

研究报告



生防放线菌 Ahn75 的荧光标记及其在水稻中的定殖

胡展 雷平 郭照辉 杨华 肖蓉 罗蓉君 黄军 付祖姣*

湖南省微生物研究院 湖南 长沙 410009

摘要:【背景】目前 *gfp* 标记基因已成为研究靶标微生物与宿主之间互作的一种重要工具。利用 *gfp* 基因标记生防菌株, 可以对生防菌株的生存及定殖能力进行有效追踪。【目的】对生防放线菌 Ahn75 进行荧光标记, 探讨其在水稻中的定殖规律, 为研究 Ahn75 的稻瘟病防治机制奠定基础。

【方法】首先通过电激转化将含绿色荧光标记基因(*gfp*)的质粒 pIJ8655 导入大肠杆菌 ET12567 中, 然后采用接合转移的方法将 *gfp* 整合到 Ahn75 基因组上; 通过平板对峙试验检验 Ahn75-GFP 在标记绿色荧光后对稻瘟病病原菌的抑菌活性; 采用喷施孢子液的方式将带荧光标记的 Ahn75-GFP 定殖水稻, 并利用荧光显微镜观察生防菌在水稻中的定殖情况; 对定殖水稻中的内生菌进行重分离, 探究菌株在水稻组织中的分布规律。【结果】PCR 扩增和荧光观察表明, 绿色荧光标记基因成功整合到生防放线菌 Ahn75 中。通过平板对峙试验, 发现 Ahn75-GFP 对稻瘟病病原菌抑菌活性与原始菌株没有显著差别。在荧光显微镜下, 可以观察到 Ahn75-GFP 能稳定定殖于水稻的根、茎、叶等组织中, 而水稻内生菌重分离试验表明该菌株在茎中的定殖力最强。【结论】获得一株绿色荧光标记生防菌株 Ahn75-GFP, 结果显示该菌株定殖水稻效果良好, 这对于研究 Ahn75 的稻瘟病防治具有重要意义。

关键词: 生防放线菌, 荧光标记, 水稻, 定殖

Fluorescent marker of biocontrol actinomycetes Ahn75 and its colonization in rice

HU Zhan LEI Ping GUO Zhao-Hui YANG Hua XIAO Rong LUO Rong-Jun HUANG Jun FU Zu-Jiao*

Hunan Microbiology Research Institute, Changsha, Hunan 410009, China

Abstract: [Background] At present, marker gene *gfp* has become an important tool to study the interaction between target microorganism and host. Using *gfp* to mark the biocontrol strain, we can track the survival and colonization of the biocontrol strain effectively. [Objective] The colonization of Ahn75 on rice was studied by making fluorescence labeling in the biocontrol actinomycete Ahn75, to lay a foundation for the resistant mechanism study of Ahn75 against rice blast. [Methods] Plasmid pIJ8655 with green fluorescent marker gene (*gfp*) was introduced into *E. coli* ET12567 by electroporation, then the *gfp*

Foundation items: Natural Science Foundation of Hunan Province (2016JJ2078); Key Science and Technology Planning Project of Hunan Province (2016NK2173)

*Corresponding author: E-mail: fzjp2004@hotmail.com

Received: 03-12-2018; Accepted: 02-04-2019; Published online: 19-04-2019

基金项目: 湖南省自然科学基金(2016JJ2078); 湖南省重点科技计划(2016NK2173)

*通信作者: E-mail: fzjp2004@hotmail.com

收稿日期: 2018-12-03; 接受日期: 2019-04-02; 网络首发日期: 2019-04-19

gene was incorporated into the genome of Ahn75 through conjugal transfer. The inhibitory activity of Ahn75-GFP against rice blast pathogens was tested by the dural culture method. Ahn75-GFP colonized in rice by spraying spores was observed by fluorescence microscopy, and re-isolated from the rice and counted, to explore the distribution of Ahn75-GFP in rice tissues. **[Results]** The PCR amplification of *gfp* and the fluorescence observation of Ahn75-GFP showed that, the green fluorescent marker gene was successfully integrated into Ahn75. The inhibitory activity of Ahn75-GFP against rice blast pathogens by the dural culture method was not significantly different from the original strain. Ahn75-GFP colonized in the root, stem and leaf, could be observed by a fluorescent microscope, and the re-isolation results of endophytic strains in rice indicated that the strains had the strongest colonization ability in stems. **[Conclusion]** A green fluorescence-labeled biocontrol strain Ahn75-GFP was successfully obtained, and showed good colonization ability in rice, which was of great significance for studying the control of rice blast by Ahn75 strain.

