

具铁载体活性植物病原真菌的筛选鉴定*

何翔¹, 张庆², 李楚¹, 李铭刚³, 徐胜涛², 陈齐斌¹, 杨佩文^{2**}

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

3. 云南大学 微生物研究所, 云南 昆明 650091)

摘要:【目的】从不同宿主植物病原真菌中筛选高产铁载体的菌种资源, 并利用整合性铁载体及病原菌对 Fe^{3+} 的竞争机制, 为病害防控提供新的作用靶点。【方法】采用CAS检测法和光吸收法进行分泌型铁载体产生菌的定性、定量筛选及类型的初步鉴定, 并基于18S rDNA对高活性优势菌株进行生物学鉴定。【结果】经定性初筛和定量复筛, 确定5株供试病原真菌为高产铁载体优势菌株, 分泌铁载体类型为异羟肟酸型、羧酸盐型和儿茶酚型; 经分子生物学鉴定, 菌株TZT-024与烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)具较高同源性, 菌株TZT-033与灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)具较高同源性, 菌株TZT-037与刀孢蜡蚧菌(*Lecanicillium psalliotae*)具较高同源性, 菌株TZT-047与吡喃腐霉(*Pythium pyrlobum*)具较高同源性, 菌株TZT-069与韦司梅拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis vismia*)具较高同源性。【结论】目前, 尚未有*L. psalliotae*、*P. pyrlobum*和*P. vismia*等植物病原真菌分泌铁载体的研究报道, 可作为后续开展铁载体防控病害研究的优选材料。

关键词: 植物病原真菌; 铁载体; CAS检测法

中图分类号: S 482.292

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X(2020)02-0235-08

Screening and Identification of Secretory Siderophore from Plant Pathogen

HE Xiang¹, ZHANG Qing², LI Chu¹, LI Minggang³, XU Shengtao²,
CHEN Qibin¹, YANG Peiwen²

(1. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Institute of Agricultural Environmental Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China;

3. Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: [Purpose] The strain resources of high-yield siderophore were screened from different host plant pathogenic fungi, and using high-sorghum siderophore and pathogens to compete with Fe^{3+} can provide a new target for the control of plant diseases. [Methods] We qualitatively and quantitatively screen the pathogenic strains of different host plants and the preliminary identification of siderophore types by CAS method and light absorption method, and biological identification of the dominant strains was according to 18S rDNA. [Results] There were 5 strains were identified as high-yield siderophore dominant strains from the test bacterial by the qualitative and quantitative screening, and the type of secretory siderophore are Hydroxamates, Carboxylates and Catecholates.

收稿日期: 2019-05-19

修回日期: 2020-03-20

网络首发时间: 2020-05-26 13:27:07

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

作者简介: 何翔(1994—), 男, 云南曲靖人, 在读硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究。

E-mail: 297752206@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 杨佩文(1973—), 男, 云南丽江人, 博士, 研究员, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: 398036877@qq.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200525.1357.003.html>



According to the molecular biology identification, strain TZT-024 has similarity with *Aspergillus fumigatus*, strain TZT-033 is very similar to *Botrytis cinerea*, strain TZT-037 is analogous to *Lecanicillium psalliotae*, strain TZT-047 and TZT-069 respectively resemble *Pythium pyrilobum* and *Pestalotiopsis vismiae*. [**Conclusion**] There are no relevant researches of siderophore production about *L. psalliotae*, *P. pyrilobum* and *P. vismiae*, currently. Therefore, it can be used as a preferred material for the disease prevention by siderophore.

Keywords: pathogenic fungi; siderophore; CAS assay

铁在地壳和土壤中的含量十分丰富。作为地球上几乎所有生物体必需的营养元素之一,铁在各项机能代谢活动中发挥着极其重要的调控作用,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,可溶性铁的含量较匮乏,生物可利用率极低^[1-3]。此外,农业生产中植株缺铁现象较为普遍,给农林作物生产和植株系统抗性带来了极大的影响。因此,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+} 具有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^[4-5]。

根据官能团和中心结构的多样性,可将铁载体分为儿茶酚型 (*Catecholates*)、羟肟酸型 (*Hydroxamates*) 和羧酸盐型 (*Carboxylates*) 三大类^[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,植物根际促生菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PG-PR) 和植物内生菌 (endophyte) 等微生物合成分泌铁载体的研究较多,且主要为铁载体产生菌分离筛选的研究^[10-11]。而国内有关植物病原菌合成分泌铁载体的研究报道还较少。铁载体对周围环境中的 Fe^{3+} 具有高度亲和力,且能与其形成稳定的螯合物,降低植物病原菌对 Fe^{2+} 的生物可利用性,减少环境中病原菌可利用铁的含量而降低病原菌的致病力,加快病原菌的衰老死亡^[2,4]。因此,对植物病原菌铁载体产生菌进行研究,充分利用分泌型铁载体产生菌种资源,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菌中筛选高产铁载体的菌株,以期为

