

研究报告

枯草芽孢杆菌 C-D6 对辣椒炭疽菌附着胞形成的抑制作用研究

曾大兴^{1*} 张晓阳^{1,2} 贾书娟^{1,2} 喇文军¹ 涂国全²

(1. 深圳职业技术学院 应用化学与生物技术学院 广东 深圳 518055)

(2. 江西农业大学 生物科学与工程学院 江西 南昌 330045)

摘要: 【目的】研究枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) C-D6 菌株对辣椒炭疽菌(*Colletotrichum capsici*)附着胞形成的抑制作用,探索炭疽病生物防治的新途径。【方法】通过对峙培养测定 C-D6 菌株的抗菌活性,应用摇瓶培养结合生物测定筛选产生抗菌活性成分的最适培养基,采用硫酸铵分级沉淀、Sephadex G-75 凝胶柱层析和阴离子交换层析对抗菌蛋白进行分离纯化,应用聚丙烯酰胺凝胶电泳测定蛋白分子量。【结果】C-D6 菌株在 PDA 平板上对辣椒炭疽菌显示明显的抑制作用,其 YPD 培养液能完全抑制该菌的附着胞形成。摇瓶培养的结果显示 C-D6 菌株产生抗菌活性物质的最适培养基为 YPD 培养基。C-D6 菌株在该培养基中培养 14 h 后,所形成的活性物质可完全抑制辣椒炭疽菌的附着胞形成。从该菌的 YPD 培养液中分离获得一个分子量为 32 kD,能明显抑制辣椒炭疽菌附着胞形成的抗菌蛋白。【结论】C-D6 菌株的生防特征显示该菌株对防治辣椒炭疽菌引起的炭疽病具有潜在的应用价值。

关键词: 枯草芽孢杆菌,辣椒炭疽菌,附着胞,抗菌蛋白

Bacillus subtilis C-D6 as a potential biocontrol agent against appressorium formation of *Colletotrichum capsici*

ZENG Da-Xing^{1*} ZHANG Xiao-Yang^{1,2} JIA Shu-Juan^{1,2} LA Wen-Jun¹ TU Guo-Quan²

(1. School of Applied Chemistry and Biological Technology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

(2. College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

Abstract: [Objective] To explore new pathways for biocontrol of anthracnose by investigating the inhibitory effect of *Bacillus subtilis* C-D6 against appressorium formation of *Colletotrichum capsici*. [Methods] The antifungal activity of *B. subtilis* C-D6 against *C. capsici* was evaluated by dual-culture method. Optimal medium for production of antifungal active substances was determined in shake flask culture. The antifungal proteins were purified by ammonium sulfate precipitation, followed by Sephadex G-75 column chromatography and anion-exchange chromatography. The molecular mass of the purified proteins were determined by SDS-PAGE. [Results] *B. subtilis* C-D6 showed high antagonistic activity and inhibitory effect of appressorium formation against *C. capsici*. The optimum medium for the production of antifungal substances of C-D6 strain was YPD and 14 h after inoculation,

基金项目: 广东省自然科学基金项目(No. S2012010009475); 深圳市基础研究计划项目(No. JC201105201186A)

*通讯作者: Tel: 86-755-26019310; 信箱: zengdx@szpt.edu.cn

收稿日期: 2015-03-12; 接受日期: 2015-06-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-06-24

the culture filtrate had a significant inhibitory effect on appressorium formation of *C. capsici*. An antifungal protein, with a molecular mass of 32 kD, was purified from culture filtrates of C-D6 strain and the purified protein exhibited obvious inhibitory activity against appressorium formation of *C. capsici*. [Conclusion] Our results suggest that *B. subtilis* C-D6 could be a potential bioagent for control of anthracnose caused by *C. capsici*.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Colletotrichum capsici*, Appressorium, Antifungal protein

炭疽菌属(*Colletotrichum* Corda)真菌引起的植物炭疽病,分布广泛、危害严重^[1]。辣椒炭疽菌(*Colletotrichum capsici*)是该属的重要种之一,其寄主范围广,在华南地区可危害多种蔬菜、花卉、药用植物和大田作物的果实、茎和叶,引起烂果、枯枝和叶斑等症状,对农林生产造成严重危害^[1-2]。炭疽病的防治以化学防治和选用抗病品种为主。近年来,由于规模化栽培、抗病品种退化、化学防治易产生抗药性和造成产品污染等原因,使该类病害处于较难防治的困境。因此,探索新的有效防治途径具有重要意义。

生物防治现已成为植物病害综合治理的重要内容。应用细菌、放线菌、酵母菌及其产生的抗菌物质开展炭疽病的生物防治研究取得了一些明显的进展^[3-5]。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)因产生多种多样的抗菌物质,且具有易培养、所制备的菌剂抗逆性强,易保存等特点,已在病害生防上得到广泛应用^[6-7]。芽孢杆菌应用于炭疽病的生物防治也有少量报道^[8-11]。然而, Yakoby 等认为搜寻应用于潜伏侵染病原的生防因子存在很大困难,因为穿透植物角质层的侵染菌丝会受到保护而避免生防因子发挥作用^[12]。因此,潜伏侵染的炭疽病的生防研究报道较少,其传统的生物防治策略存在明显局限。

