

榨菜根肿病生防细菌的筛选、鉴定及评价

蒋 欢, 彭玉梅, 闫玉芳, 张 勇, 吴朝君, 何本洪, 王旭祎*

(重庆市渝东南农业科学院, 涪陵 408099)

摘要 近年来, 由于十字花科根肿病在榨菜上扩展蔓延, 严重影响其产量, 造成巨大的经济损失。本研究筛选生防菌并研究其对榨菜根肿病的控制作用, 为其生物防治应用奠定基础。研究发现茎瘤芥等十字花科蔬菜根肿病菌根经过腐烂处理后, 休眠孢子的萌发率可到达 70% 以上。故本文采用稀释法从榨菜根肿病菌根中分离筛选出一株可刺激休眠孢子萌发的菌株 PB19。并测定了 PB19 与根肿病菌互作的最适温度和最适 pH, 温室盆栽试验和大田小区试验测定菌株 PB19 对榨菜根肿病的防治效果。最后将纯化后的菌株送至中国食品发酵工业研究院微生物检测中心(FMIC)进行种属鉴定。结果表明: PB19 与根肿菌互作的最适温度为 20~25℃, 最适 pH 为 5.5~7.0。温室盆栽结果显示 PB19 对榨菜根肿病的防治效果为 71.96%。而大田试验结果显示 PB19 对榨菜根肿病的防治效果为 18.04%。FMIC 的鉴定结果显示 PB19 为假单胞菌属 *Pseudomonas* sp.。

关键词 榨菜; 根肿病; 生防细菌; 假单胞菌; 生物防治

中图分类号: S 436.37 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017270

Screening, identification and evaluation of antagonistic bacteria against clubroot of mustard

JIANG Huan, PENG Yumei, YAN Yufang, ZHANG Yong, WU Chaojun, HE Benhong, WANG Xuyi

(Southeast Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Fuling 408099, China)

Abstract In recent years, due to the spread of the Cruciferae clubroot in mustard, it has seriously affected its production and caused great economic loss. Biocontrol bacteria has been screened and studied for control of mustard clubroot, laying a foundation for its application in biological control. Some studies have found that the germination rate of the dormant spores could reach more than 70% after the decay process of the root of cruciferous vegetables. Here the strain PB19 was isolated from the mustard clubroot, which could stimulate the germination of resting spores by dilution method. First, the optimum temperature and pH value for the interaction between PB19 and *Plasmodiophora brassicae* were measured. The control efficiency of PB19 against clubroot of mustard was evaluated in pot experiments and field plot experiments. The strain was identified by Microbiology Identification Center of CNRIFFI (FMIC). The test results showed that the optimum temperature for the interaction between PB19 and *P. brassicae* was 20–25℃, and the suitable pH value was 5.5–7.0. The control efficiency of PB19 against clubroot of mustard was 71.96% in pot experiments, and only 18.04% in field plot experiments. PB19 was identified as *Pseudomonas* sp. by FMIC.

Key words mustard; clubroot; antagonistic bacterium; *Pseudomonas* sp.; biological control

榨菜 *Brassica juncea* var. *tumida* Tsen & Lee 又名茎瘤芥、茎用榨菜, 是人们日常生活中一种重要的鲜食及加工蔬菜, 是重庆市涪陵区的特色农业资源和重点发展的蔬菜品种。近年来, 由于十字花科根肿病在榨菜上扩展蔓延, 严重影响其产量, 造成巨

大的经济损失。涪陵区于 1994 年首次发现榨菜根肿病, 随后该病迅速扩展蔓延, 危害日趋加重^[1], 根据王旭祎等^[2]对榨菜根肿病的调查结果, 涪陵沿江 19 个榨菜主栽乡镇中, 有 10 个乡镇受到根肿病危害, 其中, 重病区发病田块占调查田块的 80%, 病株

收稿日期: 2017-07-25

修订日期: 2017-09-05

基金项目: 涪陵区应用技术与开发资金 (FLKJ, 2014ABB2067; FLKJ, 2015ABB1050); 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项 (cstc2015shms-ztx0129)

