

药用植物内生放线菌的分离、筛选及活性 菌株 YIM 61470 鉴定

秦 盛^{1,2} 赵立兴¹ 陈 云¹ 赵国振¹ 李 洁¹ 朱文勇¹ 黄海玉¹ 徐丽华^{1*}

(1. 云南大学 云南省微生物研究所 云南省生物资源保护与利用重点实验室 云南 昆明 650091)

(2. 徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室 江苏 徐州 221116)

摘 要: 从云南西双版纳热带雨林多种药用植物中分离到 272 株内生放线菌, 活性筛选表明 146 株菌的发酵产物具有抗菌活性, 其中 94 株菌具有拮抗病原细菌活性, 127 株菌具有抑制病原真菌的功能。分离菌株 YIM 61470 具有广谱抗菌活性, 通过形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞化学分类特征和基于 16S rRNA 基因序列的相似性分析等研究, 菌株 YIM 61470 被鉴定为链霉菌属(*Streptomyces*)氢化链霉菌(*S. hydrogenans*)的一个菌株。

关键词: 药用植物, 内生放线菌, 抗菌活性, 鉴定, 16S rRNA 基因

Endophytic Actinomycetes Associated with Medicinal Plants: Isolation, Antimicrobial Activity and Identification

QIN Sheng^{1,2} ZHAO Li-Xing¹ CHEN Yun¹ ZHAO Guo-Zhen¹ LI Jie¹
ZHU Wen-Yong¹ HUANG Hai-Yu¹ XU Li-Hua^{1*}

(1. Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

(2. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant of Jiangsu Province, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: 272 endophytic actinomycetes were isolated from different medicinal plants collected from tropical rainforest in Xishuangbanna of Yunnan province. By antimicrobial screening, the fermentation broth of 146 strains inhibited the tested pathogenetic strains, and 94 or 127 out of the 272 endophytic actinomycetes strains showed inhibition activity against pathogenetic bacteria or fungi. The strain YIM 61470 exhibited extensive antagonism against pathogenic microbes. Based on the morphological characteristics, cultural characteristics, physiological characteristics, chemotaxonomic data and 16S rRNA gene sequence similarity analysis, strain YIM 61470 was identified as *Streptomyces hydrogenans*, a known species of the genus *Streptomyces*.

Keywords: Medicinal plants, Endophytic actinomycetes, Antimicrobial activity, Identification, 16S rRNA gene

基金项目: 国家重大基础研究发展规划项目(No. 2004CB719601); 国家科技部国际合作项目(No. 2006DFA33550); 云南省国际合作项目(No. 2005GH21); 云南省教育厅科学研究基金项目(No. 08J0008)

* 通讯作者: Tel: 86-871-5035263; E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

收稿日期: 2009-04-07; 接受日期: 2009-06-03

放线菌一直是抗生素、酶和酶抑制剂等有用生理活性物质的主要产生菌。迄今为止,微生物产生的2万多种生物活性物质45%以上是由放线菌产生的^[1]。近年来,由于已知化合物重复发现的概率越来越高^[2],以及致病菌对现有药物的抗药性不断增强,促使人们必须寻找更为有效及新的抗生素。因此越来越多研究者已经开始关注并研究新的栖息地的微生物,如盐碱等各种极端环境、海洋、植物内生环境等。

植物内生放线菌是一类相对未开发的新微生物资源,目前该类微生物已经在医药开发、农林业生物防治、植物保护、环境污染保护与监测等方面表现出了广泛的应用前景^[3],有报道从蛇藤、蓬莱蕉、印楝植物分离的内生放线菌具有良好的抗菌活性,并产生了新的抗生素^[4-6],最近从一株内生小单孢菌新种中分离到2个新的萜醌类化合物显示了很好的抗肿瘤活性^[7],Conn等^[8]2008年又首次报道了内生放线菌同样具有诱导植物抗性的功能。该类研究充分证明了植物内生放线菌是寻找微生物新药的又一个重要药源以及在生物防治上的良好潜力。我国云南西双版纳热带雨林拥有丰富的植物资源,其中不少植物具有独特的民族药用历史,为内生放线菌及其活性代谢产物的研究提供了绝好的材料,目前国际上对热带雨林药用植物内生放线菌的研究报道还很少。

