

引用格式:

高绍凯, 邓金奇, 李晨曦, 朱桓吾, 李陈贞, 罗坤. 辣椒炭疽病拮抗内生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), 2024, 50(4): 60–64.

GAO S K, DENG J Q, LI C X, ZHU H W, LI C Z, LUO K. Isolation and identification of antagonistic endophytic bacteria in capsicum and the control efficiency on capsicum anthracnose[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(4): 60–64.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



辣椒炭疽病拮抗内生菌的分离鉴定及防效试验

高绍凯, 邓金奇, 李晨曦, 朱桓吾, 李陈贞, 罗坤*

(湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 采用组织分离法, 从湖南衡阳地区辣椒炭疽病频发田块的健康果实中筛选具有抗炭疽病活性的内生细菌, 从 100 株内生菌中筛选获得 1 株对辣椒炭疽病菌具有较强拮抗效果的菌株 C3, 该菌株在平板对峙试验中的抑菌带宽为 16.5 mm, 抑菌率达到 80.26%; 结合生理生化特性测定和分子鉴定结果, 确定其为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。在果实针刺试验中, 菌液浓度为 10^7 cfu/mL 时病斑最小; 菌液浓度为 10^7 cfu/mL、每株喷施 50 mL 的盆栽防效达到 90.67%; 将菌液浓度降至 10^6 cfu/mL 时盆栽防效仍有 68.64%; 菌液浓度为 10^7 cfu/mL 时田间防效达到 48.71%, 与 400 mg/L 吡唑醚菌酯对照组的防效(54.18%)接近。

关键词: 辣椒; 炭疽病; 贝莱斯芽孢杆菌; 内生菌; 生物防治

中图分类号: S436.418.1+1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)04-0060-05

Isolation and identification of antagonistic endophytic bacteria in capsicum and the control efficiency on capsicum anthracnose

GAO Shaokai, DENG Jinqi, LI Chenxi, ZHU Huanwu, LI Chenzhen, LUO Kun*

(College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: By tissue separation, endophytic bacteria with anti-anthrax activity were screened from healthy capsicum fruits in Hengyang area of Hunan Province, and one strain named C3 with strong antagonistic effect against anthracnose in capsicum was selected from 100 endophytic strains. The inhibition bandwidth of strain C3 against the pathogen of capsicum anthracnose in the confrontation test on a plate was 16.5 mm, and the inhibition rate reached 80.26%. Based on physiological-biochemical and molecular identification, strain C3 was identified as *Bacillus velezensis*. The lesion was the smallest when strain C3 was applied at bacterial concentration of 1.0×10^7 cfu/mL in fruit infection test. In the indoor pot experiment, the control effect against anthracnose reached 90.67% when spraying 50 mL/per plant with strain C3 bacterial solution at a concentration of 1.0×10^7 cfu/mL, and the control effect was still 68.64% with bacterial solution at a concentration of 1.0×10^6 cfu/mL. Field plot experiments showed that the control effect reached 48.71% when spraying 2 L in each plot with strain C3 bacterial solution at a concentration of 1.0×10^7 cfu/mL, which was close to that(54.18%) of chemical control with 400 mg/L pyraclostrobin.

Keywords: pepper; anthracnose; *Bacillus velezensis*; endophytic bacteria; biological control

辣椒炭疽病是辣椒生长过程中的常见病害^[1]。该病害由辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)引

起, 导致辣椒产量严重下降。辣椒炭疽病病原菌的致病性因种植条件不同而存在差异^[2]。现有的防治

收稿日期: 2024-04-11

修回日期: 2024-06-20

基金项目: 湖南省教育厅项目(20A262)

作者简介: 高绍凯(1998—), 男, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究, 2316724209@qq.com; *通信作者, 罗坤, 博士, 副教授, 主要从事茄科作物病害生物防治研究, luokun@hunau.net

