

# 根茎病害研究通讯

*Communications in Plant Root and Stem Diseases Research*

(2019 年第 12 期, 总第 82 期)

主办: 西南大学植物保护学院, 重庆烟草科学研究所

主编: 丁伟

2019 年 12 月 30 日

## 研究成果

### 青枯菌与寄主、微生物互作研究的重要突破

#### ——青枯菌效应子 Brg11 参与病原-寄主-微生物的互作来提升自身生存力

植物病原细菌在于寄主互作的过程中, 通过 III 型分泌系统向寄主细胞中注射大量的效应蛋白, 来抑制寄主的免疫反应或干扰细胞的正常功能, 从而引起病害的发生。但是, 关于 III 型分泌系统效应蛋白是否参与病原物-寄主-微生物群落的互作目前还不清楚。德国图宾根大学 Thomas Lahaye 教授研究组近期在 *Cell* 子刊 *Cell Host & Microbe* 在线发表了题为 *A Plant Pathogen Type III Effector Protein Subverts Translational Regulation to Boost Host Polyamine Levels* 的研究论文。该研究首次表明, III 型分泌系统效应子很可能在病原物-寄主-微生物群落的互作过程中起着重要的作用。

TALE 是一类由黄单胞杆菌 (*Xanthomonas*) 分泌的 III 型分泌系统效应子, 这类蛋白能够结合到寄主靶标基因的启动子区域并激活下游感病基因的表达, 促进细菌侵染。Thomas 团队主要对植物青枯病菌的一个 TALE 类似效应子 Brg11 进行了探究, Brg11 具有和 TALE 类似的重复单元, 但它具有跟 TALE 不一样的 RVD 组成以及碱基识别特性。最新的这篇论文明确了该效应子的寄主靶标——精氨酸脱羧酶 (ADC) 基因。同时, 该研究发现, 青枯菌利用效应子 Brg11 靶向 ADC 来促进寄主多胺的合成。多胺通常参与植物对微生物的防御反应, 该研究还发现, Brg11 诱导的 ADC 表达及多胺的合成对青枯菌自身的生长没有影响, 而是能够抑制植物病原菌丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 的生长。

本论文的第一作者伍斗生, 是西南大学烟草植保团队毕业的研究生, 目前在德国图宾根大学 Thomas Lahaye 教授研究组进行博士阶段的学习。本论文首次揭示了病原菌通过效应子来操控寄主的防御反应, 抑制竞争微生物的生长, 提高自身在微生物群落中的竞争力。为 III 型分泌系统效应子在病原物-寄主-微生物群落的互作过程中起到的作用提供了重要证据。

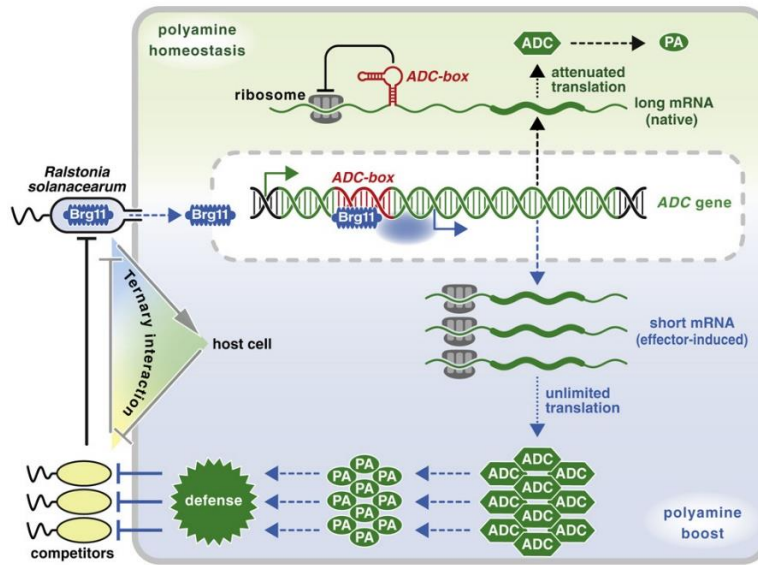


图 1 青枯菌 III 型分泌系统效应子参与病原物-寄主-微生物群落互作提升病原菌竞争力的模式图

(刘颖 供稿)

