

玉米内生细菌 Y19 的荧光标记及其在玉米体内的定殖应用效果

蒋晓玲^{1,2}, 何鹏飞¹, 王娅玲³, 郭力维¹, 吴毅歆^{2,3}, 杨静¹, 何月秋^{2,3}

(1. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201; 2. 微生物菌种筛选与应用国家地方联合工程研究中心, 昆明 650207;

3. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201)

摘要: Y19 是从玉米种子分离的具有促生、防病效果的解淀粉芽孢杆菌。为探究其在玉米体内及根围土壤中的定殖情况, 通过自然转化方式将含有绿色荧光蛋白基因 *gfpmut3a* 的质粒 pHAPII 导入 Y19, 获得具有良好荧光表型的标记菌株 Y19-GFPmut3a。室内平板对峙、玉米盆栽促生定殖实验的结果表明, 质粒的引入对 Y19 的拮抗病原及促生效果并无明显的影响, 接种后的第 40 天, 仍能在玉米的根围土壤、根、茎及叶组织中检测到标记菌株; 激光共聚焦显微镜观察结果显示, 接菌后的第 9 天, 即可观察到其在玉米根、茎及叶部组织的定殖, 表明 Y19 在玉米体内具有良好的运输传导性能。

关键词: 玉米; 解淀粉芽孢杆菌; 绿色荧光蛋白; 质粒; 遗传转化

中图分类号: S513.035

文献标识码: A

GFP-tagging and Colonization Effect of an Endophytic Bacterial Strain Y19 in Maize

JIANG Xiao-ling^{1,2}, HE Peng-fei¹, WANG Ya-ling², GUO Li-wei¹, WU Yi-xin^{2,3},
YANG Jing¹, HE Yue-qiu^{2,3}

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

2. National and Local Joint Engineering Research Center for Screening and
Application of Microbial Strains, Kunming 650207;

3. Faculty of Agronomy and Biotechnology, Kunming 650201, China)

Abstract: *Bacillus amyloliquefaciens* strain Y19 isolated from maize seed has the capacity to promote plant growth and control disease. To investigate its colonization into maize tissues and rhizosphere, a tagged strain Y19-GFPmut3a with good fluorescence was obtained through transformation of pHAPII into Y19 by natural competence. The introduction of exogenous plasmid has no significant effect on the antagonism and plant growth-promotion of Y19, according to the plate antagonistic bioassay and maize pot experiment in the greenhouse. In 40 days after inoculation (DAI), the *gfp*-tagged strain still could be detected in rhizospheric soil, roots, stems and leaves tissues of maize, meanwhile its colonization into roots, stems and leaves was observed at 9 DAI by confocal laser scanning microscope. These indicated that Y19 owns a good transduction in host plant.

Key words: Maize; Maize endophytic bacteria; Green fluorescent protein; Plasmid; Genetic transformation

收稿日期: 2014-08-21

基金项目: 云南省玉米产业体系项目

作者简介: 蒋晓玲(1988-), 女, 新疆阿勒泰人, 硕士, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: 850273778@qq.com

何鹏飞为并列第一作者。

何月秋为本文通讯作者。

植物内生细菌的发现可追溯至 19 世纪 70 年代^[1], 它是一类生活于植物组织内对寄主的生长发育无持续性伤害的细菌^[2]。内生细菌除了在植物营养、污染物降解、胁迫防御反应等方面发挥着重要的作用外^[3~5], 还能促进植物生长、防控病害^[6,7]。越来越多的内生芽孢杆菌(*Bacillus*)被从不同植物组织中分离出来^[8~10], 其在植物寄主体内的生存运行规律与促生、防病等功能关系也得到了重视。在众多研

究技术中,绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)标记因具有无须外源反应底物、操作简单、荧光稳定、检测方便、对靶标生物或细胞的活性无不良影响以及可原位实时动态观察等特点,作为一种良好标记而被广泛采用^[11~13]。

