

番木瓜炭疽病生防细菌 J-11 的筛选鉴定及其防控作用研究

吴天利^{1,2,3}, 许汝梅¹, 欧丽琼¹, 龚淇靖¹, 黄梦雪¹, 赵苗羽¹, 周艳^{1,2,3},
张鸿雁^{1,2,3}, 刘锴栋^{1,2,3*}

1. 岭南师范学院生命科学与技术学院, 广东湛江 524048; 2. 广东省热带特色资源植物开发工程技术研究中心, 广东湛江 524048; 3. 广东省热带特色资源植物科技创新中心, 广东湛江 524048

摘要: 由番木瓜胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 引起的炭疽病在番木瓜采后储藏期间大发生, 对番木瓜果实品质和产量造成重大影响。本研究从番木瓜根际土壤中筛选到胶孢炭疽菌的优良拮抗菌 J-11, 并探究其拮抗特性和防控炭疽病的能力。生防细菌 J-11 的大小约为 $1.5\ \mu\text{m}\times 3.3\ \mu\text{m}$ (生长 3 d), 呈革兰氏阳性 (G^+), 杆状或卵圆形, 常见单个排列, 其形态特征与贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 一致; 菌株 J-11 的 *16S rRNA*、*gyrA* 和 *gyrB* 序列与贝莱斯芽孢杆菌模式菌株 OOT-47 对应基因的序列一致性分别为 99.28%、97.57% 和 98.79%。系统发育树分析结果表明, 供试菌株 J-11 与贝莱斯芽孢杆菌 LB4 单独聚为一支。根据形态学、分子生物学以及理化分析结果, 明确广东省湛江地区番木瓜胶孢炭疽菌的拮抗微生物为贝莱斯芽孢杆菌。菌株 J-11 具有广谱的抑菌能力, 可抑制胶孢炭疽菌、暹罗炭疽菌 (*C. siamense*)、葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 3 种病原真菌的生长, 其拮抗指数分别为 0.48、0.41、0.40。防治试验表明, 菌株 J-11 对番木瓜叶片中胶孢炭疽菌的抑菌率为 89.96%, 对番木瓜离体果实上胶孢炭疽菌的抑菌率达 84.92%。本研究分离筛选获得的贝莱斯芽孢杆菌 J-11 对番木瓜炭疽病具有一定的防治效果, 可为深入研究植物生防菌抑菌机理提供理论依据, 为其开发利用奠定菌种资源基础。

关键词: 番木瓜; 炭疽病; 拮抗细菌; 采后病害; 抑菌率

中图分类号: S436.67 文献标志码: A

Screening, Identification and Control Effects of Biocontrol Bacterium J-11 Against Papaya Anthracnose

WU Tianli^{1,2,3}, XU Rumei¹, OU Liqiong¹, GONG Qijing¹, HUANG Mengxue¹, ZHAO Miaoyu¹,
ZHOU Yan^{1,2,3}, ZHANG Hongyan^{1,2,3}, LIU Kaidong^{1,2,3*}

1. School of Life Science and Technology, Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China; 2. Guangdong Engineering Technology Research Center of Tropical Characteristic Plant Resource Development, Zhanjiang, Guangdong 524048, China; 3. Guangdong Technology Innovation Center of Tropical Characteristic Plant Resource Development, Zhanjiang, Guangdong 524048, China

Abstract: Anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* occurs extensively during the post-harvest storage of papaya (*Carica papaya* L.), significantly affecting fruit quality and yield. In this study, the excellent antagonistic bacteria J-11 against *C. gloeosporioides* were screened from the rhizosphere soil of papaya, and the antagonistic characteristics and biological control ability were explored. The size of biocontrol bacterium J-11 was about $1.5\ \mu\text{m}\times 3.3\ \mu\text{m}$ (growing for 3 d), Gram-positive (G^+), rod-shaped or oval, common single arrangement, and its morphological characteristics were consistent with *Bacillus velezensis*. The sequences of *16S rRNA*, *gyrA* and *gyrB* genes of strain J-11 were 99.28%, 97.57% and 98.79% consistent with those of *B. velezensis* model strain OOT-47, respectively. Phylogenetic tree analysis

收稿日期 2025-04-07; 接受日期 2025-05-14

基金项目 广东省基础与应用基础研究基金项目 (No. 2022A151511183); 广东省科技创新战略专项资金 (科技支撑“百千万工程”) 项目 (No. 2024E03005); 2024 年广东农技服务轻骑兵重大农业技术乡村行推广项目。

作者简介 吴天利 (1988—), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 番木瓜抗病育种。*通信作者 (Corresponding author): 刘锴栋 (LIU Kaidong), E-mail: liukaidong2001@126.com。

showed that the tested strain J-11 and *Bacillus velezensis* LB4 were clustered into one branch. According to the results of morphological, molecular biological and physicochemical analysis, it was confirmed that the microbial antagonistic pathogen of papaya *C. gloeosporioides* in Zhanjiang area of Guangdong was *B. velezensis*. Strain J-11 demonstrated a broad-spectrum antifungal ability, inhibiting the growth of three pathogenic fungi of *C. gloeosporioides*, *C. siamense* and *Botryosphaeria dothidea*, with antagonism indices of 0.48, 0.41 and 0.40, respectively. The control testing showed that the inhibition rate of strain J-11 against the *C. gloeosporioides* on papaya leaves was 89.96%, and the inhibition rate of strain J-11 against the *C. gloeosporioides* on papaya fruits *in vitro* was 84.92%. Strain J-11 screened in this study has a certain control effect on papaya anthracnose, which could provide a theoretical basis for in-depth study of the antibacterial mechanism of plant biocontrol bacteria and will lay a foundation for its development and utilization.

