

引用格式:

高香辉, 朱丽娜, 谭泽宝, 郑井元, 严蓓, 刘敏, 罗坤. 辣椒疫霉菌拮抗细菌的分离鉴定及防效试验[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(2): 201–205.

GAO X H, ZHU L N, TAN Z B, ZHENG J Y, YAN B, LIU M, LUO K. Isolation and identification of antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici* and its antagonistic efficacy[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2023, 49(2): 201–205.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



辣椒疫霉菌拮抗细菌的分离鉴定及防效试验

高香辉¹, 朱丽娜³, 谭泽宝¹, 郑井元², 严蓓¹, 刘敏¹, 罗坤^{1*}

(1.湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省农业科学院蔬菜研究所, 湖南 长沙 410125; 3.金华市婺城区经济特产站, 浙江 金华 321000)

摘要: 在辣椒疫病为害较严重田块采集健康植株, 从其根际土壤中分离筛选出具有抗疫霉菌活性的细菌菌株 Pa608。通过菌落形态特征以及分子水平同源性鉴定, 测定其生理生化指标和胞外产酶特性, 确定该菌株为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*); 采用平板对峙法测试其抗菌谱, 盆栽试验确定防效后应用于温室辣椒田测试温室防效, 发现该菌株对灰霉菌、稻梨孢菌、疫霉菌、炭疽杆菌具有较好的拮抗作用, 当菌液浓度为 1.0×10^9 cfu/mL、盆施 3 mL 对辣椒疫病的盆栽防效达 88.00%; 菌液稀释 10 倍、株施 50 mL 的温室防效达 74.96%。

关键词: 辣椒疫病; 拮抗菌; 分离; 鉴定; 防效

中图分类号: S436.418.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)02-0201-05

Isolation and identification of antagonistic bacteria against *Phytophthora capsici* and its antagonistic efficacy

GAO Xianghui¹, ZHU Lina³, TAN Zebao¹, ZHENG Jingyuan², YAN Bei¹, LIU Min¹, LUO Kun^{1*}

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Institute of Vegetable Research, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410125, China; 3.Economic Specialties Station, Wucheng District, Jinhua, Zhejiang 321000, China)

Abstract: The bacterial strain Pa608 was isolated and screened from the inter-rhizosphere soil of healthy plants collected from fields with severe pepper blight damage, and was identified as *Pseudomonas aeruginosa* through colony morphology, molecular homology and its physiological, biochemical and extracellular enzyme-producing characteristics. The antimicrobial spectrum of *Pseudomonas aeruginosa* was tested by the plate standoff method, and the efficacy of the antimicrobial spectrum was determined in pot tests, and then applied to greenhouse pepper fields to test its greenhouse efficacy. It is found that the strain has good antagonistic effect on *Botrytis cinerea*, *Pyricularia oryzae*, *Phytophthora capsici*, *Bacillus anthracis*, etc. The efficacy was 88.00% in potted plants at a concentration of 1.0×10^9 cfu/mL, pouring 3 mL/pot, and the efficacy was 74.96% in conservatories at the tenfold dilution of the bacterial solution and pouring 50 mL/plant.

Keywords: pepper blight; antagonistic bacteria; separation; identification; control efficacy

由辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)引起的疫病是辣椒生产中危害十分严重的土传病害, 自该病流行以来, 为害范围不断扩大^[1]。辣椒疫霉菌致病力的分化明显, 且容易产生抗药性, 化学防治较难控制,

还会对环境产生危害^[2-4]。生物农药因其对环境危害小、防效持久、不易产生抗药性等优点成为辣椒疫病生物防治的首选。易龙等^[5]采用平板对峙培养法, 从辣椒根际土壤分离获得的 276 个分离物中筛选出

收稿日期: 2022-09-01

修回日期: 2023-01-10

基金项目: 湖南省教育厅项目(20C0958、20A262); 浙江省金华市科学技术局项目(2020-2-007)

作者简介: 高香辉(1997—), 男, 甘肃临夏人, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究, gxh0701@126.com; *通信作者, 罗坤, 博士, 讲师, 主要从事植物病害生物防治及杂草防控研究, luokun@hunau.net

对辣椒疫霉菌有较强拮抗作用的放线菌 7 株, 其中 1 株盆栽防效可达 73.2%; XU 等^[6]于 2017—2018 年测试 1 株多粘类芽孢杆菌 YCP16-23 对辣椒疫病的田间防效为 38.09%~76.24%, 防效不甚稳定。虽然近年来筛选出用于辣椒疫病防治的生防菌株较多, 但可应用于田间防治的优良菌株依然稀缺。

