

咖啡炭疽病菌致病性测定及其拮抗菌筛选

施春兰, 秦得强, 秦小萍, 刘全俊, 何明川, 高 熹, 唐 萍, 吴国星*

云南农业大学植物保护学院, 云南昆明 650201

摘 要: 炭疽病是咖啡的一种常见病害, 对咖啡果实的产量和质量造成严重损失, 开展引起咖啡炭疽病的病原菌致病性及其生物学特性研究, 并筛选有效的拮抗菌, 将为咖啡炭疽病的生物防治提供参考依据。对实验室分离并保存的 4 株咖啡炭疽病病原 Wyq1 (*Colletotrichum siamense*)、Yyq1 (*C. fruticola*)、Xbd1 (*C. gloeosporioides*)、Hb1 (*C. theobromicola*) 孢子悬浮液进行致病性测定, 并选择致病力最强的菌株进行后续试验; 通过平板培养法测定病原菌的生物学特性, 采用平板对峙法对病原菌进行拮抗菌筛选。致病性测定结果显示, 4 株菌株均可侵染健康咖啡叶片, 且在 4 株病原菌中菌株 Xbd1 的致病力最强; 对菌株 Xbd1 的生物学特性测定结果表明, 营养生长最适培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA), 最适氮源为胰蛋白胨, 最适碳源为葡萄糖, 最适温度为 28 °C, 最适 pH 为 7, 不同光照对其营养生长的差异不显著。室内拮抗菌筛选中有 5 株拮抗效果较好, 分别是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) MC4-2、特基拉芽孢杆菌 (*B. tequilensis*) D5-8、贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) MC2-1、弯曲芽孢杆菌 (*B. flexus*) ZLSY3 和解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliticus*) GJ7, 其中拮抗效果最好的是枯草芽孢杆菌 MC4-2, 抑制率达 57.8%。通过咖啡炭疽病病原菌致病性测定及其拮抗菌筛选, 明确了该病原菌的致病性, 筛选得到的 5 株拮抗菌的拮抗效果均较好, 为炭疽病的防治及其生防菌剂的开发奠定基础。

关键词: 咖啡炭疽病; 致病性; 生物学特性; 拮抗菌筛选

中图分类号: S435.712 文献标志码: A

Pathogenicity and Screening of Antagonistic Bacteria of Coffee Anthrax

SHI Chunlan, QIN Deqiang, QIN Xiaoping, LIU Qunjun, HE Mingchuan, GAO Xi, TANG Ping, WU Guoxing*

College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China

Abstract: Anthracnose is a common disease of coffee, which causes serious loss to the yield and quality of coffee fruit. The research on pathogenicity and biological characteristics of the pathogenic bacteria causing coffee anthracnose and screening of effective antagonists would provide reference for the biological control of coffee anthracnose. Four coffee anthracnose pathogens Wyq1 (*Colletotrichum siamense*), Yyq1 (*C. fruticola*), Xbd1 (*C. gloeosporioides*) and Hb1 (*C. theobromicola*) were isolated and tested for pathogenicity by spore suspension, and the most virulent strains were selected for further experiments. The biological characteristics of the pathogenic bacteria were studied by the plate culture method. Screening of antagonistic bacteria was done by the plate confrontation method. Xbd1 strain could infect healthy coffee leaves, and its virulence was the strongest among the four strains. The most suitable medium for the vegetative growth was PDA. The optimal nitrogen source was tryptone. The most suitable carbon source was glucose. The optimum temperature was 28 °C. The optimal pH was 7. The difference of vegetative growth was not significant under different light conditions. *Bacillus subtilis* MC4-2, *B. tequilensis* D5-8, *B. velezensis* MC2-1 and *B. flexus* ZLSY3 and *B. amyloliticus* GJ7 showed good antagonistic effect in indoor screening. *B. subtilis* MC4-2 had the best antagonistic effect, with an inhibitory rate of 57.8%. The study would lay the foundation for the control of anthrax and the development of biocontrol agents.

收稿日期 2023-02-02; 修回日期 2023-04-05

基金项目 云南省科技计划项目 (No. 202105AC160037); JDE (Jacobs Douwe Egberts) 项目 (No. 2019533517000692)。

作者简介 施春兰 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物农药开发与利用。*通信作者 (Corresponding author): 吴国星 (WU Guoxing), E-mail: wugx1@163.com。

Keywords: coffee anthracnose; pathogenic; biological characteristics; screening of antagonistic bacteria

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.05.013

咖啡是茜草科咖啡属多年生经济作物,其产量及消费量是世界三大饮料作物(咖啡、茶叶、可可)之首。我国咖啡种植主要集中于云南和海南,云南作为咖啡的主产区,种植面积达 11.8 万 hm^2 ,98% 的咖啡来自云南^[1-2]。炭疽病是咖啡的一种常见病害,对咖啡果实的产量和品质造成严重损失。当下咖啡炭疽病的防治一般多以百菌清、波尔多液等化学农药为主要手段,辅以修枝、清理病叶等手段,但长期使用化学农药易造成农药残留、水源污染、土壤产生抗药性等问题^[3]。而生物防治具有无污染、无公害、高效等优点,在各种病害的综合防治中发挥着越来越重要的作用^[4]。因此,明确云南咖啡炭疽病病原菌的生物学特性以及找到适合的生防菌对其进行生物防治,对云南咖啡产业的健康发展具有重要意义。

