



辣椒炭疽病生防菌的筛选鉴定及其防治作用研究

刘晓然,夏欢,王阳

(西北农林科技大学 植物保护学院,陕西杨凌 712100)

摘要 为了分离利用防治辣椒炭疽病的高效生防菌株,从健康辣椒根部分离对辣椒炭疽病菌具有拮抗作用的生防菌,通过多相分类鉴定、盆栽试验、次生代谢产物检测、发酵液活性物质分离及稳定性检测,对生防菌进行分类鉴定和防治作用的初步探索。分离出2株抑菌效果好的链霉菌 LX-4 和 LX-18,分别鉴定为 *Streptomyces angustmyceticus* 和 *S. luteogriseus*。LX-4 和 LX-18 对辣椒种子的萌发无影响,但对辣椒幼苗均有促生作用,对辣椒幼苗株高的增幅分别为 21.61% 和 6.89%,对根长的增幅分别为 6.76% 和 27.48%。LX-4 和 LX-18 均可产生 β -1,3-葡聚糖酶、蛋白酶、噬铁素和脂肪酶。两者的二氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇相粗提物均有抑菌活性,LX-18 的乙酸乙酯相物质抑菌活性高;LX-4 的正丁醇相物质抑菌活性高。LX-4 和 LX-18 发酵液的抑菌活性分别在 pH 2~12 和 pH 6~12 下稳定,均能在温度低于 40 °C 时和光照 96 h 内稳定,但长时间在紫外照射下活性降低。结果表明,LX-4、LX-18 对辣椒炭疽病有很好的生防应用前景。

关键词 辣椒炭疽病菌;链霉菌;多相分类鉴定;次生代谢产物;发酵液稳定性

中图分类号 S476.1

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)08-1067-09

辣椒富含多种营养物质^[1],是中国蔬菜的核心产业之一,引入中国至今已经有 400 多年的历史^[2]。辣椒炭疽病是辣椒的三大病害之一,主要由辣椒炭疽菌(*Colletotrichum capsici*)引起,主要危害辣椒的叶片和果实,影响辣椒的产量和品质,一般减产 10%~15%,严重时减产 40% 以上,威胁辣椒产业的健康发展^[3-4]。目前生产上主要采用农业综合防治^[5]、培育抗病品种^[6]、化学农药防治^[7-8]和生物防治^[9-18]等措施来防治辣椒炭疽病。其中,生物防治因其环保、持效期长,对环境、生态和人类健康安全等优点,已经逐步成为研究热点。

目前,国内外已报道多种生防菌株对辣椒炭疽病菌具有防治作用,主要有生防细菌^[9-11]、生防放线菌^[12-16]和生防真菌^[17-18]。放线菌可以产生多种抗生素、植物激素、水解酶等抑菌活性物质,具有开发生物源农药的潜力^[19]。将生防放线菌制备成活细胞制剂,不仅可以改善土壤结构,降低农药残留,而且环境兼容性好,持效期长^[20]。本研究以辣椒炭疽病菌为靶标菌,从健康辣椒植株

根部筛选得到 2 株广谱高效的拮抗链霉菌,分别命名为 LX-4、LX-18。通过对这两株生防菌的作用机制和发酵液活性进行初步探索,为这两株生防菌的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

生防菌:从陕西、河南等地健康辣椒根部土壤分离获得。

供试病原真菌有 13 种,分别为 L01:辣椒炭疽病原菌(*Colletotrichum capsici*)、L02:烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、L03:番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、L04:苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、L05:玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*)、L06:小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、L07:油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、L08:白菜黑斑病菌(*Alternariabrassicae*)、L09:梨腐烂病菌(*Valsaambiens*)、L10:小麦茎基腐病菌(*Fusarium pseudograminearum*)、L11:香蕉叶枯病菌

收稿日期:2021-08-09 修回日期:2021-10-26

基金项目:陕西省重点研发计划(2020ZDLNY07-02,2021ZDLNY03-05)。

第一作者:刘晓然,男,硕士研究生,从事蔬菜病害生物防治研究。E-mail:756531448@qq.com

通信作者:王阳,女,研究员,博士生导师,主要从事蔬菜病害及生物防治研究。E-mail:wangyang2006@nwsuaf.edu.cn

(*Pseudocercospora fijiensis*)、L12:石榴干腐病菌(*Coniella granati*)、L13:黄瓜靶斑病菌(*Corynespora cassicola*),由西北农林科技大学蔬菜病害及生物防治实验室保存提供。

1.2 试验方法

1.2.1 生防菌的筛选及抑菌活性检测 用土壤稀释法^[21]从健康辣椒植株的根际土壤样品中分离、纯化得到放线菌,以辣椒炭疽病菌等 13 种病原真菌为靶标进行筛选,采用平板对峙法测定土壤放线菌的拮抗作用。于 PDA 上划线培养生防菌,并在距其 4 cm 的位置接种靶标菌菌饼($D=6$ mm),以仅接种靶标菌的培养基作为对照,28 ℃恒温培养,记录抑菌带宽度。每个处理重复 3 次,记算抑菌带宽度。

1.2.2 生防菌多相分类鉴定 形态特征观察:将 2 株生防菌划线接种于 ISP3 培养基上,在培养基上 45°角倾斜插入无菌盖玻片,培养至菌丝孢子长出后取出盖玻片制成扫描样品,用扫描电子显微镜观察其菌丝和孢子特征并拍照。

