lowercase letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

图 7 盆栽实验的防治与促生效果

Fig. 7 Control and growth-promoting effects of pot experiment

在实验观察期间, F 处理的病情指数随时间逐渐升高, 施用生防菌 4 个处理的病情指数增长缓慢, 并且在 28~35 d 停止增长 (图 7B), 说明

多次施用生防菌 SD13 可以持续有效控制豇豆枯萎病病情的发展。14 d 后, F 处理的豇豆植株开始发病, 原生叶片开始变黄、掉落, 基茎肿胀,

植株发育不良, 发病率为 80%。F+10<sup>4</sup>S、F+10<sup>6</sup>S、F+10<sup>8</sup>S 与 F+10<sup>9</sup>S 处理的豇豆植株发病率分别为 40%、30%、80%、80%。35 d 后, F 处理的发病率达到 100%, 施用生防菌的 4 个处理发病率均无增长。如图 7C 所示, F+10<sup>6</sup>S 防治效果为 62.0%, 具有显著差异, 是最佳防治浓度。

综合防治效果与促生能力认为, 生防菌 SD13 的最佳施用浓度为 10<sup>6</sup> CFU/mL, 其防治效果最好, 而促生效果仅次于 10<sup>8</sup> CFU/mL。

### 3 讨论

国内豇豆枯萎病的防治主要依赖化学防治, 微生物防治的相关报道较少, 尤其是生防细菌, 国内外报道甚少。本研究通过从土壤中筛选 11 株拮抗细菌, 对抑制率最强的拮抗菌株 SD13 进行形态学鉴定与分子鉴定, 该菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。贝莱斯芽孢杆菌 SD13 对豇豆枯萎病菌尖孢镰刀菌的菌丝、孢子具有很强的溶解作用, 同时可以产纤维素酶、蛋白酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶 3 种抑菌胞外酶, 并具有产嗜铁素、固氮、解无机磷 3 种促生功能, 抑菌广谱。经盆栽实验证明贝莱斯芽孢杆菌 SD13 对豇豆枯萎病具有良好的防治效果, 并对豇豆植株具有较强的促生能力。贝莱斯芽孢杆菌 SD13 是一株有潜力的生防细菌, 有望成为防治豇豆枯萎病的重要生防资源。

贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) 属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的一个新种, 因具有广谱抑菌活性和促进植物生长等特点而被广泛研究<sup>[26-27]</sup>。已有研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌对小青菜、香蕉、番茄等有促生长作用, 能抑制植物病原稻瘟病菌、黄瓜枯萎病菌、辣椒疫霉菌、橡胶炭疽菌、香蕉枯萎病菌等病菌的生长<sup>[28-31]</sup>。

糖蛋白和葡聚糖是尖孢镰刀菌细胞壁的主要成分, 也是大部分真菌细胞壁的主要成分<sup>[32]</sup>。据报道, 贝莱斯芽孢杆菌可以通过分泌的蛋白酶、几丁质酶、葡聚糖酶等胞外水解酶抑制病原菌<sup>[33]</sup>, 贝莱斯芽孢杆菌 HYEB5-6 通过分泌蛋白酶和葡聚糖酶破坏炭疽菌菌丝细胞壁, 抑制分生孢子的萌发、胚芽管的生长和附着胞的形成<sup>[34]</sup>, 尤其是  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶, 广泛存在于高等植物中, 可以降低真菌细胞壁, 对植物防御致病真菌起到重要作用<sup>[35]</sup>。本研究中 SD13 对尖孢镰刀菌的菌丝、孢子溶解主要是由蛋白酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶破坏其细

胞壁导致的。

氮、磷、钾是植物生长的必需元素, 能够促进植物健康发育, 提高作物产量。作物缺氮、磷会导致作物生长缓慢。研究表明, 接种固氮菌株巨芽孢杆菌 (*B. megaterium*) N3 能够促进二月兰生长, 同时土壤的理化性质与生物学性质均得到显著改善<sup>[36]</sup>。解磷细菌贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) CBMB205 的 19 个磷酸酶基因均参与使土壤中难以利用的磷转化为植物易吸收的磷<sup>[37]</sup>。在本研究中, SD13 能够解无机磷、固氮, 对豇豆具有较强的促生能力。此外, SD13 具有较强的产嗜铁素能力, 嗜铁素 (siderophore) 也叫高铁载体, 能特异地螯合含铁离子的化合物使 SD13 在低铁环境中与病原菌竞争铁元素, 抑制病原菌的发展, 也能将难溶的铁转化为易溶的铁供植物吸收, 促进植物生长<sup>[38-41]</sup>。