随着生物防治研究的深入发展,寻找新的病害防治靶标成为创新病害防治策略和方法的重要途径。病原菌与寄主植物需经历复杂的相互作用过程才能侵入寄主,炭疽菌的侵入过程中存在复杂的信号传导关系,其侵入结构——附着胞的形成由来自植物表面的物理和(或)化学信号的识别而触发^[13]。如能阻断信号识别和传导过程,将可阻止附着胞的形成和病害的发展。Kim 等的研究证实在大肠杆菌

内表达的辣椒酯酶能抑制胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)和稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)附着胞的形成,从而控制病害的发生^[14]。从真菌中也发现了多种抑制炭疽菌附着胞形成的次生代谢产物,这些活性物质可有效地阻断病害的侵入过程,对发展新型杀菌剂具有重要意义^[15]。然而,这一重要研究领域的文献报道较少。

从枯草芽孢杆菌分离抑制辣椒炭疽菌附着胞形成的抗菌肽或次生代谢物用于该菌引起的炭疽病的生物防治研究未见报道。我们发现枯草芽孢杆菌 C-D6 产生的蛋白类物质对抑制辣椒炭疽菌的附着胞形成具有明显的效果,该类蛋白对潜伏侵染的炭疽病防治具有重要意义。本文报道菌株 C-D6 对辣椒炭疽菌的抗菌活性、C-D6 产生活性物质的培养基筛选以及活性蛋白的分离纯化及活性鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 C-D6 菌株由深圳职业技术学院应用化学与生物技术学院微生物室分离、筛选、鉴定和保存;供试病原菌:辣椒炭疽菌 501 由华南农业大学资源环境学院真菌室惠赠。

1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20。YPD 培养基(g/L): 酵母膏 10, 蛋白胨 10, 葡萄糖 10。LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 5。LBP 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, NaCl 5, K₂HPO₄ 1。LBG 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 葡萄糖 5, NaCl 5。LBYP 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 10, NaCl 5。LBYP 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 10, NaCl 5, K₂HPO₄ 1。NA 培

培养基(g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, NaCl 5。NBP 培养基(g/L): 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, K_2HPO_4 1。PDA 培养基 pH 天然, 其余培养基 pH 为 7.0–7.2。

1.3 C-D6 对辣椒炭疽菌的拮抗作用测定

采用平板对峙培养法进行测定: 辣椒炭疽菌在 PDA 平板上 25 °C 培养 7 d, 从菌落边缘取直径为 6.5 mm 的圆形小菌块接到 PDA 平板中央, 在其对称三边等距(2.5 cm)对称接入活化培养的拮抗细菌 C-D6, 25 °C 恒温培养 7 d, 测定其抑菌率。抑菌率=(对照菌落半径-处理菌落半径)/对照菌落半径×100%。每种处理 3 次重复。

1.4 C-D6 培养及培养液的抑菌活性测定

菌株 C-D6 的培养及培养液的抑菌活性测定参照文献[16]的方法进行, 并稍加修改。将已斜面活化的 C-D6 菌株接种到 YPD 或 NA、NBP 等液体培养基中(50 mL/250 mL), 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 按 1%的接种量接种到相同培养瓶中, 相同条件下振荡培养 48 h。培养液在低温(4 °C)下, 9 000 r/min 离心 20 min 去除菌体, 上清液经过滤除菌获得无菌培养液。

菌株 C-D6 培养液对辣椒炭疽菌生长的影响用牛津杯法测定。方法同 1.3 的抗菌作用测定, 仅在接种细菌处放置牛津杯, 每个牛津杯中加入 200 μ L 无菌培养液。

采用载片培养法测定细菌培养液对辣椒炭疽菌孢子萌发和附着胞形成的影响。将 20 μ L 病原菌孢子悬液(1×10^5 孢子/mL)与等量的细菌培养液混合滴加在无菌载玻片上, 25 °C 保湿培养 12 h 后, 显微观察培养液对孢子萌发、附着胞形成和菌丝生长的影响。以对应培养基为对照。

1.5 抑制附着胞形成的活性蛋白分离纯化

C-D6 蛋白粗提液的 $(NH_4)_2SO_4$ 分级盐析制备及 20%沉淀蛋白的 Sephadex G-75 凝胶柱层析粗分离参照文献[16]的方法进行。

通过阴离子交换层析 Q-Sepharose Fast Flow 对粗分离获得的活性组分进行进一步纯化。采用

AKTA 蛋白纯化系统, 以 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换树脂柱为分离柱, 柱长 20 cm, 柱高与直径之比为 20:1, 上样量为 2 mL, 流动相 A 为 10 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲溶液, 流动相 B 为 1 mol/L NaCl 洗脱液(含流动相 A); 采用线性梯度洗脱, 洗脱速度为 1 mL/min, 先用 A 液洗脱 30 min, 待柱平衡后改用 B 液洗脱, 并将梯度调整为 100%, 一直洗脱至基线平衡。280 nm 紫外吸收检测, 手动按峰收集纯化产物。

