

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.02.005

李艳, 耿冰倩, 陈灿, 等. 壳寡糖抑制十字花科黑腐病菌的活性分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(2): 51-61.

# 壳寡糖抑制十字花科黑腐病菌的活性分析

李艳<sup>1</sup>, 耿冰倩<sup>1</sup>, 陈灿<sup>2</sup>, 秦浩栋<sup>1</sup>,  
任雪松<sup>1</sup>, 宋洪元<sup>1</sup>, 廖雄<sup>1</sup>

1. 西南大学 园艺园林学院/重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715;

2. 西南大学 智慧农业学院, 重庆 400715

**摘要:** 野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)是引发十字花科黑腐病的病原菌。壳寡糖(Chito-Oligosaccharide, COS)已被证实具有广谱抑菌活性,但其对 *Xcc* 的抑菌作用尚未明确。通过一系列体外平板试验系统分析了 COS 对 *Xcc* 的抑制作用,并初步评估了 COS 对甘蓝和萝卜黑腐病的防治效果。结果表明:低浓度 COS(0.06 mg/mL)即可显著抑制 *Xcc* 生长,当浓度提升至 0.5 mg/mL 时表现出完全抑菌效果(抑菌率 100%);COS 能有效抑制 *Xcc* 胞外酶活性、胞外多糖合成和运动性;qRT-PCR 分析表明, COS 显著抑制多个效应蛋白基因(*XopD*, *XopP*, *XopK* 等)的表达;此外,外源施加 COS 能显著减轻白萝卜黑腐病发病程度,而在甘蓝上防治效果不显著。本研究明确了 COS 对 *Xcc* 的抑制作用,为开发基于 COS 的绿色生物农药防治十字花科黑腐病提供了一定的理论支撑。

**关键词:** 壳寡糖;黑腐病;野油菜黄单胞菌;抑菌作用;

致病因子

中图分类号: S435.654

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2026)02-0051-11

## Analysis of the Antibacterial Activity of Chitosan Oligosaccharide against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*

LI Yan<sup>1</sup>, GENG Bingqian<sup>1</sup>, CHEN Can<sup>2</sup>, QIN Haodong<sup>1</sup>,  
REN Xuesong<sup>1</sup>, SONG Hongyuan<sup>1</sup>, LIAO Xiong<sup>1</sup>

1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Chongqing Key Laboratory of Olericulture, Chongqing 400715, China;

2. College of Smart Agriculture, Southwest University, Chongqing 400715, China

收稿日期: 2025-07-15

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(32302555);重庆市技术创新与应用发展重大专项(CSTB2023TIAD-KPX0025)。

作者简介: 李艳, 硕士研究生, 主要从事蔬菜种质资源与遗传育种研究。

通信作者: 廖雄, 副教授。

**Abstract:** *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) is the pathogen that causes black rot in the cruciferous family. Chitosan oligosaccharide (COS) has been shown to have broad-spectrum antibacterial activity, but its antibacterial effect on *Xcc* remains unclear. In this study, a series of in vitro plate test subsystems were used to analyze the inhibitory effect of COS on *Xcc*, and the control effect of COS on black rot in cabbage and radish was preliminarily evaluated. The results showed that the growth of *Xcc* could be significantly inhibited by low concentration of COS (0.06 mg/mL), and the complete antibacterial effect was shown when the concentration was increased to 0.5 mg/mL (inhibition rate was 100%). COS can effectively inhibit extracellular enzyme activity, extracellular polysaccharide synthesis and motility; The qRT-PCR analysis showed that COS significantly inhibited the expression of multiple effector protein genes (*XopD*, *XopP*, *XopK*, etc.). In addition, exogenous application of COS could significantly reduce the severity of black rot in white radish, but the control effect on cabbage was not significant. This study clarified the inhibitory effect of COS on *Xcc*, and provided theoretical support for the development of COS-based green biopesticides for the control of cruciferous black rot.

**Key words:** chitosan oligosaccharide; black rot; *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*; antibacterial mechanism; virulence factors

十字花科黑腐病是由野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Xcc*)引起的一种系统性维管束病害,其典型症状为叶片萎蔫、维管束组织褐变坏死,进而在叶中脉上产生“V”形黄色病斑,严重影响甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)、花椰菜(*B. oleracea* var. *botrytis*)和西兰花(*B. oleracea* var. *italica*)等具有重要经济价值的蔬菜作物的产量和品质<sup>[1-2]</sup>。目前在农业生产中,主要依赖含铜杀菌剂(如波尔多液)和抗生素类药剂(如链霉素)进行黑腐病的化学防控<sup>[3]</sup>。然而,长期使用这些化学药剂不仅会导致 *Xcc* 菌株产生显著的抗药性,而且会引发化学残留、土壤污染与食品安全等问题。因此,开发环境友好的新型生物抑菌剂成为十字花科黑腐病防治的重要研究方向之一。

*Xcc* 是一种典型的革兰氏阴性需氧杆菌,其菌体形态学特征表现为两端钝圆、中间隆起的杆状结构(1.2~3.5  $\mu\text{m}$ ),表面平滑且呈现淡黄色。该菌株具有单极性鞭毛,无芽孢形成能力,可单生或链生,生长最适温度为 25~30  $^{\circ}\text{C}$ ,适宜 pH 值范围为 6.1~6.8<sup>[4]</sup>。*Xcc* 的致病机制涉及胞外多糖(EPS)、胞外酶、生物膜、运动性、III 型分泌系统(Type III secretion system, T3SS)等多种毒力因子的协调作用<sup>[5]</sup>。例如,*Xcc* 会通过分泌多种胞外酶,来降解植物细胞壁的果胶层,促进病原菌在宿主组织中的感染。研究显示,*Xcc* 胞外酶活性与病害严重度呈显著正相关,表明了其在致病过程中的重要性<sup>[6]</sup>。EPS 在 *Xcc* 的生物膜形成和环境抗性中发挥关键作用,EPS 产量降低,致病力显著减弱,进一步证实了其在 *Xcc* 致病性中的核心地位<sup>[7]</sup>。T3SS 是 *Xcc* 侵染植物的另一个重要机制,其效应蛋白基因如 *XopAY* 和 *XopL* 通过抑制植物的模式触发免疫(Pattern-Triggered Immunity, PTI)反应,促进病原菌的侵染,揭示了 T3SS 效应蛋白在调控植物免疫中的复杂机制<sup>[8]</sup>。

