

# 球孢白僵菌定殖提高番茄对灰霉病抗性及其作用机理



隋丽<sup>1</sup> 路杨<sup>1</sup> 周麟妍<sup>1,2</sup> 李楠楠<sup>1,2</sup> 张正坤<sup>1\*</sup> 李启云<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 吉林省农业微生物重点实验室, 农业农村部东北作物有害生物综合治理重点实验室, 公主岭 136100; 2. 吉林农业大学植物保护学院, 长春 130118; 3. 吉林农业科技学院, 吉林 132101)

**摘要:** 为明确球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 定殖对番茄植株抗病性的影响及作用机理, 采用灌根法将球孢白僵菌芽生孢子悬浮液接种于番茄植株内, 并通过人工接种灰霉菌 *Botrytis cinerea* 评价球孢白僵菌定殖后番茄对灰霉病的抗性水平; 检测灰霉菌胁迫下番茄植株不同位置叶片内球孢白僵菌的相对含量; 测定番茄叶片内草酸氧化酶(oxalate oxidase, OXO)、几丁质酶(chitinase, CHI)和ATP合成酶(ATP synthase, atpA)3种抗病相关基因的表达量。结果表明, 球孢白僵菌定殖能够提高番茄植株对灰霉病的抗性, 接种灰霉菌第5天, 番茄植株发病率、病斑直径和病情指数分别下降了61.6%、41.4%和26.4%; 在灰霉菌胁迫下番茄植株内球孢白僵菌偏好于在病原菌感染位置定向聚集, 并且引起植物抗病基因 *OXO*、*CHI* 和 *atpA* 的表达量上调。表明球孢白僵菌能通过内生定殖与植物互作提高植物抗病性, 在植物病害生物防治领域有较大应用潜力。

**关键词:** 球孢白僵菌; 内生定殖; 番茄灰霉病; 抗性; 作用机理; 招募作用; 抗病基因

## Enhanced tomato resistance to gray mold by fungus *Beauveria bassiana* colonization and its mechanism of action

Sui Li<sup>1</sup> Lu Yang<sup>1</sup> Zhou Linyan<sup>1,2</sup> Li Nannan<sup>1,2</sup> Zhang Zhengkun<sup>1\*</sup> Li Qiyun<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northeast China, Ministry of Agriculture and Rural Areas; Jilin Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Institute of Plant Protection, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Gongzhuling 136100, Jilin Province, China; 2. College of Plant Protection, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China; 3. Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin 132101, Jilin Province, China)

**Abstract:** In order to clarify the effect of fungus *Beauveria bassiana* colonization on tomato plant disease resistance and its mechanism of action, conidial blastospores suspension of *B. bassiana* were inoculated into tomato plants with root irrigation, and the resistance of tomato against gray mold caused by *Botrytis cinerea* after colonization by *B. bassiana* was evaluated with artificial inoculation; the relative content of *B. bassiana* at different positions of tomato leaves under the stress of *B. cinerea* was detected. The expression levels of three disease resistance genes, including oxalate oxidase (OXO), chitinase (CHI) and ATP synthase (atpA) in tomato leaves were determined. The results showed that *B. bassiana* colonization could improve resistance of tomato plants to gray mold, on the 5th day after *B. cinerea* inoculation, the incidence rate, lesion diameter and disease index in tomato decreased by 61.6%, 41.4% and 26.4%, respectively. It is noteworthy that *B. bassiana* was more likely to accumulate in the infected leaves and especially areas close to the infection sites, and up-regulated the expression levels of *OXO*, *CHI* and *atpA* genes. The results indicated that *B. bassiana* could improve plant disease resistance

基金项目: 国家自然科学基金(32271683), 吉林省自然科学基金(20220101313JC), 吉林省科技厅中青年科技创新创业卓越人才(团队)项目(创新类)(20230508011RC)

\* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: zhangzhengkun1980@126.com, qyli1225@126.com

收稿日期: 2023-04-05

through endophytic colonization and interaction with host plants, and have great application potential in the field for the biological control of plant diseases.

**Key words:** *Beauveria bassiana*; endophytic; tomato gray mold; resistance; mechanism; recruitment function; disease resistance gene

球孢白僵菌 *Beauveria bassiana* 作为一种重要的虫生真菌,具有多重生态学功能(Vega et al., 2009;徐毓笛等,2020)。近年来大量研究表明,球孢白僵菌能够在植物体内定殖并在其组织内形成完整生活史,与植物构成互惠共生关系(Vega, 2018;隋丽等, 2021a)。球孢白僵菌定殖不仅能直接促进寄主植物生长(Jaber & Enkerli, 2016),还能够诱导植物抗性增强,提高其对植食性昆虫的抗性(Barra-Bucaresi et al., 2020),球孢白僵菌定殖提升植物抗病性已成为近年来的研究热点。据报道,球孢白僵菌能够在多种大田作物和经济作物中定殖,并提升寄主植物的抗病性(Ownley et al., 2008; Jaber & Alananbeh, 2018)。如 Deb & Dutta (2021)用球孢白僵菌气生孢子处理的番茄种子对腐霉菌 *Pythium ultimum* 引起的植株病害具有显著的拮抗作用;Jaber (2015)将球孢白僵菌气生孢子悬浮液喷施至葡萄叶片能够显著降低霜霉菌 *Plasmopara viticola* 引起病害的发病率和发病程度,表明球孢白僵菌定殖能够提高多种寄主植物的抗性,在生防领域具有潜在的应用价值。

