

# 枯草芽胞杆菌GB519抗菌蛋白的理化性质及生防效果

朱峰<sup>1</sup>, 王继春<sup>1\*</sup>, 田成丽<sup>1</sup>, 祁山颜<sup>1,2</sup>, 王东元<sup>2</sup>, 任金平<sup>1</sup>, 王义山<sup>3</sup>

(1. 吉林省农业科学院植物保护研究所/农业部东北作物有害生物综合治理重点实验室, 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学植物保护学院, 长春 130118; 3. 双辽市东明镇林业站, 双辽 136414)

**摘要:** 枯草芽胞杆菌 GB519 是从土壤中分离对稻瘟病菌具有显著抑菌活性的菌株。为了明确菌株 GB519 抗菌粗蛋白的理化性质, 分析了光照、紫外线、温度、pH 和酶(蛋白酶 K、胰蛋白酶和胃蛋白酶)对抑菌活性的影响。结果表明, 抗菌蛋白对光照、紫外线和 3 种酶作用稳定; 40 °C~100 °C 处理 1 h 抑菌活性稳定, 121 °C 处理 30 min 活性仅降低了 7.4%, 具有较好的耐高温特性; 在 pH 2.0~10.0 活性稳定, 但 pH 11.0~12.0 活性有所下降, 分别降低了 14.9% 和 18.1%。抗菌蛋白对多种植物病原菌具有抑菌作用, 其中对茄子菌核病菌的抑菌活性为 72.7%。在温室条件下对水稻叶瘟的防效达到 80.1%。因此, 菌株 GB519 可作为防控稻瘟病生防潜力菌进行开发。

**关键词:** 枯草芽胞杆菌 GB519; 抑菌蛋白; 理化性质; 水稻稻瘟病

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2020)05-0778-08

## Physicochemical Characteristics and Biocontrol Efficacy of Antagonistic Protein from *Bacillus subtilis* GB519

ZHU Feng<sup>1</sup>, WANG Jichun<sup>1\*</sup>, TIAN Chengli<sup>1</sup>, QI Shanyan<sup>1,2</sup>, WANG Dongyuan<sup>2</sup>, REN Jinping<sup>1</sup>, WANG Yishan<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast, Ministry of Agriculture Institute of Plant Protection/Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, China; 2. College of Plant Protection, Jinlin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. Forest Station of Dongming Town, Shuangliao 136414, China)

**Abstract:** The strain GB519 of *Bacillus subtilis* was isolated from the soil and showed significant antimicrobial activity against rice blast caused by *Magnaporthe oryzae*. In order to clarify the physicochemical characteristics of antagonistic crude protein of strain GB519, the effects of illumination, UV, temperature, pH and enzymes (proteinase K, trypsin and pepsin) on antimicrobial activity were analyzed. The results showed that antagonistic protein was stable in illumination, UV and three kinds of enzymes; Antimicrobial activity remained stable at 40—100 °C for 1 h and decreased by only 7.4% at 121 °C for 30 min, showing good resistance to high temperature; Antimicrobial activity remained stable from pH 2.0 to 10.0, and declined by 14.9% and 18.1% at pH 11.0 and pH 12.0, respectively. Antagonistic protein had antagonistic effect on multiple crop pathogens, especially among which the antimicrobial activity against *Sclerotinia sclerotiorum* was 72.7%. Under greenhouse conditions, the biocontrol efficacy against leaf blast reached 80.1%. Therefore, the *B. subtilis* GB519 could be developed as biocontrol potential bacteria for the control of rice blast.

**Key words:** *Bacillus subtilis* GB519; antagonistic protein; physicochemical properties; *Magnaporthe oryzae*

收稿日期: 2020-02-14

基金项目: 吉林省农业科技创新工程(CXGC2017TD010); 吉林省科技厅优秀青年人才基金(20190103131JH); 吉林省农业科学院博士后基金(188320)

作者简介: 朱峰, 博士, 助理研究员, E-mail: zhufeng0726@163.com; \*通信作者, 博士, 副研究员, E-mail: wangjichun@cjaas.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.05.024

水稻是世界上最重要的粮食作物之一，稻瘟病的发生和流行，导致全球水稻不同程度的发病，每年造成 10%~30% 的产量损失<sup>[1]</sup>。种植抗病品种是防控稻瘟病最为经济、有效、环境友好的方法，但由于稻瘟病菌变异速度快导致抗病品种在推广几年后快速丧失抗病性<sup>[2]</sup>。采用化学药剂防控，虽然具有效果显著、成本低廉等优点，但极易产生农药残留危害健康、破坏生态环境和导致病原菌产生抗药性等问题<sup>[3]</sup>。近年来，生防制剂替代化学药剂防控植物病害越来越受到国内外的重视。

