

参赛学生姓名： 费璠

中学： 广东华南师范大学附属中学

省份： 广东

国家/地区： 中国

指导老师姓名： 徐春香，桂鹏

指导老师单位： 华南农业大学，广东
 华南师范大学附属中学

论文题目： 香蕉生物群落之战：探索生防
 菌防治尖孢镰刀菌引发的香蕉
 枯萎病机制

香蕉生物群落之战：探索生防菌防治尖孢镰刀菌引发的香蕉枯萎病机制

费璠

摘要：香蕉 (*Musa spp.*) 不仅是全球最受欢迎的水果之一，在非洲、南美等地区，超过五亿人将其作为主食，是继水稻 (*Oryza sativa* L.)、小麦 (*Triticum aestivum* L.) 和玉米 (*Zea mays* L.) 之后的第四大粮食作物，对许多热带和亚热带国家的粮食安全至关重要。然而，香蕉生产遭受枯萎病的严重威胁。科学家们已确认某些微生物对香蕉枯萎病病原具有拮抗作用，这些微生物的拮抗机制是目前的研究热点。本研究利用从广东茂名地区‘广粉1号’（‘不死蕉’）中分离鉴定的种子伯克霍尔德菌 (*Burkholderia seminalis*) 菌株256，开展了针对香蕉枯萎病的拮抗实验，并确认其对香蕉枯萎病病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Foc*) 4号生理小种 *Foc*4 具有拮抗作用，防控效果为56.4%。进一步应用转录组学技术分析发现，细胞壁形成与维持相关的通路可能是菌株256拮抗 *Foc*4 的机制之一。免疫荧光实验结果显示，*Foc*4 导致细胞壁重要成分去甲酯化的同源半乳糖醛酸型果胶含量下降，而菌株256能够恢复其含量，这揭示菌株256可能通过改善细胞壁的结构支撑或信号转导来防治枯萎病。本研究首次从伯克霍尔德菌改善香蕉生物学过程和通路的角度探索其生防机制，我们的发现为菌株256在香蕉枯萎病生物防控的田间应用奠定了重要基础，为香蕉枯萎病的防治提供了新的机制及应用线索。

关键词：香蕉 枯萎病 生防菌 细胞壁 果胶 转录组学

目录

1. 研究背景.....	4
1.1 香蕉和香蕉枯萎病.....	4
1.2 香蕉枯萎病的生物防治进展.....	5
1.3 广东省茂名地区‘不死蕉’不死的秘密.....	6
1.4 科学问题和研究目的.....	7
2. 材料和方法.....	8
2.1 供试香蕉苗品种.....	8
2.2 供试枯萎病菌株和生物防治菌株.....	8
2.3 香蕉苗的移栽与培育.....	8
2.4 生物防治菌株及枯萎病菌株接种香蕉苗实验.....	8
2.5 植株测量及病情指数分析.....	9
2.6 转录组测序及数据分析.....	10
2.7 样品包埋及石蜡切片.....	10
2.8 免疫荧光染色及成像.....	11
2.9 图像处理及统计学分析.....	11
3. 实验结果.....	12
3.1 菌株256促进香蕉苗生长.....	12
3.2 菌株256对 <i>Foc4</i> 引发的香蕉枯萎病具有防控作用.....	13
3.3 应用转录组学技术研究菌株256防控枯萎病机制.....	14
3.3.1 菌株256通过作用于核糖体、蛋白质合成等通路促进香蕉苗生长...15	
3.3.2 <i>Foc4</i> 导致香蕉苗核糖体、光合作用、叶绿素代谢等通路异常.....16	
3.3.3 菌株256通过调控植株缺氧反应等通路防控枯萎病.....18	
3.3.4 菌株256通过调控细胞壁相关的生物学过程防控枯萎病.....19	
3.4 免疫荧光实验揭示菌株256通过调控细胞壁果胶含量防控枯萎病.....21	
4. 讨 论.....	24
5. 参 考 文 献.....	28
6. 致 谢.....	30

1. 研究背景

1.1 香蕉和香蕉枯萎病

香蕉 (*Musa spp.*) 是热带亚热带地区的重要经济及粮食作物，被广泛认为是世界上产量最高的水果之一，也是许多国家和地区的主要粮食来源。在中国，香蕉主要种植在广东、福建、云南、广西、海南和台湾等地区。经过几千年的人工育种，我们现在所食用的无籽香蕉主要是经过杂交培育的三倍体，只能通过无性繁殖方式进行克隆繁衍¹。无性繁殖使得大部分商业种植香蕉的基因组完全一致，而缺乏遗传多样性的保护作用，一旦感染病害，整个香蕉种群都会面临灭顶之灾。

香蕉枯萎病 (*Fusarium wilt*) 是由尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Foc*) 引起的土传维管束病害¹。这种病害被认为是香蕉病害中最为严重和难以防治的，曾对香蕉产业造成毁灭性影响。*Foc* 是一种死体营养型病原菌，目前可分为4个生理小种。*Foc* 的1号生理小种 (*Foc1*) 最早于1874年在澳大利亚被发现，后来传播到巴拿马，导致当时主要种植的香蕉品种‘大米歇尔’退出国际市场。抗*Foc1*的香蕉品种‘卡文迪许’的出现拯救了濒临灭亡的全球香蕉产业。然而，随着病原菌*Foc1*的适应性变异，进化出了对‘卡文迪许’具有致病性的*Foc4*菌株，给全球香蕉产业带来新的威胁¹。

研究发现*Foc4*从表皮细胞间隙和伤口处渗入香蕉根部，逐步侵袭根、球茎、假茎的维管束组织并大量繁殖，堵塞管道组织，妨碍

养分和水的运输，导致维管束变色、腐烂，叶片自下而上发黄、枯萎，最终导致植株死亡²。

植物病害的防治措施主要包括化学、农业（如轮作、栽培抗病品种）及生物防治等方法。然而，目前香蕉枯萎病尚无有效的化学防治药剂；轮作的防治效果有限，因为香蕉枯萎病菌的厚垣孢子可以在土壤中存活多年；选育抗病品种需要较长时间，且目前已有的抗病品种均存在一些不足之处¹。近年来，生物防治备受关注。这种方法不仅符合可持续发展的理念，而且能够有效地控制香蕉枯萎病¹。通过利用天然的生物控制剂或微生物来抑制病原菌的生长，生物防治方法对减少化学农药使用、保护土壤生态系统和减少环境污染具有重要意义。

1.2 香蕉枯萎病的生物防治进展

许多国内外团队在香蕉枯萎病的生物防治方面取得了重要成果，主要集中在拮抗菌株的筛选、发酵产物对病原菌的防治效果和机理、以及拮抗菌株在植物上的定殖情况等方面。木霉菌属（*Trichoderma*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、放线菌属（*Actinomyces*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、伯克霍尔德氏菌属（*Burkholderia*）等微生物已被证实对香蕉枯萎病具有拮抗作用，不仅可以抑制病原菌生长，还能促进植物生长¹。

目前关于生防菌防控枯萎病的机制研究主要集中在生防菌对病原菌 *Foc* 的直接抑制作用。研究发现，枯草芽孢杆菌通过产生几丁质酶、挥发性物质和其他抗真菌分子对 *Foc* 起到多重拮抗作用³。链霉

菌的提取物或抗真菌代谢物通过破坏细胞膜的完整性和菌丝的超微结构抑制*Foc*生长和孢子萌发，促进香蕉幼苗生长^{4,5}。假单胞菌通过合成具有生物活性的化合物和分泌细胞壁水解酶抑制*Foc*，促进植物生长⁶。

菠萝-香蕉轮作和土壤中菠萝残留会改变细菌和真菌的群落组成，显著降低土壤中*Foc*的数量和枯萎病的发生率。其中伯克霍尔德氏菌属与病害发生率之间存在显著负相关关系，在减少*Foc*方面发挥了关键作用^{7,8}。电镜发现从芦笋中分离出的内生菌伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) 能够定殖在*Foc*的菌丝表面和大孢子上，导致菌丝变形⁹。另一项研究证明从植物内生菌中分离出的伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cenocepacia* 869T2) 能显著降低枯萎病的发生率，测序分析提示该菌株可以产生广谱抗生素吡咯喹啉，从而抑制病原真菌的生长¹⁰。从香蕉根瘤土壤中分离出的伯克霍尔德氏菌菌株 (*Burkholderia* sp. HQB-1) 对代表性的植物病原真菌具有广谱抗真菌活性，在其代谢产物中，吩嗪-1-羧酸 (phenazine-1-carboxylic acid, C₁₃H₈N₂O₂) 被鉴定为抗菌活性物质，可有效控制香蕉枯萎病，并促进香蕉植株的生长¹¹。

