

# 生防枯草芽孢杆菌 Kct99 的 GFP 标记及其在甘蓝根部的定殖示踪

田兆丰<sup>1</sup>, 刘伟成<sup>1</sup>, 董 丹<sup>1</sup>, 李永丹<sup>2</sup>, 张涛涛<sup>1</sup>, 刘德文<sup>1</sup>

(1. 北京市农林科学院 植物保护环境保护研究所, 北京 100097; 2. 中国农业大学 植物保护系, 北京 100094)

**摘要:** 将含有绿色荧光蛋白基因的质粒 pGFP4412, 电击转入生防菌株枯草芽孢杆菌 Kct99, 获得具有良好发光表型的荧光标记菌株 gfp-Kct99。经稳定性测定表明, 质粒 pGFP4412 在 gfp-Kct99 中的遗传稳定性为 89%。平板对峙培养和温室盆栽接种试验显示, 标记菌株 gfp-Kct99 对甘蓝枯萎病菌保持了原有的拮抗活性; 以标记菌株和野生型菌株培养液对甘蓝盆栽苗灌根处理 5 d 后再接种病原菌, 对甘蓝枯萎病的防治效果分别为 87.7%、90.2%, 二者无显著性差异, 但均显著高于同时接种生防菌和病原菌、接种病原菌 5 d 后再接种生防菌 2 种处理, 说明, 绿色荧光标记菌株 gfp-Kct99 抗甘蓝枯萎病的活性未受标记基因的影响。借助荧光显微镜观察表明, 标记菌株可以在甘蓝根部表皮内大量定殖, 从而阻止病原菌的侵入。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌; 绿色荧光蛋白标记; 定殖示踪; 甘蓝枯萎病; 生物防治

中图分类号: Q343.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)06-0053-05

## Colonization Observation and Control Efficiency Test against Cabbage Wilt Disease of GFP Tagged *Bacillus subtilis* Kct99

TIAN Zhao-feng<sup>1</sup>, LIU Wei-cheng<sup>1</sup>, DONG Dan<sup>1</sup>, LI Yong-dan<sup>2</sup>, ZHANG Tao-tao<sup>1</sup>, LIU De-wen<sup>1</sup>

(1. Institute of Plant & Environment Protection Beijing Academy of Agriculture & Forestry Sciences Beijing 100097, China; 2. Department of Plant Protection, China Agriculture University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** Marked strain gfp-Kct99 with luminous phenotype fluorescent was obtained by transmitting plasmid pGFP4412 containing green fluorescent protein gene. The heredity test showed that the stability of plasmid pGFP4412 in engineering strains was 89%; The confrontation culture and pot experiment proved that marked strain gfp-Kct99 maintained the original antagonistic activity to *cabbage fusarium oxysporium*; The control efficiency of the marked and wild strains were 87.7% and 90.2% against cabbage wilt disease respectively when they were vaccinated 5 d ahead of pathogenic bacteria, no significant differences between the two strains, but significantly superior to that of the two treatments when the antagonistic and Pathogenic bacteria were vaccinated simultaneously or the antagonistic bacteria was vaccinated 5 d later. The results showed that the activity of the marked strain gfp-Kct99 against cabbage blight was not influenced by GFP marking. Observing by fluorescence microscope showed that the marked strain was able to colonize in the root skin of the cabbage to stop the invasion of the pathogen.

**Key words:** *Bacillus subtilis*; Green fluorescent protein (GFP); Colonize tracking; Cabbage wilt disease; Biological control

植物病害生物防治是实现生态农业可持续发展的重要措施, 而生防拮抗菌的运用是生物防治的重要途径之一; 目前, 随着拮抗性微生物筛选工作的大量开展, 国内外研究者已获得了大量对植物病原菌

有良好拮抗活性并具潜在应用价值的微生物<sup>[1]</sup>。为了进一步阐明生防微生物在土壤或植株上的定殖、扩散和生存竞争能力, 揭示生防拮抗菌的作用机理, 基因标记示踪技术已经成为一种重要的技术手

收稿日期: 2012-09-16

基金项目: 北京市自然科学基金(6101001); 北京市农林科学院科技创新专项(KJCX201101001); 北京市科技计划课题(Z101105052010002)