相关研究发现,卡哈瓦炭疽菌(*Colletotrichum kahawae*)会引发咖啡浆果病(CBD),导致高达 80% 的产量损失。胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)和尖孢炭疽菌(*C. acutatum*)也发生在咖啡上,并导致成熟浆果疾病^[5],而且胶孢炭疽菌还被证实是引起老挝小粒种咖啡炭疽病的病原^[6]。CRISTÓBAL-MARTÍNEZ 等^[7]在墨西哥咖啡发病的叶片、枝条和浆果上分离鉴定得到 *C. gigasporum*、*C. gloeosporioides*、*C. karstii*、*C. siamense* 和 *C. theobromicola* 等 5 种炭疽菌。CAO 等^[8]报道了 *C. endophytica*、*C. fructicola*、*C. ledongense*、*C. siamense*、*C. tropicale*、*C. karstii* 和 *C. gigasporum* 等海南地区咖啡的 8 种炭疽病病菌。中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带特色经济作物病害研究室于 2018—2019 年,在云南省和海南省 9 个咖啡种植基地通过采集具典型炭疽病病症的咖啡叶片进行病原菌分离,经组织分离、纯化,共获得 74 个菌株,综合相关研究数据表明,咖啡炭疽病在我国的发生情况比较严重^[9]。

目前,咖啡炭疽病拮抗细菌以芽孢杆菌属(*Bacillus*)为主,拮抗真菌以木霉属(*Trichoderma*)为主,且多数拮抗菌来源于根际土壤或者植物体内,少有分离筛选自昆虫的拮抗菌。ADEBANJO 等^[10]发现 2 株绿色木霉菌(*T. viride*)对接种有炭疽病菌的种子具有良好的抗感染保护作用。汪远

等^[11]从红树植物秋茄植株内分离得到的内生解淀粉芽孢杆菌 Kc-38 菌株,开展该菌株对芒果炭疽病的防治研究,其防治效果可达到 65.12%。RODRÍGUEZ 等^[12]通过研究发现,孢裂链霉菌(*Ascochyta phaseoloru*)对咖啡幼苗上的胶孢炭疽菌具有较高的抑制活性,对咖啡幼苗叶面施用孢裂链霉菌 7 d 后,在咖啡幼苗叶片接种胶孢炭疽菌,可使咖啡炭疽病发病率降至 32%~41%。陈梅春等^[13]发现解淀粉芽孢杆菌 FJAT-2349 对枇杷炭疽病菌有抑制作用,其抑制率达 87.8%,且该菌株的脂肽物质也可有效抑制枇杷炭疽病菌。张晓勇等^[14]发现贝莱斯芽孢杆菌 SB023 的发酵液对芒果炭疽病病原菌有较好抑制活性。梁艳琼等^[15]研究发现,解淀粉芽孢杆菌 JNC2 对柱花草炭疽病菌的抑制效果较好,其抑菌率可达 66%以上。。蔡甜星等^[16]利用从土壤中分离得到的放线菌 V17 对胶孢炭疽菌进行抑菌试验,发现该菌株可以通过抑制菌丝和孢子生长而抑制病原菌的生长。任森等^[17]从昆虫肠道中获得 10 株木霉菌,平板对峙显示加纳木霉(*T. ghanense*) HNDF-T-6 对芒果炭疽病菌的抑菌率可高达 85.64%。张静雅等^[18]从木薯根际土中分离得到对木薯炭疽病菌具抑制效果的短密木霉(*T. brevicompactum*)、棘孢木霉(*T. asperellum*)和长枝木霉(*T. longibrachiatum*),其中长枝木霉 ZJB3-12 对木薯炭疽病菌的抑制效果最好。炭疽病发生为害较广,但对咖啡炭疽病的相关研究较少,并且鲜有对咖啡炭疽病进行拮抗菌筛选的相关研究。实验室前期从景洪市大窝塘村采集感染炭疽病的新鲜咖啡病叶,并分离鉴定出 4 株咖啡炭疽病菌,本研究对 4 株病原菌进行生物学特性研究,选用实验室已有不同来源的拮抗菌,采用平板对峙法筛选出对病原菌具有较好抑制作用的生防菌株,为咖啡炭疽病生物防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 病原菌:供试病原菌共 4 株,暹罗炭疽菌(*C. siamense*)、果生刺盘孢菌(*C. fructicola*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)、草莓炭疽病菌(*C. theobromicola*)各 1 株。

拮抗菌:供试拮抗菌共26株,包括10株芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、1株迪茨氏菌(*Dietzia* sp.)、6株泛菌(*Pantoea* sp.)、3株类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)、1株微杆菌(*Microbacterium* sp.)、1株肠杆菌(*Enterobacter* sp.)、1株莫拉菌(*Moraxella* sp.)、1株红球菌(*Rhodococcus* sp.)、1株不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)、1株克吕沃尔氏菌(*Kluyvera* sp.)。其中,21株分离自泽兰实蝇(*Procecidochares utilis*)幼虫、3株分离自美洲大蠊(*Periplaneta americana*)、2株分离自土壤。均保存于本实验室,备用。

1.1.2 供试培养基 马铃薯蔗糖琼脂培养基(PSA):马铃薯20 g/L,蔗糖2 g/L,琼脂1.5 g/L,121℃灭菌30 min。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯20 g/L,葡萄糖2 g/L,琼脂1.5 g/L,121℃灭菌30 min。

燕麦琼脂培养基(OA):燕麦3 g/L,琼脂1.8 g/L,121℃灭菌30 min。

察氏培养基(Czapek):硝酸钠0.2 g/L,磷酸氢二钾0.1 g/L,氯化钾0.05 g/L,硫酸镁0.05 g/L,硫酸亚铁0.001 g/L,蔗糖3 g/L,琼脂2 g/L,121℃灭菌20 min。

葡萄糖CAM培养基:玉米粉20 g/L,葡萄糖2 g/L,琼脂1.5 g/L,121℃灭菌30 min。

LB培养基:蛋白胨1 g/L,酵母提取物0.5 g/L,氯化钠1 g/L,琼脂1.5 g/L,121℃灭菌20 min。

1.1.3 试剂和仪器 蛋白胨、牛肉膏、葡萄糖、酵母浸粉和氯化钠等分析纯试剂均购自广东环凯微生物科技有限公司。超净工作台购自江苏安泰空气技术有限公司,冰箱购自青岛海尔股份有限公司,高压灭菌锅购自ZEALWAY GR85DA, -80℃超低温冰箱购自THErmo 906, SPX-300B-II型生化培养箱购自北京市永光明医疗仪器有限公司,普通天平购自赛多利斯科学仪器有限公司,人工气候箱购自宁波东南仪器有限公司,电热鼓风恒温干燥箱购自上海市崇明实验仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 致病性测定 参考徐丹丹等^[19]的方法,略有改动。将菌株接种于PDA培养基上,在28℃的条件下培养7 d,备用。选择新鲜、健康、大小均一的咖啡嫩叶作为接种材料,在接种前,先用3%~5%的次氯酸钠水溶液浸泡10 min,然后于70%酒精浸泡30 s,再用灭菌水冲洗3次,用无

