

# 绿针假单胞菌 HG28-5 对辣椒疫病的抑制活性及其根际定殖特性的研究

申顺善<sup>1</sup>, 赵玉华<sup>1</sup>, 张利敬<sup>1</sup>, 常淑娴<sup>1</sup>, 王晶晶<sup>1</sup>, 朴凤植<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>河南农业大学植物保护学院, 新型农药创制与应用河南省重点实验室, 郑州 450002; <sup>2</sup>河南农业大学园艺学院, 郑州 450002)

**摘要:** 利用从小麦根系中分离筛选得到的对辣椒疫病有较高拮抗活性的生防细菌 HG28-5 菌株, 通过平板对峙培养、产孢子囊和孢子萌发试验, 检测其对辣椒疫霉菌的抑制作用; 通过温室盆栽和小区试验, 确认了对辣椒疫病的防治效果; 以平板稀释培养法测定了根际定殖能力。结果表明: HG28-5 显著抑制辣椒疫霉菌菌丝生长、游动孢子囊形成、游动孢子释放和休止孢子萌发; HG28-5 对辣椒疫病具有明显的防治效果, 在盆栽试验和小区试验中防治效果分别达到 92.57% 和 79.96%; HG28-5 在辣椒根际的定殖能力很强, 用 HG28-5 处理辣椒种子, 发芽胚根中其定殖密度为  $4.45 \times 10^5$  cfu · cm<sup>-1</sup>, HG28-5 处理盆栽辣椒根系, 其定殖密度稳定维持在  $10^5$  cfu · g<sup>-1</sup> 以上。利用形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析, 鉴定 HG28-5 为绿针假单胞菌。

**关键词:** 辣椒; 疫病; 生物防治; 生防菌; 绿针假单胞菌; 生防菌

**中图分类号:** S 641.3

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2013) 08-1574-09

## Inhibitory Activity of *Pseudomonas chlororaphis* HG28-5 Against Phytophthora Blight of Pepper and Its Root Colonization Characteristic

SHEN Shun-shan<sup>1</sup>, ZHAO Yu-hua<sup>1</sup>, ZHANG Li-jing<sup>1</sup>, CHANG Shu-xian<sup>1</sup>, WANG Jing-jing<sup>1</sup>, and PIAO Feng-zhi<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Henan New Pesticide Discovery Key Laboratory, Zhengzhou 450002, China; <sup>2</sup>College of Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** A promising biocontrol agent HG28-5, a strain with strong effect on Phytophthora blight of pepper, which selected from the root of healthy wheat (*Triticum aestivum* Linn.). *In vitro* and *in vivo* experiments were used to determine its antifungal effect and root colonization ability. The results showed that, HG28-5 inhibited mycelial growth, germination of cystospores, and formation of zoospore and zoosporangia of *Phytophthora capsici* *in vitro* experiment; HG28-5 performed good control potential against Phytophthora blight of pepper in pot and vinyl house experiment, the control efficiencies were 92.57% and 79.96% respectively; HG28-5 successfully colonized on roots of pepper, the colonized density of HG28-5 was  $4.45 \times 10^5$  cfu · cm<sup>-1</sup> with Double Layer Filter paper method, in pot experiment, HG28-5

收稿日期: 2013-03-11; 修回日期: 2013-06-17

基金项目: 河南省重点科技攻关项目 (092102110096, 122102110042)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: piao1203@163.com)

persisted on root of pepper with a relative high population density which was more than  $10^5$  cfu · g<sup>-1</sup>; Based on the morphological, physiological characteristics and 16S rDNA sequence analysis, the strain HG28-5 was identified as *Pseudomonas chlororaphis*.

**Key words:** pepper; Phytophthora blight; biocontrol; biocontrol bacteria; *Pseudomonas chlororaphis*

辣椒疫病是由辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici* Leon) 引起的辣椒生产中危害最严重的土传病害之一 (周启明 等, 1984; Hwang & Kim, 1995; Hausbeck & Lamour, 2004; 兰成忠 等, 2011, 曾莉 等, 2011)。现已从土壤、植物体等分离筛选到大量对辣椒疫病具有控制作用的生防菌 (Jee et al., 1988; Park & Kim, 1989; 易图永 等, 2002; 杜晓华 等, 2005; Shen et al., 2005; 何延静 等, 2006; 张政兵和郭海明, 2006; 尹敬芳 等, 2007; 柳凤 等, 2010; 马晓飞 等, 2012), 但目前能够在生产中推广应用的还很少。

