

解淀粉芽孢杆菌 L-S60 与黄瓜互作特性研究

张莹¹ 秦宇轩¹ 尚庆茂² 张一凡¹ 李昌辉¹ 李平兰¹

(1. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083; 2. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 植物根系分泌物作为植物与土壤进行物质交换和信息传递的重要载体物质,对植物-微生物种间互作发挥着重要作用。本文分析了解淀粉芽孢杆菌 L-S60 与黄瓜的互作过程,研究了黄瓜根系分泌物的主要成分有机酸及氨基酸对菌株的趋化作用及菌株的利用情况,通过计数和荧光定量 PCR 的方式分析了菌株在黄瓜幼苗的根际定殖情况。结果表明,L-S60 能够部分利用黄瓜根系分泌物中主要的有机酸(柠檬酸、草酸、琥珀酸和苹果酸)及氨基酸(谷氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸和色氨酸)成分并且受到这些成分的趋化作用,其中对于苹果酸和谷氨酸的利用情况及受趋化作用最优。从定殖量及相关基因转录水平差异上分析,菌株具有在黄瓜幼苗根系表面定殖的能力,且菌株最大定殖量为 1.02×10^5 CFU/g。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌; 黄瓜; 根系分泌物; 互作特性

中图分类号: S482.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2019)02-0258-08

Characteristics of Interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 and Cucumbers

ZHANG Ying¹ QIN Yuxuan¹ SHANG Qingmao² ZHANG Yifan¹ LI Changhui¹ LI Pinglan¹

(1. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Plant root exudate plays an important role in the process of material exchange between plant and soil. Moreover, it is a significant factor in ‘plant-microorganisms’ interactions. The process of interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 and cucumbers was analyzed. The utilization and chemotaxis of the main components of cucumber root exudate, organic acids and amino acids, by L-S60 were studied. After establishing the interaction model between the strain and the cucumber seedlings, the colonizing of root surface in hydroponic culture was studied via counting the strain by time. Furthermore, the genes related to root colonization, swarming motility and biofilm formation on translational level were analyzed by fluorescent quantitation PCR. The results showed that L-S60 could utilize the main organic acids (citric acid, oxalic acid, succinic acid and malic acid) and amino acids (glutamic acid, phenylalanine, cysteine and tryptophan) from cucumber root exudates and provide well utilization of malic acid and glutamic acid. Also, L-S60 showed the chemotaxis toward these components and could be strongly attracted to malic acid and glutamic acid. According to the CFUs, which could colonize on the root surface, and the relative quantitative expression of the related genes on translational level, L-S60 showed strong colonization capacities on the cucumber root surface and the most amount of colonization was 1.02×10^5 CFU/g. In conclusion, L-S60 showed great potential to become a biological control agent of practical applications in the future.

Key words: *Bacillus amyloliquefaciens*; cucumbers; root exudate; characteristics of interaction

0 引言

植物根际促生菌 (Plant growth promoting

rhizobacteria, PGPR)是指自由生活在土壤或附生于植物根际的一类促进植物生长及矿质营养吸收和利用,抑制有害微生物的生防益生菌^[1]。而 PGPR 在

收稿日期: 2018-08-11 修回日期: 2018-08-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671831)和公益性行业(农业)科研专项(201303014)

作者简介: 张莹(1992—),女,博士生,主要从事应用微生物研究,E-mail: zy920506@sina.com

通信作者: 李平兰(1964—),女,教授,博士生导师,主要从事应用微生物研究,E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

实际应用过程中,会直接受到附生植物根系分泌物的影响。植物的根系分泌物是调控植物-根际微生物的关键因素,是研究 PGPR 与宿主植物互作影响与机制的关键^[2]。

根系分泌物作为植物与土壤进行物质交换和信息传递的重要载体物质,主要是指植物在生长过程中,通过根分泌的方式向根周围释放一些无机离子和有机化合物,这些物质统称为根系分泌物^[3]。研究发现,根系分泌物中含有的诸如糖、氨基酸和有机酸等低分子量物质,对植物-微生物种间互作发挥着重要作用^[4]。而对于 PGPR 来说,这些成分不但可以作为其良好的碳源,还常作为信号分子起到趋化作用,促进其在根际定殖^[5]。DE 等^[6]发现,荧光假单胞菌 WCS365 受到番茄根系分泌物中的苹果酸和柠檬酸的趋化作用,并且根系分泌物会影响菌株鞭毛的运动性;PETERS 等^[7]研究发现,在缺氮条件下,豆科植物的根系通过分泌类黄酮来诱导启动根瘤菌的结瘤基因 *nodD* 的表达,最终导致根瘤菌成功侵染根系并形成根瘤;某些 PGPR 能够利用植物根系分泌物的成分作为生物合成的前体,研究表明,燕麦会在根尖部分泌色氨酸用于 PGPR 转化为生长素(吲哚乙酸),进而促进自身的生长^[8]。

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) L-S60 是一株分离自土壤,具有优良促生抗病特性的植物根际促生菌^[9],应用于植物生防方面具有很大的潜力。为了更好地理解植物根际促生菌与植物互作这一复杂过程,本研究分析淀粉芽孢杆菌 L-S60 与黄瓜(*Cucumis sativus* L.)的互作过程。由于对根际分泌物的趋化和运动性是微生物定殖根际的前提条件,首先研究黄瓜根系分泌物的主要成分有机酸及氨基酸对菌株的的趋化作用及菌株的利用情况。在建立菌株与黄瓜幼苗互作模型后,通过计数的方式研究菌株在水培黄瓜幼苗根系表面的定殖量随时间变化的关系,并且通过荧光定量 PCR 的方式分析与黄瓜根系互作后菌株和根际定殖、群集运动、生物被膜形成相关基因转录水平的变化。

