

邳州银杏内生放线菌分离、筛选及活性菌株鉴定

谭力¹ 袁博¹ 秦盛¹ 程兆榜² 蒋继宏^{1*}

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

(2. 江苏省农业科学院 江苏 南京 210000)

摘要:【目的】从银杏中分离、筛选得到具有抑菌作用的内生放线菌,为放线菌在生物防治上的应用提供新的菌种资源。【方法】采用组织贴片培养法进行分离,生长对峙法进行筛选。【结果】从银杏的根、茎、叶中分离得到 98 株、50 株、8 株内生放线菌(共计 156 株),47 株放线菌具有拮抗植物病原真菌活性。菌株 KLBMP 5501 抗菌活性最好且具有广谱性,基于形态特征、培养特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列的相似性分析等多项分类特征表明,菌株 KLBMP 5501 是一株浅紫链霉菌(*Streptomyces violascens*)。【结论】筛选得到了具有应用潜力的高活性菌株,并进行了菌种鉴定。

关键词: 银杏, 内生放线菌, 抗菌活性

Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from *Ginkgo biloba*

TAN Li¹ YUAN Bo¹ QIN Sheng¹ CHENG Zhao-Bang² JIANG Ji-Hong^{1*}

(1. The Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plants of Jiangsu Province, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

(2. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing, Jiangsu 210000, China)

Abstract: [Objective] To isolate and screen actinomycetes with antimicrobial activity from *Ginkgo biloba*, and provide new resources for the application of actinomycetes in biological control. [Methods] The cultural method of plant tissue paste on medium were used to isolate actinomycetes. [Results] In total, we have isolated 156 endophytic actinomycetes from *Ginkgo biloba*. The fermentation broth of 47 strains could inhibit growth of the tested plant pathogenic fungi, and the strain KLBMP 5501 exhibited extensive antagonism on most of tested pathogens. Based on the morphological characteristics, cultural characteristics, physiological characteristics and 16S rRNA gene sequence similarity analysis, strain KLBMP 5501 was identified as *Streptomyces violascens*, a known species of *Streptomyces*. [Conclusion] Actinomycetes strains with high antimicrobial activity were obtained and showed potential for biological control of plant diseases. One of these strains, KLBMP 5501, was identified.

Keywords: *Ginkgo biloba*, Endophytic actinomycetes, Antimicrobial activity

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31370646, 31170605); 江苏师范大学校级一般项目(No. 2013YYB145)

*通讯作者: Tel/Fax: 86-516-83403515; ✉: jhjiang@jsnu.edu.cn

收稿日期: 2015-01-16; 接受日期: 2015-04-15; 优先数字出版日期 (www.cnki.net): 2015-04-20

植物内生放线菌是指生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织内部或细胞间隙,不引起植物产生明显症状的放线菌^[1]。研究发现,部分植物内生放线菌能够促进宿主植物生长,增加植物抗病性,增强植物抗逆性、抗虫性,而且已成为新型生物资源利用到实际生活中^[2-3]。黄以超等^[4]从牛蒡中分离得到一株孢杆链霉菌(*Streptomyces porovirgulis*)对猕猴桃溃疡病菌有较好拮抗作用;罗建军等^[5]从沙糖橘果实表面分离得到的小白链霉菌(*S. albulus*),对供试 16 种果蔬病原真菌均具有拮抗作用;张丽等^[6]从印楝叶片中分离筛选获得一株对稻瘟病菌具有优异拮抗效果的内生放线菌娄彻氏链霉菌(*S. rochei*),植物内生放线菌具有拮抗植物病原菌的能力受到了广泛的关注。

银杏(*Ginkgo biloba* L.)是我国特有树种,又名白果、公孙树、鸭脚树、平仲树,是新生代第四纪冰川之后地球上幸存下来的孑遗植物,银杏属现存的唯一生存种^[7]。大部分植物在生长过程中会受到多种病原菌的侵袭,但是银杏在生长过程中很少发生病害^[8]。银杏具有很好的抑菌能力,银杏根、茎、叶、果肉(外种皮)及果仁的提取物对水稻纹枯病菌、黄瓜炭疽病菌和番茄青枯病菌等有明显的抑制生长作用^[9-11];人们已经从银杏中筛选出具有抑菌作用的内生真菌^[8]、放线菌^[12]、细菌^[13]。本研究实验材料采集于银杏资源丰富的江苏省邳州市,并针对 13 种植物病原真菌进行了拮抗筛选。