经盆栽实验表明, 不同浓度 SD13 均具有防治豇豆枯萎病和促进豇豆植株生长的作用, 并不是浓度越高效果越好, 10<sup>6</sup> CFU/mL 为最佳防治浓度, 而 10<sup>8</sup> CFU/mL 是最佳促生浓度, 浓度为 10<sup>9</sup> CFU/mL 时, 豇豆幼苗生长受到抑制, 但这种抑制是短暂的, 豇豆植株会在抽蔓期恢复促生生长。研究显示, 多次施用生防菌 SD13 可以有效控制豇豆枯萎病病情发展, 因此, 在施用 SD13 防治枯萎病时建议少量多次。研究发现 SD13 具有溶菌作用, 在防治病害时, 溶菌作用与促生共同起作用, 在接种 SD13 后, SD13 产生的蛋白酶、蛋白酶溶解致病菌细胞壁, 减少病原菌数量。同时, SD13 具有促生作用, 提高植株的品质, 加强抗病能力, 在二者作用下, 从而控制病害的发展, 达到防治效果。

### 参考文献

- [1] RIGERT K S, FOSTER K W. Inheritance of resistance to two races of *Fusarium* wilt in three cowpea cultivars[J]. *Crop Science*, 1987, 27(2): 220-224.
  - [2] THEN C, MIYAZAKI J, BAUER-PANSKU A. Deficiencies in the risk assessment of genetically engineered Bt cowpea approved for cultivation in nigeria: a critical review[J]. *Plants*, 2022, 11(3): 380.
  - [3] 汪宝根, 吴新义, 徐沛, 吴晓花, 鲁忠富, 汪颖, 李国景. 豇豆新品种之豇 618 的选育[J]. *中国蔬菜*, 2020, 40(5): 88-92.
- WANG B G, WU X Y, XU P, WU X H, LU Z F, WANG Y,

