

特基拉芽胞杆菌JN-369抗菌粗蛋白的理化性质和抑菌效果

周 瑚^{1,2,3}, 胡 玲¹, 余曦玥¹, 朱华琚^{1,2,3}, 任佐华^{1,2*}, 刘二明^{1,2,3*}

(1. 湖南农业大学植物保护学院, 长沙 410128; 2. 植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 长沙 410128;

3. 南方粮油作物协同创新中心, 长沙 410128)

摘要: 特基拉芽胞杆菌 *Bacillus tequilensis* JN-369 是 1 株对稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae* 有较好拮抗作用的植物内生细菌, 其发酵液经硫酸铵沉淀后得到抗菌粗蛋白。为明确菌株 JN-369 抗菌粗蛋白的抑菌机理, 首先确定了该抗菌粗蛋白抑菌谱、热稳定性、酸碱稳定性、紫外稳定性以及酶稳定性, 并观察研究了抗菌粗蛋白对稻瘟病菌菌丝和分生孢子的抑制作用。并采用针刺离体接种法测定了 40% 稻瘟灵 EC、25% 三环唑 WP 及不同浓度 JN-369 抗菌粗蛋白对水稻稻瘟病的拮抗效果。结果表明: 菌株 JN-369 抗菌粗蛋白抑菌谱广, 对葡萄灰霉病菌、草莓灰霉病菌和水稻稻瘟病菌等 13 种植物病原真菌及卵菌表现出抑制作用, 而对油菜菌核病菌没有抑制作用; 该粗蛋白理化性质相对稳定, 具有应用于粮食作物生物防治的潜力; 对稻瘟病菌的菌丝生长和分生孢子萌发有双重抑制作用, 能使病原菌菌丝细胞膨大, 并可抑制病菌分生孢子的萌发; 离体防效试验显示, 供试杀菌剂对水稻稻瘟病均有显著的拮抗效果, 菌株 JN-369 抗菌粗蛋白在浓度为 50~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对稻瘟病的拮抗效果最好, 该菌株有望开发为防治稻瘟病的生防菌株。

关键词: 稻瘟病菌; 特基拉芽胞杆菌; 抗菌粗蛋白; 生物防治

中图分类号: S476 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-9261(2020)02-0211-09

Physical and Chemical Properties and Inhibitory Effect of Crude Antifungal Protein Produced by *Bacillus tequilensis* JN-369

ZHOU Hu^{1,2,3}, HU Ling¹, YU Xiyue¹, ZHU Huajun^{1,2,3}, REN Zuohua^{1,2*}, LIU Erming^{1,2,3*}

(1. College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China; 3. Southern Regional Collaborative Innovation Center for Grain and Oil Crops in China, Changsha 410128, China)

Abstract: *Bacillus tequilensis* strain JN-369 is a biocontrol strain with antagonism on *Magnaporthe oryzae*. The antifungal protein crude extraction was precipitated by ammonium sulphate after fermentation. To determine the antifungal mechanism of the crude protein the inhibition spectrum, thermostability, acid-base stability, UV stability and enzyme stability were investigated, the inhibition effect to *M. oryzae* hyphae and spores was observed, and the antagonistic effects of 40% Isoprothiolane EC, 25% Tricyclazole WP and the crude antifungal protein against *M. oryzae* in rice were detected by tissue inoculation *in vitro*. Results indicated that the crude antifungal protein of the strain JN-369 had a broad inhibition spectrum, with inhibition activity on 13 plant pathogenic fungi and oomycetes, such as *B. cinerea*, *M. oryzae*, but no inhibition on *S. sclerotiorum*. The crude protein still had antifungal activity after heat treatment, pH treatment, UV treatment and enzyme treatment, indicating it has potential application value in biocontrol of food crops. After treatment with crude protein, *M. oryzae* hyphae became enlargement and could inhibit conidiospores germination. The *in vitro* efficacy experiments showed that

收稿日期: 2019-05-25

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0300700); 中央财政专项(2014ZX0800102B); 公益性行业(农业)科研专项(201203014)

作者简介: 周瑚, 博士生, E-mail: zhouhu@stu.hunau.edu.cn; *通信作者, 博士, 教授, E-mail: ermingliu@163.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2020.02.006

all treatments had significant antagonistic effects on rice blast, and the crude antifungal protein at 50 ug/mL to 100 ug/mL had the best antagonistic effect on rice blast. The strain JN-369 was expected to be developed as a Biocontrol Strain for the control of rice blast.

Key words: *Magnaporthe oryzae*; *Bacillus tequilensis*; crude antifungal protein; biocontrol

稻瘟病菌（有性世代：*Magnaporthe oryzae*，无性世代：*Pyricularia oryzae*）引起的水稻稻瘟病是一种严重危害水稻产量和品质的真菌病害，全球每年造成的稻产损失约占总产量的 10%~30%^[1]，对农业经济造成了重大的损失。国内外学者在预防、治理水稻稻瘟病方面做了大量工作，目前稻瘟病的防治主要使用抗病品种、化学防治和生物防治。其中化学杀菌剂的使用虽然效果较好，但潜在的病原菌抗药性风险及对生态环境和人类健康的危害不容忽视^[2,3]。随着绿色农业、有机农业的兴起，开发和利用生物农药防治稻瘟病得到了飞速发展，目前被用于稻瘟病的生防微生物很多，包括芽胞杆菌 *Bacillus*^[4]、尖角突脐孢菌 *Exserohilum monoceras*、假单胞菌 *Pseudomonadaceae* spp.、放线菌 *Actinomyces* *bovis* spp.、木霉菌 *Trichoderma* spp.、小单孢菌 *Micromonospora* spp.、无色杆菌 *Achromobacter* spp.、粘质沙雷氏菌 *Serratia marcescens* 和离蠕孢 *Bipolaris* spp. 等^[5]。

