

具铁载体活性病原细菌的筛选及铁摄取干预对其生长影响

何翔^{1#}, 张庆^{2#}, 李楚¹, 番华彩², 李铭刚³,
徐胜涛², 陈齐斌¹, 杨明英², 杨佩文^{2*}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201; 2. 云南省农业科学院农业环境资源研究所, 昆明 650205; 3. 云南大学, 昆明 650091)

摘要 绝大多数病原菌可分泌铁载体, 利用螯合性铁载体及病原菌对 Fe^{3+} 的竞争可实现病害的有效防控。从植物病原菌中筛选高产铁载体的优势菌株, 并基于 EDTA 对铁离子的强螯合性, 可为病害防控提供新的方法。本研究采用 CAS 检测法和光吸收法对 42 株供试植物病原菌株进行定性、定量筛选及铁载体类型的初步鉴定, 依据菌株形态电镜观察和分子生物学技术对优势菌株进行分类鉴定, 并基于微量稀释法测定 EDTA 对优势菌株的最低抑菌浓度。经定性、定量筛选, 确定 7 株供试细菌为高产铁载体优势菌株, 分泌铁载体类型为儿茶酚型和异羟肟酸型; 根据形态特征观察和分子生物学鉴定, 菌株 TZT-057 和 TZT-058 与恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* 的一致性最高, TZT-059、TZT-063 和 TZT-064 与肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 的一致性最高, TZT-062、TZT-073 分别与鲁氏不动杆菌 *Acinetobacter lwoffii*、迪克氏菌 *Dickeya zeae* 的一致性最高。根据微量稀释法抑菌活性测定结果可知, EDTA 对菌株 TZT-058、TZT-073 的抑菌效果较好, 抑菌率分别为 85.16%、80.08%, 表明强整合剂 EDTA 能有效干预病原细菌对铁元素的摄取过程, 进而影响其生长繁殖。

关键词 植物病原菌; 铁载体; 筛选鉴定; 乙二胺四乙酸

中图分类号: S 476 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2019131

Screening of the pathogenic bacteria with siderophore-producing activity and the effect of intervention in iron uptake on its growth

HE Xiang^{1#}, ZHANG Qing^{2#}, LI Chu¹, FAN Huacai², LI Minggang³,
XU Shengtao², CHEN Qibin¹, YANG Mingying², YANG Peiwen^{2*}

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Institute of Agricultural Environment and Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; 3. Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract Most pathogenic microorganisms have the function of secreting siderophore, and the competition between sorghum siderophore and pathogens against Fe^{3+} can be used to effectively prevent and control diseases. The dominant strains producing high-yield siderophore were screened from plant pathogens, and based on the strong chelating property of EDTA to iron, it could provide a new method for the control of plant diseases. In this study, we qualitatively and quantitatively screen the pathogenic strains of different host plants and preliminarily identified the siderophore types by using the CAS method and light absorption method. Meanwhile, the biological identification of the dominant strains was performed by using the electron microscopy and 16S rDNA sequence. The minimum inhibitory concentration of EDTA against dominant strains was determined based on the microdilution method. The results showed that there were 7 strains that were identified as high siderophore-producing dominant strains from the test bacteria through qualitative and quantitative screening, and the types of secretory sid-

收稿日期: 2019-03-17 修订日期: 2019-05-12

基金项目: 国家自然科学基金(31600349, 31660600, 31760019); 国家公益性行业(农业)科研专项(201503119-03-02)

* 通信作者 E-mail: 398036877@qq.com

为并列第一作者

erophore were catecholates and hydroxamates. Base on the morphological characteristics and molecular identification, the strains TZT-057 and TZT-058 shared similarity with *Pseudomonas putida*; the strains TZT-059, TZT-063 and TZT-064 were very similar to *Klebsiella pneumoniae*; the strain TZT-062 was analogous to *Acinetobacter lwoffii*, and strain TZT-073 resembled *Dickeya zeae*. According to the microbial dilution assay, EDTA had better antibacterial activity against strains TZT-058 and TZT-073, and the inhibition rates were 85.16% and 80.08%, respectively. The results suggested that EDTA could effectively affect the uptake process of iron by pathogenic bacteria, and affect its growth and reproduction.

Key words plant pathogen; siderophore; screening and identification; EDTA

铁在地壳和土壤中的含量十分丰富,同时铁作为地球上几乎所有生物体必需的营养元素之一,在各项机能代谢活动和酶促反应中发挥着重要作用;但在自然界中性或碱性有氧条件下,铁主要以难溶的 Fe^{3+} 化合物形式存在,可溶性 Fe^{2+} 含量较匮乏,生物可利用率极低^[1-3]。农业生产中植株缺铁现象较为普遍,给农林作物生物量的生产和植株系统抗性造成极大的影响。为适应高氧低铁的胁迫环境,许多微生物自身诱导合成分泌一类与 Fe^{3+} 具高亲和性且能与其特异性螯合的小分子次级代谢产物—铁载体,用以螯合宿主体内或周围环境中大量难溶性的铁,并通过氧化还原反应将其转化为可溶性的铁,为生物体提供充足的铁元素,同时也能有效减少环境中病原菌可利用铁的含量而降低其致病力,增强植株抗性^[4-5]。

关于铁载体的研究早在1950年前后就有报道,根据铁载体官能团和中心结构的多样性,可分为儿茶酚型(catecholates)、羟肟酸型(hydroxamates)和羧酸盐型(carboxylates)^[6-7]。相较于其他微生物次级代谢产物,关于植物病原菌分泌铁载体的研究还较少^[8-9]。目前,有关植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)、植物内生菌(endophyte)等微生物分泌铁载体的研究较多,且

