

研究报告



水拉恩氏菌 JZ-GX1 产嗜铁素特性及其对林木病原菌的拮抗作用

孔维亮 周敏 吴小芹*

南方现代林业协同创新中心 南京林业大学林学院 江苏 南京 210037

摘要:【背景】嗜铁素被认为是一种具有开发和利用价值的新型生物活性物质,已被逐渐应用到植物病原菌的防治中。【目的】明确根际促生菌水拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*) JZ-GX1 产嗜铁素最佳发酵培养条件,进一步探讨嗜铁素在防治植物根部病害中的潜在作用。【方法】采用摇瓶发酵法,通过铬天青(Chrome azurol S, CAS)检测分析,对影响 JZ-GX1 菌株嗜铁素分泌的几种发酵因子进行研究,并通过菌丝生长抑制速率法测定嗜铁素对两种林木病原菌的拮抗效果。【结果】以 KMB 为基础培养基,初始 pH 8.0,装液量 25 mL/50 mL,按 1%接种量接种,在 28 °C 下培养 36 h 可获得该菌株较高产量的嗜铁素;鉴定其嗜铁素类型为羧酸盐和羟肟酸型的复合型铁载体;在最适条件下测得其发酵原液对樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的抑制率均达到 100%。【结论】水拉恩氏菌 JZ-GX1 对碱性土壤上林木根部病害的防治具有较好的潜力。

关键词: 水拉恩氏菌,嗜铁素,发酵条件,拮抗效果

Characteristics of siderophores production by *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 and its antagonism against forest pathogens

KONG Wei-Liang ZHOU Min WU Xiao-Qin*

Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China

Abstract: [Background] Siderophores is considered as a new bioactive substance with development and utilization value, and has been gradually applied to the control of plant pathogens. [Objective] To clarify the optimal fermentation conditions for the production of siderophores by rhizosphere growth-promoting bacteria *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 and further explore the potential role of siderophores in controlling plant root diseases. [Methods] Several fermentation factors affecting the secretion of siderophores were studied by CAS fermentation analysis, and the antagonistic effect of siderophores on two forest pathogenic fungi was determined by mycelial growth inhibition rate method. [Results] The results showed that KMB-based medium, initial pH 8.0, liquid volume 25 mL/50 mL, inoculated with 1%, and cultured at 28 °C for 36 h, can obtain higher yield of siderophores; it can produce carboxylate and hydroxamic acid

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0600104); Priority Academic Program Development (PAPD) of Jiangsu Higher Education Institutions

*Corresponding author: Tel: 86-25-85427427; E-mail: xqwu@njfu.edu.cn

Received: 22-01-2019; Accepted: 02-04-2019; Published online: 22-04-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0600104); 江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

*通信作者: Tel: 025-85427427; E-mail: xqwu@njfu.edu.cn

收稿日期: 2019-01-22; 接受日期: 2019-04-02; 网络首发日期: 2019-04-22

type siderophores; under optimal conditions, the inhibition rate of the fermentation stock solution against *Phytophthora cinnamomi* and *Rhizoctonia solani* was 100%. **[Conclusion]** *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 has a good potential for controlling root diseases of forest trees in alkaline soils.

Keywords: *Rahnella aquatilis*, Siderophores, Fermentation conditions, Antagonistic effect

铁是所有生物体不可或缺的营养元素之一。尽管在多数土壤中全铁含量丰富,但绝大部分铁要么是以微生物不能利用的化学形态存在,要么深埋在矿物颗粒中^[1]。栖息在土壤中的病原菌需要在宿主植物被感染之前与土壤微生物群落的其他成员竞争生长所需的稀缺可用铁,因此,铁获取是许多植物病原菌完全毒力的基础^[2]。许多植物根际促生细菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)在铁缺乏的情况下自身可产生能特异性螯合 Fe^{3+} 的小分子化合物——嗜铁素,研究表明,这些铁载体可以通过剥夺铁来抑制土壤中病原体的生长,从而达到控制植物病害的目的^[3-4]。Tortora 等利用巴西固氮螺菌(*Azospirillum brasilense*)产生的儿茶酚型铁载体防治由尖孢炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)引起的草莓炭疽病,取得了较好的效果^[5]。陈伟等从多年生黑麦草根际土壤中分离得到一株假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌,在低铁条件下对黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的生长抑制率高达 91.2%^[6]。

