

汪 惠,谢琳琳,刘文波,等. 2 种 harpin 内源表达对短短芽孢杆菌 HAB-5 菌株抑制和促生能力的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):161-166.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.046

2 种 harpin 内源表达对短短芽孢杆菌 HAB-5 菌株抑制和促生能力的影响

汪 惠,谢琳琳,刘文波,林春花,缪卫国,郑服丛

(海南大学环境与植物保护学院/海南热带生物资源可持续利用重点实验室,海南海口 570228)

摘要:采用化学方法分别将来自水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、棉花角斑病菌(*X. citri* subsp. *malvacearum*) *hrp* 基因簇中的 *hpa1*_{Xoo}、*hpa*_{Xm} 基因转化至生防菌短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*) HAB-5 菌株,测定 2 种 harpin 蛋白对短短芽孢杆菌抑菌和促生能力的影响,以期获得更高效的生防菌株。结果表明,获得转入 *hpa1*_{Xoo} 的突变体 581 个,转入 *hpa*_{Xm} 的突变体有 650 个;经 PCR 及 PCR Southern Blot 验证,确定 *hpa1*_{Xoo}、*hpa*_{Xm} 基因均成功转化至 HAB-5 菌株中;经 SDS-PAGE 电泳,在分子量大小约 39、41 ku 处可见明显条带,表明 *hpa1*_{Xoo}、*hpa*_{Xm} 基因分别编码的融合蛋白 GST-harpinXoo、GST-harpinXm 在突变体菌株中得到表达;与出发菌株 HAB-5 菌株相比,转化后的突变体在菌落形态、拮抗性上均发生了改变,且突变体总蛋白可在烟草叶片上激发过敏反应,而 HAB-5 菌株总蛋白不能激发过敏反应;突变体菌株对番茄种子的促生作用显著提高,且转入 *hpa*_{Xm} 基因的菌株效果更佳,使胚芽、胚根的生长分别提高 100.77%、69.14%。可见,harpin 能够在短短芽孢杆菌 HAB-5 菌株中得到表达,且转化后的突变体表现出良好的促生效果。

关键词: *hpa1*_{Xoo}; *hpa*_{Xm}; 转化; 短短芽孢杆菌 HAB-5; 过敏反应

中图分类号: S476 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0161-06

harpin 是一类由革兰氏阴性植物病原细菌 *hrp* 基因编码的蛋白质,由不依赖信号肽的Ⅲ型分泌机制分泌到胞外,可在非寄主植物上引起过敏反应(hypersensitive response, HR)^[1-3]。在非寄主植物上施用 Harpin 蛋白,可使植物产生抗病、抗虫、促进生长等多种有益表型^[4],这些表型与 harpin 蛋白诱导的植物内在生理生化反应相关^[5]。harpin 蛋白富含甘氨酸,缺乏半胱氨酸,热稳定但对蛋白酶敏感^[6]。harpin_{Xoo}、harpin_{Xm} 是由分别来自于水稻白叶枯病菌

(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、棉花角斑病菌(*X. citri* ssp. *malvacearum*) *hrp* 基因簇中 *hpa1* (*hrf1*) 基因编码的蛋白,均具有 harpin 蛋白的共同特征,且能诱导烟草、拟南芥、番茄、矮牵牛、马铃薯、大豆、黄瓜、辣椒等多种植物产生过敏反应^[7-8]。

芽孢杆菌作为一种较理想的生防微生物,逐渐成为近年来研究的热点^[9]。通过基因工程技术有目的地改造拮抗细菌,拓宽新型高效生防菌的防治范围并提高生防效果,已成为植物病害生物防治研究的重点^[10]。目前,已有学者将编码 harpin 蛋白的 *hrp* 基因转入枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌中,使出发菌株具有 harpin 蛋白的部分特性^[11-12]。以短短芽孢杆菌作为表达系统是研究热点,但其表达 harpin 蛋白却未见报道。短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*) HAB-5 菌株是一种较广谱的生防细菌,对多种病原菌表现出较强的抑制能力,但该菌株不具有诱导抗病能力和稳定有效的促生效果^[13]。把编码 harpin 蛋白诱导植物系统抗性的 *hrp* 基因转化到生防菌芽孢杆菌中,以期实现 harpin 蛋白在短短芽孢杆菌中的高效表达,获得更高效的生防菌株,为新型生物农药的开发利用提供基础。

收稿日期:2015-01-25

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160359、31360029);海南省产学研一体化专项(编号:CXY20140038);海南大学社会服务专项(编号:HDSF201305);教育部博士点基金(编号:20124601110004、20104601110004);国家农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-34-GW8);国家重大基础研究计划(编号:2011CBI11612)。

作者简介:汪 惠(1991—),女,硕士研究生,主要从事微生物学研究。
通信作者:郑服丛,教授,主要从事植物病理学研究。E-mail: zhengfucong@126.com。

性及危害调查[J]. 中国农业科学,2012,45(14):2856-2866.

[18]李茂柏,马殿荣,徐正进,等. 辽宁省杂草稻生物学特性研究[J]. 安徽农业科学,2006,34(20):5224-5225.

[19]刘 萍. 杂草稻与栽培稻叶片生长的竞争性研究[J]. 中国植保导刊,2010,30(5):13-15.

[20]袁锦南,刘培凤. 杂草稻的田间鉴别与防治对策浅析[J]. 上海农业科技,2010(1):134-135.