植物受到外界胁迫,自身会产生一系列防御反应,同时也会诱导植物体内共生微生物的组成和分布发生改变(Shikano et al., 2017)。很多植物共生微生物能够缓解病原微生物对植物造成的损伤,有益微生物通过占据生态位,与病原微生物争夺生长的养分和空间,直接抑制病原菌生长(Tall & Meyling, 2018)。球孢白僵菌在植物体内定殖,与寄主植物同样会产生复杂的作用关系。如球孢白僵菌芽生孢子能够在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 中萌发形成菌丝,并显著提高拟南芥对灰霉病的抗性(Sui et al., 2022);玉米植株在受到大斑病菌 *Exserohilum turcicum* 侵染时,发病部位球孢白僵菌含量更高,说明植株能够主动调控体内的球孢白僵菌参与防御反应(隋丽等, 2022)。以上研究表明球孢白僵菌在寄主植物体内呈现流动状态,并且能在适当的条件下增殖,宿存量与寄主植物的抗性呈正相关。然而,植物抗病性的增强是很多因素协同作用的结果,球孢白僵菌定殖提升植物抗病性的作用机理尚不清楚。

番茄 *Solanum lycopersicum* 作为我国栽培面积第4大的蔬菜作物,年产量约为5 500万t,占蔬菜总量的7%,对农业经济发展具有重要的意义,而番茄灰霉病是造成番茄经济损失的主要病害之一,严重威胁番茄的产量和品质(Ji et al., 2020)。本研究以球孢白僵菌和番茄灰霉菌 *Botrytis cinerea* 为研究对象,采用灌根法将球孢白僵菌定殖在番茄植株体内,调查球孢白僵菌内生定殖对番茄灰霉病的抑制作用,从球孢白僵菌在植株内变化规律和抗病基因表达量变化的角度探讨病原菌胁迫下球孢白僵菌定殖提升植物抗病性的作用机理,解析虫生真菌与植物的互作关系,以期为农业生态系统中合理利用生防微生物资源开展植物病害生物防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株及番茄植株:球孢白僵菌菌株 BbOFDH1-5-GFP,由野生型球孢白僵菌 BbOFDH1-5 (GenBank No. ANFO01)结合绿色荧光蛋白构建,保存于中国微生物菌种保藏中心,菌种保存号为 CGMCC No. 15673。番茄灰霉菌由湖南农业大学李魏教授提供。供试番茄品种为靓丽美人,种子购买于吉林省大陆种业公司。

供试培养基:马铃薯琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基由马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 13 g 和蒸馏水 1 L 配制而成;萨氏液体培养基(Sabouraud dextrose medium with yeast extract, SDY)由酵母粉 1 g、蛋白胨 1 g、葡萄糖 4 g 和蒸馏水 100 mL 配制而成。

试剂及仪器:RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯。ZWY-240 型恒温振荡培养箱,上海智城分析仪器制造有限公司;SHP-250 型生化培养箱,上海精宏试验设备有限公司;TP-114 型电子分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;Leica TCS SP8 型激光共聚焦显微镜,徕卡显微系统(上海)贸易有限公司;DYY-11 型电泳仪,北京六一仪器厂;EDC-810 型 PCR 仪,

东胜创新生物科技有限公司; QuantStudio 6 Flex 型实时荧光定量PCR仪, 赛默飞世尔(上海)仪器有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 球孢白僵菌接种及定殖率检测方法

挑取 BbOFDH1-5-GFP 菌株菌块于 SDY 培养基上, 于 26 °C、160 r/min 下培养 120 h, 获得球孢白僵菌芽生孢子, 使用 0.05% 吐温 80 溶液, 采用血球计数板计数配制成浓度为  $10^8$  个/mL 的孢子悬浮液。

本试验于 2021 年在吉林省农业科学院植物保护研究所温室中进行, 番茄植株种植行距 20 cm, 株距 50 cm, 每个小区面积 22.5 m<sup>2</sup>, 4 次重复, 共 4 个小区。待番茄生长至 4 叶期, 采用隋丽等(2018)灌根法将球孢白僵菌孢子悬浮液接种到番茄植株中, 每个处理 15 株番茄, 接种量为 20 mL/株, 每隔 24 h 灌根 1 次, 共灌根 3 次, 以接种等量的 0.05% 吐温 80 溶液作对照。灌根 3 次后 24 h, 各处理随机选取 5 个番茄叶片并进行表面消毒, 参考 Sui et al. (2022) 方法利用激光扫描共聚焦显微镜在蓝光 488 nm 波长下观察球孢白僵菌在植物叶片内的宿存情况, 每个叶片观察 3 个视野。

