

荧光假单胞菌诱导番茄抗枯萎病的 ISR 研究^①

张 亮¹, 盛 浩¹, 袁 红¹, 赵兰凤², 李华兴^{2*}

(1 湖南农业大学资源环境学院, 长沙 410128; 2 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642)

摘 要: 本文采用实时荧光定量 PCR 技术对荧光假单胞菌 PEF-5#18 诱导番茄系统性抗性(ISR)的作用机理进行了研究, 包括了诱导进程中番茄根系病程蛋白基因 PRs 族、GR 等重要防卫基因以及乙烯、水杨酸、茉莉酸等诱导信号调控路径的关键基因的表达情况。结果表明, 尖孢镰刀菌 Forl 和荧光假单胞菌 PEF-5#18 对番茄植株分别具有 SAR 和 ISR 诱导抗性能力, 而在“ Forl-番茄-PEF-5#18”互作模式下, 番茄植株受诱导所产生的抗性则受到 SAR 和 ISR 共同作用的影响; 与对照相比, Forl 或荧光假单胞菌 PEF-5#18 均能诱导番茄病程蛋白基因 PRs (PR1、PR4、PR5、PR6) 与 GR、POX、PAL 等相关防卫基因的表达进行上调, 而相关受诱导基因的表达程度与动态变化则与所诱导的 SAR 和 ISR 抗性反应类型以及诱导时间有关; 此外, 对于调控路径的分析结果显示尖孢镰刀菌 Forl 对番茄 SAR 诱导抗性主要依赖于水杨酸路径进行调控, 而荧光假单胞菌 PEF-5#18 对番茄 ISR 诱导抗性则主要依赖于茉莉酸和乙烯路径来调控。

关键词: 荧光假单胞菌; 诱导系统性抗性; 枯萎病; 信号传导路径

中图分类号: S476 **文献标识码:** A

尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis-lycopersici*, Forl) 是一种危害极大的土传病原真菌, 其侵染所致的番茄枯萎病在世界范围内对番茄生长、作物品质以及土壤生态质量构成严重威胁^[1]。近年来, 随着人们生态环境保护意识的增强, 以根际促生菌为代表的微生物防控手段逐渐兴起, 同时其作用机理的研究亦不断深入^[2-3]。植物系统性获得抗性(SAR)与诱导植物系统性抗性(ISR)是微生物介导植物抗性的重要防卫机制, 前者受病原菌诱导获得抗性, 后者受非致病微生物诱导产生抗性, 两者均对寄主作物防御尖孢镰刀菌等致病微生物的侵害具有重要意义^[4]。除诱导源不同外, 寄主植物由根际促生菌诱导所产生的系统性抗性(ISR)在分子信号调控路径上也有别于植物系统获得抗性(SAR), 大量研究结果表明 ISR 抗性主要依赖于茉莉酸(JA)/乙烯(ET)信号调控路径, 而 SAR 抗性则主要依赖于水杨酸(SA)途径^[5]。荧光假单胞菌是一类具有生物防控潜力的有益微生物^[6]。有研究发现, 荧光假单胞菌与寄主作物互作时, 可诱导寄主作物相关防卫基因表达上调并提高有关抗病蛋白的合成, 从而强化寄主作物抵御病原菌侵染的能力^[7]。

荧光假单胞菌 PEF-5#18 能有效降低由尖孢镰刀菌 Forl 引起的番茄枯萎病病情指数, 保障植株健康生长, 并具广谱的土传病害抑制潜力^[8]。然而, 其在“植物-病原菌-促生菌”互作模式中是否均有 ISR 机制以及该机制的调控路径等机理尚不清晰。因此, 笔者拟通过 RT-PCR 技术对“番茄-Forl-PEF-5#18”互作过程中番茄寄主相关重要防卫基因及其路径调控关键基因的表达予以监测, 以期对 PEF-5#18 的 ISR 作用机制予以揭示, 也为该生防菌的深入利用提供重要的参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试诱导菌株为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) PEF-5#18(野生型), 病原真菌为尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* (Forl), 均存于 -80 °C。