Chito-Oligosaccharide(COS)是壳聚糖降解产生的低聚物(聚合度 2-20),具有水溶性高、生物相容性好、广谱抑菌等特点<sup>[9]</sup>。研究表明,COS 主要通过 3 种途径抑制植物病原菌:首先,其分子表面携带的正电荷分子与细菌细胞膜中带负电的磷脂结合,破坏膜结构导致  $\text{K}^+$  和三磷酸腺苷(ATP)等关键物质的外流;其次,COS 通过抑制病原菌呼吸链酶的活性,干扰电子传递过程,降低能量代谢效率,削弱微生物的生理功能;此外,COS 还能作为植物免疫诱导剂,促进植物体内防御相关蛋白的合成,从而系统性提升植

物对病原体的免疫响应。这 3 个层面的协同作用共同构成了 COS 的广谱抗菌特性<sup>[10-12]</sup>。基于 *Xcc* 的毒力因子和 COS 的作用机制, 壳寡糖作为一种天然抑菌剂, 可能通过同时靶向多个致病因子发挥协同抑菌作用。研究表明, COS 可通过外源处理减弱烟草的 TMV 病毒的增殖, 从而促进抗病<sup>[13]</sup>; COS 可能干扰 EPS 的生物合成, 破坏生物膜的形成, 还可能通过调控 T3SS 效应蛋白的表达或功能, 抑制 *Xcc* 对植物免疫反应的干扰, 但 COS 对 *Xcc* 的抑菌作用并不清楚。

本研究聚焦 COS 对 *Xcc* 的体外抑菌作用分析, 明确了 COS 对 *Xcc* 的生长及其多个毒力因子(运动性、胞外酶活性及 EPS 合成)及效应蛋白基因表达的抑制作用。同时, 在甘蓝和萝卜等十字花科植物中比较分析 COS 对黑腐病的防治效果, 研究结果将丰富 COS 的抗菌谱, 为进一步阐明 COS 的抑菌机制和开发新型高效黑腐病抑菌剂提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌株来源

试验菌株: 野油菜黄单胞菌野油菜致病变种 *Xcc8004*, 由海南大学陶均教授课题组馈赠。

#### 1.1.2 菌株培养

取 10  $\mu\text{L}$  菌液接种到 5~10 mL 的 NYG 液体培养基(蛋白胨 5.0 g/L, 酵母提取物 3.0 g/L, 甘油 20 mL/L)中, 置于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、200 rpm 培养 36 h。

#### 1.1.3 植物材料

供试植物: 萝卜(*Raphanus sativus* L.)、甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata* Linnaeus), 均栽培于西南大学园艺园林学院歇马基地。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 最小抑菌浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)和最低杀菌质量浓度(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)的测定

接种 *Xcc* 于 NYG 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$  震荡培养至  $\text{OD}_{600}=0.4$ , 取 10  $\mu\text{L}$  菌液接种至新鲜的 NYG 液体培养基中, 加入不同质量浓度的 COS 溶液, 对照组加入等体积无菌水, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  避光震荡培养 36 h, 测定各处理组菌液  $\text{OD}_{600}$  值, 每组包含 3 个独立制备的菌液样本及 3 次同批次平行测定。

#### 1.2.2 *Xcc* 致病因子检测

将 *Xcc* 菌株在 NYG 培养基中培养(28  $^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm)培养 36 h, 用 NYG 培养基把菌液的浓度调为  $\text{OD}_{600}=0.4$ , 作为接种液, 在接种液中分别加入 COS 溶液使其终浓度为 0.3 mg/mL 和 0.4 mg/mL, 对照组加入等体积无菌水, 继续培养 2 h, 检测方法参考邢芸等的研究<sup>[14]</sup>进行, 每组设置 3 次技术重复。

1) EPS 合成检测: 取 2  $\mu\text{L}$  上述不同处理的菌液点种于含 0.5% 琼脂的 NYG 胞外多糖检测平板中心, 静置 10 min 使菌液吸附, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h, 分析比较菌落形态及直径变化。

2) 胞外蛋白酶活性检测: 取 2  $\mu\text{L}$  上述不同处理的菌液点种于含 1% 脱脂奶粉的 NYG 胞外蛋白酶检测平板中心, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 2 d, 分析菌落周围透明圈直径变化。

3) 胞外淀粉酶活性检测: 取 2  $\mu\text{L}$  上述不同处理的菌液点在含有 0.1% 可溶性淀粉的 NYG 胞外淀粉酶检测平板中心, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 48 h, 用 1:100 的  $\text{I}_2/\text{KI}$ (0.08 mol/L  $\text{I}_2$ , 3.2 mol/L KI)溶液染色 15 min, 用清水将染色液洗净后观察, 分析菌落周围透明圈直径变化。

4) 胞外纤维素酶活性检测: 取 2  $\mu\text{L}$  上述不同处理的菌液点在含有 0.5% (W/V) 的羧甲基纤维素

(CMC)的 NYG 胞外纤维素酶检测平板中心, 28 °C 培养 24 h, 在平板上加入约 20 mL 0.1% 的刚果红 (Congo Red) 染色 30 min, 水洗两次, 再用 20 mL 1 M 的 NaCl 脱色两次后观察, 分析菌落周围透明圈直径变化。

5) 运动性检测: 取 2  $\mu$ L 上述不同处理的菌液点种于含 0.5% 琼脂的 NYG 游动性检测平板和含有 2% 葡萄糖的 NYG 涌动性检测平板中心, 于 28 °C 培养 48 h 后观察试验结果。

### 1.2.3 实时荧光定量 qRT-PCR

取不同处理后的菌液, 按照细菌总 RNA 提取试剂盒说明书 (Servicebio, 武汉) 提取 RNA, 反转录为 cDNA, 具体操作参照反转录预混型试剂盒说明书 (Accurate Biology, 长沙)。以 *Xcc thyA* 为内参基因<sup>[15]</sup>, 设计特异引物 (表 1)。按照 SYBR Green I (江苏百时美生物科技有限公司, 连云港) 说明书进行 qRT-PCR 反应。每个样品含 3 个生物学重复。利用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算基因表达水平。

