

## 解淀粉芽孢杆菌 ASR-12 粗蛋白对多种植物病菌的抑制作用

王彪<sup>1</sup>, 崔文艳<sup>1</sup>, 何朋杰<sup>1</sup>, 吴毅歆<sup>1,2</sup>, 何鹏飞<sup>1,2</sup>,  
王再强<sup>1</sup>, 李兴玉<sup>1,2</sup>, 何鹏搏<sup>2</sup>, 何月秋<sup>1,2\*</sup>

(1. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201; 2. 微生物菌种筛选与应用国家地方联合工程研究中心, 昆明 650217)

**摘要:** 为探究解淀粉芽孢杆菌 ASR-12 可能存在的拮抗作用机制, 采用硫酸铵沉淀法从生防菌 ASR-12 发酵液中提取粗蛋白, 以软腐病原菌作指示菌, 测定其理化性质, 并采用牛津杯法检测粗蛋白对 8 种病原真菌的抑制作用, 同时以小麦雪腐病原菌作指示菌观察粗蛋白对病原菌的抑制作用。结果表明, 该抗菌蛋白耐高温、耐紫外, 最适 pH 值为 7.0, 对蛋白酶 K 和胰蛋白酶不敏感; 它同时可以抑制大白菜软腐病菌和 8 种病原真菌; 可抑制孢子萌发, 降解菌丝细胞壁, 造成菌丝畸形、膨大、扭曲。表明解淀粉芽孢杆菌 ASR-12 可产生至少一种理化性质稳定的抗菌蛋白, 来有效地抑制多种植物病原菌。

**关键词:** 牛津杯法; 抑菌活性; 拮抗作用

中图分类号: S476.19

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2019)05-0865-05

### The inhibitory effect of crude protein from *Bacillus amyloliquefaciens* ASR-12 against various plant pathogens

WANG Biao<sup>1</sup>, CUI Wenyan<sup>1</sup>, HE Pengjie<sup>1</sup>, WU Yixin<sup>1,2</sup>, HE Pengfei<sup>1,2</sup>,  
WANG Zaiqiang<sup>1</sup>, LI Xingyu<sup>1,2</sup>, HE Pengbo<sup>2</sup>, HE Yueqiu<sup>1,2</sup>

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201;

2. National and Local Joint Engineering Research Center for Screening and Application of Microbial Strains, Kunming 650217)

**Abstract:** In order to study a possible antagonistic mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* ASR-12, the crude protein was extracted from fermentation liquid of biocontrol agent ASR-12 by ammonium sulfate precipitation method, and its physical and chemical properties were explored using pathogen of soft rot disease as indicator. The inhibitory effect of the crude protein on 8 species of fungal pathogens was detected by plate confrontation method. At the same time, the inhibitory effect of the crude protein on pathogen was observed using *Typhula incarnata* as indicator. The results showed that the antimicrobial protein was resistant to high temperature and ultraviolet, its optimum pH value is 7, and it is insensitive to protease K and trypsin. The antimicrobial protein can simultaneously inhibit the pathogen of Chinese cabbage soft rot and 8 species of fungal pathogens. It can inhibit spore germination and degrade mycelium cell wall, causing mycelial malformation, enlargement and distortion. In conclusion *Bacillus amyloliquefaciens* ASR-12 could produce at least one antimicrobial protein with stable physical and chemical properties, which could effectively inhibit various pathogens.

**Key words:** oxford cup method; antimicrobial activity; antagonistic action

大白菜软腐病是由果胶杆菌属 (*Pectobacterium*) 引起的一种土传病害<sup>[1]</sup>。近几年, 随着有机农业的兴起, 利用拮抗微生物防治植物病害成为了一个研究热点。当前, 防治植物病害的生防菌主要有芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞杆菌属

(*Pseudomonas*)、放线菌属 (*Actinomyces*) 等<sup>[2-3]</sup>。其中, 芽孢杆菌能够产生耐高温、耐干燥、抗紫外和有机溶剂的内生孢子, 是土壤和植物微生态优势种群之一, 其中绝大部分也是目前环境中广泛存在的非致病菌, 不产毒素, 对人畜无害<sup>[4]</sup>。芽孢杆菌

