

## 研究报告



## 淡紫灰链霉菌 gCLA4 坏死诱导蛋白基因的克隆表达及功能

颜霞<sup>1,3</sup> 武立清<sup>1,3</sup> 李燕芳<sup>1,3</sup> 黄丽丽<sup>\*2,3</sup>

1 西北农林科技大学生命科学院 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学植物保护学院 陕西 杨凌 712100

3 旱区作物逆境生物学国家重点实验室 陕西 杨凌 712100

**摘要:**【背景】淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*) gCLA4 是从黄瓜中分离到的一株放线菌, 研究表明该菌对多种植物病原菌均有很好的拮抗作用, 具有潜在的生防价值。【目的】深入研究 *Streptomyces lavendulae* gCLA4 中坏死诱导蛋白(necrosis-inducing protein) 4955 的功能, 明确其提高植物抗性的作用机制。【方法】对坏死诱导蛋白 4955 基因进行克隆, 于 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中表达, 并以烟草为材料检测该蛋白的活性和稳定性; 使用 ProtParam、PredictProtein、NCBI CDD、SWISS-MODEL 分析蛋白的基本性质和三维结构; 检测该蛋白对烟草防御反应相关酶活(CAT、SOD、POD、PAL)和防御相关基因(*NPR1*、*PR1-b*、*PAL*、*LOX*、*PR1-a*)表达量的影响。【结果】蛋白 4955 的耐受温度达 40 °C, 耐受 pH 6.0–10.0。该蛋白分子量为 24 491.12 Da, 由 225 个氨基酸组成, 其等电点为 5.96, 经氨基酸序列比对含保守 NPP1 结构域。蛋白 4955 处理烟草 2 d 时, 烟草 CAT、SOD、PAL 酶活增加, POD 酶活无显著变化。该蛋白处理烟草第 1、3、5 天时, 基因 *PR1-b*、*LOX* 表达量提高; 在第 4 天时, 基因 *PAL* 的表达量提高。【结论】*Streptomyces lavendulae* gCLA4 中的坏死诱导蛋白 4955 确实能诱导烟草中的植物防御反应。

**关键词:** 淡紫灰链霉菌 gCLA4, 原核表达, 功能分析, 植物诱导抗性

Expression and characterization of necrosis-inducing protein from *Streptomyces lavendulae* gCLA4YAN Xia<sup>1,3</sup> WU Li-Qing<sup>1,3</sup> LI Yan-Fang<sup>1,3</sup> HUANG Li-Li<sup>\*2,3</sup>

1 College of Life Science, Northwest Agriculture &amp; Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China

2 College of Plant Protection, Northwest Agriculture &amp; Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China

3 State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Northwest Agriculture &amp; Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100, China

**Abstract:** [Background] *Streptomyces lavendulae* gCLA4 is an actinomycete strain isolated from

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2017YFD0201104); Key Research and Program of Shaanxi Province (2017ZDCXL-N-Y-03-02)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

**Received:** 17-03-2019; **Accepted:** 18-12-2019; **Published online:** 06-01-2020

**基金项目:** 国家重点研发计划(2017YFD0201104); 陕西省自然科学基金基础研究计划(2017ZDCXL-N-Y-03-02)

**\*通信作者:** Tel: 029-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

**收稿日期:** 2019-03-17; **接受日期:** 2019-12-18; **网络首发日期:** 2020-01-06

cucumber. Preliminary researches have showed that the strain was prominent in antagonism against a variety of pathogenic bacteria, and has potential biocontrol value. **[Objective]** In-depth study of the function of necrosis-inducing protein 4955 in *Streptomyces lavendulae* gCLA4, and to clarify its mechanism of action in improving plant resistance. **[Methods]** The necrosis-inducing protein 4955 gene was cloned and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). Activity and stability of the protein were tested in tobacco. Then, the basic properties and tertiary structure of the protein were analyzed with ProtParam, PredictProtein, NCBI CDD, and SWISS-MODEL. Tobacco defense-related enzymatic activities (CAT, SOD, POD, PAL) were detected after treatment with protein 4955. Additionally, altered gene expression (*NPRI*, *PR1-b*, *PAL*, *LOX*, *PR1-a*) was detected by qPCR. **[Results]** The protein 4955 retained its activity at temperatures up to 40 °C and pH 6.0 to 10.0. The protein has a molecular weight of 24 491.12 Da and consists of 225 amino acids. Its isoelectric point is 5.96, and the amino acid sequence alignment contains a conserved NPP1 domain. The activity of CAT, SOD and PAL increased in tobacco after two days of treatment with 4955, and the activity of POD did not change significantly. The expression of *PR1-b* and *LOX* genes was increased 1, 3, and 5 days after treatment with protein 4955, and the expression of *PAL* was up-regulated on the 4th day. **[Conclusion]** The necrosis-inducing protein 4955 in *Streptomyces lavendulae* gCLA4 does induce plant defense response in tobacco.

