

黑麦草根际产铁载体细菌 HMGY6B 的筛选鉴定及对病原菌的拮抗作用

陈伟 王小利 付薇* 曾庆飞 陈莹 舒健虹

(贵州省草业研究所 贵州 贵阳 550006)

摘要:【目的】从石灰性土壤中分离筛选出铁载体合成能力强、抗病效果好的菌株。【方法】采用刃天青(Chrome azural S, CAS)平板检测法,定性、定量筛选产铁载体能力较强的菌株,通过菌株形态、生理生化特征、16S rRNA 基因序列相似性和系统发育分析,鉴定细菌类型,然后采用平板对峙法研究菌株与病原菌的拮抗作用。【结果】从多年生黑麦草根际土壤中分离得到一株产铁载体能力很强的菌株 HMGY6B,经鉴定,该菌属假单胞菌属 *Pseudomonas* 菌株,其产生的儿茶酚型铁载体对黄瓜灰霉病(*Botrytis cinerea*)有显著的拮抗作用,在低铁条件下(0.16、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3)对黄瓜灰霉病的生长抑制率高达 91.2%,但在富铁条件下(50 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3)降为 30.2%,100 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 抑制率仅为 5.5%。【结论】菌株 HMGY6B 可用于今后复合型抗病生物菌肥的开发研制。

关键词: 铁载体产生菌, 筛选, 鉴定, 拮抗作用

Screening, identification and antagonistic against the pathogens of a siderophore-producing bacteria HMGY6B from rhizosphere of ryegrass

CHEN Wei WANG Xiao-Li FU Wei* ZENG Qing-Fei CHEN Ying
SHU Jian-Hong

(Guizhou Institute of Prataculture, Guiyang, Guizhou 550006, China)

Abstract: [Objective] In order to isolate and screen a high-affinity siderophore-producing bacteria from calcareous soil, which has a significant effect on the pathogen. [Methods] High-affinity siderophore-producing strains were screened by chrome azural S (CAS) assay. Then, we take the methods of morphological observation, biochemical and physiological characteristics, 16S rRNA gene sequence and phylogenetic analysis to identify the bacterial species. Based on the results obtained from strain's screening and identification, antagonism between strains and pathogenic

Foundation item: Scientific Research Foundation of Graduate School of Guizhou Academy of Agricultural Sciences (No. 2011015)

*Corresponding author: E-mail: fuweiwei49@163.com

Received: November 03, 2015; **Accepted:** February 24, 2016; **Published online** (www.cnki.net): February 29, 2016
基金项目: 贵州省农业科学院研究生科研创新基金项目(No. 2011015)

*通讯作者: E-mail: fuweiwei49@163.com

收稿日期: 2015-11-03; 接受日期: 2016-02-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-02-29

bacteria was researched by dual culture on potato dextrose agar. **[Results]** Siderophore-producing bacteria HMGY6B identified as *Pseudomonas* was isolated and screened out from the ryegrass (*Lolium perenne* L.) rhizosphere soil, which produced Catechol-type siderophore had the significant effects on cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*). The inhibition ratio was up to 91.2% under low iron conditions (0.16, 2, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3). But unfortunately, it decreased to 30.2% under 50 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3 and only 5.5% under Fe-replete conditions (100 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3). **[Conclusion]** The strain HMGY6B can be used to the exploitation and development of compound disease-resistant manure.

Keywords: Siderophore-producing bacteria, Screening, Identification, Antagonism

铁载体是包括细菌和真菌在内的,几乎所有好氧和兼性厌氧的微生物在铁胁迫条件下向环境分泌的对 Fe^{3+} 具有极高亲和力的小分子量铁螯合物,这些化合物所起的作用是帮助微生物从环境中获取必需的铁元素^[1]。在铁缺乏时,微生物在体内产生特异的铁载体,它可以与 Fe^{3+} 形成紧密的可溶复合物;同时在革兰氏阴性菌(G^-)的细胞外膜上产生受体蛋白,即铁受体蛋白,它可以特异识别 Fe^{3+} 载体,将 Fe^{3+} 运输到细胞内^[2]。当铁元素供给充足时,铁载体和外膜上受体蛋白的合成将被关闭。现在的一些研究表明,铁载体不光对微生物的铁营养至关重要,而且它在根际促生细菌(PGPR)抑制土壤病害过程中发挥着重要作用^[3-5],另外,铁载体还在某些动植物病原菌的致病性等诸多方面起着作用^[6]。这些具有铁载体合成能力的微生物通过竞争铁营养,不仅能够改善自身的营养状况,还能够供给植物铁营养或通过与植物病原菌竞争铁营养达到生物防治的作用^[7]。

目前,国内外对铁载体合成细菌的研究主要集中在玉米、水稻、小麦、棉花、香蕉、桃树等植物上^[8-10],利用产铁载体细菌提高牧草根际及周围土壤 Fe^{3+} 利用率的研究鲜见报道。据调查,贵州除黔东南州 8 个县以外,全省其余各县都有大面积石灰土分布,由于石灰性土壤自身碱性反应及氧化作用,使铁形成难溶性化合物而降低其生物学有效性。因此,贵州大部分地区的植物都存在着潜在性缺铁。本研究以贵州适生牧草多年生黑麦草为试验材料,采用刃天青(Chrome azural S, CAS)检测体系、 OD_{630} 方法、PDA 平板,结合形态、生理生化特征、16S rRNA 基因全序列分析、病菌生长抑制试验筛

