

杨凌糖丝菌蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2 诱导植物抗病功能

于洪佳^{1,2}, 张家阳^{1,2}, 王平平³, 崔传斌³, 颜霞^{1,2*}, 黄丽丽^{2,4*}

1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100

2 作物抗逆与高效生产全国重点实验室, 陕西 杨凌 712100

3 中国烟草总公司陕西省烟草公司, 陕西 西安 710000

4 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100

于洪佳, 张家阳, 王平平, 崔传斌, 颜霞, 黄丽丽. 杨凌糖丝菌蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2 诱导植物抗病功能[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 268-282.

YU Hongjia, ZHANG Jiayang, WANG Pingping, CUI Chuanbin, YAN Xia, HUANG Lili. Protein elicitors HSyp1 and HSyp2 from *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015 enhance disease resistance of plants[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 268-282.

摘要:【目的】前期研究从杨凌糖丝菌(*Saccharothrix yanglingensis*) Hhs.015 全基因组中初步筛选出 4 种能够诱导烟草发生过敏反应(hypersensitive response)的蛋白激发子, 本研究进一步探讨引发明显 HR 的 2 个激发子及其相关的免疫机理, 为深入研究 Hhs.015 诱导植物抗病性的分子机制提供依据。【方法】通过过敏反应和活性氧检测等方法筛选能够诱发植物免疫反应的蛋白激发子。使用原核表达系统纯化蛋白, 通过观察病斑表型、测定防御相关酶活性及分析防御基因表达, 验证这些激发子在诱导植物抗病性方面的功能。同时, 将蛋白激发子应用于苗期拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 以观察其促生效果。【结果】从 Hhs.015 中筛选出能够引起烟草(*Nicotiana benthamiana*)过敏反应、促进胼胝质和活性氧沉积、防御基因上调, 且能够以可溶性形式表达的蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2。植物抗病性检测结果表明, HSyp1 和 HSyp2 能够提高不同植物对核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、黑杆病菌(*Phytophthora capsica*)以及黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)的抗病性。此外, 研究还发现 HSyp1 和 HSyp2 对苗期拟南芥的子叶和根部发育具有一定的促生作用, 其中 HSyp2 的促生效果比 HSyp1 更为显著。【结论】本研究筛选出 2 个蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2, 能够激发植物免疫反应, 提高植物抗病能力, 并具有促生作用。这些发现为开发新型生物农药提供了理论基础, 也为其未来的田间

资助项目: 国家自然科学基金(32072477); 中国烟草总公司重大科技项目[110202101056(LS-16)]; 中国烟草总公司陕西省公司科技项目(KJ-2021-02)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072477), the Science and Technology Major Project of China National Tobacco Corporation (110202101056(LS-16)), and the Science and Technology Project of Shaanxi Branch of China National Tobacco Corporation (KJ-2021-02).

*Corresponding authors. E-mail: HUANG Lili, huanglili@nwsuaf.edu.cn; YAN Xia, luckyx@126.com

Received: 2024-07-30; Accepted: 2024-10-18; Published online: 2024-10-23

应用提供了实验依据。

关键词: 原核表达; 蛋白激发子; 过敏反应; 植物抗病性; 促生作用

Protein elicitors HSyp1 and HSyp2 from *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015 enhance disease resistance of plants

YU Hongjia^{1,2}, ZHANG Jiayang^{1,2}, WANG Pingping³, CUI Chuanbin³, YAN Xia^{1,2*}, HUANG Lili^{2,4*}

1 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

2 State Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-efficiency Production, Yangling 712100, Shaanxi, China

3 Shaanxi Tobacco Company, China National Tobacco Corporation, Xi'an 710000, Shaanxi, China

4 College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: [Objective] Preliminary studies have identified four protein elicitors from the whole genome of *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015 that can induce a hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. This study investigated the two elicitors capable of triggering a strong HR and their associated immune mechanisms, aiming to provide a basis for probing into the molecular mechanisms by which Hhs.015 enhances the disease resistance of plants. [Methods] The protein elicitors capable of inducing the immune responses of plants were screened based on the HR and reactive oxygen species (ROS) levels. A prokaryotic expression system was used to purify the proteins. Furthermore, we verified the roles of the protein elicitors in inducing plant disease resistance by observing the disease spots, measuring the activities of defense-related enzymes, and analyzing the expression of defense genes. Additionally, we treated *Arabidopsis thaliana* seedlings with the protein elicitors to evaluate the plant growth-promoting effects of the elicitors. [Results] The protein elicitors HSyp1 and HSyp2 from Hhs.015 that could induce a HR, callose and ROS deposition, and upregulation of defense genes in *N. benthamiana*, were screened and found to be soluble. HSyp1 and HSyp2 enhanced the resistance of different plants to *Sclerotinia sclerotiorum*, *Phytophthora capsica*, and *Valsa mali*. Furthermore, HSyp1 and HSyp2 promoted the cotyledon and root development of *A. thaliana* seedlings, and HSyp2 exhibited stronger plant growth-promoting effect than HSyp1. [Conclusion] This study identified two protein elicitors HSyp1 and HSyp2 capable of triggering immune responses, enhance disease resistance, and promoting growth of plants. The findings provide a theoretical basis for the development of new biocontrol agents and offer experimental evidence for their future field application.

Keywords: prokaryotic expression; protein elicitors; hypersensitive response; disease resistance of plants; plant growth-promoting effect

植物病害一直是严重影响农作物品质和产量的世界性难题。在长期进化中,植物形成了复杂的免疫系统抵御病原菌的侵害。2006年, Jones等^[1]提出了经典的“Zig-zag”模型,阐明了植物免疫系统可以处于3种不同状态: pathogen-associated molecular patterns triggered immunity (PTI)、effector-triggered susceptibility (ETS)以及 effector-triggered immunity (ETI)。植物可以单独处于这3种状态中的一种,也可以同时存在于多种状态,从而构建了一个复杂的植物免疫体系模型。

激发子是一类能够诱导植物产生防卫反应并提高植物抗病和抗逆性的物质。根据其化学性质,激发子可以分为蛋白质、多肽、低聚糖和脂质等^[2-3]种类。在植物防御机制中,蛋白激发子具有重要作用。它们可以诱导植物产生一系列免疫应答,例如在响应过程中某些组织会积累活性氧(reactive oxygen species, ROS)和胼胝质,增强防御相关酶的活性,并诱导免疫基因的表达,从而进一步提高植物抗病和抗逆能力。Sun等^[4]揭示了蛋白激发子 GP1pro 作用于蛋白 NbPIP2;4 启动宿主细胞防御,调控植物免疫; Li等^[5]研究证明蛋白激发子 PevD1 能够强烈诱导 ERF114 转录因子的表达,通过激活苯丙氨酸解氨酶基因 PAL1 的转录,进而增强了 PevD1 诱导的水杨酸和木质素的合成,最终提高植物抗病性;此外, Wang等^[6]发现来自于短孢短小芽孢杆菌 A60 的新型蛋白激发子 PeBL1 可激活本氏烟草的防御反应和系统抗性。

杨凌糖丝菌 (*Saccharothrix yanglingensis*) Hhs.015 是一株分离自黄瓜根部的生防放线菌^[7]。在前期研究中,已经证实 Hhs.015 对黑腐皮壳菌 (*Valsa mali*)、黑杆病菌 (*Phytophthora capsica*) 及不致病普通假丝酵母 (*Candida vulgaris*) 等植物病原菌均有较好防治效果^[8-9]。

同时,研究发现 Hhs.015 能够在苹果组培苗中定殖,并且组织学与细胞学观察表明 Hhs.015 可以通过拮抗溶菌、竞争作用、诱导植物抗性等防止 *V. mali* 对寄主进行侵染^[10-11],然而 Hhs.015 具体的诱抗机制仍不清楚。对 Hhs.015 进行全基因组测序,发现 142 个未知功能的假定蛋白。目前只鉴定出蛋白激发子 BAR11 与 PeSy1 参与了诱导植物免疫过程^[12-13]。本研究通过优选得到 2 个蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2,对提高植物抗病能力和促生功能进行研究,为新型生物农药的开发奠定了理论基础,也为未来在田间应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、植物和载体

