# 大豆锈病生防菌筛选体系的建立及防治效果评价

严晨怡　张紫谊　丘安扬　蒋春号　牛冬冬*

（农林生物安全全国重点实验室，南京农业大学植物保护学院，南京 210095）

**摘要：**为筛选有效防治由豆薯层锈菌 *Phakopsora pachyrhizi* 引起的大豆锈病的生防菌，鉴于该菌是活体专性寄生菌，无法通过传统方法筛选，通过活体植株侵染方法建立筛选体系，从健康大豆叶片中筛选生防菌，根据形态学特征及 *16s rDNA* 序列分析结果对拮抗菌株进行鉴定，通过孢子萌发抑制试验测定菌株对豆薯层锈菌的抑制作用，同时检测菌株处理后大豆相关抗病基因的表达，并通过温室试验评价其防治效果。结果表明：从健康大豆叶片中分离得到521株菌株，筛选得到5株对豆薯层锈菌防治效果大于70%的菌株，其中菌株z373的防治效果最佳，达到83%。根据形态学特征及 *16s rDNA* 序列分析结果将菌株z373鉴定为枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*。该菌株不但对豆薯层锈菌夏孢子的萌发有较好的抑制效果，还可以提高大豆防御相关基因的表达水平，抑制豆薯层锈菌夏孢子的致病能力。大豆叶面预先接种拮抗菌株菌液后再喷施浓度为 $1\times10^5$ 个/mL 的豆薯层锈菌孢子悬浮液，28 d后防治效果仍达72.5%。表明枯草芽胞杆菌菌株z373具有较好的生防潜力，可为大豆锈病的绿色防控提供备选生防菌。

**关键词：**大豆锈病；豆薯层锈菌；枯草芽胞杆菌；生物防治；鉴定

# Establishment a screening system for biocontrol bacteria against soybean rust and evaluation of their control efficacy

Yan Chenyi　Zhang Ziyi　Qiu Anyang　Jiang Chunhao　Niu Dongdong*

（College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University; State Key Laboratory of Agricultural and Forestry Biosecurity, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China）

**Abstract:** To screen effective biocontrol bacteria against soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*, an obligate biotrophic fungus that cannot be screened using conventional methods, a screening system based on inoculation of living soybean plants was established. Biocontrol bacteria were isolated from healthy soybean leaves, and antagonistic strains were identified based on morphological characteristics and *16S rDNA* sequence analysis. Their inhibitory activity against *P. pachyrhizi* was evaluated using urediniospore germination inhibition assays. The expression of soybean defense-related genes following bacterial treatment was also determined, and greenhouse experiments were performed to evaluate the control efficacy of the selected strains. A total of 521 bacterial strains were isolated from healthy soybean leaves, among which five strains exhibited control efficacies greater than 70% against P. pachyrhizi. Strain z373 presented the highest control efficacy, reaching 83%. Based on morphological characteristics and *16S rDNA* sequence analysis, strain z373 was identified as *Bacillus subtilis*. This strain not only effectively inhibited the germination of *P. pachyrhizi* urediniospores but also enhanced the expression of soybean defense-related genes, thereby suppressing the pathogenicity of the pathogen. After pre-

基金项目：国家重点研发计划项目(2023YFD1401000)

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：ddniu@njau.edu.cn

收稿日期：2026-01-19

inoculating soybean leaves with a suspension of antagonistic bacterial strain z373, they were sprayed with a suspension of *P. pachyrhizi* spores at a concentration of $1\times10^5$ spores/mL. The control efficacy remained 72.5% at 28 days post inoculation. These findings indicate that *B. subtilis* z373 has considerable potential as a biocontrol agent and may serve as a promising candidate for the green prevention and control of soybean rust.

**Key words:** soybean rust; *Phakopsora pachyrhizi*; *Bacillus subtilis*; biological control; identification

大豆*Glycine max*属于豆科一年生草本植物，是人类优质蛋白、油脂和维生素等营养物质的重要来源，也是最重要的粮食作物和经济作物之一，在全世界广泛种植（Yadav et al.，2017）。随着人们对植物蛋白质和油料的需求日益增长，大豆的种植面积也随之增加，产量连年增长。然而大豆的生长过程极易受到多种病害的影响，尤其是真菌种传病原菌所引起的病害（Kim et al.，2022），大豆锈病就是其中之一（Juliatti & Zambolim，2021）。

豆薯层锈菌*Phakopsora pachyrhizi*为大豆锈病的主要病原物之一，由于其最早在亚洲被发现，因此将其所引起的锈病称为亚洲大豆锈病。大豆锈病属于气传性、专性寄生病害，在大豆的整个生育期均能发生，主要侵染叶片、叶柄和茎部，在田间发病后可使大豆在短时间内落叶早衰。发病初期叶片上出现黄色小斑点，随后病斑稍扩大，形成受叶脉限制的黄褐色或深棕色病斑。病斑密度增大后会逐渐连成片，形成一个个坏死斑，叶背面症状更明显，病部会隆起形成夏孢子堆，表皮破裂后释放出大量浅黄色的夏孢子，发生严重时产量损失巨大。几乎所有商业大豆品种都对豆薯层锈菌敏感，一般使用多种杀菌剂来控制大豆锈病（Hossain et al.，2023）。防治大豆锈病的杀菌剂主要有粉锈宁（王平山等，2020）、三唑类（陈宸等，2021）、甲氧基丙烯酸酯类（刘西莉等，2022）和吡唑酰胺类（罗跃等，2022）等，但长期过量使用会造成病原菌抗药性增强、环境污染等问题，因此急需一种新型手段来防治大豆锈病。

生防菌是一类存在于土壤根际或是植物枝叶中的能促进植物生长并抑制病原菌侵染植物的有益微生物（Harbort et al.，2020；林亚琪等，2025）。目前农作物病害的生物防治主要集中于生防微生物及其活性代谢产物的开发与应用，细菌中研究较多的类群包括芽胞杆菌属*Bacillus*（张华梦等，2021）和假单胞菌属*Pseudomonas*（Lee et al.，2020；王德等，2025）；真菌中则以木霉属*Trichoderma*的研究和应用较广泛（Martanto et al.，2020）。此外，放线菌中的链霉菌属*Streptomyces*也是当前研究热点（陈嘉敏等，2017）。但目前用于大豆锈病防治的生防菌主要为外源生防菌剂，在大豆上的定殖能力弱于内生菌，且防治效果一般。芽胞杆菌作为生防菌的一大类（代晓雪等，2024），具有抗逆性强和抑菌谱广的特点，被广泛用于植物病害的防治（吴慧芳等，2024）。已有研究表明，枯草芽胞杆菌*Bacillus subtilis*可有效防治小麦赤霉病（王雅平等，1992）、黄瓜枯萎病（钱运龙等，2025）和烟草黑胫病（Han et al.，2016）等多种病害，其可以形成稳定的生物膜结构，通过竞争生态位和营养资源，有效阻止病原菌在植物根际或叶片中的定殖。此外，枯草芽胞杆菌能诱导植物产生系统抗性，增强植物自身对病害的防御能力（Yánez-Mendizábal et al.，2023）；并通过激活植物体内的水杨酸和茉莉酸等免疫信号通路，诱导防御相关物质的表达，如病程相关蛋白和抗氧化酶等，从而提高植物对多种病原菌的抵抗力（韩腾等，2016）。在棉花黄萎病的研究中，枯草芽胞杆菌NCD-2菌株通过激活水杨酸和茉莉酸信号通路，显著增强了棉花对黄萎病菌*Verticillium dahliae*的抗性，且其脂肽类代谢产物同样能诱导植物免疫反应，达到防病效果（Mo et al.，2025）。

