植物营养与肥料学报 2017, 23(5): 1276–1285
Journal of Plant Nutrition and Fertilizer
doi: 10.11674/zwyf.17078
http://www.plantnutrifert.org

钩状木霉 ACCC31649 的 GFP 标记及其对辣椒定殖和促生作用

赵兴丽[1]，陶 刚[2*]，赵玳琳[2]，卯婷婷[2]，王 廿[2]，顾金刚[3*]
（1 贵州师范大学生命科学学院，贵阳 550000；2 贵州省植物保护研究所，贵阳 550006；
3 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所，北京 100081）

摘要:【**目的**】旨在建立农杆菌介导的绿色荧光蛋白 (GFP) 基因转化钩状木霉 (*Trichoderma hamatum*) ACCC 31649 的技术方法，筛选遗传稳定的 GFP 标记转化子，并研究该菌株在辣椒植株中定殖和对辣椒的促生作用，为进一步阐明木霉在辣椒根际定殖及其与辣椒病原菌在辣椒根际和植株中的定殖、互作和生防作用奠定基础。【**方法**】通过根癌农杆菌介导的遗传转化方法筛选遗传稳定的 GFP 标记转化子，通过灌根接种方法和组织切片的水玻片荧光观察研究了钩状木霉在辣椒植株中定殖过程和对辣椒的促生作用。【**结果**】获得了遗传稳定 GFP 标记的钩状木霉转化子。荧光显微观察表明，辣椒根、茎、叶组织中都检测到 GFP 标记菌株的定殖。标记菌株首先在根部定殖，然后通过根部维管束逐步定殖到茎和叶片组织中。野生型菌株和 GFP 标记菌株灌根接种 4 叶期辣椒幼苗，30 天后，GFP 标记菌株与水处理对照相比，辣椒的株高增长 13.5%，根长增长 16.2%，鲜重和干重分别增加了 43.8% 和 45.3%，而且野生型菌株与 GFP 标记菌株对辣椒的促生作用没有显著差异。【**结论**】钩状木霉能够在辣椒植株根、茎和叶组织中定殖，并且对辣椒具有显著的促生作用。同时，GFP 标记的钩状木霉将在进一步阐明该菌株在辣椒根际定殖及其对病原菌拮抗和互作研究中发挥重要作用。

关键词: 绿色荧光蛋白；遗传转化；钩状木霉；辣椒；促生作用；定殖

GFP-labeled transformation of *Trichoderma hamatum* ACCC31649 and its promotion on colonization and growth of pepper plants

ZHAO Xing-li[1], TAO Gang[2*], ZHAO Dai-lin[2], MAO Ting-ting[2], WANG Nian[2], GU Jin-gang[3*]
(*1 Guizhou Normal University, Guiyang 550000, China; 2 Guizhou Institute of Plant Protection, Guiyang 550006, China; 3 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, CAAS, Beijing 100081, China*)

Abstract:【**Objectives**】The green fluorescent protein (GFP) gene was transferred into *Trichoderma hamatum* ACCC31649 by the *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. The growth-promoting effect and the colonizing patterns in pepper plants of this strain were investigated in this paper, which would provide a technical basis for the research of the rhizosphere colonization of *T. hamatum* in pepper plants and biocontrol mechanism of antagonistic fungus against pathogen.【**Methods**】The *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation was used to select the GFP-labeled strain *T. hamatum*-GF21 which inherited stably, and the inoculation of *T. hamatum* by pouring root treatment and the observation of water slides of pepper tissue sections by fluorescence microscopy were used for the growth- promoting effect of pepper plants and its colonizing patterns.【**Results**】The stable GFP-labeled strain *T. hamatum*-GF21 was obtained. Fluorescence microscopy observation confirmed that the GFP-labeled strain *T. hamatum*-GF21 colonized in the roots, stems and leaves of the pepper. It colonized on the

收稿日期：2017–03–03　　**接受日期**：2017–03–22　　**网络出版日期**：2017–06–01
基金项目：贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金（黔科合人字〔2015〕27 号）；贵州省科学技术联合基金（黔科合 LH 字〔2015〕7082 号）；贵州农科院专项（黔农科院院专项〔2016〕029 号）；贵州省农科院自主创新能力项目（黔农科院自主创新科研专项字〔2014〕002〕资助。
作者简介：赵兴丽（1989—），女，贵州六盘水人，硕士研究生，主要从事植物真菌病害生物防治研究。
E-mail：18786037305@163.com。* 通信作者 E-mail：ttg729@sina.com；gujingang@caas.cn

roots firstly and then moved to stems and leaves through the vascular bundle of the roots. After 30 days of pouring root treatment in the four-leaf pepper seedlings by the wide strain and the GFP-labeled strain *T. hamatum*-GF21 separately, the GFP-labeled strain *T. hamatum*-GF21 increased the pepper height by 13.5%, root length by 16.2%, fresh weight by 43.8% and dry weight by 45.3% respectively, compared with the water control. There is no significant difference between the wide strain and the GFP-labeled strain *T. hamatum*-GF21 in the effect on the plant growth promoting.【**Conclusions**】The GFP-labeled strain *T. hamatum* can colonize in the roots, stems and leaves of the pepper, and show a significant growth-promoting effect on pepper plants. Therefore, the GFP-labeled strain *T. hamatum*-GF21 can be used on the research of the rhizosphere colonization in pepper plants and the biocontrol mechanism between pathogen and its antagonistic fungus.

Key words: green fluorescent protein; genetic transformation; *Trichoderma hamatum*; pepper seedling; plant growth-promoting; colonization

木霉菌（*Trichoderma* spp）是自然界广泛分布的具有较高生防应用价值的真菌类群。木霉菌对许多作物具有较好的防病效果，2014 年尹大川等研究表明，绿木霉 (*Trichoderma virens*) 对樟子松 (*Pinus sylvestris*) 的枯梢病 (*Sphaeropsis sapinea*)、杨树 (*Populus* L.) 的烂皮病 (*Cytospora chrysosperma*) 以及由立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 和尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 引起的苗木立枯病具有较好的防治效果[1]；长枝木霉 (*Trichoderma longibrachiatum*) 对黄瓜枯萎病[*Fusarium oxysporum* (Schl.) *f.sp cucumerinum* Owen][2]、绿色木霉 (*Trichoderma viride*) 对香蕉枯萎病 (*Fusarium oxysporum* f.sp.cubense, Foc) 等都具有明显的防治作用[3]。木霉也能够促进植物的生长。哈茨木霉 (*Trichoderma harzianum*) 能够促进茄子 (*Solanum melongena*) 幼苗[4]、辣椒 (*Capsicum annum*)[5]和番茄 (*Lycopersicon esculentum*)[6]等植物生长，深绿木霉 (*Trichoderma aureoviride*) 对白三叶草 (*Trifolium rephens*) 等具有明显的促生作用[7]。目前的研究结果表明，木霉可能的促生机制包括：1) 木霉可产生植物生长调节剂，对外源植物激素起到双向调节的作用[8–10]；2) 木霉能抑制或降低植物根际周围的有害菌群产生的有利于自身生长但对植物生长有抑制作用的化合物[11–12]；3) 木霉能够产生有机酸、螯合剂、还原酶等，增加植物对养分的利用率从而促进植物的生长[13–14]。

