

王秋君, 常志州, 王光飞, 等. 铜绿假单胞菌结合生物熏蒸防控辣椒疫病的效果[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 290-297.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.011

铜绿假单胞菌结合生物熏蒸防控辣椒疫病的效果

王秋君, 常志州, 王光飞, 马 艳

(江苏省农业科学院农业资源与环境研究所, 江苏 南京 210095)

摘要: 为找到防治由疫霉菌(*Phytophthora capsici*)引起的辣椒疫病的有效方法, 首先研究了生物熏蒸过程中土壤微生物数量变化。结果发现在生物熏蒸第7 d时, 土壤疫霉和真菌数量显著低于不加菜粕病土(对照), 分别降低了20%和68%; 而细菌和放线菌数量显著高于对照, 分别增加了40%和49%; 7 d后生物熏蒸处理和对土壤土壤中疫霉数量逐渐增加, 说明生物熏蒸的最佳时间为7 d。为了增强生物熏蒸的防病效果, 通过平板试验筛选了1株既可以拮抗辣椒疫霉又可以抵抗由菜粕降解释放的挥发性杀生气体的铜绿假单胞菌, 然后将菜粕与铜绿假单胞菌株同时施入土壤中进行7 d的生物熏蒸盆栽试验。发现与生物熏蒸处理相比, 生物熏蒸结合铜绿假单胞菌处理的土壤中假单胞菌数量显著增加了401%, 疫霉菌的数量显著降低了72%, 辣椒疫病的发病率降低了8%。表明生物熏蒸结合施用拮抗菌是一种环保的防控辣椒疫病方法。

关键词: 生物熏蒸; 铜绿假单胞菌; 辣椒疫病; 疫霉

中图分类号: S436.418.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)02--

Integration of *Pseudomonas aeruginosa* with biofumigation to control phytophthora blight of pepper

WANG Qiu-jun, CHANG Zhi-zhou, WANG Guang-fei, MA Yan

(Institute of Agricultural Resource and Environment, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210095, China)

Abstract: To find effective ways to prevent phytophthora blight of pepper caused by *Phytophthora capsici*, the change of soil microbial population during the process of biofumigation was firstly studied. Biofumigation significantly reduced the population of soil *P. capsici* and fungi by 20% and 68% respectively, and increased the population of soil bacteria and actinobacteria by 40% and 49% respectively after 7 d. The population of *P. capsici* in biofumigation treatment gradually increased after the 7th day, indicating that the optimal duration for biofumigation is 7 d. An antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* was screened by dish culture, which was not only resistant to volatile and toxic gas from rapeseed meal but also antagonistic to *P. capsici*. The rapeseed meal and *P. aeruginosa* strains were applied to soil simultaneously for biofumigation for 7 d. Compared with sole biofumigation treatment, the integration of biofumigation with *P. aeruginosa* strain significantly increased the population of *Pseudomonas* by 401% and decreased the population of *P. capsici* by 72% in soil, which contributed to decreasing disease incidence of phytophthora blight of pepper by 8%. Combining biofumigation with antagonistic microorganism is environmental-friendly to control phytophthora blight of pepper.

Key words: biofumigation; *Pseudomonas aeruginosa*; phytophthora blight; *Phytophthora capsici*

收稿日期: 2014-08-30

基金项目: 江苏省科技厅支撑计划项目(BE2012379); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(12)1004-6]

作者简介: 王秋君(1983-), 男, 山西运城人, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为土壤微生物群落结构的调控。(Tel) 025-84391251; (E-mail) wangqiujuan461@163.com

通讯作者: 马 艳, (E-mail) myjaas@sina.com

辣椒疫病是辣椒病害中最严重的病害之一,目前在中国多地均有辣椒疫病的大面积发生,并且有逐年增加趋势,造成了严重的经济损失,严重限制了辣椒产业的发展^[1-3]。然而到目前为止还没有有效的方法对其进行控制。化学农药由于其显著的防病效果已成为农民控制植物土传病害的依赖性手段。但是,化学农药的过度使用已经对生态环境和人类健康造成许多负面影响,出于对食品安全和环境污染的考虑,人们越来越多关心利用生防因子来防控土传病害^[4]。