菌滤纸吸干组织表面残留的水分,置于接种盘中。取菌株生长过程中产生的橘红色分生孢子团于无菌水中,将其配成浓度为 10^5 个/mL的孢子悬浮液。各取50 μL孢子悬浮液于叶片穿刺部位进行涂抹接种,每个处理重复3次,并以穿刺不接种的咖啡叶片作为对照(CK)。处理后的咖啡叶片置于培养皿中保持湿润处理,于28℃培养箱中进行培养。定期观察叶片产生的病斑情况,选择病斑最大即致病性最强的病原菌进行后续实验。

1.2.2 病原菌株生物学特性研究 (1)不同培养基对真菌菌丝体生长的影响。在PDA培养基上培养7 d的病原菌在无菌环境下打成直径为6 mm的菌饼,分别接种到PDA、PSA、OA、Czapek、葡萄糖CAM培养基上。置于28℃恒温培养箱培养,每隔12 h通过十字交叉法测定并记录菌丝直径。每个处理设置3个重复。比较不同培养基对菌丝体生长速率的影响。

(2)不同碳源对真菌菌丝体生长的影响。参考王汉荣等^[20]和张春霞等^[21]的方法,并略作修改。以Czapek培养基为基础培养基,分别加入等量的葡萄糖、麦芽糖、山梨醇、淀粉、乳糖替换Czapek培养基中的蔗糖,配置对应培养基,以蔗糖为碳源作对照。根据1.2.2-(1)的方法,比较不同碳源对菌丝体生长速率的影响。

(3)不同氮源对真菌菌丝体生长的影响。与1.2.2-(1)相同,以Czapek培养基为基础培养基,分别加入等量的赖氨酸、牛肉浸膏、酵母浸膏、胰蛋白胨、氯化铵替换Czapek培养基中的硝酸钠,配置对应培养基,以硝酸钠为氮源作对照。根据1.2.2-(1)的方法,比较不同氮源对菌丝体生长速率的影响。

(4)不同温度对真菌菌丝体生长的影响。以上述试验获得的最适培养基作为基础培养基,设置15、20、25、28、30、37℃6个不同的温度梯度。根据1.2.2-(1)的方法,测定不同温度条件下菌丝体的生长速率。

(5)不同pH对真菌菌丝体生长的影响。以最适PDA培养基为基础培养基,用0.1%盐酸或0.1%的氢氧化钠调节培养基pH,设置5、6、7、8、9、10等6个pH梯度。根据1.2.2-(1)的方法,测定不同pH条件下菌丝体的生长速率。

(6)光照时长对真菌菌丝体生长的影响。以最适PDA培养基为基础培养基,设置3个不同光照条件,L:D分别为24:0、12:12、0:24。

根据 1.2.2- (1) 的方法, 测定不同光照条件下菌丝体的生长速率。

1.2.3 室内拮抗菌的筛选 参照何明川等^[22]的方法。供试拮抗菌提前在 LB 液体培养基中活化, 然后将发酵液稀释涂布, 得到相应的菌株, 再接种至 LB 培养基上培养。用无菌牙签在距菌饼约 2 cm 处以“十”字线对称接种拮抗菌, 开展平板对峙试验, 然后置于 28 °C 培养箱中培养。每个处理设置 3 个重复。与对照组进行比较, 计算抑菌率。

1.3 数据处理

采用 SPSS 20.0、GraphPad Prism 8.0 和 Microsoft Excel 2010 软件对试验数据进行处理分析和制作图表^[23]; 采用 Duncan's 新复极差法检验不同处理间的差异显著性。

相关计算公式: 菌落直径 (cm) = (横径 + 纵径) / 2; 抑菌率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100%, 其中处理菌落直径为对称拮抗菌两点间的距离减去拮抗菌的抑菌圈半径^[22]。

2 结果与分析

2.1 病原菌致病性测定

致病性结果如图 1 所示, Wyq1、Yyq1、Xbd1、Hb1 菌株均能侵染新鲜健康的咖啡叶片并引发病状。用橘色粘团配置的孢子液侵染 4 d 后, 叶片发病症状为: Wyq1 菌株侵染后的病斑直径为 6.8~9.2 mm; Yyq1 菌株侵染后的病斑直径为 4.5~6.4 mm; Hb1 菌株侵染后的病斑直径为 7.2~10.1 mm; Xbd1 菌株侵染后的病斑直径为 19.0~23.0 mm; 而 CK 叶片仅有穿刺后氧化留下的孔洞。结果表明 Xbd1 菌株的致病性最强。

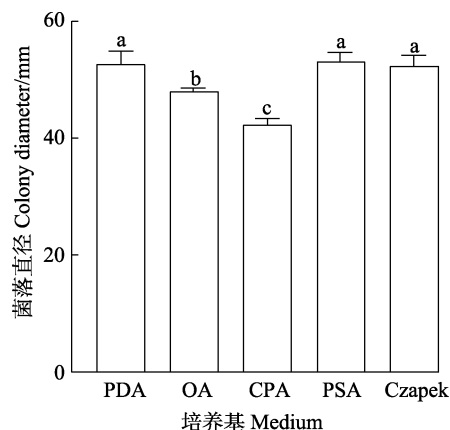


图 1 菌株侵染的叶片发病症状
Fig. 1 Symptoms of strain-infested leaves

2.2 咖啡炭疽病病原真菌生物学特性

2.2.1 不同培养基对真菌菌丝体生长的影响 如图 2 所示, 在不同培养基上, Xbd1 菌株的菌丝生长有差异。可以看出培养 132 h 后适合 Xbd1 菌株生长的培养基有 PDA、PSA、Czapek 培养基, 菌