综上，不论是伯克霍尔德氏菌还是其他生防菌对香蕉枯萎病的拮抗作用，还只是局限于生防菌对*Foc*的直接抑制机制的研究上。而在这场香蕉生物群落之战中，生防菌如何调动主角香蕉的战斗性，来抵御*Foc*引起的枯萎病还鲜有研究。

1.3 广东省茂名地区‘不死蕉’不死的秘密

在广东省茂名地区广泛种植一种抗*Foc1*的‘广粉1号’ (*Musa* spp. ABB) 突变体 (当地俗称‘不死蕉’)。蕉农主要通过吸芽进行繁殖, 然而在组培过程中, 该抗病突变体常受内生细菌污染困扰, 导致成功率低且最终扩繁的组培苗抗性显著下降。这一现状提示该突变体的根际微生物或内生菌可能对其抗性发挥关键作用。

为探究这一假设, 实验室进行了前期工作, 从种植‘广粉1号’及其抗病突变体的蕉园中分别采集根围土壤、假茎组织和根组织, 进行了细菌群落多样性分析, 并对微生物进行了分离、纯化和鉴定。通过平板对峙筛选, 成功筛选出了5株具有较好拮抗活性的细菌。并通过形态学观察、生理生化测定以及分子生物学方法, 对各拮抗菌株进行了分类鉴定。初步鉴定结果显示, 其中代号为256的菌株被确认为种子伯克霍尔德菌 (*Burkholderia seminalis*), 而其他4株则初步鉴定为贝莱斯芽孢杆菌。这些发现为进一步研究‘不死蕉’不死的秘密提供了线索。

1.4 科学问题和研究目的

我所关注的科学问题是: 种子伯克霍尔德菌 256 号菌株是否具有对由 *Foc4* 引发的香蕉枯萎病具有生物拮抗功能? 如果是肯定的, 那么这种拮抗的机制可能是什么?

本研究的目的在于评估 256 号菌株在抑制 *Foc4* 引发的香蕉枯萎病中的效果, 揭示这种生物拮抗的潜在机制, 为香蕉枯萎病的生物防治提供新的思路。

2. 材料和方法

2.1 供试香蕉苗品种

本实验的供试香蕉苗为4-6叶龄的‘巴西蕉’ (*Musa* spp. AAA), 购买于苗木公司。

2.2 供试枯萎病菌株和生物防治菌株

*Foc4*由华南农业大学植物保护学院李华平教授赠送。生物防治菌株256号由实验室从‘不死蕉’根部土壤中分离筛选得到。

2.3 香蕉苗的移栽与培育

将珍珠盐、蛭石和基质按1:1:4的体积比例混合, 加入相等体积的水后搅拌均匀。将混合土壤倒入塑料花盆杯沿处, 轻轻压实, 然后在土壤中央挖一个与大拇指深度相当的洞, 将香蕉幼苗移栽其中。浇水至杯沿处, 保持土壤湿润, 每三天浇水一次。

2.4 生物防治菌株及枯萎病菌株接种香蕉苗实验

移栽香蕉苗一周后, 将它们分为四组: 对照组 (CK, 10株), 生防菌处理组 (256, 10株), 枯萎病菌处理组 (*Foc4*, 30株), 以及生防菌和枯萎病菌共同处理组 (256+*Foc4*, 30株)。首先, 从-80℃冰箱中取出实验室前期在对抗平板中筛选出的、对*Foc4*具有良好效果的256菌株, 接种于1 ml酵母浸出粉胨葡萄糖液体培养基中, 置于28℃, 200 rpm震荡培养过夜。将该活化菌液接种到100 ml新的液体培养基中, 再次28℃, 200 rpm震荡培养过夜后, 再稀释后震荡培养至OD600 (波长为600纳米处的吸光值) 为1。取50 ml菌液灌溉于第二组和第四组的香蕉苗根部及周围。每隔7天接种一次256菌株, 共接

种3次。最后一次接种256菌株7天后，第三组和第四组接种枯萎病菌 *Foc4*孢子悬浮液（方法同上）。对照组每次均用清水处理。接种后，将植株放置于实验室外的阳台，定期浇水施肥，并记录病情变化。

2.5 植株测量及病情指数分析

接种*Foc4*两周后，测量香蕉苗从土壤处到最后一片侧叶分支点的假茎高度作为株高，应用游标卡尺在假茎靠近根部2 cm处测量假茎直径，统计叶片数，测量第二片叶（从上往下数）的叶片长度和最宽处。

根据如下标准，对每一植株进行病情分级。

等级	分级标准
0级	叶片未变黄，健康有光泽
1级	下部分叶片稍微褪绿、变黄
2级	下部大部分叶片褪绿、变黄，上部嫩叶开始褪绿、变黄
3级	大部分或全部叶片褪绿、变黄
4级	植株死亡

表1：香蕉枯萎病叶片症状分级标准

根据如下公式：病情指数= $(\sum (\text{各级病株数} \times \text{该病级数})) / (\text{调查总株数} \times \text{最高病级}) \times 100\%$ ，对*Foc4*、256+*Foc4*两组分别进行病情指数计算。

根据公式：防控效果 (%) = $(\text{Foc4组病情指数} - \text{256+Foc4组病情指数}) / \text{Foc4组病情指数} \times 100\%$ ，计算256菌株的防控枯萎病效果。

2.6 转录组测序及数据分析

CK、256、*Foc4*、256+*Foc4* 每组中选取三株有代表性的香蕉植株，在相似位置上选取 3-4 片叶片，用 PBS/RNase-free 水擦拭或冲洗干净，用吸水纸吸干样品表面后，将叶片切割为小片，经过液氮速冻后稍微碾碎一点，液氮速冻 5-10 min 后于 -80°C 冰箱保存。干冰送样品至武汉迈维代谢生物科技股份有限公司进行 RNA 提取，RNA 检测，文库构建，上机测序等。将下机数据进行过滤得到 Clean Data，与参考基因组 *Musa_acuminata_pahang_v4.fasta* 进行序列比对，功能注释和基因表达定量等分析。使用 DESeq2 进行样品组间的差异表达分析。差异基因的筛选条件为 $|\log_2 \text{Fold Change}| \geq 1$ ，且错误发现率 < 0.05 。将基因注释到 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 数据库和 Gene Ontology (GO) 数据库，进行差异表达基因 (DEG) 的功能富集分析。在获得迈维代谢的初步分析后，人工挑选细胞壁相关 GO 通路并利用微生信平台进行个性化的分析绘图。

2.7 样品包埋及石蜡切片

叶片样本用 3.7% 甲醛固定液室温固定 1 h。用磷酸缓冲液 (PBS) 漂洗 3 次。用浓度依次升高的乙醇梯度溶液于 4°C 脱水后，加甲苯胺蓝染色，再用 100% 乙醇脱水。加入低熔点多脂蜡 Steedman's Wax 与乙醇 1:1 的混合液，37°C 孵育过夜。次日更换为 3:1 的 Steedman's Wax 与乙醇的混合液继续孵育 2.5 h，最后换入纯的 Steedman's Wax 溶液处理 2 次，每次 2 h。将叶片样本与 Steedman's Wax 加入模具中，凝固后放入 4°C 保存。切片时，将包有样品的蜡块固定在小木块上，安装在手动轮转式切片机 (LEICA RM 2235 型) 上，切成约 10 μm

的薄片，用小镊子将其轻放在滴有蒸馏水的且提前涂有 0.2%聚乙烯亚胺的载玻片上展开，晾干一周后备用。

2.8 免疫荧光染色及成像

将粘有石蜡切片的载玻片放入纯乙醇中脱蜡，再用浓度依次下降的乙醇梯度溶液浸泡复水。先后用含 50 mM 甘氨酸的 PBS 溶液和含 2%牛血清白蛋白的 PBS 溶液封闭后，切片在 1: 20 稀释的小鼠 CCRC-M38 抗体中 4℃孵育过夜。PBS 充分清洗后，用 1:20 稀释的 anti-mouse IgG-FITC 抗体，室温下黑暗温育 1 h。PBS 充分清洗 3 次后，用 0.01%的甲苯胺蓝染色，去除植物的自发荧光。PBS 清洗后，稍晾干，滴少许甘油在切片上，盖以盖玻片封片，尽快在 Olympus BH2-FRCA 型荧光显微镜下成像。

2.9 图像处理及统计学分析

免疫荧光图像采用 ZEN 软件进行定量化分析。应用 GraphPad Prism 10.2.3.对所有相关数据进行统计学分析，数值展示为平均值 ± SD，多组间比较应用 One way ANOVA 分析 P 值。P < 0.05 被认为有显著差异，P 值越小，差异越显著：*P < 0.05；**P < 0.01；***P < 0.001；****P < 0.0001.