Keywords: Biocontrol actinomycete, Fluorescence labeling, Rice, Colonization

水稻稻瘟病由真菌梨孢霉菌(*Magnaporthe oryzae*)侵染引起,是全世界稻区危害最严重的水稻病害之一。每年因稻瘟病导致的水稻产量损失约占总产量的 10%–30%^[1]。目前,培育抗病新品种和喷施化学农药是防治稻瘟病的主要手段,但是抗病新品种的选育不仅周期长,而且存在抗性易丢失的问题,但大量使用化学农药不但会污染环境,还会导致有害物质残留在稻米中,影响人类健康^[2-3]。因此,探索开发新的方法来控制稻瘟病越来越受到人们重视,其中生物防治成为重要的研究领域。

微生物源农药因为具有不易产生抗药性、与环境相容性好的特点^[4-5],引起了生防专家极大的重视,并在稻瘟病生物防治方面开展了系列而深入的研究。目前,涉及稻瘟病生物防治的微生物主要有真菌^[6-7]、芽胞杆菌^[8-10]、假单胞菌^[11-12]、放线菌^[13-16]等。这些微生物能否在水稻中成功定殖,是检验其生防效果的重要指标。尤其是对于植物来源的内生放线菌来说,详细了解菌株与水稻之间的互作关系及在水稻中的定殖规律,对于提高和稳定菌剂的生防效果意义重大,同时也有助于制定科学有效的田间施用技术。

绿色荧光蛋白(GFP)是一种优质的动态活细胞标记分子,它稳定性好、易表达、对宿主细胞无毒害作用,且激发不需要消耗能量和其他辅助因子^[17],因而成为研究靶标微生物与宿主或环境互作的重要工具^[18],在炭疽菌^[19]、芽胞杆菌^[20]、

木霉真菌^[21]以及链霉菌^[22]等多种生防微生物中均有应用。本研究选取的出发菌株 Ahn75 是从海南水稻稻瘟病发病区的未发病水稻茎组织中分离纯化的一株内生链霉菌(*Streptomyces* sp.)。前期研究表明,该菌株对稻瘟病原菌的菌丝生长和孢子萌发均具有较高的抑制作用,10%的发酵滤液对稻瘟病菌丝生长抑制率为 80.8%,50%的发酵滤液对稻瘟病孢子萌发抑制率为 78.3%。为了研究该生防菌在水稻中的定殖特性,本文首先以 *E. coli* ET12567/pUZ8002 为供体菌,通过接合转移将穿梭载体 pIJ8655 上的 *gfp* 基因导入到 Ahn75 中,随后对重组菌 Ahn75-GFP 在水稻中的定殖水平进行了荧光观察和定量分析,以期探明生防菌株 Ahn75 对稻瘟病的生防机制及该菌在稻田中的施用方式提供可行性依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株、质粒和品种

生防链霉菌 Ahn75 由本实验室从水稻中分离获得;*E. coli* ET12567/pUZ8002 由本实验室保存;质粒 pIJ8655 由 Sun 等^[23]提供;稻瘟病病原菌 TCYD1 是本研究组从湖南益阳桃江地区的染病水稻植株上分离获得。水稻品种:超优一千。

1.1.2 引物

用于扩增 *gfp* 序列的特异性引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,序列为:EGFP-F:

5'-TAACTTATGGTGAGCAAGGGCG-3'; EGFP-R:
5'-GCGTTACTTGTACAGCTCGTCC-3'。

1.1.3 培养基

细菌培养采用LB培养基(g/L):胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; 放线菌培养、平板对峙试验和内生菌重分离采用ISP2培养基(g/L): 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 10.0, 葡萄糖 4.0; 接合转移试验采用2×YT培养基(g/L): 胰蛋白胨 16.0, 酵母提取物 10.0, NaCl 5.0。

1.1.4 主要试剂和仪器

各种抗生素、细菌基因组提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; *Taq* 酶试剂盒、DNA Marker DL2000, 宝生物(大连)有限公司; Hoagland 营养液, 青岛海博生物技术有限公司; 0.4%台盼蓝染液, 北京索莱宝科技有限公司。荧光显微镜, 蔡司公司; 超声波清洗器, 上海之信仪器有限公司; PCR 仪, Eppendorf 公司; 人工气候箱, 上海森信实验仪器有限公司; Gel Logic 凝胶成像仪, 柯达公司。