落直径分别达 53.1、52.8、52.4 mm, 但在葡萄糖 CAM 培养基 (CPA) 上, 其菌落直径仅 42.4 mm, 表明葡萄糖 CAM 培养基不适宜菌株 Xbd1 生长, PDA 培养基是其最适生长培养基。

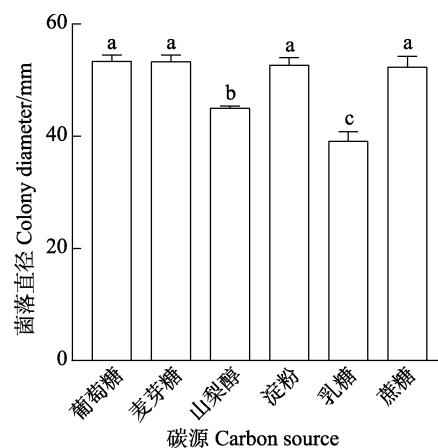


不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 2 不同培养基对 Xbd1 菌株生长的影响

Fig. 2 Effect of different culture media on the growth of Xbd1 strain

2.2.2 不同碳源对真菌菌丝体生长的影响 如图 3 所示, 培养 132 h 后, Xbd1 菌株菌丝体在葡萄糖、麦芽糖、淀粉、蔗糖不同碳源培养基上的菌落直径无显著差异, 菌落直径分别为 53.4、53.2、52.7、52.4 mm, 而以乳糖为碳源的培养基中其菌落直径最小, 仅为 39.1 mm, 生长速度相对较慢。因此, Xbd1 菌株生长的最适碳源为葡萄糖。



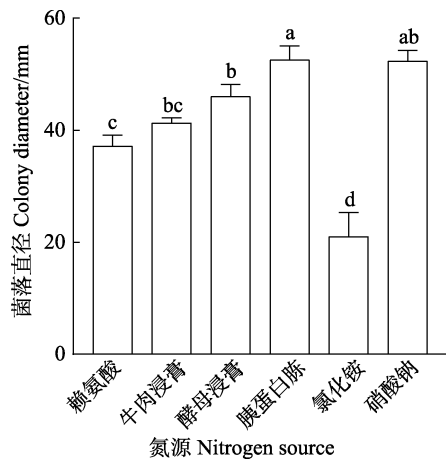
不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$).

图 3 不同碳源对 Xbd1 菌株生长的影响

Fig. 3 Effect of different carbon sources on the growth of Xbd1 strain

2.2.3 不同氮源对真菌菌丝体生长的影响 如图 4 所示, 培养 132 h 后, Xbd1 菌株在不同氮源中对有机氮源和无机氮源的利用差异显著。以胰蛋白胨

为氮源的培养基中,其菌落直径最大为 52.6 mm,其次是硝酸钠和酵母浸膏,菌落直径分别为 52.4、46.0 mm,牛肉浸膏和赖氨酸培养基中的菌落直径较小,分别为 41.3、37.2 mm,以氯化铵为氮源的培养基中其菌落直径最小,仅 21.0 mm,氯化铵是最不适合该菌株生长的氮源。因此,Xbd1 菌株的最适氮源为胰蛋白胨。



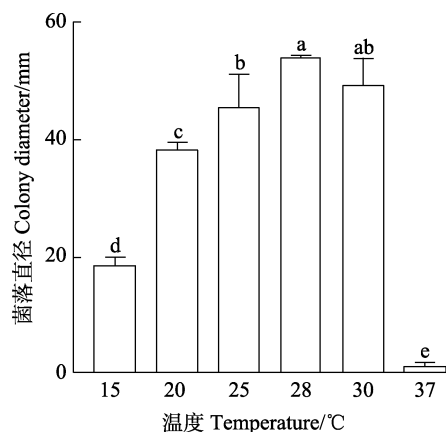
不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 4 不同氮源对 Xbd1 菌株生长的影响

Fig. 4 Effect of different nitrogen sources on the growth of Xbd1 strain

2.2.4 温度对真菌菌丝体生长的影响 如图 5 所示,在 15~28 °C 时,随温度的升高,Xbd1 菌株的菌落直径逐渐增大,30 °C 时菌落直径逐渐减小,37 °C 时菌株生长受到严重抑制,菌丝无法在 PDA 培养基上扩展。从菌落直径来看,Xbd1 菌株生长的最适温度为 28 °C,其菌落直径为 53.9 mm。



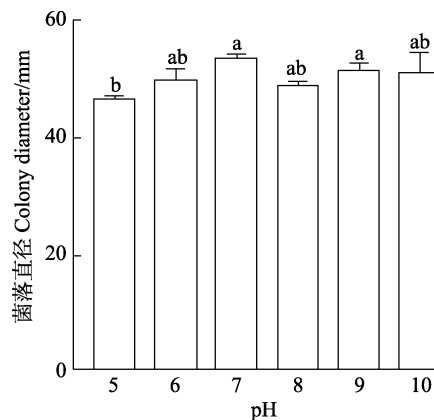
不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 5 不同温度对 Xbd1 营养生长的影响

Fig. 5 Effects of different temperatures on the growth of Xbd1 strain

2.2.5 pH 对真菌菌丝体生长的影响 如图 6 所示,在不同 pH 条件下,Xbd1 菌株菌丝的营养生长差异不显著,在 pH 为 5~10 范围内该菌株均可以较好生长,pH 为 7 时营养生长最快,其菌落直径为 52.1 mm。



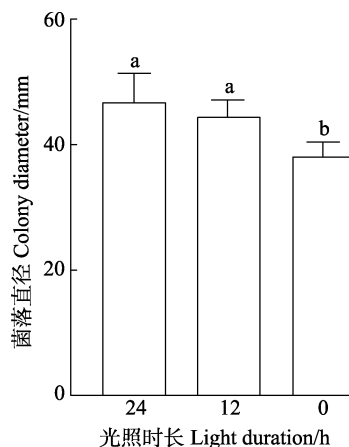
不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 6 不同 pH 对 Xbd1 菌株生长的影响

Fig. 6 Effects of different pH on the growth of Xbd1 strain

2.2.6 光照时长对真菌菌丝体生长的影响 如图 7 所示,Xbd1 菌株在不同光照时长下的生长存在显著差异。该菌株在 24 h 光照条件下生长最好,其菌落直径为 54.0 mm;其次是 12 h 光照;0 h 光照条件下菌株生长情况最差,其菌落直径仅 36.4 mm。



不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters indicate significant difference ($P<0.05$).