笔者从疫病为害严重的辣椒田块选取健康辣椒植株, 从其根部土壤中分离、筛选对辣椒疫霉菌具有拮抗作用的细菌菌株后, 对其生理生化指标、胞外产酶特性进行了测试, 并通过盆栽及温室大田进行防效试验, 以期筛选出可用于辣椒疫病防治的优良生防菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

2021 年 9 月, 于湖南省长沙县高桥镇采集辣椒疫病为害较严重田块的健康辣椒植株的根际土壤; 辣椒疫霉菌病原菌由湖南农业大学植物保护学院生物测定实验室分离、鉴定获得; 供试辣椒品种为‘中科 M105f1’, 由湖南省农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 辣椒疫霉菌拮抗菌的筛选和鉴定

将采集的土壤样本进行 LB 培养基平板稀释涂布培养, 挑取单菌落, 采用平板对峙法^[7-8]进行辣椒疫霉菌拮抗菌的筛选, 并将产生抑菌带的有效菌株纯化保存。对抑菌效果最好的菌株进行形态学鉴定^[9]、胞外产酶特性鉴定^[10]和 16S rDNA 分子鉴定^[11]。

1.2.2 辣椒疫霉菌拮抗菌的抗菌谱及其对辣椒疫病的防效测定

1) 参照况福元等^[12]的方法, 以真菌病原菌核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、稻梨孢菌(*Pyricularia oryzae*)、灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、沙皮病菌(*Phomopsis citri*)、青霉菌(*Penicillium*)为指示菌进行拮抗细菌的抗菌谱测定。

2) 种植辣椒 36 盆, 设置 3 个处理: T1, 向距离土层表面 1.5 cm 深处土壤注射 3 mL 无菌水, 为对照; T2, 参照农业行业标准《辣椒抗病性鉴定技术规程》中辣椒疫病病原菌接种方式, 向距离土层表面 1.5 cm 深处土壤注射 3 mL 疫霉菌悬浮液, 浓度为 10^7 个孢子/mL^[13], 与辣椒植株根部保持一定

距离, 避免直接接触; T3, 重复 T1, 并在 1 d 后在土层内注射拮抗菌菌悬液 3 mL, 浓度为 1.0×10^9 cfu/mL^[14]。12 个重复。从接种后 10 d 开始, 逐日调查发病情况, 至处理后 45 d 结束, 计算病情指数^[15]。

3) 在湖南省农业科学院蔬菜研究所基地(湖南省长沙县高桥镇)辣椒温室测定拮抗菌的温室防效。处理 1, 为空白对照, 用 50 mL 无菌水浇灌辣椒根部; 处理 2, 拮抗细菌菌悬液(LB 液体培养基, 35 °C、150 r/min 培养 24 h, 获得浓度为 10^9 cfu/mL 菌悬液)稀释 100 倍, 取 50 mL 浇灌辣椒植株根部; 处理 3, 拮抗细菌菌悬液稀释 10 倍, 取 50 mL 浇灌辣椒植株根部。在施菌 30 d 后测量株高。其后 6 月上旬、7 月上旬(气温高、易发病期)处理 2 和处理 3 各施菌 1 次。于 7 月 28 采收计产并统计发病情况。

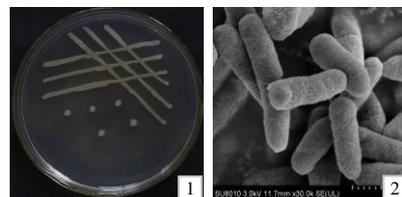
1.2.3 统计分析

运用 Microsoft Excel 2010 进行数据整理; 使用 SPSS 22 软件 One-way ANOVA 进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 辣椒疫霉菌拮抗菌的鉴定结果

从辣椒根际土壤中分离出 209 株细菌, 有 23 株对辣椒疫霉菌有拮抗作用。通过 2 次筛选, 确定有 9 株抑菌效果较好, 其中拮抗效果最好的菌株的抑菌带宽为 17.97 mm, 抑菌率达 89.83%, 将其命名为 Pa608。将该拮抗细菌在 LB 平板上 30 °C 培养 2 d, 菌落呈淡青色, 大多呈圆形, 边缘透明; 革兰染色呈阴性。扫描电镜下菌体呈棒状, 长短不一, 表面不光滑(图 1)。