[21]马 巍,马殿荣,李金英,等. 基于植物学性状的吉林省杂草稻多样性研究[J]. 北方水稻,2010,40(3):9-12.

[22]龚朝辉,龚航莲. 萍乡市杂草稻的发生与危害[J]. 杂草科学,2014,32(1):54-56.

[23]杨 庆,马殿荣,宋冬明,等. 不同密度杂草稻对栽培稻群体形态特征及产量的影响[J]. 北方水稻,2008,138(5):28-31.

[24]李国君,何卓先,王 革,等. 广东雷州杂草稻的发生与危害及其防治对策[J]. 杂草科学,2013,31(1):20-25.

[25]孙兴强,周勇军,陆永良,等. 两种生物型江都杂草稻不同栽培密度对水稻生长的影响及其与栽培稻的亲缘关系[J]. 中国水稻科学,2012,26(1):118-122.

1 材料与方法

1.1 供试菌株、培养基、植物材料

供试菌株为 HAB-5 菌株,是笔者所在实验室从棉花根际土壤中分离获得的 1 株短短芽孢杆菌^[13]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 BL21(DE3)作为重组融合蛋白 GST-harpin_{xoo}、GST-harpin_{xm}表达的宿主菌株,具有氨苄青霉素抗性(Amp,100 mg/mL),表达的重组融合蛋白 GST-harpin_{xoo}、GST-harpin_{xm}的分子量大小分别为 39、41 ku 左右。芒果炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) C7-2 菌株来自笔者所在实验室,用于拮抗测定。

LB 培养基^[14]用于 HAB-5 菌株、突变体菌株的培养;PDA 培养基^[14]用于供试病原真菌、HAB-5 菌株、突变体菌株的对峙培养。MD 培养基^[15](10 mL)配方为:10×PC 缓冲液 0.92 mL、50% 葡萄糖 0.1 mL(115℃灭菌 30 min)、5 mg/mL 色氨酸 0.1 mL、2.2 mg/mL 柠檬酸铁铵 0.005 mL、0.5 mol/L 天门冬氨酸钾 0.24 mL、1 mol/L 硫酸镁 0.03 mL。10×PC 缓冲液配方为:磷酸二氢钾 44 mmol/L、磷酸氢二钾 60 mmol/L、柠檬酸三钠 30 mmol/L。

供试烟草品种为三生烟(*Nicotiana* sp.),于(25±1)℃培养至 5~7 叶。番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)种子红粉佳人,购自天津科润农业科技股份有限公司。

1.2 酶、试剂、引物

质粒提取试剂盒、DNA Marker、*Taq* 酶、限制性内切酶、*T*₄ DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司,Southern 杂交试剂盒购自美国罗氏公司,分子操作过程均按说明书进行。引物合成、测序均由华大基因公司完成,引物序列见表 1。PCR 反应体系(总体积 25 μL)为:*EcoTaq* Mix 8.5 μL、DNA 模板 1 μL、上下游引物各 1 μL,并使用灭菌超纯水补足至 25 μL。PCR 反应条件为:95℃预变性 5 min;95℃45 s、56℃45 s、72℃45 s,共 35 个循环;72℃延伸 7 min,于 4℃保存。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,保存图像。

表 1 试验合成引物

引物名称	引物序列(5'→3')
<i>hpaI</i> _{xoo} -F	TTCGGATCCATGAACCTCTTTGAACACACAATT
<i>hpaI</i> _{xoo} -R	GGTGAGCTCTTACTGCATCGATGCGCT
<i>hpa</i> _{xm} -F	GGATCCATGAATTCTTTGAACACAC
<i>hpa</i> _{xm} -R	ATTGAGCTCTTACTGCATCGATCCG

1.3 *hpaI*_{xoo}、*hpa*_{xm} 基因转入 HAB-5 菌株

参考杨春晖的方法^[15]将 *hpaI*_{xoo}、*hpa*_{xm} 基因转入 HAB-5 菌株中。HAB-5 菌株在 LB 平板上活化后,挑取单菌落接种于 2 mL LB 液体培养基,于 28℃、160 r/min 下振荡培养 12~16 h。转接 2 mL HAB-5 菌液至 50 mL MD 培养基中,于 28℃摇床培养 4 h,以 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,弃去上清液,剩余 5 mL 上清液悬浮菌体。将 1 mL 菌液作为负对照,向其余 4 mL 菌液中加入 2~5 μg *hpaI*_{xoo} 或 *hpa*_{xm},于 28℃、200 r/min 下振荡培养 2 h;加入相应体积 10 倍的 LB 液体培养基,于 28℃、200 r/min 下振荡恢复培养 2 h;以 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,留微量上清液悬浮菌体,涂布于含抗生素 Amp(100 μg/mL)的 LB 平板上,于 28℃放

置约 24 h,可见抗性菌落长出。

1.4 HAB-5 菌株、突变体菌株的菌落形态及其对 C7-2 菌株的拮抗作用

1.4.1 菌落形态观察 用灭菌后的牙签接菌在 LB 琼脂平板上,置于 28℃培养 2 d,观察菌落形态。

1.4.2 对芒果炭疽菌 C7-2 菌株的拮抗作用 采用平板对峙法^[16],在 PDA 平板中央接种 1 块直径为 0.5 cm 的病原菌饼,在菌饼周围 2.5 cm 处接种供试细菌;单独接种直径为 0.5 cm 的病原菌饼为对照。将平板置于 28℃下培养,观察记录有无抑菌圈及其大小,并计算抑菌率。抑菌率(%)=(对照病原菌菌落直径-处理病原菌菌落直径)/对照病原菌菌落直径×100%^[17]。