Keywords: *Carica papaya* L.; anthracnose; antagonistic bacteria; postharvest diseases; antibacterial rate

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.09.014

番木瓜炭疽病 (papaya anthracnose) 是由炭疽菌属 (*Colletotrichum* spp.) 真菌引起的病害, 被认为是番木瓜主要的采后病害之一。据统计, 炭疽菌导致的番木瓜采后炭疽病在我国广东、海南、广西、福建、台湾等地发生严重。炭疽菌被列为全球第八大植物病原真菌, 其菌系复杂, 寄主范围广泛, 常危害果树的根、茎、叶、花、果实和幼苗, 可导致植株枯萎、果实腐烂、叶片病斑等症状, 造成严重经济损失^[1]。现已在番木瓜果实上发现至少 12 种致病炭疽菌及多种复合种炭疽菌, 严重影响世界各国番木瓜果实品质和产量。目前, 番木瓜炭疽病的防治策略主要是抗性番木瓜品种筛选, 但抗病育种过程复杂、耗时长, 极大消耗时间成本。其次是植物源活性物质的应用, 如用 1% 及以上浓度的壳聚糖涂膜液处理可有效抑制孢子萌发^[2]; 从薄荷、百里香、肉桂、薄荷和薰衣草植物中提取的 5 种不同植物精油对炭疽病引起的番木瓜果实腐烂具有抑制作用^[3]; 麻疯树果实提取液对番木瓜炭疽菌有抑制作用^[4]。但是绝大多数植物源抑菌剂产品处于试验研究阶段, 生产工艺不成熟, 尚不能形成规模化推广应用。此外, 低毒化学农药的喷施也是目前最主要的依赖方法, 但往往造成环境污染、病原菌耐药性增加等问题。因此, 生物防治成为当前炭疽病防治的研究热点。

国内外有关番木瓜炭疽病生物防治的报道越来越多, 作为抵御炭疽菌侵染的拮抗微生物研究主要集中在芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 等。贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) 属于芽孢杆菌属的一个新种, 广泛分布于自然界的土壤、空气、植物根系和植株表面等^[5]。贝莱斯芽孢杆菌在抑制病原菌和生物防治方面效果显著, 如贝莱斯芽孢杆菌 F85 可有效抑

制烟草炭疽菌 (*C. fructicola*) 菌丝的生长, 同时抑制炭疽菌分生孢子的萌发^[6]; 贝莱斯芽孢杆菌 CE100 对尖孢炭疽菌 (*C. acutatum*)、球炭疽菌 (*C. coccodes*)、束状炭疽菌 (*C. dematium*) 和胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) 具有较强的拮抗作用, 其挥发性有机物使炭疽菌菌丝结构发生扭曲, 代谢物还可抑制分生孢子的萌发^[7]; 贝莱斯芽孢杆菌 A4 对樱桃番茄的采后重要致病菌青霉菌 (*Penicillium expansum*) 和灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 的菌丝生长均有抑制效果, 能延长采后樱桃番茄果实的贮藏期^[8]; 贝莱斯芽孢杆菌 JS25R 对赤霉病病原菌禾谷镰刀菌 J07 有抑制作用, 且在温室中对小麦赤霉病有较好的防治效果^[9]。因此, 贝莱斯芽孢杆菌作为生防菌对真菌性病原菌的防治具有广阔的应用前景。目前关于贝莱斯芽孢杆菌对病原菌的抑制作用的研究大多停留在小型草本植物、灌木或少部分果树上^[10], 对番木瓜这类软木质的大型草本果树病害防控的研究还很少, 且对其抗病机理的探究不够全面。因此, 筛选高效的贝莱斯芽孢杆菌拮抗菌株, 研制新的生防菌剂并投入番木瓜炭疽病的生物防控应用是十分必要的。

本研究拟以番木瓜胶孢炭疽菌为靶病原菌, 从番木瓜根围土壤中分离筛选出的 1 株拮抗菌 J-11 为试验对象, 测定拮抗菌对胶孢炭疽菌的拮抗能力, 并以番木瓜叶片和采后果实进行抑菌效果试验, 以探究拮抗菌对番木瓜胶孢炭疽菌的抑菌效果, 为深入研究该拮抗菌的作用机理, 以及后续定向筛选植物生防病菌提供一定的研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试番木瓜 (*Carica papaya*)

L.) 实生苗品种为大青品种, 购自广东省湛江市坡头区坡头镇番木瓜育苗圃。选取生长 2 个月, 生长健壮、无病虫害、长势基本一致的大青实生苗为样株。供试番木瓜果实也为大青品种, 购自广东省湛江市坡头区坡头镇番木瓜果园。选取形状、大小、外观颜色相对一致, 无机械损伤、无病虫害, 成熟度为七八分熟的番木瓜果实为试验材料。

1.1.2 供试菌株 葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*) BD1、暹罗炭疽菌 (*Colletotrichum siamense*) ZJ01、胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) T3 由岭南师范学院植物病虫害实验室分离保存。供试拮抗菌为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) J-11, 从感染炭疽病的番木瓜根围土壤中分离获得。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌株 J-11 的分离与鉴定 从根围土壤分离细菌, 于 37 °C 恒温培养 24 h 后, 挑取不同形态的细菌单菌落多次划线纯化, 并于 -80 °C 保存, 备用。