图 7 不同光照时长对 Xbd1 菌株生长的影响

Fig. 7 Effects of different light duration on the growth of Xbd1 strain

2.3 拮抗菌的筛选

通过拮抗菌的室内平板对峙试验,由表 1 可知,26 株供试拮抗菌中(表中未体现抑制率为 0

的菌株)，仅有 5 株芽孢杆菌具有拮抗效果，其抑菌活性均较好，分别为枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）MC4-2、特基拉芽孢杆菌（*B. tequilensis*）D5-8、贝莱斯芽孢杆菌（*B. velezensis*）MC2-1、弯曲芽孢杆菌（*B. flexus*）ZLSY3 和解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliticus*）GJ7，其中枯草芽孢杆菌 MC4-2 的抑菌效果最好，抑菌率为 57.8%；其次是贝莱斯芽孢杆菌 MC2-1，抑菌率为 55.8%；特基拉芽孢杆菌 D5-8 抑制率较低，仅为 47.0%。

表 1 拮抗菌对咖啡炭疽病原菌的拮抗效果
Tab. 1 Antagonistic effect of biocontrol bacteria on coffee anthracnose pathogen

菌株编号 Strain No.	拉丁名 Latin name	抑制率 Inhibition rate/%
MC4-2	<i>B. subtilis</i>	57.8±1.09 ^a
D5-8	<i>B. tequilensis</i>	47.0±0.60 ^d
MC2-1	<i>B. velezensis</i>	55.8±1.08 ^b
ZLSY3	<i>B. flexus</i>	52.6±0.67 ^c
GJ7	<i>B. amyloliquefaciens</i>	55.7±0.47 ^b

注：同列不同小写字母表示差异显著（ $P<0.05$ ）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

胶孢炭疽菌属子囊菌亚门腔孢纲黑盘孢目黑盘孢科炭疽菌属真菌，病原菌分生孢子长圆形、圆柱形或椭圆形，单细胞，无色^[24]，是一种咖啡的弱病原体，感染成熟浆果，导致坏死病变。该病原菌也可以引起辣椒、芒果、柠檬、橡胶^[25]、大豆等其他作物的炭疽病。徐丹丹等^[19]采用孢子悬浮液对咖啡叶片进行致病性试验，结果表明，分离到的咖啡炭疽菌中，与胶孢炭疽菌复合种相似的 CA-16、CA-6 两株病原菌的致病性较强，其病斑直径可以达到 19.2~25.5 mm。陆英等^[26]通过菌饼接种法接种咖啡叶片，并以病斑占叶片的面积来判断其致病力强弱，通过试验发现鉴定的 3 种炭疽菌中，草莓炭疽菌（*C. theobromicola*）的致病力最强。本研究在进行致病性探究时采用孢子悬浮液涂抹接种咖啡叶片，发现菌株 Xbd1 的病斑直径可达 19.0~23.0 mm，与菌株 Yyq1、Wyq1、Hb1 相比，菌株 Xbd1 的致病性最强。

光照、pH、温度、培养基类型、氮源、碳源等因素对炭疽病原菌的生长有较大影响^[27]。本研究结果表明：适合菌株 Xbd1 生长的培养基有 PDA、Czapek、PSA 培养基，而 PDA 培养基是最

适培养基。肖文斐等^[28]在研究胶孢炭疽菌的生物学特性时也发现 PDA 培养基是最适合其生长的培养基，其次是 PSA 培养基。适合 Xbd1 菌株生长的最佳氮源是胰蛋白胨，最佳碳源为葡萄糖。Xbd1 菌株在 15~30 ℃ 范围内均可生长，30 ℃ 以上生长减缓，37 ℃ 时严重抑制生长，Xbd1 菌株适宜生长的温度范围与黄思良等^[27]的研究结果相比，Xbd1 菌株的温度范围稍窄。与姚锦爱等^[29]研究的适宜温度范围一致。最适生长温度与李菲菲^[30]的研究结果一致，均为 28 ℃。Xbd1 菌株对酸碱的耐受性很强，生长范围较广，pH 在 5~11 之间均可生长。Xbd1 菌株在不同的酸碱和温度条件下均可较好生长，说明其适应性很强。李延浩^[31]研究发现不同光照条件对菌株生长并无影响，而本研究中全光照和全黑暗条件下 Xbd1 菌株长势较好，而 12 h 光照条件下菌株长势较差，其可能与光照交替有关，说明同一病原菌在不同寄主植物上的发病情况以及生物学特性均存在一定差异。

