

一株拮抗辣椒疫霉的假单胞菌的分离与鉴定

何延静, 刘海明, 胡洪波, 许煜泉, 张雪洪*

(上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢教育部重点实验室 上海 200240)

摘 要: 从甜椒根际土壤中分离到一株对辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)具有强拮抗作用的假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)菌株 GP72, 研究其拮抗性表明, 对多种植物病原真菌均有很强的抑制作用。对该菌株进行形态特征、生理生化、Biolog GN、(G + C)mol% 含量测定及 16S rDNA 序列分析, 鉴定为绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)。特征为单细胞, 极生单个鞭毛, 不能利用聚 β -羟基丁酸盐, 能够较强地利用 Biolog 系统 95 种碳源中的 45 种作为底物生长, 较弱利用其中的 6 种底物, 与绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)的相似性达到 98%, 相似指数为 0.72。用热解链方法测得基因组 DNA 的 (G + C)mol% 含量为 65.1mol%。以 16S rDNA 序列为基础构建了包括 13 株邻近种属细菌在内的系统发育树, 其中与模式致金色假单胞菌的同源性最近。

关键词: 绿针假单胞菌, GP72, 鉴定, Biolog GN, 16S rDNA

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-6209(2006)04-0516-06

伴随着现代农业的飞速发展, 大面积作物病虫害的防治越来越依赖于化学杀虫剂的应用, 但随之而来的环境污染和病虫害抗药性的产生使得人们对现代农业的可持续性发展提出了新的要求。近年来生物防治的观点得到了世界各国的广泛关注, 寻找有效的生防菌以及研究它们相关的防治机制也就成为了当今人们关注的热点。

假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)是活跃在植物根际的一类微生物。许多菌株有抑制植物病害、促进植株生长的作用, 属植物促生菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR)类。大量研究^[1~5]表明, 这些具有生防作用的菌株尤以荧光性假单胞菌(Fluorescent *Pseudomonads* spp.)为主, 包括铜绿假单胞菌^[6,7](*Pseudomonas aeruginosa*)、致金色假单胞菌^[8,9](*Pseudomonas aureofaciens*)、绿针假单胞菌^[10,11](*Pseudomonas chlororaphis*)、荧光假单胞菌^[12,13](*Pseudomonas fluorescens*)等。有的已成为商业用生防产品, 如瑞士 BioAgri AB 公司研制的基于绿针假单胞菌的生防药剂 Cedomon, 用于大麦和燕麦种期处理可防治苗期病害^[4]。其它绿针假单胞菌如 SPR044^[10], MA 342^[11], SPB121^[14] 都经初步试验证明可作为有效的生防菌株。

我国华东地区经济作物甜椒的种植比较广泛, 并且较易受到一些植物病原菌的侵害, 特别是一些

真菌如辣椒疫霉、终极腐霉、瓜果腐霉等的, 因而从甜椒的根际土壤中筛选新的具有潜在生防效果的生防细菌具有非常重要的意义。本文报道从甜椒根际土中分离筛选到一株对植物病原菌有拮抗作用的假单胞菌属菌株 GP72, 并对其进行了形态特征、生理生化鉴定、Biolog GN、(G + C)mol% 含量测定和 16S rDNA 序列分析, 鉴定为绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源: 假单胞菌属菌株(*Pseudomonas* spp.) GP72 系土壤中分离得到。假单胞菌(*Pseudomonas* spp.) M18 及供试植物病原菌株系本实验室所保存菌株。甜椒疫霉(*Phytophthora capsici*)由上海交通大学农学院提供。致金色假单胞菌(*P. aureofaciens*) 30-84, 荧光假单胞菌(*P. fluorescens*) Q2-87, 铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) PAO1 由美国农业部 Linda S Thomashow 教授赠送。

1.1.2 培养基: King's B 培养基(KMB): 蛋白胨 20g, 甘油 15g, K_2PO_4 0.392g, 无水 $MgSO_4$ 0.732g, 琼脂 16g, pH7.5, 定容至 1L。1/3 KMB 配方与 KMB 相同, 但最后定容至 3L(无琼脂)。马铃薯葡萄糖培养基(PDA): 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 20g, 定容至

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(3-3-1)

* 通讯作者。Tel 86-21-34204854, Fax 86-21-34204051, E-mail: xuehzhang@sjtu.edu.cn

作者简介: 何延静(1982-), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要从事微生物系统分类学研究。E-mail: yanjinghe106@yahoo.com.cn