由于芽胞杆菌具有抗逆能力强、抗菌活性广谱、环境友好等优点<sup>[4,5]</sup>，逐渐成为稻瘟病绿色防控的重要途径之一<sup>[6,7]</sup>。沙月霞等<sup>[8]</sup>从水稻叶片分离到 3 株对稻瘟病菌具有高效抑菌活性的细菌，其中枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis* SYX20 对叶瘟的防治效果为 73.5%~83.5%，对穗瘟的防治效果为 64.0%~85.6%。芽胞杆菌的抑菌作用与其分泌的多种抗菌蛋白有关，抗菌蛋白的稳定性是其发挥防效的重要因素。Wang 等<sup>[9]</sup>研究了菌株 E1R-J 的抗菌蛋白 EP-2，在 100 °C 处理 30 min、蛋白酶 K 和强酸强碱条件下活性都不稳定。胡晓丹等<sup>[10]</sup>从菌株 AF0907 中分离出抑制小麦赤霉病菌的 48 kD 抗菌蛋白，在低温下稳定，60 °C 以上高温、酸碱、蛋白酶 K 和氯仿条件下都不稳定。于杰等<sup>[11]</sup>报道了菌株 B25 可分泌 38.7 kD 的抗菌蛋白，在 pH 3.0~8.0 和 100 °C 条件下稳定，在蛋白酶 K 条件下稳定性下降。Rao 等<sup>[12]</sup>分离的抗菌蛋白 AfAFP<sub>R9</sub> 100 °C 处理 20 min 活性稳定，处理 80 min 活性完全丧失。而稳定的脂肽类物质可以加工成不同的剂型，作为农用抗生素进行开发与应用<sup>[13]</sup>。

生防菌 GB519 是从公主岭采集的土壤中分离并鉴定为枯草芽胞杆菌，该菌株具有广谱抑制作物病原菌生长、促进水稻植株生长和提高植株抗病性等多重特性，通过室内盆栽和大田试验表现较高的防效，具有潜在的生防价值，可开发成新型的生物农药（数据未发表）。试验研究了 GB519 发酵液中的抗菌粗蛋白的理化性质、抑菌谱和生防效果，期望为该菌株有效物质的分离、鉴定及进一步应用提供理论和实践基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试生防菌

菌株 GB519 是本实验室分离获得的具有拮抗稻瘟病菌的活性菌株，经鉴定为枯草芽胞杆菌（专利申请号 201810228606.9）。

### 1.2 供试病原菌

供试病原菌水稻稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*、水稻恶苗病菌 *Fusarium moniliforme* (Sheld)、水稻立枯病菌 *F. graminearum*、西瓜枯萎病菌 *F. oxysporum*、西瓜炭疽病菌 *Colletotrichum lagenarium*、茄子菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、黄瓜灰霉病菌 *Borytys cinerea* 由本研究室分离、保存。

### 1.3 菌株 GB519 抗菌蛋白的粗制备及活性检测

1.3.1 GB519 种子及摇瓶培养 种子培养液（0.5%酵母提取物，1%胰蛋白胨，0.5% NaCl）经 121 °C 湿热灭菌 30 min 备用。将新培养的平板单菌落接种于 5 mL 种子培养液中，37 °C、150 r/min 培养 12~16 h。按 5% 接种量接种到装有 50 mL 发酵培养液（0.5%牛肉膏，1%蛋白胨，0.5% NaCl）的三角瓶（250 mL）中，30 °C、150 r/min 培养 48 h。发酵液经 14000 r/min 高速离心机离心 10 min，取上清液用于抗菌物质的制备。

1.3.2 GB519 抗菌蛋白的粗制备<sup>[14]</sup> 用 6 mol/L HCl 将获得的上清液调 pH 至 2.0，在 4 °C 冰箱中静置 12 h，在 4 °C、14000 r/min 下离心 20 min，收集沉淀；用 5 倍体积甲醇抽提沉淀物 3 次，旋转蒸发仪旋干，无菌水溶解；再用 2 mol/L NaOH 中和 pH 至 7.0，在 4 °C、14000 r/min 下离心 20 min，所得上清经冷冻干燥机干燥成粉末备用。本试验用无菌水配制抗菌蛋白溶液浓度为 10 mg/mL（现配现用），并用无菌 0.45 μm 微型过滤器过滤除菌。

1.3.3 GB519 抗菌蛋白对稻瘟病菌菌丝的抑制作用 采用管碟法，在直径为 90 mm 的 PSA（1%蛋白胨，1%蔗糖，2%琼脂粉）平板中央接种水稻稻瘟病菌直径为 5 mm 的菌饼，分别在距菌饼边缘 25 mm 处打直径为 5 mm 的孔，每孔加入抗菌蛋白溶液 50 μL（10 mg/mL），置于 28 °C 恒温培养箱中培养。以相同体积的菌株 GB519 发酵原液、酸沉后的余液（使用 2 mol/L NaOH 中和 pH 至 7.0）和无菌水作为对照，置于 25 °C 培养箱中培养，待对照处理长满培养皿时（14 d），试验重复 3 次，测量各处理菌落直径并计算抑菌

