

番木瓜果实内生细菌 MGP3 菌株的鉴定及拮抗作用

石晶盈^{1,2}, 刘爱媛², 李雪萍^{2,3}, 陈维信^{2,3*}

¹ 山东农业大学食品科学与工程学院, 泰安 271018

² 华南农业大学园艺学院, 广东省广州市果蔬保鲜重点实验室, 广州 510642

³ 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广州 510642

摘要:【目的】从番木瓜果皮内筛选具有较强拮抗活性的内生细菌防治番木瓜采后炭疽病和疫霉病, 以减少果实采后病害带来的损失。【方法】采用稀释分离和平板抑菌圈法进行内生细菌的分离筛选, 结合形态特征、生理生化特性及 16S rDNA 部分序列同源性分析对菌株进行鉴定, 菌株经利福平诱抗处理后田间接种到果树树干上, 测定内生菌的定殖动态, 采用采前和采后生防试验测定菌株对番木瓜炭疽病和疫霉病的生防效果。【结果】从番木瓜果皮中分离筛选到一株具有拮抗活性的内生细菌 MGP3, 对 10 种病原菌有较强的拮抗作用, 鉴定该细菌为铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, 登录号 JF708186), MGP3 可进入番木瓜叶片、叶柄和果皮中定殖。MGP3 对采后番木瓜炭疽病和疫霉病的防治效果分别达到 50% 和 71%; 除苗期外, 采前 4 个不同时期经 MGP3 菌液处理可以显著降低采收后果实炭疽菌的潜伏侵染率和炭疽病的病情指数。【结论】番木瓜内生拮抗细菌 MGP3 具有潜在的生防应用价值。

关键词: 内生细菌, 铜绿假单胞菌, 生物防治, 番木瓜炭疽病, 番木瓜疫霉病

中图分类号: X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 09-1240-08

番木瓜 (*Carica papaya* L.) 是热带、亚热带地区普遍栽培的一种水果。炭疽病 [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc.] 和疫霉病 [*Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* (Dast.) Waterh.] 是番木瓜果实采收后贮运期间经常发生的病害, 尤其是炭疽病, 由于番木瓜在田间遭受胶孢炭疽菌的潜伏侵染导致果实采后的发病率很高, 致使番木瓜采后腐烂损失严重^[1]。目前生产上主要依靠使用化学杀菌剂防治这些病害, 虽然取得较好的防治效果, 但是其残留毒性令人担心, 也可能带来

环境污染和病原菌抗药性等一系列问题, 因此寻求能减少或取代化学杀菌剂的新方法便成为当今番木瓜采后防病研究的关键, 生物防治就是一种很有前途的方法。内生细菌由于存在于植物体内不易受外界环境条件的影响, 是植物病害生物防治的天然资源菌^[2]。利用从组织内部筛选到的拮抗菌防治番木瓜采后病害, 不存在农药残毒问题, 对人和环境的影响可降到最低限度, 对于减少番木瓜采后腐烂损失有重要意义。近年来, 国内外已在拮抗菌筛选方面取得一定的成果, 报道了一批对果蔬采后病害有

基金项目: 国家自然科学基金——广东省联合基金资助项目 (U0631004); 山东省自然科学基金项目 (ZR2010CQ039); 科技部“十二五”支撑计划 (2011BAD24B02)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-20-85288280; E-mail: wxchen@scau.edu.cn

作者简介: 石晶盈 (1980-), 女, 博士, 研究方向为园艺产品采后病理及分子生物学。Tel: +86-538-8245855; E-mail: jyshi2003@gmail.com

收稿日期: 2011-02-24; **修回日期:** 2011-0-0

拮抗作用的微生物,但大多是果蔬表面或伤口处的拮抗菌,受外界环境条件影响较大,在一定程度上限制了拮抗菌的使用。目前,植物内生菌作为生防因子受到越来越多的关注,已有关于从小麦、番茄和烟草等多种植物体内分离筛选到具有防病作用的内生细菌的报道^[3-5]。内生拮抗细菌在果蔬采后病害防治中的研究还不多见,关于番木瓜内生细菌防治番木瓜采后病害的报道更是少见。为了获得对番木瓜采后炭疽病和疫霉病有较好防治效果的内生拮抗菌,本研究对从番木瓜果皮内分离到的内生细菌 MGP3 进行了分类地位、拮抗作用、定殖能力和防病效果的初步测定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试病原菌: 番木瓜疫霉病菌 (*P. nicotianae*)、番木瓜炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*)、荔枝霜疫霉病菌 (*Peronophythora litchi* Chen. ex KO et al.)、枇杷黑斑病菌 (*Alternaria tenuis* Nees)、辣椒疫霉病菌 (*Phytophthora capsici* Leonian)、辣椒软腐病细菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al.)、菜心炭疽病菌 (*Colletotrichum higginsianum*)、鸡冠花叶斑病菌 (*Fusarium oxysporum* Schl.)、柑桔青霉病菌 (*Penicillium italicum* Wehmer)、桃褐腐病菌 (*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb. Ex Fr.) Vuill) 由华南农业大学园艺学院植物病理教研室提供。