## 研究进展

### 施用草木灰进行土壤调酸，控制烟草青枯病

西南大学烟草植保团队前期研究结果表明，土壤酸化是烟草青枯病发生和加重的重要诱因，两者间具有显著的相关性，因此，防控烟草青枯病的首要任务就要进行土壤酸化改良，为筛选评估不同土壤调酸剂对土壤酸碱度的改良效果以及对烟草青枯病发生的影响，西南大学烟草植保团队选用草木灰开展了相关盆栽和田间试验，以为今后土壤酸化改良工作提供有效材料。

草木灰调酸处理室内盆栽试验处理后 20 天、40 天、50 天和 60 天土壤 pH 的检测结果如图 2 所示，草木灰与土壤质量比为 1:30。试验结果表明，草木灰粉剂和草木灰颗粒剂处理可显著提升土壤 pH，但草木灰粉剂调酸后 60 天内均能将土壤 pH 提高 1.0，而草木灰颗粒剂处理后 20 天土壤 pH 虽比对照提高了 1.22，但 40 天到 60 天其土壤 pH 仅比对照高出 0.32。

在田间调酸试验土壤 pH 和烟草青枯病发生情况如图 3 所示。草木灰粉剂和草木灰颗粒剂调酸后 20 天，土壤 pH 分别较空白对照提高了 0.47 和 0.42；调酸后 50 天，草木灰粉剂处理仍能明显提高土壤 pH 值 0.44，但此时草木灰颗粒剂土壤 pH 仅比空白对照高出 0.08（图 3A）。移栽后窝施草木灰粉剂和颗粒剂田间试验结果表明，调酸后 10 天，二者土壤 pH 分别提高了 0.39 和 0.37，但是调酸后 40 天，二者土壤 pH 和对照没有明显差别，只比对照高出 0.06 和 0.03，表明草木灰窝施调酸方式效果不佳，且不具有持续性（图 3B）。草木灰粉剂和颗粒剂处理烟草青枯病病情指数的病程进展曲线下面积（AUDPC）如 2C 所示，草木灰粉剂和草木灰颗粒剂处理对烟草青枯病整个时期的防控效果分别为 69.35%和 28.43%。

采收后期，烟株青枯病发病率达到最高值，草木灰颗粒剂不同用量处理烟草青枯发生情况和土壤 pH 如图 3D 所示。结果表明，随草木灰用量增加，土壤 pH 呈增加趋势，100 kg/667m<sup>2</sup>、200 kg/667m<sup>2</sup> 和 300 kg/667m<sup>2</sup> 草木灰用量处理土壤 pH 分别提高了 0.38、0.48 和 0.70。烟草青枯病的发病率随草木灰用量增加而降低，100 kg/667m<sup>2</sup>、200 kg/667m<sup>2</sup> 和 300 kg/667m<sup>2</sup> 草木灰用量对青枯病的相对防效分别为 32.56%、37.21%和 57.32%。