选鉴定出铁载体合成能力强、抗病效果好的菌株,为提高贵州石灰性土壤中铁的利用效率,改善植物铁营养状况提供理论依据,也为今后复合型抗病生物菌肥的开发研制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株采集: 2014 年 9 月,分别在威宁(海拔 2 100 m,年降雨量 950 mm)、晴隆(海拔 1 927 m,年降雨量 1 350 mm)、兴仁(海拔 1 963 m,年降雨量 1 320.5 mm)、望谟(海拔 896 m,年降雨量 1 222.5 mm)、独山(海拔 970 m,年降雨量 1 346.3 mm)、贵阳(海拔 1 056 m,年降雨量 1 124 mm) 6 个牧草试验地中,选取长势较为旺盛的多年生黑麦草植株,去除表层土壤和杂物,采集其土层深度 15 cm 的根际土样,去除根系上附着的大土粒,用无菌的毛刷将根上粘着的细土扫落到无菌袋后封口,贴上标签,然后将土样用冰盒迅速带回实验室进行根际土壤细菌的分离。

1.1.2 培养基及铁载体检测液: (1) LB 培养基^[11]; (2) MKB 液体培养基^[5]; (3) SA 液体培养基(g/L)^[6]: 蔗糖 20.0、L-天门冬酰胺 2.0、 K_2HPO_4 0.5、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, 8-羟基喹啉除铁后,无外加铁离子,其本底铁离子浓度约为 0.16 $\mu\text{mol/L}$, pH 7.0; (4) 铁载体检测染液^[12]: 将 0.079 g CAS 溶于 50 mL 去离子水中,再加入 10 mL 1 mmol/L FeCl_3 溶液(含 12 mmol/L HCl),溶液 A。将 0.069 g 十六烷基三甲基溴化铵(HDTMA)溶于 40 mL 的去离子水中,得溶液 B。将 A 溶液沿烧杯壁缓缓加入 B 溶液中,搅拌均匀即得 100 mL CAS 蓝色检测液; (5) 0.1 mol/L

磷酸盐缓冲液 (pH 6.8)^[11]: 每 100 mL 含 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.427 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.590 5 g, KH_2PO_4 0.075 g, NH_4Cl 0.250 g, NaCl 0.125 g, 使用时稀释 10 倍; (6) CAS 培养基^[12]: 每 1 L 含 20% 蔗糖溶液 10 mL, 10% 酸水解酪素 30 mL, 1 mmol/L CaCl_2 1 000 μL , 1 mmol/L MgSO_4 20 mL, 琼脂 18 g, 在约 60 °C 时缓慢加入磷酸盐缓冲液和 CAS 检测染液各 50 mL; (7) PDA 培养基^[11]。

1.1.3 病原真菌: 水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani* strain GZCC14-0001)、黄瓜灰霉病菌 (*Botrytis cinerea* strain GZCC-0002)、黄瓜立枯丝核病菌 (*Rhizoctonia solani* strain AS17) 由贵州省植物保护研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 黑麦草根际产铁载体细菌分离纯化与定性检测: 称取鲜土样 10 g 溶于 100 mL 灭菌的去离子水中, 28 °C、145 r/min 培养 30 min 后进行稀释。吸取上清液 50 μL 均匀涂抹在 CAS 平板上, 置于 28 °C 培养箱培养 48 h。菌落表面比较光滑, 菌落大而粘稠的菌落接种在 CAS 检测平板上进行纯化与鉴定, 纯培养物保存在 LB 斜面和甘油管以备菌种鉴定。将细菌纯培养物接种到 CAS 检测平板上, 28 °C 培养 48 h, 经过培养的 CAS 检测平板上, 分泌铁载体的细菌菌落周围会出现明显的橙黄色晕圈, 记录橙黄色晕圈产生的时间、大小、颜色、形态特征。同时, 通过计算晕圈比例即可溶性指数^[13], 对其分泌铁载体能力进行比较分析, 以定性筛选铁载体能力强的菌株。

1.2.2 黑麦草根际产铁载体细菌定量检测: 挑取晕圈比较明显的菌落, 接种于 MKB 液体培养基中培养, 28 °C、150 r/min 振荡培养 36 h, 然后将菌悬液 8 000 r/min 离心 15 min 后, 得到上清液, 分别取上清液 3 mL 与 CAS 检测液 3 mL 充分混匀, 静置 1 h 后采用 721 型分光光度计在 630 nm 波长处测定吸光值 (A_s), 并取双蒸水作对照调零, 另取 3 mL CAS 检测液与 3 mL 未接种的 MKB 液体培养基充分混匀, 同上测定吸光值即为参比值 (A_r), 计算铁

载体活性单位, 即: $[(A_r - A_s)/A_r] \times 100$ ^[14]。

1.2.3 产铁载体细菌的鉴定: (1) 菌落形态观察: 挑取纯化后的单菌落, 四分体划线接种到 LB 平板培养基上, 37 °C 培养 48 h, 进行菌落形态观察和电镜扫描; (2) 生理生化试验: 采用吲哚试验、V-P 试验、 H_2S 试验、精氨酸、双水解、明胶液化等对分离出的产铁载体细菌进行相应的生理生化检测^[15]; (3) 16S rRNA 基因序列分析: 采用 16S rRNA 基因扩增通用引物 27F/1495R, 以菌株总 RNA 为模板进行扩增^[16], 测得的序列与 GenBank 中已有的 16S rRNA 基因序列进行相似性比对, 用 MEGA 2 法构建系统进化树。