采用 Sui et al. (2020) PDA 平板检测法进行番茄植株内球孢白僵菌定殖率测定。球孢白僵菌灌根后 24 h 对各处理中每株番茄取样检测, 取样部位为番茄顶端完全展开的叶片, 叶片表面消毒后裁剪成 1 cm×1 cm 的小块, 等距离平铺在 PDA 平板上, 每个平板放置 9 块叶片, 于 26 °C 培养箱中培养 4 d, 观察是否有球孢白僵菌从叶片切片边缘长出, 当 PDA 平板中有番茄叶片长出球孢白僵菌菌落, 即表明此株番茄植株被球孢白僵菌成功定殖, 计算定殖率, 定殖率 = 白僵菌定殖的番茄株数/处理组总株数×100%。

### 1.2.2 番茄对灰霉病抗性测定

本试验于 2021 年在吉林省农业科学院植物保护研究所温室中进行, 采取随机区组设计, 本试验设置 4 个处理, 分别为: (1) 球孢白僵菌处理组, 方法同 1.2.1; (2) 灰霉菌处理组, 挑取番茄灰霉菌于 PDA 培养基上, 于 24 °C、光周期 L 12 h:D 12 h 培养 14 d, 使用直径 5 mm 的打孔器打取菌饼, 在番茄最大完全展开叶片的边缘接 1 块菌饼, 并用保鲜膜覆盖保湿; (3) 球孢白僵菌+灰霉菌处理组, 接种球孢白僵菌 24 h 后接种灰霉菌, 方法同上; (4) 不接种球孢白僵菌和灰霉菌作为对照组。番茄植株种植行距 20 cm, 株距 50 cm, 每个小区面积 22.5 m<sup>2</sup>, 每个处

理 15 株番茄, 4 次重复, 共计 240 株。

番茄植株接种灰霉菌第 5 天, 观察并记录番茄叶片灰霉病发生情况, 计算发病率, 发病率 = 每个处理番茄植株发病总株数/调查植株总数×100%。并使用直尺水平和垂直测量灰霉菌病斑的直径。同时, 在叶片出现发病情况后连续观察并统计 5 d, 记录各处理组番茄叶片发病程度和发病数量, 统计各个处理组植株发病等级并计算病情指数, 参照 Chen et al. (2020) 方法进行分级: 叶片上无症状为 1 级; 有黑褐色枯死点, 占叶面积 10% 以下为 2 级; 病斑面积占叶片面积 11%~20% 为 3 级; 病斑面积占叶片面积 21%~50% 为 4 级; 病斑面积占叶片面积 50% 以上为 5 级。病情指数 =  $\sum[(\text{该病级值} \times \text{病级叶片数}) / (\text{最高病级数} \times \text{调查总叶片数})] \times 100$ 。

### 1.2.3 番茄叶片不同位置球孢白僵菌含量测定

番茄叶片接种灰霉菌第 12、24、48 和 96 h 进行取样, 每个重复随机选取 5 株番茄幼苗, 每株番茄均在 3 个部位取样, 分别为同一叶片靠近灰霉菌位置(距离菌饼 1 cm 处)、同一叶片远离灰霉菌位置(距离菌饼 5 cm 处)以及接种灰霉菌位置对侧的叶片, 使用打孔器取直径 1 cm 的叶片。将各重复收集的番茄叶片样品混合, 利用 CTAB 法提取基因组 DNA, 以 DNA 为模板扩增球孢白僵菌 *Bb18S rDNA* 基因序列, 引物序列为 F(CAAGTCTGGCAGCAAACGTC)/R(CAGCCACCCTGTGAGATTGT), 以 *Actin7* 为内参基因, 引物序列为 F(GGTATCCACGAGACTACCTACA)/R(TGCTCATAACGGTCAGCAATAC)。本研究所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。利用荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 检测法测定番茄不同位置叶片中球孢白僵菌的相对含量 (Sui et al., 2022)。以番茄 DNA 为模板进行扩增, 20 μL qPCR 反应体系: 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10.0 μL, 引物各 0.4 μL, DNA 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。反应程序: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环; 95 °C 延伸 15 s, 60 °C 延伸 60 s, 95 °C 延伸 15 s, 进行 1 次循环。阴性对照为 ddH<sub>2</sub>O。每个样品 3 个重复。qPCR 产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

### 1.2.4 番茄叶片中抗病相关基因含量测定

本试验检测番茄植株内草酸氧化酶 (oxalate oxidase, OXO)、几丁质酶 (chitinase, CHI) 和 ATP 合成酶 (ATP synthase, atpA) 3 种抗病相关基因含量。番



茄叶片接种灰霉菌前(接种球孢白僵菌后 24 h)和接种灰霉菌后 72 h 进行取样。每个处理随机选取 5 株幼苗,利用打孔器在灰霉菌接种叶片取直径为 1 cm 的叶片。将不同处理收集的叶片混合,采用 RNA 提取试剂盒提取番茄组织总 RNA,反转录获得 cDNA,以 *Actin7* 为内参基因,利用 *OXO* (F: GGGCTA-AATCCACCTCA/R: GGCACCACGAACATCTC)、*CHI* (F: TGGTATGGCGTAAGTCGGTA/R: CTTG-GAATCAAAGTCCGGTT) 和 *atpA* (F: AGGCTCA-TATACGGAACGG/R: GAGTGAGGCTTATTTGGG-TC) 的扩增引物,以 cDNA 为模板采用 qPCR 法测定番茄叶片中 3 种基因的相对表达量,具体方法同 1.2.3。