1.1.2 培养基: 内生细菌平板培养采用 NA 培养基,液体培养采用 NB 培养基,提取 DNA 的菌体培养用 LB 培养基,以上 3 种培养基的配制参照文献^[6]进行。病原菌培养采用 PDA 培养基 (1 L 蒸馏水里面含 200 mL 的马铃薯浸出液 (200 g 马铃薯煮沸 15 min,定容至 1 L)、20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂,121 灭菌 30 min),拮抗作用测定采用 PDA 加牛肉浸膏和蛋白胨培养基 (1 L PDA 培养基内含 3 g 牛肉浸膏和 5 g 蛋白胨,121 灭菌 30 min)。

1.1.3 主要试剂和仪器: 利福平 (Rifampicin, Rif.) 购自 Sigma 公司,施保功 (Sporgon) 购自拜耳作物科学 (中国) 有限公司,瑞毒霉 (Ridomil Gold) 购自先正达生物科技 (中国) 有限公司。其余常规试剂 (分析纯) 购自上海生工生物工程技术有限公司。

克隆所用试剂盒以及 PCR 所用 Buffer、dNTP、Taq 酶等购自大连宝生物公司,引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。连接所用 pGEM-T Easy 载体购自上海普洛麦格生物制品有限公司,测序由上海英骏生物科技有限公司完成。凝胶成像系统为 T2A (美国 Bio-Rad 公司),PCR 仪为 MJ Mini (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 内生细菌的分离与筛选

番木瓜果实采自广东省广州市华南农业大学园艺基地番木瓜种植园,为‘夏威夷’ (‘Hawaii’) 品种,采收无病害症状、成熟度为果皮表面呈现三条黄色 (俗称“三线黄”) 的番木瓜果实。采用稀释分离法^[7]分离果皮中的内生细菌。以番木瓜炭疽菌作为指示菌,用对峙培养法^[8]进行拮抗菌的筛选,抑菌带半径大于 5 mm 认为有拮抗作用,筛选到一株拮抗作用较强的菌株,命名为 MGP3。采用抑菌圈法^[6]测定 MGP3 对 10 种病原菌的拮抗作用。配制供试病原菌悬浮液,悬浮液的浓度为 1×10^7 孢子 (囊) $\cdot \text{mL}^{-1}$,取 2 mL 的病原菌悬浮液,分别加入到约 45 °C 18 mL 的 PDA 加牛肉浸膏和蛋白胨培养基中,混合均匀后倒成含供试病原菌的培养基平板,在平板中央移入一块直径为 5 mm 的内生细菌菌苔,在 28 °C 下培养 3 天,测量抑菌圈半径,抑菌圈半径大于 5.0 mm 被认为有拮抗作用,以一株无拮抗作用的内生细菌作对照。每处理 6 个培养皿,3 次重复。

1.3 MGP3 在番木瓜植株内的定殖能力测定

采用抗 Rif. 标记法^[9]测定 MGP3 在番木瓜植株内的定殖能力。试验在华南农业大学园艺农场的番木瓜种植园进行,在幼果期 (坐果后一周,果实长度约 10 cm) 用浓度为 10^8 CFU $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的抗 Rif. 菌株培养液处理番木瓜植株,用 30 cm \times 10 cm \times 1 cm 的灭菌脱脂棉蘸浓度为 1×10^8 cfu $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌液 50 mL,缠在离地面约 40 cm 的树干上,用 0.03 mm 厚聚乙烯薄膜袋覆盖保湿,24 h 后去掉薄膜袋和脱脂棉,在树干上做好标记。以用无菌水处理作为对照 (CK),每处理 10 株番木瓜植株,3 次重复。于接种后 0、5、10、15、20、25 和 30 d,在接种树干的上部取番木瓜的叶片、叶柄和果皮各 1 g,分别放入 0.1% 的氯化汞中进行表面消毒 1 min,用无菌水漂洗 3 次,用灭菌的研钵研成碎末后加入 9 mL 的无菌水搅拌后静置 10 min,取上清液 1 mL 稀释 10 倍,取