活性。抑菌活性(%)=100×(对照菌落直径-处理后菌落直径)/对照菌落直径。

#### 1.4 菌株 GB519 抗菌蛋白的理化性质测定

1.4.1 光稳定性测定 将装有 1 mL 抗菌蛋白溶液(10 mg/mL, 下同)的培养皿置于 30 W 日光灯下, 分别照射 1、2、3、4、5、6、12 和 24 h, 以未处理的样品为对照, 采用管碟法测量菌落直径, 处理及计算方法同 1.3.3, 每处理 3 次重复。

1.4.2 紫外线稳定性测定 将装有 1 mL 抗菌蛋白溶液的培养皿置于 30 W 紫外灯下, 分别照射 1、2、3、4、5、6、12 和 24 h, 以未处理的样品为对照, 测量菌落直径。每处理 3 次重复。

1.4.3 温度稳定性测定 将装有 1 mL 抗菌蛋白溶液的试管分别置于 40 °C、50 °C、60 °C、70 °C、80 °C、90 °C 和 100 °C 中处理 1 h, 121 °C 处理 30 min, 以未处理的样品为对照, 测量菌落直径。每处理 3 次重复。

1.4.4 酸碱稳定性测定 将 1 mL 抗菌蛋白溶液分别调 pH 值为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0 和 12.0, 在常温下处理 2 h 后, 再调回 pH 7.0, 以未处理的样品为对照, 测量菌落直径。每处理 3 次重复。

1.4.5 酶稳定性测定 将 1 mL 抗菌蛋白溶液分别与等体积的胰蛋白酶溶液、蛋白酶 K 溶液和胃蛋白酶溶液混匀(各种酶终浓度为 1 mg/mL), 于 37 °C 水浴锅中反应 90 min, 然后再 80 °C 处理 30 min, 4 °C 立即冷却。以未处理的样品为对照, 测量菌落直径。每处理 3 次重复。

#### 1.5 菌株 GB519 抗菌蛋白的抑菌谱

方法同 1.3.3。每一个作物病原菌的处理组加入抗菌蛋白溶液 50 μL(10 mg/mL), 无菌水作对照, 试验重复 3 次。

#### 1.6 温室条件下对稻瘟病叶瘟的防控效果

挑选饱满的水稻种子吉粳 88, 播种于育秧盘(600 mm×300 mm×30 mm), 土壤选择常规育苗土, 正常水肥管理。水稻苗长到 4~6 叶期时, 用手动喷雾器喷施浓度为 10 mg/mL 的抗菌蛋白溶液, 每个育秧盘喷施 20 mL, 每处理 3 次重复, 清水处理作对照。抗菌蛋白溶液处理后 24 h 每个育秧盘接种浓度为  $1 \times 10^5$  孢子/mL 的稻瘟病菌孢子悬浮液 30 mL。接种后将育秧盘置于 25 °C、相对湿度 100% 的接种室内保温保湿 24 h, 然后置于 25 °C 温室内, 使病斑显症。7 d 后调查叶瘟发病情况, 计算病情指数和防效<sup>[15]</sup>。

#### 1.7 数据统计与分析

采用软件 SPSS 19.0 对数据进行差异显著性分析( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗菌蛋白的活性检测

生防菌株 GB519 对水稻稻瘟病菌菌丝生长有较强的抑制作用, 发酵原液的菌落直径为 49.9 mm, 抑菌活性为 42.0%; 而抗菌蛋白的菌落直径为 28.6 mm, 抑菌活性为 66.7%, 显著高于发酵原液和余液, 分别提高了 58.8% 和 100.0% (图 1)。

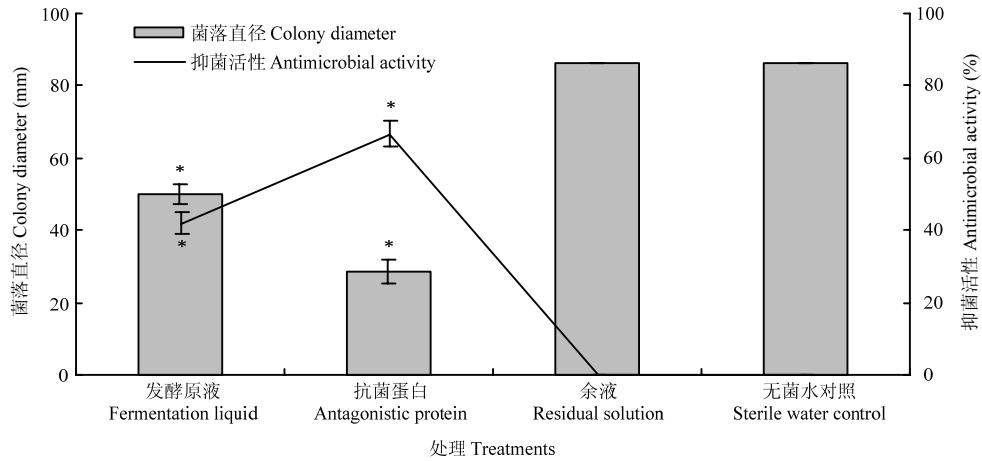
### 2.2 抗菌蛋白的理化性质

2.2.1 光稳定性试验 GB519 抗菌蛋白经过 24 h 的连续光照, 其抑制稻瘟病菌的活性与对照相比, 菌落直径和抑菌活性无显著的变化, 抑菌活性 76.0%~79.0% (图 2)。表明该抗菌蛋白对光不敏感, 有较强的抗光照的能力。