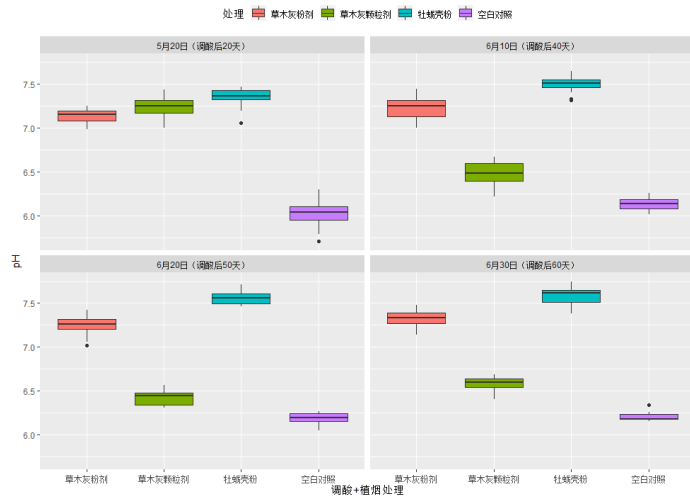


图 2 盆栽植烟调酸试验土壤 pH 变化情况

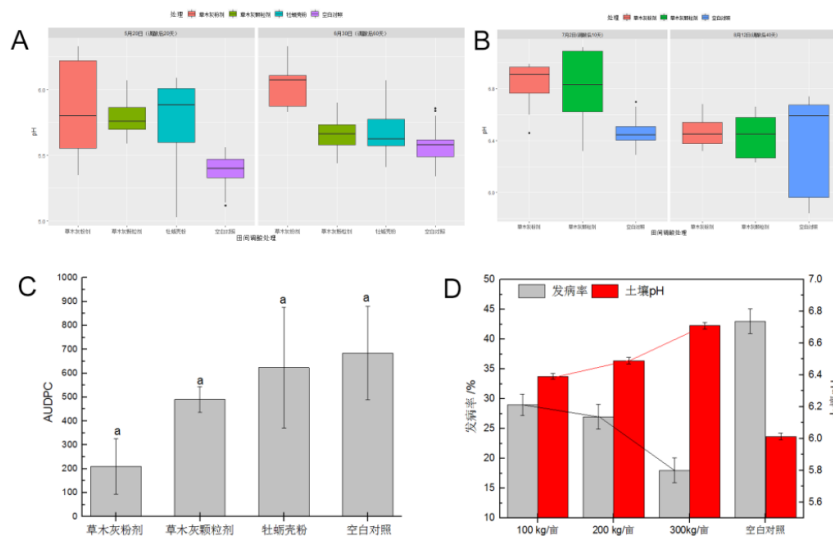


图 3 A)起垄条施草木灰对土壤 pH 的影响；B)窝施草木灰对土壤 pH 的影响；C)起垄条施草木灰副烟草青枯病发生的影响；D)不同草木灰用量对土壤 pH 和烟草青枯病发生的影响。

综上所述，盆栽和田间调酸试验结果表明，①草木灰施用方式以起垄条施调酸效果更佳。②草木灰粉剂和颗粒剂对土壤 pH 均有一定提升效果，但草木灰粉剂具有更为持久的调酸效果。草木灰粉剂和土壤质量比为 1: 30 时，室内盆栽调酸 60 天后土壤 pH 仍较空白对照高出 1.09。③100 kg/667m<sup>2</sup> 用量，草木灰粉剂田间调酸处理后 60 天，土壤 pH 仍较空白对照高出 0.4，草木灰颗粒剂处理土壤 pH 较空白对照高出 0.38，草木灰颗粒剂 300 kg/667m<sup>2</sup> 用量处理后土壤 pH 可提升 0.70。④草木灰粉剂 100 kg/667m<sup>2</sup> 用量对烟草青枯病有较好的防控效果，发病后期防效达 65.63%，整个发病期防效达 69.35%，草木灰颗粒剂 300 kg/667m<sup>2</sup> 用量

时对烟草青枯病防效可达 57.32%。

(江其朋 供稿)

### 酸长期胁迫后青枯菌菌株的特性评价

本研究团队经过多年的田间调查与分析,发现土壤酸化与青枯病发生之间存在一定的关系。同时,室内盆栽试验评价中,在 pH 4.5、5.0 和 5.5 的酸性条件下,青枯病发展得更快更严重。基于此背景,本研究团队进一步探究了酸长期胁迫对青枯菌菌株特性的影响。

研究主要设计两种 pH 不同的基础培养基 (MM),一种 pH 约 4.9,一种 pH 约 6.5,在两种不同的培养基条件下,对青枯菌进行连续传代培养,监测长期培养过程中菌株的酸适应性及其他特性评价。有评价结果可知,培养到约 1000 代时,酸环境的部分菌株还未表现出酸适应性,到 1500 代后,酸环境培养的菌株其适应性强于 pH 6.5 培养的菌株 (图 4)。

通过对各个特性进行评价,包括运动性、生物膜、竞争性以及致病力等,发现长期室内培养基培养后菌株均丧失致病力。通过竞争性试验可知,相较于 pH 6.5 培养下的菌株,酸培养的菌株在 pH 4.9 的 MM 培养基中的生长情况显著优于原始菌株 CQPS-1。另一方面,在酸环境下长期培养的菌株其运动性 (泳动性, swimming motility) 显著增强 (图 5、图 6)。