1 材料和方法

1.1 试验材料

解淀粉芽孢杆菌 L-S60,由中国农业大学食品科学与营养工程学院应用微生物研究室提供。

黄瓜品种为“中农 6 号”,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。

1.2 菌株受黄瓜根系分泌物成分影响的确定

1.2.1 有机酸成分对菌株的趋化试验

将 ADLER^[10]的方法略作修改,进行菌株对有

机酸趋化作用的定量测定,将不同浓度(50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)的有机酸趋化液(将柠檬酸、草酸、琥珀酸及苹果酸 4 种有机酸分别溶于 PBS 缓冲液,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌)取 5 mL 加入 6 孔细胞培养板中。将活菌数约为 10^8 CFU/mL 的菌液离心后重悬在等体积的无菌 PBS 缓冲液中,将吸有菌悬液的内径 1 mm、长度 3 cm 的无菌毛细管分别放入上述 6 孔细胞培养板中,37℃ 静置 1 h,以不加有机酸的 PBS 缓冲液为空白对照,将 6 孔细胞培养板中的有机酸趋化液进行平板计数。

1.2.2 菌株对有机酸的利用试验

将活菌数约为 10^8 CFU/mL 的菌液以 0.5% 的接种量接种于 pH 值调节为 5.5、浓度 200 $\mu\text{mol/L}$ 的有机酸(柠檬酸、草酸、琥珀酸、苹果酸)Hoagland 营养液^[11]中,以不加有机酸的 Hoagland 营养液(pH 值 5.5)为空白对照,37℃、200 r/min 培养 12、36 h,采用平板计数的方式计算培养液中的菌数。

1.2.3 氨基酸成分对菌株的趋化试验

不同质量浓度(5、10、20 $\mu\text{g/mL}$)的氨基酸趋化液(将谷氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸及色氨酸 4 种氨基酸分别溶于 PBS 缓冲液,用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌)分别取 5 mL 加入 6 孔细胞培养板中,其余步骤同 1.2.1 节。

1.2.4 菌株对氨基酸的利用试验

将活菌数约为 10^8 CFU/mL 的菌液以 0.5% 的接种量接种于 pH 值调节为 5.5、质量浓度 20 $\mu\text{g/mL}$ 的氨基酸(谷氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、色氨酸)Hoagland 营养液中,其余步骤同 1.2.2 节。

1.3 菌株与黄瓜幼苗互作模型的建立

参照 GRAHAM 等^[12]的方法且适当修改,具体方法如下:

(1)种子催芽:取黄瓜种子若干,用清水浸泡 2 h,75% 乙醇浸泡 1 min,5% 次氯酸钠溶液浸泡 15 min,无菌水冲洗至无刺鼻气味。在灭菌的培养皿(内垫有无菌水润湿的滤纸)中加入适量的无菌水,每皿放置约 40 粒消毒种子,室温(20℃)放置 1 h 后转至暗处,28℃ 培养 48 h。

(2)将催芽后的种子播种于装有灭菌无土栽培基质(蛭石与珍珠岩体积比为 1:1)的穴盘中,置于 28℃ 光照培养箱(16 h 光照,8 h 黑暗),每隔 24 h 用 2 倍稀释的 Hoagland 营养液灌根,直至长出第 1 片真叶(播种后约 14 d)。

(3)将穴盘取出,在每孔中加入过量的无菌水,小心拔出黄瓜幼苗,尽量不破坏幼苗的根系,用无菌水洗净根表面的基质,每 20 棵黄瓜苗根系浸入添加

50 μg/mL 利福平的 200 mL 灭菌水中,2 h 后用无菌水洗净根系。

(4)将活菌数约为 10⁸ CFU/mL 的菌液离心后重悬在等体积的 Hoagland 营养液中,吸取 5 mL 加入含有 45 mL Hoagland 营养液的 50 mL 锥形瓶中,每瓶加入 5 棵处理好的黄瓜苗,用无菌脱脂棉封口及固定黄瓜苗。将锥形瓶用锡纸包好(植物根系需避光生长),在 28℃ 光照培养箱(16 h 光照,8 h 黑暗)中培养。

1.4 菌株在水培黄瓜幼苗根系表面定殖量测定

按不同培养时间(6、12、18、24、36、48 h)将黄瓜幼苗根系移出,用无菌水冲洗掉根系表面的菌株后,切取 1 g 根系置于 9 mL 无菌生理盐水中,涡旋 1 min,平板计数。

1.5 菌株定殖相关基因转录水平差异

1.5.1 细菌总核糖核酸的提取及反转录

按不同培养时间(0.25、0.5、1、2、4、6、8 h)将植物根系移除后,将菌液低温离心,弃上清液后加入液氮研磨,采用 TRIzol 法提取细菌总核糖核酸(RNA)^[13]。将提取后的 RNA 进行反转录,反应体系为:RNA 5 μg,Random Primer 1 μL,5 × RT Reaction Mix 4 μL,TUREscript H – Rtnase 0.8 μL,加 DEPC 水至总反应体系为 20 μL。反应条件:25℃,10 min;42℃,30 min;65℃,15 min。

1.5.2 实时荧光定量 PCR

根据菌株与根际定殖、群集运动、生物被膜形成相关功能的共 17 个基因设计扩增引物(表 1),采用 20 μL 反应体系对基因相关转录水平进行实时荧光定量 PCR 检测,其中 SYBR (2 ×) qPCR Master Mix 10 μL,上下游引物各 1 μL,模板为 1 μL,ddH₂O 7 μL。反应条件为:95℃,30 s;95℃,5 s;62℃,30 s;40 个循环。数据分析参考 MORISSET 等^[14]的方法。