利用生防菌防治植物病害受诸多因素影响。生防菌在根部定殖能力是决定生防成功与否的关键, 只有引入的生防菌在根际土壤和植物根系中能够长期保持有效抑制病原菌的种群密度, 才能同病原菌进行竞争, 防止病原菌对植物的侵害, 达到防治病害的目的 (Kloepper, 1992; 张炳欣 等, 2000; Shen et al., 2005)。笔者的课题组从河南省信阳、南阳、许昌、原阳和商丘等地区采集 116 份健康小麦根系及根际土壤样品, 采用平板稀释法分离获得 871 株根际细菌, 其中筛选到对辣椒疫霉具有较强拮抗活性的 HG28-5 菌株。本研究中以 HG28-5 菌株为试验材料, 以辣椒疫霉为指示病原菌, 明确了该菌株对辣椒疫霉的拮抗能力、对辣椒疫病的防治效果和其在辣椒根际的定殖能力。在此基础上, 根据形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析对 HG28-5 进行了鉴定, 确定 HG28-5 为绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

生防菌 HG28-5 菌株从河南省商丘市健康小麦 (‘周麦 18’ 品种) 根系分离所得, 并参照吴蔼民等 (2001) 的方法, 利用逐步提高培养基中利福平浓度的方法获得稳定的抗利福平 ( $100 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 菌株, 保存于  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 。辣椒疫霉菌由本实验室分离鉴定、保存。供试辣椒品种为 ‘新机遇’ (河南豫艺种业科技发展有限公司), 在  $25 \sim 28 \text{ }^\circ\text{C}$  自然光周期的温室中育苗, 以长有 5 片真叶的辣椒幼苗作为试验材料。供试培养基为 TSA 培养基 (胰酪胨大豆肉汤 30 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1 000 mL)、PDK 培养基 (马铃薯葡萄糖肉汤 20 g, 蛋白胨 10 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1 000 mL) 和 V8A 培养基 (V8 果蔬汁 100 mL, 碳酸钙 1 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 900 mL)。

### 1.2 HG28-5 抑制辣椒疫霉菌的测定方法

#### 1.2.1 对菌丝生长的抑制能力

采用平板对峙培养法。在 PDK 平板中央接种辣椒疫霉菌块, 距离菌块 25 mm 处接种 HG28-5, 置于  $28 \text{ }^\circ\text{C}$  恒温箱培养 7 d 后调查抑菌带大小 (Shen et al., 2002)。

#### 1.2.2 对游动孢子囊形成的抑制能力

用打孔器 (直径 8 mm) 切取 V8A 培养基上长满辣椒疫霉的菌饼, 移置于无菌空培养皿 (直径 60 mm) 中, 倒入配制好的 HG28-5 菌悬液 ( $10^8$  cfu · mL<sup>-1</sup>), 以刚好浸湿菌饼表面菌丝为准, 然后

置于 25 °C 恒温箱中光照培养 16 h, 在显微镜下检测游动孢子囊数量 (Shen et al., 2002), 无菌水处理作对照。

### 1.2.3 对游动孢子释放的抑制能力

将无菌水中产生的游动孢子囊置于 HG28-5 菌悬液中, 4 °C 冰箱放置 30 min, 然后在室温条件下放置 30 min, 诱发其释放游动孢子。在显微镜下检测游动孢子囊总数和游动孢子释放后残留的空壳孢子囊数, 计算游动孢子释放率, 无菌水处理作对照。

### 1.2.4 对休止孢子萌发的抑制能力

诱发游动孢子释放后用双层纱布过滤获得休止孢子悬浮液, 取等量的休止孢子悬浮液和 HG28-5 菌悬液均匀混合, 取 30  $\mu$ L 混合液滴到凹玻片上, 置于 25 °C 恒温箱中保湿培养, 每隔 2 h 在显微镜下检测休止孢子萌发数, 计算休止孢子萌发率, 无菌水作对照。

## 1.3 HG28-5 对辣椒疫病防治效果

盆栽试验: 以生长 5 片真叶的健康辣椒幼苗为材料, 在浓度为  $10^8$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 HG28-5 菌悬液中浸根处理 1 h 后移栽至盆钵 (直径 10 cm), 然后接种辣椒疫霉游动孢子悬浮液 ( $10^4$   $\cdot$  mL<sup>-1</sup>, 5 mL  $\cdot$  株<sup>-1</sup>), 放置于温室中管理。以 80% 代森锰锌可湿性粉剂 1 000 倍液浸根处理和清水浸根处理为对照。3 次重复, 每重复 10 盆。