具分泌铁载体功能的优势菌种资源的研究、开发和应用提供一定的理论依据和数据支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

82 株供试植物病原菌株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)。

1.2 CAS 检测液及培养基

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 FeCl_3 溶液 (1 mmol/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ + 10 mmol/L HCl) 搅拌混匀,标记为 A 液;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,并搅拌均匀配制而成。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA):马铃薯 200.0 g/L、葡萄糖 15.0 g/L、琼脂 16.0 g/L 和蒸馏水 1.0 L, pH 自然。无铁查氏液体培养基:蔗糖 30.0 g/L、硝酸钠 2.0 g/L、氯化钾 0.5 g/L、硫酸镁 0.5 g/L、磷酸氢二钾 1.0 g/L、8-羟基喹啉 0.5 g/L 和去离子水 1.0 L, pH 自然。

1.3 分泌型铁载体产生菌的筛选

1.3.1 定性初筛

将 PDA 斜面培养基上活化的真菌接种到无铁查氏液体培养基上,每株菌株 3 个重复,放置于 28 °C 微生物培养箱 (型号: IGS100) 内培养 5~7 d。当培养基表面有大量菌丝出现时,即可吸取 50 μL 培养液于 96 孔板内,再加入等体积 CAS 检测液,充分混匀,将饱和的乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 溶液作为阳性对照,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和橙红色的培养液,并将相应菌株作为复筛菌株。

表 1 供试菌株汇总

Tab. 1 The summary of test strains

菌株 strains	寄主 host	发病部位 disease position	菌株 strains	寄主 host	发病部位 disease position
TZT-001	香蕉 <i>Musa nana</i>	叶片 leaf	TZT-044	三七 <i>Panax notoginseng</i>	叶片 leaf
TZT-002	香蕉 <i>Musa nana</i>	茎秆 stalk	TZT-045	秦艽 <i>Gentiana macrophylla</i>	叶片 leaf
TZT-003	白菜 <i>Brassica pekinensis</i>	叶片 leaf	TZT-046	草果 <i>Amomum tsaoko</i>	果实 fruit
TZT-004	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	叶片 leaf	TZT-047	人参 <i>Panax ginseng</i>	根部 root
TZT-005	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	叶片 leaf	TZT-048	草果 <i>Amomum tsaoko</i>	果实 fruit
TZT-006	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	叶片 leaf	TZT-049	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf
TZT-007	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	叶片 leaf	TZT-050	草果 <i>Amomum tsaoko</i>	果实 fruit
TZT-008	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	叶片 leaf	TZT-051	秦艽 <i>Gentiana macrophylla</i>	叶片 leaf
TZT-009	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	叶片 leaf	TZT-052	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf
TZT-010	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	叶片 leaf	TZT-053	秦艽 <i>Gentiana macrophylla</i>	叶片 leaf
TZT-011	三七 <i>Panax notoginseng</i>	叶片 leaf	TZT-054	草果 <i>Amomum tsaoko</i>	果实 fruit
TZT-012	三七 <i>Panax notoginseng</i>	叶片 leaf	TZT-067	香蕉 <i>Musa nana</i>	茎秆 stalk
TZT-013	三七 <i>Panax notoginseng</i>	根部 root	TZT-068	香蕉 <i>Musa nana</i>	叶片 leaf
TZT-014	玉米 <i>Zea mays</i>	叶片 leaf	TZT-069	香蕉 <i>Musa nana</i>	叶片 leaf
TZT-015	水稻 <i>Oryza sativa</i>	根部 root	TZT-070	石榴 <i>Punica granatum</i>	果实 fruit
TZT-016	玉米 <i>Zea mays</i>	叶片 leaf	TZT-071	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf
TZT-017	玉米 <i>Zea mays</i>	茎秆 stalk	TZT-072	香蕉 <i>Musa nana</i>	叶片 leaf
TZT-018	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	叶片 leaf	TZT-074	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	茎秆 stalk
TZT-019	三七 <i>Panax notoginseng</i>	根部 root	TZT-075	白芨 <i>Bletilla striata</i>	叶片 leaf
TZT-020	三七 <i>Panax notoginseng</i>	根部 root	TZT-076	滇黄精 <i>Polygonatum kingianum</i>	叶片 leaf
TZT-023	香蕉 <i>Musa nana</i>	叶片 leaf	TZT-077	香蕉 <i>Musa nana</i>	叶片 leaf
TZT-024	茶树 <i>Camellia sinensis</i>	叶片 leaf	TZT-078	玉米 <i>Zea mays</i>	叶片 leaf
TZT-025	徽甘菊 <i>Mikania micrantha</i>	叶片 leaf	TZT-079	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	叶片 leaf
TZT-026	柠檬 <i>Citrus limon</i>	果实 fruit	TZT-080	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf
TZT-027	玉米 <i>Zea mays</i>	叶片 leaf	TZT-081	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	茎秆 stalk
TZT-028	石榴 <i>Punica granatum</i>	果实 fruit	TZT-082	玫瑰 <i>Rosa rugosa</i>	叶片 leaf
TZT-029	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	茎秆 stalk	TZT-083	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf
TZT-030	秦艽 <i>Gentiana macrophylla</i>	叶片 leaf	TZT-084	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf
TZT-031	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf	TZT-085	玉米 <i>Zea mays</i>	叶片 leaf
TZT-032	草果 <i>Amomum tsaoko</i>	叶片 leaf	TZT-086	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf
TZT-033	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	茎秆 stalk	TZT-087	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf
TZT-034	滇黄精 <i>Polygonatum kingianum</i>	叶片 leaf	TZT-088	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	茎秆 stalk
TZT-035	滇黄精 <i>Polygonatum kingianum</i>	茎秆 stalk	TZT-089	滇黄精 <i>Polygonatum kingianum</i>	叶片 leaf
TZT-036	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	根部 root	TZT-090	当归 <i>Angelica sinensis</i>	块茎 tuber
TZT-037	竹节参 <i>Panax japonicus</i>	叶片 leaf	TZT-091	白芨 <i>Bletilla striata</i>	叶片 leaf
TZT-038	三七 <i>Panax notoginseng</i>	叶片 leaf	TZT-101	玉米 <i>Zea mays</i>	茎秆 stalk
TZT-039	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	根部 root	TZT-102	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	叶片 leaf
TZT-040	重楼 <i>Rhizoma paridis</i>	叶片 leaf	TZT-123	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	茎秆 stalk
TZT-041	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	叶片 leaf	TZT-124	柠檬 <i>Citrus limon</i>	叶片 leaf
TZT-042	石榴 <i>Punica granatum</i>	果实 fruit	TZT-125	当归 <i>Angelica sinensis</i>	茎秆 stalk
TZT-043	秦艽 <i>Gentiana macrophylla</i>	叶片 leaf	TZT-126	当归 <i>Angelica sinensis</i>	叶片 leaf