解淀粉芽孢杆菌Y19(简称Y19)是本实验室从玉米种子上分离出的具有抑制多种植物病原真菌菌株,对玉米等不同作物具有良好的促生效果^[14]。为进一步探究Y19在玉米体内的定殖情况和为后续的产品制剂开发,将绿色荧光质粒pHAPII导入Y19的自然感受细胞中,获得GFP标记的工程菌株并研究其在玉米上的定殖规律。

1 材料与方法

1.1 实验材料

菌株和质粒:内生解淀粉芽孢杆菌Y19、玉米茎腐镰刀菌(*Fusarium graminearum*, *F. verticillium*)、大肠杆菌(*E. coli*)TG1为本实验室保存;携带氨基青霉素抗性和卡那霉素抗性标记质粒pHAP II由南京农业大学沈其荣教授提供^[15]。

培养基:LB固体或液体培养基,解淀粉芽孢杆菌自然转化培养基GCHE、GC以及转化缓冲液^[16], PDA固体培养基。

抗生素:卡那霉素(Kan)的使用浓度25 $\mu\text{g/mL}$ 。

玉米品种:广玉88,由云南广大种业有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 GFP质粒pHAPII的提取

从大肠杆菌中提取质粒pHAPII参考《分子克隆实验指南》^[17]。

1.2.2 Y19的自然转化

Y19自然感受态细胞的制备参考Idris提出的方法,略作修改。挑取LB平板上过夜活化的Y19单菌落于液体LB中,37℃、170 r/min振荡培养过夜;次日,吸取一定体积的Y19过夜培养物于新鲜无菌的GCHE培养液中,并使其溶液OD₆₀₀在0.3左右;37℃、220 r/min剧烈振荡培养至OD₆₀₀约1.4左右;加入等体积的GC培养液稀释,相同条件继续振荡1~1.5 h;将此时的细菌培养物均匀分成两管,在5 000 r/min下于室温离心5 min;留下1/20培养基与沉淀,重悬后即为Y19的自然感受态细胞。

Y19的自然转化及标记菌株的筛选:向感受态细胞悬液中加入2 mL混有1 μg pHAPII质粒的转化缓冲液;混匀,于37℃、75 r/min摇床缓慢振荡20~30 min;向其中加入含500 μL 卡那霉素的液体LB,

剧烈振荡培养90 min;10 000 r/min,室温离心4 min,留下1/5培养基与沉淀,将重悬细胞均匀涂布于含有卡那霉素的LB平板上;37℃过夜培养,次日观察平板上有无抗性菌落的形成,并在光电折射仪(蓝盾®621)下观察有无绿色荧光菌落的出现。挑取发绿色荧光的单菌落(定名为Y19-GFPmut3a)于含有卡那霉素的液体LB中,37℃,160 r/min振荡培养6~8 h,提取质粒并转化大肠杆菌感受态细胞予以验证。

1.2.3 标记菌株的遗传稳定性测定

过夜活化标记菌株Y19-GFPmut3a,以0.1%(v/v)比例转接于无抗生素LB液体培养基中,37℃,160 r/min振荡培养5 h;再以相同的接种比例转接于无抗生素的LB液体培养基,相同条件下培养,如此重复培养10次。每次转接前,取样、10倍梯度稀释并均匀涂布于不含抗生素的LB平板上,37℃过夜培养,统计菌落总数和发绿色荧光的菌落数,计算标记菌在非选择压力下的稳定性。

1.2.4 野生菌株和标记菌株的生长曲线测定

过夜活化Y19与Y19-GFPmut3a,离心收集菌体,用无菌的液体LB洗涤,加入适量的液体LB将其密度调整至OD₆₀₀为1.0左右,以1% (v/v)接种比例分别接种至无菌的LB液体培养基中,37℃,160 r/min振荡培养。在接种后的第3、4、5、6、8、10小时以及随后每隔10 h测定细胞培养物的OD₆₀₀直到60 h为止,绘制出野生型和标记菌的生长曲线。

1.2.5 标记菌株对玉米茎腐病原菌以及轮枝镰刀菌拮抗活性观察

分别截取一小块玉米茎腐病原菌和轮枝镰刀菌的菌丝块接种于PDA平板中央,28℃下化培养2~3 d;用5 mm打孔器在菌落的边缘打取菌饼,并用接种针将其转移至新制备的PDA平板中央,无菌牙签蘸取Y19-GFPmut3a和Y19,点接于距菌饼3.0 cm处。28℃下培养5~7 d,观察抑菌圈大小。