生物熏蒸是利用植物有机质在土壤中降解时产生的挥发性杀生气体抑制或杀死土壤中有害生物的方法^[5]。大量研究发现,芸薹属植物分解过程中释放的挥发性杀生气体可以有效抑制多种重要的土传病原菌^[6-8]。菜粕是一种具有较优蛋白质的饲用蛋白质原料,但由于菜粕中含有的硫代葡萄糖苷会分解产生噻唑烷硫酮(OZT)、异硫氰酸酯(ITC)等有毒物质以及其他抗营养因子^[7],使菜籽粕饲用受到限制,必须脱毒后方可饲用,而其脱毒工艺复杂,成本较高,有“三废”污染,推广困难。菜粕用作肥料是中国的传统,但目前中国很多地方对菜粕的施用方式和施用量都不科学,使得菜粕作为有机肥料对作物和土壤的效应没有充分发挥出来。以菜粕为原料对土壤进行生物熏蒸可以有效防控作物土传病害^[5]。生物熏蒸与化学消毒方法相比具有潜在的优点,对使用者安全,不污染环境。然而,由于生物熏蒸防控土传病害的效果不稳定,商业应用受到较大限制。因此,在发病较重的土壤除应用生物熏蒸外,还应该辅助其他生防技术,这会更好地发挥生物熏蒸防控土传病害的作用。假单胞菌在自然界分布广泛,种类繁多,是土壤中有生防作用的主要细菌类群。假单胞菌对许多土传病原菌都有拮抗作用,如尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、疫霉等^[9]。本试验将生物熏蒸与施用拮抗菌相结合来研究防控辣椒疫病的效果,为作物土传病害的防控提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试土壤 试验土壤采自连续种植辣椒的塑料大棚,取自江苏省淮安市。基本理化性状:有机质 19.2 g/kg,全氮 1.8 g/kg,矿质态氮 20.4 mg/kg,速效磷 172.3 mg/kg,有效钾 31.5 mg/kg, pH 值

7.2。

1.1.2 供试作物 辣椒,品种为苏椒5号。

1.1.3 供试有机物料 菜粕,采购于市场。干燥粉碎,过1 mm筛后置4℃冰箱保存备用。菜粕中氮、磷、钾含量分别为1.3%、6.0%、1.4%。

1.1.4 供试菌种 供试拮抗菌为野生型铜绿假单胞菌 P1,由本实验室分离、筛选、鉴定。供试病原菌为辣椒疫病病原菌(*Pythophthora capsici*),由本实验室分离、筛选、鉴定。

1.1.5 供试培养基 V8培养基: V8汁 100 ml, CaCO₃ 0.2 g,琼脂 20.0 g,水 900 ml,121℃灭菌 20 min。马铃薯蔗糖培养基(PDA): 20%马铃薯浸出液(200 g马铃薯煮沸 20 min,定容至1 000 ml) 1 000 ml,蔗糖 20 g,琼脂 20 g,115℃灭菌 30 min。LB培养基:酵母膏 5 g,NaCl 10 g,蛋白胨 10 g,水1 000 ml, pH 7.2, 121℃灭菌 20 min。假单胞菌选择性培养基(mSI培养基)^[10]:蔗糖 10.0 g,甘油 10 ml,络蛋白氨基酸 5.0 g, NaHCO₃ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 1.0 g, K₂HPO₄ 2.3 g,月桂酰肌氨酸钠 1.2 g,琼脂 18.0 g, pH 7.4~7.6,115℃灭菌 30 min。

1.1.6 辣椒疫霉病土的制备 取生长于 V8 培养基上、28℃培养 5 d 的菌丝块置于盛有无菌水的培养皿中,28℃日光灯下连续光照培养 48 h,中间换水 1 次,诱发孢子囊的产生。将产生大量孢子囊的菌丝块用匀浆机打碎后,转移至辣椒连作土壤中均匀混合,在人工气候箱中 28℃、相对湿度 80% 条件下培养 2 d,使辣椒疫霉在土壤中充分定殖。

1.2 试验设计

1.2.1 辣椒病土的生物熏蒸 取方法 1.1.6 中制备的病土,加入菜粕进行生物熏蒸处理,菜粕用量为 0.4%,以不加菜粕的病土作为对照。用化肥补充对照土壤中的氮、磷、钾,使其含量与生物熏蒸处理土壤相同。混匀土壤并使土壤持水量保持在 60% 左右,装入 5 L 的塑料桶中密封,放入人工气候箱中熏蒸 37 d。人工气候箱温度设置为白天(12 h)28℃,夜晚(12 h)25℃,相对湿度为 80%。设 3 个重复。

1.2.2 拮抗菌的抗毒和抗菌鉴定

1.2.2.1 拮抗菌的抗毒效果测定 在培养皿(直径 8.5 cm,高 1.3 cm)中倒入 LB 培养基,将铜绿假单胞菌 P1 菌液涂布在培养基上,往培养皿盖中央加入 1 g 菜粕,再加入 2 ml 无菌水,然后将接种 P1 菌丝块的培养皿倒扣在培养皿盖子上,用封口膜密封,

28 ℃ 培养 24 h。对照不加菜粕。重复 5 次。

1.2.2.2 拮抗菌的拮抗效果测定 将 PDA 培养基培养的辣椒疫霉制备成直径 5 mm 的菌片,转接至 PDA 平板中央,采用对峙法将拮抗菌点接在距疫霉菌片 2 cm 处,每皿接种 4 个拮抗菌,以不接菌为对照。28 ℃ 培养 72 h,测量辣椒疫霉的菌落直径,计算抑菌率,抑菌率=(对照病原菌菌落直径-处理病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径×100%。