培养特征观察:将 2 株生防菌接种于 PDA 培养基、GS 培养基以及 ISP1、ISP2、ISP3、ISP4、ISP5、ISP6 和 ISP7 培养基,28 ℃恒温生长 15 d,依据《链霉菌鉴定手册》^[21]观察并记录两株菌株生长状况是否良好,以及基内菌丝、气生菌丝的颜色和是否产生可溶性色素,作为两株生防链霉菌定种的依据。

生理生化测定:生防链霉菌的多项生理生化指标参考《链霉菌鉴定手册》^[22]进行测定。

16S rDNA 测序及进化树构建:参照 CATB 方法提取放线菌 DNA 进行 16S rDNA 基因序列的 PCR 扩增,引物:27F:5'-AGAGTTTGTATC-CTGGCTCAG-3',1492R:5'-GGTTACCTTGT-TACGACTT-3',浓度 10 μ mol/L;反应体系(25 μ L): Master Mix 12.5 μ L,上游引物 1 μ L,下游引物 1 μ L,基因组 DNA 模板 2 μ L,dd H₂O 8.5 μ L;反应条件:94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 90 s,循环 35 次,最后 72 ℃延伸 10 min。扩增产物由擎科生物科技有限公司进行测序,将测序结果在 EzBioCloud 网站进行同源序列比对,用 MEGA 6.06 软件进行序列分析并构建系统进化树^[23]。

1.2.3 生防放线菌对辣椒出芽率以及对辣椒幼苗生长的影响 将 2 株生防菌在 PDA 培养基上划线培养 7 d 后,用无菌水冲洗收集孢子,通过血

球计数板计数配制浓度为 10⁷ CFU/mL 的孢子悬浮液。用两株菌的孢子悬浮液分别对消毒的辣椒种子进行拌种,然后种植到盛有灭菌基质的育种穴盘内,每组种植 60 株,以无菌水处理作为对照,7 d 后统计辣椒的出苗率,然后将每组处理选取 15 株长势均匀的辣椒幼苗移栽到小花盆中,20 d 后统计其株高和根长。每处理重复 3 次。

1.2.4 生防放线菌次生代谢产物检测 参照 Awla 等^[24]的研究方法测定菌株的产几丁质酶、产 β -1,3-葡聚糖酶、产蛋白酶、产纤维素酶、产脂肪酶、产噬铁素能力、产 ACC 脱氨酶能力。

1.2.5 放线菌发酵液中抗真菌活性成分的初步探究 PDB 培养液中接种两株放线菌菌饼($D=6$ mm),28 ℃、180 r/min 恒温振荡培养 7 d 获得两株菌的发酵液,5 000 r/min 离心 10 min 收集发酵上清液,随后按照极性从小到大分别依次加入二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,旋转蒸发干燥后收集 3 种有机相中的物质并称重。取各个萃取相的物质溶于甲醇中配制成浓度为 100 μ g/mL 的溶液,取各相甲醇溶液 100 μ L 与 10 mL PDA 混匀后倒平板,以加等量甲醇的 PDA 作为对照,28 ℃培养 5 d 后用十字交叉法测量对照组和各处理组的菌落直径,试验重复 3 次,抑制率计算公式如下:

菌丝生长抑制率=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径 $\times 100\%$

1.2.6 发酵滤液稳定性检测 分别从温度、pH、紫外光处理和光照处理 4 个方面分析放线菌发酵液的稳定性。将待测菌株的发酵滤液分别在 20 ℃、40 ℃、60 ℃、80 ℃、100 ℃下处理 1 h,在紫外灯下分别照射 30 min、60 min、90 min、120 min、150 min、180 min、210 min、240 min,日光灯下分别照射 12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、84 h、96 h,调节发酵滤液的 pH 为 2、4、6、8、10、12 处理 1 h 后调回原始值。取 1.5 mL 处理后的发酵滤液与 15 mL PDA 培养基混匀后倒板,以加 1.5 mL 无菌水的 PDA 作为对照,28 ℃培养 5 d 后用十字交叉法测量各处理组和对照组的菌落直径,试验重复 3 次,计算抑制率。

1.3 数据分析

采用 IBM SPSS Statistics 21.0 对试验数据进行统计学分析,采用 Duncan's 多重比较法进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗放线菌筛选

拮抗放线菌筛选结果表明(表 1),LX-4、LX-18 两个菌株呈现出广谱的抗真菌活性,对供试的 13 种不同病原真菌均有抑制作用,其中 LX-18 对 13 种病原菌的抑菌半径均大于 10 mm。LX-4、LX-18 均对辣椒炭疽病菌有很强的抑制作用,LX-4 对辣椒炭疽病菌抑菌半径宽达 14.33 mm,LX-18 对辣椒炭疽病菌抑菌半径宽达 21.33 mm(图 1)。

2.2 放线菌分类鉴定

2.2.1 扫描电镜观察 扫描电镜下观察到菌株 LX-4 菌丝丰富,无横隔、无断裂,孢子丝链状卷曲,孢子椭圆状,两端略扁,表面较粗糙,孢子长度大约 1~2 μm;菌株 LX-18 菌丝丰富,无横隔、无断裂,孢子丝长链状,孢子为表面光滑的短杆状,孢子长度大约 0.5~2 μm(图 2)。