1.2.4 铁载体制备: G-229-21T 铁载体的制备参照 Risse 的方法^[17], 略有改进: 先用活化的 XAD-2 大孔径树脂吸附按 1.2.2 方法制备的无菌铁载体上清液 (1.1 cm \times 80 cm 玻璃层析柱), 再用 2 倍柱体的 ddH₂O 洗涤除去未被吸附的杂质和其它非铁载体物质, 再用 4 倍柱体积的 H₂O/CH₃OH (1:1, 体积比) 洗脱到流出的洗脱液无色为止, 分段回收, 合并 CAS 检测阳性洗脱液, 旋转蒸发除去甲醇和水, 将得到的铁载体溶解在 ddH₂O 中, 0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4 °C 保存备用。

1.2.5 铁载体类型检测: (1) 异羟肟酸型铁载体^[18]: FeCl_3 试验: 在 3 mL 离心分离细菌的铁载体溶液中加入 1–5 mL 2% 的 FeCl_3 , 若用紫外可见分光光度计测得在 420–450 nm 之间有吸收峰, 则说明产生的是异羟肟酸型铁载体。四唑试验: 在少量四唑盐中加入 1–2 滴 2 mol/L NaOH 和 1 mL 制备的 3 mg/L 的铁载体溶液中, 若立即呈现深红色则说明有异羟肟酸型铁载体的存在。(2) 儿茶酚型铁载体^[18]: Arnow's 试验: 在 1 mL 上述制备的 3 mg/L 的铁载体溶液中加入 0.1 mL 5 mol/L HCl, 0.5 mL 反应液 (50 mL 水中溶解 NaNO_2 和 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 各 10 g), 待反应液变成黄色后加入 0.1 mL 10 mol/L NaOH (将出现红色) 并补足蒸馏水至 5 mL。515 nm 处将有吸收峰。(3) 羧酸型铁载体^[18]: 在 1 mL 上述制备的 3 mg/L 的铁载体溶液中加入 1 mL 250 $\mu\text{mol/L}$

CuSO₄ 和 2 mL pH 4.0 的醋酸盐缓冲液。波长扫描看形成的复合物在 190–280 nm 波长范围内是否有相应的吸收峰。

1.2.6 黑麦草根际产铁载体分泌曲线测定: 将筛选得到的菌株以 1% 的接种量接种于 MKB 培养液中, 28 °C、150 r/min 振荡培养, 分别于 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、36、48、60、72 h 取样, 紫外分光光度计检测 OD₆₀₀, 同时按照 1.2.2 步骤检测样品 A_s/A_r (OD₆₃₀), 绘制菌株生长曲线及铁载体分泌曲线图^[9]。

1.2.7 产铁载体细菌对病原真菌生长抑制作用: 采用 PDA 平板对峙法, 将检测筛选出的铁载体产生菌株与水稻纹枯病、黄瓜灰霉病、黄瓜立枯丝核菌同时接种在 PDA 平板, 25 °C 培养 6 d, 观察铁载体细菌与真菌拮抗效果^[19-20]。将培养 7 d 的病菌用无菌水配制成孢子悬液(10⁶ mg/L)。取孢子悬液 1 mL 分别接种到含不同浓度 FeCl₃ (0.16、2、5、10、50 和 100 μmol/L) 和外加铁载体(0、4、8、12 mg/L) 的 99 mL SA 液体培养基中, 150 r/min、28 °C 振荡培养 7 d, 收获菌丝体, 60 °C 烘至恒重后称重测定生长量^[21]。

2 结果与分析

2.1 黑麦草根际铁载体细菌分离纯化与定性检测

CAS 培养基培养 48 h 后, 部分细菌周围出现明显橙黄色晕圈, 依据细菌形态、颜色、大小,

挑选出 64 株菌株, 继续接种于 CAS 培养基, 经过连续 4 代培养后, 得到 9 株产铁载体能力较强的菌株(图 1), 9 份菌株第 3 天菌落直径大小约 1.03–1.43 cm、颜色乳白或淡粉色, 可溶性指数 1.76–4.13 (表 1)。可溶性指数由大到小依次为 HMGY6B (贵阳)>HMDS4B (独山)>HBGY4B (贵阳)>HMXR2D (兴仁)>HMWN1B (威宁)>HMDS2D (独山)>HMDS2A (独山)>HMWN3B (威宁)>HMWN4C (望谟)。

