

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

王志远¹ 吴兴兴¹ 吴毅歆² 毛自朝² 何月秋^{1,2}

1. 农业生物多样性应用技术国家工程研究中心, 昆明 650201; 2. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201

摘要 以质粒 pMarA 转入解淀粉芽孢杆菌植生亚种 B9601-Y2 菌株, 获得了卡那霉素抗性标记遗传稳定的菌株 Y2-pMarA。采用浇灌法、拌种法和浸根法接种大白菜, 并用浇灌法接种烟草, 观察菌株在大白菜和烟草根部的定殖与消长动态。结果表明: 通过 10 μg/mL 卡那霉素的 LB 平板和 PCR 方法, 证明标记菌株 Y2-pMarA 均能在植株根际、根表和根内定殖。在播种时浇灌大白菜 37 d 后, 在自然土处理中根际土、根表土和根内菌量分别为浇灌 7 d 后菌量的 94.31%、95.00% 和 84.75%, 在灭菌土中则分别为 75.26%、84.92% 和 177.74%; 在拌种处理大白菜时, 自然土处理中根际土、根表土和根内菌量分别为拌种 7 d 后菌量的 94.44%、95.27% 和 61.06%, 在灭菌土处理中则分别为 75.64%、90.91% 和 69.06%; 在浸根 10 min 后移栽, 标记菌株能在大白菜根际土壤中扩散和进入根内; 至移栽后 33 d, 自然土处理中根际土、根表土和根内菌株定殖密度分别为 6.28×10^5 、 9.54×10^5 和 4.69×10^3 cfu/g; 灭菌土处理中则分别为 6.97×10^5 、 1.12×10^6 和 1.02×10^4 cfu/g。

关键词 穿梭质粒; 标记菌株; 定殖; 生防菌株

中图分类号 S 482.2⁺92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0313-07

植物病害的生物防治是实现农业可持续发展的重要措施。有益微生物在作物根际定殖能力的强弱决定着其应用效果的高低, 检测微生物在作物根际和土壤中的消长规律是确定生防菌株防治潜力的重要依据^[1-3]。随着微生物分子生态学的进展, 特别是基因标记技术的应用已为生物农药的理论研究提供了有效手段^[4]。

芽孢杆菌 B9601-Y2(简称 Y2)是从小麦的根际分离到的 1 株有益菌, 现已通过分子技术将其鉴定为解淀粉芽孢杆菌植生亚种(*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*)^[5]。芽孢杆菌 B9601-Y2 菌株能促进植物生长和植株插条生根, 同时还能抑制真菌性、细菌性和线虫性病害。笔者利用适合在芽孢杆菌中复制与表达的穿梭质粒 pMarA, 通过电转化将其转入芽孢杆菌 B9601-Y2 菌株, 并以抗性基因标记分析 Y2 菌株在大白菜和烟草根部的定殖与消长动态, 旨在为研究该菌株防病促生长的作用机制和将其作为生物制剂的开发与应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

芽孢杆菌 Y2 菌株是由笔者所在实验室分离保存的菌株; 质粒 pMarA 由德国 Borriss 教授惠赠。试验用土取自云南农业大学实验农场, 类型为红壤。将土样过筛除去石块、枯草等杂物后装入花盆中(直径 30 cm, 高 15 cm); 另取部分土样于 121 °C 湿热灭菌 60 min, 再按同样方法装入花盆中。供试作物为大白菜(青岛 83-1)和烟草(云烟 85), 将种子表面经消毒和冲洗后, 吸去多余水分, 自然晾干备用。

1.2 质粒 pMarA 转化及转化子筛选

质粒 pMarA 的提取^[6]根据上海生工质粒试剂盒所提供的程序进行。参照 Wuenscher 等^[7]的电转化法, 利用基因电转化仪(Electrooperator 2510, Eppendorf)将质粒 pMarA 转入 Y2 菌株。用 500 μL 过夜培养的 Y2 菌液接种到 50 mL LBSP 培养基(1×LB, 250 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L 磷酸钾, pH 7.2)中, 菌株生长到指数生长期, 通过离心收集

收稿日期: 2011-04-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30660007)和科技部国际科技合作项目(2009DFA32360)

