



研究报告

马铃薯根系分泌物及酚酸类物质对萎缩芽孢杆菌促生菌株 QHZ3 趋化成膜的介导作用

陈兰兰^{1,2} 邱慧珍^{*1,2} 董爱菊^{1,2} 魏茹云^{1,2}

1 甘肃农业大学资源与环境学院 甘肃省干旱生境作物学重点实验室 甘肃 兰州 730070

2 甘肃省畜禽废弃物资源化利用工程研究中心 甘肃 兰州 730070

摘要:【背景】根系分泌物介导的微生物趋化成膜是根际促生菌在根际定殖及功能发挥的重要前提,深入了解该过程对理解菌株定殖机制具有重要意义。【目的】探明马铃薯根系分泌物中使萎缩芽孢杆菌促生菌株 QHZ3 在根际趋化成膜的信号物质。【方法】通过高效液相色谱鉴定马铃薯根系分泌物中的主要酚酸类物质,采用半固体平板法与类毛细管法比较马铃薯根系分泌物和不同酚酸类物质对促生菌株 QHZ3 趋化作用,并通过结晶紫染色法观察马铃薯根系分泌物和不同酚酸类物质对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响。【结果】马铃薯根系分泌物中的酚酸类物质主要包括富马酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸和肉桂酸。半固体平板法结果显示,马铃薯根系分泌物和 4 种酚酸对菌株 QHZ3 均具有趋化作用,富马酸的趋化作用最强;类毛细管定量试验结果表明,不同浓度酚酸对菌株 QHZ3 的趋化作用不同,中高等浓度的富马酸(25–100 $\mu\text{mol/L}$)和低浓度的阿魏酸(10 $\mu\text{mol/L}$)对菌株 QHZ3 的趋化作用最强;结晶紫染色法结果表明,120–240 $\mu\text{g/mL}$ 马铃薯根系分泌物和 50–75 $\mu\text{mol/L}$ 富马酸及 100 $\mu\text{mol/L}$ 对羟基苯甲酸可显著促进菌株 QHZ3 生物膜的形成,而阿魏酸和肉桂酸对菌株的生物膜形成没有显著影响。【结论】根系分泌物和酚酸均可介导菌株 QHZ3 在马铃薯根际趋化成膜,但 4 种酚酸的作用不同,富马酸和阿魏酸对菌株的趋化作用显著,富马酸和对羟基苯甲酸则是对菌株生物膜的形成具有显著影响。

关键词: 萎缩芽孢杆菌, 根际促生菌, 根系分泌物, 酚酸, 趋化性, 生物膜

Effects of potato root exudates and phenolic acids on inducing chemotaxis of *Bacillus atrophiae* isolate QHZ3CHEN Lanlan^{1,2} QIU Huizhen^{*1,2} DONG Aiju^{1,2} WEI Ruyun^{1,2}

1 Gansu Provincial Key Laboratory of Arid-Land Crop Science, College of Resources and Environmental Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

2 Engineering Research Center of Livestock and Poultry Waste Resource Utilization in Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730070, China

Abstract: [Background] Chemotaxis of microorganisms mediated by root exudates is an important prerequisite for root colonization and function of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), and

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31760614); National Key Research and Development Program of China (2017YFD0800200)

***Corresponding author:** Tel: 86-931-7631731; E-mail: hzqiu@gsau.edu.cn

Received: 08-01-2021; **Accepted:** 23-02-2021; **Published online:** 28-04-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31760614); 国家重点研发计划(2017YFD0800200)

***通信作者:** Tel: 0931-7631731; E-mail: hzqiu@gsau.edu.cn

收稿日期: 2021-01-08; **接受日期:** 2021-02-23; **网络首发日期:** 2021-04-28

further understanding of this process is of great significance to understand the colonization mechanism of the strains. **[Objective]** To study the signal substances in root exudates of potato which can promote the colonization of PGPR QHZ3 in rhizosphere. **[Methods]** The some phenolic acids in potato root exudates were identified by high performance liquid chromatography (HPLC). The chemotaxis of potato root exudates and different phenolic acids to isolate QHZ3 were compared using the semi-solid plate method and capillary-like method. The effects of different phenolic acids on biofilm formation of QHZ3 were observed by crystal violet staining. **[Results]** Phenolic acids in potato root exudates mainly included fumaric acid, p-hydroxybenzoic acid, ferulic acid and cinnamic acid. The semi-solid plate method shows that both the root exudates of potato and the four phenolic acids mentioned above had chemotactic effects on strain QHZ3, and the chemotactic effect of fumaric acid was the strongest. Capillary-like quantitative test showed that the chemotactic effect of phenolic acids on strain QHZ3 was different at different concentrations. The chemotactic effect of middle and high concentrations of fumaric acid (25–100 $\mu\text{mol/L}$) and low concentration of ferulic acid (10 $\mu\text{mol/L}$) on strain QHZ3 was the strongest. Crystal violet staining showed that 120–240 $\mu\text{g/mL}$ potato root exudates, 50–75 $\mu\text{mol/L}$ fumaric acid and 100 $\mu\text{mol/L}$ p-hydroxybenzoic acid could significantly promote biofilm formation of QHZ3, while ferulic acid and cinnamic acid had no significant effect on biofilm formation. **[Conclusion]** Both root exudates and phenolic acids could mediate the chemotaxis of strain QHZ3 to form biofilm in potato rhizosphere, but the effects of four phenolic acids were different. The chemotaxis of fumaric acid and ferulic acid was significant, while fumaric acid and p-hydroxybenzoic acid had significant effects on the formation of biofilm.

Keywords: *Bacillus atrophiae*, plant growth-promoting rhizobacteria, root exudates, phenolic acid, chemotaxis, biofilm

马铃薯作为我国第四大主粮作物,在保障我国粮食安全、精准扶贫、调整种植业结构和农业生产转型升级等方面发挥着重要作用^[1-2]。我国马铃薯种植面积和总产量均居世界首位,但由于病虫害等因素的制约,单产水平低于世界平均水平^[3-4],其中由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)侵染引起的黑痣病使马铃薯产业的可持续发展受到严重制约^[5-6]。

植物根际促生菌(Plant Growth-Promoting Rhizobacteria, PGPR)是一类可直接或间接促进植物生长、增加作物产量以及能防治土传病害的有益微生物,存活于植物根际或定殖在植物根系^[7-9]。PGPR 通过合成植物激素、活化土壤养分和释放挥发性有机物质等方式促进植物生长,并通过释放抗生素类物质与病原菌竞争生存空间和营养物质,以及通过诱导使植株形成诱导性抗性途径防控土传病害的发生^[10-15]。研究表明,施用由 PGPR 菌株制成的生物有机肥可安全有效地防治黄瓜枯萎病、香蕉枯萎病、西瓜枯萎病和棉花黄萎病等土传病害,因此在农业生产中得到广泛应用^[16-19]。PGPR 发挥促生和生防能力的前提

是其在根际的成功定殖,该过程主要由植物根系分泌物所介导^[20],介导的信号物质可能是根系分泌物中的一些小分子如有机酸、氨基酸、小分子糖、酚酸或次级代谢产物^[21-24]。这一过程主要包括菌株向根际趋化和在根系聚集形成生物膜 2 个步骤^[25-27],而且只有当 PGPR 在根系聚集成膜到一定程度才能发挥其促生和生防作用^[28]。