其他作者: 蒋海霞

收稿日期: 2005-10-08, 接受日期: 2006-02-07, 修回日期: 2005-12-21

1L。

1.1.3 主要试剂和仪器：用于 PCR 扩增的全套试剂及扩增引物均购自上海生工生物工程技术有限公司，其他试剂均为 A. R. 级；MODELU-200UV/VIS 紫外分光光度计及恒温摇床(Series 25) 购自 Edison 公司，H-600 透射电镜购自日立公司，Biolog 细菌自动分析鉴定仪购自 Biolog 公司，DHG-9123A 型电热恒温水槽购自上海精宏试验设备有限公司，PCT-100 型 PCR 仪购自 Perkin-Elmer 公司。

1.2 菌株的分离筛选

从江苏淮阴地区采集不同甜椒根际土样若干，称取 1g 甜椒根须和 1g 附着于根须的土壤样品溶于 50mL 1/3 KMB 液体培养基中，并添加抗生素：氯苄青霉素(40μg/mL)，氯霉素(13μg/mL)，放线菌酮(100μg/mL)，28℃ 下 230r/min 摇床振荡 1h，6 个重复混和，从中取 200μL 涂布于含同样剂量抗生素的 KMB 琼脂平板上。在 28℃ 培养 16 ~ 18h 待长出单菌落后用异步培养法^[15]进行辣椒疫霉抑菌性试验，从中筛选出具有最大抑菌活性的强拮抗菌株。

1.3 拮抗性检测

用异步培养法^[15]测定菌株 GP72 对油菜菌核病、黄瓜枯萎病、西瓜枯萎病、西瓜炭疽病、棉花立枯病、水稻纹枯病、终极腐霉的拮抗作用。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH 5α 为阴性对照菌株，*Pseudomonas* sp. M18 为阳性对照菌株^[16]。

1.4 形态特征

革兰氏法染色，光学显微镜下观察菌体形态、大小，磷钨酸钠染色，透射电子显微镜下观察鞭毛；KMB 固体培养基 28℃ 培养，观察 24h 菌龄的菌落形态。

1.5 生理生化特征

参照文献 [17] [18] 对 GP72 进行生理生化鉴定。

1.6 Biolog GN 分析

在 Biolog GN 96 孔平板上，除对照孔不含碳源外，每孔都含有四唑紫(tetrazolium violet)缓冲营养培养基和不同碳源，被鉴定的菌细胞悬浮于微孔中，培养 24h 后用 Biolog 细菌自动鉴定仪检测供试菌株 GP72 的代谢指数。

1.7 基因组 DNA 的(G + C)mol% 含量测定

基因组 DNA 的提取参照文献 [19] 的方法并稍做改进，即在最后用 70% 乙醇洗涤干燥后，加 1/10 体积的 RNase，37℃ 温浴 30min 备用。将制备好的 DNA 溶于 1× SSC 中，采用热变性温度法(T_m 值法) 来测定 DNA (G + C) mol% 含量^[18]，按照经验公式 1

$\times \text{SSC} (G + C) \text{mol} \% = 2.44 \times (T_m - 69.3)$ 计算。对照菌株为大肠杆菌 *E. coli* DH 5α。

1.8 16S rDNA 的序列分析

采用通用 27F/1492R 引物(正向引物：5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'；反向引物：5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增^[20]。PCR 扩增条件：94℃ 5min，80℃ 1min (hot-start)；94℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 2min，30 个循环，72℃ 5min。

扩增产物经纯化后，送上海英骏生物技术有限公司测序。所测序列用 BLAST 软件与 GenBank 和 RDP 数据库进行相似性分析，并与 GenBank 中的相近序列在 Clustal X(1.8) 程序包中进行多重序列匹配排列(Multiple alignments) 分析，最后形成一个多重序列匹配排列阵，其中形成的缺口用横杠“ - ”填补，用 MEGA(3.1) 程序包中的 Neighbor-Joining 法^[21] 构建系统进化树。使用 Kimura 2-parameter 法，系统树各分枝的置信度经重抽样法(Bootstrap)1000 次重复检测，DNA 序列变异中的转换和颠换赋予相同的加权值。