王志远, 博士研究生。研究方向: 植物病害生物防治。E-mail: yuan33441@sina.com

通讯作者: 何月秋, 博士, 教授。研究方向: 植物病害生物防治。E-mail: ynfh2007@163.com

细胞并用 SHMG 培养基 (250 mmol/L 蔗糖, 1 mmol/L HEPES, 1 mmol/L 氯化镁, 质量分数 10% 的甘油) 洗涤培养基中的盐分, 然后用 1 mL SHMG 重悬菌体。用 500 ng 质粒 (约 5 μ L) 加入到 100 μ L 上述悬浮细胞中, 混合并放置冰上 20 min。将混合液转入至预冷、灭菌的样品杯 (0.2 cm 电极间距) 中。电转化的条件为电压 1 750 V, 电容 25 μ F。转化后细胞悬浮于 900 μ L LBSP 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 振荡 2 h, 然后涂布于 LB 平板上 (含 10 μ g/mL 卡那霉素), 并于 37 $^{\circ}$ C 下过夜培养。

依据质粒 pMarA 中的卡那霉素抗性基因序列设计检测引物对 Kmpmar A1/2 (Kmpmar A1: 5'-TCCGTCGATACTATGTTATACG-3'; Kmpmar A2: 5'-TATGGACAGTTGCGGATGTAC-3'), 以 PCR 方法检测与确定转化子, 并以野生型菌株 Y2 为对照。

1.3 菌株质粒稳定性测定

参照钟晓东^[8]的方法进行。将 0.1% 过夜活化菌株, 接种无抗生素的 LB 液体培养基, 于 30 $^{\circ}$ C 下 200 r/min 培养 5 h, 再取样以 0.1% 接种无抗生素的 LB 液体培养基, 培养条件相同, 如此重复培养 50 h。然后涂布无抗生素 LB 平板, 随机选取 300 个克隆转入含 10 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板, 以抗性菌株所占百分比来计算菌株质粒的遗传稳定性。

1.4 标记菌株的接种

将标记菌株用 LB 培养液培养, 接种时菌体浓度为 1×10^7 cfu/mL。方法分浇灌法、拌种法和浸根法 3 种。浇灌法: 每盆播种 100 粒种子后, 在种子附近施入菌悬液 1 mL, 再覆盖厚约 1 cm 的土壤, 置于温室中培养; 拌种法: 将种子置于含 1% 甲基纤维素的菌悬液中拌匀, 晾干后播种, 每盆播种 50 粒; 浸根法: 幼苗长至 5 叶期时, 用菌液浸根 10 min, 再将植株移植到方盘中, 每盘 50 株。3 种接种方法均以液体培养基处理为对照, 重复 3 次。

1.5 定殖能力的测定

1) 大白菜。浇灌法与拌种法处理后 7 d (即自长出第 1 片真叶后) 开始取样, 此后每 3 d 取样 1 次, 共取样 11 次, 即播种后 7、10、13、16、19、22、25、28、31、34、37 d 取样调查根际土、根表土及根部组织; 浸根法在移栽后 3 d 开始取样, 此后每 3 d 取样 1 次, 共取样 11 次, 即分别于浸根处理后 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30、33 d 取样调查根际土、根表土及根部组织。取样时将大白菜植株轻轻地从土中拔

出, 各重复取 1 株, 共取 4 株。

2) 烟草。浇灌法处理后 10 d (即长出第 1 片真叶后) 开始取样, 每 5 d 取样 1 次, 共取样 7 次, 即播种后 10、15、20、25、30、35、40 d 取样调查根际土、根表土及根部组织。取样时将烟草植株轻轻地从土中拔出, 各重复取 1 株, 共取 4 株。

根际土: 取拔出的植株苗, 充分抖动植株, 收集抖落的土壤, 称质量后置于装有 50 mL 无菌水的三角瓶中, 摇床上 100 r/min 振荡 30 min。

根表土: 将采过根际土的植株根系剪下称质量, 置于装有 50 mL 无菌水的三角瓶中, 在摇床上 100 r/min 振荡 30 min 后取出, 用吸水纸吸尽根周围的水分后再称质量, 2 次质量之差即为根表土质量^[9]。

