

## 烟草根际铁载体产生菌 G-229-21T 的筛选、鉴定及拮抗机理

田方, 丁延芹, 朱辉, 姚良同, 靳奉理, 杜秉海\*

(山东农业大学生命科学学院, 山东农业大学农业微生物学重点实验室, 泰安 271018)

**摘要:** 【目的】从烟草根际筛选烟草疫霉 [*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hann) Tucker] 拮抗菌, 探索其拮抗机理。【方法】限铁(2.0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$ )蔗糖-天冬酰胺平板对峙法筛选烟草疫霉拮抗菌; 刃天青(CAS)法检测其铁载体的产生及其对铁离子的亲和能力。结合形态、生理生化、16S rRNA 序列同源性和系统发育分析及种特异性分子法对其进行鉴定。XAD-2 吸附层析法提取其铁载体, 分光光度法检测其铁载体类型。不同铁离子浓度下, 比较其铁载体对烟草疫霉的抑制作用。【结果】我们筛选到一株限铁条件下烟草疫霉拮抗菌 G-229-21T, 该菌产生高亲和力铁载体, 被初步鉴定为 *Pseudomonas mediterranea*。该菌产生的羧酸型铁载体, 在低铁条件下(0.16  $\mu\text{mol/L}$ ~10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$ )对烟草疫霉的抑制率达 92.3%以上, 而在富铁条件下(100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$ )抑制率仅为 2.0%。【结论】首次报道 *P. mediterranea* G-229-21T 产生高亲和力羧酸型铁载体, 该铁载体在低铁条件下对烟草疫霉有显著的抑制作用。

**关键词:** *Pseudomonas mediterranea*; 铁载体; 筛选; 鉴定; 拮抗机理

中图分类号: Q935, Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 05-0631-07

烟草是一种重要的经济作物, 而连续耕作引起的土传病害每年都造成大量的经济损失; 植物根际促生细菌(Plant Growth-promoting Rhizobacteria)在一些植物土传病害防治上得到了很好的应用, 展示了广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。

铁载体是大部分需氧和部分厌氧微生物在限铁条件下产生的一种小分子量(一般<10 kDa)的铁螯合物<sup>[2]</sup>。研究证实 PGPR 产生的铁载体可与植物根际病原微生物争夺有限的铁营养, 从而抑制病原微生物生长繁殖, 起到生物防治作用<sup>[3]</sup>; 同时植物则可以利用微生物产生的铁载体螯合的铁, 从而改善植物的铁营养, 防治碱性缺铁土壤植物缺铁失绿症的发生<sup>[4]</sup>。

假单胞菌是一类重要的 PGPR, 国内外研究证实假单胞菌产生的铁载体在防治土传真菌病害方面发

挥着重要作用<sup>[1]</sup>; 根据铁载体螯合基团结构的差异, 细菌分泌的铁载体可以分为: 异羟肟酸型、儿茶酚型、羧酸型和混合型四大类。其中羧酸型铁载体依靠羧基和羟基来螯合铁, 主要由真菌产生, 细菌中则只报道过苜蓿中华根瘤菌和猪葡萄球菌产生此类铁载体。铁载体结构类型的检测方法主要有三氯化铁实验、四唑盐实验、Arnow's 实验、分光光度实验等化学、物理方法和生物量检测法<sup>[5]</sup>。

本文对烟草根际铁载体产生菌 G-229-21T 进行了生理生化和分子鉴定; 用 XAD-2 大孔径树脂吸附层析法获得了其铁载体, 用化学和物理方法检测了其铁载体类型; 并验证了低铁条件下 G-229-21T 产生的铁载体对烟草疫霉的拮抗效果, 以期对其在限铁条件下防治土传真菌病害中的应用提供一定的理论基础。

基金项目: 山东省优秀中青年科研奖励基金(2006BS06012)

\*通讯作者。Tel: +86-538-8249958; E-mail: bhdu@sdau.edu.cn

作者简介: 田方(1981-), 男, 山东冠县人, 硕士研究生, 主要从事分子微生物学研究。E-mail: tianfang2001@126.com

收稿日期: 2007-10-17; 修回日期: 2008-01-09

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种来源：***Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 、铁载体产生菌 *Pseudomonas mosselii* E1 系本实验室所保存菌株，供试烟草疫霉系山东农业大学植物病理研究室提供。