0.1 mL 稀释液放于含有 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ Rif. 的 NA 平板培养基中, 涂抹均匀, 置于 28°C 恒温箱中培养 2 d 后记录平板上的菌落个数, 计算 $\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ 。参照文献[9], 用 $\log_{10}[(\text{CFU} + 1) \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}]$ 的形式表示定殖量。

1.4 MGP3 的生理生化性状测定

MGP3 的形态特征、培养性状和生理生化特性的测定参照文献[10]的方法进行。

1.5 MGP3 的 16S rDNA 克隆、序列测定与分析

内生细菌总 DNA 用细菌基因组 DNA 小量抽提试剂盒提取, 以上述 DNA 为模板, 采用扩增细菌 16S rDNA 的通用引物 (63 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1387 R: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAG-3') 扩增目标细菌的 16S rDNA, 50 μL 的 PCR 反应体系包括 5 μL 1 \times 反应缓冲液, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, 3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 , 30 $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 正反向引物, 2.5 U Ex *Taq* DNA 聚合酶 (5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 10 ng 模板 DNA。PCR 扩增反应条件为: 94°C 变性 3 min; 94°C 变性 1 min, 50°C 复性 45 s, 72°C 延伸 2 min, 循环数为 30; 72°C 充分延伸 10 min。PCR 产物在 100 V 电压下进行琼脂糖凝胶电泳 20 min, 放入溴化乙锭溶液中染色 20 min, 在凝胶成像系统的紫外灯下迅速切下反应条带。PCR 产物采用 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification kit (Ver. 2.0) 试剂盒进行回收纯化, 纯化后连接 pGEM-T Easy 载体, 转化 *Escherichia coli* DH5 α 并测序。

对测到的 DNA 序列采用 GenBank 中的 BLASTN 软件以及 RDP II (Ribosomal Database Project II) 中的 SEGMatch 进行同源性比较。利用 Mega 5.0 对测序得到的序列及参比序列进行比对, 并构建系统发育树, 用 Bootstrap 分析评估树的稳定性。

1.6 MGP3 的生防作用测定

1.6.1 对番木瓜炭疽病的防治效果测定: 采收时果实成熟度为果皮表面出现三条黄色 (俗称“三线黄”), 采后将果实当天运回实验室, 清洗晾干, 挑选成熟度、大小基本一致, 无机械伤无病虫害的果实进行下一步处理。果蒂切新伤口后用 0.3% 的含氯洗剂浸泡 5 min, 晾干。

预处理后的果实用 MGP3 培养液 (28°C, 80 \times g 振荡培养 24 h, 浓度为 10^8 $\text{CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$) 浸泡 5 min,

分别以无菌水和 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的施保功浸泡的果实作对照。晾干后用 0.03 mm 厚聚乙烯薄膜袋单果包装置于 25°C 温度下贮藏。24 h 后参照文献[11]的方法接种番木瓜炭疽菌, 接种后立即用薄膜袋单果包装置于 25°C, RH 为 85% 下贮藏。于接种病原菌后的第 5、7 和 9 d 调查病斑直径, 参照文献[12]按照病斑直径大小将果实的发病程度分为 6 个等级。按照下式计算病情指数和防治效果: 病情指数 = $[\sum(\text{病果数} \times \text{病情级数}) / (\text{总调查果数} \times \text{最高病情级数})] \times 100$, 防治效果 (%) = $[(\text{对照果病情指数} - \text{处理果病情指数}) / \text{对照果病情指数}] \times 100\%$ 。每处理 20 个果, 3 次重复。

分别于番木瓜的苗期 (10 片真叶)、花期 (开花后一周)、幼果期 (坐果后一周)、青果期 (坐果后一月) 和采收前 (采前 15 d) 在植株上接种内生菌悬浮液, 处理方法同 1.3。等番木瓜果实成熟度达到“三线黄”时采收, 分别进行以下两种处理:

(1) 参照文献[13]的方法统计炭疽菌的潜伏侵染率。潜伏侵染率 (%) = $(\text{分离出某病菌的果皮数} / \text{供试总果皮数}) \times 100\%$ 。

(2) 果实预处理后, 放置在 25°C 冷库, 第 9 天时调查病情指数, 计算防治效果。参考文献[14]的方法将果实发病程度分为以下 9 个等级, 病情指数按照上式进行计算。