1.2.6 野生菌株和标记菌株对玉米的促生效果比较

菌液的制备:挑取Y19-GFPmut3a和Y19的单菌落分别接种于含或不含卡那霉素LB液体培养基,37℃、160 r/min振荡培养3~4 d,使其营养耗尽至90%以上细胞形成芽孢,10倍梯度稀释并涂布培养以检测菌量。

接菌与培养:取大田土与漂浮育苗基质按4:1比例混合,180℃,干热灭菌5 h,自然冷却后过夜,再灭菌1次,用于玉米的栽培种植;拌入适量的细菌悬液至菌体密度达10⁶ CFU/g土,均匀分装于盆钵中并播入玉米种子(4粒/盆)。实验设置无菌水、液体LB、野生型及荧光标记菌共4个处理,每个处理3个重

复,每个重复4盆。出苗后,根据土壤墒情补入适量的水分。在播种后的第30天测量玉米型高(茎基到最长叶尖间的距离)、根长、鲜重、干重等性状指标。

1.2.7 标记菌株的回收及其在玉米体内定殖部位的观察

按1.2.6中方法种植玉米,在玉米种子播种后的第3、6、9、12、20、30及40 d分别取样调查根际、根围、根表土壤以及根、茎和叶片组织中的Y19-GFPmut3a存活数量^[18]。10倍梯度稀释根际、根围、根表土,制备土壤悬浮液,吸取200 μ L的土壤稀释液,均匀涂布于含有卡那霉素的LB平板上,37℃过夜培养,在光电折射仪下统计绿色荧光菌落数。

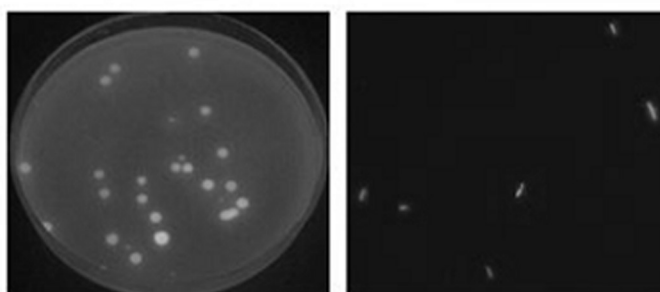
分别取玉米苗植株的根、茎及叶各0.5 g,1%次氯酸钠表面消毒5 min,75%酒精消毒3 min,无菌水漂洗3~4次,吸取最后1次漂洗水涂布于含卡那霉素的LB平板上,以确认表面消毒彻底;加入2 mL无菌水研磨成匀浆状,静置30 min,10倍梯度稀释,吸取一定体积的稀释液,均匀涂布于含有卡那霉素的LB平板上,37℃过夜培养,在光电折射仪下统计绿色荧光菌落数。

在播种后的第3、6、9天,观察玉米叶、茎、初生根、次生根不同部位上的发绿色荧光菌。从土壤拔出玉米苗,用无菌水洗净黏附在根表的泥土,以无菌吸水纸吸干玉米根表水分。随后用干净的手术刀将根切成长1 cm左右的小段,将其置于载玻片上滴加一滴10%的无菌甘油,盖上盖玻片,在莱卡激发共聚焦荧光显微镜下观察,观察时使用的激发波长为480 nm,收集波长为510~560 nm。叶、茎等组织部位的荧光观察,除了无需用无菌水洗涤外,其他操作细节与根系类似。

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽孢杆菌Y19的GFP标记

将大肠杆菌—芽孢杆菌穿梭GFP质粒pHAPII导入Y19的自然感受态细胞,结果发现,在卡那霉素LB平板上长出抗性菌落。抗性菌落在光电折射仪上的形态呈现出明亮的绿色;在荧光显微镜下也可以观察到单个菌体细胞发出强烈的绿色荧光,菌体的形状清晰,呈典型的杆状,表明GFP在Y19的细胞内被成功地表达(图1)。



注:A为Y19-GFPmut3a菌落;B为Y19-GFPmut3a菌体细胞。

Note: A, Y19-GFPmut3a colonies; B, Y19-GFPmut3a cells.