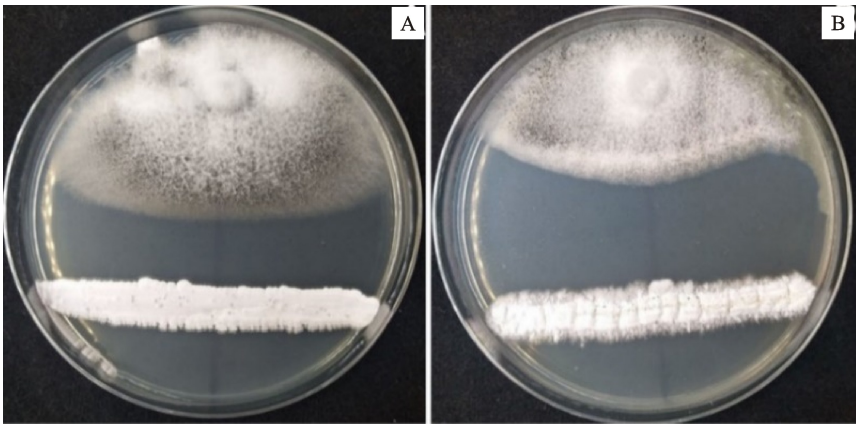
2.2.2 培养特征观察 观察结果显示(表 2),菌株 LX-4 气生菌丝多呈灰白色,基内菌丝在不同培养基上颜色有差别,主要有黄色、白色、砖红色,在所有测试培养基上均不产生可溶性色素,在 ISP2、ISP3、ISP7、PDA 培养基上长势好,在 ISP1、ISP4、ISP6、GS 培养基上长势差;菌株 LX-18 的气生菌丝在 ISP1 上呈现淡黄色,在其他培养基上多呈灰色或白色,基内菌丝在不同培养基上颜色有差别,主要有灰白色、灰黄色、黄褐色,在

ISP6 培养基上产生棕黑色可溶性色素,在 ISP2、ISP3、ISP5、ISP7、PDA 培养基上长势好,在 ISP1、ISP4、ISP6 培养基上长势差。

表 1 两株放线菌对 13 种植物病原真菌的抑制作用

病原菌 Pathogen	抑菌半径/mm Inhibition radius	
	LX-4	LX-18
L01	14.13±0.11 b	15.08±0.10 f
L02	12.70±0.15 cd	19.67±0.25 abc
L03	16.90±0.11 a	21.67±0.12 a
L04	14.70±0.06 bc	17.67±0.06 cde
L05	15.37±0.25 ab	18.67±0.21 bcd
L06	3.56±0.25 j	21.10±0.10 ab
L07	7.63±0.06 f	14.33±0.06 f
L08	10.17±0.11 e	19.67±0.21 abc
L09	11.10±0.12 de	16.33±0.06 def
L10	12.97±0.10 cd	15.67±0.06 ef
L11	13.37±0.06 b	15.13±0.10 f
L12	13.10±0.09 cd	18.05±0.10 cde
L13	14.33±0.06 b	21.33±0.06 a

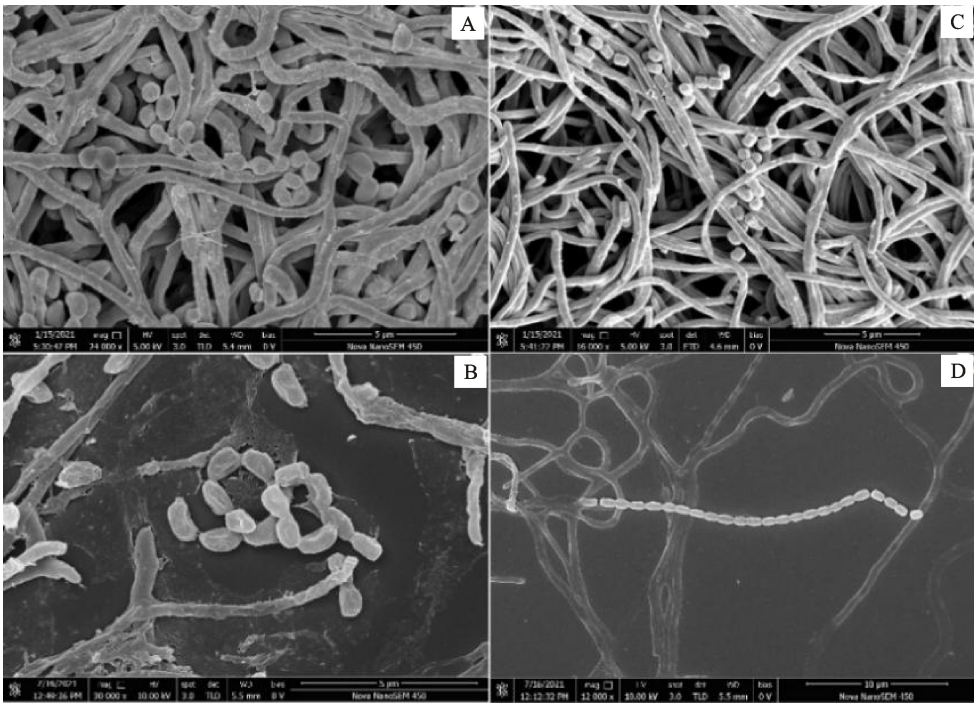
注:数据为“平均值±标准差”,下同。同列中不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。
Note:Data in the table are “mean±standard deviation”,the same below. Different lowercase letters within the same columns indicate significant differences at the 0.05 level.