1.5 粗蛋白的提取及 SDS-PAGE 电泳

参照缪卫国提取 harpin 粗蛋白、菌体总蛋白的方法^[8],采用 LB 液体培养基振荡培养(160 r/min、28℃)菌株 12 h,以 8 000 r/min 下离心 10 min 收集菌体。将菌体用 PBS 悬浮,经超声波破碎仪破碎菌体后于 4℃、8 000 r/min 离心 10 min。采用 0.22 μm 细菌过滤器过滤上清液,获得粗蛋白,煮沸(100℃)10 min 进一步纯化粗蛋白以检测 harpin 蛋白的活性。SDS-PAGE 电泳参照汪家政等的方法^[18]进行。

1.6 烟草过敏反应及突变体蛋白特性

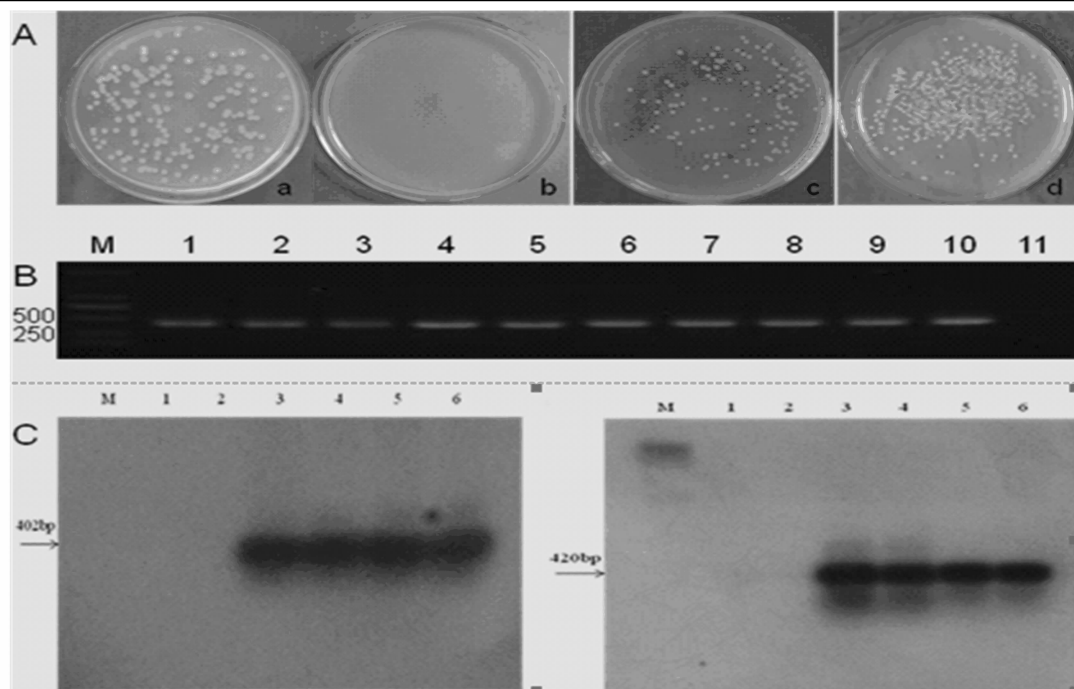
过敏性反应的测定参照 Klement 的方法^[19],分别取 HAB-5 菌株的总蛋白、突变体代表菌株的总蛋白、GST-harpin_{xoo} 蛋白、GST-harpin_{xm} 蛋白、PBS 各 50 μL,注射到烟草叶片中,于(25±1)℃下放置,观察烟草叶片是否发生过敏反应。突变体蛋白特性的研究参照谌晓曦等的方法^[20],分别测定菌体粗蛋白在煮沸 10 min、强酸碱、蛋白酶 K、紫外线等处理下的稳定性。

1.7 短短芽孢杆菌 HAB-5 菌株及其突变体菌株对番茄种子的促生作用

取 HAB-5 菌株、突变体代表菌株,测试其对番茄种子的促生作用。取摇菌过夜的菌株培养液,于 4℃、8 000 r/min 下离心 10 min,弃去上清液。经无菌水清洗后再次离心,并用无菌水调节至 *D*_{600 nm}=0.8,即菌液浓度约为 10 亿 CFU/mL,保存备用。采用无菌水将各菌株菌悬液依次稀释为 1 亿、0.1 亿、0.01 亿、0.001 亿 CFU/mL 等浓度,每个处理浓度 3 次重复,每个重复 10 粒番茄种子。种子经温汤浸种后,置于铺有单层滤纸的培养皿(9 cm)中,分别向各培养皿中注入 5 mL 不同浓度的处理液,种子上部再铺 1 层滤纸,置于(28±1)℃恒温培养箱中。于 72 h 后观察发芽势情况,于 96 h 后计算发芽率,并测定胚根、胚芽的长度,以根长达到 0.2 cm 为萌芽标志^[21]。试验中对照均为无菌水。