邳州市银杏成片园面积 180 km²,定植银杏总株数 1 410 万株,在圃各类银杏苗木 2.5 亿株,邳州叶用银杏栽培面积位居全国第一,已发展成为全国最丰富的银杏种苗繁育基地,经济效益、社会效益、生态效益均十分显著,银杏资源总量列全国第一^[14]。

同一种植物生长在不同环境下,其内生菌种类不会完全相同,目前邳州银杏内生放线菌还未见报道。本研究从邳州银杏中分离得到了内生放线菌,检测了对茄链格孢、灰葡萄孢、辣椒枝孢等植物病原菌的抑菌作用,筛选出了具有较好抗菌活性的菌

株,并进行了菌种鉴定,为银杏放线菌的进一步开发利用打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物样本:实验所用的银杏于 2013 年 10 月份采集于江苏省邳州市港上镇银杏园。

1.1.2 指示植物病原真菌:茄链格孢(*Alternaria solani* JSPA1201)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea* JSPB1202)、辣椒枝孢(*Cladosporium capsici* JSPC1203)、古巴假霜霉菌(*Pseudoperonospora cubensis* JSPP1205)、茄腐镰孢(*Fusarium solani* JSPF1206)、西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. JSPF1207)、西瓜壳二孢(*Ascochyta citrullina* JSPA1208)、串珠镰孢(*Fusarium moniliforme* JSPF1211)、灰梨孢(*Pyricularia grisea* JSPP1212)、稻绿核菌(*Ustilagoidea virens* JSPU1213)、葱链格孢(*Alternaria porri* CFCC7900)、甘薯长喙壳菌(*Ceratocystis fimbriata* CFCC8430)和链格孢菌(*Alternaria alternata* KLBMP 01234),以上植物病原真菌由中国林业科学院、江苏省农业科学院和江苏省江苏师范大学药用植物生物技术重点实验室提供。

1.1.3 培养基:(1)内生放线菌分离培养基:水酵母琼脂培养基、淀粉酪素培养基、克氏一号培养基、高氏一号培养基、海藻糖脯氨酸培养基、YCED 培养基、丙酸钠-精氨酸培养基和改良无机盐淀粉培养基参照文献[15]。分别加入萘啶酮酸(Nalidixic acid) 25 mg/L、制霉菌素(Nystatin) 50 mg/L、重铬酸钾(K₂Cr₂O₇) 25 mg/L 辅助分离^[16]。(2)内生放线菌纯化、发酵培养基:ISP2 培养基。(3)拮抗菌株形态及培养特征观察培养基:M-1 察氏培养基、M-2 燕麦粉培养基、M-3 葡萄糖天门冬素琼脂培养基、M-4 无机盐淀粉琼脂培养基、M-5 伊莫松培养基、M-6 葡萄糖酵母琼脂培养基、M-7 酪氨酸琼脂培养基、M-8 高氏 1 号合成琼脂培养基和 M-9 马铃薯块培养基^[17]。(4)植物病原真菌培养基:PDA 培养基^[18]。

1.2 方法

1.2.1 银杏样本的采集及内生放线菌的分离、纯化: 选择生长势好、健康的银杏根、茎、叶进行采集, 用蜡封住断面, 置于保鲜袋内, 用标签纸做好标记, 带回实验室后即刻开始分菌。如果不能马上进行分菌等处理工作, 则将样品晾干水汽置于 4 °C 储藏, 于一周之内处理。采用组织贴片培养分离法进行内生放线菌的分离^[18]: 将植物样品用自来水冲洗除去表面泥土和尘垢后, 再将植物样品剪成 2 cm×5 cm 左右的小块进行超声洗净, 每次超声 10 min, 3~4 次直到清洗液比较清澈。将样品于超净工作台中进行表面消毒处理: 次氯酸钠浸泡 3~5 min (根 4 min, 茎叶 3 min), 2.5% 硫代硫酸钠处理 10 min; 75% 酒精灭菌 3~5 min (根 2 min, 茎叶 1.5 min); 用 5% 碳酸氢钠溶液处理 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 °C 培养 3~6 周, 待放线菌长出。纯化后的菌株置于 20% 甘油中 -80 °C 保存。为确保内生放线菌的分离, 同时采用漂洗液检验法^[19]和组织印迹法^[20]进行表面灭菌效果的检验。两种表面消毒效果检测的平板在 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。