供试番茄品种为 Bonny Best(常规感病品种)。

供试土壤为健康的菜园土(0 ~ 10 cm 耕作层), 质地砂壤, 碱解氮 183 mg/kg, 有效磷 166 mg/kg,

基金项目: 广东省教育部产学研结合项目(2009B090300330)资助。

* 通讯作者(huaxli@scau.edu.cn)

作者简介: 张亮(1984—), 男, 山西大同人, 博士, 讲师, 主要从事土壤微生物研究。E-mail: qingzhiweiwu@sina.com

速效钾 307 mg/kg, 有机质 71.3 g/kg, pH 8.0。

1.2 培养基、引物、PCR 试剂与试剂盒

LB 培养基: LB 配方培养基(Sigma 公司)。PDB 培养基: PDB 配方培养基(Sigma 公司)。

试剂: RadSafe 染料(RadSafe 公司), SYBR green master mix (SsoFast 公司), DEPC 水(Invitrogen 公司)。

试剂盒: RNeasy Plant Mini 植物总 RNA 提取试剂盒(Qiagen 公司), RNeasy 纯化试剂盒(Qiagen 公司), SuperScript[®] RIII 反转录试剂盒(Invitrogen 公司)。

引物: 引物详见文献[9-14](Sigma 公司合成)。

1.3 诱导试验设计

试验共布置 4 个处理, 分别为 PEF-5#18+*Forl*、PEF-5#18、*Forl*、清水对照。

诱导剂制备^[15]: 挑取纯化后的 PEF-5#18 单菌落并接种于液体 LB 培养基中, 于 180 r/min、室温条件下振荡培养 48 h, 离心, 生理盐水悬浮(10^9 cfu/ml)后与灭菌泥炭粉按 1:10 比例(v:m)混合均匀作为诱导剂(10^8 cfu/ml), 备用。

感病土壤配制: 接种病原菌(*Forl*)于 PDB 培养基, 于 24 °C、180 r/min 条件下振荡培养 120 h, 双层灭菌纱布过滤, 无菌水稀释至 10^6 cfu/ml, 与健康壤土按 1:10(v:m)比例混合, 备用。

盆栽诱导试验: 每盆(直径 15 cm)含 600 g 感病土壤并移栽 3 叶 1 心番茄幼苗 1 株, 每株根部包裹 3 g 相应处理的诱导剂, 以清水无菌泥炭包裹处理为对照。每个处理设 15 盆, 5 盆为 1 个重复。日常管理(15 h、22 °C 光照, 9 h、19 °C 无光, 定时浇水保持表土稍润)。

1.4 样品采集

分别于试验第 1、2、3、4、5 天(相同时间点)后, 各处理随机挑选 3 盆, 轻轻拔离植株根部周围土体, 自来水快速冲洗, 无菌纸吸干, 置于液氮运输并转 -80 °C 冰箱保存、备用。

1.5 RT-PCR 基因表达监测

模板制备: 称取 0.1 g 番茄根部样品, 试剂盒法提取植物总 RNA, 纯化, 分别进行核酸仪浓度监测与 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

反转录: 分别以 0.5 μ g RNA 为模板与 oligo (dT12-18) 引物按照反转录试剂盒操作步骤配制 20 μ l 反应体系, 反转录为 cDNA, 备用。

RT-PCR 检测: 经 CFX96 实时荧光定量 PCR 仪检测完成。10 μ l PCR 扩增反应体系为: 3 μ l(1/10 稀释)cDNA, 1 μ l 0.5 μ mol/L 引物(F/R), 5 μ l SYBR green master mix。反应条件为: 95 °C 30 s, 95 °C 15 s, 60

°C 30 s, 72 °C 延长 30 s, 40 个循环。每次检测均在反应完成后再进行一个 72 ~ 95 °C 的反应溶解曲线对检测基因的扩增进行单峰特异性检验。每个样品的定量 PCR 反应重复 3 次。以 LeActin 内参基因表达值作参比, 计算各样品目的基因的相对表达量^[16]。