本实验室前期从马尾松根际分离得到一株根际促生菌水拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*) JZ-GX1,前期研究表明,该菌能够产生嗜铁素、纤维素酶和磷酸酯酶,对杨树溃疡病有一定的防治效果^[7]。然而关于水拉恩氏菌 JZ-GX1 产嗜铁素的最优培养条件未见报道,同时该菌株对林木根部病原的拮抗作用也不清楚。鉴于嗜铁素在根际促生菌铁营养竞争中的重要地位,同时考虑到规模化生产应用的需求,本研究拟对水拉恩氏菌 JZ-GX1 产嗜铁素条件进行优化,并对产嗜铁素类型进行鉴定,最后对优化后的菌株发酵液对两种林木根部病原菌的拮抗效果进行初步评价,以期运用微生物产生的嗜铁素对铁的清除作用来评价由铁载体介导的土传病害防控提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

根际促生细菌水拉恩氏菌(*Rahnella aquatilis*) JZ-GX1 分离自广西南宁 28 年生马尾松根际土壤,土传病原菌:立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、樟疫霉(*Phytophthora cinnamomi*),均保存于南京林业大学森林病理实验室。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

MSA 培养基(g/L):蔗糖 20.0,天冬酰胺 2.0, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5。SM 培养基(g/L): K_2HPO_4 6.0, $NH_4H_2PO_4$ 3.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2,琥珀酸钠 4.0, pH 7.0-7.2。NB 培养基(g/L):牛肉膏 3.0,蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 7.4-7.6。LB 培养基(g/L):蛋白胨 10.0,酵母浸出粉 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0。KMB 培养基(g/L):蛋白胨 20.0,甘油 10 mL, K_2HPO_4 1.5。PDA 培养基(g/L):马铃薯 200.0,葡萄糖 20.0。CM 培养基(g/L):柠檬酸钠 2.0, NH_4NO_3 1.0, K_2HPO_4 0.5。

天冬酰胺,中国惠兴生化试剂有限公司;丙三醇,南京化学试剂股份有限公司;硝酸钠,合肥科华精细化工研究所;钼酸钠,南京宁试化学试剂有限公司;其它生化试剂,国药集团化学试剂有限公司。

紫外分光光度计,珀金埃尔默股份有限公司;高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂;pH 计,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司。

1.2 菌株产嗜铁素的类型分析

通过 $FeCl_3$ 实验^[8]、四唑盐实验^[9]、Arnow's 实验^[10]及 Shenker's 实验^[11]分析和确定菌株产嗜铁素的类型。

1.3 菌株产嗜铁素的定量分析

从固体 NA 平板上挑取单菌落,用铂金丝接种环挑取新鲜菌苔于 50 mL NB 培养基中,28 °C、180 r/min

培养过夜,之后 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用 0.85%的生理盐水洗涤 2 次,调节菌悬液浓度为 10^7 CFU/mL 备用。然后将该菌悬液按上述处理接到相应的培养基中,4 °C、10 000 r/min 离心 10 min 取上清。按体积比 1:1 加入铬天青(Chrome azurol S, CAS)检测液,充分混匀后静置 1 h,测定 630 nm 处的吸光值(A_s),以双蒸水为对照调零。另取空白培养基与 CAS 检测液等体积混匀,以其吸光值作参比值(A_r),根据公式 $[(A_r - A_s)/A_r] \times 100\%$ 计算嗜铁素的相对含量^[12]。

1.4 菌株产嗜铁素的最佳发酵条件筛选

1.4.1 培养基

选取 KMB、NB、LB、PDB、CM、MSA、LNM 和 SM 共 8 种培养基^[13]进行菌株嗜铁素产生的发酵培养,按照 1.3 中公式计算嗜铁素的相对含量,选用最优培养基进行后续实验。

1.4.2 起始 pH

将发酵培养基的起始 pH 值分别设 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0 共 11 个处理,其他培养条件和检测方法同 1.4.1。

1.4.3 发酵时间

分别设 6、12、24、36、48、60、72 h 共 7 个处理进行菌株嗜铁素产生的发酵培养,其它培养条件和检测方法同 1.4.1。

1.4.4 接种量

分别设 0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、3.0% 共 6 个处理进行菌株嗜铁素产生的发酵培养,其它培养条件和检测方法同 1.4.1。