方法主要有化学防治和抗病育种 2 种。长期依赖化学防治,病原菌会产生耐药性,导致防效降低,同时也会对人类健康及生态系统构成威胁,而抗病育种选择精准性要求较高,难度较大。生物防治因其环境友好、无残留已成为研究热点。微生物药剂的应用不仅对调节植物生长和抑制病害耐药性有积极影响,而且比传统的化学防治更加环保和便捷。针对辣椒炭疽病的生物防治研究已取得了诸多进展。申顺善等^[3]从化香的根际土壤中分离得到多黏类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)HK18-8,其对辣椒炭疽病菌的离体防效达 88.58%。曾大兴等^[4]研究发现,枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)C-D6 能产生一种抗菌蛋白,能有效阻止炭疽病菌生长。内生拮抗菌株资源的研究和应用,尤其是针对辣椒病害的生物防控,已经显示出巨大的潜力和广阔的应用前景^[5]。由于生态适应性不强,防治效果不稳定,目前还没有好的用于大面积防治的微生物药剂,从辣椒果实上分离的内生高效拮抗菌有望解决这一问题。

笔者从健康辣椒果实中分离筛选出 1 株内生防菌株,对其进行形态学分析、生理生化特征测定以及分子鉴定,测定该菌株对辣椒离体果实及盆栽和田间果实的防效,以期对辣椒炭疽病防治的生防菌剂开发提供新资源。

1 材料与方法

1.1 材料

2022 年 8 月,于湖南省衡阳市祁东县辣椒炭疽病发病严重的田块中采集健康的辣椒果实。

1.2 方法

1.2.1 辣椒炭疽病菌内生拮抗菌的分离筛选和鉴定

采用组织分离法^[6]分离辣椒果实的内生菌。从消毒后的辣椒果实中取 3 g 果肉,研磨后用清液分别稀释 10、100、1 000、10 000、100 000 倍,涂布在 LB 固体培养基上,置于 37 ℃ 的恒温培养箱中倒置培养 10~24 h,挑选纯化单一菌落。

参照豆雅楠等^[7]的方法,通过平板三点对峙法筛选拮抗细菌。在 28 ℃ 暗处培养,直至对照组菌

落长满培养皿。记录菌落直径和抑菌带宽度,计算抑制率。保存具有最佳抑制效果的菌株作为辣椒炭疽菌的拮抗菌。

根据文献[8],采用《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌鉴定手册》方法,对拮抗效果最佳的菌株进行形态学观察、生理生化特性分析与分子鉴定。

1.2.2 内生拮抗菌的防效测定

1) 内生拮抗菌对针刺离体果实的防效测定。对辣椒果实表面进行消毒,待干燥后,用 10^8 cfu/mL 内生拮抗菌液稀释 10、20、40 倍,将稀释后的培养液均匀涂抹于辣椒果实表面,干燥后采用针刺接种法破坏辣椒表皮,接种 1 mL 10^6 cfu/mL 的辣椒炭疽病菌分生孢子悬浮液。所有样本置于 28 ℃、光暗交替条件下湿润培养,直至阳性对照组辣椒出现炭疽病特征性症状后停止培养。

2) 内生拮抗菌对盆栽辣椒防效的测定。挑选生长状况基本一致的 48 盆辣椒,第 1 种处理,只用 10^6 cfu/mL 辣椒炭疽病菌处理;第 2、第 3 种处理,辣椒植株用 10^6 cfu/mL 炭疽病菌处理后,分别用 10^6 cfu/mL、 10^7 cfu/mL 内生拮抗菌液处理;第 4 种为清水处理。每隔 7 d 喷施 1 次,共喷施 3 次。最后 1 次喷施菌液后 10 d,调查和统计辣椒叶片发病情况并计算发病率、病情指数、相对防效。

3) 内生拮抗菌对辣椒田间果实防效的测定,在湖南省农业科学院蔬菜研究所基地温室进行。设 3 个处理:拮抗菌液组喷 10^7 cfu/mL 拮抗菌菌液,对照组喷清水,阳性对照组喷 400 mg/L 吡唑醚菌酯。分别于 2023 年 6 月 10 日和 7 月 10 日发病高峰期喷施 2 次,分别于 7 月 28 日和 8 月 5 日调查统计辣椒果实的炭疽病发病率,采用的数据处理方法^[9]遵循室内抗性鉴定技术规程。

1.3 数据处理

采用 SPSS 22.0 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 辣椒炭疽病内生拮抗菌的鉴定结果

