

# 假单胞菌株 JKD-2 分泌铁载体抑制稻瘟病菌\*

许煜泉 高虹 童耕雷 祝新德

(上海交通大学生命科学技术学院 上海 200240)

**摘要** 利用铬奥醇(CAS)分析法测定了假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)JKD-2分泌铁载体的特征,在无铁环境下JKD-2菌能分泌高亲和力的铁载体;在低铁条件下,铁载体的分泌量减少;在富铁环境下,则不能分泌。结果还显示菌株JKD-2在无铁条件下分泌的铁载体,能在低铁条件下抑制稻瘟病菌(*Piricularia oryzae*)的生长。

**关键词** 假单胞菌,铁载体,抑制稻瘟病菌

**分类号** Q939.96, S154.381 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654-(1999)-03-0180-183

## SIDEROPHORE PRODUCTION AND THEIR ACTIVITY AGAINST *PIRICULARIA ORYZAE* BY *PSEUDOMONAS* JKD-2

Xu Yuquan Gao Hong Tong Genglei Zhu Xinde

(College of Biological Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

**Abstract** The present study demonstrates the siderophore production of *Pseudomonas* sp. JKD-2, measured by the chrome azurol S (CAS) assay. The study shows that JKD-2 produces high-affinity iron-transport molecule siderophore in iron-deficient media while not produces in iron-rich media. Furthermore, the results illustrate that the siderophore excreted by JKD-2 can suppress *Piricularia oryzae* growth in a bioassay.

**Key words** *Pseudomonas* sp. JKD-2, Siderophore, Suppressing *Piricularia oryzae*

铁是一种地球上含量丰富的金属元素,但主要以不溶性的 $Fe^{3+}$ 形式存在。pH7时的溶解度仅为 $10^{-8}$ mol/L。促进植物生长的根际细菌(Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR),是生存在土壤中的一类根际细菌,它们通过多种直接或间接的代谢机制抑制病原菌的繁殖并促进植物的生长<sup>[1-3]</sup>。在低铁的土壤中,其主要的抑菌机制是分泌一类与铁高亲和( $Kd = 10^{-20} \sim 10^{-50}$ )的铁载体(分子量约为400~1000u),并以特异的转运系统转移至体内,供微生物自身生长的需要<sup>[4-7]</sup>,同时,降低了环境中的铁浓度,使植物病原真菌生长受到抑制。在土壤中,大多数植物根系与植物病原真

菌相比,能在铁浓度低1000倍条件下正常生长。所以PGPR引起的局部缺铁不会损害植物的正常生长。

铬奥醇(CAS)法是测定PGPR分泌铁载体的常用方法。但是,用CAS法测出的铁载体分泌量与病原菌的抑制作用,并不完全正相关。Manninen<sup>[8]</sup>和Laine<sup>[9]</sup>认为铁载体对病原菌的抑制作用在种的水平上具有选择性,除了用CAS法测定铁载体分泌量外,还必须采用生物测定的方法,才能判断这些铁载体对某种病原菌是

\* 上海市科技兴农重点攻关项目资助(农科攻字98-05-9)

否有直接的拮抗作用。

本实验室从稻茬中筛选得到了一株对稻瘟病菌等多种植物病原菌具有强抑制能力的拮抗细菌假单胞菌株(*Pseudomonas* sp.)JKD-2,在水稻苗期的盆栽试验中,也能有效地抑制稻瘟病菌的接种感染<sup>[10]</sup>。为了研究JKD-2抑制病原菌的机理,本文测定了在无铁条件下该菌分泌铁载体的特征,生物测定了该菌分泌的铁载体对稻瘟病菌的抑制作用。实验结果表明,JKD-2菌分泌的铁载体对稻瘟病菌生长具有明显的抑制作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)JKD-2株由本实验室从稻茬上分离得到<sup>[10]</sup>。

稻梨孢(稻瘟病菌 *Piricularia oryzae*)Pb-2株由上海市农业科学研究院陈全庆提供。

### 1.2 铁载体的定性检测

按 Schwyn 和 Neilands<sup>[11]</sup>法,将JKD-2菌接种在铬奥醇(chrome azurol S, CAS)琼脂培养基上,以 *E. coli* 作为对照,于28℃培养48h,观察菌落周围的颜色变化。

### 1.3 JKD-2菌株的生长曲线及铁载体的分泌特征

玻璃容器经6mol/L的HCl浸洗过夜,并用重蒸水淋洗干净。在无铁的蔗糖-L-天冬酰胺(SA)培养基上<sup>[12]</sup>,测定JKD-2菌的生长曲线和铁载体分泌量。培养基中  $K_2HPO_4$  的量减至0.3g/L<sup>[9]</sup>,28℃,90r/min振荡培养。在SA培养基中加入100μmol/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  作为富铁培养基对照。