**1.1.2 培养基：**细菌分离用牛肉膏蛋白胨培养基 (NA)；分子生物学试验用 LB 培养基；烟草疫霉培养用 PDA 培养基；细菌菌落形态及色素产生情况检测用 KB 培养基(1L 培养基中含：胰蛋白胨 20.0 g、甘油 10.0g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5g)、YPGA 培养基(1 L 培养基中含：胰蛋白胨 5 g、酵母粉 5 g、葡萄糖 5 g)；铁载体定性检测用 CAS 平板<sup>[6]</sup>；铁载体的定量分析、铁载体类型的检测和铁载体对烟草疫霉拮抗作用检测用限铁蔗糖-L-天冬酰胺(SA)培养基(1L 培养基中含：蔗糖 20.0g、L-天门冬酰胺 2.0 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g；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  $\mu$ mol/L<sup>[7]</sup>)。

**1.1.3 主要试剂和仪器：**用于 PCR 扩增的全套试剂购自上海申能博彩生物科技有限公司；Amberlite XAD-2 大孔树脂购自北京北实纵横科技发展有限公司；其它分子生物学试剂购自 TaKaRa 公司。5810R 型冷冻离心机(Eppendorf 公司)；S-3100 型紫外-可见分光光度计(Scinco 公司)；JEM-1200EX 型投射式电子显微镜(Olympus 公司)；96 孔梯度 PCR 扩增仪(Biometra 公司)；UVP GelDoc-It (UVP 公司)凝胶成像系统。

### 1.2 菌株的分离筛选

从贵州遵义地区采集烟草根际土样，称取 5 g 烟草根须和 5 g 附着于根须的土壤样品溶于 90 mL 无菌水，200 r/min 摇床振荡 30 min，从中取 100  $\mu$ L 涂布 NA 平板。在 30  $^{\circ}$ C 培养 2~3 d，长出单菌落后，用异步培养法在低铁 SA(2.0  $\mu$ mol/L FeCl<sub>3</sub>)固体平板上进行平板对峙试验，即先用无菌镊子在平板中心接种新鲜烟草疫霉菌丝体，28  $^{\circ}$ C 培养 48h 后，再在距烟草疫霉菌丝体边缘约 2 cm 处用无菌牙签接种新鲜的分离物，根据抑菌距离的大小，从中筛选出对烟草疫霉有较大抑菌活性的菌株。

### 1.3 铁载体的定性检测和定量分析

用无菌牙签挑取 G-229-21T 单菌落接种在 CAS 平板上，28  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后观察平板上橙黄色透明圈

的产生和大小。用铂金丝接种 G-229-21T 的新鲜菌苔于限铁 SA 液体(0.16  $\mu$ mol/L FeCl<sub>3</sub>)培养基中，28  $^{\circ}$ C 摇床培养(150 r/min)48 h；菌悬液经 1376  $\times$  g 离心 15 min，取上清液，以 1:1 的体积比加入 CAS 检测液<sup>[6]</sup>，充分混匀，静止 1 h 后，测定 630 nm 波长处的吸光值(A)，取双蒸水作为对照调零，以同法测定的未接种的 SA 液体培养基作为上清液的吸光值作为参比值(Ar)。并按 Machuca 和 Miliagres 的方法<sup>[8]</sup>表示铁载体活性单位([(Ar-As)/Ar] $\times$ 100)。以 *E. coli* DH5 $\alpha$ 和 *P. mosselii* E1 作为阴性和阳性对照。