小区试验: 2012 年在河南农业大学科教园区辣椒疫病常发温室进行。选取生长 5 片真叶的健康幼苗, 移栽前在浓度为  $10^8$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 的 HG28-5 菌悬液里浸根 1 h, 定植时再将  $10^8$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 浓度的 HG28-5 菌悬液一次灌注处理 (100 mL  $\cdot$  株<sup>-1</sup>), 以 80% 代森锰锌可湿性粉剂 1 000 倍液灌注处理和清水移栽前浸根 1 h 后定植时一次灌注处理为对照。3 次重复, 每小区面积为 12 m<sup>2</sup>, 随机区组排列。

## 1.4 HG28-5 根际定殖能力的测定

参照 Shen 等 (2005) 的方法, 采用双层滤纸法 (Double Layer Filter paper method, DLF) 和盆栽试验测定 HG28-5 根际定殖能力。

双层滤纸法: 经 70% 酒精表面消毒过的辣椒种子在 HG28-5 菌悬液 ( $10^8$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 中浸泡处理 1 h 后, 无菌水冲洗 3 次, 用吸水纸吸干表面, 整齐放于铺有一层湿润滤纸的培养皿 (直径 90 mm) 中, 然后上面再覆盖一层湿润滤纸, 置于 28 °C 恒温箱内培养。种子长出胚根后, 切取 1 cm 根尖, 磨碎, 用 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 溶液稀释  $10^3$  倍和  $10^4$  倍后, 涂抹在含有利福平的 TSA 培养基平板上, 置于 28 °C 恒温箱内培养 48 h, 待 HG28-5 形成菌落, 检测菌落数, 推算出 HG28-5 根际定殖密度。

盆栽试验测定法: 将生长 5 片真叶的幼苗在 HG28-5 菌悬液 ( $10^8$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>) 中浸根处理 1 h 后移栽至盆钵 (直径 10 cm), 置于温室中管理, 每隔 7 d 测定 HG28-5 在辣椒根系的定殖密度。测定方法为: 轻轻拔出辣椒根系, 在流水中清洗, 剪取 1 g, 研磨后用 0.1 mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 溶液稀释  $10^3$  倍和  $10^4$  倍涂抹在含利福平的 TSA 培养基平板上, 置于 28 °C 恒温箱内培养 48 h, 待形成菌落, 测定其定殖密度。

## 1.5 HG28-5 的鉴定

### 1.5.1 形态特征及生理生化特性

主要参考伯杰氏细菌鉴定手册 (Buchanan & Gibbons, 1994), 按照常规细菌学方法鉴定 HG28-5 的形态特征及生理生化特性。

### 1.5.2 16S rDNA 序列测定及系统发育树分析

以 HG28-5 基因组 DNA 为模板, 以细菌 16S rDNA 通用引物 27f(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') (Chen & Chen, 2009) 为上、下游引物扩增 HG28-5 菌株的 16S rDNA。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

PCR 反应条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 30 个循环后 72 °C 延伸 5 min。

PCR 产物采用 TaKaRa 公司 DNA 凝胶回收试剂盒回收, 回收片段与 pMD18-T Vector 载体连接, 热转化至 JM109 感受态细胞中, 涂布平板, 过夜培养菌体, 挑选阳性菌落, 提取质粒, 送宝生物工程(大连)有限公司测序。

将测序结果采用 NCBI 数据库中的 BLAST 软件进行同源性比较, 以 Clustal X 进行多重比对, 利用 MEGA4 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 HG28-5 对辣椒疫霉菌的抑制能力

HG28-5 对辣椒疫霉菌菌丝生长具有较强的抑制活性, 其抑菌带宽度为 11 mm, 接种菌后 14 d 抑菌效果仍很明显(图 1)。

HG28-5 能使辣椒疫霉菌的菌丝顶端和分枝处膨大, 分枝数多, 且粗而短, 而对照菌丝生长细长而均匀, 没有膨大现象(结果未显示)。

在皿内试验中 HG28-5 显著抑制辣椒疫霉菌游动孢子囊形成和游动孢子的释放。在 25 °C 恒温箱中光照培养 16 h 后, 对照处理每个视野(10 × 10 倍镜)有疫霉菌游动孢子囊 124.33 个, 而 HG28-5 处理每个视野(10 × 10 倍镜)有 34.25 个, 对游动孢子囊形成的抑制率达到 72.45% (表 1); 在皿内诱发游动孢子囊释放游动孢子处理 30 min 后, 对照处理的游动孢子释放率为 86.49%, 而 HG28-5 处理为 37.33%, 其抑制率达到 56.84% (表 1)。