主要为铁载体产生菌初步分离筛选的研究^[10-12]。而有关植物病原菌分泌铁载体的研究,目前国内外的报道还较少。乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)是一种重要的强螯合剂,能与环境中的碱金属、稀土元素和过渡金属等形成稳定且水溶性较好的螯合物。微生物纯培养环境中,EDTA的外源添加能介导微生物对必需金属元素的吸收利用,进而影响其生长繁殖。因此对铁载体产生菌进行相关研究,充分利用具分泌铁载体功能的植物病原菌菌种资源,并测定抑菌药物对其的最低抑菌浓度(MIC),探索分泌型铁载体在植物病害防治中的作用机制具有重要的研究前景和补充意义。

为挖掘更多的微生物资源,本研究采用CAS检测法和光吸收法,从不同宿主植物病原细菌中筛选高产铁载体的优势菌株,并基于微量稀释法测定EDTA对其最低抑菌浓度(MIC),以期为其分泌铁载体能力的植物病原菌菌种资源的研究、开发和应用提供一定的理论依据和数据支撑。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

42株供试植物病原细菌均为云南省农业科学院农业环境资源研究所保藏菌种(表1)。

表 1 供试菌株信息
Table 1 The summary of test strains

菌株编号 Strain code	寄主植物 Host	发病部位 Disease site	菌株编号 Strain code	寄主植物 Host	发病部位 Disease site
TZT-021	三七 <i>Panax notoginseng</i>	根部	TZT-100	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	茎秆
TZT-056	七叶一枝花 <i>Paris polyphylla</i>	茎秆	TZT-103	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	茎秆
TZT-057	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	茎秆	TZT-104	滇黄精 <i>Polygonatum kingianum</i>	块茎
TZT-058	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	茎秆	TZT-105	滇黄精 <i>P. kingianum</i>	块茎
TZT-059	香蕉 <i>Musa nana</i>	叶片	TZT-106	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	果实
TZT-060	香蕉 <i>M. nana</i>	茎秆	TZT-107	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	茎秆
TZT-061	香蕉 <i>M. nana</i>	叶片	TZT-108	三七 <i>P. notoginseng</i>	茎秆
TZT-062	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	茎秆	TZT-109	玉米 <i>Zea mays</i>	叶片
TZT-063	香蕉 <i>M. nana</i>	叶片	TZT-110	滇黄精 <i>P. kingianum</i>	叶片

续表 1 Table 1(Continued)

菌株编号 Strain code	寄主植物 Host	发病部位 Disease site	菌株编号 Strain code	寄主植物 Host	发病部位 Disease site
TZT-065	魔芋 <i>Amorphophallus rivieri</i>	茎秆	TZT-112	白及 <i>Bletilla striata</i>	叶片
TZT-066	香蕉 <i>M. nana</i>	茎秆	TZT-113	水稻 <i>O. sativa</i>	叶片
TZT-073	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	茎秆	TZT-114	柠檬 <i>Citrus limon</i>	果实
TZT-092	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	茎秆	TZT-115	马铃薯 <i>S. tuberosum</i>	块茎
TZT-093	水稻 <i>Oryza sativa</i>	叶片	TZT-116	珠子参 <i>Codonopsis convolvulacea</i>	茎秆
TZT-094	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	块茎	TZT-117	珠子参 <i>C. convolvulacea</i>	叶片
TZT-095	水稻 <i>O. sativa</i>	茎秆	TZT-118	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	茎秆
TZT-096	白菜 <i>Brassica pekinensis</i>	叶片	TZT-119	烟草 <i>N. tabacum</i>	叶片
TZT-097	水稻 <i>O. sativa</i>	叶片	TZT-120	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	叶片
TZT-098	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	茎秆	TZT-121	秦艽 <i>Gentiana macrophylla</i>	块茎
TZT-099	七叶一枝花 <i>P. polyphylla</i>	茎秆	TZT-122	当归 <i>Angelica sinensis</i>	块茎

1.2 供试溶液及培养基的制备

CAS 检测液:称取 0.060 5 g 铬天青 S(chromeazurol S, CAS)溶于 50 mL 去离子水中,并加入 10 mL FeCl₃ 溶液(1 mmol/L FeCl₃·6H₂O+10 mmol/L HCl)搅拌混匀,标记为“A 液”;再称取 0.072 9 g 十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, HDTMA)溶于 40 mL 去离子水,标记为“B 液”;最后将 A 液缓慢倒入 B 液中,并搅拌均匀。

TTC 显色剂的制备:称取 1.0 g 氯化三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)溶于 10 mL 去离子水中,用 0.22 μm 无菌滤膜过滤后转入无菌 EP 管中保存备用,得到 0.1 g/mL 的无菌 TTC 溶液。

EDTA 药液的制备:称取 40 mg EDTA 溶于 2 mL 去离子水中,并用 0.22 μm 无菌滤膜过滤后转入无菌 EP 管中保存备用,得到 20 mg/mL 的无菌测试母液。

醋酸盐缓冲液的配制:将 847 mL 0.1 μmol/L 的 H₃COOH 溶液加入到容量瓶内,并加 0.1 μmol/L 的 CH₃COONa 溶液,定容至 1 000 mL,盖紧瓶塞振荡混匀。

供试菌株菌悬液的制备:无菌条件下,在供试菌株斜面内加入 2 mL 无菌去离子水并刮取菌苔,转入无菌 EP 管中保存备用;吸取一定量的菌液于无菌试管内,加入无菌去离子水稀释,采用麦氏比浊法测定待测液的 OD₆₂₅,使稀释后的待测液 OD₆₂₅ 介于 0.098 0~0.220 9 之间。