利用 PGPR 抑制立枯丝核菌的侵染以控制马铃薯黑痣病的发生,是一种很有前景的防控方法^[29]。本实验室前期已从马铃薯根系分离出一株具有促生和抗病效果的根际促生萎缩芽孢杆菌 QHZ3,施用辅以菌株 QHZ3 的生物有机肥可观察到菌株能在马铃薯根际定殖并可显著降低马铃薯黑痣病的发生^[30-31],但马铃薯根系分泌物中可介导菌株 QHZ3 趋化成膜的信号物质尚不明确。研究表明,酚酸类物质能使促生菌在植株根系趋化成膜^[32-33]。因此,本研究鉴定马铃薯根系分泌物中酚酸类物质,并比较马铃薯根系分泌物和不同酚酸类物质对菌株 QHZ3 趋化成膜的影响,以期揭示菌株 QHZ3 在马铃薯根际定殖机制。

1 材料与方法

1.1 材料

供试品种：马铃薯“大西洋”原原种种子购于定西市农业科学研究院。

供试菌株：萎缩芽孢杆菌 QHZ3，由甘肃省干旱生境作物学重点实验室分离、鉴定、保存，经试验证明对马铃薯黑痣病具有良好的防控效果。

培养基与营养液：LB 培养基、生理盐水、趋化缓冲液、胰蛋白胍大豆肉汤(Tryptone soy Broth, TSB)培养基等参考沈怡斐等^[22]方法进行配制。

空白培养基：向 1/20 浓度 TSB 液体培养基中加入 10% 的马铃薯土壤浸出液。

马铃薯土壤浸出液：向 100 mL 去离子水中加入 50 g 马铃薯土壤，25 °C、170 r/min 振荡 4 h 后，5 000 r/min 离心 5 min 后收集上清液，经 0.22 μm 滤膜除菌后待用。

1.2 方法

1.2.1 无菌马铃薯苗培养

选取大小一致的马铃薯种子，用 0.1% 的次氯酸钠溶液浸种消毒 10 min 后用无菌水冲洗数遍，在室温下将种子自然风干，然后将种子放于垫有湿润无菌脱脂棉的托盘中，在 25 °C 下催芽 5 d 后，将发芽程度一致的原原种播入 350 mL 无菌组培瓶中，组培瓶中盛有约占瓶体高度 1/3 的无菌混合基质(石英砂:蛭石=1:1, 体积比)，加 1/2 MS (不含蔗糖)营养液(上海源叶生物科技有限公司)至瓶中基质潮湿但无可见水迹，在人工气候箱中进行培育。培育条件为：光照 16 h，黑暗 8 h，光照强度 4 000 lx，温度 25 °C，相对湿度 60%。培育至三叶一心时将幼苗轻轻取出，用无菌水冲洗根系表面的基质后移栽至 50 mL 锥形瓶，锥形瓶中装有无菌 1/2 MS 营养液 40 mL，并用适量无菌脱脂棉包裹幼苗茎干以固定和隔离杂菌，锥形瓶外用锡纸包裹以避光。每 3 d 更换一次营养液。

1.2.2 根系分泌物收集

采用水溶液培养收集法^[34]，选取 5–6 片真叶长势一致的马铃薯苗进行根系分泌物收集。将生

长良好的幼苗从营养液中小心取出，用无菌水仔细冲洗根系 3 遍后将幼苗移至 50 mL 无菌锥形瓶中，并将幼苗根系完全没入 40 mL 的无菌水中，于 25 °C 培养 24 h (光照 16 h/黑暗 8 h)后收集锥形瓶中的溶液。收集的溶液经慢速过滤(滤膜孔径 0.22 μm)后再进行冷冻干燥，即可得到马铃薯根系分泌物干粉，-80 °C 保存备用。

1.2.3 不同浓度马铃薯根系分泌物对菌株 QHZ3 生长的影响

将 37 °C、170 r/min 培养过夜的 QHZ3 种子液接种至含有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 锥形瓶中，37 °C、170 r/min 条件下培养至对数中期(OD_{600} 为 1.0)，于 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min，无菌生理盐水漂洗 2 次后重悬于等体积生理盐水中制成菌悬液。在装有 3 mL 空白培养基的试管中接种上述菌悬液 10 μL，并外源添加 20 mg/mL 的根系分泌物浓缩液 9、18、36 μL，使试管中根系分泌物的终浓度分别为 60、120、240 μg/mL，以不添加根系分泌物的空白培养基作为对照，每个处理设置 6 个重复。将试管于 37 °C、170 r/min 条件下连续培养 12 h，每隔 2 h 测定各处理的 OD_{600} 值。

1.2.4 根系分泌物中酚酸类物质的鉴定

用高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)检测根系分泌物中的酚酸，根系分泌物检测浓度为 1 mg/mL。标准品的配制：分别称取 10 mg 富马酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、香豆酸、苯甲酸、没食子酸、肉桂酸(均为色谱纯级，购自上海源叶生物有限公司)，用水定容至 10 mL，即为 1 mg/mL 的标准液。7 种酚酸分别取 100 μL 混合，制成 100 μg/mL 的混合标品溶液。HPLC 仪器为岛津 Lc20A，色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C18 (250 mm×4.6 mm×5 μm)，进样量为 20 μL，流速为 1.0 mL/min，柱温为 40 °C，紫外检波长为 280 nm。采用的流动相为 0.025 mol KH_2PO_4 (A)和色谱甲醇(B)，具体梯度洗脱步骤：0 min，95% A+5% B→10 min，90% A+10% B→16 min，75% A+25% B→18 min，70% A+30%

B→23 min, 65% A+35% B→30 min, 50% A+ 50% B→42 min, 65% A+35% B→45 min, 80% A+ 20% B→50 min, 80% A+20% B→停止。记录峰面积和保留时间, 通过与标样品峰面积和保留时间的比对鉴定样品中酚酸的种类。

1.2.5 根系分泌物及酚酸对菌株 QHZ3 的趋化作用

根系分泌物和酚酸对菌株 QHZ3 的趋化作用定性分析参照 Park 等^[35]的方法: 半固体琼脂培养基含有终浓度为 30 $\mu\text{mol/L}$ 的酚酸和 60 $\mu\text{g/mL}$ 根系分泌物, 琼脂含量为 0.7%, 将直径为 6 mm 的无菌滤纸片置于半固体平板培养基中间; 按 1% 的比例将活化过夜的 QHZ3 种子液接种于 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.4, 吸取 10 μL 菌悬液滴加到培养基中间的无菌滤纸片上, 以不加待测物的半固体培养基作为对照, 每个处理 3 个重复, 平板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h; 用十字交叉法测定平板上的菌落直径, 测定 3 次求平均值, 最终每个处理再取 3 个重复的平均值。

趋化作用定量分析参考 Ling 等^[24]的方法略做修改: 按 1% 的比例将活化过夜的 QHZ3 种子液接种于 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 培养至对数前期 (OD_{600} 为 1.0), 4 $^{\circ}\text{C}$ 、5 000 r/min 离心 5 min 后重新悬浮在等体积的趋化缓冲液中, 并用移液枪吸取 100 μL QHZ3 菌悬液待用; 用 1 mL 注射器准确吸取 100 μL 不同浓度的马铃薯根系分泌物(0、60、120、120 $\mu\text{g/mL}$)和酚酸标品(0、10、25、50、75、100 $\mu\text{mol/L}$), 并将注射器针头插入上述移液枪头细口端, 使待测物质与菌液充分接触; 室温条件下, 在超净工作台静置 2 h 后, 将注射器小心取出, 对注射器中的溶液进行平板稀释涂布计数; 每个处理设置 3 次重复, 以趋化缓冲液作为对照, 计算 3 个重复平板菌落数(Colony-Forming Units, CFU)的平均值。趋化性指数(Relative Chemotaxis Index, RCI)为处理菌落数与对照菌落数的比值, 当 $\text{RCI} \geq 2$ 时即可认为处理的趋化性与对照相比差异显著。