根内: 将称质量后的根系用 0.1% 升汞消毒 3~5 min, 分别用 20 mL 无菌水冲洗 3 次, 再用吸水纸吸尽根系表面水分后至研钵中充分磨碎。组织磨碎后用 20 mL 无菌水转入三角瓶中, 再用 10 mL 无菌水冲洗研钵, 一同转入三角瓶中, 共冲洗 3 次。

取处理好的土样或根组织的悬浮液, 按稀释平板法逐级稀释, 再分别移取样品 200 μ L 均匀涂布于卡那霉素 (10 μ g/mL) 的 LB 平板上, 于 30 $^{\circ}$ C 条件下培养 20 h 后, 分别统计平板上的菌落数。每个处理 3 次重复。定殖密度的计算公式:

定殖密度 (cfu/g) = (同一稀释梯度 3 次重复的平均菌落数 \times 稀释倍数) / 样品质量

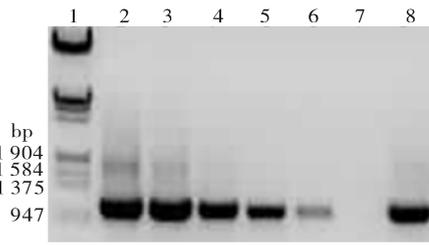
2 结果与分析

2.1 Y2 菌株转化子的获得

利用电转化法使质粒 pMarA 转化解淀粉芽孢杆菌 Y2 菌株, 并通过抗生素平板筛选转化子, 同时以 PCR 检测转化子的质粒和菌体 (图 1), 证实质粒 pMarA 成功地转化了 Y2 菌株。转化菌株命名为 Y2-pMarA, 即作为标记菌株。

2.2 质粒遗传稳定性的检测

将标记菌株 Y2-pMarA 在不含抗生素的 LB 上连续稀释培养 10 次, 每隔 5 h 取样涂布在不含抗生素的培养基上, 再随机挑取 300 个菌落于卡那霉素 LB 平板上检测。结果表明, 随着培养代数的增加, 稳定性下降。在 5 h 内稳定性为 100%, 10 h 为 99.67%, 至 50 h 稳定性仍达 90.67% (图 2)。按在实验室条件下芽孢杆菌分裂 1 代通常需要 20~30 min 计算, Y2-pMarA 菌株连续分裂 100~150 代, 其稳定性仍达 91%; 按在土壤中分裂 1 代所需



1: λ DNA marker (*EcoR* I + *Hind* III); 2: 阳性对照 (pMarA); 3, 4: 转化子质粒; 5, 6, 8: 转化子菌落; 7: 阴性对照 (B9601-Y2)。1: λ DNA marker (*EcoR* I + *Hind* III); 2: Positive control (pMarA); 3, 4: Plasmid from the transformants; 5, 6, 8: Transformant colonies; 7: Negative control (B9601-Y2)。

图 1 引物为 Kmpmar A1/2 转化子的 PCR 检测

Fig. 1 PCR detection of the transformants with primers Kmpmar A1/2

时间为 50~100 h 计算^[10], 如果 Y2-pMarA 菌株在土壤中能生存, 那么其中的质粒至少在 120 d 内是稳定的, 这一稳定性应能满足试验需要。

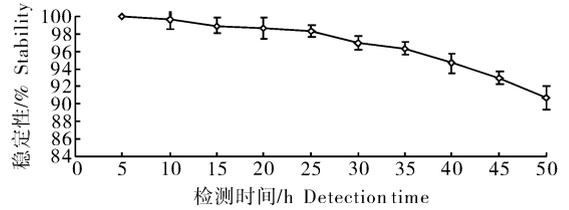


图 2 Y2-pMarA 菌株的质粒稳定性

Fig. 2 Stability of plasmid in strain Y2-pMarA

2.3 Y2-pMarA 菌株在大白菜根部的定殖

1) 浇灌法接种测定 Y2-pMarA 菌株在大白菜根部的定殖与消长动态。利用浇灌法接种处理的 Y2-pMarA 菌株在定殖的试验过程中表现为先上升后下降的趋势(表 1)。