由于豆薯层锈菌属于专性寄生真菌，传统平板对峙培养筛选生防菌的方式并不适用，因此目前用于防治大豆锈病的生防菌研究较少。本研究拟通过活体植株侵染方法建立大豆锈病的生防菌筛选体系，分离筛选出拮抗菌株并对其进行鉴定，进一步通过温室试验验证其防治效果，探究其抑制大豆锈病发生的作用机制，以期为大豆锈病的生物防治提供有效资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试植株和菌株：大豆品种Williams 82为易感病品种，种子由南京农业大学植物保护学院卵菌与真菌分子生物学实验室提供。提前加水搅拌蛭石，待完全湿润后盛入直径15 cm、高15 cm的育苗钵中，将种子播于钵内，于温度25 ℃、光周期16 h光照/8 h

黑暗条件下培养14 d，即2叶期时，每钵定苗16株供试。豆薯层锈菌菌株SS4的孢子粉同样由上述实验室提供，于−80 ℃保存备用。

供试样品：2023年10月自四川省自贡市的大豆锈病发病田块采集健康大豆植株叶片，随机选取5个田块，每块田取10片叶片，于4 ℃保存供试。

培养基：Luria-Bertani（LB）固体培养基成分为酵母浸粉5 g、氯化钠10 g、胰蛋白胨10 g、琼脂粉15 g，超纯水定容至1 L，调节pH至7.2；LB固体培养基配方中去掉琼脂粉即制得LB液体培养基。

试剂：细菌基因组DNA提取试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；植物RNA提取试剂盒，江苏有康生物科技有限公司；2×PCR Master Mix、反转录试剂盒、ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix，南京诺唯赞生物科技股份有限公司；其余试剂均为国产分析纯。

仪器：LR5645微量冷冻台式离心机、BIOMATE 3S紫外/可见蛋白核酸分析仪，赛默飞世尔科技公司；SPX-2508SH-II生化培养箱，上海新苗医疗器械有限公司；T20基因扩增仪，杭州朗基科学仪器有限公司；E100体式显微镜，日本Nikon公司；LineGene 9600 plus荧光定量PCR仪，博日杭州科技股份有限公司；QI G5000凝胶成像仪，广州道一科学技术有限公司；PowerPac Basic型电泳仪，美国Bio-Rad公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大豆叶片内生菌的分离纯化

在超净台中将供试大豆健康叶片剪碎成小块，置于45 mL无菌水中，200 r/min振荡培养1 h，使用无菌纱布过滤得到悬浊液，并采用10倍梯度稀释法制备$10^{-3}$、$10^{-4}$、$10^{-5}$的悬浊液。分别吸取100 μL不同浓度悬浊液涂布于LB固体平板上，每个浓度3个重复，每个重复1个平板。28 ℃培养48 h，挑取平板上颜色、光泽度、大小和类型不同的单菌落，纯化计数并做好标记后于−80 ℃保存备用。

#### 1.2.2 拮抗菌株的筛选

将分离菌株分别置于LB液体培养基中，于28 ℃、180 r/min条件下振荡培养24 h，将菌液稀释5倍后按体积比1∶1 000加入吐温20混匀，分别喷洒至大豆2叶期活体叶片表面，每片叶片喷洒约1 mL，每株菌株重复4片叶片，即两株大豆幼苗。喷洒每株菌株菌液时采取隔离措施，以防交叉接种。于温室25 ℃自然条件下培养24 h，备用。将装有豆薯层锈菌菌株SS4孢子粉的2 mL EP管从−80 ℃冰箱取出，于42 ℃水浴热激5 min，加入吐温20洗涤孢子，室温下以12 000 r/min离心3 min，弃废液。在沉淀中加入$ddH_2O$制成浓度为$1\times10^5$个/mL的孢子悬浮液，均匀喷洒至上述接种分离菌株菌液后24 h的大豆叶片表面，每片叶片喷施约1 mL，黑暗处理24 h后转移至25 ℃光照培养箱，以仅喷施等量清水的植株为对照。14 d后观察叶片发病情况，使用Adobe photoshop CC 2018软件统计各处理锈孢子堆数量，计算每平方厘米相对锈孢子堆数量、病情指数和防治效果。大豆锈病发生程度的分级标准：0级，叶片未见发病；1级，叶部见病斑，病斑面积占叶部面积的比例≤1%；3级，叶背面孢子堆呈零星分布，1%<病斑面积占叶部面积的比例≤10%；5级，叶片发病较严重，10%<病斑面积占叶部面积的比例≤25%；7级，叶片发病面积较大，25%<病斑面积占叶部面积的比例≤70%；9级，叶片发病严重，病斑面积占叶部面积的比例>70%。病情指数=$\frac{\sum(\text{各级病叶数}\times\text{各病级代表值})}{(\text{最高级代表值}\times\text{调查总叶片数})}\times100$；防治效果=（空白对照组的病情指数−用药处理组的病情指数）/空白对照组的病情指数×100%。试验进行3轮筛选方法，从上述初筛试验中选择防治效果达60%以上的菌株进行第2轮筛选，方法同初筛；从复筛试验中选择防治效果达75%以上的菌株进行第3轮筛选，方法同初筛，但每株菌株菌液重复16株大豆幼苗（即1钵）。最后选择防治效果最高的菌株，进行3次重复试验，方法同上，以验证其效果的稳定性。

#### 1.2.3 拮抗菌株的鉴定

将1.2.2筛选得到的防治效果最高的拮抗菌株接种至LB固体平板上，于28 ℃恒温培养24 h，参照《常见细菌系统鉴定手册》对其进行形态学特征观察。记录菌株的形状、颜色、质地，最后进行革兰氏染色和显微镜形态观察。

挑取纯化后的拮抗菌株单菌落至LB液体培养基中，28 ℃、180 r/min条件下振荡培养24 h收集菌体，使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株基因组DNA，作为模板备用。采用引物对27F/1492R和gyrB-F/gyrB-R（表1）分别扩增用于鉴定芽胞杆菌种属的保守基因*16S rDNA*序列和DNA回旋酶亚基B（DNA gyrase subunit B，gyrB）基因序列。本研究所有引物均由南京擎科生物科技有限公司合成。20 μL PCR反应体系：2×PCR Master Mix 10 μL、$ddH_2O$ 4 μL、上下游引物各2 μL、模板DNA 2 μL。PCR扩增程序：95 ℃预变性5 min；95 ℃变性15 s，56 ℃退火15 s，72 ℃延伸1 min，30个循环；最后72 ℃延伸

5 min。将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测后，回收纯化产物并委托江苏有康生物科技有限公司进行测序。将测序所得*16S rDNA*和*gyrB*序列上传至NCBI进行BLAST比对分析，以初步鉴定拮抗菌株的分类地位。进一步基于*16S rRNA*序列，以序列相似性≥95%为阈值，下载与之相似性最高的16株参考菌株序列，使用MEGA 12.0软件以邻接法构建系统发育进化树，重复检验1 000次。

**表1 本研究所用引物**

Table 1 Primers used in this study

| 引物 Primer | 序列(5′−3′) Sequence (5′−3′) | 目的 Application | 产物大小 Product size/bp | 退火温度 Annealing temperature/℃ |
|---|---|---|---|---|
| 27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | *16S rDNA*基因扩增 *16S rDNA* gene amplification | 1 500 | 56.9 |
| 1492R | GGTTACCTTGTTACGACTT | | | 52.2 |
| *gyrB*-F | GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYG-CNGGNGGNAARTTYGA | *gyrB*基因扩增 *gryB* gene amplification | 1 200 | 58.0 |
| *gyrB*-R | AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRT-CNGCRTCNGCRTCNGTCAT | | | 58.0 |
| *CHS*-qRTF | CCCAAGCCGATTACCCTGA | *CHS*基因的qPCR检测 qPCR analysis of the *CHS* gene | 150 | 59.1 |
| *CHS*-qRTR | GATTTCCTCCACGGTCACCA | | | 59.7 |
| *AOS*-qRTF | GTCTCCTCTCTCTTGCCCTTCT | *AOS*基因的qPCR检测 qPCR analysis of the *AOS* gene | 150 | 60.9 |
| *AOS*-qRTR | AGGTAAGTAGTAGTACGAGTGG | | | 55.9 |
| *PR2*-qRTF | CACAGATCAAGCTCCAGGGG | *PR2*基因的qPCR检测 qPCR analysis of the *PR2* gene | 150 | 60.1 |
| *PR2*-qRTR | TGGCACACCATACCTCTTG | | | 57.0 |
| *Actin*-qRTF | GCGGGAAATTGTAAGGGATGT | *Actin*基因的qPCR检测 qPCR detection of *Actin* gene | 150 | 58.6 |
| *Actin*-qRTR | TCGCCAATAGTGATGACCTG | | | 57.4 |

R=A/G; Y=C/T; N=A/G/C/T.