1.6.2 MGP3 对番木瓜采后疫病的防治效果测定: 番木瓜果实采后处理方式同 1.6.2, 分别以无菌水和 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的瑞毒霉浸泡的果实作对照。分别于 0、24 和 48 h 后接种疫霉菌孢子囊悬浮液 (10^4 个孢子囊 $\cdot\text{mL}^{-1}$), 接种后立即用薄膜袋单果包装置于 25°C, RH 为 85% 下贮藏。于接种病原菌后的 72 h 调查病斑直径, 按照病斑直径大小将果实的发病程度分为以下 6 个等级: 0 级, 接种点未发病; 1 级, 0 mm < 病斑直径 \leq 10 mm; 2 级, 10 mm < 病斑直径 \leq 20 mm; 3 级, 20 mm < 病斑直径 \leq 30 mm; 4 级, 30 mm < 病斑直径 \leq 40 mm; 5 级, 病斑直径 > 40 mm。病情指数和防治效果的计算方法同上。每处理 20 个果, 3 次重复。

1.6.3 数据统计分析及作图: 采用 SPSS13.0 进行数据统计和显著性水平检验。使用 SPSS 公司的 Sigmaplot 10.0 软件进行绘图。

2 结果

2.1 内生细菌 MGP3 的筛选及对病原菌的拮抗作用

根据菌落形态、颜色和生长特性的不同,将分离到的内生细菌进行简单分类,发现从番木瓜果皮内分离到 104 个株系,其中菌株 MGP3 对 10 种园艺产品常见病原菌有明显的平板抑制作用(表 1)。测得对照的抑菌圈半径为 0 mm。

表 1 内生细菌 MGP3 对 10 种病原菌的抑制作用

Table 1 Inhibitory effect of endophytic bacterium

MGP3 on ten plant pathogens	
Pathogens	Radius of suppression circle/mm
<i>P. nicotianae</i>	18.1 ± 1.0
<i>P. capsici</i>	17.8 ± 1.9
<i>P. litchii</i>	17.0 ± 0.8
<i>C. gloeosporioides</i>	14.0 ± 1.1
<i>E. carotovora</i>	13.5 ± 1.5
<i>A. mali</i>	12.3 ± 2.0
<i>C. higginsianum</i>	10.3 ± 0.5
<i>F. oxysporum</i>	9.0 ± 1.0
<i>R. stolonifer</i>	7.5 ± 0.5
<i>P. italicum</i>	7.0 ± 0.9

The data were reported as means ± sd (n = 3).

2.2 内生细菌 MGP3 在番木瓜植株内的定殖

幼果期接种内生菌 MGP3 后,菌株在番木瓜叶片、叶柄和果皮内的定殖动态基本相同,都是呈先升高再下降的趋势,在叶片和叶柄内的定殖量在第 10 d 达到高峰,在果皮内第 15 d 达到高峰,定殖量最高达 10^5 CFU·mL⁻¹。

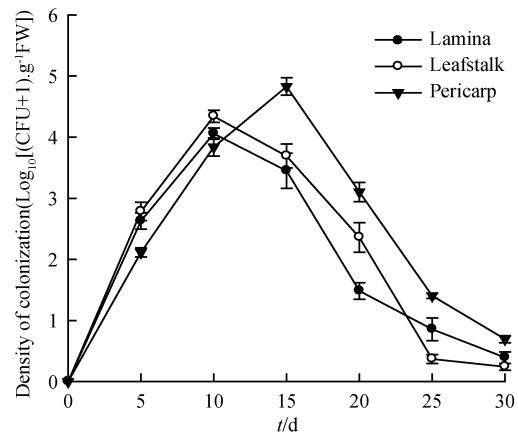


图 1 田间幼果期接种后 MGP3 在番木瓜植株内的定殖量

Fig. 1 Density of colonization of MGP3 in papaya plant inoculated at young fruit stage in the field.

2.3 MGP3 16S rDNA 的序列分析

以内生菌 MGP3 的总 DNA 为模板,通过引物 63 F 和 1387 R 扩增,在 1.5 kb 左右获得了一条特异片段,回收片段进行序列测定。测序结果用 GenBank 和 RDP 数据库进行同源性分析,在两个数据库中的同源性分析表现了一致的结果:MGP3 (GenBank 登陆号: JF708186) 和 *Pseudomonas aeruginosa* isolate PAL106 (GenBank 登陆号: DQ466090, 华中农业大学生命科学院 Zhan 等分离得到) 的同源性达 99.9% (图 2)。由此可以初步鉴定该菌株属于假单胞菌属的铜绿假单胞菌,但是,由于假单胞菌属各种间序列同源性非常高,所以种的鉴定还要通过进一步的培养形态和生理生化鉴定确定。

