

分类号: Q36
学号: 20212006003

密级: 公开
单位代码: 10759

石河子大学

硕士学位论文



利用重组内生菌防治香梨“枝枯病”

学位申请人 张晓丽

指导教师 李锦 副教授

申请学位门类级别 理学硕士

学科、专业名称 生物学

研究方向 遗传学

所在学院 生命科学学院

中国·新疆·石河子

2024年6月

**Utilization of recombinant endophytes to control "branch blight" of
Korla fragrant pear**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Natural Science

By

Zhang Xiao-Li

(Genetics)

Dissertation Supervisor: Prof.

June, 2024

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所提交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：张晓丽

时间：2024年5月13日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：张晓丽

时间：2024年5月13日

导师签名：李锦

时间：2024年5月13日

摘要

库尔勒香梨(*Pyrus sinkiangensis* Yu)作为新疆的特色果树之一,在促进农业增效、农民增收和区域经济发展中发挥着重要作用。然而,由于枝枯病(branch blight)危害性大且难以有效防治,香梨病害问题日益突出,对香梨产业造成严重损失。因此,寻求香梨枝枯病的绿色防治策略是当前香梨产业重中之重。已有研究表明,Harpin 蛋白作为免疫激发子,可诱导香梨产生防卫反应,提高植物对枝枯病的抗性。因此,本研究拟通过筛选具有拮抗且促生的内生菌,利用同源重组方法异源表达 Harpin 基因,从而有效提高香梨抗病性,为枝枯病的生物防治提供新的思路。

本研究首先从蔷薇科植物枝条中筛选出与病原菌拮抗且具有促生作用的内生菌;然后,克隆并构建 Harpin 基因过表达载体和同源重组载体,通过电转化法将 Harpin 基因成功导入内生拮抗菌,获得过表达菌株和重组菌株;通过离体植物组织分析 Harpin 基因异源表达菌株的防治效果;最后,利用 RNA-Seq 技术,对重组菌株处理的枝条进行转录组分析,解析 Harpin 蛋白激发子诱发香梨免疫信号调控通路。主要研究结果如下:

(1)从蔷薇科植物枝条中分离出 14 株内生拮抗细菌,分别为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)1 株、萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)1 株、耐盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*)7 株、莫加夫芽孢杆菌(*Bacillus mojavensis*)1 株和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)4 株。平板对峙实验和促生实验中萎缩芽孢杆菌 PSL2 拮抗效果好,故选用此菌株防治香梨枝枯病。

(2)构建组成型分泌表达载体 PBE2R-Harpin 和同源重组 PCU-Harpin 载体,利用电击方法转化于萎缩芽孢杆菌 PSL2,通过 PCR 及测序分析,获得过表达菌株 *Bacillus atrophaeus* PSL2-1 和同源重组菌株 *Bacillus atrophaeus* PSL2-2。通过对两种株系的分泌蛋白进行 SDS-PAGE 分析发现,两种株系在 39 kDa 处呈现特异条带,与 Harpin 蛋白的分子量相等,表明 Harpin 基因在分泌表达菌株和重组菌株表达成功。

(3)在叶片防效实验中,野生型菌株 PSL2 处理后平均防效为 24.49%,而 Harpin 组成型表达菌株 PSL2-1 和同源重组型菌株 PSL2-2 处理后平均防效为 46.45%,表明 Harpin 基因表达显著提高枝枯病的防治效果;在枝条防效实验中,野生型菌株 PSL2 处理香梨与杜梨枝条的病斑抑制率分别为 69.15% 和 68.35%,而 Harpin 组成型表达菌株 PSL2-1 和同源重组型菌株 PSL2-2 处理的病斑抑制率为 75.23%~78.12%。可初步推断 Harpin 基因的表达增强植物对病原菌的防治。

(4)为了明确 Harpin 基因增强香梨抗病的分子机理,对水、野生型和重组菌株处理的枝条进行转录组测序。结果鉴定出 985 个差异表达基因由 Harpin 蛋白引起,分析发现 Harpin 蛋白调控 BAK1 触发 PTI 反应,并提高了香梨枝条中与活性氧积累、植保素合成、细胞壁增厚、早/晚期防御反应等抗病相关基因的表达;同时激活了 Ca²⁺信号通路、乙烯信号通路、茉莉酸信号通路和 ABA 信号通路等信号转导相关基因的表达。结果表明 Harpin 蛋白能够激活多种抗病信号传导途径来提高香梨对枝枯