2 结果

2.1 拮抗菌的分离筛选

土壤样品匀浆后涂布于含抗生素的 KMB 平板，通过异步培养法对平板上的单菌落进行筛选，得到了对辣椒疫霉产生抑菌性最强的菌株 GP72(图 1)。进一步研究其拮抗性表明，GP72 对多种植物病原真菌均有很强的抑制作用(表 1)。

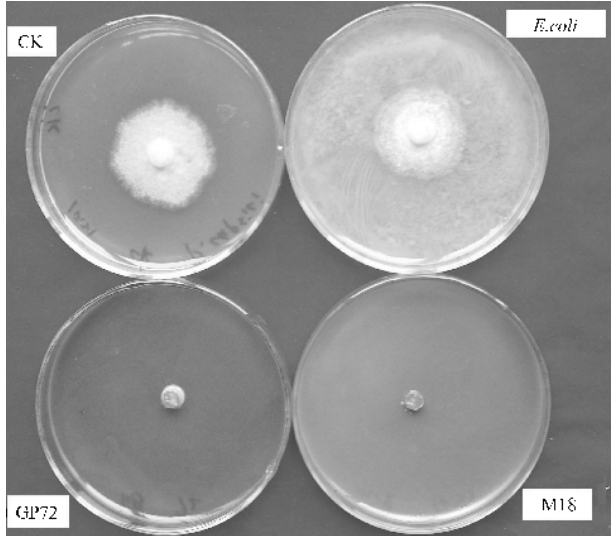


图 1 GP72 对辣椒疫霉产生的抑菌作用

Fig.1 The inhibition of GP72 against *Phytophthora capsici*.

表 1 GP72 与对照处理接真菌菌丝体的生长情况对比
Table 1 Mycelial growth and comparison of 8 funguses by GP72 in asynchronous culture assay

Strain	Degrees of mycelial growth				
	CK	<i>E. coli</i>	GP72	M18	
<i>Phytophthora capsici</i>	+	+	+	+	0
<i>Rhizoctonia solani</i>	+	+	+	+	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	+	+	+	+	0
<i>Pythium ultimum</i>	+	+	+	+	+
<i>Sclerotinia Sclerotiorum</i>	+	+	+	+	0
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	+	+	+	+	+
<i>Corticium sasakii</i>	+	+	+	+	0
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	+	+	+	+	+

0 : no mycelial growth ; + : 1 ~ 10mm wide zone ; + + : 11 ~ 20mm wide zone ; + + + : more than 21mm wide zone.

2.2 形态特征

菌株 GP72 为杆状(图 2), 0.3 μ m ~ 0.8 μ m \times 1.0 μ m ~ 1.1 μ m,革兰氏染色阴性,无芽孢,单极生鞭毛,能运动。在 KMB 培养基上培养 24h 后可形成 1.2mm 菌落,菌落可产生橙色色素,圆形,表面凸起,光滑,较粘稠,易挑起,边缘整齐。

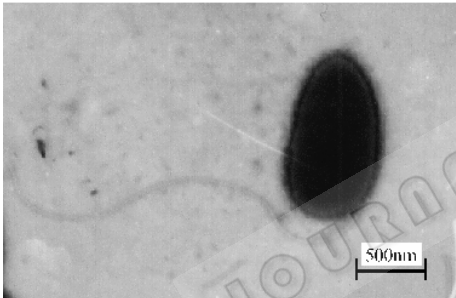


图 2 菌株 GP72 透射电镜下的细胞形态(10000 \times)
Fig.2 The strain GP72 cell morphology under trans-electron microscope (10000 \times).

2.3 生理生化特征

试验结果为表 2, 其中对照菌株为 *P. aureofaciens* 30-84, *P. fluorescens* Q2-87, *P. aeruginosa* PAO1, *Pseudomonas* sp. M18。与其它 4 种假单胞菌标准株比较,它们都能产生荧光色素,能水解精氨酸双水解酶、脂酶、氧化酶、过氧化氢酶、柠檬酸盐、明胶,不水解淀粉,也不产生 H₂S,都不能利用聚 β -羟基丁酸盐作碳源。菌株 GP72 最适培养温度为 28 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C,最适生长 pH 值为 7.0 ~ 7.5,可产生橙色非荧光色素,能利用卵磷脂酶,可把蔗糖转化为果聚糖,不产生脓青素,也不进行反硝化作用。最适生长的 NaCl 浓度为 0 ~ 6%,当 NaCl 浓度大于 7% 时,生长被抑制。