### 1.4 菌株的鉴定

**1.4.1 形态特征：**投射电子显微镜下观察菌体形态、大小；KB、YPGA 平板，28  $^{\circ}$ C 培养，观察 24 h 龄龄的菌落形态及色素产生情况。

**1.4.2 生理生化特征：**参照文献[9]进行生理生化鉴定。

**1.4.3 16S rDNA 的序列分析：**参照文献[10]的方法提取 G-229-21T 基因组 DNA，以 P1(5'-AGAGTTTG-ATCCTGGTCAGAACGCT-3')和 P6(5'-TACGGCT-ACCTTGTTACGACTTCACCCC-3')作为引物进行扩增。PCR 反应采用 50  $\mu$ L 体系，扩增条件：95  $^{\circ}$ C 5 min；94  $^{\circ}$ C 1 min，56  $^{\circ}$ C 30 s，72  $^{\circ}$ C 1.5 min，30 次循环；72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物胶回收按试剂盒说明书进行，将回收产物与 pMD18-T Vector 连接，转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞，采用蓝白筛选法和质粒快速检测法筛选重组子，选取阳性重组子送上海英俊生物技术有限公司测序。将测序结果用 BLAST 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)与 GenBank 数据库进行相似性分析，并与 GenBank 和 Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/>)中的相近模式种的 16S rRNA 基因序列在 CLUSTAL X 1.8 (<ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/>) 程序包中进行多重序列匹配排列(Multiple alignments)分析，最后形成一个多重序列匹配排列阵，其中形成的缺口用横杠“-”填补，用 TREECON 1.3 b 程序包中的 Neighbor-Joining 法构建系统进化树。使用 Kimura 2-parameter 法进行遗传距离估计，系统树拓扑结构的可靠性经自展值分析(Bootstrap)重复 1000 次，DNA 序列变异中的转换和颠换赋予相同的加权重。

**1.4.4 种特异性分子鉴定：**参照文献[11]中的引物序列、扩增体系和反应条件扩增 G-229-21T 中 600 bp

或 1100 bp 大小的特异性片段。特异性片段的回收、测序方法同上。

### 1.5 铁载体的制备

G-229-21T 铁载体的制备参照文献[12]的方法略有改进。先用活化的 XAD-2 大孔径树脂吸附按 1.3 方法制备的无菌铁载体上清液(1.1 cm × 80 cm 玻璃层析柱),再用 2 倍柱体积的 ddH<sub>2</sub>O 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 H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>OH(1:1, V/V)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 ddH<sub>2</sub>O 中,0.22 μm 滤膜过滤除菌,4 ℃ 保存备用。

### 1.6 铁载体类型的检测

参照文献[13]的方法略有改进。

**1.6.1 异羟肟酸型铁载体:** FeCl<sub>3</sub> 试验:在 1 mL 上述制备的 3 mg/L 的铁载体溶液中加入 1~5 mL 2% 的 FeCl<sub>3</sub>,若用紫外可见分光光度计在 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 上述制备的 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。

**1.6.2 儿茶酚型铁载体:** 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<sub>2</sub> 和 Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>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。 FeCl<sub>3</sub> 试验:在 1 mL 上述制备的 3 mg/L 的铁载体溶液中加入 1 mL 2% 的 FeCl<sub>3</sub>,若在 495 nm 处有吸收峰,则说明有儿茶酚型铁载体的存在。

**1.6.3 羧酸型铁载体:**分光光度试验<sup>[14]</sup>在 1 mL 上述制备的 3 mg/L 的铁载体溶液中加入 1 mL 250 μmol/L CuSO<sub>4</sub>和 2 mL pH4.0 的醋酸缓冲液。波长扫描看形成的复合物在 190 nm~280 nm 波长范围内是否有相应的吸收峰。

### 1.7 铁载体对烟草疫霉的抑制作用

将培养 7 d 的烟草疫霉用无菌水配制成孢子悬液(10<sup>6</sup>个/mL)。取该孢子悬液 1 mL 分别接种到含不同浓度三价铁离子(0.16 μmol/L、2 μmol/L、10 μmol/L、50 μmol/L 和 100 μmol/L)和外加铁载体(0 mg/L、3 mg/L、6 mg/L、9 mg/L)的 99 mL SA 液体培养基中,150 r/min,28 ℃ 振荡培养 7 d,收获菌丝体,60 ℃ 烘至恒

重后称重测定生长量。

上述与铁载体产生、检测有关试验中所用的试剂和培养基均用双蒸去离子水配制,所有玻璃器具均在 6 mol/L HCl 中浸泡 3 d,并用双蒸去离子水多次淋洗以除去痕量的铁离子。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株的筛选