收稿日期: 2019-02-18

基金项目: 云南省自然科学基金 (2017FB051) 和科技部国际合作项目 (2009DFA32360) 共同资助。

作者简介: 王彪, 硕士研究生。E-mail: 1306751591@qq.com

\* 通信作者: 何月秋, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: ynfh2007@163.com

作为生物防治的主要细菌之一,可以通过产生脂肽类抗生素、挥发性物质、抗菌蛋白等活性物质来控制植物病害<sup>[5-7]</sup>。王晓辉等<sup>[8]</sup>从解淀粉芽孢杆菌 K1 发酵液中获得一种分子量为 55KDa 的抗菌蛋白,该蛋白可有效抑制灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的生长,张宝俊等<sup>[9]</sup>从解淀粉芽孢杆菌 LP-5 中获得一种对梨黑斑病菌(*Alternaria alternata*)具有较强抑制作用的抗菌蛋白。分离、纯化和利用这类抗菌物质对植物病害生物防治具有重要意义。

本实验室前期从大白菜植株内部分离获得了一株对软腐病具有良好防治效果的拮抗菌株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) ASR-12,并同时发现其对多种病原菌有抑制作用。在此基础上,本研究采用硫酸铵沉淀法从该菌株发酵液中提取抗菌粗蛋白,进一步对其理化性质和拮抗机理进行了初步研究,以期为其开发应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株:解淀粉芽孢杆菌 ASR-12、软腐病原菌(*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*)、玉米小斑病菌(*Bipolaria maydis*)、拟轮枝镰孢菌(*Fusarium verticilloides*)、番茄枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)、尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、小麦雪腐病菌(*Typhula incarnata*)、茶叶轮斑病菌(*Pestalotiopsis theae*)、黄曲霉菌(*Aspergillus flavus*)。

### 1.2 方法

**1.2.1 病原悬浮液的制备** 将待测病原真菌在 PDA 平板上活化培养,3 d 后转接至适宜的产孢培养基内培养(除禾谷镰刀菌使用羧甲基纤维素钠培养基外,其余均使用 PDA 培养基),当菌丝长满整个培养皿时用 10 mL 灭菌水洗脱菌丝表面孢子,并用灭菌纱布过滤去除断裂菌丝体,最后用血球计数板计数,调整孢子浓度至约  $10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>。将软腐病原菌活化,挑取单菌落接种于 LB 液体培养基内过夜培养,以稀释涂布法调整菌液浓度至约  $10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>。

**1.2.2 ASR-12 菌株抗菌蛋白粗提液制备** 将活化的 ASR-12 菌株接种于 LB 液体培养基中,37℃,160 r·min<sup>-1</sup>,振荡培养 72 h。发酵液在高速冷冻离心机中 4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,去除沉淀保留上清。采用硫酸铵沉淀法<sup>[10]</sup>在上清液中加入饱和度 50%的固体硫酸铵,4℃沉淀过夜。在高速冷冻

离心机中 4℃、12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,保留沉淀。沉淀加入适量灭菌 ddH<sub>2</sub>O 溶解,将溶解液置于透析袋中(截留分子量 3.5 KDa)透析 48 h,期间更换透析液 4 次,透析袋内液体用 0.22 μm 细菌过滤器过滤,滤液即为抗菌蛋白粗提液。

**1.2.3 抗菌蛋白粗提液抑菌活性的检测** 采用牛津杯法<sup>[11]</sup>测定粗提液对软腐病原菌抑菌活性,吸取 200 μL 软腐病原菌悬液涂布在 LB 固体培养基内,内部放置 2 个牛津杯(内径 6 mm、外径 8 mm),牛津杯内加入 100 μL 粗蛋白提取液,以无菌水为对照,置于 37℃ 恒温培养箱内培养 24 h。