- LI G J. A new cowpea cultivar—'Zhijiang 618'[J]. *China Vegetables*, 2020, 40(5): 88-92. (in Chinese)
- [4] 李秋洁, 符启位, 王爽, 黄国宋, 刘勇, 叶其宏, 吴乾兴, 孔祥义. 海南三亚豇豆枯萎病原菌鉴定及室内药剂筛选[J]. *热带农业科学*, 2017, 37(6): 38-42.
- LI Q J, FU Q W, WANG S, HUANG G S, LIU Y, YE Q H, WU Q X, KONG X Y. Pathogenic identification and indoor screening of cowpea *Fusarium* wilt in Sanya, Hainan provinces[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2017, 37(6): 38-42. (in Chinese)
- [5] POTTORFF M, WANAMKER S, MA Y Q, EHLERS J D, ROBERTS P A, CLOSE T J. Genetic and physical mapping of candidate genes for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *tracheiphilum* race 3 in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp][J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e41600.
- [6] 赵秀娟, 张衍荣. 对羟基苯甲酸对豇豆枯萎病菌的抑制作用[J]. *中国蔬菜*, 2009, 29(18): 38-40.
- ZHAO X J, ZHANG Y R. Effects of phydroxybenzoic acid on cowpea *Fusarium* wilt fungus[J]. *China Vegetables*, 2009, 29 (18): 38-40. (in Chinese)
- [7] 袁伟方, 王硕, 张曼丽, 陈川峰, 李祖莅, 邓德智. 三亚市豇豆重大病虫害发生动态监测[J]. *中国植保导刊*, 2017, 37(7): 39-41, 65.
- YUAN W F, WANG S, ZHANG M L, CHEN C F, LI Z L, DENG D Z. Dynamic monitoring of major diseases and insect pests of cowpea in Sanya[J]. *China Plant Protection*, 2017, 37(7): 39-41, 65. (in Chinese)
- [8] SAXENA M, SAXENA D R, BHALE M S, KHARE M N. Diseases of cowpea and their management[J]. *Diseases of Field Crops and Their Management*, 1998: 239-252.
- [9] 金国藩, 蒋士强, 王静, 桑立伟, 马永娇. 从“海南毒豇豆”事件看农产品食品安全监管与农残检测[J]. *食品安全导刊*, 2010, 4(4): 23-25.
- JIN G F, JIANG S Q, WANG J, SANG L W, MA Y J. From the “Hainan Poison Cowpea” incident to look at the food safety supervision of agricultural products and the detection of pesticide residues[J]. *China Food Safety Magazine*, 2010, 4(4): 23-25. (in Chinese)
- [10] 求真. 山东通报一批次豇豆高毒农药残留严重超标[J]. *农药市场信息*, 2020, 35(8): 1.
- QIU Z. Shandong notified a batch of cowpea highly toxic pesticide residues that seriously exceeded the standard[J]. *Pesticide Market News*, 2020, 35(8): 1. (in Chinese)
- [11] 钟丽伟, 谭鸿升, 陈泽斌, 钟宇, 刘佳妮, 魏薇. 根际微生物防治土传病害的研究进展[J]. *昆明学院学报*, 2022, 44(3): 75-82.
- ZHONG L W, TAN H S, CHEN Z B, ZHONG Y, LIU J N, WEI W. Advances in rhizobacteria control of soil-borne plant diseases[J]. *Journal of Kunming University*, 2022, 44(3): 75-82. (in Chinese)
- [12] 李凤芳. 番茄立枯病生防细菌的筛选及其防治效果[D]. 南宁: 广西大学, 2020.
- LI F F. Screening of biocontrol blight and performce against tomato damping-off[D]. Nanning: Guangxi University, 2020. (in Chinese)
- [13] 郝晓娟. 作物枯萎病生防细菌的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- HAO X J. Study on antagonistic bacteria for biocontrol of the *Fusarium* wilt[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006. (in Chinese)
- [14] 李娜, 李晶, 付麟云, 刘锦霞, 丁品, 武建荣. 1 株优良生防细菌的筛选及其对甘肃温室黄瓜枯萎病的防治效果[J]. *中国瓜菜*, 2022, 35(1): 86-90.
- LI N, LI J, FU L Y, LIU J X, DING P, WU J R. Screening and identification of an excellent biocontrol bacteria against cucumber *Fusarium* wilt in heliogreen house of Gansu and its biological effect[J]. *China Cucurbits and Vegetables*, 2022, 35(1): 86-90. (in Chinese)
- [15] 周东兴, 王恩泽, 刘多, 金聪敏, 李欣, 姜姍, 白皓天. 番茄枯萎病生防细菌的筛选及对植株防御酶活性的影响[J]. *生态学杂志*, 2020, 39(5): 1753-1760.
- ZHOU D X, WANG E Z, LIU D, JIN C M, LI X, JIANG S, BAI H T. Screening of biocontrol bacteria against tomato wilt and the effect on defense enzyme activity of plants[J]. *Journal of Ecology*, 2020, 39(5): 1753-1760. (in Chinese)
- [16] 郑丽, 张海鹏, 陈阳, 刘孟浩, 宋艳培, 江绍锋, 林江, 高赛超, 何时雨, 覃新导. 防治木薯细菌性枯萎病的生防菌株筛选和防效测定[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(8): 1519-1528.
- ZHENG L, ZHANG H P, CHEN Y, LIU M H, SONG Y P, JIANG S F, LIN J, GAO S C, YU S Y, QIN X D. Selection and identification of biocontrol agents against cassava blight bacteria[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(8): 1519-1528. (in Chinese)
- [17] 王明江, 章如意, 林多多, 林玲, 周益军. 棉花黄萎病不同抗性品种内生菌数量调查与拮抗菌筛选[J]. *江苏农业科学*, 2010, 38(2): 102-104.
- WANG M J, ZHANG R Y, LIN D D, LIN L, ZHOU Y J. Quantity of endophytes and screening of antagonistic bacteria in cotton varieties with *Verticillium* wilt resistance[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2010, 38(2): 102-104. (in Chinese)
- [18] 陈爽, 王继华, 张必弦, 刘秀林. 贝莱斯芽孢杆菌对大豆根腐病盆栽防效及防御酶活性检测[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(19): 6492-6500.
- CHEN S, WANG J H, ZHANG B X, LIU X L. Control ef-