杨凌糖丝菌 Hhs.015、黑杆病菌、核盘菌和黑腐皮壳菌均保存于西北农林科技大学植物保护学院和作物抗逆与高效生产全国重点实验室,农杆菌感受态 GV3101、大肠杆菌感受态 DH5 α 和 BL21 均购自北京擎科生物科技股份有限公司。

本氏烟草种子、1 月龄苹果组培苗 (GL-3)、野生型 Col-0 拟南芥种子、原核表达载体 pET28a 和马铃薯 X 病毒载体 (potato virus X) 均由本实验室提供。

1.1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0, 15.0–20.0 琼脂粉^[14]; LB 液体培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0; LB 固体培养基加 15.0–20.0 琼脂粉^[15]; V8 果汁培养基(g/L): V8 果汁 200.0, CaCO₃ 3.0, 琼脂 15.0–20.0, pH 5.8^[16]; 1%水琼脂培养基(g/L): 琼脂粉 10.0。

1.1.3 主要试剂

限制性内切酶, 赛默飞世尔科技公司; 2×*Taq* MasterMix, 康为世纪生物科技股份有限公司; RealStar Green Mixture 定量检测 Mix, 北京康润诚业生物科技股份有限公司; 溶菌酶(MP biomedical)、5×SDS 蛋白上样缓冲液和蛋白质 SDS-PAGE Marker, 北京索莱宝科技有限公司; 蛋白凝胶快速染液, 北京庄盟国际生物基因科技有限公司; 高保真 DNA 聚合酶 Phanta[®] Max Super-Fidelity DNA Polymerase 试剂盒、ClonExpress[®] II 一步克隆试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒 DNA 提取试剂盒和凝胶回收试剂盒, Omega 公司; 植物 RNA 提取试剂盒, 北京华越洋生物科技股份有限公司; 细菌 DNA 提取试剂盒 PrepMan[™] Ultra、反转录试剂盒和 Ni-NTA 蛋白纯化试剂盒, 赛默飞世尔科技公司。

1.2 蛋白激发子在大肠杆菌中表达载体及诱导坏死载体的构建

使用 Primer Premier 软件进行引物设计, 用于片段扩增的引物序列见附表 S1 (已提交国家微生物科学数据中心, 编号为 HSyp1: NMDCNO00646H, HSyp2: NMDCN0006461, HSyp3: NMDCN000646J, HSyp4: NMDCNO00646K)。使用赛默飞世尔科技公司的 PrepMan[™] Ultra 提取 Hhs.015 基因组 DNA, 对目的基因进行扩增。PCR 反应体系(50 μL): 2×Phanta Max Buffer 25 μL, dNTP Mix (10 mmol/L each) 1 μL, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 17 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。回收的 PCR 产物与酶切后的 pET28a 载体(*Sal* I/*Eco*R I)以及

PVX 载体(*Cla* I/*Sal* I)进行连接, 热激转入大肠杆菌 DH5α 感受态, 24 h 后提取质粒, 所有质粒送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序验证。

1.3 蛋白激发子在烟草中的瞬时表达

将质粒 PVX-HSyp1 (His.015_GM002882)、PVX-HSyp2 (His.015_GM007256)、PVX-HSyp3 (His.015_GM003220)和 PVX-HSyp4 (His.015_GM007061)转入农杆菌感受态 GV3101, 在 28 °C、220 r/min 摇床中避光培养 18 h (LB 双抗液体培养基: 卡那霉素 50 μg/mL, 利福平 25 μg/mL)。用 10 mmol/L MgCl₂ 溶液将收集的菌体洗涤 2 次, 7 000 r/min 离心 2 min, 弃上清; 再用 10 mmol/L MMA 溶液 (10 mmol/L MES、0.2 mmol/L 乙酰丁香酮、10 mmol/L MgCl₂)洗涤 1 次后重悬菌体, 与 P19 1:1 混合, 用 MMA 溶液调节 OD₆₀₀ 至 0.6, 避光静置 2 h^[17]。选取长势良好的本氏烟草, 背面进行注射, 并以 PVX-GFP (GV3101)为阴性对照, PVX-INF1 (GV3101)为阳性对照。注射后将烟草置于 22 °C 温室(14 h 光照/10 h 黑暗)继续生长, 5 d 后观察结果, 拍照记录并取样。

1.4 烟草叶片的活性氧及胍胍质检测

用二氨基联苯氨染色法(DAB 染色法)对烟草叶片进行染色, 检测 H₂O₂ 的累积^[18]。农杆菌注射 24 h 后, 对叶片进行取样, 然后置于 1 mg/mL DAB (pH 3.8)溶液中, 在光照条件下反应 18 h, 用脱色液(75 mL 无水乙醇、25 mL 氯仿、体积分数 0.15%的三氯乙酸)进行脱色至叶片表面无明显绿色, 观察并拍照记录结果。

胍胍质观察采用苯胺蓝染色法^[18], 先将经过实验处理的叶片脱色至无色, 然后置于苯胺蓝染色液 (150 mmol/L K₂HPO₄、体积分数 0.01%的苯胺蓝、pH 9.5)中避光放置 12 h, 通过荧光显微镜紫外通道观察结果, 并拍照记录。

1.5 蛋白激发子的原核表达及蛋白纯化

将重组质粒热激转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态, 挑取阳性单菌落接种于 5 mL 含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 14–18 h; 取培养好的菌液按 1:100 比例转接到 300 mL LB 液体培养基中(50 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6; 加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 在 16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下诱导 18 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, PBS 缓冲液洗涤 2–3 次后再悬浮, 加入终浓度 0.2 mg/mL 的溶菌酶、1 mmol/L PMSF 和 1 mmol/L β -巯基乙醇后室温反应 30 min。反应后放置冰上进行超声破碎(功率 40%, 超声开 3 s 关 4 s, 持续 30 min), 之后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 15 min 收集上清液。

上述收集的蛋白上清液用 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 细菌过滤器对其进行了过滤处理, 使用 Thermo HisPur Ni-NTA Resin 并依据说明书进行纯化。得到的纯化蛋白使用 PBS 缓冲液进行透析除咪唑。取 200 μL 上清液加入 50 μL 5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液, 煮沸 10 min 后进行蛋白电泳检测, 采用考马斯亮蓝染色观察蛋白纯化结果。其余样品液氮速冻后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 蛋白结构的生物信息学分析

通过 ExPasy 对蛋白序列进行分析, 使用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 和 InterProScan 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 对激发子的蛋白质家族和结构域进行预测分析。通过 NCBI 的 BLAST 数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)检索蛋白激发子相似序列, 用 MEGA 构建系统发育树, 通过 Phyre2 (www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2)对蛋白激发子三级结构进行预测。

1.7 蛋白激发子引起烟草叶片的过敏反应

将经过纯化且透析除盐后的蛋白激发子稀释至 1、2、5、10、15、20 和 25 $\mu\text{mol/L}$ 浓度梯

度, 对烟草叶片进行真空注射, 观察烟草叶片的过敏反应。以最后 1 次 PBS 透析液为对照。

1.8 台盼蓝染色

提前配制台盼蓝染色液, 按照 1 mg/mL 的浓度称取台盼蓝, 加入等体积的蒸馏水、乳酸、丙三醇和苯酚(体积比为 1:1:1:1), 充分混匀后备用。将进行实验处理的烟草叶片置于台盼蓝染色液中, 完全浸没后煮沸 4 min, 常温下避光静置 24 h, 2.5 g/mL 的水合氯醛进行脱色。观察并拍照记录脱色结果。

1.9 RNA 提取和 RT-qPCR 检测

蛋白激发子真空注射烟草叶片, 在 0、12、24、36 和 48 h 分别取样, 液氮速冻。采用北京华越洋生物科技有限公司植物组织 RNA 提取试剂盒, 参照说明书提取 RNA, 利用 NanoDrop Micro Photometer 进行浓度测定, 使用 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板, 引物序列详见附表 S1。用 RealStar Green Mixture 进行 RT-qPCR。反应体系: RealStar Green Mixture 10 μL , Primer F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , Primer R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , cDNA 2 μL , ddH₂O 补至 20 μL 。Roche LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪进行测定, 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共循环 45 次。