1.2.3 生物熏蒸及强化措施的盆栽防效试验

1.2.3.1 拮抗菌接种体的制备 LB 培养基活化 P1 菌株保藏种,转接到含 LB 培养基的三角瓶中,30 ℃、170 r/min 振荡培养 24 h。7 000 r/min 离心 10 min 取菌体,无菌水稀释,用平板系列稀释涂布法测定菌悬液中菌体浓度,菌悬液 4 ℃ 保藏待用。

1.2.3.2 土壤处理 取方法 1.1.6 中制备的病土,分别进行生物熏蒸和生物熏蒸结合拮抗菌处理。生物熏蒸处理:病土中加入菜粕,用量为 0.4%;生物熏蒸结合拮抗菌处理:病土中加入菜粕和拮抗菌 P1,菜粕用量为 0.4%,拮抗菌 P1 用量为 1 g 病土拌入 1×10^8 CFU;对照:不加菜粕和拮抗菌 P1。用化肥补充对照土壤中的氮、磷、钾,使其含量与 2 个处理土壤相同。混匀土壤并使土壤持水量保持在 60% 左右,装入 5 L 的塑料桶中密封,放入人工气候箱中熏蒸 7 d。人工气候箱温度设置为白天(12 h)28 ℃,夜晚(12 h)25 ℃,相对湿度为 80%。熏蒸结束后,用做盆栽试验。

1.2.3.3 盆栽试验 在塑料盆中装土 0.5 kg,移栽 4 叶期健壮辣椒苗,每个处理 15 个重复。在移栽后开始统计发病率,观察 20 d。

1.3 试验方法

1.3.1 病情调查 辣椒幼苗移栽后,每天观察辣椒植株的生长情况。开始发病后每天连续调查记录各处理辣椒植株的发病情况。辣椒疫病的发病率按如下方法计算:发病率=发病株数/重复次数×100%。

1.3.2 土壤样品采集 在 37 d 生物熏蒸试验中,每 3 天采取 1 次土样,每个处理取 3 个样品,放入 4 ℃ 冰箱中待用。在盆栽试验中,移栽结束后每个处理采集 15 棵辣椒植株的根际土,混匀后平分 3 份,放入 4 ℃ 冰箱中待用。

1.3.3 假单胞菌计数 采用稀释平板法进行土壤假单胞菌计数,250 ml 三角瓶中加入 10 g 根际土和 90 ml 无菌水,170 r/min 振荡 30 min。土壤悬液在

含有 mS1 培养基的平板上进行系列稀释涂布。平板 23 ℃ 培养 3 d 后计数。

1.3.4 Real-time PCR 计数 采用 SYBR® Premix Ex Taq™(宝生物工程公司)试剂盒于 ABI(Applied BIO systems)PRISM® 7500 Real-time PCR System 扩增仪上对 DNA 样品进行绝对定量 PCR 分析。Real-time PCR 扩增反应采用 96-well Fast Thermal Cycling plate,反应体系 20 μl,反应液包括 10.0 μl SYBR® Premix Ex Taq™(2×)、上下游引物各 0.4 μl、0.4 μl ROX Reference Dye II(50×)、2.0 μl DNA 模板、6.8 μl 灭菌双蒸水,每个土壤 DNA 样品做 3 个重复。采用两步法 Real-time PCR 扩增标准程序:第 1 步预变性,95 ℃,30 s;第 2 步 PCR 反应,40 循环,95 ℃,5 s,60 ℃,34 s;熔解过程,95 ℃,15 s,60 ℃,1 min,95 ℃ 15 s,得出扩增产物的 C_t 值和熔解曲线。辣椒疫霉的引物序列为 CAPFW(5'-TTTAGTTGGGGTCTTGTACC-3')和 CAPRV1(5'-CCTCCACAACCAGCAACA-3')^[11];细菌的引物序列为 338f(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')和 534r(5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')^[12];真菌的引物序列为 NS1(5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3')和 Fung(5'-ATTCCCCGTTACCCGTTG-3')^[13];放线菌的引物序列为 F243(5'-GGATGAGCCCCGCGCCTA-3')和 R513(5'-CGGCCGCGGCTGCTGGCACGTA-3')^[14]。

1.4 数据统计

数据采用 Microsoft Excel™ 处理。采用 SPSS statistical Ver. 20 software 进行方差分析,显著性水平设定 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 生物熏蒸对土壤微生物的影响

由图 1 可看出,对照和生物熏蒸处理的疫霉数量在熏蒸的前 7 d 迅速下降,然后逐渐增加,27 d 后又逐渐降低。生物熏蒸处理的疫霉数量在整个熏蒸过程中都低于对照,且在 27 d 和 37 d 时差异显著。

在生物熏蒸过程中细菌数量变化与对照不同,对照和生物熏蒸处理的细菌数量在熏蒸的前 7 d 都明显增加,7 d 之后生物熏蒸处理的细菌数量继续呈缓慢增加的趋势,27 d 时开始下降,而对照的细菌数量在 7 d 后逐渐降低,27 d 时开始增加。整个熏蒸过程中,生物熏蒸处理的细菌数量都显著高于