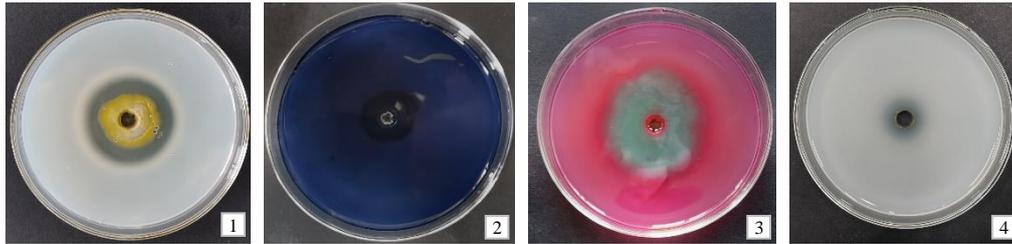


1 在 LB 培养皿中的菌落形态; 2 扫描电镜菌落形态。

图 1 拮抗菌 Pa608 的菌落形态

Fig.1 Colony morphology of antagonistic bacteria strain Pa608

拮抗菌 Pa608 菌株在甘露醇、明胶、10% NaCl、葡萄糖、氧化酶反应中表现为阳性; 在乳糖、L-阿拉伯糖、麦芽糖、半乳糖、木糖、蔗糖、吡啶中表现为阴性。另外, Pa608 菌株可向胞外分泌蛋白酶、纤维素酶, 并具有溶磷效果, 但该菌株不向胞外分泌淀粉酶(图 2)。



1 蛋白酶分泌检测结果; 2 淀粉酶分泌检测结果; 3 纤维素酶分泌检测结果; 4 磷酸盐溶解检测结果。

图 2 拮抗菌 Pa608 的胞外产酶特性

Fig. 2 Characterization of extracellular enzyme of strain Pa608

提取拮抗菌 Pa608 的 DNA, 通过 PCR 扩增获得 1425 bp 16S rDNA 序列。将获得序列在 NCBI 数据库中进行比对, 确定其与 *Pseudomonas aeruginosa* strain WZ029 序列的相似度为 99.30%, 确定该菌株为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)。将获得的 16S rDNA 序列上传至 NCBI

数据库, 获得登录号为 ON908816。从 GenBank 中调取假单胞菌属不同种的 8 个菌株的 16S rDNA 序列, 并结合 Pa608 序列构建系统发育树, 如图 3 所示, 将该菌株命名为 *Pseudomonas aeruginosa* Pa608。

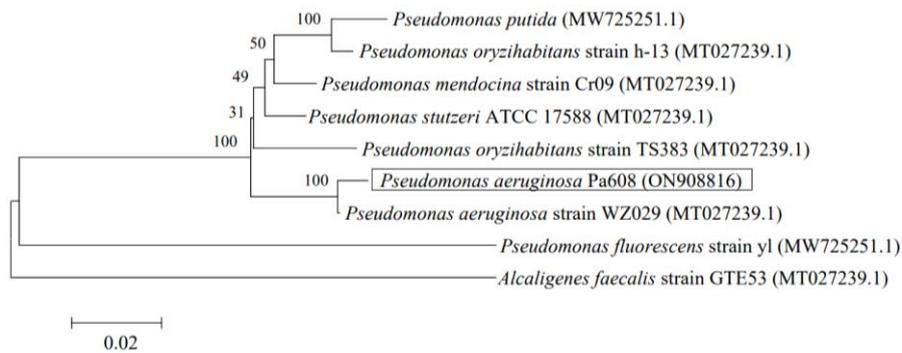


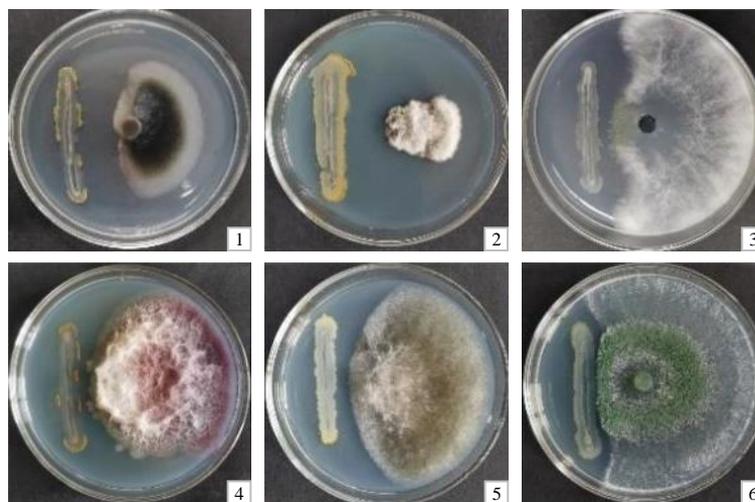
图 3 基于 16S rDNA 基因序列构建的拮抗菌 Pa608 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strain Pa608 based on 16S rDNA gene sequence