A. LX-4 菌株对辣椒炭疽病菌抑制作用;B. LX-18 菌株对辣椒炭疽病菌抑制作用
A. Inhibitory effect of LX-4 on *C. capsici*; B. Inhibitory effect of LX-18 on *C. capsici*

图 1 生防菌株对辣椒炭疽菌的血内抑菌效果

Fig. 1 Antagonistic effect of biocontrol strains against *Colletotrichum capsici* in dishes



A、B. LX-4 菌和孢子链;C、D. LX-18 菌和孢子链
A,B. LX-4 colony and spore chain; C,D. LX-18 colony and spore chain

图 2 LX-4 和 LX-18 扫描电镜图

Fig. 2 Scanning electron microscope of LX-4 and LX-18

表 2 两株放线菌的培养特征观察

Table 2 Culture characteristics of two actinomycetes

菌株编号 Isolate No.	培养基 Medium	培养特征 Cultural characteristics			
		长势 Growth vigour	气生菌丝颜色 Aerial mycelium	基内菌丝颜色 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
LX-4	ISP1	+	灰白色 Grey white	淡黄色 Pale yellow	—
	ISP2	+++	灰白色 Grey white	米褐色 Brown beige	—
	ISP3	+++	灰色 Grey	亮黄色 Bright yellow	—
	ISP4	+	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	—
	ISP5	++	白色 White	粉白色 Shocking pink	—
	ISP6	+	白色 White	淡黄色 Pale yellow	—
	ISP7	+++	白色 White	砖红色 Brick red	—
	PDA	+++	白色 White	灰白色 Grey white	—
	GS	+	白色 White	灰白色 Grey white	—
LX-18	ISP1	+	淡黄色 Pale yellow	淡黄色 Pale yellow	—
	ISP2	+++	白色 White	米褐色 Brown beige	—
	ISP3	+++	灰色 Grey	黄褐色 Tawny	—
	ISP4	+	白色 White	白色 White	—
	ISP5	++	白色 White	灰白色 Grey white	—
	ISP6	+	灰白色 Grey white	灰白色 Grey white	棕黑色 Dark brown
	ISP7	+++	灰色 Grey	灰黄色 Yellow grey	—
	PDA	+++	白色 White	灰白色 Grey white	—
	GS	++	白色 White	灰白色 Grey white	—

注：“+”表示生长；“++”表示生长良好；“+++”表示生长旺盛；“—”表示无。
Note: “+” Growth; “++” Good growth; “+++” Vigorous growth; “—” Non.

2.2.3 生理生化鉴定结果 生防放线菌 LX-4 和 LX-18 的相关生理生化指标特征测定结果(表 3)表明,生防菌 LX-4 和 LX-18 均能产生接触酶;

表 3 两株放线菌的生理生化特征

Table 3 Physiobiochemic character of two actinomycetes

生理生化指标 Physiobiochemic index	菌株编号 Isolate No.	
	LX-4	LX-18
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	—
淀粉水解 Starch hydrolysis	—	+
产硫化氢 H ₂ S production	—	—
产黑色素 Melanin production	—	—
吡哌试验 Indole test	+	—
接触酶试验 Contact enzyme test	+	+

注:—, 阴性反应; +, 阳性反应,表 5 同。

Note:—, Negative reaction; +, Positive reaction,the same with table 5.

LX-4 菌株有良好的明胶液化能力,吡哌试验显阳性,无淀粉水解能力;LX-18 菌株有良好的淀粉水解能力,无明胶液化能力,吡哌试验显阴性,两株菌均没有产硫化氢和黑色素的能力。

2.2.4 生防放线菌的 16S rDNA 序列的系统发育分析 16S rDNA 序列的同源性分析结果显示,菌株 LX-4 与 *Streptomyces angustmyceticus* (NRRL B-2347)有最高的序列相似性 99.93%,并在 78%水平聚在进化树上同一支,LX-4 最终鉴定为 *S. angustmyceticus*;菌株 LX-18 和 *Streptomyces luteogriseus* (NBRC 13402)有最高的序列相似性 100%,并在 99%水平上聚在进化树上的同一支,LX-18 最终鉴定为 *S. luteogriseus*(图 3)。

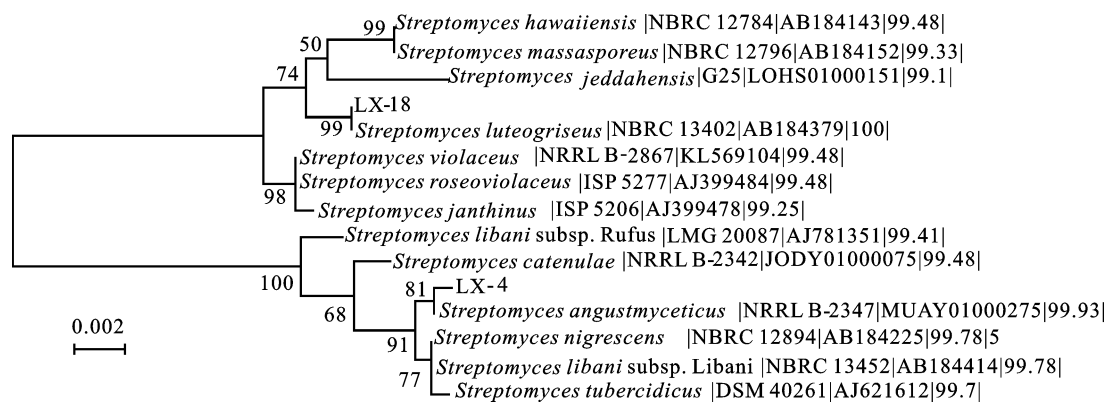


图 3 菌株 LX-18 和 LX-4 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of strains LX-18 and LX-4