在动植物宿主系统中,细菌的运动性是一个重要的毒力因子,它介导病原菌的粘附、侵染和定殖。青枯菌能在土壤或其他环境中搜寻并感知植物信号如根系分泌物等,通过鞭毛进行游动到达植物根际。泳动性即通过鞭毛摆动进行运动,在液体培养基里表现为典型的泳动,仅由端生鞭毛控制。运动性可以保证青枯菌能够有效地侵染寄主植物。酸环境使青枯菌的泳动性增强,说明菌株适应酸环境可能提升了其寻找植物寄主的能力。更多机制还有待进一步深入分析。

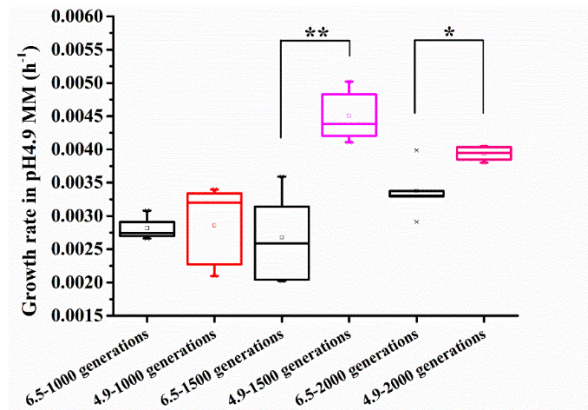


图 4 青枯菌在不同 pH 环境中长期培养后对酸的适应性评价

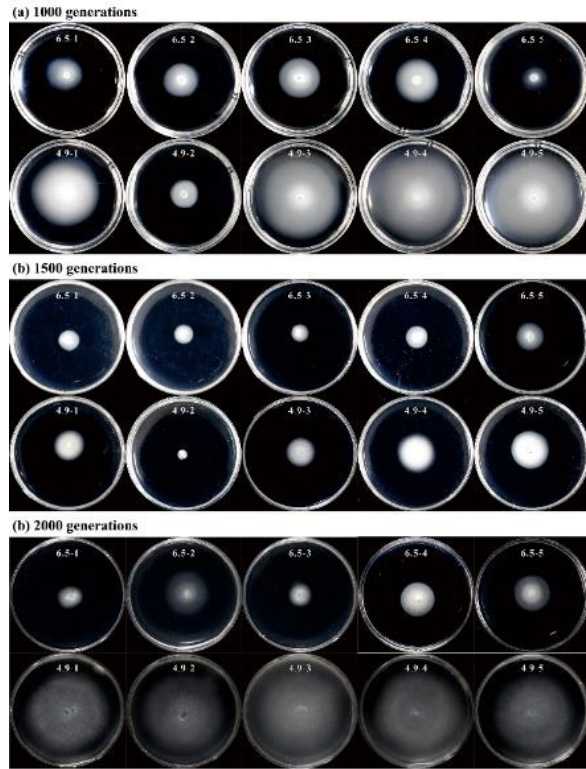


图 5 不同 pH 环境中长期培养后青枯菌的运动特性评价

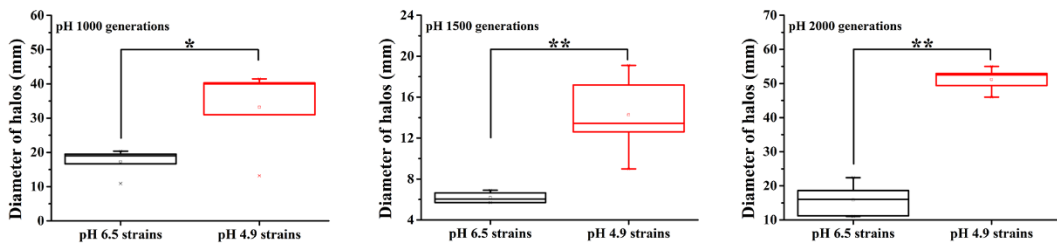


图 6 酸环境长期培养后青枯菌的运动性显著增强

(刘颖 供稿)