### 1.3 数据分析

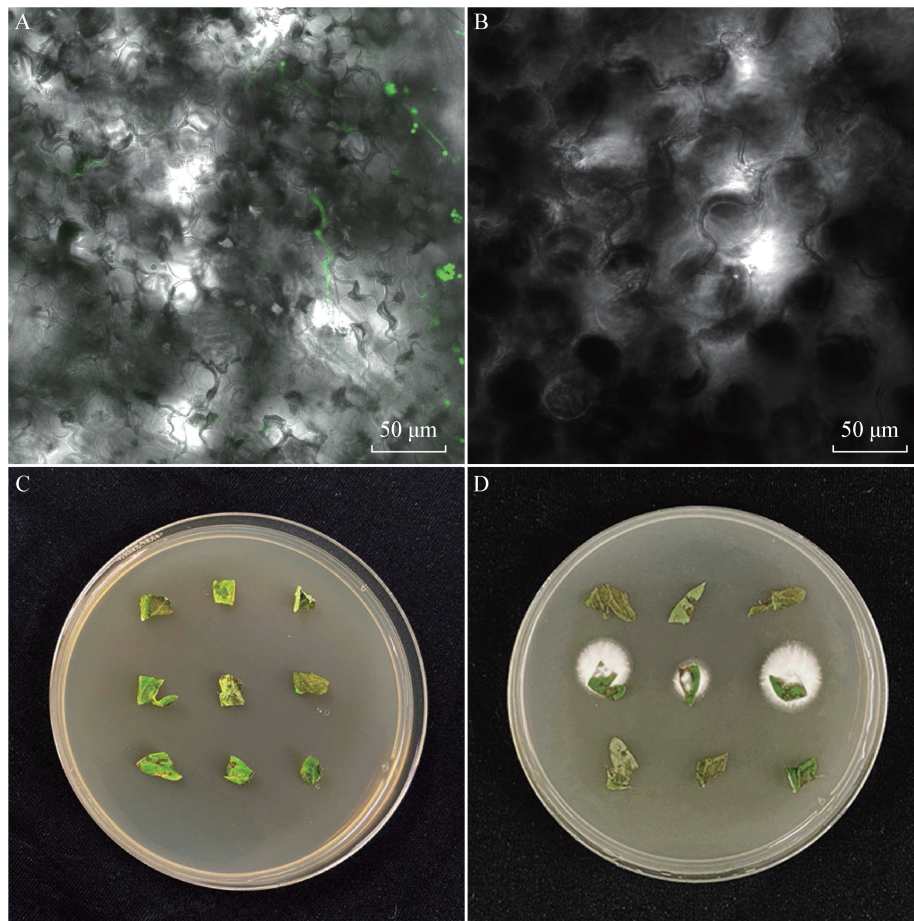
试验数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,球

孢白僵菌与对照之间定殖率采用 *t* 检验法进行差异显著性检验,其他数据用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。利用 GraphPad 8.0.2 进行绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 球孢白僵菌在番茄植株中的定殖

番茄植株接种球孢白僵菌 24 h,共聚焦显微镜下观察到,在球孢白僵菌接种处理组番茄叶片内出现带有荧光标记的球孢白僵菌芽生孢子和萌发的菌丝,不均匀地分布在组织间隙,对照组未观察到菌体(图 1-A~B);球孢白僵菌接种处理组番茄叶片组织在 PDA 平板周围长出白色菌落,对照组均无白色菌落出现(图 1-C~D)。球孢白僵菌接种处理组球孢白僵菌定殖率为 43.3%,与对照组间差异显著。



A、B: 激光扫描共聚焦显微镜下未接种球孢白僵菌和球孢白僵菌定殖番茄叶片; C: 对照组; D: 球孢白僵菌从番茄叶片中长出。A, B: Tomato leaves without or with *Beauveria bassiana* inoculation under confocal laser scanning microscope; C: control; D: *B. bassiana* growing from tomato leaf sections.

图 1 球孢白僵菌在番茄叶片内生定殖

Fig. 1 Endophytic colonization of *Beauveria bassiana* in tomato leaves

### 2.2 球孢白僵菌定殖对番茄植株抗病性的影响

球孢白僵菌芽生孢子定殖能显著减轻番茄灰霉

病的发生,对照组和球孢白僵菌接种处理组均未发病。番茄植株接种灰霉菌第 5 天,灰霉菌处理组的



发病率为86.67%,球孢白僵菌+灰霉菌处理组发病率为33.33%,发病率降低61.54%(表1)。

球孢白僵菌芽生孢子处理能有效抑制灰霉病病斑扩展。番茄植株接种灰霉菌第5天,球孢白僵菌+

灰霉菌处理组番茄发病叶片病斑直径显著小于灰霉菌处理组,病斑平均直径降低41.37%(表1);球孢白僵菌+灰霉菌处理组番茄叶片灰霉病病情指数显著低于灰霉菌处理组,病情指数降低26.36%(表1)。