2 结果与分析

2.1 突变体菌株的筛选及 PCR、PCR Southern Blot 验证 将 *hpaI*_{xoo}、*hpa*_{xm} 基因转化 HAB-5 菌株 48 h 后,在 Amp 抗性平板上形成单菌落,作为阳性转化子,分别获得转入 *hpaI*_{xoo}、*hpa*_{xm} 的转化子 581、650 个(图 1-A)。挑取 50 个阳性转化子进行 PCR 验证,发现在 400~500 bp 间均可扩增出特异性条带,经测序比对分别与 *hpaI*_{xoo}、*hpa*_{xm} 基因序列吻合。其中 10 个突变体的电泳结果见图 1-B,分别将转入 *hpa*_{xm} 的



A—突变体菌株的筛选；a—HAB-5 未转化前菌落平板；b—HAB-5 转化后菌落平板；c—转 *hpa1_{Xoo}* 菌落平板；d—转 *hpa_{Xm}* 菌落平板。
B—转 *hpa1_{Xm}*、*hpa_{Xoo}* 基因突变体菌株的 PCR 扩增结果；M—2 000 marker；1—B1xm；2—B2xm；3—B3xm；4—B4xm；5—B5xm；6—B1xoo；7—B2xoo；8—B3xoo；9—B4xoo；10—B5xoo；11—HAB-5。C—转 *hpa1_{Xm}*、*hpa_{Xoo}* 基因突变体菌株的 PCR Southern Blot 验证结果；左：M—marker；1—ddH₂O；2—HAB-5；3—xm；4—B1xm；5—B2xm；6—B3xm。右：M—marker；1—ddH₂O；2—HAB-5；3—xoo；4—B2xoo；5—B3xoo；6—B5xoo

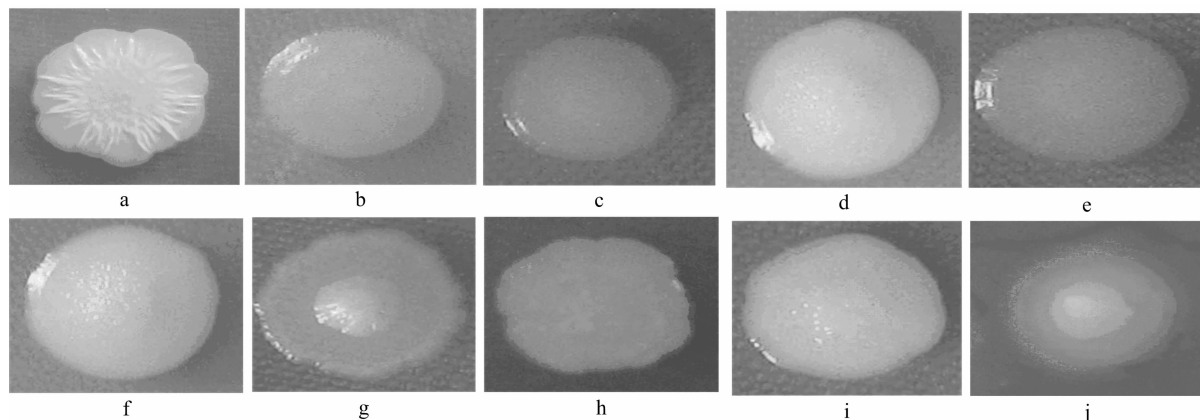
图1 突变体菌株的筛选及 PCR、PCR Southern Blot 验证结果

突变体命名为 B1xm、B2xm、B3xm、B4xm、B5xm，将转入 *hpa1_{Xoo}* 的突变体命名为 B1xoo、B2xoo、B3xoo、B4xoo、B5xoo。进行 PCR Southern Blot 验证以确保试验的精确性，可见选取的突变体均产生明显阳性信号（图 1 - C），由此确定 *hpa1_{Xoo}*、*hpa_{Xm}* 基因均已成功转化至 HAB-5 菌株中。

2.2 菌落形态对比

转化后的突变体在固体 LB 培养基平板上接种 72 h，与

HAB-5 菌株相比，转入 *hpa1_{Xoo}*、*hpa_{Xm}* 基因的突变体菌落均发生了一定程度的形态变化。HAB-5 菌株的菌落呈白色，菌落表面微起皱褶，菌苔边缘呈波纹状，不透明，易挑起；转化后突变体的菌落颜色各异，呈白色或微黄色，菌落表面凸起，半透明且有光泽，质地湿润，不易挑起。转 *hpa_{Xm}* 菌株的菌落较平滑，菌苔边缘较整齐；转 *hpa1_{Xoo}* 菌株的菌落多呈蛋黄状，中心凸起，边缘较平坦，菌苔边缘多呈不规则状（图 2）。