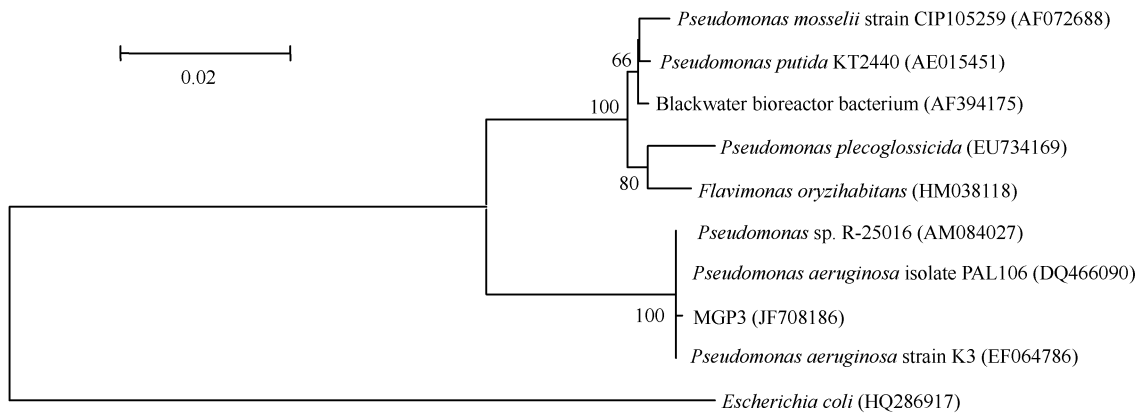


图 2 MGP3 与参比菌株系统发育关系树状图

Fig. 2 Figure of phylogenetic tree of the strains MGP3 in relation to reference strains. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.02 sequence divergence.

2.4 MGP3 的形态特征和培养性状

MGP3 菌株革兰氏染色阴性。在光学显微镜和透射电镜下,菌体呈杆状,大小为(0.5–0.8) μm \times (1.5–3.0) μm ,不产芽胞,具有极生单鞭毛,能运动。在 NA 培养基上(28 $^{\circ}\text{C}$)培养 48 h 后,菌落呈蓝色,菌落光滑、湿润。由表 2 可以看出,在所测定的生理生化指标中, MGP3 与铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (我们从番木瓜上分离得到的 MG-P13, GenBank 登陆号: EU364810.1) 的性质一致。

2.5 MGP3 对番木瓜采后炭疽病的防治效果

由表 3 可以看出,采后用 MGP3 菌悬液处理的番木瓜果实,其炭疽病的发病速度显著低于对照, MGP3 对番木瓜炭疽病的防治效果随着时间的延长逐渐降低。但是内生细菌对番木瓜炭疽病的防治效

果不如化学杀菌剂处理。

表 2 MGP3 的生理生化特性

Characters	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	MGP3
Growth at 4 $^{\circ}\text{C}$	–	–
Growth at 41 $^{\circ}\text{C}$	+	+
Fluorescent pigment	+	+
pyocyanin	d	+
Arginine dihydrolase	+	+
Starch hydrolysis	–	–
Gelatin hydrolysis	+	+
Oxidase reaction	+	+
DNA G + C mol %	67.2	67.2
Lipase	+	+
Denitrification	+	+
Levan formation from sucrose	–	–
Utilization of glucose	+	+
Utilization of fucose	–	–

+ : positive; – : negative; d: 11%–89% of strains are positive.

表 3 MGP3 对番木瓜采后炭疽病的防治效果

Table 3 Control effect of MGP3 on postharvest papaya anthracnose disease

Treatments	Days after <i>C. gloeosporioides</i> inoculated					
	5 d		7 d		9 d	
	Disease index	Control effect/%	Disease index	Control effect/%	Disease index	Control effect/%
MGP3	3.9 b	50	9.3 b	44	18.0 b	35
Sporgon	0	100	3.3 c	80	10.7 c	62
CK	7.8 a	–	16.7 a	–	27.8 a	–

Means in the same column with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

采前 5 个时期在番木瓜植株上接种内生细菌后,除苗期以外, MGP3 可以显著降低炭疽菌在番木瓜果实上的潜伏侵染率,同时可以显著降低采后果实炭疽病的病情指数,花期、幼果期、青果期和采收前接种 MGP3 后对炭疽菌的潜伏侵染率无显著性差异。青果期喷施内生菌液后对番木瓜采后炭疽病的防治效果最好,可达 74% (图 3)。

2.6 MGP3 对番木瓜采后疫霉病的防治效果

由表 4 可以看出,采后用 MGP3 菌悬液处理的番木瓜果实,其疫霉病的发病速度显著低于对照, MGP3 处理后分别放置 24 和 48 h 再接种番木瓜疫霉菌对疫霉病的防治效果好于 0 h 的。但是内生细菌对番木瓜疫霉病的防治效果不如化学杀菌剂处理。