* 通信作者 E-mail: 654265736@qq.com

率为 50% 以上,少数田块死苗绝收。

十字花科根肿病俗称根癌病,是由芸苔根肿菌 *Plasmodiophora brassicae* 引起的一种重要的世界性土传病害^[3-5]。寄主范围广,可危害榨菜、大白菜、甘蓝、萝卜和花椰菜等多种栽培以及野生的十字花科植物^[6]。国内外已针对该病原菌进行了大量防治技术的研究,包括抗病品种选育^[7-8]、农业^[9-10]和化学防治^[11-12]、生物防治^[13-14],其中生物防治因具有对人畜安全,环境兼容性好且病菌不易产生抗药性等优点而被重视并初见成效。

研究发现茎瘤芥等十字花科蔬菜根肿病菌根经过腐烂处理后,休眠孢子的萌发率可达到 70% 以上^[15-18],菌根材料先经 -20℃ 冷冻保存,再进行腐烂处理,由此获得的休眠孢子囊萌发率比材料未经腐烂处理获得的休眠孢子囊萌发率高^[19],但新鲜菌根直接腐烂处理比冷冻后腐烂处理萌发率更高^[20]。肖崇刚等^[18]在镜检腐烂菌根时观察到大量细菌存在,认为可能是由于腐烂处理时细菌的作用改变了根肿病菌休眠孢子细胞壁的透性,从而提高了萌发率。因根肿菌是一种专性寄生菌,其休眠孢子囊在适宜的条件下萌发,释放出游动孢子,如果短时间内没有可供侵染的寄主组织,就会丧失侵染能力。这为我们提供了一种根肿病防治新的思路,利用生物防治技术广泛筛选能够促进菌根快速腐烂和孢子萌发的微生物,在寄主收获后,施用此类微生物促进残留在土壤中的病残体迅速腐烂并刺激其休眠孢子萌发,从而降低田间菌源量。

综上所述,本文旨在从腐烂的菌根中分离筛选出能促进菌根快速腐烂并刺激休眠孢子萌发的微生物,利用病原菌只能活体培养的特性,使萌发后的孢子找不到寄主而丧失侵染能力,从而降低根肿病田间菌源量,达到减轻根肿病危害程度的目的。

1 材料与方法

1.1 材料

供试榨菜品种为‘涪杂 2 号’。供试根肿病菌根采自重庆市渝东南农业科学院根肿病试验田,放置冰箱 -20℃ 保存备用。拮抗细菌用 LB 培养基培养。

1.2 菌根的腐烂处理

将 -20℃ 保存的榨菜菌根于 25℃ 恒温黑暗条件下腐烂处理 5 d。

1.3 致病微生物的初步筛选

将腐烂处理后的菌根于榨汁机,按菌根组织与蒸馏水质量比 1:5 加入蒸馏水,充分绞碎,用蒸馏水稀释到 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 后,每个浓度取 50 μL 涂布于 LB 平板上,于 28℃ 恒温培养箱中倒置培养 24~48 h,挑取单菌落于液体 LB 培养基培养 24 h(用 LB 培养基将 OD 值调至 1.0)后接种于 -20℃ 保存的根肿菌根上(将菌根切成大小均等的块状,每块菌根接种 500 μL 菌液),于 25℃ 恒温以及黑暗条件下腐烂处理,每天观察菌根的腐烂情况,观察 2 d 根据腐烂速度初步筛选致病微生物。

将筛选出的微生物进行数次划线纯化,以得到纯培养的菌株,将纯化后的菌株再接种菌根(不接种的菌根作为对照),于 25℃ 恒温黑暗条件下腐烂处理 2 d 后,按照吴道军^[19]的方法制备根肿病菌休眠孢子悬浮液,于显微镜下观察孢子萌发情况,根据公式:孢子萌发率 = 萌发的孢子数 / 调查总孢子数 $\times 100\%$,得到孢子萌发率,萌发率高的就是我们所需要的微生物。

1.4 生防菌与根肿病菌互作的最适温度研究

1.4.1 根分泌物的收集

将榨菜种子在 24℃ 条件下催芽 2 d,播种在盛有 1/2 Hoagland 营养液的 100 mL 小烧杯的纱布上,每杯播 20 粒,在 24℃ 恒温培养箱中光暗交替培养 7 d 后收集含根分泌物的溶液,0.22 μm 细菌过滤器过滤后 4℃ 保存备用,用于休眠孢子萌发试验。