图 1 HG28-5 对辣椒疫霉菌菌丝生长的抑制效果  
Fig. 1 Inhibitory effect of HG28-5 on mycelia growth of *Phytophthora capsici*

表 1 HG28-5 对辣椒疫霉菌游动孢子囊形成和游动孢子释放的抑制效果

Table 1 Inhibitory effect of HG28-5 on zoosporangia formation and zoospore release of *Phytophthora capsici*

处理 Treatment	游动孢子囊 Zoosporangia		游动孢子 Zoospore	
	数量 Number	抑制率/% Inhibition ratio	释放率/% Release rate	抑制率/% Inhibition ratio
HG28-5	34.25 ± 0.07 a	72.45	37.33 ± 0.39 a	56.84
对照 Control	124.33 ± 0.17 b	-	86.49 ± 0.43 b	-

注: 小写字母表示  $P < 0.05$  水平下的差异显著性。

Note: The different small letters after values show significant difference at  $P < 0.05$ .

HG28-5 对辣椒疫霉菌休止孢子萌发的抑制效果显著。

在对照处理培养 2 h 时休止孢子萌发率达 84.56%，培养 8 h 萌发率达到了 98.80%，而 HG28-5 处理的休止孢子培养 2 h 时萌发率为 19.89%，培养 8 h 时萌发率为 37.32%，抑制效果达到 62.23%（图 2）。

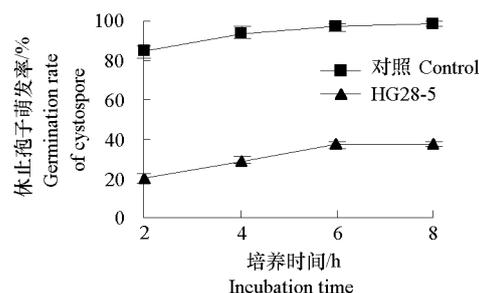


图 2 HG28-5 对辣椒疫霉菌休止孢子萌发的抑制效果  
Fig. 2 Inhibitory effect of HG28-5 on cystospore germination of *Phytophthora capsici*

## 2.2 HG28-5 对辣椒疫病的防治效果

盆栽试验结果表明，辣椒幼苗对照在移栽后 7 d 开始发病，植株茎基部表现变黑症状，14 d 茎部变黑腐烂，上部叶片枯萎，植株死亡，发病率达 100%。代森锰锌处理比对照发病症状表现稍迟，且进展缓慢，移栽后 14 d 发病率达 29.80%，防治效果为 70.20%，而 HG28-5 处理移栽后 10 d 开始茎部表现轻微的发病症状，14 d 时发病率仅为 7.43%，防治效果达到 92.57%（表 2，图 3）。

在温室小区试验中，移栽后 60 d 对照的发病率为 20.86%，而 HG28-5 处理的发病率仅为 4.18%，其防治效果达到 79.96%，代森锰锌处理的发病率为 10.24%，防治效果为 50.91%（表 2）。在盆栽试验和温室小区试验中，HG28-5 处理对辣椒疫病的防治效果均显著高于农药处理，并且 HG28-5 处理的辣椒株高、长势明显优于对照和代森锰锌处理（图 3）。

表 2 在盆栽试验和温室小区试验中 HG28-5 对辣椒疫病的防治效果

Table 2 Control effect of HG28-5 on phytophthora blight of pepper in pot and vinyl house experiments

处理 Treatment	盆栽试验 Pot experiment		小区试验 Vinyl house experiment	
	发病率/% Disease incidence	防治效果/% Control efficiency	发病率/% Disease incidence	防治效果/% Control efficiency
HG28-5	7.43 ± 0.08 a	92.57	4.18 ± 0.31 a	79.96
代森锰锌 Mancozeb	29.80 ± 0.13 b	70.20	10.24 ± 0.22 b	50.91
对照 Control	100.00 ± 0.00 c	-	20.86 ± 0.72 c	-

注：小写字母表示  $P < 0.05$  水平下的差异显著性。

Note: The different small letters after values show significant difference at  $P < 0.05$ .



图 3 HG28-5 处理对辣椒疫病的防治效果

A: HG28-5 处理; B: 代森锰锌处理; C: 清水 (对照)。

Fig. 3 Suppression of phytophthora blight of pepper by treatment of HG28-5

A: HG28-5; B: Mancozeb; C: Water (Control).