### 哈茨木霉诱导烟草抗青枯病的机制研究

木霉是目前生物防治上研究的热点生防因子之一,因其优良的生防效果已经在许多国家得到了大量的应用。目前国内外对木霉的研究机制也较为全面,木霉的主要生防机制主要包括,竞争作用、抗生作用、诱导抗性作用等。*Hypocrea lixii* TMN-1 是实验室通过采集植烟区健康土壤筛选分离的到的一株木霉菌株,初期的室内盆栽实验结果显示, TMN-1 菌株对防治烟草青枯病具有较好的生防效果,于是,继续对 TMN-1 菌株对防控烟草青枯病的机制进行探究,实验结果显示:灌根木霉孢子悬浮液后 4 天,处理后的烟草叶片内 PAL 酶活力呈逐渐上升的趋势,清水对照叶片内 PAL 酶活没有显著的变化,相较于对照组第三天时和第四天时,处理组相较于对照组 PAL 酶活显著高出 3.09 倍,和 2.16 倍。



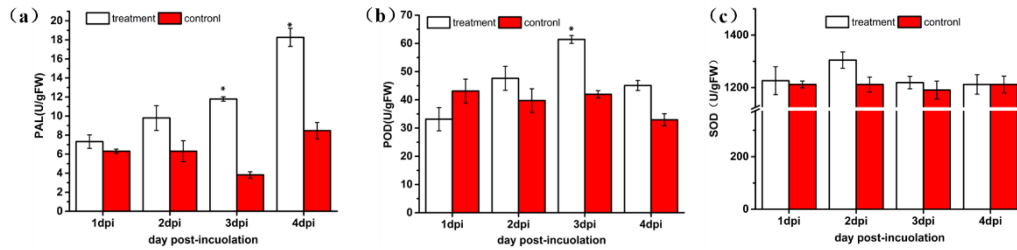


图7 哈茨木霉 TMN-1 对烟草防御酶活力的影响

对烟草叶片内的 POD 酶活检测发现，灌根使用木霉烟草叶片内 POD 酶活力在第三天时达到峰值，对照组 POD 活力为 61.39 U/g.FW，同时期对照组为 41.96 U/g.FW，为对照组的 1.46 倍。在 5% 的水平上具有显著性差异。对叶片中 SOD 酶活检测发现，处理后不会引起烟草叶片内 SOD 酶活力的变化。

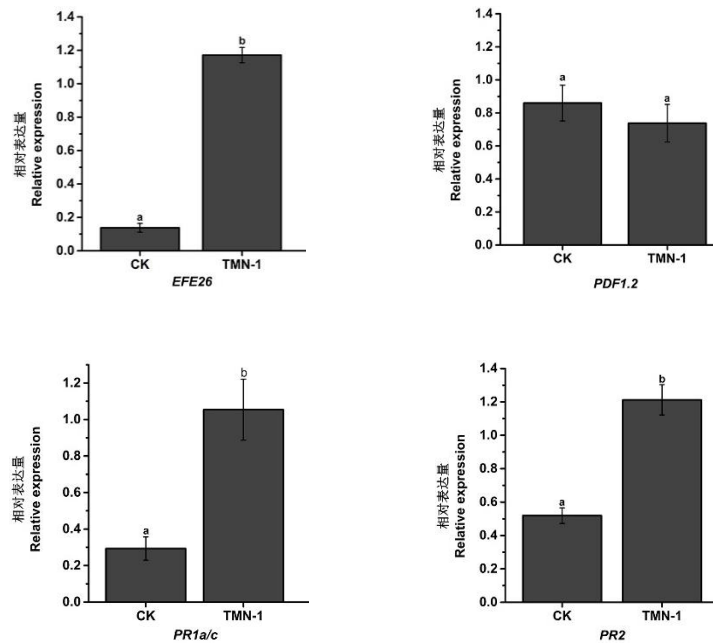


图8 木霉处理后对烟草叶片内抗性基因表达的影响

对烟草叶片内相关抗病基因表达的检测结果显示，木霉 TMN-1 菌株处理后，烟草叶片内水杨酸 SA 途径相关抗性基因 PR1a/c、PR2 表达较对照显著上调 3.60 倍和 2.34 倍；乙烯途径关键基因 EFE26 表达显著上调达 8.52 倍。对茉莉酸途径相关的关键基因 PDF1.2 的相对表达量检测发现，茉莉酸途径的关键基因无显著上调表达。