1.2.6 菌株 QHZ3 生物膜的形成过程和动态变化分析

生物膜的形成过程参考曹启航等^[36]的方法略做

修改: 活化过夜的 QHZ3 种子液接种于 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、170 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.2, 将菌悬液于 LB 液体培养基中做 1:100 稀释; 将稀释后菌悬液加入无菌培养皿中, 每皿约 12 mL 菌悬液, 放入无菌载玻片使菌悬液液面与载玻片相平, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6、12、24、36、48、72 h 后取出载玻片, 用无菌生理盐水冲洗 3 次, 甲醇固定 30 min 后, 用无菌生理盐水冲洗 3 次, 再用 0.1% 结晶紫染色 30 min, 弃染液后用灭菌生理盐水冲洗 4 次, 在室温晾干后于光学显微镜下观察。

动态变化测定方法: 将上述稀释后的菌悬液加入到 96 孔细胞培养板中, 200 μL /孔, 盖好盖子, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6、12、24、36、48、72 h, 每个处理设置 8 个重复; 然后小心将各孔生物膜下的培养基吸出, 用 250 μL 的无菌生理盐水冲洗 3 次, 将尚未形成生物膜的浮游菌体清除; 室温干燥后, 加入 200 μL 的 0.1% 结晶紫溶液染色 30 min, 弃去染液后用 200 μL 的灭菌生理盐水漂洗 4 次, 以去除未结合的结晶紫; 室温干燥后, 加入 200 μL 的 95% 乙醇溶液脱色, 混匀后稀释 40 倍, 用酶标仪测定光吸收值(OD_{562})。

1.2.7 根系分泌物及酚酸对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响

将根系分泌物和酚酸加入到上述稀释后的菌悬液中, 每毫升菌液加 10 μL 的根系分泌物或酚酸, 酚酸浓度为 10、25、50、75 和 100 $\mu\text{mol/L}$, 根系分泌物浓度为 6、12、24 mg/mL , 使根系分泌物的终浓度为 60、120、240 $\mu\text{g/mL}$, 涡旋混匀再分装至 96 孔细胞培养板的小孔中, 每孔 200 μL , 每个处理 8 个重复, 将培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 24 h, 以不添加待测物的菌液作为空白, 定量步骤同生物膜动态变化测定方法。

1.3 数据统计与分析

试验数据采用 Excel 2019 进行统计分析和作图, 用 SPSS 18 进行不同处理的方差分析和差异显著性检验, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 不同浓度马铃薯根系分泌物对菌株 QHZ3 生长的影响

向空白培养基中添加根系分泌物浓缩液后, 菌株 QHZ3 随时间的生长趋势如图 1 所示。结果表明, 与未添加根系分泌物的对照相比, 除接种 2 h 外, 添加根系分泌物的处理显著促进了菌株 QHZ3 的生长; 随着根系分泌物浓度的增大, 促生效果显著加强, 而且随着培养时间的递增, 促生效果越来越显著。推测是根系分泌物为菌株 QHZ3 提供了碳氮源或其他营养, 对菌株 QHZ3 的生长起到了诱导和促进作用。

2.2 马铃薯根系分泌物中酚酸类物质的鉴定

利用 HPLC 对马铃薯根系分泌物中酚酸类物质进行鉴定, 结果如图 2 和表 1 所示。从图 2 中可

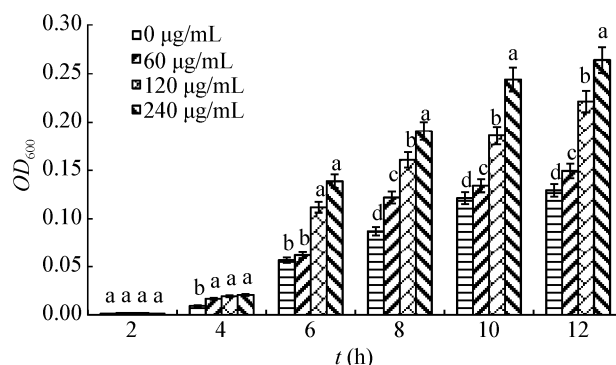


图 1 不同浓度马铃薯根系分泌物对菌株 QHZ3 生长的影响

Figure 1 Effects of different concentrations of potato root exudates on the growth of strain QHZ3

注: 不同小写字母表示同一时间各处理在 $P < 0.05$ 水平上存在显著差异

Note: The different small letters indicate significant differences among treatments at the $P < 0.05$ level at the same time

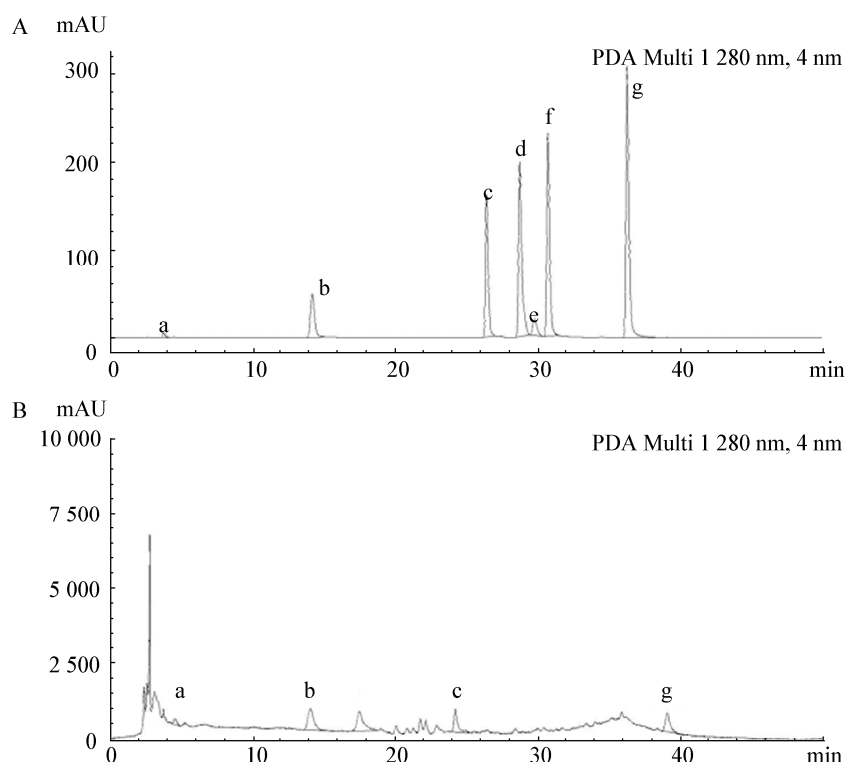


图 2 酚酸色谱图

Figure 2 Phenolic acid chromatogram

注: A: 标样图谱上的峰从左到右依次为富马酸(a)、对羟基苯甲酸(b)、阿魏酸(c)、香豆酸(d)、苯甲酸(e)、没食子酸(f)、肉桂酸(g); B: 马铃薯根系分泌物酚酸图谱

Note: A: The peaks on the chromatogram in the standard sample from left to right are: fumaric acid (a), p-hydroxybenzoic acid (b), ferulic acid (c), coumaric acid (d), benzoic acid (e), gallic acid (f), cinnamic acid (g); B: Chromatogram of phenolic acid in potato root exudates