**Keywords:** *Streptomyces lavendulae* gCLA4, Prokaryotic expression, Function analysis, Plant induced resistance

植物在诱导因子的作用下或产生局部反应限制病原菌的侵染,或产生诱导抗性全面提高植物的防御能力,称为植物的诱导抗性<sup>[1]</sup>。激发子可以引起植物产生防御反应,且能使植物在生化性质和分子机理方面发生变化,如防御相关酶 CAT、SOD、POD、PAL、PPO 等的变化和防御相关基因的表达等,激发子引起植物的过敏反应或诱导植物产生系统抗性从而提高植物抗性<sup>[2-4]</sup>。利用植物诱导抗性防治植物病原菌具有前瞻性、预防性、可控性、持久性和系统性<sup>[5]</sup>。

诱导因子可以是放线菌,也可以是其代谢产物,通过浸种、涂叶以及灌根等途径诱导植物产生抗性<sup>[6]</sup>。诱导的植物抗性对病原菌无特异性,可以作用于多个种类。Singh 等研究发现一株内生链霉菌能提高鹰嘴豆对 *Sclerotium rolfsii* 的系统抗性,使防御相关酶如 SOD、POD、PAL、PPO、APX 和 GPX 酶活提高,以及编码防御相关酶的基因表达量显著增加<sup>[7]</sup>。*Streptomyces rochei* A-1 处理苹果果实后,可以促进 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的产生,抑制脂质过氧化,增加  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶、POD、CAT、SOD 及 PAL 的活性,提高 *CHI*、*GLU* 和 *PR-8* 等防御相关基因的表达量。*S. rochei* A-1 通过一系列的防

御反应提高苹果果实对 *Botryosphaeria dothidea* 的抗性<sup>[8]</sup>。来自 *Streptomyces* sp. AG-P1441 的巴龙霉素作为诱导因子可以增加辣椒中防御相关基因 *PR-1*、*PR-4*、*PR-10*、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶和过氧化物酶等的表达,增强了辣椒对 *Phytophthora capsici* 的防御<sup>[9]</sup>。

关于蛋白激发子的研究已有很多报道。Nep1-like proteins (NLPs)蛋白能诱导植物抗性,该蛋白家族大部分是从病原菌分泌蛋白中得到<sup>[10]</sup>。但这种植物的防御反应仅存在于双子叶植物上,而对单子叶植物无作用。第一个识别的成员 Nep1 是从尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的培养物滤液中分离的一个 24 kD 蛋白质, Nep1 通过增加乙烯的产量引起植物叶片坏死和细胞死亡<sup>[11]</sup>。研究发现, NLPs 蛋白作为微生物相关的分子模式 (microbe-associated molecular pattern, MAMP)能够在拟南芥中引发免疫反应<sup>[12]</sup>。MAMP 在植物中引发基本的免疫反应,例如产生乙烯、活性氧、抗菌物质及程序性细胞死亡<sup>[13]</sup>。现有研究表明该家族蛋白也存在于放线菌中<sup>[14-15]</sup>。

淡紫灰链霉菌(*Streptomyces lavendulae*) gCLA4 是从黄瓜叶片分离的植物内生放线菌,对多种病原

真菌都有很好的拮抗作用<sup>[16]</sup>,对猕猴桃溃疡病有良好的防治效果,具有潜在的生防价值<sup>[17]</sup>。坏死诱导蛋白在原核和真核生物中均存在且序列高度保守,但不同来源导致其功能有很大差异。在研究gCLA4的外泌蛋白时,我们发现其中存在一个坏死诱导蛋白(necrosis-inducing protein) 4955,为研究该蛋白在gCLA4中的作用,本研究对该蛋白基因进行克隆、表达,探究其活性,并对诱导抗性相关的酶活及防御相关基因的表达进行检测,为进一步阐明坏死诱导蛋白的作用机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