### 1.2.4 菌株 ASR-12 抗菌蛋白粗提液稳定性测定

(1) 热稳定性。将制备的 ASR-12 菌株的抗菌蛋白粗提液分别置于 25℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃、90℃、100℃ 水浴锅中水浴 20 min,参照 1.2.3 测定抑菌活性,同时以未处理的蛋白粗提液为对照,每处理 3 次重复。

(2) 对 pH 的稳定性。分别用浓度为 5 mol·L<sup>-1</sup> HCl 和 5 mol·L<sup>-1</sup> NaOH 调整抗菌蛋白粗提液 pH 值至 4、5、6、7、8、9、10、11,12 h 后恢复 pH 至原始值,参照 1.2.3 测定 pH 值变化对抗菌蛋白粗提液活性的影响,以未作处理的蛋白粗提液做对照,每处理 3 次重复。

(3) 对紫外照射的稳定性。将抗菌蛋白粗提液分别经过紫外(20 W,光源距蛋白液 0.5 m)照射 20 min、40 min、60 min 后进行抑菌活性测定,以未经紫外照射处理的粗提液为对照,每处理 3 次重复。

(4) 对蛋白酶稳定性。分别用蛋白酶 K 和胰蛋白酶在 37℃ 条件下处理抗菌蛋白粗提液 90 min,每种酶的使用终浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup>,之后各处理置于 65℃ 水浴锅中 10 min 终止反应,参考 1.2.3 对处理后的抗菌蛋白粗提液做活性测定,以未经酶处理的粗提液为对照,每处理 3 次重复。

**1.2.5 抗菌蛋白抑菌谱测定** 参考熊国如等<sup>[12]</sup>采用改良牛津杯法测定抗菌蛋白粗提液对 8 种真菌病原的抑制作用,每皿内放置 2 个牛津杯,一个加入 100 μL 抗菌蛋白粗提液,另一个加入 100 μL 无菌 ddH<sub>2</sub>O 为对照,每个处理 3 次重复。

### 1.2.6 抗菌蛋白粗提液对小麦雪腐病菌的抑制作用

(1) 粗蛋白对菌丝生长影响。处理方法参考 1.2.5,4 d 后挑取抑菌圈边缘菌丝于载玻片上,置于光学显微镜下观察菌丝形态,以挑取加 ddH<sub>2</sub>O 的牛津杯四周的菌丝做对照。

(2) 粗蛋白对孢子萌发的影响。取抗菌蛋白粗

提液与孢子悬浮液(约  $10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>)等体积混合,以孢子悬浮液与 ddH<sub>2</sub>O 的混合液为对照,置于 28℃ 培养箱中,定时观察。

**1.2.7 统计分析** 本试验中所有数据均利用 SPSS.20 软件处理,采用 Duncan 新复极差法进行差异性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 蛋白粗提液抑菌活性

将发酵上清液进行饱和度 50%硫酸铵沉淀,经过溶解、透析、过滤后,粗提液呈现黄褐色透明状。活性检测结果表明:ASR-12 菌株胞外蛋白粗提液对软腐病菌有明显的抑制作用,抑菌圈直径达到了 26 mm (图 1)。

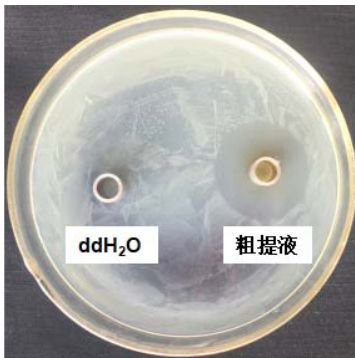


图 1 抗菌蛋白对软腐病原的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of antibacterial protein on soft rot pathogen

**2.1.1 粗蛋白的热稳定性** 随着温度的提高,粗蛋白抑菌活性整体呈下降的趋势,但变化幅度较小(图 2);粗蛋白分别经 25℃ 和 40℃ 水浴处理后,活性检测显示其抑菌圈直径分别达到了 23.67 mm、23.17 mm,与对照相比差异性不显著;最后 3 个处理对大白菜软腐病菌的抑菌圈直径分别为 21.83 mm、21.67 mm 和 21.67 mm,明显低于对照的 23.67 mm。以上结果说明菌株 ASR-12 胞外抗菌蛋白对高温不敏感,热稳定性较好。