图1 光电折射仪及荧光显微镜下的Y19-GFPmut3a

Fig.1 GFP-tagged strain Y19-GFPmut3a under optical refractometer and fluorescence microscope

2.2 标记菌株Y19-GFPmut3a中质粒的遗传稳定性

连续稀释培养的试验结果表明,随着培养时间的加长,质粒pHAPII在菌体Y19细胞中不断地丢失;继代培养10次(50 h)后,兼有卡那霉素抗性且发荧光的菌株占菌落总数的比例为46%,明显低于其他人的实验结果^[9]。表明质粒pHAPII在Y19中不太稳定。芽孢杆菌在实验室营养丰富的条件下大约20~30 min分裂1次,在自然条件下繁殖一代所需的时间为50~100 h^[20]。据此推算,初步认为标记菌株适合于较短时期的定殖研究。

2.3 野生菌株和标记菌株的生长曲线比较

菌株Y19与Y19-GFPmut3a在LB液体培养基

中的生长曲线如图3所示,在培养的前10 h,标记菌株的生长速度比野生菌株略慢,但差异不明显,之后两株菌生长曲线的变化趋势基本相同。说明外源多拷贝质粒的引入和外源蛋白的表达对宿主菌的生长量并未产生明显的不利影响。

2.4 野生菌株和标记菌株对玉米茎腐病菌拮抗能力比较

从图4可以看出,标记菌株与野生型菌株对玉米茎腐病菌(禾谷镰刀菌和轮枝镰刀菌)的拮抗能力基本相同,外源质粒的引入对Y19的病原真菌拮抗活性并无太大的影响。

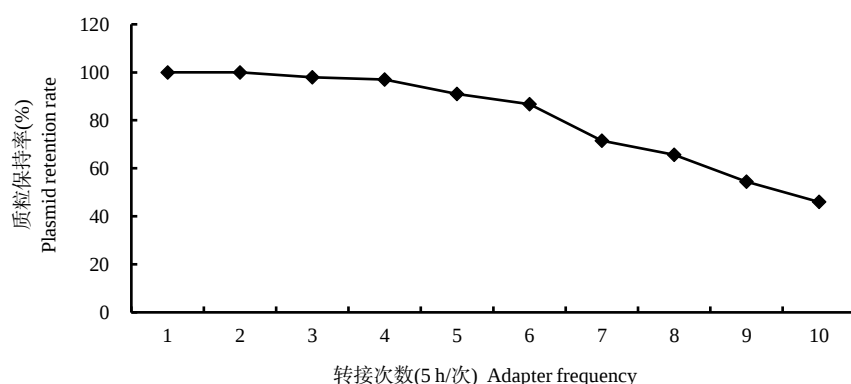


图2 Y19-GFPmut3a的质粒稳定性检测

Fig.2 Plasmid stability detection of Y19-GFPmut3a

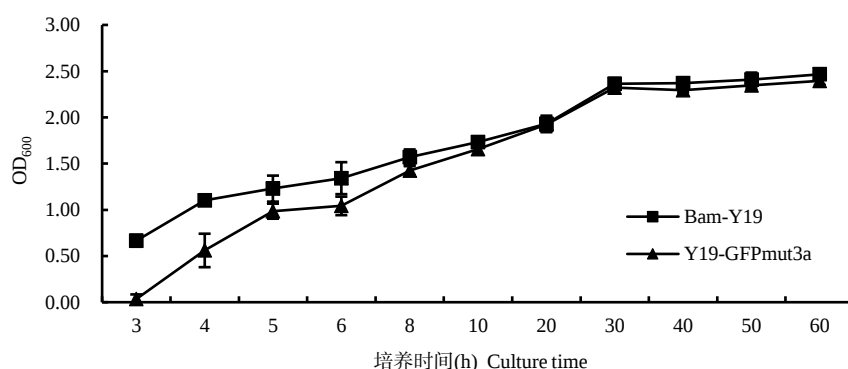
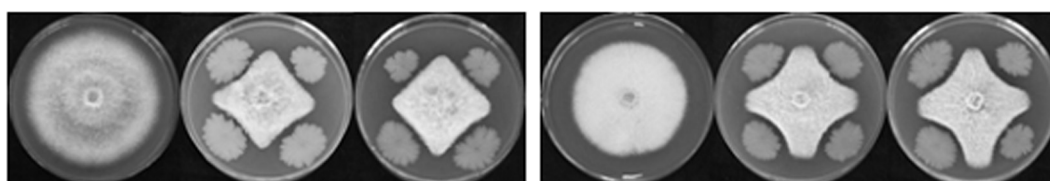