纯化蛋白经抗菌活性检测后, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行纯度检测和分子量测定。SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%。

采用高效液相色谱(HPLC)检测各级分离的活性蛋白纯度。色谱仪为 Agilent 1200 HPLC, 色谱柱为 Agilent C3 柱(4.6 mm×180 mm), 流动相为含 0.09% TFA 的 70%乙腈, 流速 1 mL/min, 进样量 20 μ L, 柱温 4 °C, 280 nm 波长检测。

抑制附着胞形成活性蛋白的生物测定参见 1.4 的载片培养法, 蛋白溶液用量为每处理 20 μ L。

1.6 数据处理

用 SPSS 11.0 软件进行数据处理; 用该软件的 One-Way ANOVA 进行方差分析, LSD 法检验数据的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 菌株 C-D6 对辣椒炭疽菌的拮抗作用

用平板对峙培养法测定了菌株 C-D6 对辣椒炭疽菌 501 的拮抗效果。结果表明: 菌株 C-D6 对辣椒炭疽菌有明显的拮抗作用, 能显著抑制辣椒炭疽菌的生长, 其抑菌率高达 61.54% (图 1)。载片培养的结果显示: 菌株 C-D6 培养 48 h 的 YPD 培养液能完全抑制辣椒炭疽菌的附着胞形成。

2.2 菌株 C-D6 产生抗菌活性物质的培养基筛选

选用 LB 培养基、牛肉膏蛋白胨培养基和 YPD 培养基等 8 种培养基, 进行 C-D6 产生抑菌活性物质的培养基筛选, 平板对峙培养的测定结果见表 1。

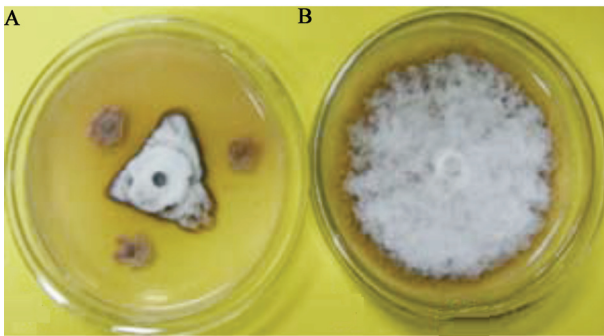


图1 枯草芽孢杆菌 C-D6 对辣椒炭疽菌生长的抑制作用
Figure 1 Antifungal activity of antagonist C-D6 against *C. capsici* on PDA plates

注: A: C-D6 对辣椒炭疽菌生长的抑制; B: 对照菌落.

Note: A: Colony of *C. capsici* treated with the strain C-D6; B: Colony of *C. capsici* (CK).

结果表明: C-D6 菌株 48 h 摇瓶培养的 YPD 培养液的抑菌率最高, 达到 58.14%, LB 培养液和 NA 培养液的抑菌率分别为 33.19%和 23.63%, 其抑菌效果明显不如 YPD 培养液, LBP 培养液和 NBP 培养液的抑菌率分别为 49.62%和 33.47%, 其抑菌效果明显高于 LB 培养液和 NA 培养液, 这一结果说明在 LB 培养基和牛肉膏蛋白胨培养基中添加 1 g/L K_2HPO_4 可明显促进 C-D6 菌株产生抗菌物质。

表1 不同培养基的 C-D6 培养液对辣椒炭疽菌生长的抑制作用(平均值±标准误)

Table 1 Effect of C-D6 culture filtrates from different media on growth of *C. capsici* ($\bar{x} \pm s$)

培养基 Medium	抑菌率 Inhibitory rate (%)
YPD	58.14±0.28 a
LB	33.19±0.54 d
LBP	49.62±1.69 b
LBPY	34.87±0.31 c
LBG	15.83±0.96 f
LBY	24.59±0.80 e
NA	23.63±0.61 e
NBP	33.47±1.38 cd

注: 每列数值后的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$).

Note: Values of each column followed by different letters are significantly different ($P < 0.05$).

采用载片培养法测定了 8 种培养基及其细菌培养液对辣椒炭疽菌孢子萌发和附着胞形成的影响。结果表明: YPD 培养基不影响辣椒炭疽菌的孢子萌发, 在该培养基中 25 °C 培养 12 h 后, 孢子萌发率高达 96%–100%, 而其余 7 种培养基对辣椒炭疽菌的孢子萌发都有显著的抑制作用, 在这些培养基中孢子不萌发或萌发率很低(低于 30%)。菌株 C-D6 的 YPD 培养液能完全抑制辣椒炭疽菌的附着胞形成。由于孢子在其余 7 种培养基中不萌发或萌发率很低, 未测定这些培养基的细菌培养液对附着胞形成的影响。

YPD 培养基不仅最适于抗菌活性物质的产生, 而且对炭疽菌的孢子萌发没有影响, 有利于通过载片培养直接测定培养液中抑制附着胞形成的活性物质的产生情况。这些结果说明: YPD 培养基为培养 C-D6 提取活性抗菌物质的最适培养基。