1.6 数据统计与分析

数据采用 Excel 2010、SPSS 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 荧光假单胞菌诱导番茄 PRs(病程蛋白)基因表达

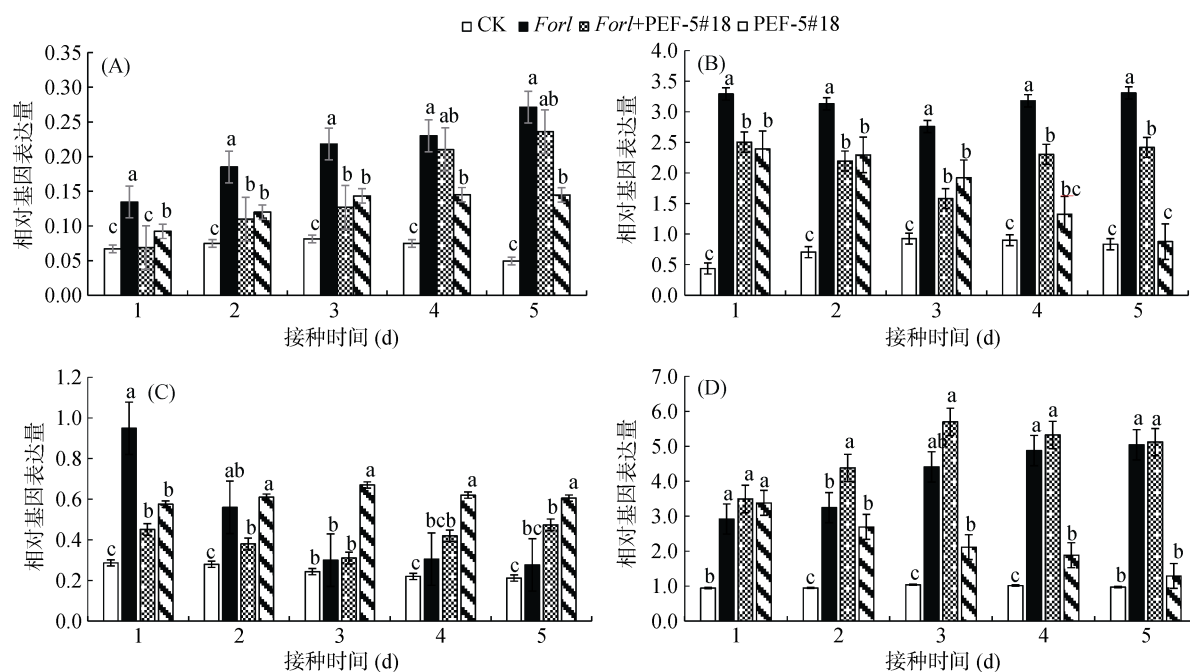
数据显示, 与对照相比, 其他处理 PRs 基因均受到不同程度的诱导表达, 其诱导效果受处理与时间的影响(如图 1 所示)。受 *Forl* 对番茄 SAR 诱导作用的影响, *Forl* 处理的 *PR1* 与 *PR6* 基因的相对表达量从第 1 天起逐渐上调, 至第 5 天时的相对基因表达量分别为对照基因表达量的 5.40 倍和 5.21 倍; *PR4* 基因从第 1 天起即受到诱导, 且基因表达明显上调并相对稳定, 其表达量维持在对照 3~4 倍的水平; *PR5* 基因仅在第 1 天有明显上调(为对照组表达量的 3.28 倍), 随后表达趋于微弱。

与对照相比, 单接荧光假单胞菌 PEF-5#18 处理的番茄 *PR1* 基因表达量在接种第 1 天后逐渐上调, 其第 5 天的相对基因表达量已达到对照的 2.80 倍; *PR5* 基因在第 3 天表达最强烈, 其相对基因表达量较对照组上调了 1.79 倍; *PR4* 和 *PR6* 基因只接种后第 1 天有较强表达, 此时的相对基因表达量为对照的 5.43 倍和 3.60 倍, 而随后表达逐渐减弱。