表1 番茄叶片灰霉病发病情况以及病情指数

Table 1 Occurrence of gray mold and disease index of gray mold on tomato leaves

处理组 Treatment	发病率 Incidence rate/%	病斑直径 Lesion diameter/cm	病情指数 Disease index
对照 Control	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c
球孢白僵菌 <i>Beauveria bassiana</i>	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c	0.00±0.00 c
球孢白僵菌+灰霉菌 <i>Beauveria bassiana</i> + <i>Botrytis cinerea</i>	33.33±3.33 b	2.55±0.76 b	41.42±10.36 b
灰霉菌 <i>Botrytis cinerea</i>	86.67±3.33 a	4.35±0.59 a	56.25±9.27 a

表中数据为平均数±标准误。同列不同小写字母表示不同处理经Duncan氏新复极差法检验差异显著( $P<0.05$ )。Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ ).

### 2.3 灰霉菌胁迫下球孢白僵菌在番茄植株内的分布情况

灰霉菌侵染番茄植株后,球孢白僵菌在番茄叶片不同位置的含量存在一定差异。在靠近接种灰霉菌位置(靠近位置)的番茄叶片部位,球孢白僵菌含量随时间的增加呈现上升趋势,从取样24 h开始,番茄植株内靠近位置球孢白僵菌含量高于其他位置。在远离接种灰霉菌位置(远离位置)的番茄叶片部位,球孢白僵菌含量随时间的增加也呈现上升趋势,但相对含量始终低于靠近位置中球孢白僵菌含量。在接种灰霉菌对称位置(对称位置)的番茄叶片部位,球孢白僵菌含量始终低于其他2个取样位置,第96 h取样时,该位置处球孢白僵菌含量有所升高,然仍低于靠近位置内球孢白僵菌的相对含量(图2)。表明灰霉菌胁迫能够引起番茄叶片不同位置球孢白僵菌含量发生改变,球孢白僵菌偏好于在靠近病原菌接种位置聚集。

### 2.4 球孢白僵菌定殖对番茄植株抗病关键基因的作用

灰霉菌接种前,球孢白僵菌处理组番茄叶片内OXO、CHI和*atpA*基因的相对表达量均低于对照组(图3-A~C)。灰霉菌接种后72 h,球孢白僵菌处理组和球孢白僵菌+灰霉菌处理组番茄叶片内3种抗病关键基因相对含量均高于对照组,3种抗病关键基因在灰霉菌处理组内相对含量均低于对照组(图3-D~F)。结果表明,无论是否接种病原菌,球孢白僵菌芽生孢子均能够诱导番茄叶片内抗病相关基因表达量升高,仅接种球孢白僵菌则会引起番茄植株内抗性相关基因表达量下降。

## 3 讨论

关于虫生真菌定殖提升植物抗病性的报道最早于2004年由Ownley et al.(2004)报道,该研究发现番茄和棉花的种子经过球孢白僵菌孢子悬浮液处理后,能够有效抑制根腐病的发生,使番茄和棉花植株的倒伏数量显著下降,Ownley et al.(2008)还明确了不同浓度梯度球孢白僵菌孢子悬浮液对植株抗病性的影响,确认球孢白僵菌定殖能减缓病原菌对植物的侵害,降低植物病害发生程度。自此,关于球孢白僵菌定殖提高植物抗病性的研究受到广泛关注,一些研究又相继明确了球孢白僵菌在不同寄主上采用不同方式接种对植物病原菌具有抑制作用(Barra-Bucarei, 2019; Canassa et al., 2020)。本研究采用灌根法将球孢白僵菌芽生孢子在番茄植株内定殖,结果发现,番茄植株接种球孢白僵菌后,对番茄灰霉病的抗性显著提升,病情指数下降。还有研究表明,木霉菌 *Trichoderma* spp. 与化学杀菌剂联用能够协同拮抗番茄灰霉病(马志强等, 2013),生防微生物芽胞杆菌 *Peanibacillus* spp. 对番茄灰霉病也具有抑制作用(司方洁等, 2022),本研究首次提出球孢白僵菌内生定殖能够减缓植物灰霉病的发生。此外,本研究选取球孢白僵菌芽生孢子接种植物是由于相比于疏水性的气生孢子,芽生孢子对植物更有亲和性,在植物中更容易萌发并增殖,其抗病效果也更明显(Sui et al., 2022),而国内外鲜有关于球孢白僵菌芽生孢子作用于植物的报道,在后续研究中,可以利用球孢白僵菌芽生孢子的生物学特性进一步开展相关