2.3 生防放线菌对辣椒出芽率的影响及对辣椒幼苗的促生作用

在播种后第 7 天统计各组的出芽率,结果显示,生防菌 LX-4 和 LX-18 处理较对照出芽率无显著性差异。在播种后第 20 天测量了各处理组辣椒幼苗的株高和根长,结果表明,生防菌 LX-4 和 LX-18 处理较对照株高均有所提高,增幅分别为 21.61%和 6.89%;生防菌 LX-4 和 LX-18 处理较对照根长也均有所增长,且差异均达显著水平,增幅分别为 6.76%和 27.48%(表 4)。综上可知,LX-4 和 LX-18 对辣椒的生长均有促进作用,LX-4 主要能够增加辣椒的株高,LX-18 主要能够增加辣椒的根长。

表 4 两株生防菌下辣椒种子出苗率和幼苗生长

Table 4 Seed emergence rate and seedling growth of pepper under treatment of two biocontrol strains

处理 Treatment	出苗率/% Emergence rate	增幅/% Increase rate	株高/cm Plant height	增幅/% Increase rate	根长/cm Root length	增幅/% Increase rate
CK	96.71±0.64	—	8.56±0.33	—	2.22±0.11	—
LX-4	96.30±0.74	—0.42	10.41±0.17**	21.61	2.37±0.13*	6.76
LX-18	95.07±0.37	—1.70	9.15±0.11*	6.89	2.83±0.34**	27.48

注: * 表示较 CK 差异显著(P<0.05), ** 表示较 CK 差异极显著(P<0.01)。

Note: * represent significant difference compared with the control(P<0.05), ** represent extremely significant difference compared with the control (P<0.01).

2.4 生防放线菌次生代谢产物检测

检测结果表明:菌株 LX-4 能产生 β -1,3-葡聚糖酶、蛋白酶、脂肪酶、铁载体等次生代谢产物;菌株 LX-18 能产生 β -1,3-葡聚糖酶、蛋白酶、脂肪酶、ACC 脱氨酶、纤维素酶和铁载体等次生代谢产物(表 5)。LX-4 和 LX-18 均能产生 β -1,3-葡聚糖酶、蛋白酶、脂肪酶具有降解真菌细胞细胞壁的能力,并能够产生铁载体具有促进辣椒植株生长的能力。

表 5 两株放线菌产生次生代谢产物的能力
Table 5 Ability of two strains of actinomycetes to produce secondary metabolites

次生代谢产物 Secondary metabolites	菌株编号 Isolate No.	
	LX-4	LX-18
几丁质酶 Chitinase	—	—
β -1,3-葡聚糖酶 β -1,3-GA	+	+
纤维素酶 Cellulase	—	+
蛋白酶 Protease	+	+
脂肪酶 Lipase	+	+
铁载体 Siderophore	+	+
ACC 脱氨酶 ACC deaminase	—	+

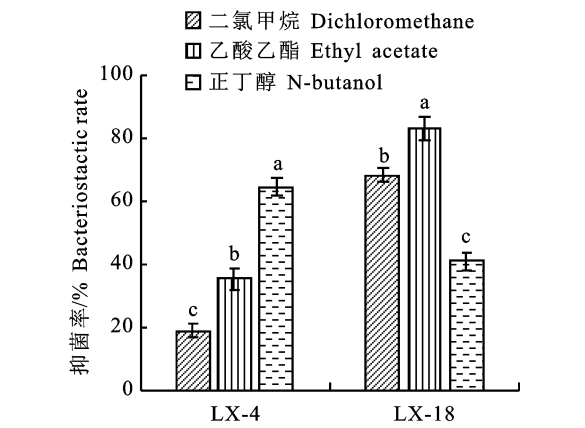
2.5 放线菌发酵液中抗真菌活性成分的初步探究

两株生防菌发酵液的二氯甲烷相、乙酸乙酯相、正丁醇相粗提物对辣椒炭疽菌的抑制作用如图 4 所示,结果表明,LX-4 和 LX-18 的 3 种有机相提取物均有抑菌活性,活性产物种类丰富。菌株 LX-18 发酵液的乙酸乙酯相的抑菌率更高,正丁醇相的抑菌率低,说明发酵液里的主要抑菌物质极性较小;菌株 LX-4 的正丁醇相的抑菌活性高,二氯甲烷相的抑菌率低,发酵液里的主要抑菌物质极性较大(图 4)。

2.6 发酵滤液稳定性检测

如图 5 所示: LX-4 和 LX-18 发酵液的抑菌活性在 40 ℃ 以内活性稳定,随着温度的升高抑菌活性不断下降; LX-4 在酸性环境和碱性环境中抑菌活性都较稳定, LX-18 在碱性环境中活性稳定,在酸性环境中抑菌活性降低; LX-4 和 LX-18 发酵液在可见光条件下有较好的稳定性, LX-4 在可见光连续照射 96 h 条件下较对照无显著差异, LX-18 在可见光连续照射 24 h 时活性轻微下降; LX-4 和 LX-18 发酵液在紫外照射 60 min 后活性显著降低,并随着时间的延长逐渐降低。综上所述, LX-4 和 LX-18 发酵液的的抑菌活性分别在 pH 2~12 和 pH 6~12 下稳定,均能在温度低于

40 ℃ 时和光照 96 h 内稳定,在紫外照射下活性降低。



不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同
Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$), the same below