我们采集了西双版纳热带雨林80多种药用植物,从中分离到上百株内生放线菌,本文报道这些内生放线菌对病原菌的拮抗活性,并选择具有广谱抗菌活性的菌株YIM 61470,对其进行分类鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药用植物与指示菌: 本实验所用药用植物于2007年6月份采集自云南西双版纳热带雨林(包括红豆蔻、鸡血藤、豆腐渣果、哥纳香、美登木、嘉兰、红杆叶下珠、绞股兰、草珊瑚、两面青、萝芙木、豆瓣草、三尖杉、川楝等80多种草本与木本药用植物);抗菌活性指示菌株:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、镰

刀菌(*Fusarium oxysporum*)、皮斑病霉(*Protomyces macrosporus*)均由云南省微生物研究所保存。

1.1.2 培养基和主要试剂: 内生放线菌分离培养基: TWYE^[9]、HV^[10]培养基;内生放线菌发酵采用葡萄糖-大豆粉培养基;培养特征观察采用ISP 2(International *Streptomyces* projects)系列培养基并按相关文献配制^[11];病原细菌培养采用牛肉膏-蛋白胨培养基,病原真菌培养采用马铃薯-葡萄糖(PDA)培养基。PCR试剂购于上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 植物内生放线菌的分离、保存和初步鉴定: 采集的植物样品经自来水多次冲洗除去表面泥土后,采用如下程序进行表面消毒处理: 0.01% Tween-20处理1 min,有效氯含量为4.5%~5%的次氯酸钠处理3 min~8 min(根、茎、叶处理时间不同),无菌2.5%硫代硫酸钠10 min,75%乙醇处理5 min,无菌水清洗多次,最后用无菌10%碳酸氢钠浸泡10 min。消毒后的植物样品经无菌滤纸充分吸干水分,在无菌条件下粉碎后撒在分离平板上,于28℃培养3~6周,待放线菌长出。纯化后的菌株置于20%甘油中-80℃保存。根据菌落形态、显微镜下菌丝及孢子特征进行初步鉴定。

1.2.2 表面消毒可靠性检验: 随机选取部分植物样品的根、茎、叶,采用以下2种方法检验表面消毒是否彻底: 1) 将最后处理过的植物在ISP 2固体培养基表面擦拭1 min,然后将平板于28℃培养3~6周,观察是否有菌落长出; 2) 将用于最后一遍清洗的无菌水取0.2 mL涂布于ISP 2固体培养基上,同样将平板于28℃培养3~6周,观察是否有菌落长出。

1.2.3 内生放线菌的抑菌实验: 采用滤纸片法,指示细菌置于37℃,指示真菌置于28℃,分别培养24 h~48 h后,测量抑菌圈直径的大小。

1.2.4 形态培养特征和生理生化特征: 菌株YIM 61470的培养特征参照国际链霉菌计划(ISP)中有关放线菌的培养特征描述所采用的标准培养基进行观察、记录。显微形态特征取28℃条件下ISP 2培养基培养21 d的埋片进行观察,菌丝特征及孢子形态与着生方式用扫描电镜观察(JSM5600LV, JEOL)。生理生化特征按照徐丽华等^[12]的方法进行。

1.2.5 细胞化学组分分析: 菌株YIM 61470细胞壁化学组分分析采用王平^[13]的方法进行研究。

1.2.6 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与系统发育分析: 菌株 YIM61470 总 DNA 经酶法提取后, 扩增 16S rRNA 基因。PCR 扩增正向引物为 PA: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 PB: 5'-TTAAGGTGATCCAGCCGCA-3'。PCR 扩增条件为: 95°C 5 min; 95°C 1 min, 54°C 1 min, 72°C 3 min, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物送上海生物工程技术有限公司测序。16S rRNA 基因测序后, 利用 EzTaxon 在线比对服务(<http://www.eztaxon.org/>)进行相关有效种的相似性搜索, 确定菌株的属种, 并调出相关放线菌的 16S rRNA 基因序列, 用 Clustal X1.8 软件进行序列比对, 随后用 Mega3.1 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 内生放线菌的分离与种群组成