3. 实验结果

3.1 菌株256促进香蕉苗生长

4-6叶龄香蕉苗移栽后的一周里茁壮生长（图1A），如前所述，将它们分为四组：对照组（CK），生防菌处理组（256），枯萎病菌处理组（*Foc4*），以及生防菌和枯萎病菌共同处理组（256+*Foc4*）。256组和256+*Foc4*组提前接种菌株256三次（图1B），第三次接种菌株256一周后，256+*Foc4*组和*Foc4*组接种*Foc4*。对照组在每次接种中只用清水处理。*Foc4*接种后的第一周，各组植株都长势良好，256组的植株略显高大（图1C-E）。



图1.香蕉苗(*Musa* spp. AAA)的移栽、接种和观察。A.刚完成移栽的香蕉苗，B.给香蕉苗接种生防菌256，C-D. *Foc4*接种后第一周的CK组和256组香蕉苗（C），*Foc4*组（D），和256+*Foc4*组（E）香蕉苗。CK:对照；256: 种子伯克霍尔德菌(*Burkholderia seminalis*)菌株256；*Foc4*: 香蕉枯萎病病菌4号生理小种。

*Foc4*接种两周后，在256+*Foc4*组，特别是*Foc4*组出现明显黄色叶片，表明枯萎病已经开始发病（图2A）。于是，我测量了每组各植株的假茎高度和直径，叶片长度和宽度。结果显示尽管各组之间

假茎的直径没有显著差异，但256组和256+Foc4组植株的假茎高度显著高于CK组和Foc4组(图2B, C)，256组的叶片长度和宽度也明显长于CK组和Foc4组(图2D, E)，表明菌株256具有促进香蕉植株生长的作用。

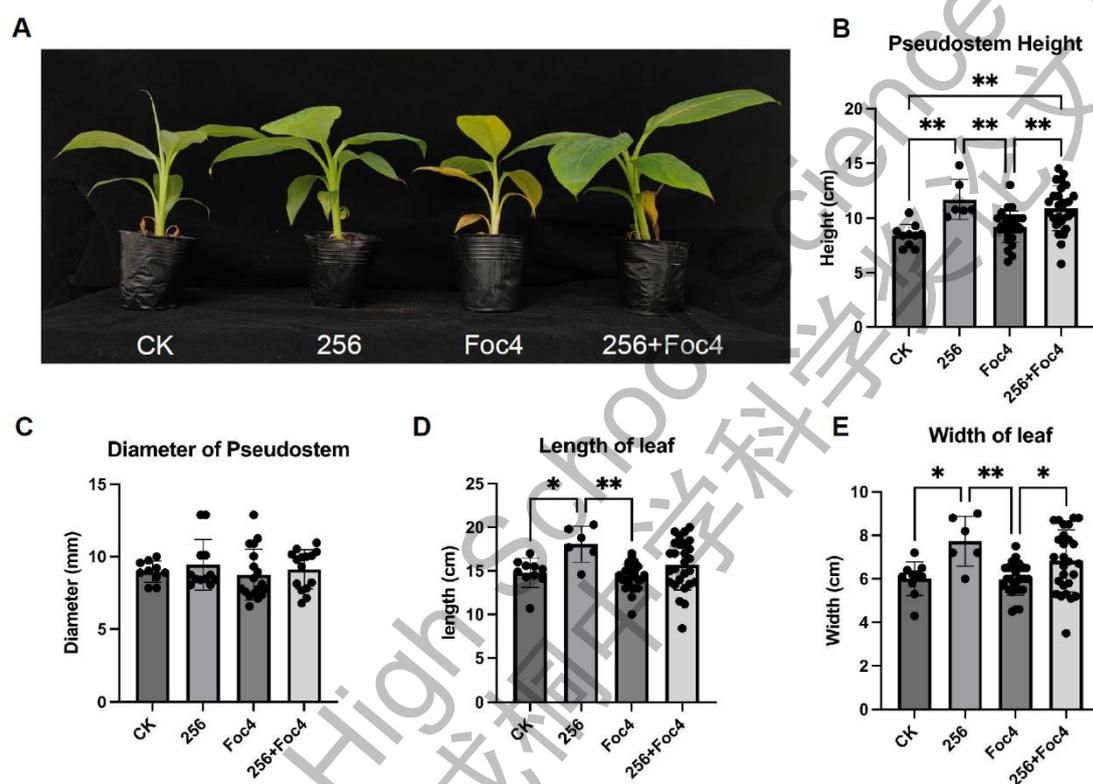


图2. 种子伯克霍尔德菌(*Burkholderia seminalis*)菌株256对香蕉(*Musa* spp. AAA)生长发育的影响。A. 表型, B. 假茎高度, C. 假茎直径, D. 叶片长度, E. 叶片宽度。CK:对照; Foc4:香蕉枯萎病菌4号生理小种。

3.2 菌株 256 对 Foc4 引发的香蕉枯萎病具有防控作用

为了研究菌株 256 对枯萎病的发病是否有抑制作用，我进一步测量了每组各植株的绿叶数目，并应用 SPAD-502 叶绿素仪测量叶片的 SPAD 值（代表叶绿素相对含量）。根据表 1 所示的香蕉枯萎病叶片症状分级标准，给每组各植株进行分级，并计算各组病情指数。结果显示 Foc4 组与其它各组相比，绿叶数目多从 6、7 片降低为 2、3 片，256+Foc4 组绿叶数目虽然比对照组低，但明显优于 Foc4

组，说明菌株 256 对改善 *Foc4* 引起的枯叶症状还是有明显作用的（图 3A）。叶绿素含量检测结果显示 *Foc4* 组与 CK 组绿叶的叶绿素含量没有明显差别，但 256 组和 256+*Foc4* 组的叶绿素含量明显高于 CK 组和 *Foc4* 组（图 3B），表明菌株 256 可能会促进叶绿素的生成，即使在 *Foc4* 导致枯萎病的情况下也能够促进叶绿素生成。植株的叶片症状分级 *Foc4* 组多为 2 级，256+*Foc4* 组多为 1 级（图 3C），后两组的病情指数分别为 50.9%，22.2%。菌株 256 对枯萎病的防控效果为 56.4%。以上结果说明 *Foc4* 引起的香蕉苗枯萎病症状明显，而菌株 256 对 *Foc4* 引发的香蕉枯萎病具有防控作用。

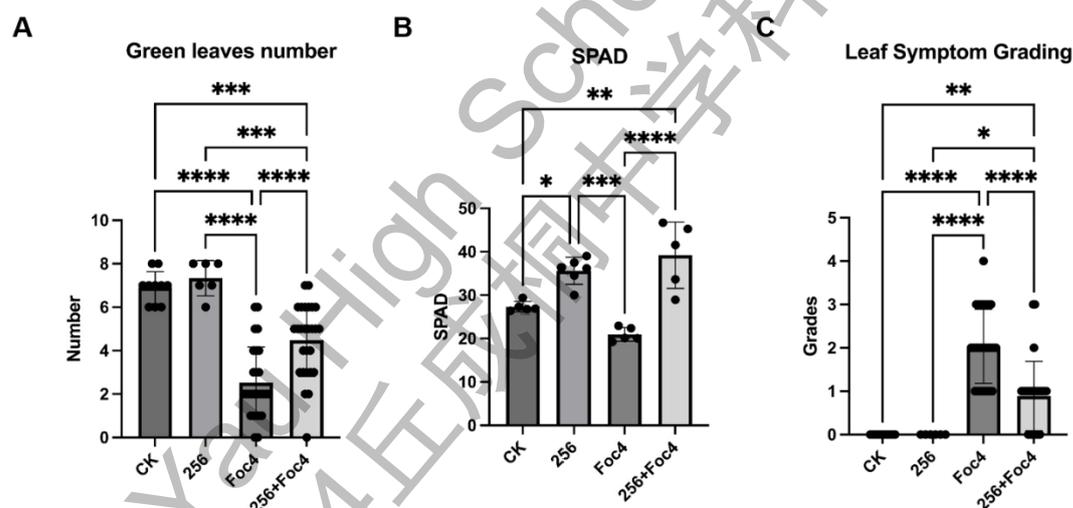


图3. 种子伯克霍尔德菌 (*Burkholderia seminalis*) 菌株256减轻了*Foc4*引起的香蕉 (*Musa* spp. AAA) 枯萎病症状。A. *Foc4*接种两周后各组植株绿叶数目，B. 叶绿素含量，C. 叶片症状分级。CK:对照；*Foc4*: 香蕉枯萎病病菌4号生理小种。

3.3 应用转录组学技术研究菌株 256 防控枯萎病机制

为了进一步研究菌株 256 对 *Foc4* 引发的香蕉枯萎病的防控机制，我们在 CK、256、*Foc4*、256+*Foc4* 每组中选取三株有代表性的香蕉植株提取叶片样本进行转录组测序及数据分析。每两组相互比较上调和下调的 DEG 数目发现，与 CK 组比较，256 组上调基因 29 个，

下调基因 279 个；*Foc4* 组上调基因 2025 个，下调基因 2435 个；与 *Foc4* 组相比，256+*Foc4* 组上调基因 954 个，下调基因 554 个(图 4)。