图3 野生型 Y19与Y19-GFPmut3a的生长曲线

Fig.3 Growth curve of Y19 and Y19-GFPmut3a



注:A为禾谷镰刀菌;B为轮枝镰刀菌(左:对照;中:Y19野生型;右:Y19-GFPmut3a)。

Note: A, *Fusarium graminearum*; B, *F. verticillium* (Left: blank control; middle: Y19; right: Y19-GFPmut3a).

图4 野生型Y19与Y19-GFPmut3a对茎腐病菌的拮抗

Fig.4 Antagonism of Y19 and Y19-GFPmut3a against *Fusarium*

2.5 野生菌株和标记菌株的促生长效果比较

测量玉米播种第30天玉米的型高、根长、鲜重及干重(表1)。与无菌水及液体LB处理比较,拌施Y19和Y19-GFPmut3a的处理组玉米的平均型高、干重及鲜重都显著增加,以Y19-GFPmut3a处理组促生效果最为明显。与空白对照相比,Y19-GFPmut3a处理的根长差异不显著,但玉米型高、鲜重以及干重分别增加26.63%、73.54%和155.21%,略高于野生型处理,说明质粒的引入没有影响Y19促进玉米生长的活性。

2.6 标记菌株在玉米根围土壤及不同组织中的定殖

标记菌株在玉米的根围土壤及玉米组织部位中的定殖总体上呈现出“先上升后下降”的趋势(图5)。接菌的初期阶段,标记菌在根表土中的数量持续增加,接种后的第12天达到最高峰,后期开始下降,至第40天与最初的接种量基本持平;根围土中标记菌数量在前期(3~12 d)略高于根际土,初期稳定(3~9 d),中期缓慢增长(9~30 d),随后略有下降,仍保持在一种高数量水平,表明内生细菌Y19与宿主玉米存有良好的互作关系。

表1 野生菌株和标记菌株的促生长效果
Table 1 Growth-promotion effect of Y19 wild type and tagged strain Y19-GFPmut3a

处 理 Treatment	型高(cm) Type height	增加(%) Increase	根长(cm) Root length	增加(%) Increase	鲜重(g) Fresh weight	增加(%) Increase	干重(g) Dry weight	增加(%) Increase
H ₂ O	33.46±0.30 c		27.04±0.65 a		45.12±1.89 b		3.17±0.57 b	
LB	34.20±0.48 bc	2.21	27.92±0.83 a	3.25	42.89±0.59 b	-4.94	4.52±0.25 b	42.59
Y19	39.50±0.56 bc	18.05	26.73±0.58 a	-1.15	66.12±0.57 a	46.54	7.10±0.40 a	123.97
Y19-GFPmut3a	42.37±0.89 a	26.63	26.73±0.59 a	-1.15	73.54±0.51 a	73.54	8.09±0.68 a	155.21