无铁查氏液体培养基:葡萄糖 30.0 g/L、硝酸钠

2.0 g/L、三水合磷酸钾 1.0 g/L、氯化钾 0.5 g/L、七水合硫酸镁 0.5 g/L、8-羟基喹啉 0.75 g/L、去离子水 1.0 L。

LB 去铁液体培养基:酵母提取物 5.0 g/L、氯化钠 10.0 g/L、蛋白胨 10.0 g/L、8-羟基喹啉 0.75 g/L、去离子水 1.0 L,pH 自然(固体斜面培养基添加琼脂,15~20 g/L)。

TTC-LB 液体培养基:40 mL 常规无菌 LB 液体培养基中加入 2.0 mL 0.1g/mL TTC 溶液,混匀后密封保存备用。

1.3 分泌型铁载体产生菌定性初筛和定量复筛

从 LB 固体斜面培养基上活化的细菌中挑取单菌落接种至 LB 去铁液体培养基内,每株菌株 3 个重复,置于 28℃ 微生物培养箱内培养 2~3 d,当液体培养基表面出现浑浊时,吸取 50 μL 发酵培养液于 96 孔板内,加入等体积 CAS 检测液充分混匀,以饱和的 EDTA 溶液(与 CAS 检测液反应呈红色)为阳性对照,未接种的培养液与 CAS 检测液等体积混合作为阴性对照,观察并记录颜色变为红色、橙红色的培养液,并将相应菌株作为复筛菌株。

初筛入选的菌株用无铁查氏液体培养基于 28℃ 150 r/min 的恒温摇床(型号:HS-200B)上培养 48 h,培养结束后吸取 2~5 mL 培养液用 0.22 μm 无菌滤膜过滤后加入等体积的 CAS 检测液,静置 1 h 后用全波长酶标仪(型号:Multiska GO)测定其 OD₆₃₀(记作“As”),用相同方法测定未接菌的液体培养基的 OD₆₃₀ 作为参比值(记作“Ar”)。铁载体的浓度用铁载体活性单位(siderophore unit, SU)表示,SU=[(Ar-As)/Ar]×100%,测定重复 3 次,取平均值

进行比较分析。

1.4 复筛菌株铁载体的化学结构初步鉴定

1.4.1 异羟肟酸型铁载体

采用氯化铁检测法(FeCl_3 test)鉴定:1 mL 培养滤液中加入 1 mL 2% FeCl_3 溶液,出现红色或紫色表明测试样品中含有铁载体物质。用紫外分光光度计检测,在 420~450 nm 之间出现吸收峰则说明螯合物为异羟肟酸型铁载体。

1.4.2 儿茶酚型铁载体

采用氯化铁检测法鉴定:1 mL 培养滤液中加入 1 mL 2% FeCl_3 溶液,用紫外分光光度计检测,如果在 495 nm 附近出现吸收峰则说明螯合物为儿茶酚型铁载体。

1.4.3 羧酸型铁载体

采用分光光度法鉴定:1 mL 培养滤液中加入 1 mL 0.25 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 溶液和 2 mL pH4.0 的醋酸盐缓冲液,用紫外分光光度计检测,在 190~280 nm 之间出现吸收峰则说明螯合物为羧酸型铁载体。

1.5 菌株 16S rDNA 扩增测序、序列分析及菌落形态电镜观察

分泌型铁载体产生菌菌株的 16S rDNA 扩增测序参照王丽丽等^[13]的方法。测序结果经 BLAST 搜索(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)后与 GenBank 数据库中相关种属的基因序列进行比较分析,选用同源性较高的模式菌株序列作为参比对象,用 Clustal X 1.8 软件进行多序列比对,计算供试菌株与参比菌株序列的相似性。系统发育分析时排除碱基缺失位点,采用邻接法(neighbor-joining analysis)用 MEGA 7 构建供试菌株与参比菌株之间的系统发育树。其中,Bootstrap 值设定为 1 000,其余均为默认值。分泌型铁载体产生菌菌落形态扫描电镜观察参照侯旭等^[14]的方法。

1.6 EDTA 对分泌型铁载体产生菌生长的影响

1.6.1 定性检测

采用微量稀释法进行定性检测,每菌株各 3 个重复。分别在 96 孔板内添加 100 μL 无菌 TTC-LB 液体培养基;A1~A12 设置为阴性对照,只添加 100 μL 无菌 TTC-LB 液体培养基,不添加菌悬液,B1~B12 设置为生长对照,添加 100 μL 无菌 TTC-LB 液体培养基和 100 μL 菌悬液;在 C1、D1、E1 孔

内加入 100 μL 20 mg/mL 的无菌 EDTA 药液,并采用倍半稀释的方法对 EDTA 药液进行稀释,直至最后一孔,此时该三列孔内 EDTA 的浓度从左往右依次为:10、5、2.5……0.156 25 mg/mL,而后每孔再加入 100 μL 稀释好的菌悬液,此时每孔的药液浓度从左到右依次为:5、2.5、1.25……0.078 1 mg/mL;将 96 孔板放入 30℃ 恒温培养箱培养 16 h,定期观察并记录孔板的颜色变化。

1.6.2 定量测定

采用微量稀释法进行定量测定,每菌株各 3 重复。分别在 96 孔板内添加 100 μL 无菌 LB 液体培养基;A1~A12 设置为阴性对照,只添加 100 μL 无菌 LB 液体培养基,不添加菌悬液,B1~B12 设置为生长对照,添加 100 μL 无菌 LB 液体培养基和 100 μL 菌悬液;在 C1、D1、E1 孔内加入 100 μL 20 mg/mL 的无菌 EDTA 药液,并对 EDTA 药物进行倍半稀释直至最后一孔,此时该三列孔内浓度从左往右依次为:10、5、2.5……0.156 25 mg/mL,而后再加入 100 μL 稀释好的菌悬液,此时每孔的药液浓度从左到右依次为:5、2.5、1.25……0.078 1 mg/mL;将 96 孔板放入 30℃ 恒温培养箱培养 16 h,测定每块板的 OD_{630} ,并根据公式计算 EDTA 对供试菌株的抑菌率。测定过程中,药品组吸光度值与生长对照组区别不大的孔样可忽略不计,仅明显低于对照组的样品的吸光度值才进行抑制率计算。计算公式如下:

抑制率 = (生长对照组吸光度 - 药品组吸光度) / 生长对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 分泌型铁载体产生菌的定性初筛和定量复筛

根据 CAS 检测液特有的显色反应,从 42 株供试细菌中初步筛选出 18 株有颜色变化的细菌,其中有 13 株为红色或橙红色,5 株为紫色(表 2),因而可将这 18 株细菌作为复筛目标菌株。根据 18 株复筛菌株培养液和 CAS 检测液混合后颜色变化的深浅可知,菌株 TZT-057、TZT-058、TZT-059、TZT-062、TZT-063、TZT-064 和 TZT-073 与 CAS 检测液显色反应过程较迅速,反应后呈鲜红色,表明分泌铁载体的活性最强。因而这 7 株复筛菌株作为后续研究对象。

表 2 96 孔板复筛结果¹⁾

Table 2 The re-screening results of siderophore by using 96-well plate

96 孔板 96-well plate	菌株编号 Strain code	CAS 反应颜色 The color of CAS reaction	96 孔板 96-well plate	菌株编号 Strain code	CAS 反应颜色 The color of CAS reaction
E3	TZT-021	紫色	F6	TZT-064	红色
E4	TZT-056	橘红色	F7	TZT-065	橘红色
E5	TZT-057	红色	F8	TZT-066	紫色
E6	TZT-058	红色	G3	TZT-073	红色
E7	TZT-059	红色	G4	TZT-092	橘红色
E8	TZT-060	橘红色	G5	TZT-098	橘红色
F3	TZT-061	紫色	G6	TZT-107	橘红色
F4	TZT-062	红色	G7	TZT-113	紫色
F5	TZT-063	红色	G8	TZT-121	紫色

1) 96 孔板中,E1、F1、G1 添加 EDTA+CAS 溶液(CAS 显色反应为红色);E2、F2、G2 添加 CAS 空白溶液。
In the 96-well plate, the samples E1, F1 and G1 are added with the solution EDTA+CAS (The CAS reaction is red); E2, F2 and G2 are added with CAS control solution.

如表 3 所示,复筛选出的 7 株优势菌株其 As/Ar 均小于 0.5,且铁载体活性单位(SU)均大于 50.0%,表明所选的 7 株优势菌株均为高产铁载体菌株。

表 3 优势菌株分泌铁载体的定量检测¹⁾

Table 3 Quantitative test of siderophore produced by positive bacterial strains

菌株编号 Strain	OD ₆₃₀	As/Ar	铁载体活性/% Siderophore activity unit
CK(Ar)	1.159	—	—
TZT-057 (As)	(0.462±0.023)d	(0.400±0.020)c	(60.140±3.007)ab
TZT-058 (As)	(0.448±0.022)d	(0.390±0.020)c	(61.350±3.068)a
TZT-059 (As)	(0.531±0.027)ab	(0.460±0.023)ab	(54.190±2.710)cd
TZT-062 (As)	(0.573±0.029)a	(0.490±0.025)a	(50.560±2.528)d
TZT-063 (As)	(0.518±0.026)bc	(0.450±0.023)ab	(55.310±2.766)bcd
TZT-064 (As)	(0.526±0.026)bc	(0.450±0.023)ab	(54.620±2.731)cd
TZT-073 (As)	(0.482±0.024)cd	(0.420±0.021)bc	(58.410±2.921)abc

1) 表中数据为平均值±标准差。同一列中不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。
The data are means±SD. The different lowercase letters in the same column indicate significant difference by using Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

2.2 复筛菌株铁载体类型的鉴定

如表 4 所示,菌株 TZT-059、TZT-062、TZT-063、TZT-064 能合成分泌儿茶酚型铁载体和异羟肟酸型铁载体,菌株 TZT-057、TZT-058 和 TZT-073 只能合成分泌儿茶酚型铁载体。

2.3 分泌型铁载体产生菌的分子生物学鉴定

2.3.1 菌株 16S rDNA 序列分析结果及系统发育进化树的构建

在初步形态鉴定的基础上,利用 16S rDNA 序列 PCR 扩增通用引物进一步对筛选到的 7 株高产铁载体优势菌株进行目标序列的 PCR 扩增、测序。测序结果在 GenBank 数据库中进行相似性搜索,并与同源性较高的典型标准菌株序列进行同源对比,明确菌株的生物学分类地位。