3 讨论

内生细菌 MGP3 对危害园艺产品的寄生和腐生真菌以及病原细菌都有不同程度的拮抗作用,表明

此菌株具有较为广谱的抗菌活性。通过多种方法对菌株进行分类鉴定,确定其为番木瓜内生铜绿假单胞菌,它是广泛存在于土壤和植物体内的植物非致病菌,已经有从甜菜、粗皮柠檬中分离到内生铜绿假单胞菌的报道^[15–16]。研究发现,铜绿假单胞菌对豆类枯萎病、菜豆灰霉病、番茄绵腐病、水稻纹枯病等有不同的防治作用^[17–20],而作为生防菌首次从番木瓜果皮内分离筛选到。

成功的生物防治有两个重要的基本条件,一是拮抗细菌在引进位点能有效的定殖,二是在侵染位点能表现出与离体测定中相同的拮抗作用。在田间番木瓜植株的树干上接种番木瓜内生拮抗菌 MGP3 后,可以在番木瓜叶片、叶柄和果皮上回收到此菌株,尤其是在果皮中菌落数量高达 10^5 CFU \cdot mL⁻¹ (图 1),表明此菌株可以进入番木瓜体内,并且定殖量较高,利于其在番木瓜体内占据有利的生态位。有研究报道假单胞菌类在根际要显示出生防活性,需达到相对较高水平的种群密度,这就要求生防菌的活菌数必须达到一定数量标准^[21–22]。铜绿假单

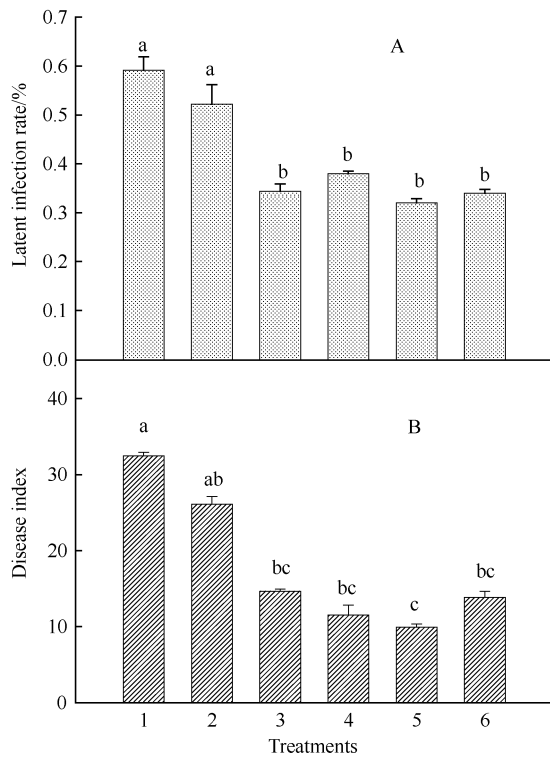


图3 采前不同时期接种 MGP3 对采后番木瓜炭疽病的潜伏侵染率和病情指数的影响

Fig.3 Effects of MGP3 inoculation at different stages before harvest on (A) latent infection rate and (B) disease index of anthracnose of harvested papaya fruit. 1, CK; 2, Seedling stage; 3, Flowering stage; 4, Young fruit stage; 5, Green fruit stage; 6, Preharvest stage. Values with different letters are statistically different according to Duncan's analysis ($P \leq 0.05$).

胞菌在番木瓜植株内的防治效果是否与种群密度有关还有待研究。MGP3 不仅可以在离体试验中抑制 10 种病原微生物的生长,而且在活体试验中可以有效防治采后番木瓜炭疽病和疫霉病,由此可以预见此菌株具有潜在的生防应用价值。希望通过本研究,利用有拮抗活性的内生菌有效防治番木瓜果实采后病害,为果蔬采后病害的防治提供新的思路。

由于菌株为植物内生细菌,接菌后菌体可主动进入植物体内,有报道认为,内生细菌进入植物体内的途径与病原菌侵入的途径同或相似^[23],内生细菌在进入植物体过程中可能先占领了病原菌的侵入位点,阻止病菌的入侵;另一方面菌株可在体内及侵入位点分泌抗菌物质,抑制病菌的生长;Wang 等^[24]报道,*Pseudomonas aeruginosa* K-187 能产生几丁质酶和溶菌酶,抑制 36 株真菌的生长。我们的研究初步发现,MGP3 发酵除菌后经酸沉淀、有机溶剂提取、旋转蒸干后的粗提物有明显的平板抑菌作用,炭疽菌的潜伏侵染率的降低可能与此菌株在番木瓜体内产生胞外抗菌物质有关。若能通过相应的栽培措施和喷施某些定殖能力较强的内生拮抗菌来改善果蔬内部有益微生物的菌群结构,对于减少果蔬潜伏侵染病害具有重要意义。此外,有些内生菌进入植物体内后对植物具有诱导抗病作用^[12]。本研究观测到接种 MGP3 菌悬液后间隔 24 和 48 h 再接种原菌的防病效果比立即接种病原菌的高(表 4),可能与诱导果实的抗病机制有关,但是 MGP3 通过何种