2 结果与分析

2.1 菌株受黄瓜根系分泌物成分的影响

2.1.1 有机酸成分对菌株的趋化试验

由图 1 可知,柠檬酸、草酸、琥珀酸及苹果酸 4 种有机酸对解淀粉芽孢杆菌 L – S60 均具有正趋化作用,整体来看,有机酸对于 L – S60 的趋化作用都较为微弱,且趋化作用对有机酸的浓度有较强的依赖性。其中,苹果酸对 L – S60 的趋化作用最强,以浓度为 200 μmol/L 时为最佳;而草酸和柠檬酸对菌株的趋化作用相对较弱。

2.1.2 菌株对有机酸的利用试验

由图 2 可知,解淀粉芽孢杆菌 L – S60 能够利用

表 1 与根际定殖、群集运动、生物被膜形成相关基因引物序列

Tab.1 Primers sequence of genes involved in root colonization, swarming motility and biofilm formation		
目的基因	碱基序列(5'→3')	扩增片段长度/bp
16S(管家基因)	上游:TTCAAATAGGGCGGCACCTT	201
	下游:CTGCACTCAAGTTCCCCAGT	
<i>sacB</i>	上游:GGACTGGATGTGTGGGACAG	216
	下游:GTTCGCGTCGAAGTTATCGC	
<i>ycdH</i>	上游:TCGGTCGAACCCCATGATTG	185
	下游:TCCGAACCTTCGAGCAAGTC	
<i>yfiQ</i>	上游:CGGTTGATGCATTTTCGGACC	213
	下游:CTGAAACGAATCCGGCTCCT	
<i>sfp</i>	上游:GCCCGGAGTGGGAAATGTTA	183
	下游:GCCGGCGCTTTTACCATAAG	
<i>yczE</i>	上游:GTTAAAGCCACGATGACCGC	194
	下游:CGGGAATCTTGTATGCGCTG	
<i>srfAA</i>	上游:CGGACCGTGTCAGTACACAA	207
	下游:TCTGTTTGACGGACGCATCA	
<i>comP</i>	上游:CGTCTCCCGGTCATCAAAA	190
	下游:AAAGCAGCGTTCCGATTGTG	
<i>efp</i>	上游:TCGGCAGTTCAATACCGAGC	218
	下游:CCGTGCAGGTGAAAAAGTCG	
<i>swrB</i>	上游:AAACACCCTTGACGCGTTTC	190
	下游:TTCGTCACTTTCAGCCCGTT	
<i>swrA</i>	上游:TGCTTCGCACACTCTTCATTG	184
	下游:AGAGGGCAAGTATTGTGCGCT	
<i>spo0A</i>	上游:GATTTTTCCGCTTCGGCTCC	209
	下游:CATCATGCTGACGGCATTCTG	
<i>sigH</i>	上游:TGTTGGGGATAGTGATGCGT	220
	下游:TGCGGTAATAATCTGGCGGG	
<i>sinR</i>	上游:AAAGCTGGGGTAGCGAAGTC	195
	下游:TGTCATCGCATCGCGAACTA	
<i>epsA</i>	上游:GCACAACCGGGCTTTTCATT	182
	下游:AGCAGTTGTAACGCTGGTGA	
<i>yqxM</i>	上游:TCCAGTCAGAAACAGTCCGC	192
	下游:GCTTCAGTCTCCCGGTTCAA	
<i>sipW</i>	上游:AGCAGTTTCCCGTCCTTTTT	200
	下游:GCCATCTTCGGCTATACGCT	
<i>tasA</i>	上游:CGGAACTCCGTCGTACTCAG	209
	下游:TCGGTAAAGAAGGGGGCAAC	

苹果酸作为唯一的碳源进行生长,在培养 36 h 时,活菌数依然保持上升趋势。而 L – S60 利用其他 3 种有机酸的效果并不明显,虽然活菌数都高于空白对照,但仍为下降趋势。

2.1.3 氨基酸成分对菌株的趋化试验

由图 3 可知,谷氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸和色氨酸 4 种氨基酸对解淀粉芽孢杆菌 L – S60 均具有正趋化作用,整体来看,氨基酸对于 L – S60 的趋化作用都较为微弱,且趋化作用对氨基酸的浓度有较