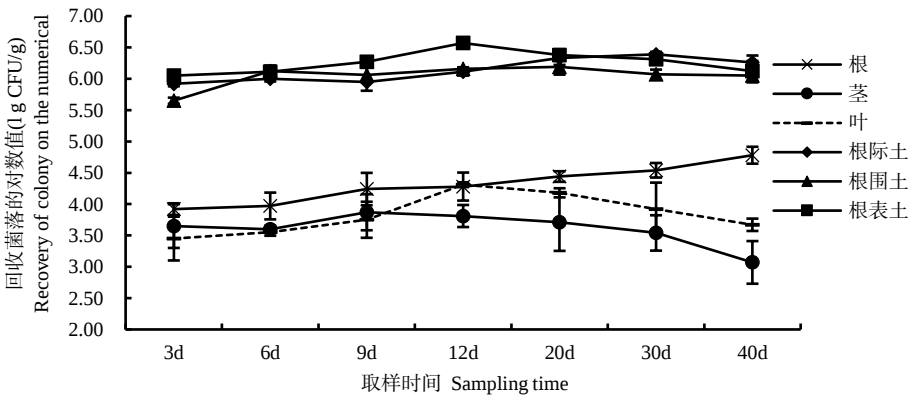
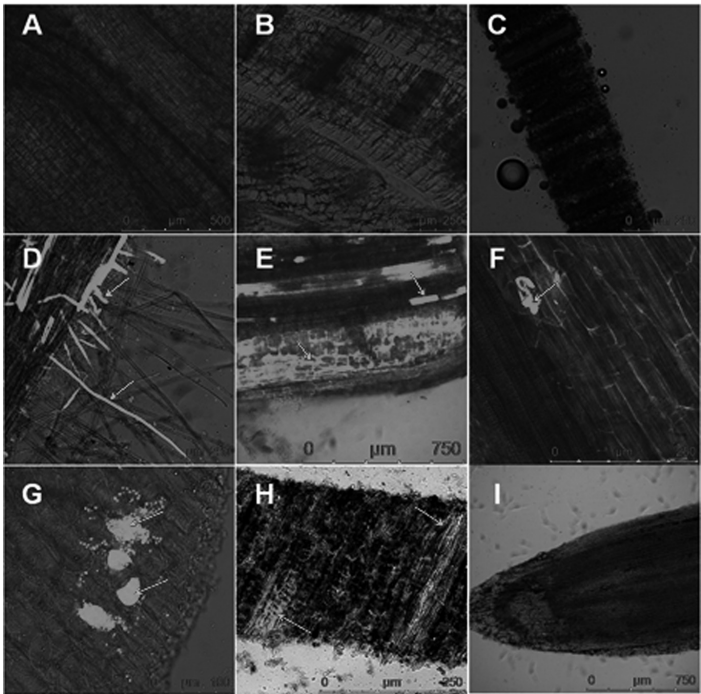


图5 荧光标记菌Y19-GFPmut3a在玉米根围土壤及不同组织内的定殖动态
Fig.5 Colonizing dynamic of Y19-GFPmut3a in maize rhizospheric soils and tissues

2.7 标记菌株在玉米体内的定殖显微观察



注:A为根对照;B为茎对照;C为叶对照;D为根毛;E为主根;F为次生根;G为茎薄壁组织(第6天);H为叶组织(第9天);I为根冠组织。
箭头表示Y19-GFPmut3a 菌株所在位置。
Note: A-C, Negative controls, Root(A), Stem(B), Leaf(C); D, Root hairs; E, Main root; F, Secondary root; G, Stem parenchyma(6 DAI); H, Leaf(9 DAI); I, Root cap. The arrow showing colonization sites of Y19-GFPmut3a.

图6 Y19-GFPmut3a在玉米根、茎及叶组织中的定殖
Fig.6 The colonization of Y19-GFPmut3a in maize root, stem and leaf tissues

激光共聚焦显微镜观察,Y19-GFPmut3a在玉米植株体内的定殖结果如图6所示。接种后的第3天就可以观察到标记菌在玉米根系定殖,优先定殖于玉米的根毛、分生区以及伸长区,同时还伴随有致密的生物膜形成;第6天,在茎组织的切片中发现标记菌的踪迹,这与在茎组织中回收到标记菌的结果相吻合;第9天,在叶片组织有标记菌株的存在,说明标记菌株能向地上运输。在根冠部分很少有标记菌的定殖,这可能与根冠部分的细胞未分化完全或生长过快、菌体数量少难以见到有关。