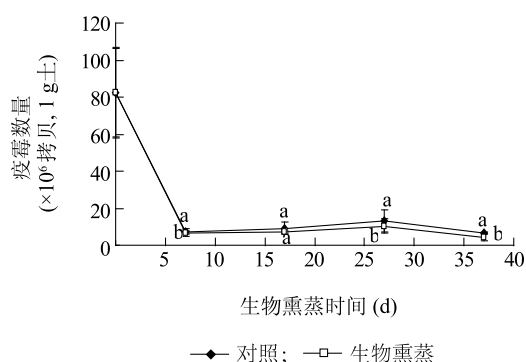


图1 生物熏蒸处理的土壤疫霉数量的动态变化

Fig. 1 The dynamic change of population of *Phytophthora capsici* in biofumigated soil

对照(图2)。对照和生物熏蒸处理的土壤真菌数量在熏蒸的前7 d 都增加,7 d 后逐渐降低,然而对照在27 d 时开始升高,生物熏蒸处理在17 d 则开始缓慢增加,27 d 后又逐渐降低。在整个熏蒸过程中,除了在27 d 时外,生物熏蒸处理的真菌数量都显著低于对照(图3)。

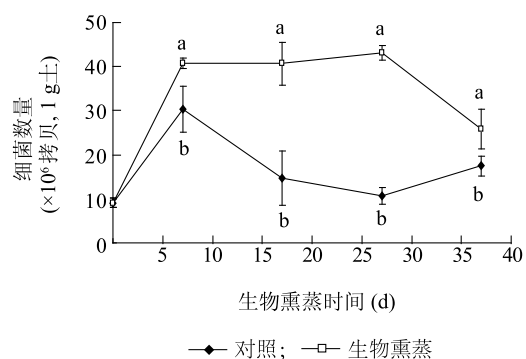


图2 生物熏蒸处理的土壤细菌数量的动态变化

Fig. 2 The dynamic change of bacteria population in biofumigated soil

土壤熏蒸过程中放线菌数量的变化趋势与真菌的相似。对照和生物熏蒸处理的放线菌数量在熏蒸的前7 d 都明显增加,7 d 时开始下降,对照在27 d 时开始逐渐增加,而生物熏蒸处理在17 d 时开始增加,27 d 后又逐渐降低(图4)。生物熏蒸处理的放线菌数量在7 d 和27 d 时显著高于对照,而在17 d 和37 d 时显著低于对照。

2.2 铜绿假单胞菌的抗毒效果

从图5 可看出,与不加菜粕的平板相比,加菜粕的平板上铜绿假单胞菌菌落形态相似,说明菜粕分

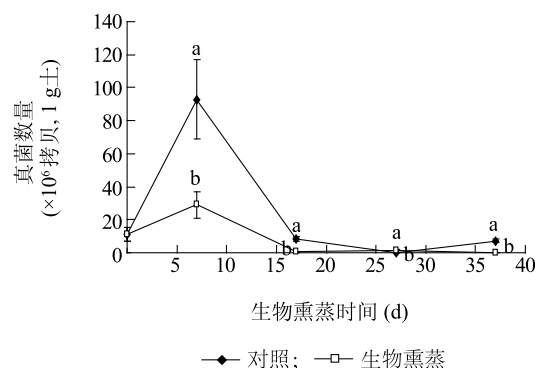


图3 生物熏蒸处理的土壤真菌数量的动态变化

Fig. 3 The dynamic change of fungi population in biofumigated soil

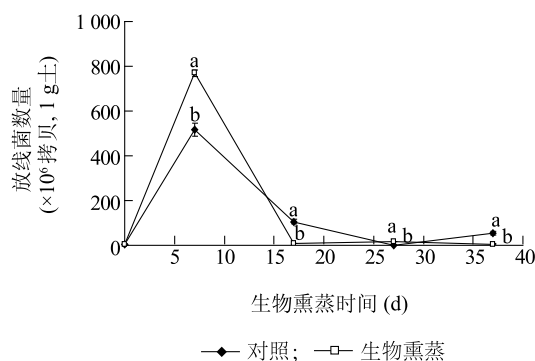


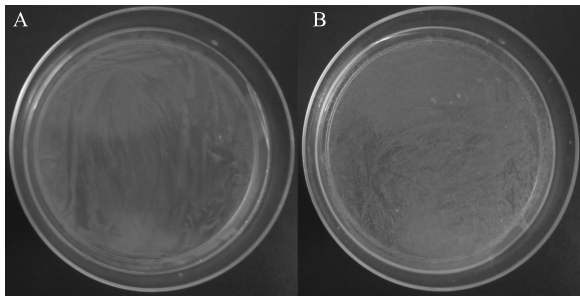
图4 生物熏蒸处理的土壤放线菌数量的动态变化

Fig. 4 The dynamic change of actinobacteria population in biofumigated soil

解所产生的挥发性气体对拮抗菌 P1 没有抑制作用。平板对峙试验结果(图6)显示,铜绿假单胞菌 P1 对辣椒疫霉的生长有强烈的抑制作用,拮抗菌周围形成明显的抑菌圈。测量和计算结果表明对照平板的辣椒疫霉菌落直径为9 cm,对峙平板上的辣椒疫霉菌落直径为5 cm,菌株 P1 对辣椒疫霉菌丝生长的抑制率为44.4%。