1.2.2 拮抗菌株的筛选: (1) 拮抗菌株的初筛: 采用对峙生长法^[21]。将培养 7 d 的病原真菌菌饼($\Phi=6$ mm)接种于 PDA 培养基平板中央, 用灭菌后的竹签挑取大小相同的放线菌单菌落放在距离病菌菌饼四周 3 cm 处, 在培养皿背面标记放线菌的编号, 以纯接种病菌菌饼的平板作对照, 重复 3 次。在 28 °C 的培养箱中培养 5~7 d 后, 观测抑菌效果, 确定有明显抑菌圈的菌株具有抑菌作用。(2) 拮抗菌株的复筛及菌株 KLBMP 5501 的拮抗活性检测: 采用生长速率法^[22]。将放线菌接种于装有 50 mL 发酵培养基的 300 mL 摇瓶中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 7 d 后, 于 5 000 r/min 离心, 用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌得到滤液。取 2 mL 滤液, 按滤液: 培养

基=1:9 的比例与 18 mL 的 PDA 培养基(灭菌后冷却至 60 °C 左右)混合倒平板, 将培养 7 d 的植物病原真菌菌饼($\Phi=6$ mm)放置于平板上, 每个处理 3 个平行, 28 °C 培养 5~7 d 后测量菌落直径(十字交叉测量 2 次, 取平均值), 以 3 次平行菌落直径的平均值计算抑菌率。

抑菌率=[(对照组的病原菌落半径-对峙培养中病原菌落半径)/对照的病原菌落半径]×100%。

1.2.3 拮抗放线菌株的鉴定: (1) 形态、培养特征: 显微形态特征取 28 °C 条件下 ISP 2 培养基培养 14 d 的埋片进行观察, 菌丝特征用扫描电镜观察 (JSM5600LV, JEOL)^[23]。菌株 KLBMP 5501 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^[17]。(2) 生理生化特征: 参照《链霉菌鉴定手册》推荐的标准培养基和常用生理生化方法培养、观察和记录^[17]。牛奶凝固胨化、明胶液化、淀粉水解、纤维素分解、黑色素和 H₂S 产生等及 pH、温度、NaCl 浓度耐受性实验^[23]。(3) 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与系统发育分析: 菌株 KLBMP 5501 总 DNA 经微波法^[24]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 产物送上海生工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, 随后用 MEGA 6.0 软件进行序列比对并用邻接法 (Neighbour-Joining) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 内生放线菌的分离

从银杏的根、茎、叶中共分离纯化获得内生放线菌 156 株, 其中有 98 株分离自根, 50 株分离

自茎, 8 株分离自叶, 分别占总分离数的 62.8%、32.1%和 5.1%, 根中的内生放线菌数量要多于茎和叶。

2.2 内生放线菌的抗菌活性

针对 13 个病原真菌菌株的抗菌活性筛选结果表明, 156 株内生放线菌中有 47 株菌对至少一个病原真菌菌株具有拮抗作用, 活性菌株比例为 30.1%, 其中对 3 个以上病原真菌菌株有拮抗作用的有 24 株, 占分离总菌数的 15.4%。且对 13 株指示菌有拮抗作用的内生放线菌活性菌株数不同(表 1)。

2.3 菌株 KLBMP 5501 的抗菌谱

抗菌活性结果统计表明, 菌株 KLBMP 5501 具

有较好的抗菌活性, 且抗菌谱广, 对 13 株指示菌株均具有拮抗性, 对其中 8 株菌的抑菌率高于 50% (表 2)。

2.4 菌株 KLBMP 5501 的鉴定

2.4.1 形态、培养特征: 在高氏 1 号合成琼脂培养基上, KLBMP 5501 气丝白色, 在 28 ℃ 培养 7 d 后逐渐转变成紫色, 有可溶性色素(图 1)。在扫描电镜下(图 2), 菌株 KLBMP 5501 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, 孢子呈圆柱状, 表面光滑, 表现出典型的链霉菌属的特征。菌株 KLBMP 5501 在大多数培养基上均生长良好(表 3)。