2.2 黑麦草根际产铁载体细菌定量检测

在 MKB 培养基中培养 36 h 检测 9 份菌株铁载体产生能力, 检测结果如表 2 所示。CAS 检测液的

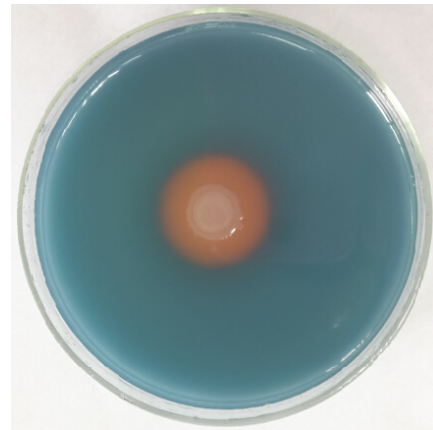


图 1 菌株 HMGY6B 纯化与 CAS 检测筛选
Figure 1 Purification and chrome azural S (CAS) assay of the siderophore-producing bacterium HMGY6B

表 1 产铁载体细菌菌落大小、晕圈直径

Table 1 Colonial size, halo diameter and other characters of siderophore-producing bacteria

采集地 Collection site	菌株编号 Screening number	菌落直径 Colony diameter (cm)	菌落+晕圈直径 Colony and halo diameter (cm)	可溶性指数 Soluble index
威宁 Weining	HMWN1B	1.17	3.45	2.95
	HMWN3B	1.29	2.68	2.08
兴仁 Xinren	HMXR2D	1.31	4.50	3.44
望谟 Wangmo	HMWN4C	1.27	2.24	1.76
贵阳 Guiyang	HMGY4B	1.43	5.01	3.50
	HMGY6B	1.31	5.41	4.13
独山 Dushan	HMDS2A	1.37	3.22	2.35
	HMDS2D	1.20	3.13	2.61
	HMDS4B	1.03	3.99	3.87

表 2 9 份菌株在 630 nm 波长处的吸光值及铁载体活性单位
Table 2 Absorbance and siderophore unit of the 9 strains under 630 nm wavelength

采集地 Collection site	菌株编号 Screening number	A_s	A_r	$(A_r - A_s)/A_r$	A_s/A_r
威宁 Weining	HMWN1B	0.156	0.443	0.648	0.35
	HMWN3B	0.187	0.443	0.578	0.42
兴仁 Xinren	HMXR2D	0.167	0.443	0.623	0.38
望谟 Wangmo	HMWN4C	0.201	0.443	0.546	0.45
贵阳 Guiyang	HMGY4B	0.142	0.443	0.679	0.32
	HMGY6B	0.101	0.443	0.772	0.23
独山 Dushan	HMDS2A	0.184	0.443	0.585	0.42
	HMDS2D	0.189	0.443	0.573	0.43
	HMDS4B	0.139	0.443	0.686	0.31

吸收值在不同 pH 条件下极易产生偏差,而且细菌培养液样品 pH 变化较大,所测数据值有偏差,该种检测方法对铁载体的定量可以通过 A_s/A_r 值的降低来衡量,如表 2 所示 HMGY6B 菌株的 A_s/A_r 值最低,约 0.23,铁载体活性单位 $(A_r - A_s)/A_r$ 较高达 77%,依据 Manjanatha 等^[22]对细菌产铁载体能力划分, A_s/A_r 从 0–1.0 之间以 0.2 为间隔,每减少 0.2 增加一个+,该菌株分泌铁载体的能力为++++,由此表明 HMGY6B 为一株产铁载体能力很强的菌株。

2.3 黑麦草根际产铁载体菌株鉴定

2.3.1 菌株的形态及生理生化特征:在 CAS 培养基上,菌株 HMGY6B 菌落较小、淡粉色、表面光滑不透明、边缘整齐、中部略微凸起。HMGY6B 革兰氏染色阴性,近椭圆形的短杆状,短径 0.5 μm –1.0 μm ,长径 1 μm –2 μm ,具端鞭毛,运动,不产芽孢(图 2)。最适生长温度为 28–32 $^{\circ}\text{C}$,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 仍然可以生长,而 41 $^{\circ}\text{C}$ 无法生长,最适生长 pH 为 6.8–7.5,pH 9.0 时仍然可以生长,pH 值小于 3.0 不能生长。接触酶阳性,氧化酶阳性,明胶液化阴性(表 3),生理生化特征与假单胞菌属恶臭假单胞菌较为一致。

2.3.2 菌株 HMGY6B 的 16S rRNA 基因序列分析:以 HMGY6B 菌株总 RNA 为模版,对其 16S rRNA 全基因进行测序,得到总长为 1 501 bp 的 16S rRNA 基因序列。将 HMGY6B 的 16S rRNA 基因序列在 BLAST 中进行对比,发现 HMGY6B 与假单胞菌多个不同种相似性均在 99% 以上。根据 16S rRNA 基

因序列构建的 HMGY6B 的系统发育树(图 3),结果显示分离菌株 HMGY6B 与 *P. putida* strain AS90 (AY622320)和 *P. putida* M35 (KC934869)两者最为相近,相似性分别高达 99.8%和 99.7%,但并未与恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 其他菌株聚在同一类,聚类较远,与 *P. putida* strain OK-St (EU439425)相似性为 99%,而与 *P. putida* zol-13 (JQ968690)聚类较远,相似性仅为 98.1%,相反与 *P. sp.* 4062 (JX566603)和 *P. sp.* 4063 (JX566604)聚类较近,相似性达 99.6%。尽管 HMGY6B 生理生化特征鉴定与恶臭假单胞菌表现较为一致,但因聚类分析中还有其他种类菌株,因此仅将其鉴定为假单胞菌属菌株,具体分类地位有待进一步的明确。