作者简介: 田兆丰(1966-), 女, 山西榆社人, 副研究员, 博士, 主要从事植物病毒及其生物防治的研究。

通讯作者: 刘伟成(1959-), 男, 辽宁凌源人, 研究员, 博士, 主要从事植物真菌病害及其生防微生物研究。

段。绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 标记系统等现代基因标记技术的应用, 为探明拮抗细菌的根围定殖动态提供了有效的研究手段。GFP 具有基因小(约 1 kb)、安全、稳定、灵敏度高、稳定性好以及可实时、原位监测等优点, 已被成功运用于基因调控、微生物动态监测、病菌侵染宿主后在其组织中的增殖等示踪研究<sup>[1-2]</sup>。

枯草芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*) 能产生耐热抗逆的芽孢, 对菌剂的生产、剂型加工及其在环境中的存活、定殖与繁殖都十分有利<sup>[3-5]</sup>。其菌体在生长过程中产生枯草菌素、杆菌肽等多种抗菌活性物质, 对各种致病菌有明显的抑制作用<sup>[3]</sup>。Kct99 是从京郊菜田土壤中自主分离筛选的一株枯草芽孢杆菌, 前期研究表明, 其对甘蓝枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*)、桃褐腐病菌 (*Monilinia fructicola*) 和黄瓜角斑病菌 (*Pseudomonas lachrymans*) 等多种植物病原真菌和细菌均具有强烈的拮抗作用<sup>[6]</sup>, 对甘蓝枯萎病的温室试验也取得了较好的防治效果, 具有良好的开发应用前景。

为阐明其在甘蓝根围的存活、定殖、繁殖等微生物行为规律及其抗菌防病机制, 科学制定施用技术, 提高生防菌剂的生防效果, 笔者利用含有绿色荧光蛋白基因的穿梭载体 pGFP4412 电击转化 Kct99, 获得 GFP 标记的工程菌株, 并进一步对标记菌株的遗传稳定性、抗病活性及其在甘蓝根部的定殖进行了研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

菌株与质粒: 枯草芽孢杆菌 Kct99 由北京市农林科学院植保环保所生防微生物研究室从土壤中筛选、分离、鉴定和保存; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由生防微生物实验室提供; 含有绿色荧光蛋白基因的质粒 pGFP4412 由中国农业大学农学与生物技术学院生防微生物实验室惠赠, 质粒 pGFP4412 的结构及其构建过程参见文献 [1]。

培养基: Kct99 的固体培养基参见文献 [6], Kct99 的液体培养采用 LB 培养液; 大肠杆菌采用 LB 培养基。

抗生素: 氨苄青霉素 (Amp) 工作浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 新霉素 (Neo) 工作浓度 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 1.2 试验方法

1.2.1 质粒 pGFP4412 转化大肠杆菌及其在大肠杆菌中的表达 CaCl<sub>2</sub> 法制备大肠杆菌感受态细胞, 大肠杆菌的质粒转化参照文献 [7] 进行, 将质粒

pGFP4412 转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中; 抗生素氨苄青霉素 (Amp) 工作浓度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 转化的大肠杆菌进行质粒的小量提取, 具体方法按照天庚生物技术有限公司质粒提取试剂盒提供的步骤进行, 然后电泳验证质粒大小; 同时在尼康荧光倒置显微镜下以 450 ~ 520 nm 波长光激发 (显微镜型号为 TE2000-u), 观察转化后的大肠杆菌菌落是否发出绿色荧光。

1.2.2 质粒 pGFP4412 转化生防芽孢杆菌 Kct 99 及转化基因的表达 Kct99 感受态细胞的制备: 挑取 LB 平板上活化的 Kct99 单菌落于 5 mL LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养过夜; 菌悬液按 1/1 000 接种量转接至 125 mL LB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 振荡培养至菌悬液 OD<sub>600</sub> 为 0.6 ~ 0.8; 转移至冰上, 冰浴 30 min; 将预冷的菌液转移至预冷的 1.5 mL 离心管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 1 min, 沉淀用等体积预冷的无菌水重悬; 可以适当合并沉淀, 使菌量多些。再次 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 1 min, 沉淀用等体积预冷的无菌水重悬 (洗涤); 第 3 次在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 1 min 后, 沉淀用 1/2 体积预冷的无菌水重悬; 最后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min 离心 1 min, 沉淀用 200  $\mu\text{L}$  冰预冷的无菌水重悬, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存 (不超过 7 d)。

