

魏欣莹, 邢珏珺, 苗爽, 秦迪, 邓小银, 李华勇, 喻国辉. 芽胞杆菌 ZKY01 防控花生果腐病研究 [J]. 广东农业科学, 2023, 50 (3): 97-104.

芽胞杆菌 ZKY01 防控花生果腐病研究

魏欣莹¹, 邢珏珺¹, 苗爽¹, 秦迪¹, 邓小银², 李华勇³, 喻国辉¹

(1. 仲恺农业工程学院植物健康创新研究院 / 农业农村部华南果蔬绿色防控重点实验室 / 广东省普通高校果蔬病虫害绿色防控重点实验室, 广东 广州 510225;
2. 罗定市农产品质量安全监督检测站, 广东 罗定 527299;
3. 罗定市船步镇基础综合服务中心, 广东 罗定 527225)

摘要:【目的】镰刀菌复合感染引起花生果腐病是广东花生重大土传病害,严重影响花生的产量和品质。针对花生果腐病筛选出生防菌并对其开展鉴定、生理生化测试和田间防控效果评估,以期为花生果腐病绿色防控提供理论依据。【方法】采用平板拮抗法从实验室保存的生防芽胞杆菌中筛选对花生果腐病原菌具有广谱拮抗活性的菌株,然后结合 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 序列扩增结果和系统发育分析开展菌株鉴定,并测定菌株的生理生化指标和 Biolog-GN 板碳源利用能力,利用 MSgg、BGM1、BGDM 培养基测定菌株的生物被膜形成能力,并通过大田小区试验测定菌株的田间防病效果。【结果】生防菌株 ZKY01 对花生果腐病原菌 *Fusarium* sp. G15、*F. oxysporum* R5 和 *F. solani* R4.2 具有较好的广谱拮抗活性,平板抑菌率分别为 72.23 (±3.36)%、54.14 (±10.33)% 和 69.37 (±2.17)%;系统发育分析结果显示,菌株 ZKY01 为贝莱斯芽胞杆菌 (*Bacillus velezensis*),该菌能在 3%~10%NaCl 溶液中正常生长,生长温度范围为 10~50℃,能利用 50 种碳源;能在 MSgg、BGM1 和 BGDM 液体培养基上形成稳定的薄皮。田间防效测试结果显示,ZKY01 可湿性粉剂苗期淋施,对镰刀菌引起花生果腐病防治效果达到 95.14%。【结论】贝莱斯芽胞杆菌 ZKY01 在镰刀菌引起花生果腐病生物防治中具有较大的应用潜力。

关键词: 贝莱斯芽胞杆菌;生理生化特性;生物被膜;花生;果腐病;生物防治

中图分类号: S435.652

文献标志码: A

文章编号: 1004-874X (2023) 03-0097-08

Study on the Bio-Control Efficiency of Peanut Pod Rot by *Bacillus* ZKY01

WEI Xinying¹, XING Juejun¹, MIAO Shuang¹, QIN Di¹, DENG Xiaoyin², LI Huayong³, YU Guohui¹

(1. Innovative Institute for Plant Health, Zhongkai University of Agriculture and Engineering / Key Laboratory of Green Prevention and Control on Fruits and Vegetables in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / Guangdong University Key Laboratory for Sustainable Control of Fruit and Vegetable Diseases and Pests, Guangzhou 510225, China; 2. Luoding Agricultural Products Quality and Safety Supervision and Testing Station, Luoding 527299, China; 3. Basic Integrated Service Center in Chuanbu Town, Luoding City, Luoding, 527225 China)

Abstract:【Objective】Pod rot caused by *Fusarium* spp. is a major soil-borne peanut disease in Guangdong, which affects the yield and quality of peanut seriously. In order to provide a theoretical basis for green prevention and control of pod rot, a biocontrol bacterium was screened and its identification, physiological biochemistry characteristics and control

收稿日期: 2022-12-07

基金项目: 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目 (2019KJ136-06, 2020KJ136-06, 2021KJ136-06, 2022KJ136-06)

作者简介: 魏欣莹 (1997—), 女, 在读硕士生, 研究方向为植物病害生物防治, E-mail: 826391136@qq.com

通信作者: 喻国辉 (1976—), 男, 博士, 教授, 研究方向为植物病害生物防治, E-mail: ygh76411@zhku.edu.cn

efficiency in fields were evaluated. 【Method】 Strains with wide antimicrobial spectrum activity the pathogens of peanut pod rot were screened from biocontrol *Bacillus* strains preserved in laboratory by plate antagonism method, and identified by sequence amplification and phylogenetic analysis of 16S rDNA, *gyrA*, and *gyrB* sequences. Then, their physiological and biochemical characteristics, carbon source utilization capacity of Biolog-GN plate, biofilm formation in MSgg, BGM1, and BGDM media were determined. Meanwhile, the control effects of these strains on peanut pod rot were conducted by field plot tests. 【Result】 A *Bacillus* strain ZKY01 with wide antimicrobial spectrum activity was selected, and its plate inhibition rates on *Fusarium* sp. G15, *F. oxysporum* R5 and *F. solani* R4.2 were 72.23 (± 3.36)%, 54.14 (± 10.33)% and 69.37 (± 2.17)%, respectively. According to the phylogenetic analysis, the strain ZKY01 was identified as *Bacillus velezensis*. ZKY01 could grow normally in 3% to 10% NaCl solution, and temperature suitable for its growth ranged from 10 °C to 50 °C. It could use 50 kinds of carbon sources and form robust pellicles on MSgg, BGM1 and BGDM liquid media. Field control test results showed that ZKY01 wettable powder drenching at seedling stage had a control effect of 95.14% against *Fusarium*-caused peanut pod rot. 【Conclusion】 *Bacillus velezensis* ZKY01 has great application potential in the biological control of peanut pod rot caused by *Fusarium* spp.