1.10 防御酶活测定

纯化后的蛋白激发子真空注射烟草叶片。在 0、12、24、36 和 48 h 分别取样, 每组鲜重 0.2 g, 以 PBS 缓冲液为对照组, 每组实验重复 3 次。样品置于液氮中冷冻, 使用全自动样品快速研磨仪进行研磨。向离心管内加入 2 mL 酶提取液, 混匀之后于冷冻离心机中 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 20 min, 将离心后上清转入新的 2 mL 离心管中, 即为酶粗提液。

取 2.9 mL 过氧化物酶(Peroxidase, POD)反应液提前置于 37 °C 水浴锅中预热 15 min^[19], 然后加入 0.1 mL 酶粗提液迅速混匀, 倒入比色皿中记录 470 nm 处吸光值(A_0), 2 min 后再次测定吸光值(A_2)。以每分钟单位样品质量 A_{470} 值变化 0.01 为 1 个酶活单位, 用公式(1)计算 POD 酶活。

$$\text{POD 活力(U/(g FW} \cdot \text{min))} = \frac{\Delta A_{470} \times \text{酶液总体积(mL)}}{0.01 \times 0.1 \text{ mL} \times 2 \text{ min} \times \text{样品质量(g)}} \quad (1)$$

将 0.1 mL 酶粗提液在避光条件下加入到 2.9 mL 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)反应液中^[20], 混匀后放置在日光灯下反应 20 min, 然后立刻避光终止反应并测定在 560 nm 处的吸光值($A_{\text{处理}}$)。用煮沸 5 min 的酶粗提液作为对照组($A_{\text{对照}}$)。以抑制硝基蓝四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)光化还原反应 50% 酶量为 1 个酶活力单位, 用公式(2)计算 SOD 酶活。

$$\text{SOD 活力(U/g FW)} = \frac{\Delta A_{560} \times \text{酶液总体积(mL)} \times 100\%}{A_{\text{对照}} \times 0.1 \text{ mL} \times \text{样品质量(g)} \times 50\%} \quad (2)$$

将配制好的过氧化氢酶(catalase, CAT)反应液提前置于 30 °C 水浴锅中预热 15 min^[21], 将 2.9 mL CAT 酶反应液置于 5 mL 离心管中, 然后加入 0.1 mL 酶粗提液迅速混匀后倒入比色皿中, 测定在 240 nm 处的吸光值(A_0)。反应 2 min 后再次测定 (A_2)。以每分钟单位样品质量 A_{240} 值变化 0.01 为 1 个酶活单位, 用公式(3)进行计算 CAT 酶活。

$$\text{CAT 活力(U/(g FW} \cdot \text{min))} = \frac{\Delta A_{240} \times \text{酶液总体积(mL)}}{0.01 \times 0.1 \text{ mL} \times 2 \text{ min} \times \text{样品质量(g)}} \quad (3)$$

1.11 激发子处理烟草后诱抗功能检测

PDA 培养基活化核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*), V8 果汁培养基活化 *P. capsici*, 使用 5 mm 打孔器在菌丝边缘取菌饼。用 2 $\mu\text{mol/L}$ HSyp1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ HSyp2 的蛋白对 4–6 周龄的烟草叶片进行真空注射, 以最后 1 次 PBS 透析

液为对照, 24 h 后取叶片接种病原菌, 25 °C 继续培养 24 h, 拍照记录, 用 ImageJ 计算病斑面积。每组实验重复 3 次。

PDA 培养基活化 *V. mali*, 使用 4 mm 打孔器在 *V. mali* 菌丝边缘取菌饼, 蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2 分别稀释至 2 $\mu\text{mol/L}$ 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 。选取一月龄的苹果组培苗 (*Malus domestica*), 整株浸泡于蛋白液中 5 min, 再插入 1% 的水琼脂培养基培养 24 h, 取苹果叶片接种病原菌, 室温继续培养 24 h, 用 ImageJ 计算病斑面积。实验进行 3 次生物学重复。

1.12 激发子处理苗期拟南芥

将消毒后的拟南芥种子 (75% 乙醇浸泡 10 min, 无菌水洗涤 3 次, 3%–5% 次氯酸钠溶液避光浸泡 10 min, 无菌水洗涤 3 次) 点在 1/2 MS 培养基中, 避光置于 4 °C 冰箱培养 3 d。在 22 °C 培养箱自然生长 10–14 d 后, 分别将 2 $\mu\text{mol/L}$ HSyp1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ HSyp2 蛋白溶液浸没芽苗期拟南芥上, 继续放回培养箱, 14 d 后对拟南芥表型进行观察并拍照记录, 对其性状进行统计分析。以最后 1 次 PBS 透析液为对照, 每组处理进行 3 次重复, 实验进行 3 次生物学重复。

对蛋白激发子处理后的苗期拟南芥进行相关基因 RT-qPCR 分析。主要包括生长素运输蛋白基因 (*AtAUX1*、*AtEIR1*) 和生长素反应因子相关基因 (*AtAXR3*、*AtARF1*), 以及相关抗性基因 RT-qPCR 分析, 相关基因序列及内参详见附表 S1。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导的蛋白激发子引起烟草过敏反应

将农杆菌 GV3101 介导的蛋白激发子 HSyp1、HSyp2、HSyp3 和 HSyp4 在烟草叶片背部进行真空注射, 观察发现瞬时表达第 5 天时, 4 个蛋白激发子均能使烟草产生较明显的

坏死(图 1A), 其中 HSyp2 坏死程度最强。

为了进一步验证候选蛋白激发子是否能诱导植物产生早期防卫反应, 在瞬时表达 24 h 后, 观察其活性氧(ROS)和胼胝质的累积。其中蛋白激发子 HSyp2 导致的叶片 H_2O_2 累积的量最多, HSyp1 其次, HSyp4 累积的量最少(图 1B)。4 个蛋白激发子均能使烟草叶片产生胼胝质的迸发(图 1C), 其中 HSyp2 能够使烟草叶片产生大量的胼胝质沉积, 其他 3 个蛋白激发子无明显差异。阳性对照 INF1 活性氧和胼胝质均有明显沉积, 阴性对照 GFP 则相反。

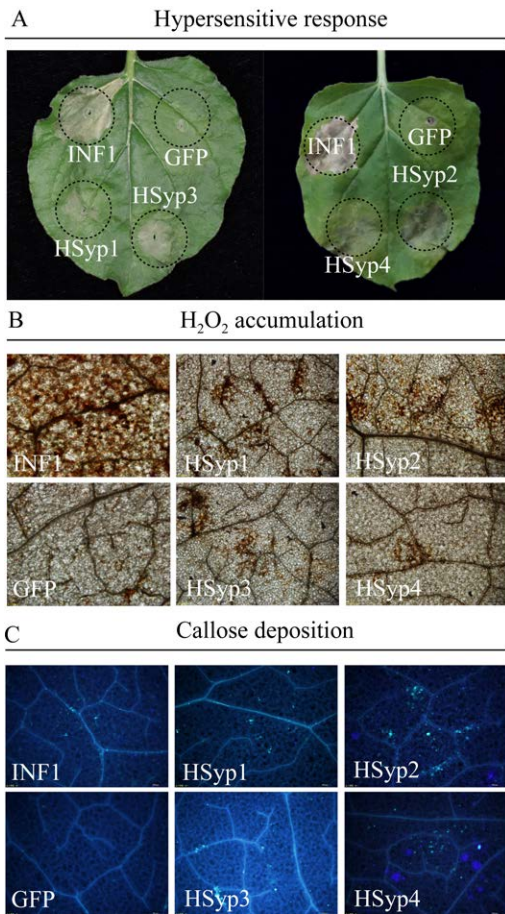


图 1 农杆菌 GV3101 介导的烟草瞬时表达

Figure 1 *Agrobacterium* GV3101-mediated transient expression in *Nicotiana benthamiana*. Five days after *Agrobacterium* injection into *Nicotiana benthamiana* leaves. A: Hypersensitive reaction; B: H_2O_2 accumulates; C: Outburst of callose.