- fect of *Bacillus velezensis* on soybean root rot in pot and detection of defensive enzyme activity[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(19): 6492-6500. (in Chinese)
- [19] CANTWELL B A, MCCONNELL D J. Molecular cloning and expression of a *Bacillus subtilis*  $\beta$ -glucanase gene in *Escherichia coli*[J]. *Gene*, 1983, 23(2): 211-219.
- [20] 王明欢, 张小娜, 林冰, 邓锦辉, 张英. 中药药渣中固氮菌、解磷菌、解钾菌的筛选[J]. *中成药*, 2020, 42(02): 531-533.
- WANG M H, ZHANG X N, LIN B, DENG J H, ZHANG Y. Screening of nitrogen-fixing bacteria, phosphate-solubilizing bacteria and potassium-solubilizing bacteria in traditional Chinese medicine residues[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2020, 42(2): 531-533. (in Chinese)
- [21] 代志, 高俊明. 兼具解磷解钾功能生防菌分离鉴定及效果评价[J]. *山西农业科学*, 2018, 46(4): 627-633.
- DAI Z, GAO J M. Isolation, identification and effect evaluation of biocontrol bacteria with phosphorus and potassium dissolving[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2018, 46(4): 627-633. (in Chinese)
- [22] 虞凡枫, 赵进, 孙铭悦, 樊子婧, 陈芳, 牛世全. 黄瓜枯萎病拮抗芽孢杆菌 A7-3-14 的筛选及鉴定[J]. *北方园艺*, 2022, 46(3): 41-46.
- YU F F, ZHAO J, SUN M Y, FAN Z J, CHEN F, NIU S Q. Screening and identification of antagonistic *Bacillus* A7-3-14 in cucumber *Fusarium* wilt[J]. *Northern Horticulture*, 2022, 46(3): 41-46. (in Chinese)
- [23] 闫助冰, 王玫, 明常军, 姜远茂, 沈向, 陈学森, 尹承苗, 毛志泉. 贝莱斯芽孢杆菌 XC1 的筛选、鉴定及其对苹果连作障碍的影响[J]. *园艺学报*, 2021, 48(3): 409-420.
- YAN Z B, WANG M, MING C J, JIANG Y M, SHEN X, CHEN X S, YIN C M, MAO Z Q. Screening and identification of *Bacillus velezensis* XC1 and its influence on apple replant disease[J]. *Horticultural Plant Journal*, 2021, 48(3): 409-420. (in Chinese)
- [24] 林福呈, 李德葆. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)S9 对植物病原真菌的溶菌作用[J]. *植物病理学报*, 2003, 49(2): 174-177.
- LIN F C, LI D B. Cell-lytic effect of *Bacillus subtilis* on plant fungal pathogens[J]. *Acta Phytopathologica Sinica* 2003, 49(2): 174-177. (in Chinese)
- [25] 万兵兵, 刘晔, 吴越, 张东艳, 王国文, 姜瑛. 一株玉米根际多功能促生菌的筛选鉴定及效应研究[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(8): 169-176.
- WAN B B, LIU Y, WU Y, ZHANG D Y, WANG G W, JIANG Y. Screening and identification of maize growth-promoting rhizobacteria and its promoting effects on maize[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(8): 169-176. (in Chinese)
- [26] RUIZ-GAREIA C, BEJAR V, MARTINEZ-CHECA F, LLAMAS I, QUESADA E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 191-195.
- [27] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3634-3649.
- ZHANG D F, GAO Y X, WANG Y J, LIU C, SHI C B. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3634-3649. (in Chinese)
- [28] 徐婷, 朱天辉, 李姝江, 譙天敏. 贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* YB15 $\beta$ -葡聚糖酶的抑菌作用与基因克隆[J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(2): 276-281.
- XU T, ZHU T H, LI S J, QIAO T M. Fungus-inhibitory activity and gene cloning of  $\beta$ -glucanase from *Bacillus velezensis* YB15[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, 30(2): 276-281. (in Chinese)
- [29] 李万芹, 何鹏飞, 吴毅歆, 何鹏搏, Shahzad Munir, 孔宝华, 李兴玉, 何月秋. 香蕉内生贝莱斯芽孢杆菌 YX-11 的分离鉴定与功能研究[J]. *江西农业学报*, 2021, 33(12): 8-13.
- LI W Q, HE P F, WU Y X, HE P B, SHAHZAD M, KONG B H, LI X Y, HE Y Q. Isolation, identification and functional properties of endophytic *Bacillus velezensis* YX-11 from banana[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2021, 33(12): 8-13. (in Chinese)
- [30] 李永丽, 周洲, 尹新明. 贝莱斯芽孢杆菌 Mr12 预防苹果轮纹病等病害的潜力及其全基因组分析[J]. *果树学报*, 2021, 38(9): 1459-1467.
- LI Y L, ZHOU Z, YIN X M. Potential and genome-wide analysis of *Bacillus velezensis* Mr12 in preventing apple ring rot and other diseases[J]. *Journal of Fruit Science*, 2021, 38(9): 1459-1467. (in Chinese)
- [31] 何伟, 罗文芳, 周军辉, 许建军, 孙晓军. 贝莱斯芽孢杆菌 JTB8-2 对加工番茄促生作用及其安全性评价[J]. *新疆农业科学*, 2022, 59(5): 1260-1269.
- HE W, LUO W F, ZHOU J H, XU J J, SUN X J. Growth promoting effect and safety evaluation of *Bacillus velezensis* JTB8-2 on processed tomato[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2022, 59(5): 1260-1269. (in Chinese)
- [32] SCHOFFELMEER E A M, KLIS F M, SIETSMA J H. The cell wall of *Fusarium oxysporum*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 1999, 27(2/3): 275-282.
- [33] 陶永梅, 潘洪吉, 黄健, 席昕, 李鹏, 卢志军. 新型生防微生物因子贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究与应用