表 4 MGP3 对番木瓜采后疫霉病的防治效果

Table 4 Effect of MGP3 on postharvest papaya blight disease

Treatments	Hours after <i>P. aeruginosa</i> inoculated					
	0 d		24 d		48 d	
	Disease index	Control effect/%	Disease index	Control effect/%	Disease index	Control effect/%
MGP3	6.13 b	47	4.36 b	63	3.38 b	71
Ridomil Gold	1.81 c	84	2.13 bc	82	2.01 b	83
Control	11.46 a	-	11.80 a	-	11.52 a	-

Means in the same column with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

途径引起果实抗病力增强目前还不清楚。

果蔬潜伏性侵染病菌往往在生长期就感染了果实,但是并不表现出病害症状,在果实采收后的后熟阶段才开始发病,单纯依靠采后的防治措施通常较难控制,田间不同生长期接种内生拮抗菌处理可以不同程度地降低采后果实炭疽菌的潜伏侵染率和炭疽病的病情指数,对采后番木瓜炭疽病的防治效果能够达到 74% (图 3),而采后浸泡内生菌对番木瓜

炭疽病的防治效果只有 50% (表 3),这是由于炭疽菌在采前田间就侵染了番木瓜果实,而采前接种内生菌可能在一定程度上抑制了炭疽菌的入侵或生长从而降低果实的潜伏侵染率。田间试验结果还表明,苗期接种内生拮抗菌对抑制炭疽菌的潜伏侵染率及炭疽病的病情指数无显著性影响(图 3),由此可见,接种内生细菌的时间对采后病害的防治效果影响较大,这可能与 MGP3 在番木瓜果皮内的定殖

量、定殖时间及病原菌侵染果实的时间有关^[25-26]。就具有潜伏侵染特性的病原菌角度而言,水果采前潜伏侵染菌量与采后病害轻重有密切的关系,减少采前潜伏侵染菌量和延长潜伏期是采后病害防治的两条主要思路,MGP3 主要是依靠降低采前的潜伏侵染率还是通过提高果实本身的抗病性延长了潜伏期还有待深入研究。