图 4 两株菌的抑菌活性成分分布
Fig. 4 Distribution of inhibition activity components of two strains

3 讨论与结论

辣椒炭疽病已成为全球性病害,在成熟的果实上发生严重造成巨大的经济损失。而且引起辣椒炭疽病的病原真菌复杂多样且经常混合发生,病害一旦发生防治困难,化学杀菌剂在一定程度上可以防治该病害,但化学农药的持续使用对蔬菜安全和农业可持续发展造成了不良影响^[25]。目前,国家政策要求对农药减施增效,利用生防菌防治辣椒炭疽病成为一个有价值的课题,国内外已报道了多株对辣椒炭疽病有防治效果的生防菌^[9-18]。

本研究通过皿内对峙筛选出 LX-4(*S. angustmyceticus*)和 LX-18(*S. luteogriseus*)两株链霉菌,对供试的 13 种病原菌均有抑制作用。Prisana 等^[12]在 2019 年报道了 *S. angustmyceticus* 对炭疽菌和新月弯孢菌引起的结球白菜叶斑病有很好的防治作用,能够释放出挥发性抗真菌化合物,包括醇类、醛类、羧酸类和脂肪酸类,还可以产生多种细胞壁降解酶;藤黄灰链霉菌 *S. luteogriseus* 抑菌活性产物种类丰富,人们相继从其发酵液中分离出寡霉素 A 和 C^[26]、氨基酸抗生素 KT-151^[27]等抑菌活性产物,对多种病害都有明显的抑制作用。因此, LX-4 和 LX-18 两株链霉菌均有广谱抑菌活性,具有一定的生防潜力。

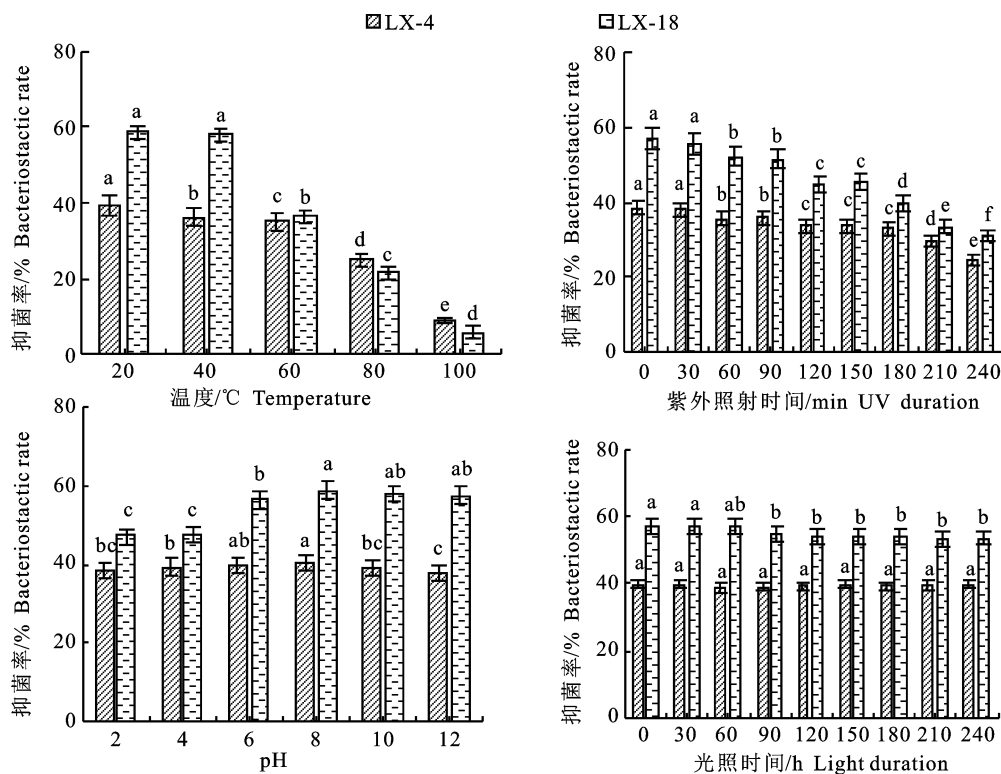


图5 不同处理两株菌发酵液抑菌活性

Fig. 5 Inhibition activities of two strains under different treatments

土壤微生物与植物之间相互作用,植物将光合作用产生的有机物释放到土壤,供给微生物能源,微生物则将蛋白质、淀粉等大分子物质分解成无机养分释放到土壤中,被植物作为营养源吸收^[28],通过增加植物营养来促进植物的生长和发育。此外,植物还可以通过分泌植物激素,产生铁载体等方式促进植物生长。本研究筛选出的两株链霉菌 LX-4 和 LX-18 均能促进辣椒的生长, LX-4 对辣椒株高的增幅达到 21.61%, LX-18 对辣椒根长的增幅达到 27.48%。次生代谢产物检测结果显示 LX-4 和 LX-18 均能产生蛋白酶、脂肪酶和铁载体,初步揭示了两株生防菌的促生机制。

生防菌可以通过生产抗生素、挥发性化合物、合成降解真菌细胞壁的胞外酶、诱导系统抗性以及对营养物和生态位的竞争等方式,保护植物不受各种病原体的影响。真菌的细胞壁主要成分有几丁质、纤维素、葡聚糖、蛋白质和类脂等,生防菌通过产生相关酶类来抑制病原真菌。结果表明 LX-4 和 LX-18 均能分泌 β -1,3-葡聚糖酶、纤维素酶等次生代谢产物,推测它们能够降解辣椒炭疽病菌的真菌细胞壁而表现出一定的抑制作用。LX-4 和 LX-18 发酵液的二氯甲烷相、乙酸乙酯