表 1 *Xcc8004* 内参基因及效应蛋白引物序列

引物名称	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
<i>thyA</i>	CTGCCATAGCCTGTTCCA	CATCGCCCAGTGTGTGTA
<i>XopD</i>	TTCACCTTGCCGACTCGC	CAGGAACACGATAGGTGGGA
<i>XopL</i>	AAGCGGCTCAGATGTGGA	TCTCAGAAGCGTCAGTCGC
<i>XopZ</i>	GGCAATAGCGACCTCAACC	GCCAGCTCGTCCTGTGA
<i>XopAC</i>	TGCCAAACTGGGTTGTTG	TTGTCCCGCATCTAAGCA
<i>XopP</i>	TGAGAACTATCCGAATGTGGCT	TAACGCCGTCCATCTGAAAA
<i>XopK</i>	TGGTCAGGCGGCTCAAC	CGGTCAATGTATCGGTATGTTT
<i>XopR</i>	GCGTCCATCTGCACCAT	GCGAGGCAACTCCACAG
<i>XopN</i>	CGGCGAAACGATGAAC	GCCGCATCCACGAAA

### 1.2.4 COS 对萝卜和甘蓝黑腐病的防治试验

COS 对十字花科作物甘蓝和萝卜黑腐病的防治试验参照李峰等的方法<sup>[16]</sup>, 略作修改, 具体如下: 将 *Xcc* 接种于 NYG 液体培养基中, 28 °C 震荡培养至平台期备用。取新鲜白萝卜和甘蓝用自来水清洗干净、晾干后, 用 75% 的酒精消毒; 萝卜切成厚约 5 mm 薄片, 甘蓝叶片用 1.5 cm 的打孔器取样, 置于铺有滤纸的 9 cm 无菌培养皿中 (每皿 10 个甘蓝叶片)。试验设 4 组 (每组 3 个重复): 3 组分别接种 *Xcc* 菌液 (萝卜 100  $\mu$ L/片, 甘蓝 20  $\mu$ L/片), 待菌液稍干后, 处理组分别施加 0 mg/mL、0.3 mg/mL 和 0.4 mg/mL COS 溶液, 对照组不接菌, 施加等量无菌水。28 °C 培养 2~5 d 后观察记录结果。

### 1.2.5 数据处理方法

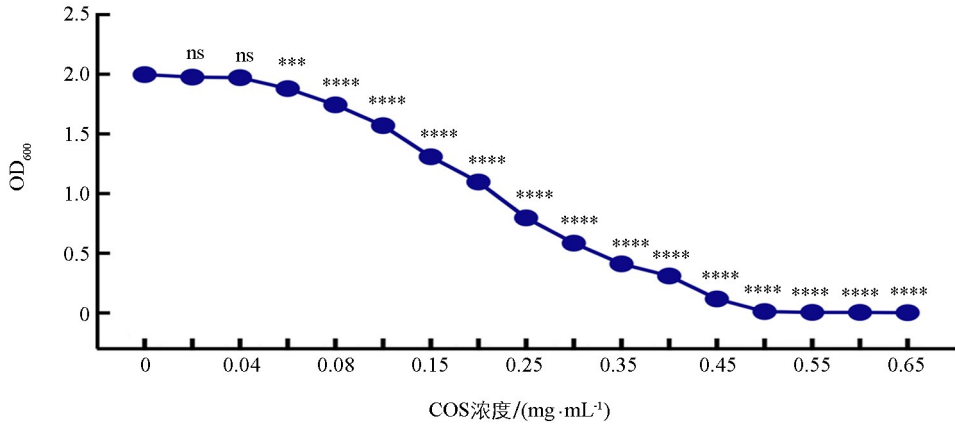
本研究所用的 t-test 和相关性分析均采用 SPSS 26.0 软件进行处理。

## 2 结果与分析

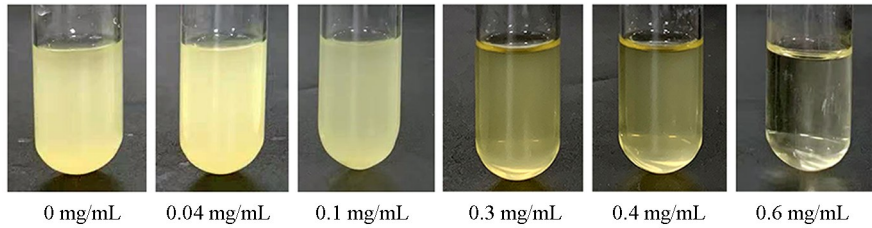
### 2.1 COS 对 *Xcc* 的抑菌活性分析

采用浓度梯度稀释法测定 COS 对 *Xcc* 的最低抑菌质量浓度 (MIC) 和最低杀菌质量浓度 (MBC), 如图 1 所示。在不同浓度的 COS 处理 *Xcc* 菌液 36 h 后, 在 0~0.65 mg/mL 浓度范围内, OD<sub>600</sub> 值随 COS 的浓度升高而显著下降, COS 质量浓度在 0.06 mg/mL 时能够显著抑制 *Xcc* 的生长, 表明 COS 对 *Xcc* 的最低抑菌质量浓度 (MIC) 为 0.06 mg/mL; 当 COS 质量浓度达到 0.5 mg/mL 时, *Xcc* 的活性被完全抑制,

即最低杀菌质量浓度(MBC)为 0.5 mg/mL。本研究选取了 0.3 mg/mL 和 0.4 mg/mL 作为后续试验中 COS 对 *Xcc* 致病因子的试验浓度。