试验。

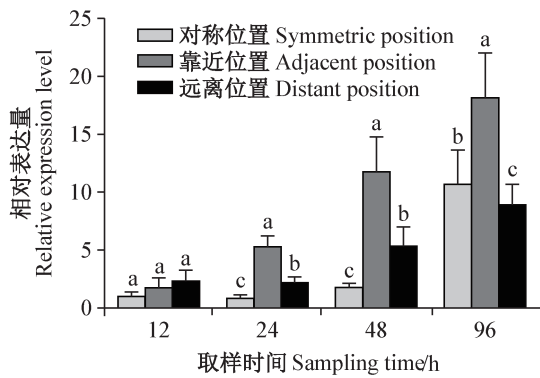


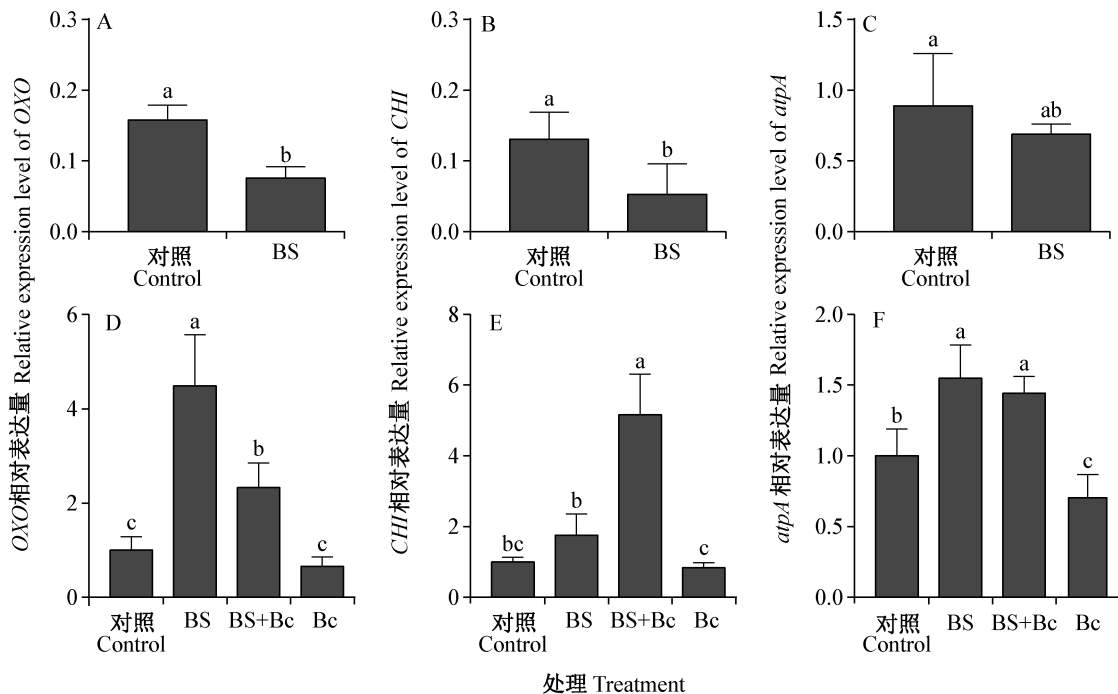
图2 不同位置番茄叶片内球孢白僵菌相对表达量

Fig. 2 Relative expression level of *Botrytis cinerea* in different positions of tomato leaves

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示不同位置间经Duncan氏新复极差法检验差异显著( $P<0.05$ )。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicate significant difference among different positions by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ ).

虫生真菌能够通过抑制病原菌生长、诱导植物

产生系统抗性和促进植物生长等不同机制提高寄主植株对病虫害的抗性(隋丽等, 2021b)。Sui et al. (2022)前期研究表明,玉米植株在受到病原菌胁迫的情况下,球孢白僵菌能够在寄主植株内自下而上发生迁移,表现为玉米叶片中球孢白僵菌含量显著增加,根际土壤中球孢白僵菌数量下降。McKinnon et al. (2018)和Gange et al. (2019)也提出植物受到生物胁迫和非生物胁迫时会主动“招募”虫生真菌向被胁迫部位聚集。本研究中发现,在灰霉菌胁迫下,番茄植株内球孢白僵菌在不同位置叶片和接种叶片的部位相对含量均不同,总体趋向于向病害发生部位聚集,且病害发生部位球孢白僵菌相对含量最高,说明球孢白僵菌在植株内能发生水平转移,验证了外界胁迫条件下,植物能调控虫生真菌在植物组织内的分布,参与自身防御反应。球孢白僵菌向发病部位聚集,能够与病原菌竞争养分和空间,从而降低病原菌的侵染能力,同时也可能直接与病原菌产生拮抗作用,抑制病原菌生长,降低植物的发病率和减缓发病症状。



BS: 球孢白僵菌; BS+Bc: 球孢白僵菌+灰霉菌; Bc: 灰霉菌。BS: *Beauveria bassiana*; BS+Bc: *Beauveria bassiana*+*Botrytis cinerea*; Bc: *Botrytis cinerea*.

图3 灰霉菌接种前和灰霉菌接种后72 h番茄叶片内抗病基因OXO(A、D)、CHI(B、E)和atpA(C、F)的相对表达量

Fig. 3 Relative expression level of disease resistance genes OXO (A, D), CHI (B, E) and atpA (C, F) in tomato leaves before and 72 h after *Botrytis cinerea* inoculation

图中数据为平均数±标准误。不同小写字母表示不同处理间经Duncan氏新复极差法检验差异显著( $P<0.05$ )。Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference among different treatments by Duncan's new multiple range test ( $P<0.05$ ).