近年来，农杆菌介导的遗传转化方法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation，ATMT) 被广泛用于真菌的菌种改良、基因功能鉴定和基因标记与克隆等研究[15]，它具有转化效率高[16]，转化受体广泛（如孢子、菌丝、子实体等真菌组织可作为转化受体[17]），T-DNA 单拷贝随机插入，能够形成遗传稳定的转化子等特点[18–19]。由于不需要对样品进行复杂处理，通过绿色荧光蛋白 (GFP) 标记的菌株在活细胞状态下即可以进行实时观察，使其在植物与微生物相互作用的研究中得到广泛的应用，例如 Luc 等[20]利用 GFP 标记，观察发现一种内生细菌在水稻的根系表面和茎组织细胞等部位定殖；Nicole 等[21]分别利用红色荧光蛋白 (RFP) 和 GFP 标记研究了丛枝菌根真菌 (AMF) *Glomus intraradices* 在植物根组织中的定殖。

钩状木霉 (*Trichoderma hamatum*) ACCC31649 是一株具有生防潜力的优良专利菌株 (专利号：ZL2013 10023319.1)，前期研究表明该菌株具有显著促进黄瓜生长的特性。其它研究也表明钩状木霉能够产生内切几丁质酶从而有效地抑制辣椒白绢病 (*Sclerotium rolfsii* Sacc.)[22]，木霉菌（*Trichoderma parareesei* T6）莽草酸途径影响木霉菌对植物抗性的诱导和植物耐盐性[23]。本研究选择 GFP 基因作为标记基因，利用 ATMT 方法建立钩状木霉的遗传转化体系，获得稳定遗传的 GFP 标记转化子，并研究野生型和 GFP 标记的钩状木霉在宿主组织中的侵染和定殖过程及对辣椒的促生作用，为进一步研究钩状木霉在辣椒根际土壤的存活、定殖及其与病原菌的互作提供重要的技术和手段。

1　材料与方法

1.1　试验菌株与根癌农杆菌质粒

供试钩状木霉菌株 (*T. hamatum*'ACCC 31649) 由中国农业科学院农业微生物菌种保藏中心提供。根癌农杆菌 GFP 基因表达载体质粒 EGFP-PSK2251[18]由美国宾夕法尼亚州立大学 (The Pennsylvania State University) Kang 教授实验室构建，并同意授权中国科学院微生物所真菌学国家重点实验室刘杏忠研究员惠赠。

1.2　GFP 基因的转化

根癌农杆菌介导 (ATMT) 遗传转化方法参照

Mullins *et al*.的 ATMT 介导的 GFP 转化方法进行[18]。

1.2.1 钩状木霉对潮霉素 B 敏感性测试　潮霉素 B 浓度梯度分别为 15、25、50、75 和 100 μg/mL，不加潮霉素 B 的培养平板为对照处理，每个处理设 5 个重复，28℃ 暗培养，6 d 后，观察记录结果，确定潮霉素 B 对野生菌株的合适敏感浓度。

1.2.2 钩状木霉细胞核数观察　荧光染料及配制：1）荧光染料 1 制备　称取 DAPI (4′, 6-diamidine -2-phenylindole dihydrochloride, Roche)，用适量无菌超纯水溶解调整浓度为 50 μg/mL 制备的母液，于 –620℃ 下保存备用。使用时用无菌水稀释成 1 μg/mL 的染色液[24]；2）荧光染料 2 制备　将 1 g/L 的荧光增白剂溶液卡氏白 (Calcoflour white，Sigma) 用无菌水稀释至终浓度为 1 μg/mL 使用[25]；FAA 固定液 (100 mL) 为 50% 乙醇 90 mL、醋酸 5 mL、甲醛 5 mL。

样品的荧光染色处理：染色方法参照并改进胡晓棣等的 DAPI 和 Calcoflour white 双重染色的方法[26]。将一盖玻片放于载玻片上，在盖玻片中央滴加一滴孢子悬液，微波炉加热 30 sec (LG 烧烤型 WD800 (MG-5520M) 800 W)，于超净台风干，再水洗 2 次，加 FAA 固定液 (或将待观察材料直接浸入 FAA 固定液中) 固定 1～2 h，50% 乙醇冲洗 2 次，加 100 μL DAPI 染色液 (1 μg/mL)，室温黑暗放置 30 min，加 100 μL Calcoflour white 染色液 (1 μg/mL)，室温黑暗放置 10 min，水冲洗 2～3 次。最后将盖玻片的观察材料的一面加微量水并避免气泡，反转倒置于载玻片上，指甲油封片。选择 340～488 nm 波长激发光与发射光进行荧光显微观察。

1.2.3 GFP 基因的遗传转化　菌株 ACCC31649 孢子液制备：转接木霉菌株于 PDA 平板，28℃ 培养 6 天左右，用适量无菌水洗培养平板，经 4 层灭菌擦镜纸过滤掉菌丝，取 2 mL 用于血球计数板计算孢子数目，将孢子悬液浓度调到 10^7 spores/mL。

根癌农杆菌菌株的活化和诱导培养：从–80℃ 取出，冻融，在 50 ng/mL 卡那霉素的 YEB 培养平板上划线，28℃ 暗培养 2 天，挑取单菌落接种于 1 mL 的 MM 液体培养基中，同时加入 2 μL 的 25 μg/mL 卡那霉素，28℃ 暗培养 2 天，取 100 μL 活化的农杆菌液于 900 μL 的诱导培养液 (IM) 中，同时加入 2 μL 的卡那霉素 (50 μg/mL) 和 4 μL 的 0.1 mol/L 乙酰丁香酮 (AS)，28℃，140 r/min，黑暗条件下摇菌 10 h，使农杆菌菌液 OD_{600} 达到 0.6 左右。

MM 培养液、IM 诱导液及共生培养基配方及配制参照王梅娟等方法[27]进行。

根癌农杆菌与真菌共培养及遗传转化：取 100 μL 的农杆菌菌液和 100 μL 的孢子液均匀混合，涂布于共生培养平板[18]上，25℃，黑暗条件下培养 60 h 后，将共培养物用 2 mL 无菌水洗涤，取 200 μL 过滤液涂布于含有潮霉素 B (50 μg/mL)、噻孢霉素 (30 μg/mL) 和利福平 (50 μg/mL) 的 PDA 平板上，风干后覆盖一层相同抗生素的 PDA 培养基[28]。每天观察检查，待平板上出现菌落时镜检，挑取有荧光的转化子于潮霉素 B (50 μg/mL) PDA 平板上培养。

1.2.4 遗传稳定转化子的筛选和 PCR 验证　将挑取的转化子在潮霉素 B (50 μg/mL) PDA 平板连续转接 5 代，再接种于不含潮霉素 B 的 PDA 平板上，培养 5 天左右 (长满平板并产孢) 进行单孢分离。体视镜视野下，用酒精灯灼烧的注射器针头挑取菌落菌丝于 1mL 灭菌水的 1.5 mL EP 管中，充分混匀，以挑取次数设置孢子浓度梯度，一般设挑一次和两次的两个梯度。再用灭菌的胶头滴管吸取孢子悬液滴于皿底划有网格线并加有链霉素 (50 μg/mL) 的 2% 的水琼脂培养基 (WA，2 g 琼脂粉，100 mL 蒸馏水) 平板上，室温静置培养 15 h，在体视镜下，用注射器针头将视野中萌发的单个孢子挑取接种到潮霉素 B (50 μg/mL) 的 PDA 平板，28℃，黑暗培养 1～2 天，镜检，保留强荧光的转化子，再重复 4 次上述单孢分离过程，筛选得到遗传稳定的 GFP 标记转化子。筛选保留 10 个遗传稳定的转化子。