芽胞杆菌属能形成芽胞且具有较好地抑制较多植物病原物的能力，是被广泛应用于农业领域的生物防治剂，特基拉芽胞杆菌 *Bacillus tequilensis* 是芽胞杆菌属的一个成员，最早于 2006 年由学者 Gatson 等^[6]在墨西哥中西部的哈利斯科州的一个墓穴中获得并命名。之后一些学者对特基拉芽胞杆菌做了相关的研究，发现特基拉芽胞杆菌是具有较高生防潜力的芽胞杆菌，对许多病菌具有抑菌活性。Gholami 等^[7]从大豆根中分离获得一株对大豆炭疽病菌 *Colletotrichum truncatum* 具有抑制作用的特基拉芽胞杆菌，袁雪等^[8]从高产桃园土壤中分离获得一株对美澳型核果链核盘菌 *Monilinia fructicola* 具有很好抑制作用的特基拉芽胞杆菌，张猛等^[9]从番茄植株中分离获得特基拉芽胞杆菌 wm031 对西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 具有显著抑制作用，谢洁等^[10]从桑树品种川 7637 植株中分离获得特基拉芽胞杆菌 7PJ-16 不仅对桑椹核地杖菌 *Scleromitrua shiraiana* 具有很好的抑制作用，而且可以促进桑树的生长。

笔者课题组前期从感病水稻品种湘早籼 24 号病丛中的健康植株茎叶内筛选获得一株拮抗细菌特基拉芽胞杆菌 JN-369 (GenBank: MG004174)，对稻瘟病菌具有显著的抑制作用，为明确该菌产生抑菌效果的有效抗菌物质，本文对该菌株拮抗蛋白的理化性质、抑菌谱和抑菌机理进行研究，以期进一步为该抗菌蛋白应用于稻瘟病的生物防治奠定理论基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试菌株包括拮抗菌：特基拉芽胞杆菌 JN-369；病原菌：水稻稻瘟病菌、葡萄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、草莓灰霉病菌 *B. cinerea* Pers.、水稻纹枯病菌 *Rhizoctonia solan*、水稻稻曲病菌 *Ustilaginoidea virens*、柑橘沙皮病菌 *Diaporthe citri*、烟草黑胫病菌 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、辣椒枯萎病菌 *F. oxysporum*、香樟炭疽病菌 *C. gloeosporioides*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternate*、马铃薯早疫病菌 *A. solani*、棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 和油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*，菌种保存于湖南农业大学植物病原微生物及水稻病害实验室。

供试水稻品种：玉针香和湘晚籼 12 号均购自湖南金色农丰种业有限公司，Y 两优 1998 购自湖南希望种业科技股份有限公司，种植于湖南农业大学植物保护学院教学基地温室。

供试杀菌剂 40%稻瘟灵乳油（EC）和 20%三环唑可湿性粉剂（WP），均购自长沙科发贸易公司农药经营部。

1.2 抗菌粗蛋白的提取

采用硫酸铵分级盐析法^[11]提取菌株 JN-369 抗菌粗蛋白。用接种环挑取一环菌株 JN-369，接种于装有 50 mL 新鲜 NB 培养液的 100 mL 锥形瓶中，于 28 ℃、180 r/min 振荡培养 24 h 至对数生长期，获得种子发酵液；将种子发酵液按照体积分数为 1%的接种量接种于装有 200 mL 新鲜 NB 培养液的 300 mL 锥形瓶

中,于 28 ℃、180 r/min 振荡培养 48 h,获得 JN-369 菌悬液;将该菌悬液于 4 ℃、10000 r/min 离心 15 min,弃菌体,取上清液;向上清液中加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至饱和度为 80%,振荡混匀,于 4 ℃静置 48 h,析出蛋白沉淀;再于 10000 r/min 离心 15 min 后,收集沉淀;用体积分数为 5%的 PBS 缓冲液对获得的沉淀进行溶解悬浮,再置于透析袋(8 000~14000 D)中采用相同浓度的 PBS 缓冲液透析除盐,经 0.22 μm 细菌过滤器过滤,即得菌株 JN-369 的抗菌粗蛋白,于 4 ℃保存。使用 Nano Drop 检测蛋白样品浓度。重复检测 3 次。

1.3 抗菌粗蛋白的抑菌活性测定

将直径为 6 mm 的稻瘟病菌菌饼接种至 PDA 平板中央,距菌饼中央左右两侧 25 mm 处各打一直径 6 mm 的孔,试验组孔内注入 40 μL 800.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 菌株 JN-369 抗菌粗蛋白,对照组孔内注入 40 μL PBS 缓冲液。每处理重复 3 次。于 28 ℃恒温培养,待对照菌落直径达到培养皿直径 3/4 以上时,观察并测量各皿菌落直径,计算菌株 JN-369 抗菌粗蛋白对病原菌生长的抑制率($I/\%$)^[12]。