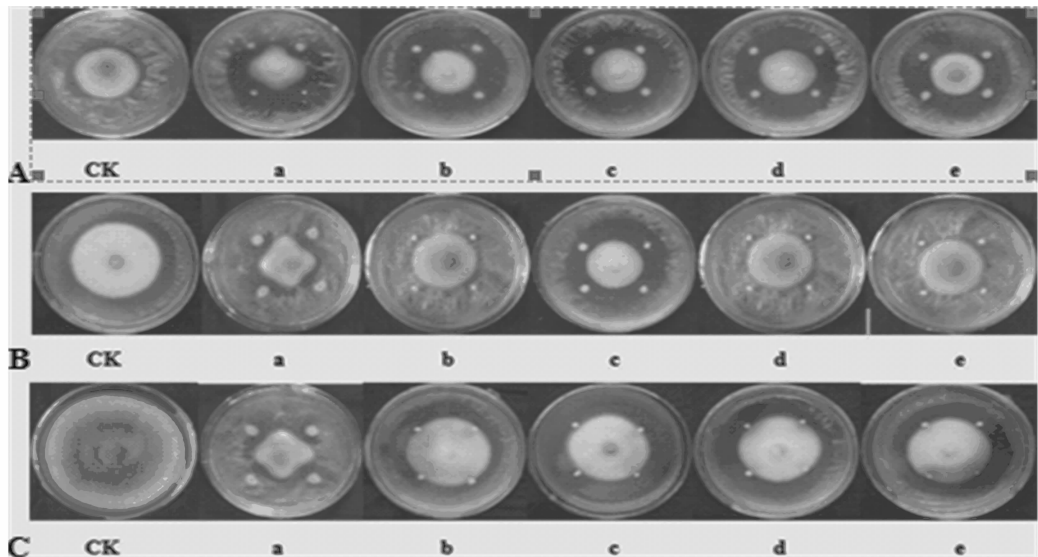
a—HAB-5菌株；b—B1xm菌株；c—B2xm菌株；d—B3xm菌株；e—B4xm菌株；f—B1xoo菌株；g—B2xoo菌株；h—B3xoo菌株；i—B4xoo菌株；j—B5xoo菌株

图2 HAB-5 菌株转化前后的菌落形态

2.3 突变体对炭疽病 C7-2 菌株的拮抗作用

对峙培养后，HAB-5 菌株及各突变体菌株在培养 3、5、7 d 后均对病原菌 C7-2 菌株产生不同程度的抑制作用，但与 HAB-5 菌株相比，突变体的拮抗活性均减弱。对峙 3 d

后产生抑菌带；对峙 5 d 后抑菌带逐渐减弱，但抑菌效果有所增强；对峙 7 d 后抑菌带消失，但对病原菌仍有一定程度的抑菌作用（图 3、表 2）。



A—拮抗 3 d 效果；B—拮抗 5 d 效果；C—拮抗 7 d 效果。CK—C7-2 菌株；a—HAB-5 菌株对 C7-2 的拮抗效果；b—B2xm 菌株对 C7-2 的拮抗效果；c—B3xm 菌株对 C7-2 的拮抗效果；d—B2xoo 菌株对 C7-2 的拮抗效果；e—B5xoo 菌株对 C7-2 的拮抗效果

图3 突变体菌株的拮抗效果

表 2 各菌株对 C7-2 菌株的抑菌效果

菌株	3 d		5 d		7 d	
	菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)	菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)	菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)
CK	3.60aA	—	5.70aA	—	9.00aA	—
HAB-5	2.70dD	-25.00	2.78fE	-51.22	2.93dD	-67.44
B2xm	3.40bAB	-5.56	3.93bB	-31.05	6.93cC	-23.00
B3xm	3.00cC	-16.67	3.25eD	-42.98	6.77cC	-24.78
B2xoo	3.43bAB	-4.72	3.70cBC	-35.09	8.07bB	-10.33
B5xoo	3.30bB	-8.33	3.50dC	-38.60	7.90bA	-12.22

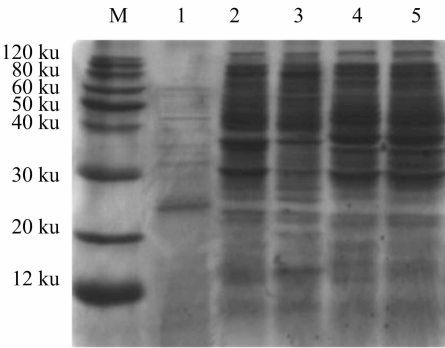
注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)，不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)，下表同。

2.4 突变体 harpin 蛋白的表达

从突变体中选取 2 株代表性菌株 B3xm、B5xoo，用作后续研究。细胞破碎提取 GST-harpin 粗蛋白以及 HAB-5、B3xm、B5xoo 菌株总蛋白后，经 SDS-PAGE 电泳，在 30~50 ku 之间，约 39、41 ku 位置可见 B3xm、B5xoo 菌株总蛋白均存在明显条带，与 GST-harpin_{xm}、GST-harpin_{xoo} 相应位置的条带相同；而在 HAB-5 菌株总蛋白的泳道相同位置并未出现类似条带，表明融合蛋白 GST-harpin_{xm}、GST-harpin_{xoo} 在突变体 B3xm、B5xoo 菌体内得到表达。此外，与 HAB-5 菌株相比，B3xm、B5xoo 在整个蛋白谱带上均发生了改变，表明突变体菌株在多肽和蛋白表达的种类、数量上也有很大改变（图 4）。

2.5 突变体粗蛋白过敏性反应检测及其特性

将 GST-harpin_{xoo} 粗蛋白、GST-harpin_{xm} 粗蛋白、B3xm 粗蛋白、B5xoo 粗蛋白分别注射至烟草叶片中，18 h 后均能在烟草叶片上产生过敏性反应，而 HAB-5 菌株粗蛋白不能产生过敏性反应。分别以 100℃ 煮沸 10 min、强酸、强碱处理突变体粗蛋白，仍能在 18 h 内激发 HR；经蛋白酶 K 水解 30 min、紫外光照射处理则完全丧失了激发 HR 的能力，表明突变体表达的 harpin 蛋白对酸碱不敏感，对热稳定、紫外线和蛋白酶 K 敏感，此结论与已报道的 GST-harpin_{xoo}、GST-harpin_{xm} 粗蛋白特性^[8] 相同（图 5）。