以烟草疫霉为指示菌,通过初筛、复筛得到一株在低铁 SA 平板上具有明显拮抗效果的菌株(图 1),编号为 G-229-21T。

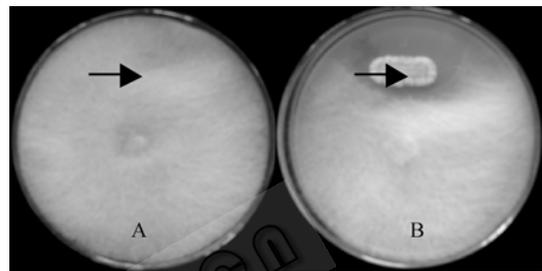


图 1 在低铁 SA 平板上 G-229-21T 对烟草疫霉的拮抗效果  
Fig. 1 Antagonisation of isolate G-229-21T against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hann) Tucker on low iron SA plate with 2.0 μmol/L FeCl<sub>3</sub>(the figure B) (the figure A was control experiment with 100.0 μmol/L FeCl<sub>3</sub>)The arrow indicated the inoculated G-229-21T.

### 2.2 铁载体的定性检测和定量分析

在 CAS 平板上检测 G-229-21T 的铁载体产生能力,结果显示该菌株具有很强的铁载体产生能力(图 2)。定量分析结果显示 G-229-21T 产生的铁载体,活性([(Ar-As)/Ar] × 100)达 82.3,属于超强螯和能力的铁载体。

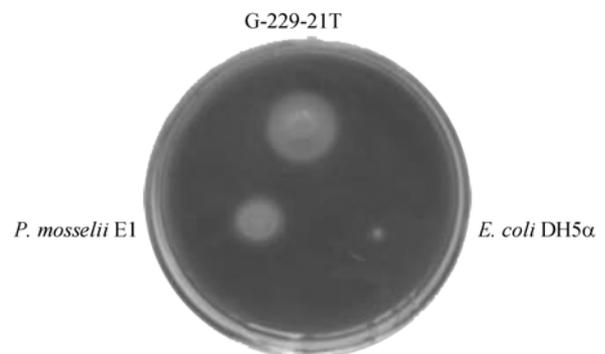


图 2 在 CAS 平板上 G-229-21T 产生较大的显色圈  
Fig. 2 Isolate G-229-21T producing biggish orange halos on CAS agar plates. The *P.mosselii* E1 was the positive control, the *E. coli* DH5α was the negative control.

### 2.3 菌株的鉴定

#### 2.3.1 菌株的菌落、菌体特征和生理生化特征：

G-229-21T 在 LB 平板上培养 24 h 菌落特征：菌落较大、微黄色、湿润、较粘稠、边缘整齐、无突起；菌体特征：G 杆菌、无芽孢、菌体大小  $0.5 \mu\text{m} \sim 0.6 \mu\text{m} \times 2 \mu\text{m} \sim 2.5 \mu\text{m}$ ，单或数根极毛运动（图 3）。G-229-21T 生理生化特征：能将硝酸盐还原为亚硝酸盐，氧化酶、过氧化氢酶、脲酶、精氨酸双水解酶、苯丙氨酸脱氨酶呈阳性，在 KB 和 YPGA 培养基上均不产生荧光色素，不进行反硝化作用，DNA 酶、卵磷脂酶、磷脂酶、脂酶呈阴性，不产生吲哚，也不水解淀粉；能以甘露醇、D-木糖、蔗糖、肌醇、D(-)-酒石酸盐作为唯一碳源生长，其最适生长温度为  $28 \sim 30$ ，在  $4$  仍然可以生长，而在  $41$  则不能生长；最适生长 pH 值为  $7.0 \sim 7.5$ ，pH 值  $9.0$  时仍然可以生长，pH 值  $3.0$  时则不能生长；最适生长的 NaCl 浓度为  $0\% \sim 4\%$ ，当 NaCl 浓度大于  $5\%$  时，生长被抑制。

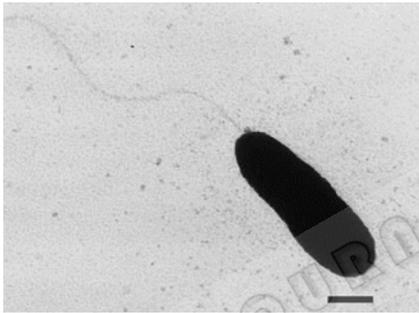


图 3 G-229-21T 在透射电镜下的形态特征(25000 $\times$ )

Fig.3 The morphological character of isolate G-229-21T under the trans-electron microscope (25000 $\times$ ). The scale bar represents 500 nm.