表 1 对各个指示菌菌株具有高抗菌活性的内生放线菌数 Table 1 Number of endophytic actinomycetes with high antimicrobial activities against indicator strains			
指示菌菌株 Indicator strains	活性菌株数 Number of active strains	指示菌菌株 Indicator strains	活性菌株数 Number of active strains
JSPA1201	20	JSPF1211	9
JSPB1202	15	JSPP1212	10
JSPC1203	21	JSPU1213	12
JSPP1205	14	CFCC7900	16
JSPF1206	15	CFCC8430	19
JSPF1207	9	KLBMP 01234	17
JSPA1208	9		

表 2 菌株 KLBMP 5501 的抗菌活性 Table 2 Antimicrobial activity of strain KLBMP 5501			
指示菌菌株 Indicator strains	实验组直径 Diameter of the experimental group (mm)	对照组直径 Diameter of the control group (mm)	抑菌率 Inhibition rate (%)
JSPA1201	1.57	5.45	71.2
JSPB1202	3.17	7.63	57.3
JSPC1203	3.08	7.05	56.3
JSPP1205	4.72	8.95	47.3
JSPF1206	5.25	7.50	30.0
JSPF1207	6.13	8.80	30.3
JSPA1208	4.57	8.00	42.9
JSPF1211	3.58	7.35	51.3
JSPP1212	1.85	5.00	63.0
JSPU1213	3.28	8.40	61.0
CFCC7900	3.33	7.63	56.4
CFCC8430	2.63	7.20	63.5
KLBMP 01234	1.90	7.55	74.8

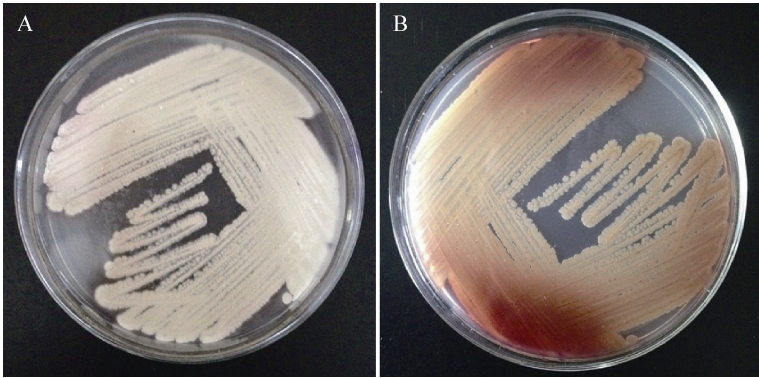


图 1 菌株 KLBMP 5501 在高氏 1 号培养基上的菌落

Figure 1 Colony morphology of strain KLBMP 5501 on Gause's synthetic No.1 agar

注: A: 平板正面; B: 为平板背面.

Note: A: The front of the plate; B: The back of the plate.

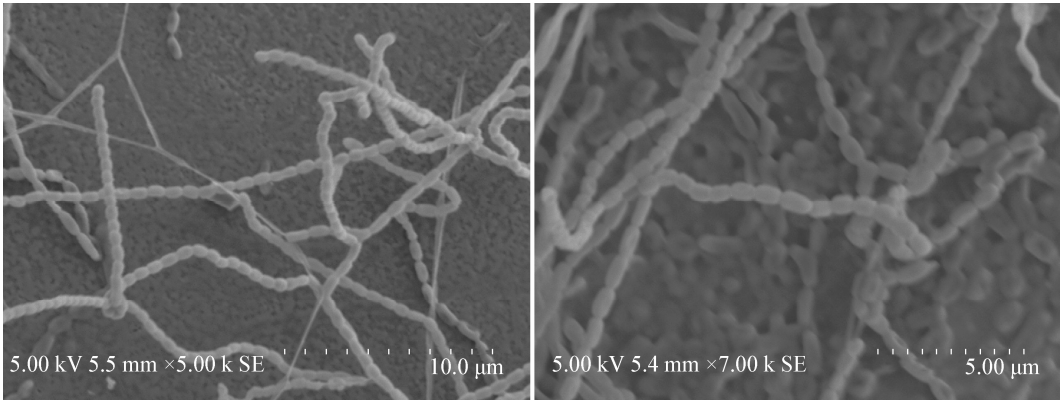


图 2 扫描电镜下菌株 KLBMP 5501 的形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of strain KLBMP 5501 by scanning electronmicroscope

注: A: KLBMP 5501 在扫描电镜下的微观形态(5 000×); B: KLBMP 5501 在扫描电镜下的微观形态(7 000×).