3 结论与讨论

在芽孢杆菌中表达异源蛋白存在的一个难题就是质粒不稳定。质粒不稳定可以划分为分离不稳定和结构不稳定,其中结构不稳定与质粒的复制方式有关。目前,质粒复制方式主要有滚环和 θ 复制。以芽孢杆菌质粒为例,滚环复制类型常见于一些小分子量、高拷贝的载体中,如pC194、pE19ts及pUB110等,此类型的质粒在复制时会形成大量的由单链DNA(ssDNAs)和高分子量多聚物(HMWs)组成的中间体,这些物质较为活跃,积极参与质粒内部序列的重排事件,从而导致质粒结构上的不稳定^[21]。同时也有报道^[22]认为,外源插入片段会与pUB110质粒内部的同源序列发生交换,从而导致片段的丢失。荧光质粒pHAPII是以pUB110为骨架构建起来的,在无选择压条件下,比较容易从芽孢杆菌中丢失,本研究的结果也证实了这一点。与他人的结果相比,pHAPII在Y19中的稳定性更差,但其中原因需要进一步探讨。

标记菌株在玉米根内的定殖数量呈现持续增长的趋势,可能与玉米生长过程中根部可侵入并定殖的位点逐渐增多有关。接菌第3天就在玉米的茎叶组织中检测到标记菌,这显示内生菌在宿主植物体内有良好的传导性能。标记菌在茎、叶中的定殖趋势表现出前期不断上升,分别于第9天、第12天达到最大值,后开始下降,但叶片组织中的菌含量高于茎组织,这可能是由于蒸腾拉力或其他因素(如细菌鞭毛运动、水流等)的作用菌株可以在维管束内由地下部向茎甚至叶等地上部迁移或扩散,而叶片是光合作用的场所,富含有更多新合成碳水化合物。此外,茎是运输水分、矿物质、养分的通道,如果茎组织中含菌量过多反而会堵塞运输通道不利于作物的生长,作物不能很好生长,对于具有良好协同关系的内生细菌来说,也是不利的。

有研究指出,pHAPII在芽孢杆菌中容易丢失,

只适合于短期(15~20 d)研究^[23]。本研究中,接种40 d后,仍然能够从玉米的根围土壤、根、茎及叶组织中分别检测到 10^6 、 10^4 、 10^4 、 10^3 CFU/g的荧光标记菌,表明高拷贝不稳定质粒的引入虽然给宿主菌带来了沉重的能量负荷,但在玉米体内仍然高剂量的存在,这一方面证明Y19来自玉米适于在玉米体内生存;另一方面说明种子中分离出来的,它与玉米一定存在良好互作关系,在玉米生长、增产、防病中可能存在重大意义。

Y19-GFPmut3a在寄主植物上的定殖行为与前人对其他内生菌的报道相似,优先定殖于根毛、次生根与主根交界处等细胞间隙较大的区域。一般认为,生防细菌在植物根系的定殖与根系分泌物、自身的趋化性及生物膜的形成密切相关。恶臭假单胞杆菌(*Pseudomonas putida*) KT2440接种48 h后就可可在玉米根上形成致密生物膜并实现最大化的定殖^[24]。本研究中观察到,在接种的第3天,Y19-GFPmut3a也能在玉米根部形成生物膜,生物膜的形成有助于生防细菌长时间的定殖,减少或避免寄主植物遭受病原微生物的侵染,从而保护寄主植物。荧光定殖观察结果表明,解淀粉芽孢杆菌Y19的确能够进入玉米的内部,这有助于Y19更稳定地发挥其促生、防病功能。

Y19-GFPmut3a在生长速度、抑菌效果及促生长效果上与野生型菌株Y19相似,在组织切片及菌量检测证明它能很好地在玉米根围、根表土及植株体内定殖,由于Y19本身是从玉米种子中分离到的内生菌,从而间接地表明Y19可以用于玉米促生长、防病等肥料及药剂的开发。

参考文献:

- [1] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W F, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(10): 895-914.
- [2] Schulz B, Boyle C. What are endophytes?[M]//Microbial root endophytes[J]. Springer Berlin Heidelberg, 2006: 1-13.
- [3] Chi F, Shen S H, Cheng H P, et al. Ascending migration of endophytic rhizobia, from roots to leaves, inside rice plants and assessment of benefits to rice growth physiology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7271-7278.
- [4] Siciliano S D, Fortin N, Mihoc A, et al. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(6): 2469-2475.
- [5] Cho S J, Park S R, Kim M K, et al. Endophytic *Bacillus* sp. isolated from the interior of balloon flower root [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2002, 66(6): 1270-1275.