(1) 形态特征鉴定。拮抗菌 J-11 在马铃薯葡萄糖培养基 (PDA) 上培养长出单菌落后, 用无菌接种环刮取少量菌落至装有 100 μ L 无菌水的离心管中, 用移液枪反复吹打混匀, 制成 10^0 菌液。然后用移液枪吸取 10 μ L 菌液移入含 90 μ L 无菌水的离心管中, 混合均匀制备成 10^1 倍稀释液; 以此类推, 连续稀释 5 次, 制成 10^5 倍稀释液。依据涂布平板法, 用移液枪吸取 20 μ L 拮抗菌 J-11 菌液至 PDA 培养基表面, 用无菌涂布器将菌液涂抹均匀, 再将平板倒置于 28 °C 恒温恒湿箱中培养 24 h, 观察记录单菌落形态, 并拍照保存。使用革兰氏染色试剂盒 (广东环凯微生物科技有限公司, 中国) 对 J-11 菌株的单菌落进行染色。参照《伯杰细菌鉴定手册》^[11] 对拮抗菌进行初步鉴定。

(2) 分子生物学鉴定。采用 DNA 快速抽提试剂盒提取拮抗菌的 DNA, 分别用引物对 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') / 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'), p-gyrA-r (5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3') / p-gyrA-f (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3'), gyrB-F (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCT-3') / gyrB-R (5'-ACCACTTTATGATAACGCGC-3') 对

J-11 的 16S rDNA、gyrA、gyrB 基因序列进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (25 μ L): 模板 1.5 μ L, 正向和反向引物各 1.5 μ L, Taq 酶 12.5 μ L, 水 8.0 μ L。PCR 扩增程序: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共设 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 终止反应。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经电泳检测呈阳性的 PCR 产物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 测序结果在 NCBI 上进行 Blast 序列对比分析, 并结合数据库中的同源序列, 下载 Blast 比对结果一致性高的菌株及其近缘种代表性菌株的序列 (表 1); 利用 SnapGene 分析目的基因序列, 拼接序列后进行多重序列比较分析; 最后使用 Mega 11.0 软件中的最大似然法构建系统发育树。

1.2.2 平板对峙试验 采用平板对峙法检测拮抗菌 J-11 的抑菌活性。待活化的炭疽菌菌丝长满 PDA 平板后, 取直径为 5 mm 的菌块接种于新的 PDA 平板中央, 以炭疽菌为圆心, 十字交叉在距离培养基边缘 1.5 cm 处等距离接种拮抗菌 J-11, 以不接拮抗菌的 PDA 作对照组, 倒置于 28 °C 的恒温恒湿箱中培养 4 d。在第 4 天时测量抑菌圈半径和拮抗菌半径, 计算拮抗指数^[12]。抑菌圈半径为拮抗菌菌饼中心到番木瓜病原菌菌丝边缘的距离。拮抗指数=(抑菌圈半径 - 拮抗菌半径)/拮抗菌半径。

1.2.3 拮抗菌株 J-11 对炭疽菌的防治效果 (1) 对番木瓜叶片中胶孢炭疽菌的抑菌效果。选取长势和健康状态基本一致的番木瓜实生苗为试验对象, 每株实生苗选取 3 片位置相似的叶片, 利用 75% 酒精消毒后用接种针在叶片上呈倒三角形刺 3 个 1 mm 大小的伤口。将 J-11 拮抗菌制备成 OD₆₀₀ 为 1.5 的拮抗菌悬浮液。同时, 制备 OD₆₀₀ 为 1.5 的番木瓜炭疽菌孢子悬浮液。孢子悬浮液的制备, 采用无菌接种环小心刮取病原菌菌体接种于 100 mL PDB 中, 置于 28 °C、180 r/min 的恒温振荡器中培养 24~36 h。随后用无菌纱布过滤菌丝至 200 mL 的产孢培养基中, 相同条件下继续培养 36 h 获得孢子液。将拮抗菌悬浮液与炭疽菌孢子液按照 1:1 体积比混合后接种于番木瓜叶片, 以无菌水作为对照。设置 3 次重复, 在第 2、4、8、10、12 天时拍照。使用 Image J 软件测量叶片病斑直径并记录数据, 计算抑菌率^[13]。抑菌率=(对照组病原菌直径 - 处理组病原菌直径)/对照

表 1 本研究中的参考菌株及其 GenBank 登录号

Tab. 1 Reference isolates used in this study and their GenBank accession numbers

种类 Species	菌株 Strain	GenBank 登录号 GenBank accession No.		
		gyrA	gyrB	16S rRNA
贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i>)	BGS21	OR134737.1	OR501062.1	OR016129.1
贝莱斯芽孢杆菌 (<i>B. velezensis</i>)	E-17	PP085430.1	PQ152015.1	PQ072335.1
贝莱斯芽孢杆菌 (<i>B. velezensis</i>)	LB4	OR966879.1	OR966880.1	OR958734.1
解淀粉芽孢杆菌 (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	AS1.398	KM667968.1	KM654297.1	KM654296.1
解淀粉芽孢杆菌 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	ATCC15841	FN662838.1	DQ309310.1	AY055226.1
解淀粉芽孢杆菌 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	BJ-6	MN295596.1	MN295597.1	MN272328.1
解淀粉芽孢杆菌 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	CICC 10063	KM667970.1	KM596840.1	KM596837.1
解淀粉芽孢杆菌 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	CICC 10160	KM667969.1	KM596842.1	KM596839.1
解淀粉芽孢杆菌 (<i>B. amyloliquefaciens</i>)	XKPY2	OQ659399.1	OQ659396.1	OP324656.1
萎缩芽孢杆菌 (<i>B. atrophaeus</i>)	QH-588	MW401272.1	MW401276.1	MW380650.1
芽孢杆菌 (<i>B. inaquosus</i>)	NRRL B-23052	EU138605.1	HQ605914.1	NR_116188.1
高地芽孢杆菌 (<i>B. altitudinis</i>)	J1	OQ408169.1	OQ408194.1	OQ382865.1
大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)	K-12 substrain MG1655	NC_000913.3	CP097883.1	CP097884.1