2.2 激发子的蛋白纯化及 Western blotting 检测

将带有重组质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)进行诱导, 经过前期试验, 诱导条件为 IPTG 0.5 mmol/L, 在 16 °C、180 r/min 培养 18 h 最佳。经过纯化后成功得到 2 个激发子的蛋白, 分别为 HSyp1 和 HSyp2 (图 2A)。

为了进一步验证目的蛋白是否表达, 采用 Western blotting 检测进行进一步验证。结果表明, 蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2 能够稳定表达, 大小分别在 25 kDa 和 55 kDa 左右(图 2B)。结合过敏反应结果, 优选出蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2 进行后续试验。

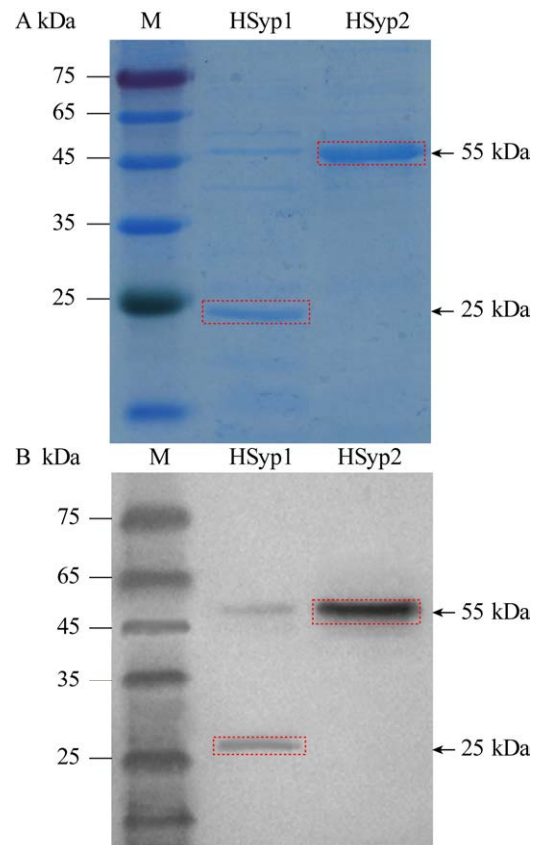


图 2 蛋白激发子在大肠杆菌 DH5α 中的表达

Figure 2 Expression of protein elicitors in *Escherichia coli* DH5α. A: Coomassie bright blue staining of HSyp1 and HSyp2 proteins; B: Western blotting analysis of HSyp1 and HSyp2 proteins.

2.3 蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2 生物信息学分析

通过 InterProScan 数据库和 SMART 对蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2 进行分析, 结果显示 HSyp1 前 18 个氨基酸为信号肽, HSyp2

前 24 个氨基酸为信号肽。2 个蛋白激发子均未预测到同源蛋白家族, 为假想蛋白 (hypothetical protein)。HSyp2 有 1 个 Septum-form 结构域, 位置在第 43–258 个氨基酸之间(图 3A、3B)。

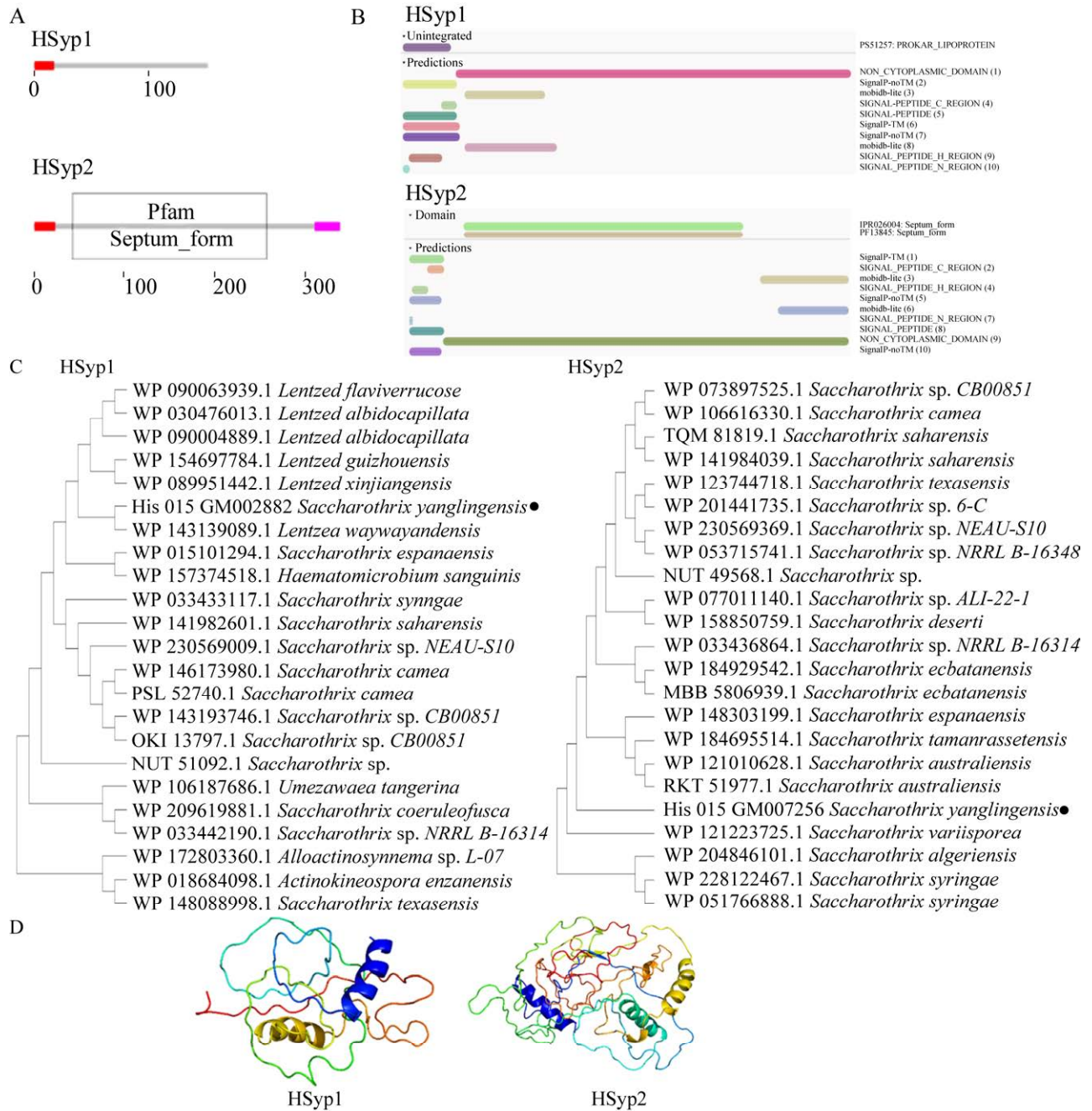


图 3 蛋白激发子生物信息学分析

Figure 3 Bioinformatics analysis of protein elicitors. A and B: Protein structure and function prediction of HSyp1 and Hsyp2; C: Phylogenetic trees of HSyp1 and Hsyp2; D: Protein 3D structure prediction of HSyp1 and HSyp2.

经过 NCBI 序列比对, 从中选取 22 条同源性较高的序列构建系统发育树, HSyp1 同源性较高的蛋白大部分为放线菌假想蛋白, 主要为糖丝菌属 (*Saccharothrix*) 和伦茨氏菌属 (*Lentzea*)。HSyp2 同源性较高蛋白主要为糖丝菌属(图 3C)。通过 Phyre2 预测蛋白结构, 发现 HSyp1 结构较简单, 仅有 2 个 α 螺旋, HSyp2 显示有 3 个 α 螺旋、4 个 β 折叠(图 3D)。

2.4 蛋白 HSyp1 和 HSyp2 引起植物免疫反应

为了确认激发植物诱导抗性的最小浓度, 将纯化后的激发子蛋白 HSyp1 和 HSyp2 稀释后对烟草叶片真空注射。3 d 后烟草叶片出现过敏反应, 同时进行台盼蓝染色。结果显示当 HSyp1 浓度大于 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 叶片开始发黄, 浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时会使叶片明显坏死; 当 HSyp2 蛋白浓度大于 5 $\mu\text{mol/L}$ 时叶片开始发黄, 浓度大于 20 $\mu\text{mol/L}$ 时叶片明显坏死(图 4A)。

用稀释至 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSyp1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSyp2 注射烟草叶片, 注射 24 h 后用 DAB 染色法进行活性氧检测, 用苯胺蓝染色法进行胼胝质沉积的检测。可以看到纯化后的蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2 均可以引起活性氧的累积, 其中 HSyp2 产生活性氧较多。胼胝质沉积的检测结果显示 2 $\mu\text{mol/L}$ HSyp1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ HSyp2 均能诱导烟草叶片产生胼胝质的沉积(图 4B)。