表 1 根系分泌物中酚酸的种类和含量

Table 1 Types and contents of phenolic acid in root exudates

峰号 Peak No.	化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	面积 Area (μAU×min)	高度 Height (μAU)	浓度 Concentration (μg/mL)
a	富马酸 Fumaric acid	4.581	2 818	190	1.572
b	对羟基苯甲酸 P-hydroxybenzoic acid	14.039	21 106	643	0.781
c	阿魏酸 Ferulic acid	24.243	13 739	746	0.407
g	肉桂酸 Cinnamic acid	39.094	13 943	621	0.176

以看出马铃薯根系分泌物中主要有富马酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸、肉桂酸。表 1 结果显示, 富马酸含量最高, 为 1.572 μg/mL; 肉桂酸含量最低, 仅为 0.176 μg/mL。

2.3 根系分泌物及酚酸类物质对菌株 QHZ3 的趋化作用

采用半固体平板法检测根系分泌物和不同酚酸对萎缩芽孢杆菌 QHZ3 的趋化作用, 结果如图 3 和图 4 所示。与对照组相比, 根系分泌物和供试酚酸对菌株 QHZ3 的趋化性均有显著影响, 但作用程度不同, 以富马酸对菌株 QHZ3 趋化性影响最大, 趋化圈直径为 37.1 mm, 是对照(12.9 mm)的 2.88 倍; 其次是阿魏酸(30.0 mm)、对羟基苯甲酸(27.2 mm)和肉桂酸(21.9 mm), 分别是对照的 2.33、2.10 和 1.70 倍。

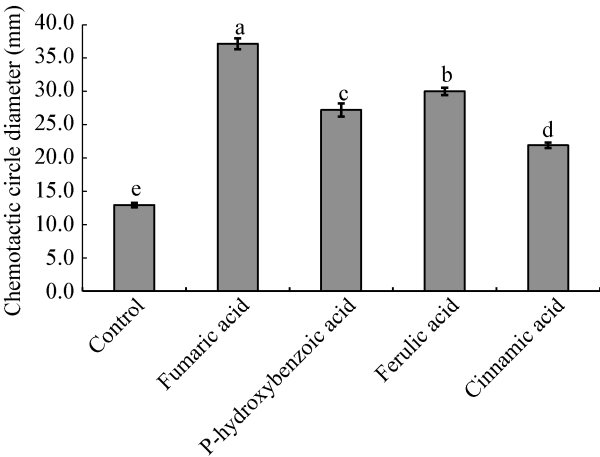


图 3 根系分泌物和酚酸对菌株 QHZ3 趋化性的影响 (半固体平板法)

Figure 3 Effects of root exudates and phenolic acids on the chemotaxis of strain QHZ3 (semi-solid plate method)

注: 不同小写字母表示各处理在 $P<0.05$ 水平上存在显著差异

Note: The different small letters indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level

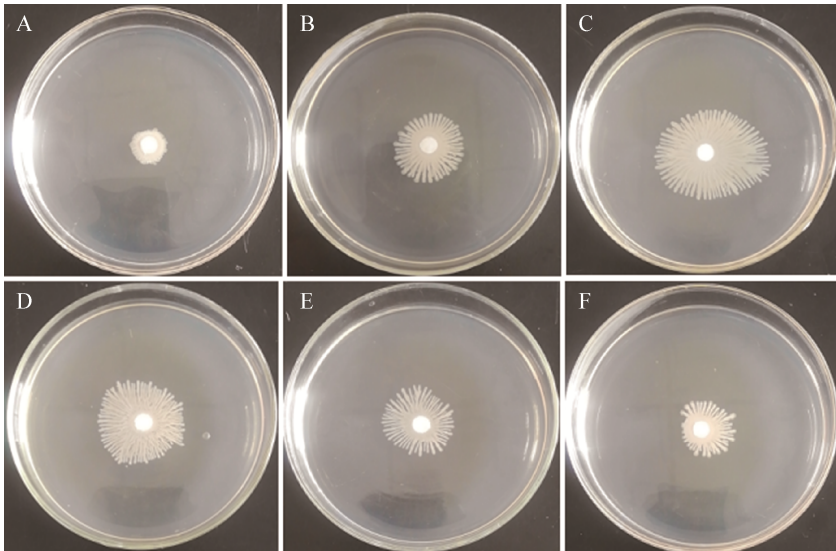


图 4 根系分泌物和酚酸对菌株 QHZ3 趋化性的影响

Figure 4 Effects of root exudates and phenolic acid on the chemotaxis of strain QHZ3

注: A: 对照; B: 根系分泌物; C: 富马酸; D: 阿魏酸; E: 对羟基苯甲酸; F: 肉桂酸

Note: A: Control; B: Root exudates; C: Fumaric acid; D: Ferulic acid; E: P-hydroxybenzoic acid; F: Cinnamic acid

在定性试验的基础上, 采用类毛细管定量方法研究不同浓度酚酸类物质对菌株 QHZ3 的趋化作用, 结果如图 5 所示。整体上看, 各个浓度酚酸对菌株 QHZ3 均有趋化性作用, 但趋化性指数(RCI)>2 的酚酸为富马酸(25、50、75 和 100 $\mu\text{mol/L}$)和阿魏酸(10 $\mu\text{mol/L}$), 即处理的趋化作用与对照相比具有显著差异, 其他浓度的酚酸对菌株 QHZ3 趋化作用没有显著影响; 从图 5

也可以看出, 不同浓度的酚酸对菌株 QHZ3 趋化作用的趋势各不相同。随着各酚酸浓度升高, 富马酸和肉桂酸对菌株 QHZ3 趋化作用呈现先上升后下降的趋势, 对羟基苯甲酸对菌株 QHZ3 趋化作用呈现上升趋势, 而阿魏酸对菌株 QHZ3 趋化作用则呈现下降趋势。

2.4 菌株 QHZ3 生物膜的形成过程和动态变化

生物膜的形成过程如图 6 所示, 培养 6 h 后,

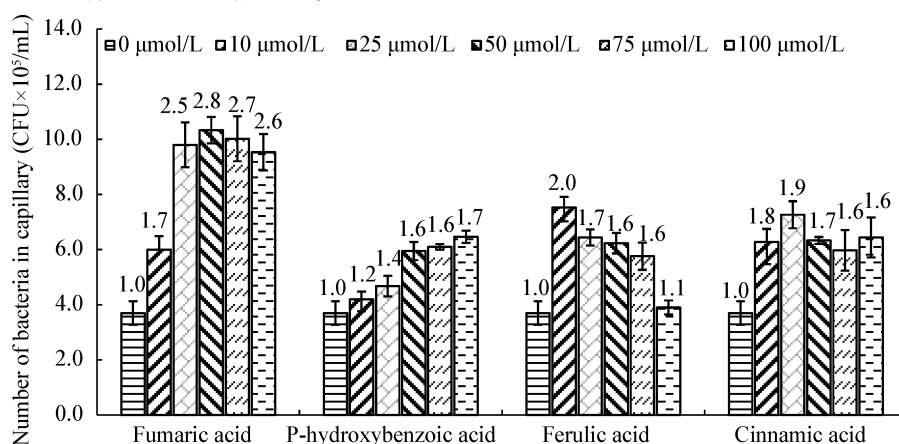


图 5 不同浓度酚酸对菌株 QHZ3 的趋化作用(类毛细管试验)