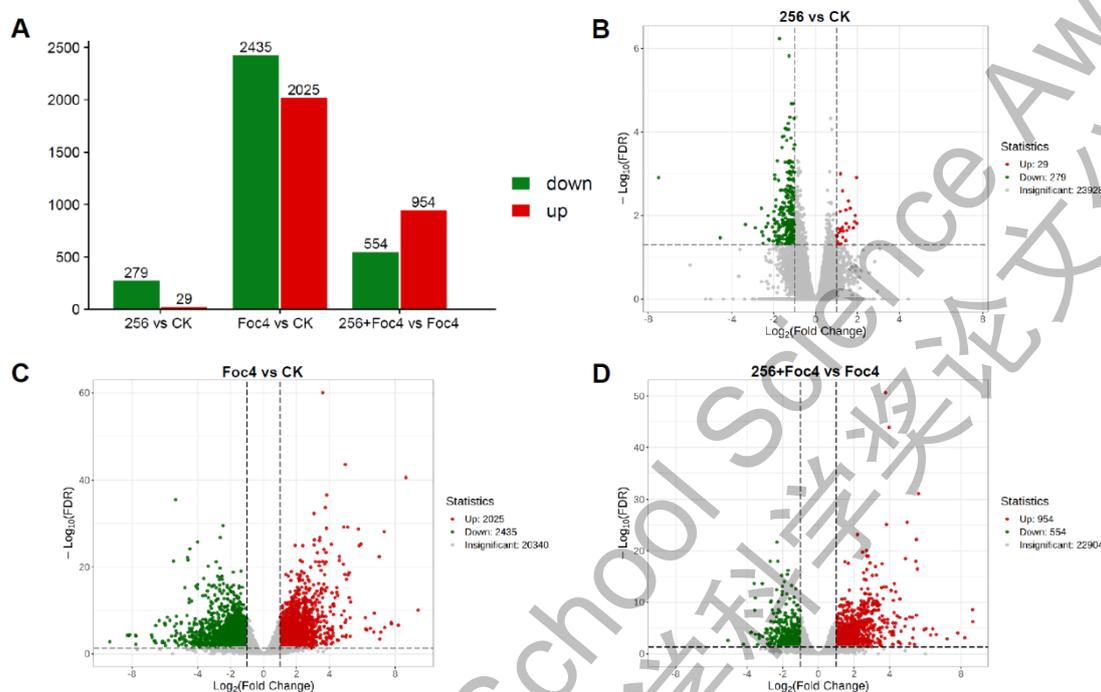


图4. 种子伯克霍尔德菌(*Burkholderia seminalis*)菌株256接种引起正常和感病状况下香蕉(*Musa* spp. AAA)基因的差异表达情况。A. 各处理组间DEG数目, B-D. 每个比较组间DEG的火山图。CK:对照; DEG: 差异表达基因; *Foc4*: 香蕉枯萎病病菌4号生理小种。

为了鉴定这些数目庞大的 DEG 作用在哪些具体的分子信号通路上, 通过何种机制来影响枯萎病的致病, 将这些基因注释到 KEGG 数据库和 GO 数据库, 进行 DEG 的功能富集分析。得到的主要结果如下。

3.3.1 菌株 256 通过作用于核糖体、蛋白质合成等通路促进香蕉苗生长

256 组与 CK 组相比的 DEG 主要富集在核糖体生成、氨基酸生物合成、蛋白质合成折叠和核苷酸代谢等(图 5), 这些通路可以解释我们观察到的菌株 256 促进植株生长的作用机制。

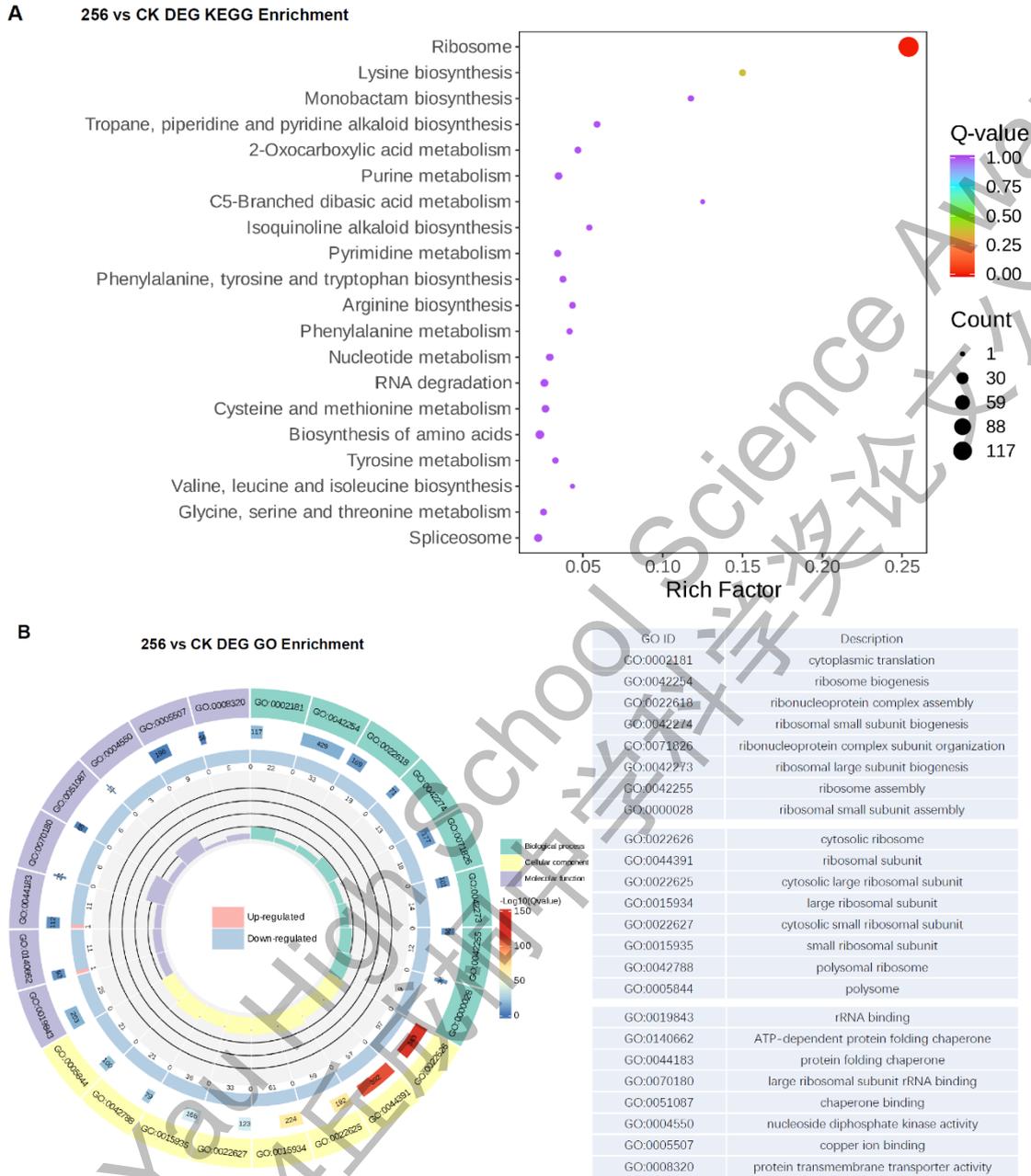


图5. 种子伯克霍尔德菌(*Burkholderia seminalis*)菌株256接种引起香蕉(*Musa spp.* AAA)差异表达基因的富集通路。A. 256组与CK组相比的DEG富集的KEGG通路的富集气泡图, B. 256组与CK组相比的DEG富集的GO通路的富集圈图及相关GO通路的描述。CK:对照; DEG: 差异表达基因; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; GO: Gene Ontology。

3.3.2 *Foc4* 导致香蕉苗核糖体、光合作用、叶绿素代谢等通路异常

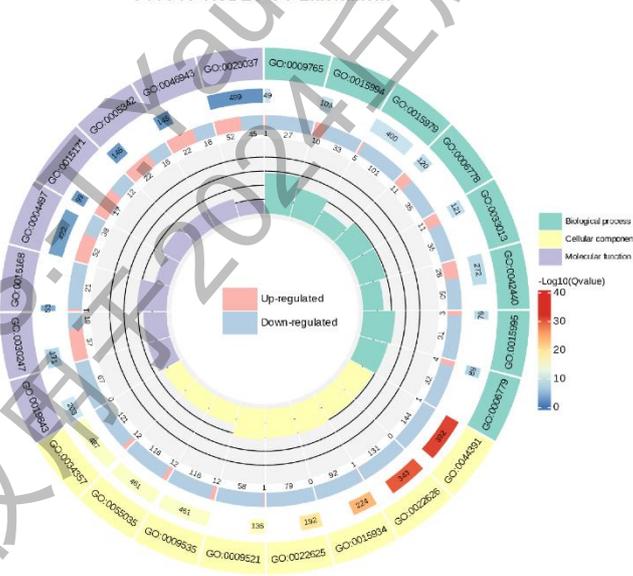
Foc4 组与对照组相比的 DEG 主要富集在核糖体、光合作用、叶绿素代谢、含卟啉化合物代谢及四吡咯代谢等通路 (图6), 后两者参与了叶绿素生物合成, 色素合成及氧化还原反应。这些富集通路