病的抗性。

综上所述，李子中筛选获得的萎缩芽孢杆菌 PSL2，对香梨枝枯病病原菌具有显著的抑制作用，同时可显著促进植株的生长。而 *Harpin* 基因的异源表达，可通过激活植物的免疫信号通路进一步提高该菌株在枝枯病上的防治效果。然而，*Harpin* 蛋白作为免疫激发子，在香梨中受体靶标仍不清楚，其具体信号诱导机制需要进一步研究。整体上，本研究为今后香梨枝枯病的防治提供一种新的思路和方法，同时也对香梨产业的持续发展具有重要的理论和实践价值。

关键词：枝枯病；内生拮抗菌；*Harpin* 基因；同源重组；库尔勒香梨

Abstract

Korla pear (*Pyrus sinkiangensis* Yu) as one of the characteristic fruit trees in Xinjiang, plays an important role in promoting agricultural production, farmers' income and regional economic development. However, branch blight could cause serious losses to the pear industry, because of its damaging and difficult to control effectively. The problem of Korla pear diseases is becoming more prominent. Therefore, the top priority for the Korla pear industry at present is to find a green prevention and cure strategy for branch blight. It has been identified that Harpin protein could be act as immune elicitor, inducing a defense response in Korla pear and increasing plant resistance to blanch blight. Therefore, this study utilized the antagonistic and growth-promoting endophytes to express the *Harpin* gene by a homologous recombination method, in order to effectively improve the disease resistance of Korla pear. This will provide a new idea approach for the biological control of branch blight.

In this study, we firstly screened endophytic bacteria from the branches of Rosaceae, and analyzed antagonism with pathogenic bacteria and growth-promoting effects. Then, the *Harpin* overexpression vector and the homologous recombination vector were constructed. The *Harpin* gene was successfully introduced into endophytic antagonist by electrical conversion method to obtain the overexpression strain and the recombinant strain; Analysis of the control effect of *Harpin* gene heterologous expression strains on isolated plant tissues; Finally, using RNA-seq technology, the recombinant strain-treated branches were subjected to transcriptome analysis to resolve the Harpin protein elicitor induced immune signaling and regulatory pathways in Korla pear. The main findings are as follows:

(1) Fourteen strains of endophytic antagonistic bacteria were isolated from the branches of Rosaceae, including *Bacillus velezensis* (1 strain), *Bacillus atrophaeus* (1 strain), *Bacillus halotolerans* (7 strains), *Bacillus mojavensis* (1 strain) and *Bacillus subtilis* (4 strains). The antagonistic effect of *Bacillus atrophaeus* PSL2 was good in the plate confrontation experiment and the growth promotion experiment. Therefore, the *Bacillus atrophaeus* PSL2 was selected to control branch blight of Korla pear.

(2) The constitutive secretion expression vector PBE2R-*Harpin* and homologous recombinant PCU-*Harpin* vectors were constructed and transformed with *Bacillus atrophaeus* PSL2 using the electroshock method. Overexpression *Bacillus atrophaeus* PSL2-1 strain and homologous recombinant *Bacillus atrophaeus* PSL2-2 strain were identified by PCR and sequencing methods. SDS-PAGE analysis of the secreted proteins of both strains revealed that both strains showed a specific band at 39 kDa, similar to the molecular weight of the Harpin protein. It was identified that *Harpin* gene was successfully expressed in

the expression strain and the recombinant strain.

(3) In the leaf efficacy experiments, the average efficacy was 24.49% after treatment with the wild-type strain PSL2. However, the average efficacy was 46.45% after treatment with constitutively expressing PSL2-1 strain and homologous recombinant PSL2-2 strain of *Harpin* gene. The results showed that *Harpin* gene expression significantly improved the prevention and cure effect of branch blight. In the branch efficacy experiments, Disease spot inhibition rate of Korla pear and *Pyrus betulifolia* branch was 69.15% and 68.35% after treatment with the wild-type strain PSL2, respectively. However, Disease spot inhibition rate was 75.23%~78.12% after treatment with constitutively expressing PSL2-1 strain and homologous recombinant PSL2-2 strain. It can be tentatively inferred that *Harpin* gene expression enhances plant control of pathogens.