2.4 Biolog GN 分析

将 GP72 菌株细胞悬浮液接种到 95 种碳源的

表 2 GP72 及相关菌株的表型特征比较
Table 2 Main characteristics and comparisons of GP72 and the relevant strains

Characteristics	Strains				
	GP72	30-84	Q2-87	PAO1	M18
Flagellation	1	ND	ND	ND	1
Pyocyanin production	-	-	-	+	+
Fluorescent pigment	+	+	+	+	+
Non-fluorescent pigment	green	-	-	-	-
	orange	+	-	-	-
blue, non-water soluble		-	-	-	-
Hydrolysis of	Gelatin	+	+	+	+
	Starch	-	-	-	-
Poly- β -hydroxybutyrate		-	-	-	-
Litmus and milk reaction	+	+	+	+	+
Nitrate reduced to nitrite	+	+	+	+	+
Protease : skim milk agar	+	+	-	+	-
Fructosan production	+	+	+	-	-
Growth at	4 $^{\circ}$ C	+	+	+	+
	41 $^{\circ}$ C	-	-	-	+
Lecithinase	+	+	-	-	-
Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
Lipase	+	+	-	+	-
Oxidase	+	+	+	+	+
Denitrification	-	-	-	+	+
M. R. test	-	-	-	-	-
Citrate utilization	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer test	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Indole formation	-	-	-	-	-
H ₂ S formation	-	-	-	-	-
Growth at 5% NaCl	+	-	-	-	-

+ :Positive ; - : Negative ; ND : No datum.

Biolog 板微孔中,培养 24h 后,测定菌株代谢指数,表 3 为 GP72 对 95 种碳底物的利用能力。经 Biolog 细菌鉴定系统分析代谢指数,其与 *Pseudomonas chlororaphis* 标准菌株的相似率为 98%,该菌株应属 *Pseudomonas chlororaphis*。

2.5 G + C 含量测定

由热扫描曲线得出菌株 GP72 的 T_m 值为 96 $^{\circ}$ C。由公式计算得 DNA 中的“G + C mol%”值为 65.1mol%,符合 *Pseudomonas* 属的“(G + C)mol%”值特征。

2.6 16S rDNA 的序列分析

以 GP72 总 DNA 为模板,用引物 27F 和 1492R 进行 PCR 扩增,得到约 1.5kb 的 PCR 产物,菌株 GP72 的 16S rDNA 序列 GenBank 登录号(accession number : DQ158873)。将 GP72 菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的序列进行比较,表明与其同源性最高的 13 个模式菌株相似性最高的是致金色假单胞菌,但与 RDP 数据库比对的结果显示,与 GP72 最高

相似的种属是绿针假单胞菌。用 Neighbor-Joining 方法的相似性最高 ,如图 3 所示。这与生理生化试验和法构建的系统发育树表明 GP72 与致金色假单胞菌 Biolog GN 分析的结果相一致。

表 3 GP72 对 Biolog 板上 95 种碳底物的利用能力

Table 3 Utilization of 95 carbon-substrates by strain GP72 using Biolog microplate