两种表面消毒效果检测用 ISP 2 平板在 28°C 放置 3 周以后均没有菌落长出, 由此证明植物表面消毒已经彻底, 后续分离到的菌株是植物内生菌。从 80 多种药用植物的根、茎、叶中共分离纯化获得内生放线菌 272 株, 其中根组织中内生放线菌的数量明显多于茎和叶。在 272 株总分离菌株中有 116 株分离自根, 占总分离数的 42.7%, 分离自茎与叶的分别有 71 株和 85 株, 分别占总分离数的 26.1% 和 31.2%, 根中的内生放线菌多样性要高于茎与叶。每种药用植物中都分离到数目不等的内生放线菌, 分离自草本植物的有 161 株, 占总分离数的 59.2%; 分离自木本植物的有 111 株, 占总分离菌株的 40.8%。根据菌落形态、气生菌丝的有无等特征, 272 株内生放线菌中链霉菌属(*Streptomyces*)占到了 70% 以上, 其它优势类群为小单孢菌属(*Micromonospora*)与假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*), 还包括少数拟诺卡氏菌属(*Nocardopsis*)、野野村氏菌属(*Nonomuraea*)、马杜拉放线菌属(*Actinomadura*)以及一些尚未确定到属的稀有类群放线菌。从根、茎、叶获得的内生放线菌中, 链霉菌属、小单孢菌属与假诺卡氏菌属均是分离频率最高的类群, 这 3 个属在该地区的不同药用植物中具有广泛分布, 而其它属的内生放线菌不具有广泛分布的特点, 其分布具有一定的宿主植物与组织器官特异性。

2.2 内生放线菌的抗菌活性

抗菌活性筛选结果表明, 272 株内生放线菌中有

146 株菌对至少一种指示菌具有拮抗作用, 活性菌株比例为 53.7%。其中对 3 种指示细菌有抑制作用的菌株有 94 株, 占到分离总菌株数的 34.6%, 127 株菌具有抑制病原真菌的活性, 占分离总菌株数的比例为 46.7%。从图 1 可以看出, 对 7 种指示菌有拮抗作用的内生放线菌菌株数不同, 抗大肠杆菌与烟草赤星病菌的菌株数(55 株)>抗金黄色葡萄球菌的(47 株)>镰刀菌的(46 株)>皮斑病霉的(42 株)>抗黑曲霉的(2 株)>抗枯草芽孢杆菌的(21 株)。另外发现, 对每种病原菌都有一些高活性菌株(表 1), 其中对 3 种指示真菌烟草赤星病菌、镰刀菌与皮斑病霉具有高活性的菌株最多, 分别有 10 株、10 株、13 株。统计结果显示, 来自根组织的 116 株菌中 64%(74 株)具有抗菌活性, 而茎组织中有 49%(35 株)、叶中有 44%(37 株)的菌株为拮抗菌, 说明从根组织中比较容易筛选到抗菌活性菌株。

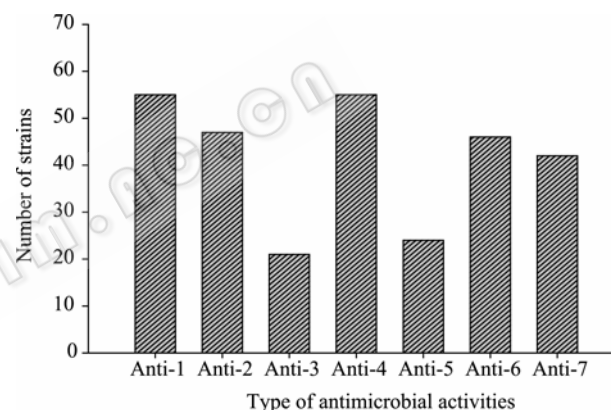


图 1 具抗菌活性的内生放线菌统计

Fig. 1 Statistics of endophytic actinomycetes with antimicrobial activities

注: Anti-1: 抗大肠杆菌; Anti-2: 抗金黄色葡萄球菌; Anti-3: 抗枯草芽孢杆菌; Anti-4: 抗烟草赤星病菌; Anti-5: 抗黑曲霉; Anti-6: 抗镰刀菌; Anti-7: 抗皮斑病霉。