Kct99 的电击转化及标记菌株的筛选: 将 80  $\mu\text{L}$  已制备好的感受态细胞悬液与 10  $\mu\text{L}$  已制备好的待转化质粒 DNA 混合, 并将其转至 0.2 cm 预冷的电击杯中; 将装有混合液的电击杯冰中预冷 5 min 后电击转化 (使用的电击转化仪型号为 BIO-RAD Micropulser<sup>TM</sup> 411BR6452, 选择的电压分别 1 000, 1 200, 1 500 V 三档), 转化时间随 DNA 样品的不同而变化, 并由仪器自动给出, 一般在 3.5 ~ 6.0 ms 范围内; 电击后取出转化液加入 800  $\mu\text{L}$  的 LB 液体培养基, 于 30 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 ~ 3 h; 将转化液涂于 LB (新霉素 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 平板上, 每平板上约涂布 150 ~ 300  $\mu\text{L}$ , 于 30 $^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养, 直至长出菌落。用荧光显微镜检测, 挑取发绿色荧光的转化菌株 gfp-Kct99 在 PDA 培养基上划线培养, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.2.3 标记菌株 gfp-Kct99 的遗传稳定性测定 过夜活化 gfp-Kct99 菌株, 以 0.1% 接种无抗生素 LB 培养液, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 水浴摇床培养 5 h 左右取样, 再以 0.1% 接种无抗生素 LB 培养液于同样条件培养, 如此重复继代培养 10 次 (约 50 h), 最后随机选取 300 个克隆转入抗生素平板, 以抗性菌株所占百分比计算工程菌株的遗传稳定性。

1.2.4 工程菌株对甘蓝枯萎病菌拮抗活性测定 采用平板对峙培养法<sup>[8]</sup>进行拮抗性测定: 在 PDA 平

板距边缘 15 mm 处等距离接种 3 点经活化培养的拮抗性标记菌株 gfp-Kct99 或其野生菌株, 平板中央接种直径 5 mm 的指示病原菌菌饼, 每处理 3 次重复 28℃ 下培养 5~7 d, 至拮抗菌与指示菌菌落间产生明显抑菌带时测量抑菌带宽度。

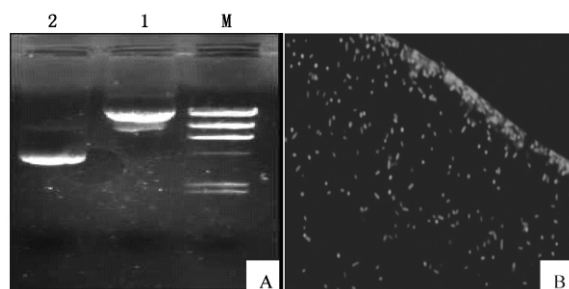
1.2.5 gfp-Kct99 对甘蓝枯萎病防治效果试验及其在甘蓝根部定殖的观察 供试甘蓝品种为中甘 21 号, 其种子在自来水中浸泡 24 h, 置于底部垫有湿润纱布的培养皿中, 待其发根 0.5 mm 后播种在直径 30 cm 的花盆中 2~3 片叶时定植至盛有灭菌土的 8 cm × 8 cm 培养钵中, 进行甘蓝枯萎病的防治试验, 具体方法参照文献 [9]。试验设标记菌 gfp-Kct99 及野生菌 Kct99 发酵液(不经过滤)灌根前 5 d 接种病原菌、灌根的同时接种病原菌, 灌根后 5 d 接种病原菌 6 个处理, 另设单纯接种枯萎病菌作为对照, 每处理 15~20 株, 重复 3 次。

在标记菌接种 3 d 后每隔 2 d 随机取 2~3 株幼苗的少量根用自来水冲洗, 除去黏附在根表的沙土颗粒, 在荧光显微镜下观察有无绿色发光菌体 gfp-Kct99 附着在根表。甘蓝枯萎病菌接种后 15 d 进行病情调查, 计算生防菌对甘蓝枯萎病的防治效果, 方法参见文献 [10]。采用方差分析对结果进行差异显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 质粒 pGFP4412 在大肠杆菌中的表达

pGFP4412 转化后的大肠杆菌 DH5α 进行质粒提取, 琼脂糖凝胶电泳如图 1-A, 质粒大小约 10.6 kb, 正好符合重组质粒 pGFP4412 的大小; 转化后的大肠杆菌在尼康荧光显微镜下观察到了很强的绿色荧光, 如图 1-B, 说明重组质粒在大肠杆菌中得到了高效表达。