Figure 5 Chemotaxis of strain QHZ3 by phenolic acids with different concentrations (capillary-like test)

注: 柱顶的数字代表趋化性指数(RCI)

Note: The number at the top of the bars represents the RCI

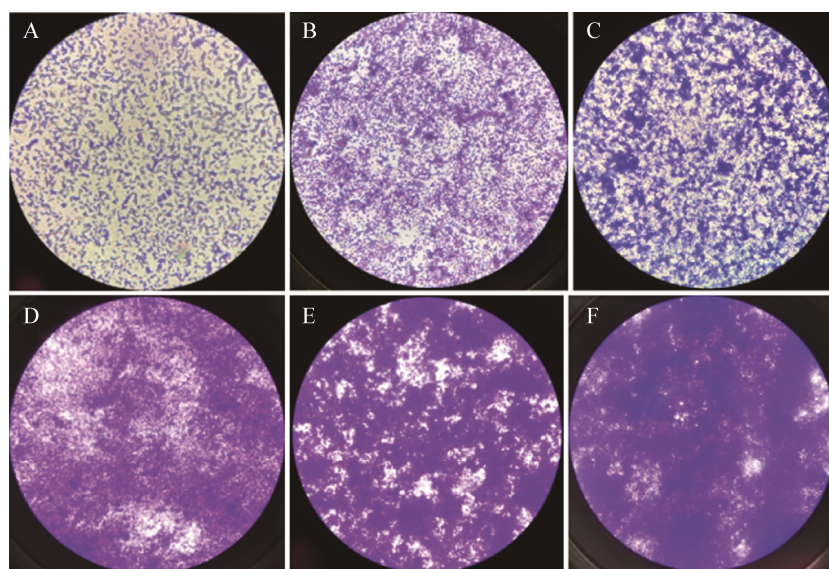


图 6 不同培养时间生物膜的形成能力(100 \times)

Figure 6 Biofilm formation ability at different culture time (100 \times)

Note: A: 6 h; B: 12 h; C: 24 h; D: 36 h; E: 48 h; F: 72 h

载玻片上只黏附了少量细菌; 12 h 后黏附细菌数量明显增多, 而且有小部分微菌落形成; 24 h 后菌株 QHZ3 向一起聚集形成菌落, 而且菌落形成片状结构; 36 h 后生物膜变得致密, 菌株布满整个视野且具有一定厚度; 48 h 后生物膜聚集叠加, 形成了复杂的团状结构; 72 h 后团状结构相互叠加, 生物膜变厚, 形成更加致密的生物膜。

生物膜的形成动态变化如图 7 所示, OD_{562} 值随着培养时间的增加而逐渐增大, 说明菌株 QHZ3 生物膜的生物量随培养时间变化在不断增加, 这与图 6 观察到的结果一致; 与培养 6 h 相比, 菌株 QHZ3 随着培养时间的增加(12–72 h), 其生物膜生物量分别提高了 3.03、3.77、4.27、5.14 和 6.39 倍, 与培养 6 h 的生物量差异显著 ($P<0.05$)。

2.5 根系分泌物及酚酸类物质对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响

马铃薯根系分泌物对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响结果如图 8 所示。由图 8 可知, 马铃薯根系分泌物可促进菌株 QHZ3 生物膜形成。与未添加根系分泌物的处理相比, 120 $\mu\text{g/mL}$ 和 240 $\mu\text{g/mL}$ 根系分泌物处理可显著促进菌株 QHZ3 生物膜的形成, 而 60 $\mu\text{g/mL}$ 根系分泌物处理则与对照没有显著差异 ($P<0.05$)。

酚酸类物质对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响

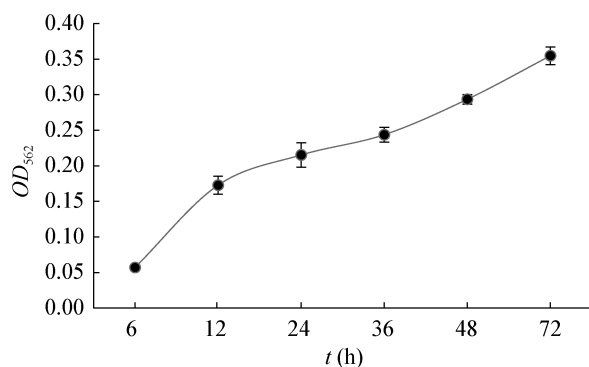


图 7 培养时间对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响
Figure 7 Effect of culture time on biofilm formation of strain QHZ3

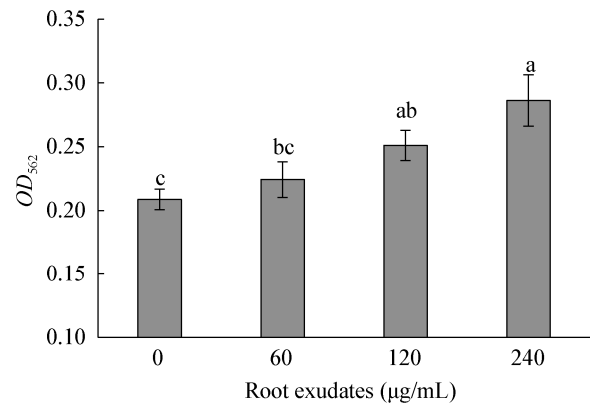


图 8 根系分泌物对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响
Figure 8 Effect of root exudates on biofilm formation of strain QHZ3

注: 不同小写字母表示各处理在 $P<0.05$ 水平上存在显著差异
Note: The different small letters indicate significant differences among treatments at $P<0.05$ level

结果如图 9 所示。整体来看, 酚酸对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响不大, 只有 50–75 $\mu\text{mol/L}$ 的富马酸和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的对羟基苯甲酸可显著促进菌株 QHZ3 生物膜的形成, 而阿魏酸和肉桂酸对促生菌的生物膜形成无显著影响。

3 讨论与结论

根系分泌物是联系植物与根际土壤微生物的重要枢纽, 它们之间的互作也是由根系分泌物所介导, 植物通过光合作用固定的碳以根系分泌物的形式进入到土壤中, 为根际土壤微生物的生长提供了营养^[37], 而且根系分泌物中的某些物质可作为信号物质吸引或排斥特异的微生物, 以此调控土壤微生物群落^[38]。根系周围的可溶性碳通过趋化作用影响土壤微生物的分布与种类, 使土壤微生物游向富含根系分泌物的根际及根表面进行定殖与繁殖^[39]。根际微生物在根系的聚集也同样能影响植物的代谢。有研究表明, 小麦在自然条件下根系分泌物是灭菌土壤条件下的 2 倍^[40]。Ling 等^[24]发现西瓜枯萎病病原菌侵染宿主后会导致植株根系分泌更多肉桂酸。朱丽霞等^[41]报道了多粘杆菌产生的多糖素导致植株根系分泌较多的氨基酸。

