

引用格式:

吕翠, 张亮, 黄军, 刘清术, 郑井元, 王运生, 戴良英, 陈武. 辣椒果实胎座中生防细菌对白绢病的防效[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(3): 331–335.

LYU C, ZHANG L, HUANG J, LIU Q S, ZHENG J Y, WANG Y S, DAI L Y, CHEN W. Isolation and identification of endophytic bacteria in the fruit of placenta of capsicum and its biocontrol effect against *Capsicum sclerotium*[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2020, 46(3): 331–335.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



辣椒果实胎座中生防细菌对白绢病的防效

吕翠¹, 张亮², 黄军³, 刘清术³, 郑井元⁴, 王运生¹, 戴良英¹, 陈武^{1*}

(1.湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128; 3.湖南省微生物研究院, 湖南 长沙 410009; 4.湖南省蔬菜研究所, 湖南 长沙 410125)

摘 要:从辣椒果实胎座中分离出 60 株内生细菌, 平皿对峙培养发现 13 株细菌对辣椒白绢病菌(*Sclerotium rolfsii* Sacc.)有拮抗作用, 其中 6 株对白绢病抑制率较高的生防菌对辣椒疫病(*Phytophthora capsici*)和辣椒炭疽病(*Colletotrichum capsici*)病原菌也有抑菌活性。16S rRNA 鉴定结果表明, 菌株 G242 和 T443 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), 菌株 YZ12、G241、T151、T442 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。以单一菌株或菌株复配进行盆栽试验, 结果 G241 和 T443 复配后对辣椒白绢病的防效达到 88.41%, 高于单一菌株 G241(29.14%)和 T443(38.16%)的防效。

关 键 词:辣椒; 果实胎座; 生防菌; 辣椒白绢病; 防效

中图分类号: S436.418.1¹⁺² 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2020)03-0331-05

Isolation and identification of endophytic bacteria in the fruit of placenta of capsicum and its biocontrol effect against *Capsicum sclerotium*

LYU Cui¹, ZHANG Liang², HUANG Jun³, LIU Qingshu³, ZHENG Jinyuan⁴,

WANG Yunsheng¹, DAI Liangying¹, CHEN Wu^{1*}

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.College of Agromy, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 3.Department of Applied Fungi, Hunan Institute of Microbiology, Changsha, Hunan 410009, China; 4.Institute of Vegetable, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha, Hunan 410125, China)

Abstract: Sixty strains of endophytic bacteria were isolated from the fruit of placenta of capsicum, and in antagonistic assay 13 of them showed antagonistic effect on *Sclerotium rolfsii* Sacc., the 6 most effective biocontrol strains also inhibited the growth of *Phytophthora capsica* and *Colletotrichum capsici*. Strain G242 and T443 were identified as *Bacillus velezensis* and strain YZ12, G241, T151, and T442 were verified as *Bacillus amyloliquefaciens* by 16S rRNA test. The planting experiments in the greenhouse were conducted on single strain or combining strains and the results indicated that the control effect of combining strains of G241 and T443 on *Sclerotium rolfsii* Sacc. reached to 88.41% which is much higher than G241(29.14%) and T443(38.16%) alone.

Keywords: capsicum; the placenta; biocontrol bacteria; pepper southern blight; biocontrol effect

收稿日期: 2020-02-04

修回日期: 2020-04-15

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(2019JJ40119、2019JJ40169、2019JJ40153); 湖南省科学技术厅重点研发计划项目(2019NK2192)

作者简介: 吕翠(1996—), 女, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 主要从事生防资源挖掘研究, 2280287150@qq.com; *通信作者, 陈武, 博士, 副教授, 主要从事作物土传病害生物防控研究, chenwuworrior@163.com