表 1 浇灌法接种 Y2-pMarA 菌株在大白菜根际、根表和根内的定殖密度

Table 1 Colonization number of Y2-pMarA in rhizosphere, root surface and inner root of Chinese cabbage by drenching 10^4 cfu/g

播种后取样天数/d Sampling day post seeding	自然土 Natural soil			灭菌土 Sterilized soil		
	根内 Inner root	根际 Rhizosphere	根表 Root surface	根内 Inner root	根际 Rhizosphere	根表 Root surface
7	102.46	119.81	5.18	189.83	178.51	6.47
10	93.52	127.12	8.00	158.48	213.58	10.81
13	107.67	117.78	12.87	178.31	205.30	23.19
16	111.45	156.00	13.38	195.86	232.44	27.17
19	120.76	173.04	19.23	187.58	257.82	35.81
22	133.67	158.36	15.34	205.13	235.96	31.71
25	114.73	151.19	11.67	231.38	213.19	19.95
28	106.63	148.08	14.79	204.80	221.96	25.17
31	108.75	126.75	6.69	178.48	152.61	12.38
34	99.84	117.23	5.86	169.71	176.33	8.74
37	96.22	114.28	4.39	143.38	151.95	11.55

自然土处理中, 根表土在播种 19 d 后菌株定殖密度就达到最高水平, 为 1.73×10^6 cfu/g, 而根际土和根内则在 22 d 后分别达到 1.34×10^6 cfu/g 和 1.92×10^5 cfu/g; 灭菌土处理中, 根表土和根内的定殖密度也在 19 d 后达到最高水平, 分别为 2.58×10^6 cfu/g 和 3.58×10^5 cfu/g, 根际土到 25 d 后才达到 2.31×10^6 cfu/g。整个过程中根际土、根表土和根内均回收到菌株, 而且至 37 d 后菌量仍保持较高水平。在自然土处理中, 其定殖密度分别为 9.62×10^5 、 1.14×10^6 、 4.39×10^4 cfu/g, 分别达到第 1 次取样 7 d 后菌量的 94.31%、95.00% 和 84.75%; 在灭菌土处理中, 其定殖密度分别为 14.34×10^5 、 1.51×10^6 、 11.55×10^4 cfu/g, 分别达到第 1 次取样 7 d 后菌量的 75.26%、84.92% 和 177.74%。在整个过程中, 灭菌土处理中的菌量高于自然土处理。

2) 拌种法接种测定 Y2-pMarA 菌株在大白菜根部的定殖与消长动态。与浇灌法相比, 拌种法接种处理的菌株定殖量总体上略低些, 但变化趋势与浇灌法相似, 即先上升后下降(表 2)。在播种 19 d 后根表土与根内菌株定殖密度达到最高水平, 在灭菌土处理中分别为 3.18×10^5 cfu/g 和 3.80×10^4 cfu/g, 在自然土处理中分别为 2.13×10^5 cfu/g 和 1.89×10^4 cfu/g, 而自然土处理和灭菌土处理的大白菜根际土分别在播种 22 d 和 25 d 后菌株定殖密度才达到最高水平, 分别为 1.70×10^5 cfu/g 和 2.85×10^5 cfu/g。直至 37 d 后, 在自然土处理中, 根际土、根表土和根内的定殖密度仍达第 1 次取样 7 d 后菌量的 94.44%、95.27% 和 61.06%, 而在灭菌土处理中, 其菌量则为 75.64%、90.91% 和 69.06%。

表 2 拌种法接种 Y2-pMarA 菌株在大白菜根际、根表和根内的定殖密度

Table 2 Colonization number of Y2-pMarA in rhizosphere, root surface and inner root of Chinese cabbage by coating seeds 10^4 cfu/g