Note: A: The microcosmic modality of KLBMP 5501 in the scan electron microscope (5 000×); B: The microcosmic modality of KLBMP 5501 in the scan electron microscope (7 000×).

表 3 菌株 KLBMP 5501 的培养特征				
Table 3 Cultural characteristics of strain KLBMP 5501				
培养基 Medium	基质菌丝 Substrate mycelium	气生菌丝 Aerial mycelium	菌落生长状况 Growth	可溶性色素 Soluble pigment
M-1	乳白色带浅紫色	乳白色带浅紫色	粉状, 中央凸起	无
M-2	象牙黄	象牙黄	粉状, 中央凸起	无
M-3	象牙黄	象牙黄色带浅紫色	毛绒状, 中央凸起	无
M-4	乳白色带浅紫色	乳白色带浅紫色	粉状, 中央凸起	无
M-5	桂皮棕至芒果棕	乳黄	山峰状皱起凸起	无
M-6	尘灰色	象牙黄	粉状, 中央凸起	无
M-7	桂皮棕	象牙黄	毛绒状, 中央凸起	无
M-8	乳白色带浅紫色	乳黄带浅紫色	粉状, 中央凸起	有
M-9	象牙黄	象牙黄	毛绒状, 中央凸起	无

2.4.2 生理生化特征:菌株 KLBMP 5501 水解淀粉能力弱,不能水解纤维素,能液化明胶,能够使牛奶不凝固但胨化,不能产生黑色素及硫化氢,革兰氏染色及结晶紫染色呈阳性,产生过氧化氢酶,不能降解苯酚;能利用阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖等碳源,不能利用果糖、纤维二糖、山梨醇、肌醇;

能利用甘氨酸、精氨酸、谷氨酸等氮源(表 4)。菌株 KLBMP 5501 适宜在偏碱性的环境中生长(表 5);其最适宜的生长温度是 28 ℃,在 4 ℃ 和 45 ℃ 时 20 d 内不生长,37 ℃ 和 40 ℃ 时生长缓慢(表 6);适宜其生长的盐浓度为 6%–10%,盐浓度过低或者过高都不适宜此菌生长(表 7)。

表 4 菌株 KLBMP 5501 的生理生化特征			
Table 4 Physiological and biochemical characteristics of strain KLBMP 5501			
实验项目	Test items	结果	Results
果糖	D-Fructose	—	
阿拉伯糖	L-(+)Arabinose	+	
纤维二糖	D-(+)Cellobiose	—	
半乳糖	D-(+)Galactose	+	
甘露糖	D-Mannose	+	
棉籽糖	D-Raffinose	+	
葡萄糖	Glucose	+	
蔗糖	Sucrose	+	
木糖醇	Xylitol	+	
山梨醇	D-Sorbitol	—	
肌醇	Inositol	—	
甘露醇	D-Mannitol	+	
麦芽糖	Maltose	+	
淀粉水解	Starch hydrolysis	W	
纤维素水解	Hydrocellulose	—	
革兰氏染色	Gram's stain	+	
结晶紫	Crystal violet, 0.001% (W/V)	+	
甘氨酸	Glycine	+	
精氨酸	L-Arginine	+	
谷氨酸	L-Glutamic	+	
脯氨酸	L-Proline	+	
L-组氨酸	L-Histidine	+	
赖氨酸	L-Lysine	+	
缬氨酸	L-Valine	+	
酪氨酸	L-Tyrosine	+	
丝氨酸	L-Serine	+	
半胱氨酸	L-Cysteine	+	
明胶液化	Gelatin liquefaction	W	
牛奶固化	Coagulation of milk	—	
牛奶胨化	Peptonize of milk	+	
黑色素的产生	Melanin eneration	—	
H ₂ S 的产生	Production of H ₂ S	—	
过氧化氢酶	Catalase	+	
苯酚	Phenol, 0.1% (W/V)	—	

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.

表 5 菌株 KLBMP 5501 的 pH 生长耐受性实验		
Table 5 Growth resistance experiment of strain KLBMP 5501 at different pH values		
pH	生长状况	Growth status
4.0	+	
5.0	++	
6.0	+++	
7.0	+++	
8.0	+++	
9.0	+++	
10.0	+++	

注: +: 生长比较贫乏; ++: 生长良好; +++: 生长旺盛。

Note: +: Strain can weakly grow; ++: Strain can grow well; +++: Strain can grow vigorously.