1.4.2 孢子悬浮液的制备

休眠孢子悬浮液的制备结合肖崇刚等^[18]和郭向华^[22]的方法。

1.4.3 生防菌培养液的制备

将活化后的菌株接种在 LB 培养基中,置于 28℃ 的摇床中 180 r/min 振荡培养,3 d 后得到菌株培养液。

1.4.4 生防菌与根肿病菌互作的最适温度

将制备的孢子悬浮液用根分泌物调节浓度至 10^7 个孢子/mL,按孢子悬浮液和生防菌培养液体积比 10:1 加入生防菌培养液,于 5、10、15、20、25、30、35℃ 黑暗培养 3 d 后,于显微镜下观察孢子萌发情况,以不加生防菌为 CK。

1.5 生防菌与根肿病菌互作的最适 pH

根分泌物的收集、孢子悬浮液的制备以及生防菌培养液的制备同 1.4。将制备的孢子悬浮液用根分泌物调节浓度至 10^7 个孢子/mL,按孢子悬浮液和生防菌培养液体积比 10:1 加入生防菌培养液,用

KOH 和 HNO₃ 调节 pH 至 3.0、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、10.0, 以不加生防菌为 CK, 放入 25℃ 恒温培养箱培养 3 d 后显微镜下镜检孢子萌发情况。

1.6 室内防效试验

将-20℃ 冰箱内保存的根肿材料解冻后洗净、沥干水分、切碎, 与无菌营养土按质量比 1:5(W:W) 的比例混匀后, 分装至 8 cm×8 cm 的营养钵中, 进行以下处理, 处理 1: 每钵浇灌生防菌培养液 10 mL, 与处理 3 同时播种, 共处理 30 钵。处理 2: 每钵浇灌生防菌培养液 10 mL, 7 d 后再次每钵浇灌生防菌培养液 10 mL, 与处理 3 同时播种, 共处理 30 钵。处理 3, 每钵浇灌生防菌培养液 10 mL, 7 d 后和 14 d 后再次每

钵浇灌生防菌培养液 10 mL, 21 d 后播种, 共处理 30 钵。另设置清水对照(CK)和发病对照(DK, 不浇灌生防菌培养液)。每处理 3 次重复。所有处理播种前均置于 25℃ 光照培养箱(光照 16 h, 黑暗 8 h)。

所有幼苗置于温度 24℃, 光照 16 h 条件下培养, 保持土壤湿度, 以育苗盘底部始终保持有少量水为宜。50 d 后拔出幼苗, 调查、记录根部发病情况, 参照吴道军^[19]所用的 0~9 级分级标准进行分级。

病株率 = 发病株数 / 总株数 × 100 %;

病情指数 = $\sum(\text{发病级代表值} \times \text{各级病株数}) \times 100 / (\text{调查总株数} \times \text{最高级发病代表值})$;

防治效果 = $[(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100 \%$ 。



图 1 榨菜幼苗根肿病各级发病症状

Fig. 1 Root morphology of clubroot of mustard seedlings at different disease stages

1.7 田间防效试验

试验地为渝东南农业科学院根肿病重病田, 采用随机区组设计, 每个小区长 4 m, 宽 1.7 m, 移栽 60 株。试验作如下处理, 处理 1: 榨菜移栽前 1 个月浇灌生防菌培养液, 每隔 7 d 浇 1 次, 每窝浇 100 mL, 共浇 3 次。处理 2(清水对照): 用清水替代生防菌培养液, 浇灌方法同处理 1。处理 3(阳性对照): 用 23% GZB(一种防治十字花科蔬菜根肿病的药剂, 有效成分为甲噻诱胺+科家, 使用剂量为 10 mL 原液兑水 15 kg)替代生防菌培养液, 浇灌方法同处理 1。每处理 3 次重复。榨菜移栽后, 田间常规管理, 待植株成熟后, 调查发病情况。

榨菜根肿病田间分级标准^[21]分为 5 级。0 级: 无肿瘤。1 级: 侧根发病, 肿瘤小而少, 白色, 对植株生长无或有轻微影响, 产量损失为 0~5%。2 级: 主根中下部肿瘤小或侧根上肿瘤大而多, 呈白色或米黄色, 对植株生长有一定影响, 但地上部分无明显症

状, 产量损失 6%~20%。3 级: 主根肿瘤大且变黑, 表面粗糙龟裂, 有少量侧根, 地上部分生长受阻, 中心叶片变为深绿色, 在阳光下出现轻度萎蔫, 产量损失 21%~35%。4 级: 主根肿瘤龟裂或腐烂变黑, 几乎无侧根, 地上部分生长严重受阻, 株型矮小, 叶色暗绿, 菜头小且皮厚筋多, 在阳光下整株严重萎蔫, 极易拔起, 产量损失(不包括无实际收获价值的病株)在 36% 以上。