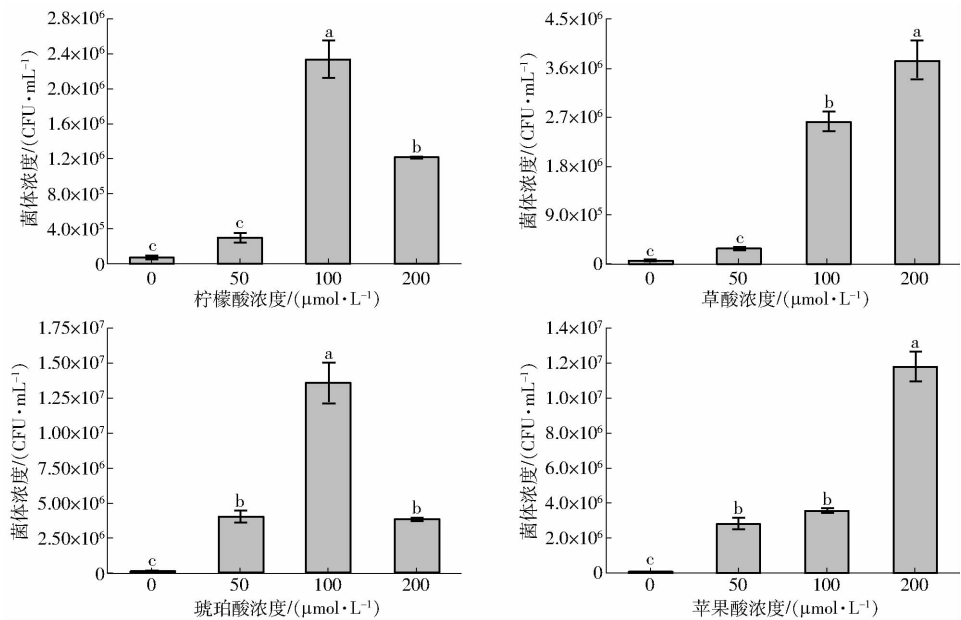


图 1 有机酸对 L-S60 的趋化作用

Fig. 1 Chemotaxis toward organic acid from L-S60

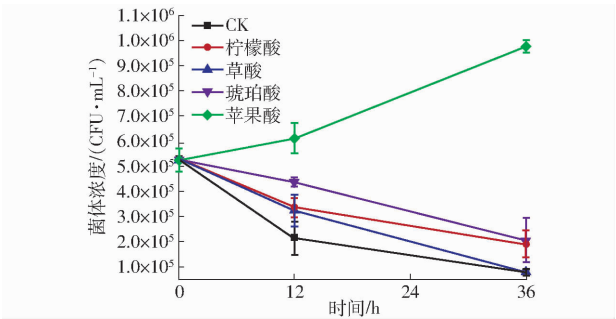


图 2 L-S60 对有机酸的利用

Fig. 2 Utilization of organic acids by L-S60

强的依赖性。其中,谷氨酸对 L-S60 的趋化作用最强,而其他 3 种氨基酸的趋化作用相对较弱。

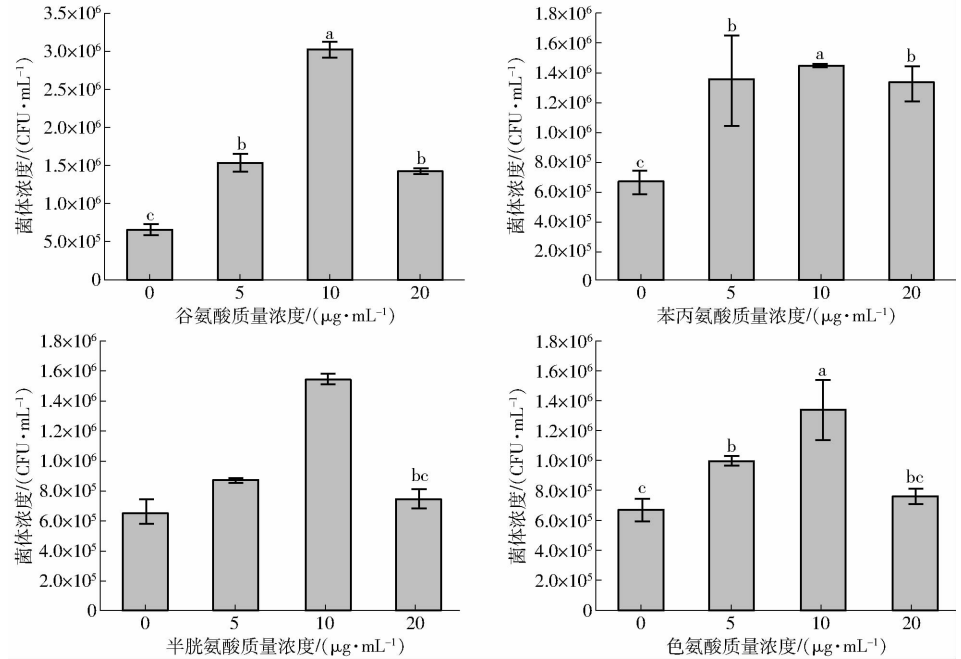


图 3 氨基酸对 L-S60 的趋化作用

Fig. 3 Chemotaxis toward amino acid from L-S60

2.1.4 菌株对氨基酸的利用试验

由图 4 可知,解淀粉芽孢杆菌 L-S60 对于 4 种氨基酸的利用效果并不明显,虽然活菌数都高于空白对照,但仍为下降趋势。其中,L-S60 对谷氨酸的利用情况最优,在培养 12 h 及 36 h 时,添加谷氨酸的培养液中活菌数显著大于空白对照及其他种类的氨基酸。

2.2 菌株在水培黄瓜幼苗根系表面的定殖量

由图 5 可知,L-S60 具有在黄瓜幼苗根系表面定殖的能力,且根据定殖菌数随时间变化的趋势,在菌株与黄瓜幼苗根际共培养初期,定殖量随时间的

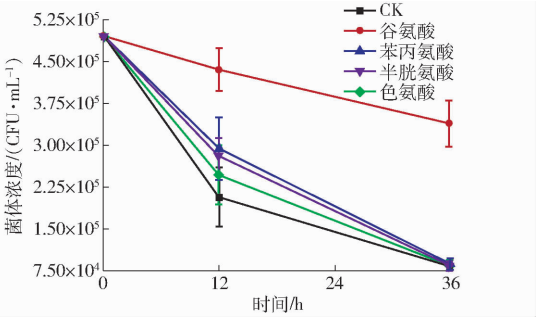


图 4 L-S60 对氨基酸的利用

Fig. 4 Utilization of amino acid by L-S60

增长而变大,而在共培养 18 h 时,菌株定殖量达到最大,L-S60 的定殖量为 1.02×10^5 CFU/g。而共培养 18 h 后,菌株的定殖量随时间的增长而逐渐变小。