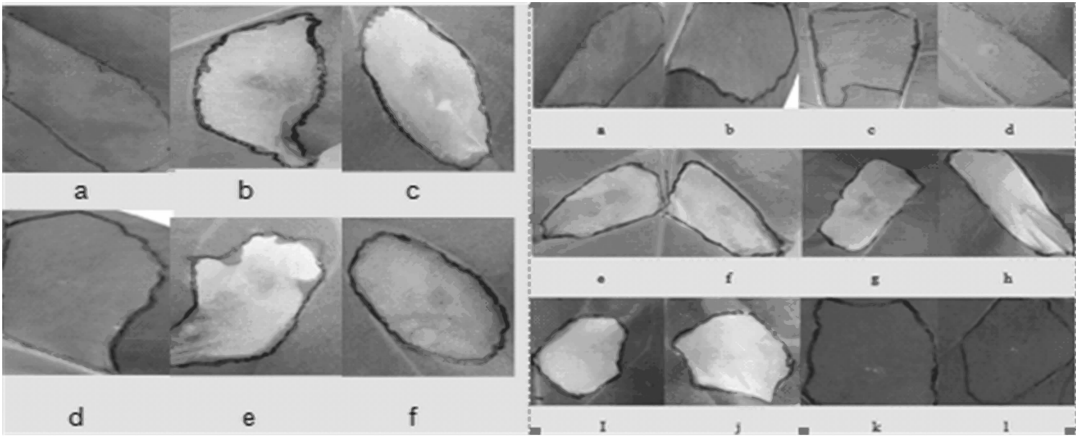


M—Protein marker；1—HAB-5 粗蛋白；2—HarpinXm 粗蛋白；3—B3xm 粗蛋白；4—HarpinXoo 粗蛋白；5—B5xoo 粗蛋白

图4 菌体总粗蛋白SDS-PAGE电泳

2.6 各菌株对番茄种子的促生效果

与清水对照相比，HAB-5、B3xm、B5xoo 不同浓度菌悬液对胚芽、胚根的生长均有显著性差异。除 10 亿 CFU/mL 外，随着浓度的降低，HAB-5 菌悬液的胚芽生长分别比对照高 10.85%、24.03%、26.36%、34.11%，胚根生长分别比对照高 9.14%、26.29%、29.71%、36.00%，0.001 亿 CFU/mL 为菌悬液的最适浓度，胚芽、胚根生长分别提高 34.11%、36.00%；B3xm 菌悬液的胚芽生长分别比对照高 100.77%、59.70%、27.13%、44.19%、45.74%，胚根生长分别比对照高



左：烟草过敏反应测定。a—PBS；b—GST-HarpinXm 粗蛋白；c—GST-HarpinXoo 粗蛋白；d—HAB-5粗蛋白；e—B3xm 粗蛋白；f—B5xoo 粗蛋白。右：蛋白特性测定。a—PBS；b—HAB-5 粗蛋白；c—B3xm粗蛋白蛋白酶 K 处理；d—B5xoo 粗蛋白蛋白酶k处理；e—B3xm 粗蛋白酸处理；f—B5xoo 粗蛋白酸处理；g—B3xm 粗蛋白碱处理；h—B5xoo 粗蛋白碱处理；i—B3xm 粗蛋白热处理；j—B5xoo 粗蛋白热处理；k—B3xm 粗蛋白紫外照射处理；l—B5xoo 粗蛋白紫外照射处理

图5 突变体粗蛋白过敏性反应检测及其特性

69.14%、28.29%、21.71%、24.00%、20.57%，10 亿 CFU/mL 为菌悬液的最适浓度，胚芽、胚根生长分别提高 100.77%、69.14%；B5xoo 菌悬液的胚芽生长分别比对照高 68.21%、54.26%、69.77%、91.47%、46.51%，胚根生长分别比对照高 36.86%、25.71%、38.57%、47.14%、38.86%，0.01 亿 CFU/mL 为菌悬液的最适浓度，胚芽、胚根生长分别提高 91.47%、

47.14%。可见，除 10 亿 CFU/mL 的 HAB-5 菌悬液外，不同浓度的菌悬液对番茄胚根、胚芽生长均有不同程度的促生作用；与 HAB-5 菌株相比，转化后的突变体菌株 B3xm、B5xoo 对胚芽和胚根的促生作用均有明显提高，且高浓度菌悬液对番茄种子的生长并无抑制作用（表 3）。