2.2.2 紫外稳定性试验 GB519 抗菌蛋白经过 24 h 的连续紫外线照射, 其抑菌活性无显著变化, 抑菌活性 76.0%~80.0% (图 3), 表明该抗菌蛋白对紫外线不敏感, 有较强的抗紫外线的的能力。

2.2.3 热稳定性试验 试验设置从 40 °C~121 °C 共 8 个热温度处理。随着处理温度的升高, 抗菌蛋白的抑菌活性变化不大。在 100 °C 下处理 60 min 抑菌活性为 77.3%, 较对照无显著变化; 在 121 °C 下灭菌 30 min 抑菌活性为 72.9%, 与对照相比, 活性降低了 7.4%, 表明该抗菌蛋白的热稳定性很强 (图 4)。

2.2.4 酸碱稳定性试验 抗菌蛋白经 11 个不同 pH 处理后, 其稳定性结果表明, 在 pH 3.0~10.0 抑菌活性差异不显著; 与对照相比, pH 11.0 和 pH 12.0 处理后, 抑菌活性显著降低, 分别下降了 14.9% 和 18.1% (图 5)。表明该抗菌蛋白在酸性、中性或偏碱性环境中都比较稳定, 在强碱性环境中具有一定的稳定性。



注：\*表示显著性差异  $P < 0.05$ 。

Note: \* indicated significant difference,  $P < 0.05$ .

图 1 菌株 GB519 抗菌蛋白对稻瘟病菌的菌落直径和抑菌活性

Fig. 1 Colony diameter and antimicrobial activity against *M. oryzae* by antagonistic protein of strain GB519

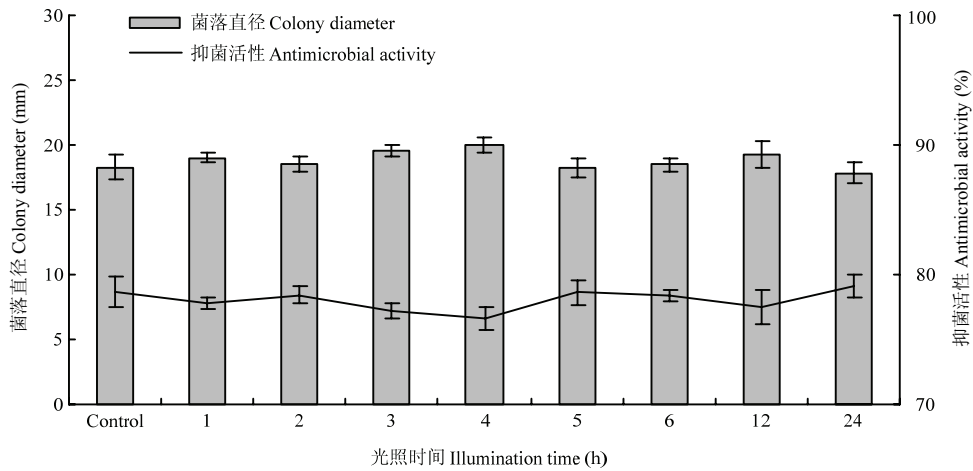


图 2 光照对菌株 GB519 抗菌蛋白抑菌活性的影响

Fig. 2 Effect of illumination on antimicrobial activity of antagonistic protein of strain GB519