Key words: *Bacillus velezensis*; physiological and biochemical characteristics; biofilm; peanut; pod rot; biocontrol

【研究意义】花生果腐病 (Peanut pod rot), 又称“烂果病”, 受害植株地上部分与正常植物无异, 地下果荚腐烂严重, 是世界范围内普遍发生的花生土传病害之一。花生果腐病危害严重, 难于治理, 发病田轻者产量损失 15%, 重者绝收^[1-2]。目前花生果腐病已在我国广东、河北、河南、山东、海南等地发生^[3-7], 对花生产业造成严重损失。【前人研究进展】引起花生果腐病的病原菌主要有茄病镰刀菌 (*Fusarium solani*)、群结腐霉菌 (*Pythium myriotylum*)^[2,4]、*Neocosmospora vasinfecta*^[8]、*N. striata*^[9] 和尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)^[3]。目前国内花生果腐病的防控措施主要包括化学防控^[10]、抗性育种^[11]和生物防治^[12-13]等, 其中解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)^[12] 和贝莱斯芽胞杆菌 (*B. velezensis*)^[13] 对不同病原菌引起的花生果腐病都表现出较好防效, 具有良好的应用前景。果腐病的防控包括抗病品种选育、农业防治、生物防治和化学防治, 生产上主要采用化学防治的方法。但长期使用化学农药容易引起病原菌产生抗药性, 造成环境污染, 因此需要寻找一种有效且绿色环保的防治途径。【本研究切入点】贝莱斯芽胞杆菌种名于 2005 年确立, 2007 年将解淀粉芽胞杆菌和贝莱斯芽胞杆菌认定为同物异名而失去细菌命名法中的地位^[14]。2010 年, 解淀粉芽胞杆菌被划分为两个亚种: 解淀粉芽胞杆菌亚种和解淀粉芽胞杆菌植物亚种。2015 年后确认贝莱斯芽胞杆菌不是解淀粉芽胞杆菌的同物异名, 而甲基营养型芽胞杆菌和解淀粉

芽胞杆菌植物亚种是贝莱斯芽胞杆菌的同物异名, 因此 2015 年以前被鉴定为甲基营养型芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌植物亚种的菌株均为贝莱斯芽胞杆菌^[14-15]。例如, 贝莱斯芽胞杆菌 FZB42 菌株, 之前被鉴定为解淀粉芽胞杆菌植物亚种, 是极具生防潜力的芽胞杆菌, 被广泛应用在微生物肥料中, 对多种病原具有广谱的拮抗活性, 研究该菌株的学术论文多达 300 多篇^[15]。贝莱斯芽胞杆菌 Hsg1949 菌株对引起花生果腐病的 3 株镰刀菌 *F. spp.* 病原菌表现出良好的拮抗活性, 其抑菌率为 77.0%、69.7%、61.9%, 田间施用 Hsg1949 菌悬液后可显著降低花生果腐病的发病率^[13], 表现出较好的防控效果, 值得开发应用于花生土传病害的防控。【拟解决的关键问题】本研究从实验室保存的芽胞杆菌菌株中筛选出一株对果腐病具有良好抑菌效果的菌株 ZKY01, 并进行分子鉴定和生物学特性研究, 利用该菌株制备的可湿性粉剂开展田间防效试验, 为今后研发芽胞杆菌制剂防控广东花生重大土传病害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试病原菌 花生果腐病病原菌 R4-2 菌株 (*F. solani*)、R5 菌株 (*F. oxysporum*) 和 G15 菌株 (*F. spp.*), 均由仲恺农业工程学院植物健康创新研究院于 2019 年从韶关市曲江区樟市镇患果腐病的腐烂花生果荚中分离获得, 并经过致病性回接试验确定为果腐病病原菌^[3]。

1.1.2 供试菌株 供试生防菌株 ZKY01, 由仲

恺农业工程学院植物健康创新研究院分离保存。ZKY01 可湿性粉剂委托华中农业大学微生物农药生物工程中心加工, 芽胞含量 2×10^{10} CFU/g。

1.1.3 供试培养基 供试培养基为 LB 培养基、PDA 培养基、MS_{gg} 培养基^[16]、BGM1 培养基^[17]、BGDM 培养基^[17]、厌氧培养基^[18]。

1.2 试验方法

1.2.1 生防菌活化 将 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 甘油保藏的菌株 ZKY01 在 LB 培养基平板上划线, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养过夜备用。

1.2.2 病原菌活化 将 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保藏的果腐病病原菌琼脂块接种到 PDA 培养基平板上, $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养, 培养 5 d 后备用。

1.2.3 平板拮抗效果测定 将 LB 固体培养基和 PDA 培养基用微波炉加热融化, 等体积混合均匀, 制备平板备用。用 1 mL 无菌蓝色吸头在培养 5 d 的病原菌培养皿上沿菌落边缘打孔获得菌饼, 然后将菌饼接种到混合平板中央, 每个平板上接种 1 个菌饼, 在距离病原菌接种中心 3 cm 的位置, 接种活化的 ZKY01 单菌落, 并涂布成直径约 0.5 cm 的菌苔, 以不接种 ZKY01 单菌落的病原菌平板为对照。 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 培养皿倒置培养。5 d 后, 采用十字交叉法测量对照和处理病原菌菌落直径, 采用菌丝生长速率法^[13]计算抑菌率。抑菌率 (%) = $[(\text{对照菌落半径} - \text{处理菌落半径}) / \text{对照菌落半径}] \times 100$ 。

1.2.4 菌株 ZKY01 的分子鉴定 使用 FastPure Bacteria DNA Isolation Mini Kit(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)试剂盒提取菌株 ZKY01 基因组 DNA, 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 扩增所用引物如表 1 所示。扩增产物送上海生工生物股份有限公司进行测序。PCR 采用 50 μL 反应体系: 2 \times Taq PCR Mix 25 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 2 μL , DNA 模板 2.0 μL , ddH₂O 补足至 50 μL 。PCR 反应体系: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 28 次循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。将测序所得的 16S rDNA、*gyrA*、*gyrB* 基因序列分别在 NCBI 中的核酸数据进行 BLAST 分析, 并用 MEGA7.0 软件构建系统发育树, 其中利用 16S rDNA 构建系统发育树时, 选择 *Alicyclobacillus acidocaldarius* DSM 446 (AJ496806) 作为外群, 利用 *gyrA* 构建发育