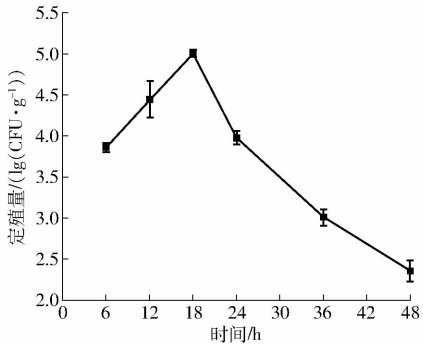


图 5 菌株在黄瓜根系表面的定殖量

Fig. 5 Viable count of L-S60 colonizing cucumber root

2.3 菌株定殖相关基因转录水平差异

2.3.1 表面黏附相关基因转录水平差异

L-S60 与黄瓜幼苗根系互作不同时间后, *sacB*、*ycdH* 及 *yfiQ* 3 个基因的转录水平差异见图 6。整体来看,3 个与表面黏附相关基因转录水平表达上调,尤其是在互作 4 h 左右,表达显著上调,因此认为菌株在黄瓜幼苗根系有黏附现象的发生。

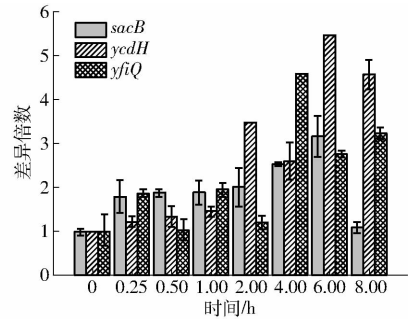


图 6 L-S60 在不同处理时间 *sacB*、*ycdH* 及 *yfiQ* 基因转录水平差异

Fig. 6 Difference of *sacB*, *ycdH* and *yfiQ* gene translational levels of L-S60 at different times

2.3.2 表面活性素合成相关基因转录水平差异

L-S60 与黄瓜幼苗根系互作不同时间后的 *sfp*、*yczE*、*srfAA* 及 *comP* 4 个基因的转录水平差异见

图 7。整体来看,除 *yczE* 在处理 6 h 后表达下调外,其他基因在处理不同时间时整体都表达上调,尤其是在互作 0.25 ~ 0.5 h 左右,4 个基因表达显著上调,因此认为菌株在与黄瓜幼苗根系接触的过程中会分泌表面活性素。

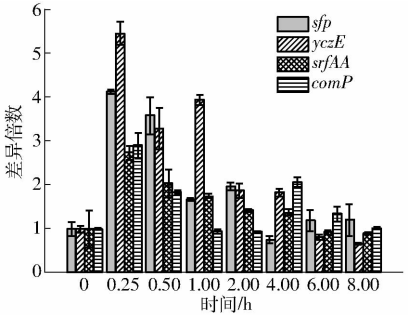


图 7 L-S60 在不同处理时间 *sfp*、*yczE*、*srfAA* 及 *comP* 基因转录水平差异

Fig. 7 Difference of *sfp*, *yczE*, *srfAA* and *comP* gene translational levels of L-S60 at different times

2.3.3 群集运动相关基因转录水平差异

L-S60 与黄瓜幼苗根系互作不同时间后的 *efp*、*swrB* 及 *swrA* 3 个基因的转录水平差异见图 8。整体来看,3 个基因随着处理时间的增加表达水平由上调逐渐转变为下调,因此认为菌株与黄瓜幼苗根系接触初期群集运动能力较强,而后期菌株逐渐黏附在植物根系,形成了生物被膜。

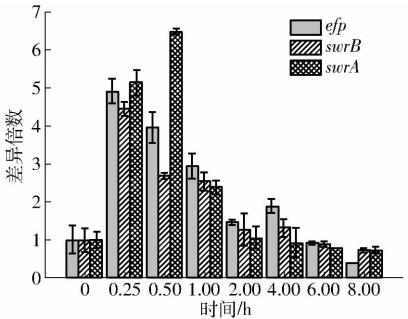


图 8 L-S60 在不同处理时间 *efp*、*swrB* 及 *swrA* 基因转录水平差异

Fig. 8 Difference of *efp*, *swrB* and *swrA* gene translational levels of L-S60 at different times

2.3.4 生物被膜合成相关基因转录水平差异

L-S60 与黄瓜幼苗根系互作不同时间后的 *spo0A*、*sigH*、*sinR*、*epsA*、*yqxM*、*sipW* 及 *tasA* 7 个基因的转录水平差异见图 9。整体来看,*spo0A*、*sigH* 及 *sinR* 为生物被膜形成过程中的全局调控因子,*spo0A*、*sigH* 表达出现先下调后上调的趋势,而 *sinR* 表达出现逐渐下调的趋势;在处理时间 8 h 左右,*epsA* 的表达水平上调并不明显,而 *yqxM* - *sipW* - *tasA* 操纵子表达均上调,因此认为菌株与黄瓜幼苗根系互作过程中能够形成生物被膜。