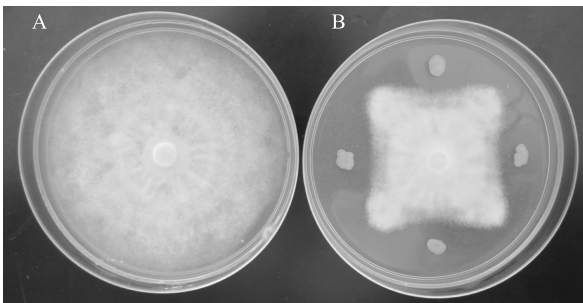
2.3 铜绿假单胞菌结合生物熏蒸对辣椒疫病的防控效果

由图7 可以看出,与对照和生物熏蒸处理相比,铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理可延缓和降低辣椒疫病的发病率。在整个辣椒生长过程中,铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理的辣椒疫病发病率一直最低,对照最高;至盆栽试验结束时,铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理的辣椒疫病发病率为73%,生物熏蒸处理的发病率为80%,对照为100%。



A:不加菜粕;B:加菜粕。

图5 铜绿假单胞菌菌株 P1 的抗毒效果

Fig. 5 The antitoxic effect of antagonistic *Pseudomonas aeruginosa* strain P1

A:疫霉;B:P1 对峙疫霉。

图6 铜绿假单胞菌菌株 P1 对辣椒疫霉拮抗效果

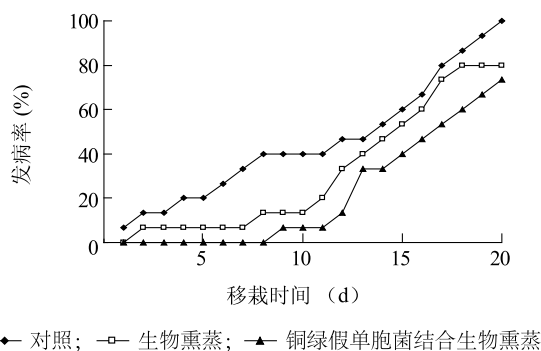
Fig. 6 The antagonistic effect of *P. aeruginosa* strain P1 against *P. capsici*

图7 不同处理的辣椒疫病发病率

Fig. 7 The disease incidence of phytophthora blight under different treatments

不同处理的土壤微生物数量发生了不同程度的变化。与对照($1 \text{ g} \pm 1.9 \times 10^7$ 拷贝)相比,生物熏蒸处理($1 \text{ g} \pm 9.6 \times 10^6$ 拷贝)和铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理($1 \text{ g} \pm 2.6 \times 10^6$ 拷贝)显著降低了土壤中疫

霉的数量,且铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理显著高于生物熏蒸处理;与对照($1 \text{ g} \pm 8.9 \times 10^9$ 拷贝)相比,生物熏蒸处理($1 \text{ g} \pm 1.5 \times 10^{10}$ 拷贝)和铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理($1 \text{ g} \pm 1.4 \times 10^{10}$ 拷贝)显著增加了土壤中细菌的数量,生物熏蒸处理的土壤细菌数量高于铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理,但未达到显著水平;与对照($1 \text{ g} \pm 1.3 \times 10^8$ 拷贝)相比,生物熏蒸处理($1 \text{ g} \pm 2.9 \times 10^9$ 拷贝)和铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理($1 \text{ g} \pm 1.1 \times 10^9$ 拷贝)显著增加了土壤中真菌的数量,且生物熏蒸处理显著高于铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理(表 1)。

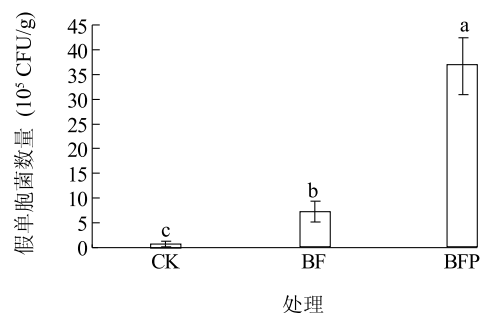
表1 不同处理土壤中疫霉、细菌和真菌数量

Table 1 The population of *P. capsici*, bacteria and fungi in soil with different treatments