表 4 铁载体的化学结构鉴定¹⁾

Table 4 Chemical structure identification of siderophores

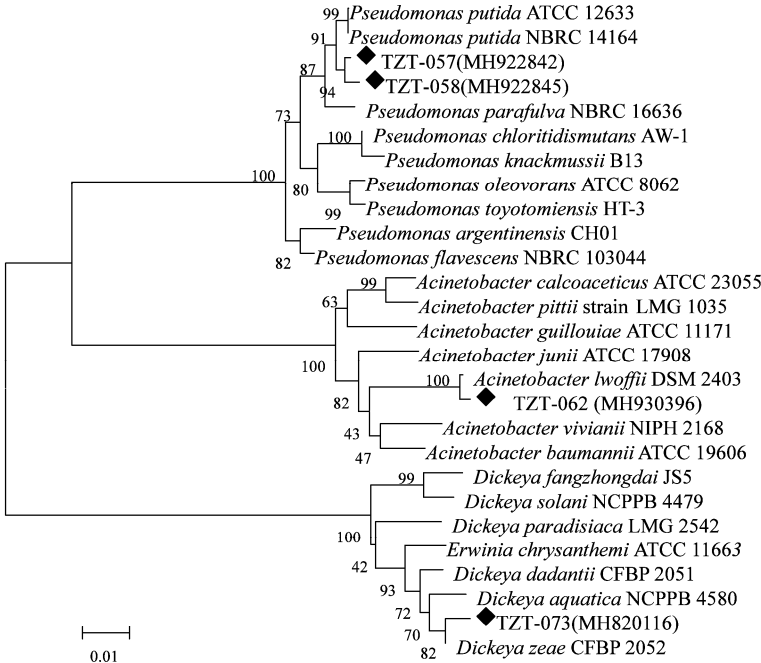
菌株 编号 Strain code	氯化铁检测法 FeCl ₃ test		分光光度法 Spectrophotometric test
	儿茶酚型峰 值在 495 nm	异羟肟酸型峰 值在 420~450 nm	羧酸盐型峰值 在 190~280 nm
	Peak of catecholate type at 495 nm	Peak of hydroxamate type at 420—450 nm	Peak of carboxylate type at 190—280 nm
TZT-057	+	—	—
TZT-058	+	—	—
TZT-059	+	+	—
TZT-062	+	+	—
TZT-063	+	+	—
TZT-064	+	+	—
TZT-073	+	—	—

1) +: 表明吸收峰;—: 表明没有吸收峰。
+: Indicates absorption peak; —: Indicates no absorption peak.

研究结果表明:菌株 TZZT-059(登录号:MH922846)、TZZT-063(登录号:MH930397)和 TZZT-064(登录号:MH930398)的 16S rDNA 基因片段分别为 1 439、1 441、1 445 bp。其中,菌株 TZZT-059 和肺炎克雷伯氏菌 *K. pneumoniae*(登录号:MF767577)的相似性达 99.73%,TZZT-063 和肺炎克雷伯氏菌 *K. pneumoniae*(登录号:KJ803926)的相似性达 99.86%,TZZT-064 和肺炎克雷伯氏菌 *K. pneumoniae*(登录号:KU937377)的相似性达 99.85%,菌株间均具有极高同源性。

如图 1 所示,菌株 TZZT-057(登录号:MH922842)、TZZT-058(登录号:MH922845)、TZZT-062(登录号:MH930396)和 TZZT-073(登录号:MH820116)的 16S rDNA 基因片段分别为 1 397、1 398、1 401 bp 和 1 351 bp。采用 BLAST 搜索与 GenBank 数据库

中收录序列比对,选择有详细信息的 18 株标准菌株(type culture strain)作为参比菌株,进行 Clustal W 多重比对,并构建系统发育进化树。菌株 TZZT-057、TZZT-058 和 *P. putida*(登录号:NR114479)间具有极高同源性,初步鉴定为普罗特斯门,γ 普罗特斯纲,假单胞菌目,假单胞菌科,假单胞菌属,恶臭假单胞 *P. putida*。菌株 TZZT-062 和 *A. lwoffii*(登录号:NR026209)的相似性达 99.76%,菌株间具有极高同源性,初步鉴定为变形菌门,γ-变形菌纲,假单胞菌目,莫拉氏菌科,不动杆菌属,鲁氏不动杆菌 *A. lwoffii*。菌株 TZZT-073 和 *D. zeae*(登录号:NR041923)的相似性达 99.81%,菌株间具有极高同源性,初步鉴定为变形菌门,γ-变形菌纲,肠杆菌目,果胶杆菌科,欧文氏菌属,迪克氏菌 *Dickeya zeae*。



系统发育进化树采用邻接法构建,自展数为1 000。每隔节点上的数值表示自展数的贡献值。每个菌株名称后括号中的数字是 GenBank 中的 16S rDNA 基因序列登录号。NBRC: 日本技术评价研究所生物资源中心; ATCC: 美国典型菌种保藏中心; DSM: 德国微生物菌种保藏中心; NCPPB: 英国国家植物性原细菌保藏中心; LMG: 比利时根特大学微生物实验室; CFBP: 法国植物病菌收集保藏中心

The rooted tree is constructed by using neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 1 000 resampling. The number at each node indicates the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each strain name are 16S rDNA gene sequence accession numbers in GenBank. NBRC: NITE Biological Resource Center, Japan; ATCC: American Type Culture Collection, USA; DSM: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Germany; NCPPB: National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, UK; LMG: Laboratorium voor Microbiologie, Universiteit Gent, Belgium; CFBP: Collection Francaise des Bacteries Phytopathogenes, France

图 1 菌株 TZZT-057、TZZT-058、TZZT-062 和 TZZT-073 基于 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

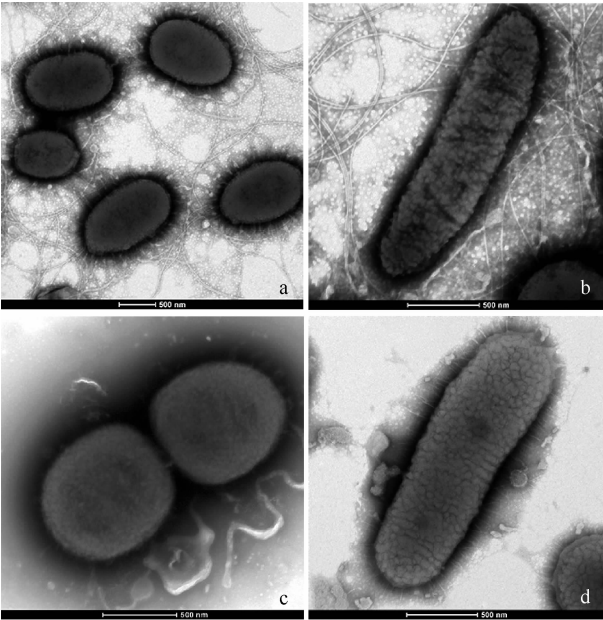
Fig. 1 Phylogenetic tree of strains TZZT-057, TZZT-058, TZZT-062 and TZZT-073 based on 16S rDNA sequences