### 2.3 HG28-5 根际定殖能力

采用双层滤纸法测定 HG28-5 根际定殖能力, 结果发现, 随着种子发芽, HG28-5 能够移动到胚根很好地定殖, 其定殖密度为  $4.75 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

如表 3 所示, 在盆栽试验中, HG28-5 在辣椒根系定殖密度比较稳定, 移栽 7 d 时定殖密度为  $6.85 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ , 到 28 d 时定殖密度为  $6.75 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ , 均稳定维持在  $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$  以上。

### 2.4 HG28-5 的鉴定

HG28-5 菌体为微弯的杆状, 直径  $0.6 \sim 0.8 \mu\text{m}$ , 长  $1.5 \sim 2.8 \mu\text{m}$ , 革兰氏阴性, 多个极生鞭毛。生长温度范围  $4 \sim 40 \text{ }^\circ\text{C}$ , 最适生长温度为  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 最高耐盐浓度为 5%。在 NA 平板上菌落成米白色, 圆形, 表面光滑湿润, 不透明, 边缘整齐。能利用蔗糖、葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、丙酸盐和丁酸盐, 不能利用 L-阿拉伯糖和山梨醇, 硝酸盐还原反应、过氧化氢酶反应和明胶液化呈阳性, 淀粉水解呈阴性, 产生荧光色素, 不产生  $\text{H}_2\text{S}$  (表 4)。

表 3 盆栽试验中 HG28-5 菌株在辣椒根系定殖能力

Table 3 The root colonization ability of HG28-5 on the root of pepper in pot experiment

测定时间/d Detection days	定殖密度/ $(\times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1})$ Colonization density
7	$6.85 \pm 0.03 \text{ a}$
14	$5.96 \pm 0.02 \text{ ab}$
21	$6.27 \pm 0.03 \text{ ab}$
28	$6.75 \pm 0.01 \text{ a}$

注: 小写字母表示  $P < 0.05$  水平下的差异显著性。

Note: The different small letters after values show significant difference at  $P < 0.05$ .

表 4 HG28-5 与绿针假单胞菌的形态特征与生理生化特性

Table 4 Morphological characteristics and physiological and biochemical characteristics of HG28-5 and *Pseudomonas chlororaphis*

鉴定指标 Identification index	HG28-5	绿针假单胞菌 (Buchanan & Gibbons, 1994) <i>Pseudomonas chlororaphis</i>
菌体形状 Cell shape	微弯杆状 Slightly curved rod	杆状 Rod
菌体大小 Cell size	$0.6 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 1.5 \sim 2.8 \mu\text{m}$	$0.7 \sim 0.8 \mu\text{m} \times 1.5 \sim 3.6 \mu\text{m}$
鞭毛 Flagellum	多个极生 Multi polar flagella	单个或多个极生 Single or multi polar flagella
革兰氏反应 Gram reaction	-	-
在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 生长 Growth at $4 \text{ }^\circ\text{C}$	+	+
在 $41 \text{ }^\circ\text{C}$ 生长 Growth at $41 \text{ }^\circ\text{C}$	-	-
最适生长温度 Optimum growth temperature	$30 \text{ }^\circ\text{C}$	$28 \sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$
耐盐浓度 Salt concentration	$\leq 5\%$	$0 \sim 6\%$
生长所需的营养 Nutrition		
蔗糖 Sucrose	+	+
葡萄糖 Glucose	+	+
半乳糖 Galactose	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	-
柠檬酸盐 Citrate	NT	+
丙酸盐 Propionate	+	+
丁酸盐 Butyrate	+	+
淀粉水解 Amylolysis	-	-
明胶液化 Gelatine liquefaction	+	+
荧光色素 Fluorochrome	+	+
$\text{H}_2\text{S}$ 的产生 Production of $\text{H}_2\text{S}$	-	-
硝酸盐还原反应 Nitrate reduction reaction	+	+
过氧化氢酶反应 Catalase reaction	+	+

注: + 表示阳性, - 表示阴性, NT 表示未测定。

Note: + indicates positive, - indicates negative, NT indicates No determination.