Note: Anti-1: Anti-*Escherichia coli*; Anti-2: Anti-*Staphylococcus aureus*; Anti-3: Anti-*Bacillus subtilis*; Anti-4: Anti-*Alternaria alternata*; Anti-5: Anti-*Aspergillus niger*; Anti-6: Anti-*Fusarium oxysporum*; Anti-7: Anti-*Protomyces macrosporus*.

2.3 菌株 YIM 61470 的抗菌谱

抗菌活性结果统计表明, 菌株 YIM 61470 具有较好的抗菌活性, 其抗菌谱如表 2 所示, 该内生放线菌对大肠杆菌、烟草赤星病菌、黑曲霉、镰刀菌、皮斑病霉都具有较强的抗菌活性。

2.4 菌株 YIM 61470 的鉴定

2.4.1 形态和培养特征: 菌株 YIM 61470 在大多数培养基上均生长良好, 在燕麦与营养琼脂培养

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

表 1 具有高抗菌活性内生放线菌统计
Table 1 Statistics of endophytic actinomycetes with high antimicrobial activities

指示菌 Test microbe	活性菌株数 Number of active strains	菌株号 Strain No.
<i>Escherichia coli</i>	7	YIM61113、YIM61118、YIM61131、YIM61227、YIM61241、YIM61259、YIM61470
<i>Strphylococcus aureus</i>	7	YIM61018、YIM61086、YIM61168、YIM61178、YIM61188、YIM61190、YIM61259
<i>Bacillus subtilis</i>	4	YIM61136、YIM61187、YIM61211、YIM61241
<i>Alternaria alternata</i>	10	YIM61007、YIM61013、YIM61017、YIM61019、YIM61108、YIM61111、YIM61146、YIM61221、YIM61291、YIM61470
<i>Aspergillus niger</i>	6	YIM61035、YIM61211、YIM61224、YIM61237、YIM61288、YIM61470
<i>Fusarium oxysporum</i>	10	YIM61049、YIM61149、YIM61155、YIM61191、YIM61206、YIM61209、YIM61223、YIM61245、YIM61297、YIM61470
<i>Protomyces macrosporus</i>	13	YIM61001、YIM61007、YIM61011、YIM61018、YIM61047、YIM61049、YIM61155、YIM61149、YIM61175、YIM61269、YIM61297、YIM61280、YIM61470

注：以上菌株抑菌圈直径均大于 15 mm。
Note: Diameters of inhibition zones above 15 mm.

表 2 菌株 YIM 61470 的抗菌活性
Table 2 Antimicrobial activity result of strain YIM 61470

菌株 Strain	抑菌直径 Inhibit diameters (mm)
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	17
金黄色葡萄球菌 <i>Strphylococcus aureus</i>	14
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	13
烟草赤星病菌 <i>Alternaria alternata</i>	22
黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	19
镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	30
皮斑病霉 <i>Protomyces macrosporus</i>	21

基上中等生长，所有供试培养基上均不产生可溶性色素(表 3)。气生菌丝浅黄色至黄白色，基内菌丝浅褐色至深褐色。扫描电镜下观察，菌株 YIM 61470 基内菌丝多分枝、不断裂，气生菌丝丰富，气生菌丝上着生长孢子链，偶有弯曲，孢子呈柱状，表面光滑(图 2)，为典型链霉菌属的形态特征。



图 2 扫描电镜下菌株 YIM 61470 的形态特征
Fig. 2 Morphological characteristics of strain YIM 61470 by scanning electronmicroscope