在辣椒果实中共分离出约 100 株细菌,其中 6 株显示出对辣椒炭疽病菌有拮抗作用。经过 2 轮筛

选, 确定了 1 株具有较强抑菌效果的菌株。测量其抑菌带宽度, 并与空白对照组进行比较, 最优拮抗菌株的平均抑菌带宽度为 16.5 mm, 抑菌率为

80.26%, 将此菌株命名为 C3。该拮抗菌在 28 °C 下于 LB 平板培养 2 d 后, 菌落呈现乳白色, 圆形、边缘不规则, 菌落表面有褶皱(图 1)。



1 辣椒炭疽病形态; 2 C3 与辣椒炭疽病菌的对峙培养; 3 C3 菌落形态。

图 1 辣椒内生拮抗菌 C3 的菌落形态

Fig.1 Morphology of the colony of endophytic antagonistic bacteria strain C3 from capsicum

内生拮抗菌 C3 菌株在生理生化测试中对接触酶、柠檬酸盐测试呈阳性反应, 在甲基红、厌氧生长测试中呈阴性反应。C3 菌株能够分泌蛋白酶和淀粉酶, 具有溶磷功能, 但不具备分泌纤维素酶的能力。提取 C3 的 DNA, 采用 PCR 方法扩增 16S rDNA 片段, 得到长度为 1 450 bp 的基因序列。在 NCBI 数据

库中分析比对后显示其与 *Bacillus velezensis* IAXXS ON259318.1 的基因的序列相似度达到 99%。构建的 C3 的系统发育树如图 2 所示。综合 C3 的生理生化特性和分子鉴定结果, 初步鉴定该菌株为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。

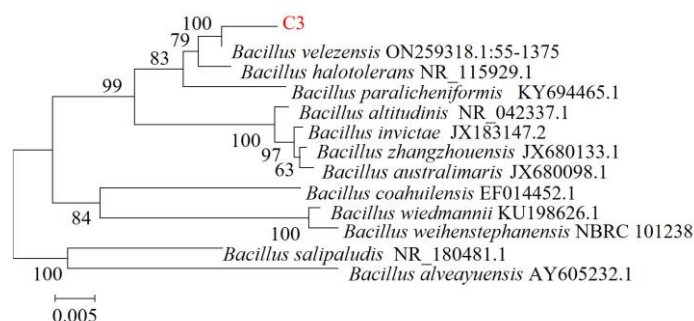


图 2 基于 16S rDNA 基因序列构建的 C3 的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree for strain C3 with 16S rDNA

2.2 辣椒炭疽病内生拮抗菌对炭疽病菌的防效

经辣椒炭疽病菌孢子悬浮液处理 3 d 后的果实出现明显的病斑。与阳性对照组的辣椒果实相比, 不同 C3 菌液浓度处理后的辣椒果实对辣椒炭疽病菌都表现出一定防效, 其中以 10^7 cfu/mL C3 菌液处理的病斑最小, 防治效果最好(图 3)。

在盆栽试验中, 处理 10 d 后, 仅接种辣椒炭疽病菌孢子悬浮液的植株叶片出现大量的病斑, 植株枯萎(图 4), 病情指数高达 44。 10^7 cfu/mL C3 菌

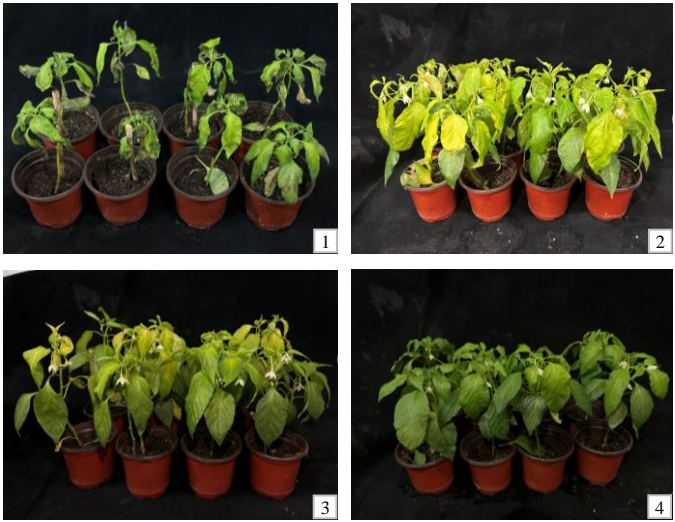
液+ 10^6 cfu/mL 辣椒炭疽病菌的处理组表现出较好的抗病效果, 病情指数降至 4.2, 防效达到 90.46%。 10^6 cfu/mL C3 菌液+ 10^6 cfu/mL 辣椒炭疽病菌处理组的病情指数为 13.8, 防效为 68.64%, 植株长势与对照组的相似。持续观察至第 45 天时, 处理组的植株逐渐枯萎, 清水对照组的植株大量枯萎。这些结果表明, C3 菌的防病效果持续时间较长, 能较持久地控制病害的发展。