Carbon-substrates	Results	Carbon-substrates	Results	Carbon-substrates	Results
H ₂ O	+	Turanose	-	D-Alanine	+
α-Cyclodextrin	-	Xylitol	-	L-Alanine	+
Dextrin	-	Methyl Pyruvate	-	L-Alanyl-glycine	+
Glycogen	-	Mono-Methyl-Succinate	w	L-Asparagine	+
Tween 40	+	Acetic Acid	+	L-Aspartic Acid	+
Tween 80	+	Cis-Aconitic Acid	+	L-Glutamic Acid	+
N-Acetyl-D-galactosamine	-	Citric Acid	+	Glycyl-L-Aspartic Acid	-
N-Acetyl-D-glucosamine	+	Formic Acid	w	Glycyl-L-Glutamic Acid	-
Adonitol	-	D-Glactonic Acid Lactone	+	L-Histidine	+
L-Arabinose	+	D-Galacturonic Acid	-	Hydroxy-L-Proline	+
D-Arabitol	+	D-Gluconic Acid	+	L-Leucine	-
D-Cellobiose	-	D-Glucosaminic Acid	-	L-Omithine	-
i-Erythritol	-	D-Glucuronic Acid	-	L-Phenylalanine	-
D-Fructose	+	α-Hydroxy Butyric Acid	-	L-Proline	+
L-Fucose	-	β-Hydroxy Butyric Acid	+	L-Pyrogglutamic Acid	+
D-Galactose	w	γ-Hydroxy Butyric Acid	-	D-Serine	+
Gentiobiose	-	p-Hydroxy Phenylacetic Acid	+	L-Serine	+
α-D-Glucose	+	Itaconic Acid	w	L-Threonine	-
m-inositol	+	α-Keto Butyric Acid	-	D,L-Carnitine	+
α-D-Lactose	-	α-Keto Glutaric Acid	+	γ-Amino Butyric Acid	+
Lactulose	-	α-Keto Valeric Acid	+	Urocanic Acid	+
Maltose	-	D,L-Lactic Acid	+	Inosine	+
D-Mannitol	+	Malonic Acid	+	Uridine	-
D-Mannose	+	Propionic Acid	+	Thymidine	-
D-Melibiose	-	Quinic Acid	+	Phenylethylamine	w
β-Methyl-D-Glucoside	-	D-Saccharic Acid	+	Putrescine	+
D-Psicose	-	Sebacic Acid	-	2-Aminoethanol	+
D-Raffinose	-	Succinic Acid	+	2,3-Butanediol	-
L-Rhamnose	-	Bromo Succinic Acid	+	Glycerol	+
D-Sorbitol	-	Suceinamic Acid	-	D,L-α-Glycerol Phosphate	w
Sucrose	+	Glucuronamide	-	Glucose-1-Phosphate	-
D-Trehalose	+	L-Alaninamide	-	Glucose-6-Phosphate	-

+ Positive ;- Negative ;w Weak.

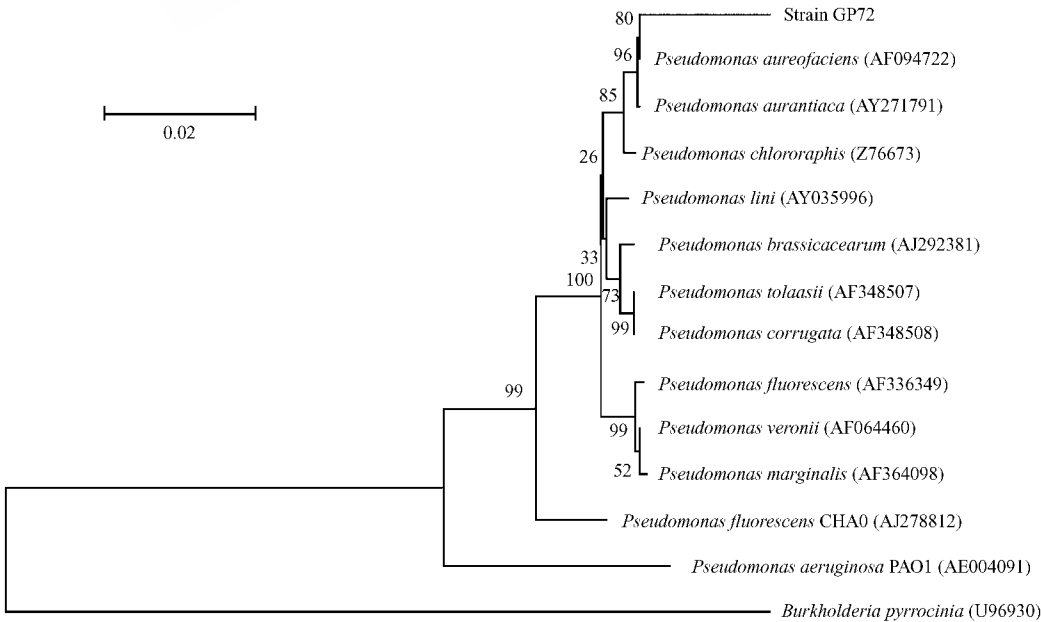


图 3 菌株 GP72 的系统发育学地位

Fig.3 Phylogenetic tree of strain GP72 and its relatives. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank.

The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 2% sequence divergence.