内生菌作为植物微生态系统的重要组成部分,几乎可定殖于植物的各个组织,它们之间存在共生、竞争和对抗等各种关系^[1]。辣椒组织中存在大量内生菌。LEE 等^[2]从辣椒果实中筛选到能拮抗辣椒炭疽病的内生菌,对辣椒炭疽病的盆栽防效可达 79%; YANG 等^[3]从辣椒植株根际和叶片中分离到 17 株生防菌,其中对疫病的防效最高达 92.3%; 李娟等^[4]从辣椒植株的茎、叶和果肉中分离到能拮抗辣椒疫霉病菌(*Phytophthora capsici*)、辣椒黑霉病菌(*Stemphylium botryosum*) 和辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),对辣椒疫病的生防效果达到 74%。

将分离自不同生态位,或者具有不同抑菌活性的生防菌株进行复配,可以实现多菌株之间的优势互补,增加自然竞争力和存活力,提高防病效果^[5]。李凤等^[6]将生防菌株 B01-2 和 B23-1 复配,对撑绿杂交竹枯萎病的防效达 81.5%,高于单一菌株 B01-2(70.4%) 与 B23-1(63.0%) 的防效; 张维等^[7]发现复配拮抗菌群 FP246(沙福芽孢杆菌 YJC-4、枯草芽孢杆菌 CY106/CY111)对烟草黑胫病的温室盆栽平均防效为 85.40%,优于单一菌株的防效。

辣椒果实胎座是着生种子的组织,也是合成和贮存辣椒素的主要部位。笔者以辣椒白绢病菌(*Sclerotium rolfsii* Sacc.)为靶标菌,尝试分离和鉴定辣椒果实胎座中的拮抗细菌,并通过盆栽试验对部分拮抗菌株的生防效果进行观察测试,以期防治辣椒白绢病提供生防菌资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试辣椒品种博辣天星、辣椒白绢病菌(*Sclerotium rolfsii* Sacc.)LJB-2、辣椒疫病病原菌(*Phytophthora capsici*)LYB-1 和辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)LCB-3,均由湖南省农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 辣椒果实胎座内生细菌的分离纯化与鉴定

辣椒果实用 75%乙醇表面消毒^[8]后,在超净台内将其撕开,取果实胎座 0.5 g,研磨成匀浆后加入 1

mL 无菌水,2 000 r/min 离心 2 min,取上清液 100 μ L,分别在 PDA 培养基^[9]、辣椒根际土壤培养基、辣椒叶培养基和辣椒根系培养基^[10]的固体平板上涂布均匀,30 $^{\circ}$ C 恒温培养 2 d,分别统计菌落数量,按照文献^[11]的方法,对菌落类型进行分类。

将分离得到的辣椒胎座内生细菌进行单菌落划线纯化。以辣椒白绢病菌 LJB-2 作为靶标菌,将白绢病菌菌块接种于 NB 平板中央,挑取纯化的单菌落接种于距平板中央 2.5 cm 处的 3 个角点处,以仅接白绢病菌 LJB-2 的平板作对照,每处理 3 次重复。30 $^{\circ}$ C 恒温培养 7 d,观察菌株的拮抗作用,测定病原菌菌落扩展半径,并计算各个菌株的菌落生长抑制率^[12]。另分别以辣椒疫病 LYB-1 和辣椒炭疽病 LCB-3 为靶标菌,测试内生菌株的广谱抑菌活性。

参考试剂盒说明书提取各个细菌菌株的基因组 DNA,PCR 扩增 16S rRNA 的通用引物序列为 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 2 $\times$ Easy Taq PCR SuperMix 25 μ L、引物 27F 1.5 μ L、引物 1492R 1.5 μ L,用 ddH₂O 补足至 50 μ L。PCR 反应程序: 98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s,延伸 90 s(30 个循环); 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将所得 PCR 扩增产物送上海生工生物工程股份有限公司测序。将测序结果进行 BLAST 比对,运用 MEGA7.0 软件构建菌株的系统发育树。