1.3.2 定量复筛

初筛入选的菌株用无铁查氏液体培养基放置于 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 值, 记作 As; 用相同方法测定未接菌的液体培养基的吸光值作为参比值, 记作 Ar。铁载体的浓度用铁载体活性单位 (siderophore unit, SU) 表示, $SU=[(Ar-As)/Ar]\times 100\%$, 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

儿茶酚型和异羟肟酸型铁载体采用氯化铁检测法测定^[12]; 羧酸盐型铁载体采用分光光度法测定^[13]。

1.5 菌株形态特征观察及 18S rDNA 扩增测序及序列分析

无菌条件下, 取直径 7 mm 纯化菌饼接种至 PDA 平板培养基中央, 25 ℃ 黑暗条件下恒温培养至菌落形成, 观察菌落培养性状; 待菌株产孢后, 在 Nikon Eclipse E200 荧光生物显微镜下观察并测量产孢结构和分生孢子的形态及大小。根据荧光生物显微镜下病原物的形态特征初步确定病原物的分类地位。分泌型铁载体产生菌的 18S rDNA 扩增及测序参照高杨杨等^[14]的方法。测序结果经 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 搜索后与 GenBank 数据库中相关种属的菌株进行比较分析, 选用同源性较高的典型菌株序列作为参比对象, 用 ClustalX 1.8 软件进行多序列比对, 计算供试菌株与参比菌株之间的序列相似性。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 7.0 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。

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 82 株供试真菌中初步筛选出 24 株有颜色变化的菌株, 其中有 17 株为红色或橙红色, 7 株为紫色, 因而可将这 24 株真菌作为复筛目标菌株。由表 2 可知: 菌株 TZT-024、TZT-033、TZT-037、TZT-047 和 TZT-069 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, 因此选择该 5 株复筛菌株作为后续研究对象。

由表 3 可知: 复筛入选的 5 株阳性菌株其 As/Ar 均小于 0.5, 且铁载体活性单位 (SU) 均大于 50.0%, 这表明所选的 5 株阳性菌株均为高产铁载体菌株。

2.2 复筛菌株铁载体类型的鉴定

由表 4 可知: 菌株 TZT-024、TZT-037 和 TZT-069 能合成分泌异羟肟酸型铁载体和羧酸盐型铁载体, 菌株 TZT-033 能合成分泌异羟肟酸型铁载体, 菌株 TZT-047 能合成分泌儿茶酚型铁载体。

2.3 5 株优势菌株形态特征观察

5 株高产铁载体优势菌株形态特征观察如图 1

表 2 96 孔板复筛结果
Tab. 2 The re-screening result of siderophore by using 96-well plat