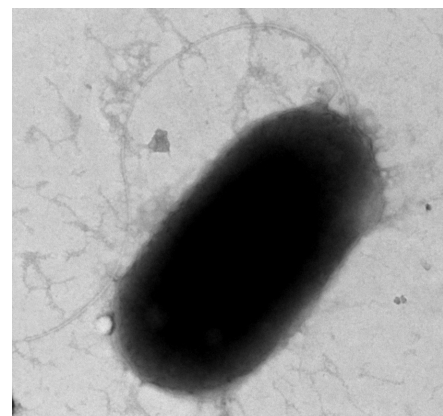


图 2 HMGY6B 在扫描电镜下的形态特征(8 000 \times)
Figure 2 The morphological character of strain HMGY6B under the trans-electron microscope (8 000 \times)

表3 菌株 HMGY6B 的生理生化特征
Table 3 Biochemical and physiological characteristics of strain HMGY6B

生理生化特征 Physiological and biochemical characteristics	结果 Result	生理生化特征 Physiological and biochemical characteristics	结果 Result
厌氧生长 Anaerobic growth	-	氧化酶 Oxidase	+
葡萄糖氧化发酵 Glucose oxidative ferment	-	荧光色素 Fluorochrome	-
接触酶 Contact enzyme	+	V-P	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
果糖 Fructose	+	脓青素 Pyocyanine	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	-	脲酶 Urease	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	-	邻硝基苯酚 β -半乳糖苷 ONPG	-
硫化氢 Hydrogen sulfide	-	精氨酸脱羧酶 Arginine decarboxylase	-
D-葡萄糖 D-glucose	+	甲基红 Methyl red	-
反硝化作用 Denitrification	-		

注：+：阳性；-：阴性。

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

2.4 产铁载体菌株 HMGY6B 铁载体类型检测

在 3 mL 离心分离细菌的铁载体溶液中加入 0.1 mL 5 mol/L HCl, 0.5 mL 反应液(50 mL 水中溶解 NaNO₂ 和 Na₂MoO₄·2H₂O 各 10 g), 溶液呈现黄色, 加入 0.1 mL 10 mol/L NaOH, 在 510 nm 波长处扫描, 发现有吸收峰出现, 表明菌株 HMGY6B 所分泌的铁载体含有儿茶酚型铁载体。但羟肟酸型铁载体和羧酸型铁载体未检测出。

2.5 菌株 HMGY6B 生长及产铁载体分泌规律

HMGY6B 对数生长期主要在 8–24 h, 这一时期菌株生长速度明显增快, 铁载体分泌量快速增加, A_s/A_r 值持续下降, 12–14 h 左右降到最低 (A_s/A_r=0.23, +++)。随着菌体逐渐成熟及细菌数量的增加, 对数生长后期 A_s/A_r 值缓慢上升, 但仍维持

在 0.3 左右。36 h 之后细菌生长趋于稳定, 此时 A_s/A_r 值基本维持在 0.3–0.4 之间(图 4)。

2.6 产铁载体细菌对病原真菌生长抑制作用

在平板对峙拮抗试验中, 菌株 HMGY6B 被水稻纹枯病、黄瓜立枯丝核菌不同程度覆盖, 但对黄瓜灰霉病有较好的拮抗作用, 由此初步筛选出一株产生高亲和力铁载体且拮抗黄瓜灰霉病的细菌 HMGY6B (图 5)。黄瓜灰霉病菌的生长与铁离子浓度有很大的相关性, 当 FeCl₃ 浓度为 0.16、2、5、10、50 和 100 μ mol/L 时, 黄瓜灰霉病菌生长量抑制率分别为 71.2%、57.8%、46.3%、35.6%、18.3% 和 3.2%, 结果显示随着铁离子浓度的增加, 对灰霉病抑菌作用逐渐减弱, 铁离子浓度为 50 μ mol/L 时抑制率为 21.66%, 100 μ mol/L 时抑制率仅为