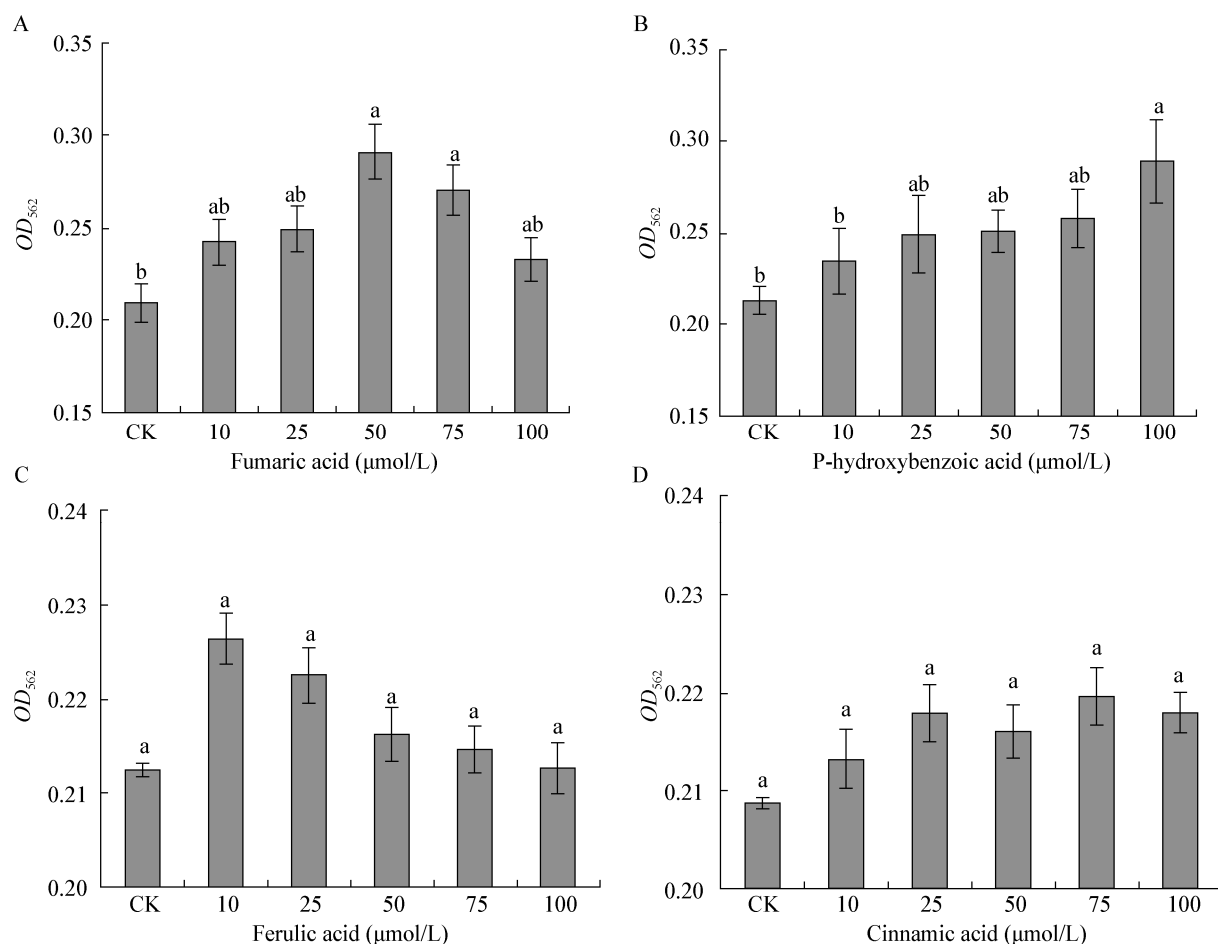


图9 不同浓度酚酸对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响

Figure 9 Effects of different concentrations of phenolic acids on biofilm formation of strain QHZ3

注：不同小写字母表示各处理在 $P < 0.05$ 水平上存在显著差异

Note: The different small letters indicate significant differences among treatments at $P < 0.05$ level. A: Fumaric acid; B: P-hydroxybenzoic; C: Ferulic acid; D: Cinnamic acid.

趋化性指微生物对某种化学物质的浓度梯度产生趋向或趋避的响应行为^[42-43]，通常被认为是土壤微生物在植物根际定殖的主要因子之一^[44]。本试验通过 HPLC 鉴定出马铃薯根系分泌物存在 4 种主要酚酸(富马酸、对羟基苯甲酸、阿魏酸和肉桂酸)，通过测定这 4 种酚酸对菌株 QHZ3 的趋化作用，结果表明 4 种酚酸对菌株 QHZ3 均具有趋化作用，但趋化程度各不相同，以富马酸趋化作用最强。同时，马铃薯根系分泌物对菌株 QHZ3 也具有趋化作用。De Weert 等^[45]报道了根际分泌物中的苹果酸和柠檬酸可以趋化荧光假单胞

菌；Gaworzewska 等^[46]研究报道了豌豆根系分泌物能够对根瘤菌具有趋化作用。冯海超^[32]和张楠^[47]研究表明植物根系分泌的有机酸、酚酸和氨基酸等物质可以影响根际微生物的移动，而且这些根系分泌的物质对根际微生物的趋化作用因物质的种类及浓度的不同而产生不同效果。同时，有研究发现，植物根系分泌的 L-苹果酸参与了植物对促生菌 *Bacillus subtilis* FB17 的“招募”过程，并且 L-苹果酸对 *Bacillus subtilis* FB17 的“招募”具有剂量效应^[48]。这与本实验观察到不同浓度酚酸对菌株的趋化作用具有不同趋势的结果一致。

另外, 本实验研究了不同浓度根系分泌物和酚酸对菌株 QHZ3 生物膜形成的影响, 研究发现根系分泌物和酚酸可促进菌株 QHZ3 生物膜形成, 尤其是 120–240 $\mu\text{g/mL}$ 马铃薯根系分泌物、50–75 $\mu\text{mol/L}$ 的富马酸和 100 $\mu\text{mol/L}$ 的对羟基苯甲酸可显著促进菌株 QHZ3 生物膜的形成。赵卫松等^[49]研究发现 L-脯氨酸可显著促进枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株生物膜形成。Zhou 等^[50]研究表明外源添加 10–20 mg/mL 的聚谷氨酸能显著促进枯草芽孢杆菌 Bs916 生物膜的形成, 但浓度升高至 30 mg/mL 时菌株生物膜形成能力受到抑制。冯海超^[32]研究发现酚酸类物质如香草酸、阿魏酸和肉桂酸等可以促进菌株 SQR9 生物膜的形成, 但随着各物质浓度的升高, 菌株的生物膜形成能力表现出先增强后减弱的趋势。从以上研究结果可知, 菌株生物膜的形成能力不是随着外源添加剂的浓度升高而增强, 当浓度过高时可能会抑制生物膜的形成, 而且菌株生物膜形成能力与外源添加剂类别也有关系。

植物根际是一个受植物根系活动所影响的特殊生态环境, 向植物根际引入趋化物有利于根际促生菌在植物根际的存活和定殖。本实验通过研究根系分泌物及酚酸类物质对萎缩芽孢杆菌 QHZ3 的趋化作用, 以及不同浓度根系分泌物及酚酸对萎缩芽孢杆菌 QHZ3 生物膜形成的影响, 发现马铃薯根系分泌物和酚酸均会介导菌株 QHZ3 的趋化成膜, 而且富马酸对菌株 QHZ3 的趋化性和生物膜形成均具有显著影响, 因此, 富马酸可能是介导菌株 QHZ3 定殖的信号物质。

根据前述结果和分析讨论, 可以得出如下结论: 添加根系分泌物可显著促进菌株 QHZ3 的生长, 而且随着根系分泌物浓度增大和培养时间的递增, 促生效果显著加强; 根系分泌物和酚酸均可介导菌株 QHZ3 在马铃薯根际趋化成膜, 但 4 种酚酸的作用不同, 富马酸和阿魏酸对菌株 QHZ3 的趋化作用显著, 富马酸和对羟基苯甲酸则对菌株生物膜的形成具有显著影响。