1.2.2 生防菌株防控白绢病的盆栽试验

将辣椒种子播于育苗盆中,待辣椒苗长至 6 叶期时,移栽至 25 cm $\times$ 20 cm $\times$ 16 cm 的花盆中,每盆 1 株,每盆 1 500 g 土壤。设 2 个单菌菌悬液、菌悬液等比例混合、空白对照(ddH₂O)4 个处理。每株辣椒苗根部浇施 100 mL 菌悬液,3 d 后接种辣椒白绢病菌,每处理 15 株辣椒苗,重复 3 次,接种后 30 d 观察辣椒白绢病的发病情况,记录发病率并计算防效。菌种活化及接种方法如下。

分别在 LB 固体培养基上划线活化生防菌株,挑单菌落接种于 LB 液体培养基过夜培养。按 5% 比例将新鲜种子液接种到 LB 发酵培养基中,30 $^{\circ}$ C、220 r/min 发酵培养 15 h,离心,收集菌体,再用 ddH₂O 重悬至菌体密度为 1×10^8 cfu/mL,备用。

在 PDA 平板上活化培养辣椒白绢病菌，取直径 5 mm 菌饼接种麦粒培养基^[13]，每瓶培养基接种 5~6 个菌饼，28 ℃培养，待菌丝长满麦粒的表面，取一颗麦粒贴于长至 6 叶期的辣椒苗茎基部。

2 结果与分析

2.1 辣椒果实胎座生防细菌的鉴定结果

对 PDA 培养基、辣椒根际土壤培养基、辣椒叶培养基和辣椒根系培养基上的菌落分别计数，并根据菌落外观形态特征对菌株进行粗略分类。从分离的菌落数量来看，PDA 培养基分离的菌落数量最多，达到 $(11.73\pm4.96)\times10^3$ cfu/mL，其后依次是辣椒根际土壤培养基 $(9.73\pm0.23)\times10^3$ cfu/mL、辣椒根系培养基 $(8.20\pm0.92)\times10^3$ cfu/mL 和辣椒叶培养基 $(7.47\pm1.70)\times10^3$ cfu/mL；从分离的菌落种类来看，辣椒根际土壤培养基分离得到的菌落种类最多，有 6 类，PDA 培养基和辣椒叶培养基的各有 5 类，辣椒根系培养基的有 4 类。

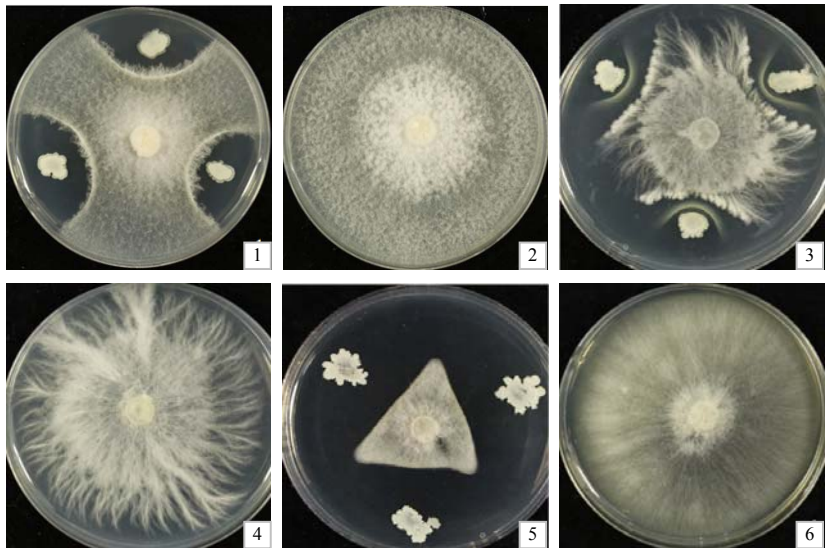
从 20 个种类细菌中每类随机挑选 3 个菌株，共 60 个菌株，分别与白绢病菌 LJB-2 对峙培养，计算菌落生长抑制率，抑制率超过 30%，判定有良好的抑制作用。初筛结果表明，共有 13 株细菌对辣椒白绢病菌 LJB-1 有抑制作用，其中 G242、T443、