2.3 培养时间对 C-D6 产生抗菌活性物质的影响

用载片培养法测定了不同培养时间的 YPD 培养液对辣椒炭疽菌孢子萌发和附着胞形成的影响, 结果见图 2。结果显示: 25 °C、180 r/min 摇瓶培养 8 h 后, 菌株 C-D6 开始产生抗菌活性物质, 所产生的抗性活性物质不抑制附着胞的形成, 但能使部分附着胞膨大, 形成膨大、色浅的无效附着胞, 培养至 14 h, 所产生的活性物质能完全抑制附着胞形成, 并在菌丝前端形成膨大的球形结构, 培养 24 h 后, 培养液使部分菌丝形成厚壁的串珠状膨大, 此后至 48 h 的培养液对菌丝形态没有明显影响, 但随着培养时间的延长, 抑制菌丝生长的作用明显加强, 培养 60 h 后, 培养液开始明显抑制孢子萌发, 并进一步抑制菌丝生长。

2.4 活性蛋白的粗分离

采用 $(NH_4)_2SO_4$ 分级盐析法, 制备 0–20%、20%–30%、30%–40%和 40%–70%饱和度的盐析蛋白组分。载片培养的结果显示: 0–20%饱和度的盐析蛋白粗提液能够强烈抑制辣椒炭疽菌的附着胞形成和芽管生长(图 3)。30%–40%和 40%–70%饱和度的盐析蛋白粗提液对辣椒炭疽菌附着胞形成和

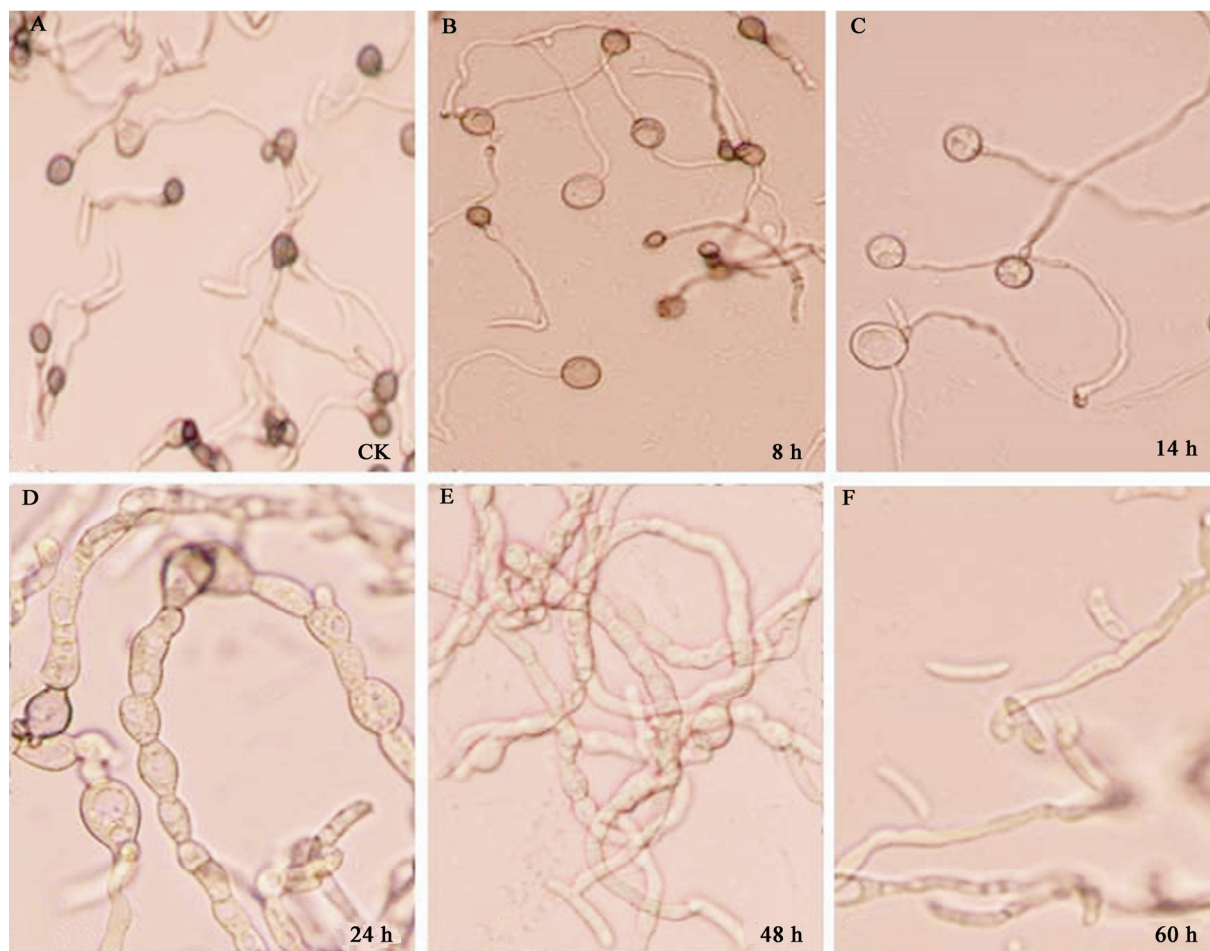


图 2 不同时间的 YPD 培养液对辣椒炭疽菌孢子萌发和附着胞形成的影响

Figure 2 Effect of C-D6 culture filtrates of YPD media from different culture time on spore germination and appressorium formation of *C. capsici*