1 清水对照; 2 10^6 cfu/mL 炭疽病菌处理; 3 10^6 cfu/mL 炭疽病菌+ 10^8 cfu/mL C3 菌液; 4 10^6 cfu/mL 炭疽病菌+ 10^7 cfu/mL C3 菌液; 5 10^6 cfu/mL 炭疽病菌+ 5.0×10^6 cfu/mL C3 菌液; 6 10^6 cfu/mL 炭疽病菌+ 2.5×10^7 cfu/mL C3 菌液。

图 3 C3 对辣椒果实炭疽病菌的防效

Fig.3 Control effect of strain C3 on anthracnose in pepper fruit



1 10^6 cfu/mL 炭疽病菌处理; 2 10^6 cfu/mL 炭疽病菌+ 10^7 cfu/mL C3 菌液处理; 3 10^6 cfu/mL 炭疽病菌+ 10^6 cfu/mL C3 菌液处理; 4 清水对照。

图 4 C3 对盆栽辣椒炭疽病菌的防效

Fig.4 Control effect of strain C3 on anthracnose in potted peppers

在田间小区试验中,采用平行线法,随机选取每个小区 5 个点固定调查 20 株辣椒炭疽病发病情况并计算田间防效。结果(表 1)显示,15 d 后,施用 C3 菌株培养液处理组的防效与化学农药处理组的

防效分别为 48.71%和 54.18%,差异不显著。这说明 C3 菌株具有较强的抗病能力,在温室条件下能有效防止辣椒炭疽病的发生。

表 1 C3 菌株对辣椒炭疽病的田间防效

Table 1 Control effect of strain C3 on anthracnose in pepper in the field

处理	发病率/%	病情指数	防效/%
400 mg/L 吡唑醚菌酯	(25.28±1.57)b	(13.76±1.13)b	54.18±2.12
10^7 cfu/mL C3 菌液	(26.36±1.48)b	(14.65±1.10)b	48.71±2.01
CK	(51.15±1.15)a	(30.75±1.12)a	

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

已有研究表明,芽孢杆菌的抗菌谱较宽、环境兼容性较好^[10]。蔡学清^[11]研究表明,BS-2 和 BS-1 型枯草芽孢杆菌能有效控制辣椒炭疽病。BioCWB

报道过 1 株芽孢杆菌,将其命名为贝莱斯芽孢杆菌(*B. subtilis*),具有固氮、产吡啶乙酸、产铁载体等促生作用^[12]。生防菌在田间实际应用中的防效稳定性仍有待提高,亟需筛选出在实验室与田间条件下均有稳定防治效果的生防菌株。内生芽孢杆菌不仅能促

进植物生长,还能有效激发植物的抗病性^[13-14]。已有研究表明,贝莱斯芽孢杆菌在防治炭疽病方面具有明显效果^[15],并已在农业生产实践中得到验证和应用^[16]。

C3 对辣椒炭疽病菌有较好的拮抗效果,表现出相近于 400 mg/L 吡唑醚菌酯药剂的防效。内生菌可通过根部裂纹、伤口、以及叶部表面等部位进入宿主植物^[17],在宿主植物体内成功定殖有利于内生菌发挥生防功效,长期对宿主产生积极影响^[18]。C3 菌是从辣椒炭疽病发病严重的田块的健康辣椒果实上分离筛选获得的,与辣椒果实炭疽病菌具有相同生态位,进而可更有效地筛选出具有拮抗效果的生防菌^[19],这种微生物能更好地在辣椒植株上定殖,赋予其持续的抗病性^[20],从而与辣椒植株形成良好的互作关系。