2.4.2 生理生化特征：菌株 YIM 61470 能够使牛奶不凝固但胨化，能水解淀粉、液化明胶，硝酸盐还原为阳性，不产生黑色素及硫化氢；能利用阿拉伯糖、

表 3 菌株 YIM 61470 的培养特征
Table 3 Cultural characteristics of strain YIM 61470

培养基 Medium	生长 Growth	气生菌丝 Aerial mycelium	基内菌丝 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
Yeast-malt extract agar	Good	Pale yellow	Pale brown	—
Oatmeal agar	Moderate	Pale yellow	Pale brown	—
Inorganic salt/starch agar	Good	Yellow-white	Yellow- brown	—
Glycerol/asparagine agar	Good	Pale yellow	Yellow- brown	—
Czapek's agar	Good	Pale yellow	Pale brown	—
Nutrient agar	Moderate	Pale yellow	Deep brown	—
Potato extract agar	Good	Pale yellow	Brown	—

注：—：阴性。
Note: —: Negative.

表 4 菌株 YIM 61470 的生理生化特征
Table 4 Physiological and biochemical properties of strain YIM 61470

实验项目 Test items	结果 Results	实验项目 Test items	结果 Results
Arabinose	+	Xanthine	+
Cellobiose	+	Hydroxyproline	+
Dulcitol	-	Lysine	+
Fructose	+	Serine	-
Galactose	+	Phenylalanine	-
Glucose	+	Tyrosine	+
Glycerol	-	Alanine	+
Inositol	+	Asparagine	-
Lactose	-	Starch hydrolysis	+
Mannitol	+	Nitrate deoxidization	+
Mannose	+	Gelatin liquefaction	+
Sodium acetate	W	Coagulation of milk	-
Sodium oxalate	-	Peptonize of milk	+
Hypoxanthine	+	Production of H ₂ S	-
Valine	+	Melanin generation	-

注: +: 利用或该反应为阳性; -: 不利用或该反应为阴性; W: 弱利用。
Note: +: Positive; -: Negative; W: Weakly positive.

纤维二糖、果糖、半乳糖、葡萄糖等碳源, 能利用赖氨酸、酪氨酸、羟脯氨酸等氮源(表 4), 但不能利用卫矛醇、甘油、乳糖、草酸钠、丝氨酸、苯丙氨酸、天门冬氨酸生长。

2.4.3 细胞壁化学特征: 菌株 YIM 61470 的全细胞壁水解物中含有 L-DAP、天门冬氨酸、甘氨酸、谷氨酸和丙氨酸, 含半乳糖、葡萄糖、核糖等糖类。细胞壁化学特征与链霉菌属特征相符。

2.4.4 16S rRNA 基因序列相似性及系统发育分析: 菌株 YIM 61470 的 16S rRNA 基因序列的有效片段长度为 1461 bp, 提交 GenBank 数据库序列号为 FJ615282。在 EzTaxon 数据库中进行有效种的序列相似性搜索, 发现菌株 YIM 61470 与链霉菌属的菌株高度相关, 说明菌株 YIM 61470 是链霉菌属的成员。与菌株 YIM 61470 相似性最高的链霉菌属的有效种为氢化链霉菌(*S. hydrogenans*, 相似性为 99.792%), 其次为拒霉素链霉菌(*S. resistomycificus*, 99.375%), 浅紫链霉菌(*S. violascens*, 99.374%), 气味链霉菌(*S. odorifer*, 99.312%)和桑氏链霉菌(*S. sampsonii*, 99.247%)。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析也显示菌株 YIM 61470 与链霉菌菌株 *S. hydrogenans* 同在一个进化分支上(图 3)。上述分析初步表明, 菌株 YIM 61470 为氢化链霉菌的一个菌株。