目前炭疽菌的拮抗菌多以芽孢杆菌属为主，芽孢杆菌具有特殊的性质，可以产生抗生素，对真菌和一些细菌病原体具有拮抗活性，其代谢物可以促进植物生长，并且通过影响根际微生物，触发宿主的防御反应提高植物的抗逆性，使芽孢杆菌成为很好的生物防治剂^[32]。本研究开展炭疽病拮抗菌的筛选，拮抗细菌来源于土壤、美洲大蠊肠道以及泽兰实蝇幼虫。本研究筛选到 5 株抑制效果较好的拮抗菌，分别是枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）MC4-2、特基拉芽孢杆菌（*B. tequilensis*）D5-8、贝莱斯芽孢杆菌（*B. velezensis*）MC2-1、弯曲芽孢杆菌（*B. flexus*）ZLSY3、解淀粉芽孢杆菌（*B. amyloliquefaciens*）GJ7，其中拮抗效果最好的是来自美洲大蠊肠道的枯草芽孢杆菌 MC4-2，但杨苑等^[33]的研究结果表明，分离自土壤的枯草芽孢杆菌对炭疽菌的抑制率最弱，仅为 34%，抑菌效果的差异可能是拮抗菌不同来源导致。徐睿等^[34]利用油茶内生菌诱变获得枯草芽孢杆菌 YL13，研究表明，该菌株对 5 种油茶炭疽菌[胶孢炭疽菌、暹罗炭疽菌（*C. siamense*）、果生炭疽菌（*C. fructicola*）、哈锐炭疽菌（*C. horii*）、山茶炭疽菌（*C. camelliae*）]均有拮抗效果，该菌株的发酵滤液对胶孢炭疽菌的抑制率高达 83.46%。吕倩等^[35]从南海深海沉积样品中分离筛选得到一株甲基营养型芽孢杆菌（*B. methy-*

lotrophicus), 该芽孢杆菌产生的抗真菌脂肽对黄爪炭疽病有一定的抑制作用。韩长志等^[36]在核桃根际土壤中分离出芽孢杆菌, 并通过平板对峙获得其对核桃炭疽病的抑制率可达到 80%以上。真菌对胶孢炭疽菌也有较好的抑制作用, 胡丽杰等^[37]在枸杞中分离得到 4 株内生真菌, 其中镰刀属菌株 NQ8GII4 对胶孢炭疽菌的抑制率高达 93.43%。高云慨^[38]从海南芒果表面和伤口处筛选得到 4 株有较好生防活性的酵母菌, 其中一株蒙毕赤氏酵母 (*Meyerozyma guilliermondii*) LZ5 对芒果炭疽病菌有明显的抑制作用。本研究仅探究拮抗菌对胶孢炭疽菌的室内抑制作用, 还应展开拮抗机制和田间防治效果方面的研究。

4 结论

通过咖啡炭疽病病原菌致病性测定及其拮抗菌筛选, 明确 4 株病原真菌 Wyq1 (*C. siamense*)、Yyq1 (*C. fruticola*)、Xbd1 (*C. gloeosporioides*)、Hb1 (*C. theobromicola*) 中 Xbd1 菌株的致病性最强, 对其进行生物学特性研究, 并通过平板对峙筛选到对 Xbd1 菌株具有抑菌效果较好的 5 株拮抗菌, 为咖啡炭疽病的防治及其生防菌剂的开发奠定基础。

参考文献

- [1] 袁卫晶. 盆栽新宠咖啡树[J]. 北京农业, 2007, 4(10): 17.
YUAN W J. Potted new favorite coffee tree[J]. Beijing Agriculture, 2007, 4(10): 17. (in Chinese)
- [2] 杨弃非. 种植面积占全国九成以上云南咖啡亟需加快国际化建设[J]. 中国食品, 2020(21): 74-76.
YANG Q F. Planting area accounts for more than 90% of the country Yunnan coffee needs to speed up its internationalization[J]. China Food, 2020(21): 74-76. (in Chinese)
- [3] 李雅芝. 小粒咖啡高产栽培及病虫害防治技术[J]. 云南农业, 2019(2): 59-62.
LI Y Z. High-yield cultivation and pest control technology of small-grain coffee[J]. Yunnan Agriculture, 2019(2): 59-62. (in Chinese)
- [4] 程睿君. 烟草黑胫病拮抗菌 ZY-11-2 的筛选、鉴定及其生物防治效果研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019.
CHENG R J. Screening, identification and control efficacy of antagonistic strain ZY-11-2 against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2019. (in Chinese)
- [5] PHUONG T H N, OLGQ V P, PETER O, ERLAND L. Identification of *Colletotrichum* species associated with anthracnose disease of coffee in Vietnam[J]. European Journal of Plant Pathology, 2010, 127(1): 73-87.
- [6] SOMLIT V, SOMDEJ K, KAUCHIA K, SOYTONG K. Nano-particle derived from *Chaetomium cuprem* cc3003 against anthracnose of *Coffea* var. *arabica*[J]. International Journal of Plant Biology, 2018, 9: 7736.
- [7] CRISTÓBAL-MARTÍNEZ A L, DE JESÚS YÁÑEZ-MORALES M, SOLANO-VIDAL R, SEGURA-LEÓN O, HERNÁNDEZ ANGUIANO A M. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 147(3): 605-614.
- [8] CAO X R, XU X M, CHE H Y, WEST J S, LUO D Q. Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China[J]. Plant Pathology, 2019, 68(6): 1146-1156.
- [9] 巩佳莉. 我国咖啡炭疽病的病原鉴定及化防药剂筛选研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
GONG J L. Pathogen identification of coffee anthracnose and screening of chemical control agents in China[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [10] ADEBANJO A, BANKOLE S A. Evaluation of some fungi and bacteria for biocontrol of anthracnose disease of cowpea[J]. Journal of Basic Microbiology, 2004, 44(1): 3-9.
- [11] 汪远, 詹儒林, 何红, 吕柱彬, 余小琴, 梁永琪, 陈鸿宇. 红树内生细菌菌株 Kc-38 的抗菌物质及对采后芒果炭疽病的防效[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(1): 82-87.
WANG Y, ZHAN R L, HE H, LYU Z B, YU X Q, LIANG Y Q, CHEN H Y. Antibiotic substances produced by mangrove endophytic bacteria Kc-38 and biocontrol efficacy on anthracnose of postharvest mangoes[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(1): 82-87. (in Chinese)
- [12] RODRÍGUEZ G A A, DE ABREU M S, PINTO F A M F, MONTEIRO A C A, NÚÑEZ Á M P, VILELA DE RESENDE, M L, SOUZA J T, VASCONCELOS DE MEDEIROS F H. *Phialomyces macrosporus* decreases anthracnose severity on coffee seedlings by competition for nutrients and induced resistance[J]. Biological Control, 2016, 103: 119-128.
- [13] 陈梅春, 邓英杰, 陈燕萍, 肖荣凤, 郑雪芳, 朱育菁, 王阶平, 刘波. 芽孢杆菌 FJAT-2349 脂肽对枇杷采后炭疽病菌抑制作用[J]. 福建农业学报, 2021, 36(12): 1478-1483.
CHEN M C, DENG Y J, CHEN Y P, XIAO R F, ZHENG X F, ZHU Y J, WANG J P, LIU B. Inhibitory effect of lipopeptide secreted by *Bacillus* strain FJAT-2349 against anthracnose pathogen[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2021, 36(12): 1478-1483. (in Chinese)