- [6] Feng Y, Shen D, Song W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(5): 938–945.
- [7] Chanway C, Shishido M, Nairn J, et al. Endophytic colonization and field responses of hybrid spruce seedlings after inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Forest Ecology and Management, 2000, 133(1–2): 81–88.
- [8] Liu K, Ding X, Deng B, et al. Isolation and characterization of endophytic taxol-producing fungi from *Taxus chinensis*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2009, 36(9): 1171–1177.
- [9] Rai R, Dash P K, Prasanna B M, et al. Endophytic bacterial flora in the stem tissue of a tropical maize (*Zea mays* L.) genotype: isolation, identification and enumeration[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23(6): 853–858.
- [10] Rijavec T, Lapanje A, Dermastia M, et al. Isolation of bacterial endophytes from germinated maize kernels[J]. Canadian journal of microbiology, 2007, 53(6): 802–808.
- [11] 姚震声, 陈中义, 陈志谊, 等. 绿色荧光蛋白基因标记野生型生防枯草芽孢杆菌的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(5): 551–556.
- Yao Z S, Chen Z Y, Chen Z Y, et al. Genetically marking of natural biocontrol bacterium *Bacillus subtilis* strains with Green Fluorescent Protein Gene[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2003, 19(5): 551–556. (in Chinese)
- [12] 田涛, 亓雪晨, 王琦, 等. 芽孢杆菌绿色荧光蛋白标记及其在小麦体表定殖的初探[J]. 植物病理学报, 2004, 34(4): 346–351.
- Tian T, Qi X C, Wang Q, et al. Colonization study of GFP—tagged *Bacillus* strains on wheat surface[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(4): 346–351. (in Chinese)
- [13] 范晓静, 邱思鑫, 吴小平, 等. 绿色荧光蛋白基因标记内生枯草芽孢杆菌[J]. 应用与环境生物学报, 2007, 13(4): 530–534.
- Fan X J, Qiu S X, Wu X P, et al. Endophytic *Bacillus subtilis* strain BS-2 labeled with Green Fluorescent Protein Gene[J]. Chin. J. Appl. Environ. Biol., 2007, 13(4): 530–534. (in Chinese)
- [14] 郭力维. 云南省玉米内生细菌种类和有益潜力菌株研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2013.
- [15] Cao Y, Zhang Z, Ling N, et al. *Bacillus subtilis* SQR9 can control Fusarium wilt in cucumber by colonizing plant roots[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(5): 495–506.
- [16] Idris E S E, Iglesias D J, Talon M, et al. Tryptophan-dependent production of indole-3-acetic acid (IAA) affects level of plant growth promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2007, 20(6): 619–626.
- [17] DY J. Molecular Cloning—A Laboratory Manual[D]. Beijing: Science Press, 2002.
- [18] 王志远, 吴兴兴, 何月秋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 抗性基因标记及其在作物根部的定殖能力[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(3): 313–319.
- Wang Z Y, Wu X X, He Y Q, et al. Resistance genes labeling and colonization ability of a biocontrol agent B9601-Y2 of *Bacillus amyloliquefaciens* in crop rhizosphere[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(3): 313–319. (in Chinese)
- [19] Zhang N, Wu K, He X, et al. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11[J]. Plant and Soil, 2011, 344(1–2): 87–97.
- [20] Hecker M, Schumann W, Völker U. Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 1996, 19(3): 417–428.
- [21] Gruss A, Ehrlich S D. The family of highly interrelated single-stranded deoxyribonucleic acid plasmids[J]. Microbiological Reviews, 1989, 53(2): 231–241.
- [22] Chen X H, Vater J, Piel J, et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(11): 4024–4036.
- [23] 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, 2012.
- [24] Espinosa-Urgel M, Kolter R, Ramos J L. Root colonization by *Pseudomonas putida*: love at first sight[J]. Microbiology, 2002, 148(2): 341–343.

(责任编辑: 高阳)