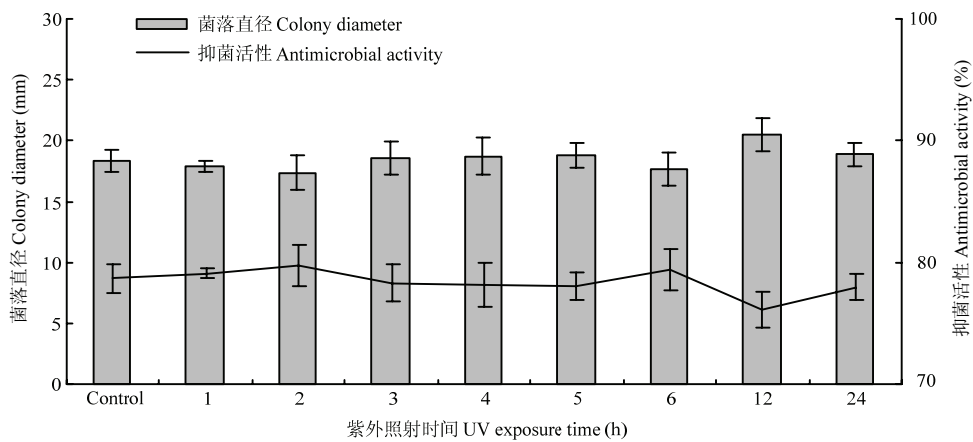
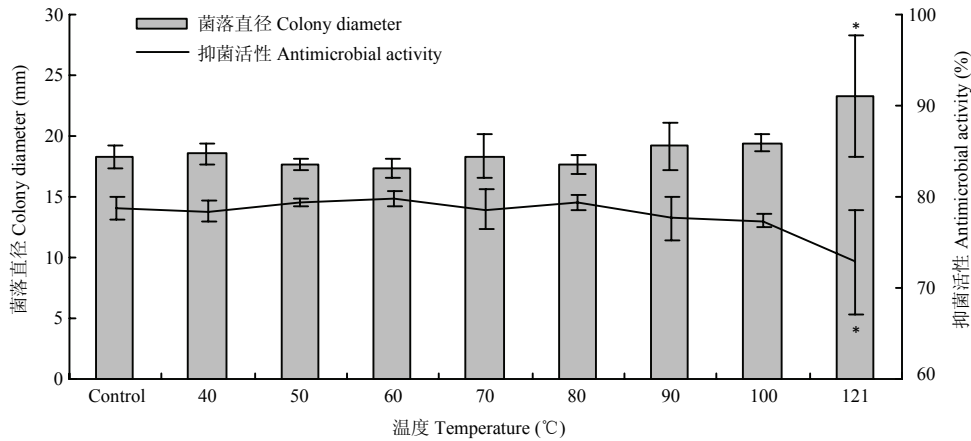


图 3 紫外对菌株 GB519 抗菌蛋白抑菌活性的影响

Fig. 3 Effect of UV on antimicrobial activity of antagonistic protein of strain GB519

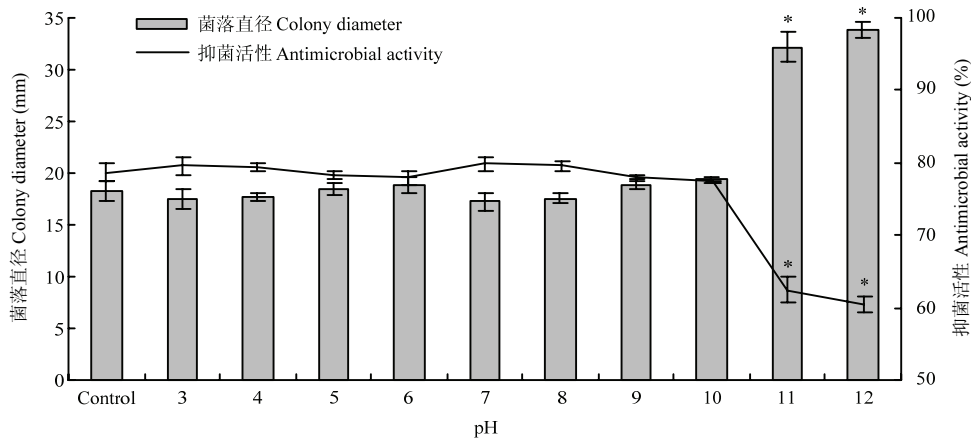


注: \*表示显著性差异  $P < 0.05$ 。

Note: \* indicated significant difference,  $P < 0.05$ .

图 4 温度对菌株 GB519 抗菌蛋白抑菌活性的影响

Fig. 4 Effect of temperature on antimicrobial activity of antagonistic protein of strain GB519



注: \*表示显著性差异  $P < 0.05$ 。

Note: \* indicated significant difference,  $P < 0.05$ .

图 5 pH 对菌株 GB519 抗菌蛋白抑菌活性的影响

Fig. 5 Effect of pH on antimicrobial activity of antagonistic protein of strain GB519

2.2.5 抗酶解稳定性试验 胰蛋白酶、蛋白酶 K 和胃蛋白酶处理抗菌蛋白后, 对其抑菌活性变化不显著, 表明该抗菌蛋白在以上 3 种酶中较稳定 (图 6)。

### 2.3 抗菌蛋白的抑菌谱

菌株 GB519 抗菌蛋白对 7 种作物病原真菌进行抑菌谱试验, 均有不同程度抑制菌丝生长的作用, 其中对茄子菌核病菌的抑制作用最明显, 菌落直径为 23.5 mm, 抑菌活性达到 72.7%; 其次对水稻立枯病菌、纹枯病菌和恶苗病菌的抑菌活性 49.4%~62.0%, 对另外 3 种作物病原真菌抑菌活性低于 40.0% (表 1)。