a. 浓度梯度稀释法测定MIC及MBC值



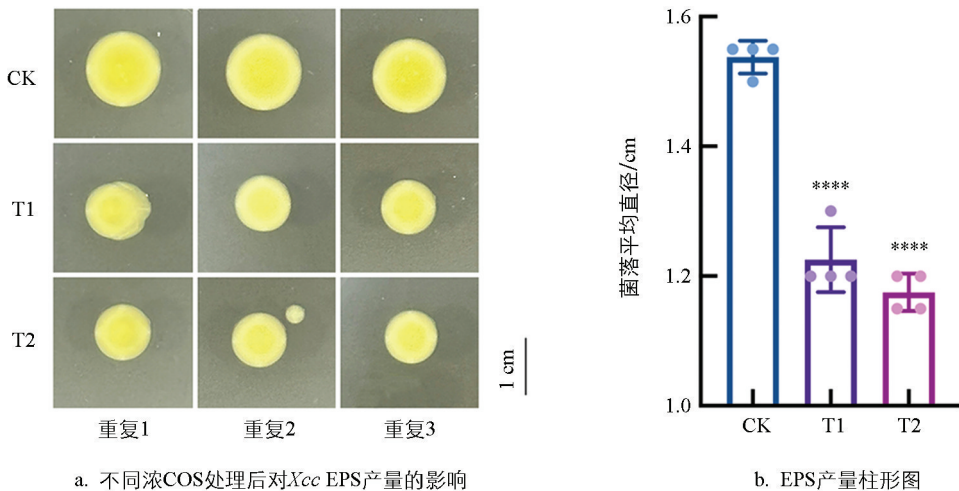
b. 不同浓度COS对*Xcc*菌液生长的影响

\*\*\* 表示  $p < 0.005$ , \*\*\*\* 表示  $p < 0.001$ , ns 表示  $p > 0.05$ 。

图 1 COS 对 *Xcc* 的抑菌活性分析

## 2.2 COS 对 *Xcc* 分泌 EPS 能力的影响

如图 2 所示,随着 COS 浓度的逐步增大,平板中 *Xcc* 菌落的直径呈现出逐渐下降的趋势。在 COS 的浓度为 0.3 mg/mL 时,菌落直径由 1.55 cm 减小至 1.25 cm;在浓度为 0.4 mg/mL 时,菌落直径由 1.55 cm 减小至 0.95 cm,较对照组减小至 61.3%。这表明 COS 对 *Xcc* 的 EPS 合成产生了明显的抑制作用。



a. 不同浓COS处理后对*Xcc* EPS产量的影响

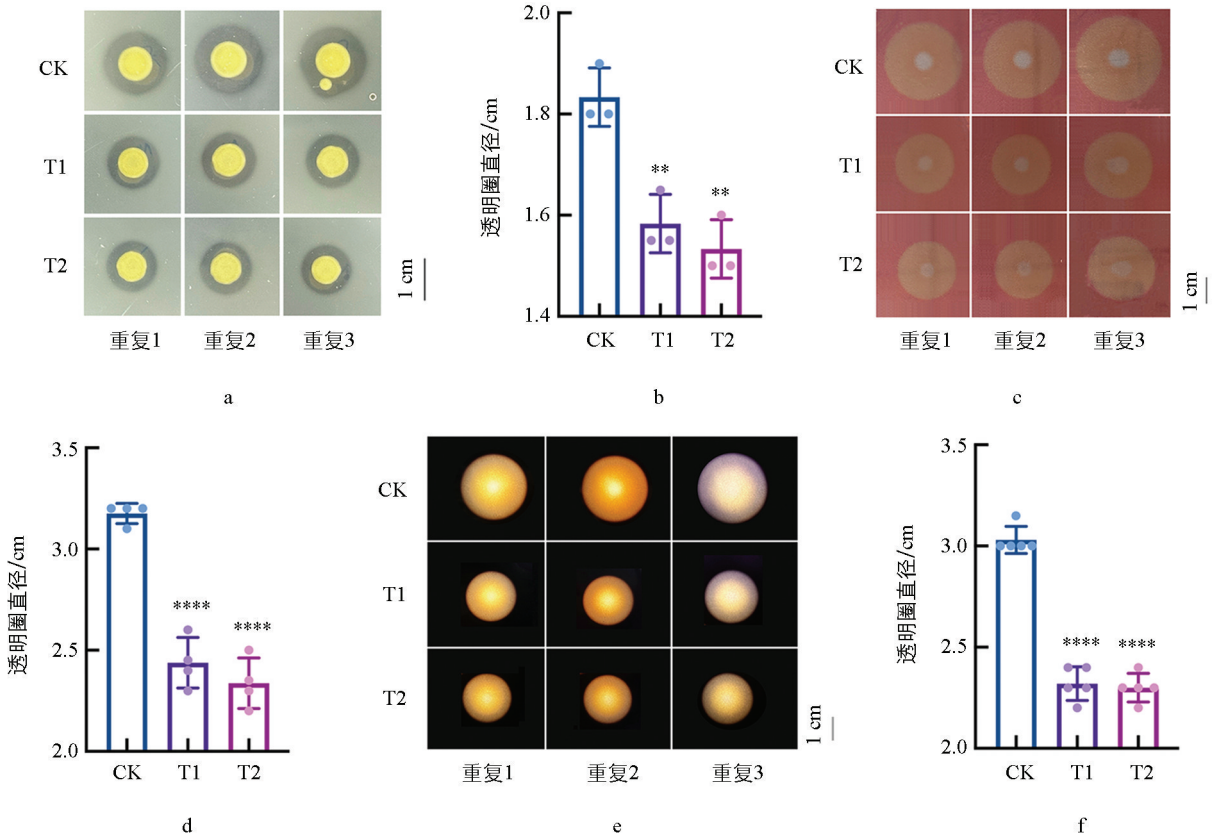
b. EPS产量柱形图

T1、T2 分别表示加入的 COS 浓度为 0.3 mg/mL、0.4 mg/mL; \*\*\*\* 表示  $p < 0.001$ 。

图 2 COS 对 *Xcc* 分泌 EPS 能力的影响

### 2.3 COS 对 *Xcc* 分泌胞外酶的影响

如图 3 所示,在 0.3 mg/mL 和 0.4 mg/mL COS 处理时,能显著抑制 *Xcc* 胞外酶的分泌。在添加 0.3 mg/mL COS 时,胞外蛋白酶菌落直径由 1.85 cm 减小至 1.55 cm,纤维素酶菌落直径由 3.2 cm 减小至 2.4 cm,淀粉酶菌落直径由 3.1 cm 减小至 2.4 cm;而在 COS 浓度为 0.4 mg/mL 时,*Xcc* 的胞外酶的菌落直径分别下降至 78.9%、71.9%、73.3%。研究结果说明 COS 对 *Xcc* 胞外酶的分泌均具有显著抑制效果。



a、b: 不同浓度 COS 对 *Xcc* 胞外蛋白酶的影响; c、d: 不同浓度 COS 对 *Xcc* 胞外纤维素酶的影响; e、f: 不同浓度 COS 对 *Xcc* 胞外淀粉酶的影响。T1、T2 分别表示加入的 COS 浓度为 0.3 mg/mL、0.4 mg/mL; \*\* 表示  $p < 0.01$ , \*\*\*\* 表示  $p < 0.0001$ 。