和 *Foc4* 组叶片枯黄、绿叶数目少等表型一致。除了上述显著富集通路外，*Foc4* 组与对照组相比的 DEG 在植物病原相互作用，次生代谢产物苯丙类化合物的生物合成，异喹啉生物碱合成等通路也有富集（图 6A），这些通路在 *Foc4* 所致枯萎病的发病过程中所起的具体作用仍需进一步实验来确定。

A Foc4 vs CK DEG KEGG Enrichment



B Foc4 vs CK DEG GO Enrichment



GO ID	Description
GO:0009765	photosynthesis, light harvesting
GO:0015994	chlorophyll metabolic process
GO:0015979	photosynthesis
GO:0006778	porphyrin-containing compound metabolic process
GO:0033013	tetrapyrrole metabolic process
GO:0042440	pigment metabolic process
GO:0015995	chlorophyll biosynthetic process
GO:0006779	porphyrin-containing compound biosynthetic process
GO:0044391	ribosomal subunit
GO:0022626	cytosolic ribosome
GO:0015934	large ribosomal subunit
GO:0022625	cytosolic large ribosomal subunit
GO:0009521	photosystem
GO:0009535	chloroplast thylakoid membrane
GO:0055035	plastid thylakoid membrane
GO:0034357	photosynthetic membrane
GO:0019843	rRNA binding
GO:0030247	polysaccharide binding
GO:0016168	chlorophyll binding
GO:0004497	monooxygenase activity
GO:0015171	amino acid transmembrane transporter activity
GO:0005342	organic acid transmembrane transporter activity
GO:0046943	carboxylic acid transmembrane transporter activity
GO:0020037	heme binding

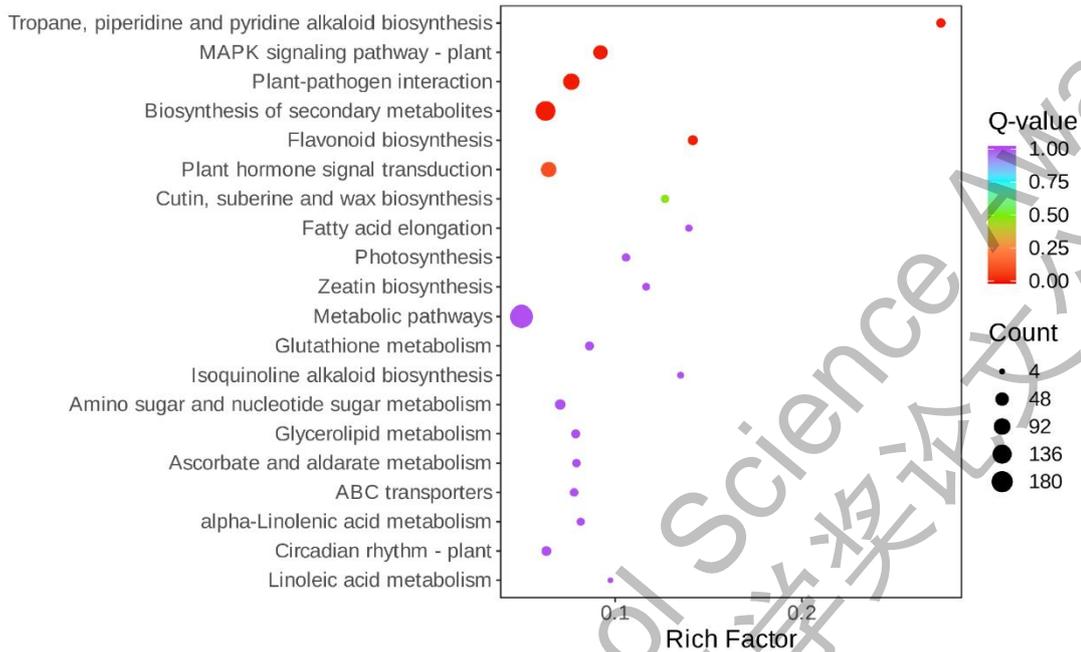
图6. 香蕉枯萎病病菌4号生理小种*Foc4*引起香蕉(*Musa* spp. AAA)差异表达基因的富集通路。A. *Foc4*组与CK组相比的DEG富集的KEGG通路的富集气泡图, B. *Foc4*组与CK组相比的DEG富集的GO通路的富集圈图及相关GO通路的描述。CK:对照; DEG: 差异表达基因; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; GO: Gene Ontology。

3.3.3 菌株 256 通过调控植株缺氧反应等通路防控枯萎病

为了揭示菌株 256 拮抗 *Foc4* 所致的枯萎病的机制, 我着重分析了 256+*Foc4* 组与 *Foc4* 组相比的 DEG 在 KEGG 和 GO 的富集通路。在 KEGG 中显著富集的通路有托烷、哌啶、吡啶生物碱的生物合成, MAPK 信号通路, 植物-病原体相互作用, 次生代谢产物生物合成, 类黄酮生物合成, 及植物激素信号转导 (图 7A)。

256+*Foc4* 组与 *Foc4* 组相比的 DEG 在 GO 的富集通路分为生物学过程、细胞组成和分子功能三类。生物学过程显著富集的有 147 个通路, 其中最显著的有细胞对缺氧的响应、细胞对氧气水平下降的响应、细胞对氧气水平的响应、类黄酮生物合成过程及乙烯激活的信号通路等 (图 7B)。256+*Foc4* 组和 *Foc4* 组相比的 DEG 在 GO 细胞组成中的富集不具有显著性意义, 在分子功能显著富集的包括甘油-3-磷酸 2-O-酰基转移酶活性、alpha 淀粉酶活性、硝酸盐跨膜转运蛋白活性等 (图 7B)。这些分子功能都和植物的代谢调节相关, 可能与信号转导途径相关联, 在植物适应环境变化的过程中发挥作用。

A 256+Foc4 vs Foc4 DEG KEGG Enrichment



B 256+Foc4 vs Foc4 DEG GO Enrichment

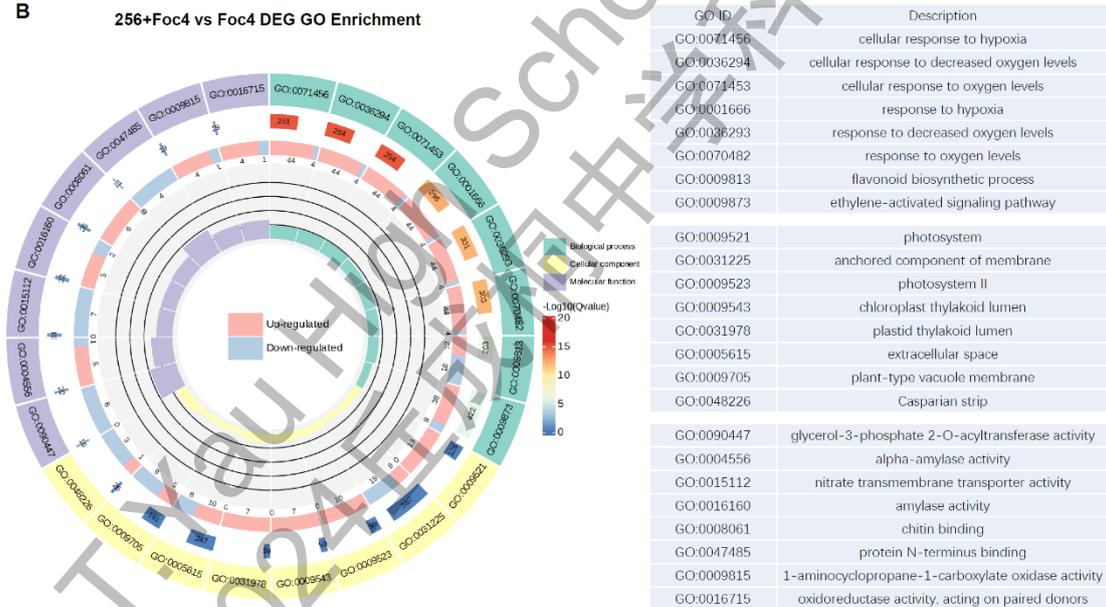
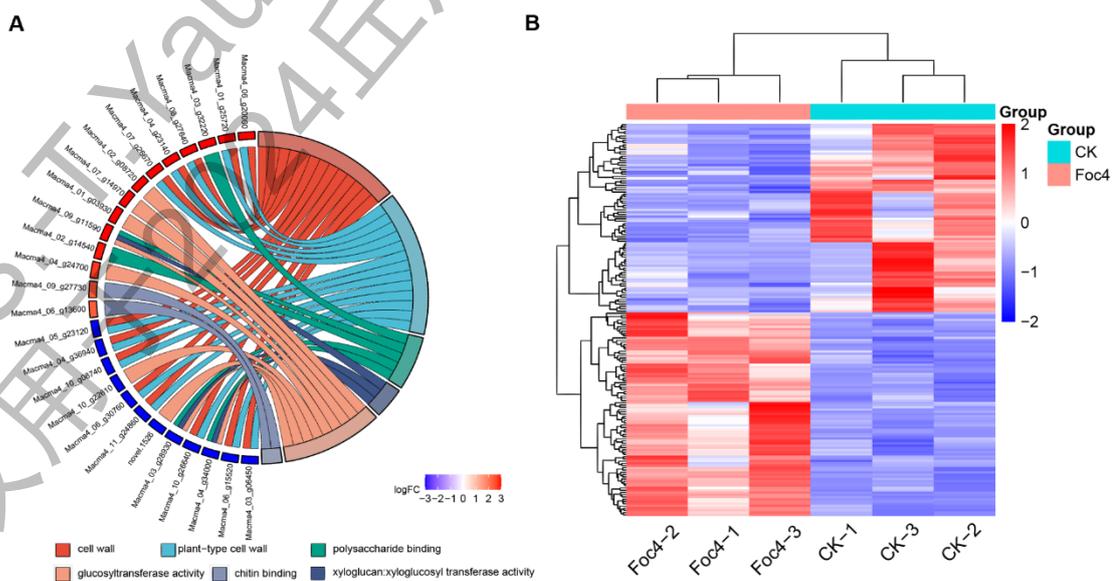