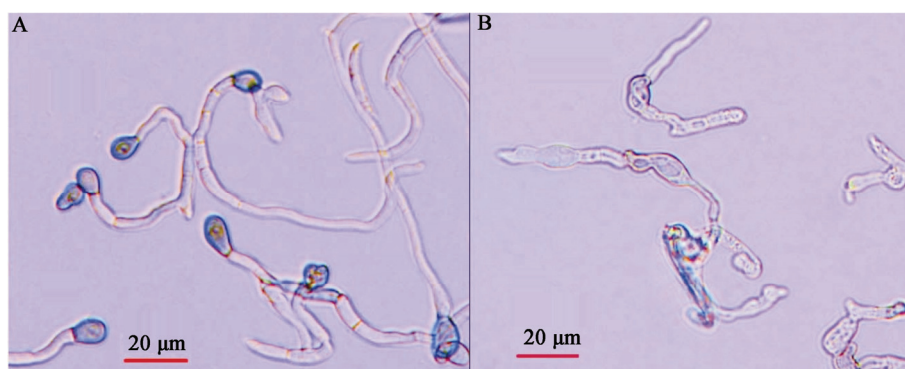


图 3 20%饱和度硫酸铵盐析粗蛋白对辣椒炭疽菌附着胞形成的抑制作用

Figure 3 Effect of crude protein obtained from 20% ammonium sulfate precipitation on appressorium formation of *C. capsici*

注: A: 在 YPD 培养基中形成附着胞(对照); B: 在盐析粗蛋白中附着胞形成被抑制.

Note: A: Appressorium formation in YPD medium (CK); B: Appressorium formation was inhibited in crude protein extract.

芽管生长也有部分抑制活性,而 20%–30%饱和度的盐析蛋白粗提液未检测到活性存在。所以可以确定分离抑制辣椒炭疽病附着胞形成的活性蛋白组分的硫酸铵盐析最适饱和度为 20%。

2.5 活性蛋白纯化

采用 Sephadex G-75 层析,将盐析后、透析除盐得到的 20%饱和度盐析蛋白粗提液,用 AKTA 蛋白分离纯化系统进行分离纯化,洗脱结果如图 4 所示。结果显示:20%饱和度盐析蛋白粗提液经 Sephadex G-75 柱层析分离,共出现 2 个峰,收集后标记为组分 I 和组分 II。载片培养检测收集液的生物活性:组分 I 对辣椒炭疽菌的附着胞形成的抑制作用与过柱前的效果一致,组分 II 无效果。

采用 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析对活性组分 I 进行进一步纯化。结果见图 5。结果显示:从上样至洗脱完成共出现 3 个峰,其中峰 I 为死体积峰,即鬼峰,峰 II 和峰 III 为 1 mol/L NaCl 洗脱峰。收集后分别标记为组分 i、组分 ii 和组分 iii。生物活性检测显示:组分 i 和组分 iii 无活性,组分 ii 能抑制附着胞形成,但抑制活性有所改变,表现为在芽管前端形成比正常附着胞大很多倍的球形结构,类似于 C-D6 14 h 培养液对附着胞形成的影响(图 2)。结果表明组分 ii 是纯化的目的峰。分离过程所引起的抑制活性改变有待进一步研究。

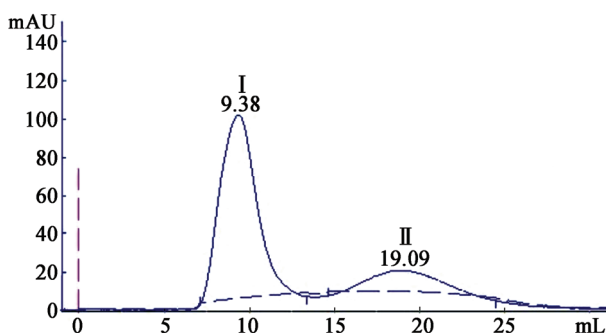


图 4 20%饱和度硫酸铵盐析蛋白粗提液的 Sephadex G-75 柱层析分离图谱

Figure 4 Elution profile of crude protein obtained from 20% ammonium sulfate precipitation by Sephadex G-75 chromatography

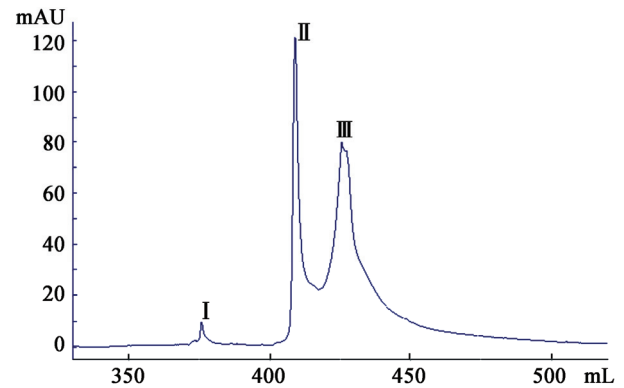


图 5 Sephadex G-75 层析分离的活性蛋白的阴离子交换层析图谱

Figure 5 Elution profile of activated protein obtained from Sephadex G-75 chromatography by Q-Sepharose Fast Flow chromatography