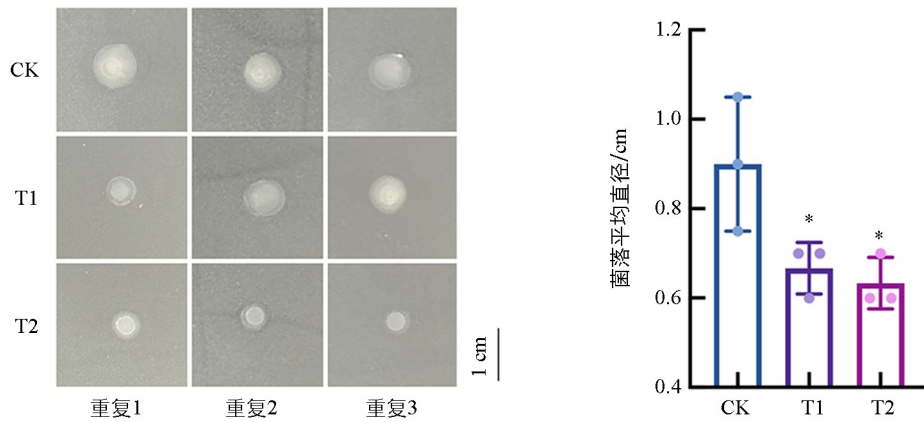
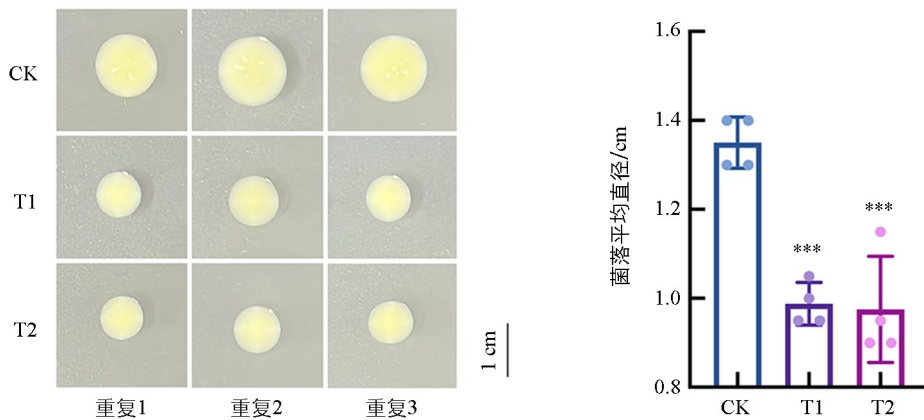
图 3 COS 对 *Xcc* 胞外酶的影响

### 2.4 COS 对 *Xcc* 运动性的影响

*Xcc* 的致病因子还包括其运动性,细菌运动的方式主要是涌动 (Swarming motility)、游动 (Swimming motility) 和颤动 (Twitching motility) 3 种<sup>[17]</sup>,本研究主要聚焦于 COS 对 *Xcc* 涌动性和游动性的抑制作用。如图 4 所示,在 COS 浓度为 0.3 mg/mL 时,与对照组相比,*Xcc* 游动能力和涌动能力均减弱;而在 0.4 mg/mL 的 COS 作用下,*Xcc* 的游动直径由 0.9 cm 降至 0.6 cm,仅为对照组的 66.7%(图 4a、4b),涌动直径由 1.35 cm 降为 0.95 cm,仅为对照组的 70.4%(图 4c、4d)。试验结果表明 COS 对 *Xcc* 的运动性具有显著的抑制作用。

### 2.5 COS 对 *Xcc* 效应蛋白基因表达的影响

效应蛋白也是 *Xcc* 致病性的重要因素之一,本研究检测了 COS 处理后,*Xcc* 关键毒力基因的表达变化。如图 5 所示,在添加 0.3 mg/mL COS 处理时,效应蛋白基因 *XopL*、*XopAC*、*XopK* 和 *XopN* 的相对表达量无明显差异(图 5b、5d、5f、5h),*XopZ*、*XopR* 的相对表达量具有显著差异(图 5c、5g),*XopD*、

a. 不同浓COS处理对*Xcc*游动性的影响b. 不同浓COS处理对*Xcc*涌动性的影响

T1、T2 分别表示加入的 COS 浓度为 0.3 mg/mL、0.4 mg/mL；\* 表示  $p < 0.05$ ，\*\*\* 表示  $p < 0.005$ ，ns 表示  $p > 0.05$ 。

图 4 COS 对 *Xcc* 运动性的影响

*XopP* 的相对表达量具有极显著差异(图 5a、5e)；而在添加 0.4 mg/mL COS 处理时，效应蛋白基因 *XopL*、*XopAC* 和 *XopN* 的相对表达量均显著降低(图 5b、5d、5h)，*XopD*、*XopZ*、*XopP*、*XopR*、*XopK* 的相对表达量具有极显著差异(图 5a、5c、5e、5g)。其中，COS 对 *XopZ* 基因的表达抑制最为显著，其表达量仅为为对照组的 1.78%(图 5c)。