**1.2.4** 拮抗菌株抑制锈菌孢子萌发能力的测定

将拮抗菌株接种于LB液体培养基中，28 ℃、180 r/min条件下振荡培养24 h，当其$OD_{600\ nm}$为1时，测定菌液浓度约为$2\times10^8$~$4\times10^8$ CFU/mL。将菌液分别稀释5倍、10倍和100倍，浓度分别约为$4\times10^7$~$8\times10^7$、$2\times10^7$~$4\times10^7$、$2\times10^6$~$4\times10^6$ CFU/mL，分别处理相同浓度的锈菌孢子悬浮液，制备方法同1.2.2，稀释菌液与锈菌孢子悬浮液体积比为1∶1。各处理在28 ℃培养36 h，每个处理取10 μL溶液滴于血球计数板上，随机选取6个视野，计数大豆锈菌总孢子数量与萌发孢子数量，计算萌发率。每个处理重复3次。

**1.2.5** 拮抗菌株对大豆体内抗病相关基因的影响测定

采用1.2.4方法制备拮抗菌株菌液，浓度调整至$5\times10^7$ CFU/mL，待大豆生长至3叶期，将其均匀喷洒至二出复叶表面，每片叶片喷洒约1 mL，以喷洒等量清水为对照；24 h后在同株三出复叶上再接种大豆锈菌孢子悬浮液，浓度为$1\times10^5$个/mL，每片叶片喷洒约1 mL，14 d后观察三出复叶上的锈菌侵染情况，并取样定量检测靶标基因的表达量。分别取处理与对照三出复叶组织各100 mg，于−20 ℃预冷研钵中用液氮研磨成沫后，迅速转入1.5 mL离心管中，加入TRIzol试剂1 mL，按照说明书提取植物总RNA，用反转录试剂盒参照说明书合成cDNA，作为模板备用。

本研究选择3种大豆防御相关基因进行检测，分别为查尔酮合成酶（chalcone synthase，CHS）基因、病程相关蛋白2（pathogenesis-related protein 2，PR2）基因和丙二烯氧化物合酶（allene oxide synthase，AOS）基因。以大豆*Actin*为内参基因，利用引物*CHS*-qRTF/*CHS*-qRTR、*PR2*-qRTF/*PR2*-qRTR和*AOS*-qRTF/*AOS*-qRTR（表1）进行目的基因的实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）检测。20 μL反应体系：ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL、上下游引物各0.4 μL、cDNA 2 μL，用去离子水补足至20 μL。反应程序：95 ℃预变性30 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火34 s，共40个循环，测定其循环阈值（cycle threshold，Ct），采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算相关基因的相对表达量，每个处理重复3次。

**1.2.6** 拮抗菌株对大豆锈病的温室防治效果试验

将拮抗菌株接种于LB液体培养基中，于28 ℃、180 r/min条件下振荡培养至菌液$OD_{600\ nm}$为1，稀释5倍后得到生防菌剂，浓度为$5\times10^7$ CFU/mL。将其喷施至大豆2叶期活体叶片表面，每片叶片约喷施1 mL，以喷施等量清水的大豆植株为对照。喷施后24 h再喷雾接种大豆锈菌孢子悬浮液（制备方法同

1.2.2)，浓度为1×10$^5$个/mL，每片叶片喷洒约1 mL，待到大豆叶片处于湿润状态，再将其置于温度25 ℃、光周期16 h光照/8 h黑暗且高湿的培养箱内培养，以喷雾接种仅喷水的植株为对照。试验期间及时保湿，14 d与28 d后观察各处理大豆锈病的发生情况，计算病情指数和防治效果，检验其持效性。

### 1.3 数据分析

采用Excel 2021软件整理试验数据，使用DPS 9.01软件进行方差分析，并通过最小显著差数(least significant difference，LSD)法进行处理间的差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆锈病生防菌的分离保存

利用采集得到的大豆叶片样品制备出10$^{-3}$、10$^{-4}$、10$^{-5}$三个梯度的悬浊液并涂布于LB平板上，48 h后长出颜色、光泽度、大小和类型不同的单菌落(图1)，挑选统计后最终共纯化获得521株细菌，所有菌株均保存在南京农业大学生物农药及绿色植保实验室−80 ℃冰箱中备用。