(朱洪江 供稿)

理论支撑

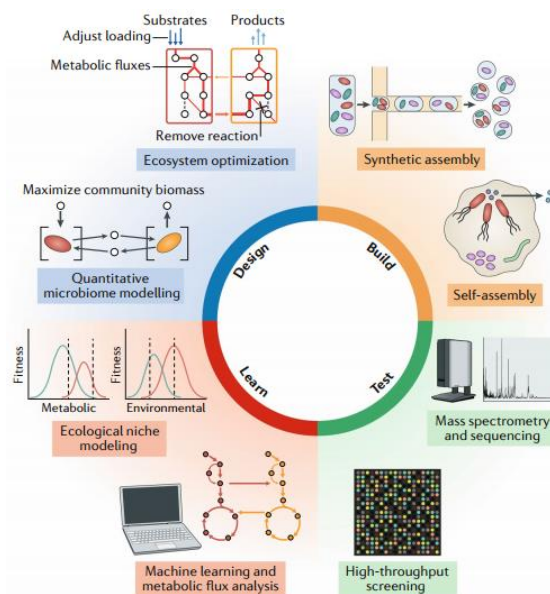
构建理想微生物组，解决植物健康问题

微生物群落驱动着地球生物地理化学循环，在所有环境生态位中均有发现<sup>[1,2]</sup>，拥有着

近乎无止境的能力，其在植物健康中扮演的重要地位已被许多研究所证实。因此，长期以来工程学家和科学家都在试图挖掘微生物的能力，例如操控土壤微生物组以提高作物产量<sup>[3]</sup>、刺激自然或和引入的微生物来修复污染的地下水<sup>[4]</sup>、建立微生物反应器来恢复污水中由价值是资源<sup>[5]</sup>。虽然这些研究成就明确了微生物具有极大价值的功能，但微生物绝大多数具有变革和开创性的功能还没有被解锁和利用。近年来，DNA 测序技术帮助阐明了许多不可培养的微生物遗传多样性及其在不同生态系统中关键角色，同时也为具有潜力的新颖生物技术的应用提供了参考。

当意识到微生物研究中这些未知的潜在研究领域，许多资助机构和国际科学界都在呼吁全世界相关领域的科学家共同开展微生物研究<sup>[6,7]</sup>。这些研究的目标已不仅仅局限于对微生物的描述，而更希望构建一个系统的方法去阐明微生物过程的机制，让我们在进行合理微生物编辑的过程中能有一个预见性和有的放矢的理解<sup>[6]</sup>。然而，对微生物基因、代谢和功能的不了解，以及对开展可控试验以明确详细功能系统的缺乏，阻碍了这一转变的实现。

采用工程学的方法集成基本科学的发现能克服上述的问题，开发一个具有革命性的解决方法，以支持可持续自然资源的管理。2019 年 9 月，Christopher 等在《Nature Reviews Microbiology》上发表的名为“设计微生物组的一般原则和最佳实践”的综述，文章总结前人研究，提出了一个基于设计、构建、测试和学习（design-build-test-learn, DBTL）循环的微生物组设计流程，为我们获得理想微生物组提供了参考。



首先，设计微生物组。主要有两种方法：

**自上而下 (top-down)**，即通过调节生态系统水平来构建具有预期功能的微生物群落。在此方法中可以使用特定的化学计量参数和动力学参数进行建模以表示微生物的关键生理功能，获得微生物群落功能。

**自下而上 (bottom-up)**，即通过预测代谢网络和相互作用构建具有所需功能的微生物群

落。通常该方法的设计过程是获得单个微生物（特别是已知的关键物种）的基因组，重建它们的代谢网络，使用模型和/或网络分析进行设计。

未来成功的微生物群落设计需要自上而下和自下而上方法的合理结合，选择未知群落或已有组合，将两种方法构建的模型合并，以实现期望的功能。

**第二步是构建微生物组。**构建阶段对应也分为两种：

**自组装微生物组 (self-assembled microbiomes)**，通过自上而下操作自然群落，使用反应器工程(例如，废水处理生物反应器)或生物刺激(例如，添加到土壤或地下含水层)开放混合培养的微生物群落，其中，环境可以促进微生物进行生长和预期的生理活动。