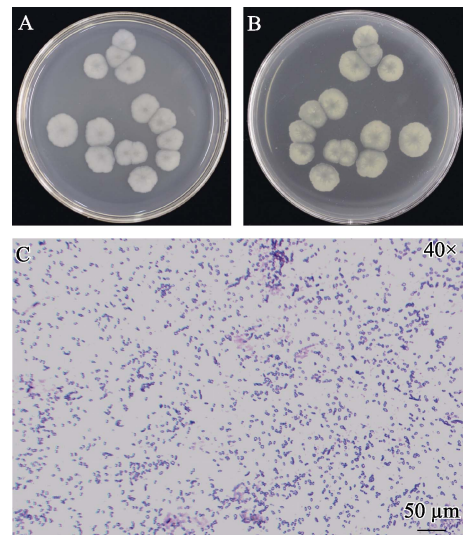
组病原菌直径 $\times 100\%$ 。使用 GraphPad Prism 8 软件进行显著性分析和作图，筛选出对番木瓜叶片抑菌效果最好且稳定的优势拮抗菌。

(2) 对采后番木瓜果实炭疽菌的抑菌效果。番木瓜果实用 75%酒精消毒 2~3 min，利用灭菌接种针在果实同一平面上呈“口”字形刺 4 个伤口，伤口横向间距为 4.5 cm，纵向间距为 5.5 cm。在接菌前，用无菌纸擦拭干净伤口处溢出的番木瓜汁液。将筛选到的拮抗菌 J-11 制备成 OD₆₀₀ 为 2.5 的拮抗菌悬浮液，同时制备 OD₆₀₀ 为 2.5 的番木瓜炭疽菌 T3 的孢子悬浮液。将拮抗菌悬浮液与炭疽菌孢子等比例接种于离体番木瓜果实刺伤部位，以无菌水作为对照组。设置 3 次重复。在第 0、2、4、6、8、10、12 天拍照，并使用 Image J 软件测量番木瓜果实刺伤部位病斑直径并记录数据，计算抑菌率。数据分析同 1.2.3-(1)。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌 J-11 的鉴定

2.1.1 形态学鉴定 通过稀释涂布平板法将 J-11 涂布在 PDA 培养基平板上，28 °C 培养 2 d 获得单菌落。形态学观察显示，J-11 的单个菌落在 PDA 培养基上呈白色、扁平、蜡质、不透明，表面光滑，菌落边缘不规则，近圆形，中心有白色凹陷，中心点周围隆起 (图 1A, 图 1B)，革兰氏染色呈阳性 (图 1C)。生理生化特性表明，J-11 对盐有一定的耐受性。根据 J-11 菌落形态特征，初步鉴



A: 培养基正面; B: 培养基背面; C: 革兰氏染色。

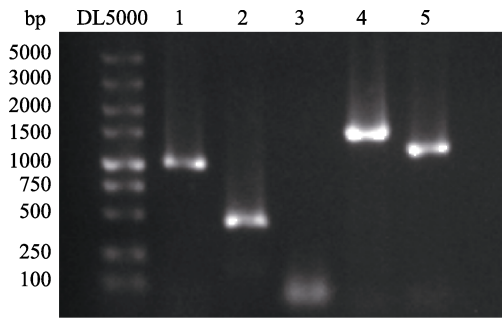
A: Front of the culture medium; B: Back of the culture medium; C: Gram stain test.

图 1 番木瓜根际土壤中拮抗细菌 J-11 的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of antagonistic strain J-11 in the rhizosphere soil of papaya

定其为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。

2.1.2 分子生物学鉴定 PCR 扩增结果显示，使用 *gyrA*、*gyrB* 和 *16S rRNA* 基因引物扩增 J-11 的片段大小分别约为 1000、1200、1500 bp (图 2)。通过 NCBI 数据库进行 Blast 同源性比对，结合数据库中的同源序列构建系统发育树，发现基于 *gyrA-gyrB-16S rRNA* 序列构建的进化树中 J-11 菌株与贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis* LB4) 位于同一分支上，序列相似度达 95% (图 3)。根



1、4、5 分别为引物对 p-gyrA-r/f、F27/R1541 和 gyrB-F/R 扩增拮抗菌的 PCR 扩增产物;2 和 3 分别为引物对 V3-V4 illuminaF/R 和 gyrB-UP1F/UP2SR 扩增拮抗菌 *16S rDNA* 和 *gyrB* 基因序列的 PCR 扩增产物。

1, 4 and 5 were PCR amplification products of antagonistic bacteria with primers of p-gyrA-r/f, F27/R1541 and gyrB-F/R, respectively; 2 and 3 were PCR amplified products of the *16S rDNA* and *gyrB* gene sequences of antagonistic bacteria by V3-V4 illuminaF/R and gyrB-UP1F/UP2SR primers, respectively.