3 讨论

辣椒疫病、西瓜枯萎病、棉花枯萎病等是农业生产上危害很大的土传病害,导致作物减产严重时甚至绝收。当前国内外从抗病育种、化学防治和农业措施等方面做了大量工作,初见防病效果。开发利用新的生防菌被认为是最具发展潜力的防治方法之一,绿针假单胞菌是一种常见的拮抗微生物,利用绿针假单胞菌进行农作物的防治时有报告^[10,11,14],绝大多数对人畜无害。目前,国内未见有利用绿针假单胞菌来控制农作物病害的报道。本文首次在国内报道了从甜椒根际土壤中分离筛选到一株绿针假单胞菌 GP72,对辣椒疫霉等农作物病原菌有很强的抑制作用。假单胞菌的促生长作用机理之一是产生活性物质或改善矿质营养直接促进植物生长;二是菌体产生代谢物质或通过竞争作用抑制或阻碍根围病原微生物的发展,间接促进植物的生长^[2]。其生防作用机理涉及有效的根部定殖、抗生作用、根际营养竞争(特别是对 Fe 的竞争)诱导植物抗性和分泌降解微生物的酶等。其中荧光性假单胞菌的抗病机理主要是通过分泌一种或几种抗生素来抑制植物病原菌的生长,如 2,4-二乙酰藤黄酚(2,4-diacetylphloroglucinol Phl),吩嗪-1-羧酸(Phenazine-1-carboxylic acid PCA),藤黄绿脓菌素(Pyoluteorin,Plt),硝吡咯菌素(Pyrrolnitrin)和氰化物(HCN)等,本文通过拮抗性实验表明 GP72 的次生代谢产物可能产生其中的某几种抗生素而抑制植物病原菌的生长,从而使 GP72 起到拮抗多种植物病害的作用。

由常规生理生化试验的比较及从 NCBI 数据库得到的 16S rDNA 序列比对结果表明 GP72 与致金色假单胞菌同源性最近。但根据 Biolog GN 碳源利用分析,GP72 与绿针假单胞菌的相似性达 98%,相似指数达 0.72,这与 16S rDNA 从 RDP 数据库得到的序列比对结果相一致。其实这并不矛盾,假单胞菌最近分类的中已把致金色假单胞菌归于绿针假单胞菌^[17,22]。因此综合各项实验结果,将 GP72 鉴定为绿针假单胞菌(*P. chlororaphis*)是适当的。从与其它几株模式菌的常规生理生化实验比较可以看出,GP72 与致金色假单胞菌 30-84 非常相似,但这两株菌的耐盐性不同:由表 1 我们可以看出在 5% NaCl 浓度下,GP72 仍可生长而 30-84 生长已被抑制。有关菌株的其他特性及生防机理有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Bender CL, Rangaswamy V, Loper JE. Polyketide production by plant-associated *Pseudomonads*. *Annu Rev Phytopathol*, 1999, **37**: 175–196.
- [2] O'Sullivan DJ, O'Gara F. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogen. *Microbiological Review*, 1992, **56**(4): 662–676.
- [3] Ligon JM, Hill DS, Hammer PE, et al. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manag Sci*, 2000, **56**: 688–695.
- [4] Xavier L, Sandrine D, Pascal M, et al. Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Agronomie*, 2003, **23**: 397–405.
- [5] Voisard C, Keel C, Haas D, et al. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J*, 1989, **8**: 351–358.
- [6] Bano N, Musarrat J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent. *Curr Microbiol*, 2003, **6**: 324–328.
- [7] Kumar RS, Ayyadurai N, Pandiaraja P, et al. Characterization of antifungal metabolite produced by a new strain *Pseudomonas aeruginosa* PUPa3 that exhibits broad-spectrum antifungal activity and biofertilizing traits. *J Appl Microbiol*, 2005, **98**: 145–154.
- [8] Timothy P, Brian NT, Pascale G, et al. A novel antifungal furanone from *Pseudomonas aureofaciens*, a biological agent of fungal plant pathogens. *J Chem Ecol*, 2000, **26**(6): 1515–1524.
- [9] Pierson III IS, Pierson EA. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: Role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **136**: 101–108.
- [10] Schmidt-Eisenlohr H, Rittig HM, Baron C. Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* with Trb protein specific antisera. *Environ Microbiol*, 2001, **3**: 720–730.
- [11] Lennart J, Margareta H, Berndt G. Performance of the *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol agent MA 342 against cereal seed-borne diseases in field experiments. *Euro J Plant Pathol*, 1998, **104**: 701–711.
- [12] Pierson EA, Weller DM. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology*, 1994, **84**: 940–947.
- [13] Bangera MG, Thomashow LS. Identification and characterization of a gene cluster for synthesis of the polyketide antibiotic 2,4-diacetylphloroglucinol from *Pseudomonas fluorescens* Q2-87. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 3155–3163.
- [14] Kravchenko LV, Makarova NM, Azarova TS, et al. Isolation and phenotypic characterization of plant growth-promoting rhizobacteria with high antiphytopathogenic activity and root-colonizing ability. *Mikrobiologiya*, 2002, **71**(4): 521–525.
- [15] 许煜泉, 石荣, 林志新. 具有 ACC 脱氨酶活性及抗枯萎病菌的假单胞菌株 B₈. 上海交通大学学报, 1999, **33**(2): 206–209.