原核表达载体 pCold TF、供试菌株 *Streptomyces lavendulae* gCLA4、表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)等均保存于西北农林科技大学植物保护学院果树病害综合防治实验室。*FastPfu* Polymerase, 北京全式金生物有限公司;限制性内切酶 *Nde* I/*Xho* I, TaKaRa 公司;植物 RNA 提取试剂盒,北京华越洋生物科技有限公司;反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific Fermentas 公司; AceQ qPCR SYBR Green Master Mix, Vazyme 公司。PCR 仪, ABI 公司;电泳仪、凝胶成像仪, Bio-Rad 公司。LB 培养基的配制参考文献[18];TSB 培养基和高氏 I 号培养基的配制参见链霉菌遗传操作手册<sup>[19]</sup>。

本氏烟草:将烟草种植于育苗基质中,于 25–28 °C 的温室中培养,光照 14 h。待长到 5–8 片叶时进行试验。

### 1.2 蛋白 4955 基因的克隆与表达载体的构建

以 *Streptomyces lavendulae* gCLA4 中蛋白 4955 的基因序列为模板,Primer Primer 5.0 设计引物 4955F (5'-GGAATTCCATATGGTCTCGTCGGCGTCC CGCAG-3')和 4955R (5'-CCGCTCGAGCTACAG GTACGGGTCGAAGGGGATG-3'),在引物 5'端加 *Nde* I/*Xho* I 双酶切位点,片段大小为 708 bp。CTAB 法<sup>[20]</sup>提取 gCLA4 基因组 DNA。以 gCLA4 基因组

DNA 为模板,梯度 PCR 扩增目的片段,以不加模板 DNA 的体系作对照。PCR 反应体系:模板 DNA 0.5 µg,正、反向引物(10 µmol/L)各 1 µL, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 µL, *FastPfu* Polymerase (2.5 U/µL) 1 µL, 5×*FastPfu* Buffer 10 µL, DMSO 5 µL, ddH<sub>2</sub>O 补至 50 µL。PCR 反应条件:95 °C 2 min; 95 °C 20 s, 56 °C 20 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min, 16 °C 保存。PCR 扩增产物由 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,回收、酶切后与相应酶切的载体 pCold TF 连接并转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态,氨苄抗性及 PCR 检测并测序验证,筛选阳性转化子。

### 1.3 重组蛋白的表达及鉴定

挑取阳性转化子于含 50 µg/mL 氨苄的 LB 培养基中,37 °C、220 r/min 培养 12 h。再以 1:100 的比例接种于 20 mL 含 50 µg/mL 氨苄的 LB 培养基中,培养至 *OD*<sub>600</sub> 达到 0.4–0.6,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,于 15 °C 的条件下诱导 24 h。4 °C、8 000×g 离心 10 min 收集菌体,用 1 mL 0.1 mol/L PBS (pH 7.4)重悬,反复冻融 5–6 次(液氮 1 min, 37 °C 5 min),4 °C、8 000×g 离心 10 min,取上清即为粗蛋白液。SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。

### 1.4 蛋白 4955 活性及稳定性检测

采用在烟草叶片背面注射蛋白原液的方式检测其活性,处理组用 4955 粗蛋白液,对照组用空载体 pCold TF 粗蛋白液,24 h 后观察叶片坏死情况。同时,将 4955 粗蛋白液分别在 4、25、40、50、60、70、80、100 °C 的条件下处理 10 min,检测蛋白热稳定性。用 HCl、NaOH 分别调蛋白液 pH 至 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0,注射烟草叶片,以原 pH 作对照,检测蛋白 pH 稳定性。

### 1.5 基本性质分析及三维结构模拟

分别用 ProtParam、PredictProtein、NCBI CDD、SWISS-MODEL 对蛋白 4955 的基本性质、二级结

构、结构域、三维结构进行分析<sup>[21]</sup>。

1.6 诱导烟草防御反应基因表达定量

防御反应基因表达定量的样品处理是通过在烟叶背面注射 4955 蛋白原液, 对照组注射空载蛋白原液, 于处理后的 1、2、3、4、5、6、7、8 d 取样。采用植物 RNA 提取试剂盒提取烟草 RNA, 用反转录试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA 第一链, 以 *EFlα* 作内参<sup>[22]</sup>, 定量 PCR 所用引物见表 1。采用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 进行 qPCR 分析, 反应体系: cDNA 50 ng, 基因特异性引物 0.2 μmol/L, AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 补至 20 μL。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 55 °C 20 s, 72 °C 45 s, 40 个循环(启用数据收集和实时分析); 65–95 °C 30 s, 61 个循环(每个循环温度提高 0.5 °C, 启用熔解曲线数据收集和分析); 25 °C 保存。