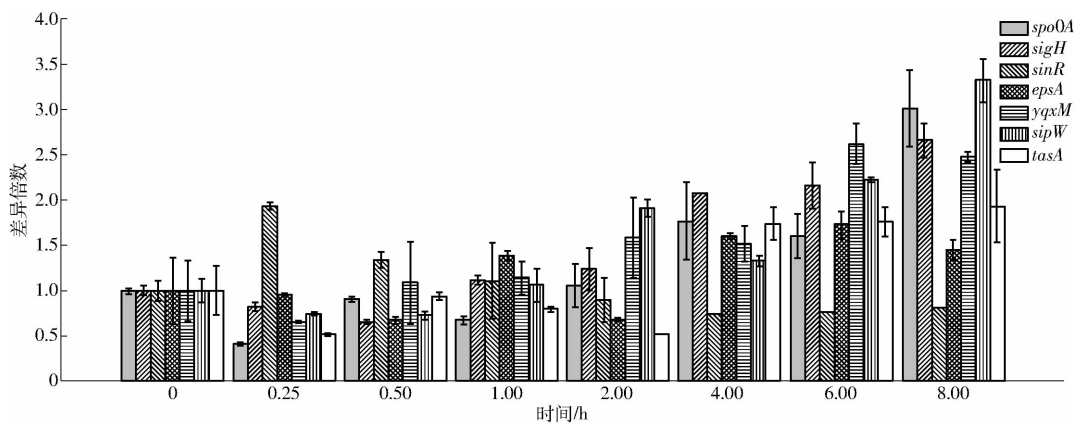


图 9 L-S60 在不同处理时间 *spo0A*、*sigH*、*sinR*、*epsA*、*yqxM*、*sipW* 及 *tasA* 基因转录水平差异

Fig.9 Difference of *spo0A*, *sigH*, *sinR*, *epsA*, *yqxM*, *sipW* and *tasA* gene translational levels of L-S60 at different times

3 讨论

3.1 菌株受黄瓜根系分泌物成分的影响

一般来说,根系分泌物被认为是影响根际微生物行为和分布的重要因素,由于它们中不同的组分会在根系的不同部位呈现不同的浓度分布,进而导致对不同组分有趋化性及偏好性的微生物会呈现出不同的趋化性与定殖行为^[15]。RUDRAPPA 等^[16]发现拟南芥受病原菌感染后分泌的苹果酸可以诱导根际促生菌(枯草芽孢杆菌)定殖;LING 等^[17]研究发现苹果酸和柠檬酸可以促进多粘类芽孢杆菌 SQR-21 在西瓜根际的定殖。HEINRICH 等^[18]研究了小麦根分泌物对其根际细菌 *Azospirillum lipoferum* 的趋化作用,认为根系分泌物中的氨基酸组分是一种正趋化物质;乐毅全等^[19]研究发现假单胞菌 No. 5 对凤眼莲根系分泌物中的亮氨酸、丝氨酸、缬氨酸具有正趋化性。

KAMILOVA 等^[20]的研究发现,黄瓜根系分泌物中含量最多的 4 种有机酸为柠檬酸、草酸、琥珀酸和苹果酸,因此本试验研究这 4 种主要有机酸对菌株的趋化作用及菌株的利用情况。结果显示,这 4 种有机酸菌对 L-S60 均具有正趋化作用,且苹果酸的趋化作用最强。而菌株对除苹果酸外其他 3 种有机酸的利用效果并不明显,这可能是由于培养液中有有机酸浓度较低,营养成分不足以让菌株生长,只能减缓其死亡的速度。

KIMANI 等^[21]研究发现,黄瓜根系分泌物中含量最多的 3 种氨基酸为谷氨酸、苯丙氨酸和半胱氨酸。而色氨酸是植物生长素吲哚乙酸 (IAA) 的前体,对于植物的生长发育起到重要的作用,因此本试验研究这 4 种氨基酸对菌株的趋化作用。结果显示,4 种氨基酸对 L-S60 均具有正趋化作用,且谷氨酸的趋化作用最强。而菌株对于 4 种氨基酸的利用效果均并不明显,虽然活菌数都高于空白对照,但

仍为下降趋势,这可能是由于培养液中氨基酸浓度较低,营养成分不足以让菌株生长,只能减缓其死亡的速度。

本试验结果显示,解淀粉芽孢杆菌 L-S60 对黄瓜根系分泌的 4 种有机酸及氨基酸具有正趋化作用,并且能够分别利用其中部分有机酸和氨基酸,这为菌株能够在黄瓜幼苗根系定殖提供了有力的理论依据。此外,根系分泌物具体成分在植物-微生物互作方面的详细机制目前尚未明了,有待进一步研究。

3.2 菌株在黄瓜幼苗根系定殖情况

本试验采用水培黄瓜幼苗的方式建立了解淀粉芽孢杆菌 L-S60 与黄瓜根系互作的模型,首先通过计数的方式考察了菌株在黄瓜幼苗根系的定殖情况。虽然在共培养 18 h 时达到了最大定殖量,但随着时间的延长,菌株的定殖量降低较大。这可能是由于在模型建立的初始,菌株能够利用黄瓜根系分泌出的营养物质生存,但由于营养物质有限,水培营养液中又没有菌株可利用的能源,导致菌株由于环境恶劣的原因转变成芽孢休眠状态,进而导致根际定殖量的下降。而刘健等^[22]也发现了类似的情况,巨大芽孢杆菌在小麦根际定殖量也会随着时间的延长而降低。

本试验通过荧光定量 PCR 的方式研究了与黄瓜互作菌株定殖相关 17 个基因转录水平的差异,为了方便讨论,将这 17 个基因分为 4 类:①*sacB*、*yedH* 及 *yfiQ* 3 个基因均与细菌在根系的表面黏附过程相关,*sacB* 表达果聚糖蔗糖酶(胞外),产物果聚糖与细菌的根系粘附定殖相关^[23]; *yedH* 表达高亲和性 Zn^{2+} ABC 运输脂蛋白,与细菌在根系的表面粘附过程相关^[24]; *yfiQ* 表达细菌的表面粘附蛋白^[24]。②*sfp*、*yczE*、*srfAA* 及 *comP* 4 个基因均与表面活性素合成过程相关,*sfp* 表达脂肽和聚酮化合物(主要抗菌物质)合成必须的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶^[25-26]; *yczE* 表达影响脂肽和聚酮化合物合成的跨