播种后取样天数/d Sampling day post seeding	自然土 Natural soil			灭菌土 Sterilized soil		
	根内	根际	根表	根内	根际	根表
	Inner root	Rhizosphere	Root surface	Inner root	Rhizosphere	Root surface
7	12.63	14.77	0.89	23.40	22.01	1.17
10	14.49	15.67	0.99	23.24	26.33	2.57
13	14.75	16.99	1.59	21.98	28.31	2.37
16	16.21	19.23	1.10	24.15	31.66	2.73
19	16.12	21.33	1.88	23.13	31.79	3.80
22	16.97	19.52	1.89	25.29	29.95	3.42
25	14.15	18.64	1.44	28.53	26.28	2.14
28	13.15	18.26	1.82	25.25	27.36	1.38
31	13.41	15.63	0.82	22.00	24.81	1.23
34	13.54	14.45	0.72	20.92	22.58	1.08
37	11.86	14.09	0.54	17.68	20.03	0.81

3) 浸根接种法测定 Y2-pMarA 菌株在大白菜根部的定殖与消长动态。与上述 2 种方法相比, 浸根法接种的根际与根表菌株定殖密度表现出不同的趋势, 即一直维持在较高的水平, 定殖动态变化不明显; 根内菌量相对偏少, 移栽后 12 d 才能检测到菌体, 其动态变化和浇灌及拌种相似, 即呈现先上升再下降的趋势(表 3)。自然土处理 24 d 后菌株定殖密

度达到最高水平, 为 1.58×10^4 cfu/g, 而灭菌土处理 15 d 后菌株定殖密度就达到最高水平, 为 3.16×10^4 cfu/g。至移栽后 33 d, 自然土处理的根际、根表与根内菌株定殖密度分别为 6.28×10^5 、 9.54×10^5 、 0.47×10^4 cfu/g, 灭菌土处理的根际、根表与根内菌株定殖密度则分别为 6.97×10^5 、 11.17×10^5 、 1.02×10^4 cfu/g。

表 3 浸根法接种 Y2-pMarA 菌株在大白菜根际、根表和根内的定殖密度

Table 3 Colonization number of Y2-pMarA in rhizosphere, root surface and inner root of Chinese cabbage by soaking root 10^4 cfu/g

移栽后取样天数/d Sampling day post transplanting	自然土 Natural soil			灭菌土 Sterilized soil		
	根内	根际	根表	根内	根际	根表
	Inner root	Rhizosphere	Root surface	Inner root	Rhizosphere	Root surface
3	91.83	93.76	0.00	90.83	85.80	0.00
6	81.00	99.49	0.00	89.90	92.25	0.00
9	79.22	92.18	0.00	83.50	94.01	0.00
12	72.69	96.09	0.33	80.68	97.14	2.40
15	73.76	93.42	0.56	81.87	105.41	3.16
18	75.18	99.94	1.04	78.12	102.76	2.80
21	74.83	94.93	1.05	83.06	107.11	1.76
24	69.54	91.89	1.58	77.19	103.68	2.22
27	70.93	99.20	0.72	78.73	111.93	1.09
30	65.11	97.75	0.63	72.28	110.29	0.77
33	62.76	95.44	0.47	69.66	111.69	1.02

2.4 Y2-pMarA 菌株在烟草根部的定殖

在烟草播种后, 浇灌 Y2-pMarA 菌悬液, 从第 1 次取样开始均能连续从烟草根际土、根表土回收标记菌株(表 4)。根内在灭菌土处理 20 d 和自然土处理 25 d 后才能回收到标记菌株。根际和根表的菌株定殖密度保持在 $1.84 \times 10^3 \sim 1.53 \times 10^4$ cfu/g 的水平, 根内保持在 $6.78 \times 10^2 \sim 4.04 \times 10^3$ cfu/g 的水平。

菌株在自然土和灭菌土中的定殖动态近似, 根际和根表在初期有较高的定殖密度, 随后出现短暂下降, 此后再上升, 后期则出现明显回落。至 40 d 后, 在自然土处理的根际土、根表土和根内菌株定殖密度分别为 3.64×10^3 、 2.54×10^3 、 0.68×10^3 cfu/g, 灭菌土处理的菌株定殖密度分别为 4.16×10^3 、 6.55×10^3 、 1.00×10^3 cfu/g。从总体定殖数量来看, 自然土中菌株数量均低于灭菌土。

表 4 浇灌法接种 Y2-pMarA 菌株在烟草根际、根表和根内的定殖密度

Table 4 Colonization number of Y2-pMarA in rhizosphere, root surface and inner root of tobacco by drenching