- [14] 张晓勇, 李树江, 严凯, 翁贵英, 张韵霞, 龙巧芳, 梁文, 蒋芹娜, 杨友联. 杧果采后炭疽病生防菌株筛选及其培养特性研究[J]. 园艺学报, 2021, 48(11): 2171-2184.
ZHANG X Y, LI S J, YAN K, WENG G Y, ZHANG Y X, LONG Q F, LIANG W, JIANG Q N, YANG Y L. Screening and culture characteristics of biocontrol strains of postharvest anthracnose of mango[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2021, 48(11): 2171-2184. (in Chinese)
- [15] 梁艳琼, 吴伟怀, 习金根, 李锐, 郑金龙, 黄兴, 贺春萍, 易克贤. 柱花草炭疽病生防菌的筛选与鉴定[C]//中国植物病理学会 2018 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2018: 530.
LIANG Y Q, WU W H, XI J G, LI R, ZHENG J L, HUANG X, HE C P, YI K X. Screening and identification of biocontrol bacteria against anthracnose of stylosanthes anthracnose[C]//Proceedings of the 2018 Academic Annual Conference of the Chinese Society of Plant Pathology. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2018: 530. (in Chinese)
- [16] 蔡甜星, 刘楚非, 蔡烈伟, 陈美霞, 郑世仲. 放线菌 V17 的分类鉴定及其对茶树炭疽病菌的拮抗作用[J]. 宁德师范学院学报(自然科学版), 2021, 33(3): 281-285.
CAI T X, LIU C F, CAI L W, CHEN M X, ZHENG S Z. Identification of the actinomycete V17 and its antagonistic effect against *Gloeosporium theae-sinensis* Miyake[J]. Journal of Ningde Normal University (Natural Science Edition), 2021, 33(3): 281-285. (in Chinese)
- [17] 任森, 胡伊慧, 张漫漫, 高圣风, 侯巨梅, 刘铜. 昆虫肠道木霉及其对芒果炭疽病菌拮抗作用[J]. 菌物学报, 2022, 41(1): 30-40.
REN S, HU Y H, ZHANG M M, GAO S F, HOU J M, LIU T. *Trichoderma* spp. from insect guts and their antagonistic effects against mango anthracnose[J]. Journal of Fungus, 2022, 41(1): 30-40. (in Chinese)
- [18] 张静雅, 李欣雨, 张成, 王伟伟, 张鹏, 侯巨梅, 刘铜. 木薯炭疽病拮抗木霉菌筛选与室内防效研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 115-124.
ZHANG J Y, LI X Y, ZHANG C, WANG W W, ZHANG P, HOU J M, LIU T. Screening of antagonistic *Trichoderma* against cassava anthracnose and investigation on its control effect in laboratory[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 115-124. (in Chinese)
- [19] 徐丹丹, 石力允, 张羽, 林泽勉, 姜子德, 乔方. 广东咖啡炭疽病原菌初步鉴定及防治药剂筛选[J]. 广东农业科学, 2021, 48(2): 100-107.
XU D D, SHI L Y, ZHANG Y, LIN Z M, JIANG Z D, QIAO F. Pathogen identification of anthracnose disease on *Coffea arabica* in Guangdong province and screening of fungicides[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2021, 48(2): 100-107. (in Chinese)
- [20] 王汉荣, 茹水江, 郭仁裕, 滕敏忠, 邱鸿奎. 浙江省长瓜炭疽病原菌鉴定及其病原生物学特性研究[J]. 浙江农业学报, 2000(2): 33-37.
WANG H R, RU S J, GUO R Y, TENG M Z, QIU H K. Studies on the identification of pathogen and the biological characteristics of calabash gourds anthracnose[J]. Acta Agriculturae Zhejiang, 2000(2): 33-37. (in Chinese)
- [21] 张春霞, 李加智, 何明霞, 蔡志英. 两种橡胶炭疽病菌生物学特性的比较[J]. 西南农业学报, 2008(3): 667-670.
ZHANG C X, LI J Z, HE M X, CAI Z Y. Biological characteristics of two 2 species of *Colletotrichum* causing *Colletotrichum* leaf disease[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2008(3): 667-670. (in Chinese)
- [22] 何明川, 王志江, 谢永辉, 詹筱国, 柯昌磊, 李微杰, 张忠, 吴国星. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2): 428-439.
HE M C, WANG Z J, XIE Y H, ZHAN X G, KE C L, LI W J, ZHANG Z, WU G X. Screening, identification and fermentation optimization of antagonists against tobacco black shank disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(2): 428-439. (in Chinese)
- [23] 曾舒泉, 钮徐融, 魏聪聪, 何明川, 兰明先, 谢永辉, 王志江, 詹筱国, 吴国星, 金红岗. 烟草黑胫病拮抗菌 HZ15 的发酵条件优化[J]. 江西农业学报, 2021, 33(12): 14-20.
ZENG S Q, NIU X R, WEI C C, HE M C, LAN M X, XIE Y H, WANG Z J, ZHAN X G, WU G X, JIN H G. Optimization of fermentation conditions for antagonistic bacterium HZ15 against tobacco black shank[J]. Journal of Jiangxi Agricultural, 2021, 33(12): 14-20. (in Chinese)
- [24] 刘昌芬. 主要热带和亚热带经济作物的胶孢炭疽菌[J]. 云南热作科技, 1995(4): 27-29.
LIU C F. *Colletotrichum gloeosporioides* of major tropical and subtropical cash crops[J]. Journal of Yunnan Tropical Crops Sciences and Technology, 1995(4): 27-29. (in Chinese)
- [25] 林春花, 徐轩, 戈玉琪. 中国 2 种橡胶树炭疽病菌对咪鲜胺敏感性比较[J]. 热带作物学报, 2017, 38(1): 111-115.
LIN C H, XU X, GE Y Q. Comparison of sensitivity between two *Colletotrichum* species from *Hevea brasiliensis* to prochloraz in China[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(1): 111-115. (in Chinese)
- [26] 陆英, 贺春萍, 吴伟怀, 梁艳琼, 郑金龙, 黄兴, 习金根, 谭施北, 易克贤. 我国咖啡炭疽病菌致病力分化[J]. 西南农业学报, 2021, 34(5): 1008-1014.
LU Y, HE C P, WU W H, LIANG Y Q, ZHENG J L, HUANG X, XI J G, TAN S B, YI K X. Pathogenicity differentiation of coffee anthracnose in China[J]. Southwest