膜蛋白^[25-26]; *srfABCD* 表达 Surfactin (表面活性素) 合成酶^[25], 其中 *srfAA* 为 *srfABCD* 基因簇中的关键基因; *comP* 表达 ComX 传感器激酶, 调控 Surfactin 的合成^[26]。③ *efp*、*swrB* 及 *swrA* 3 个基因均与表面活性素合成过程相关, *efp* 表达延伸因子 P (Elongation factor P) 类似蛋白, 为细菌群集运动所必需的蛋白^[27]; *swrA* 和 *swrB* 表达群集运动所必需的蛋白 (Swarming protein)^[27]。④ *spo0A*、*sigH*、*sinR*、*epsA*、*yqxM*、*sipW* 及 *tasA* 7 个基因均与生物被膜的合成过程相关, *spo0A* 表达产孢的全局调控因子, 在生物被膜形成的初始阶段起着重要的作用^[28]; *sigH* 表达 RNA 聚合酶相关的调控因子 σ^H 因子 (Sigma factor H), 在芽孢生成阶段调控 *spo0A* 启动转录, 但不影响生物被膜的起始, 对生物被膜中辐射状结构的生长发挥了重要的作用^[28-29]; *sinR* 表达生物被膜形成的全局调控因子, 负调控生物被膜的形成^[30]; *epsA-O* 表达胞外多糖生物合成操纵子, 为合成生物被膜所必需^[31], 其中 *epsA* 为 *epsA-O* 基因簇中的关键基因; *yqxM-sipW-tasA* 操纵子表达合成生物被膜基质的主要蛋白, *yqxM* 能够合成脂蛋白, *sipW* 表达 I 型信号肽酶, *tasA* 表达芽孢外壁形成的相关蛋白^[32]。其中, 磷酸化的 *Spo0A* 会促进下游 *sinI* 基因的表达, *sinI* 为 *sinR* 的对抗物, *sinI* 会解除 *sinR* 对 *epsA-O* 和 *yqxM-sipW-tasA* 操纵子的抑制作用, 进而正向调控生物被膜的形成。此外, 表面活性素作为一种自我诱导剂也能够促进 *yqxM* 基因的表达, 促进生物被膜的形成。

将 L-S60 与黄瓜幼苗根系互作不同时间后, 4 类与菌株定殖相关的基因转录水平具有较为显著的差异变化: ① *sacB*、*ycdH* 及 *yfiQ* 3 个基因在不同处理时间都表达上调, 尤其是在互作 4 h 左右表达显著上调, 可能是由于菌株在与黄瓜幼苗根系接触一段时间后, 黏附相关的蛋白才会大量表达。② 除 *yczE* 在处理 6 h 后表达下调外, *sfp*、*srfAA* 及 *comP* 3 个基因在处理不同时间时整体都表达上调, 尤其是在互作 0.25~0.5 h 左右, 4 个基因表达显著上调, 可能是由于表面活性素在菌株与黄瓜幼苗根系接触初期发挥作用, 因此相关基因的表达水平在接触初期会呈现显著的上调。③ *efp*、*swrB* 及 *swrA* 3 个基因随着处理时间的增加表达水平由上调逐渐转变为下调, 可能是由于菌株与黄瓜幼苗根系接触初期其根系分

泌物中的信号分子对菌株由趋化作用, 菌株的群集运动能力较强, 基因表达水平上调; 而随着处理时间的增加, 菌株逐渐黏附在植物根系, 形成生物被膜, 运动能力下降, 基因水平表达下调。④ *spo0A*、*sigH* 表达出现先下调后上调的趋势, 而 *sinR* 表达出现逐渐下调的趋势。3 个全局调控因子表达水平的不同步可能是由于对照组 (0 h) 菌株没有与植物根系接触, 环境相比于同根系共培养的菌株更为恶劣, 刺激菌株产孢, 因而导致初始对照组的 *spo0A* 表达水平上调; 而随着处理时间的增加, 菌株逐渐在黄瓜根系黏附, 开始形成生物被膜, 因此表达水平下调。在处理时间 8 h 左右, *sinR* 表达下调, *epsA-O* 及 *yqxM-sipW-tasA* 这两个操纵子表达均上调。但 *epsA* 的表达水平上调并不明显, 可能是处理时间较短造成的, 此时 *epsA-O* 中其他基因可能参与了调控。根据这 4 类基因的转录水平差异, 从分子的水平上检测出了菌株在与黄瓜幼苗根系互作的过程中, 发生了根际定殖的现象。

本试验采用水培黄瓜幼苗的方式建立的解淀粉芽孢杆菌 L-S60 与黄瓜根系互作的模型, 虽然具有易于收集菌体、菌株及黄瓜幼苗受其他外界条件干扰小的优点, 且从短期培养结果上来看也比较接近菌株的定殖行为, 但长期培养时其厌氧的水培环境不利于好氧微生物的生命活动, 因此建立更为真实的模拟菌株与植物根系互作模型问题还有待解决。

4 结束语

通过对解淀粉芽孢杆菌 L-S60 与黄瓜互作过程的研究, 确定了菌株能够部分利用黄瓜根系分泌物的主要成分有机酸 (柠檬酸、草酸、琥珀酸和苹果酸) 及氨基酸 (谷氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸和色氨酸) 成分, 且受到这些成分的趋化作用, 其中对于苹果酸和谷氨酸的利用情况及受趋化作用最优。在建立了菌株与黄瓜幼苗互作模型后, 通过计数的方式研究了菌株在水培黄瓜幼苗根系表面的定殖量随时间变化的关系, 并且通过荧光定量 PCR 的方式, 从与黄瓜根系互作后菌株与根际定殖、群集运动、生物被膜形成相关基因转录水平差异上分析, 菌株具有在黄瓜幼苗根系表面定殖的能力, 且菌株最大定殖量为 1.02×10^5 CFU/g。

参 考 文 献

[1] KLOEPPER J W, METTING F B J. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents [M] // Brenners Encyclopedia of Genetics, 1992: 353-355.
[2] BAIS H P, PARK S W, WEIR T L, et al. How plants communicate using the underground information superhighway[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(1): 26-32.