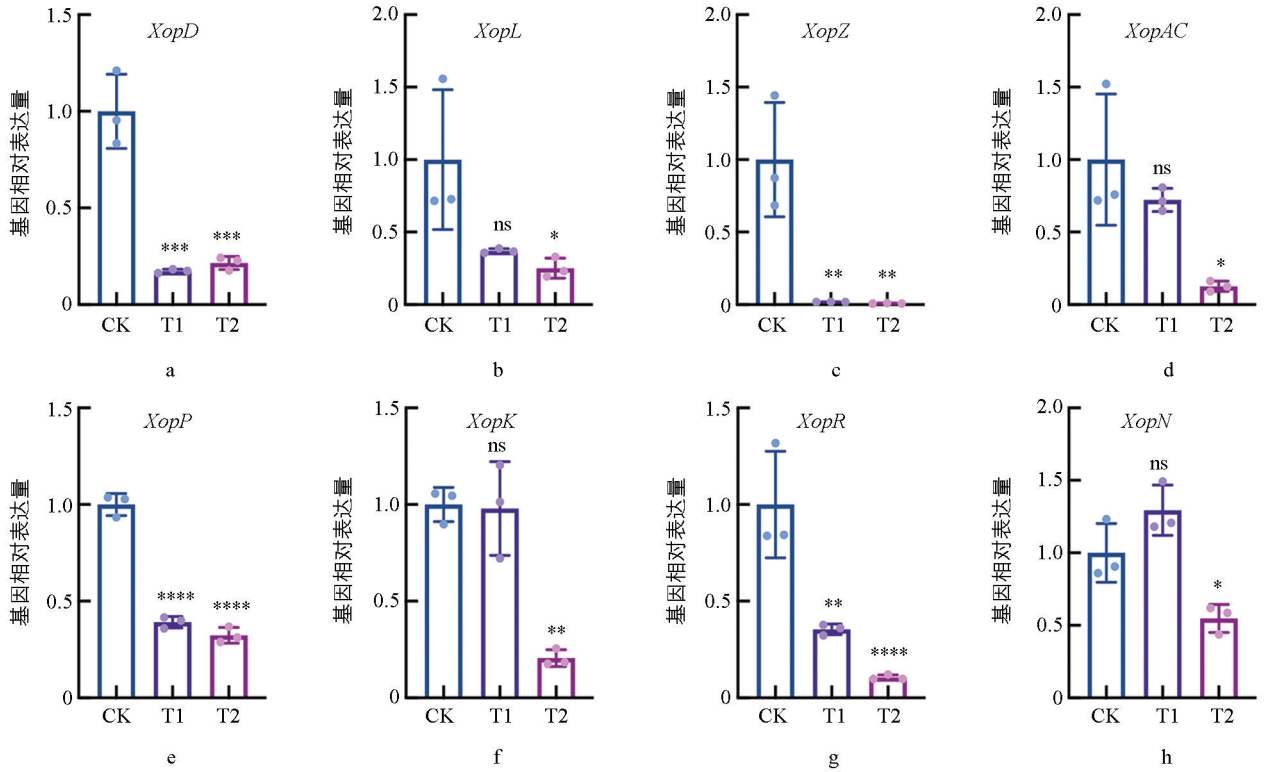
## 2.6 COS 对十字花科作物甘蓝、萝卜黑腐病的离体防治效果

本研究发现 COS 对 *Xcc* 的致病因子有显著抑制效果，接下来探讨了外源 COS 处理对十字花科作物萝卜和甘蓝黑腐病的防治效果。由图 6 所示，在接种黑腐病病菌 *Xcc8004* 后，与对照组仅接菌而不添加 COS 相比，当接种液中分别添加 0.3 mg/mL 和 0.4 mg/mL 浓度的 COS 时，萝卜黑腐病的发病症状显著减轻(图 6a)；然而，相同浓度的 COS 对甘蓝黑腐病的抑制效果并不显著(图 6b)。这一现象表明，COS 对十字花科不同作物中黑腐病的防治效果存在显著差异，可能与不同寄主植物对 COS 的吸收代谢特性不同或病原菌侵染宿主时的特异性机制相关。

## 3 讨论与结论

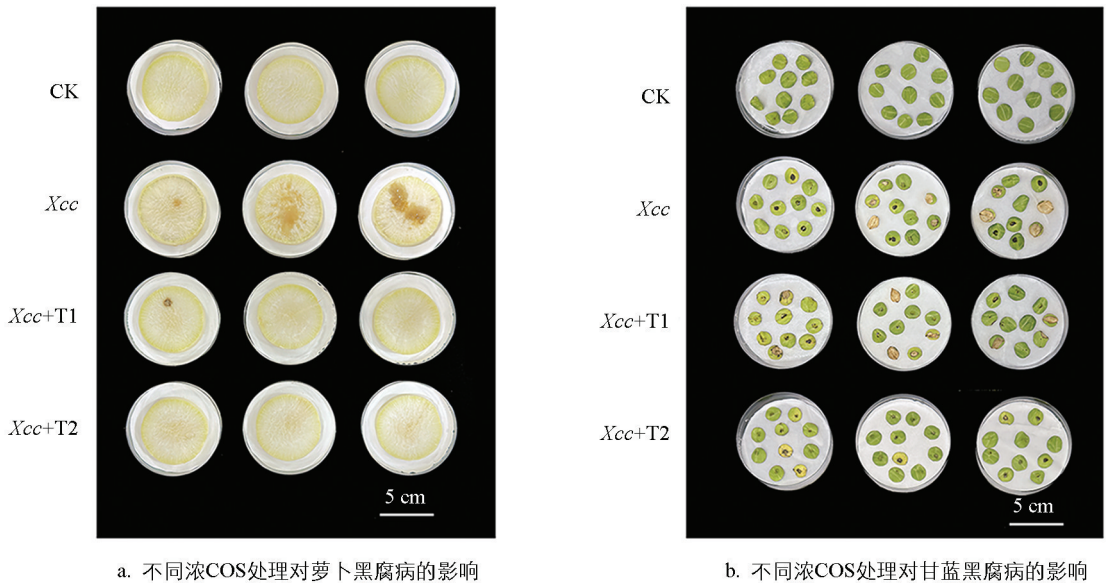
### 3.1 讨论

目前国内外对 *Xcc* 的致病机制已有系统性研究，已明确多个关键毒力因子<sup>[18-22]</sup>，其治病过程依赖多种途径。例如，EPS 通过聚集堵塞植物木质部导管，阻碍水分运输并改变细胞渗透压，最终引发叶片萎蔫及



T1、T2 分别表示加入的 COS 浓度为 0.3 mg/mL、0.4 mg/mL；\* 表示  $p < 0.05$ ，\*\* 表示  $p < 0.01$ ，\*\*\* 表示  $p < 0.005$ ，\*\*\*\* 表示  $p < 0.001$ ，ns 表示  $p > 0.05$ 。

图 5 COS 对 *Xcc* 部分效应蛋白基因表达的影响



a. 不同浓COS处理对萝卜黑腐病的影响

b. 不同浓COS处理对甘蓝黑腐病的影响

T1、T2 分别表示加入的 COS 浓度为 0.3 mg/mL、0.4 mg/mL。

图 6 COS 对萝卜和甘蓝黑腐病的防治效果

组织坏死；T3SS 介导效应蛋白转运以促进病原体定殖<sup>[23]</sup>；多种胞外酶(胞外蛋白酶、纤维素酶和淀粉酶)协同降解植物细胞壁组分，为病原菌的入侵与定殖创造条件<sup>[17]</sup>。然而现有防治手段仍面临双重挑战：一方面，化学农药因环境风险和抗药性发展问题难以持续；另一方面，生防菌受限于田间稳定性不足和作用迟缓。因此，靶向 *Xcc* 毒力因子的新型抑菌剂研发成为突破方向。近期研究发现，植物天然产物如儿茶素可通过破坏 *Xcc* 细胞膜或抑制胞外蛋白酶发挥抑菌作用，但其分子机制尚未阐明<sup>[16]</sup>，本研究发现，COS 可多