此外,本研究还探讨了 *OxO*、*CHI* 和 *atpA* 抗性相关基因对植物接种球孢白僵菌和灰霉菌的响应,发现球孢白僵菌定殖能够诱导番茄植株内相关基因表达量上调。*OxO* 基因是诱导番茄对灰霉菌产生抗性的关键基因,*OxO* 基因在麦类作物中的研究较多,早期时在小麦中作为萌芽标记被发现,在植物生长发育中扮演着重要角色,此外也能增强植物的抗病能力(Caliskan & Cuming, 1998)。在植物防御病原真菌侵害的过程中,水杨酸和茉莉酸途径发挥着重要的作用,*CHI* 和 *atpA* 作为以上 2 条途径的关键基因,其表达量上调与植物抗病性密切相关(Lorito et al., 1998)。*atpA* 基因的产物为 ATP 合成酶 CF1 的  $\alpha$  亚基,是叶绿体上影响光合作用的相关蛋白,其在生物胁迫与非生物胁迫方面具有重要作用,Wu et al. (2013) 研究表明 ATP 合成酶 CF1 $\alpha$  亚单位能够促进能量的增加,使植物抗性增强。因此,本研究中球孢白僵菌定殖诱导番茄植株内 3 种抗性相关基因表达量上调,表明球孢白僵菌定殖能够调节植物抗病信号转导途径发生改变,促进植物抗病性增强。

综上所述,本研究通过开展球孢白僵菌-植物-病原菌之间的互作试验,探讨了球孢白僵菌芽生孢子定殖增强番茄植株对灰霉病的抗性,从球孢白僵菌定殖植物能够定向迁移,抑制病原菌生长和调节抗病相关基因表达量的角度解析了虫生真菌提升植物抗病性的机理,对虫生真菌与植物之间的互作关系有了更深层次的了解。在后续研究中,可以充分利用球孢白僵菌芽生孢子的生物学特性开展对植物病害的防治研究,明确其对不同靶标生物的生态调控作用,使其在生物防治领域发挥更大价值。

### 参 考 文 献 (References)

- Barra-Bucarei L, González MG, Iglesias AF, Aguayo GS, Peñalosa MG, Vera PV. 2020. *Beauveria bassiana* multifunction as an endophyte: growth promotion and biologic control of *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) in tomato. *Insects*, 11(9): 591
- Barra-Bucarei L, Iglesias AF, González MG, Aguayo GS, Carrasco-Fernández J, Castro JF, Campos JO. 2019. Antifungal activity of *Beauveria bassiana* endophyte against *Botrytis cinerea* in two Solanaceae crops. *Microorganisms*, 8(1): 65
- Caliskan M, Cuming AC. 1998. Spatial specificity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination. *The Plant Journal*, 15(2): 165-171
- Canassa F, Esteca FCN, Moral RA, Meyling NV, Klingen I, Delalibera I. 2020. Root inoculation of strawberry with the entomopathogenic fungi *Metarhizium robertsii* and *Beauveria bassiana* reduces incidence of the two spotted spider mite and selected insect pests and plant diseases in the field. *Journal of Pest Science*, 93(1): 261-274
- Chen C, Cao Z, Li J, Tao C, Feng YN, Han YN. 2020. A novel endophytic strain of *Lactobacillus plantarum* CM-3 with antagonistic activity against *Botrytis cinerea* on strawberry fruit. *Biological Control*, 148: 104306
- Deb L, Dutta P. 2021. Antagonistic potential of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin against *Pythium myriotylum* causing damping off of tomato. *Indian Phytopathology*, 74(3): 715-728
- Gange AC, Koricheva J, Currie AF, Jaber LR, Vidal S. 2019. Meta-analysis of the role of entomopathogenic and unspecialized fungal endophytes as plant bodyguards. *New Phytologist*, 223(4): 2002-2010
- Jaber LR. 2015. Grapevine leaf tissue colonization by the fungal entomopathogen *Beauveria bassiana* s.l. and its effect against downy mildew. *BioControl*, 60(1): 103-112
- Jaber LR, Alananbeh KM. 2018. Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biological Control*, 126: 117-126
- Jaber LR, Enkerli J. 2016. Effect of seed treatment duration on growth and colonization of *Vicia faba* by endophytic *Beauveria bassiana* and *Metarhizium brunneum*. *Biological Control*, 103: 187-195
- Ji JY, Yang J, Zhang BW, Wang SR, Zhang GC, Lin LN. 2020. Sodium pheophorbide a controls cherry tomato gray mold (*Botrytis cinerea*) by destroying fungal cell structure and enhancing disease resistance-related enzyme activities in fruit. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 166: 104581
- Lorito M, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, et al. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(14): 7860-7865
- Ma ZQ, Niu FS, Bi QY, Han XY, Wang WQ, Zhang XF. 2013. The synergistic mechanism of *Trichoderma harzianum* combined with boscalid to *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Protection*, 40(4): 369-373 (in Chinese) [马志强, 牛芳胜, 毕秋艳, 韩秀英, 王文桥, 张小风. 2013. 哈茨木霉菌与啮酰菌胺联用对番茄灰霉病菌的增效机制. *植物保护学报*, 40(4): 369-373]
- McKinnon AC, Glare TR, Ridgway HJ, Mendoza-Mendoza A, Holyoake A, Godsoe WK, Bufford JL. 2018. Detection of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* in the rhizosphere of wound-stressed *Zea mays* plants. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1161
- Ownley BH, Griffin MR, Klingeman WE, Gwinn KD, Moulton JK, Pereira RM. 2008. *Beauveria bassiana*: endophytic colonization and plant disease control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3): 267-270
- Ownley BH, Pereira RM, Klingeman WE, Quigley NB, Leckie BM. 2004. *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism,