1.7 诱导烟草防御相关酶活变化

防御相关酶活的样品处理参照防御反应基因表达定量的样品处理方法, 取样至第 6 天。参照宋瑞芳等方法提取酶液, 并测定 CAT、SOD、POD、PAL 酶活<sup>[23]</sup>。

表 1 qPCR 引物序列

Table 1 Primers used for qPCR

引物名称	引物序列
Primers name	Primers sequence (5'→3')
<i>EFlα</i> -F	TATGATTACTGGTACCTCCC
<i>EFlα</i> -R	ACCTAGCCTTGAATACTTG
<i>NPR1</i> -F	GGCGATGATTGCGTATG
<i>NPR1</i> -R	CTCTAAGCCGATTCAAGTGC
<i>PR1-b</i> -F	GTGGACACTATACTCAGGTG
<i>PR1-b</i> -R	TCCAACCTTGGAATCAAAGGG
<i>PAL</i> -F	TTGAGGTCATCCGTTCTGC
<i>PAL</i> -R	GGCTAATCTAGCGTTGTCCAT
<i>LOX</i> -F	AAAACCTATGCCTCAAGAAC
<i>LOX</i> -R	TGAGGGATAGGAGATGAAAGTG
<i>PR1-a</i> -F	CGAAAACCTAGCTGAGGGA
<i>PR1-a</i> -R	CGAGTTACGCCAAACCACC

2 结果与分析

2.1 蛋白 4955 表达载体的构建

利用 4955F/4955R 引物对重组质粒进行 PCR 验证, 结果如图 1 所示, pCold TF-4955 重组质粒扩增得到 708 bp 的目的片段, 而对照 pCold TF 未能扩增出该片段。经测序验证正确后, 得到阳性重组质粒 pCold TF-4955。

2.2 重组蛋白的诱导表达

成功构建的重组质粒 pCold TF-4955 转化 BL21(DE3)感受态细胞, 0.1 mmol/L IPTG 诱导目的蛋白表达, 菌体经破碎后取上清液进行 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 显示蛋白 4955 在相应分子量位置(约 73 kD)有明显的表达条带(图 2), 而仅含空载体的菌株则没有相应表达蛋白的条带。

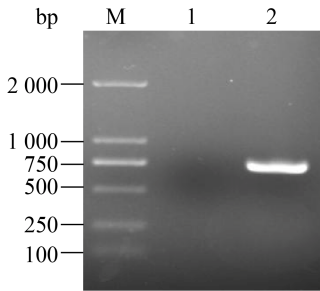


图 1 pCold TF-4955 重组质粒验证

Figure 1 Verification of recombinant plasmid pCold TF-4955

Note: M: DL2000 DNA Marker; 1: pCold TF; 2: pCold TF-4955.

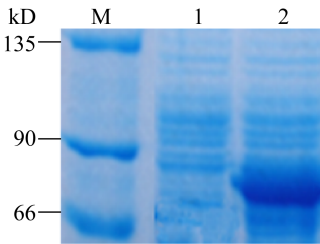


图 2 pCold TF-4955 重组蛋白的表达

Figure 2 Expression of pCold TF-4955 recombinant protein

注: M: 广谱蛋白 Marker; 1: *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF 表达产物; 2: *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF-4955 表达产物。

Note: M: Protein Marker; 1: Product of *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF; 2: Product of *E. coli* BL21(DE3)/pCold TF-4955.

### 2.3 活性及稳定性

重组蛋白 4955 可以激活烟草叶片中的植物免疫应答,引起侵染点附近的细胞或组织迅速坏死,是植物的一种抗病机制,伴随细胞的程序性死亡,结果如图 3 所示。热稳定性检测结果如图 4 所示,蛋白 4955 在处理 10 min 的条件下,在 25 °C 时仍有活性,40 °C 时活性较弱,而 50 °C 和 60 °C 时该蛋白失去活性。pH 稳定性检测结果见图 5,当 pH 值介于 6.0–10.0 时蛋白 4955 有活性,pH 值低于 4.0 或高于 12.0 时该蛋白无活性。