1.8 菌株的鉴定

用细菌 16S rDNA 通用引物 27f: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'; 1492R: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACTT-3', 以提取的基因组 DNA 为模板, 扩增基因序列。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 25 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳验证后, 送上海生工生物工程股份有限公司测序, 将测得的 16S rDNA 基因序列在 NCBI 核酸数据库上采用

BLAST 程序进行比对分析, 测序结果递交 Gen-Bank 获取登录号。纯化后的菌株送中国食品发酵工业研究院微生物检测中心进行菌种鉴定。

1.9 统计分析

试验数据用 Excel 2007 和 DPS V 7.05 进行整理和统计分析。

2 结果与分析

2.1 致病微生物初步筛选

从腐烂处理的菌根中共分离得到 112 株菌株, 用这些菌株接种到菌根后初步筛选得到 3 株可致菌根快速腐烂的菌株, 分别是 PB11、PB19 以及 PB76 (图 2)。

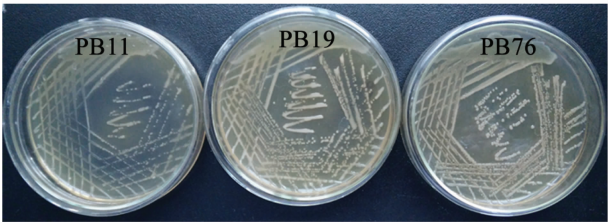


图 2 各菌株生长情况

Fig. 2 The growth status of different microbial strains

2.2 刺激休眠孢子萌发微生物筛选

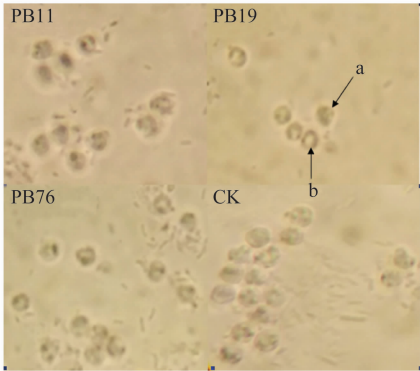
将得到的 3 株纯培养的菌株再接种菌根后进行腐烂处理, 制备孢子悬浮液, 于显微镜下观察孢子萌发情况, 结果(表 1)表明, 用 PB19 进行腐烂处理后, 休眠孢子的萌发率显著高于对照及其他两株菌株, 说明 PB19 能促进休眠孢子的萌发。各处理下休眠孢子萌发情况如图 3 所示, 从图中可以看出 PB19 处理的大多数孢子是空的, 说明已经萌发, 而 PB11、PB76 处理以及 CK 中的大多数孢子都有内容物, 说明未萌发。

表 1 不同菌株处理下根肿菌休眠孢子萌发率¹⁾

Table 1 Germination rates of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* under different treatments

菌株 Strain	休眠孢子平均萌发率/% Mean germination rate
PB11	(7.89±1.47)b
PB19	(63.43±3.33)a
PB76	(10.15±3.09)b
CK	(7.48±0.74)b

1) 同列数据后不同小写字母表示差异达显著水平($P<0.05$)。Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).



a: 未萌发; b: 已萌发
a: Ungerminated; b: Germinated

图 3 不同菌株处理下根肿菌休眠孢子萌发情况

Fig. 3 Germination of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* under different treatments

2.3 PB19 与根肿菌互作的最适温度

温度试验结果显示(表 2), 在 20℃ 和 25℃ 时, 休眠孢子的萌发率分别为 45.67%、62.33%, 显著高于其他温度和 CK, 说明 PB19 与根肿病菌互作的最适温度为 20~25℃, 随着温度的升高和降低休眠孢子萌发率逐渐下降。

表 2 不同温度条件下(PB19)根肿菌休眠孢子萌发率¹⁾

Table 2 Germination rates of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* under different temperatures

温度/℃ Temperature	休眠孢子平均萌发率/% Mean germination rate	
	PB19	CK
5	(6.33±0.67)fA	(5.67±0.57)cdA
10	(9.67±0.58)eA	(6.67±1.15)cB
15	(24.33±1.58)dA	(6.33±0.77)cB
20	(45.67±1.52)bA	(12.67±1.15)aB
25	(62.33±2.51)aA	(13.33±0.52)aB
30	(32.67±1.52)cA	(9.67±0.74)bB
35	(12.00±2.00)eA	(4.67±0.57)dB

1) 小写字母表示同列数据差异达显著水平($P<0.05$), 大写字母表示同行数据差异达显著水平($P<0.05$)。下同。The lowercase letters indicate significant difference among the same column data ($P<0.05$). The capital letters indicate significant difference between the same row data ($P<0.05$). The same below.