表 6 菌株 KLBMP 5501 的温度生长耐受性实验		
Table 6 Growth resistance experiment of strain KLBMP 5501 at different temperatures		
温度	Temperature (°C)	生长状况
4		—
28		+++
37		++
40		+
45		—

注: —: 不生长; +: 生长比较贫乏; ++: 生长良好; +++: 生长旺盛。

Note: —: Strain can't grow; +: Strain can weakly grow; ++: Strain can grow well; +++: Strain can grow vigorously.

表 7 菌株 KLBMP 5501 的 NaCl 生长耐受性实验							
Table 7 Growth resistance experiment of strain KLBMP 5501 at different concentrations of NaCl							
NaCl (%)		生长状况	Growth status	NaCl (%)		生长状况	Growth status
1			—	6			+++
2			—	7			+++
3			++	8			+++
4			++	9			+++
5			++	10			++

注: —: 不生长; +: 生长比较贫乏; ++: 生长良好; +++: 生长旺盛。
Note: —: Strain can't grow; +: Strain can weakly grow; ++: Strain can grow well; +++: Strain can grow vigorously.

2.4.3 16S rRNA 基因序列相似性及系统发育分析: 菌株 KLBMP 5501 的 16S rRNA 基因序列的有效片段长度为 1 436 bp, 提交 GenBank 数据库序列号为 KP636799。在 EzTaxon 数据库中进行有效种的序列相似性搜索,发现菌株 KLBMP 5501 与链霉菌属的菌株高度相关,说明此菌株是链霉菌属的成员。与菌株 KLBMP 5501 相似性最高的链霉菌属的有效种为浅紫链霉菌(*S. violascens*, 相似性为 99.57%), 其次为黄白链霉菌(*S. albidoflavus*, 99.30%), 氢化链霉菌(*S. hydrogenans*, 99.23%), 索马里链霉菌(*S. somaliensis*, 99.23%)。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析也显示菌株 KLBMP 5501 与链霉菌菌株 *S. violascens* 同在一个进化分支上(图 3), 该菌株属于紫链霉菌的一个菌株。

3 讨论

近年来,化学农药带来的食品安全问题和环境污染问题倍受关注,一些危险性的农药已经被禁用,利用有益微生物防治成为植物病害治理的研究热点。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^[25]。放线菌能产生抗菌素,对许多细菌和真菌都具有较强的抑制作用,是一类有很大应用潜力的微生物资源,在生物防治中显示出了广阔的应用前景。

关于银杏的研究主要集中在其产生的银杏内酯、黄酮等化合物,而针对银杏内生放线菌拮抗植物病原真菌研究的报道相对较少。本研究从银杏中分离获得的 156 株内生放线菌中活性菌株有 47 株。

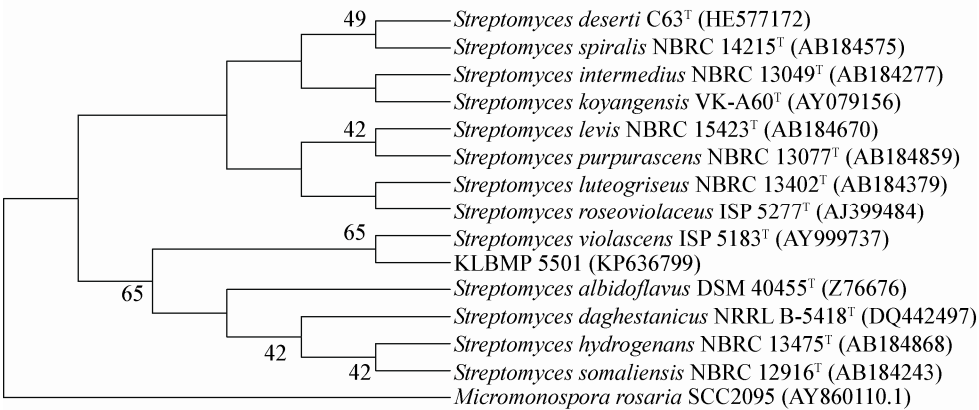


图 3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree by Neighbour-Joining based on the 16S rRNA gene sequences of strain KLBMP 5501 and related streptomyces species

Note: Numbers on branch nodes are bootstrap values (1 000 resamplings). Bar, 0.5% sequence divergence.