M. λHind Marker; 1. 重组质粒 pGFP4412(10.6 kb);

2. 对照质粒 pGFP78(6.45 kb)。

M. λHind Marker; 1. Reconstructed plasmid pGFP4412(10.6 kb);

2. Control plasmid pGFP78(6.45 kb)。

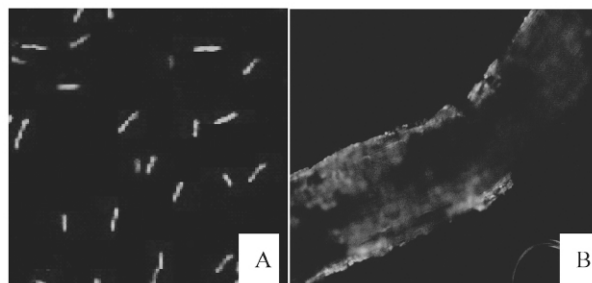
图 1 大肠杆菌转化菌株的质粒鉴定(A)

及其绿色荧光观察(B)(1000 倍)

Fig.1 Identification of the plasmid with GFP gene(A) and observation of transmitted DH5 α with green fluorescent(B)

### 2.2 GFP 标记芽孢杆菌的表达

用含有氨苄青霉素的平板筛选转化子。用荧光显微镜检测(450~520 nm 波长激发)可以看到发绿色荧光的芽孢杆菌菌体(图 2-A), 但相比在大肠杆菌中所发出的绿色荧光较弱。这可能是由于 GFP 在菌株 Kct99 细胞内的表达量较低造成, 也可能与培养时间或培养条件等有关。该菌最低可转化电压为 1.2 kV, 转化时间平均为 4.6 ms。



A. gfp-Kct99 的绿色荧光观察(1000 倍);

B. gfp-Kct99 在甘蓝根部定殖的观察(100 倍)。

A. Observation of *Bacillus subtilis* gfp-Kct99(1000 times);

B. Colonization of gfp-Kct99 in cabbage root(100 times)。

图 2 标记菌株 gfp-Kct99 及其在

甘蓝根部定殖的荧光显微观察

Fig.2 Observation of gfp-Kct99 and its colonization in cabbage root

### 2.3 标记菌株 gfp-Kct99 中质粒的遗传稳定性

菌株 gfp-Kct99 连续稀释培养的试验结果表明, 在本试验条件下, 连续继代培养 10 次(约 50 h)后, 以抗生素抗性菌株所占百分比计算, 该标记菌株中重组质粒的遗传稳定性为 89%, 说明重组质粒 pGFP4412 在芽孢杆菌 Kct99 中具有较好的稳定性。一般芽孢杆菌在自然条件下分裂一代所需时间为 50~100 h, 在实验室适宜条件下约 20 min 分裂一代<sup>[1]</sup>, 因此, 标记菌株 gfp-Kct99 的质粒稳定性可以满足一般作物某一生育期甚至一年生育期研究的需要。



图 3 标记菌株 gfp-Kct99 对甘蓝枯萎病的盆栽防治效果

Fig.3 Control efficiency of gfp-Kct99 against Cabbage wilt disease

### 2.4 标记菌株 gfp-Kct99 对甘蓝枯萎病菌的拮抗性

对峙培养试验表明, 转化后的标记菌株 GFP-Kct99 与其野生型菌株对甘蓝枯萎病菌都具有一定

的抑制作用 2 者抑菌带平均宽度分别为 4.3 4.5 mm,无显著性差异,说明菌株 Kct99 经 GFP 转化后对甘蓝枯萎病菌的拮抗活性没有受到明显影响。

## 2.5 gfp-Kct99 对甘蓝枯萎病盆栽防治效果及其在甘蓝根部的定殖

甘蓝枯萎病菌接种 10 d 后,对照苗出现明显的症状,接种后 15 d 的病情调查结果表明,gfp-Kct99 及其野生菌株对甘蓝枯萎病都有较好的防治效果

表 1 GFP 标记菌株 gfp-Kct99 及其野生菌株发酵滤液对甘蓝枯萎病的防治效果

Tab.1 Control efficiency of gfp-Kcts99 and its wild strain fermentation filtrate against Cabbage wilt disease