处理	疫霉数量 (10^6 拷贝, 1 g)	细菌数量 (10^9 拷贝, 1 g)	真菌数量 (10^8 拷贝, 1 g)
CK	$19.1 \pm 0.7a$	$8.9 \pm 1.1b$	$1.3 \pm 0.2c$
BF	$9.6 \pm 3.1b$	$15.9 \pm 3.5a$	$29.2 \pm 5.7a$
BFP	$2.6 \pm 0.2c$	$14.4 \pm 3.4a$	$10.7 \pm 2.3b$

CK:对照;BF:生物熏蒸;BFP:铜绿假单胞菌结合生物熏蒸。同一栏中不同字母表示差异达到 0.05 显著水平。

不同处理对土壤假单胞菌数量有显著影响(图 8)。铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理(3.6×10^6 CFU/g)和生物熏蒸处理(7.3×10^5 CFU/g)土壤的假单胞菌数量显著高于对照(6.7×10^4 CFU/g),且铜绿假单胞菌结合生物熏蒸处理显著高于生物熏蒸处理。



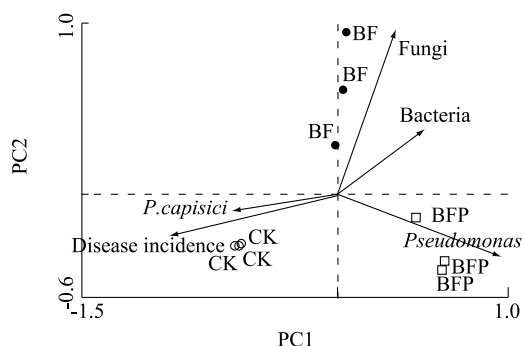
CK:对照;BF:生物熏蒸;BFP:铜绿假单胞菌结合生物熏蒸。不同字母表示差异达到 0.05 显著水平。

图8 不同处理土壤中假单胞菌数量

Fig. 8 *Pseudomonas* population in soil with different treatments

土壤微生物数量与辣椒疫病发病率的 PCA 分析结果(图 9)显示,第一主成分对于所有指标的贡献率是 64.1%,第二主成分对所有指标的贡献率为

32.9%,两者之和达到97.0%,即前两个主成分能把全部指标提供信息的97.0%反映出来。因此,利用主成分分析是科学的、可靠的。从图9中可看出,不同处理对土壤微生物数量和辣椒疫病发病率有不同的影响,辣椒疫病发病率与土壤疫霉数量相关性较大,呈正相关,与其他指标呈负相关。



CK:对照;BF:生物熏蒸;BFP:铜绿假单胞菌结合生物熏蒸。

图9 土壤微生物数量与辣椒疫病发病率的PCA分析

Fig. 9 PCA analysis of soil microbial population and disease incidence of *Phytophthora* blight of pepper

3 讨论

目前,大量研究结果表明利用芸薹属植物对土壤进行生物熏蒸可以防控作物土传病害^[15-17],本研究是国内首个利用菜粕进行生物熏蒸来防控辣椒疫病的报道。虽然有许多研究利用生物熏蒸来防控作物土传病害,然而对于生物熏蒸过程中土壤土传病原菌及其他微生物数量变化的报道还很少。通过研究37 d生物熏蒸过程中微生物数量变化特征,发现生物熏蒸7 d可以有效地降低疫霉数量,同时增加土壤中细菌、放线菌数量,显著改善土壤微生物群落结构。本试验利用菜粕对辣椒疫病土壤进行37 d的生物熏蒸,结果发现施用菜粕对土壤进行生物熏蒸处理可以降低土壤中辣椒疫霉的数量,这说明菜粕在土壤中降解释放的挥发性杀生气体可以抑制辣椒疫霉的生长。有学者研究发现熏蒸释放的杀生性气体可以抑制疫霉的生长,这与本试验结果相似。

土壤中微生物数量的传统分析方法都依靠可培养技术,该方法既耗时又不具有明确性。由于荧光定量PCR具有高特异性、灵敏度和可重复性等特点,本试验利用荧光定量PCR技术检测土壤中疫霉和其他微生物数量的变化。定量PCR结果显示,生物熏蒸增加了土壤中细菌和放线菌的数量,而降低

了真菌的数量。这说明菜粕降解过程中释放的杀生性气体对真菌的抑制作用较强,对土壤大多细菌和放线菌没有抑制作用。许多研究结果也表明,芸薹属植物降解过程释放的杀生性气体主要是抑制土壤中真菌的生长,对土壤细菌和放线菌抑制作用很小^[6,18]。菜粕含有丰富的氨基酸及活性多肽,具有碳源活性高、氮素有效性高的特点,是一种优质的有机肥料^[19]。菜粕施入土壤后为土壤微生物提供了充足的能源和养分,促进了微生物生长繁殖,使微生物数量显著增加。土壤细菌占微生物总量的80%左右,其中很多芽孢杆菌和假单胞菌对土传病原菌都有一定的拮抗作用^[20-21]。放线菌在土壤中除了可以转化养分外,还可以分泌放线菌素抑制病原菌的生长,而且具有光谱性,对抑制作物土传病原菌有一定的作用^[22]。有学者研究发现生物熏蒸可能是通过改变土壤微生物群落结构来抑制土传病原菌的生长^[23]。