表 1 用于菌株 ZKY01 鉴定的引物序列

Table 1 Primer sequences for ZKY01 strain identification

基因 Gene	引物序列 (5'-3') Premier sequence (5'-3')
16S rDNA	F- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R- AAGTCCTAACAAGGTAGCCGT
<i>gyrA</i>	F- CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT R- AGCAATGCCTGGAGCATTACCTTG
<i>gyrB</i>	F- GAAGTCATCATGACCCTTCTG R- CTGCGACATCCGTACCTGCT

树时以 *Klebsiella pneumoniae* SB3432 (FO203501) 作为外群, 利用 *gyrB* 构建发育树时以 *E. coli* (X04341) 为外群。

1.2.5 菌株 ZKY01 的理化性质测定 参考文献 [18] 方法测定菌株最适生长温度、厌氧生长能力、耐盐能力以及溶菌酶、接触酶、氧化酶反应、苯丙氨酸脱氨酶产生能力, 并对菌株的代谢能力开展测定, 如葡萄糖及阿拉伯糖发酵、V.P. 实验、淀粉水解、柠檬酸盐利用、丙酸盐利用、硝酸盐还原亚硝酸盐、木糖、甘露醇、半乳糖、吡啶、硫化氢、二羟基丙酮、酪蛋白、尿素、吐温 80 利用能力测定。

样品送往广东省微生物分析检测中心, 利用 Biolog 细菌鉴定系统测定的碳源对 ZKY01 菌株进行 Biolog 鉴定。

1.2.6 菌株 ZKY01 的生物被膜形成能力测定 参考文献 [17] 开展菌株生物被膜形成能力测定。将 ZKY01 菌株接种于 LB 固体培养基划线活化, 挑取单菌落至 5 mL LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 震荡培养过夜至 OD₆₀₀ 为 0.8~1.0。按照 1% 接种量, 取 50 μL 菌液接种至新的 5 mL LB 液体培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 震荡培养 4 h, 稀释菌液至 OD₆₀₀ 为 0.02。取 9 μL 菌液分别加入到 MS_{gg}、BGM1、BGDM 液体培养基中, 取 2 μL 菌液分别加入至 MS_{gg}、BGM1、BGDM 固体培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置培养 4 d 后, 观察生物被膜形成情况。观察并拍照记录。

1.2.7 菌株 ZKY01 田间防效验证 2019 年秋在韶关市曲江区樟市镇新民村开展 ZKY01 可湿性粉剂防控花生果腐病的田间试验。试验田上茬种植水稻, 水稻收割后, 重新起垄播种花生 (农户自留种, 品种名未知)。花生出苗 10 d 后, 用 1 000 倍稀释的 ZKY01 可湿性粉剂对花生种苗喷淋, 每株 50 mL 左右。以不喷淋上述可湿性粉剂

为对照, 对照区仅防控其他病虫害。对照区和处理区面积均为 266.4 m²。花生收获时, 在处理区和对照区随机选择 3 个样点, 每个样点 10 株花生, 统计单株花生果荚总数、腐烂果荚总数和花生果荚鲜重。

单株果腐病发病率 (%) = (烂果数 / 果荚总数) × 100

防效 (%) = (对照区平均单株果腐病发病率 - 处理区平均单株果腐病发病率) / 对照区平均单株果腐病发病率 × 100

1.2.8 数据分析方法 使用 DPS (2010) 数据分析软件, 采用单因素方差分析和邓肯氏新复极差法开展多重比较。

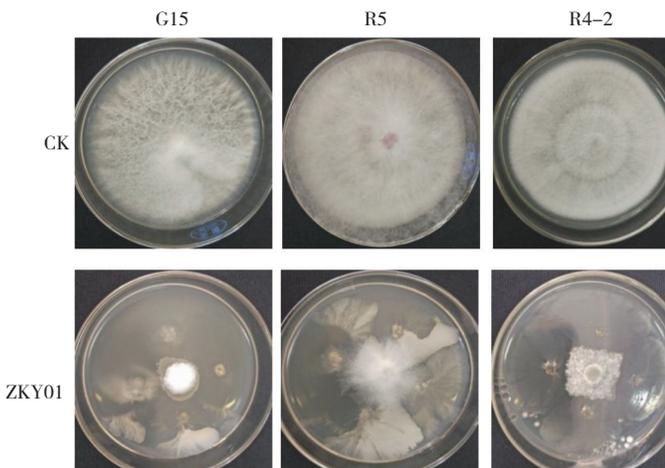


图 1 菌株 ZKY01 对 3 株病原真菌的拮抗效果
Fig. 1 Antagonistic effect of ZKY01 strain against three strains of pathogenic fungi

2.2 菌株 ZKY01 的分子鉴定

为明确菌株 ZKY01 的分类地位, 将菌株 ZKY01 的 16S rDNA 序列于 NCBI 中进行 BLAST 分析, 结果显示, 菌株 ZKY01 与贝莱斯芽胞杆菌 VCN56 (OM349135)、贝莱斯芽胞杆菌 TK2 (OM401682) 等菌株的 16S rDNA 同源性达到 99.86%。系统发育分析显示, ZKY01 与贝莱斯芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌、莫海威芽胞杆菌处于同一分支 (图 3A)。进一步利用 *gyrA*、*gyrB* 序列于 NCBI 中进行 BLAST 分析, 结果显示, ZKY01 的 *gyrA* (图 3B)、*gyrB* 序列 (图 3C) 均与贝莱斯芽胞杆菌处于同一分支。