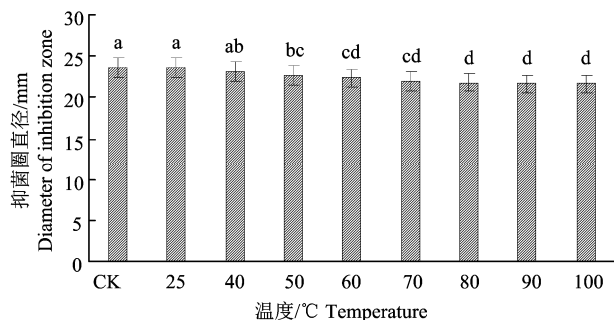


图 2 抗菌蛋白热处理后对软腐病原的抑菌活性

Figure 2 Inhibitory activity of the antibacterial protein treated with different temperatures on soft rot pathogen

**2.1.2 粗蛋白的酸碱稳定性** 抗菌蛋白在不同 pH 值条件下处理一段时间后,抗菌蛋白的最佳 pH 值为 4~7;当 pH 值为 7.0 时,对大白菜软腐病菌的抑菌活性最大,抑菌圈直径为 25.17 mm; pH 值为 11 时抑菌活性最小,抑菌圈直径为 18.83 mm,与最佳 pH 值条件相比,抑菌活性降低了 25.19%(图 3)。

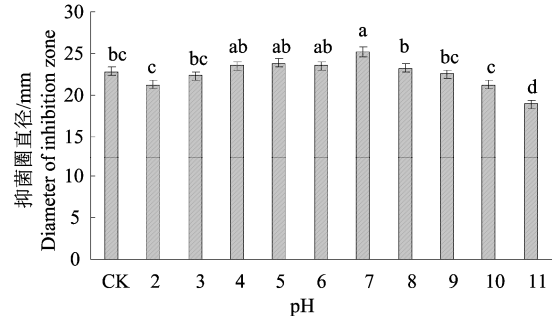


图 3 抗菌蛋白在不同 pH 下对软腐病原的抑菌活性

Figure 3 Inhibitory activity of the antibacterial protein under the conditions of different pH values on soft rot pathogen

**2.1.3 粗蛋白的紫外线稳定性** 抗菌蛋白粗提液分别经过 20 min、40 min、60 min 的紫外照射后,对软腐病原仍有明显的抑菌活性(图 4),其中经 20 min 和 40 min 紫外照射的处理组抑菌圈直径为 20.33 mm 和 20.17 mm,而对照为 20.50 mm,三者之间差异性不显著;经 60 min 的紫外照射后,抑菌活性与对照相比仅下降了 4.88%,说明该抗菌蛋白对紫外线不敏感。

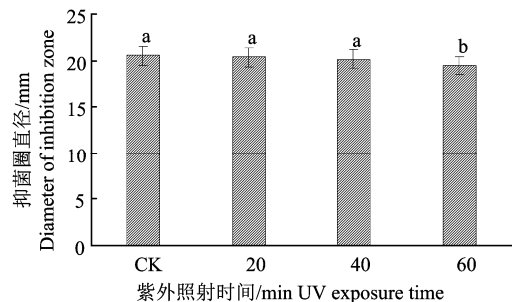


图 4 抗菌蛋白经不同时间的紫外照射后对软腐病原的抑菌活性

Figure 4 Inhibitory activity of the antibacterial protein exposed to UV at different times on soft rot pathogen

**2.1.4 粗蛋白的蛋白酶稳定性** 在 37℃ 条件下抗菌蛋白粗提液经胰蛋白酶和蛋白酶 K 反应 90 min 后,活性检测结果显示(图 5):处理组对软腐病原菌的抑菌活性仍保持在较高水平,抑菌圈直径分别为 25.25 mm 和 24.92 mm,与对照相比三者之间差异性不显著,表明粗提液中的抗菌蛋白对这两种酶不敏感。