### 2.4 抗菌蛋白防治叶瘟试验

温室条件下先喷雾 GB519 抗菌蛋白, 然后接种稻瘟病菌, 接种 7 d 后调查统计稻瘟病叶瘟病情指数, 抗菌蛋白对叶瘟的病情指数为 9.5, 与对照组的病情指数 48.5 相比, 对叶瘟的防效达到了 80.1% (表 2)。

## 3 讨论

水稻稻瘟病是世界范围内严重影响水稻产量和质量的主要病害<sup>[16]</sup>。利用生防菌剂防控稻瘟病, 不仅能够直接抑制稻瘟病菌菌丝的生长、侵入和扩展, 而且能够促进水稻植株生长、诱导产生抗性和增强抗病能力, 从而有效减轻病害发生所造成的产量和品质的下降<sup>[17,18]</sup>。

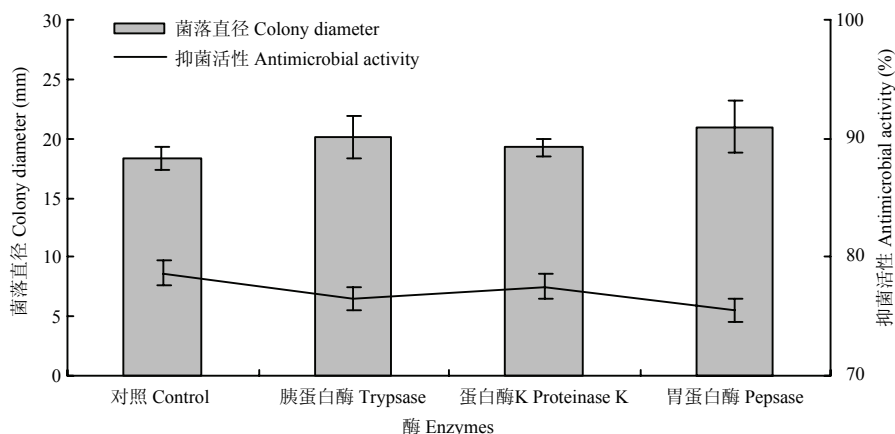


图 6 酶类对菌株 GB519 抗菌蛋白抑菌活性的影响

Fig. 6 Effect of various enzymes on antimicrobial activity of antagonistic protein of strain GB519

表 1 菌株 GB519 抗菌蛋白对多种作物病原菌的抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activity against multiple crop pathogens by GB519 antagonistic protein *in vitro*

病原菌 Pathogens	菌落直径 Colony diameter (mm)	抑菌活性 Antimicrobial activity (%)
茄子菌核病 <i>S. sclerotiorum</i>	23.5 ± 1.5 e	72.7 a
水稻立枯病菌 <i>F. graminearum</i>	32.7 ± 3.1 d	62.0 b
水稻纹枯病菌 <i>R. solani</i>	37.0 ± 0.5 c	57.0 c
水稻恶苗病菌 <i>F. moniliforme</i>	43.5 ± 0.9 b	49.4 d
黄瓜灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	57.8 ± 1.9 a	32.7 e
西瓜炭疽病菌 <i>C. lagenarium</i>	58.8 ± 0.8 a	31.6 e
西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	60.0 ± 3.0 a	30.2 e

注：表中数据为平均值 ± 标准误，不同字母表示 0.05 水平差异显著。下同。

Note: Data were presented as mean ± SE, data with the different letters indicated significant difference at 0.05 level. The same below.

表 2 抗菌蛋白在温室条件下对叶瘟的生防效果

Table 2 Biocontrol efficacy of GB519 antagonistic protein on leaf blast under greenhouse condition

处理 Treatments	病情指数 Disease index	生防效果 Biocontrol efficacy (%)
抗菌蛋白 Antagonistic protein	9.5 ± 1.6 b	80.1 ± 4.6
对照 Control	48.5 ± 5.0 a	—

自从枯草芽胞杆菌中发现伊枯草菌素以来，越来越多的抗菌蛋白被发现。理化性质稳定的抗菌蛋白是生产应用的关键。而不同菌株抗菌蛋白的理化性质丰富多样，具有不同的耐热性和耐酸碱性，对酶的稳定性的差异较大。本研究从枯草芽胞杆菌 GB519 胞外代谢产物中，通过酸沉的方式获得了抗菌蛋白，该蛋白对光照和紫外线照射（0~24 h）稳定，与对紫外线照射（0~12 h）不敏感的粗蛋白相似<sup>[19]</sup>。有些已报道的抗菌蛋白具有耐高温的特性。如刘静等<sup>[20]</sup>从菌株 JA 中获得环状脂肽，121 °C 处理 10 min 后活性没有降低，处理 120 min 后活性仅下降 25%；Zhao 等<sup>[21]</sup>从菌株 XF-1 中分离到抗菌蛋白 PBT1，在 100 °C 处理 20 min 后保持 100% 活性，121 °C 处理 20 min 后保持 60% 的活性。但并不是所有的抗菌蛋白都具有耐高温的能力，部分抗菌蛋白在 100 °C 以上高温处理后，活性部分或者全部丧失。如 Krid 等<sup>[22]</sup>研究表明菌株 F1、F-4 和 B2 的抗菌蛋白 80 °C 处理 30 min 活性无影响，100 °C 处理 30 min 活性完全丧失；还有 Li 等<sup>[23]</sup>研究发现抗菌蛋白 B29I 在 80 °C 以下活性稳定，高于 100 °C 无活性；耐热性最不稳定的是裴韬等<sup>[24]</sup>从菌株 P72 中获得的拮抗蛋白，仅在 60 °C 以下稳定。而菌株 GB519 产生的抗菌蛋白在 40 °C~100 °C 处理 1 h 后活性无变化，121 °C 高温高压处理 30 min 后活性仅下降 7.4%，比文献报道的蛋白更耐高温，可能该蛋白具有更稳定的结构，具有进一步研究的价值。