将野生型菌株和转化子接种 PDA 平板上培养一周左右，刮取菌丝提取基因组 DNA，以基因组 DNA 为模板和特异性引物 Hmbf1 (5′-CTGTCGAGAAGTTTCTGATCG-3′) 和 Hmbr1 (5′-CTGATAGAGTTGGTCAAGACC-3′) 扩增潮霉素标记基因片段进行验证[29]。扩增反应条件为 95℃ 预变性 3 min，95℃ 30 s，62℃ 45 s，72℃ 60 s，进行 35 个循环，72℃ 10 min。

1.2.5 钩状木霉的生物学特性观察测定　菌落及菌丝和孢子形态：在 PDA 平板上活化培养钩状木霉野生型菌株 ACCC31649 及 10 个筛选的稳定转化子，用打孔器取菌落边缘生长的菌丝块，接种于 90 mm PDA 平板中央，以野生型菌株 ACCC31649 为对照，28℃ 黑暗培养 6 天左右，记录其菌落形态，并制片，通过光学显微镜观察形态学特征。

生长速率测定：以钩状木霉野生型菌株 ACCC31649 为对照处理，选择稳定转化子 ACCC31649-GF21 测定菌落的生长速率，每个处理 5 个重复，28℃，黑暗培养，采用十字交叉法测量菌落直径。

生物量的测定：参照陈美娟[30]的方法进行。以钩状木霉野生型菌株 ACCC31649 为对照处理，每个处理 5 次重复。在 PDA 平板 (Φ = 90 mm) 上铺一层灭菌的玻璃纸，将活化的菌株接种菌丝块 (Φ = 5 mm) 于玻璃纸中央，28℃，培养 7 d，从玻璃纸上去除接种的菌丝块，刮取培养物，于电子天平上称量菌丝鲜重，然后在 60℃ 烘箱中烘烤 6 h，彻底去除水分，测量干重。

产孢量的测定：以钩状木霉野生型菌株 ACCC 31649 为对照处理。将菌丝块接种到 PDA 平板上，28℃ 黑暗培养 7 d，先加入 3 mL 灭菌蒸馏水，用灭菌涂布棒轻轻刮取培养基表面的菌丝，经 4 层擦镜纸过滤，再用 1 mL 灭菌蒸馏水冲洗过滤纸，收集分生孢子，用血球计数板测量分生孢子液浓度，每个处理 5 次重复。

1.3　野生型菌株与 GFP 标记菌株对辣椒促生作用

挑选子粒饱满、大小均匀的辣椒种子 (中椒 6 号，中国农业科学院蔬菜花卉研究所选育)，表面消毒 (3%NaClO，1 min；75% 酒精，1 min)。将消毒后的种子均匀平铺在铺有灭菌纱布的保鲜盒中，覆盖一层灭菌纱布，加入适量 (纱布湿润即可) 的无菌水，密封、28℃ 黑暗下催芽。待种子冒白芽后播种于装有灭菌营养土的育苗钵中，长至四叶一心时进行木霉灌根接种处理。

将野生菌株 ACCC31649 于 PDA 平板上培养 6 d 左右，加无菌水制成分生孢子悬浮液，血球计数板计数调整浓度为 1×10^7 spores/mL。取 2 mL 分生孢子液于 120 mL PDB 三角瓶中，28℃，150 r/min 摇瓶培养 6 天，4 层灭菌滤纸过滤，制备浓度为 1×10^7 spores/mL 孢子液。每株辣椒幼苗接种 15 mL 孢子液于根围，以无菌水为对照处理，每个处理设 16 个重复，于 26℃、14 h 光照/10 h 黑暗交替培养 30 d，测量辣椒根长、株高、鲜重、干重。计算菌株对辣椒幼苗的促生率[31]：

$$\text{促生率} = \frac{\text{生防菌处理组} - \text{对照处理组}}{\text{对照处理组}} \times 100\%$$

1.4　GFP 标记菌株在辣椒组织中的定殖

按照 1.3 的方法在辣椒幼苗根围接种 GFP 标记菌株 ACCC31649-GF21，26℃，14 h 光照/10 h 黑暗交替培养，每隔 24 h 取辣椒根、茎和叶，徒手切片，制成水玻片，荧光显微镜下观察菌株在辣椒各组织中的定殖情况。

1.5　数据统计与分析

数据采用 DPS 7.05 软件进行方差分析，并用 LSD 法比较各处理间的差异显著性 (P=0.05) 。

2　结果与分析

2.1　钩状木霉的遗传转化

2.1.1　钩状木霉 ACCC31649 对潮霉素 B 的敏感性　钩状木霉 ACCC31649 在不同浓度的潮霉素平板，28℃ 培养 4 d。当潮霉素 B 浓度在 50 μg/mL 及以上时 (图 1)，ACCC31649 菌丝不能生长。因此，本研究采用 50 μg/mL 的潮霉素 B 作为筛选转化子的适宜浓度。

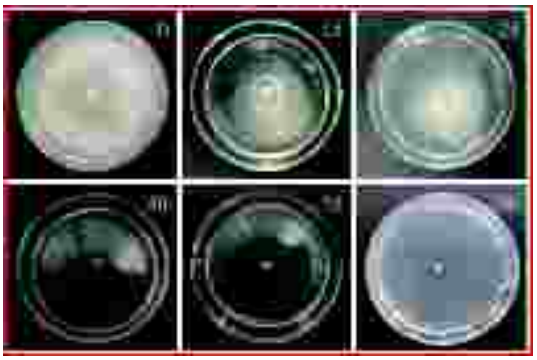

图 1　不同潮霉素 B 浓度 (μg/mL) 对钩状木霉 ACCC 31649 的生长抑制

Fig. 1　Inhibition of different concentrations of hygromycin B (μg/mL) on mycelium growth of *T. hamatum* ACCC31649

2.1.2　细胞核染色及观察　通过 DAPI 染色液和 Calcoflour white 染色液对钩状木霉细胞核进行组合染色后，在 345～488 nm 发射波长范围进行荧光显微观察，由图 2 可清楚观察到钩状木霉分生孢子为单核细胞。

2.1.3　钩状木霉转化子的筛选　将选择性培养基上长出的单孢菌落挑出接种于含潮霉素 B (50 μg/mL) 的 PDA 培养基上，5 天后荧光检测并挑取边缘菌丝接种于含潮霉素 B 的 PDA 培养基上，这样重复操作 5 次初步得到 GFP 标记的转化子。从上述转化子中挑选出 10 个具有强绿色荧光的转化子，每一个转化子分别进行 5 代的单孢分离培养，最终保留 10 个能够稳定遗传的 GFP 标记转化子 (图 3)。

转化子 PCR 验证：分别选取 2 个 GFP 标记转化子和野生型菌株的基因组 DNA 做为模板，特异性引物 Hmbf1 和 Hmbr1 扩增潮霉素标记基因片段进行验证。扩增产物凝胶电泳结果，其条带在 750 bp 左右 (图 4)，与预期目标片段大小一致。