2.4 PB19 与根肿菌互作的最适 pH

用不同 pH 的 PB19 悬浮液处理根肿菌休眠孢子, 结果(表 3)表明, pH 在 5.0~7.0 时休眠孢子萌发率较高, 在 pH 6.5 时达到最高(64.33%), 而在强酸以及碱性条件下萌发率较低, 说明 PB19 与生防菌互作的最适 pH 在 5.5~7.0。

表 3 不同 pH 条件下 PB19 对根肿菌休眠孢子萌发率的影响

Table 3 Germination rates of resting spores of <i>Plasmodiophora brassicae</i> after different pH values		
pH	休眠孢子平均萌发率/%	Mean germination rate
	PB19	CK
3.0	(20.00±1.00)gA	(8.67±0.58)fgB
4.0	(30.00±1.00)eA	(9.00±1.00)fgB
4.5	(40.33±0.58)dA	(9.33±1.53)fgB
5.0	(47.67±2.08)cA	(15.67±1.53)cB
5.5	(57.67±2.52)bA	(18.67±0.58)bB
6.0	(62.67±0.58)aA	(21.33±0.53)aB
6.5	(64.33±1.15)aA	(21.33±0.58)aB
7.0	(48.00±2.65)cA	(13.67±1.53)dB
7.5	(37.00±2.00)dA	(12.00±1.00)deB
8.0	(24.33±1.53)fA	(9.67±1.54)efB
8.5	(16.67±2.08)gA	(7.67±0.58)ghB
9.0	(13.33±7.37)hA	(6.33±0.58)hB
10.0	(8.33±0.58)hA	(5.67±1.53)hB

2.5 室内盆栽试验

将榨菜播种于浇灌了 PB19 培养液的菌土中，

结果显示(表 4):浇灌培养液后,榨菜发病率和病情指数明显低于发病对照,其中浇灌培养液 2 次和 3 次的植株发病率和病情指数差异不明显,但显著低于浇灌 1 次培养液的处理。浇灌培养液 2 次和 3 次对榨菜根肿病的防治效果分别为 68.76%和 71.96%,显著高于浇灌 1 次培养液(22.72%),说明 PB19 能有效减轻榨菜根肿病的发生程度,但至少需要浇灌 2 次培养液。

2.6 田间防效

大田试验表明各个处理的发病率均为 100%,施用 PB19 培养液后,榨菜根肿病病情指数与清水对照无显著性差异,显著高于阳性对照(甲噻诱胺十科家)。PB19 防效只有 18.04%,低于阳性对照(防效 23.27%)。产量测定结果(表 5)显示,PB19、阳性对照和清水对照处理的产量分别为 15.0、20.7、13.2 kg,折算成 667 m² 产量后 PB19 的增产率为 13.6%,低于 GZB 的增产率(28.0%)。

表 4 PB19 对榨菜根肿病的盆栽防治效果

Table 4 Biocontrol efficacy of PB19 against mustard clubroot in pot experiment				
处理 Treatment	处理次数/次 Treatment times	发病率/% Occurrence rate	病情指数 Disease index	防治效果/% Control efficacy
PB19 培养液	1	(79.51±4.59)b	(50.78±3.57)b	(22.72±5.45)b
PB19 fermented liquid	2	(23.12±2.00)c	(20.37±0.65)c	(68.76±0.78)a
	3	(24.74±3.81)c	(18.42±2.51)c	(71.96±3.81)a
发病对照	—	(85.32±2.34)a	(65.72±0.98)a	—
Without PB19 fermented liquid (DK)	—			
水 Water (CK)	—	0	0	—

表 5 PB19 对榨菜根肿病的田间小区防治效果

Table 5 Biocontrol efficacy of PB19 against mustard clubroot in field plot experiments				
处理 Treatment	发病率/% Occurrence rate	病情指数 Disease index	防治效果/% Control efficacy	产量/kg Yield
PB19	100	(70.79±5.62)ab	(18.04±4.70)a	(15.2±0.64)b
GZB	100	(66.27±8.81)b	(23.27±8.77)a	(20.7±1.49)a
CK	100	(86.37±3.23)a	—	(13.2±1.29)b