1.4 抗菌粗蛋白的抑菌谱测定

采用平板对峙法^[13]测定菌株 JN-369 抗菌粗蛋白对葡萄灰霉病菌、草莓灰霉病菌、水稻稻瘟病菌、水稻纹枯病菌、水稻稻曲病菌、柑橘沙皮病菌、烟草黑胫病菌、小麦赤霉病菌、香樟炭疽病菌、烟草赤星病菌、棉花黄萎病菌、辣椒枯萎病菌、马铃薯早疫病菌、油菜菌核病菌 14 种病原真菌和卵菌的抑制作用。

1.5 抗菌粗蛋白理化性质测定

温度对抗菌粗蛋白抑菌活性的影响^[14]:将质量浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗菌粗蛋白分别置于-20 ℃、4 ℃、20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃、60 ℃、70 ℃、80 ℃、90 ℃、100 ℃和 121 ℃处理 30 min,再置于冰上迅速冷却至室温。以稻瘟病菌为指示菌,测定热处理后的蛋白提取物的抑菌活性的变化,每个处理重复 3 次,以相同质量浓度未经处理的抗菌粗蛋白为对照。

pH 对抗菌粗蛋白抑菌活性的影响:将质量浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗菌粗蛋白经 1 mol/L 的盐酸溶液和氢氧化钠溶液分别调节 pH 至 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0,将溶液 4 ℃保存过夜,再将各 pH 值用盐酸溶液和氢氧化钠溶液全部调整为 7.0。以稻瘟病菌为指示菌,测定 pH 处理后的蛋白提取物的抑菌活性的变化,每个处理重复 3 次,以相同质量浓度未经处理的抗菌粗蛋白为对照。

蛋白酶对抗菌粗蛋白抑菌活性的影响:将质量浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗菌粗蛋白分别与 1 mg/mL 的蛋白酶 K、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶、碱性蛋白酶等量混合,在 37 ℃条件下处理 60 min,而后在 100 ℃的水浴锅中处理 5 min,以使蛋白酶失活。以稻瘟病菌为指示菌,测定酶处理后的蛋白提取物的抑菌活性的变化,每个处理重复 3 次,以相同质量浓度未经处理的抗菌粗蛋白为对照。

紫外对抗菌粗蛋白抑菌活性的影响:将质量浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗菌粗蛋白置于 28 W 紫外灯下,距离 10 cm 处,分别照射处理 0.25、0.5、0.75、1、2、4、6 和 12 h。以稻瘟病菌为指示菌,测定紫外处理后的蛋白提取物的抑菌活性的变化,每个处理重复 3 次,以相同质量浓度未经处理的抗菌粗蛋白为对照。

1.6 抗菌粗蛋白对稻瘟病菌菌丝生长的影响

在 PD 液体培养基(50 mL/250 mL)中接入一块稻瘟病菌菌饼,将质量浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的抗菌粗蛋白加入三角瓶中,于 28 ℃、180 r/min 摇床培养,1、2、3、4 和 5 d 后分别镜检,观察菌丝的变化。每个处理重复 3 次,对照组菌丝液中添加等体积的无菌水。

1.7 抗菌粗蛋白对稻瘟病菌孢子的影响

利用血球计数板将稻瘟病菌孢子悬浮液的浓度调节为 2×10^5 孢子/mL^[15],加入适量 0.1%的 Tween-20 溶液备用。分别取抗菌粗蛋白溶液与稻瘟病菌孢子悬浮液等体积混合于无菌 PE 管中,对照组稻瘟病菌孢子悬浮液中添加等体积的无菌水。28 ℃静置培养,2、4、6、8、10 和 12 h 分别镜检,统计视野内孢子的总数和萌发的孢子数。

1.8 抗菌粗蛋白对离体水稻叶瘟的拮抗效果

采用针刺离体接种法^[16],将抗菌粗蛋白用适量无菌水配置成系列质量浓度 25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗菌粗蛋白溶液。在水稻 5 叶期选取大小相近的健康叶片,在水稻叶面喷施不同浓度的抗菌粗蛋白,以喷施 40%稻瘟灵可湿性粉剂 500 倍稀释液、20%三环唑可湿性粉剂 750 倍稀释液、清水的水稻叶片为试验对

照。试验设2个处理：(1)先喷施药剂，24 h后在每个叶片表面接种稻瘟病菌孢子悬浮液(-24 h)；(2)先在每个叶片表面接种稻瘟病菌孢子悬浮液，24 h后喷施药剂(+24 h)。将处理好的材料置于相对湿度100%，28 °C完全黑暗处理24 h，然后光暗交替(10L:14D)培养5 d，记录发病情况，计算拮抗效果^[17]。

1.9 数据统计与分析

试验数据均采用 Excel 2017 和 SPSS 20.0 统计软件进行处理分析。

2 结果与分析

2.1 抗菌粗蛋白抑菌谱

采用平板对峙法测定菌株 JN-369 抗菌粗蛋白对供试 14 株植物病原真菌及卵菌的抑制情况结果表明，菌株 JN-369 抗菌粗蛋白能够抑制 13 株植物病原真菌的生长，但抑菌活性存在差异，对葡萄灰霉病菌的抑菌效果最强，抑菌率达 49.00%，对草莓灰霉病菌、水稻稻瘟病菌等其他 13 株植物病原真菌或卵菌的生长也具有一定的抑制作用，而对油菜菌核病菌没有抑制作用，说明内生细菌 JN-369 的抗菌粗蛋白在病害防治中具有一定的应用价值(表 1)。

表 1 抗菌粗蛋白对各种病原菌的抑菌谱

Table 1 The antibacterial spectrum of antibacterial protein on various of pathogens