96 孔板 96-well plate	菌株 strains	CAS 反应颜色 the color of CAS reaction	96 孔板 96-well plate	菌株 strains	CAS 反应颜色 the color of CAS reaction
A3	TZT-001	紫色 purple	C3	TZT-045	橘红色 orange red
A4	TZT-004	紫色 purple	C4	TZT-047	红色 red
A5	TZT-005	橘红色 orange red	C5	TZT-048	橘红色 orange red
A6	TZT-006	橘红色 orange red	C6	TZT-069	红色 red
A7	TZT-014	紫色 purple	C7	TZT-070	橘红色 orange red
A8	TZT-024	红色 red	C8	TZT-071	橘红色 orange red
B3	TZT-025	橘红色 orange red	D3	TZT-073	紫色 purple
B4	TZT-028	紫色 purple	D4	TZT-074	紫色 purple
B5	TZT-031	橘红色 orange red	D5	TZT-075	橘红色 orange red
B6	TZT-033	红色 red	D6	TZT-080	紫色 purple
B7	TZT-037	红色 red	D7	TZT-083	橘红色 orange red
B8	TZT-041	橘红色 orange red	D8	TZT-087	橘红色 orange red

注: 96 个孔板中, A1、B1、C1 和 D1 添加 EDTA+ CAS 溶液 (CAS 显色反应为红色); A2、B2、C2 和 D2 添加 CAS 空白溶液。
Note: Among the 96 well plates, the corresponding samples as A1, B1, C1 and D1 were composed with solution of EDTA+ CAS (the chromogenic reaction of CAS is red); A2, B2, C2 and D2 were CAS blank solution.

表 3 阳性菌株分泌铁载体的定量检测 (mean±SD)
Tab. 3 The quantitative test of siderophore produced by positive fungal strains

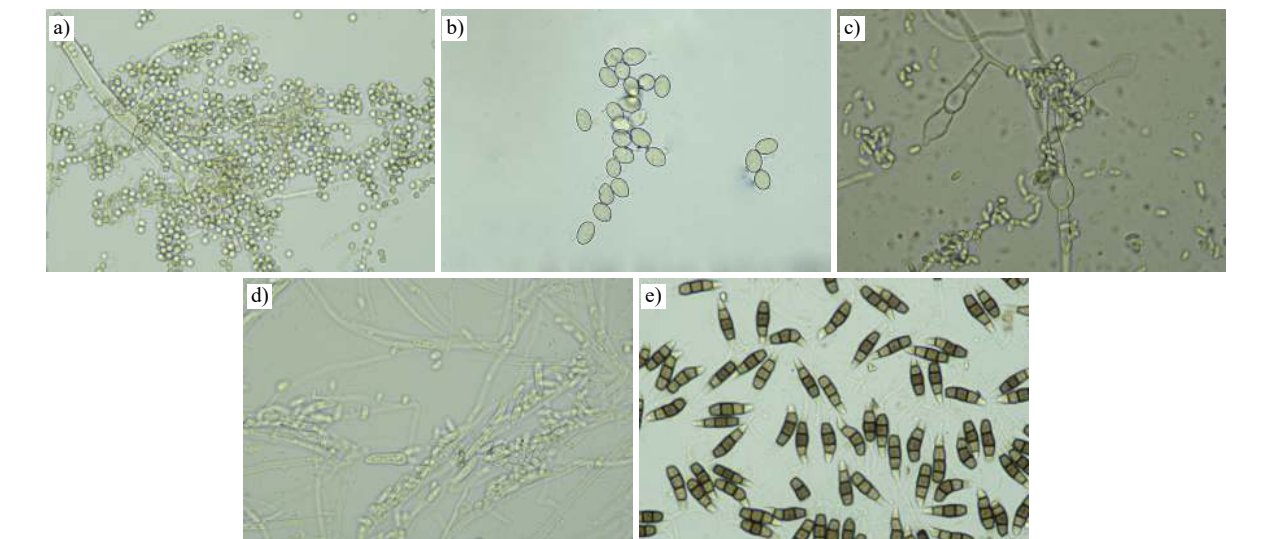
菌株 strains	OD ₆₃₀ 值 OD ₆₃₀	As/Ar 值 the value of As/Ar	铁载体活性单位/% siderophore units
CK(Ar)	1.425	—	—
TZT-024(As)	0.597±0.030 b	0.410±0.021 a	58.810±2.906 a
TZT-033(As)	0.705±0.035 a	0.490±0.025 b	50.530±2.527 b
TZT-037(As)	0.578±0.029 b	0.410±0.021 b	59.440±2.972 a
TZT-047(As)	0.682±0.034 a	0.480±0.024 a	52.140±2.607 b
TZT-069(As)	0.596±0.030 b	0.420±0.021 b	58.180±2.909 a

注: 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 ($P<0.05$)。
Note: The different small letters in the same column indicate significant differences by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$).