### 2.4 基本性质分析及三维结构模拟

蛋白 4955 的基本性质分析结果表明,该蛋白相对分子量为 24 491.12 Da,含有 225 个氨基酸,等电点为 5.96。其中,正电荷残基数(Arg+Lys)为 19 个,负电荷残基数(Asp+Glu)为 25 个。消光系数



图 3 蛋白 4955 诱导烟草过敏反应

Figure 3 Hypersensitive response of tobacco induced by protein 4955

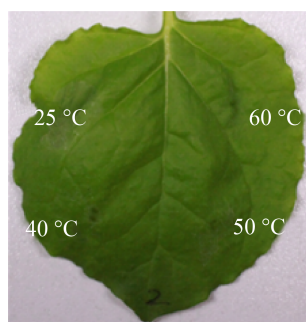


图 4 不同温度处理蛋白 4955 后诱导烟草过敏反应

Figure 4 Hypersensitive response of tobacco induced by protein 4955 treated at different temperatures

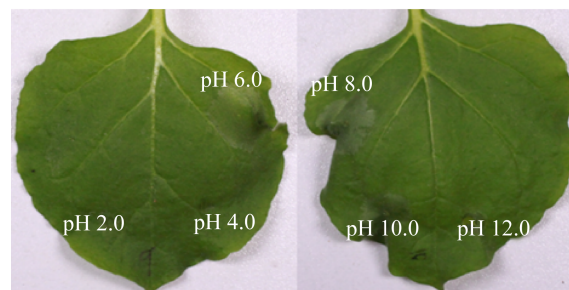


图 5 不同 pH 处理蛋白 4955 后诱导烟草过敏反应

Figure 5 Hypersensitive response of tobacco induced by protein 4955 treated at different pH

在 280 nm 下测得,若成对的半胱氨酸残基均形成胱氨酸,其消光系数为 55 140;若所有的半胱氨酸残基均被还原,则为 54 890。预测蛋白 4955 在体外条件下的半衰期为:哺乳动物网织红细胞中 4.4 h、大肠杆菌体内>10 h、酵母体内>20 h。该蛋白不稳定指数为 24.59,小于 40,归为稳定蛋白质。蛋白 4955 脂肪指数为 63.87,总体亲水性均值为-0.495。经 NCBI-CDD 比对后,蛋白 4955 含有 Necrosis inducing protein (NPP1)的保守结构域,为 11–214 位氨基酸。SWISS-MODEL 分析模拟蛋白 4955 的三维结构见图 6。

### 2.5 诱导烟草防御反应基因表达定量

蛋白 4955 诱导烟草防御反应相关基因 *NPR1*、*PR1-b*、*PAL*、*LOX*、*PR1-a* 的表达量见图 7。蛋白 4955 处理烟草后,防御相关的基因 *PR1-b*、*LOX* 在第 1 天均被激活,且于诱导处理后的第 3、5 天增量表达,基因 *PR1-b* 的表达量于第 3 天最高,*LOX* 至第 5 天达到最高峰值,基因 *PAL* 于处理后的第 4 天上调表达,而 *NPR1* 始终保持组成性表达水平。

### 2.6 诱导烟草防御相关酶活变化

蛋白 4955 诱导烟草 CAT、SOD、POD、PAL 酶活变化结果见图 8。蛋白 4955 处理烟草后,与对照相比,防御相关的 CAT、SOD 和 PAL 酶活变化呈现出相同的趋势,均是先上升后下降,最后与对照组基本无明显差异。在该蛋白处理烟草叶片



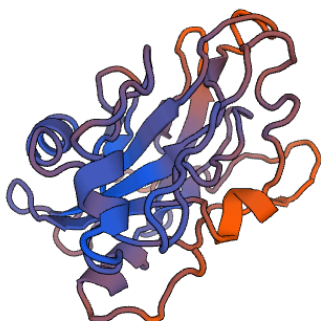


图 6 蛋白 4955 的三维结构  
Figure 6 Tertiary structure of protein 4955

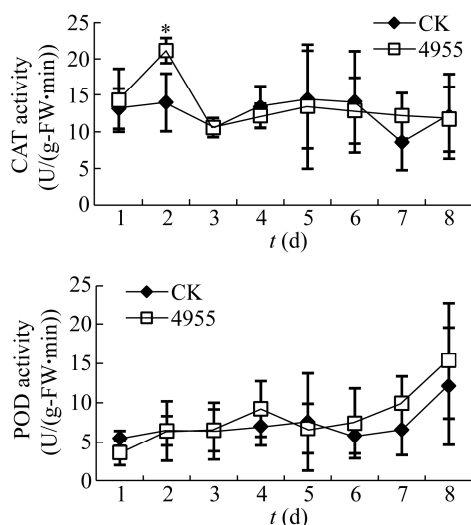


图 8 蛋白 4955 诱导烟草防御酶活性变化  
Figure 8 Variety of tobacco defense enzyme activity induced by protein 4955  
注: \*: 有显著性差异,  $P<0.05$ .  
Note: \*: Significant difference,  $P<0.05$ .