编号 No.	病原菌 Pathogens	抑制率 Inhibition rate (%)
1	葡萄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	49.00
2	草莓灰霉病菌 <i>B. cinerea</i> Pers.	33.36
3	水稻稻瘟病菌 <i>M. oryzae</i>	28.93
4	水稻纹枯病菌 <i>R. solan</i>	24.93
5	水稻稻曲病菌 <i>U. virens</i>	18.62
6	柑橘沙皮病菌 <i>D. citri</i>	16.41
7	烟草黑胫病菌 <i>P. parasitica</i> var. <i>nicotianae</i>	16.16
8	小麦赤霉病菌 <i>F. graminearum</i>	15.94
9	香樟炭疽病菌 <i>C. gloeosporioides</i>	15.58
10	烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	15.50
11	棉花黄萎病菌 <i>V. dahliae</i>	12.91
12	辣椒枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	11.45
13	马铃薯早疫病菌 <i>A. solani</i>	5.06
14	油菜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	0

2.2 温度对菌株抗菌粗蛋白抑制稻瘟病菌活性的影响

抗菌粗蛋白经-20 °C、4 °C、20 °C、30 °C处理30 min，其活性保持相对稳定；而当温度高于40 °C时，抑菌活性则出现显著差异，随温度升高其抑菌活性逐渐下降；100 °C高温处理30 min，仅能保持原有活性的36.44%；121 °C高温处理30 min，基本丧失抑菌活性(图1)。由此说明该抗菌粗蛋白对高温较敏感，在-20 °C~40 °C时，抗菌粗蛋白几乎保持原有的抑菌活性，表明该抗菌蛋白在自然环境下能够发挥效果，具有一定的开发应用潜力。

2.3 pH对菌株抗菌粗蛋白抑制稻瘟病菌活性的影响

该抗菌粗蛋白的抑菌活性随pH的升高呈现先增加后下降的趋势，pH对其抑菌活性影响显著($P < 0.05$)；在pH 6.0~7.0的情况下，抗菌粗蛋白保持了良好的抑菌活性；菌株对过酸和过碱的条件都比较敏感，说明该抗菌粗蛋白可耐受的pH范围较窄，pH会影响细胞中代谢酶的活性，从而对其生长和代谢造成影响，影响抗菌粗蛋白的抑菌活性(图2)。

2.4 蛋白酶对菌株抗菌粗蛋白抑制稻瘟病菌活性的影响

与对照相比，抗菌粗蛋白经蛋白酶K、碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、链蛋白酶处理后，其对水稻稻瘟病菌的抑菌活性显著下降；尤其是经蛋白酶K处理后，该抗菌粗蛋白几乎丧失抑菌活

性；抗菌粗蛋白对胰蛋白酶及胃蛋白酶处理敏感，表明该抗菌粗蛋白可被人体消化系统中的蛋白酶消化掉，不会影响肠道内有益微生物菌群，也不会对人体产生不利的影响（图 3）。

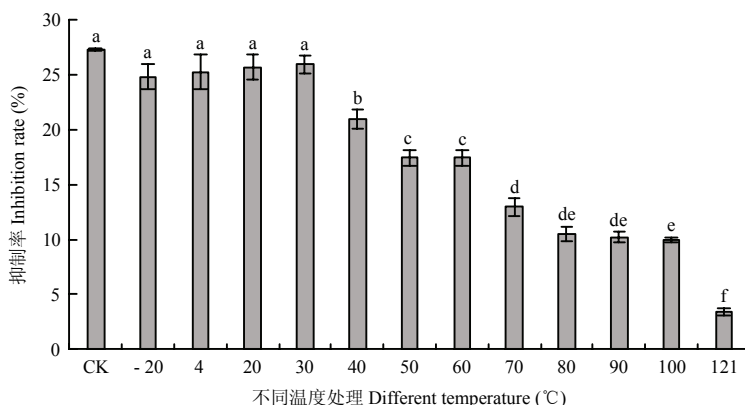


图 1 温度对抗菌粗蛋白抑制稻瘟病菌活性的影响

Fig. 1 Effect of different temperature on the activity of antifungal crude protein against *M. oryzae*

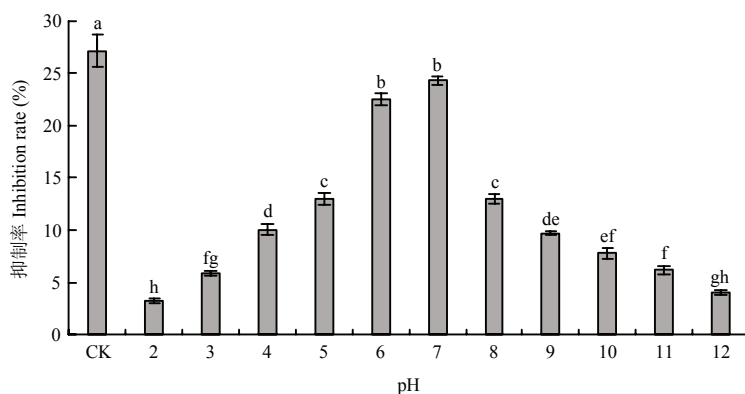


图 2 pH 对抗菌粗蛋白抑制稻瘟病菌活性的影响

Fig. 2 Effect of different pH on the activity of antifungal crude protein against *M. oryzae*