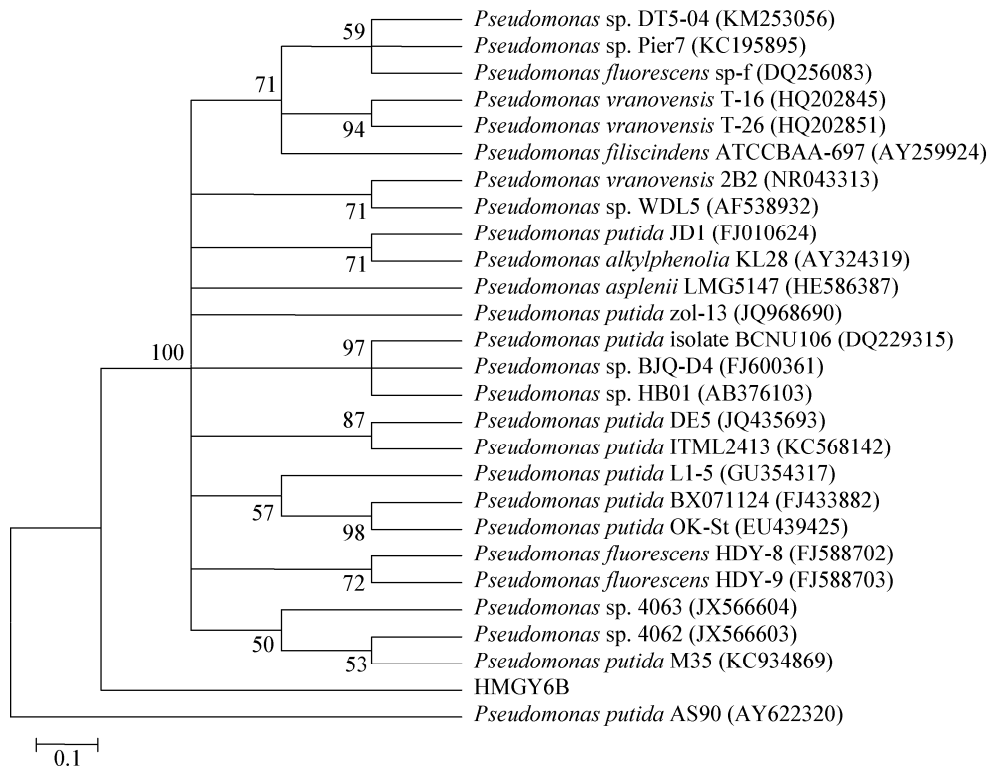


图 3 菌株 HMGY6B 的系统进化树

Figure 3 A Neighbor-Joining bootstrap consensus tree based on 16S rRNA gene sequences of isolate HMGY6B

注: 标尺 0.1 表示序列差异的分支长度; 发育树节点的数值表示 Bootstrap 值; 括号内数值为 GenBank 数据库的登录号.

Note: Bar 0.1 nucleotide divergence. Numbers at node present bootstrap percentages. Those in parentheses are GenBank accession number.

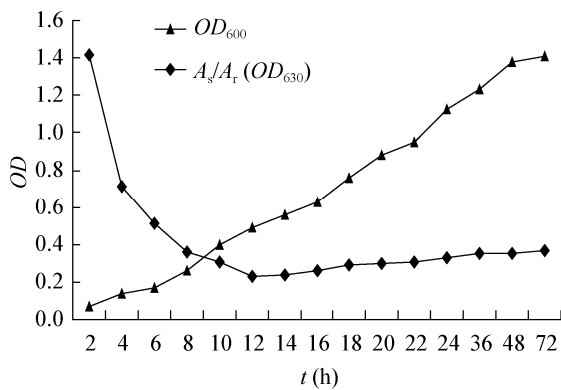


图 4 菌株 HMGY6B 生长曲线及铁载体分泌曲线图

Figure 4 Growth curve and siderophore-producing curve of strain HMGY6B

4.28%, 对黄瓜灰霉病几乎没有抑制作用。在低铁条件下(0.16、2、5、10 μmol/L), 添加铁载体对黄瓜灰霉病有十分显著的抑制作用, 铁载体浓度越高抑制效果越加明显, 当铁载体浓度为 12 mg/L 时, 4 种低铁条件下黄瓜灰霉病抑制率分别为 91.2%、

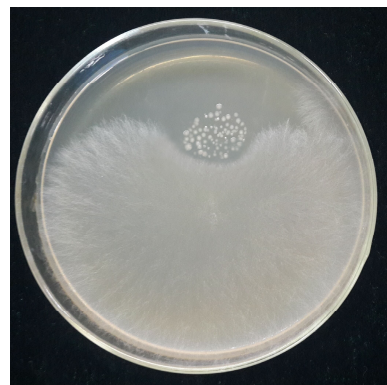


图 5 菌株 HMGY6B 对黄瓜灰霉病菌的拮抗作用

Figure 5 Antagonism against the cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*) of strain HMGY6B

87.3%、84.6%、80.2%, 随着铁离子浓度的增加, 对黄瓜灰霉病的抑制作用显著降低, 50 μmol/L FeCl₃ 时抑制率下降至 30.2%, 100 μmol/L FeCl₃ 时抑制率仅为 5.5%, 对黄瓜灰霉病基本没有抑制作用(图 6)。

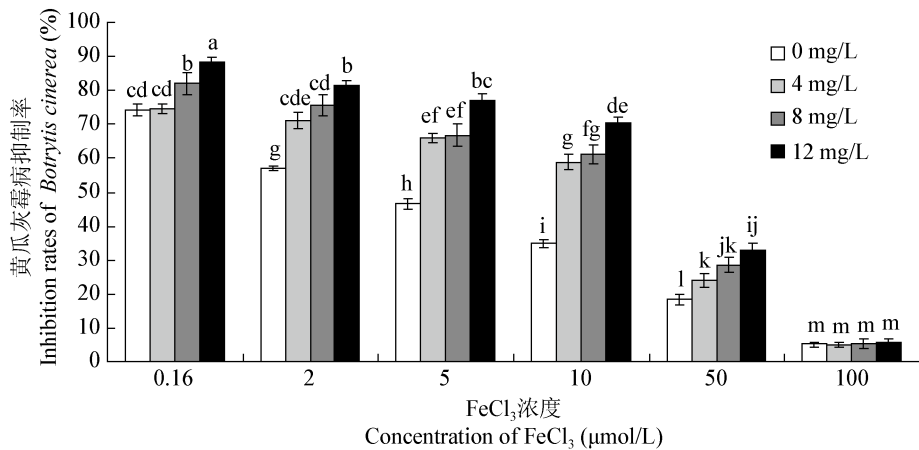


图6 菌株 HMGY6B 对黄瓜灰霉病的抑制作用

Figure 6 Antagonisation of siderophore produced by isolate HMGY6B against cucumber gray mold (*Botrytis cinerea*)