(4) In order to clarify the molecular mechanism of *Harpin* gene enhancing the disease resistance of Korla pear, Branches treated with water, wild-type, and recombinant strains were transcriptome-sequencing. The results identified 985 differentially expressed genes. The analysis showed that the Harpin protein could regulate BAK1 to trigger the PTI response. Meanwhile, it increased the expression of disease resistance-related genes associated with ROS accumulation, phytoalexin synthesis, cell wall thickening and early/late defense responses in Korla pear branches. Moreover, it also activated the expression of signal transduction-related genes, such as Ca²⁺ signaling pathway, ethylene signaling pathway, jasmonic acid signaling pathway and ABA signaling pathway. The results indicate that Harpin protein can activate various disease resistance signaling pathways to enhance the resistance of Korla pear to branch blight.

In conclusion, *Bacillus atrophicus* PSL2 obtained by screening in *Prunus salicina*. It has a significant inhibitory effect on the pathogenic bacteria of branch blight. Meanwhile, it could significantly promote the growth of the plant. Heterologous expression of *Harpin* gene can activate immune signaling pathways in plants. It can further improve the prevention and cure effect of the strain on branch blight. However, the receptor target of the Harpin protein as an immune elicitor in Korla pear remains unclear. Therefore, the specific signal-inducing mechanism needs to be further studied. In a word, this study provides a new idea and method for the prevention and control of branch blight in future. It has important theoretical and practical value for the sustainable development of the Korla pear industry.

Key words: Branch blight; Endogenous antagonistic bacteria; Harpin gene; Homologous recombination; Korla pear

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 枝枯病对香梨的简介	1
1.1.1 香梨简介	1
1.1.2 枝枯病简介	1
1.2 枝枯病防治策略	3
1.2.1 培育抗性品种	3
1.2.2 化学方法	3
1.2.3 病区果园管理	4
1.2.4 生物防治	4
1.3 植物抗病分子机理	5
1.4 生物诱抗分子	7
1.5 本研究的目的与意义	9
1.6 技术路线	9
第 2 章 蔷薇科植物内生细菌的分离	10
2.1 实验材料	10
2.1.1 供试植物	10
2.1.2 供试病原菌	10
2.1.3 培养基和溶液	10
2.1.4 器材	10
2.2 试验方法	11
2.2.1 内生细菌的分离	11
2.2.2 菌液的活化	11
2.2.3 拮抗菌的初筛	11
2.2.4 拮抗菌的复筛	12
2.2.5 拮抗菌株的鉴定	12
2.3 结果与分析	14
2.3.1 蔷薇科植株内生细菌的分离与筛选	15

2.3.2 内生拮抗细菌菌落形态特征	16
2.3.3 拮抗菌对拟南芥种子萌发的影响	19
2.3.4 拮抗菌对拟南芥种子幼苗生长的影响	20
2.4 讨论	21
第 3 章 同源重组载体的构建以及重组菌的获得	24
3.1 实验材料	24
3.1.1 供试菌株和质粒	24
3.1.2 主要试剂及药品	24
3.1.3 培养基和溶液	24
3.1.4 器材	25
3.2 实验方法	25
3.2.1 萎缩芽孢杆菌(<i>Bacillus atrophaeus</i> PSL2)基因组 DNA 提取	25
3.2.2 大肠杆菌质粒 DNA 的小量提取	26
3.2.3 基因的 PCR 扩增	26
3.2.4 连接体系建立	27
3.2.5 萎缩芽孢杆菌电转化体系的确定	28
3.2.6 萎缩芽孢杆菌感受态的制备及电转化	28
3.2.7 萎缩芽孢杆菌重组菌株的获得	29
3.2.8 Harpin 基因在萎缩芽孢杆菌中的表达	29
3.3 结果与分析	30
3.3.1 萎缩芽孢杆菌 PSL2 电转化体系	30
3.3.2 Harpin 和 SPapE + Harpin 基因的扩增	31
3.3.3 表达载体 PBE2R-Harpin 的构建	31
3.3.4 过表达菌株 <i>Bacillus atrophaeus</i> PSL2-1 的获得	32
3.3.5 萎缩芽孢杆菌上下游同源序列扩增	33
3.3.6 重组质粒 PCU-Harpin 的构建及鉴定	33
3.3.7 重组菌株 <i>Bacillus atrophaeus</i> PSL2-2 的获得	35
3.3.8 重组菌分泌 Harpin 蛋白鉴定	36
3.4 讨论	36
第 4 章 重组菌生防效果测定	39
4.1 实验材料	39
4.2 实验方法	39
4.2.1 接种液的制备	39