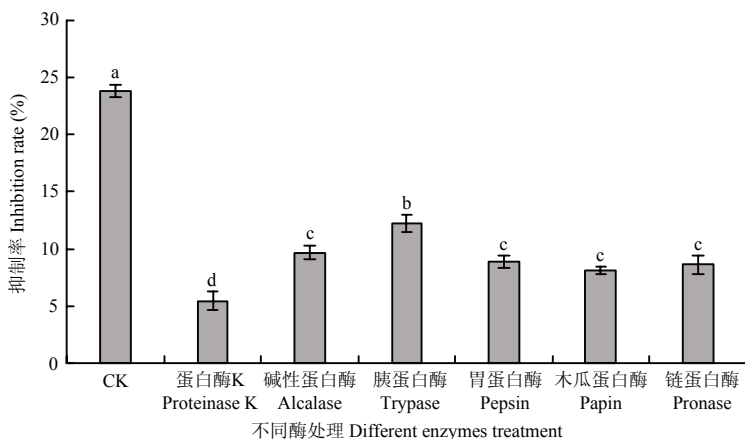


图 3 不同蛋白酶对抗菌粗蛋白抑制稻瘟病菌活性的影响

Fig. 3 Effect of different proteinases on the activity of antifungal crude protein against *M. oryzae*

2.5 紫外线对菌株抗菌粗蛋白抑制稻瘟病菌活性的影响

紫外线照射抗菌粗蛋白 12 h 后，其抑菌活性保持稳定，抑菌活性均在原有活性的 90% 以上，说明抗菌粗蛋白对紫外线照射不敏感，具有较好的抗紫外线能力（图 4）。

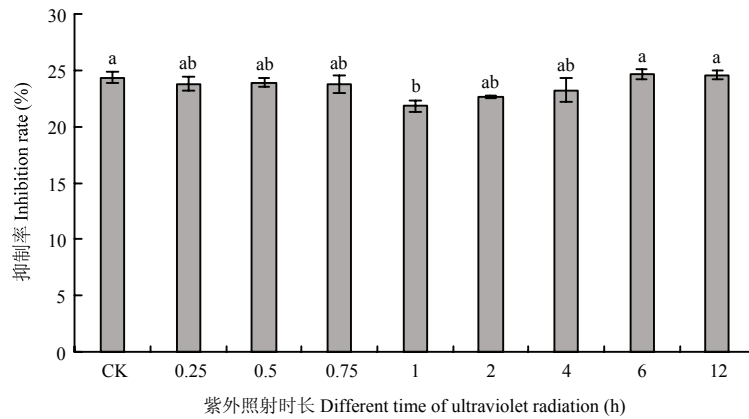
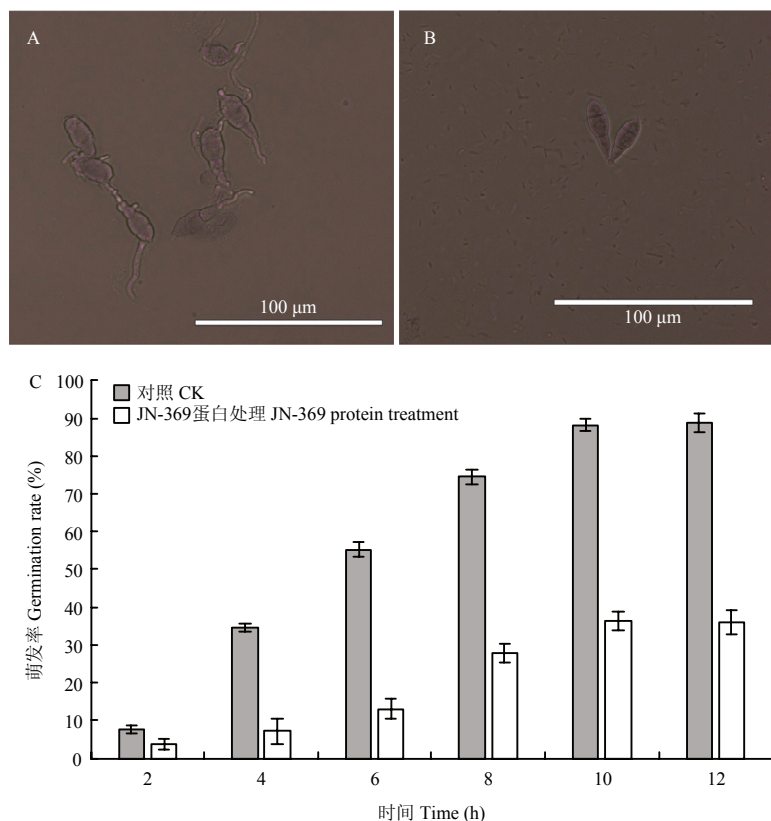


图4 紫外照射时间对抗菌粗蛋白抑制稻瘟病菌活性的影响

Fig. 4 Effect of different time of ultraviolet radiation on the activity of antifungal crude protein against *M. oryzae*

2.6 抗菌粗蛋白的抑菌效果

2.6.1 菌株 JN-369 抗菌粗蛋白对稻瘟病菌孢子萌发的作用 经抗菌蛋白处理的孢子悬液置于 28 °C 培养箱暗培养 12 h 结果表明, 菌株 JN-369 抗菌粗蛋白对水稻稻瘟病菌分生孢子的萌发具有抑制作用, 随着时间的延长, 对孢子萌发抑制率逐渐显著, 12 h 后对照组稻瘟病菌分生孢子的萌发率为 88.72%, 而抗菌蛋白处理的孢子萌发率仅为 36.00%, 下降了 52.72%, 表明抗菌粗蛋白对稻瘟病菌孢子萌发具有强烈的抑制作用 (图 5)。