2.3 菌株 ZKY01 理化性质测定

生理生化测定结果表明, 菌株 ZKY01 能在 3%~10%NaCl 中正常生长, 生长温度为 10~50 ℃,

2 结果与分析

2.1 菌株 ZKY01 对花生果腐病原菌的平板拮抗活性测定

平板拮抗试验结果显示, 菌株 ZKY01 对引起花生果腐病的 G15、R5、R4-2 病原菌具有很强的拮抗活性。静置培养 5 d 后, 对照的病原菌已经长满整个平板, 但是接种 ZKY01 的平板上, 病原菌的菌丝被限制在平板中间 (图 1A、B、C)。其中 ZKY01 对 G15 菌株的抑制率达到 72.23 (±3.36)%, 对 R5 菌株的抑制率达到 54.14 (±10.33)%, 对 R4-2 菌株的拮抗活性达到 69.37 (±2.17)% (图 2)。

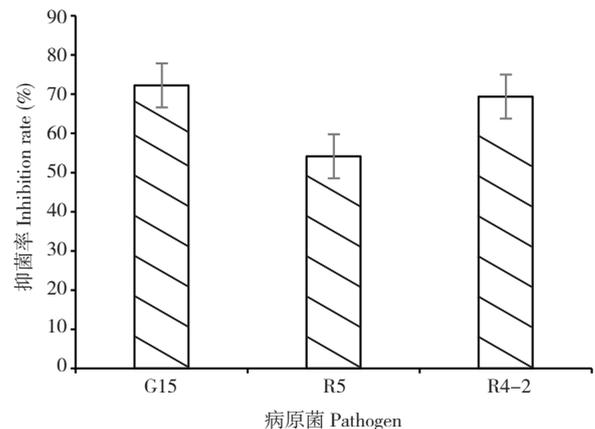


图 2 菌株 ZKY01 对花生果腐病的平板抑菌率
Fig. 2 Plate inhibition rate of ZKY01 strain against the pathogens of peanut pod rot

0.001% 溶菌酶、氧化酶、淀粉水解反应、柠檬酸盐利用、硝酸盐还原亚硝酸盐、酪蛋白水解、尿素分解均为阳性。V.P. 实验、丙酸盐利用、苯丙胺酸脱氢酶、吐温 80 水解为阴性。菌株 ZKY01 能利用葡萄糖、木糖、甘露醇、半乳糖, 无法利用阿拉伯糖; 该菌株可产硫化氢, 无法产吡啶和二羟基丙酮 (表 2)。Biolog 细菌鉴定系统中 Biolog-GN 板碳源测定的 ZKY01 碳源利用结果见表 3, ZKY01 可以利用 α-环式糊精等 50 种碳源。

2.4 菌株 ZKY01 的生物被膜形成能力测定

ZKY01 在 MSgg、BGM1、BGDM 液体培养基上均能形成漂浮的薄皮, 在 MSgg 固体培养基上能够形成具有多重褶皱的菌落, 在 BGM1 固体培养基上形成分支菌落, 在 BGDM 固体培养基上也能形成具有褶皱的菌落 (图 4)。