- [16] Hu HB , Xu YQ , Cheng F , *et al.* Isolation and characterization of a new *Pseudomonas* strain produced both phenazine 1-carboxylic acid and pyoluteorin. *J Microbiol Biotech* , 2005 , **15** : 86 – 90.
- [17] Bergey D , John GH. Bergey ' s Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins , 1994.
- [18] 东秀珠 , 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京 : 科学出版社 , 2001.
- [19] Osborn F , Blinder R , Justin RE , *et al.* 精编分子生物学实验指南. 颜子颖 , 王海林 , 译. 第一版. 北京 : 科学出版社 , 2001 , 39 – 40.
- [20] Gurtler V , Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S – 23S rDNA spacer region. *Microbiology* , 1996 , **142** : 3 – 16.
- [21] Saitou N , Nei M. The neighbour-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* , 1987 , **4** : 406 – 425.
- [22] Johnson JL , Palleroni NJ. Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *Int J Syst Bacteriol* , 1989 , **39** : 230 – 235.

Isolation and characterization of a new *Pseudomonas* strain against *Phytophthora capsici*

HE Yan-jing , LIU Hai-ming , HU Hong-bo , XU Yu-quan , ZHANG Xue-hong*

(School of Life Science & Biotechnology , Shanghai Jiaotong University , Shanghai 200240 , China)

Abstract : One *Pseudomonas* strain GP72 , which was against *Phytophthora capsici* , was isolated from green pepper rhizosphere in Jiangsu province. It had distinctively inhibitive effect on several kinds of pathogenic fungi ; mostly of them are soilborne pathogens. Therefore , this strain may be used for an effective biocontrol strain in the crop protection. The morphological , biochemical and physiological characteristics , Biolog GN , G + C mol% content and 16S rDNA sequence analysis of this strain were studied. In comparison and conclusion of all the experimental data , GP72 is identified as *Pseudomonas chlororaphis*. The strain is single-cellular and motile by means of single polar flagellum. It was not able to accumulate ploy- β -hydroxybutyrate. Compared to *P. aureofaciens* 30-84 , the strain was able to survive at the concentration of 5% NaCl. It could strongly utilize 45 of 95 carbon-substrates ; weakly utilize 6 of the whole carbon-substrates and never utilize 43 of the whole carbon-substrates resulting from analysis of Biolog GN , bearing the similarity probability of 98% with *Pseudomonas chlororaphis* and with the similarity index 0.72. The G + C content of the strain DNA was 65.1 mol% using the thermal denaturation method. A phylogenetic tree was constructed by comparing with the validly published 16S rDNA sequences of the related type strains from GenBank , using the Neighbor-Joining method of Saitou and Nei and the Clustal X program to do the multiple alignments. The tree topology was tested by a bootstrap analysis of 1000 samplings. The overall similarity value between strain GP72 and typical is the closest in the phylogenetic tree. For the latest taxonomical development has put genus *Pseudomonas aureofaciens* to the genus *Pseudomonas chlororaphis* , then it is appropriate to say that GP72 belongs to the genus *Pseudomonas chlororaphis*. This is the first time in China to report that a strain of *Pseudomonas chlororaphis* was isolated from green pepper rhizosphere , having a strong inhibitive effect on *Phytophthora capsici* and other soilborne pathogenic fungus. The other characteristics and the biocontrol mechanism are yet to be further studied.

Keywords : *Pseudomonas* spp. ; GP72 ; Identification ; Biolog GN ; 16S rDNA