相和正丁醇相的粗提物均有抑菌活性,说明两株菌能够产生丰富的活性物质。LX-18 的乙酸乙酯相粗提物抑菌活性高,该菌主要产生小极性的抑菌活性化合物; LX-4 的正丁醇相物质抑菌活性高,该菌主要抑菌活性化合物极性较大。本研究以辣椒炭疽病菌为靶标菌,对 LX-4 和 LX-18 的发酵液进行稳定性检测。结果显示, LX-4 的发酵液在强酸碱条件下和可见光处理后较稳定,在高温和紫外条件下,抑菌活性明显下降; LX-18 的发酵液在碱性条件和可见光处理后较稳定,在酸性、高温和紫外条件下,抑菌活性明显下降。发酵液稳定性测定和初步萃取分离为后续这两株菌的活性物质的分离纯化以及产品的开发提供理论依据。

综上所述,本研究筛选到两株生防链霉菌 LX-4 和 LX-18,次生代谢产物丰富,具有广谱抗真菌活性并能促进辣椒幼苗生长。两株菌的发酵液稳性较强,在病害防治上有良好的应用前景,其实际应用还需进行大田试验验证。

参考文献 Reference:

- [1] MATERSKA M, PERUCKA I. Antioxidant activity of the main phenolic compounds isolated from hot pepper fruit (*Capsicum annuum* L.)[J]. *Agriculture & Food Chemistry*, 2005, 53: 1750-1756.

- [2] 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.
ZHOU X X, MA Y Q, DAI X Z, *et al.* Spread and industrial development of pepper in China[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2020, 47(9):1715-1726.
- [3] LINU M S, JISHA M S. Effect of biocontrol agents against *Colletotrichum capsici* causing anthracnose of chilli (*Cap-sicum annuum* L.)[J]. *International Journal of Pharma-ceutics*, 2013, 2:2218-2223.
- [4] 杨佳文,赵尊练,张管曲,等. 陕西线辣椒炭疽病原菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 西北农业学报,2017,26(11):1695-1705.
YANG J W, ZHAO Z L, ZHANG G Q, *et al.* Identification and biological characterization of anthrax bacteria in xian-liao chili pepper in Shaanxi province[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2017, 26(11):1695-1705.
- [5] AMRITA S, RICHA R, VIJAI K G, *et al.* Chilli anthrac-nose: The epidemiology and management[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7:1527.
- [6] 梁芳芳,刘颖,常介田,等. 辣椒新品种‘粮源辣2号’[J]. 园艺学报,2021,48(4):843-844.
LIANG F F, LIU Y, CHANG J T, *et al.* A new chili variety ‘Liangyuan Spicy 2’[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2021, 48(4):843-844.
- [7] REN L, WANG S F, SHI X J, *et al.* Characterisation of sen-sitivity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotri-chum capsici*, causing pepper anthracnose, to picoxystrobin [J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2020, 127: 657-666.
- [8] 薄鑫,罗大成,李海静,等. 6种杀菌剂对辣椒炭疽病菌室内毒力测定及田间药效评价[J]. 西北农业学报,2021, 30(7):1100-1105.
BO X, LUO D CH, LI H J, *et al.* Evaluation of laboratory toxicity and field efficacy of six fungicides against pepper anthracnose [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2021, 30(7):1100-1105.
- [9] SHIN J H, PARK B S, KIM H Y, *et al.* Antagonistic and plant growth-promoting effects of bacillus velezensis BSI isolated from rhizosphere soil in a pepper field[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2021, 37(3):307-314.
- [10] LAMSAL K, KIM S W, KIM Y S, *et al.* Application of rhizobacteria for plant growth promotion effect and bio-control of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on pepper[J]. *Mycobiology*, 2012, 40(4):244-251.
- [11] KIM J D, JEON B J, HAN J W, *et al.* Evaluation of the endophytic nature of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GYL4 and its efficacy in the control of anthracnose[J]. *Pest Management Science*, 2016, 72(8):1529-1536.
- [12] PRISANA W, NAKARIN S, SAISAMORN L, *et al.* *Streptomyces angustmyceticus* NR8-2 as a potential mi-croorganism for the biological control of leaf spots of *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* caused by *Colletotrichum* sp. and *Curvularia unata* [J]. *Biological Control*, 2019, 138(C):104046.
- [13] THILAGAM R, HEMALATHA N. Plant growth promo-tion and chilli anthracnose disease suppression ability of rhizosphere soil actinobacteria[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(6):1835-1849.
- [14] KHOMSAN S, CHITTI T, WILUNDA C, *et al.* Antimi-crobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Re-search in Microbiology*, 2016, 167(4):290-298.
- [15] BUNGONSIRI I, ISADA M, TAKUYA N, *et al.* Identifi-cation of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causa-tive agent of anthracnose disease [J]. *BMC Research Notes*, 2011, 4(1):98.
- [16] INTRA B, GREULE A, BECHTHOLD A, *et al.* Thailan-dins a and b, new polyene macrolactone compounds isola-ted from *Actinokineospora bangkokensis* strain 44EHWT possessing antifungal activity against anthracnose fungi and pathogenic yeasts[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(25):5171-5179.
- [17] NAZIYA B, MURALI M, AMRUTHESH K N. Plant growth-promoting fungi (PGPF) instigate plant growth and induce disease resistance in *Capsicum annuum* L. up-on infection with *Colletotrichum capsici* (Syd.) butler & bisby[J]. *Biomolecules*, 2019, 10(1):41-41.
- [18] YADAV M, DUBEY M K, UPADHYAY R S. Systemic resistance in chilli pepper against anthracnose (caused by *Colletotrichum truncatum*) induced by *Trichoderma har-zianum*, *Trichoderma asperellum* and *Paenibacillus den-dritiformis* [J]. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, 2021, 7(4):307-307.
- [19] CAO L X, QIU Z Q, YOU J L, *et al.* Isolation and charac-terization of endophytic streptomycete antagonists of *Fu-sarium* wilt pathogen from surfaces sterilized banana roots [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 247(2):147-152.
- [20] GERBORE J, BENHAMOU N, VALLANCE J, *et al.* Bio-logical control of plant pathogens: advantages and limita-tions seen through the case study of *Pythium oligandrum* [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(7):4847-4860.
- [21] 方中达. 植病研究方法(第三版)[M]. 北京:中国农业出版社,1998:243-245.
FANG ZH D. Methods of Research on Plant Diseases (Third Edition) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998:243-245.
- [22] Group of Actinomycetes Taxonomy of Institute of Micro-biology of Chinese Academy of Sciences. Streptomyces Identification Manual [M]. Beijing: Science Press, 1975: 13-15.
- [23] KIM O S, CHO Y J, LEE K, *et al.* Introducing Ez Taxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species[J]. *Interna-tional Journal of Systematic and Evolutionary Microbi-ology*, 2012, 62(3):716-721.
- [24] AWLA H K, RASHID T S, HAMID S, *et al.* Plant growth-promoting abilities and biocontrol efficacy of *Streptomyces* sp. UPMRS4 against *Pyricularia oryzae* [J]. *Biological Control*, 2017, 112:55-63.
- [25] PASSARI A K, MISHRA V K, SAIKIA R, *et al.* Isola-