表 4 铁载体的化学结构鉴定
Tab. 4 The chemical structure identification of siderophore

菌株 strains	氯化铁检测法 FeCl ₃ test	分光光度法 spectrophotometric test
	异羟肟酸型峰值在 420~450 nm 之间 peak at 420-450 nm Hydroxamates type	儿茶酚型峰值位 于 495 nm peak at 495 nm Catecholates type 羧酸盐型峰值在 190~280 nm 之间 peak at 190-280 nm Carboxylates type
TZT-024	+	+
TZT-033	+	-
TZT-037	+	+
TZT-047	-	-
TZT-069	+	+

注: “+”表明吸收峰; “-”表明没有吸收峰。
Note: “+” indicates absorption peak; “-” indicates no absorption peak.



注/Note: a) TZT-024; b) TZT-033; c) TZT-037; d) TZT-047; e) TZT-069。

图 1 5 株高产铁载体优势菌株形态特征观察

Fig. 1 Morphological observation of five high-yield siderophore dominant strains

所示。Nikon Eclipse E200 荧光生物显微镜下, 菌株 TZT-024 分生孢子梗顶端膨大呈圆形, 上面着生放射状的瓶状小梗, 分生孢子呈圆形且淡色, 主要聚集在分生孢子梗顶端和四周, 根据形态特征观察结果可初步确定为烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。菌株 TZT-033 分生孢子梗呈葡萄状分枝且膨大凸起, 分生孢子呈椭圆形, 着生于分生孢子梗顶端, 根据形态特征观察结果可初步确定为灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)。菌株 TZT-037 分生孢子梗呈葡枝状, 基部较细至顶端逐渐膨大, 分生孢子呈卵圆形或椭圆形, 分布于分生孢子梗周围, 根据形态特征观察结果可初步确定为刀孢蜡蚧菌 (*Lecanicillium psalliotae*)。菌株 TZT-047

无明显分化的分生孢子梗, 丝状孢子囊着生于菌丝上, 分生孢子呈卵圆形, 根据形态特征观察结果可初步确定为吡喃腐霉 (*Pythium pyrilobum*)。菌株 TZT-069 成熟分生孢子呈直或略弯的纺锤状, 具 3~4 个隔膜, 中间 3 个细胞着色, 上部 2 个细胞呈深褐色, 细胞间隔处颜色较深; 分生孢子顶端细胞有 2~3 根无色透明附属丝, 不分枝, 根据形态特征观察结果可初步确定为韦司梅拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis vismiaie*)。