用 2 $\mu\text{mol/L}$ HSyp1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ HSyp2 对烟草进行真空注射, 不同时间段的酶活力水平有明显的变化。如图 4C 所示, HSyp1 处理烟草后 POD 酶活力在 24 h 达到峰值, 在 36 h 时短暂下降后上升, 相较于对照组差别不大; SOD 酶活力在 24 h 之后水平缓慢上升后下降, 在 36 h 是对照组的 2.0 倍; CAT 酶

活力水平持续上升, 在 24 h 时达到最高, 约为对照组的 55.0 倍, 24 h 后迅速降低, 在 48 h 时与对照组基本一致。HSyp2 处理烟草后 POD 酶活快速上升, 24 h 是对照组的 2.1 倍, 36 h 达到峰值, 约为对照组的 3.2 倍, 在 48 h 相是对照组的 1.6 倍; SOD 酶活力在 24 h 时快速提高, 并且持续上升, 在 48 h 时是对照组的 5.0 倍; CAT 酶活力水平在 12 h 后开始缓慢上升, 24 h 之后呈现快速增长的趋势, 36 h 后趋势逐渐平缓, 处理 48 h 时 CAT 酶活力水平是对照组的 12.9 倍。

在用 HSyp1 处理烟草后发现, PR 蛋白基因 *NbPR1*、*NbPR2* 和 *NbPR4* 及 ET 通路标志基因 *NbERF1* 均明显上调, 其中 *NbPR1* 在处理 36 h 后表达量是对照组的 120.0 倍, *NbPR2* 在 24 h 时表达量达到峰值, 较对照组上调 9.0 倍。*NbPR4* 和 *NbERF1* 在处理 12 h 后表达量达到峰值, 此时分别较对照组上调 23.0 倍和 20.0 倍。JA 通路的 *NbLOX1*、*NbPDF1.2* 和苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonialyase, PAL)相关基因 *NbPAL* 均有小幅度上调。*NbLOX1* 在 36 h 时较对照组上调 3.5 倍, *NbPDF1.2* 在 12 h 时较对照组上调 4.3 倍。*NbPAL* 在 12 h 时上调表达 4.6 倍(图 4D)。HSyp2 处理烟草 12 h 后 *NbPR1* 和 *NbPR4* 表达量达峰值, 分别较对照组上调 116.0 倍和 100.0 倍。*NbPR2* 从 12 h 后持续上调, 36 h 时达到峰值, 此时较对照组上调 18.0 倍。*NbLOX1*、*NbERF1*、*NbPAL* 在 HSyp2 处理后均有小范围上调。其中 *NbLOX1* 在 24 h 时表达量达峰值, 较对照组上调 6.8 倍, *NbERF1* 在 12 h 较对照组上调 6.4 倍, *NbPAL* 在 24 h 时上调 2.6 倍。*NbPDF1.2* 较对照组未上调表达。以上结果表明, HSyp1 和 HSyp2 激活了 SA、JA/ET 介导的植物抗性相关通路。

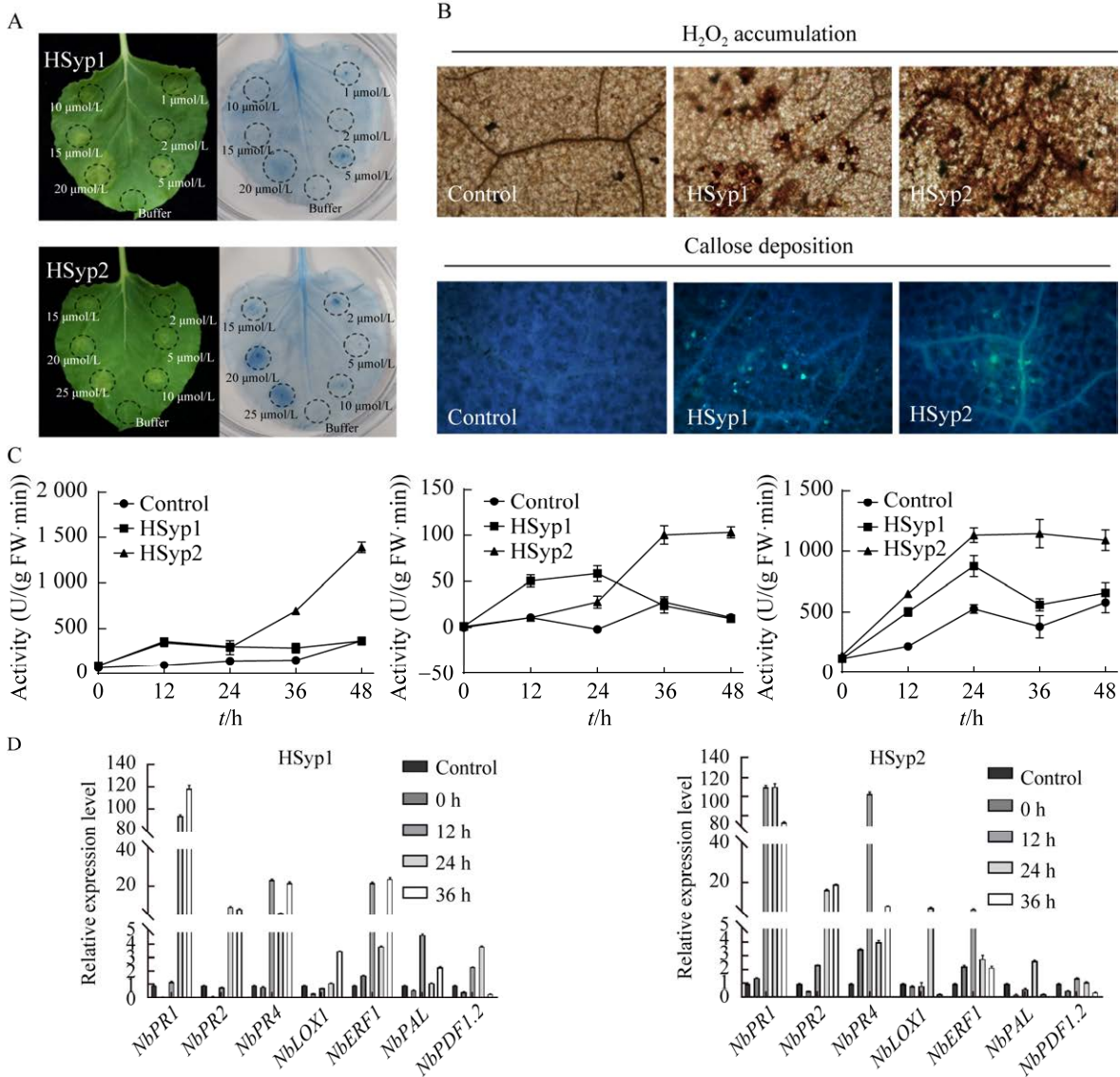


图 4 不同浓度 HSyp1 和 HSyp2 蛋白注射四周龄的烟草叶片引起免疫反应

Figure 4 Injection of four-weeks-old *Nicotiana benthamiana* leaves with different concentrations of HSyp1 and HSyp2 proteins elicits an immune response. *Nicotiana benthamiana* leaves were injected with different concentrations of HSyp 1 and HSyp2 pure proteins at four weeks of age. A: Hypersensitive response and Taipan blue staining; B: Assay of H_2O_2 and callose; C: Assay of defence-related enzyme activity, in the order of SOD, CAT and POD; D: Assay of defence-related genes.