T151、G241、YZ12、T442 等 6 株细菌对白绢病菌的抑制率高于 50%(表 1)。

表 1 辣椒果实胎座生防菌对辣椒白绢病菌的拮抗能力

Table 1 Antagonistic ability of isolates against <i>Sclerotium rolfsii</i>		
菌株编号	辣椒白绢病菌菌落 生长半径/mm	抑制率/%
G242	15.67±0.58	57.66±1.56
T443	16.67±0.67	54.96±3.12
T151	16.00±0.00	56.76±1.56
T222	23.00±1.00	37.84±2.70
G241	17.00±0.00	54.05±0.00
YZ12	16.17±1.61	56.31±4.34
T341	22.67±1.53	38.74±4.12
PDA33	24.33±0.58	34.23±1.56
T331	23.67±1.15	36.04±3.12
T442	17.17±0.76	53.60±2.06
T343	21.00±1.00	43.24±2.70
PDA24	22.33±2.89	39.64±7.80
T123	23.33±0.58	36.94±1.56

将这 6 株菌株分别与辣椒疫霉病菌 LYB-1 和辣椒炭疽病菌 LCB-3 对峙培养，结果这 6 株拮抗菌对辣椒炭疽病菌和疫霉病菌有良好的抑制作用(图 1)，对辣椒炭疽病菌 LCB-3 的抑制率为 $(61.71\pm11.33)\%$ ~ $(76.58\pm1.55)\%$ ，对辣椒疫霉病菌的抑制率为 $(48.65\pm2.70)\%$ ~ $(56.76\pm9.74)\%$ 。



1、3、5 分别为 T443 对辣椒疫霉病原菌、辣椒白绢病原菌和辣椒炭疽病原菌的拮抗效果；2、4、6 分别为对照组辣椒疫霉病原菌，辣椒白绢病原菌和辣椒炭疽病原菌。

图 1 菌株 T443 与辣椒病原菌的平皿对峙培养结果

Fig.1 The antifungal activities against 3 pepper pathogen by biocontrol bacteria strain T443

将菌株 YZ12、G241、T151、T442、G242 和 T443 的 16S rRNA 序列在 GenBank 中进行同源性比较,结果 YZ12、G241、T151 和 T442 与解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的同源性分别达到 99.59%、99.49%、100%和 97.73%,G242 和 T443 与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的同源性分

别达到 98.66% 和 99.18%。构建系统发育树, YZ12、G241、T151 和 T442 与解淀粉芽孢杆菌(登录号为 EF423607)聚在同一个分支,据此将这 4 个菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌;菌株 G242 和 T443 与贝莱斯芽孢杆菌(登录号为 KY694464)聚在同一个分支,将这 2 个菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(图 2)。