图7. 种子伯克霍尔德菌(*Burkholderia seminalis*)菌株256接种引起Foc4感染的香蕉(*Musa spp. AAA*)差异表达基因的富集通路。A. 256+Foc4组与Foc4组相比的DEG富集的KEGG通路的富集气泡图, B. 256+Foc4组与Foc4组相比的DEG富集的GO通路的富集圈图及相关GO通路的描述。Foc4: 香蕉枯萎病菌4号生理小种; DEG: 差异表达基因; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; GO: Gene Ontology。

3.3.4 菌株 256 通过调控细胞壁相关的生物学过程防控枯萎病

Foc4 组与 CK 组相比的 DEG 在 GO 显著富集的细胞组成和分子功能中有 6 种 GO 和细胞壁相关（图 8A, B），提示细胞壁异常可能是 *Foc4* 引发香蕉枯萎病的机制之一。进一步分析 256+*Foc4* 组与 *Foc4* 组的 DEG 在 GO 富集的生物学过程，发现有 13 个与细胞壁形成和维持相关：葡萄糖二糖代谢过程，角质素生物合成过程，寡糖代谢过程，葡萄糖氨基糖醛代谢过程，葡萄糖二糖分解代谢过程，葡萄糖二糖生物合成过程，葡萄糖氨基糖醛生物合成过程，UDP-葡萄糖醛酸生物合成过程，UDP-葡萄糖醛酸代谢过程，寡糖分解代谢过程，寡糖生物合成过程，壳聚糖代谢过程，壳聚糖分解代谢过程（图 8C, D）。细胞壁是植物细胞外部的结构，由多种生物聚合物组成，包括多糖类物质和蛋白质。以上这些过程涉及到细胞壁组分的合成和降解，对细胞壁的形成和维持起着重要作用，菌株 256 可能通过影响这些过程调控细胞壁的结构和功能，从而对 *Foc4* 引发的香蕉枯萎病起到拮抗作用。



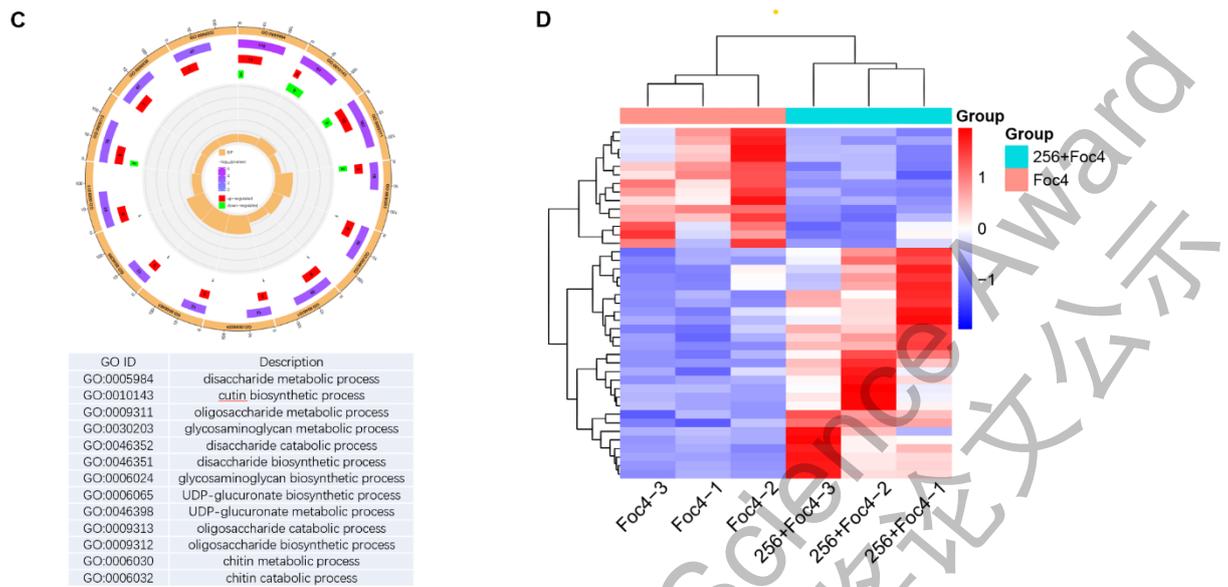


图8. 种子伯克霍尔德菌(*Burkholderia seminalis*)菌株256接种引起*Foc4*感染的香蕉(*Musa* spp. AAA)差异表达基因的富集通路中与细胞壁形成和维持相关的通路。A-B. *Foc4*组和CK组相比DEG富集的与细胞壁相关的GO通路弦图(A)及这些DEG聚类热图(B), C-D. 256+*Foc4*组与*Foc4*组相比DEG富集的与细胞壁相关的GO通路的富集圈图(C)及相关DEG的聚类热图(D)。CK:对照; *Foc4*: 香蕉枯萎病病菌4号生理小种; DEG: 差异表达基因; GO: Gene Ontology。

3.4 免疫荧光实验揭示菌株 256 通过调控细胞壁果胶含量防控枯萎病

为了验证基于转录组学分析的猜想，我运用免疫荧光技术检测不同组别叶片石蜡切片中细胞壁重要组成果胶的含量。CCRC-M38抗体通过结合到完全去酯化的同半乳糖醛酸基元，识别植物细胞壁中去甲酯化的同源半乳糖醛酸 (Homogalacturonan, HG)。HG 是含量最丰富的果胶多糖，它不仅是细胞壁的关键结构组分，同时，不同程度的甲酯化修饰赋予了 HG 结构的多变性，使其在细胞壁组装和重塑过程中与其他细胞壁多糖动态结合，作为信号分子监测细胞壁完整性，能够被细胞膜上特异的受体识别，启动胞内的信号转导¹²。

CCRC-M38 抗体荧光染色显示每个组别香蕉叶片的不同细胞类型，包括表皮细胞，保卫细胞，叶肉细胞，维管束鞘细胞，木质部

和韧皮部细胞的细胞壁均有去甲酯化 HG 的分布，但 *Foc4* 组叶片的细胞壁的免疫荧光信号强度显著低于其它 3 组，其中 256+*Foc4* 组的荧光强度最高，以三颗星的显著程度高于 *Foc4* 组（图 9，图 10）。这个结果表明 *Foc4* 导致患有枯萎病的香蕉植株细胞壁的去甲酯化 HG 含量降低，而菌株 256 能够在 *Foc4* 感染的菌株中上调细胞壁去甲酯化 HG 含量，可能在其拮抗 *Foc4* 引发的香蕉枯萎病中起到重要作用。