处理 Treatment		发病率/% Disease incidence	病情指数 Disease index	防治效果/% Control efficiency	差异显著性 Difference significance
提前 5 d 接种生防菌	标记菌 Gfp-Kct99	18.2	8.4	87.7	A
Antagonistic bacteria 5 days before pathogens	野生菌 Kct99	16.9	6.9	90.2	A
病原菌和生防菌同时接种	标记菌 Gfp-Kct99	70.5	30.2	55.8	B
Vaccinating antagonistic bacteria simultaneously	野生菌 Kct99	68.2	32.1	53.0	B
延后 5 d 接种生防菌	标记菌 Gfp-Kct99	88.6	50.7	25.8	C
Antagonistic bacteria 5 days after pathogens	野生菌 Kct99	86.4	48.3	29.3	C
病原菌 Pathogens(CK)	病原菌 Pathogens(CK)	100.00	68.3		

注:最后一列的不同大写字母表示各处理间防治效果在  $P=0.01$  水平上的差异显著性。

Note: The letters in the last column indicate significant differences at  $P=0.01$  level.

通过荧光显微镜观察,甘蓝根表有大量 gfp-Kct99 绿色发光菌体,说明其可在根表附着、存活并大量繁殖。标记菌株接种 3 d 即可观察到在根部表皮有微量定殖,5 d 即可见其有较大量定殖,从而在根表形成保护层(图 2-B),阻止病原菌侵入。标记菌与病原菌同时接种或滞后于病原菌接种时,根表观察到的发光菌体较少或不易观察到,这一现象与不同处理间防治效果的显著性差异相一致。

## 3 讨论

虽然 GFP 分子标记技术只有 10 多年的历史,但其作为快速高效的研究工具,在实时、定位、微生物与环境及宿主相互作用研究等方面已展示了良好的应用前景<sup>[11-12]</sup>。芽孢杆菌对外源基因具有较好的包容性,很利于外源基因的稳定表达<sup>[13]</sup>。本研究对枯草芽孢杆菌 Kct99 进行了 GFP 标记,并借助荧光显微镜对标记菌株 gfp-Kct99 的遗传稳定性及其在甘蓝根部的定殖进行了初步研究,为进一步阐明该类生防菌在植物体及其根际的定殖、扩展和消长规律奠定了基础。

平板对峙培养试验是拮抗菌抑菌强度研究的最基本方法之一,但抑菌强度受试验所选用的培养基、接种方法或培养条件等因素的影响较大<sup>[14-15]</sup>。本试验中菌株 Kct99 及其标记菌株 gfp-Kct99 对甘蓝枯萎病菌的抑菌带宽度只有 4.5 mm 左右,而通常

(图 3 表 1)。拮抗菌株提前于病菌 5 d 接种、同时接种或滞后接种 3 种处理对甘蓝枯萎病的防治效果差异极显著。提前接种拮抗菌株防效最好,同时接种次之,病原菌接种 5 d 后再以拮抗菌灌根防效较差。而标记菌株 gfp-Kct99 对甘蓝枯萎病的防治效果与野生菌株 Kct99 无显著差异,生防效果没有因荧光蛋白的标记和表达受到明显影响。

同类拮抗菌对峙培养试验抑菌带宽度可达 10 mm 左右<sup>[6]</sup>。但考虑到不同培养条件等因素的影响,抑菌带宽度也只能作为拮抗性强度的参考指标。盆栽试验是检验拮抗菌对病菌抑制能力的重要方法,本试验中拮抗菌提前接种 5 d,对甘蓝枯萎病的防治效果可达到 90% 以上,显著高于其同时或滞后接种时的作用效果,说明此生防菌的作用以预防为主,在生产应用中要在发病前或发病初期施用,待拮抗菌提前定殖并在作物根部占领一定的生态位点和空间后,病原菌才会受到更强的抑制,从而更有效防止病害的发生。