REFERENCES

- [1] Gao YL, Xu J, Liu N, Zhou Q, Ding XH, Zhan JS, Cheng XY, Huang J, Lu YW, Yang YH. Current status and management strategies for potato insect pests and diseases in China[J]. Plant Protection, 2019, 45(5): 106-111 (in Chinese)
高玉林, 徐进, 刘宁, 周倩, 丁新华, 詹家绥, 成新跃, 黄剑, 鲁宇文, 杨宇红. 我国马铃薯病虫害发生现状与防控策略[J]. 植物保护, 2019, 45(5): 106-111
- [2] Dong L, Qiu HZ, Zhou YZ, Dong AJ, Chen LL, Wang YL, Wang C. Rapid detection and application of antagonistic bacterium QHZ11 against *Rhizoctonia solani* in potato by real-time fluorescence quantitative PCR[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4338-4348 (in Chinese)
董莉, 邱慧珍, 周洋子, 董爱菊, 陈兰兰, 王友玲, 王川. 马铃薯立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 的实时荧光定量 PCR 快速检测与应用[J]. 微生物学通报, 2020, 47(12): 4338-4348
- [3] Li JT, Yang RW, Luo ZQ, Xu LL, Li KM. Analysis on occurrence of fungous disease of potato in northern Xinjiang Uygur Autonomous Region[J]. Chinese Potato, 2019, 33(3): 165-169 (in Chinese)
李江涛, 杨茹薇, 罗正乾, 徐琳黎, 李克梅. 新疆维吾尔自治区北疆地区马铃薯真菌病害发生情况分析[J]. 中国马铃薯, 2019, 33(3): 165-169
- [4] Cui LX, Wei LJ, Han XP, Yang CD, Xue L, Zhang JL. Field efficacy test of different pesticides against potato black scurf[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2019, 28(5): 815-819 (in Chinese)
崔凌霄, 魏立娟, 韩相鹏, 杨成德, 薛莉, 张俊莲. 不同药剂防治马铃薯黑痣病的田间药效试验[J]. 西北农业学报, 2019, 28(5): 815-819
- [5] Liu BY, Hu J, Meng ML, Zhang XY, Shi LH. Molecular identification and biological characters of the pathogen causing black scurf disease in potato[J]. Acta Phytologica Sinica, 2011, 38(4): 379-380 (in Chinese)
刘宝玉, 胡俊, 蒙美莲, 张笑宇, 石立航. 马铃薯黑痣病病原菌分子鉴定及其生物学特性[J]. 植物保护学报, 2011, 38(4): 379-380
- [6] Guo CJ, Shen RQ, Zhang LR, Wang XG, Zhang SW, Xu BL. Effects on biological control against potato black scurf (*Rhizoctonia solani*) and rhizosphere soil micro-ecosystem of *Trichoderma harzianum* applied together with straw[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(7): 1447-1455 (in Chinese)
郭成瑾, 沈瑞清, 张丽荣, 王喜刚, 张树武, 徐秉良. 哈茨木霉协同秸秆对马铃薯黑痣病及根际土壤微生态的影响

- 响[J]. 核农学报, 2020, 34(7): 1447-1455
- [7] Penrose DM, Glick BR. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118(1): 10-15
- [8] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63: 541-556
- [9] Gray EJ, Smith DL. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 37(3): 395-412
- [10] Liu ZP, Wang ZG, Xu WH, Chen WJ, Lü ZH, Wang CL, Shi YR. Screen, identification and analysis on the growth-promoting ability for the rice growth-promoting rhizobacteria[J]. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2018, 35(2): 119-125 (in Chinese)
- 刘泽平, 王志刚, 徐伟慧, 陈文晶, 吕智航, 王春龙, 史一然. 水稻根际促生菌的筛选鉴定及促生能力分析[J]. *农业资源与环境学报*, 2018, 35(2): 119-125
- [11] Lin W, Okon Y, Hardy RW. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, 45(6): 1775-1779
- [12] Xie YS. Screening of plant growth-promoting rhizobacteria and analysis of growth-promoting and biocontrol mechanism of its volatile organic compounds[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 谢越盛. 植物有益细菌筛选及其挥发性化合物的防病促生机理分析[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2016
- [13] Zhang PP. Effects of some plant growth-promoting rhizobacteria volatiles on *Arabidopsis* and antagonistic properties[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2013 (in Chinese)
- 张鹏鹏. 几株植物根际促生细菌释放的挥发性物质对拟南芥及病原菌的影响[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2013
- [14] Vessey JK. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers[J]. *Plant and Soil*, 2003, 255(2): 571-586
- [15] 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
- [16] Borriss R. Use of Plant-Associated *Bacillus* Strains as Biofertilizers and Biocontrol Agents in Agriculture[M]. *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*, 2011
- [17] Yuan YJ, Hu J, Ling N, Qiu MH, Shen QR, Yang XM. Effects and mechanisms of application with different bio-organic fertilizers in controlling *Fusarium* wilt of cucumber[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2014, 20(2): 372-379 (in Chinese)
- 袁玉娟, 胡江, 凌宁, 仇美华, 沈其荣, 杨兴明. 施用不同生物有机肥对连作黄瓜枯萎病防治效果及其机理初探[J]. *植物营养与肥料学报*, 2014, 20(2): 372-379
- [18] Ling N. The effects and mechanisms of bio-organic fertilizer on biological control of fusarium wilt of watermelon in *Fusarium*-infested soil[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- 凌宁. 根际施用生物有机肥防控西瓜土传枯萎病效果及机理研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2012
- [19] He X, Hao WY, Yang XM, Shen QR, Huang QW. Effects of bioorganic fertilization on growth and controlling *Fusarium*-wilt disease of banana[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2010, 16(4): 978-985 (in Chinese)
- 何欣, 郝文雅, 杨兴明, 沈其荣, 黄启为. 生物有机肥对香蕉植株生长和香蕉枯萎病防治的研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16(4): 978-985
- [20] Luo X, Feng HC, Xia LM, Zhang RF, Yu GH, Shen QR, Zhang N. Transcriptomic profiling of plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 in response to banana root exudates[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2019, 42(1): 102-110 (in Chinese)
- 罗兴, 冯海超, 夏丽明, 张瑞福, 余光辉, 沈其荣, 张楠. 根际促生解淀粉芽孢杆菌 SQR9 对香蕉根系分泌物响应的转录组分析[J]. *南京农业大学学报*, 2019, 42(1): 102-110
- [21] Fang ZY. The effects and mechanisms of *Bacillus amyloliquefacien* strain SQY162 on biological control of bacterial wilt of tomato[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 房志颖. 解淀粉芽孢杆菌 SQY162 防控土传番茄青枯病效果及其机理研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2016
- [22] Shen YF, E YY, Yang F, Zhang N, Huang QW, Shen QR. Effects of amino acids in root exudates of watermelon on the chemotactic reaction and root colonization of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(1): 101-108 (in Chinese)
- 沈怡斐, 鄂珪瑶, 阳芳, 张楠, 黄启为, 沈其荣. 西瓜根系分泌物中氨基酸组分对多黏类芽孢杆菌 SQR-21 趋化性及根际定殖的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2017, 40(1):