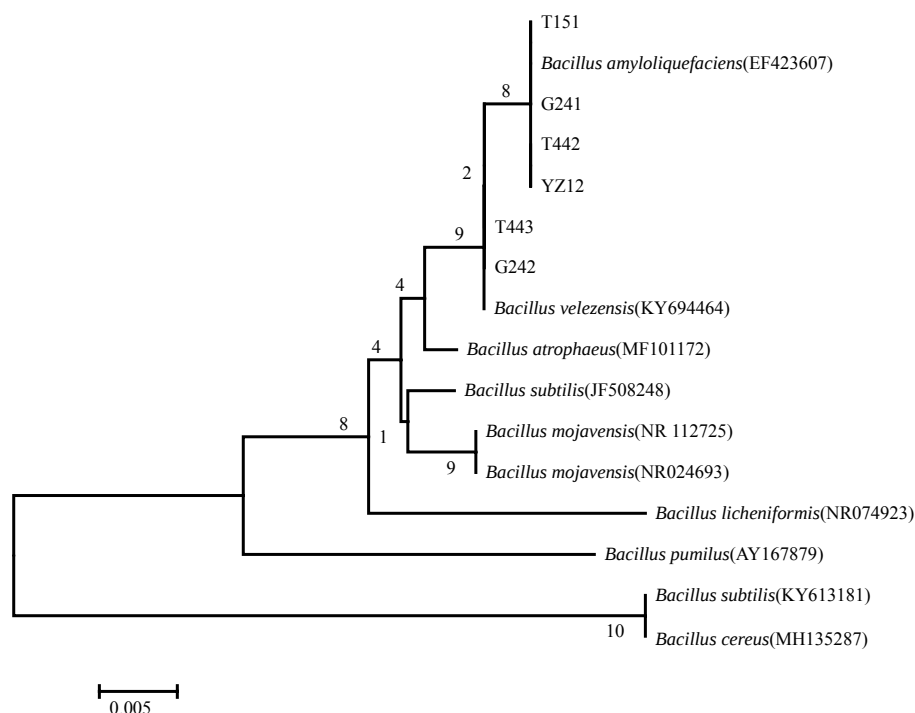


图 2 6 株拮抗细菌的 16S rRNA 区域的进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of the 16S rRNA region of 6 antagonistic bacteria

2.2 生防菌株对辣椒白绢病的盆栽防效

接种辣椒白绢病菌后,各个处理均不同程度发病,其中对照组的发病率为 85.27%,G241 和 T443 菌悬液处理后的辣椒白绢病发病率分别为 60.42%和 52.73%,防效分别为 29.14%和 38.16%;复配处理的发病率为 9.88%,防效为 88.41%,菌株复配大幅提高了对白绢病的防治效果。

3 讨论

辣椒白绢病、疫病和炭疽病都是辣椒真菌性病害,从辣椒种子、根、茎和叶中挖掘生防资源的研究报道较多。本研究基于 4 种培养基,从辣椒果实胎座中分离得到 20 个菌落种类,从每个菌落种类中随机挑选 3 个菌株(合计 60 个菌株),分别与辣椒白绢病菌、辣椒疫霉菌和辣椒炭疽病菌进行平皿对峙培养,筛选得到 YZ12、G241、T151、T442、G242 和 T443 等 6 株具有抑菌活性的菌株。鉴定结果表

明,它们分属解淀粉芽孢杆菌和贝莱斯芽孢杆菌。这 2 种芽孢杆菌被公认为植物促生微生物^[14],因而在后续应用上符合对环境和生态安全的要求。

考虑到影响生防菌定殖的环境因素多,田间防效不稳定等突出问题,目前探讨生防菌株复配后的协同增效现象的研究^[15]较多。本研究发现菌株 G241 与 T443 复配相对于单个菌株对辣椒白绢病的防治效果大幅提高,后续将从生防菌株的定殖、对辣椒根际微生物的影响、以及抑菌活性物质鉴定等方面探究菌株复配后协同增效的机制。

参考文献:

- [1] 方珍娟,张晓霞,马立安.植物内生菌研究进展[J].长江大学学报(自科版),2018,15(10):41-45.
FANG Z J,ZHANG X X,MA L A.Research progress of endophyte[J].Journal of Yangtze University(Natural Science Edition),2018,15(10):41-45.
- [2] LEE E J,AHN Y J,LEE H S,et al.Biocontrol of pepper anthracnose by a new *Streptomyces* sp. A1022 under