2.5 蛋白 HSyp1 和 HSyp2 增强植物抗病性

用 2 $\mu\text{mol/L}$ HSyp1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ HSyp2 的蛋白对整片烟草叶片进行真空注射。接种 *S. sclerotiorum* 24 h 后对叶片发病情况进行观

察，从图 5A 可以看出，对照组发病情况明显，经过蛋白激发子处理的烟草叶片病斑面积显著小于对照。通过测量病斑面积，对照组病斑面积在 24 h 约为 HSyp1 和 HSyp2 的 2.0 倍，36 h 约为 3.0 倍(图 5A)。

为了验证蛋白激发子诱导植物提高抗病性是否针对专一病原菌, 在 *N. benthamiana* 上接种 *P. capsici* 24 h 后由 HSyp1 和 HSyp2 处理过的烟草叶片病斑面积相对偏小(图 5B)。对病斑面积进行统计, 接种 24 h 时 HSyp1 和 HSyp2 处理后叶片病斑面积均小于对照组, 对照组病斑面积是 HSyp1 的 2.0 倍, 是 HSyp2 的 2.7 倍。

为了进一步验证诱导抗性功能是否具有寄

主专一性, 采用 2 $\mu\text{mol/L}$ HSyp1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ HSyp2 的蛋白处理苹果组培苗, 24 h 后接种 *V. mali*, 对发病情况进行持续观察。如图 5C 所示, 蛋白激发子处理后的苹果组培苗对苹果腐烂病抗病能力明显上升。在接种苹果腐烂病 48 h 时, 对病斑面积进行统计, 对照组发病面积是 HSyp1 的 2.9 倍, 是 HSyp2 的 2.2 倍。在接种苹果腐烂病 56 h 时, 对照组病斑面积是 HSyp1 的 3.7 倍, 是 HSyp2 的 2.3 倍。

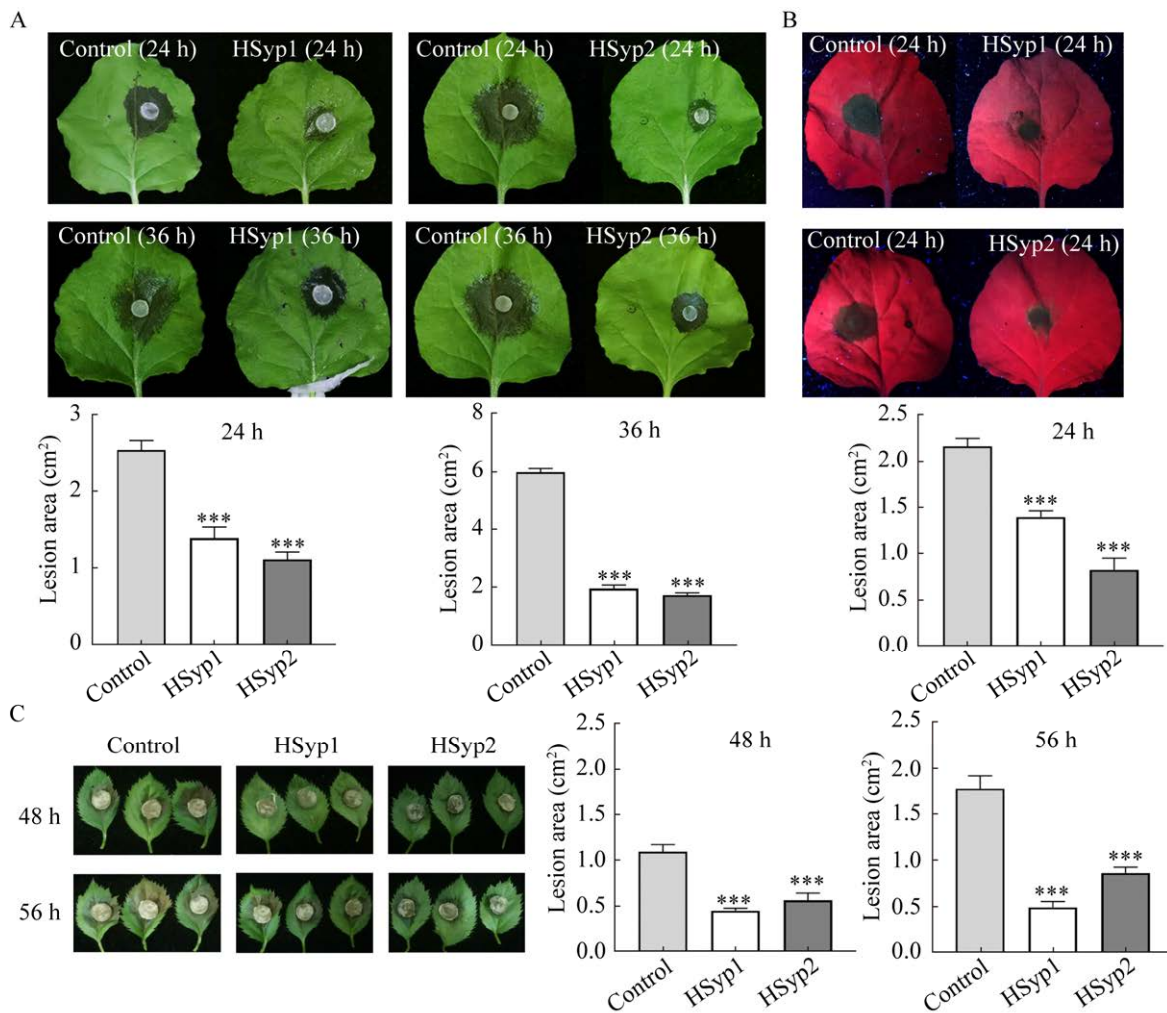


图 5 HSyp1 和 HSyp2 诱导不同植物增强对病原菌的抗病性

Figure 5 HSyp1 and HSyp2 induce enhanced disease resistance to pathogens in different plants. A: HSyp1 and HSyp2 induced disease resistance in *Nicotiana benthamiana* against *Sclerotinia sclerotiorum* at 24 h and 36 h; B: HSyp1 and HSyp2 induced disease resistance in *Nicotiana benthamiana* against *Phytophthora capsica*; C: HSyp1 and HSyp2 induced disease resistance of apple histocultures against *Valsa mali* at 48 h and 56 h. Using *t*-test for comparison, ***: $P < 0.001$, indicating extremely significant differences.

2.6 蛋白 HSyp1 和 HSyp2 对苗期拟南芥的促生作用

用 2 $\mu\text{mol/L}$ HSyp1 和 5 $\mu\text{mol/L}$ HSyp2 的蛋白对 10–14 d 的芽期拟南芥进行处理, 14 d 后对拟南芥进行观察, 结果如图 6 所示。通过图 6A–6C 可以看出, 经过 HSyp1 处理的拟南芥叶片要略大于对照组, HSyp2 处理的拟南芥叶片大小明显大于对照组。对根长进行统计和数据分析, HSyp1 处理的拟南芥根长约为对照组的 1.5 倍, HSyp2 处理的拟南芥根长为对照组 2.0 倍(图 6D)。对鲜重进行统计和数据分析, 以 10 棵/组进行计量, 结果如图 6E 所

示, HSyp1 每组鲜重为对照组的 1.6 倍, HSyp2 每组鲜重为对照组的 2.2 倍。

通过对蛋白激发子处理后的拟南芥进行促生相关基因 RT-qPCR 检测, 分析促生机制。结果如图 6F 所示, HSyp1 处理的拟南芥乙烯(ET)通路标志基因 *AtERF1* 表达量上调 2.7 倍, HSyp2 处理的拟南芥 SA 通路标志基因 *AtPR2*、乙烯通路 *AtERF1* 和 JA 通路标志基因 *AtAOS* 均有一定上调, 其中 *AtPR2* 上调 11.0 倍、*AtERF1* 上调 5.8 倍、*AtAOS* 上调 3.2 倍。HSyp1、HSyp2 均未诱导拟南芥生长素相关基因的上调。