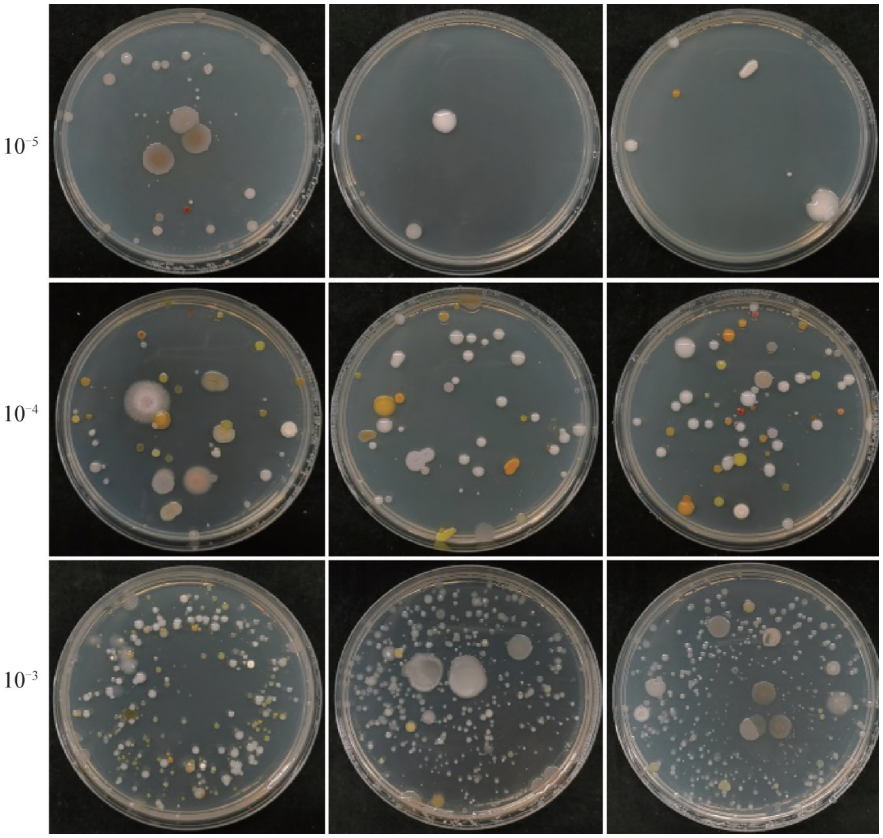


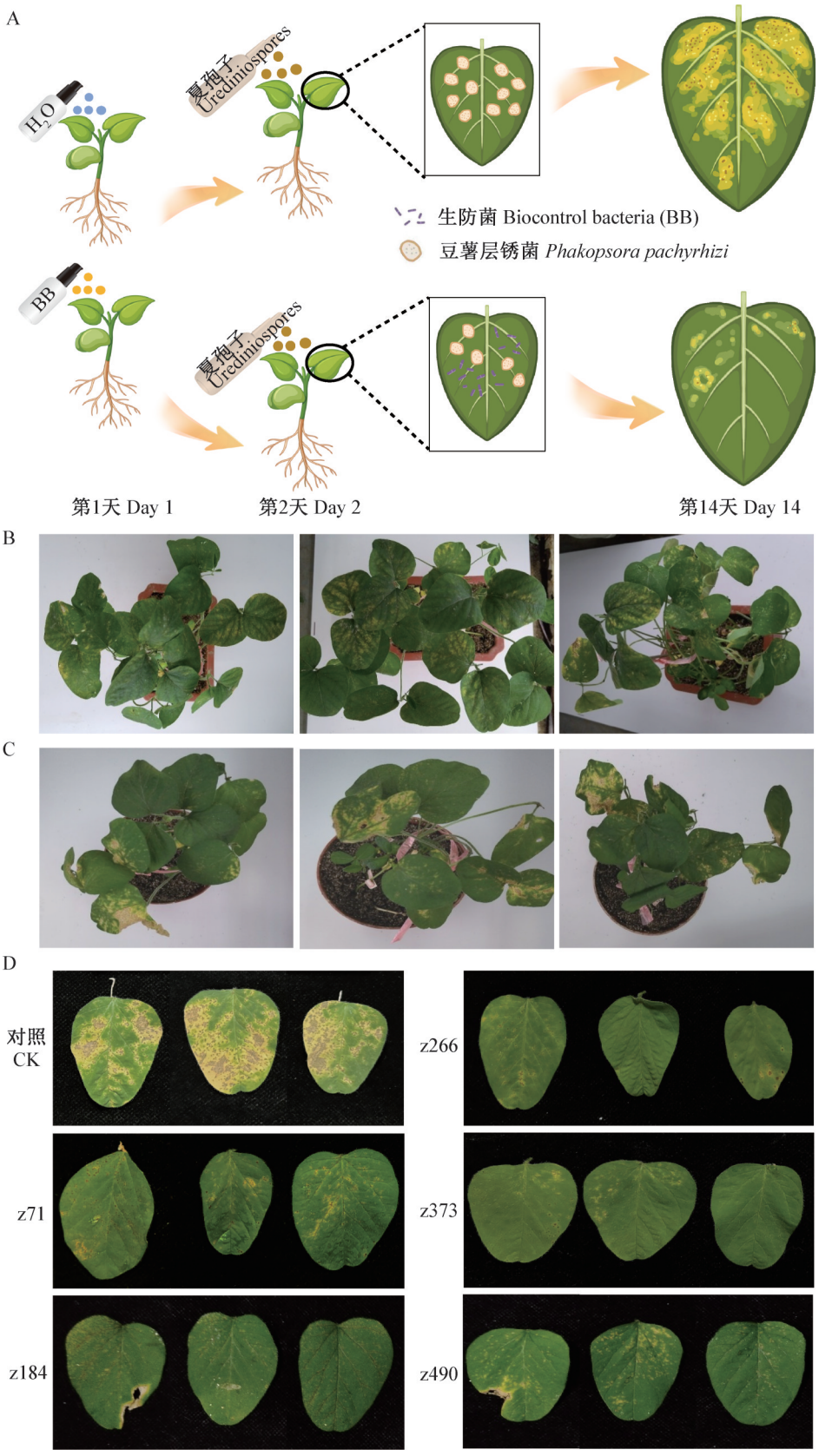

**图1 大豆锈病生防菌的分离**

Fig. 1 Isolation of bacterial strains from healthy soybean leaves

### 2.2 大豆锈菌生防菌活体筛选体系的建立

由于大豆锈菌为活体专性寄生菌，不能利用平板培养，本研究主要通过对活体叶片喷施新鲜细菌菌液后接种致病菌，观察分离菌株对大豆锈病的防治效果，筛选具有高防治效果的菌株，建立防治大豆锈病的活体筛菌体系(图2-A)。第1轮进行初步广筛，从521株分离菌株中筛选到120株防治效果达60%以上的菌株，这些菌株处理与清水对照相比，有效减轻了病害发生，使夏孢子堆数量减少，病斑面积减小(图2-B)。对120株菌株进行第2轮筛选，获得防治效果达75%以上的菌株共37株(图2-C)；第3轮筛选从37株菌株中筛选到z266、z71、z373、z184和z490这5株菌株对大豆锈病表现出较稳定的防治效果(图2-D)，防治效果分别达72%、80%、83%、75%和73%。

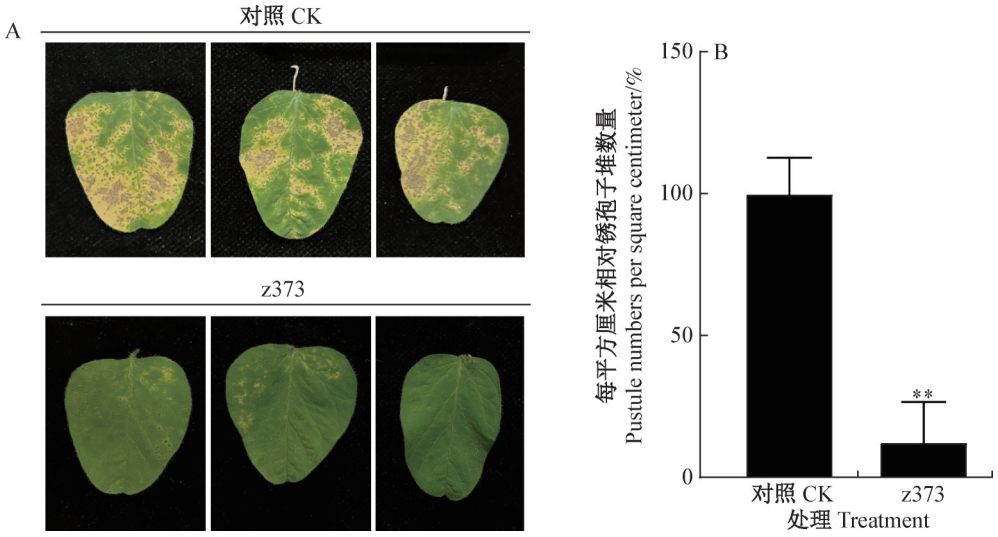
稳定性筛选过程中，菌株z373在3次重复试验中的防治效果均达80%以上，表现最稳定。此外，通过喷施菌株z373悬液后，统计发现大豆叶片锈病的病斑面积显著减少(图3-A)，与清水对照相比，每平方厘米相对锈孢子堆数量降低至12.6%(图3-B)，表明其对大豆锈病具有良好的生防潜力，后续试验针对该菌株进行。




A：筛菌处理流程；B~D：分别为防治大豆锈病的拮抗菌第1、2、3轮筛选。A: Workflow of the strain screening procedure; B–D: first, second, and third rounds of screening for antagonistic bacteria against soybean rust.

**图2 防治大豆锈菌的活体筛菌体系的建立**

Fig. 2 Establishment of a live microbial screening system for soybean rust control




A：经生防菌株z373预处理1 d后大豆叶片接种豆薯层锈菌的防治效果；B：根据记录的病害症状计算的每平方厘米相对锈孢子堆数量。A: Control efficacy against soybean rust on detached soybean leaves pre-treated with biocontrol strain z373 for 1 day and subsequently inoculated with *P. pachyrhizi*; B: relative number of rust pustules per cm2 calculated from disease symptoms.

**图3 菌株z373对豆薯层锈菌引起的大豆锈病的防治效果**

Fig. 3 Control efficacy of strain z373 against soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi*

图中数据为平均数±标准误。**表示对照与处理间经LSD法检验差异极显著（$P$<0.01）。Data are presented as the mean± SE. ** indicates a highly significant difference between the control and treatment groups according to LSD test ($P$<0.01).