2 d 时, 烟草 CAT、PAL 及 SOD 酶活均显著高于对照, 达到最高值, 而 POD 活性无明显差异。

### 3 讨论与结论

*Streptomyces lavendulae* gCLA4 中坏死诱导蛋白 4955 含保守结构域 NPP1, 引起烟草过敏反应, 同时能引起烟草的防御反应。

诱导抗性按不同的信号路径分为系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)和诱导系统抗性(induced systemic resistance, ISR)。SAR 主要由水杨酸(salicylic acid, SA)信号途径介导, *NPR1* 是 SA 途径下游的重要调节因子<sup>[24]</sup>, 病程相关蛋白

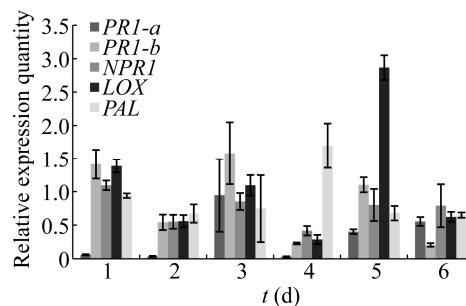
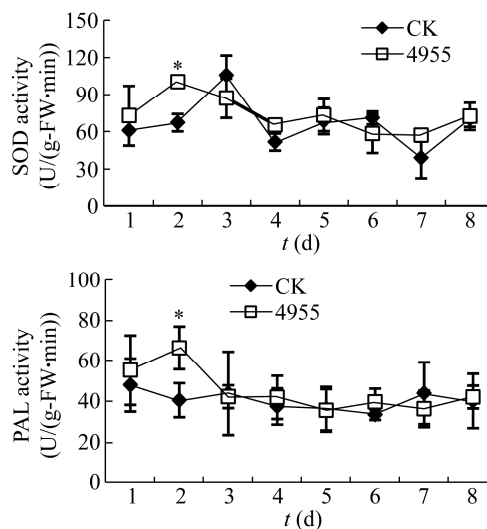


图 7 蛋白 4955 诱导烟草防御基因表达变化  
Figure 7 Variety of tobacco defense gene expression induced by protein 4955



(pathogenesis related protein, PR-蛋白)是由被诱导植物产生的非常重要的防御蛋白<sup>[25]</sup>, SA 水平的积累与基因 *PR-1* 的表达高度相关<sup>[26]</sup>, 而 *PAL* 是水杨酸合成途径的重要基因<sup>[27]</sup>。ISR 由茉莉酸(jasmonic acid, JA)和乙烯(ethylene, ET)信号转导途径介导, *LOX* 是 JA 信号通路的标记基因<sup>[28]</sup>。PAL 和 POD 是植物防御反应过程中重要的酶类。PAL 与植物的抗病性直接相关, 是植物苯丙烷途径中的关键酶和限速酶<sup>[29]</sup>。植物被病原菌侵染后, 首先伴随着 PAL 活性的增加, 同时产生一系列抑菌活性物质, 如植保素、木质素及酚类物质等, 这些物质阻止了

植物被病原菌进一步侵染,因此 PAL 酶活性可以直接用来衡量植物的抗病性<sup>[30]</sup>。*Streptomyces lavendulae* gCLA4 是一株植物内生防放线菌,本研究表明坏死诱导蛋白 4955 能激活烟草的抗性反应,使烟草中防御相关的 CAT、SOD、PAL 酶活增加;同时,与 SA 信号途径相关的防御基因 *PR1-b* 和 *PAL* 及与 JA 信号途径相关的防御基因 *LOX* 均上调表达,SA 信号途径和 JA 信号途径同时被激活,表明坏死诱导蛋白 4955 处理后,SAR 和 ISR 二者交叉协同作用。