- [3] 陈龙池,廖利平,汪思龙,等. 根系分泌物生态学研究[J]. 生态学杂志, 2002, 21(6): 57–62.
CHEN Longchi, LIAO Liping, WANG Silong, et al. A review for research of root exudates ecology[J]. Chinese Journal of Ecology, 2002, 21(6): 57–62. (in Chinese)
- [4] BAETZ U, MARTINOIA E. Root exudates: the hidden part of plant defense[J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(2): 90–98.
- [5] STANLEY N R, BRITTON R A, GROSSMAN A D, et al. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays[J]. Journal of Bacteriology, 2003, 185(6): 1951–1957.
- [6] DE W S, VERMEIREN H, MULDER I H, et al. Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2002, 15(11): 1173–1180.
- [7] PETERS N K, FROST J W, LONG S R. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes[J]. Science, 1986, 233(4767): 977–980.
- [8] LII C H J, LINDOW S E, MILLER W, et al. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2685–2690.
- [9] QIN Y, SHANG Q, ZHANG Y, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* L-S60 reforms the rhizosphere bacterial community and improves growth conditions in cucumber plug seedling[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2620.
- [10] ADLER J. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*[J]. Journal of General Microbiology, 1973, 74(1): 77–91.
- [11] HOAGLAND R D. The absorption of ions by plants[J]. Soil Science, 1923, 16(16): 225–246.
- [12] GRAHAM J H, LEONARD R T, MENGE J A. Membrane-mediated decrease in root exudation responsible for phosphorus inhibition of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation[J]. Plant Physiology, 1981, 68(3): 548–552.
- [13] KIRKLAND P A, BUSBY J, JR S S, et al. Trizol-based method for sample preparation and isoelectric focusing of halophilic proteins[J]. Analytical Biochemistry, 2006, 351(2): 254–262.
- [14] MORISSET D, ŠTEBIH D, MILAVEC M, et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR[J]. Plos One, 2013, 8(5): e62583.
- [15] COMPANT S, CLEMENT C, SESSITSCH A. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2010, 42(5): 669–678.
- [16] RUDRAPPA T, CZYMMEK K J, PARE P L, et al. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria[J]. Plant Physiology, 2008, 148(3): 1547–1556.
- [17] LING N, HUANG Q, GUO S, et al. *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 systemically affects root exudates of watermelon to decrease the conidial germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum[J]. Plant and Soil, 2011, 341(1): 485–493.
- [18] HEINRICH D, HESS D. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1985, 31(1): 26–31.
- [19] 乐毅全, 郑师章, 周纪伦. 凤眼莲-根际微生物系统的降解效应[J]. 植物生态学报, 1990, 14(2): 151–159.
LE Yiquan, ZHENG Shizhang, ZHOU Jilun. Phenol degradation effect of waterhyacinth-rhizosphere microorganism system[J]. Acta Phytocologica et Geobotanica Sinica, 1990, 14(2): 151–159. (in Chinese)
- [20] KAMILOVA F, KRAVCHENKO L V, SHAPOSHNIKOV A I, et al. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(3): 250–256.
- [21] KIMANI V N, CHEN L, LIU Y P, et al. Characterization of extracellular polymeric substances of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 induced by root exudates of cucumber[J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56(11): 1183–1193.
- [22] 刘健, 李俊, 姜昕, 等. 巨大芽孢杆菌 *luxAB* 标记菌株的根际定殖研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 1–4.
LIU Jian, LI Jun, JIANG Xin, et al. Study on root colonization of wheat by *luxAB* genes-marked *Bacillus megaterium* ATCC14581[J]. Microbiology China, 2001, 28(6): 1–4. (in Chinese)
- [23] BEZZATE S, AYMERICH S, CHAMBERT R, et al. Disruption of the *Paenibacillus polymyxa* levansucrase gene impairs its ability to aggregate soil in the wheat rhizosphere[J]. Environmental Microbiology, 2000, 2(3): 333–342.
- [24] WIPAT A, HARWOOD C R. The *Bacillus subtilis* genome sequence: the molecular blueprint of a soil bacterium[J]. FEMS Microbiology Ecology, 1999, 28(1): 1–9.
- [25] STRAIGHT P D, WILLEY J M, KOLTER R. Interactions between *Streptomyces coelicolor* and *Bacillus subtilis*: role of surfactants in raising aerial structures[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(13): 4918–4925.
- [26] KEARNS D B, CHU F, RUDNER R, et al. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(2): 357–369.
- [27] TSUGE K, OHATA Y, SHODA M. Gene *yerP*, involved in surfactin self-resistance in *Bacillus subtilis*[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2001, 45(12): 3566–3573.
- [28] BRANDA S S, GONZALEZPASTOR J E, BENYEHUDA S, et al. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(20): 11621–11626.
- [29] BRANDA S S, VIK S, FRIEDMAN L, et al. Biofilms: the matrix revisited[J]. Trends in Microbiology, 2005, 13(1): 20–26.
- [30] KEARNS D B, CHU F, BRANDA S S, et al. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2005, 55(3): 739–749.
- [31] BRANDA S S, GONZALEZPASTOR J E, DERYN E, et al. Genes involved in formation of structured multicellular communities by *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(12): 3970–3979.
- [32] CHU F, KEARNS D B, BRANDA S S, et al. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(4): 1216–1228.