表 3 不同浓度菌悬液对番茄种子生长的影响

菌悬液 (CFU/mL)	胚芽长度						胚根长度					
	HAB-5		B3xm		B5xoo		HAB-5		B3xm		B5xoo	
	平均值 (cm)	比 CK 增 (%)	平均值 (cm)	比 CK 增 (%)	平均值 (cm)	比 CK 增 (%)	平均值 (cm)	比 CK 增 (%)	平均值 (cm)	比 CK 增 (%)	平均值 (cm)	比 CK 增 (%)
CK	1.29cB		1.29cB		1.29bA		3.50cB		3.50bB		3.50bB	
1×10 ⁹	1.27cB	-1.55	2.59aA	100.77	2.17aA	68.21	2.40dC	-31.43	5.92aA	69.14	4.79aAB	36.86
1×10 ⁸	1.43bcAB	10.85	2.06abAB	59.70	1.99aAB	54.26	3.82bcAB	9.14	4.49bAB	28.29	4.4abAB	25.71
1×10 ⁷	1.60abAB	24.03	1.64bcB	27.13	2.19aA	69.77	4.42abAB	26.29	4.26bAB	21.71	4.85aAB	38.57
1×10 ⁶	1.63abAB	26.36	1.86bcAB	44.19	2.47aA	91.47	4.54abAB	29.71	4.34bAB	24.00	5.15aA	47.14
1×10 ⁵	1.73aA	34.11	1.88bcAB	45.74	1.89aAB	46.51	4.76aA	36.00	4.22bAB	20.57	4.86aAB	38.86

3 结论与讨论

目前,harpin 蛋白基因表达宿主主要是大肠杆菌、酵母、芽孢杆菌表达系统。大肠杆菌是经典的蛋白基因表达系统,能够高水平表达外源蛋白基因,但由于革兰氏阴性菌细胞壁复杂,具有双层膜结构,其分泌的水解酶常在信号肽的引导下跨越第 1 层膜后滞留在周质空间,因而很难将蛋白分泌到胞外;此外,大肠杆菌是一种潜在的病原菌,其生长过程中不断释放脂多糖等致热源物质,为产物的分离和纯化带来巨大困难^[22]。酵母菌虽具有一定蛋白翻译后的加工能力,有利于真核蛋白的表达,但在表达外源基因时会出现产物蛋白不均一、降解、信号肽加工不完全、形成多聚体等问题,蛋白分泌效率低^[23]。相对于前两者,芽孢杆菌表现出很大的优越性。王钰利用枯草芽孢杆菌表达 harpin 蛋白,生物活性检测、诱导植物抗病性分析结果表明,工程菌能够诱导烟草叶片产生过敏反应,并能提高番茄对早疫病菌的抗性^[11]。乔俊卿等将 harpin

编码基因导入解淀粉芽孢杆菌 FZB42 菌株中,harpin 蛋白可分泌到胞外并保持生物活性,表现出比出发菌株更好的促生和防病能力^[12]。本研究将 2 种 harpin 编码基因导入短短芽孢杆菌 HAB-5 菌株中,反而降低了该菌株的抑菌能力,但能够诱导烟草叶片产生过敏反应,并提高出发菌株的促生能力。关于芽孢杆菌生防菌株的构建,枯草芽孢杆菌的研究较为成熟,但由于其胞外蛋白酶活性很强,会大量降解外源蛋白,在构建工程生防菌株时具有较大局限性。苏云金芽孢杆菌虽然胞外蛋白酶活性不高,但野生菌株中含有大量内生质粒,而内生质粒对外源基因的导入和表达具有较大影响。本研究中短短芽孢杆菌 HAB-5 菌株的胞外蛋白酶活性仅为枯草芽孢杆菌的 1.6%,且细胞壁较薄,内生质粒较少^[24],从而能有效防止外源蛋白的降解,促进外源基因的高效导入,使有促生防病效果的 harpin 蛋白与生防芽孢杆菌真正结合起来,研制出新型高效的生防制剂。以短短芽孢杆菌作为表达系统是研究热点,但未见其表达 harpin 的相关报道。本研究结果

表明,将突变体菌体总蛋白 B3xm、B5xoo 注射至烟草叶片,均能在烟草叶片上产生明显的过敏性坏死斑;经 SDS - PAGE 电泳,分别在分子量大小为 39、41 ku 处可见明显条带,表明融合蛋白 GST - harpin_{xm}、GST - harpin_{xoo}在突变体菌体内得到良好表达。此结论与编码 harpin 基因转入枯草芽孢杆菌^[11]、解淀粉芽孢杆菌 FZB42 菌株的研究结论^[12]相一致。

本研究通过化学方法成功将 hpa1_{xoo}、hpa_{xm} 基因转入短链芽孢杆菌 HAB - 5 菌株中,得到一系列转化子。虽转化效率很高,但得到的突变体菌落均发生了形态变化,且目前筛选出的突变体对致病菌的拮抗效果与原始菌株相比均不理想。已有研究表明,用质粒进行菌株标记时,由于质粒中报告基因、抗生素等基因的表达是在宿主菌体的复制、转录、翻译系统作用下进行的,消耗了宿主的物质和能量,对宿主造成代谢负担,可能影响宿主菌体的拮抗性能^[25]。此外,在 SDS - PAGE 电泳过程中发现,突变体 B3xm、B5xoo 菌株在整个蛋白谱带上与 HAB - 5 菌株有很大差异,菌株体内表达的多肽和蛋白质的数量、种类均发生了变化,从而使表达的抑菌活性物质发生改变。在突变体与病原菌 C7 - 2 菌株的对峙培养过程中,培养 3 d 后突变体对 C7 - 2 菌株表现出一定程度的抑菌作用,5 d 后抑菌作用有所增强,7 d 后抑菌作用逐渐减弱。已有研究表明,枯草芽孢杆菌代谢过程中产生的某些抗菌物质,可能作为营养物质被细菌本身和其他菌利用,导致抗菌物质减少、抑菌作用减弱^[26-27],此现象有待进一步验证。