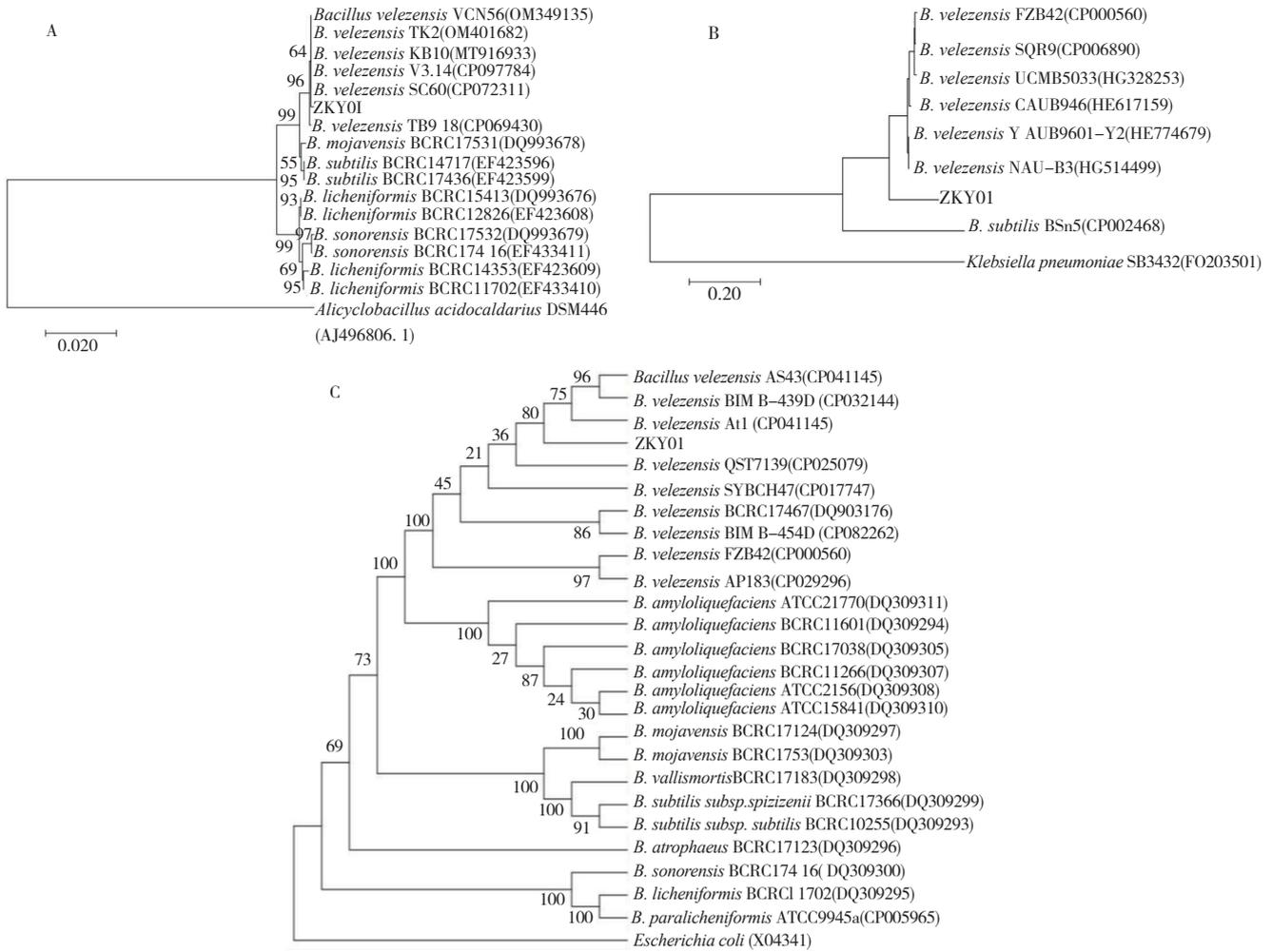


图 3 基于菌株 ZKY01 16S rDNA (A)、*gyrA* (B) 和 *gyrB* (C) 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on 16S rDNA (A), *gyrA* (B) and *gyrB* (C) sequences of ZKY01 strain

表 2 菌株 ZKY01 生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of ZKY01 strain

序号 No.	试验项目 Tested item	结果 Result	序号 No.	试验项目 Tested item	结果 Result	序号 No.	试验项目 Tested item	结果 Result
1	厌氧生长	-	11	最高生长温度 (50℃不長)	-	21	硝酸盐还原亚硝酸盐	+
2	pH5.7 生长	+	12	最低生长温度 (10℃不長)	-	22	苯丙氨酸脱氨酶	-
3	3%NaCl 生长	+	13	葡萄糖产酸	+	23	产吡啶	-
4	5%NaCl 生长	+	14	阿拉伯糖产酸	-	24	产硫化氢	+
5	7%NaCl 生长	+	15	木糖	+	25	产二羟基丙酮	-
6	10%NaCl 生长	+	16	甘露醇	+	26	酪蛋白水解	+
7	0.001% 溶菌酶生长	+	17	半乳糖	+	27	酪氨酸水解	-
8	接触酶	-	18	淀粉水解	+	28	尿素分解	+
9	氧化酶	+	19	柠檬酸盐利用	+	29	吐温 80 水解	-
10	V.P. 实验	-	20	丙酸盐利用	-			

注：“-”表示阴性，“+”表示阳性。
Note: “-” means negative, “+” means positive.

2.5 菌株 ZKY01 对花生果腐病田间防控

田间防治试验结果显示，对照区花生的果腐病发病率为 27.79 (± 5.19) %，处理区花生果腐病发病率为 1.35 (± 0.51) %，两者差异显著，ZKY01 可湿性粉剂苗期喷淋 1 次的果腐病防控效

率 95.14%。对照和处理区各采集 30 株花生，花生果腐病发生情况如图 5 所示，对照区的花生果腐病发生严重，处理区花生果腐病极少。对照区单株果荚质量 69.00(± 6.37) g，处理区单株果荚质量 73.86 (± 3.99) g，两者差异不显著，可见

表3 Biolog 鉴定系统提供的菌株 ZKY01 代谢能力

Table 3 Metabolic capacity of ZKY01 strain provided by Biolog identification system

序号 No.	代谢底物 Metabolic substrate	代谢能力 Metabolic capacity									
1	α -环式糊精	+	24	L-阿拉伯糖	+	47	α -D-乳糖	-	70	β -甲基-葡萄糖苷	+
2	β -环式糊精	+	25	D-阿拉伯糖醇	-	48	乳果糖	-	71	α -甲基-甘露糖苷	-
3	糊精	+	26	熊果苷	+	49	麦芽糖	+	72	帕拉金糖	+
4	糖原	-	27	D-纤维二糖	+	50	麦芽三糖	+	73	D-阿洛酮糖	+
5	菊糖	+	28	D-果糖	+	51	D-甘露醇	-	74	D-棉子糖	+
6	甘露聚糖	+	29	L-海藻糖	-	52	D-甘露糖	+	75	L-鼠李糖	-
7	吐温 40	+	30	D-半乳糖	+	53	D-松三糖	-	76	D-核糖	+
8	吐温 80	+	31	D-半乳糖醛酸	-	54	D-蜜二糖	-	77	水杨苷	+
9	N-乙酰基-D-葡萄糖胺	+	32	龙胆二糖	+	55	α -甲基-D-半乳糖苷	-	78	景天庚酮聚糖	-
10	N-乙酰基- β -D-甘露糖胺	+	33	D-葡萄糖酸	-	56	β -甲基-D-半乳糖苷	-	79	D-山梨醇	+
11	苦杏仁苷	+	34	α -D-葡萄糖	+	57	3-甲基-葡萄糖	+	80	水苏四糖	-
12	D-塔格糖	-	35	m-肌醇	-	58	α -甲基-葡萄糖	-	81	蔗糖	-
13	D-海藻糖	+	36	乳酰胺	-	59	L-丙氨酰胺	-	82	腺苷	+
14	松二糖	+	37	D-乳酸甲基酯	-	60	D-丙氨酸	-	83	2-脱氧腺苷	+
15	D-阿洛酮糖	-	38	L-乳酸	-	61	L-丙氨酸	-	84	肌苷	+
16	D-木糖	+	39	D-苹果酸	-	62	L-丙氨酰-甘氨酸	+	85	胸腺嘧啶	+
17	乙酸	-	40	L-苹果酸	-	63	L-天冬酰胺	+	86	尿核苷	+
18	α -羟基丁酸	-	41	丙酮酸甲基酯	-	64	L-谷氨酸	+	87	腺苷-5'单磷酸	+
19	β -羟基丁酸	-	42	琥珀酸单甲基酯	-	65	甘氨酸-谷氨酸	-	88	胸腺嘧啶-5'单磷酸	+
20	γ -羟基丁酸	-	43	丙酸	-	66	L-焦谷氨酸	+	89	尿核苷-5'单磷酸	-
21	p-羟基-苯乙酸	-	44	丙酮酸	+	67	L-丝氨酸	+	90	D-6磷酸果糖	+
22	α -Ketovaleric acid	-	45	琥珀酸氨酸	-	68	丁二胺	-	91	1-磷酸- α -D-葡萄糖	+
23	N-甲基-L-谷氨酸	-	46	D-L- α -甘油磷酸酯	+	69	甘油	+			