2.2　野生型和转化子的菌落、菌丝和孢子的形态特征

野生型钩状木霉 ACCC31649 菌落多为基内菌

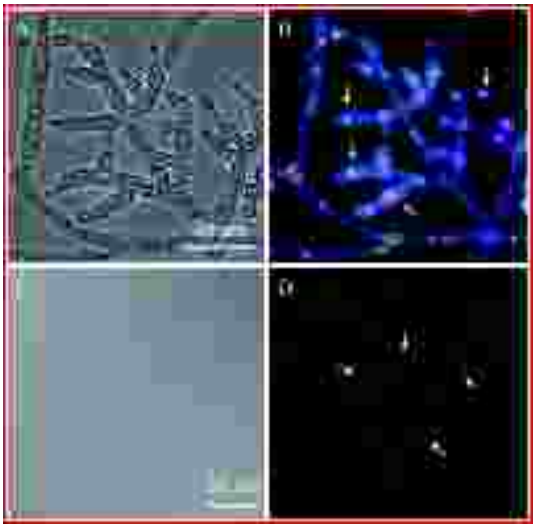

图 2 ACCC31649-GF21 在辣椒植株中的定殖

Fig. 2 Colonization of the ACCC31649-GF21 in the pepper plants

[注（Note）：A—明场下的野生型菌株 ACCC31649 的菌丝；B，D—DAPI 和卡氏白荧光染色图；C—明场下的野生型菌株 ACCC31649 的分生孢子；图中箭头示细胞核。A—Hyphae of *T. hamatum* ACCC31649 under bright field; B, D—DAPI and Calcoflour white stained epifluoresence microphotograph; C—Conidia of *T. hamatum* ACCC31649 under bright field; The arrows indicate nucleus.]

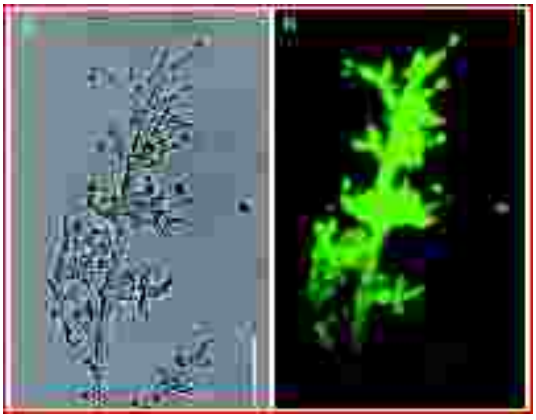

图 3 钩状木霉 ACCC31649-GF21 的 GFP 荧光蛋白表达 (标尺 25 μm)

Fig. 3 Expression of GFP fluorescent proteins in *T. hamatum* ACCC31649-GF21 (bar 25 μm)

[注（Note）：A— 明场下的 GFP 标记菌株 ACCC31649-GF21 的菌丝和分生孢子; B—紫外激发光下的 GFP 标记菌株 ACCC31649-GF21 的菌丝和分生孢子。 A— Hyphae and conidia of *T. hamatum* ACCC31649-GF21 under bright field; B— Hyphae and conidia of *T. hamatum* ACCC31649-GF21 under fluorescence microscope.]

丝，少量气生菌丝，且气生菌丝呈卷毛状，白色至灰色，分生孢子产生于致密的垫状或者半球形的产孢簇中，产孢簇表面呈绒毛状，初期为白色，渐变为暗绿色，背面暗灰色；ACCC 31649-GF21 菌落基

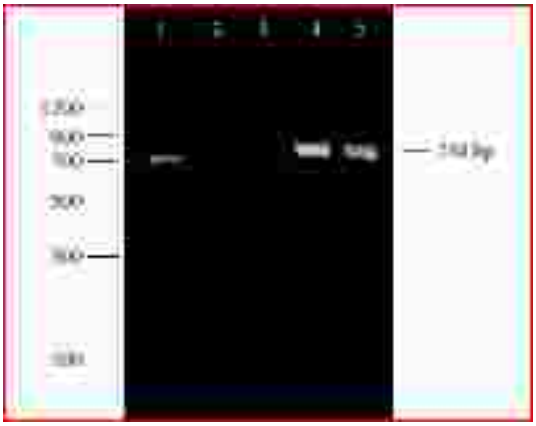

图 4 钩状木霉 ACCC31649-GF21 的潮霉素标记基因 PCR 检测

Fig. 4 PCR detection of Hyg B gene of *T. hamatum* ACCC31649-GF21

[注（Note）：泳道 1～5 依次为 MarkerⅡ(DL1200, 天根生物)，阴性对照，钩状木霉 ACCC 31649, ACCC 31649-GF21-1, ACCC 31649-GF21-2。 Lane 1–5: Marker Ⅱ DL1200 (TIANGEN Biotech), Negative control, *T. hamatum* ACCC 31649, *T. hamatum* ACCC 31649-GF21-1, *T. hamatum* ACCC 31649-GF21-2.]

内菌丝发达，白色至黄绿色，背面无色至灰色。野生型与 GFP 标记 GF21 菌株形态特征相比较，两者菌落边缘规则整齐，菌丝直径 1～7 μm，分生孢子都为椭圆形，大小 (3.9～5.6) μm × (2.8～4.0) μm，尖端阔圆形，基部变细或者稍微呈尖形；气生菌丝上稀疏地产生分生孢子梗，在分生孢子梗尖端下部产生 1～2 个轮生瓶梗，瓶梗从基部向上至顶尖逐渐缢缩，中间部位有时候稍微膨大 (图 5)。

2.3 野生型与转化子菌落生长速度及生物量测定

通过对标记前后菌株的培养特征进行显微观察和测定，在菌丝大小、产孢结构及孢子形态等方面，转化子与野生型无明显差异，而在相同培养条件下，GFP 标记菌株 ACCC 31649-GF21 菌落的生长速率比野生型变慢了，而 ACCC31649-GF21 产孢量与野生型相比却增加了，但在菌落的鲜重和干重等生物量方面，ACCC31649-GF21 与野生型菌株基本一致 (表 1)。

2.4 ACCC31649-GF21 在辣椒植株中的定殖

通过取样切片荧光显微观察，在接种 ACCC 31649-GF21 后的 24 h，GF21 的菌丝和孢子聚集在根表皮 (图 6A、B)；48 h 后，GFP 标记菌株在主根维管束中生长定殖 (图 6C)；接种 3 d，菌丝穿透皮层细胞在主根韧皮部定殖 (图 6D)，同时在辣椒的茎部木质部 (图 6E) 也观察到菌株的定殖；接种 5 d，定殖至茎表皮 (图 6F) 和根茎连接处 (图 6G) 及茎部气孔