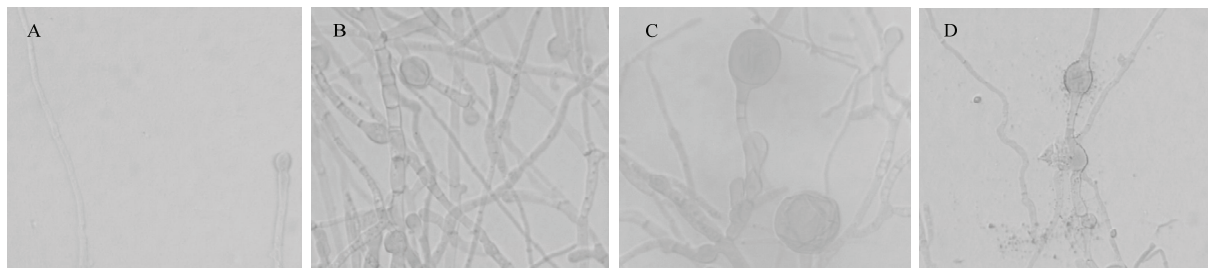


A: 对照处理 12 h Treated for 12 h as control; B: 200 µg/mL 抗菌粗蛋白处理 12 h Treated for 12 h with 200 µg/mL crude antimicrobial protein; C: 菌株 抗菌粗蛋白对稻瘟病菌孢子萌发的抑制作用 The inhibitory effect of the antifungal protein against conidiospore germination rate of *M. oryzae*

图5 抗菌粗蛋白对稻瘟病菌分生孢子萌发的抑制作用

Fig. 5 Inhibiting effect of antifungal crude protein against conidium germination activity of *M. oryzae*

2.6.2 菌株 JN-369 抗菌粗蛋白对稻瘟病菌菌丝生长的作用 观察经抗菌粗蛋白处理的稻瘟病菌菌丝的生长情况。显微观察发现, 未经处理的稻瘟病菌菌丝粗细均匀, 菌丝内部物质分布均匀; 经抗菌粗蛋白处理 24 h 后稻瘟病菌菌丝形态呈现扭曲异常、粗细不一、多处膨大等异常现象, 随着处理时间的加长, 菌丝内膨大物增多, 膨大扭曲加剧; 原生质溶解, 出现透明条带; 菌丝体壁破裂乃至溶解, 表明该抗菌粗蛋白能够抑制稻瘟病菌菌丝体的生长 (图 6)。



A: 对照菌丝 The control mycelium; B、C、D 为抗菌粗蛋白处理过的菌丝 Treated with antimicrobial proteins

图 6 抗菌粗蛋白对水稻稻瘟病菌菌丝的影响 (400×)

Fig. 6 Effect of the antifungal protein on the *M. oryzae* mycelium (400×)

2.7 抗菌粗蛋白对离体水稻叶片稻瘟病的拮抗效果

不同质量浓度的菌株 JN-369 抗菌粗蛋白离体接种处理水稻叶片拮抗试验结果表明, 清水对照处理的植株, 发病率可达 77.26%~88.09%; 而经 25%三环唑 WP、40%稻瘟灵 EC 及 25~200 $\mu\text{g/mL}$ 菌株 JN-369 拮抗蛋白处理的水稻叶片, 其稻瘟病发病率明显降低; 从拮抗效果可以看出, 菌株 JN-369 蛋白在质量浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 拮抗效果相对最好, 发病率仅为 11.04%~21.85%; 且提前 24 h 施用抗菌粗蛋白的水稻叶片的发病率相对低于 24 h 后施用处理, 与对照药剂 25%三环唑可湿性粉剂 750 倍稀释液和 40%稻瘟灵乳油 500 倍稀释液的拮抗效果基本相当, 表明其在生产中具有预防和防治稻瘟病的应用潜力 (表 2)。

表 2 不同质量浓度的菌株 JN-369 抗菌粗蛋白对水稻稻瘟病的离体拮抗效果

Table 2 Effects of JN-369 crude antimicrobial protein with different concentration on rice blast control *in vitro*

处理 Treatment	玉针香 Yuzhenxiang		Y 两优 Yliangyou1998		湘晚籼 12 号 Xiangwanxian No.12	
	发病率-24 h Incidence (%)	发病率+24 h Incidence (%)	发病率-24 h Incidence (%)	发病率+24 h Incidence (%)	发病率-24 h Incidence (%)	发病率+24 h Incidence (%)
清水对照 CK	77.26 ± 7.01 a	84.94 ± 4.48 a	87.66 ± 2.04 a	88.09 ± 3.99 a	79.94 ± 5.99 a	84.07 ± 4.49 a
25%三环唑 tricyclazole WP	7.36 ± 0.67 d	56.31 ± 6.72 b	10.37 ± 0.64 d	56.30 ± 3.40 b	25.31 ± 1.75 b	46.11 ± 3.47 b
40%稻瘟灵 isoprothiolane EC	11.04 ± 1.00 cd	11.48 ± 1.70 d	18.40 ± 1.67 c	20.25 ± 1.86 f	22.96 ± 3.40 b	30.99 ± 2.04 c
25 $\mu\text{g/mL}$ JN-369 蛋白 protein	28.77 ± 1.83 b	37.12 ± 3.84 c	25.87 ± 0.84 b	39.81 ± 4.72 d	23.42 ± 2.47 b	28.77 ± 1.83 c
50 $\mu\text{g/mL}$ JN-369 蛋白 protein	14.71 ± 1.34 c	18.40 ± 1.67 d	10.25 ± 2.97d	30.00 ± 3.33 e	23.21 ± 5.56 b	20.74 ± 1.28 d
100 $\mu\text{g/mL}$ JN-369 蛋白 protein	11.04 ± 1.00 cd	14.38 ± 0.91 d	11.91 ± 3.99d	21.85 ± 1.70 f	11.20 ± 1.25 c	18.40 ± 1.67 d
200 $\mu\text{g/mL}$ JN-369 蛋白 protein	25.75 ± 2.34 b	37.90 ± 1.83 c	19.51 ± 0.85 c	48.95 ± 3.54 c	17.71 ± 4.87 bc	33.33 ± 3.34 c