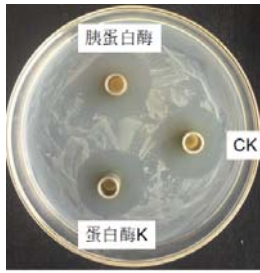


图 5 抗菌蛋白经蛋白酶处理后对软腐病原的抑菌活性  
Figure 5 Inhibitory activity of the antibacterial protein treated with proteinases on soft rot pathogen

2.2 抗菌蛋白的抑菌谱

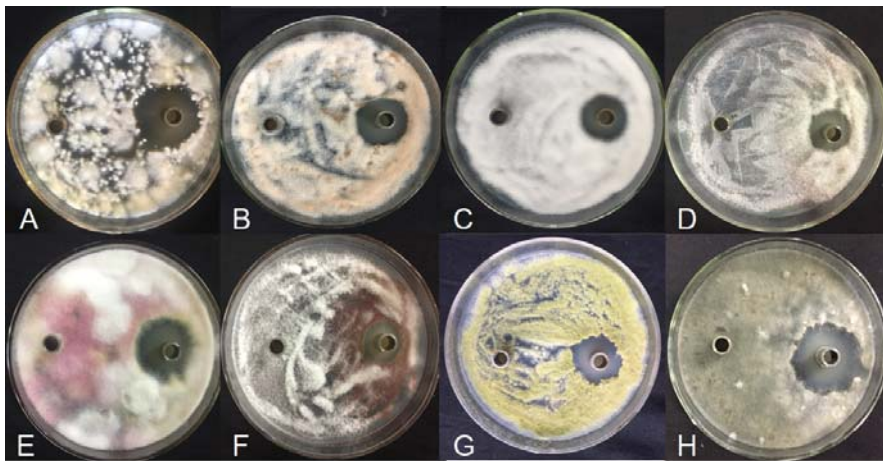
从图 6 可以看出, 抗菌蛋白粗提液对这 8 种病原真菌均有一定的抑制作用, 且抑菌圈内没有任何菌丝生长。其中, 粗蛋白对禾谷镰孢菌和小斑病原菌的抑制作用最强, 抑菌圈直径分别达到了 30.5 mm 和 30.25 mm (表 1); 对茶叶轮斑病菌的抑制作用次之, 抑菌圈直径为 28.17 mm; 而对尖孢镰孢菌抑制作用较弱, 抑菌圈直径为 18.33 mm。以上结果表明, 该抗菌蛋白具有广谱抑菌活性。

表 1 粗蛋白对多种真菌性病原的抑制作用  
Table 1 Inhibitory effect of crude protein on fungal pathogens

病原菌 Pathogen	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibitory zone	病原菌 Pathogen	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibitory zone
禾谷镰孢菌 <i>F. graminearum</i>	30.50±0.25 <sup>a</sup>	小麦雪腐病菌 <i>T. incarnata</i>	22.00±0.29 <sup>c</sup>
玉米小斑病菌 <i>B. maydis</i>	30.25±0.25 <sup>a</sup>	番茄枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	20.58±0.08 <sup>d</sup>
茶叶轮斑病菌 <i>P. theae</i>	28.17±0.30 <sup>b</sup>	拟轮枝镰孢菌 <i>F. verticilloides</i>	20.42±0.38 <sup>d</sup>
黄曲霉 <i>A. flavus</i>	22.17±0.30 <sup>c</sup>	尖孢镰孢菌 <i>F. oxysporum</i>	18.33±0.29 <sup>e</sup>

注: 数字后的不同字母表示在  $\alpha=0.05$  水平下的显著性差异。

Note: The different letters after the numerals mean significant differences at  $\alpha=0.05$  level.