原核生物和真核生物中均存在 Necrosis-inducing 蛋白,其蛋白序列高度保守,但不同来源的蛋白功能却不同<sup>[31]</sup>。已有的研究结果表明 NLPs 在作用于双子叶植物时可以产生活性氧、一氧化氮及乙烯类物质,并伴随着过敏反应和抗性相关酶活的提高,以及防御相关基因的表达,从而激活植物的抗性反应,并且认为 NPP1 通过水杨酸信号途径诱导植物产生一系列的防御反应<sup>[32]</sup>。此外,防御反应早期还会出现细胞膜完整性被破坏、接触点组织细胞碱化及胞间  $K^+$  积累等现象<sup>[33]</sup>。同时,NLPs 还可能通过减少植物对毒性激发剂的易感性,从而提高植物对半营养或坏死性植物病原体的抗性<sup>[31]</sup>。除此之外,NLPs 还在植物被侵染的过程中作为毒素发挥作用<sup>[34-38]</sup>。本研究中坏死诱导蛋白 4955 作为诱导因子,诱导植物防御相关的酶活增加,防御反应相关基因的表达量提高,引起植物的防御反应,这不仅为明确 Necrosis-inducing 蛋白的功能奠定基础,使生防菌 *Streptomyces lavendulae* gCLA4 可以在植物病虫害综合防治中发挥作用,同时也为植物病害生物防治提供新思路。

## REFERENCES

- [1] Weng QY, Li KB. Study and progress in induction of systemic resistance of plant[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 1998, 13(4): 23-28 (in Chinese)  
翁启勇, 李开本. 诱导植物系统抗性研究及进展[J]. 福建农业学报, 1998, 13(4): 23-28
- [2] Scheel D, Parker JE. Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation[J]. Zeitschrift für Naturforschung C, 1990, 45(6): 569-575
- [3] Li SP, Yang XF, Yuan JJ, et al. Screening of interacting proteins with protein elicitor Hrip1 and its prokaryotic expression[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(6): 182-189 (in Chinese)  
李书鹏, 杨秀芬, 袁京京, 等. 蛋白激发子 Hrip1 互作蛋白的筛选及其原核表达[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 182-189
- [4] Meng FL, Xiao Y, Guo LH, et al. A DREPP protein interacted with PeaT1 from *Alternaria tenuissima* and is involved in elicitor-induced disease resistance in *Nicotiana* plants[J]. Journal of Plant Research, 2018, 131(5): 827-837
- [5] Wang WN, Quan XJ, Xiao CG. Research advances on application and mechanism of induced resistance of plant[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2010, 49(1): 204-206 (in Chinese)  
王万能, 全学军, 肖崇刚. 植物诱导抗性的机理和应用研究进展[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(1): 204-206
- [6] Qiu DW. Current status and development strategy for biological control of plant diseases in China[J]. Plant Protection, 2010, 36(4): 15-18,35 (in Chinese)  
邱德文. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 15-18,35
- [7] Singh SP, Gaur R. Evaluation of antagonistic and plant growth promoting activities of chitinolytic endophytic actinomycetes associated with medicinal plants against *Sclerotium rolfsii* in chickpea[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 121(2): 506-518
- [8] Zhang QM, Yong DJ, Zhang Y, et al. *Streptomyces rochei* A-1 induces resistance and defense-related responses against *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit during storage[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 115: 30-37
- [9] Balaraju K, Kim CJ, Park DJ, et al. Paromomycin derived from *Streptomyces* sp. AG-P 1441 induces resistance against two major pathogens of chili pepper[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(9): 1542-1550
- [10] Gijzen M, Nürnberger T. Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa[J]. Phytochemistry, 2006, 67(16): 1800-1807
- [11] Bailey BA. Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*[J]. Phytopathology, 1995, 85(10): 1250-1255
- [12] Oome S, Raaymakers TM, Cabral A, et al. Nep1-like proteins from three kingdoms of life act as a microbe-associated molecular pattern in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2014, 111(47): 16955-16960
- [13] Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MH. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy[J]. The Plant Cell, 2011, 23(1): 4-15
- [14] Hamedi J, Moghimi H, Papiran R, et al. Screening of phytotoxic activity and *nlp* genes from rhizosphere