HG28-5 菌株的 16S rDNA 序列分析结果显示, 其 16S rDNA 序列长度为 1 474 bp, 与绿针假单胞菌 (*Pseudomonas chlororaphis*) 同源性最高, 相似值均在 99% 以上。

用 MEGA4 软件将 HG28-5 与来自 GenBank 的 9 株细菌一起构建基于 16S rDNA 序列的系统发育树 (图 4), HG28-5 与绿针假单胞菌聚在一个分支。

结合形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析结果, 将 HG28-5 鉴定为绿针假单胞菌。

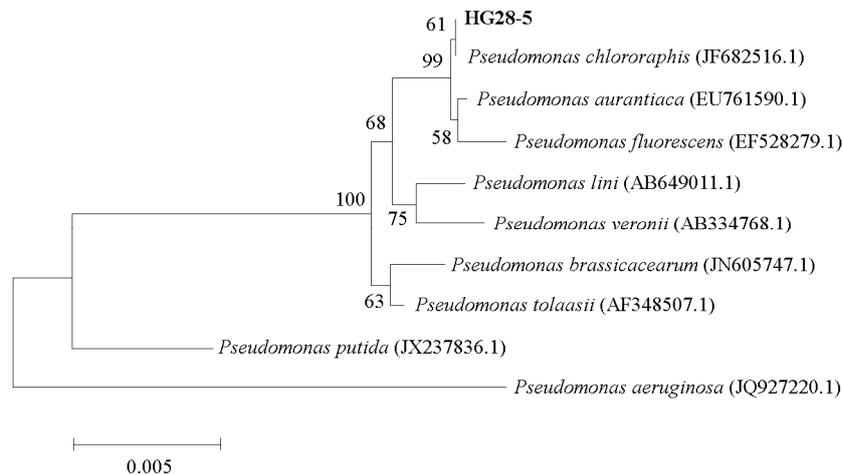


图 4 HG28-5 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain HG28-5

### 3 讨论

植物根际存在的微生物群体中有很多对植物病原菌具有各种各样抑制作用的有益微生物, 怎样筛选和利用此类有益微生物在植物病害生物防治中具有重要意义 (汪雪静 等, 2011; 刘金秀 等, 2012)。

辣椒疫病是典型的土传病害, 病原菌是以菌丝体、卵孢子或厚垣孢子在病株残体和土壤中越冬, 第 2 年条件适宜时萌发并侵入寄主。病株上的病原体产生孢子囊, 借助雨水和灌溉水传播, 进行再侵染。孢子囊可直接萌发侵染, 也可释放游动孢子侵入寄主, 致使病害流行。游动孢子囊及游动孢子是辣椒疫霉菌在田间迅速传播的主要形式 (郑小波, 1997)。因此在辣椒疫病的防治中, 不仅可以通过抑制辣椒疫霉菌的菌丝生长, 还可以通过抑制辣椒疫霉菌游动孢子囊和游动孢子形成, 来有效减少病害在田间的扩散。本研究中, 筛选辣椒疫病生防菌时不仅测定了其对菌丝的抑制能力, 还测定了其对游动孢子囊的形成、游动孢子的释放及休止孢子萌发的抑制能力, 综合多项抑菌指标作为筛选辣椒疫病生防菌的标准。筛选获得的 HG28-5 菌株, 在室内抑菌试验中表现出强烈的抑制辣椒疫霉菌的菌丝生长、游动孢子囊形成、游动孢子释放和休止孢子的萌发的效果, 温室盆栽和小区试验中也能够有效防治辣椒疫病的发生, 是很有利用潜力的生防菌。

对土传病害的生物防治来说, 生防菌的定殖能力决定了其潜在生防作用的大小 (Weller, 1988; 张炳欣 等, 2000)。一般认为, 生防菌只有首先定殖于植物根部, 优先占领植物根际, 才能在植物根际同病原菌进行竞争、产生抗菌物质、诱导植物产生抗病性等, 控制病害的发生 (Kloepper, 1992)。本研究中发现 HG28-5 随着种子萌发从胚根向根系移动, 在辣椒根系内部组织和根系表面均有 HG28-5, 并维持稳定的定殖密度。在温室盆栽试验中, 辣椒幼苗根际处理 HG28-5, 移栽后 10 d 在

辣椒根系维持  $6.85 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$  的定殖密度, 直到移栽后 30 d 仍保持  $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$  以上的定殖密度, HG28-5 表现出良好的根际定殖能力, 显示出生防潜力。另外, 植物病害生物防治从室内到田间还有很大的差距, 很多生防微生物, 往往由于受到各种环境因素的影响防病效果不稳定, 甚至有时根本没有防病作用。因此对于 HG28-5 详细的应用技术和前景尚待进一步研究。