2.7 PB19 的鉴定

PB19 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 上的登录号为 MF490469,纯化后的菌株送中国食品发酵工业研究院微生物研究所检测鉴定。根据 16S rDNA 基因序列的比对结果以及系统发育学分析,发现 PB19 与假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. 菌株高度相关,构建的发育树和同源性分析结果显示 PB19 与假单胞菌中的湖南假单胞菌 *Pseudomonas hunanensis* LV(JX545210)进化上的距离最近,两者相似性为 99.93%,但结合菌株的宏观以及微观形态、生理生化特征等试验数据综合分析,只能将 PB19

鉴定为假单胞菌属 *Pseudomonas* sp.。

3 结论与讨论

十字花科作物根肿菌属于专性寄生菌,可长期存活于土壤中,土壤一旦带菌将不再适合种植十字花科作物。因此,该病严重威胁着十字花科作物的可持续发展,国内外虽已进行了大量针对该病害防治技术的研究,但目前仍无根治的方法。Arie 等^[23]首次报道葡萄茎枯病菌 *Phoma glomerata* JCM 9972 可以抑制根肿菌休眠孢子萌发,生防菌的筛选成为该病防治的一条新途径,但研究都集中于筛选

抑制休眠孢子萌发的菌株。肖崇刚等^[18]研究发现通过对根肿病菌根进行腐烂处理可提高休眠孢子的萌发率,且在镜检腐烂菌根时观察到大量细菌存在,认为可能是腐烂处理时细菌的作用改变了休眠孢子细胞壁的透性,从而提高了萌发率。这为我们提供了一条根肿病的防治新思路,筛选能够促进菌根快速腐烂和孢子萌发的微生物,在寄主收获后,施用此类微生物促进残留在土壤中的病残体迅速腐烂并刺激其休眠孢子萌发,从而降低田间菌源量。

本文从腐烂的菌根中分离筛选出一株能促进菌根快速腐烂并刺激休眠孢子萌发的细菌菌株 PB19,其与根肿菌互作的最适温度为 20~25℃,最适 pH 为 5.5~7.0,这些结果可为后续的防效试验以及 PB19 与根肿菌的互作机制研究提供参考。

温室盆栽试验结果显示浇灌培养液 3 次后,榨菜根肿病发病率和病情指数显著低于对照,防效为 71.96%。而大田试验结果显示,PB19 对榨菜根肿病防效只有 18.04%,低于室内防效,究其原因一方面可能是 PB19 的施用时间不恰当,本研究是在榨菜移栽前一个月施用 PB19 培养液于田间的,此时的温度湿度等环境条件不适于 PB19 与根肿菌的相互作用,从而导致 PB19 在田间的应用不理想,故后期将对 PB19 的施用时间进行进一步的研究。另一方面可能是由于田间微生物群落相较于温室复杂得多,每种微生物都有自己的生态位,一种新的微生物进入需要与他们竞争获得生态位从而定殖,Miho 等^[24]通过光学和电子显微镜发现 *H. chaetospira* 在接种 3 周后才能进入根部表皮细胞,故一株好的生防菌不仅需要具备良好的防病效果,还应具备强的田间定殖能力,所以可能由于 PB19 不能很好地在田间定殖,从而难以形成足够数量的微生物群体进而不能稳定发挥其拮抗作用,故关于 PB19 在田间的定殖能力以及施用方法还需进一步研究。

PB19 经中国食品发酵工业研究院微生物研究所(FMIC)鉴定为假单胞菌属细菌 *Pseudomonas* sp.,近几十年假单胞菌被广泛应用于生物防治方面,非致病假单胞菌属于植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria,PGPR),是最主要的 PGPR 之一,已被应用于土壤中以抑制谷物病原菌的生长^[25]。非致病假单胞菌的生防机理主要包括分泌降解微生物的酶,抗生素作用和根际营养竞争(尤其是对铁元素的竞争)等。Wang 等^[26]研究发现 *Pseudomonas*

aeruginosa K-187 可产生溶菌酶和几丁质酶,能抑制 36 株真菌的生长。在抗生素作用方面,如荧光假单胞菌产生的两种典型的抗生素吩嗪酸(PCA)和 2,4-二乙酰藤黄酚(Ph1)对小麦全蚀病有重要作用^[27]。假单胞菌自身可产生嗜铁素^[28],病原微生物不能或产生很少量的嗜铁素且不能利用假单胞菌产生的嗜铁素,这样病原菌就会因缺铁而不能生长。