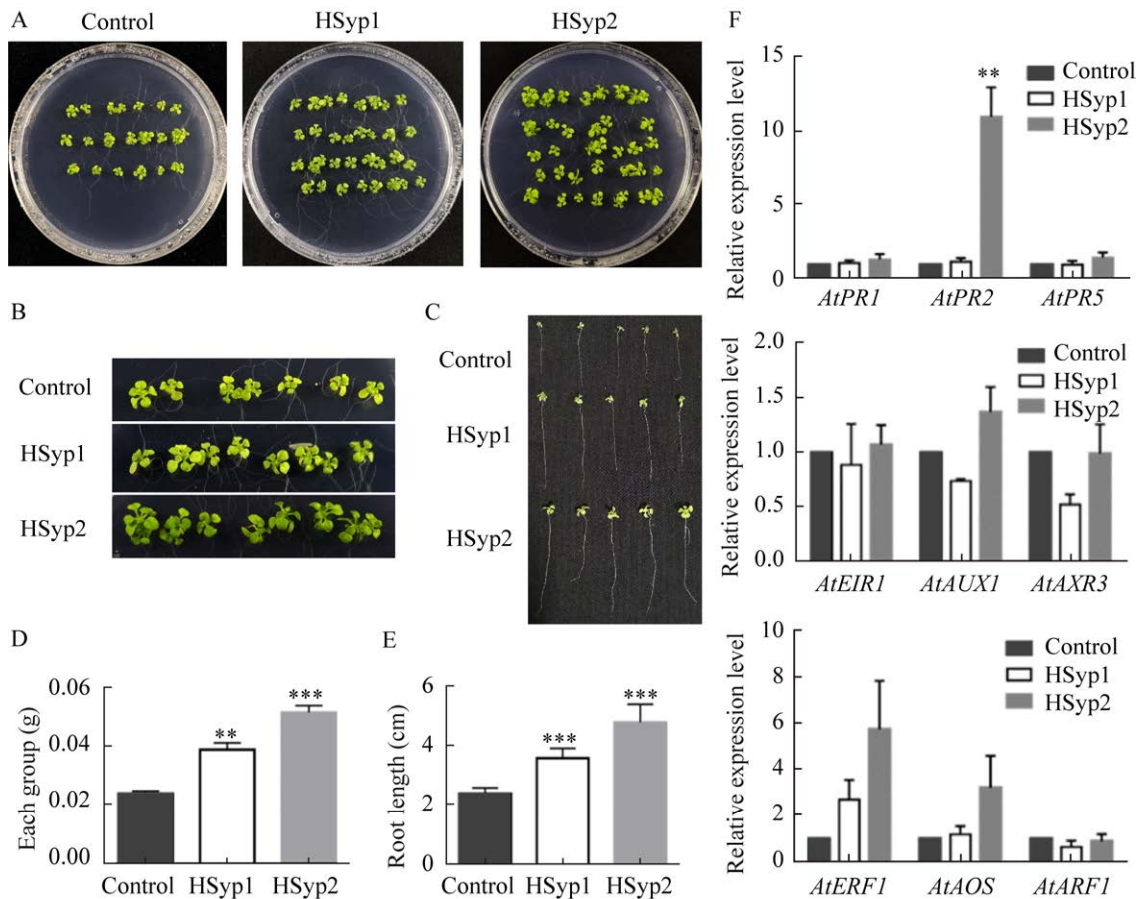


图 6 HSyp1 和 HSyp2 处理苗期拟南芥后对子叶和根长的促生作用

Figure 6 Promoter effects of protein elicitors on seedling *Arabidopsis thaliana*. A and B: *Arabidopsis thaliana* seedling phenotypes after different protein elicitors treatments; C: *Arabidopsis thaliana* seedling root phenotypes after different protein elicitors treatments; D: Root length statistical results; E: Fresh weight statistical results; F: Growth promotion related gene expression. Using *t*-test for comparison, ***: $P < 0.001$, indicating extremely significant differences; **: $P < 0.01$, indicating highly significant differences.

3 讨论与结论

糖丝菌属(*Saccharothrix*)是典型稀有的丝状放线菌。基因组分析发现,参与放线菌许多抗生素生物合成的非核糖体多肽合成酶(nonribosomal peptide synthetases, NRPSs)途径相关基因在糖丝菌属中高频存在^[22],同时从 *S. algeriensis*、*S. espanaensis*、*S. xinjiangensis* 等^[23-26]菌株中分离到具有抗细菌、抗真菌和抗肿瘤等广泛生物活性的次级代谢产物。此外,糖丝菌 *S. australiensis* IFO 14444 产生的纤维素酶系主要成分——内切 β -1,4-葡聚糖酶作为一种酶制剂可应用于洗涤剂或纺织工业中^[27]。*S. mutabilis* NM-6-5 可在 40–50 °C 下有效分解纤维素,在工业和农业中具有很好的应用前景^[28]。

生长素(auxin)在植物生长发育过程中起着核心作用,通过调节细胞生长、细胞分裂以及细胞特异性的分化参与一系列生长发育过程^[29]。其早期响应基因可归为 3 类: *Aux/IAAs*、*GH3s*、*SAURs*^[30]。本研究中 HSyp1 和 HSyp2 在拟南芥苗期对子叶和根部发育有一定促生作用。然而在 RT-qPCR 的结果中我们发现蛋白激发子并未引起相关基因 *AtAUX/IAA*^[31] (*auxin/indole-3-acetic acid*)、*AtEIR1*^[32] (*ethylene insensitive root 1*) 和 *AtAXR3*^[33] (*auxin co-receptor 3*) 表达量的变化。说明 HSyp1 和 HSyp2 对拟南芥的促生作用不依赖于 Aux/IAA 信号通路,具体的促生机制仍需进一步研究探讨。

综上所述,糖丝菌属的菌株大多具有良好的活性,极具研发潜力。然而针对生防放线菌中功能性外泌蛋白的研究仍十分有限。本实验室前期研究发现,*S. yanglingensis* Hhs.015 的分泌蛋白 BAR11 通过与烟草中过氧化氢酶 catalases 相互作用提高烟草对病原菌的抗性^[12], PeSy1 作为 MAMP 分子与 NbRSy1 相互作用激发植物

免疫功能^[13]。本研究从生防放线菌 Hhs.015 中筛选得到 2 个诱导植物提高抗性的蛋白激发子 HSyp1 和 HSyp2。首次报道了假想蛋白 HSyp1 和 HSyp2 的功能,通过影响 SA、JA/ET 信号通路基因来激发植物免疫系统,诱导植物提高对核盘菌、黑杆病菌和黑腐皮壳菌的抗性,具有广谱诱导植物抗性的功能。

作者贡献声明

于洪佳:实验内容及文章写作;张家阳:实验内容;王平平:数据处理;崔传斌:文章检查修改;黄丽丽:论文指导,实验思路构思;颜霞:论文指导,实验方法探究。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] JONES JD, DANGL JL. The plant immune system[J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 323-329.
- [2] CHISHOLM ST, COAKER G, DAY B, STASKAWICZ BJ. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 803-814.
- [3] 刘冬. 激发子及其诱导的植物免疫反应概述[J]. *生物学教学*, 2021, 46(9): 21-23.
LIU D. Summary of elicitor and its induced plant immune response[J]. *Biology Teaching*, 2021, 46(9): 21-23 (in Chinese).
- [4] SUN YB, REN XY, GUO WH, WANG Y, YAN H, HAN LR, FENG JT. Protein elicitor GP1pro targets aquaporin NbPIP2;4 to activate plant immunity[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2023, 46(8): 2575-2589.
- [5] LI Z, ZHANG Y, REN J, JIA FL, ZENG HM, LI GY, YANG XF. Ethylene-responsive factor ERF114 mediates fungal pathogen effector PevD1-induced disease resistance in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2022, 23(6): 819-831.
- [6] WANG HQ, YANG XF, GUO LH, ZENG HM, QIU DW. PeBL1, a novel protein elicitor from *Brevibacillus laterosporus* strain A60, activates defense responses and systemic resistance in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(8): 2706-2716.