研究表明,芽孢杆菌是土壤、植物根际的重要微生物种群,目前已经有许多有关芽孢杆菌天然分离株促进植物生长和产生抗菌物质的报道,是植物病害生防菌株的重要来源<sup>[16-17]</sup>。枯草芽孢杆菌生防机制主要为竞争、拮抗和诱导抗性 3 个方面<sup>[6,18]</sup>。通过 GFP 标记菌的盆栽防病试验和荧光观察表明,该菌株的防病效果部分来自于拮抗菌和病原菌之间的空间竞争作用。试验中观察到芽孢杆菌在根基部及中部的定殖量大于根尖部,与 Benizir 等<sup>[1,19]</sup>的试验结果相一致,这应该是由该菌的迁移速度慢于根的生长速度所致。

一般来说,GFP 的高效表达会对转化菌株造成额外的代谢负荷,这种具有额外代谢负荷的菌体在自然界中和其他微生物进行生存竞争时可能会处于

不利的地位<sup>[20]</sup>。在本试验研究中,生防菌 Kct99 的荧光蛋白标记及其基因表达对其拮抗活性及防病效果未产生显著影响,而且质粒的遗传稳定性较好,能够满足一般作物一个生育期研究的需要。这为我们下一步对拮抗菌、病原菌及寄主植物之间生态关系的研究奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] 田 涛, 卞雪晨, 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.
- [2] Stuurman N. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad host range vectors to visualize rhizobia interacting with plants [J]. The American Phytopathological Society 2000, 13(11): 1163 – 1169.
- [3] 程洪斌, 刘晓桥, 陈红漫. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展 [J]. 上海农业学报, 2006, 22(1): 109 – 112.
- [4] 辛玉成, 秦淑莲, 李宝笃, 等. 枯草芽孢杆菌 X1V16 菌株制剂对苹果霉心病的防治及病原的抑制作用 [J]. 植物病理学报, 2000, 30(1): 66 – 70.
- [5] 赵 达, 刘伟成, 裘季燕, 等. 枯草芽孢杆菌 B03 对植物病原真菌的抑制作用 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(15): 4554 – 455.
- [6] 任大明, 张晓轩, 董 丹, 等. 拮抗菌株 Kct99 的鉴定及其抑菌活性研究 [J]. 生物技术通报, 2011(4): 153 – 157.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 等译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] 方中达. 植病研究法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [9] 潘争艳, 刘伟成, 裘季燕, 等. 放线菌 III-61 和 A-21 对蔬菜枯萎病和灰霉病的控制作用 [J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 92 – 97.
- [10] 田仁鹏, 康俊根, 耿丽华, 等. 甘蓝枯萎病抗性鉴定方法研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(4): 39 – 42.
- [11] Errampalli D, Leung K, Cassidy M B, et al. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms [J]. Journal of Microbiological Methods, 1999, 35: 187 – 199.
- [12] Zhao H, Thompson R B, Lockatell V, et al. Use of green fluorescent protein to assess urease gene expression by Uropathogenic *Proteus mirabilis* during experimental ascending Urinary tract infection [J]. Infection and Immunity, 1998, 66(1): 330 – 335.
- [13] 陈乃用. 枯草芽孢杆菌中质粒的稳定性问题 [J]. 微生物学通报, 1993, 20(4): 226 – 232.
- [14] 黄 曦, 许兰兰, 黄荣韶, 等. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2010(1): 24 – 29.
- [15] 倪长春. 杀菌微生物农药枯草杆菌的特性及开发现状 [J]. 世界农药, 2001, 23(3): 26 – 28.
- [16] Msadek T, Dartois V, Kunst F, et al. ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and Sporulation [J]. Mol Microbiol, 1998, 27(5): 899 – 914.
- [17] 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): 251 – 256.
- [18] 程洪斌, 刘晓桥, 陈红漫. 枯草芽孢杆菌防治植物真菌病害研究进展 [J]. 上海农业学报, 2006, 22(1): 109 – 112.
- [19] Benizri E, Baudoin E, Guckert A. Root colonization by inoculated plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Biocontrol Science and Technology, 2001, 11: 557 – 574.
- [20] Qazi S N A, Rees C E D, Mellits K H, et al. Development of GFP vectors for expression in *Listeria monocytogenes* and other low G + C gram positive bacteria [J]. Microbial Ecology, 2001, 41(4): 301 – 309.