参考文献

- [1] 戚佩坤,广东果树真菌病害志.北京:中国农业出版社,2000;56-59.
- [2] Liu CH, Zou WX, Lu H, Tan RX. Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. *Journal of Biotechnology*, 2001, 88: 277-282.
- [3] 王刚,李志强.小麦内生细菌的分离及对小麦纹枯菌的拮抗作用.微生物学通报(*Microbiology*), 2005, 32(2): 20-24.
- [4] 王美琴,刘慧平,韩巨才,路涛.番茄内生细菌种群动态分析及拮抗菌株的筛选.中国农学通报(*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2010, 26(9): 277-282.
- [5] 马冠华,周常勇,肖崇刚,陈国康,易龙.烟草内生细菌 Itb57 的鉴定及其对烟草黑胫病的防治效果.植物保护学报(*Acta Phytophylacica Sinica*), 2010, 37(4): 148-152.
- [6] Shi JY, Liu AY, Li XP, Feng SJ, Chen WX. Identification of endophytic bacterial strain MGPI selected from papaya and its biocontrol effects on pathogens infecting harvested papaya fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(2): 227-232.
- [7] 袁军,孙福在,田宏先,崔林,赵廷昌.防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选.微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2002, 42(3): 270-274.
- [8] 曲宝成,孙军德,冯敏.番茄灰霉病内生拮抗细菌的分离筛选初报.微生物学杂志(*Journal of Microbiology*), 2004, 24(4): 62-64.
- [9] Bacon CW, Hinton DM. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biological Control*, 2002, 23: 274-284.
- [10] Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th Edition. Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1994; 93-157.
- [11] Capdeville G, Jr. MTS, Santos JRP, Miranda SP, Caetano AR, Torres FAG. Selection and testing of epiphytic yeasts to control anthracnose in post-harvest of papaya fruit. *Scientia Horticulturae*, 2007, 111: 179-185.
- [12] Shi JY, Liu AY, Li XP, Feng SJ, Chen WX. Inhibitory mechanisms induced by the endophytic bacterium MGY2 in controlling anthracnose of papaya. *Biological Control*, 2011, 56(1): 2-8.
- [13] Gu H, Liu AY, Chen WX, Shi JY, Feng SJ. Studies on the development and the control of postharvest diseases of loquat fruit. *Acta Horticulture*, 2007, 750: 437-443.
- [14] Lay-Yee M. Quality and disease incidence of 'waimanalo soli' papaya following forceair heat treatment. *Hortscience*, 1997, 32: 255-257.
- [15] Jacobs MJ, Bugbee WM, Gabrielson DA. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Canadian Journal of Botany*, 1985, 63: 1262-1265.
- [16] Gardner JM, Feldman AW, Zablutowicz RM. Identity and behavior of xylem-residing bacteria in rough lemon of Florida citrus trees. *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, 43(6): 1335-1342.
- [17] De Meyer G, Höfte M. Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*, 1997, 87: 588-593.
- [18] Anjaiah V, Cornelis P, Koedam N. Effect of genotype and root colonization on the biological control of Fusarium wilts in pigeonpea and chickpea by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. *Canadian Journal of Microbiology*, 2003, 49: 85-91.
- [19] Buysens S, Heungens K, Poppe J, Höfte M. Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 865-871.
- [20] 任小平,谢关林,王笑.铜绿假单胞菌 ZJ1999 对水稻纹枯病的防治及其在水稻上的定殖.中国生物防治(*Chinese Journal of Biological Control*). 2006, 22(1): 54-57.
- [21] Molina L, Ramos C, Duque E, Ronchel MC, Garcia JM, Wyke L, Ramos JL. Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2000, 32(3): 315-321.
- [22] Achouak W, Thiéry JM, Roubaud P, Heulin T. Impact of crop management on intraspecific diversity of *Pseudomonas corrugate* in bulk soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2000, 31(1): 11-19.

- [23] Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2000, 19: 1-30.
- [24] Wang SL, Yieh TC, Shih IL. Production of antifungal compounds by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 25 (1): 142-148.
- [25] Daykin MN. Infection of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease*, 1984, 68: 948-950.
- [26] Latunde-dada AO. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology*, 2001, 2: 187-198.

Identification and antagonistic activities of an endophytic bacterium MGP3 isolated from papaya fruit

Jingying Shi^{1,2}, Aiyuan Liu², Xueping Li^{2,3}, Weixin Chen^{2,3*}

¹College of Food Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China

²Guangdong Key Laboratory for postharvest Science and Technology of Fruits and Vegetables, College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

³State Key Laboratory for Subtropical Agribiological Resources Conservation and Utilization, Guangzhou 510642, China

Abstract: [**Objective**] Postharvest decay resulted from anthracnose caused by pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and blight diseases caused by *Phytophthora nicotianae* leads to significant loss of papaya fruits. In order to reduce such loss, we isolated endophytic bacteria that may possess powerful antagonistic activities toward these pathogens for effective biological control of anthracnose and blight diseases. [**Methods**] The methods of dilution and inhibition circle were used for isolating and screening endophytic bacteria from papaya fruit. Based on morphological, physiological and biochemical characteristics, and homology analysis of the partial sequence of 16S rDNA, an endophytic bacterium was identified. The colonization of the antagonistic endophyte in papaya was detected by inoculating suspension of strains in caudices of papaya plant after Rifampicin-resistant mutants (rif^r) induction. The effects on diseases caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and *Phytophthora nicotianae* were tested by preharvest and postharvest experiments. [**Results**] One of the endophytic bacteria named MGP3 was selected from the papaya pericarp and identified as *Pseudomonas aeruginosa* (Accession No. JF708186). This bacterium was able to colonize in the laminae, leafstalk or pericarp of papaya, and strongly inhibit 10 phytopathogens. In the postharvest experiment, MGP3 inhibited 50% anthracnose and 71% blight of harvested papaya fruits. The application of MGP3 at five preharvest stages of papaya significantly reduced latent infection rate of *Colletotrichum gloeosporioides* and disease index of anthracnose. [**Conclusion**] Antagonistic endophytic bacterium MGP3 isolated from papaya fruit had potential application value as a biological control agent.

Keywords: endophytic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, biological control, papaya anthracnose, papaya blight

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (U0631004), by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2010CQ039) and by the National Key Technology R&D Program of China (2011BAD24B02)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-20-85288280; E-mail: wxchen@scau.edu.cn

Received: 24 February 2011/ Revised: 6 May 2011