2.3.2 分泌型铁载体产生菌菌落形态电镜观察

4 株产铁载体优势菌株经扫描电镜放大 21 000 倍后其形态结果如图 2 所示。菌株 TZZT-057 为椭圆状单球菌,直径 0.63~0.75 μm,菌株表面附着一层细

且短的菌毛,顶端着生粗且长的丝状单生鞭毛;菌株 TZZT-058 为长杆状菌,长 2.26 μm,宽 0.71 μm,菌株表面附着少量细短的菌毛,顶端着生粗且长的丝状单生鞭毛;菌株 TZZT-062 呈圆球状,为双球菌,直径

0.86~0.88 μm ,菌株表面无菌毛,顶端着生略短的单生鞭毛;菌株 TZT-073 为长杆状菌,长 2.14 μm ,宽 0.84 μm ,菌株表面附着一层细短的菌毛,顶端着生粗且长的丝状鞭毛。



a: TZT-057; b: TZT-058; c: TZT-062; d: TZT-073。标尺=500 nm
a: TZT-057; b: TZT-058; c: TZT-062; d: TZT-073。Scale=500 nm

图 2 4 株优势菌株电镜形态观察(放大倍数为 21 000 倍)
Fig. 2 Morphological observation of four dominant strains by electron microscopy (magnification is 21 000 times)

2.4 EDTA 对分泌型铁载体产生菌生长的影响

根据微量稀释法对 7 株优势菌株定性、定量抑菌活性测定结果及判定标准可知,EDTA 对菌株 TZT-058 (Accession no. MH922845)、TZT-073 (Accession no. MH820116)有较好的抑菌活性。菌株 TZT-058 生长对照组吸光度值为 0.505 1,药品组平均吸光度值为 0.074 9,根据计算公式,EDTA 对菌株 TZT-058 的抑菌率为 85.16%,对应的最低抑菌浓度为 0.019 5 mg/mL;菌株 TZT-073 生长对照组吸光度值为 0.296 4,药品组平均吸光度值为 0.059 1,根据计算公式,EDTA 对菌株 TZT-058 的抑菌率为 80.08%,对应的最低抑菌浓度为 0.312 5 mg/mL。结果表明,当培养环境中存在强螯合剂 EDTA 时,其能更有效地干预病原细菌对铁元素的摄取过程,影响自身的各项机能代谢活动,抑制生长繁殖。

3 讨论

EDTA 能与铁离子特异性螯合,且可溶性的铁

离子又在微生物各项机能代谢过程中发挥着重要作用。前期研究表明,当植物病原菌培养环境中存在 EDTA 溶液时,EDTA 能利用其较强的螯合能力更有效的竞争环境中的铁离子,使病原物处于缺铁胁迫条件,延缓铁-蛋白复合物的形成,直接影响病原物对铁离子的吸收利用机制,进而抑制其生长繁殖,起到防控病害的作用。本研究首次以植物病原细菌为筛选靶标,采用 CAS 检测法和光吸收法对 42 株不同宿主植物病原细菌进行产铁载体活性筛选,并确定 7 株高产铁载体的优势菌株。经铁载体化学结构的初步鉴定,所产铁载体类型为异羟肟酸型和儿茶酚型。有研究指出,细菌主要合成分泌异羟肟酸型和儿茶酚型铁载体^[15],本研究结果与之相吻合。此外,比较分析本研究两种类型铁载体的铁螯合能力,儿茶酚型>异羟肟酸型,与 Wang 等^[16]的研究结果一致;此外,本研究筛选到的 7 株植物病原菌均能分泌儿茶酚型铁载体,且 SU 均大于 50%。本研究还开展了抑菌药物 EDTA 对优势菌株的抑菌活性研究,结果表明 EDTA 对 *P. putida* 和 *D. zeae* 均具有较好的抑菌活性。

经分子生物学鉴定,本研究筛选到 7 株产铁载体优势菌株均为革兰氏阴性菌,*K. pneumoniae* 3 株、*P. putida* 2 株、*A. lwoffii* 和 *D. zeae* 各 1 株。目前尚未有关于 *A. lwoffii* 和 *D. zeae* 分泌铁载体的研究报道,因而本研究筛选出的这两株菌株可作为后续铁载体相关研究工作的优选材料。目前,已有大量关于克雷伯氏菌属、假单胞菌属、不动杆菌属和欧文氏菌属微生物分泌铁载体的研究报道。肺炎克雷伯氏菌为常见的高产铁载体微生物,目前国内外学者对其研究较为全面^[10-12]。假单胞菌属也是常见的高产铁载体优势属,研究者们先后从不同寄主植株或根际土壤中发现铜绿假单胞菌^[17]、荧光假单胞菌^[18]、恶臭假单胞菌^[19-21]、栖稻黄色假单胞菌^[22]、沼泽红假单胞菌^[23]、草假单胞菌^[24]、摩氏假单胞菌^[25]、地中海假单胞菌^[26]等不同种的微生物均能分泌铁载体,且主要为儿茶酚型铁载体。此外,研究者们还从醋酸钙不动杆菌^[27]、鲍曼不动杆菌^[28]、溶血不动杆菌^[29]、约氏不动杆菌^[30]、嗜油不动杆菌^[31]和皮氏不动杆菌^[32]等不动杆菌属微生物中筛选到分泌型铁载体产生菌,并对所产铁载体的化学结构和形式作了详细的解析。目前,有关欧文氏菌属分泌铁载体的研究还较少,仅发现胡萝卜软腐