根据37 d生物熏蒸的试验结果,本研究利用菜粕和拮抗菌P1对土壤进行7 d的生物熏蒸,并进行盆栽试验,结果表明,生物熏蒸与拮抗菌结合施用能够抑制病原菌的生长繁殖并降低辣椒疫病的发病率。大量研究结果表明,土壤中铜绿假单胞菌对一些土传病原菌有一定的拮抗作用^[24-27]。也有研究结果表明铜绿假单胞菌对化学农药、油污等有害物质都有一定的降解作用^[28]。本实验室筛选的铜绿假单胞菌菌株P1既可以拮抗辣椒疫霉又可以对抗菜粕降解产生的杀生气体。有研究结果表明,在平板上拮抗效果明显的拮抗菌在盆栽和田间上的生防效果并不一定好^[29]。有学者认为生防菌剂产品在实际应用中遇到的主要问题就是在田间施用的拮抗菌,很难在土壤中存活及发挥它的拮抗功能^[30]。许多报道指出,有机载体与拮抗菌的结合较单独的拮抗菌对于土传病害的防控效果更佳^[31-32]。本试验结果表明生物熏蒸与生防菌结合施用能够抑制病原菌的生长繁殖并降低辣椒疫病的发病率,其效果要好于单独生物熏蒸处理,因为菜粕所含营养物质能为拮抗菌的生长提供碳源及其他养分,有助于拮抗菌形成菌群定植于土壤中^[20,33-34]。本试验中生物熏蒸结合施用拮抗菌处理的土壤假单胞菌数量显著高于其他处理,同时疫霉数量显著低于其他处理,可能是因为菜粕的养分促进了拮抗菌P1的生长,使其在土壤中形成优势菌种,有效地抑制了土壤中疫霉的

生长。Saravanan 等研究发现,含荧光假单孢菌的饼肥料能有效地防控香蕉枯萎病^[35],该研究结果与我们的研究结果相似。

综上所述,生物熏蒸结合施用拮抗菌处理辣椒病土 7 d 就可以有效降低辣椒疫病的发病率。原因可能是因为菜粕的养分提高了拮抗菌在土壤中的存活和繁殖能力,有效抑制了土壤中疫霉的生长,同时还增加了土壤中细菌和真菌的数量,改善了土壤的微生物群落结构。

参考文献:

- [1] WANG Q, MA Y, WANG G, et al. Integration of biofumigation with antagonistic microorganism can control *Phytophthora* blight of pepper plants by regulating soil bacterial community structure [J]. European Journal of Soil Biology, 2014, 61: 58-67.
- [2] 杨春艳,刘 飞,吉 恒,等. 辣椒疫病的傅里叶变换红外光谱研究[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(6): 113-116.
- [3] 王中武,班德权. 6 种药剂对辣椒疫病的防治效果比较[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(6): 110-111.
- [4] PANE C, SPACCINI R, PICCOLO A, et al. Compost amendments enhance peat suppressiveness to *Pythium ultimum*, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor* [J]. Biological Control, 2011, 56(2): 115-124.
- [5] MAZZOLA M, GRANATSTEIN D M, ELFVING D C, et al. Suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolate content [J]. Phytopathology, 2001, 91(7): 673-679.
- [6] SARWAR M, KIRKEGAARD J, WONG P, et al. Biofumigation potential of brassicas [J]. Plant and Soil, 1998, 201(1): 103-112.
- [7] WALKER J. Crambe and rapeseed meal as soil amendments: nematocidal potential and phytotoxic effects [J]. Crop Protection, 1996, 15(5): 433-437.
- [8] ANGUS J, GARDNER P, KIRKEGAARD J, et al. Biofumigation: Isothiocyanates released from brassica roots inhibit growth of the take-all fungus [J]. Plant and Soil, 1994, 162(1): 107-112.
- [9] HAAS D, DÉFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(4): 307-319.
- [10] TARNAWSKI S, HAMELIN J, LOCATELLI L, et al. Examination of Gould's modified S1 (mS1) selective medium and Angle's non-selective medium for describing the diversity of *Pseudomonas* spp. in soil and root environments [J]. Fems Microbiology Ecology, 2003, 45(2): 97-104.
- [11] SILVAR C, DUNCAN J, COOKE D, et al. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon [J]. European Journal of Plant Pathology, 2005, 112(1): 43-52.
- [12] LIOUSSANNE L, PERREAULT F, JOLICOEUR M, et al. The bacterial community of tomato rhizosphere is modified by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi but unaffected by soil enrichment with mycorrhizal root exudates or inoculation with *Phytophthora nicotianae* [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(3): 473-483.
- [13] LUO J, SHEN Q, RAN W, et al. Application of bio-organic fertilizer significantly affected fungal diversity of soils [J]. Soil Science Society of America Journal, 2010, 74(6): 2039-2048.
- [14] LEARN-HAN L, YOKE-KQUEEN C, SHIRAN M, et al. Identification of actinomycete communities in Antarctic soil from Barrientos Island using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Genetics and Molecular Research, 2012, 11(1): 277-291.
- [15] HANSEN Z, KEINATH A. Increased pepper yields following incorporation of biofumigation cover crops and the effects on soil-borne pathogen populations and pepper diseases [J]. Applied Soil Ecology, 2013, 63: 67-77.
- [16] GABLER F M, MERCIER J, JIMENEZ J, et al. Integration of continuous biofumigation with *Muscodor albus* with pre-cooling fumigation with ozone or sulfur dioxide to control postharvest gray mold of table grapes [J]. Postharvest Biology and Technology, 2010, 55(2): 78-84.
- [17] LU P, GILARDI G, GULLINO M L, et al. Biofumigation with *Brassica* plants and its effect on the inoculum potential of *Fusarium* yellows of *Brassica* crops [J]. European Journal of Plant Pathology, 2010, 126(3): 387-402.
- [18] COHEN M, YAMASAKI H, MAZZOLA M. *Brassica napus* seed meal soil amendment modifies microbial community structure, nitric oxide production and incidence of *Rhizoctonia* root rot [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(7): 1215-1227.
- [19] 蒋小芳,罗 佳,黄启为,等. 不同原料堆肥的有机无机复混肥对辣椒产量和土壤生物性状的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2008, 14(4): 766-773.
- [20] ZHAO Q, DONG C, YANG X, et al. Biocontrol of *Fusarium* wilt disease for *Cucumis melo* melon using bio-organic fertilizer [J]. Applied Soil Ecology, 2011, 47(1): 67-75.
- [21] GOBBIN D, REZZONICO F, GESSLER C. Quantification of the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* Pf153 in soil using a quantitative competitive PCR assay unaffected by variability in cell lysis-and DNA-extraction efficiency [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(7): 1609-1619.
- [22] ZAITLIN B, TURKINGTON K, PARKINSON D, et al. Effects of tillage and inorganic fertilizers on culturable soil actinomycete communities and inhibition of fungi by specific actinomycetes [J]. Applied Soil Ecology, 2004, 26(1): 53-62.
- [23] OMIROU M, ROUSIDOU C, BEKRIS F, et al. The impact of biofumigation and chemical fumigation methods on the structure and function of the soil microbial community [J]. Microbial Ecology, 2011, 61(1): 201-213.