1.2 方法

1.2.1 放线菌 Ahn75 的荧光标记

取 37 °C、800 r/min 培养过夜的 *E. coli* ET12567/pUZ8002 菌液, 接种到新的 LB 培养基中, 培养至 OD_{600} 为 0.1, 加入质粒 pIJ8655, 混匀后按照电激法^[24]进行细胞转化; 转化后的细胞 37 °C、800 r/min 培养 1 h 后涂布于含有卡那霉素(25 μg/mL)、氯霉素(25 μg/mL)和安普霉素(50 μg/mL)的 LB 平板上, 37 °C 培养 16 h 筛选阳性菌株。放线菌 Ahn75 与 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pIJ8655 间的接合转移参考刘晓瑜等^[22]的方法, 在含有萘啶酮酸(50 μg/mL)和安普霉素(50 μg/mL)的 ISP2 平板上筛选可能的接合子, 挑取单菌落纯化, 确定菌株为链霉菌后用含 50 μg/mL 的安普霉素抗性平板培养, 并将重组菌株命名为 Ahn75-GFP。

1.2.2 Ahn75-GFP 的分子及荧光检测

采用细菌基因组提取试剂盒提取重组子 Ahn75-GFP 的基因组, 以其为模板, 利用引物

EGFP-F/R 进行特异性扩增, 目的片段长度为 720 bp。PCR 反应体系(25 μL): 模板(120 mg/L) 1 μL, 引物 EGFP-F/R (10 μmol/L)各 0.5 μL, 2×PCR Master Mix 12.5 μL, ddH₂O 10.5 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶图像分析系统拍照。插片法培养放线菌 Ahn75-GFP, 使用荧光显微镜对其发光表型进行检测。

1.2.3 Ahn75-GFP 的抑菌活性及遗传稳定性检测

生防菌对稻瘟病菌生长的抑制作用采用平板对峙法测定, 方法参照蔡长平等^[25]的方法, 抑制率(%)=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/(对照组菌落直径-菌饼直径)×100。挑取第一代 Ahn75-GFP 转化子的单菌落于普通的 ISP2 液体培养基中转接 20 代, 随后挑取菌液在荧光显微镜下观察菌丝及其荧光强度。

1.2.4 生防菌在水稻中的定殖

取饱满健康的水稻种子, 70%酒精表面消毒 5 min, 无菌水漂洗 3 次, 而后将种子平铺于湿润滤纸表面, 覆盖浸湿的 6 层纱布于暗处催芽 48 h。取发芽的种子转接至平铺了塑料网格并装满 Hoagland 营养液(3 d 更换一次营养液)的水培盒中, 于人工气候培养箱培养, 光照 99%每天 12 h, 温度 28 °C, 湿度 80%, 培养 7 d。在培养水稻苗的同时, 将菌株 Ahn75-GFP 接入含安普霉素的 ISP2 平板上 28 °C 培养 5 d, 用 0.1%吐温溶液冲洗下平板上的孢子, 血球计数板计算孢子浓度, 最后用 0.05%的吐温水溶液稀释至 10⁸ CFU/mL。将配制好的孢子溶液喷施在水稻植株上, 平均每株喷施 0.5–0.8 mL 溶液, 对照喷施等量的 0.05%吐温水溶液。喷施后的水稻幼苗转移至温室继续培养。

1.2.5 定殖观察及重分离

喷施孢子溶液 7 d 后, 取水稻幼苗的根、茎、叶等组织进行切片, 制成临时装片, 于荧光显微镜下观察 Ahn75-GFP 在组织中的定殖情况。另外,

取水稻幼苗的根进行台盼蓝染色并制成临时装片, 于荧光显微镜下观察 Ahn75-GFP 对水稻根部的感染, 方法参照费云舟^[26]。在喷施孢子溶液后的第 1、3、5、7、12、17、22、27 天分别取 10 株水稻幼苗, 对定殖于根、茎、叶组织中的 Ahn75-GFP 进行重分离, 具体操作: 将水稻组织洗净后剪成 1 cm 大小, 室温下放置干燥过夜, 称过干重后于超净工作台进行表面消毒; 75% 乙醇浸泡 1 min, 无菌水清洗 3 遍, 5% 次氯酸钠溶液浸泡 3 min, 无菌水清洗 4 遍, 取最后一次清洗液 100 μ L 涂布于普通 ISP2 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 3–5 d 无微生物长出说明消毒彻底; 将消毒后的组织置于碾钵中磨成匀浆, 并稀释 10–100 倍, 分别取 100 μ L 匀浆液和稀释浆液涂布于含安普霉素抗性的 ISP2 平板上, 在 28 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 3–5 d 后, 统计目标菌数。