经12, 24, 36, 48, 60, 72, 84及96h培养后,分别测定菌悬液在600nm处的光密度(OD)值。

菌悬液经4000r/min离心10min后,取上清液。以1:1的体积比加入CAS分析液<sup>[9]</sup>,稀释10倍,于630nm处测定OD值,OD的相对减少值,作为铁载体的分泌量。

以上实验重复3次,取平均值,作出生长曲

线及铁载体分泌量曲线。

### 1.4 测定铁载体对稻瘟病菌的拮抗作用

将JKD-2菌接至无铁SA液体培养基中振荡培养3d,28℃,100r/min。将培养菌液以10000r/min离心10min。上清液经微孔滤膜(0.2μm)过滤后,取20mL加入到70mL低铁SA培养基中(含20μmol/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )。用毛笔轻轻刷下稻草玉米粉培养基上,培养7d的稻瘟病菌孢子,稀释成 $10^6$ 个/mL浓度的孢子液。取该孢子液10mL接种到前述90mL培养基中,100r/min,28℃振荡培养。以富铁的SA培养基(铁离子浓度为100μmol/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )为对照,重复上述步骤,培养JKD-2菌。

空白培养基为90mL无铁SA培养基和90mL低铁SA培养基。

## 2 结果

### 2.1 JKD-2菌分泌铁载体的定性分析

JKD-2菌于蓝色CAS琼脂培养基上长势良好。2d后,在湿润光滑的菌落周围有明显的桔黄色透明晕圈生成。加长培养时间,该晕圈变化不大。而作为对照的 *E. coli* 菌在该培养基上,菌落周围无明显晕圈生成。CAS琼脂培养基中由于含有CAS,十六烷基三甲基铵(HDTMA)以及  $Fe^{3+}$  的三元复合物而呈蓝色。只有当更强的螯合剂将铁从该复合物中移出,它的颜色才会由蓝色转为橙色。因此,可以断定JKD-2菌在生长过程中分泌了一种对铁具有较高亲和力的铁载体类物质。

### 2.2 JKD-2菌无铁条件下的生长情况及铁载体的诱导

从图1可看出:JKD-2菌在富铁SA培养基(100μmol/L  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ )上生长情况好于无铁SA培养基。富铁培养36h后的OD值约比无铁培养基中OD值增加近1倍。培养72h后,JKD-2菌在无铁培养基中已进入停滞期,在富铁培养基中的OD继续在增加,说明JKD-2菌仍处于增殖期中。而无铁培养基中JKD-2菌的菌悬液于24h就开始分泌绿色物质,随着培养时间的增长,这种绿色物质逐渐增多。离心后

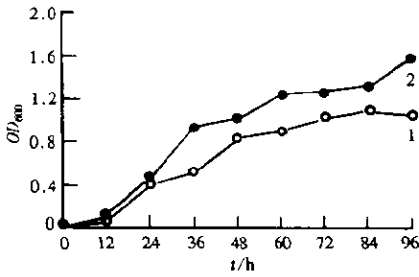


图1 JKD-2菌的生长曲线

1. 无铁, 2. 有铁

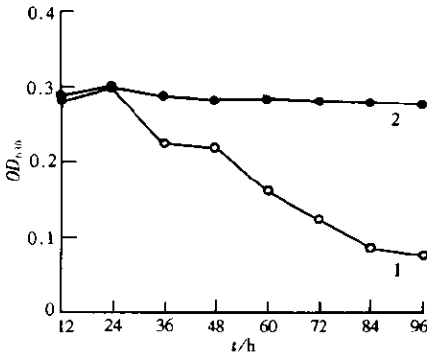


图2 假单胞菌JKD-2分泌铁载体的特性

1. 无铁, 2. 有铁

菌体仍为乳白色,而上清液为绿色。推测与分泌的铁载体生色基团有关。

图2给出了JKD-2菌分泌铁载体的特征。在波长为630nm处,OD<sub>630</sub>值随着CAS, HDTMA, Fe<sup>3+</sup>三元复合物含量的减少而降低,OD<sub>630</sub>值的变化与铁载体的增加呈负相关。在无铁培养基中,JKD-2迅速地分泌铁载体,仅培养至36h,就已有明显的铁载体分泌;培养48h后,能继续大量分泌铁载体;进入停滞期后,仍然有铁载体分泌。而有铁条件下,JKD-2菌仅在培养至24~36h之间,分泌少量铁载体;在对数期后几乎不分泌具有强铁亲和力的铁载体。结果表明,无铁环境能诱导JKD-2菌中铁载体的生成,而高铁浓度则抑制铁载体的大量分泌。