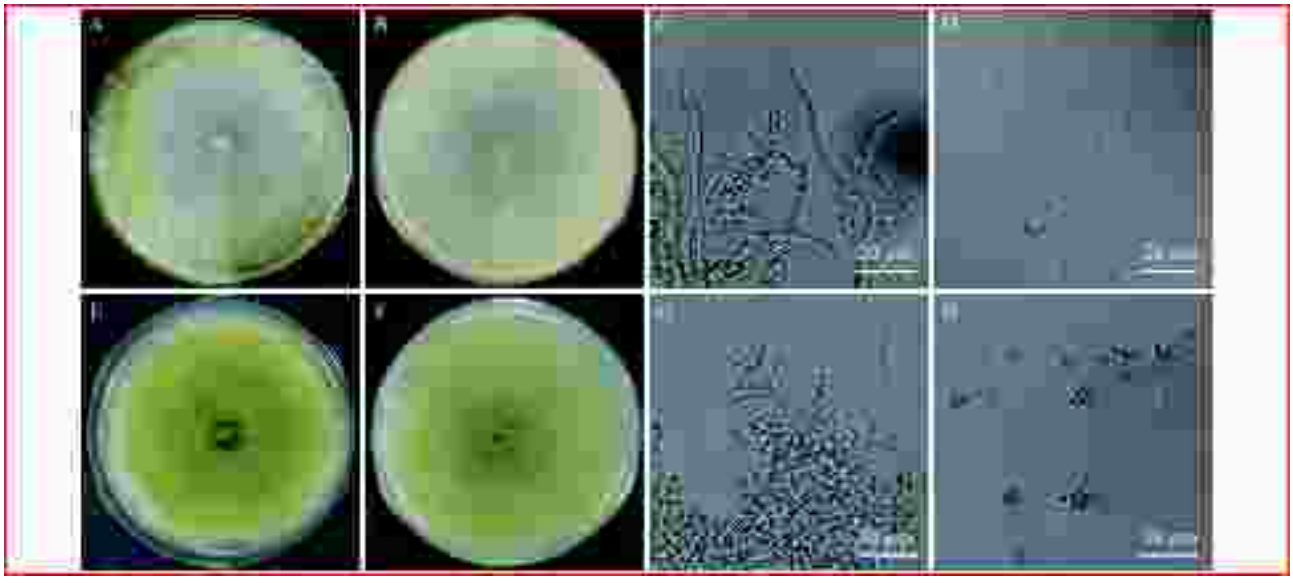

图 5　钩状木霉 ACCC31649 与 ACCC31649-GF21 的形态特征

Fig. 5　The morphology of *T. hamatum* ACCC31649 and *T. hamatum* ACCC31649-GF21

[注（Note）: A、B、C、D— 野生型菌株; E、F、G、H — GFP 标记菌株 ACCC31649-GF21。
A、B、C、D—ACCC31649 *T. hamatum* ACCC31649; E、F、G、H— *T. hamatum* ACCC31649-GF21.]

表 1　钩状木霉野生菌株和转化子生长速率、产孢量及生物量的比较

Table 1　Comparison of growth rate, biomass and conidiation of *T. hamatum* ACCC31649 and *T. hamatum* ACCC31649-GF21

菌株 Strains	生长速率 (cm/d) Growth rate	产孢量 (× 10^6 conidia/plate) Spore yield	生物量 Biomass (g/plate)	
			鲜重 Fresh weight	干重 Dry weight
ACCC31649	2.04 ± 0.38 a	5.93 ± 0.60 b	0.25 ± 0.02 a	0.05 ± 0.01 a
ACCC31649-GFP21	1.03 ± 0.12 b	46.37 ± 5.03 a	0.29 ± 0.02 a	0.05 ± 0.00 a

注（Note）：同列数据后不同小写字母表示菌株间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different lowercase letters in the same column are significantly different between two strains ($P < 0.05$)

(图 6H)；25 d 后，菌丝到达辣椒植株的第一片真叶的叶柄 (图 6I、J) 和叶片 (图 6M、L) 组织中。从 30 天到 70 天后，辣椒组织中仍然可以观察到绿色荧光菌丝。上述结果表明，通过灌根接种，标记的钩状木霉菌株能够从辣椒根部维管束自下向上定殖，首先在辣椒幼苗的侧根周围富集、吸附，后侵入侧根表层，进入维管束和韧皮部，沿维管束向上经主根、根茎交界、茎和叶定殖生长，但最后都未能够定殖到辣椒植株的顶端。

2.5　野生型菌株与转化子对辣椒的促生作用

接种钩状木霉 30 天后，辣椒幼苗的株高、根长及植株的干重和鲜重等数据统计结果表明，经野生型菌株处理后，辣椒的株高比对照增加 15.9%，根长增加 19.4%，鲜重增加 36.3%，干重增加 43.4%，野生型菌株对辣椒幼苗具有显著的促生作用；而经转化子 GF21 处理的辣椒幼苗，辣椒的株高比对照增加 13.5%，根长增加 16.2%，鲜重增加 43.8%，干重增加 45.3%，转化子同样表现出显著的促生作用 (图 7、表 2)。上述结果表明，转化子 GF21 和野生型菌株都能够明显促进辣椒幼苗的生长。

3　讨论

目前，植物病害生物防治中应用较多的生防真菌主要有木霉菌[32]、芽孢杆菌[33−34]、丛枝菌根真菌[35−36]、毛壳菌[37]等。研究已经证明木霉菌能够通过溶菌、重寄生、竞争营养和空间来抑制病原真菌[38−39]，同时还能够促进植物生长[40−41]，从而增强植物的抗逆能力。本研究以 GFP 基因作为标记基因，利用 ATMT 方法建立了 GFP 基因的钩状木霉 ACCC31649 遗传转化体系。近年的研究表明，单核真菌通过 ATMT 介导的遗传转化子具有很高的遗传稳定性[42−43]，因此，本研究通过 DAPI 对钩状木霉 ACCC 31649 分生