1.4.5 温度

分别设 15、20、25、28、30、33、37 °C 共 7 个处理进行菌株嗜铁素产生的发酵培养,其它培养条件和检测方法同 1.4.1。

1.4.6 装瓶量

50 mL 瓶中分别设 10、20、25、30、40 mL 共 5 个装瓶量进行菌株产生嗜铁素的发酵培养,其它培养条件和检测方法同 1.4.1。

1.5 菌株产嗜铁素发酵液与病原菌拮抗作用测定

将 1.4 中不同处理得出的最佳发酵影响因素综合起来再进行发酵,发酵液离心后,经 0.22 μm 的

微孔滤膜过滤除菌,然后分别按原液、10 \times 、100 \times 的稀释倍数与 PDA 培养基混合,制成带毒平板,待培养基凝固后,在平板中央接种直径为 8 mm 的各病原菌菌块,25 °C 下培养 5 d 后,用十字交叉法测量菌饼直径^[14]。以加 KMB 培养基为阴性对照,以加 50 mg/L 的 8-羟基喹啉(去除痕量铁)为阳性对照。菌饼扩展直径(mm)为菌饼的平均直径(mm)与接种菌饼直径(8 mm)之差,抑制率公式计算:抑制率(%)=(对照组菌饼扩展直径-处理组菌饼扩展直径)/对照组菌饼扩展直径 \times 100。

1.6 数据分析

试验数据利用 SPSS 22.0 软件进行方差分析和 Duncan 多重比较($P < 0.05$),计算所有均值的标准误。

2 结果与分析

2.1 水拉恩氏菌 JZ-GX1 嗜铁素种类的特异性分析

在 Shenker's 实验中,由 JZ-GX1 制备的铁载体溶液在 230 nm 处出现吸收峰,说明该菌能产生羧酸型铁载体;在四唑盐实验中,溶液颜色能够立即发生变化呈深红色,说明该菌能够产生异羟肟酸型嗜铁素,因此判断水拉恩氏菌 JZ-GX1 的嗜铁素为复合型铁载体。

2.2 水拉恩氏菌 JZ-GX1 产嗜铁素的发酵条件优化

2.2.1 培养基对 JZ-GX1 菌株嗜铁素产量的影响

由图 1 可知,水拉恩氏菌 JZ-GX1 嗜铁素上清液的 OD_{630} 值在各供试培养基中由大到小依次为:KMB>MSA>LNM>NB,各培养基之间差异达到显著水平;而在 LB、CM、PDB、SM 培养基中,JZ-GX1 嗜铁素上清液 OD_{630} 值均为负值。说明在 8 种供试培养基中,KMB 培养基最有利于菌株 JZ-GX1 分泌嗜铁素。

2.2.2 初始 pH 对 JZ-GX1 菌株嗜铁素产量的影响

由图 2 可知,环境 pH 值对 JZ-GX1 菌株嗜铁素产量的影响总趋势是:随着 pH 值增大呈先上升后下降的趋势,于 pH 值 8.0 时达到最大值表明 JZ-GX1 分泌的复合型铁载体更倾向于偏碱性的环境,这对于碱性和石灰性土壤抗缺铁营养胁迫和病原菌拮抗具有特殊意义。

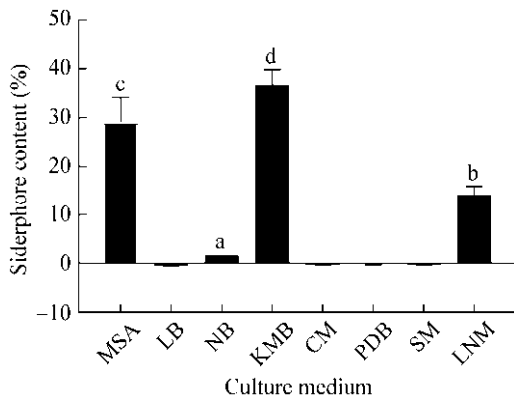


图1 培养基对 JZ-GX1 嗜铁素产量的影响

Figure 1 Effects of different medium on siderophore production

注: 柱状图上不同小写字母代表在 0.05 水平上差异显著.