图 2 拮抗菌 J-11 的 PCR 扩增结果

Fig. 2 PCR amplification results of antagonistic strain J-11

据形态学和分子生物学分析, 最终确定 J-11 为贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*)。

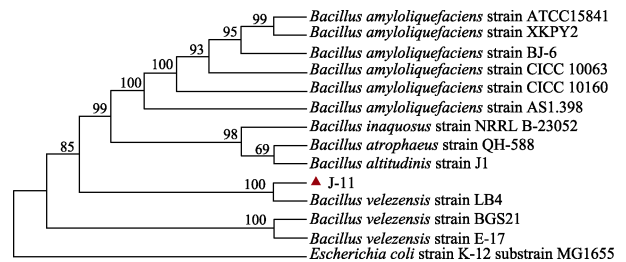
2.2 拮抗菌 J-11 对 3 种病原真菌的拮抗作用

平板对峙实验结果 (图 4) 显示, 拮抗菌 J-11 对 3 种真菌有不同程度的抑制作用, 形成大小不同的抑菌圈, 且形成抑菌圈后继续培养 10 d 抑菌

圈大小不变。其中 J-11 对葡萄座腔菌的抑菌圈半径为 1.23 cm, 对应的拮抗指数为 0.40; J-11 对暹罗炭疽菌的抑菌圈半径为 1.28 cm, 对应的拮抗指数为 0.41; J-11 对胶孢炭疽菌的抑菌圈半径为 1.52 cm, 对应的拮抗指数为 0.48 (表 2)。结果表明, J-11 具有一定的抑菌能力, 且抑菌性能稳定。

2.3 拮抗菌对番木瓜苗叶片炭疽菌的抑菌效果

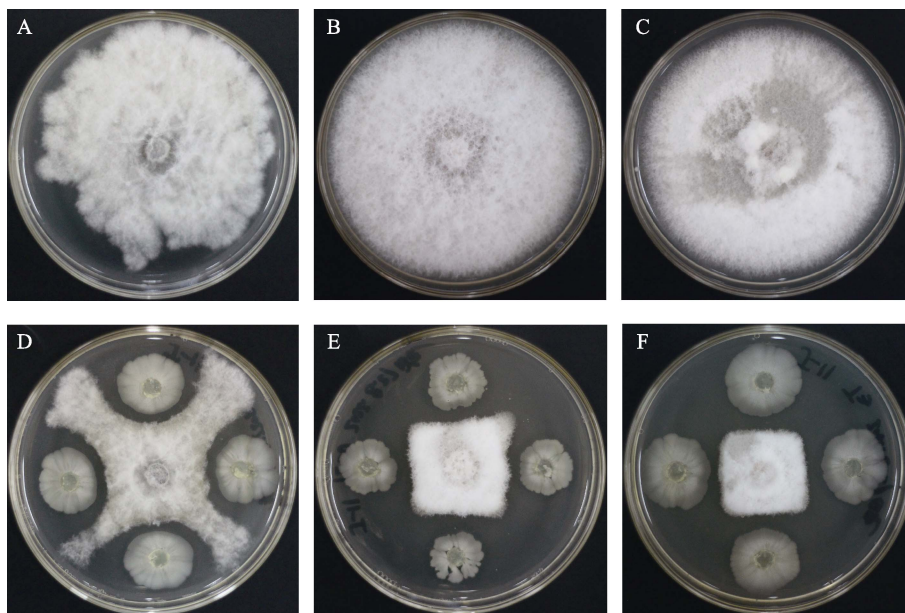
番木瓜活体叶片抑菌结果如图 5 所示, 胶孢炭疽菌 T3 感染番木瓜叶片后, 感染部位出现变黄变干的现象, 随着感染时间的延长, 感染部位呈



以大肠杆菌菌株 K-12 substrain MG1655 作为进化树的外群。E. coli strain K-12 substrain MG1655 was used as the outgroup of the phylogenetic tree.

图 3 拮抗菌 J-11 基于 *gyrA*、*gyrB* 和 *16S rRNA* 基因序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of antagonistic strain J-11 based on *gyrA*, *gyrB* and *16S rRNA* gene sequence



A: 葡萄座腔菌 BD1; B: 暹罗炭疽菌 ZJ01; C: 胶孢炭疽菌 T3; D: 葡萄座腔菌 BD1+J-11; E: 暹罗炭疽菌 ZJ01+J-11; F: 胶孢炭疽菌 T3+J-11
A: *B. dothidea* BD1; B: *C. siamense* ZJ01; C: *C. gloeosporioides* T3; D: *B. dothidea* BD1+J-11; E: *C. siamense* ZJ01+J-11; F: *C. gloeosporioides* T3+J-11.

图 4 拮抗菌 J-11 与番木瓜病原菌的对峙试验

Fig. 4 Confrontation experiment between antagonistic strain J-11 and papaya pathogen

表 2 贝莱斯芽孢杆菌 J-11 对病原菌的抑制作用

Tab. 2 Inhibitory effect of *B. velezensis* J-11 on pathogenic bacteria

菌种 Stain	抑菌圈半径 Inhibition zone radius/cm	生防菌半径 Radius of biocontrol bacteria/cm	拮抗指数 Antagonistic index	病原菌的生长半径 Growth radius of the pathogen/cm	病原菌的抑制生长半径 Inhibition growth radius of pathogenic bacteria/cm	抑制百分率 Inhibition percentage
J-11+葡萄座腔菌 BD1	1.23±0.13 ^b	0.83±0.10 ^b	0.40±0.14 ^a	2.47±0.06 ^a	1.27±0.06 ^a	0.49±0.30 ^a
J-11+暹罗炭疽菌 ZJ01	1.28±0.08 ^{ab}	0.91±0.10 ^{ab}	0.41±0.08 ^a	2.70±0.00 ^b	1.43±0.10 ^{ab}	0.47±0.14 ^b
J-11+胶孢炭疽菌 T3	1.52±0.06 ^a	1.09±0.06 ^a	0.48±0.03 ^a	3.93±0.12 ^c	1.60±0.06 ^c	0.59±0.15 ^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 ($P < 0.05$).