综上所述,本文从刺激根肿菌休眠孢子萌发从而减少田间菌源量的角度出发,筛选出假单胞菌 PB19,温室盆栽试验显示出具有生防潜能,但田间的防治效果却不甚理想,故对于 PB19 与根肿病菌的互作机制还需深入研究,以便为田间的施用时间以及方法提供参考依据。

参考文献

- [1] 王旭祎,彭洪江,高明泉,等.茎瘤芥(榨菜)根肿病病原初步鉴定及发病影响因素[J].西南农业学报,2002,15(4):75-78.
- [2] 王旭祎,高明泉,彭洪江,等.涪陵茎瘤芥根肿病调查与防治[J].长江蔬菜,2004(5):38-39.
- [3] SUWABE K, TSUKAZAKI H, IKETANI H, et al. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance [J]. Genetics, 2006, 173(1): 309-319.
- [4] HWANG S F, STRELKOW S E, FENG J, et al. *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(2): 105-113.
- [5] VERMA S S, RAHMAN M H, DEYHOLOS M K, et al. Differential expression of miRNAs in *Brassica napus* root following infection with *Plasmodiophora brassicae* [J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e86648.
- [6] 商桑,黄绵佳,田丽波.十字花科蔬菜根肿病生物学特性及分子生物学研究进展[J].吉林农业科学,2009,34(2):43-46.
- [7] BRADSHAW J E, GEMMELL D J, WILSON R N. Transfer of resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) to swedes (*Brassica napus* L. var. *napobrassicae* Peterm) from *B. rapa* [J]. Annals of Applied Biology, 1997, 130: 337-348.
- [8] 司军,李成琼,宋红元,等.结球甘蓝对根肿病的抗性鉴定与评价[J].西南大学学报:自然科学版,2009,31(6):26-30.
- [9] GAO Yuliang, KIM B, LIM T H, et al. Soil-blending effect of eggshell powder on the control of club root disease and the growth of Chinese cabbage in the field [J]. Research in Plant Disease, 2009, 15(2):106-111.
- [10] NIWA R, KUMEI T, NOMURA Y, et al. Increase in soil pH due to Ca-rich organic matter application causes suppression of the club root disease of crucifers [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(3): 778-785.

- [11] 李妍, 谢学文, 石延霞, 等. 防治白菜根肿病的药剂筛选[J]. 农药学报, 2010, 12(1): 93-96.
- [12] 张日波. 成都市十字花科根肿病调查及防治药剂筛选[D]. 雅安: 四川农业大学, 2010.
- [13] 王靖, 黄云, 姚佳, 等. 两株根肿病生防放线菌的鉴定及其防病效果[J]. 中国农业科学, 2011, 44(13): 2692-2700.
- [14] GUO Shengye, MAO Zichao, WU Yixin, et al. Genome sequencing of *Bacillus subtilis* strain XF-1 with high efficiency in the suppression of *Plasmodiophora brassicae* [J]. Genome Announcements, 2013, 1(2): e00066-13.
- [15] 杨文强. 小白菜根肿病发生规律、发生条件及病菌生物学特性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2009.
- [16] 张铨哲, 陈聪, 解明静, 等. 芸薹根肿菌的休眠孢子萌发条件的研究[J]. 北方园艺, 2014(7): 112-114.
- [17] HOWARD R J, STRELKOV S E, HARDING M W. Clubroot of cruciferous crops new perspectives on an old disease[J]. Plant Pathology, 2010, 32: 43-57.
- [18] 肖崇刚, 郭向华. 甘蓝根肿病菌的生物学特性研究[J]. 菌物系统, 2002, 21(4): 597-603.
- [19] 吴道军. 十字花科根肿病室内接种标准化研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2013.
- [20] SUZUKI K, MATSUMIYA E, UENO Y, Et al. Some properties off gemination-stimulation factor from plants for resting spores of *Plasmodiophora brassicae* [J]. Japanese Journal of Phytopathology, 1992, 58(5): 699-705.
- [21] 高明泉, 彭洪江, 王旭祎, 等. 涪陵榨菜根肿病的危害与产量损失测定[J]. 植物保护, 2002, 28(6): 31-33.
- [22] 郭向华. 甘蓝根肿病菌的生物学特性及致病研究[D]. 重庆: 西南农业大学, 2001.
- [23] ARIE T, KOBAYASHI Y, OKADA G, et al. Control of soil-borne clubroot disease of cruciferous plants by epoxydon from *Phoma glomerata* [J]. Plant Pathology, 1998, 47(6): 743-748.
- [24] MIHO Y, FUMIAKI U, NARISAWA K, et al. Anatomical study on the interaction between the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospora* and Chinese cabbage [J]. Mycoscience, 2004, 45(6): 367-371.
- [25] HAAS D, DEFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by *Fluorescent pseudomonads* [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3: 307-319.
- [26] WANG S L, YIEH T C, SHIH I L. Production of antifungal compounds by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab powder as a carbon source [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 25(1): 142-148.
- [27] SCHISLER D A, SLININGER R J, BEHLE R W, et al. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases [J]. Phytopathology, 2004, 94: 1267-1271.
- [28] 许煜泉, 高虹. 假单胞菌株 JKD-2 分泌铁载体抑制稻瘟病菌 [J]. 微生物学通报, 1999, 26(3): 180-183.