Note: Columns with different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

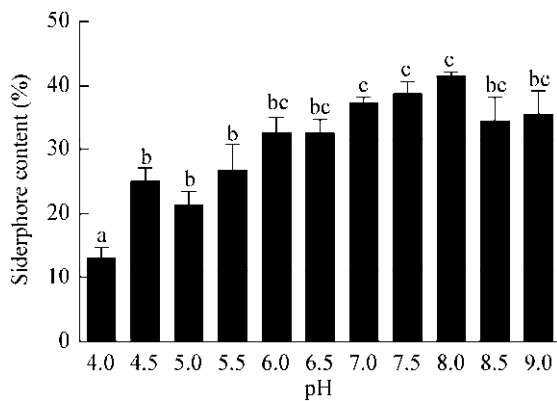


图2 初始 pH 值对 JZ-GX1 嗜铁素产量的影响

Figure 2 Effects of different initial pH value on siderophore production

注: 柱状图上不同小写字母代表在 0.05 水平上差异显著.

Note: Columns with different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

2.2.3 发酵时间对 JZ-GX1 菌株嗜铁素产量的影响

由图 3 可知, 发酵时间直接影响 JZ-GX1 菌株嗜铁素的分泌量, 随着发酵时间的延长, 从 6 h 到 36 h 急剧上升, 于 36 h 达到最大分泌量, 36 h 到 72 h 之间有所下降。因此, 选择 36 h 为最佳的产嗜铁素发酵时间。

2.2.4 接种量对 JZ-GX1 菌株嗜铁素产量的影响

接种量的大小对发酵单位有较大影响, 接种量小的时候, 延迟期变长, 发酵时间延长; 接种量变

大时, 菌体迅速生长, 导致培养基营养成分不够, 从而降低发酵单位。由图 4 可以看出以 1% 接种量为最佳, 然而各处理间差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.2.5 温度对 JZ-GX1 菌株嗜铁素产量的影响

由图 5 可知, JZ-GX1 在供试的温度范围内培养均可获得一定量的嗜铁素, 在 28 °C 以下, 随着温度的升高, 嗜铁素产量逐渐提高, 在 28 °C 时达到最大值; 之后随着温度升高产量逐渐下降, 说明温度对嗜铁素分泌的影响较大, 在最适生长温度范围 (20–30 °C) 内, 嗜铁素产量较高, 温度偏低或偏高均不利于 JZ-GX1 分泌嗜铁素。

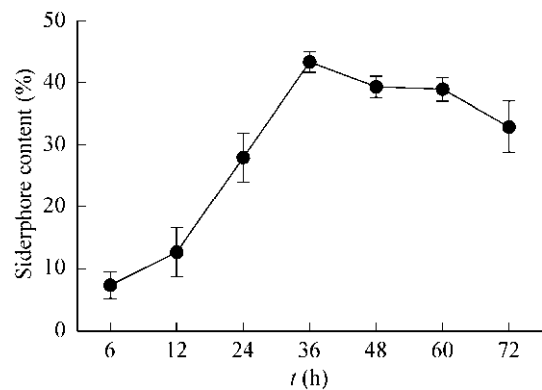


图3 发酵时间对 JZ-GX1 嗜铁素产量的影响

Figure 3 Effects of different fermentation time on siderophore production

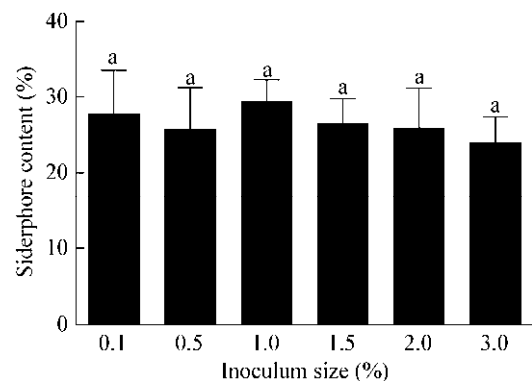


图4 接种量对 JZ-GX1 嗜铁素产量的影响

Figure 4 Effects of different inoculation amount on siderophore production

注: 柱状图上相同小写字母代表在 0.05 水平上差异不显著.

Note: Columns with same letters indicate no significant differences at $P > 0.05$.