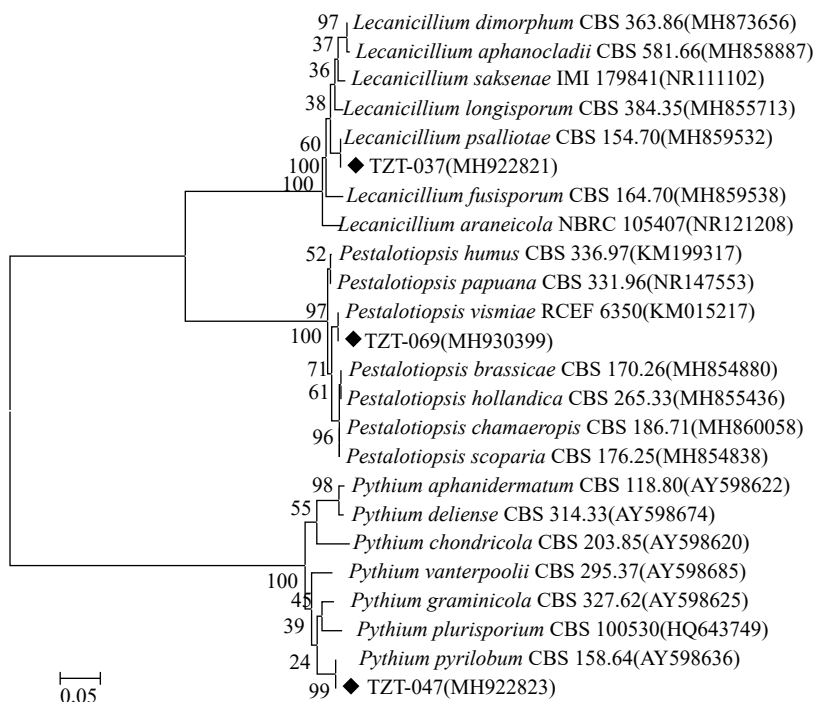
2.4 优势菌株 18S rDNA 序列分析结果及系统发育进化树的构建

菌株 TZT-024 (登录号: MH919847) 和 *A. fumigatus* (登录号: JQ776545) 的相似性达 99.0%,

菌株间具有极高同源性, 经 PCR 扩增菌株 TZT-024 的 18S rDNA 基因序列, 获得目的基因片段 601 bp。菌株 TZT-033 (登录号: MH922820) 和 *B. cinerea* (登录号: KR080290) 的相似性达 99.0%, 菌株间具有极高同源性, 经 PCR 扩增菌株 TZT-033 的 18S rDNA 基因序列, 获得目的基因片段 546 bp。菌株 TZT-037 (登录号: MH922821) 和 *L. psalliotae* (登录号: MH859532) 的相似性达 99.0%, 菌株间具有极高同源性, 初步鉴定为半知菌亚门无孢目淡色孢科轮枝菌属刀孢蜡蚧菌 (*L. psalliotae*); 经 PCR 扩增菌株 TZT-037 的 18S rDNA 基因序列, 获得目的基因片段 589 bp。菌株 TZT-047 (登录号: MH922823) 和 *P. pyrilobum* (登录号: AY598636) 的相似性达 99.0%, 菌株间具有极高同源性, 初步鉴定为鞭毛菌门霜霉目霜

疫霉科腐霉属吡喃腐霉 (*P. pyrilobum*); 经 PCR 扩增菌株 TZT-047 的 18S rDNA 基因序列, 获得目的基因片段 842 bp。菌株 TZT-069 (登录号: MH930399) 和 *P. vismiae* (登录号: KM015217) 的相似性达 99.0%, 菌株间具有极高同源性, 初步鉴定为半知菌亚门腔孢纲黑盘孢目黑盘孢科拟盘多毛孢属韦司梅拟盘多毛孢 (*P. vismiae*); 经 PCR 扩增菌株 TZT-069 的 18S rDNA 基因序列, 获得目的基因片段 566 bp。

如图 2 所示: 根据菌株 TZT-037、TZT-047 和 TZT-069 的目的基因片段长度及碱基排列顺序, 采用 BLAST 搜索与 GenBank 数据库中收录的序列比对, 选择有详细信息的 21 株标准菌株作为参比菌株, 进行 Clust W 多重比对, 并构建系统发育进化树。



注: 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 ITS 基因序列登录号。

Note: The tree rooted was constructed by neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 1 000 resampling. The numbers at each node that indicated the percentage of bootstrap supporting. The numbers in the brackets after each strain name are ITS gene sequence accession numbers in GenBank.

图 2 菌株 TZT-037、TZT-047 和 TZT-069 基于 ITS 基因序列构建的系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain TZT-037, TZT-047 and TZT-069 based on ITS gene sequences

3 讨论

本研究首次以植物病原真菌为筛选靶标, 采用 CAS 检测法和光吸收法对 82 株不同宿主植物病原真菌进行产铁载体活性定性和定量筛选, 得

到 5 株高产铁载体优势菌株。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、儿茶酚型和羧酸盐型。真菌主要合成异羟肟酸型和羧酸盐型铁载体, 本研究测定结果与 GRESH 等^[15]、FORESTER 等^[16]和 SCHRETTL 等^[17]的相吻合。

就植物病原菌分泌铁载体的活性强弱而言,真菌铁载体的铁螯合能力较细菌铁载体的略低,这与LOPER等^[18]的研究结果相一致,不同分泌铁载体的菌株所产铁载体的类型有很大不同,细菌主要分泌含有邻苯二酚官能团的儿茶酚型铁载体,且儿茶酚又作为一种强还原剂,能更有效地与病原真菌竞争铁离子。此外,有研究指出:羧酸盐型铁载体的铁螯合能力要强于异羟肟酸型铁载体^[19]。本研究中菌株TZT-033分泌异羟肟酸型铁载体,其SU值为50.53%,且有3株病原真菌都能分泌羧酸盐型铁载体,这可能是由于病原真菌在宿主体内侵染感病过程中为适应可溶性铁含量较低的胁迫环境而演化出的结果。

经系统发育和聚类分析可知:5株产铁载体优势菌株属于曲霉属、孢盘菌属、轮枝菌属、腐霉属和拟盘多毛孢属。其中,曲霉属为高产铁载体的优势种属。菌株TZT-024为烟曲霉(*A. fumigatus*),分离自茶树赤星病叶片病斑组织,植株发病症状与王丽^[20]的研究结果相一致;且其铁载体生物合成机制也做了详细阐述^[21-22]。菌株TZT-033为灰葡萄孢(*B. cinerea*),分离自滇重楼灰霉病叶片病斑组织,植株发病症状与马维思等^[23]的研究结果相一致;*B. cinerea*能合成分泌异羟肟酸型铁载体,且目前已有关于此类微生物分泌铁载体的报道^[24-25]。刀孢蜡蚧菌(*L. psalliotae*)是一类重要的病原真菌,分离自珠子参溃疡病叶片病斑组织,病原物形态与李戌清等^[26]的研究结果相吻合;吡喃腐霉(*P. pyrilobum*)寄主范围较广,可寄生多种植物,能引起植株猝倒、根腐、苗腐和根茎腐等病害;该菌株分离自珠子参根部腐烂组织,引起珠子参腐霉根腐病,与张悦丽等^[27]的研究相一致。韦斯梅拟盘多毛孢(*P. vismiae*)是一类重要的植物致病菌,该菌株分离自香蕉叶斑病病斑组织,植株发病症状与病原物形态与曾莉等^[28]和陈全助等^[29]的研究结果相一致。目前,尚未有关于*L. psalliotae*、*P. pyrilobum*和*P. vismiae*分泌铁载体的研究报道,因而本研究筛选到的产铁载体优势菌株可作为后续开展铁载体相关病害防治研究工作的良好材料。