(责任编辑: 田 喆)

(上接 68 页)

- [16] MARCELIS L F M, HO L C. Blossom-end rot in relation to growth rate and calcium content in fruits of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 1999, 50(332): 357-363.
- [17] LEE S E, JIN M P, NOH J S, et al. Comparison of calcium content between blossom-end rot and healthy fruits in red pepper (*Capsicum annuum* L.) grown in open field [J]. Korean Journal of Soil Science and Fertilize, 2012, 45(1): 83-85.
- [18] 周卫, 汪洪. 植物钙吸收、转运及代谢的生理和分子机制[J]. 植物学报, 2007, 24(6): 762-778.
- [19] MIQUELOTO A, TALAMINI DO AMARANTEA C V, STEFFENS C A, et al. Relationship between xylem functionality, calcium content and the incidence of bitter pit in apple fruit [J]. Scientia Horticulturae, 2014, 165(3): 319-323.
- [20] 汪良驹, 姜卫兵, 何岐峰, 等. 苹果苦痘病的发生与钙、镁离子及抗氧化酶活性的关系[J]. 园艺学报, 2001, 28(3): 200-205.
- [21] 贾晓辉, 王文辉, 王荣华, 等. 秋锦苹果苦痘病与果实矿质元素含量和品质相关性的研究[J]. 北方园艺, 2010(20): 39-41.
- [22] 武英霞, 唐志鹏, 钟川. 芒果果实钙素营养与果实生理病害 [J]. 广西热带农业, 2004(2): 43-45.
- [23] NONAMI H, FUKUYAMA T, YAMAMOTO M, et al. Blossom-end rot of tomato plants may not be directly caused by calcium deficiency [J]. Acta Horticulturae, 1995, 396: 107-114.
- [24] TONETTO DE FREITAS S, PADDA M, WU Qingyu, et al. Dynamic alternations in cellular and molecular components during blossom-end rot development in tomatoes expressing sCAX1, a constitutively active Ca^{2+}/H^{+} antiporter from *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2011, 156(2): 844-855.
- [25] CLARK C J, SMITH G S. Seasonal changes in the composition, distribution and accumulation of mineral nutrients in persimmon fruit [J]. Scientia Horticulturae, 1990, 42(1/2): 99-111.
- [26] CLARK C J, SMITH G S, GRAVETT I M. Seasonal accumulation of mineral nutrients by tamarillo fruit [J]. Scientia Horticulturae, 1989, 40(3): 203-213.
- [27] QUINLAN J D. Chemical composition of developing and shed fruits of Laxton's fortune apple [J]. Journal of Horticultural Science, 1969, 44(1): 97-106.
- [28] WAINWRIGHT H, BURBAGE M B. Physiological disorders in mango (*Mangifera indica* L.) fruit [J]. Journal of Horticultural Science, 1989, 64(2): 125-135.
- [29] CLINE J A, HANSON E J, BRAMLAGE W J, et al. Calcium accumulation in delicious apple fruit [J]. Journal of Plant Nutrition, 1991, 14(11): 1213-1222.
- [30] ROGIER S Y, GREER D H, HATFIELD J M, et al. Solute transport into shiraz berries during development and late-ripening shrinkage [J]. American Journal of Enology & Viticulture, 2006, 57(1): 73-80.

(责任编辑: 田 喆)