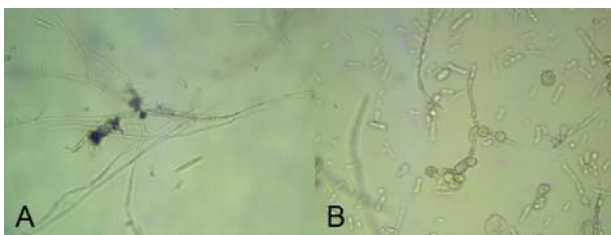


A: 茶叶轮斑病菌; B: 小麦雪腐病菌; C: 番茄枯萎病菌; D: 拟轮枝镰孢菌; E: 禾谷镰孢菌; F: 尖孢镰孢菌; G: 黄曲霉菌; H: 玉米小斑病菌

A: *P. theae*; B: *T. incarnata*; C: *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*; D: *F. verticilloides*; E: *F. graminearum*; F: *F. oxysporum*; G: *A. flavus*; H: *B. maydis*

图 6 抗菌蛋白对 8 种病原的抑菌活性

Figure 6 Inhibitory activity of the antibacterial protein on 8 fungal pathogens



A: 对照; B: 处理. (10×20) A: CK; B: Treatment. (10×20)

图 7 抗菌蛋白对菌丝生长抑制作用

Figure 7 Inhibitory effect of the antibacterial protein on mycelial growth



a: 对照 (10×40); b-c: 处理 (10×20)

a:CK (10×40); b-c:Treatments (10×20)

图 8 抗菌蛋白对孢子萌发的抑制作用

Figure 8 Inhibitory effect of the antibacterial protein on spore germination

### 2.3 粗蛋白对小麦雪腐病原菌的抑制作用

**2.3.1 对菌丝生长的影响** 如图 7 所示, 对照组菌丝表面光滑, 形态大小均匀, 原生质分布均匀, 而处理组菌丝形态异常, 表面粗糙, 菌丝顶端及中部膨大, 串珠状畸形, 并发生断裂; 菌丝内部原生质分布不均匀, 形成泡状物, 严重时泡状物破裂, 内容物外泄。

**2.3.2 对孢子萌发影响** 小麦雪腐病原菌的分生孢子经抗菌蛋白处理 24 h 后, 在光学显微镜下观察:

对照组 (图 8a) 的孢子能从顶端处正常萌发, 处理组孢子萌发受到抑制 (图 8b 和 8c), 已萌发的孢子芽管顶端膨大, 孢子内原生质分布不均匀、畸形, 形成巨大泡状物, 孢子出现断裂, 内容物外泄。

## 3 讨论

大量研究结果表明, 芽孢杆菌可以通过核糖体途径产生抗菌蛋白等活性物质<sup>[13-14]</sup>。本试验通过饱和度 50% 硫酸铵沉淀的粗蛋白对软腐病原菌具有较强的抑制作用, 抑菌圈直径达到了 26 mm, 推测该粗蛋白中存在至少 1 种或多种对软腐病原具有抑制作用的抗菌蛋白。纪兆林等<sup>[15]</sup>研究的地衣芽孢杆菌 W10 抗菌蛋白在 100℃ 水浴下处理 20 min, 与对照相比抑菌活性保留 80% 以上, 另外该蛋白对胰蛋白酶和蛋白酶 K 不敏感, 对紫外照射不敏感, 这与本试验结果类似。而韩冬梅等<sup>[16]</sup>研究的针对魔芋软腐病菌的新型抗菌蛋白 APn5 对高温敏感, 对蛋白酶 K 和胰蛋白酶部分敏感, 耐酸不耐碱, 这与本试验研究结果不同。本研究中粗蛋白在经不同的条件处理后, 耐酸碱、耐紫外, 对蛋白酶 K 和胰蛋白酶不敏感, 对热稳定, 在经 100℃ 水浴 20 min 后, 与对照相比其活性仍保持在 90%。以上结果表明, 该抗菌蛋白耐受性强, 这为今后该粗蛋白研制成蛋白类杀菌剂提供了理论依据。

大多数研究结果表明, 多数抗菌蛋白均具有抑制孢子萌发和菌丝生长的作用<sup>[17-20]</sup>。ASR-12 菌株产生的抗菌蛋白同样可抑制孢子的萌发和菌丝的生长, 降解细胞壁, 造成孢子及菌丝畸形、扭曲、膨大, 内部原生质分布不均匀, 严重时发生裂解, 造成内容物外泄, 这与 Zhang 等<sup>[21]</sup>分离获得的抗菌蛋白作用效果一致。此外, 该抗菌蛋白具有广谱抑菌活性, 它不仅能抑制大白菜软腐病菌, 同时也能抑制多种植物病原真菌, 具有巨大的开发应用价值。

### 参考文献:

[1] 冯洁. 植物病原细菌分类最新进展[J]. 中国农业科学,

2017, 50(12): 2305-2314.