- 用[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(9): 26-33.
- TAO Y M, PAN H J, HUNAG J, XI X, LI P, LU Z J. Research and application of a novel biocontrol microbial factor *Bacillus velezensis*[J]. China Plant Protection, 2019, 39(9): 26-33. (in Chinese)
- [34] HUANG L, LI Q C, HOU Y, LI G Q, YANG J Y, LI D W, YE J R. *Bacillus velezensis* strain HYEB5-6 as a potential biocontrol agent against anthracnose on *Euonymus japonicus*[J]. Biocontrol Science and Technology, 2017, 27(5): 636-653.
- [35] 国慧. 生防萎缩芽孢杆菌  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶拮抗功能的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2017.
- GUO H. Cloning and expression of  $\beta$ -1,3-glucanase gene from *Bacillus atrophicus*[D]. Huhehaote: Inner Mongolia University, 2017. (in Chinese)
- [36] 魏志敏, 孙斌, 方成, 代子雯, 刘满强, 焦加国, 胡锋, 李辉信, 徐莉. 固氮芽孢杆菌 N3 的筛选鉴定及其对二月兰的促生效果[J]. 土壤, 2021, 53(1): 64-71.
- WEI Z M, SUN B, FANG C, DAI Z W, LIU M Q, JIAO J G, HU F, LI H X, XU L. Isolation and characterization of *Bacillus* nitrogen-fixing bacteria and its growth promotion on *Orychophragmus violaceus*[J]. Soils, 2021, 53(1): 64-71. (in Chinese)
- [37] HWANGBO K, UM Y K, KI Y, MADHAIYAN M, SA T M, LEE Y. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* CBMB205, a phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizoplane of rice in the Republic of Korea[J]. Genome Announcements, 2016, 4(4): e00654-16.
- [38] 沈佳慧, 左杨, 乔俊卿, 刘永锋, 刘邰洲. 贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* YL2021 嗜铁素合成基因 *dhbC* 的功能研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(3): 602-612.
- SHEN J H, ZUO Y, QIAO J Q, LIU Y F, LIU Y Z. Functional analysis of *dhbC* gene from the siderophore producing bacterium *Bacillus velezensis* YL2021[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(3): 602-612. (in Chinese)
- [39] PAYNE S M. Detection, isolation, and characterization of siderophores[J]. Methods in Enzymology, 1994, 235: 329-344.
- [40] 许煜泉, 高虹. 假单胞菌株 JKD-2 分泌铁载体抑制稻瘟病菌[J]. 微生物学通报, 1999, 26(3): 180-183.
- XU Y Q, GAO H. Production and their activity against *Piricularia oryzae* by *Pseudomonas* JKD-2[J]. Microbiology China, 1999, 26(3): 180-183. (in Chinese)
- [41] 刘艳萍, 滕松山, 赵蕾. 高产嗜铁素恶臭假单胞菌 A3 菌株的鉴定及其对黄瓜的促生作用[J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17(6): 8.
- LIU Y P, TENG S S, ZHAO L. Identification of a siderophore-producing bacterium *Pseudomonas putida* A3 and its growth-promoting effects on cucumber seedlings[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2011, 17(6): 8. (in Chinese)