2.6 活性蛋白的 SDS-PAGE 电泳和 HPLC 检测

采用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测 20%饱和度盐析蛋白组分和经 Sephadex G-75 层析分离的活性组分 I 的纯度和分子量大小。结果如图 6 所示。由图 6 可知,20%饱和度盐析蛋白初提液的成分复杂,在 40、32 和 31 kD 附近均出现明显的蛋白条带,该蛋

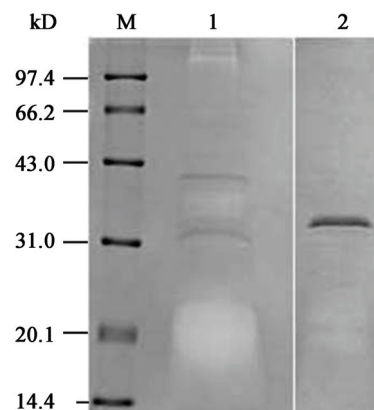


图 6 不同纯化方法获得的活性蛋白的 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 6 SDS-PAGE electrophoretogram of activated protein obtained from different purification methods

注: M: 标准蛋白分子量标记; 1: 20%饱和度硫酸铵盐析粗蛋白; 2: Sephadex G-75 层析分离的活性蛋白。

Note: M: Standard protein marker; 1: Crude protein by 20% ammonium sulfate precipitation; 2: Activated protein by Sephadex G-75 chromatography.

白粗提液经 Sephadex G-75 柱分离后, 其活性组分 I 仅显示一条明显的蛋白带, 分子量约为 32 kD。这一结果表明: 此分离过程去除了大部分杂蛋白, 活性成分得到有效纯化。

采用高效液相色谱(HPLC)检测 20%饱和度硫酸铵盐析粗蛋白、Sephadex G-75 层析分离的活性组分 I 和 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析分离的活性组分 ii, 结果见图 7。结果表明: 20%饱和度硫酸铵盐析蛋白成分复杂, 在 HPLC 图谱上共显示 14 个分离峰, 有待进一步纯化。活性粗

蛋白经 Sephadex G-75 层析分离获得活性组分 I, 在 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱上仅有一条带, 电泳检测结果显示成分较为单一, 但经 HPLC 检测发现: 该组分至少包含两种以上蛋白组分, 仍需进一步纯化。活性蛋白经过 Q-Sepharose Fast Flow 阴离子交换柱层析纯化后获得的活性组分 ii, 在 HPLC 图谱上显示单一峰, 表明其组分单一。