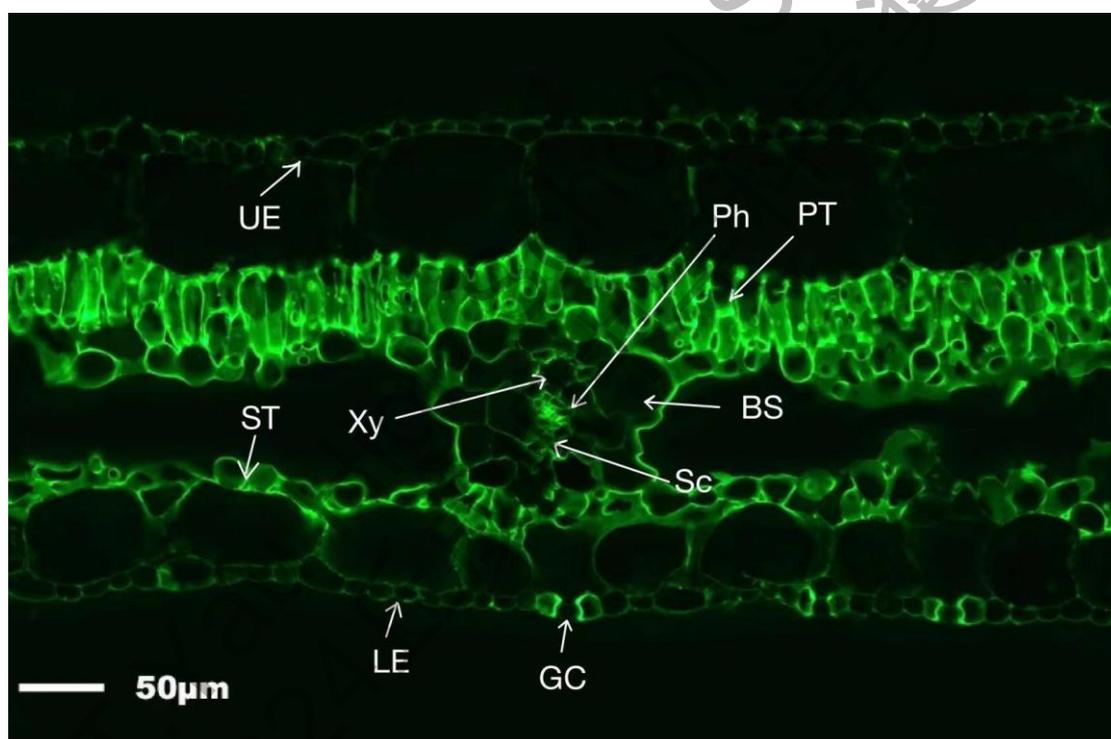


图9.香蕉(*Musa* spp. AAA)叶片侧脉横截面的免疫荧光照片(CCRC-M38抗体)。UE: Upper Epidermis, 上表皮; PT: Palisade Tissue, 栅栏叶肉组织; BS: Bundle sheath, 维管束鞘; Xy: Xylem, 木质部; Ph: phloem, 韧皮部; ST: Spongy Tissue, 海绵叶肉组织; GC: Guard Cells, 保卫细胞; LE: Lower Epidermis, 下表皮。标尺表示50 μm。

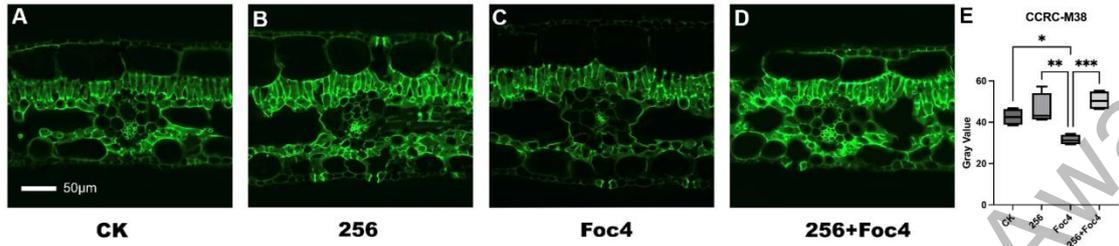


图 10. 种子伯克霍尔德菌 (*Burkholderia seminalis*) 菌株 256 接种导致 *Foc4* 感染的香蕉 (*Musa* spp. AAA) 能够维持去甲酯化同源半乳糖醛酸含量。A. CK 组, B. 256 组, C. *Foc4* 组, D. 256+*Foc4* 组植株叶片 CCRC-M38 抗体的免疫荧光染色图片和荧光强度的定量化统计 (E)。CK:对照; *Foc4*: 香蕉枯萎病病菌 4 号生理小种。标尺表示 50 μm 。

4. 讨论

香蕉不仅是全球最受欢迎的水果之一，也是世界第四大粮食作物，对许多热带和亚热带国家的粮食安全至关重要。然而，香蕉枯萎病对全球香蕉产业造成了严重威胁。科学家们已确认某些微生物对香蕉枯萎病具有拮抗作用，但这些微生物的拮抗机制尚未完全阐明。本研究利用从茂名地区‘广粉1号’（‘不死蕉’）中分离鉴定的种子伯克霍尔德菌菌株256，开展了针对病原菌*Foc4*引起的香蕉枯萎病的拮抗实验，确定了菌株256对枯萎病的防控效果为56.4%。进一步应用转录组学技术分析了菌株256和*Foc4*对香蕉苗的作用机制，以及菌株256对*Foc4*的拮抗机制，发现细胞壁形成与维持相关的通路可能是菌株256拮抗*Foc4*的机制之一。免疫荧光实验展示*Foc4*导致细胞壁重要成分去甲酯化HG含量下降，而菌株256能够恢复去甲酯化HG的含量。这提示菌株256可能通过改善细胞壁的结构支撑或信号传导来防治枯萎病。与以往研究局限于研究生防菌直接抑制*Foc*存活机制不同，本研究首次从生防菌对香蕉代谢通路的影响角度出发探索种子伯克霍尔德菌菌株256防控香蕉枯萎病的机制，为进一步研究生防菌抗枯萎病机制提供了重要线索和新的方向。

细胞壁是植物细胞的骨架，由多种不同成分组成，包括纤维素、半纤维素、果胶等多糖类物质和蛋白质。细胞壁不仅对细胞提供结构支持、屏障保护、水分调节等作用，还能够对发育和环境信号做出复杂的动态调整，甚至释放一些信号分子，在植物细胞的生长、分化和免疫反应等关键过程中扮演重要的角色^{12,13}。

在本研究中, *Foc4* 组的植株叶片相较于对照组的 DEG 富集在细胞壁、多糖结合、木聚糖: 木聚糖基转移酶活性、葡萄糖基转移酶活性及壳聚糖结合等与细胞壁相关的细胞组成和分子功能通路上。说明 *Foc4* 的侵袭导致了细胞壁的结构变化, 免疫荧光实验也证实 *Foc4* 的侵袭导致去甲酯化 HG 含量降低。去甲酯化 HG 含量降低可能导致细胞壁整体结构的改变, 影响细胞的形态和稳定性, 进而导致细胞壁的保护性能下降, 使细胞更容易受到外界环境的伤害和病原体的侵袭; 可能影响细胞间信号传递的有效性, 进而影响细胞的生长、发育和响应能力¹²。*Foc4* 的侵袭导致去甲酯化 HG 含量降低的机制之一可能来自于光合作用的缺陷。*Foc4* 由根部感染香蕉, 向上扩散到达香蕉假茎的维管束组织, 大量繁殖, 堵塞管道组织, 使得养分和水都不能很好地运输, 光合作用无法正常进行。转录组学也发现 *Foc4* 组与对照组的 DEG 显著富集在包括光合作用的 GO 通路上。光合作用生成的葡萄糖和其他有机物是植物合成多种生物大分子的基础, 当然也包括去甲酯化 HG 的前体物质。调节 HG 去甲酯化程度的甲酯酶与果胶甲酯酶抑制子的合成与作用也需要光合作用提供能量, 而果胶甲酯化也会影响光合作用促植物生长的作用¹⁴。所以在枯萎病发病过程中, 光合作用缺陷和 HG 去甲酯调节障碍可能彼此影响, 共同参与了香蕉植株的发病。

在 256+*Foc4* 组与 *Foc4* 组的植株叶片 DEG 显著富集的 GO 中包含 13 个与细胞壁形成和维持相关的生物学过程。免疫荧光实验也证实菌株 256 能够恢复叶片细胞壁去甲酯化 HG 含量。恢复细胞壁结构

可能提高细胞壁的保护性能，也会恢复细胞间通讯，有利于植物细胞之间的信号传递和协调；还有助于恢复细胞壁的正常功能，包括水分调节、营养储存等，从而促进植物整体生长和发育¹²。