假单胞菌属细菌是植物根际土壤微生态的优势微生物种群之一。其中荧光假单胞菌、铜绿假单胞菌、绿针假单胞菌在植物病害生物防治中已广泛应用。其主要的防病机理是根际定殖的有力竞争、产生嗜铁素、产生抗生素和诱导植物产生抗性等(何延静等, 2006; 杨光富和魏云林, 2011)。本研究中发现 HG28-5 菌株具有良好的根际定殖能力, 是有力的根际定殖竞争者, 并且在后续的研究中初步发现 HG28-5 菌株能够产生嗜铁素和抗生物质(结果未列出), 初步判断这与防病机制有关。HG28-5 菌株的详细防病机制及环境因素对其发挥作用的影响等还有待于进一步研究。

## References

- Buchanan R E, Gibbons N E. 1994. Bergeys manual of systematic bacteriology 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins Company.
- Chen L, Chen W L. 2009. Genome shuffling enhanced antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* and tolerance to chemical fungicides in *Bacillus subtilis* BS14. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7 (2): 856 - 860.
- Du xiao-hua, Gong Zhen-hui, Li Da-wei. 2005. Inheritance and breeding of resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in *Capsicum*. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 14 (1): 30 - 36. (in Chinese)
- 杜晓华, 巩振辉, 李大伟. 2005. 辣椒抗疫病的遗传与育种. *西北农业学报*, 14 (1): 30 - 36.
- Hausbeck M K, Lamour K H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. *Plant Dis*, 88 (12): 1292 - 1303.
- He Yan-jing, Liu Hai-ming, Hu Hong-bo, Xu Yu-quan, Zhang Xue-hong. 2006. Isolation and characterization of a new *Pseudomonas* strain against *Phytophthora capsici*. *Acta Microbiologica Sinica*, 46 (4): 516 - 521. (in Chinese)
- 何延静, 刘海明, 胡洪波, 许煜泉, 张雪洪. 2006. 一株拮抗辣椒疫霉的假单胞菌的分离与鉴定. *微生物学报*, 46 (4): 516 - 521.
- Hwang B K, Kim C H. 1995. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea. *Plant Dis*, 79: 221 - 227.
- Jee H J, Nam C G, Kim C H. 1988. Studies on biological control of phytophthora blight of red-pepper I. Isolation of antagonists and evaluation of antagonistic activity *in vitro* and in greenhouse. *Korean Journal Plant Pathol*, 4 (4): 305 - 312.
- Klopper J W. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 38 (6): 667 - 672.
- Lan Cheng-zhong, Li Ben-jin, Chen Qing-he, Weng Qi-yong. 2011. The occurrence of *Phytophthora* blight of pepper and integrated control. *Modern Agricultural Science and Technology*, (24): 190 - 191. (in Chinese)
- 兰成忠, 李本金, 陈庆河, 翁启勇. 2011. 辣椒疫病的发生与综合防治. *现代农业科技*, (24): 190 - 191.
- Liu Feng, Ou Xiong-chang, He Hong, Hu Han-qiao, Guan Xiu-qiong. 2010. Mechanism of biological control of phytophthora blight in pepper by mangrove endophytic bacterium strain RS261. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40 (1): 74 - 80. (in Chinese)
- 柳凤, 欧雄常, 何红, 胡汉桥, 关秀琼. 2010. 红树内生细菌 RS261 防治辣椒疫病机理的初步研究. *植物病理学报*, 40 (1): 74 - 80.
- Liu Jin-xiu, Ma Zheng, Shentu Xu-ping, Yu Bing, Yu Xiao-ping. 2012. Isolation and identification of antagonistic actinomycetes and their application in the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 39 (6): 1123 - 1130. (in Chinese)
- 刘金秀, 马正, 申屠旭萍, 于冰, 俞晓平. 2012. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌筛选及其生防作用鉴定. *园艺学报*, 39 (6): 1123 - 1130.
- Ma Xiao-fei, Liu Chang-yuan, Zhao Kui-hua, Liang Chun-hao, Guan Tian-shu, Wang Hui, Li Bai-hong. 2012. Study on identification and control mechanism of biocontrol *Phytophthora capsici*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 28 (10): 136 - 141. (in Chinese)
- 马晓飞, 刘长远, 赵奎华, 梁春浩, 关天舒, 王辉, 李柏宏. 2012. 辣椒疫病生防菌株鉴定及控病机理研究. *中国农学通报*, 28 (10): 136 - 141.
- Park J H, Kim H K. 1989. Biological control of *Phytophthora* crown and root rot of greenhouse pepper with *Trichoderma harzianum* and