- greenhouse condition[J]. Journal Korean Society for Applied Biological Chemistry, 2012, 55(3): 447–449.
- [3] YANG M M, XU L P, XUE Q Y, et al. Screening potential bacterial biocontrol agents towards *Phytophthora capsici* in pepper[J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 134(4): 811–820.
- [4] 李娟, 夏延斌, 蔡文韬. 辣椒内生菌的分离及拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 农产品加工(学刊), 2013(2): 1–3.
- LI J, XIA Y B, CAI W T. Isolation and selection and identification of endophytic antifungal bacteria from capsicum[J]. Academic Periodical of Farm Products Processing, 2013(2): 1–3.
- [5] 卯婷婷, 陶刚, 赵兴丽, 等. 4种微生物菌剂对辣椒主要病害的生物防治作用[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(2): 258–264.
- MAO T T, TAO G, ZHAO X L, et al. Biological control of four kinds of microbial preparations against main diseases of pepper[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(2): 258–264.
- [6] 李凤, 刘会涛, 田莎, 等. 复配芽孢杆菌对撑绿杂交竹枯萎病的生物防治效果研究[J]. 北京林业大学学报, 2018, 40(12): 76–84.
- LI F, LIU H T, TIAN S, et al. Biological control effect of compounded bacillus on wilt disease of *Bambusa pervariabilis* × *Dendrocalamopsis daii*[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2018, 40(12): 76–84.
- [7] 张维, 刁朝强, 李斌, 等. 复配拮抗菌 FP246 对烟草黑胫病和根际土壤微生物群落功能多样性的影响[J]. 烟草科技, 2019, 52(7): 10–17.
- ZHANG W, DIAO C Q, LI B, et al. Effects of combinatory antagonistic bacteria FP246 on tobacco black shank and functional diversity of rhizosphere soil microbial communities[J]. Tobacco Science and Technology, 2019, 52(7): 10–17.
- [8] 姬文秀, 李虎林, 冷雪, 等. 产 ACC 脱氨酶人参内生细菌的分离和促生特性分析[J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41(2): 168–174.
- JI W X, LI H L, LENG X, et al. Isolation and promoting growth properties of endophytic bacteria producing ACC deaminase of panax ginseng[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2019, 41(2): 168–174.
- [9] 肖龙敏, 刘雪峰, 张玉洲, 等. 松栎柱锈菌侵染蒙古栎叶上的真菌种群分布[J]. 中国森林病虫, 2018, 37(3): 26–30.
- XIAO L M, LIU X F, ZHANG Y Z, et al. Fungi community distribution on oak leaves infected by *Cronartium quercuum* [J]. Forest Pest and Disease, 2018, 37(3): 26–30.
- [10] MOURAD E F, MOHAMED S, SARHAN H S, et al. Plant materials are sustainable substrates supporting new technologies of plant-only-based culture media for in vitro culturing of the plant microbiota[J]. Microbes and Environments, 2018, 33(1): 40–49.
- [11] 刘鲁峰, 寸海春, 何鹏飞, 等. 甘蔗内生菌分离鉴定及功能多样性研究[J]. 热带作物学报, 2019, 40(6): 1144–1152.
- LIU L F, CUN H C, HE P F, et al. Isolation, identification and multiple function analyses of sugarcane endophytes[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2019, 40(6): 1144–1152.
- [12] 宋利沙, 蒋妮, 蓝祖裁, 等. 肿节风炭疽病拮抗真菌筛选及作用机理研究[J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2214–2221.
- SONG L S, JIANG N, LAN Z Z, et al. Screening and mechanism of fungi antagonistic to *Colletotrichum dematium* of *Sarcandra glabra*(Thunb.) [J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(10): 2214–2221.
- [13] 郭金飞, 楼杰. 用麦粒培养基制作红托竹荪原种的方法[J]. 中国蔬菜, 2000(4): 44.
- WU J F, LOU J. Method of making the original species of *Dictyophora rotundifolia* with wheat grain medium[J]. Chinese Vegetables, 2000(4): 44.
- [14] GLIK B R. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications[J]. Scientifica, 2012, 2012: 1–15.
- [15] 张爱华, 雷锋杰, 强薇, 等. 2株拮抗菌剂复配对西洋参立枯病和锈腐病的防治及促生长作用[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2014, 40(6): 611–614.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维