对铁载体的研究已持续了近70年,但与原核生物铁载体相比,真核生物铁载体的研究依旧较少,且大多集中在铁载体产生菌的分离筛选及所产铁载体类型的鉴定,而对真菌铁载体的生物

合成和识别转运等的研究还比较匮乏。基于曲霉属的全基因组测序结果,研究者们对烟曲霉和黑曲霉等微生物内有关铁载体生物合成及识别转运的基因簇进行详细的解析^[21,30-31],以便在实际应用中能提供一定的理论依据。大量的研究表明:真菌铁载体在植物营养健康^[32-33]及病害防治^[34-36]等方面都具有重要的影响,开展相关真菌铁载体产生菌的分离筛选和检测鉴定具有重要的实践意义。

[参考文献]

- [1] WANG Z P, GUO Y Z, LIU Z Z, 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 and Photobiological Sciences, 2015, 14(2): 473. DOI: 10.1039/c4pp00371c.
- [2] GAMIT D A, TANK S K. Effect of siderophore producing microorganism on plant growth of *Cajanus cajan* (pigeon pea)[J]. International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology, 2014, 4(1): 20.
- [3] MUSIANI F, CHURLI S. Evolution of macromolecular docking techniques: the case study of nickel and iron metabolism in pathogenic bacteria[J]. Molecules, 2015, 20(8): 14265. DOI: 10.3390/molecules200814265.
- [4] AHMED E, HOLMSTROM S J M. Siderophores in environmental research: roles and applications[J]. Microbial Biotechnology, 2014, 7(3): 196. DOI: 10.1111/1751-7915.12117.
- [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. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.01.017.
- [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. DOI: 10.1038/170282a0.
- [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. DOI: 10.1038/163365b0.
- [8] 钱丽红, 陶妍, 谢晶. 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. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.2010.11.005.
- [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. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.12.0074.
- [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. DOI: 10.13344/j.microbiol.china.2013.03.019.
- [11] 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. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6184.2017.05.011.
- [12] 孙萌, 李韵雅, 吴祎, 等. 解淀粉芽孢杆菌 SYBC