注: 表中数据为平均数 ± 标准误, 同列数据后不同字母表示存在显著性差异 $P < 0.05$ 。

Note: Data were mean ± SE. Different lowercase letters in the same column indicated significant difference at 0.05 level.

3 讨论

特基拉芽胞杆菌 JN-369 的抗菌粗蛋白能有效抑制水稻稻瘟病菌菌丝的生长, 且抑菌谱广, 对草莓灰霉病菌等 14 种病原真菌及卵菌表现出一定的抑制作用; 其稳定性较好, 热处理、紫外照射、pH 对其抑菌活性影响较小, 且对碱性蛋白酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、链蛋白酶具有一定的耐受性。Oberoi 等^[18]报道, 抗菌蛋白的温度和酸碱度稳定性对其产品的生产开发应用起关键作用, 在 pH 8.0~11.0、70 °C 内环境条件下, 仍能保持较高抑菌活性的抑菌蛋白具有更大的工业生产前景。特基拉芽胞杆菌 JN-369 的

抗菌粗蛋白具有较宽的温度适应范围,在60℃处理30min条件下依然可保持较高的抑菌活性;对紫外线照射不敏感;常见作物种植适宜的土壤酸碱度为pH5.0~8.0^[19],该抗菌蛋白能够应用于一般作物的自然生长环境条件。对蛋白酶的敏感性也是评价抗菌蛋白是否具有应用价值的重要指标之一,不同芽胞杆菌产生的抗菌蛋白对不同蛋白酶的敏感性各异,周盈等^[20]发现枯草芽胞杆菌BSn5的抗菌蛋白对胰蛋白酶不敏感,对蛋白酶K敏感;王青华等^[21]发现贝莱斯芽胞杆菌*B. velezensis* DH82菌株的抗菌粗蛋白对胃蛋白酶、胰蛋白酶、蛋白酶K及木瓜蛋白酶均不敏感。特基拉芽胞杆菌JN-369的抗菌粗蛋白对胰蛋白酶及胃蛋白酶处理敏感,表明可被人体消化系统中的蛋白酶消化掉,对人体健康无害;这些特性说明该抗菌粗蛋白具有应用于粮食作物生物防治的潜力。这些差异说明不同芽胞杆菌产生的抗菌蛋白对一些物质的敏感性有较大的差异。菌株JN-369抗菌粗蛋白能明显抑制孢子萌发及菌丝生长,并导致菌丝生长畸形,使菌丝不能正常分化、产孢,由此推断,该抗菌粗蛋白可能是通过抑制病原菌的孢子萌发和菌丝溶解来发挥作用的。这与目前国内外报道的生防菌抗菌物质主要是通过抑制孢子萌发和破坏细胞壁^[22]达到抑菌效果的作用方式较为一致。孙平等^[23]从果树根际土壤中筛选获得的多产色链霉菌*Streptomycetaceae polychromogenes* L-30能有效防治梨灰霉病,菌株发酵液能有效抑制梨灰霉病孢子萌发。秦楠等^[24]报道禾谷镰孢菌*F. graminearum*拮抗细菌解淀粉芽胞杆菌*B. amyloliquefaciens* HRH317抗菌蛋白主要是通过抑制孢子萌发且造成菌丝变细、畸形、扭曲及末端膨大现象,影响其正常生长来达到对病原菌抑制作用。王奕丁等^[25]报道棉花黄萎病拮抗细菌枯草芽胞杆菌ZL2-70抗菌蛋白同样能强烈抑制大丽轮枝菌分生孢子的萌发,且能抑制菌丝生长。在杨胜清等^[26]对贝莱斯芽胞杆菌S6菌株拮抗蛋白、杨定祥等^[27]对枯草芽胞杆菌XG-1拮抗蛋白的研究中也均有体现。

本试验中菌株JN-369抗菌粗蛋白对水稻稻瘟病的离体预防效果与对照药剂25%三环唑可湿性粉剂的预防效果基本相当,菌株JN-369抗菌粗蛋白对水稻稻瘟病的离体防治效果与40%稻瘟灵乳油的防治效果基本相当,表明其在实际生产应用中具有预防或者防治稻瘟病的应用潜力,可作为稻瘟病生物防治的资源菌被进一步研发和利用。利用细菌的抑菌作用研制出针对真菌所引起的植物病虫害的农药,可以很好地保护土壤环境,而且还能保证粮食安全。