注：“+”表示具有代谢能力，“-”表示不具有代谢能力。

Note: “+” means the strain has metabolic capacity, “-” means the strain does not have metabolic capacity

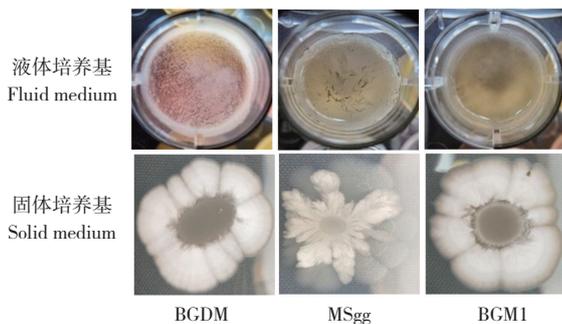


图4 菌株 ZKY01 在不同培养基上的生物被膜形成情况
Fig. 4 Biofilm formed on the different media of ZKY01 strain



图5 ZKY01 喷淋对花生果实果腐病的防控效果
Fig. 5 Control effect of ZKY01 sprayed on peanut pod rot

ZKY01 单次喷淋不具备增产效果。

3 讨论

本研究鉴定菌株 ZKY01 为贝莱斯芽胞杆菌。贝莱斯芽胞杆菌 ZKY01 可在 3%~10%NaCl、pH 5 条件下生长，而温度超过 50℃无法生长，这与已报道的贝莱斯芽胞杆菌特性一致^[19-20]。已报道的贝莱斯芽胞杆菌 19742-1、19742-2 与 ZKY01 均无法利用水苏糖、 α -D-乳糖、D-海藻糖、D-

阿拉伯醇，但 ZKY01 能利用 19742-1、19742-2 无法利用的 D-松二糖、N-乙酰基- β -D 甘露糖胺、D-半乳糖、肌苷^[21]。与报道的菌株相比，贝莱斯芽胞杆菌 ZKY01 能在环境中利用更多的碳源。

芽胞杆菌的生物被膜形成能力与其定殖能力有关^[22-23]。贝莱斯芽胞杆菌 5YN8 生物被膜增强型突变体与野生型相比在叶片定殖量显著增多^[23]，贝莱斯芽胞杆菌 ZKY01 能在 Msgg、

BGM1 以及生物被膜形成缺陷培养基 BGDM 上形成薄皮, 说明该菌株具有很强的生物被膜形成能力。芽胞杆菌的生物被膜形成能力越强, 越能增强其对环境胁迫的抗逆性及生物防治能力^[24-25]。

从花生根际土壤分离的解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) GF-3 和 GF-22 制备的生物有机肥能降低侵脉新赤壳菌 (*N. vasinfesta*) 引起花生果腐病, 防效分别达到 32.35% 和 79.41%, 且增产显著^[12]。从花生根际分离的贝莱斯芽胞杆菌 (*B. velezensis*) Hsg1949 对引起花生果腐病的镰刀菌具有拮抗活性, 在 2×10^8 CFU/mL 和 5×10^8 CFU/mL 施用时对镰刀菌引起花生果腐病防效分别为 66.54% 和 71.27%, 与多菌灵防效 (75.11%) 相当^[13], 而使用 ZKY01 可湿粉苗期喷淋 1 次田间防效可以达到 95.14%, 在花生苗期采用可湿性粉剂喷淋 1 次 (芽胞杆菌用量为 2×10^7 CFU/mL) 的防控方式, 可以显著减少花生果腐病的发生, 防效达到 95.14%, 具有良好的应用前景。芽胞杆菌主要通过产生丰富的脂肽类抗生素来抑制病原菌, 如表面活性素 (Surfactins)、伊枯草菌素 (Iturins) 和芬芥素 (Fengycins)^[22] 等。贝莱斯芽胞杆菌 ZKY01 对不同的病原真菌表现出广谱的拮抗活性, 还需要对其产生的抗生素类物质进一步研究, 以揭示其防治花生果腐烂的机制。

4 结论

本研究筛选到 1 株对花生果腐病具有拮抗活性的生防芽胞杆菌 ZKY01, 经 16S rDNA、gyrA、gyrB 基因序列发育分析鉴定其为贝莱斯芽胞杆菌。ZKY01 能在 MSgg、BGM1、BGDM 液体培养基上形成薄皮, 在 MSgg 固体培养基形成多重褶皱的菌落, 在 BGM1 固体培养基上能形成分支的菌落, 但在 BGDM 固体培养基上却只形成圆形的光滑菌落, 表明 ZKY01 具有很强的生物被膜形成能力, 更容易定殖于植物根系。ZKY01 能够利用 50 种碳源, 具有很强的环境适应性。利用 ZKY01 的可湿性粉剂在大田对花生果腐病进行防控, 其防效达到 95.14%。贝莱斯芽胞杆菌 ZKY01 对花生果腐病表现出良好的防控效果, 可用于花生土传病害的防控, 但防控机制还有待深入研究。

参考文献 (References):