- H47 铁载体合成酶基因 *dhbA*、*dhbB*、*dhbC* 的克隆表达与序列分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(10): 4175. DOI: [10.13417/j.gab.036.004175](https://doi.org/10.13417/j.gab.036.004175).
- [13] 张孝龙, 王永霞, 赵江源, 等. 四株碱性环境真菌铁载体活性筛选[J]. 微生物学报, 2016, 56(6): 1022. DOI: [10.13343/j.cnki.wsxb.20150435](https://doi.org/10.13343/j.cnki.wsxb.20150435).
- [14] 高杨杨, 禾丽菲, 李北兴, 等. 山东省辣椒炭疽病原菌的鉴定及高效防治药剂的筛选[J]. 中国农业科学, 2017, 50(8): 1452. DOI: [10.3864/j.issn.0578-1752.2017.08.009](https://doi.org/10.3864/j.issn.0578-1752.2017.08.009).
- [15] GRESH N, PERAHIA D, DE C B, et al. Complexes of a Zn-metalloenzyme binding site with hydroxamate-containing ligands. A case for detailed benchmarkings of polarizable molecular mechanics/dynamics potentials when the experimental binding structure is unknown[J]. Journal of Computational Chemistry, 2016, 37(32): 2770. DOI: [10.1002/jcc.24503](https://doi.org/10.1002/jcc.24503).
- [16] FORESTER N T, LANE G A, STERLING M, et al. Contrasting roles of fungal siderophores in maintaining iron homeostasis in *Epichloë festucae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2018, 111: 60. DOI: [10.1016/j.fgb.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.11.003).
- [17] SCHRETTL M, IBRAHIM G O, DROIN S, et al. The crucial role of the *Aspergillus fumigatus*, siderophore system in interaction with alveolar macrophages[J]. Microbes and Infection, 2010, 12(12/13): 1035. DOI: [10.1016/j.micinf.2010.07.005](https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.07.005).
- [18] LOPER J E, HENKELS M D. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1999, 65(12): 5357.
- [19] BAAKZA A, VALA A K, DAVE B P, 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. DOI: [10.1016/j.jembe.2003.12.028](https://doi.org/10.1016/j.jembe.2003.12.028).
- [20] 王丽. 烟曲霉基因组与致病机制[J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(1): 1. DOI: [10.3969/j.issn.1673-3827.2011.01.001](https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-3827.2011.01.001).
- [21] MARTIN J D C, ECKSHAINLEVI M, VOGELAAR N J, et al. Author correction: identification of *Aspergillus fumigatus* UDP-galactopyranose mutase inhibitors[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1): 4723. DOI: [10.1038/s41598-017-11022-5](https://doi.org/10.1038/s41598-017-11022-5).
- [22] HAAS H. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*[J]. Natural Product Reports, 2014, 31(10): 1266. DOI: [10.1039/C4NP00071D](https://doi.org/10.1039/C4NP00071D).
- [23] 马维思, 陈君, 严世武, 等. 滇重楼炭霉病及其病原鉴定[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(14): 2918. DOI: [10.19540/j.cnki.cjcmm.20180510.003](https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20180510.003).
- [24] SREEVIDYA M, GOPALAKRISHNAN S, MELO T M, et al. Biological control of *Botrytis cinerea* and plant growth promotion potential by *Penicillium citrinum* in chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. Biocontrol Science and Technology, 2015, 25(7): 739. DOI: [10.1080/09583157.2015.1010483](https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1010483).
- [25] KIM A Y, SHAHZAD R, KANG S M, et al. Paenibacillus terrae AY-38 resistance against *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicum* L. plants through defence hormones regulation[J]. Journal of Plant Interactions, 2017, 12(1): 244. DOI: [10.1080/17429145.2017.1319502](https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1319502).
- [26] 李成清, 田忠玲, 李红斌, 等. 一株分离自番茄叶片的刀抱蜡蚧菌的鉴定、生物学特性及其对杀菌剂敏感性[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(1): 62. DOI: [10.16409/j.cnki.2095-039x.2016.01.010](https://doi.org/10.16409/j.cnki.2095-039x.2016.01.010).
- [27] 张悦丽, 张博, 马立国, 等. 小麦腐霉根腐病原鉴定 I [J]. 山东农业科学, 2017, 49(8): 110. DOI: [10.14083/j.issn.1001-4942.2017.08.024](https://doi.org/10.14083/j.issn.1001-4942.2017.08.024).
- [28] 曾莉, 郭志祥, 潘华彩, 等. 云南山地香蕉叶部真菌病害调查及鉴定[C]//中国菌物学会 2015 年学术年会论文摘要集, 2015.
- [29] 陈全助, 金亚杰, 郭朦朦, 等. 闽楠叶斑病病原鉴定及其生物学特性测定[J]. 植物病理学报, 2018, 48(3): 313. DOI: [10.13926/j.cnki.apps.000133](https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000133).
- [30] SAHA M, SARKAR S, SARKAR B, et al. Microbial siderophores and their potential applications: a review[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(5): 3984. DOI: [10.1007/s11356-015-4294-0](https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0).
- [31] FRANKEN A C W, LECHNER B E, WERNER E R, et al. Genome mining and functional genomics for siderophore production in *Aspergillus niger*[J]. Briefings in Functional Genomics, 2014, 13(6): 482. DOI: [10.1093/bfpg/elu026](https://doi.org/10.1093/bfpg/elu026).
- [32] HASELWANDTER K, HANINGER G, GANZAERA M. Linear fusigen as the major hydroxamate siderophore of the ectomycorrhizal Basidiomycota *Laccaria laccata* and *Laccaria bicolor*[J]. Biometals, 2013, 26(6): 969. DOI: [10.1007/s10534-013-9673-8](https://doi.org/10.1007/s10534-013-9673-8).
- [33] 李海云, 姚拓, 张榕, 等. 红三叶根际促生菌中具生防效果菌株筛选、鉴定及特性研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2018, 24(3): 743. DOI: [10.11674/zwyf.17377](https://doi.org/10.11674/zwyf.17377).
- [34] YASMIN S, ALCAZAR F L, GRUNDLINGER M, et al. Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012, 109(8): 2707. DOI: [10.1073/pnas.1106399108](https://doi.org/10.1073/pnas.1106399108).
- [35] KOULMAN A, LEE T V, FRASER K, et al. Identification of extracellular siderophores and a related peptide from the endophytic fungus *Epichloë festucae* in culture and endophyte-infected *Lolium perenne*[J]. Phytochemistry, 2012, 75(6): 128. DOI: [10.1016/j.phytochem.2011.11.020](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2011.11.020).
- [36] CHEN L H, LIN C H, CHUNG K R. A nonribosomal peptide synthetase mediates siderophore production and virulence in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*[J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(5): 497. DOI: [10.1111/mpp.12021](https://doi.org/10.1111/mpp.12021).

责任编辑: 何馨成