注：每个处理 3 次重复；柱状图上不同小写字母代表在 0.05 水平上差异显著。

Note: Experiments were repeated three times. Columns with different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

3 讨论

本研究从多年生黑麦草根际土壤里筛选得到一株对黄瓜灰霉病有明显拮抗作用的铁载体产生细菌 HMGY6B。通过分离纯化、定性定量检测、菌落形态、生理生化、16S rRNA 基因序列分析，对 HMGY6B 进行了系统鉴定。将 HMGY6B 的 16S rRNA 基因序列在 BLAST 中进行对比，发现 HMGY6B 与 *P. putida* strain AS90 相似性高达 99.8%，其生理生化特征与恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 最相似，但因聚类分析中并未与全部 *Pseudomonas putida* 菌株聚在一起，中间还有其他种类菌株，因此仅能将其鉴定为假单胞菌属菌株，具体分类地位有待进一步的鉴定。分析该种情况存在的原因，很有可能是 GenBank 数据库中不规范 16S rRNA 基因序列的存在^[23]，一定程度上影响了 BLAST 比对结果的可信度。

通过 SA 液体培养基限铁实验，研究了 6 种不同铁离子浓度下，不同铁载体添加量对黄瓜灰霉病的生长抑制实验，结果表明，在低铁条件下，黄瓜灰霉病菌的生长与铁载体浓度有很大的相关性，铁载体浓度越高抑制效果越明显，这与田方等^[21]研究结果相一致，其发现一株产羧酸型铁载体细菌，在低铁条件下(0.16–10.00 $\mu\text{mol/L}$ FeCl_3)对烟草疫霉的抑制率达 92.3%以上，而在富铁条件下(100 $\mu\text{mol/L}$

FeCl_3)抑制率仅为 2.0%。推断 HMGY6B 对黄瓜灰霉病的拮抗机理，可能是 HMGY6B 菌株通过产生超强螯合能力的铁载体，从而螯合了环境中痕量的铁供自身代谢利用，黄瓜灰霉病菌自身无法产生铁载体或产生的铁载体螯合铁的能力没有 HMGY6B 菌株铁螯合能力强，加之黄瓜灰霉病菌本身无法吸收利用 HMGY6B 菌株产生的铁载体，因而在拮抗实验中被 HMGY6B 菌株所抑制。研究表明，利用微生物铁载体还可防治植物在石灰性土壤上的缺铁黄化，Jurkevitch 等^[24]利用假单胞菌 *Pseudomonas* sp. 合成的铁载体，使双子叶植物花生的缺铁黄化在石灰性土壤上得以改善，进一步表明石灰性土壤上双子叶植物的缺铁失绿症状能够通过微生物分泌的铁载体缓解。Yehuda 等^[25]研究也发现，缺铁黄花的植物通过添加少根根霉菌 *Rhizopus arrhizus* 分泌的铁载体，螯合铁离子后逐渐恢复正常生长。有关 HMGY6B 菌株对贵州植物缺铁黄化防治和石灰性缺铁土壤真菌病害的盆栽试验以及菌株自身的生防安全性正在进行当中，作者将对有关的研究结果作进一步报道。

本研究还利用 XAD-2 大孔径树脂吸附层析法获得了 HMGY6B 菌株产生的铁载体，通过 FeCl_3 试验、Arnow's 试验、 CuSO_4 实验检测了其铁载体类型，明确了其主要的功能基团为儿茶酚型铁载

体, 儿茶酚型铁载体主要是一些 2,3-二羟基苯甲酸(2,3-DHBA)的简单衍生物, 它们主要特征是有 1-3 个氨基酸连接于 2,3-DHBA 的羧基上^[26], 其铁载体的详细结构将在今后的研究中通过 RP-HPLC 等分析仪器进一步明确。研究发现, 一些细菌能分泌不止一种类型铁载体, 赵翔等^[13]用反向高效液相色谱检测无铁环境和高铁环境下培养液上清, 比较发现铁载体细菌上清含有 3 种含儿茶酚胺类基团铁载体, 其中包括荧光和非荧光性的脓菌素, 200 $\mu\text{mol/L}$ Fe^{2+} 可完全抑制荧光性质脓菌素的分泌, 而非荧光性质脓菌素则不能被完全抑制, 铁载体的组成型随着培养条件的变化发生了变化。