[1] 王传堂, 禹山林, 于洪涛, 王秀贞, 唐月昇, 崔凤高, 陈殿绪, 张建成,

- 李术臣. 花生果腐病原分子诊断 [J]. 花生学报, 2010,39(1): 1-4. DOI: 10.3969/j.issn.1002-4093.2010.01.001.
- WANG C T, YU S L, YU H T, YU S T, WANG X Z, TANG Y Y, CUI F G, CHEN D X, ZHANG J C, LI S C. Molecular diagnosis of peanut pod rot pathogens [J]. *Journal of Peanut Science*, 2010,39(1):1-4. DOI:10.3969/j.issn.1002-4093.2010.01.001.
- [2] 李术臣, 陈丹, 贾海民, 赵聚莹, 康海燕, 张根启. 花生果腐病研究进展 [J]. 河北农业科学, 2010,14(9):74-75. DOI:10.3969/j.issn.1088-1631.2010.09.027.
- LI S C, CHEN D, JIA H M, ZHAO J Y, KANG H Y, ZHANG G Q. Research progress of peanut rot [J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2010,14(9): 74-75. DOI:10.3969/j.issn.1088-1631.2010.09.027.
- [3] 邢珏, 许毓钊, 苏钰彤, 魏欣莹, 江海琪, 喻国辉, 尹艳. 广东花生果腐病原菌鉴定及药剂筛选试验 [J]. 广东农业科学, 2022,49(8): 73-80. DOI: 10.16768/j.issn.1004-874X.2022.08.009.
- XING J J, XU Y Z, SU Y T, WEI X Y, JIANG H Q, YU G H, YIN Y. Identification of peanut pod rot pathogens in Guangdong Province and screening of fungicides [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022, 49(8):73-80. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2022.08.009.
- [4] 李术臣, 贾海民, 赵聚莹, 陈丹. 河北省花生果腐病原菌鉴定及致病性研究 [J]. 河北农业科学, 2011,15(5): 37-39. DOI: 10.3969/j.issn.1088-1631.2011.05.013.
- LI S C, JIA H M, ZHAO J Y, CHEN D. Pathogens identification and pathogenicity pod rot in Hebei Province [J]. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 2011,15(5):37-39. DOI:10.3969/j.issn.1088-1631.2011.05.013.
- [5] 张成玲, 张田田, 吴翠霞, 路兴涛. 花生果腐病原菌鉴定及生物学特性 [J]. 花生学报, 2016,45(3): 27-31. DOI: 10.14001/j.issn.1002-4093.2016.03.005.
- ZHANG C L, ZHANG T T, WU C X, LU X T. Identification and biological characteristics of fungal isolates causing peanut pod rot pathogen [J]. *Journal of Peanut Science*, 2016,45(3):27-31. DOI:10.14001/j.issn.1002-4093.2016.03.005.
- [6] 刘小玉, 付登强, 余凤玉, 杨伟波, 尹欣幸. 海南花生果腐病原菌的分离、鉴定及生物学特性研究 [J]. 江苏农业科学, 2020,48(6): 104-107. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2020.06.021.
- LIU X Y, FU D Q, YU F Y, YANG W B, YIN X X. Isolation, identification and biological characteristics of peanut fruit rot pathogen in Hainan Province [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020,48(6): 104-107. DOI: 10.15889/j.issn.1002-1302.2020.06.021.
- [7] 刘晓光, 范燕, 赵雪飞, 陈志, 陈胜萍. 冀东地区花生果腐病发生动态及致病因子研究 [J]. 花生学报, 2021,50(3): 55-60. DOI: 10.14001/j.issn.1002-4093.2021.03.008.
- LIU X G, FAN Y, ZHAO X F, CHEN Z, CHEN S P. Study on the occurrence dynamics and pathogenic factors of pod rot in eastern Hebei [J]. *Journal of Peanut Science*, 2021,50(3): 55-60. DOI: 10.14001/j.issn.1002-4093.2021.03.008.
- [8] SUN W M, FENG L N, GUO W, LIU D Q, LI Y N, RAN L X. First report of peanut pod rot caused by *Neocosmospora vasinfesta* in northern China [J]. *Plant Disease*, 2012,96(3):455. DOI:10.1094/PDIS-03-11-0240.
- [9] SUN W M, FENG L N, GUO W, LIU D Q, YANG Z H, LIU L F, RAN L X, MENG Q F. First report of *Neocosmospora striata* causing peanut pod rot in China [J]. *Plant Disease*, 2012,96(1):146. DOI:10.1094/PDIS-06-11-0461.