Forl 胁迫条件下, 接种荧光假单胞菌处理(PEF-5#18+*Forl*)的番茄 PRs 基因表达受到 SAR 和 ISR 双重作用的影响。与对照相比, 该处理的 *PR1* 基因在前 3 天的表达上调程度不明显, 而从第 4 天起才逐渐明显上调, 其第 5 天的相对基因表达量为对照的 4.80 倍; *PR4* 基因受 SAR 诱导作用影响, 相对基因表达量稳定且维持在对照 2 倍左右的水平; *PR5* 基因在第 1 天起即受到诱导上调, 但上调程度不明显, 其第 5 天的相对表达量最高, 为对照的 2.24 倍; *PR6* 基因在第 1 天起即明显上调, 至第 3 天达到峰值(为对照的 5.48 倍)。

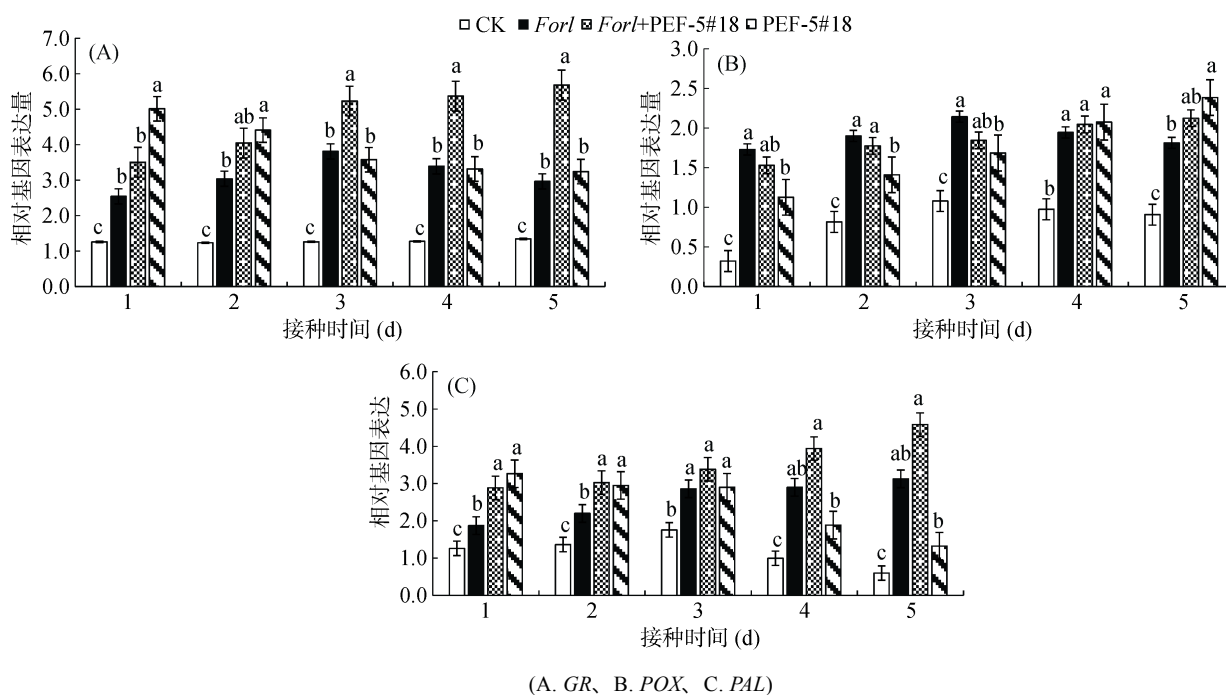
2.2 荧光假单胞菌诱导番茄防卫基因表达

从图 2 可以看出, 与对照相比, 各处理均能诱导番茄相关防卫基因表达上调, 而表达量的变化在不同处理间有不同表现。



(A. *PR1* ; B. *PR4* ; C. *PR5* ; D. *PR6* , 图中小写字母不同表示处理间差异达到 $P < 0.05$ 显著水平, 下同)