2.2 辣椒疫霉菌拮抗细菌的抗菌谱及其防效

拮抗菌 Pa608 对灰霉菌、稻梨孢菌、沙皮病菌等

都具有抑制作用(图 4), 对稻梨孢菌的抑菌效果最好, 抑菌带宽达 18 mm; 对青霉菌几乎无抑制作用。



1 核盘菌; 2 稻瘟病菌; 3 灰霉病菌; 4 炭疽杆菌; 5 沙皮病菌; 6 青霉菌。

图 4 拮抗菌 Pa608 对 6 种植物病原真菌的抑制效果

Fig. 4 Inhibition effect of strain Pa608 on some plant pathogenic fungi

盆栽辣椒在处理后的第10天, T2组的辣椒植株大部分枯萎, 茎基部呈黑色(图5-1), 病情指数为55; 而T3组的病情指数仅为6.6, T2组的防效达

88.00%(图5-2), 长势与对照组相当(图5-3)。后续观察至第45天时, T2组的植株全部死亡, T3组的病害也加重。



1 对照组; 2 疫霉菌处理; 3 疫霉菌+Pa608 菌液处理。

图5 拮抗菌 Pa608 防治辣椒疫病的盆栽防效

Fig.5 Pot experiment on control effect of strain Pa608 against pepper blight

温室田间防效试验结果(表1)表明, 施用 Pa608 菌液后, 处理2、处理3的发病率及病情指数显著下降, 且较高浓度菌液处理的发病率相对较低, 稀释10倍液防效达75.0%, 稀释100倍后防效仍有67.3%。可见该菌株抗病能力较强, 在温室辣椒田中可有效控制疫病的发生。另外, 菌株 Pa608 对辣

椒植株有一定的促生长作用, 处理2、处理3(菌剂处理)植株比处理1(无菌水处理)的健壮, 且植株生长也比处理1的更快。施菌后30d, 处理2、处理3的植株比处理1的高3~4cm, 处理3的产量比处理1的(疫病严重)高1400g左右, 高出116%, 有较明显的保产、增收效果。

表1 拮抗菌 Pa608 对辣椒疫病的温室防效

Table 1 Control efficacy of strain Pa608 against epidemic disease in the greenhouse

处理	株高/cm	单株产量/g	发病率/%	病情指数	防效/%
1	(15.90±5.07)d	(1209.71±103.45)c	97.68	68.93	
2	(18.05±5.52)c	(1928.18±102.83)b	55.00	22.54	67.30
3	(19.96±6.92)b	(2611.02±133.20)a	48.95	17.26	74.96

同列不同字母表示处理间的差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

植物根际有益微生物具有产生多种抗生素、改善植物土壤环境、促进植物生长等多种功效^[16]。辣椒疫病生防菌主要有芽孢杆菌、假单胞菌、木霉菌、链霉菌等, 其中有关芽孢杆菌属和假单胞菌属细菌的研究较多, 但目前真正应用于田间植物病害的防治还有很多问题需要解决, 包括田间定殖难、防治效率低等^[17]。赵旂森等^[18]从土壤中分离出的多粘类芽孢杆菌 LRS-1, 其室内抑菌率为68%, 温室防效为63.4%; 尹敬芳等^[19]所测试的枯草芽孢杆菌 BS 对辣椒疫霉菌的抑制率为33.2%~59.4%, 其与荧光假单胞菌 BCA14 对辣椒疫病的温室防效分别为56.83%和57.81%。笔者分离出来的菌株属铜绿假单胞菌, 对辣椒疫霉菌的抑制率为89.83%, 盆栽防效达88%, 温室田间防效达74.96%, 这表明铜绿假单胞菌具有较强的环境适应能力, 这使得其在根际土