比较图1与图2,可知在富含铁的环境下,它能容易地从周围环境中获取铁,满足自身生长需要,不再分泌与铁具有高亲和力的铁载体。只在低铁的条件下,进入停滞期,生长受到抑制时,作为一种挽救手段,诱导分泌具有高亲和力的铁载体,吸收环境中的铁。

### 2.3 JKD-2菌铁载体抑制稻瘟病菌的能力

在SA培养基中,稻瘟病菌能够在低铁20μmol/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O环境下缓慢生长,7d后可观察到明显的菌丝体生成。无铁培养基中的稻瘟病菌则几乎不生长。表明稻瘟病菌的孢子萌发和菌丝体的生长与培养基中的铁浓度有关。

将富铁条件下培养的JKD-2菌株上清液加入低铁培养基,接种稻瘟病菌孢子悬浮液,经震荡培养7d后,稻瘟病菌由孢子长成球状的菌丝体。培养基仍为无色。可见该上清液中并无明显抑制稻瘟病菌的物质。而将无铁条件下培养的JKD-2菌上清液加入低铁培养基中,接种稻瘟病菌7d后,只观察到了极少量的菌丝体(表1)。可见该上清液中分泌的铁载体通过竞争性地与铁结合,降低了培养基中的铁浓度,从而抑制了稻瘟病菌的生长。

表1 不同铁离子浓度下培养的JKD-2菌株上清液对稻瘟病菌的抑制作用

培养基	SA	SA+(1)	SA+(2)
富铁	+++		
低铁	+	-	+
无铁	-	-	-

(1) 无铁培养的JKD-2菌上清液;

(2) 富铁培养的JKD-2菌上清液

+: 有稻瘟病菌生长; -: 无稻瘟病菌生长

### 3 讨论

无铁条件能诱导JKD-2菌大量分泌铁载体。而有铁(尤其是高铁)条件下,JKD-2菌分泌铁载体的能力受到明显抑制。这种铁载体对稻瘟病菌的生长具有较强的抑制能力。

Manninen和Mattila-Sandolm<sup>[8]</sup>曾用CAS法测定了各种PGPR的铁载体分泌量,Laine等人<sup>[9]</sup>分析了CAS法测定的铁载体分泌量和抗病原菌能力的相关性,发现假单胞菌的某些菌株分泌的铁载体具有种的选择性,对某些病原真菌具有很强的抑菌作用,对另一些病菌可能没有拮抗作用,甚至会有相反的促进作用。但是他们采用的病原菌培养基全部为无铁培养基,

得到的结果就不能确切说明对病原菌的抑制作用是由于该培养基中加入了铁载体所致,还是培养基本身没有铁离子引起的假象。本文在测定JKD-2铁载体对稻瘟病菌拮抗能力时,对Laine等人的方法作了改进。我们用 $20\mu\text{mol/L}$   $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 的低铁培养基代替无铁培养基,因为在低铁培养基上稻瘟病菌虽生长缓慢,但仍能生长,而加入铁载体后,稻瘟病菌的生长受到抑制。这样能更准确地检测铁载体所起的抑菌作用。

### 参 考 文 献

- [1] Davison J. *Bio/Technology*, 1988, **6**:282~286.
- [2] Kloepper J W, Lifshitz R, Zablotowicz R M. *Trends Biotechnol*, 1989, **7**:39~43.
- [3] Glick B R. *Can J Microbiol*, 1995, **41**:109~117.
- [4] Neilands J B. *Ann Rev Biochem*, 1981, **50**:715~731.
- [5] Neilands J B. *Structure and Bonding*, 1984, **58**:1~24.
- [6] Neilands J B. Siderophore systems of bacteria and fungi. In: Beveridge T J. and Doyle R J. ed. *Metal Ions and Bacteria*. Somerset, NJ, USA: John Wiley, 1989, 141~164.
- [7] 许煜泉,林志新,钟仲贤等. *上海农业学报*, 1997, **13**(4):89~96.
- [8] Manninen M, Mattila-Sandholm T J. *Microbiol Methods*, 1994, **19**:223~234.
- [9] Laine M H, Karwoski M T, Raaska L B *et al*. *Letters in Appl Microbiol*, 1996, **22**:214~218.
- [10] 许煜泉,张彦,俞吉安等. *上海交通大学学报*, 1998, **32**(3):111~116.
- [11] Schwyn B, Neilands J B. *Analytical Biochem*, 1987, **160**:47~56.
- [12] Scher F M, Baker R. *Phytopathol*, 1982, **72**:1567~1573.