### 2.3 菌株z373的分类鉴定

菌株z373在LB固体培养基上28 ℃培养24 h形成的菌落近圆形，表明粗糙、干燥、不透明，颜色为污白色，中央颜色深于边缘，边缘不整齐（图4-A）。革兰氏染色呈紫色，为革兰氏阳性菌（图4-B）。将z373菌株的*16S rDNA*和*gyrB*基因序列上传至NCBI数据库进行BLAST比对，结果显示与枯草芽胞杆菌的相似度最高，达到100%。基于*16S rDNA*序列，选取相近种菌株目标序列构建系统发育树，结果显示菌株z373与枯草芽胞杆菌聚在同一个分支（图4-C）。综合上述形态特征及基于*16S rDNA*基因序列的系统发育分析结果，将菌株z373鉴定为枯草芽胞杆菌*B. subtilis*。

### 2.4 菌株z373对大豆锈菌孢子萌发的影响

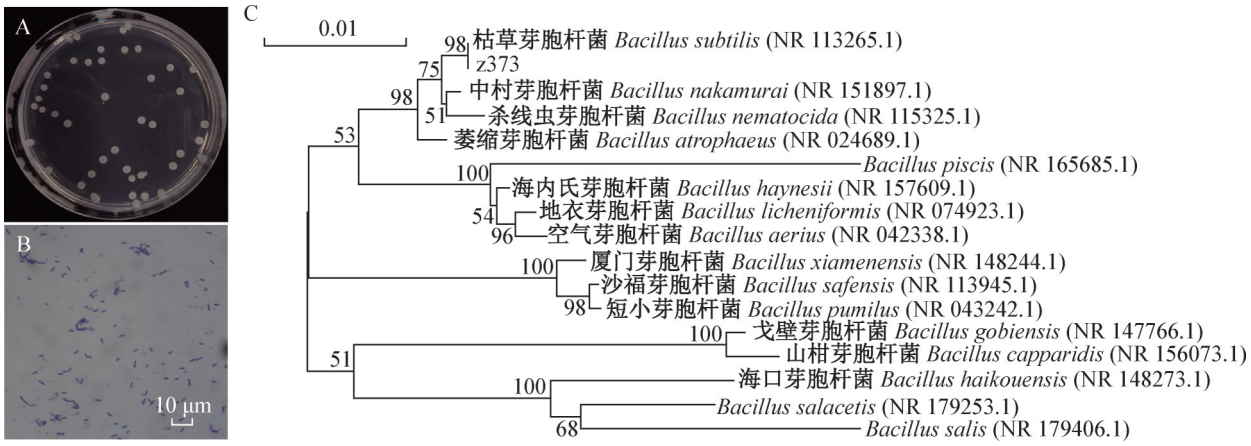
将菌株z373菌液稀释不同倍数后与锈菌夏孢子孵育24 h，发现在z373菌液原液处理下大豆锈菌孢子破裂、胞内物质流出的情况明显增多（图5-A），且孢子相对萌发率仅为7.6%；而在稀释5倍、10倍和100倍的z373菌液处理下孢子相对萌发率依次为28.0%、45.0%和65.9%，均较对照极显著降低（$P$<0.01），说明z373菌液处理对大豆锈菌夏孢子的萌发有显著抑制作用（图5-B）。

### 2.5 菌株z373对大豆防御相关基因表达的影响

接种菌株z373菌液的大豆三出复叶的发病情况较清水对照明显减轻，黄色病斑面积较少（图6-A），且叶片上锈菌生物量也较清水对照显著减少，仅为对照的61.0%（图6-B）。接种大豆锈菌后12 h，z373菌液处理的大豆叶片中*PR2*、*AOS*、*CHS*基因的相对表达量均较清水对照显著升高，*PR2*的相对表达量提高了74.0%（图6-C），*AOS*的相对表达量提高了1.22倍（图6-D），*CHS*的相对表达量提高了81.4%（图6-E）。这说明z373菌液处理可以诱导大豆叶片防御相关基因的上调表达，以提高植株的抗病能力。

### 2.6 菌株z373对大豆锈病的温室防治效果

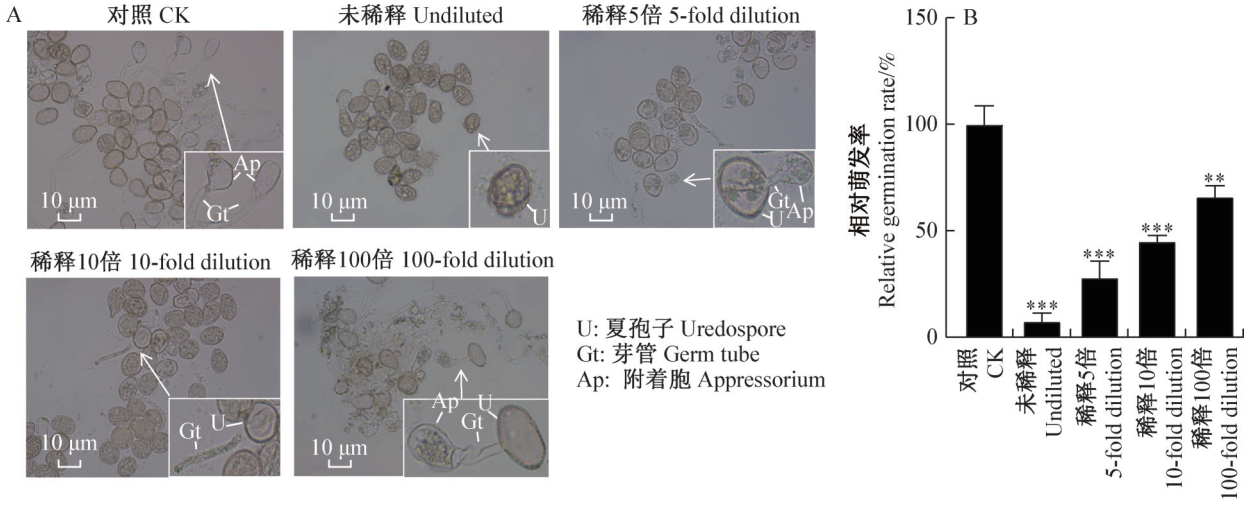
接种大豆锈菌孢子悬浮液后14 d，对照大豆叶片上出现淡黄色斑点（图7-A），而菌株z373预处理大豆叶片几乎与健康植株无异（图7-B），此时菌株z373对大豆锈病的温室防治效果可达89.1%（表2）；待接种后28 d，对照大豆叶片发病严重，病斑面积占叶部面积的比例达70%~90%，甚至出现枯黄掉落现象（图7-C），此时菌株z373预处理大豆叶片开始出现黄色病斑（图7-D），防治效果达72.5%（表2）。说明菌株z373处理可显著抑制大豆锈菌孢子的萌发，提高大豆植株的抗病能力，从而抑制大豆锈菌在大豆叶片上的侵染，具有良好的防治效果。




A：可见光源下的菌落形态；B：革兰氏染色结果；C：基于*16S rDNA*序列采用邻接法构建的系统发育树。A: Colony morphology under visible light; B: gram straining result; C: neighbor-joining phylogenetic tree constructed based on *16S rDNA* sequence.

**图4 菌株z373的鉴定**

Fig. 4 Identification of strain z373




A：大豆锈菌孢子与稀释不同浓度的z373细胞悬液共培养24 h后夏孢子萌发情况；B：各处理组大豆锈菌夏孢子的相对萌发率。A: Urediniospore germination of *Phakopsora pachyrhizi* after co-incubation with serially diluted suspensions of strain z373 for 24 h; B: relative germination rate of *P. pachyrhizi* urediniospore under different treatments.