3 讨论

植物内生放线菌的分离过程中, 表面消毒处理必不可少。本文使用了次氯酸钠与乙醇两种常用的消毒试剂。碳酸氢钠浸泡的目的是使植物组织内呈略碱性, 有利于抑制内生真菌的生长干扰。在次氯酸钠消毒后立即用 2.5% 硫代硫酸钠处理, 是为了降低残留次氯酸对内生菌的毒害。我们通过多种植物消毒实验发现, 2.5% 硫代硫酸钠处理后能够提高内生放线菌的出菌率, 其作用效果具有普遍性(秦盛, 云南大学博士学位论文)。Miché 和 Balandreau^[14]曾经使用 2.0% 浓度的硫代硫酸钠代替无菌水进行水稻种子表面消毒, 结果发现使用硫代硫酸钠实验组的水稻种子萌发率较对照组有明显提高。本研究将 2.5% 浓度的硫代硫酸钠用在植物表面处理, 分离植物内生菌尚属首次。表面消毒检验结果证明我们所分离到的放线菌来自植物内生环境, 而不是植物表面菌。

本研究获得的 272 株内生放线菌中活性菌株有 146 株, 抗菌活性菌的比例很高, 46.7% 的菌株对植物病原真菌具有拮抗作用, 且不少菌株具有高活性(表 1), 菌株 YIM 61470 显示了广谱抗菌活性, 可能具有很好的生物防治的潜力。刘宁等^[15]曾对同样分离自西双版纳药用植物的 165 株内生放线菌进行

<http://journals.im.ac.cn/wwxwtbcn>

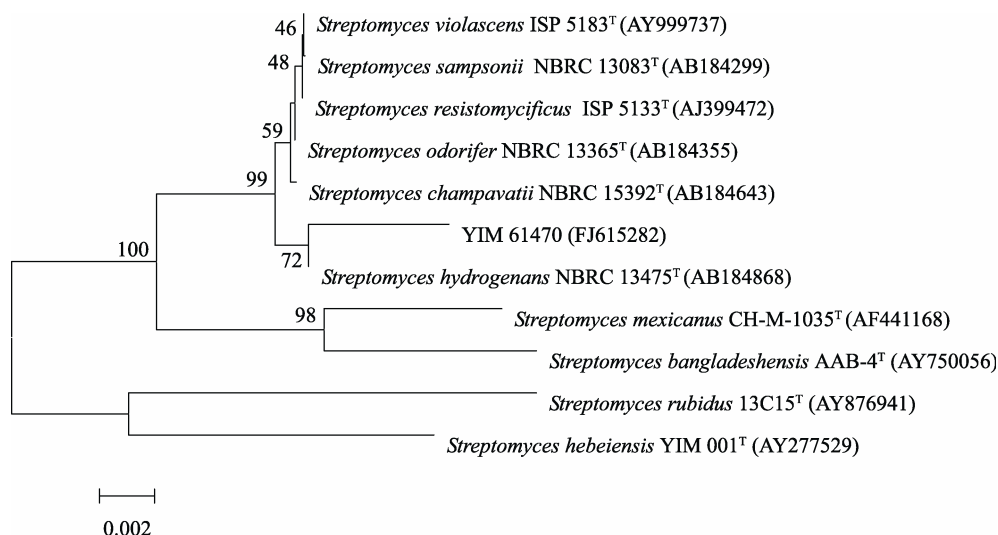


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic neighbour-joining tree based on the 16S rRNA gene sequences of strain YIM 61470 and related *Streptomyces* species

Note: Numbers on branch nodes are bootstrap values (1000 resamplings). Bar, 0.2% sequence divergence.

了抗菌活性测试,发现超过 42%的菌株对病原菌表现出拮抗活性,且对病原真菌的总体拮抗活性明显强于土壤放线菌,而本文发现 53.7%的菌株具有抗菌活性。与通常使用根际微生物进行植物病害生物防治相比,内生放线菌由于定殖在植物体内,不易受环境条件的影响,具有稳定的生存空间,可以在植物体内定殖和转运,避免了同根际众多微生物的生存竞争,更具有生物防治上的优势与潜在应用价值。