图 1 *Forl* 胁迫下接种荧光假单胞菌 PEF-5#18 对番茄病情蛋白 PRs 族基因表达的影响



(A. *GR*、B. *POX*、C. *PAL*)

图 2 *Forl* 胁迫下接种荧光假单胞菌 PEF-5#18 对番茄 *GR*、*POX*、*PAL* 等防卫基因表达的影响

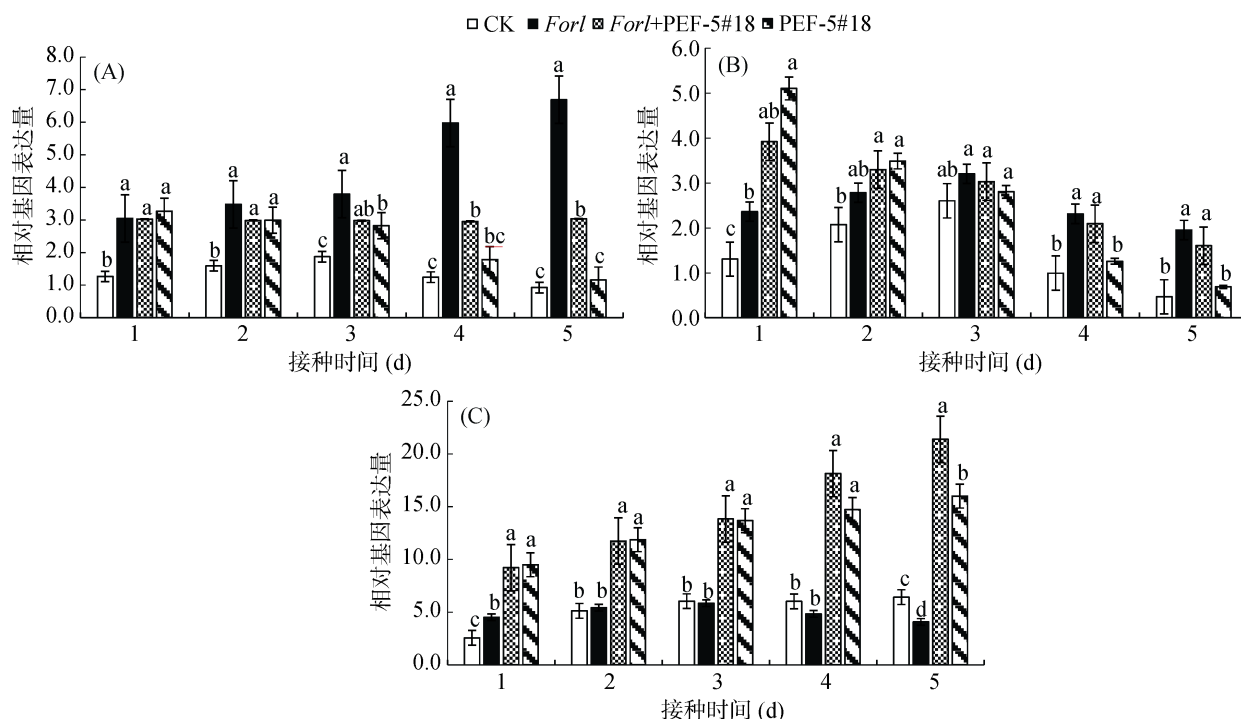
从第 1 天起, 各处理的谷胱甘肽还原酶基因 (*GR*) 表达普遍上调, 其中 *Forl* 处理的 *GR* 基因的表达在第 3 天达到峰值 (为对照的 3.02 倍); 单接 PEF-5#18 处理的 *GR* 基因仅在第 1 天表达明显, 此时的相对基因表达量为对照的 3.98 倍, 而后随着时间的延长而减弱; PEF-5#18+*Forl* 处理的 *GR* 基因