**图5 不同浓度z373菌液处理对大豆锈菌夏孢子萌发的影响**

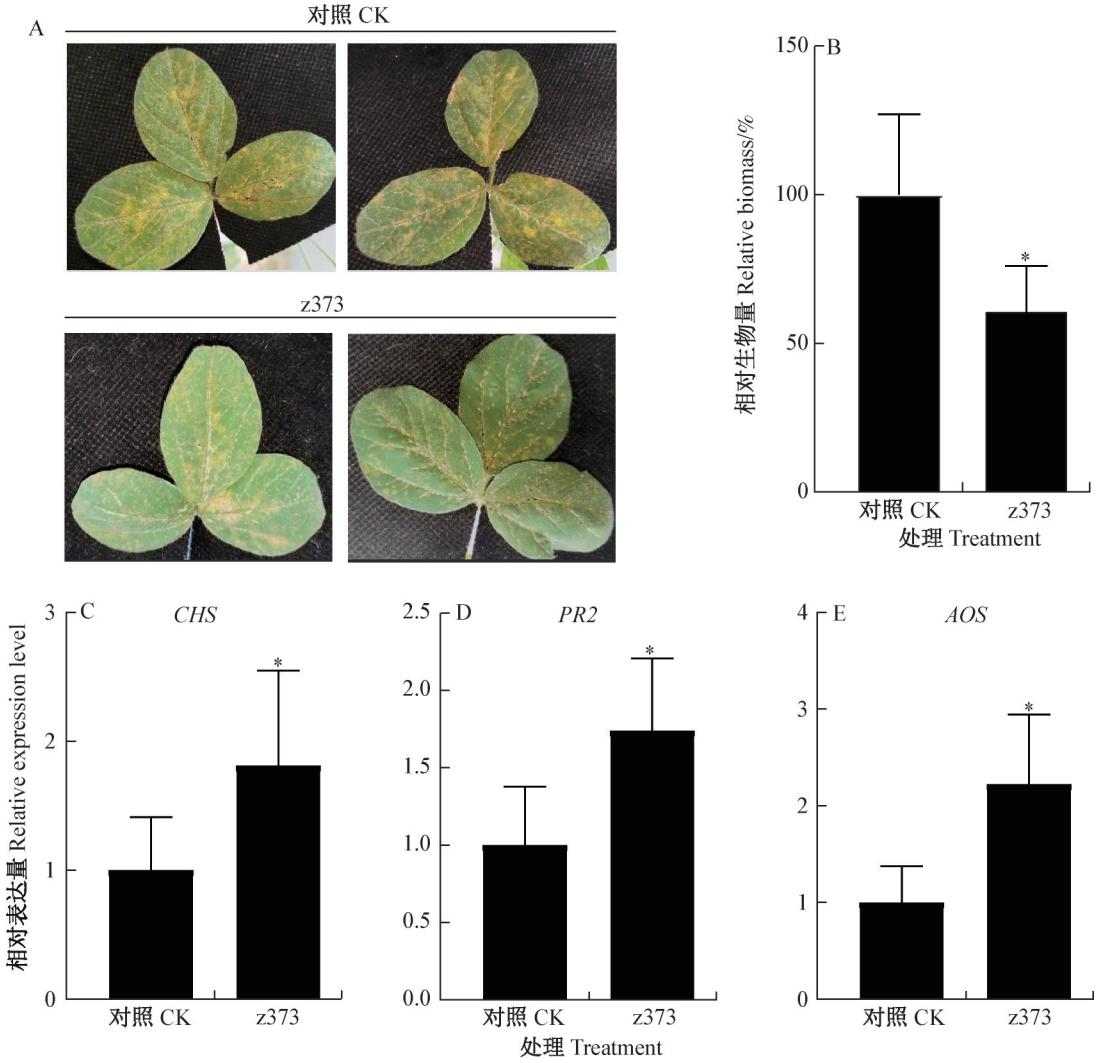
Fig. 5 Effects of different concentrations of strain z373 on the germination of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores

图中数据为平均数±标准误。**和***表示对照与处理之间经LSD法检验差异极显著（$P$<0.01和$P$<0.001）。Data are presented as the mean±SE. ** and *** indicate highly significant differences between the control and treatment groups according toLSD test ($P$<0.01 and $P$<0.001, respectively).

## 3 讨论

目前市面上尚没有完全抗锈病的商业化大豆品种，喷施化学农药成为防治大豆锈病的主要手段（Chicowski et al.，2024），但生物防治具有保护生态环境以及可持续发展的特点，具有较高的应用价值。本研究建立了筛选防治大豆锈病生防菌的活体筛选体系，从发病田块中健康大豆植株的叶片中分离筛选出1株对大豆锈病具有显著拮抗活性的菌株z373，其温室防治效果最高可达89.1%。综合形态学特征及基于*16S rRNA*基因的系统发育分析结果，将该菌株鉴定为枯草芽胞杆菌。枯草芽胞杆菌是一种广泛应用于生物防治的细菌，可以通过直接抑制病原菌生长（钱欣雨等，2023；周嘉敏等，2025）、激活植物免疫系统（Dong et al.，2025）、改变土壤微生物群落结构（Guo et al.，2019）来发挥作用，也可以通过

与其他物质复配施用的方式来发挥作用(姚志鹏等,2025),对多种病害具有防治效果,但在大豆锈病方面的应用鲜有报道,本研究结果为大豆锈病的生防资源开发提供了一定的理论基础和菌种资源。




A:菌株z373预处理大豆叶片接种大豆锈菌14 d病害发展情况;B:大豆锈菌生物量的实时荧光定量PCR评估;C~E:防御相关基因的实时荧光定量PCR检测。A: Disease development on soybean leaves pre-treated with strain z373 at 14 days post-inoculation with *Phakopsora pachyrhizi*; B: quantification of *P. pachyrhizi* biomass by qPCR; C−E: qPCR analysis of defense-related genes.

**图6 菌株z373处理对大豆防御能力的影响**

Fig. 6 Effects of strain z373 on soybean defense responses

图中数据为平均数±标准误。*表示对照与处理之间经LSD法检验差异显著($P$<0.05)。Data are presented as the mean± SE. * indicates a significant difference between the control and treatment groups according to LSD test ($P$<0.05).

对锈菌(肖珂雨等,2024)、白粉菌(Ferreira dos Santos et al.,2024)、黑粉菌(Huang et al.,2024)等活体寄生真菌来说,由于其只能从活体寄主细胞中获取营养,不能利用常规平板对峙培养方法进行筛选,如小麦锈病相关研究多以水琼脂平板法为主而非平板对峙培养法(Saimi et al.,2024),筛选抑制这类病害的生防菌较为困难,且目前尚未见基于活体大豆植株构建的生防菌筛选体系。本研究建立的大豆锈病生防菌活体筛选体系直接在活体大豆叶片上开展致病性与生防效果评价,其核心优势在于能够筛选用于防治大豆锈病的内生细菌,弥补了离体筛选无法真实反映菌株对大豆锈病的防治效果以及其对大豆本身抗病能力的提升作用。同时,整个筛选过程均采用叶片喷施方式,3次重复筛选流程统一且操作规范,筛选条件与田间发病条件高度契合,能更真实、准确地评价菌株对大豆锈病的实际生防潜力。本研究结果表明,菌株z373对大豆锈病具有较好的防治效果,在活体叶片上喷施后,每平方厘米相对锈

孢子堆数量降低至12.6%；处理活体叶片后温室防治效果最高可达89.1%。此外，菌株z373的菌液对大豆锈菌夏孢子的萌发有显著抑制作用，说明该菌株可能通过挥发性有机物、酶类或营养竞争等机制，直接干扰了孢子萌发所需的生理过程。然而，关于菌株z373产生的特异性活性物质仍有待后续深入研究。