水渍状扩散，逐渐干枯腐烂，同时被感染的叶片易从番木瓜植株上调落。T3+J-11 孢子液混合感染的感病速度较慢，在接菌 12 d 后伤口周围泛黄，接种炭疽菌 T3 的对照组病斑平均直径为 3.05 cm，而 T3+J-11 处理组病斑平均直径为 0.31 cm (图 6)，通过计算得出 J-11 对炭疽菌 T3 的抑菌率为 89.96%。结果表明拮抗菌 J-11 显著抑制炭疽菌 T3 病原菌的感染，且抑菌效果明显。

2.4 拮抗菌对采后番木瓜果实炭疽菌的抑菌效果

采后番木瓜果实抑菌试验结果 (图 7) 显示，胶孢炭疽菌 T3 感染番木瓜果实较叶片更具危害性，在无拮抗菌处理的条件下，炭疽菌感染离体番木瓜果实后，感染部位出现黄色或暗褐色的水渍状小斑点，随着病斑逐渐扩大，病斑中间凹陷，之后长出白色菌丝覆盖在果肉接种孔处。随着菌丝的生长，感染部位开始迅速蔓延，造成整个番木瓜果实大面积感染。J-11 菌悬液与炭疽菌 T3 孢子悬液混合感染的番木瓜果实，在早期时伤口处变黑，出现轻微凹陷的水渍样症状，但是感染速度明显减缓。接菌第 12 天时，T3 病原菌处理

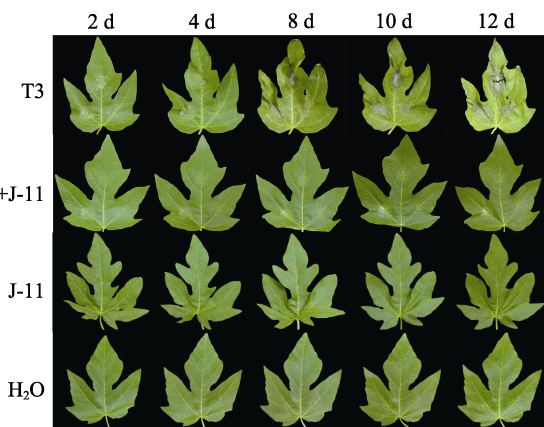
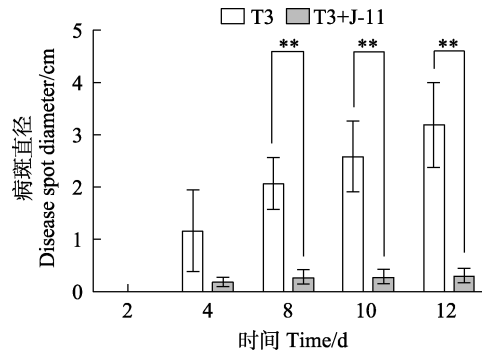


图 5 拮抗菌 J-11 对番木瓜苗叶片炭疽菌 T3 的抑菌效果
Fig. 5 Antibacterial effect of strain J-11 against *C. gloeosporioides* T3 on papaya seedling leaves



**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 6 拮抗菌 J-11 对番木瓜幼苗叶片炭疽菌 T3 的抑菌活性

Fig. 6 Inhibitory activity of strain J-11 against *C. gloeosporioides* T3 on papaya seedling leaves

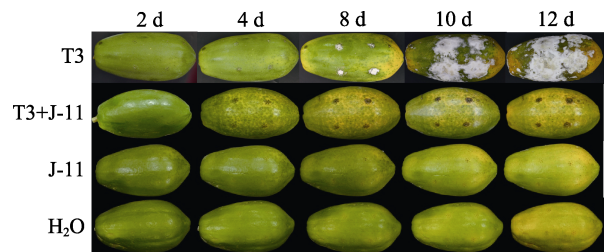


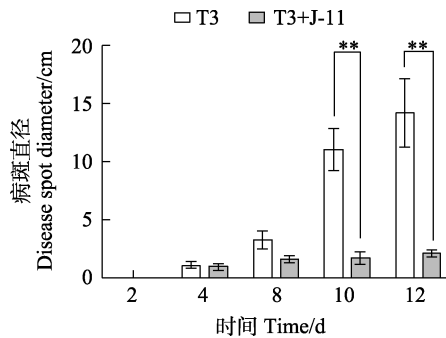
图 7 拮抗菌 J-11 在离体番木瓜上对病原菌 T3 的抑菌效果

Fig. 7 Antibacterial effect of strain J-11 on pathogenic bacteria T3 on isolated papaya

的病斑平均直径为 15.01 cm, T3+J-11 处理的病斑直径为 2.23 cm (图 8)，经过计算得出 J-11 对炭疽菌 T3 的抑菌率达 84.92%，表明 J-11 对炭疽菌 T3 具有明显的抑制作用。

3 讨论

土壤中存在许多有益微生物，尤其是芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.)，可作为抑制植物病害的生防资源来源，已被用作生物防治剂以直接控制多种农作物的病害。贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) 是芽孢杆菌属的一种，可作为有效的抗真菌剂对



**表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

** indicates extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 8 拮抗菌 J-11 对采后番木瓜果实炭疽菌 T3 的抑菌活性

Fig. 8 Inhibitory activity of strain J-11 against *C. gloeosporioides* T3 in postharvest papaya fruit