- Enterobacter agglomerans* by improved method of application. Korean Journal Plant Pathol, 5 (1): 1 - 12.
- Shen S S, Choi O H, Lee S M, Park C S. 2002. *In vitro* and *in vivo* activities of a biocontrol agent, *Serratia plymuthica* A21-4, against *Phytophthora capsici*. The Plant Pathology Journal, 18 (4): 221 - 224.
- Shen S S, Choi O H, Park S H, Park C S. 2005. Root colonizing and biocontrol competency of *Serratia plymuthica* A21-4 against Phytophthora blight of pepper. The Plant Pathology Journal, 21 (1): 64 - 67.
- Wang Xue-jing, Bu Chun-ya, Jin Yong-sheng, Liang Wei, Tong Bao-sheng, Shi Guang-lu, Wang You-nian. 2011. Identification and inhibitory effects of antagonistic bacteria against strawberry root rot (*Fusarium oxysporum*). Acta Horticulturae Sinica, 38 (9): 1657 - 1666. (in Chinese)  
汪雪静, 卜春亚, 靳永胜, 梁 为, 仝宝生, 师光禄, 王有年. 2011. 草莓根腐病菌拮抗细菌的分离与鉴定. 园艺学报, 38 (9): 1657 - 1666.
- Weller D M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review Phytophthology, 26: 379 - 407.
- Wu Ai-min, Gu Ben-kong, Fu Zheng-qing, Hu Hua-dong. 2001. Studies on the population fluctuation of entophytic bacteria 73a in cotton plant. Acta Phytopathologica Sinica, 31 (4): 289 - 294. (in Chinese)  
吴嵩民, 顾本康, 傅正擎, 胡华东. 2001. 内生菌 73a 在不同抗性品种棉花体内的定殖和消长动态研究. 植物病理学报, 31 (4): 289 - 294.
- Yang Guang-fu, Wei Yun-lin. 2011. The research status and application prospect of *Pseudomonas*. Biotechnology Bulletin, (1): 37 - 39, 49. (in Chinese)  
杨光富, 魏云林. 2011. 假单胞菌研究现状及应用前景. 生物技术通报, (1): 37 - 39, 49.
- Yin Jing-fang, Zhang Wen-hua, Li Jian-qiang, Li Yong-hong, Hou Hong-li, Zhou Xiang-yang. 2007. Screening and antagonistic mechanism of biocontrol agents against pepper phytophthora blight. Acta Phytopathologica Sinica, 37 (1): 88 - 94. (in Chinese)  
尹敬芳, 张文华, 李健强, 李永红, 侯红利, 周向阳. 2007. 辣椒疫病生防菌的筛选及其抑菌机制初探. 植物病理学报, 37 (1): 88 - 94.
- Yi Tu-yong, Xie Bing-yan, Zhang Bao-xi, Gao Bi-da. 2002. Advance on the research on the control of Phytophthora blight of capsicum. China Vegetables, (5): 52 - 55. (in Chinese)  
易图永, 谢丙炎, 张宝玺, 高必达. 2002. 辣椒疫病防治研究进展. 中国蔬菜, (5): 52 - 55.
- 曾 莉, 徐小万, 李 颖, 罗少波, 王恒明, 田永红. 2011. 辣椒疫病抗病性状的 SRAP 标记. 园艺学报, 38 (增刊): 2575.
- Zhang Bing-xin, Zhang Ping, Chen Xiao-bin. 2000. Factors affecting colonization of introduced microorganisms on plant roots. Chin J Appl Ecol, 11 (6): 951 - 953. (in Chinese)  
张炳欣, 张 平, 陈晓斌. 2000. 影响引入微生物根部定殖的因素. 应用生态学报, 11 (6): 951 - 953.
- Zhang Zheng-bing, Guo Hai-ming. 2006. Advance on the research on the control of phytophthora blight of capsicum. Agrochemicals Research & Application, 10 (4): 10 - 12, 16. (in Chinese)  
张政兵, 郭海明. 2006. 辣椒疫病防治研究进展. 农药研究与应用, 10 (4): 10 - 12, 16.
- Zheng Xiao-bo. 1997. Phytophthora and their technology study. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)  
郑小波. 1997. 疫霉菌及其研究技术. 北京: 中国农业出版社.
- 周启明, 李林英, 杨淑华. 1984. 辣椒疫病的调查研究. 中国蔬菜, (1): 40 - 43.