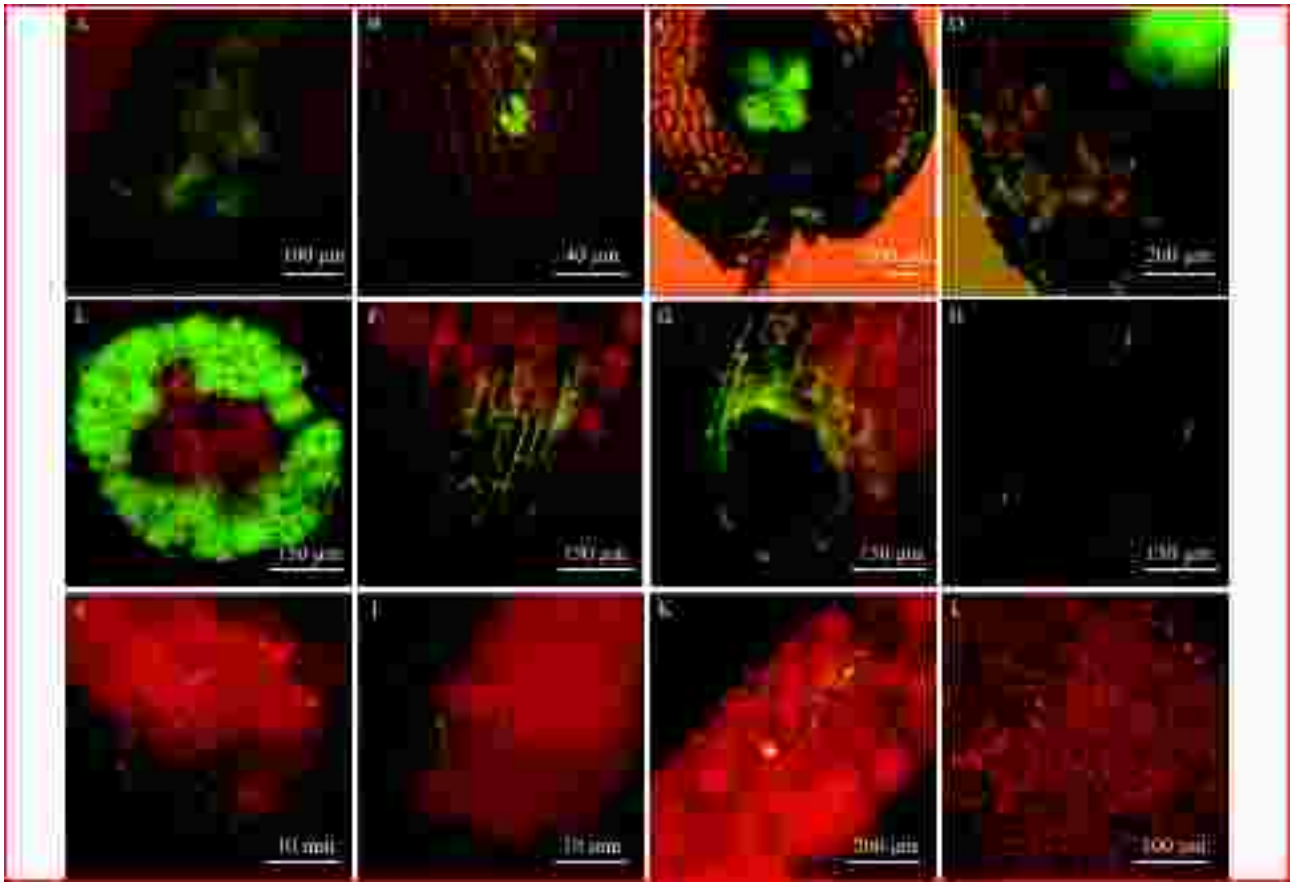

图 6 ACCC31649-GF21 在辣椒植株中的定殖

Fig. 6 Colonization of the ACCC31649-GF21 in the pepper plants

[注（Note）：A— 标记菌株的菌丝和分生孢子在辣椒侧根富集; B— 分生孢子吸附在辣椒根表皮; C— 标记菌株定殖于辣椒主根维管束中; D— 标记菌株菌丝穿透皮层细胞进入主韧皮部; E— 标记菌株在辣椒茎部木质部中定殖; F— 标记菌株向上定殖到达茎表皮; G— 根茎交接处聚集大量菌丝 H— 菌丝定殖至辣椒茎部气孔; I、J— 菌丝到达辣椒叶柄中定殖; K、L— 标记菌株在辣椒叶片定殖; 绿色荧光的钩状木霉在图中呈现绿色或黄绿色，红色为辣椒组织自发荧光。 A— The hyphae and conidia of labeled fungus clustered on the branch roots of the pepper; B— The conidia formed on the surface of the roots; C— The labeled fungus grew into the vascular bundle of taproot; D— The labeled fungus penetrated into the phloem of taproot; E— The labeled fungus penetrated into hadromestome of the stems; F— The labeled fungus colonized on the surface of the stems; G— The labeled fungus colonized into the junctions between roots and stems; H— The labeled fungus colonized into the stomata of stems; I, J— The labeled fungus colonized into the petioles; K, L— The labeled fungus grew in the tissues of leaves; The labeled *T. hamatum* presented in green or yellow-green, while the tissues of pepper presented in red by auto fluorescence.]

孢子的细胞核进行染色，确定了钩状木霉 ACCC31649 清晰的单核细胞结构，经不断摸索并优化了转化条件，即当乙酰丁香酮 (AS) 浓度为 200 mmol/L，诱导培养 10 h，25℃ 黑暗共培养 60 h 时成功获得了稳定遗传的 GFP 标记菌株 ACCC31649-GF21。转化子的遗传稳定性是进行生防菌定殖机理研究的重要条件[44]，故对 ACCC 31649-GF21 进行扩增潮霉素抗性基因验证及真菌形态检测，结果表明该基因在转化子 GF21 中得到稳定、高效的表达；此外，对 ACCC 31649-GF21 的生长速率、产孢量和生物量测定结果表明，转化子 GF21 的生长速率变慢，但这种现象在其他菌株中也有出现，如车建美等用 GFP 标记青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*)[45]及刘路宁[46]用 GFP 标记绿木霉 (*Trichoderma virens*) 的研究中，也出现了标记菌株生长变慢。但对菌株 ACCC31649-GF21 检测分析后发现，GFP 标记菌株促生效果与野生型相比没有显著性差异。

通过 GFP 标记技术能够实时、动态地研究微生物的空间定位、微生物与环境及宿主之间的互作[47–48]，如武坤毅等利用 GFP 标记技术成功观测了溶杆菌 (*Lysobacter* sp.) SNNU513 在玉米 (*Zea mays*) 根部定殖规律[49]；李亮亮等利用 GFP 标记短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilu*) 并观察到其在马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb) 体内的定殖动态[50]。本研究证明了钩状木霉 ACCC 31649 能够通过菌丝和孢子在辣椒不同组织中定殖，可通过侧根、根毛和根表皮的自

图 7　钩状木霉对辣椒幼苗生长的影响

Fig. 7　Effects of the *T. hamatum* on the growth of the pepper seedlings

表 2　钩状木霉对辣椒幼苗生长的影响

Table 2　Effects of the *T. hamatum* on the growth of the pepper seedlings

处理 Treatment	株高 (cm) Plant height	根长 (cm) Root length	鲜重 (g) Fresh weight	干重 (g) Dry weight
CK	14.57 ± 0.33 b	15.69 ± 0.81 b	5.76 ± 0.28 c	0.53 ± 0.04 b
ACCC 31649-GF21	16.54 ± 0.24 a	18.23 ± 0.56 a	8.28 ± 0.33 a	0.77 ± 0.07 a
ACCC 31649	16.89 ± 0.27 a	18.73 ± 0.51 a	7.85 ± 0.25 b	0.76 ± 0.06 a

注（Note）：同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$) Values followed by different lowercase letters in the same column are significantly different among treatments ($P < 0.05$).

然孔口或气孔侵入辣椒植株根内，经皮层到达根维管束系统，在蒸腾拉力或其它因素 (如矿物质的运输等) 的作用下由地下根部向茎甚至叶等地上部迁移或扩散[51]。研究还发现，在辣椒植株的茎部维管束中未检测到 ACCC31649-GF21 定殖，所以标记菌株是通过茎部木质部进行自下而上的侵染，而不是通过茎部维管束。同时，接种生防钩状木霉 ACCC31649 对辣椒幼苗的株高、根长及生物量等方面具有显著的促生作用。本文的相关结果为进一步研究生防钩状木霉与辣椒病原菌及宿主植物之间的互作和生防作用奠定了重要基础。

致谢：本文在显微照相方面得到贵州省农业生物技术重点实验室谭玉梅、朱英两位老师和贵州省植物保护研究所吴石平老师的帮助和指导，在转化菌株和质粒方面得到中国科学院微生物所真菌学国家重点实验室刘杏忠研究员的帮助和指导，特此感谢！

参 考 文 献：

[1] 尹大川, 邓勋, 宋瑞清, 等. 绿木霉 (*Trichoderma virens*) 对四种重要林木病原菌的抑制效果及抑菌机理[J]. 生态学志, 2014, 33(7): 1911–1919.
Yin D C, Deng X, Song R Q, *et al*. Inhibiting effect and mechanism of *Trichoderma virens* T43 on four major species of forest pathogen[J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(7): 1911–1919.