欧文氏菌^[33]、解淀粉欧文氏菌^[34]、菊欧文氏菌^[35]和草生欧文氏菌^[36] 4 个种的微生物能分泌合成铁载体。

本研究从植物病原菌中筛选高产铁载体的优势菌株,以期解析分泌型铁载体在植物体内或根际土壤中的响应机制,以及分泌型铁载体介导的寄主与病原互作机制,为植物病害防治提供新的作用靶点,同时也在生防菌的开发应用等方面具有重要的实践意义。

参考文献

- [1] WANG Zongping, GUO Yizhou, LIU Zizheng, et al. Catechin as a new improving agent for a photo-Fenton-like system at near-neutral pH for the removal of inderal [J]. Photochemical & Photobiological Sciences Official Journal of the European Photochemistry Association & the European Society for Photochemistry, 2015, 14(2): 473–480.
- [2] ARIFK K, ARCHANA G, DESAI A J. Engineering heterologous iron siderophore complex utilization in rhizobia: Effect on growth of peanut and pigeon pea plants [J]. Applied Soil Ecology, 2012, 53(1): 65–73.
- [3] MUSIANI F, CIURLI S. Evolution of macromolecular docking techniques: the case study of nickel and iron metabolism in pathogenic bacteria [J]. Molecules, 2015, 20(8): 14265–14292.
- [4] AHMED E, HOLMSTROM S J M. Siderophores in environmental research: roles and applications [J]. Microbial Biotechnology, 2014, 7(3): 196–208.
- [5] GASSER V, GUILLON L, CUNRATH O, et al. Cellular organization of siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: Evidence for siderosomes [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2015, 148: 27–34.
- [6] LOCHHEAD A G, BURTON M O, THEXTON R H. A bacterial growth-factor synthesized by a soil bacterium [J]. Nature, 1952, 170(4320): 282.
- [7] FRANCIS J, MADINAVEITIA J. Isolation from acid-fast bacteria of a growth-factor for *Mycobacterium johnei* and of a precursor of phthiocol [J]. Nature, 1949, 163(4140): 365–366.
- [8] 钱丽红. 茶多酚对金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌机理[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1628–1633.
- [9] 刘侃, 郝葆青, 伍红. 沼泽红假单胞菌对金黄色葡萄球菌抑制作用的试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(8): 171–174.
- [10] 毛得奖, 朱亚玲, 韩宁. 假单胞菌铁载体及色素研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(3): 500–516.
- [11] 周婷, 陈吉祥, 杨智, 等. 一株嗜油不动杆菌(*Acinetobacter oleivorans*)的分离鉴定及石油降解特性[J]. 环境工程学报, 2015, 9(11): 5626–5632.
- [12] 徐水宝, 金嘉琳. 高毒力肺炎克雷伯菌的分子致病机制[J]. 微生物与感染, 2017, 12(5): 320–326.
- [13] 王丽丽, 周旭东, 李国安, 等. 番茄青枯病原菌拮抗菌株的筛选及其田间防控作用研究[J]. 植物保护, 2017, 43(1): 182–185.
- [14] 侯旭, 张国庆, 胡晓, 等. 桃褐腐病菌拮抗性内生细菌的筛选及其抑病效果[J]. 微生物学通报, 2017, 44(8): 1874–188.
- [15] HAAS H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2003, 62(4): 316–330.
- [16] WANG Zongping, LIU Zizheng, YU Fang, et al. Siderophore-modified fenton-like system for the degradation of propranolol in aqueous solutions at near neutral pH values [J]. Chemical Engineering Journal, 2013, 229(8): 177–182.
- [17] 朱慧明, 张彦, 杨洪江. 高产铁载体假单胞菌的筛选及其对铁氧化物的利用[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 177–182.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] BAR-NESS E, CHEN Y, HADAR Y, et al. Siderophores of *Pseudomonas putida* as an iron source for dicot and monocot plants [J]. Plant & Soil, 1991, 130(1/2): 231–241.
- [21] VENTURI V, OTTEVANGER C, BRACKE M, et al. Iron regulation of siderophore biosynthesis and transport in *Pseudomonas putida* WCS358: involvement of a transcriptional activator and of the Fur protein [J]. Molecular Microbiology, 2010, 15(6): 1081–1093.
- [22] 滕松山, 刘艳萍, 赵蕾. 具 ACC 脱氢酶活性的碱蓬内生细菌的分离、鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学报, 2010, 50(11): 1503–1509.
- [23] 胡碧惠, 赵春贵, 杨素萍. 铁对产铁载体的沼泽红假单胞菌光合色素与铁载体合成的影响[J]. 微生物学报, 2014, 54(4): 408–416.
- [24] 梅新兰, 闪安琪, 蒋益, 等. 适应玉米的溶磷细菌筛选及其对玉米生长的影响[J]. 土壤学报, 2016, 53(2): 502–509.
- [25] 黄伟红, 丁延芹, 姚良同, 等. *Pseudomonas mosselii* E1 铁载体合成相关基因 *cysI* 的克隆与功能初步分析[J]. 微生物学报, 2007, 47(5): 910–913.
- [26] 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.
- [27] NUDEL C, GONZALEZ R, CASTANEDA N, et al. Influence of iron on growth, production of siderophore compounds, membrane proteins, and lipase activity in *Acinetobacter calcoaceticus* BD 413 [J]. Microbiological Research, 2001, 155(4): 263–269.
- [28] YAMAMOTO S, OKUJO N, SAKAKIBARA Y. Isolation and structure elucidation of acinetobactin, a novel siderophore from *Acinetobacter baumannii* [J]. Archives of Microbiology, 1994, 162(4): 249–254.