壤中更容易定殖。拮抗菌株 Pa608 对疫霉菌的盆栽抑制效果可持续45d左右; 在后续温室田间试验中增加施菌次数至3次, 其中2次在高温生长期(6—8月), 结果显著降低了疫病危害程度, 还可以起到明显的促生作用, 这跟杨明洁等^[20]的研究结果一致。另外还发现拮抗菌 Pa608 能够分泌多种胞外酶, 如蛋白酶、纤维素酶等, 这可能与该菌株优良的抑菌活性有关, 而这些酶类的丰度指标也是优良生防菌株的参考因素之一^[21]。决定生防菌株是否优良的因子多种多样, 将在后续试验中通过全基因组分析及抑菌物质的分离鉴定来深入探究该菌株的生防机制, 为该类资源的开发利用提供支持。

参考文献:

- [1] 徐暄, 侯旭东, 蒋世昌. 保护地辣椒土传病害绿色防控技术研究进展[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(23): 116-118.

- [2] JI P, CSINOS A S. Effect of oxathiapiprolin on asexual life stages of *Phytophthora capsici* and disease development on vegetables[J]. *Annals of Applied Biology*, 2015, 166(2): 229–235.
- [3] 吴燕梅. 农药的危害及绿色植保技术[J]. 中国农业文摘(农业工程), 2019, 31(2): 71–73.
- [4] XIAO J J, HE Q B, LIU Q Q, et al. Analysis of honey bee exposure to multiple pesticide residues in the hive environment[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 805: 150292.
- [5] 易龙, 肖崇刚, 张迎芳, 等. 辣椒疫病拮抗放线菌的筛选及防治试验初报[J]. 中国蔬菜, 2009(12): 28–32.
- [6] XU S J, JING Z Q, GUO Z J, et al. Growth-promoting and disease-suppressing effects of *Paenibacillus polymyxa* strain YCP16-23 on pepper(*Capsicum annuum*) plants[J]. *Tropical Plant Pathology*, 2020, 45: 415–424.
- [7] 谈泰猛, 黎继烈, 申爱荣, 等. 辣椒疫病拮抗菌的分离、鉴定及其生防效果[J]. 生态学杂志, 2017, 36(4): 988–994.
- [8] 朱宏建, 周倩, 高必达. 放线菌株 D35 的分离鉴定及其抗植物病原真菌活性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2009, 35(2): 138–141.
- [9] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*[M]. Beijing: Science Press, 1984: 729–731.
- [10] 岑贞陆, 何忠, 郑露露. 木薯细菌性枯萎病病原菌致病力差异及其胞外酶活性的研究[J]. 西南农业学报, 2011, 24(6): 2213–2216.
- [11] 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(10): 1035–1041.
- [12] 况福元, 吴小丽, 吕凤青, 等. 菜心炭疽病菌拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36(9): 1350–1355.
- [13] 张莹丽, 巩振辉, 李大伟, 等. 陕西辣椒疫病病原鉴定及其防治剂的室内筛选[J]. 西北农业学报, 2009, 18(5): 336–340.
- [14] 黄艺烁, 谢学文, 石延霞, 等. 一株绿针假单胞菌拮抗黄亚种在防治番茄匍柄霉叶斑病中的应用[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(6): 1265–1275.
- [15] 何烈干, 邹芬, 熊水平, 等. 江西省地方辣椒种质资源对辣椒疫霉菌的抗性差异[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2020, 46(2): 184–190.
- [16] 周文杰, 吕德国, 秦嗣军. 植物与根际微生物相互作用关系研究进展[J]. 吉林农业大学学报, 2016, 38(3): 253–260.
- [17] 杨海君, 谭周进, 肖启明, 等. 假单胞菌的生物防治作用研究[J]. 中国生态农业学报, 2004, 12(3): 163–166.
- [18] 赵旖森, 张亮, 盛浩, 等. 辣椒疫霉菌生防细菌的筛选鉴定及其防效[J]. 中国蔬菜, 2019(1): 65–69.
- [19] 尹敬芳, 张文华, 李健强, 等. 辣椒疫病生防菌的筛选及其抑菌机制初探[J]. 植物病理学报, 2007, 37(1): 88–94.
- [20] 杨明洁, 张晓曼, 赵蔓. 镉胁迫下根际促生菌对紫花地丁生长和镉含量的影响[J]. 西南农业学报, 2022, 35(4): 831–839.
- [21] 刘邮洲, 陈夕军, 尹小乐, 等. 23 株芽胞杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性比较[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 533–542.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维