2.3.2 16S rDNA 序列分析：以 G-229-21T 总 DNA 为模板，用引物 P1 和 P6 进行 PCR 扩增，得到约 1.5kb 的 PCR 产物。将 G-229-21T 的 16S rDNA 序列（1517 bp）提交 GenBank，所得收录号为 EF673038。将 G-229-21T 的 16S rDNA 序列在 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)中进行比对，结果 G-229-21T 与假单胞菌属的多个不同种的相似性均在 99% 以上。结合以上菌落、菌体特征、生理生化指标，将 G-229-21T 初步鉴定为假单胞菌。将 G-229-21T 的 16S rRNA 基因序列与假单胞菌属已报道 93 个种的模式菌株的 16S rRNA 基因序列进行进化树分析，结果显示（图 4）分离菌株 G-229-21T 与 *P. corrugata* 和 *P. thivervalensis* 的同源性

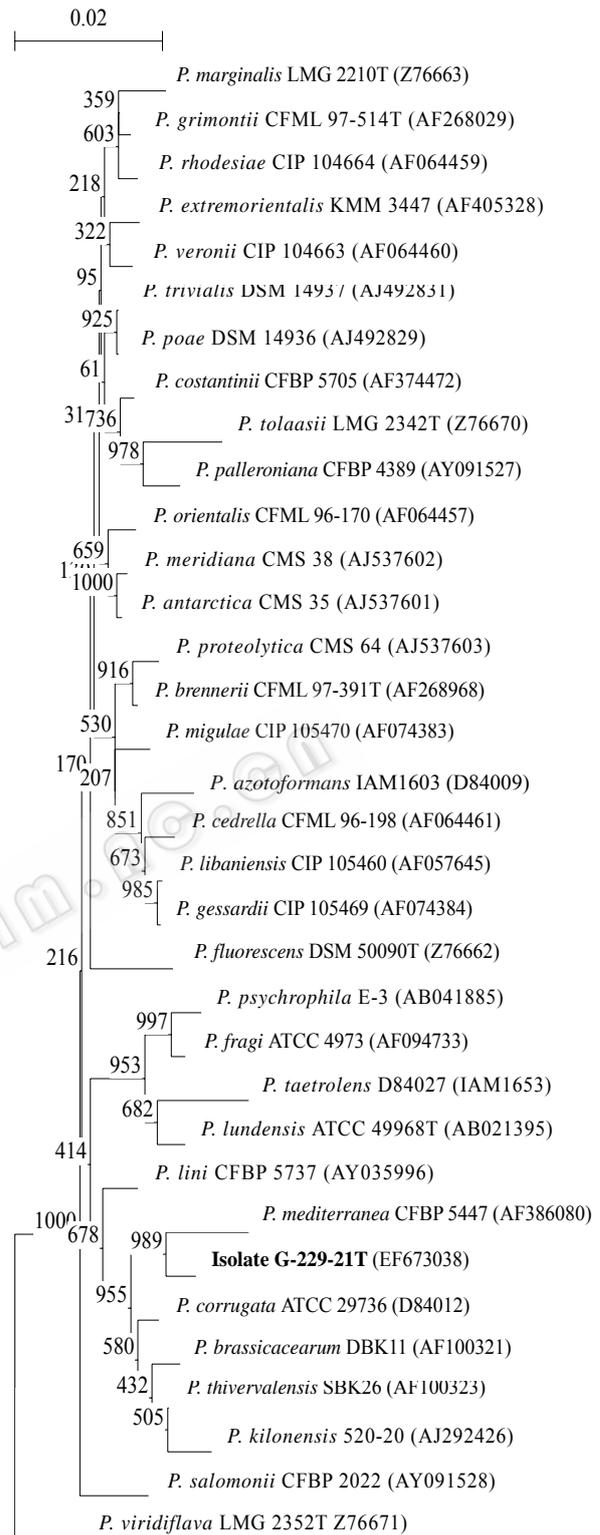


图 4 基于 16S rRNA 的系统发育树

Fig. 4 A neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of isolate G-229-21T and its 33 relatives type strains of *Pseudomonas*. Bootstrap analyses were made with 1000 cycles. The scale bar represents 0.02 substitutions per nucleotide.