- [29] OKUJO N, SAKAKIBARA Y, YOSHIDA T, et al. Structure of acinetoferrin, a new citrate-based dihydroxamate siderophore from *Acinetobacter haemolyticus* [J]. Biometals An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology Biochemistry & Medicine, 1994, 7(2): 170–176.
- [30] TIAN Shijing, MUHAMMAD A, XIE Li, et al. Genome-sequence analysis of *Acinetobacter johnsonii* MB44 reveals potential nematode-virulent factors [J/OL]. SpringerPlus, 2016, 5(1): 986. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2668-5>.
- [31] NEILANDS J B. Microbial iron compounds [J]. Annual Review of Biochemistry, 2003, 50(1): 715–731.
- [32] ZANDER E, BONNIN R A, SEIFERT H, et al. Characterization of blaOXA-143 variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii* [J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2014, 58(5): 2704–2708.
- [33] BULL C T, ISHIMARU C A, LOPER J E. Two genomic regions involved in catechol siderophore production by *Erwinia carotovora* [J]. Applied & Environmental Microbiology, 1994, 60(2): 662–669.
- [34] SMITS T H, DUFFY B. Genomics of iron acquisition in the plant pathogen *Erwinia amylovora*: insights in the biosynthetic pathway of the siderophore desferrioxamine E [J]. Archives of Microbiology, 2011, 193(10): 693–699.
- [35] FRANZA T, MAHE B, EXPERT D. *Erwinia chrysanthemi*, requires a second iron transport route dependent of the siderophore achromobactin for extracellular growth and plant infection [J]. Molecular Microbiology, 2010, 55(1): 261–275.
- [36] BERNER I, KONETSCHNY-RAPP S, JUNG G, et al. Characterization of ferrioxamine E as the principal siderophore of *Erwinia herbicola* (*Enterobacter agglomerans*) [J]. Biology of Metals, 1988, 1(1): 51–56.
- (责任编辑: 田 喆)
- ~~~~~
- (上接 84 页)
- [13] 杨栗艳, 刘长远, 浦铜良, 等. 大葱提取物对黄瓜枯萎病菌抑菌活性研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2009, 40(2): 218–220.
- [14] 杨栗艳. 大葱提取物抑菌活性及作用机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.
- [15] CHEN X R, KLEMSDAL S S, BRURBERG M B. Identification and analysis of *Phytophthora cactorum* genes up-regulated during cyst germination and strawberry infection [J]. Current Genetics, 2011, 57(5): 297–315.
- [16] 苏莉. 大蒜鳞茎粗提物对辣椒疫霉病抑制效应及其机理[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2008.
- [17] SUNG Y Y, KIM D S, KIM S H, et al. Aqueous and ethanolic extracts of welsh onion, *Allium fistulosum*, attenuate high-fat diet-induced obesity [J]. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2018, 18: 105.
- [18] CHEN J H, TSAI S J, CHEN H I. Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) extracts alter vascular responses in rat aortae [J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 1999, 33(4): 515–520.
- [19] WANG Borsen, HUANG Gunanjhong, LU Yahui, et al. Anti-inflammatory effects of an aqueous extract of Welsh onion green leaves in mice [J]. Food Chemistry, 2013, 138(2–3): 751–756.
- [20] WANS B S, LIN S S, HSIAO W C, et al. Protective effects of an aqueous extract of Welsh onion green leaves on oxidative damage of reactive oxygen and nitrogen species [J]. Food Chemistry, 2006, 98(1): 149–157.
- [21] JANG H W, KA M H, LEE K G. Antioxidant activity and characterization of volatile extracts of *Capsicum annuum* L. and *Allium* spp. [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2008, 23(3): 178–184.
- [22] BOELEN H, DE VOLOIS P J, WOBEN H J, et al. Volatile components from onion [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1971, 19: 984–991.
- [23] BLOCK E, BENTLEY M D, DAVIS F A, et al. Electron impact induced process of thermally and photochemically labile organic sulfur compounds. A mass spectral study of dialkyl disulfides, trisulfides, and α -disulfones [J]. The Journal of Organic Chemistry, 1975, 40: 2770–2773.
- [24] ALBRAND M, DUBOIS P, GELIN R, et al. Identification of a new volatile compound in onion (*Allium cepa*) and leak (*Allium porum*): 3,4-dimethyl-2,5-dihydrothiophene [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1980, 28: 1037–1038.
- [25] KUO M C, HO C T. Volatile constituents of the solvent extracts of Welsh onions (*Allium fistulosum* L. Variety Maichuon) and scallions (*A. fistulosum* L. Variety Caespitosum) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1992, 40: 1906–1910.
- [26] 黄雪松. 大葱挥发油含量与化学成分的分析[J]. 食品与发酵工业, 2004, 30(10): 114–117.
- [27] 郭海忱, 崔兰, 朱前翔, 等. 用 GC/MS 测定大葱挥发油中的化学成分[J]. 质谱学报, 1996, 17(2): 63–66.
- [28] BENKEBLIA N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2004, 37(2): 263–268.
- [29] 季文平, 陈夕军, 何超, 等. 大蒜粗提物挥发性成分分析及其对辣椒疫病控制作用[J]. 中国蔬菜, 2019(1): 57–64.
- [30] 吴峤, 伍强, 张茜, 等. 噻吩类杀菌剂的研究进展[J]. 农药, 2010, 49(1): 5–10.
- (责任编辑: 田 喆)