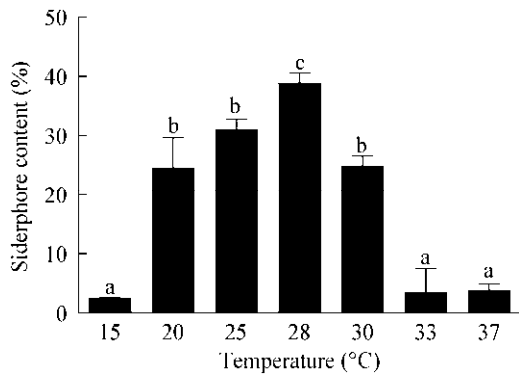


图5 温度对JZ-GX1嗜铁素产量的影响

Figure 5 Effects of different temperature on siderophore production

注: 柱状图上不同小写字母代表在0.05水平上差异显著。

Note: Columns with different letters indicate significant differences at $P < 0.05$.

2.2.6 装瓶量对JZ-GX1菌株嗜铁素产量的影响

装瓶量的多少关系到发酵时的通气量, 通气量是影响需氧菌菌体生长和代谢物生成的重要因素。试验结果表明, 在瓶装量为25 mL/50 mL时, 嗜铁素的产量最多, 但与其他装瓶量处理后的嗜铁素含量相比没有显著性差异($P > 0.05$) (图6)。

2.3 水拉恩氏菌JZ-GX1嗜铁素发酵液对立枯丝核菌和樟疫霉生长的影响

由图7可以看出, 水拉恩氏菌JZ-GX1嗜铁

素的发酵滤液对两种病原菌具有较强的抑制作用, 抑制率在26.36%–100% (表1)。随着发酵液稀释倍数的增加, 嗜铁素浓度降低, 抑制率减小, 当稀释倍数为10×和100×时, JZ-GX1菌株产嗜铁素发酵滤液对樟疫霉的抑制效果要强于立枯丝核菌; 而原液则完全抑制樟疫霉和立枯丝核菌的生长, 达到了和阳性对照(添加8-羟基喹啉)同样的效果。方差分析结果显示, 对于两种林木根部病原菌, 嗜铁素滤液各个浓度之间的抑制作用差异极显著($P < 0.05$)。

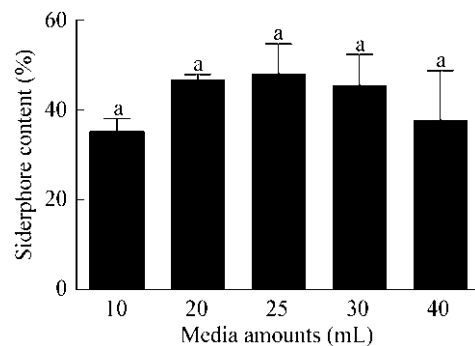


图6 装瓶量对JZ-GX1嗜铁素产量的影响

Figure 6 Effects of different media amounts on siderophore production

注: 柱状图上相同小写字母代表在0.05水平上差异不显著。

Note: Columns with same letters indicate no significant differences at $P > 0.05$.

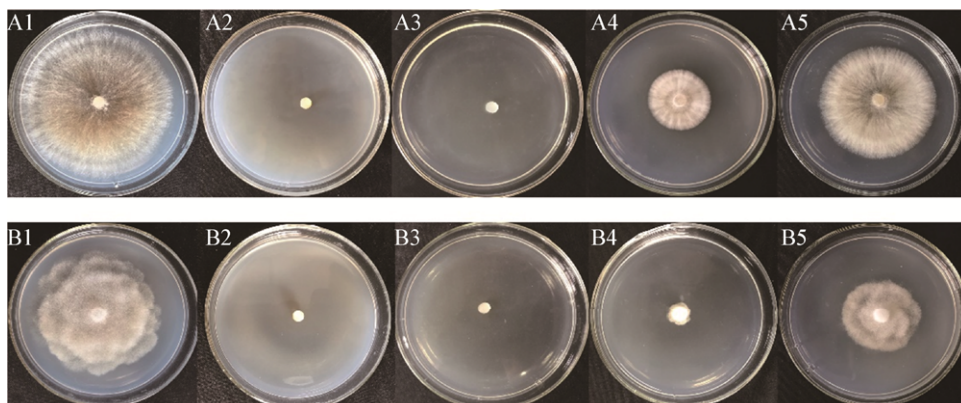


图7 不同水拉恩氏菌JZ-GX1嗜铁素发酵液稀释倍数的抑菌效果

Figure 7 The antagonism of different dilution times of siderophores produced by *R. aquatilis* JZ-GX1 against two pathogens

注: A: 立枯丝核菌; B: 樟疫霉; 1、2、3、4、5 分别代表阴性对照、阳性对照、嗜铁素发酵原液、10倍和100倍稀释液。

Note: A: *Rhizoctonia solani*; B: *Phytophthora cinnamomi*; 1, 2, 3, 4, 5 represent negative control, positive control, stock solution, 10 times and 100 times dilution of siderophores respectively.