4.2.2 拮抗菌对梨树叶片的防效.....	39
4.2.3 拮抗菌对梨树枝条的防效.....	40
4.3 结果与分析.....	40
4.3.1 叶片的体内抗菌活性.....	40
4.3.2 库尔勒香梨枝条的体内抗菌活性.....	43
4.3.3 杜梨枝条的体内抗菌活性.....	43
4.4 讨论.....	45
第 5 章 利用比较转录组学初步分析 <i>Harpin</i> 基因在香梨抗病中的分子机理.....	48
5.1 材料与方法.....	48
5.1.1 供试菌株与实验材料.....	48
5.1.2 转录组样品的准备.....	48
5.1.3 建库测序.....	49
5.1.4 生物信息学分析.....	49
5.1.5 实时荧光定量 PCR 验证.....	50
5.2 结果分析.....	52
5.2.1 送测样品分析.....	52
5.2.2 测序数据统计.....	52
5.2.3 qRT-PCR 验证.....	53
5.2.4 差异表达分析.....	57
5.2.5 差异表达基因 GO 富集性分析.....	59
5.2.6 差异表达基因 KEGG 通路富集分析.....	60
5.2.7 <i>Harpin</i> 蛋白和病原菌互作过程.....	60
5.3 讨论.....	61
第 6 章 结论与展望.....	64
6.1 结论.....	64
6.2 创新点.....	65
6.3 展望.....	65
参考文献.....	67
致谢.....	74

第 1 章 绪论

1.1 枝枯病对香梨的简介

1.1.1 香梨简介

库尔勒香梨(*Pyrus sinkiangensis* Yu)属于双子叶植物纲,蔷薇科,梨亚属,梨属白梨系统,香梨品种,主要分布在新疆库尔勒地区^[1]。库尔勒地处中国新疆中部东部、天山山脉南面、塔里木盆的东北部边界,北倚天山支脉,南与全球第二大沙漠塔克拉玛干沙漠相邻。区别于新疆的其他地区,库尔勒市日照充足、阳光充沛、空气干燥,属于极端干旱的气候,得天独厚的自然环境和数千年的驯化种植形成了库尔勒香梨特有的品质和极强的地方特征^[2],使得库尔勒香梨具有肉质细腻酥脆、果肉洁白、汁多味甜和耐贮藏等特点,是新疆特色水果之一,距今已有 1400 多年的培育历史,在海内外各地的香梨市场占据独有的地位^[3]。

库尔勒道路四通八达,现已发展成新疆第二大交通枢纽,地理位置的优越为库尔勒香梨的种植、宣传、销售提供了便利的平台,让香梨产业得到了广阔的发展前景,从 2005 年到 2012 年库尔勒香梨种植面积平均年增长率为 7.6%。目前因香梨发展起来的产业就有 50 多家,合作社 150 多个,种植香梨的农户达 1 万多,香梨对库尔勒经济的发展有重要作用^[4]。

目前,库尔勒市香梨主要种植于恰尔巴克镇、铁克其镇、兰干镇、英下乡、阿瓦提镇等几个乡村。但随着香梨工业的蓬勃发展,除了经常的低温冰冻的自然灾害以外,各类病虫害也是影响香梨产量的主要因素。近年来,香梨干腐病、流胶病、褐斑病等病害的发生率逐渐提升,对香梨产量影响严重。同时发现对梨树、苹果、山楂等蔷薇科植物产生破坏性的、重大检疫性的细菌病害枝枯病发生的风险性也增大^[5]。

1.1.2 枝枯病简介

枝枯病是由解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)引起的细菌性病害,对蔷薇科植物具有毁灭性的危害^[6],首次发现是 1780 年在美国纽约的哈德逊河谷,此后传播到欧洲、非洲、大洋洲和中东^[109]。仅美国,2000 年在密歇根州因枝枯病的损失估计达数百万元

[8,110]。枝枯病于 2016 年侵入我国新疆地区,阻碍了当地林果产业的发展^[9]。*E. amylovora* 为革兰氏阴性、杆菌,菌体大小为 $0.9\sim 1.8\times 0.6\sim 1.5\ \mu\text{m}$,外表附有荚膜,周生鞭毛,在含 5%蔗糖的 NA 培养基上最适生长^[10-11]。*E. amylovora* 可以被鸟类、昆虫、风、雨、露等携带到植物花柱头表面,病原菌一旦定植在柱头,遇到适宜的温度,每朵花上细菌种群可以在 1-2 天生长到 $10^6\sim 10^7$ 个细胞,有 100 多种昆虫参与枝枯病的扩散,一般情况下枝枯病的自然传播速度为 6 km/年^[50,111]。*E. amylovora* 的侵染通过分泌致病因子到寄主植物体内,包括 III 型分泌系统和胞外多糖等^[51]。*E. amylovora* 是第一个被证明会导致植物病害的细菌^[52-53]。