- [7] 王心选. 植物内生放线菌 Hhs.015 (BARR1-5)的鉴定及发酵条件优化[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2009.
WANG XX. Studies on identification and optimization of fermentation process of one plant endophytic actinomycetes strain Hhs.015 (BAR1-5)[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2009 (in Chinese).
- [8] 王建勋, 康凤, 孙玲, 颜霞, 黄丽丽. 杨凌糖丝菌 Hhs.015 拮抗苹果树腐烂病菌转录组分析及抗菌机制探究[J]. 西北农业学报, 2022, 31(1): 105-116.
WANG JX, KANG F, SUN L, YAN X, HUANG LL. Transcriptome analysis and antibacterial mechanism of *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015 antagonistic *Valsa mali*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2022, 31(1): 105-116 (in Chinese).
- [9] WANG XX, HUANG LL, KANG ZS, BUCHENAUER H, GAO XN. Optimization of the fermentation process of actinomycete strain hhs.015[J]. Journal of Biomedicine & Biotechnology, 2010, 2010: 141876.
- [10] 颜霞, 张亚男, 刘聪, 赵玲云, 郭红梅, 李燕芳, 黄丽丽. 生防菌 Hhs.015 对苹果枝条皮层内生细菌区系的影响[J]. 果树学报, 2017, 34(9): 1170-1177.
YAN X, ZHANG YN, LIU C, ZHAO LY, GUO HM, LI YF. Effect of biocontrol strain Hhs.015 on endophytic bacterial flora of apple trees[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(9): 1170-1177 (in Chinese).
- [11] 范东颖, 赵玲云, 黄丽丽, 颜霞. 生防菌 Hhs.015 防止苹果腐烂菌侵染寄主的组织学与细胞学研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(10): 126-132.
FAN DY, ZHAO LY, HUANG LL, YAN X. Histological and cytological study on biocontrol stain Hhs.015 in preventing *Valsa Mali* from infecting host[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2016, 44(10): 126-132 (in Chinese).
- [12] ZHANG YN, YAN X, GUO HM, ZHAO FY, HUANG LL. A novel protein elicitor BAR11 from *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015 improves plant resistance to pathogens and interacts with catalases as targets[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 700.
- [13] WANG JX, LIU S, REN P, JIA FG, KANG F, WANG RL, XUE RZ, YAN X, HUANG LL. A novel protein elicitor (PeSyl) from *Saccharothrix yanglingensis* induces plant resistance and interacts with a receptor-like cytoplasmic kinase in *Nicotiana benthamiana*[J]. Molecular Plant Pathology, 2023, 24(5): 436-451.
- [14] 柳利龙, 张爱琴, 张环, 米永伟, 胡晓芬, 李玉芳. 当归根际土壤中木霉菌的分离鉴定及拮抗作用[J]. 寒旱农业科学, 2024, 3(8): 774-778.
LIU LL, ZHANG AQ, ZHANG H, MI YW, HU XF, LI YF. Isolation, identification and antagonism of biocontrol *Trichoderma* spp. from rhizosphere soil of *Angelica sinensis*[J]. Journal of Cold-Arid Agricultural Sciences, 2024, 3(8): 774-778 (in Chinese).
- [15] 张泽宇, 肖扬, 詹亚斌, 魏雨泉, 徐道清, 李季. 不同营养类型培养基番茄内生细菌群落结构研究[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(11): 128-133.
ZHANG ZY, XIAO Y, ZHAN YB, WEI YQ, XU DQ, LI J. Study on the community structure of endophytic bacteria in tomato with different nutrient media[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(11): 128-133 (in Chinese).
- [16] 马铃铃, 刘念析, 郑宇宏, 厉志, 刘佳, 衣志刚, 董志敏, 王曙明. 大豆灰斑病菌生长和产孢高效培养方法探讨[J]. 大豆科学, 2019, 38(4): 589-596.
MA LL, LIU NX, ZHENG YH, LI Z, LIU J, YI ZG, DONG ZM, WANG SM. Study on the high efficiency culture method of growth and sporulation of soybean frogeye leaf spot pathogen[J]. Soybean Science, 2019, 38(4): 589-596 (in Chinese).
- [17] FRÍAS M, GONZÁLEZ C, BRITO N. BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host[J]. The New Phytologist, 2011, 192(2): 483-495.
- [18] 李响, 戴懿, 梁鹏, 缪卫国, 郑服丛. 橡胶树白粉菌诱导寄主及非寄主植物产生活性氧积累的研究[J]. 广东农业科学, 2013, 40(9): 68-70, 封2.
LI X, DAI Y, LIANG P, MIAO WG, ZHENG FC. Study on the accumulation of active oxygen in host and non-host plants during the infection of *Oidium heveae*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(9): 68-70, Feng 2 (in Chinese).
- [19] 冯星星, 仲念, 万鹏, 罗壮, 曹修春, 董玉玮. 水杨酸和低温复合处理对韭黄品质的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2024, 15(4): 122-130.
FENG XX, ZHONG N, WAN P, LUO Z, CAO XC, DONG YW. Effect of salicylic acid and low temperature combined treatment on the quality of leek[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2024, 15(4): 122-130 (in Chinese).
- [20] 刘泽厚, 李阳, 彭欣媛, 李执, 伍雨, 姜华于, 覃鹏, 蒲至恩. 叶面喷施硒肥对彩色小麦种子活力影响[J]. 四川农业大学学报, 2024, 42(2): 285-295.
LIU ZH, LI Y, PENG XY, LI Z, WU Y, JIANG HY, QIN P, PU ZE. Effect of foliar spraying selenium fertilize on seed vigor of colored wheat[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2024, 42(2): 285-295 (in Chinese).
- [21] 简敏菲, 陈玺, 饶丹, 邹勇军, 丛明昉, 阳文静, 刘淑丽. 模拟湿地土壤微塑料暴露下藓类植物的生长和抗氧化酶活的响应特征[J]. 环境科学学报, 2023, 43(9): 377-386.
JIAN MF, CHEN X, RAO D, ZOU YJ, CONG MY, YANG WJ, LIU SL. Response characteristics of the growth and antioxidant enzyme activity of mosses under microplastics stress in simulated wetland soils[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2023, 43(9): 377-386 (in Chinese).
- [22] NIKOLOULI K, MOSSIALOS D. Bioactive compounds synthesized by non-ribosomal peptide synthetases and type-I polyketide synthases discovered

- through genome-mining and metagenomics[J]. *Biotechnology Letters*, 2012, 34(8): 1393-1403.
- [23] MERROUCHE R, YEKKOUR A, COPPEL Y, BOURAS N, ZITOUNI A, MATHIEU F, SABAOU N. *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, the first non-*Streptomyces actinobacterium*, produces holomycin after cystine feeding[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(9): 2509-2516.
- [24] GORNIÁKOVÁ D, PETŘÍČEK M, KAHOUN D, GRABIC R, ZELENKA T, CHROŇÁKOVÁ A, PETŘÍČKOVÁ K. Activation of a cryptic manumycin-type biosynthetic gene cluster of *Saccharothrix espanaensis* DSM44229 by series of genetic manipulations[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(3): 559.
- [25] WANG XL, TABUDRAVU J, JASPARS M, DENG H. Tianchimymins A–B, 16-membered macrolides from the rare actinomycete *Saccharothrix xinjiangensis*[J]. *Tetrahedron*, 2013, 69(30): 6060-6064.
- [26] BABADI ZK, SUDARMAN E, EBRAHIMIPOUR GH, PRIMAHAHA G, STADLER M, WINK J. Structurally diverse metabolites from the rare actinobacterium *Saccharothrix xinjiangensis*[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2020, 73(1): 48-55.
- [27] ANNAMALAI N, RAJESWARI MV, BALASUBRAMANIAN T. *Microbial Enzymes in Bioconversions of Biomass*[M]. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- [28] 程斐, 孙朝晖, 赵玉国, 谢平林, 李式军. 高温分解纤维素的易变糖丝菌菌株筛选及其特性[J]. *南京农业大学学报*, 2002, 25(2): 35-38.
- CHENG F, SUN ZH, ZHAO YG, XIE PL, LI SJ. Isolation of efficiency decomposing cellulose of *Saccharothrix mutabilis*[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2002, 25(2): 35-38 (in Chinese).
- [29] 司马晓娇, 郑炳松. 植物生长素原初响应基因 Aux/IAA 研究进展[J]. *浙江农林大学学报*, 2015, 32(2): 313-318.
- SIMA XJ, ZHENG BS. Advances in primary auxin-responsive Aux/IAA gene family: a review[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2015, 32(2): 313-318 (in Chinese).
- [30] 孙涛, 柴团耀, 刘戈宇, 张玉秀. 植物 GH3 基因家族研究进展[J]. *生物工程学报*, 2008, 24(11): 1860-1866.
- SUN T, CHAI TY, LIU GY, ZHANG YX. Progress in the plant *GH3* gene family[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(11): 1860-1866 (in Chinese).
- [31] LUO J, ZHOU JJ, ZHANG JZ. Aux/IAA gene family in plants: molecular structure, regulation, and function[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(1): 259.
- [32] LUSCHNIG C, GAXIOLA RA, GRISAFI P, FINK GR. EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Genes & Development*, 1998, 12(14): 2175-2187.
- [33] KUBALOVÁ M, MÜLLER K, DOBREV PI, RIZZA A, JONES AM, FENDRYCH M. Auxin co-receptor IAA17/AXR3 controls cell elongation in *Arabidopsis thaliana* root solely by modulation of nuclear auxin pathway[J]. *The New Phytologist*, 2024, 241(6): 2448-2463.