表 1 水拉恩氏菌 JZ-GX1 嗜铁素发酵液对不同病原菌的抑制率

Table 1 The inhibition rate of siderophores produced by *R. aquatilis* JZ-GX1 against two pathogens (%)

病原 Pathogen	阳性对照 Positive control	原液 Stock solution	10×	100×
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	100a	100a	51.08±0.48b	26.36±3.31c
樟疫霉 <i>Phytophthora cinnamomi</i>	100a	100a	93.33±1.36b	68.98±2.23c

注: 表中数据为平均值±标准偏差, 同一行中不同小写字母表示差异显著性($P<0.05$).

Note: The datas represent means±SD, and different letters in the same line indicate significant difference ($P<0.05$).

3 讨论与结论

国内外已有一些关于嗜铁素产生菌筛选方面的报道, 主要集中在假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[15-16]、芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[17]、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia*)^[18]、不动杆菌属(*Acinetobacter*)^[19]等。微生物铁载体通常包括儿茶酚(Catchlate)、羟肟酸(Hydroxamates)、羧酸盐型(Carboxylate-type) 3 种类型^[20], 本研究首次鉴定拉恩氏属细菌(*Rahnella aquatilis*) JZ-GX1 可以分泌羧酸盐型和羟肟酸型两种嗜铁素, 属于复合型铁载体, 而对该铁载体的详细结构研究还需要进一步借助液质或气质联用等分析仪器进行分析。

产生嗜铁素被认为是植物根际促生菌最主要的直接和间接促进植物生长的有效途径之一, 而嗜铁素的分泌受到多种因素的影响^[21-22]。本试验对影响细菌嗜铁素分泌的几个因子进行了研究, 发现培养基种类、初始 pH、温度、发酵时间对水拉恩氏菌 JZ-GX1 嗜铁素产量有显著影响, 说明碳氮源种类、土壤的理化性质对微生物功能的发挥起着至关重要的作用, 这也就解释了一些实验室条件下拮抗效果良好的菌株在大田试验时生防效果却不稳定的现象。而接种量和装瓶量未造成 JZ-GX1 嗜铁素产量的显著变化, 说明嗜铁素的分泌与初始接种量无关。氧的供应量在摇瓶到发酵罐的放大过程中是至关重要的^[23], 所以要确定合适的装瓶量还要进行大罐发酵试验。

从抑菌试验的结果可以看出, 不加铁载体处理的供试病原菌生长最好, 而添加去铁 8-羟基喹啉之后菌丝完全没有生长, 说明 8-羟基喹啉将 PDA 培

养基里的铁全部去除, 病原菌的菌丝由于得不到铁营养而无法存活, 水拉恩氏菌 JZ-GX1 产嗜铁素的发酵原液和 PDA 制成的带毒平板达到了相同的结果; 而当稀释倍数为 100×时, 抑菌效果不显著, 说明培养基中铁过多, 有限的铁载体不能完全将铁占据, 铁营养不成为病原菌生长的限制性因素, 铁载体显然也没有作用。只有当细菌铁载体有能力将环境中的铁完全占据, 这时候由于病原菌得不到铁, 其生长就会受到影响暗示了微生物通过铁和铁载体在生态中搭建的真实关系, 若病原菌和 PGPR 的铁载体螯合力及其分泌量相差不多时, 谁优先控制了环境中的铁离子, 谁就在铁营养的竞争占据主动, 而 PGPR 通过铁载体能够抑制病原菌的一个重要因素在于他们是土著菌, 已经优先控制了周围有限的铁, 如果他们主动侵入某一病原菌的领地, 那么他们能否取得胜利还是一个未知数; 当然, 由于铁载体种类繁多, 铁载体对铁的螯合能力相差很大, 那些铁载体分泌能力非常强的微生物无疑在生态中占据及其明显的竞争优势^[24]。