- tion, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their in vitro antimicrobial biosynthetic potential[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 273.
- [26] 李一青, 刘树芳, 李铭刚, 等. 藤黄灰链霉菌 ECO 00001 菌株中寡霉素 A 和 C 的分离鉴定及其活性[J]. 植物保护学报, 2008, 35(1): 47-50.
- LI Y Q, LIU S H F, LI M G, *et al.* Separation and identification of oligomycins A and C from *Streptomyces luteogriseus* ECO 00001 and their bioactive properties [J]. *Journal of Plant Protection*, 2008, 35(1): 47-50.
- [27] MOTOO S, MASARU U, YUTAKA K, *et al.* A new amino acid antibiotic KT-151, produced by *Streptomyces luteogriseus*, strain No. KT-151 [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 2014, 41(9): 1767-1771.
- [28] 孙一凡, 冯朝阳, 冯冰聪, 等. 2 株优良芽孢杆菌的筛选鉴定及促生特性[J]. 西北农业学报, 2021, 30(1): 132-142.
- SUN Y F, FENG C H Y, FENG B C, *et al.* Screening and identification of two *Bacillus* sp. and their growth promotion characteristics [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2021, 30(1): 132-142.

Screening and Identification of Biocontrol Strains of *Colletotrichum capsici* and Their Antagonistic Effect

LIU Xiaoran, XIA Huan and WANG Yang

(College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract The biocontrol strains which have good antagonistic effect on *Colletotrichum capsici* were isolated from healthy pepper roots. Through multiphase classification and identification, pot experiment, detection of secondary metabolites, separation and stability detection of active substances in fermentation broth, the identification and preliminary biocontrol mechanism of biocontrol strains were investigated. Two strains of *Streptomyces*, LX-4 and LX-18 were isolated and identified as *Streptomyces angustmyceticus* and *S. luteogriseus*, respectively. LX-4 and LX-18 had no effect on the germination of pepper seeds, but could promote the growth of pepper seedlings. LX-4 and LX-18 increased the plant height of pepper seedlings by 21.61% and 6.89%, and the root length by 6.76% and 27.48%, respectively. Both strains could produce β -1,3-glucanase, protease, siderophore, and lipase. The crude extracts of dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol from LX-4 and LX-18 showed antifungal activity. The ethyl acetate phase substance in LX-18 had high antifungal activity, n-butanol phase substance in LX-4 had high antifungal activity. The antifungal activities of LX-4 and LX-18 fermentation broth were stable at pH 2–12 and pH 6–12, respectively, both of them were stable at temperature below 40 °C and light for 96 h, but the activity decreased under long time UV irradiation. Overall, it is suggested that the strain LX-4 and LX-18 have good application prospects as biocontrol agents against *Capsicum anthracnose*.

Key words *Colletotrichum capsici*; *Streptomyces*; Polyphase identification; Secondary metabolites; Stability of fermentation broth

Received 2021-08-09

Returned 2021-10-26

Foundation item Key Research and Development Plan of Shaanxi Province (No. 2020ZDLNY07-02, No. 2021ZDLNY03-05).

First author LIU Xiaoran, male, master student. Research area: vegetable diseases and biological control. E-mail: 756531448@qq.com

Corresponding author WANG Yang, female, research fellow, doctoral supervisor. Research area: vegetable diseases and biological control. E-mail: wangyang2006@nwsuaf.edu.cn

(责任编辑: 史亚歌 Responsible editor: SHI Yage)