- China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(5): 1008-1014. (in Chinese)
- [27] 黄思良, 霍秀娟, 韦刚. 芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 的生物学特性[J]. 西南农业学报, 1999(2): 84-90.
- HUANG S L, HUO X J, WEI G. Biological characters of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 1999(2): 84-90. (in Chinese)
- [28] 肖文斐, 柴伟国, 忻雅, 来文国, 阮松林, 裘劭人. 杭州地区葡萄炭疽菌的分离与生物学特性[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(10): 2034-2035, 2043.
- XIAO W F, CHAI W G, XIN Y, LAI W G, RUAN S L, QIU J R. Isolation and biological characteristics of anthracnose from grape in Hangzhou[J]. Zhejiang Agricultural Science, 2021, 62(10): 2034-2035, 2043. (in Chinese)
- [29] 姚锦爱, 黄鹏, 余德亿, 吕苏敏, 林丽萍. 建兰炭疽病原菌分离、鉴定及培养条件优化[J]. 热带作物学报, 2011, 32(10): 1940-1944.
- YAO J A, HUANG P, YU D Y, LYU S M, LIN L P. Isolation and identification of anthracnose pathogen on *Cymbidium ensifolium* and its culture condition optimization[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2011, 32(10): 1940-1944. (in Chinese)
- [30] 李菲菲. 柑橘炭疽病的生物学特性及其拮抗酵母菌的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- LI F F. Study on biological characteristics and antagonistic yeast of citrus anthracnose[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009. (in Chinese)
- [31] 李延浩. 开封地区桂花炭疽病菌的生物学特性及病菌毒素性质的研究[D]. 郑州: 河南大学, 2010.
- LI Y H. Study on biological characteristics and toxin properties of *Anthraxis osmanthus* in Kaifeng[D]. Zhengzhou: Henan University, 2010. (in Chinese)
- [32] WULFF E G, MGUNI C M, MANSFELD-GIESE K, FELS J, LVBECK M, HOCKENHULL J. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*[J]. Plant Pathology, 2002, 51(5): 574-584. (in Chinese)
- [33] 杨苑, 郭永福, 唐浩智, 张彪, 史龚林, 汪娅婷, 杨俊, 魏兰芳. 云南芒果采后炭疽病原菌的鉴定及室内生防菌的筛选[J]. 生物技术进展, 2020, 10(4): 371-377.
- YANG Y, GUO Y F, TANG H Z, ZHANG B, SHI G L, WANG Y T, YANG J, WEI L F. Identification of pathogen responsible for anthracnose disease of postharvest mango in Yunnan province and its biocontrol bacterium laboratory screening[J]. Biotechnology Progress, 2020, 10(4): 371-377. (in Chinese)
- [34] 徐睿, 刘闯, 张潇月, 周国英, 刘君昂. 2株拮抗生防菌对油茶炭疽病多种病原菌的抑菌活性及防效[J]. 经济林研究, 2021, 39(2): 27-34.
- XU R, LIU C, ZHANG X Y, ZHOU G Y, LIU J A. Antibacterial activity and control effect of two antagonistic biocontrol bacteria against various pathogens of *Camellia oleifera* anthracnose[J]. Non-wood Forest Research, 2021, 39(2): 27-34. (in Chinese)
- [35] 吕倩, 胡江春, 王楠, 王雪梅, 王书锦. 南海深海甲基营养型芽孢杆菌 SHB114 抗真菌脂肽活性产物的研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 113-120.
- LYU Q, HU J C, WANG N, WANG X M, WANG S J. Anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* SHB114 isolated from South China Sea[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(1): 113-120. (in Chinese)
- [36] 韩长志, 霍超. 核桃炭疽病生防菌 yb33 的鉴定及其次生代谢物特性分析[J]. 经济林研究, 2015, 33(3): 63-67.
- HAN C Z, HUO C. Identification of biocontrol strain yb33 against walnut anthracnose and analysis of its secondary metabolite characteristics[J]. Non-wood Forest Research, 2015, 33(3): 63-67. (in Chinese)
- [37] 胡丽杰, 闫思远, 李嘉泓, 杜娟, 顾沛雯. 枸杞内生真菌对胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 的拮抗作用及生防潜力[J]. 植物保护, 2020, 46(1): 125-133.
- HU L J, YAN S Y, LI J H, DU J, GU P W. Antagonism and control potential of endophytic fungi from *Lycium barbarum* against *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Plant Protection, 2020, 46(1): 125-133. (in Chinese)
- [38] 高云慨. 一株对芒果炭疽病菌有拮抗作用的酵母菌的鉴定、生防效果评价及抗逆性改良[D]. 海口: 海南大学, 2014.
- GAO Y K. Identification and biocontrol efficacy assessment of yeast strain against *Colletotrichum gloeosporioides* of mango fruit and its stress resistance improvement[D]. Hainan University, 2014. (in Chinese)