- [10] 杨富军, 王绍伦, 张丽, 李春洁, 朱统国, 刘海龙, 周玉萍, 孙晓苹, 高华援. 吉林省高纬度地区花生果腐病药剂防治效果[J]. 安徽农业科学, 2015,43(5): 140-141. DOI: 10.13989/j.cnki.0517-6611.2015.05.053.
YANG F J, WANG S L, ZHANG L, LI C J, ZHU T G, LIU H L, ZHOU Y P, SUN X P, GAO H Y. Control effects of agent against peanut pod rot at high latitudes [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015,43(5):140-141. DOI:10.13989/j.cnki.0517-6611.2015.05.053.
- [11] 于静, 李莹, 许曼琳, 张霞, 郭志青, 吴菊香, 迟玉成. 花生品种对花生果腐病的抗性鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2020,42(4): 681-686. DOI: 10.19802/j.issn.1007-9084.2020015.
YU J, LI Y, XU M L, ZHANG X, GUO Z Q, WU J X, CHI Y C. Evaluation of resistance of different peanut varieties to peanut pod rot [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2020,42(4): 681-686. DOI:10.19802/j.issn.1007-9084.2020015.
- [12] 孙伟明, 时晨, 张梦涛, 赵丹, 陈璇, 冯丽娜, 罗永松, 郭巍. 花生侵脉新赤壳菌果腐病生防芽胞杆菌的分离鉴定及防病效果[J]. 微生物学报, 2018,58(9): 1573-1581. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20170528.
SUN W M, SHI C, ZHANG M T, ZHAO D, CHEN X, FENG L N, LUO Y S, GUO W. Isolation and identification of *Bacillus* spp. controlling *Neocosmospora* pod rot of peanut [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018,58(9):1573-1581. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.20170528.
- [13] 曹伟平, 陆晴, 鹿秀云, 臧卫平, 宋健. 花生果腐病拮抗菌贝莱斯芽胞杆菌 Hsg1949 鉴定与防效[J]. 中国生物防治学报, 2021,37(4): 761-770. DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2021.04.005.
CAO W P, LU Q, LU X Y, ZANG W P, SONG J. Identification of antagonistic bacterium *Bacillus velezensis* Hsg1949 and its biocontrol effect on peanut pod rot [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021,37(4):761-770. DOI:10.16409/j.cnki.2095-039x.2021.04.005.
- [14] 刘洋, 刘晓昆, 陈文浩. 贝莱斯芽胞杆菌 (*Bacillus velezensis*) 物种名称的“前世今生”[J]. 生物技术通报, 2019,35(7):230-232. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2019-0600.
LIU Y, LIU X K, CHEN W H. “Past and present” species name of *Bacillus velezensis* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019,35(7):230-232. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2019-0600.
- [15] 张文博, 李昱龙, 周蕾, 沈东霞, 朱丽华, 樊奔. 植物根际益生菌代表菌株贝莱斯芽胞杆菌 FZB42 对松材线虫的抑杀性[J]. 微生物学报, 2021,61(5): 1287-1298. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20200372.
ZHANG W B, LI Y L, ZHOU L, SHEN D X, ZHU L H, FAN B. Inhibition of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(5):1287-1298. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.20200372.
- [16] BRANDA, STEVEN, GONZÁLEZ-PASTOR, ETIENNE D S, DUSKO E, RICHARD L, ROBERTO K. Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis* [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004,186(12):3970-3979. DOI:10.1128/JB.186.12.3970-3979.2004.
- [17] 李一平, 沈汉国, 喻国辉, 王燕, 李驰, 叶志文, 周东辉, 吴绪波. 一种芽胞杆菌生物被膜形成缺陷培养基的研究[J]. 广东农业科学, 2016,43(9): 98-104. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2016.09.015.
LI Y P, SHEN H G, YU G H, WANG Y, LI C, YE Z W, ZHOU D H, WU X B. Study on bacillus biofilm growth defective culture medium [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2016,43(9):98-104. DOI:10.16768/j.issn.1004-874X.2016.09.015.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG X Z, CAI M Y. Handbook for identification of common bacterial systems [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [19] 陶永梅, 潘洪吉, 张小利, 黄健, 李鹏, 卢志军. 贝莱斯芽胞杆菌 NSZ-YBGJ001 的鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2020,47(2): 324-331. DOI: 10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2019115.
TAO Y M, PAN H J, ZHANG X L, HUANG J, LI P, LU Z J. Identification and biological characteristics of *Bacillus velezensis* NSZ-YBGJ001 [J]. *Journal of Plant Protection*, 2020,47(2):324-331. DOI:10.13802/j.cnki.zwbhxb.2020.2019115.
- [20] 赵昱榕, 李磊, 谢学文, 石延霞, 柴阿丽, 孙广玉, 李宝聚. 贝莱斯芽胞杆菌 ZF2 对多主棒孢病菌防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2019,35(2): 217-225. DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.02.018.
ZHAO Y R, LI L, XIE X W, SHI Y X, CHAI A L, SUN G Y, LI B J. Biocontrol effect of *Bacillus velezensis* strain ZF2 against *Corynespora cassiicola* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2019,35(2): 217-225. DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.02.018.
- [21] 郭鹤宝, 王星, 何山文, 张晓霞. 表型特征结合基因组分析鉴定不同菌落形态 *Bacillus velezensis* ACCC 19742 [J]. 生物技术通报, 2020,36(2): 142-148. DOI: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2019-0750.
GUO H B, WANG X, HE S W, ZHANG X X. Phenotypic characteristics combined with genomic analysis to identify different colony morphology *Bacillus velezensis* ACCC 19742 [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020,36(2):142-148. DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2019-0750.
- [22] MASA AKI M. Beneficial biofilm formation by industrial bacteria *Bacillus subtilis* and related species [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006,101(1): 1-8.
- [23] 司方洁, 任金瑶, 黄海祥, 俞仪阳, 郭坚华, 蒋春号. 贝莱斯芽胞杆菌 5YN8 生物被膜在防治番茄灰霉病过程中的功能研究[J]. 中国生物防治学报, 2022,38(5): 1223-1230. DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2022.06.010.
SI F J, REN J Y, HUANG T X, YU Y Y, GUO J H, JIANG C H. The function of *Bacillus velezensis* 5YN8 biofilm in controlling of botrytis cinerea in tomato [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022,38(5):1223-1230. DOI:10.16409/j.cnki.2095-039x.2022.06.010.
- [24] 凡肖, 束长龙, 关雄, 黄天培. 细菌生物被膜在生物防治中的作用[J]. 中国生物防治学报, 2018,34(5):791-801. DOI:10.16409/j.cnki.2095-039x.2018.05.019.
FAN X, SHU C L, GUAN X, HUANG T P. Progress in the application of bacterial biofilm on biological control [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2018,34(5):791-801. DOI:10.16409/j.cnki.2095-039x.2018.05.019.
- [25] 李生樟, 陈颖, 杨瑞环, 张翠萍, 刘昭, 李逸朗, 陈涛, 陈功友, 邹丽芳. 一株拮抗黄单胞菌的贝莱斯芽胞杆菌的分离和鉴定[J]. 微生物学报, 2019,59(10):1969-1983. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.20180513.
LI S Z, CHEN Y, YANG R H, ZHANG C P, LIU Z, LI Y L, CHEN T, CHEN G Y, ZOU L F. Isolation and identification of a *Bacillus velezensis* strain against plant pathogenic *Xanthomonas* spp. [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019,59(10):1969-1983. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.20180513.