通过上述工作, 建立了从 C-D6 菌株分离抑制辣椒炭疽菌附着胞形成的活性蛋白的实验方法。

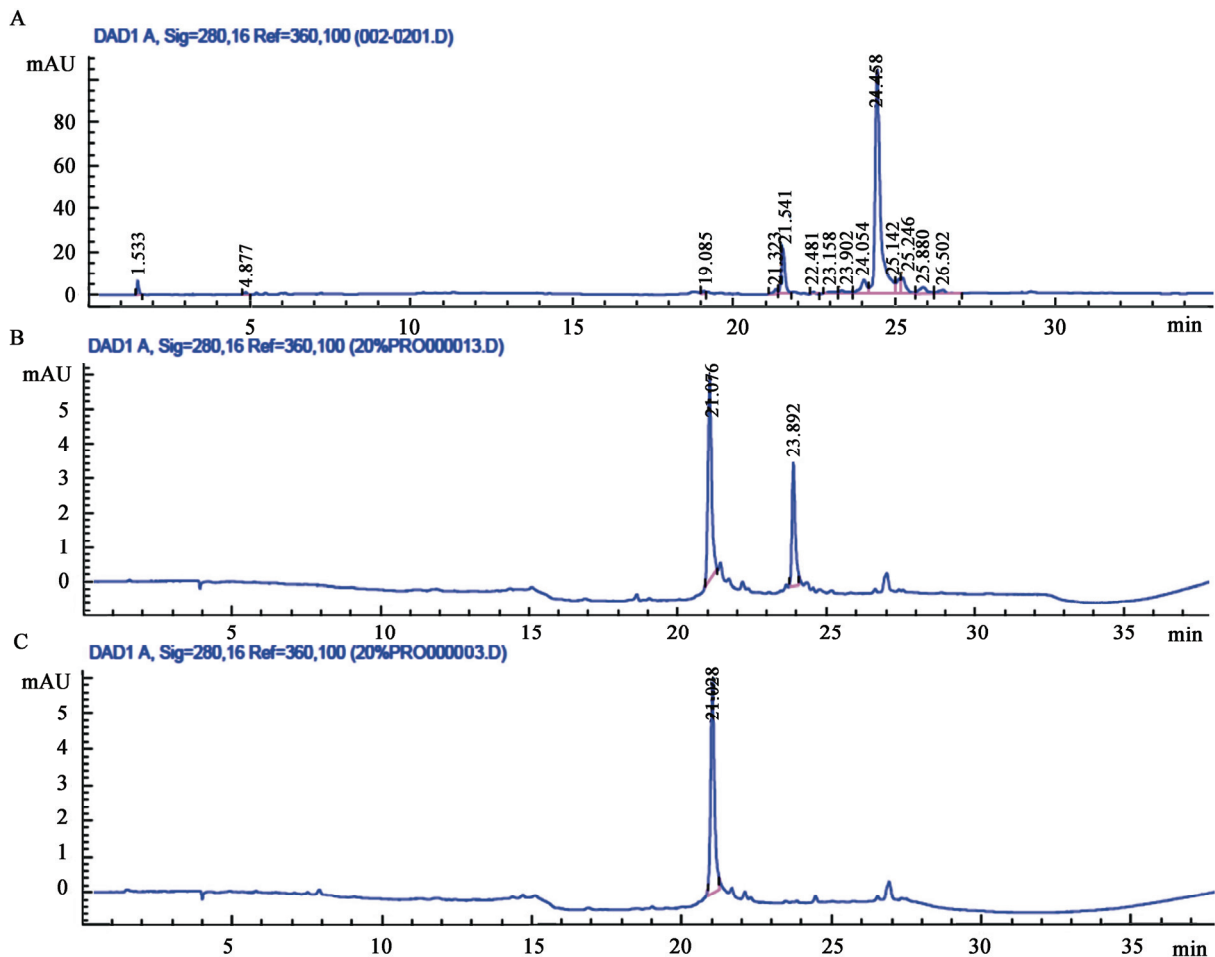


图 7 不同纯化方法获得的活性蛋白的 HPLC 图谱

Figure 7 HPLC chromatogram of activated protein obtained from different purification methods

注: A: 20%饱和度硫酸铵盐析粗蛋白; B: Sephadex G-75 层析分离的活性蛋白; C: 阴离子交换层析分离的活性蛋白。

Note: A: Crude protein by 20% ammonium sulfate precipitation; B: Activated protein by Sephadex G-75 chromatography; C: Activated protein by Q-Sepharose Fast Flow chromatography.

3 结论

在过去几十年,芽孢杆菌,尤其是枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌,因可产生多种脂肽类抗生素、细胞壁裂解酶和多种抗菌蛋白^[7,17-19],已广泛应用于多种重要真菌病害的生物防治。芽孢杆菌应用于炭疽病的生物防治也有少量报道^[8-11]。这些研究的防病机理主要集中在利用芽孢杆菌产生的各种抗生素和抗菌蛋白抑制孢子萌发、菌丝生长或直接杀死菌丝。然而,上述传统的生防途径对多种炭疽病的防治存在明显的局限,原因是炭疽病为潜伏侵染病害,其病原侵入植物后,潜伏侵染的菌丝会受到植物的保护而使生防因子不能发挥作用^[12]。因此,以病菌侵入循环中的附着胞形成为靶点,筛选、分离抑制附着胞形成的细菌菌株或抗菌蛋白阻断侵入循环,从而预防病害发生的创新生防策略研究,对探索炭疽病生物防治的新途径具有重要的理论和现实意义。枯草芽孢杆菌 C-D6 是我们从植物根际土壤分离获得的一株抑制病原真菌附着胞形成的细菌菌株。在本研究中,C-D6 菌株在 PDA 平板上对辣椒炭疽菌具有明显的抑制作用,其 YPD 培养液能完全抑制辣椒炭疽菌的附着胞形成,且抑制附着胞形成的活性物质产生时间早,作用效果稳定。这些结果表明菌株 C-D6 对多种炭疽病的生物防治具有潜在的应用价值。

从生防菌株分离抗菌活性物质是生防机理及应用研究的重要环节,我们曾应用硫酸铵分级沉淀和 Sephadex G-75 凝胶柱层析分离,从 C-D6 菌株的培养液中分离获得一个能抑制稻瘟病菌正常附着胞形成的抗菌蛋白^[16]。本研究采用同样方法制备的抗菌蛋白对抑制辣椒炭疽菌的附着胞形成具有显著的效果。实验结果说明影响两种病原真菌附着胞形成的活性蛋白是一致的。但该活性蛋白对两种病原真菌附着胞形成的影响存在明显的差别,该蛋白不抑制稻瘟病菌附着胞的形成,仅使其形成色浅、膨大的异常附着胞^[16];对于辣椒炭疽菌,该蛋白可完全抑制其附着胞的形成。这些结果表明 C-D6 菌