受诱导上调最为明显, 以第 5 天的相对表达量最高, 为对照的 2.42 倍。

与对照相比, *Forl* 处理对番茄 *POX* 基因的诱导表达效果明显, 该基因在第 3 天的相对表达量达到峰值, 为对照的 1.98 倍; 单接 PEF-5#18 处理可诱导 *POX* 基因表达上调, 其上调程度与诱

导时间呈正相关,第 5 天峰值时的相对表达量为对照的 2.63 倍;PEF-5#18+*Forl* 处理的 *POX* 基因表达上调程度较为稳定,基本维持在对照 2.30 倍左右的水平。

Forl 胁迫条件下,各处理番茄 *PAL* 基因的相对表达量均随诱导时间的延长而逐渐上调,至第 5 天时,*Forl* 处理 *PAL* 基因的相对表达量较对照上调了 4.2 倍,而 PEF-5#18+*Forl* 处理 *PAL* 基因的相对表达量较对照上调了 6.63 倍;单接 PEF-5#18 处理 *PAL* 基因仅在第 1 天表达最强烈(为对照的 2.20 倍),而后随诱导时间的延长而趋于减弱。



(A. 水杨酸调控路径基因 *PR1a*; B. 茉莉酸调控路径基因 *Pin2*; C. 乙烯调控路径基因 *PR1b*)

图 3 *Forl* 胁迫下接种荧光假单胞菌 PEF-5#18 对番茄防卫调控路径基因表达的影响

如图 3 所示,单接 PEF-5#18 的茉莉酸调控基因 *Pin2* 在第 1 天上调最明显,为对照的 3.90 倍,而后随诱导时间的延长而减弱;而与对照相比,接种病原菌的各处理(*Forl* 与 PEF-5#18+*Forl*)的 *Pin2* 基因的相对表达量上调幅度均表现为先下降后提高,并在第 5 天达到相对表达量峰值(分别为对照的 4.15 倍和 3.43 倍)。

从图 3 可以看出,*Forl* 处理的 *PR1b* 基因的表达仅在第 1~2 天有略微上调,而第 3~5 天则均未检测出上调;而接种荧光假单胞菌的 2 个处理(PEF-5#18、PEF-5#18+*Forl*)的 *PR1b* 基因表达均随诱导时间的延长而呈递增性上调趋势,其第 5 天的相对基因表达量分别为对照的 2.49 倍和 3.33 倍。

2.3 荧光假单胞菌诱导番茄系统性抗性(ISR)表达的信号传导途径

从图 3 可以看出,随诱导时间的延长,*Forl* 处理的水杨酸调控基因 *PR1a* 表达呈现出递增性上调,其相对基因表达量从第 1 天的 2.40 倍,递增至第 5 天的 7.19 倍;单接 PEF-5#18 处理的 *PR1a* 基因在第 1 天表达最强烈,为对照的 2.57 倍,而后伴随接种时间的延长而逐渐下调,至第 5 天时的上调幅度近乎微弱;PEF-5#18+*Forl* 处理的 *PR1a* 基因表达情况较为稳定,其相对表达量普遍维持对照 2 倍左右的水平。

3 结论

1) 接种荧光假单胞菌 PEF-5#18 能诱导番茄植株产生 ISR 抗性反应,其植株 PRs (*PR1*、*PR4*、*PR5*、*PR6*) 基因及 *GR*、*POX*、*PAL* 等防卫基因均被诱导上调表达;病原菌 *Forl* 胁迫时,番茄寄主所受诱导抗性受 SAR 和 ISR 共同作用影响,各抗性基因的诱导表达效果和规律与 SAR 和 ISR 抗性诱导生物源类型及诱导时间有关。

2) 病原菌 *Forl* 对番茄植株的 SAR 抗性诱导传导路径主要依赖于 SA 调控途径;而接种荧光假单胞菌 PEF-5#18 对番茄的 ISR 抗性诱导传导路径则主要依赖于茉莉酸和乙烯调控路径。