- [24] ALMARIO J, MOËNNE-LOCCOZ Y, MULLER D. Monitoring of the relation between 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* and *Thielaviopsis basicola* populations by real-time PCR in tobacco black root-rot suppressive and conducive soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2012, 57: 144-155.
- [25] SVERCEL M, HAMELIN J, DUFFY B, et al. Distribution of *Pseudomonas* populations harboring *phlD* or *hcnAB* biocontrol genes is related to depth in vineyard soils [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42(3): 466-472.
- [26] 胡军华, 张伏军, 蓝希铨, 等. 烟草根际细菌铜绿假单胞菌 swu31-2 的定殖能力及其对烟草青枯病的防治作用 [J]. 植物保护, 2009(5): 89-94.
- [27] 郝晓娟, 刘 波, 谢关林, 等. 铜绿假单胞菌 FJAT-346 对番茄枯萎病的生防作用 [J]. 山西农业大学学报: 自然科学版, 2011, 31(1): 39-43.
- [28] HOLTZE M S, NIELSEN P, EKELEND F, et al. Mercury affects the distribution of culturable species of *Pseudomonas* in soil [J]. Applied Soil Ecology, 2006, 31(3): 228-238.
- [29] MEW T, ROSALES A. Bacterization of rice plants for control of sheath blight caused by *Rhizoctonia solani* [J]. Phytopathology, 1986, 76(11): 1260-1264.
- [30] VAN VEEN J A, VAN OVERBEEK L S, VAN ELSAS J D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1997, 61(2): 121-135.
- [31] QIU M, ZHANG R, XUE C, et al. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil [J]. Biology and Fertility of Soils, 2012, 48: 807-816.
- [32] ZHANG N, WU K, HE X, et al. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11 [J]. Plant and Soil, 2011, 344(1): 87-97.
- [33] ZHAO Q, SHEN Q, RAN W, et al. Inoculation of soil by *Bacillus subtilis* Y-IVI improves plant growth and colonization of the rhizosphere and interior tissues of muskmelon (*Cucumis melo* L.) [J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47: 507-514.
- [34] WEI Z, YANG X, YIN S, et al. Efficacy of *Bacillus*-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field [J]. Applied Soil Ecology, 2011, 48: 152-159.
- [35] SARAIVANAN T, MUTHUSAMY M, MARIMUTHU T. Development of integrated approach to manage the fusarial wilt of banana [J]. Crop Protection, 2003, 22(9): 1117-1123.

(责任编辑:张震林)