[2] 谷祖敏, 毕卉. 长枝木霉THLJ菌株防治黄瓜枯萎病影响因素分析[J]. 农药, 2016, 55(1): 58–60.
Gu Z M, Bi H. Influence factors of control efficacy against cucumber *Fusarium* wilt with *Trichoderm longibrachiatum*[J]. Agrochemicals, 2016, 55(1): 58–60.

[3] 梁昌聪, 刘磊, 张建华, 等. 绿色木霉菌H06固体浅盘发酵工艺优化[J]. 菌物学报, 2014, 33: 1313–1326.
Liang C C, Liu L, Zhang J H, *et al*. Optimization of shallow tray fermentation process of *Trichoderma viride* H06[J]. Mycosystema, 2014, 33: 1313–1326.

[4] 胡洁, 秦克伟, 蔡枫, 等. 哈茨木霉SQR-T037对茄子幼苗促生效应

的研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(32): 15671–15673, 15694.
Hu J, Qin K W, Cai F, *et al*. Study on growth-promoting effect of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on eggplant seedlings[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(32): 15671–15673, 15694.

[5] 胡琼. 哈茨木霉TC对辣椒促生效果的研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(21): 8941–8943.
Hu Q. Study on promotion effects of *Trichoderma* TC on pepper (*Capsicum annum* Linn.) growth[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(21): 8941–8943.

[6] 李栎, 肖曼, 高新征, 等. 哈茨木霉TL-1促进植物生长及病害防治效果初报[J]. 广东农业科学, 2012, 22: 91–94.
Li L, Xiao M, Gao X Z, *et al*. Primary study on growth-promoting and biological control effects of *Trichoderma harzianum* TL-1[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 22: 91–94.

[7] 张树武, 徐秉良, 程玲娟, 等. 深绿木霉对白三叶草促生作用及生理生化特性的影响[J]. 草业学报, 2015, 24(2): 161–167.
Zhang S W, Xu B L, Cheng L J, *et al*. Effects of *Trichoderma aureoviride* fermentation on the growth and physiological characteristics of *Trifolium repens*[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(2): 161–167.

[8] Harman G, Howell C R, Viterbo A, *et al*. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. Nature, 2004, 2: 43–56.

[9] Hexon A C C, Lourdes M R, Carlos C P, *et al*. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through and auxin-dependent mechanism in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2009, 149: 1579–1592.

[10] Valerie G, Hani A, Russell J, *et al*. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA)[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39: 1968–1977.

[11] Ezzi M I, Lynch J M. Cyanide catabolizing enzymes in *Trichoderma* spp.[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 31: 1042–1047.

[12] Adams P, De-Leij F A A M, Lynch J M. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil[J]. Microbial Ecology, 2007, 54: 306–313.

[13] Altomare C, Norvell W A, Björkman T, *et al*. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22[J]. Applied Environmental Microbiology, 1999, 65: 2926–2933.

[14] Adams P, Lynch J M, De-Leij F A A M. Desorption of zinc by extracellularly produced metabolites of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma reesei* and *Coriolus versicolor*[J]. Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2240–2247.

[15] 李国田, 杨合同, 周红姿. 根癌农杆菌介导的木霉插入转化及其应用[J]. 山东科学, 2006, 19(6): 24–30.
Li G T, Yang H T, Zhou H Z. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and its application in *Trichoderma* spp[J]. Shandong Science, 2006, 19(6): 24–30.

[16] De Groot M J A, Bundok P, Hooykaas P P J, *et al*. *Agrobacterium - tumefaciens* mediated transformation of filamentous fungi[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16(9): 839–842.

[17] Bundock P, Den Dulk-Ras A, Beijersbergen A, *et al*. Trans-kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae*[J]. The EMBO Journal, 1995, 14(13): 3206–3214.

[18] Mullins E D, Chen X, Romaine P, *et al*. *Agrobacterium* mediated-transformation of *Fusarium oxysporum*: An efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer[J]. Phytopathology, 2001, 91: 173–180.

[19] Tanaka S, Kondo N, Naito S. Isolation of pathogenicity and gregatin-deficient mutants of *Phialophora gregata* f. sp. adzukicola through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Journal of General Plant Pathology, 2007, 73(4): 242–249.

[20] Luc F M, Rouws C H S G, *et al*. Monitoring the colonization of sugarcane and rice plants by the endophytic diazotrophic bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* marked with *gfp* and *gusA* reporter genes[J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51: 325–330.

[21] Nicole H, Natalia R. Expression of the fluorescence markers DsRed and GFP fused to nuclear localization signal in the arbussular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*[J]. New Phytologist, 2008, 177: 537–548.

[22] 李俊, 谢伟国, 程鹏, 等. 抗辣椒白绢病致病菌的钩状木霉中几丁质酶诱导表达分析[J]. 陕西农业科学, 2016, 62(5): 12–14.
Li J, Xie W G, Cheng P, *et al*. Analysis on viride chitinase of *Trichoderma hamatum* for *Sclerotium rolfsii*[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2016, 62(5): 12–14.

[23] Rubio M B, Quijadn N M, Perez E, *et al*. Identfying beneficial qualities of *Trichoderma parareeset* for plants[J]. Applied and Environmental Mictobiology, 2014, 80(6): 1864–1873.

[24] Liesche J, Ziomkiewicz I, Schulz A. Super-resolution imaging with Pontamine Fast Scarlet 4BS enables direct visualization of cellulose orientation and cell connection architecture in onion epidermis cells[J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(2): 285–288.

[25] Thomas J, Ingerfeld M, Nair H, *et al*. Pontamine fast scarlet 4B: a new fluorescent dye for visualising cell wall organisation in radiata pine tracheids[J]. Wood Science and Technology, 2013, 47(1): 59–75.

[26] 胡晓棣, 李熠, 任蜀豫, 等. 冬虫夏草、蛹虫草菌丝隔膜和细胞核荧光染色[J]. 菌物学报, 2016, 35(9): 1099–1105.
Hu X L, Li Y, Ren S Y, *et al*. Fluorescent staining of septa and nuclei in *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*[J]. Mycosystema, 2016, 35(9): 1099–1105.

[27] 王梅娟, 李坡, 吴敏, 等. 玉米大斑病菌ATMT突变体库的构建及其分析[J]. 中国农业科学, 2012, 45(12): 2384–2392.
Wang M J, Li P, Wu M, *et al*. Constuction and evaluation of ATMT mutant library of *Setosphaeria turcica*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(12): 2384–2392.

[28] Zeilinger S. Gene disruption in *Trichoderma atroviride* via *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Current Genetics, 2003, 45: 54–60.

[29] Crespo-Sempere A, Lopez-Perez M, Martinez-Culebras P V, *et al*. Development of a green fluorescent tagged strain of *Aspergillus carbonarius* to monitor fungal colonization in grapes[J]. International Journal of Food Microbiology, 2011, 148(2): 135–140.