菌株 256 提高 *Foc4* 感染的香蕉植株细胞壁去甲酯化 HG 含量的上游调控机制还不清楚。256+*Foc4* 组与 *Foc4* 组相比 DEG 在 KEGG 中最显著富集的通路有托烷、哌啶、吡啶生物碱的生物合成，MAPK 信号通路，植物-病原体相互作用等信号转导途径（图 7A），这些信号转导途径涉及到植物对内外部环境刺激的响应和调节，帮助植物适应环境变化和抵御外界压力和病原体侵袭^{15,16}。在 GO 中显著富集的生物学过程更是多达 147 条，最显著的有细胞对缺氧的响应、细胞对氧气水平下降的响应、细胞对氧气水平的响应、类黄酮生物合成过程及乙烯激活的信号通路等（图 7B）。在 GO 中显著富集的分子功能包括甘油-3-磷酸 2-O-酰基转移酶活性、alpha 淀粉酶活性、硝酸盐跨膜转运蛋白活性等，都和植物的代谢调节相关。这提示菌株 256 对枯萎病的防控是多方面、全方位的，很可能通过调控香蕉植株信号转导通路，进而调节代谢，导致香蕉植株对缺氧的响应、细胞壁结构成分等发生变化，从而增强其抵御 *Foc4* 的能力。

本研究明确了在广东省茂名地区‘不死蕉’根际土壤中分离的种子伯克霍尔德菌菌株 256 对 *Foc4* 导致的枯萎病具有 56.4% 的防控效果。首次应用香蕉转录组学技术对伯克霍尔德菌如何改善香蕉植株的生物学过程和通路进行初步探讨，为伯克霍尔德菌的生防机制

提供了新的信息，为未来应用生物学实验揭示更具体的内在机制提供了线索。

2024 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2024丘成桐中学科学奖论文公示

5. 参考文献:

1. 香蕉枯萎病的发生及防控研究现状. 华南农业大学学报 **40**(5): 128–136 (2019)。
2. Li, C., Yang, J., Li, W., Sun, J. & Peng, M. Direct Root Penetration and Rhizome Vascular Colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the Key Steps in the Successful Infection of Brazil Cavendish. *Plant Dis.* **101**, 2073–2078 (2017).
3. Khan, N. *et al.* Antifungal Activity of Bacillus Species Against Fusarium and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Front. Microbiol.* **9**, 2363 (2018).
4. Cao, M. *et al.* Antifungal Mechanism of Metabolites from Newly Isolated Streptomyces sp. Y1-14 against Banana Fusarium Wilt Disease Using Metabolomics. *J. Fungi* **8**, 1291 (2022).
5. Wang, X. *et al.* Antifungal effects and biocontrol potential of lipopeptide-producing Streptomyces against banana Fusarium wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Front. Microbiol.* **14**, 1177393 (2023).
6. Xie, J. *et al.* Pseudomonas aeruginosa Strain 91: A Multifaceted Biocontrol Agent against Banana Fusarium Wilt. *J. Fungi* **9**, 1047 (2023).
7. Wang, B. *et al.* Inducing banana Fusarium wilt disease suppression through soil microbiome reshaping by pineapple–banana rotation combined with biofertilizer application. *Soil* **8**, 17–29 (2022).
8. Yang, J. *et al.* Suppression of Banana Fusarium Wilt Disease with Soil Microbial Mechanisms via Pineapple Rotation and Residue Amendment. *Agronomy* **13**, 377 (2023).
9. Pan, M. J., Rademan, S., Kunert, K. & Hastings, J. W. Ultrastructural Studies on the Colonization of Banana Tissue and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4 by the Endophytic Bacterium *Burkholderia cepacia*. *J. Phytopathol.* **145**, 479–486 (1997).
10. Ho, Y.-N. *et al.* In planta biocontrol of soilborne Fusarium wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant Soil* **387**, 295–306 (2015).
11. Xu, Z. *et al.* Isolation of Burkholderia sp. HQB-1, A Promising Biocontrol Bacteria to Protect Banana Against Fusarium Wilt Through Phenazine-1-Carboxylic Acid Secretion. *Front. Microbiol.* **11**, 605152 (2020).
12. Du, J., Anderson, C. T. & Xiao, C. Dynamics of pectic homogalacturonan in cellular morphogenesis and adhesion, wall integrity sensing and plant development. *Nat. Plants* **8**, 332–340 (2022).
13. Shin, Y., Chane, A., Jung, M. & Lee, Y. Recent Advances in Understanding the Roles of Pectin as an Active Participant in Plant Signaling Networks. *Plants Basel Switz.* **10**, 1712 (2021).
14. Weraduwage, S. M. *et al.* Pectin Methylesterification Impacts the Relationship Between Photosynthesis and Plant Growth in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **171**(2), 833–848 (2016).
15. Meng, X. & Zhang, S. MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annu. Rev. Phytopathol.* **51**, 245–266 (2013).

16. Zaynab, M. *et al.* Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microb. Pathog.* **124**, 198–202 (2018).

2024 S.-T. Yau High School Science Award
仅用于2024丘成桐中学科学奖论文公示

6. 致谢

这篇论文缘起一个小吃货对一个曾经风靡全球、如今却已灭绝的香蕉品种‘大米歇尔’的追忆。从小爱吃香蕉布丁，喝香蕉饮料的我，一度奇怪这些添加了香蕉香精的美味，为啥和超市里的香蕉味道不太一样，香味却更浓郁。一路寻找美味香蕉，从德国找回北京，从北京来到广州，直到和爸爸二十年前的师姐、华南农业大学香蕉病虫害防控专家徐春香老师相见，我才从她那里第一次听到香蕉枯萎病——惊心动魄的香蕉大瘟疫。原来香蕉香精里承载的才是人类忘却的曾经的‘大米歇尔’香蕉的风味记忆。在那场香蕉瘟疫中脱颖而出的，对枯萎病致病真菌 *Foc1* 有抵抗作用的香蕉品种‘卡文迪许’，如今面临着进化更强的 *Foc4* 却无抵抗之力，随时可能重蹈‘大米歇尔’覆灭的旧辙。作为我国香蕉第一种植大省的广东，加强香蕉病害防控对于香蕉产业稳定高质量发展意义重大，对于广东省“十四五”高质量推进乡村振兴具有重要的现实意义。就是在这样的背景和机缘巧合下，我开始了研究“香蕉生物群落之战”的课题。

我衷心感谢华南农业大学徐春香教授无偿给予我科研平台的使用、课题指导和论文写作指导。感谢广东华南师范大学附属中学的桂鹏老师对我选题的指导、思路的启发和论文写作的指导。感谢华南农业大学谢玲老师对我石蜡切片和免疫荧光技术的指导。感谢华南农业大学徐春香教授团队的师兄师姐们对我实验技术的指导，并在我不在的时候帮我照料香蕉苗。感谢武汉迈维代谢生物科技股份

有限公司提供的转录组测序服务和初步分析。感谢微生信网站提供了在线生物信息学分析、可视化云平台，让我学会做出酷炫的生信绘图。感谢我的父母一直以来对我好奇心的呵护，对我生物学研究兴趣的支持，对我自由探索的鼓励。感谢丘成桐中学科学奖赛事组委会和各位评审老师给予我这个学习和交流的机会。

谨以此篇致敬为我国华南地区粮食及经济作物病害防治工作做出重要贡献的、也是徐春香老师和我父亲共同的导师——范怀忠先生。

——费璠

参赛选手简介：

费璠，女，2006年10月出生于中国北京，先后入读德国德累斯顿国际学校，北京大学附属小学，华南师范大学附属小学，广东华南师范大学附属中学。从小热爱大自然、运动和生物科学。曾获得第39届广东省青少年科技创新大赛银奖、中宣教育科技创新奖；澳大利亚生物奥林匹克竞赛（ASOB）一等奖，英国生物奥林匹克竞赛（UKBC）铜奖，美国生物奥林匹克竞赛中国赛区（USABO）银奖，2024年全国中学生生物学联赛广东省三等奖。

辅导教师简介：

徐春香，女，植物病理学专业博士，教授，果树专业博士生导师，曾担任广东省香蕉菠萝产业技术体系香蕉病虫害防控岗位专家。

2001年博士毕业后分配至华南农业大学园艺学院热带亚热带果树研

究室工作。研究工作主要有：（1）长期从事香蕉种质资源的利用与创新工作，在国内率先成功建立香蕉胚性细胞悬浮系（ECS），建立了以之为试材的遗传转化、辐射诱变及化学诱变育种技术体系；获得农业部香蕉新品种权 1 个；参与审定、鉴定香蕉新品种各 1 个；（2）香蕉枯萎病诱导抗性剂的筛选及抗性机理研究；（3）采用免疫标记、蛋白质组学、分子生物学等手段开展香蕉体细胞胚胎发育、香蕉抗枯萎病、抗冷机理等相关理论研究。先后主持和参加国家自然科学基金、广东省自然科学基金、广东省农业科技攻关等各级项目 20 多项，发表相关研究论文 50 多篇，参编教材 3 部。

桂鹏，华南师范大学附属中学数学高级教师，数学奥林匹克一级教练员。他在学校负责拔尖创新人才的培养工作，有丰富的学科竞赛和科技创新指导经验，多次指导学生在丘成桐科学奖全球总决赛和全国青少年科技创新大赛和大学生创新创业大赛萌芽赛道中取得佳绩。