- with activity against insect pests and plant pathogens.//Lartey RT, Caesar AJ. Emerging concepts in plant health management 2004. Trivandrum: Research Signpost, pp. 255-269
- Shikano I, Rosa C, Tan CW, Felton GW. 2017. Tritrophic interactions: microbe-mediated plant effects on insect herbivores. Annual Review of Phytopathology, 55(1): 313-331
- Si FJ, Ren JY, Huang TX, Yu YY, Guo JH, Jiang CH. 2022. The function of *Bacillus velezensis* 5YN8 biofilm in controlling of *Botrytis cinerea* in tomato. Chinese Journal of Biological Control, 38(5): 1223-1230 (in Chinese) [司方洁, 任金瑶, 黄涛祥, 俞仪阳, 郭坚华, 蒋春号. 2022. 贝莱斯芽胞杆菌 5YN8 生物被膜在防治番茄灰霉病过程中的功能研究. 中国生物防治学报, 38(5): 1223-1230]
- Sui L, Lu Y, Jiang YY, Wan TY, Xu WJ, Zhang ZK, Li QY. 2021a. Advance and prospect of endophytic entomopathogenic fungi in biological control. Journal of Maize Sciences, 29(6): 169-174, 183 (in Chinese) [隋丽, 路杨, 姜媛媛, 万婷玉, 徐文静, 张正坤, 李启云. 2021a. 内生性虫生真菌在生物防治中的研究现状与展望. 玉米科学, 29(6): 169-174, 183]
- Sui L, Lu Y, Zhu H, Wan TY, Li QY, Zhang ZK. 2022. Endophytic blastospores of *Beauveria bassiana* provide high resistance against plant disease caused by *Botrytis cinerea*. Fungal Biology, 126(8): 528-533
- Sui L, Wan TY, Lu Y, Xu WJ, Zhang ZK, Li QY. 2021b. Review of fungal endophytes on plant growth promotion and stress resistance. Chinese Journal of Biological Control, 37(6): 1325-1331 (in Chinese) [隋丽, 万婷玉, 路杨, 徐文静, 张正坤, 李启云. 2021b. 内生真菌对植物促生、抗逆作用研究进展. 中国生物防治学报, 37(6): 1325-1331]
- Sui L, Xu WJ, Zhang ZK, Yang Z, Wang ZH, Du Q, Wang YZ, Chen RZ, Li QY, Lu Y. 2018. Colonization of GFP-labeled *Beauveria bassiana* in maize. Chinese Journal of Biological Control, 34(6): 848-857 (in Chinese) [隋丽, 徐文静, 张正坤, 杨芷, 王志慧, 杜茜, 汪洋洲, 陈日翌, 李启云, 路杨. 2018. GFP 标记的球孢白僵菌在玉米中的定殖. 中国生物防治学报, 34(6): 848-857]
- Sui L, Zhu H, Xu WJ, Guo QF, Wang L, Zhang ZK, Li QY, Wang DL. 2020. Elevated air temperature shifts the interactions between plants and endophytic fungal entomopathogens in an agroecosystem. Fungal Ecology, 47: 100940
- Tall S, Meyling NV. 2018. Probiotics for plants? Growth promotion by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* depends on nutrient availability. Microbial Ecology, 76(4): 1002-1008
- Vega FE. 2018. The use of fungal entomopathogens as endophytes in biological control: a review. Mycologia, 110(1): 4-30
- Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, Koike M, Maniania NK, Monzón A, Ownley BH, et al. 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecology, 2(4): 149-159
- Wu LJ, Wang SX, Chen X, Wang XT, Wu LC, Zu XF, Chen YH. 2013. Proteomic and phytohormone analysis of the response of maize (*Zea mays* L.) seedlings to sugarcane mosaic virus. PLoS ONE, 8(7): e70295
- Xu YD, Wei HS, Shi JW, Chen HH, Shi WP, Tan SQ. 2020. Comparison of virulence of three *Beauveria bassiana* strains against fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. Journal of Plant Protection, 47(4): 867-874 (in Chinese) [徐毓笛, 魏红爽, 石嘉伟, 陈宏灏, 石旺鹏, 谭树乾. 2020. 三株球孢白僵菌对草地贪夜蛾的毒力比较. 植物保护学报, 47(4): 867-874]

(责任编辑:王璇)