Strobel^[16]认为逐渐消失的热带雨林植物是最有可能获得内生菌新物种以及它们活性代谢产物的宝贵资源库。我们从西双版纳热带雨林多种药用植物中曾分离到糖多孢菌属、假诺卡氏菌属、糖霉菌属等多个属内生放线菌的新物种^[17-19],它们大多具有高抗肿瘤、抗菌活性,同时 PKS 与 NRPS 基因筛选阳性的链霉菌菌株^[20],结合本文的实验结果,证明了植物种类丰富的热带雨林药用植物内生放线菌的高度多样性和研究开发的價值。对于我国丰富的药用植物资源而言,内生放线菌资源发掘、开发利用的潜力巨大。

参 考 文 献

- [1] Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *J Antibiot*, 2009, **62**: 5-16.
- [2] Fenical W, Baden D, Burg M, *et al*. Marinederived pharmaceuticals and related bioactive compounds. In *From Monsoons to Microbes: Understanding the Ocean's Role in Human Health*. Edited by Fenical W. National Academies Press, 1999, pp.71-86.
- [3] 秦 盛, 陈华红, 李 洁, 等. 植物内生放线菌研究进展//生态科学进展. 第 4 卷. 北京: 高等教育出版社, 2008, pp.59-74.
- [4] Pullen C, Schmitz P, Meurer K, *et al*. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strains residing in the wood of Celastraceae. *Planta*, 2002, **216**(1): 162-167.
- [5] Ezra D, Castillo U, Strobel G, *et al*. Coronamycins, peptide antibiotics produced by a verticillate *Streptomyces* sp. (MSU-2110) endophytic on *Monstera* sp.. *Microbiol*, 2004, **150**: 785-793.
- [6] Verma VC, Gond SK, Kumar A, *et al*. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss: isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microb Ecol*, 2009, **57**: 749-756.
- [7] Igarashi Y, Trujillo ME, Martínez-Molina E, *et al*. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov.. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, **17**: 3702-3705.
- [8] Conn VM, Walker AR, Franco CM. Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2008, **21**(2): 208-218.
- [9] Coombs JT, Franco C. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69**(9): 5603-5608.
- [10] Hayakawa MT, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new method for the selective isolation of soil actinomy-

- cetes. *J Ferment Bioeng*, 1987, **65**: 501–509.
- [11] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 1966, **16**: 313–340.
- [12] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学. 北京: 科学出版社, 2007, pp.40–45.
- [13] 王 平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法—薄层析法. *微生物学通报*, 1986, **13**(5): 479–491.
- [14] Miché L, Balandreau J. Effects of rice seed surface sterilization with hypochlorite on inoculated *Burkholderia vietnamiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 3046–3052.
- [15] 刘 宁, 张 辉, 郑 文, 等. 药用植物内生放线菌的生物活性及菌株 D62 的代谢产物分析. *微生物学报*, 2007, **47**(5): 823–827.
- [16] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection*, 2003, **5**: 535–544.
- [17] Qin S, Li J, Zhao GZ, et al. *Scharopolyspora endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Maytenus austroyunnanensis*. *Syst Appl Microbiol*, 2008, **31**(5): 352–357.
- [18] Chen HH, Qin S, Li J, et al. *Pseudonocardia endophytica* sp. nov., isolated from a pharmaceutical plant *Lobelia clavata*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, **59**(3): 559–593.
- [19] Qin S, Wang HB, Chen HH, et al. *Glycomyces endophyticus* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Carex baccans*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, **58**(11): 2525–2528.
- [20] Li J, Zhao GZ, Chen HH, et al. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. *Lett Appl Microbiol*, 2008, **47**(6): 574–580.

(上接 p.1637)

征 稿 简 则

3.4 摘要写作注意事项

3.4.1 英文摘要:

1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免好多长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.4.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

4 特别说明

4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲) 或 GenBank (美国) 或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.) 后再投来。

4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的) 版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。凡被录用的稿件将及时发出录用通知, 对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 打印稿不退。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊网上传电子版修改稿, 待编辑部复审后将给作者发送稿件录用通知单, 请作者将修改稿纸稿和签字盖章后的承诺书一并寄回编辑部, 按照稿号顺序进入排队发表阶段。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊及单行本。

6 联系我们

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部 (100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>