参 考 文 献

- [1] Haas D, D'efago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(4): 307-319
- [2] Taghavi S, van der Lelie D, Hoffman A, et al. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638[J]. PLoS Genetics, 2010, 6(5): e1000943
- [3] Catara V. *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource?[J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(3): 233-244
- [4] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, et al. Endophytic bacteria and their potential applications[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6): 583-606
- [5] Xie XJ, Wang JG. Study on effect factor of the production of catechol-type siderophores secreted by a strain of soil bacteria[J]. Microbiology China, 2006, 33(1): 105-109 (in Chinese)
谢小军, 王敬国. 一株细菌儿茶酚型铁载体分泌的影响因素研究[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 105-109
- [6] Manninen M, Mattila-Sandholm T. Methods for the detection *Pseudomonas siderophores*[J]. Journal Microbiological Methods, 1994, 19(3): 223-234
- [7] Barzanti R, Ozino F, Bazzicalupo M, et al. Isolation and characterization of endophytic bacteria from the nickel hyperaccumulator plant *Alyssum bertolonii*[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(2): 306-316
- [8] Zhu PL, Du BH, Ding YQ, et al. Genetic diversity and phylogeny of siderophore producing bacteria isolated from cotton rhizosphere in China's Xinjiang[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(5): 1568-1574 (in Chinese)
朱彭玲, 杜秉海, 丁延芹, 等. 新疆棉花根际土壤铁载体产生菌的遗传多样性及系统发育研究[J]. 中国农业科学, 2009, 42(5): 1568-1574
- [9] He M, Huang Y, Wang J, et al. Isolation, characterization and mutation breeding of siderophore-producing bacterium MX-26 of peach rhizosphere[J]. Acta Phytologica Sinica, 2011, 38(5): 432-436 (in Chinese)
何苗, 黄云, 王靖, 等. 桃树根际铁载体产生菌 MX-26 的分离鉴定及诱变选育[J]. 植物保护学报, 2011, 38(5): 432-436
- [10] Yu SF, Ding YQ, Yao LT, et al. Isolation and identification of siderophores producing bacteria E19 from cotton rhizosphere[J]. Biotechnology, 2007, 17(6): 19-21 (in Chinese)
于素芳, 丁延芹, 姚良同, 等. 一株棉花根际铁载体产生菌 E19 的分离鉴定[J]. 生物技术, 2007, 17(6): 19-21
- [11] Fang ZD. Research methods of plant disease[M]. 3rd Edition. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 41-50 (in Chinese)
方中达. 植物研究方法[M]. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 41-50
- [12] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56
- [13] Zhao X, Chen SX, Xie ZX, et al. Isolation, identification and over-siderophores production of *Pseudomonas fluorescens* sp-f[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(5): 691-695 (in Chinese)
赵翔, 陈绍兴, 谢志雄, 等. 高产铁载体荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* sp-f 的筛选鉴定及其铁载体特性研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(5): 691-695
- [14] Machuca A, Milagres AMF. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on the siderophore production by *Aspergillus*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2003, 36(3): 177-181
- [15] Xiao YH, Li J, Liu ZX, et al. Isolation, screening and identification of sidero-carrier bacteria from *Huperzia serrata* Rhizosphere[J]. Journal of Microbiology, 2013, 33(2): 63-67 (in Chinese)
肖艳红, 李菁, 刘祝祥, 等. 1 株蛇足石杉根际铁载体细菌的分离、筛选与鉴定[J]. 微生物学杂志, 2013, 33(2): 63-67
- [16] Alain B, Isabelle G, Henri M, et al. Characterization of fluorescent and nonfluorescent peptide siderophores produced by *Pseudomonas syringae* strains and their potential use in strain identification[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(4): 1718-1727
- [17] Risse D, Beiderbeck H, Taraz K, et al. Corrugatin, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugata*[J]. Zeitschrift für Naturforschung. C, 1998, 53(5/6): 295-304
- [18] Baakza A, Vala AK, Dave BP, et al. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2004, 311(1): 1-9
- [19] Rong LY, Yao T, Zhao GQ, et al. Screening of siderophore-producing PGPR bacteria and their antagonism against the pathogens[J]. Plant Protection, 2011, 37(1): 59-64 (in Chinese)
荣良燕, 姚拓, 赵桂琴, 等. 产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用[J]. 植物保护, 2011, 37(1): 59-64
- [20] Lin TX, Tang M, Huang MY, et al. Screening and identification of a high yield siderophore-producing bacteria SS05 isolated from cotton soil[J]. Microbiology China, 2012, 39(5): 668-676 (in Chinese)
林天兴, 唐梅, 黄明远, 等. 高产铁载体棉田土壤细菌 SS05 的筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2012, 39(5): 668-676
- [21] Tian F, Ding YQ, Zhu H, et al. Screening, identification and antagonistic activity of a siderophore-producing bacteria G-229-21T from rhizosphere of tobacco[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(5): 631-637 (in Chinese)
田方, 丁延芹, 朱辉, 等. 烟草根际铁载体产生菌 G-229-21T 的筛选、鉴定及拮抗机理[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 631-637
- [22] Manjanatha MG, Loynachan TE, Atherly AG. Tn5 mutagenesis of Chinese *Rhizobium fred* for siderophore overproduction[J]. Soil Biology Biochemistry, 1992, 24(2): 151-155
- [23] Ashelford KE, Chuzhanova NA, Fry JC, et al. At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 7724-7736
- [24] Jurkevitch E, Chen Y, Hadar Y. Involvement of bacterial siderophores in the remedy of lime-induced chlorosis in peanut[J]. Soil Science Society of America Journal, 1988, 52(4): 1032-1037
- [25] Yehuda Z, Shenker M, Romheld V, et al. The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants[J]. Plant Physiology, 1996, 112(3): 1273-1280
- [26] Barton LL. Iron Chelation in Plants and Soil Microorganisms[M]. New York: Academic Press, 1993: 3,261