在番茄种子促生试验中,与 HAB - 5 菌株相比,突变体的促生作用明显提高,且转入 hpa_{xm} 基因效果更佳,胚芽、胚根生长分别提高 100.77%、69.14%,为今后微生物农药的开发提供依据。10 亿 CFU/mL HAB - 5 菌悬液对番茄种子的生长具有抑制作用,但随着浓度的降低,均能对番茄种子产生促生作用。宋永燕等在研究 LM - 3 对水稻的促生作用时发现,低浓度拮抗菌无细胞滤液对植物均有促生作用,较高浓度的拮抗菌滤液则出现抑制作用^[28],这与本研究结论相似。在番茄种子促生试验中,未发现 B3xm、B5xoo 突变体菌株菌悬液抑制种子生长的现象,这可能与 harpin 蛋白在 HAB - 5 菌株中的表达有关,有待开展后续相关研究,以期为生防菌的实际应用提供依据。

参考文献:

- [1] Liu R, Lü B, Wang X, et al. Thirty - seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biosciences*, 2010, 35(3): 435 - 450.
- [2] Zhang L, Xiao S, Li W, et al. Overexpression of a harpin - encoding gene *hrf1* in rice enhances drought tolerance [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(12): 4229 - 4238.
- [3] Alfano J R, Collmer A. Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2004, 42: 385 - 414.
- [4] He S Y, Huang H C, Collmer A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpins: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants [J]. *Cell*, 1993, 73(7): 1255 - 1266.
- [5] Wang Y, Li Y Q. Expression and bio - activity test of *Erwinia caroto-*

- vor* Harpin in *Bacillus subtilis* [C]// The 6th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, 2008.
- [6] Wei Z M, Laby R J, Zumoff C H, et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora* [J]. *Science*, 1992, 257(566): 85 - 88.
- [7] 闻伟刚, 王金生. 水稻白叶枯病菌 harpin 基因的克隆与表达 [J]. *植物病理学报*, 2001, 31(4): 295 - 300.
- [8] 缪卫国. 转 hpa1_{xoo} 基因棉花抗病虫防卫反应与全基因组转录谱分析及棉花角斑病菌 hpa_{xm} 基因的功能 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [9] 朱明妍, 刘 姣, 杜春梅, 等. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(34): 16635 - 16638.
- [10] 赵立平, 申 泉, 李艳琴, 等. 产 harpin 的成团泛菌工程菌的构建 [J]. *植物病理学报*, 1999, 29(2): 142 - 146.
- [11] 王 钰. 表达 Harpin 蛋白的枯草芽孢杆菌生防菌的构建 [D]. 太原: 山西大学, 2009.
- [12] 乔俊卿, 伍辉军, 霍 蓉, 等. 表达 Harpin 蛋白的芽孢杆菌工程菌的构建及其生防效果 [J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36(6): 37 - 44.
- [13] 杨廷雅, 孙 亮, 周婷婷, 等. 短链芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis* HAB - 5 主要抑菌活性成分的分析及其特性研究 [J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(2): 222 - 231.
- [14] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1979.
- [15] 杨春晖. 短小芽孢杆菌碱性蛋白酶基因启动子的功能研究 [D]. 成都: 四川大学, 2006.
- [16] 王家和. 烟草根病拮抗真菌的分离与筛选 [J]. *中国生物防治*, 1998, 14(1): 29 - 32.
- [17] 马 平, 李社增, 陈新华, 等. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病 [J]. *沈阳农业大学学报*, 1999, 18(3): 390.
- [18] 汪家政, 范 明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 231 - 238.
- [19] Hypersensitivity K Z. Mount [M]. New York: Academic Press, 1982: 149 - 177.
- [20] 谌晓曦, 陈卫良, 马志超, 等. 抗水稻纹枯病菌拮抗蛋白质的理化性质研究 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 1999, 25(5): 42 - 45.
- [21] 姜冷若, 张振华, 胡永红, 等. 不同浓度 NaCl 胁迫对番茄种子发芽特性的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2002(5): 41 - 42.
- [22] Rosano G L, Ceccarelli E A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 172.
- [23] 范翠英, 冯利兴, 樊金玲, 等. 重组蛋白表达系统的研究进展 [J]. *生物技术*, 2012, 22(2): 76 - 80.
- [24] Udaka S, Yamagata H. Protein secretion in *Bacillus brevis* [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1993, 64(2): 137 - 143.
- [25] 车建美, 刘 波, 蓝江林, 等. 短链芽孢杆菌 JK - 2 的 GFP 标记及其抑菌作用 [J]. *中国生物防治*, 2010, 26(2): 230 - 234.
- [26] 毛 涛, 袁科平, 韦扬帆. 固定化枯草芽孢杆菌净化池塘养殖水体的效果 [J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(6): 1355 - 1359.
- [27] 朱丽云, 戴贤君, 张富明, 等. 枯草芽孢杆菌对畜禽常见致病微生物体外拮抗作用的研究 [J]. *中国畜牧杂志*, 2009, 45(21): 41 - 43.
- [28] 宋永燕, 李 平, 李姝晋, 等. 生防细菌 LM - 3 对水稻的促生性和诱导抗性研究 [J]. *西南农业学报*, 2006, 19(3): 438 - 441.