2 结果与分析

2.1 荧光标记菌株的鉴定

质粒 pIJ8655 通过电激法转化到 *E. coli* ET12567/pUZ8002 中, 转化子用含有卡那霉素、氯霉素和安普霉素的 LB 平板进行筛选, 并采用菌落 PCR 进行鉴定(结果未显示)。然后, 以 *E. coli* ET12567/pUZ8002/pIJ8655 作为供体菌, 与放线菌 Ahn75 进行接合转移, 用萘啶酮酸和安普霉素的抗性平板筛选接合子, 挑取单菌落进行纯化。获得的接合菌株 Ahn75-GFP, 用试剂盒提取其基因组 DNA 并进行 PCR 鉴定(图 1)。与此同时, 应用插片法培养 Ahn75-GFP 5 d 后, 在荧光显微镜下观察到重组菌株的自发荧光(图 2)。因此, 上述结果表明, 荧光基因已成功导入到生防菌基因组中。

2.2 菌株 Ahn75-GFP 的抑菌活性及遗传稳定性测定

如图 3 所示, 标记菌株 Ahn75-GFP 与原始菌株 Ahn75 对稻瘟病原菌都有较好的抑制活性。通过 3 组平行试验得出 Ahn75-GFP 和 Ahn75 对稻瘟病菌丝生长的平均抑制率分别为 61.8% 和 63.1%, 二者无明显差别, 说明荧光标记基因的整体

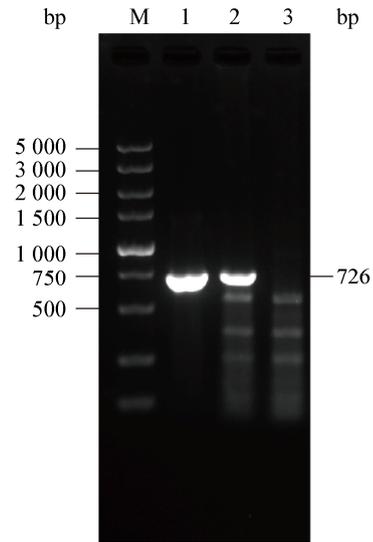


图 1 重组接合子的 PCR 鉴定

Figure 1 PCR identification of recombinant strain

注: M: DL5000 DNA marker; 1: 质粒 pIJ8655; 2: 重组接合子 Ahn75-GFP; 3: 放线菌 Ahn75.

Note: M: DL5000 DNA marker; 1: Plasmid pIJ8655; 2: Recombinant strain Ahn75-GFP; 3: Ahn75.

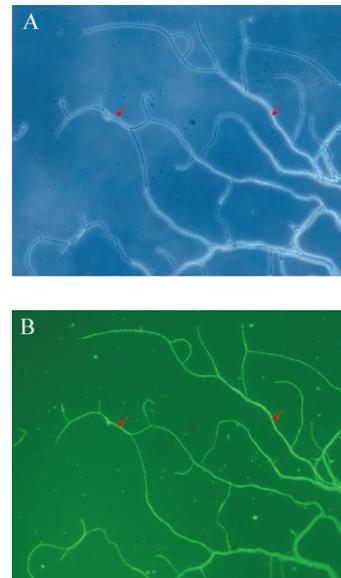


图 2 重组接合子 Ahn75-GFP 的荧光鉴定

Figure 2 Fluorescence identification of recombinant strain Ahn75-GFP

注: A: 荧光显微镜相差视野下观察 Ahn75-GFP (400 \times); B: 荧光显微镜暗视野下观察 Ahn75-GFP (400 \times).

Note: A: Ahn75-GFP observed under phase contrast field of fluorescence microscopy (400 \times); B: Ahn75-GFP observed under dark field of fluorescence microscopy (400 \times).