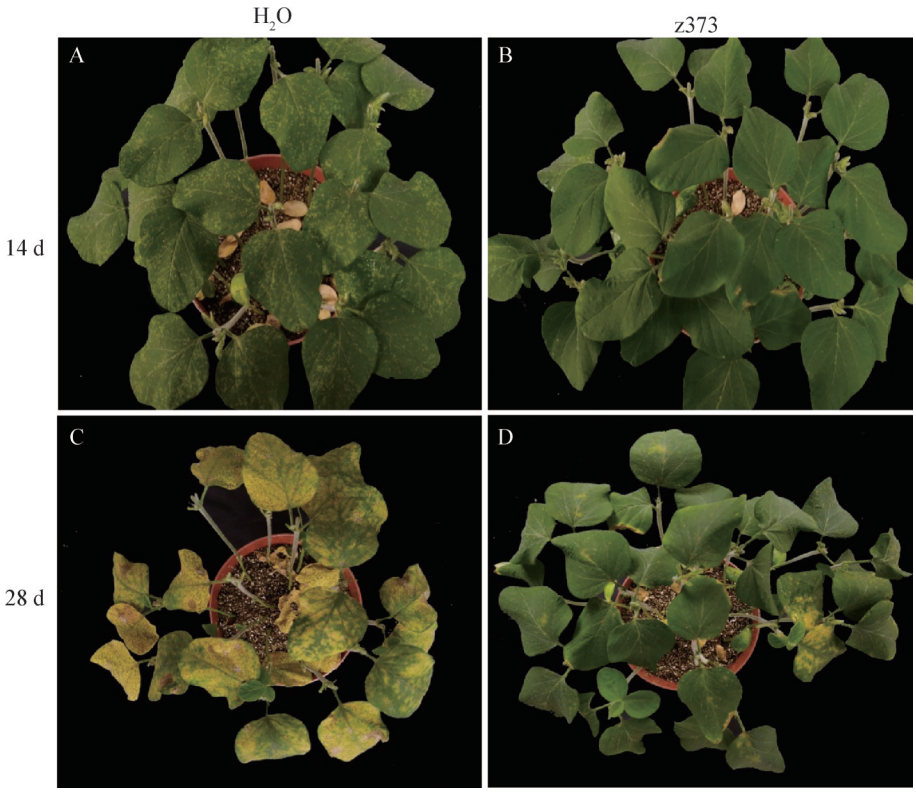



**图7　菌株z373在不同时间点对大豆锈病的温室防治效果**

Fig. 7　Greenhouse evaluation of the control efficacy of strain z373 against soybean rust at different time points

**表2　z373菌液对大豆锈病的温室防治效果**

Table 2　Greenhouse control efficacy of strain z373 against soybean rust

| 处理 Treatment | 处理14 d后 14 d after treatment | | 处理28 d后 28 d after treatment | |
|---|---|---|---|---|
| | 病情指数 Disease index | 防治效果 Control efficacy/% | 病情指数 Disease index | 防治效果 Control efficacy/% |
| 对照CK | 52.6±5.1*** | – | 84.7±7.0*** | – |
| z373 | 7.4±3.2 | 89.1±3.9 | 23.5±6.8 | 72.5±7.0 |

表中数据为平均数±标准误。***表示对照与处理之间经LSD法检验差异极显著（$P$<0.001）。Data are presented as the mean±SE. *** indicates a highly significant difference between the control and treatment groups according to LSD test ($P$<0.001).

为探究菌株z373防治大豆锈病的机理，对大豆防御相关基因的表达量进行了检测，发现菌株z373处理后大豆*PR2*、*AOS*、*CHS*基因的相对表达量均有所提高，分别提高了74.0%、1.22倍和81.4%，说明生防菌的介入激活了寄主的多层免疫网络。*CHS*作为类黄酮合成通路的限速酶基因，其上调意味着寄主加速合成植保素、黄酮苷等抗菌/抗氧化次生代谢物，可在胞外形成化学屏障；*PR2*编码的$\beta$-1,3-葡聚糖酶兼具降解真菌细胞壁与释放寡糖激发子的双重功能，直接削弱病原菌结构完整性并放大病原相关分子模式触发的免疫信号；*AOS*则是茉莉酸生物合成的关键基因，其表达量升高预示着茉莉酸信号通路被快速启动，增强了系统性获得抗性。这些都使得叶片在大豆锈菌附着胞形成前即进入防御状态，从分子水平解释了防治效果数据。本研究结果为后续菌株改良、效应物挖掘及田间精准施用提供了可量化的生物标志，也将为建立基于基因表达谱的大豆锈病生防评价标准奠定理论基础。

## 参 考 文 献（References）


Chen C, Zhang K, Ding T, Feng JG, Yang J, He Z, Chen XJ, 2021. Development of prothioconazole+tebuconazole 240 g/kg SC and its control effect on rice sheath blight and wheat sharp eyespot in the field[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 23(3): 578−586 (in Chinese) [陈宸, 张坤, 丁涛, 冯建国, 杨进, 贺振, 陈夕军, 2021. 24%丙硫·戊唑醇悬浮剂的研制及其对稻麦纹枯病的防治效果[J]. 农药学学报, 23(3): 578−586]

Chen JM, Guan WX, Zhu JQ, Wei M, Fu BZ, Li GY, 2017. Research development of microbial antagonists against plant disease[J]. Advances in Microbiology, 6(2): 35−43 (in Chinese) [陈嘉敏, 管维轩, 朱洁倩, 魏蜜, 傅本重, 李国元, 2017. 植物病害生防菌株的研究进展[J]. 微生物前沿, 6(2): 35−43]

Chicowski AS, Bredow M, Utiyama AS, Marcelino-Guimarães FC, Whitham SA, 2024. Soybean-*Phakopsora pachyrhizi* interactions: towards the development of next-generation disease-resistant plants[J]. Plant Biotechnology Journal, 22(2): 296−315

Dai XX, Li XH, Yao ZP, Jiang CH, Niu DD, 2024. Identification of the causal agents of *Lonicera japonica* root rot and screening for biocontrol agents against the disease[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 54(5): 1008−1019 (in Chinese) [代晓雪, 李晓涵, 姚志鹏, 蒋春号, 牛冬冬, 2024. 金银花根腐病的病原鉴定及生物防治研究[J]. 植物病理学报, 54(5): 1008−1019]

Dong YZ, Zhu MZ, Zhao YW, Yi EJ, Zhang J, Wang Z, Wang CX, Yu CM, Ma LJ, 2025. *Bacillus subtilis* strain TCX1 isolated from *Ambrosia artemisiifolia*: enhancing cucumber growth and biocontrol against cucumber *Fusarium* wilt[J]. Plants, 14(19): 3068

Ferreira dos Santos JL, Laranjeira D, Gava CAT, 2024. Selecting *Bacillus* strains antagonist to *Erysiphe necator* (Schw.) Burr. the causal agent of grape powdery mildew[J]. Biocontrol Science and Technology, 34(11): 1055−1067

Guo S, Zhang JW, Dong LH, Li X, Asif M, Guo QG, Jiang WJ, Ma P, Zhang LQ, 2019. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 is involved in suppression of clubroot on Chinese cabbage[J]. Biological Control, 136: 104001

Han T, You C, Zhang L, Feng C, Zhang C, Wang J, Kong F, 2016. Biocontrol potential of antagonist *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank[J]. BioControl, 61(2): 195−205

Han T, Zhang LM, Gao JM, Kong FY, Feng C, Wang J, Zhang CS, 2016. Correlation between root irrigation of *Bacillus subtilis* Tpb55 and variation of bacterial diversity in tobacco rhizosphere[J]. Acta Microbiologica Sinica, 56(5): 835−845 (in Chinese) [韩腾, 张立猛, 高加明, 孔凡玉, 冯超, 王静, 张成省, 2016. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Tpb55灌根与烟草根围细菌多样性变化的相关性[J]. 微生物学报, 56(5): 835−845]

Harbort CJ, Hashimoto M, Inoue H, Niu YL, Guan R, Rombolà AD, Kopriva S, Voges MJEEE, Sattely ES, Garrido-Oter R, et al., 2020. Root-secreted coumarins and the microbiota interact to improve iron nutrition in *Arabidopsis*[J]. Cell Host & Microbe, 28(6): 825−837

Hossain MM, Sultana F, Yesmin L, Rubayet MT, Abdullah HM, Siddique SS, Bhuiyan MAB, Yamanaka N, 2023. Understanding *Phakopsora pachyrhizi* in soybean: comprehensive insights, threats, and interventions from the Asian perspective[J]. Frontiers in Microbiology, 14: 1304205

Huang LY, Ökmen B, Stolze SC, Kastl M, Khan M, Hilbig D, Nakagami H, Djamei A, Doehlemann G, 2024. The fungal pathogen *Ustilago maydis* targets the maize corepressor RELK2 to modulate host transcription for tumorigenesis[J]. New Phytologist, 241(4): 1747−1762

Juliatti FC, Zambolim L, 2021. Etiology, epidemiology and management of Asian soybean rust (ASR) in Brazil and vulnerability of chemical control of specific without multisite fungicides[M]// Goyal AK. Cereal grains, volume 1. London: IntechOpen, pp. 3−46