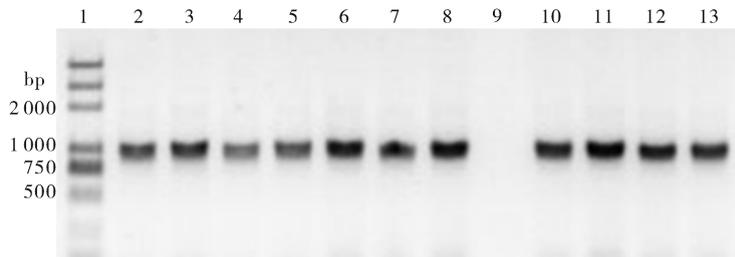
10³ cfu/g

播种后取样天数/d Sampling day post seeding	自然土 Natural soil			灭菌土 Sterilized soil		
	根内	根际	根表	根内	根际	根表
	Inner root	Rhizosphere	Root surface	Inner root	Rhizosphere	Root surface
10	15.41	9.46	0.00	22.02	12.51	0.00
15	7.50	6.55	0.00	8.99	8.70	0.00
20	10.23	6.54	0.00	9.49	9.56	1.24
25	2.85	13.61	1.05	11.34	14.12	1.04
30	1.84	15.32	1.13	6.74	12.41	3.05
35	5.20	7.09	4.04	8.82	13.02	2.26
40	3.64	2.54	0.68	4.16	6.55	1.00

2.5 回收菌体的检测与验证

从大白菜和烟草定殖试验中历次回收保存的菌株中,随机挑取部分菌株培养,其培养性状与野生型菌株无差异,部分回收菌株经 PCR 验证后,均能扩

增到与卡那霉素抗性基因大小一致的条带(图 3),即在抗性平板上获得的菌株,均为标记菌株 Y2-pMarA,证明采用抗性质粒转化野生型菌株 Y2 用于该菌株定殖研究是可靠的。



泳道 1: 2 000 plus marker; 2~8: 大白菜定殖回收菌; 9: 野生型菌株 Y2; 10~13: 烟草定殖回收菌。Lane 1: 2 000 plus marker; 2-8: Recovered strains of Chinese cabbage colonization; 9: Wild-type Y2; 10-13: Recovered strains of tobacco colonization.

图 3 大白菜和烟草定殖试验中回收菌的 PCR 检测

Fig. 3 PCR detection of recovered strains in colonization test of Chinese cabbage and tobacco

3 讨论

长期以来,芽孢杆菌的转化一直是困扰其遗传研究的一个难题。尽管有转化成功的报道,但转化的方法没有广泛适用性,这极大地制约了多种芽孢杆菌尤其是具有生防作用芽孢杆菌遗传转化研究的进展^[11]。本试验采用枯草芽孢杆菌的经典 Spizizen 转化方法^[12]、传统芽孢杆菌的 SP 培养基转化法和电转化法^[13-16]均未成功地转化 Y2 菌株。经过对转化方法不断地摸索和条件的优化,最终利用 Wuenschel 等^[7]电转化法成功获得 Y2 菌株的转化菌株 Y2-pMarA,表明 Y2 菌株具有特殊性。Y2-pMarA 菌株的获得有利于 Y2 菌株的遗传操作和定殖研究。

基因标记法是将外源基因即标记/报告基因引入到目标菌株中,并在菌体中能稳定遗传,通过检测基因表达产物来监测细菌的分布并区别于其他微生物。生防菌在植株根围定殖常用的是利用利福平诱导抗性菌株,但该方法需要逐步提高利福平的诱导浓

度,不但耗时较长,而且获得的抗性菌株稳定性较差^[17-18]。本试验利用质粒载体上的卡那霉素抗性基因作为筛选标记,排除土壤中杂菌的干扰,分析了生防菌 Y2 在根部的定殖动态,且具有较好的重复性。