参考文献:

- [1] 邹学校,马艳青,戴雄泽,等. 辣椒在中国的传播与产业发展[J]. 园艺学报, 2020, 47(9): 1715-1726.
- [2] 李小霞,肖仲久. 贵州省辣椒炭疽病原菌鉴定及室内毒力测定[J]. 广东农业科学, 2011, 38(17): 55-57.
- [3] 申顺善,张涛,王娟,等. 多粘类芽孢杆菌 HK18-8 对辣椒炭疽病菌的抑制作用及其定殖能力[J]. 园艺学报, 2019, 46(3): 499-507.
- [4] 曾大兴,张晓阳,贾书娟,等. 枯草芽孢杆菌 C-D6 对辣椒炭疽菌附着胞形成的抑制作用研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(12): 2377-2385.
- [5] GOWTHAM H G, MURALI M, SINGH S B, et al. Plant growth promoting rhizobacteria-Bacillus amyloliquefaciens improves plant growth and induces resistance in chilli against anthracnose disease[J]. Biological Control, 2018, 126: 209-217.
- [6] DENG Z J, ZHANG R D, SHI Y, et al. Characterization of Cd-, Pb-, Zn-resistant endophytic Lasiodiplodia sp. MXSF31 from metal accumulating Portulaca oleracea and its potential in promoting the growth of rape in metal-contaminated soils[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(3): 2346-2357.
- [7] 豆雅楠,牛世全,豆建涛,等. 芽孢杆菌拮抗苹果树腐烂病菌的筛选、鉴定及抑菌活性初探[J]. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2684-2694.
- [8] 廖延雄. 《伯杰氏鉴定细菌学手册》与《伯杰氏分类细菌学手册》[J]. 微生物学通报, 1992(4): 249.
- [9] 毛爱军,胡洽,耿三省. 辣椒炭疽病抗病性鉴定技术及利用[J]. 华北农学报, 2004, 19(2): 87-91.
- [10] 朱宏建,欧阳小燕,周倩,等. 一株辣椒尖孢炭疽病菌拮抗菌株的分离鉴定与发酵条件优化[J]. 植物病理学报, 2012, 42(4): 418-424.
- [11] 蔡学清. 内生枯草芽孢杆菌 BS-2(Bacillus subtilis)在植物体内的定殖及促生作用[D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
- [12] PANNEERSELVAM P, SENAPATI A, KUMAR U, et al. Antagonistic and plant-growth promoting novel Bacillus species from long-term organic farming soils from Sikkim, India[J]. 3 Biotech, 2019, 9(11): 416.
- [13] GAO H Y, LI P Z, XU X X, et al. Research on volatile organic compounds from Bacillus subtilis CF-3: Biocontrol effects on fruit fungal pathogens and dynamic changes during fermentation[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 456.
- [14] RABBEE M F, ALI M S, CHOI J, et al. Bacillus velezensis: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes[J]. Molecules, 2019, 24(6): 1046.
- [15] 冯江鹏,邱莉萍,梁秀燕,等. 草莓胶孢炭疽菌拮抗菌贝莱斯芽孢杆菌 JK3 的鉴定及其抗菌活性[J]. 浙江农业学报, 2020, 32(5): 831-839.
- [16] 张德锋,高艳侠,王亚军,等. 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.
- [17] FERNÁNDEZ-ZLLAMOSAS H, DIAZ E, CARMONA M. Motility, adhesion and c-di-GMP influence the endophytic colonization of rice by Azorarcus sp. cib[J]. Microorganisms, 2021, 9(3): 554.
- [18] 农向群,王广君,蔡霓,等. 绿僵菌与植物的多重关系及其在植物保护中的应用潜力[J]. 植物保护, 2022, 48(3): 22-30.
- [19] SPRAGGE F, BAKKEREN E, JAHN M T, et al. Microbiome diversity protects against pathogens by nutrient blocking[J]. Science, 2023, 382: ead3502.
- [20] 张智浩,邓毅书,聂强,等. 白菜健康株与根肿病患植株的土壤微生物群落和功能差异[J]. 中国生态农业学报(中英文), 2023, 31(4): 530-542.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗 维