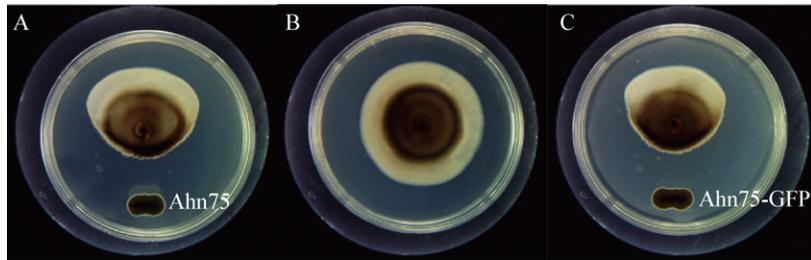


图3 重组接合子 Ahn75-GFP 的抑菌活性鉴定

Figure 3 Anti-blast activity identification of recombinant zygote Ahn75-GFP

注: A: Ahn75; B: 稻瘟病原菌; C: Ahn75-GFP.

Note: A: Ahn75; B: *Magnaporthe grisea*; C: Ahn75-GFP.

合不会影响 Ahn75 的抑菌活性。此外,第一代 Ahn75-GFP 在 ISP2 培养液中传代 20 次后,在荧光显微镜下可以观察到菌丝正常发出荧光(图 4),表明 *gfp* 基因在 Ahn75 菌株中的遗传稳定。

2.3 Ahn75-GFP 在水稻组织中的定殖观察

Ahn75-GFP 在水稻中定殖 7 d 后,取根、茎、叶组织制成临时切片,在荧光显微镜下进行观察。如图 5 所示,虽然植物组织本身有部分背景荧光,

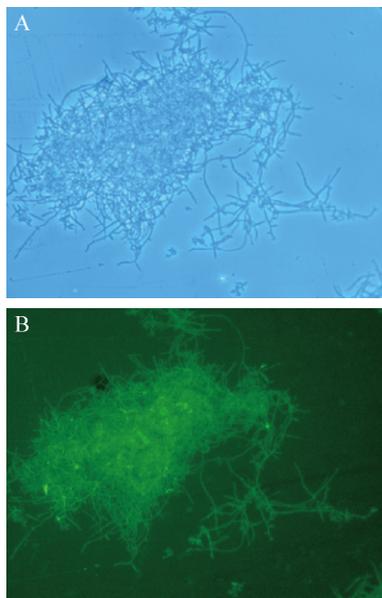


图4 Ahn75-GFP 传代 20 次后的荧光鉴定

Figure 4 Fluorescence identification of Ahn75-GFP subcultured 20 times

注: A: 荧光显微镜相差视野(200×); B: 荧光显微镜暗视野(200×)。

Note: A: Under phase contrast field of fluorescence microscopy (200×); B: Under dark field of fluorescence microscopy (200×).

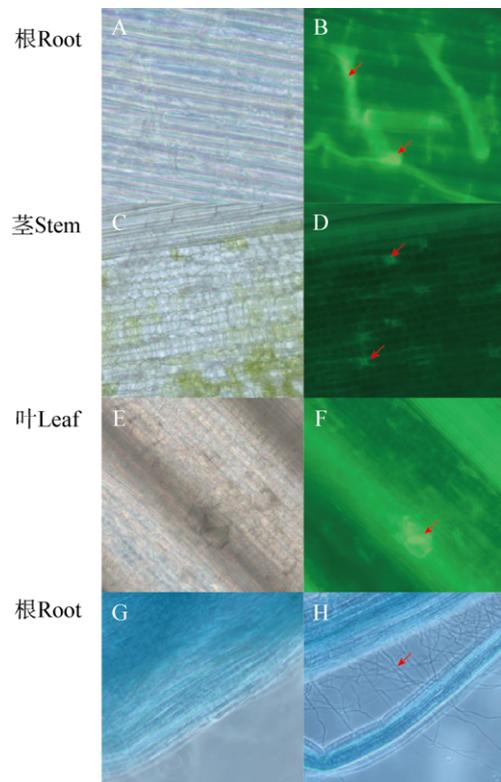


图5 Ahn75-GFP 在水稻根、茎、叶组织中的定殖观察
Figure 5 Colonization of Ahn75-GFP in the root, stem and leaf of rice

注: A、C、E: 荧光显微镜相差视野下观察定殖后的根、茎、叶组织(200×); B、D、F: 荧光显微镜暗视野下观察定殖后的根、茎、叶组织(200×); G、H: 荧光显微镜相差视野下观察经台盼蓝染色处理的空白对照根和定殖根组织(200×)。

Note: A, C, E: The root, stem and leaf colonized by Ahn75-GFP under phase contrast field of fluorescence microscopy (200×); B, D, F: The root, stem and leaf colonized by Ahn75-GFP under dark field of fluorescence microscopy (200×); G, H: The blank control root and the colonized root treated with Trypan blue dye under phase contrast field of fluorescence microscopy (200×).