靶点 *Xcc* 活性, 兼具环境友好性和速效性(在一定浓度下, 短时间内即可完全抑制 *Xcc* 菌株的生长), 展现出一定的应用潜力。

革兰氏阴性菌利用 T3SS 将其效应因子注入植物细胞内, 最终导致植物感病。目前对于 *Xcc8004* 的效应因子的研究已经取得了系列进展<sup>[24-26]</sup>。例如, 当 *Xcc* 效应蛋白 *XopD*<sup>[27]</sup> 和 *XopL*<sup>[28]</sup> 发生突变时, 其对宿主的定殖能力显著下降, 但其作用机制尚不明确。近期的研究表明, *XopAM* 效应蛋白基因具有脂酶活性, 进而影响植物细胞内的脂质稳态, 在植物细胞过敏性坏死过程发挥重要作用<sup>[29]</sup>。本研究初步揭示了 COS 对 T3SS 效应蛋白的抑制作用: 不同浓度的 COS 处理均使 *Xcc* 效应蛋白基因 *XopL*、*XopD* 的表达量显著下调, 在 0.3 mg/mL 时分别下调了 83.6%、63.4%, 而在 0.4 mg/mL 时的浓度分别下调了 80.5%、76.1%。同时也检测了其他 6 个 *Xcc* 关键效应蛋白的表达量, 在 0.4 mg/mL 时均下调了 50% 以上, 暗示其对 T3SS 效应蛋白功能的广谱性抑制。然而, 该调控是否通过全局调控因子(如 Clp 或 RsmA)实现仍需验证。此外, 当前研究尚未阐明 COS 与宿主免疫反应的关联性——例如其是否通过诱导植物防卫基因表达来增强抗病性, 这一方向值得进一步探索。

COS 作为壳聚糖的低聚物, 具有广谱的抑菌特性, 其抗菌机制具有多靶点特性: 对革兰氏阳性菌(如金黄色葡萄球菌)可通过重塑能量代谢途径实现增殖抑制<sup>[30]</sup>; 对革兰氏阴性菌(如大肠杆菌)则能特异性阻断 DNA 转录过程<sup>[31]</sup>; 对铜绿假单胞菌, 可通过干扰群体感应系统显著抑制生物膜形成<sup>[32]</sup>。本研究中, COS 对 *Xcc* 的抑制作用涉及抑制 III 型分泌系统效应蛋白分泌、降低细菌运动性等多重协同机制。此外, COS 在抗病毒领域同样表现出色。研究表明, COS 能够有效预防番茄晚疫病、黄瓜白粉病和辣椒病毒病等果蔬病害的发生, 其作用机制涉及诱导植物产生系统抗性、干扰病毒复制周期等多个方面。这些特性使得 COS 在绿色农业和可持续植保领域具有广阔的应用前景<sup>[33]</sup>。

COS 作为植物免疫激活剂, 可通过激活水杨酸(SA)和茉莉酸(JA)信号通路增强宿主抗性<sup>[12, 34]</sup>。有趣的是, 而 T3SS 效应蛋白(如 *XopL*)可通过干扰植物 SA 信号通路, 从而抑制宿主免疫反应<sup>[8]</sup>。基于此, 本研究推测 COS 可能通过“双效抑制”模式发挥作用: 一方面通过显著下调 T3SS 效应蛋白基因(如 *XopL*、*XopD*), 直接削弱病原菌入侵与定殖能力; 另一方面可能通过激活 SA/JA 信号通路, 提升植物自身防御机制。在后续研究中, 进一步明确 COS 对 SA/JA 通路的具体调控节点及其与 *Xcc* 效应蛋白(如 *XopD*)的互作靶点对于解析 COS 抑制十字花科黑腐病的发生是十分必要的; 同时, 还需验证 COS 对不同十字花科作物黑腐病抑制效果差异的分子机制, 并评估长期施用对作物生理(如光合作用、根系发育)的影响, 以确保符合绿色农业对环境友好型杀菌剂的要求。此外, 鉴于 COS 的安全性和环境相容性, 可探索其与植物诱抗剂(如茉莉酸甲酯)或生防菌(如枯草芽孢杆菌)的协同应用, 通过多靶点联合调控提升防控效率, 同时延缓病原菌抗药性发展, 兼顾生态安全与田间实用价值。

### 3.2 结论

本研究明确了 COS 对 *Xcc* 具有显著抑制作用, 可显著抑制其胞外多糖和运动性、胞外酶等毒力因子。离体控病试验表明 COS 对白萝卜的黑腐病有显著防控效果, 但对甘蓝黑腐病的抑制效果并不显著, 为病害绿色防治和 COS 功能拓展提供了一定的参考依据。

### 参考文献:

- [1] 蔡珍. 受体组氨酸激酶 RpfC 感应脂脂肪酸分子 DSF 信号的生物化学机制 [D]. 北京: 中国科学院大学, 2025.
- [2] AN S Q, POTNIS N, DOW M, et al. Mechanistic Insights into Host Adaptation, Virulence and Epidemiology of the Phytopathogen *Xanthomonas* [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2020, 44(1): 1-32.