抗多种植物病原真菌, 包括灰霉菌 (*Botrytis cinerea*)^[14]、拟轮枝镰孢菌 (*Fusarium verticillioides*)、尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*)^[15]、茄孢菌 (*F. solani*)^[16]、稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)^[17]、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*)^[15]、青霉菌 (*Penicillium expansum*)^[8]、禾谷镰刀菌 (*F. graminearum*)^[9]等。炭疽病菌被列为全球第八大植物病原真菌, 其在科学研究和经济上十分重要^[18]。尽管过去数年来, 人们对芽孢杆菌在多种病害生物防治方面的应用进行了广泛研究, 但对防治炭疽病的芽孢杆菌的筛选及其生防机制的研究很大程度上仍是未知的, 尤其是贝莱斯芽孢杆菌在防治炭疽病方面尚无报道。本研究从番木瓜根围土壤中分离筛选获得 1 株拮抗菌 J-11, 通过形态学和分子生物学分析, 确定该菌株为贝莱斯芽孢杆菌。J-11 能一定程度防治番木瓜炭疽病, 弥补了目前国内贝莱斯芽孢杆菌在防治番木瓜炭疽病方面的空白。数据显示, 贝莱斯芽孢杆菌 J-11 在 PDA 培养基上对暹罗炭疽菌的拮抗活性比对胶孢炭疽菌的拮抗活性更高, 但是活体防治炭疽病的效果却相反。之前也有类似的报道, 徐欣韵等^[19]发现相对平板拮抗活性较低的 B23 拮抗菌表现出显著防治番茄青枯病的能力。

芽孢杆菌属的抑菌机制多种。芽孢杆菌属能够合成多种次级代谢产物直接抑制植物病原菌, 包括抗菌肽 AMPs (细菌素、脂肽)、聚酮化合物、裂解酶、胞外多糖和挥发性物质等^[20]。例如, 贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 产生的抗菌化合物艰难梭菌素 (difficidin) 和杆菌素 (bacilysin) 对水稻黄单胞菌稻生致病变种 (*Xanthomonas oryzae* pv.

oryzae) 引起的水稻细菌性叶枯病具有优异的生物防治效果, 显著下调了与病原菌毒力、细胞分裂和细胞壁/蛋白质合成相关基因的表达^[21]。许多病害的生物防效还与芽孢杆菌在根部的定殖能力呈正相关。具体而言, 芽孢杆菌通常以细胞聚集体的形式定殖于植物根系, 这些聚集体嵌入在细胞外基质中, 被称为生物膜^[22]。芽孢杆菌在根系上形成生物膜有助于与植物病原菌进行空间竞争并抑制病害^[20]。例如, B23 拮抗菌能迅速定殖在植物根部并提高番茄抵御青枯菌入侵的能力^[23]。某些芽孢杆菌菌株与植物根系的相互作用可以通过引发诱导性系统抗性 (induced systemic resistance, ISR) 来触发宿主防御, 其中接种有益细菌可以增强整株植物对致病细菌、真菌和病毒的抵抗力^[24]。例如, 贝莱斯芽孢杆菌 SQR9 在拟南芥叶片抵抗灰霉菌感染中发挥了重要的 ISR 介导的保护作用^[20]。本研究从番木瓜根围土壤中分离筛选获得贝莱斯芽孢杆菌 J-11。平板对峙试验明确菌株 J-11 显著抑制番木瓜葡萄座腔菌、暹罗炭疽菌和胶孢炭疽菌 3 种病原真菌的菌丝生长。结合番木瓜实生苗叶片接菌以及番木瓜离体果实接菌试验结果, 表明 J-11 对番木瓜炭疽菌有较好的抑菌效果。在接菌 12 d 时 J-11 对叶片和果实中炭疽菌的抑菌率分别达到 89.96% 和 84.92%。说明贝莱斯芽孢杆菌 J-11 在防治番木瓜炭疽病中具有很好的抑菌效果。本研究首次描述了贝莱斯芽孢杆菌 J-11 抑制采后番木瓜储存期间炭疽菌菌丝生长, 但 J-11 具体的抑菌机制还有待进一步研究。

综上所述, 本研究结果凸显了贝莱斯芽孢杆菌 J-11 作为番木瓜炭疽病生物防治剂的潜力和应用价值。研究表明 J-11 对番木瓜炭疽菌有初步的抑制作用, 但其具体有效抑菌成分、作用机制以及田间的应用效果有待进一步探究。因此, 后期在此基础上深入研究贝莱斯芽孢杆菌 J-11 的拮抗作用机理、活性物质等方面具有现实意义, 为研究番木瓜采后炭疽病的防治提供一定的理论参考。

参考文献

- [1] 刘丽萍, 高洁, 李玉. 植物炭疽菌属 *Colletotrichum* 真菌研究进展[J]. 菌物研究, 2020, 18(4): 266-281.
- LIU L P, GAO J, LI Y. Advances in knowledge of the fungi referred to the genus *Colletotrichum*[J]. Journal of Fungal