参考文献：

- [1] Colla P, Gilardi G, Gullino M L. A review and critical analysis of the European situation of soilborne disease management in the vegetable sector[J]. *Phytoparasitica*, 2012, 40(5): 515–523
- [2] 江欢欢, 程凯, 杨兴明, 等. 辣椒青枯病拮抗菌的筛选及其生物防治效应[J]. *土壤学报*, 2010, 47(6): 1225–1230
- [3] 文春燕, 高琦, 张杨, 等. 含PGPR菌株LZ-8生物育苗基质的研制与促生效应研究[J]. *土壤*, 2016, 48(2): 414–417
- [4] 王璐瑶, 蒋盼盼, 甘颖, 等. 解淀粉芽孢杆菌B1619诱导番茄防御酶活性提高和抗病相关基因的表达上调[J]. *中国生物防治学报*, 2017, 33(2): 234–240
- [5] Burketová L, Trdák L, Ott P, et al. Bio-based resistance inducers for sustainable plant protection against pathogens[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.004
- [6] Bolwerk A, Lagopodi A L, Wijffjes A H M, et al. Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(11): 983–993
- [7] Pieterse C M J, Zamioudis C, Berendsen R L, et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes[J]. *Phytopathology*, 2014, 104(3): 347–375
- [8] Zhang L, Khabbaz S E, Wang A, et al. Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of *Fusarium* crown and root rot disease of tomato[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2015, 118(3): 685–703
- [9] Çakır B, Gül A, Yolageldi L, et al. Response to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato roots involves regulation of SA-and ET-responsive gene expressions[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2014, 139(2): 379–391
- [10] Sahu P P, Rai N K, Puranik S, et al. Dynamics of defense-related components in two contrasting genotypes of tomato upon infection with Tomato Leaf Curl New Delhi Virus[J]. *Molecular Biotechnology*, 2012, 52(2): 140–150
- [11] Aimé S, Alabouvette C, Steinberg C, et al. The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47: A good candidate for priming the defense responses in tomato roots[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(8): 918–926
- [12] Van Kan J A L, Joosten M H A J, Wagemakers C A M, et al. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20(3): 513–527
- [13] Milling A, Babujee L, Allen C. *Ralstonia solanacearum* extracellular polysaccharide is a specific elicitor of defense responses in wilt-resistant tomato plants[J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e15853
- [14] Tornero P, Gadea J, Conejero V, et al. Two PR-1 genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(5): 624–634
- [15] Khabbaz S E, Abbasi P A. Isolation, characterization, and formulation of antagonistic bacteria for the management of seedlings damping-off and root rot disease of cucumber[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2013, 60(1): 25–33
- [16] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45–e45

Induction of Systemic Resistance and Signal Passway Regulation by *Pseudomonas fluorescens* PEF-5#18 Against *Fusarium* Wilt Disease on Tomato

ZHANG Liang¹, SHENG Hao¹, YUAN Hong¹, ZHAO Lanfeng², LI Huaxing^{2*}

(1 College of Natural Resources and Environment, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

2 College of Natural Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In this study, the expressions of pathogenic protein genes (PRs), defence related genes like *GR*, etc., and signal regulated key genes of SA, JA, ET passway were analyzed through RT-PCR technology in order to understand the mechanism of induced systemic resistance by *P. fluorescens* PEF-5#18 on tomato. The results showed that the pathogenic *Forl* and *P. fluorescens* PEF-5#18 could induce tomato plant resistance by SAR or ISR, respectively, whereas, under the interaction condition of *Forl*-Tomato- PEF-5#18, the joint-inducing effects from SAR and ISR affected tomato's resistance. Compared with the control treatment, all of the PRs family (*PR1*, *PR4*, *PR5*, *PR6*) genes as well as the related defense genes (*GR*, *POX*, *PAL*) were up-regulated, however, the expressing values and dynamic changes of induced genes were influenced by the SAR or ISR type and inducing time. In addition, the results implied the SAR induced by *Forl* was regulated through SA singal passway, and the ISR induced by *P. fluorescens* PEF-5#18 was mainly depend on JA or ET singal passway.

Key words: *Pseudomonas fluorescens*; Induced systemic resistance; Tomato wilt; Signal passway