植物花、果实、叶片等受到枝枯病病原菌侵害后,短时间内变成褐色最后变成黑褐色,如同火烧一般挂在树上。国际上根据枝枯病发病症状和受侵害部位将其分成花枯萎、溃疡枯萎、枝枯萎、损伤枯萎以及砧木枯萎 5 个阶段^[12]。一般在早春时期,病原菌侵入开放的花朵,花朵发病后通过雨水可扩展至花梗及花簇中其它的花,随着病原菌的繁殖花梗和花从褐色变至黑褐色挂在树上;进入夏季,病原菌通过雨水,露珠、气流、昆虫和鸟类快速传播;枝和嫩枝是继花朵最易感病的部位,细菌直接感染前 1~3 叶的枝尖,在初秋条件适宜时,细菌感染嫩枝后几天之内便可以移动 15~30 cm,致使整枝或者整棵树死亡,潮湿时,病原菌在枝条上会生成菌脓。随着病菌不断增值,寄主植物主干皮层会收缩、下陷形成溃疡斑,同时溃疡斑又为病原菌提供越冬场所,到第二年的再次诱发病害^[13,54,55]。

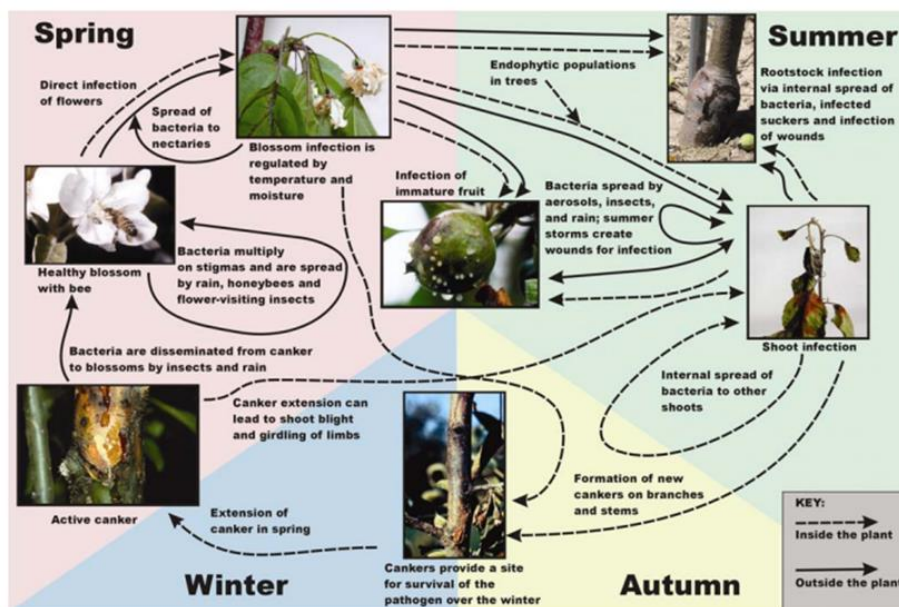


图 1-1 枝枯病的病害循环^[54]

Figure 1-1 The disease cycle of *Erwinia amylovora*

1.2 枝枯病防治策略

由于 *E. amylovora* 的存活与迁移性极强,而且其易感种类和组织结构的复杂性极大,无法寻找一个高效的根治靶标,造成了枝枯病的防治十分困难,目前的主要防控方法有培育抗性品种、病区果园管理、化学方法和生物方法^[56]。

1.2.1 培育抗性品种

通过筛选抗性植株和培育转基因抗性植株培育抗性品种,但这种方法耗时太长。陈励坤等鉴定了新疆 31 个梨品种的抗病性,发现新疆梨系统中棉梨、也历克阿木特和绿梨对枝枯病表现为高抗^[14]。美国通过嫩枝接种病原菌后移栽大田观测,筛选出 ‘Harrow Delight’、‘Maxine’、‘Harrow Sweet’等抗病品种^[57-58]。Harshman 等人对 200 多份野生苹果种质资源经过多次抗性鉴定,筛选得到梨 ‘Hessle’ 品种对火疫病抗性良好^[59-60]。李洪涛等人从 20 个梨品种中鉴定到 ‘晋酥’ 和 ‘绿梨’ 这两个品种表现较好的抗病性^[15]。