最高为 99% , 与 *P. mediterranea*、*P. brassicacearum*、*P. lini*、*P. salomonii*、*P. palleroniana* 的同源性为 98% ; 且 G-229- 21T 与 *P. mediterranea* 形成的群的 1000 次 bootstrap 自展检验支持率达 98.9% , 因此进一步判断 G-229-21T 可能属于 *P. mediterranea*。

**2.3.3 种特异性分子鉴定** :以 G-229-21T 基因组 DNA 为模板,用引物 PC1/1( 5'-GGATATGAGCCAGGTC-TTCG 3' )、PC1/2( 5'-CGCTCAAGCGCGACTTCAG 3' ) 可以成功扩增 600 bp 左右的片段,而用引物 PC5/1( 5'-CCACAGGACAACATGTCCAC-3' )、PC5/2( 5'-CAGGCGCTTTCTGGAACATG-3' ) 则得不到扩增产物,因此 G-229-21T 可以被初步鉴定为 *P. mediterranea*。将上述 600 bp 左右的片段胶回收、连接载体、测序结果显示所得片段为 591 bp, 将该序列在 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 中进行比对, 结果没有获得同源性较高的序列,故该序列可能是 *P. mediterranea* 的种特异性序列,该序列 GenBank 收录号为: EU177098。

#### 2.4 铁载体的制备和类型的检测

用 XAD-2 大孔径树脂吸附法,1 L 无菌上清液可以获得约 10 mg 的铁载体,在 1 mL 上述制备的 3 mg/L 的铁载体溶液中加入 2 mL 2% 的  $\text{FeCl}_3$ , 上清液很快变成紫色,表明上述制备的溶液中含有铁载体;在 1 mL 上述制备的 3 mg/L 的铁载体溶液中加入 1 mL 250  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CuSO}_4$  和 2 mL pH4.0 的醋酸盐缓冲液,波长扫描结果显示在 190 nm~280 nm 波长范围内有明显的吸收峰,说明 G-229-21T 产生的是羧酸型铁载体。而其它铁载体类型检测反应均成阴性。

#### 2.5 铁载体对烟草疫霉的拮抗作用

结果显示: $\text{FeCl}_3$  浓度为 0.16  $\mu\text{mol/L}$ 、2  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$  时烟草疫霉的生长受铁离子浓度的影响明显,相对于 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  时烟草疫霉生长量抑制率分别为: 87.8%、71.6%、58.2%和 25.1%; 9mg/L 的 G-229-21T 铁载体在 0.16  $\mu\text{mol/L}$ 、2  $\mu\text{mol/L}$ 、10  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  低铁条件下对烟草疫霉有明显的抑制作用,相对于对应铁离子浓度下不添加铁载体对照抑制率分别为: 98.0%、93.0%和 92.3%,随着铁离子浓度的增加抑菌作用减弱,50  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  时抑制率为 22.6%,100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$  时抑制率仅为 2.0%,几乎失去了对烟草疫霉的抑制作用(图 5)。

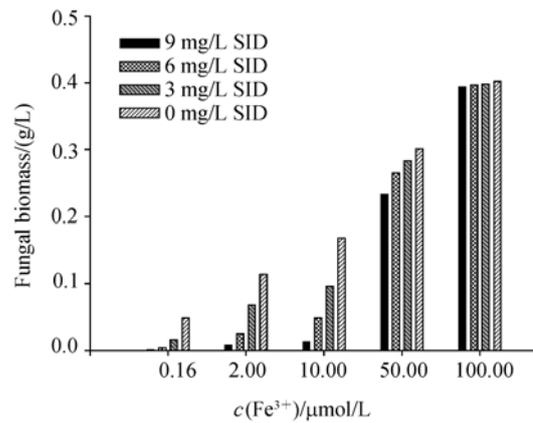


图 5 G-229-21T 产生的铁载体在低铁条件下对烟草疫霉的抑制作用

Fig. 5 Antagonisation of siderophore produced by isolate G-229-21T against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hann) Tucker under low iron conditions.