菌株 KLBMP 5501 具有广谱抗菌活性, 对本实验中 13 株指示菌株的其中 8 株的抑制率高于 50%, 具有很好的生物防治的潜力。通过形态和培养特征表现出典型的链霉菌属的特征, 结合生理生化特征及 16S rRNA 基因序列分析, 初步鉴定菌株 KLBMP 5501 为一株浅紫链霉菌(*S. violascens*)。目前将从银杏中分离得到的内生放线菌应用于防治植物病害的研究尚未见报道, 开展对银杏内生放线菌的研究可以为其在生产实践中的应用奠定基础。然而菌株 KLBMP 5501 对植物病害的防治实验、抗生素的分离纯化及其抑菌机理均有待进一步研究, 期望在植物病害防治领域中开发具有应用前景的抗菌产品。

参 考 文 献

- [1] Stone JK, Bacon CW, White JF. Microbial Endophytes[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29
- [2] Huang XH, Li S, Tan ZJ, et al. Progress of study on endophytic actinomycetes in plant[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(1): 42-46 (in Chinese)
黄晓辉, 李珊, 谭周进, 等. 植物内生放线菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(1): 42-46
- [3] Jiang JS, Zhang X. Recent advance on endophytes producing antibacterial active substances[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(22): 11704-11705, 11761 (in Chinese)
江军山, 张鑫. 产抗菌活性物质植物内生菌的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(22): 11704-11705, 11761
- [4] Huang YC, Yan X, Wang JH, et al. Identification of a bioactive endophytic actinomycete TGBNBSA5 and study on its active substances[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2012, 21(8): 26-31, 37 (in Chinese)
黄以超, 颜霞, 王建华, 等. 生防放线菌 TGNBSA5 的鉴定及其活性物质的研究[J]. 西北农业学报, 2012, 21(8): 26-31, 37
- [5] Luo JJ, Li H, Geng P, et al. Isolation and identification of actinomyce strain MY-4 and its antagonistic activity against pathogenic fungi of fruits and vegetables[J]. Journal of Fruit Science, 2012, 29(4): 644-649 (in Chinese)
罗建军, 李辉, 耿鹏, 等. 拮抗放线菌 MY-4 的分离、鉴定及其对果蔬病原菌的抑制作用[J]. 果树学报, 2012, 29(4): 644-649
- [6] Zhang L, Ji MS, Yu ZG. Antifungal activities and stability of metabolites from *Streptomyces rochei* YL-2 against pyricularia oryzae[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2014, 45(2): 143-146 (in Chinese)
张丽, 纪明山, 于志国. 娄彻氏链霉菌 YL-2 代谢产物对稻瘟病菌的抑制活性及其稳定性[J]. 沈阳农业大学学报, 2014, 45(2): 143-146
- [7] Shentu XP, Yu XP. Endophytic fungi with anti-pathogenic fungi activities isolated from Ginkgo[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2006, 18(5): 317-320 (in Chinese)
申屠旭萍, 俞晓平. 银杏中抗病病原真菌的内生真菌的分离筛选[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(5): 317-320
- [8] Guo JX, Sun GY, Zhang R, et al. Isolation and screening endophytic fungi of antifungal isolates from in *Ginkgo biloba* L.[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2005, 14(4): 14-17 (in Chinese)
郭建新, 孙广宇, 张荣, 等. 银杏内生真菌抗真菌活性菌株的分离和筛选[J]. 西北农业学报, 2005, 14(4): 14-17
- [9] Yang XM, Chen J, Qian ZY, et al. Study on the antibacterial activity of Ginkgolic acids[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2002, 25(9): 651-653 (in Chinese)
杨小明, 陈钧, 钱之玉, 等. 银杏酸抑菌效果的初步研究[J]. 中药材, 2002, 25(9): 651-653
- [10] Ding ZE. The value and the development of research of Ginkgo leaves[J]. Economic Forest Researches, 2003, 21(4): 128-130 (in Chinese)
丁之恩. 银杏叶的利用价值及其研究进展[J]. 经济林研究, 2003, 21(4): 128-130
- [11] Zhao SQ, Cai YF, Wen YX, et al. Inhibition of extract from exopleura of Ginkgo biloba on pathogens attaching crops[J]. Agro-Environmental Protection, 2001, 20(5): 368-369 (in Chinese)
赵肃清, 蔡燕飞, 文永新, 等. 银杏外种皮提取液对农作物病原菌抑制效应研究[J]. 农业环境保护, 2001, 20(5): 368-369
- [12] Zhan MG. Biodiversity of antagonistic endophytic actinomycetes from Ginkgo biloba and etiological study of lactuca sativa leaf blight[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest Agriculture and Forestry University, 2006 (in Chinese)
詹刚明. 银杏颞颥内生放线菌生物多样性暨莴苣叶疫病病原菌抑制效应研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2006
- [13] Yang RX, Tao YF, Song MX, et al. Inhibition of endophytic bacterial strains isolated from Ginkgo biloba against phytophthora blight of pepper[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(4): 552-559 (in Chinese)
杨瑞先, 陶玉凤, 宋美仙, 等. 银杏内生细菌防治辣椒疫病研究[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(4): 552-559
- [14] Zhang BG, Zhang XH, Shi YG, et al. Analysis on the development status and countermeasures of deep processing industry of Ginkgo in Pizhou[J]. Manager Journal, 2014(21): 134 (in Chinese)
张保国, 张晓惠, 史云贵. 邳州银杏深加工产业发展现状与对策分析[J]. 经营管理, 2014 (21): 134
- [15] Du HJ, Su J, Yu LY, et al. Isolation and physiological characteristics of endophytic actinobacteria from medicinal plants[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(1): 15-23 (in Chinese)
杜慧竟, 苏静, 余利岩, 等. 药用植物内生放线菌的分离和生物学特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(1): 15-23
- [16] Wei YZ, Zhang YQ, Zhao LL, et al. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from mangroves at shankou of Guangxi Province[J]. Microbiology China, 2010, 37(6): 823-828 (in Chinese)
魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 等. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(6): 823-828