但是在定殖的水稻幼苗根、茎、叶等组织中还是能比较明显地观察到 Ahn75-GFP 发出的绿色荧光, 它们主要位于组织或细胞的间隙之间。此外, 与空白对照相比(图 5G), 定殖的水稻根组织经台盼蓝染色处理后, 可以更清晰地观察到大量菌丝缠绕在根组织中或周围(图 5H)。这些结果表明, Ahn75 生防菌株能在水稻植株中稳定地生存, 这是其发挥抗稻瘟病作用的重要基础。

2.4 Ahn75-GFP 在水稻组织中的分布

为了研究 Ahn75-GFP 在水稻植株中的具体分布, 经过组织表面消毒后, 对定殖的菌株进行了重分离。结果如图 6 所示, Ahn75-GFP 在水稻各组织中的数量都呈现先快速增长, 而后随着时间的推移逐渐下降, 直至达到平缓状态。其中, 根组织内的菌数变化最大, 其原因可能在于最初喷施孢子时培养水稻的营养液促使了放线菌大量繁殖, 而后不断更换营养液又导致根内部放线菌的快速逸出, 而且随着时间的延长, 根组织内部的放线菌也会沿着韧皮部组织导管往上迁移。茎组织中的菌数在前 5 天有一个大幅度的增长, 到了后期其数量相对其他组织而言依然占据优势, 这可能与 Ahn75 本身就是从水稻茎组织中分离获得有关, 茎内部环境可能更适宜 Ahn75 的稳定生存。由此可以得出结论, 相较于根和叶而言, Ahn-75 在茎组织中的定殖能力更强。

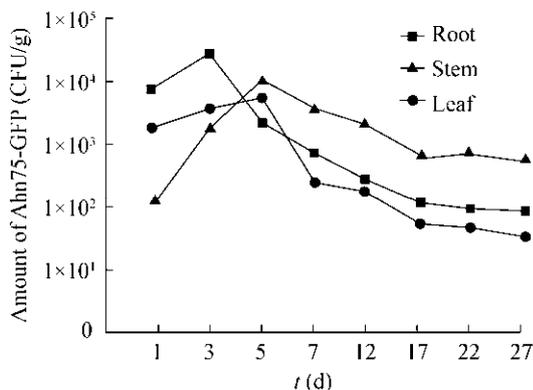


图 6 水稻中定殖 Ahn75-GFP 的定量分析

Figure 6 Quantity of Ahn75-GFP colonized in rice

3 讨论与结论

稻瘟病是当前水稻种植区威胁稻谷产量的三大病害之一。随着人们环保意识的增强, 传统的稻瘟病防治方法已不能适应新型农业的发展, 尤其在当前农业绿色转型发展的重要时期, 迫切需要对环境友好且绿色无公害的新方法来解决这一重大问题。已有研究表明, 内生放线菌在稻瘟病防治中具有极大潜力, 而且它绿色安全, 对环境不会造成任何污染^[16,27]。为此, 本实验室从水稻植株中分离获得了几株对稻瘟病菌具有明显拮抗作用的内生放线菌。其中 Ahn75 对 14 个稻瘟病原菌生理小种的抑菌率超过 50%, 盆栽试验显示该菌株对叶瘟和穗颈瘟的生物防效显著, 具有较大的潜在生防价值。