Kim J, Roy M, Ahn SH, Shanmugam G, Yang JS, Jung HW, Jeon J, 2022. Culturable endophytes associated with soybean seeds and their potential for suppressing seed-borne pathogens[J]. Plant Pathology Journal, 38(4): 313−322

Lee GY, Li WQ, Chirwa UM, Shi J, 2020. Effect of substrate characteristics on the growth and sporulation of two biocontrol microorganisms during solid state cultivation[J]. Fermentation, 6(3): 69

Lin YQ, Yang JJ, Lu SM, Lü PT, Zheng WH, Yun YZ, 2025. Diversity and antagonistic potential of endophytic bacteria in banana roots against banana *Fusarium* wilt[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 55(4): 978−990 (in Chinese) [林亚琪, 杨俊杰, 卢松茂, 吕培涛, 郑文辉, 云英子, 2025. 香蕉根部内生细菌群落多样性及香蕉枯萎病拮抗细菌筛选[J]. 植物病理学报, 55(4): 978−990]

Liu XL, Miao JQ, Zhang C, 2022. Fungicide resistance and the management strategies[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 24(5): 921−936 (in Chinese) [刘西莉, 苗建强, 张灿, 2022. 植物病原菌抗药性及其抗性治理策略[J]. 农药学学报, 24(5): 921−936]

Luo Y, Wu XM, Hu XF, Yao XL, Liu XD, Han L, 2022. Research progress on pyraclostrobin degradation, metabolism, and toxicology[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 39(4): 651−663 (in Chinese) [罗跃, 吴小毛, 胡贤锋, 姚小龙, 刘旭东, 韩磊, 2022. 吡唑醚菌酯的降解代谢及毒理研究进展[J]. 农业资源与环境学报, 39(4): 651−663]

Martanto EA, Tanati AE, Samen B, Tata HR, Murdjoko A, 2020. Effectiveness of biological control of *Trichoderma harzianum* on soybean leaf rust disease and the production in West Papua Lowland, Indonesia[J]. Biodiversitas, 21(5): 1935−1939

Mo SJ, Zhao WS, Wei YR, Su ZH, Li SZ, Lu XY, Zhang XY, Qu YH, Wang PP, Dong LH, et al., 2025. Defense responses stimulated by *Bacillus subtilis* NCD-2 through salicylate- and jasmonate-dependent signaling pathways protect cotton against *Verticillium* wilt[J]. International Journal of Molecular Sciences, 26(7): 2987

Qian XY, Wang HM, Hou ML, Shen S, Hao ZM, Dong JG, 2023. Stability and active component analysis of antifungal protein from maize endophyte strain YY1 of bacterium *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Plant Protection, 50(3): 725−732 (in Chinese) [钱欣雨, 王会敏, 候美玲, 申珅, 郝志敏, 董金皋, 2023. 玉米内生菌YY1菌株抗菌蛋白的稳定性和活性组分分析[J]. 植物保护学报,

50(3): 725–732]

Qian YL, Zhao Y, Yang L, Zhang YF, Zhang SJ, 2026. Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* LTB49 against cucumber *Fusarium* wilt[J]. Journal of Tropical Biology, 17(1): 75–83 (in Chinese) [钱运龙, 赵玉, 杨琳, 张云飞, 张淑静, 2026. 芽孢杆菌LTB49对黄瓜枯萎病生防潜力研究[J]. 热带生物学报, 17(1): 75–83]

Saimi A, Zhang QQ, Liu Q, Li GK, Gao HF, Chen J, 2024. Screening of endophytic antagonistic bacteria in wheat and evaluation of biocontrol potential against wheat stripe rust[J]. Plants, 13(10): 1366

Wang D, Pan Y, Liang AX, Dong ZY, Hu TL, Wang YN, 2025. Screening and identification of three biocontrol bacteria with anti-tobacco mosaic virus activity and broad-spectrum antagonistic activity[J]. Journal of Plant Protection, 52(1): 178–189 (in Chinese) [王德, 潘媛, 梁爱霞, 董震杨, 胡同乐, 王亚南, 2025. 三株抗TMV兼具广谱拮抗活性的生防细菌筛选和鉴定[J]. 植物保护学报, 52(1): 178–189]

Wang PS, Cheng YX, Zhu CJ, 2020. Study on the control efficacy of several triazole fungicides on wheat scab[J]. Barley and Cereal Sciences, 37(1): 43–45 (in Chinese) [王平山, 成谊新, 朱崇敬, 2020. 几种三唑类杀菌剂混用对小麦赤霉病的防效[J]. 大麦与谷类科学, 37(1): 43–45]

Wang YP, Liu YQ, Pan NS, Chen ZL, 1992. Preliminary studies on the control of wheat scab with *Bacillus subtilis* A014 strain[J]. Chinese Journal of Biological Control, 8(2): 54–57 (in Chinese) [王雅平, 刘伊强, 潘乃穗, 陈章良, 1992. 枯草芽孢杆菌A014菌株防治小麦赤霉病的初步研究[J]. 生物防治通报, 8(2): 54–57]

Wu HF, Meng Y, Shi HQ, Wei L, Shen S, 2024. Identification of a biocontrol bacterium against potato dry rot and its antibacterial activity[J]. Plant Protection, 50(3): 111–120 (in Chinese) [吴慧芳, 蒙耀, 石晖琴, 魏琳, 沈硕, 2024. 一株马铃薯干腐病生防菌的鉴定及其抑菌活性研究[J]. 植物保护, 50(3): 111–120]

Xiao KY, Jia RM, Yang LS, Ma Q, Wang Y, 2024. Screening, identification and biocontrol efficacy of antagonistic bacterial strain against wheat stripe rust[J]. Journal of Plant Protection, 51(2): 314–323 (in Chinese) [肖珂雨, 贾瑞敏, 杨利飒, 马青, 王阳, 2024. 小麦条锈病生防菌株的筛选、鉴定及其防治效果[J]. 植物保护学报, 51(2): 314–323]

Yadav R, Bhullar MS, Kaur S, Kaur T, Jhala AJ, 2017. Weed control in conventional soybean with pendimethalin followed by imazethapyr + imazamox/quizalofop-p-ethyl[J]. Canadian Journal of Plant Science, 97(4): 654–664

Yánez-Mendizábal V, Falconí CE, Kanaley K, 2023. Production optimization of antifungal lipopeptides by *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 using low-cost optimized medium[J]. Biological Control, 185: 105306

Yao ZP, Zhang ZY, Cao YH, Wang YM, Niu DD, 2025. Efficacy enhancement and its mechanism of action of bacterium *Bacillus cereus* AR156 against rice sheath blight by silica nanoparticles[J]. Journal of Plant Protection, 52(2): 351–365 (in Chinese) [姚志鹏, 张紫谊, 曹怡晗, 王雨萌, 牛冬冬, 2025. 纳米二氧化硅增强蜡质芽胞杆菌AR156对水稻纹枯病的防效及其作用机制[J]. 植物保护学报, 52(2): 351–365]

Zhang HM, Zheng LY, Wang JC, Zhu F, Niu DD, 2021. Screening of biocontrol bacteria for rice sheath blight and their relations with the formation of infection cushion of the pathogen[J]. Journal of Plant Protection, 48(2): 289–297 (in Chinese) [张华梦, 郑礼煜, 王继春, 朱峰, 牛冬冬, 2021. 水稻纹枯病生防细菌筛选及其与病原菌侵染垫形成的关系[J]. 植物保护学报, 48(2): 289–297]

Zhou JM, Zhao AH, Zheng LR, Cui YH, Jiang CH, Li JZ, Dai K, Niu DD, 2025. Screening, identification and biocontrol potential of antagonistic bacteria against tobacco black shank[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 55(4): 898–910 (in Chinese) [周嘉敏, 赵阿慧, 郑琳冉, 崔永和, 蒋春号, 李江舟, 代快, 牛冬冬, 2025. 烟草黑胫病生防菌的筛选鉴定及防治效果研究[J]. 植物病理学报, 55(4): 898–910]

（责任编辑：李美娟）