1.2.2 化学方法

化学方法主要是在开花期防治,喷施杀菌药品,防控效果最为显著。国外早期多使用硫酸链霉素、土霉素等抗生素防治枝枯病,由于病菌的抗药性不断增强,抗生素带来的残留风险、环境风险不断加大,很多国家已禁止了这些药剂的施用^[16]。链霉素可以与病原菌核糖体结合并阻断蛋白质的合成,是目前杀菌效率最高的化学药剂之一^[61]。但是目前已经发现枝枯病对链霉素产生了抗性,编码核糖体蛋白的染色体基因 *rpsL* 自发突变,导致病原菌对链霉素免疫^[62]。Bantleon 等研究发现梨树遭受冰雹伤害后使用链霉素和含链霉素喷雾的防效达 80 %和 90 %以上^[63]。在密歇根州东兰辛的实验果园中,在四个田间季节进行的六项实验中评估了配制为 Kasumin 的春日霉素控制枝枯病的功效。用 Kasumin 预处理的苹果花柱头上, *E. amylovora* 繁殖被抑制,相比于对照处理组降低 100 倍。与用水处理的树木相比,在田间的苹果树上施用的 Kasumin 也使可培养细菌总数减少了 100 倍^[64]。王泓力等发现喷施 40 %春雷·噻唑锌悬浮剂对盆栽杜梨苗枝枯病表现出最好的预防和治疗效果,2 d 的防效分别为 95.63 %和 80.55 %,持效期最长达 21 d^[17]。然而,化学防治很容易破坏生态环境的平衡,长期使用病虫害在进化的过程中形成了抗药性,为了防治加大药剂形成恶性循环,同时药剂的残留对人畜的健康也会造成危害。

1.2.3 病区果园管理

枝枯病发生后, 修剪钳用 0.5 %次氯酸钠消毒, 并修剪溃疡病口以下生长的健康枝部位, 并用消毒药品处理伤口。如病原菌已侵入植物树干, 应及时挖掉病树, 并快速清理地面枝条、树叶、果实等垃圾移离园外集中烧毁^[18]。王俊等利用电加热自动消毒修枝剪修建病枝, 修剪后病枝的平均防效为 91 %, 如对修枝剪不经消毒直接修剪病枝复发率较高^[19]。很多昆虫也是枝枯病菌的重要传播媒介, Cellini 等评估蜜蜂能否区别健康花朵和病原菌感染的花朵, 从而改变病原体的传播, 发现蜜蜂更愿意去健康的花朵上采食, 这会引发病菌的继发性传播^[20]。班学等报道禁蜂授粉可以显著降低枝枯病的发病率, 如兵团某梨园 2019 年放蜂授粉, 第一年, 果园发病率达到 100 %; 在禁止蜜蜂授粉后, 第二年发病率下降至 33 %; 第三年再次放蜂授粉后, 果园发病率又达到 100 %^[65]。因此在枝枯病发生地区, 应尽量避免使用蜜蜂授粉。合理种植也能减少枝枯病的发病率。

1.2.4 生物防治

自然界中的微生物在生长繁殖过程中可产生各类初级、次级代谢产物, 有些微生物自身或其代谢产物可预防和治疗植物的病虫害。这些有益的微生物种类多、繁殖快、数量大; 不仅可以抑制病原菌的生长, 也能够促进植物生物量的增加, 利用微生物的这个特性, 从自然界中获得大量抗菌活性物质制成微生物制剂, 将其应用于大田防治, 以期降低植物土传病害的发生, 即为生物防治^[21,22,66]。Sanford 最早提出生物防治, 他发现土壤中一些拮抗性微生物能够抑制土传病原菌的发生, 但这一报道当时并未引起广泛关注^[17]。我国生物防治的研究始于 20 世纪 50 年代, 曾筛选出许多良好的生防菌种, 并应用于农业生产, 为我国生物防治的发展奠定了良好的基础^[66]。王东昌等筛选的拮抗菌株枯草芽孢杆菌 XM16 发酵提取液制备成的抗菌素经过连续两年的小区试验发现, XM16 对苹果霉心病的防效明显高于抗菌素和化学药剂处理, 最高防效达 92.8 %, 且效果稳定^[21]。杨兴有等分离的芽孢杆菌 TBWR1 对烟草青枯病有明显抑制作用, 该菌株对烟草青枯病的生防效果达 71.1 %, 并能显著促进烟草株高、茎围生长、叶长和根系生物量增加^[22]。*Beauveria bassiana* 08F04 喷施小麦根系土壤, 能使谷物孢囊线虫雌性数量显著减少 64.4 %^[67]。*B. subtilis* BY-2 是从油菜根系中分离获得的内生细菌分离株, 通过与油菜根系互作防控油菜茎腐病^[68]。*B. subtilis* SG-6 可通过产生几丁质酶、丰原素、表面活性素等拮抗物质抑制病原菌镰刀菌菌丝生长和孢子萌发^[69]。荧光假单胞菌 UM16, UM240, UM256 和 UM270 对灰霉病菌菌丝直接抑制率达到了 86 %, 同时还对立枯丝核菌和菜豆炭疽病菌具有抗性, 而且能显著提高苜蓿的生物量和叶绿素含量, 对叶绿素的增加量