[30] 陈美娟. 希金斯刺盘孢*Ch-STE7*和*Ch-SEC1*基因的功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2014.
Chen M J. Functional analysis of *Ch-STE7* and *Ch-SEC1* in *Colletotrichum higginsianum*[D]. Wuhan: MS Thesis of Huazhong Agricultural University, 2014.

[31] 乔俊卿, 陈志谊, 梁雪杰, 等. 枯草芽孢杆菌Bs916防治番茄青枯病[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 229–234.
Qiao J Q, Chen Z Y, Liang X J, *et al*. Biocontrol efficacy on tomato

bacterial wilt by *Bacillus subtilis* Bs916[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 229–234.

[32] 吴琳, 黄华平, 杨腊英, 等. 拮抗香蕉枯萎病镰刀菌木霉菌株的分离筛选[J]. 热带作物学报, 2010, 31(1): 106–110.
Wu L, Huang H P, Yang L Y, *et al*. Screening of *Trichoderma* spp. antagonizing *Fusarium oxysporum*, *f.* sp. *cubense* Owen[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2010, 31(1): 106–110.

[33] 张晓云, 李宝庆, 郭庆港, 等. 生防枯草芽孢杆菌CAB-1抑菌蛋白产生条件及其稳定性研究[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(2): 59–64.
Zhang X Y, Li B Q, Guo Q G, *et al*. Optimization of antifungal protein production by *Bacillus subtilis* strain CAB-1 and its stability analysis[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011, 13(2): 59–64.

[34] 薛鹏琦, 刘芳, 乔俊卿, 等. 油菜菌核病生防芽孢杆菌的分离鉴定及其脂肽化合物分析[J]. 植物保护学报, 2011, 38(2): 127–132.
Xue P Q, Liu F, Qiao J Q, *et al*. Screening of *Bacillus* strains with high inhibition on rape *Sclerotinia* disease and its lipopeptide compounds detection[J]. Acta Phytophylasica Sinica, 2011, 38(2): 127–132.

[35] Ashok S, Keerti D, Deepak V, *et al*. Interactions between arbuscular mycorrhizae and *Fusarium oxysporum* f. sp. Ciceris: effects on fungal development, seedling growth and wilt disease suppression in *Cicer arietinum* L[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2015, 48(3): 240–252.

[36] Li Y J, Liu Z L, Hou H Y, *et al*. Arbuscular mycorrhizal fungi-enhanced resistance against *Phytophthora sojae* infection on soybean leaves is mediated by a network involving hydrogen peroxide, jasmonic acid, and the metabolism of carbon and nitrogen[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2013, 35(12): 3465–3475.

[37] 印容, 高慧娟, 赵秀云. 球毛壳菌及其产生的鞘氨醇对油菜的室内生防作用[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(5): 58–62.
Yin R, Gao H J, Zhao X Y. Biocontrol effect of *Chaetomium globosum* and sphingosine on *Plasmodiaphora brassicae*[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(5): 58–62.

[38] Chen J L, Sun S Z, Miao C P, *et al*. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*[J]. Journal of Ginseng Research, 2016, 40(4): 315–324.

[39] Bisen K, Keswani C, Mishra S, *et al*. Unrealized potential of seed biopriming for versatile agriculture[A]. Rakshit A, Singh H B, Sen, A. Nutrient use efficiency: From basics to advances[M]. New Delhi: Springer, 2015: 193-206.

[40] Contreras-Cornejo H A, Macias R L, Cortes P C, *et al*. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2009, 149: 1579–1592.

[41] Fan L L, Fu K H, Yu C J, *et al*. Construction and functional analysis of *Trichoderma harzianum* mutants that modulate maize resistance to the pathogen *Curvularia lunata*[J]. Journal of Environmental Science and Health(Part B), 2014, 49(8), 569-577.

[42] 康振生, 李振歧, 商鸿生, 等. 植物病原真菌细胞核和隔膜的双重荧光染色技术[J]. 真菌学报, 1993, 12(2): 174–186.
Kang Z S, Li Z Q, Shang H S, *et al*. On technique of double fluorescence staining for nucelei and septa of plant pathogenic fungi[J]. Acta Mycologica Sinica, 1993, 12(2): 174–186.

[43] 毕朝位, 仇剑波, 周明国, 等. 禾谷镰孢菌*Fusarium gram inearum* Schwabe分生孢子萌发过程中的核相变化及有丝分裂过程观察[J]. 菌物学报, 2008, 27(6): 901–907.
Bi C W, Qiu J B, Zhou M G, *et al*. Mitotic division in germ tube of *Fusarium graminearum* Schwabe[J]. Mycosystema, 2008, 27(6): 901–907.

[44] 张淑梅, 王玉霞, 李晶, 等. 基因标记枯草芽孢杆菌BS-68A在黄瓜上定殖[J]. 生物技术, 2007, 16(4): 73–74.
Zhang S M, Wang Y X, Li J, *et al*. Colonization of a gene-marked *Bacillus subtilis* BS-68A in cucumber[J]. Biotechnology, 2007, 16(4): 73–74.

[45] 车建美, 蓝江林, 刘波. 转绿色荧光蛋白基因的青枯雷尔氏菌生物学特性[J]. 中国农业科学, 2008, 41(11): 3626–3635.
Che J M, Lan J L, Liu B. GFP tagging *Ralstonia solanacearum* with *gfp*/*lux AB* mini-Tn5[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(11): 3626–3635.

[46] 刘路宁. 绿木霉 (*Trichoderma virens*) TY009菌株胶霉毒毒素分离纯化及绿色荧光蛋白标记研究[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2008.
Liu L N. Isolation and purification of gliotoxin from *Trichoderma virens* strain TY009 and its GFP-labeling[D]. Hangzhou: PhD Dissertation of Zhejiang University, 2008.

[47] Monteiro R A, Schmidt M A, de Baura V, *et al*. Early colonization pattern of maize (*Zea mays* L. Poales, Poaceae) roots by *Herbaspirillum seropedicae* (Burkholderiales, Oxalobacteraceae)[J]. Genetics and Molecular Biology, 2008, 31: 932–937.

[48] Sarrocco S, Falaschi N, Vergara M, *et al*. Use of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* transformed with marker genes to follow colonization of carnation roots[J]. Journal of Plant Pathology, 2007, 89: 47–54.

[49] 武坤毅, 王斐斐, 崔浪军, 等. 溶杆菌SNNU513基因gfp标记及在玉米根部定殖[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 134–142.
Wu K Y, Wang F F, Cui L J, *et al*. Colonization of *gfp*-tagged *Lysobacter* sp. SNNU513 on maize's root[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(1): 134–142.

[50] 李亮亮, 谈家金, 陈凤毛. GFP标记短小芽孢杆菌LYMC-3在马尾松体内的定殖[J]. 华中农业大学学报, 2016, 35(6): 68–73.
Li L L, Tan J J, Chen F M. Colonization of GFP-tagged *Bacillus pumilus* strain LYMC-3 in masson pine[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2016, 35(6): 68–73.

[51] 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.
Shen X Q, Liu T, Hu X L, *et al*. Labeling *Bacillus pumillus* with Green Fluorescent Protein (GFP) and its colonization in rice seedlings[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(24): 5024–5031.