不同的抗菌蛋白具有不同的耐酸碱性。抗菌蛋白 EP-2 在 pH 5 活性最高, 减少或增大 pH 活性均降低, pH 11 以上无活性<sup>[9]</sup>。菌株 P72 的抗菌蛋白在中性和酸性条件下稳定<sup>[24]</sup>, 菌株 AF0907 和 B2 的抗菌蛋白只在中性条件下比较稳定<sup>[10,22]</sup>, 而菌株 JA 和 B115 的抗菌蛋白在偏酸至偏碱条件下比较稳定<sup>[20,25]</sup>。而菌株 GB519 的抗菌蛋白在 pH 2.0~10.0 活性稳定, pH 11.0~12.0 活性仅下降了 14.9%和 18.1%, 与菌株 B034 的抗菌蛋白 (pH 4~12) 相似, 对酸碱适应度宽<sup>[26]</sup>, 比已报道蛋白更耐酸碱。

不同菌株间的抗菌蛋白对酶稳定性差别非常明显, 菌株 B115 和 B034 的抗菌蛋白仅对胰蛋白酶稳定, 对蛋白酶 K 处理后活性分别降低了 21.4%和 26.7%<sup>[25,26]</sup>。菌株 B-916 的抗菌蛋白对蛋白酶 K 和胰蛋白酶都不稳定, 处理后活性分别下降了 75%和 20%<sup>[27]</sup>。还有菌株 E1R-J、AF0907 和 B2 对蛋白酶 K 稳定性差, 活性分别下降了 71.9%、60.68%和 100%<sup>[9,10,22]</sup>。而菌株 GB519 抗菌蛋白对蛋白酶 K、胰蛋白酶活性比较稳定, 与环状脂肽<sup>[20]</sup>相似。

菌株 GB519 抗菌蛋白在温室条件下对水稻叶瘟的防治效果达 80.1%。该蛋白不但对水稻稻瘟病菌具有很好的抑制作用, 而且对其他 7 种作物病原真菌均有不同程度的抑菌活性, 具有抗菌谱广泛的特点。生防菌发挥作用与其产生多种次级代谢产物如丰原素 fengycin<sup>[28]</sup>、伊枯草菌素 iturin<sup>[29]</sup>和表面活性素 surfactin<sup>[30]</sup>等脂肽类物质相关。而脂肽类物质是研究较多的一类抑菌活性物质, 具有较强的抑制真菌、细菌和病毒等活性, 从而在生物农药上具有非常广泛的应用价值<sup>[31,32]</sup>。本研究结果表明, 菌株 GB519 产生的抗菌粗蛋白是一类脂肽类物质, 与已报道的抗菌蛋白相比, 菌株 GB519 抗菌蛋白理化性质更稳定, 即耐酸碱又耐高温, 抗酶解能力稳定, 是发挥作物病害防治效果的关键因素, 具有进一步开发成新型生防产品的潜力。有关菌株 GB519 抗菌蛋白结构正在进行解析。本研究分析枯草芽孢杆菌 GB519 抗菌蛋白的特性, 将为揭示该菌株防治水稻稻瘟病的机理、提高防治效果和挖掘代谢基因奠定基础, 也为该抗菌蛋白的应用提供更为广阔的发展前景。