达到 200%以上^[23]。沈启芳从“绿穗”小麦中分离出一株假单胞菌 W55 通过抑制侵染菌在小麦穗轴中的扩展能够有效的抑制赤霉病^[24]。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)JT86 发酵液处理 24 h 对烟草菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、烟草白绢病菌(*Sclerotium rolfsii*)和烟草立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)菌核萌发抑制率就达到 100 % , 且抑制率不会随着时间的延长而失效;检测 JT86 发酵液的细胞壁降解酶活性,发现 JT86 可以产生蛋白酶、纤维素酶和几丁质酶;同时电镜扫描观察 JT86 发酵液处理后病原菌菌丝体和菌核的形态变化,影响了菌丝体的生长发育,导致菌核丧失活性,不能正常萌发产生新的菌丝^[7]。

1.3 植物抗病分子机理

植物也和我们人体一样受到“皮肤”的保护,“皮肤”是细胞壁顶部的蜡质角质层,破坏该屏障的潜在病原体会遇到一个活跃的植物免疫系统,该系统能识别一系列的病原相关分子,随后激活植物自生的防御反应,以防止进一步的感染^[70]。为了抵抗病原微生物的入侵,植物逐渐进化出一套相对比较完整的免疫系统来抵御侵入的病原物生物,我们称之为植物的先天免疫系统^[71]。植物的免疫分为 2 个层次,第 1 层是由细胞膜定位的模式识别受体 PRRs(Pattern-recognition receptors)直接识别病原菌的病原相关分子模式 PAMPs(pathogen-associated molecular patterns)或损伤相关分子模式 DAMPs (Damage-associated molecular patterns)而触发的植物免疫反应,称为 PTI(Pattern-triggered immunity),病原菌为了逃避植物的识别,会分泌效应蛋白来抑制 PTI;第 2 层免疫系统是由位于胞内的 NLR(Nucleotide-binding Leucine-rich Repeat proteins)受体蛋白直接或间接地感知病原菌的效应因子(Effectors)从而触发的植物免疫,称为 ETI(Effector-triggered immunity),此时,病原菌会通过效应蛋白的突变或者进化出新的效应蛋白来逃避或抑制 ETI^[72]。

尽管 PTI 和 ETI 的结构和作用位点不同,但它们诱发下游防御反应包括 Ca^{2+} 信号、ROS 信号、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)级联信号等,调控植物细胞因子和防御激素的产生^[73]。高等植物拥有大量的细胞表面和细胞内免疫受体,可以感知与病原体感染相关的各种免疫原性信号^[74-75],细胞表面免疫受体(PRR)由受体样蛋白 (RLP) 和受体激酶 (RK) 组成,植物使用裂解酶来促进入侵病原体释放 PAMPs 表位,如细菌鞭毛蛋白表位 flg22 和肽聚糖^[76-77]。此外,病原体可通过细胞壁降解酶和毒素对植物组织造成损害,从而释放植物细胞壁碎片、细胞外 ATP 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD)^[78],这些分子都可以作为损伤相关分子模式(DAMPs),病原体 PAMP 或宿主 DAMP 与细胞表面受体 PRR 结合激活触发细胞内激酶 RLCK 和 MAPK 的磷酸化,RLCK 磷酸化激活了 Ca^{2+}