在自然环境下, 生防微生物能否稳定生存并有效定殖于作物各组织中是发挥其生物防效的重要条件, 定殖能力越强, 防治病害的效果就越明显^[28]。与根际和土壤微生物相比, 内生菌由于与宿主植物长期协同进化, 形成了互惠互利、相互依存的关系^[29], 因此它们定殖在植物组织间受环境的影响较小, 作为生防因子能发挥出更大的优势。本研究所选用的 Ahn75-GFP 菌株能有效定殖于水稻植株各组织中, 经 27 d 后, 在每克茎组织中的菌数依然能达到 10³ 数量级, 而每克根和叶组织中的数量也能达到或接近 10² 数量级。而且, 在第 17 天的时候, 我们对定殖的水稻植株也做了无表面消毒处理来分离 Ahn75-GFP: 将水稻组织在无菌水中进行 3 次 1 min 的超声洗涤后, 直接碾磨成匀浆进行涂布培养。我们发现其菌数含量比进行了表面消毒处理的植株至少多了 2 个数量级, 说明 Ahn75-GFP 在水稻组织的表面也有很好的生存能力, 这为菌株在水稻组织内部的稳定定殖奠定了基础。由此可以得出结论, 在整个苗期, Ahn75-GFP 都能在水稻植株中稳定生存, 为植株免受稻瘟病菌的侵染起到保护作用。

外源基因 *gfp* 常被用于研究靶标微生物与宿

主或环境之间的互动,它的便利为人们提供了一把打开微观世界大门的钥匙。不过,外源基因的大量表达有可能会对菌株造成额外的负担,影响原始菌株一些代谢功能^[30]。本研究对工程菌株 Ahn75-GFP 的生长状态和抑菌活性与原始菌株 Ahn75 做了比对,发现它们之间没有明显变化;而且 Ahn75-GFP 在传代了 20 次以后,荧光表达依然稳定。这些结果充分肯定了对 Ahn75 遗传改造的可行性,也为同类型的研究提供了一种思路。

REFERENCES

- [1] Dagdas YF, Yoshino K, Dagdas G, et al. Septin-mediated plant cell invasion by the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. *Science*, 2012, 336(6088): 1590-1595
- [2] Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A. Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards[J]. *Interdisciplinary Toxicology*, 2009, 2(1): 1-12
- [3] Chuma I, Isobe C, Hotta Y, et al. Multiple translocation of the AVR-Pita effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(7): e1002147
- [4] Hyakumachi M, Takahashi H, Matsubara Y, et al. Recent studies on biological control of plant diseases in Japan[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2014, 80(4): 287-302
- [5] Sha YX. Application of biopesticide against rice blast and analysis of its prospect[J]. *Plant Protection*, 2017, 43(5): 27-34 (in Chinese)
沙月霞. 生物农药在稻瘟病防治中的应用及前景分析[J]. *植物保护*, 2017, 43(5): 27-34
- [6] Wang YL, Liu SY, Mao XQ, et al. Identification and characterization of rhizosphere fungal strain MF-91 antagonistic to rice blast and sheath blight pathogens[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2013, 114(5): 1480-1490
- [7] Liu LN, Tu YL, Zhang JZ. Biocontrol potential of *Trichoderma virens* strain TY009 against rice sheath blight and other main fungal diseases[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(10): 2031-2038 (in Chinese)
刘路宁, 屠艳拉, 张敬泽. 绿木霉菌株 TY009 防治纹枯病等水稻主要真菌病害的潜力[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(10): 2031-2038
- [8] Chaiham M, Chunhaleuchanon S, Lumyong S. Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(11): 1919-1928
- [9] Saikia R, Gogoi DK, Mazumder S, et al. *Brevibacillus laterosporus* strain BPM3, a potential biocontrol agent isolated from a natural hot water spring of Assam, India[J]. *Microbiological Research*, 2011, 166(3): 216-225
- [10] Zhao LF, Xu YJ, Peng DH, et al. Screening and inhibitory effect of antagonistic endophytic bacteria associated with soybean root nodules against *Magnaporthe grisea*[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 998-1008 (in Chinese)
赵龙飞, 徐亚军, 彭顶华, 等. 稻瘟病菌拮抗性大豆根瘤内生细菌的筛选及抑制效果[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 998-1008
- [11] Prathuangwong S, Chuaboon W, Chatnaparat T, et al. Induction of disease and drought resistance in rice by *Pseudomonas fluorescens* SP007s[J]. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 2012, 11(1): 45-55
- [12] Gohel NM, Chauhan HL. Integrated management of leaf and neck blast disease of rice caused by *Pyricularia oryzae*[J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2015, 10(19): 2038-2040
- [13] Oh HS, Lee YH. A target-site-specific screening system for antifungal compounds on appressorium formation in *Magnaporthe grisea*[J]. *Phytopathology*, 2000, 90(10): 1162-1168
- [14] Li QL, Jiang YH, Ning P, et al. Suppression of *Magnaporthe oryzae* by culture filtrates of *Streptomyces globisporus* JK-1[J]. *Biological Control*, 2011, 58(2): 139-148
- [15] Khalil MS, Moubasher H, Hasan FF. Biological control of rice blast disease by *Streptomyces flavotricini*[J]. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2014, 5(5): 1453-1461
- [16] Wang ZZ, Xu T, Yuan SS, et al. Identification of an endophytic actinomyce OsiRt-1 isolated from rice and its effect against rice blast disease[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(5): 1009-1018 (in Chinese)
王真真, 徐婷, 袁珊珊, 等. 水稻内生放线菌 OsiRt-1 的分离鉴定及对稻瘟病的防治作用[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(5): 1009-1018
- [17] Kong HG, Choi K, Heo KR, et al. Generation of a constitutive green fluorescent protein expression construct to mark biocontrol bacteria using P43 promoter from *Bacillus subtilis*[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2009, 25(2): 136-141
- [18] Yang XR, Tian T, Sun SQ, et al. GFP-expressing *Bacillus subtilis* B579 strain and its colonization detection[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2013, 43(1): 82-87 (in Chinese)
杨秀荣, 田涛, 孙淑琴, 等. GFP 标记生防细菌 B579 及其定殖能力检测[J]. *植物病理学报*, 2013, 43(1): 82-87
- [19] Horowitz S, Freeman S, Sharon A. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*[J]. *Phytopathology*, 2002, 92(7): 743-749
- [20] Shen XQ, Liu T, Hu XL, et al. Labeling *Bacillus pumilus* with green fluorescent protein (GFP) and its colonization in rice seedlings[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(24): 5024-5031 (in Chinese)
沈新迁, 刘通, 胡晓璐, 等. 短小芽孢杆菌转座突变株的 GFP 标记及在水稻上的定殖[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(24): 5024-5031
- [21] Sarrocco S, Mikkelsen L, Vergara M, et al. Histopathological studies of sclerotia of phytopathogenic fungi parasitized by a GFP transformed *Trichoderma virens* antagonistic strain[J]. *Mycological Research*, 2006, 110(2): 179-187