## 参 考 文 献

- [1] Yasin F D, Kae Y, Gulay D. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. Science, 2012, 336(6088): 1590-1595.
- [2] Miah G, Rafii M Y, Ismail M R, et al. Blast resistance in rice: a review of conventional breeding to molecular approaches[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 40: 2369-2388.
- [3] Todorova S, Kozuharova L. Characteristics and antimicrobial activity of *Bacillus subtilis* strains isolated from soil[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2010, 26: 1207-1216.
- [4] 张丽霞, 李荣禧, 王琦, 等. 枯草芽孢杆菌发酵培养基的优化[J]. 中国生物防治, 2006, 22(S): 82-88.
- [5] Tokpah D P, Li H W, Wang L Y, et al. An assessment system for screening effective bacteria as biological control agents against *Magnaporthe grisea* on rice[J]. Biological Control, 2016, 103(1): 21-29.
- [6] Ghasemi S, Ahmadian G, Sadeghi M, et al. First report of a bifunctional chitinase/lysozyme produced by *Bacillus pumilus* SG2[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48(3): 225-231.
- [7] Huang X, Yong X, Zhang R, et al. The supernatant of *Bacillus pumilus* SQR-N43 has antifungal activity towards *Rhizoctonia solani*[J]. Journal of Basic Microbiology, 2013, 53(8): 657-663.
- [8] 沙月霞, 王琦, 李燕. 稻瘟病生防芽孢杆菌的筛选及防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(4): 474-484.
- [9] Wang N N, Yan X, Gao X N, et al. Purification and characterization of a potential antifungal protein from *Bacillus subtilis* E1R-J against *Valsa mali*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32: 63.
- [10] 胡晓丹, 王建伟, 李孝敬, 等. 赤霉病菌拮抗菌 *Bacillus subtilis* AF0907 抗菌物质研究[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(3): 378-385.
- [11] 于杰, 张荣意, 谭志琼, 等. 枯草芽孢杆菌 B25 抗真菌作用及抗菌蛋白的分离纯化[J]. 基因组学及应用生物学, 2016, 35(3): 629-634.
- [12] Rao Q, Guo W B, Chen X H. Identification and characterization of an antifungal protein, AfAFP<sub>R9</sub>, produced by marine-derived *Aspergillus fumigatus* R9[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015, 25(5): 620-628.
- [13] 王法国, 许婷婷, 张荣胜, 等. 解淀粉芽孢杆菌干悬浮剂对稻瘟病的防治效果及安全性评价[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(2): 241-247.
- [14] Chen H, Wang L, Su C X, et al. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(3): 180-186.

- [15] Prabavathy V R, Mathivanan N, Murugesan K. Control of blast and sheath blight diseases of rice using antifungal metabolites produced by *Streptomyces* sp. PM5[J]. *Biological Control*, 2006, 39(3): 313-319.
- [16] Spence C, Alff E, Johnson C, *et al.* Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections[J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 130.
- [17] Meng X K, Yu J J, Yu M N, *et al.* Dry flowable formulations of antagonistic *Bacillus subtilis* strain T429 by spray drying to control rice blast disease[J]. *Biological Control*, 2015, 85(1): 46-51.
- [18] Fan H Y, Ru J J, Zhang Y Y, *et al.* Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease[J]. *Microbiological Research*, 2017, 199: 89-97.
- [19] 黄娜, 周莉质, 费丹, 等. 枯草芽胞杆菌胞外抗菌蛋白的初步分离及性质的研究[J]. *植物保护*, 2015, 41(6): 49-54.
- [20] 刘静, 王军, 姚建铭, 等. 枯草芽胞杆菌 JA 抗菌物特性的研究及抗菌肽的分离纯化[J]. *微生物学报*, 2004, 44(4): 511-514.
- [21] Zhao J, Wu Y X, Ho H H, *et al.* PBT1, a novel antimicrobial protein from the biocontrol agent *Bacillus subtilis* XF-1 against *Plasmodiophora brassicae*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2016, 145(3): 583-590.
- [22] krid S, Rhouma A, Mogou I, *et al.* *Pseudomonas savastanoi* endophytic bacteria in olive tree knots and antagonistic potential of strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2010, 92(2): 335-341.
- [23] Li J, Yang Q, Zhao L H, *et al.* Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29[J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2009, 10(4): 264-272.
- [24] 裴韬, 任大明, 石皎. 小麦赤霉病拮抗菌 P72 抗菌物质的分离纯化和性质研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(6): 2576-2577.
- [25] 沈锦玉, 尹文林, 曹铮, 等. 枯草芽胞杆菌 B115 抗菌蛋白的分离纯化及部分性质[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(6): 689-693.
- [26] 童有仁, 马志超, 陈卫良, 等. 枯草芽胞杆菌 B034 拮抗蛋白的分离纯化及特性分析[J]. *微生物学报*, 1999, 39(4): 339-343.
- [27] 陈志谊, 许志刚, 陆凡, 等. 拮抗细菌 B-916 培养液对水稻纹枯病的抗生活性及其抗菌物质的研究[J]. *江苏农业科学*, 2000, 16(3): 148-152.
- [28] Magali D, Michel P. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94: 2667-2679.
- [29] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structure, syntheses and specific functions[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 845-857.
- [30] Carrillo C, Teruel J A, Aranda F J, *et al.* Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin[J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2003, 1611(1-2): 91-97.
- [31] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(1): 115-125.
- [32] 穆常青, 刘雪, 陆庆光, 等. 枯草芽胞杆菌 B-332 菌株对稻瘟病的防治效果及定殖作用[J]. *植物保护学报*, 2007, 34(2): 123-128.