通道和 RBOHD 氧爆酶从而启动植物免疫防御。病原菌就会释放各种效应物来抑制 PTI 反应, 细胞内的 NLR(包括免 CNL 和 TNL)免疫受体蛋白能够识别这些效应物, 或者间接的感知病原菌的效应因子触发 ETI 反应。CNL 能够通过钙渗透通道介导 ETI 信号传导, TNL 免疫激活后 TNLs 的 TIR 结构域切割 NAD, NAD 磷酸盐和其他相关小分子, 产生 pRib-AMP/ADP 和 ADPr-ADP/di-ADPR, 它们又可作为第二信使被 EDS1/SAD101 和 EDS1/PAD4 复合体识别, EDS1/SAD101 与 NRG1 相互作用形成电阻体诱导 HR 细胞凋亡, 同时 EDS1/SAD101 与 NRG1 相互作用可调控水杨酸和乙烯等的合成从而发挥抗病功能^[79]。

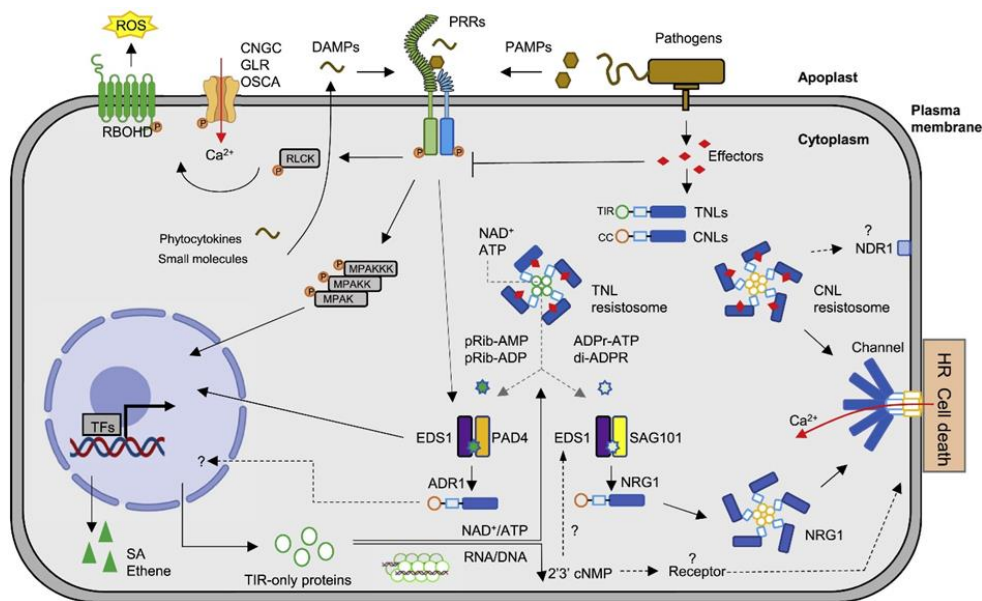


图 1-2 植物免疫系统和信号网络^[73]

Figure 1-2 Plant immune system and signaling network

植物受到诱导因子刺激后会调控相关代谢途径来提高植物的抗病性, 抗病机制主要表现为: (1)HRG 合成增多植物细胞壁木栓化、木质化^[80-81]; (2)病原相关蛋白-PR 蛋白基因表达量显著上调, 如过氧化物酶类、葡聚糖类 PPR-9 和几丁质蛋白酶类蛋白, 参与细胞木质化过程或具有直接杀菌活性^[82]; (3)植物激素积累, 水杨酸、茉莉酸、乙烯和脱落酸等激素能参与 PTI 和 ETI 免疫信号系统的调控; (4)抗病相关基因的表达, 抗病基因在植物抵抗病原体侵染过程中发挥着十分重要的作用, 植物受到外源物刺激或诱导后, 一些基因的表达量发生变化, 这些基因可能是抗病相关基因。利用灰葡萄孢侵染番茄后一定时间内, 番茄体内 PI I 和 PI II 基因显著上调^[83]。(5) 植保素积累和防御酶活性提高; 植物体利用这个复杂的网络提高抗病性^[25]。位于本氏烟草叶肉细胞细胞质的 *NtPP2-B11* 基因, 能够通过促进活性氧的积累和胍胍质沉积提高烟草对青枯病的抗性^[26]。真菌 HND5 菌株激发子蛋白 SbES 处理辣椒后发现抗病相关基因 *Ca-PR1*、*Ca-MYB306*、*Ca-*