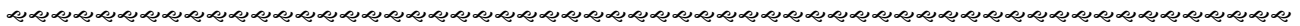
株产生的活性蛋白对抑制辣椒炭疽菌附着胞形成的作用更好。

采用 Sephadex G-75 凝胶柱层析分离获得的抑制附着胞形成的活性蛋白,经 SDS-PAGE 检测,在凝胶图谱上只有一条大小为 32 kD 的蛋白条带。进一步用高效液相色谱(HPLC)检测,发现该蛋白存在两种以上的蛋白成分。为此,我们在优化前期分离过程的基础上,应用阴离子交换层析对该蛋白组分进行进一步纯化,获得的活性蛋白经高效液相色谱检测,在 HPLC 图谱上仅有一个峰,表明成分单一。这些研究为活性蛋白鉴定及该蛋白抑制附着胞形成的作用机理研究奠定了较好的基础。近年来,从芽孢杆菌分离抗菌蛋白应用于真菌病害生防研究的报道也不少^[7,17-21]。但从芽孢杆菌分离抑制炭疽菌附着胞形成的抗菌蛋白的研究未见报道,进一步对该蛋白进行鉴定和作用机理研究,将可能为植物炭疽病的防治提供新的途径。

参考文献

- [1] Sutton BC. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*[A]//Bailey JA, Jeger MJ. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*[M]. Wallingford: CAB International, 1992: 1-26
- [2] Zeng DX, Qi PK, Jiang ZD. Identification of the falcate *Colletotrichum* on vegetable using RAPD analysis[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2002, 32(2): 170-174 (in Chinese) 曾大兴, 戚佩坤, 姜子德. 应用 RAPD 技术快速鉴定蔬菜上的弯孢炭疽菌[J]. *植物病理学报*, 2002, 32(2): 170-174
- [3] Chanchaichavivat A, Ruenwongsa P, Panijpan B. Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (*Colletotrichum capsici*)[J]. *Biological Control*, 2007, 42(3): 326-335
- [4] Silimela M, Korsten L. Evaluation of pre-harvest *Bacillus licheniformis* sprays to control mango fruit diseases[J]. *Crop Protection*, 2007, 26(10): 1474-1481
- [5] Tripathi M, Johri BN, Sharma A. Plant growth-promoting *Pseudomonas* sp. strains reduce natural occurrence of anthracnose in soybean (*Glycine max* L.) in central Himalayan region[J]. *Current Microbiology*, 2006, 52(5): 390-394
- [6] Elliott ML, Des Jardin EA, Batson WE Jr, et al. Viability and stability of biological control agents on cotton and snap bean seeds[J]. *Pest Management Science*, 2001, 57(8): 695-706
- [7] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 845-857
- [8] He H, Cai XQ, Guan X, et al. Biological control of capsicum anthracnose by endophytic *Bacillus subtilis* BS-2 and BS-1[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2003, 33(2): 170-173 (in Chinese) 何红, 蔡学清, 关雄, 等. 辣椒内生枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) BS-2和 BS-1防治辣椒炭疽病研究[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(2): 170-173

- [9] Kim PI, Chung KC. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234: 177-183
- [10] Kim PI, Ryu J, Kim YH, et al. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin, and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(1): 138-145
- [11] Ryu H, Park H, Suh DS, et al. Biological control of *Colletotrichum panacicola* on *Panax ginseng* by *Bacillus subtilis* HK-CSM-1[J]. Journal of Ginseng Research, 2014, 38(3): 215-219
- [12] Yakoby N, Zhou R, Kobiler I, et al. Development of *Colletotrichum gloeosporioides* restriction enzyme-mediated integration mutants as biocontrol agents against anthracnose disease in Avocado fruits[J]. Phytopathology, 2001, 91(2): 143-148
- [13] Kojima K, Kikuchi T, Takano Y, et al. The mitogen-activated protein kinase gene *MAF1* is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(12): 1268-1276
- [14] Kim YS, Lee HH, Ko MK, et al. Inhibition of fungal appressorium formation by pepper (*Capsicum annuum*) esterase[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(1): 80-85
- [15] Thines E, Anke H, Weber RWS. Fungal secondary metabolites as inhibitors of infection-related morphogenesis in phytopathogenic fungi[J]. Mycological Research, 2004, 108(1): 14-25
- [16] Jia SJ, Zeng DX, Wu XL, et al. Inhibitory of an antifungal protein produced by *Bacillus subtilis* C-D6 against *Magnaporthe oryzae*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2011, 27(3): 362-367 (in Chinese)
贾书娟, 曾大兴, 吴小丽, 等. 枯草芽孢杆菌 C-D6 抗菌蛋白对稻瘟病菌的抑菌作用[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(3): 362-367
- [17] Leelasuphakul W, Sivanunsakul P, Phongpaichit S. Purification, characterization and synergistic activity of β -1,3-glucanase and antibiotic extract from an antagonistic *Bacillus subtilis* NSRS 89-24 against rice blast and sheath blight[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 38(7): 990-997
- [18] Liu D, Cai J, Xie CC, et al. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(3/4): 252-256
- [19] Li J, Yang Q, Zhao LH, 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
- [20] Theis T, Stahl U. Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004, 61(4): 437-455
- [21] Liu YF, Chen ZY, Ng TB, et al. Bacisubin, an antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916[J]. Peptides, 2007, 28(3): 553-559

**征订启事**

欢迎订阅 《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国自然科学核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2015 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

邮购地址: (100101) 北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所 《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413