### 3 讨论

本研究从低铁 SA 平板上筛选得到一株对烟草疫霉有明显拮抗作用的铁载体产生细菌 G-229-21T; 并用形态、生理生化、16S rRNA 序列分析等方法对 G-229-21T 进行了鉴定,但由于 Blast 比对结果显示 G-229-21T 的 16S rRNA 序列与 GenBank 中的假单胞菌属多个不同种的相似性都在 99% 以上,所以不能直接明确其种水平的分类地位,另外 GenBank 数据库中不规范 16S rRNA 序列的存在<sup>[15]</sup>,也影响了 BLAST 比对结果的可信度;本研究通过 G-229-21T 16S rRNA 序列与假单胞菌属已经报道的所有 93 个种的模式菌株的 16S rRNA 序列进行系统发育树分析,明确了其分类地位。*P. mediterranea* 种特异性序列的成功扩增和对所得到的特异性序列的分析也证实了这种分析方法的可信度。将所得特异性序列提交 GenBank,以期对以后研究者对 *P. mediterranea* 的快速、准确鉴定有所帮助。

蔗糖-天冬酰胺(SA)平板对峙实验显示:在限铁条件下(SA 中含 2.0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$ )菌株 G-229-21T 对烟草疫霉有显著的拮抗作用,而在富铁条件下(SA 中含 100  $\mu\text{mol/L}$   $\text{FeCl}_3$ )则没有拮抗作用,这表明 G-229-21T 在 SA 培养基上除了产生铁载体来起抗生作用外,并不产生吩嗪、藤黄绿脓菌素、绿脓菌素、2,4-二乙酰基藤黄酚、硝吡咯菌素、Viscosinamide、HCN 等不受低铁条件诱导的抗生物质<sup>[1]</sup>,因为若是产

生的话,在富铁条件下 G-229-21T 也应该对烟草疫霉有拮抗作用;在不同铁离子浓度下,添加不同浓度的铁载体后烟草疫霉生长实验证实 G-229-21T 在低铁条件下对烟草疫霉的拮抗机理是:G-229-21T 产生的超强螯合能力的铁载体螯合了环境中痕量的铁,供自己利用,烟草疫霉因自身不能产生铁载体或产生的铁载体螯合铁的能力没有 G-229-21T 产生的铁载体螯合铁的能力强,而烟草疫霉自身又不能吸收利用 G-229-21T 产生的铁载体,从而在拮抗实验中被 G-229-21T 所抑制<sup>[16]</sup>。

本研究用 XAD-2 大孔径树脂吸附层析法获得了 G-229-21T 产生的铁载体,用化学、物理方法检测了其铁载体类型,明确了其主要的功能基团为羧基和羟基,但对其铁载体的详细结构研究还需要借助液质或气质联用等分析仪器<sup>[12]</sup>。

*P. mediterranea* 是 2002 年报道的假单胞菌属的一个新种<sup>[11]</sup>。现在国外对该菌的研究也处于起步阶段,已有研究证实与其分类地位最近的 *Pseudomonas corrugata* 在生物防治<sup>[17]</sup> 方面起着非常重要的作用,但有关 *P. mediterranea* 的生物防治作用则有待进一步研究。

有关 G-229-21T 在碱性缺铁土壤的土传真菌病害生物防治和植物缺铁失绿症的防治和改善中的作用的温室栽培试验正在进行当中,有关的研究结果,作者将作进一步报道。

### 参 考 文 献

- [1] Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonas*. *Nat Rev Microbiol*, 2005, 3: 307–319.
- [2] Leong J. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 1986, 24: 187–209.
- [3] Kloepper JW, John L, Teintze M. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, 1980, 286: 885–886.
- [4] Masalha J, Kosegarten H, Elmaciö, et al. The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biol Fertils Soils*, 2000, 30: 433–439.
- [5] Baakza A, Vala AK, Dava BP, et al. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, 311: 1–9.
- [6] Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*, 1987, 160: 47–56.
- [7] Manninen M, Mattila-Sandholm T. Methods for the detection of *Pseudomonas* siderophores. *J Microbiol Meth*, 1994, 19: 223–234.
- [8] Machuca A, Milagres AMF. Use of CAS-agar plate modified to study the effect of different variables on siderophore production by *Aspergillus*. *Lett Appl Microbiol*, 2003, 36: 177–181.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [10] Osborn F, Blinder R, Justin RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998, pp39–40.
- [11] Catara V, Sutra L, Morineau A, et al. Phenotypic and genomic evidence for the revision of *Pseudomonas corrugata* and proposal of *Pseudomonas mediterranea* sp. nov.. *Int J Syst Evol Micr*, 2002, 52: 1749–1758.
- [12] Risse D, Beiderbeek H, Taraz K, et al. Corrugatin, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugata*. *Z Naturforsch*, 1998, 53: 295–304.
- [13] Baakza A, Vala AK, Dave BP, et al. A comparative study of siderophore production by fungi from marine and terrestrial habitats. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2004, 311: 1–9.
- [14] Shenker M, Oliver I, Helmann M, et al. Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*. *J Plant Nutr*, 1992, 15: 2173–2182.
- [15] 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. *Appl Environ Microb*, 2005, 71: 7724–7736.
- [16] Schroth MN, Hancock JG. Disease-suppressive soil and root-clonizing bacteria. *Science*, 1982, 216: 1376–1381.
- [17] Catara V. *Pseudomonas corrugata*: plant pathogen and/or biological resource? *Mol Plant Pathol*, 2007, 8: 233–244.