- actinomycetes[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(1): 527-532
- [15] Hamed J, Papiran R. Molecular characterization and periplasmic expression of the *nlp* gene of *Streptomyces cyaneofuscatus* UTM 2101 in *Escherichia coli*[J]. *Annals of Microbiology*, 2015, 65(4): 2047-2052
- [16] Tu X, Huang LL, Gao XN, et al. Endophytic actinomycetes of cucumber: isolation, antagonistic activity and identification[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2008, 38(3): 244-251 (in Chinese)  
涂璇, 黄丽丽, 高小宁, 等. 黄瓜内生放线菌的分离、筛选及其活性菌株鉴定[J]. *植物病理学报*, 2008, 38(3): 244-251
- [17] Shen Z, Huang LL, Tu X, et al. Control effect of kiwifruit bacterial canker by active metabolites from plant endophytic actinomycetes[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2008, 24(4): 329-334 (in Chinese)  
申哲, 黄丽丽, 涂璇, 等. 植物内生放线菌活性物质防治猕猴桃溃疡病[J]. *中国生物防治学报*, 2008, 24(4): 329-334
- [18] Rédei GP. LB (Luria-Bertani) bacterial medium[A]//Rédei GP. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics*[M]. Dordrecht: Springer, 2008: 1087
- [19] Hopwood DA. *Genetic Manipulation of Streptomyces a Laboratory Manual*[M]. Deng ZX, Tang JL, trans. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1988 (in Chinese)  
霍普伍德. 链霉菌遗传操作实验手册[M]. 邓子新, 唐纪良, 译. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988
- [20] Amaro A, Duarte E, Amado A, et al. Comparison of three DNA extraction methods for *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47(1): 8-11
- [21] Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(W1): W252-W258
- [22] Schmidt GW, Delaney SK. Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 283(3): 233-241
- [23] Song RF, Ding YL, Gong CR, et al. Research advances in relationship between tobacco resistance and protective enzymes activity[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(5): 309-314 (in Chinese)  
宋瑞芳, 丁永乐, 宫长荣, 等. 烟草抗病性与防御酶活性间的关系研究进展[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(5): 309-314
- [24] Johnson C, Boden E, Desai M, et al. *In vivo* target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor[J]. *The Plant Journal*, 2001, 28(2): 237-243
- [25] Jiang S, Han XL, Guo XL. Pathogenesis-related proteins induced in tobacco and sugar beet by virucides for plant[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1995, 25(3): 243-246 (in Chinese)  
江山, 韩熹莱, 郭雪柳. 抗植物病毒剂对烟草和甜菜病程相关蛋白的诱导作用[J]. *植物病理学报*, 1995, 25(3): 243-246
- [26] Ryals J, Lawton KA, Delaney TP, et al. Signal transduction in systemic acquired resistance[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(10): 4202-4205
- [27] Conrath U. Systemic acquired resistance[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2006, 1(4): 179-184
- [28] Guo H. Cloning and expression analysis of Jasmonic acid biosynthesis pathway genes in *Solanum melongena* L.[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2015 (in Chinese)  
郭航. 茄子茉莉酸生物合成途径相关基因的克隆与表达分析[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2015
- [29] Zhang SS, Hu L, Liu ZL, et al. Relationship between the disease defense-related enzymes and the disease resistance of plants[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2006, 12(13): 48-49,5 (in Chinese)  
张树生, 胡蕾, 刘忠良, 等. 植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系[J]. *安徽农学通报*, 2006, 12(13): 48-49,5
- [30] Klarzynski O, Descamps V, Plesse B, et al. Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(2): 115-122
- [31] Qutob D, Kamoun S, Gijzen M. Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy[J]. *The Plant Journal*, 2002, 32(3): 361-373
- [32] Qutob D, Tedman-Jones J, Gijzen M. Effector-triggered immunity by the plant pathogen *Phytophthora*[J]. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(11): 470-473
- [33] Jennings JC, Apel-Birkhold PC, Mock NM, et al. Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*[J]. *Plant Science*, 2001, 161(5): 891-899
- [34] Amsellem Z, Cohen BA, Gressel J. Engineering hypervirulence in a mycoherbicidal fungus for efficient weed control[J]. *Nature Biotechnology*, 2002, 20(10): 1035-1039
- [35] Kamoun S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44: 41-60
- [36] Mattinen L, Tshuikina M, Mäe A, et al. Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(12): 1366-1375
- [37] Pemberton CL, Salmond GPC. The Nep1-like proteins — a growing family of microbial elicitors of plant necrosis[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2004, 5(4): 353-359
- [38] Pemberton CL, Whitehead NA, Sebaihia M, et al. Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(4): 343-353