- [3] 李明远. 十字花科蔬菜黑腐病的发生与防治 [J]. 当代蔬菜, 2004, (11): 36-37.
- [4] 赖传雅, 袁高庆. 农业植物病理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [5] 胡姗姗. 十字花科黑腐病菌 tRNA 衍生片段的系统鉴定及假 tRNA 基因的功能研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2024.
- [6] LENG M, LU Z J, QIN Z S, et al. FLP, a Fis-Like Protein, Contributes to the Regulation of Type III Secretion and Virulence Processes in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(8): 1119-1133.
- [7] STEFFENS T, VORHÖLTER F J, GIAMPÀ M, et al. The Influence of a Modified Lipopolysaccharide O-Antigen on the Biosynthesis of Xanthan in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* B100 [J]. BMC Microbiology, 2016, 16(1): 93.
- [8] HUANG J, DONG Y R, LI N N, et al. The Type III Effector *XopLXcc* in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Targets the Proton Pump Interactor 1 and Suppresses Innate Immunity in *Arabidopsis* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(17): 9175.
- [9] WANG J T, CHEN H H, WANG N, et al. Chitosan Oligosaccharides: A Natural Rich, High-Efficiency, and Safe Frontrunner for the Futural Fruits/Vegetables Preservation [J]. Food and Bioprocess Technology, 2025, 18(2): 1104-1124.
- [10] 贾盼盼, 刘晓丹, 吝晨晨, 等. 壳寡糖对杏果实采后主要病原菌抑菌作用的研究 [J]. 新疆农业科学, 2012, 49(2): 290-295.
- [11] LU H Y, WANG M, ZHOU S F, et al. Chitosan Oligosaccharides Mitigate Flooding Stress Damage in Rice by Affecting Antioxidants, Osmoregulation, and Hormones [J]. Antioxidants, 2024, 13(5): 521.
- [12] 高雨萌, 费昭雪, 史健飞, 等. 壳寡糖对花椒干腐病菌的抑菌活性研究 [J]. 中国森林病虫, 2021, 40(3): 1-8.
- [13] SHANG W J, WU Y F, ZHAO X M, et al. Effect of Chito-Oligosaccharide Induction on Long-Distance Movement of TMV in Tobacco [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2006, 26(9): 1759-1763.
- [14] 邢芸, 占昭宏, 吴可建, 等. 脯氨酸亚氨基酸酶调控野油菜黄单胞菌的致病力 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(3): 406-414.
- [15] YAN X, ZHANG Q L, ZOU J, et al. Selection of Optimized Reference Genes for QRT-PCR Normalization in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Cultured in Different Media [J]. Current Microbiology, 2019, 76(5): 613-619.
- [16] 李峰, 邓江丽, 陈雯雯, 等. 儿茶素对野油菜黄单胞菌的抑菌作用 [J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2021(2): 215-222.
- [17] 李晓霞. Hfq 调控十字花科黑腐病菌运动机理研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2022.
- [18] YE T, ZHOU T, LI Q T, et al. *Cupriavidus* Sp. HN-2, a Novel Quorum Quenching Bacterial Isolate, Is a Potent Biocontrol Agent Against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. Microorganisms, 2020, 8(1): 45.
- [19] RYAN R P, VORHÖLTER F J, POTNIS N, et al. Pathogenomics of *Xanthomonas*: Understanding Bacterium-Plant Interactions [J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9(5): 344-355.
- [20] RYAN R P, AN S Q, ALLAN J H, et al. The DSF Family of Cell-Cell Signals: An Expanding Class of Bacterial Virulence Regulators [J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(7): e1004986.
- [21] VICENTE J G, HOLUB E B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Cause of Black Rot of Crucifers) in the Genomic Era Is still a Worldwide Threat to Brassica Crops [J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(1): 2-18.
- [22] ZHOU L, ZHANG L H, CÁMARA M, et al. The DSF Family of Quorum Sensing Signals: Diversity, Biosynthesis, and Turnover [J]. Trends in Microbiology, 2017, 25(4): 293-303.
- [23] TAMPAKAKI A P, FADOULOGLOU V E, GAZI A D, et al. Conserved Features of Type III Secretion [J]. Cellular Microbiology, 2004, 6(9): 805-816.
- [24] RAMNARINE S D B, JAYARAMAN J, RAMSUBHAG A. Comparative Genomics of the Black Rot Pathogen *Xan-*

- thomonas campestris* pv. *campestris* and Non-Pathogenic Co-inhabitant *Xanthomonas melonis* from Trinidad Reveal Unique Pathogenicity Determinants and Secretion System Profiles [J]. *PeerJ*, 2022, 9: e12632.
- [25] ADLUNG N, BONAS U. Dissecting Virulence Function from Recognition; Cell Death Suppression in *Nicotiana Benthamiana* by XopQ/HopQ1-Family Effectors Relies on EDS1-Dependent Immunity [J]. *The Plant Journal*, 2017, 91(3): 430-442.
- [26] DAI H J, HU L L, WANG J, et al. Constructing a Novel Disease Resistance Mechanism Model for Cruciferous Crops: An Example from Black Rot [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2025, 26(2): e70060.
- [27] KIM J G, STORK W, MUDGETT M B. *Xanthomonas* Type III Effector *XopD* Desumoylates Tomato Transcription Factor SIERF4 to Suppress Ethylene Responses and Promote Pathogen Growth [J]. *Cell Host & Microbe*, 2013, 13(2): 143-154.
- [28] HUANG J, ZHOU H, ZHOU M, et al. Functional Analysis of Type III Effectors in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Reveals Distinct Roles in Modulating Arabidopsis Innate Immunity [J]. *Pathogens*, 2024, 13(6): 448.
- [29] XIE Q B, WEI B Z, ZHAN Z H, et al. Arabidopsis Membrane Protein AMAR1 Interaction with Type III Effector *XopAM* Triggers a Hypersensitive Response [J]. *Plant Physiology*, 2023, 193(4): 2768-2787.
- [30] LI J, LIU C H, WANG S, et al. *Staphylococcus Aureus* Enters Viable-but-Nonculturable State in Response to Chitooligosaccharide Stress by Altering Metabolic Pattern and Transmembrane Transport Function [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2024, 330: 121772.
- [31] BENCHAMAS G, HUANG G L, HUANG S Y, et al. Preparation and Biological Activities of Chitosan Oligosaccharides [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 107: 38-44.
- [32] HE X J, HWANG H M, AKER W G, et al. Synergistic Combination of Marine Oligosaccharides and Azithromycin Against *Pseudomonas Aeruginosa* [J]. *Microbiological Research*, 2014, 169(9-10): 759-767.
- [33] 罗华丽, 遇艳萍, 李娜, 等. 壳寡糖在果蔬中的应用研究 [J]. *中国果菜*, 2023, 43(8): 54-57.
- [34] CUI K B, SHU C, ZHAO H D, et al. Preharvest Chitosan Oligochitosan and Salicylic Acid Treatments Enhance Phenol Metabolism and Maintain the Postharvest Quality of Apricots (*Prunus armeniaca* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 267: 109334.

责任编辑 王新娟