- Research, 2020, 18(4): 266-281. (in Chinese)
- [2] HEWAJULIGE I G N, SULTANBAWA Y, WILSON WIJERATNAM R S, WIJESUNDARA R L C. Mode of action of chitosan coating on anthracnose disease control in papaya[J]. *Phytoparasitica*, 2009, 37: 437-444.
- [3] SARKHOSH A, SCHAFFER B, VARGAS A I, PALMATEER A J, LOPEZ P, SOLEYMANI A, FARZANEH M. Antifungal activity of five plant-extracted essential oils against anthracnose in papaya fruit[J]. *Biological Agriculture & Horticulture*, 2018, 34(1): 18-26.
- [4] RAHMAN M, AHMAD S H, MAHMUD M T M, RAHMAN M Z A. Extraction of *Jatropha curcas* fruits for antifungal activity against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of papaya[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(48): 9796-9799.
- [5] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3634-3649.
- ZHANG D F, GAO Y X, WANG Y J, LIU C, SHI C B. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3634-3649. (in Chinese)
- [6] 刘涵斐, 徐婷婷, 李锡宏, 邱梦娟, 张艺千, 郑露, 黄俊斌, 黎妍妍. 贝莱斯芽孢杆菌 F85 对烟草炭疽病的生防作用研究[J]. *中国烟草科学*, 2023, 44(3): 47-52.
- LIU H F, XU T T, LI X H, QIU M J, ZHANG Y Q, ZHENG L, HUANG J B, LI Y Y. Study on the biocontrol effect of *Bacillus velezensis* F85 against tobacco anthracnose[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2023, 44(3): 47-52. (in Chinese)
- [7] KIM T Y, HWANG S H, NOH J S, CHO J Y, MAUNG C E H. Antifungal potential of *Bacillus velezensis* CE 100 for the control of different *Colletotrichum* species through isolation of active dipeptide, Cyclo-(D-phenylalanyl-D-prolyl)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(14): 7786.
- [8] 赵焕兰, 曹嘉灿, 管媛媛, 张苑珩, 刘雯鑫, 苗敏. 生防菌 A4 的鉴定及其对樱桃番茄采后主要病害的抑制作用[J]. *保鲜与加工*, 2022, 22(4): 82-89.
- ZHAO H L, CAO J C, GUAN Y Y, ZHANG Y H, LIU W X, MIAO M. Identification of biocontrol strain A4 and the inhibitory effects on main postharvest diseases of cherry tomato[J]. *Storage and Process*, 2022, 22(4): 82-89. (in Chinese)
- [9] 宗英, 赵月菊, 刘阳, 杨庆利. 一株贝莱斯芽孢杆菌抑制禾谷镰刀菌的研究[J]. *核农学报*, 2018, 32(2): 310-317.
- ZONG Y, ZHAO Y J, LIU Y, YANG Q L. Study on the inhibitory effect of *Bacillus velezensis* on *Fusarium graminearum*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(2): 310-317. (in Chinese)
- [10] 皮娜娜, 王玺茜, 罗建军, 翁群芳. 贝莱斯芽孢杆菌防控植物病害的研究进展[J]. *广东农业科学*, 2024, 51(6): 48-59.
- PI N N, WANG X Q, LUO J J, WENG Q F. Research progress on the prevention and control of plant diseases by *Bacillus velezensis*[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2024, 51(6): 48-59. (in Chinese)
- [11] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984.
- BUCHANAN R E, GIBBONS N E. *Bergey's manual of determinative bacteriology*[M]. Beijing: Science Press, 1984. (in Chinese)
- [12] 王雅君. 番木瓜采后炭疽病拮抗菌的分离鉴定及拮抗机理研究[D]. 海口: 海南大学, 2020.
- WANG Y J. Isolation and identification of the antagonistic bacteria against postharvest papaya anthracnose and the mechanisms involved[D]. Haikou: Hainan University, 2020. (in Chinese)
- [13] 陈亮. 番木瓜炭疽病拮抗菌鉴定、抗菌成分分析及作用机理研究[D]. 海口: 海南大学, 2015.
- CHEN L. Identification of antagonistic bacteria against papaya anthracnose, analysis of antibacterial components and mechanism of action[D]. Haikou: Hainan University, 2015. (in Chinese)
- [14] MAUNG C E H, LEE H G, CHO J Y, KIM K Y. Antifungal compound, methyl hippurate from *Bacillus velezensis* CE 100 and its inhibitory effect on growth of *Botrytis cinerea*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37: 159.
- [15] CAO Y, PI H, CHANDRANGSU P, LI Y, WANG Y, ZHOU H, XIONG H, HELMANN J D, CAI Y. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 4360.
- [16] WANG C, YE X, NG T B, ZHANG W. Study on the biocontrol potential of antifungal peptides produced by *Bacillus velezensis* against *Fusarium solani* that infects the passion fruit *Passiflora edulis*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(7): 2051-2061.
- [17] LIM S M, YOON M Y, CHOI G J, CHOI Y H, JANG K S, SHIN T S, PARK H W, YU N H, KIM Y H, KIM J C. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2017, 33(5): 488-498.
- [18] DEAN R, VAN KAN J A L, PRETORIUS Z A, HAMMOND-KOSACK K E, DI PIETRO A, SPANU P D,

- RUDD J J, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J, FOSTER G D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(7): 414-430.
- [19] 徐欣韵, 王宁, 丁佳, 陈妍, 田光明. 番茄青枯病拮抗菌的定向筛选及其抗病促生机制研究[J]. *微生物学报*, 2021, 61(10): 3276-3290.
- XU X Y, WANG N, DING J, CHEN Y, TIAN G M. Isolation and identification of antagonistic bacteria against tomato bacterial wilt and the mechanisms in disease prevention and plant growth promotion[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(10): 3276-3290. (in Chinese)
- [20] ZHANG N, WANG Z Q, SHAO J H, XU Z H, LIU Y P, XUN W B, MIAO Y Z, SHEN Q R, ZHANG R F. Biocontrol mechanisms of *Bacillus*: improving the efficiency of green agriculture[J]. *Microbial Biotechnology*, 2023, 16(12): 2250-2263.
- [21] WU L M, WU H J, CHEN L N, YU X F, BORRIS R, GAO X W. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12975.
- [22] ARNAOUTELI S, BAMFORD N C, STANLEY-WALL N R, KOVÁCS Á T. *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19: 600-614.
- [23] HUANG J F, WEI Z, TAN S Y, MEI X L, YIN S X, SHEN Q R, XU Y C. The rhizosphere soil of diseased tomato plants as a source for novel microorganisms to control bacterial wilt[J]. *Applied Soil Ecology*, 2013, 72: 79-84.
- [24] KLOEPFER J W, RYU C M, ZHANG S. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp.[J]. *Phytopathology*, 2004, 94(11): 1259-1266.