- [22] Liu XY, Ma YC. Green fluorescent protein marker of biocontrol *Streptomyces* SSD49 and its colonization on the *Populus tomentosa* somaclone[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(9): 197-202 (in Chinese)
刘晓瑜, 马玉超. 生防链霉菌 SSD49 的绿色荧光蛋白标记及其在毛白杨组培苗中的定殖[J]. 生物技术通报, 2016, 32(9): 197-202
- [23] Sun J, Kelemen GH, Fernández-Abalos JM, et al. Green fluorescent protein as a reporter for spatial and temporal gene expression in *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. Microbiology, 1999, 145: 2221-2227
- [24] Shen HX. Protocols and Techniques of Molecular Biology[M]. Guangzhou: Sun Yat-Sen University Press, 2010 (in Chinese)
申焯焯. 分子生物学实验方法与技巧[M]. 广州: 中山大学出版社, 2010
- [25] Cai CP, Huang J, Lei P, et al. Screening and identification of antagonistic actinomycete CZ133 against rice blast and analysis of its antimicrobial activity[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2018(9): 1-5 (in Chinese)
蔡长平, 黄军, 雷平, 等. 稻瘟病拮抗放线菌 CZ133 的筛选、鉴定及抑菌活性分析[J]. 湖南农业科学, 2018(9): 1-5
- [26] Fei YZ. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the growth of *Astragalus sinicus*. L and heavy metal uptake in sludge contaminated soil[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2010 (in Chinese)
费云舟. 污泥污染土壤中接种 AM 真菌对紫云英生长及重金属吸收的影响[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2010
- [27] Qin S, Li J, Chen HH, et al. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6176-6186
- [28] Weller DM. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria[J]. Annual Review of Phytopathology, 1988, 26: 379-407
- [29] Ryan P, Germaine K, Franks A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(1): 1-9
- [30] Li XM, Xu ZG, Mew TW. Colonization of antagonistic bacteria on rice plants and their influence on native bacteria[J]. Acta Ecologica Sinica, 2008, 28(8): 3868-3874 (in Chinese)
李湘民, 许志刚, Mew TW. 稻株上拮抗细菌的定殖及其对土著细菌的影响[J]. 生态学报, 2008, 28(8): 3868-3874