随着植物促生根际细菌研究的兴起,越来越多优良性状的菌株从实验室研究阶段进入大田应用阶段。然而在自然条件下,时有应用效果不佳的情况发生,其原因是存在土著微生物的竞争或其他不良环境因子的影响^[19-20],因此,定殖能力是影响植物根际促生细菌能否在大田应用中取得良好效果并最终开发为生物农药的重要因素之一。本试验采用携带卡那霉素抗性基因的质粒 pMarA 成功转化具有应用与开发前景的野生型菌株 Y2,且 Y2 菌株转化子与野生型菌株培养性状没有差异,PCR 扩增也证明转化是成功的,在实验室证明其分裂 100~150 代后,该质粒仍保持 91% 的稳定性;在温室盆栽试验中,即使在浇灌后 37 d,大白菜根围土、根表土和根内菌量在自然土处理中仍达到第 1 次取样 7 d 后菌量的 94.31%、95.00% 和 84.75%,在灭菌土处理中则分

别为 75.26%、84.92% 和 177.74%，证明 Y2 菌株在大白菜根围、根表和根内有很好的定殖能力，并具有良好的促进生长和防治病害的作用。

根际细菌引入后，能否在作物根部定居、繁殖，并同根围固有微生物竞争营养和空间位点，决定了其在根部的存活能力，从而决定其生防能力^[21]。研究 Y2 菌株的定殖、消长规律，不仅有助于了解其应用范围和效果，也有利于揭示其与土壤环境之间关系。本试验结果表明，Y2 菌株的定殖因接种方式和时间的变化而变化，其中大白菜浇灌与拌种方式接种中，菌株定殖密度均随时间延长而先增长随后降低，而浸根接种中 Y2 菌株定殖密度在根际土和根表土一直保持较高水平，证明 Y2 菌株不仅能停留在根表面，且能在根围中扩散，这也是该菌株能较好定殖的原因之一。与播种时浇灌及拌种处理相比，浸根后 12 d 才检测到根内的 Y2 菌株存在，这从另一方面证明菌株能在大白菜根内定殖，且经根外进入有一个时间过程，播种时浇灌和拌种处理，根内部较早出现菌体的原因可能与种子萌发、菌体从根毛组织易于进入根内有关。Y2 菌株能在根外和根内定殖可能与其具促进植物生长的能力有关^[22]。从浇灌、拌种和浸根 3 种施用方法来看，Y2 菌株进入根内的速度存在差异，浸根处理菌株进入根内较慢，因此，在作为农药施用时应早不宜迟。

Y2 菌株能在大白菜和烟草根围、根表和根内定殖的结果表明，该菌株具有较广泛的适应性，但其是否在其他植物根围也有很好的定殖能力还有待进一步研究证实。从定殖群体数量在自然土中较灭菌土中少的结果分析表明，Y2 菌株定殖能力还受土壤中微生物种群的影响，因而在农田应用时，为了更好地发挥其促进生长和防治病害的作用，宜适当提高用菌量或增加施用次数。