- [2] 程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 732-737.
- [3] DOMENECH J, REDDY M S, KLOEPPER J W, et al. Combined application of the biological product LS213 with *Bacillus Pseudomonas* or *Chryseobacterium* for growth promotion and biological control of soil-borne diseases in pepper and tomato[J]. *Biocontrol*, 2006, 51(2): 245-258.
- [4] 赵圣明, 赵岩岩, 马汉军, 等. 1 株广谱抗菌活性菌株的筛选鉴定及其抗菌蛋白的分离纯化[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 170-176.
- [5] YUAN J, LI B, ZHANG N, et al. Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens[J]. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60(12): 2976-2981.
- [6] RAZA W, YUAN J, LING N, et al. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. *Biol Control*, 2015, 80: 89-95.
- [7] RAVU R R, JACOB M R, CHEN X, et al. Bacillusin A, an antibacterial macrodiolide from *Bacillus amyloliquefaciens* AP183[J]. *J Na Prod*, 2015, 78(4):924-928.
- [8] 王晓辉, 王贵鹏, 张庆芳, 等. 一株抗灰霉病解淀粉芽孢杆菌的筛选鉴定及抑菌蛋白的分离[J]. 吉林农业科学, 2015, 40(1): 64-67.
- [9] 张宝俊, 张家榕, 韩巨才, 等. 内生解淀粉芽孢杆菌 LP-5 抗菌蛋白的分离纯化及特性[J]. 植物保护学报, 2010, 27(2): 143-147.
- [10] 陶慰孙. 蛋白质分子基础[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981.
- [11] 刘宁, 郭庆港, 安海, 等. 番茄灰霉病生防细菌 BAB-1 的鉴定及发酵条件的优化[J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(2): 56-62.
- [12] 熊国如, 张翠英, 刘庆丰, 等. 枯草芽孢杆菌 XF-1 粗蛋白抑菌活性初步研究[J]. 植物保护, 2009, 35(4): 92-95.
- [13] ZHAO X Y, ZHAO X M, WEI Y M, et al. Isolation and identification of a novel antifungal protein from a Rhizobacterium *Bacillus subtilis* Strain F<sub>3</sub>[J]. *J Phytopathol* 2013, 161(1): 43-48.
- [14] 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.
- [15] 纪兆林, 唐丽娟, 张清霞, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 抗菌蛋白的分离纯化及其理化性质研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(3): 260-264.
- [16] 韩冬梅, 班慧芳, 余子全, 等. 新型抑菌蛋白 APn5 抑制胡萝卜软腐欧文氏菌[J]. 微生物学报, 2008, 48(9): 1192-1197.
- [17] KAVITHA S, SENTHILKUMAR S, GNANAMANICKAM S, et al. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16[J]. *Process Biochem*, 2005, 40(10): 3236-3243.
- [18] 刘洋, 朱天辉, 郑磊, 等. 一株内生拮抗细菌的分离鉴定及其抗菌机理研究[J]. 植物保护, 2016, 42(1): 33-39.
- [19] TENDULKAR S R, SAIKUMARI Y K, PATEL V, et al. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*[J]. *J Appl Microbiol*, 2007, 103(6): 2331-2339.
- [20] 杨胜清, 张帆, 马贵龙. 贝莱斯芽孢杆菌 S6 拮抗物质分离纯化及抑菌机理[J]. 农药, 2017, 56(9): 645-648.
- [21] ZHANG C X, ZHANG X X, SHEN S H. Proteome analysis for antifungal effects of *Bacillus subtilis* KB-1122 on *Magnaporthe grisea* P131[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30(6): 1763-1774..