## Screening, identification and antagonistic activity of a siderophore-producing bacteria G-229-21T from rhizosphere of tobacco

Fang Tian, Yanqin Ding, Hui Zhu, Liangtong Yao, FengLi Jin, Binghai Du\*

(College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China)

**Abstract:** [Objective] To screen antagonistic bacteria from rhizosphere of tobacco against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hann) Tucker and to analyze its antagonistic activity. [Methods] The antagonistic bacteria were screened by dual culture with *P. parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hann) Tucker on low iron (2 μmol/L FeCl<sub>3</sub>) Sucrose-L-Asparagine (SA) plate. The chrome azurol S (CAS) assay was used to detect the siderophore production and its affinity to ferric ion. The strain was identified by using morphological, biochemical and physiological characteristics, 16S rRNA sequence homology, phylogenetics and specific species molecular analysis. The siderophore was isolated by column chromatography on Amberlite XAD-2 and analyzed by spectrophotometer. Antagonistic activity of the siderophore was confirmed by incubation of *P. parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hann) Tucker in liquid SA medium with different concentration of siderophore and FeCl<sub>3</sub>. [Results] We obtained an antagonistic bacterium G-229-21T against *P. parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hann) Tucker. The strain produced high-affinity siderophore under low iron conditions and was identified as *Pseudomonas mediterranea*. This strain produced carboxylate-type siderophore against *P. parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hann) Tucker. The suppression ratio was up to 92.3% under low iron conditions (0.16 μmol/L~10 μmol/L FeCl<sub>3</sub>). However, it was only 2.0% under Fe-replete conditions (100 μmol/L FeCl<sub>3</sub>). [Conclusion] *P. mediterranea* G-229-21T could produce high-affinity carboxylate-type siderophore against *P. parasitica* var. *nicotianae* (Breda de Hann) Tucker under low iron conditions.

**Keywords:** *Pseudomonas mediterranea*; siderophore; screening; identification; antagonistic mechanism

Supported by the Research Award Fund for Outstanding Middle-aged and Young Scientist of Shandong Province (2006BS06012)

\*Corresponding author. Tel: +86-538-8249958; E-mail: bhdu@sdau.edu.cn

Received: 17 October 2007/ Revised: 9 January 2008

### 科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介(2008-03)

#### 微生物肥料的生物学及生产技术

刘丽丽 编著; 978-7-03-020563-6; ¥58.00; 2008年3月25日出版

本书基于国内外及作者本人有关土壤微生物学的研究成果, 运用土壤微生物学的基础理论, 阐述微生物肥料使农业生产增收的生物学本质和特性, 并介绍一些新型的绿色无公害微生物肥料, 以土壤生态学理论为基础论述绿色微生物肥料在改良土壤、活化已污染的农田、消除化肥负面影响等方面的作用, 以及微生物肥料的研究现状及展望。即具有较高的学术价值, 又具有实际应用价值, 适应当今国民经济发展的需要。

本书可供农业微生物学、生物技术及农学专业相关的教学科研人员, 从事微生物肥料研制和生产的技术人员, 农业技术推广人员, 从事农业生产的人员参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书(免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学销售中心 邮编: 100717

联系人: 周文字 联系电话: 010-64031535(带传真)

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目