- 101-108
- [23] Ling N, Huang QW, Guo SW, Shen QR. *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(1/2): 485-493
- [24] Ling N, Raza W, Ma JH, Huang QW, Shen QR. Identification and role of organic acids in watermelon root exudates for recruiting *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 in the rhizosphere[J]. European Journal of Soil Biology, 2011, 47(6): 374-379
- [25] Liu YP. Mechanism of rhizosphere colonization and induction of systemic resistance by *Bacillus amyloliquefaciens*[D]. Beijing: Post-Doctoral Work Report of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
刘云鹏. 根际促生解淀粉芽孢杆菌根际定殖和诱导植物系统抗性的机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士后研究报告, 2019
- [26] Zhang XL. Screening of rhizosphere efficient phosphate solubilizing bacteria and its mechanisms suitable for the rhizosphere[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
张小兰. 根际高效溶磷菌的筛选及其适应根际的机理研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2014
- [27] Compant S, Clément 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 and Biochemistry, 2009, 42(5): 669-678
- [28] Xu ZH. The molecular mechanisms of biofilm formation and cucumber root colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
徐志辉. 解淀粉芽孢杆菌 SQR9 生物膜形成和根际定殖分子机理研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2014
- [29] Li XL, Li YZ. Research advances in biological control of soil-borne disease[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(3): 204-212 (in Chinese)
李兴龙, 李彦忠. 土传病害生物防治研究进展[J]. 草业学报, 2015, 24(3): 204-212
- [30] Guan XM. Isolation of antagonistic bacterium strains against pathogen causing black scurf of potato and its acting mechanism[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2014 (in Chinese)
关小敏. 马铃薯黑痣病生防细菌的筛选及其生防作用机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2014
- [31] Qiu XL. Effects of bio-organic fertilizers on soil biological activities and the root growth, morphology and activities of potato[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2018 (in Chinese)
邱晓丽. 不同生物有机肥对土壤生物活性以及对马铃薯的生物效应的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2018
- [32] Feng HC. Correlation of root exudates components and gene transcription of SQR9 and its effects on chemotaxis and biofilm formation[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese)
冯海超. 根系分泌物组分与 SQR9 基因转录的相关性分析及其趋化与成膜的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2015
- [33] Cui SQ. A study of the mechanisms of inhibitory effect of phenolic acids derived from rice straw on *Staphylococcus aureus* biofilm[D]. Shanghai: Master's Thesis of Shanghai University, 2019 (in Chinese)
崔收庆. 秸秆酚酸对金黄色葡萄球菌生物膜的影响[D]. 上海: 上海大学硕士学位论文, 2019
- [34] Shen YF. Investigation of chemotaxis and transcriptional responses of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 in the rhizosphere of watermelon[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese)
沈怡斐. 多粘类芽孢杆菌 SQR-21 在西瓜根际趋化及转录组学研究[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2016
- [35] Park SY, Kim R, Ryu CM, Choi SK, Lee CH, Kim JG, Park SH. Citrinin, a mycotoxin from *Penicillium citrinum*, plays a role in inducing motility of *Paenibacillus polymyxa*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65(2): 229-237
- [36] Cao QH, Liu YY, Sun YN, Wei HL, Xue HW, Gou HT. Effect of different culture conditions on the formation of biofilm of *Listeria monocytogenes*[J]. Chinese Veterinary Science, 2020, 50(12): 1563-1571 (in Chinese)
曹启航, 刘圆圆, 孙亚楠, 委慧玲, 薛惠文, 苟惠天. 不同培养条件对单核细胞增生李斯特菌生物被膜形成的影响[J]. 中国兽医科学, 2020, 50(12): 1563-1571
- [37] Wu LK, Lin XM, Lin WX. Advances and perspective in research on plant-soil-microbe interactions mediated by root exudates[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2014, 38(3): 298-310 (in Chinese)
吴林坤, 林向民, 林文雄. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望[J]. 植物生态学报, 2014, 38(3): 298-310
- [38] Bais HP, Park SW, Weir TL, Callaway RM, Vivanco JM. How plants communicate using the underground information superhighway[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(1): 26-32
- [39] Zhang Y, Qin YX, Shang QM, Zhang YF, Li CH, Li PL.

- Characteristics of interaction between *Bacillus Amyloliquefaciens* L-S60 and cucumbers[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2019, 50(2): 258-265 (in Chinese)
- 张莹, 秦宇轩, 尚庆茂, 张一凡, 李昌辉, 李平兰, 解淀粉芽孢杆菌 L-S60 与黄瓜互作特性研究[J]. 农业机械学报, 2019, 50(2): 258-265
- [40] Wang RH, Zhang QF, Zhou BL, Lian H, Ma GS. Analysis on the interaction between root exudates and rhizosphere microbes[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2007, 38(1): 167-172 (in Chinese)
- 王茹华, 张启发, 周宝利, 廉华, 马光恕. 浅析植物根分泌物与根际微生物的相互作用关系[J]. 土壤通报, 2007, 38(1): 167-172
- [41] Zhu LX, Zhang JE, Liu WG. Review of studies on interactions between root exudates and rhizospheric microorganisms[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2003, 12(1): 102-105 (in Chinese)
- 朱丽霞, 章家恩, 刘文高. 根系分泌物与根际微生物相互作用研究综述[J]. 生态环境, 2003, 12(1): 102-105
- [42] Feng HC, Zhang N, Du WB, Zhang HH, Liu YP, Fu RX, Shao JH, Zhang GS, Shen QR, Zhang RF. Identification of chemotaxis compounds in root exudates and their sensing chemoreceptors in plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9[J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2018, 31(10): 995-1005
- [43] Yang SS. Chemotaxis determination and functional analysis of *cheA* and *cheY* gene in chemotaxis system of *Acidovorax citrulli*[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2015 (in Chinese)
- 杨姗姗. 西瓜嗜酸菌趋化性测定及趋化基因 *cheA* 和 *cheY* 功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2015
- [44] Vande Broek A, Lambrecht M, Vanderleyden J. Bacterial chemotactic motility is important for the initiation of wheat root colonization by *Azospirillum brasilense*[J]. Microbiology, 1998, 144 (9): 2599-2606
- [45] De Weert S, Vermeiren H, Mulders IHM, Kuiper I, Hendrickx N, Bloemberg GV, Vanderleyden J, De Mot R, Lugtenberg BJJ. 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
- [46] Gaworzewska ET, Carlile MJ. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants[J]. Journal of General Microbiology, 1982, 128(6): 1179-1188
- [47] Zhang N. Research of interaction between plant roots and rhizosphere beneficial *Bacillus* strains N11 and SQR9[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- 张楠. 根际有益芽孢杆菌 N11 及 SQR9 与植物根系的互作研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2012
- [48] Rudrappa T, Czymmek KJ, Paré PW, Bais HP. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria[J]. Plant Physiology, 2008, 148(3): 1547-1556
- [49] Zhao WS, Guo QG, Dong LH, Wang PP, Zhang XY, Su ZH, Lu XY, Li SZ, Ma P. Effect of L-proline on biofilm formation of *Bacillus subtilis* NCD-2[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2021, 51(1): 115-122 (in Chinese)
- 赵卫松, 郭庆港, 董丽红, 王培培, 张晓云, 苏振贺, 鹿秀云, 李社增, 马平. L-脯氨酸对枯草芽孢杆菌 NCD-2 菌株生物膜形成的影响[J]. 植物病理学报, 2021, 51(1): 115-122
- [50] Zhou HF, Luo CP, Fang XW, Xiang YP, Wang XY, Zhang RS, Chen ZY. Loss of *GltB* inhibits biofilm formation and biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* Bs916 by altering the production of γ -polyglutamate and three lipopeptides [J]. PLoS One, 2016, 11(5): 015624