参 考 文 献

- [1] 杨华,雷平,郭照辉,等. 细菌防治水稻稻瘟病研究进展[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(7): 99-104.
- [2] Liu X, Fang Y, Xie F, et al. Synthesis and *in vivo* fungicidal activity of some new quinoline derivatives against rice blast[J]. Pest Management Science, 2017, 73(9): 1900-1907.
- [3] Wu L, Xiao W, Chen G, et al. Identification of *Pseudomonas mosselii* BS011 gene clusters required for suppression of rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 16(4): 1-9.
- [4] 谢梓语,郭恩辉,孙宇波,等. 枯草芽胞杆菌B1409对番茄和辣椒的防病促生作用[J]. 植物保护学报, 2018, 45(3): 520-527.
- [5] Johansson A H, Bejai S, Niazi A, et al. Studies of plant colonisation by closely related *Bacillus amyloliquefaciens* biocontrol agents using strain specific quantitative PCR assays[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2014, 106(6): 1247-1257.
- [6] Gatson J W, Benz B F, Chandrasekaran C, et al. *Bacillus tequilensis* sp nov. isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(7): 1475-1484.
- [7] Gholami M, Khakvar R, Aliasgarzad N. Application of endophytic bacteria for controlling anthracnose disease (*Colletotrichum lindemuthianum*) on bean plants[J]. Archives Phytopathology and Plant Protection, 2013, 46(15): 1831-1838.
- [8] 袁雪,侯旭,胡晓,等. 桃褐腐病拮抗细菌的筛选、鉴定及生防作用[J]. 北京农学院学报, 2018, 33(4): 11-17.
- [9] 张猛,王琼,冯发运,等. 植物内生特基拉芽胞杆菌的分离、鉴定及防治西瓜枯萎病效果[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 371-377.
- [10] 谢洁,任慧爽,唐翠明,等. 一株桑树内生细菌的鉴定和对桑椹核地杖菌的拮抗作用[J]. 蚕业科学, 2016, 41(5): 815-824.
- [11] Adenekan M K, Fadimu G J, Odunmbaku L A, et al. Effect of isolation techniques on the characteristics of pigeon pea (*Cajanus cajan*) protein isolates[J]. Food Science and Nutrition, 2018, 6(1): 146-152.
- [12] 周珊,邹秋霞,胡玲,等. 特基拉芽胞杆菌JN-369的分离鉴定及其抑菌物质分析[J]. 农药学报, 2019, 21(1): 52-58.
- [13] 邹秋霞,任佐华,高诗涵,等. 枯草芽胞杆菌YN145分离鉴定及抑菌活性[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 421-426.

- [14] Gotor-Vila A, Teixidó N, Sisquella M, *et al.* Biological characterization of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8: the effect of temperature, pH and water activity on growth, susceptibility to antibiotics and detection of enterotoxigenic genes[J]. *Current Microbiology*, 2017, 74: 1089-1099.
- [15] 周瑚, 任佐华, 虞选杰, 等. 湖南桃江病圃稻瘟病菌对 24 个水稻抗稻瘟基因的毒性分析[J]. *植物保护*, 2017, 43(3): 165-170.
- [16] Ma J, Lei C, Xu X, *et al.* *Pi64*, encoding a novel CC-NBS-LRR protein, confers resistance to leaf and neck blast in rice[J]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2015, 28(5): 558-568.
- [17] 马晨燕, 袁正杰, 杨海河, 等. 水稻离体叶片抗纹枯病接种方法的研究[J]. *浙江农业学报*, 2016, 28(10): 1730-1737.
- [18] Oberoi R, Beg Q K, Puri S, *et al.* Characterization and wash performance analysis of an SDS-stable alkaline protease from a *Bacillus* sp.[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2001, 17(5): 493-497.
- [19] 隋好林, 王仁山, 王义华, 等. 土壤酸碱度对作物生长的影响及改良剂应用效果初探[J]. *山东农业科学*, 2007(2): 90-91.
- [20] 周盈, 陈琳, 柴鑫莉, 等. 魔芋内生拮抗细菌的分离及其抗菌物质特性研究[J]. *微生物学报*, 2007, 47(6): 1076-1079.
- [21] 王青华, 孙晓晖, 唐旭, 等. 深海贝莱斯芽胞杆菌 DH82 的筛选、鉴定及其抗菌粗蛋白性质分析[J]. *海洋通报*, 2019(1): 63-69.
- [22] Thiel T, Wolk C P. Autoinhibition of spore germination in *Nostoc spongiaeforme* (Cyanophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2010, 18(2): 305-306.
- [23] 孙平平, 贾晓辉, 崔建潮, 等. 梨灰霉病拮抗放线菌 L-30 的筛选、鉴定及作用机制研究[J]. *园艺学报*, 2016, 43(12): 2335-2346.
- [24] 秦楠, 郝林, 李鑫. 解淀粉芽胞杆菌 HRH317 抗菌蛋白的分离纯化及其抗菌作用[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(5): 813-819.
- [25] 王奕丁, 姜婷婷, 王全. 棉花黄萎病拮抗细菌 *Bacillus subtilis* ZL2-70 抗菌蛋白的理化性质和抑菌机理[J]. *棉花学报*, 2017, 29(6): 560-569.
- [26] 杨胜清, 张帆, 马贵龙. 贝莱斯芽胞杆菌 S6 拮抗物质分离纯化及抑菌机理[J]. *农药*, 2017, 56(9): 645-648.
- [27] 杨定祥, 林巧玲, 卢乃会, 等. 拮抗辣椒疫霉菌海洋细菌菌株 SH-27 的筛选鉴定及其防病促生作用[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(1): 54-63.