常媛等从八宝景天土壤中分离获得一株长枝木霉(*Trichoderma longibrachiatum*), 采用平板对峙法测得该木霉对立枯丝核菌的抑菌率为 58.56%^[25]。罗同阳等发现产几丁质酶的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)对引起棉花立枯病的立枯丝核菌具有拮抗作用, 提取的几丁质酶对菌丝生长抑制率为 88.1%^[26]。此次试验结果表明水拉恩氏菌 JZ-GX1 产嗜铁素的发酵液抑菌率更高, 而关于樟疫霉的生防菌则属于首次报道。因此, 水拉恩氏菌 JZ-GX1 在生产中抗病促生的应用潜力较大。

研究表明,利用微生物铁载体还可以防治植物在石灰性土壤上的缺铁黄化,Zhou等利用伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)在低铁条件下有效改善黄芩的铁采集^[27],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。有关JZ-GX1菌株对林木缺铁黄化和石灰性土壤上真菌病害的防治试验正在进行中,我们今后将对有关研究结果作进一步报道。

REFERENCES

- [1] Liu YP, Teng SS, Zhao L. Identification of a siderophore-producing bacterium *Pseudomonas putida* A3 and its growth-promoting effects on cucumber seedlings[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2011, 17(6): 1507-1514 (in Chinese)
刘艳萍, 滕松山, 赵蕾. 高产嗜铁素恶臭假单胞菌 A3 菌株的鉴定及其对黄瓜的促生作用[J]. *植物营养与肥料学报*, 2011, 17(6): 1507-1514
- [2] Verbon EH, Trapet PL, Stringlis IA, et al. Iron and immunity[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2017, 55: 355-375
- [3] 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
- [4] Chen W, Shu JH, Chen Y, et al. Screening, identification and fermentation condition optimum of a siderophore-producing bacteria WN-H3 from rhizosphere of ryegrass[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2016, 32(10): 219-226 (in Chinese)
陈伟, 舒健虹, 陈莹, 等. 黑麦草根际铁载体产生菌 WN-H3 的分离鉴定及其产铁载体培养条件的优化[J]. *生物技术通报*, 2016, 32(10): 219-226
- [5] Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO. *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*[J]. *Archives of Microbiology*, 2011, 193(4): 275-286
- [6] Chen W, Wang XL, Fu W, et al. Screening, identification and antagonistic against the pathogens of a siderophore-producing bacteria HMGY6B from rhizosphere of ryegrass[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(10): 2207-2215 (in Chinese)
陈伟, 王小利, 付薇, 等. 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[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(10): 2207-2215
- [7] Song FX, Wu XQ, Zhao Q. Antagonism of plant growth-promoting bacteria *Rahnella aquatilis* JZ-GX1 to canker in poplar[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2017, 41(4): 42-48 (in Chinese)
- [8] Snow GA. Mycobactin. A growth factor for *Mycobacterium johnei*. Part II. Degradation, and identification of fragments[J]. *Journal of the Chemical Society*, 1954: 2588-2596
- [9] Arnow LE. Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxyphenylalanine-tyrosine mixtures[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1937, 118(2): 531-537
- [10] Shenker M, Oliver I, Helmann M, et al. Utilization by tomatoes of iron mediated by a siderophore produced by *Rhizopus arrhizus*[J]. *Journal of Plant Nutrition*, 1992, 15(10): 2173-2182
- [11] Stookey LL. Ferrozine — a new spectrophotometric reagent for iron[J]. *Analytical Chemistry*, 1970, 42(7): 779-781
- [12] 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
- [13] Yu XM. Isolation of siderophore producing bacterium *B. subtilis* CAS15 from the rhizosphere soil of rubber tree in Hainan island and cloning, expression and function analysis of the siderophore related gene *dhbC*[D]. Tai'an: Doctoral Dissertation of Shandong Agricultural University, 2009 (in Chinese)
余贤美. 海南岛橡胶根际嗜铁细菌 *B. subtilis* CAS15 筛选及嗜铁素基因 *dhbC* 克隆、表达与功能分析[D]. 泰安: 山东农业大学博士学位论文, 2009
- [14] Han S, Zhang SC, Huang XY, et al. Antagonism of a siderophore-producing entophytic bacteria on *Fusarium oxysporum*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(5): 1039-1044 (in Chinese)
韩松, 张守村, 黄晓艳, 等. 一株产铁载体内生细菌对尖孢镰刀菌的拮抗作用[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(5): 1039-1044
- [15] Radzki W, Gutierrez Mañero FJ, Algar E, et al. Bacterial siderophores efficiently provide iron to iron-starved tomato plants in hydroponics culture[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 104(3): 321-330
- [16] Nagata T, Oobo T, Aozasa O. Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(6): 686-690
- [17] Yu XM, Zhou GF, Xin L. Study on factors influencing the siderophore production of *Bacillus subtilis* BS-15 and effects of BS-15 on disease control and growth promotion of sweet pepper[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2010, 12(2): 135-141 (in Chinese)
余贤美, 周广芳, 辛力. 枯草芽孢杆菌 BS-15 产嗜铁素条件及其对甜椒的防病促生效应[J]. *农药学报*, 2010, 12(2): 135-141
- [18] Yang C. The conditions for siderophore producing of CAS19 and cloning and analysis of the siderophore synthesis-related gene *cepR*[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2010 (in Chinese)