**合成微生物组 (synthetic microbiomes)**，自下而上使用自然产生或工程微生物组装设计的微生物组。合成微生物组复杂性大大降低，使用遗传上易于处理的微生物进行组合，通过实验室试验确定功能，再添加到环境中。

合理的微生物组设计的最终目标是开发能让设计者在理想的操作条件下直接原位添加、删除或修改特定功能和表型的工具。原位宏基因组设计与 CRISPR-CAS 基因编辑技术的结合的进一步发展将能精确操作原位微生物的代谢网络，有效地结合自组装和合成的微生物组。

**第三步是测试微生物组。**

检测阶段包括测定微生物组相关的表型和特性，以确保设计构建方案的有效性，例如是否达到设计预期，以及是否与观察到的结果有关联(建立因果关系)。这通常需要了解生态系统的理化性质和关键生态系统过程及微生物功能化学计量学和动力学。文中设想了一个测试阶段，包括对微生物组设计-构建的解决方案进行高通量表型筛选，使用多组学和代谢通量分析对有可能的设计方案进行更深入的研究，了解潜在的机制。高通量表型检测可以使用微流体液滴系统和全自动微生物反应器平台。结合新兴的检测方式来测定代谢网络活动和代谢过程，将获得丰富的信息，有利于后续的学习阶段。

**第四步是学习微生物组。**

DBTL 循环的学习阶段对于成功设计并提高微生物组效率至关重要，它要求从以前的设计、构建和测试阶段的经验中学习，并将新知识纳入后续的循环。此外还需要进一步发展计算方法，包括机器学习算法、代谢通量分析、生态系统建模方法等。这些分析可以从大型数据中分离出微生物群落相互作用和功能的主要驱动因素，从而为微生物群落设计提供信息。

近年来，人们开发了实验室模拟生态系统来研究植物与土壤微生物的相互作用，这样就可以使用一种可控的方式，设计具有所需功能的工程微生物群落，并能够将实验室结果与自然环境下结果进行比较。实验室模拟生态系统与 DBTL 循环的结合对于理解微生物相互作用和功能稳定性的机制十分重要。通过使用实验室模拟生态系统，



结合现有的微生物生态学和工程设计知识，有可能破译微生物群落的化学语言，发现其他重要生态过程的机制，从而使微生物群落功能更加强大和稳定。通过这个理想微生物获得循环流程，我们可以筛选在控制对植物病原微生物具有抑制作用、对植物病害具有防控的关键微生物类群，以物化控病产品。

### 参考文献

- [1] Falkowski, P. G., Fenchel, T. & Delong, E. F. The microbial engines that drive earth 's biogeochemical cycles. *Science* 320, 1034–1039 (2008).
- [2] Kuypers, M. M. M., Marchant, H. K. & Kartal, B. The microbial nitrogen- cycling network. *Nat. Rev. Microbiol.* 16, 263–276 (2018).
- [3] O'Connell, K. P., Goodman, R. M. & Handelsman, J. Engineering the rhizosphere: expressing a bias. *Trends Biotechnol.* 14, 83–88 (1996).
- [4] LÖfler, F. E. & Edwards, E. A. Harnessing microbial activities for environmental cleanup. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 274–284 (2006).
- [5] Mccarty, P. L., Bae, J. & Kim, J. Domestic wastewater treatment as a net energy producer a can this be achieved? *Environ. Sci. Technol.* 45, 7100–7106 (2011).
- [6] Alivisatos, A. P. et al. A unified initiative to harness Earth's microbiomes. *Science* 350, 507–508(2015).
- [7] Dubilier, N., McFall- Ngai, M. & Zhao, L. Create a global microbiome effort. *Nature* 526, 631–634(2015).
- [8] Lawson, C. E., Harcombe, W. R. et al. Common principles and best practices for engineering microbiomes. *Nature Reviews Microbiology* 17, pages725–741(2019) (2019).

（江其朋 供稿）