参 考 文 献

- [1] 黄金玲, 刘志明, 陆秀红, 等. 根际细菌 9 个菌株对南方根结线虫的盆栽防效[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(6): 700-703.
- [2] 祝明亮, 张克勤, 李天飞, 等. 烟草根际厚孢轮枝菌生态效应研究[J]. 微生物学通报, 2002, 29(2): 4-8.
- [3] KIOEPPEL J W. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacterial [J]. Can J Microbiol, 1992, 38(6): 667-672.
- [4] 韦兵, 唐欣响. 假单胞菌 JK45 菌株 *lux* 基因标记及在土壤中的存活[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1524-1528.
- [5] BORRISS R, CHEN X, RUECKERT C, et al. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM7T and FZB42: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on their discriminating complete genome sequences [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2011, 61(8): 1786-1801.
- [6] BRETON Y L, MOHAPATRA N P, HALDENWANG W G. *In vivo* random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLBI, a mariner-based transposon [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1): 327-333.
- [7] WUENSCHER M D, KÖHLER S, BUBERT A, et al. The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity [J]. J Bacteriol, 1993, 175(11): 3491-3501.
- [8] 钟晓东. 锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)基因在野生型芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)中的转化和表达[D]. 北京: 中国农业大学图书馆, 1998.
- [9] 赵秀香. 烟草黑胫病多功能生防菌剂的研制[D]. 沈阳: 沈阳农业大学植物保护学院, 2006.
- [10] HECKER M, VÖLKER U. General stress proteins in *Bacillus subtilis* [J]. FEMS Microbiol Ecol, 1990, 74: 197-214.
- [11] 信珊珊, 祁高富, 朱发银, 等. 1 株解淀粉芽孢杆菌发酵条件的优化及其对油茶炭疽病的防效[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 411-415.
- [12] SPIZIZEN J. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate [J]. Proc Nat Acad Sci, USA, 1958, 44: 1072-1078.
- [13] 唐雪明, 邵蔚蓝, 王正祥, 等. 地衣芽孢杆菌感受态细胞的形成及高效电转化[J]. 生物技术, 2002, 12(4): 13-15.
- [14] 彭清忠, 彭清静, 张惟村, 等. 短芽孢杆菌的转化方法[J]. 吉首大学学报: 自然科学版, 2004, 25(4): 35-38.
- [15] 徐敏, 马骏双, 王正祥. 高渗透压对细菌电转化率的影响[J]. 无锡轻工大学学报, 2004, 23(4): 98-100.
- [16] 张献芳, 文凯, 逯晋忠, 等. 2 株内生细菌在油菜体内的定殖、促生长及抗虫性检测[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(2): 143-147.
- [17] 张淑梅, 王玉霞, 李晶, 等. 基因标记枯草芽孢杆菌 BS-68 在黄瓜上定殖[J]. 生物技术, 2006, 16(4): 73-74.
- [18] 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.
- [19] KLOEPPEL J W, SCHROTH M N, MILLER T D. Enhanced plant growing by siderophores produced by plant growing promoting rhizobacteria [J]. Nature, 1980, 286: 885-886.
- [20] 杜立新, 冯书亮, 曹克强, 等. 枯草芽孢杆菌 BS-208 和 BS-209 菌株在番茄叶面及土壤中定殖能力的研究[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(6): 78-82.
- [21] 郭荣君, 刘杏忠, 杨怀文, 等. 芽孢杆菌 BH1 防治大豆根腐病的效果及机制[J]. 中国生物防治, 2003, 19(4): 180-184.
- [22] 刘拴成, 杨进成, 马丽华, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 提高玉米生长和产量的效应[J]. 玉米科学, 2010, 18(6): 28-32.

Resistance genes labeling and colonization ability of a biocontrol agent B9601-Y2 of *Bacillus amyloliquefaciens* in crop rhizospheres

WANG Zhi-yuan¹ WU Xing-xing¹ WU Yi-xin² MAO Zi-chao² HE Yue-qiu^{1,2}

1. National Engineering Center of Agricultural Biodiversity, Kunming 650201, China;

2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract The kanamycin-resistant labeling strain Y2-pMarA, which has a good stability of genetics, was gained by electrotransformation of shuttle plasmid pMarA into *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2. Chinese cabbage was inoculated by drenching, coating seeds, soaking root and tobacco by drenching. The results show as follows: LB agar plate containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of kanamycin and PCR proved that Y2-pMarA could colonize in rhizosphere soil, root surface and inner root. After seeding for 37 d, the Chinese cabbage, under the natural soil condition, colonization numbers of rhizosphere soil, root surface, and inner root of natural soil were 94.31%, 95.00% and 84.75% of seeding for 7 d respectively; the corresponding ratios in sterilized soil were 75.26%, 84.92% and 177.74% respectively. In the Chinese cabbage with coating seeds, the ratios of colonization numbers of rhizosphere soil, root surface, and inner root of natural soil were 94.44%, 95.27% and 61.06% of seeding for 7 d respectively, while they were 75.6%, 90.9% and 69.1% in sterilized soil respectively. By transplanting Chinese cabbage seedlings soaked for 10 min, Y2-pMarA strain could expand into the soil and enter the roots of the plant. After transplanting for 33 d, the colonization density in the rhizosphere soil, root surface and inner root in the natural soil were 6.28×10^5 , 9.54×10^5 and 4.69×10^3 cfu/g respectively; while the corresponding density were 6.97×10^5 , 1.12×10^6 and 1.02×10^4 cfu/g in sterilized soil respectively.

Key words shuttle plasmid; labeling strain; colonization; biocontrol agent

(责任编辑:陈红叶)