- 杨岑. 嗜铁菌 CAS19 产嗜铁素条件及其嗜铁素合成相关基因 *cepR* 的克隆与分析[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2010
- [19] Maindad DV, Kasture VM, Chaudhari H, et al. Characterization and fungal inhibition activity of siderophore from wheat rhizosphere associated *Acinetobacter calcoaceticus* strain HIRFA32[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2014, 54(3): 315-322
- [20] Liu YP. Purification of siderophore produced by rhizobacteria and its role in plant growth promotion[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Normal University, 2012 (in Chinese)
刘艳萍. 植物根际促生菌嗜铁素的纯化及其促生机制的研究[D]. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, 2012
- [21] Zhao RY, Zhao SZ, He HL. Factors influencing production of siderophore from *Pseudomonas* C-12[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2013, 41(1): 112-114 (in Chinese)
赵荣艳, 赵士振, 贺宏露. 嗜铁假单胞杆菌 C-12 产嗜铁素的影响因素[J]. *贵州农业科学*, 2013, 41(1): 112-114
- [22] Yi YJ, Zhou GZ, Shi Y, et al. Fermentation conditions of siderophore produced by *Pseudomonas fluorescens* RB5[J]. *Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)*, 2011, 32(6): 32-35,39 (in Chinese)
伊艳杰, 周广舟, 时玉, 等. 荧光假单胞菌 RB5 产嗜铁素的发酵条件[J]. *河南工业大学学报: 自然科学版*, 2011, 32(6): 32-35,39
- [23] Wang S. Plant growth promotion and control of plant disease with *Bacillus* spp. and lipopeptide[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2009 (in Chinese)
王帅. 芽孢杆菌及其脂肽类化合物防治植物病害和促进植物生长的研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2009
- [24] Xie XJ. Analysis of catechol-type iron carrier secreted by soil bacteria and its effect on pathogenic fungi[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2006 (in Chinese)
谢小军. 土壤细菌分泌的儿茶酚型铁载体分析及其对病原真菌作用的研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2006
- [25] Chang Y, Yang XT, Jiang CY, et al. A *Trichoderma longibrachiatum* strain with antagonistic effects against three soil-borne pathogenic fungi[J]. *Pratacultural Science*, 2017, 34(2): 246-254 (in Chinese)
常媛, 杨兴堂, 姜传英, 等. 一株能拮抗 3 种土传病害病原真菌的长枝木霉[J]. *草业科学*, 2017, 34(2): 246-254
- [26] Luo TY, Zheng X, Li B. Inhibition of chitinase-producing *Bacillus subtilis* against *Rhizoctonia solan*[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2014(22): 107-108 (in Chinese)
罗同阳, 郑翔, 李宾. 产几丁质酶枯草芽孢杆菌对立枯丝核菌的抑制作用研究[J]. *现代农业科技*, 2014(22): 107-108
- [27] Zhou C, Zhu L, Ma ZY, et al. Improved iron acquisition of *Astragalus sinicus* under low iron-availability conditions by soil-borne bacteria *Burkholderia cepacia*[J]. *Journal of Plant Interactions*, 2018, 13(1): 9-20