- [17] Group of actinomycetes taxonomy institute of microbiology chinese academy of science translating and editing. Streptomyces Classification Manual[M]. Beijing: Science Press, 1975 (in Chinese)
中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌分类手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975
- [18] Li HY, Ruan GH, Li ZY, et al. Isolation, antioxidant and antibacterial activities of endophytic fungi from *Osmanthus fragrans*[J]. Journal of Guilin University of Technology, 2014, 34(1): 138-144 (in Chinese)
李海云, 阮贵华, 李子院, 等. 桂花树内生真菌的分离及其抗氧化抑菌活性[J]. 桂林理工大学学报, 2014, 34(1): 138-144
- [19] Mcinroy JA, Kloepper JW. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn[J]. Plant and Soil, 1995, 173(2): 337-342
- [20] Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, et al. Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth[J]. Biology and Fertility of Soils, 1997, 25(1): 13-19
- [21] Ou XC, Liu F, He H, et al. Antifungal activity of mangrove endophytic bacterium AmS2 against plant pathogenic fungi[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2013, 40(5): 73-75 (in Chinese)
欧雄常, 柳凤, 何红, 等. 红树内生细菌 AmS2 对多种植物病原真菌的抑制作用[J]. 广东农业科学, 2013, 40(5): 73-75
- [22] Huang DL, Xu YJ, Yuan GF, et al. A simple and rapid preparation method for actinomycetes scanning electron microscopy sample[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010(17): 8849-8850 (in Chinese)
黄大林, 徐雅娟, 袁桂峰, 等. 放线菌扫描电镜样品简便快速的制备方法[J]. 安徽农业科学, 2010(17): 8849-8850
- [23] Zhang JY, Zhang QR, Xiang WH, et al. Screening, identification and physiological characteristics of an actinomycete strain against *Rhizoctonia solani*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(2): 394-399 (in Chinese)
张靖宜, 张倩茹, 项文化, 等. 一株拮抗立枯丝核菌的放线菌筛选、鉴定及生理特征[J]. 生态学杂志, 2014, 33(2): 394-399
- [24] Xu P, Li WJ, Xu LH, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes[J]. Microbiology China, 2003, 30(4): 82-84 (in Chinese)
徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA[J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84
- [25] Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress[J]. Journal of Antibiotics, 2009, 62(1): 5-16
- ~~~~~
- (上接 p.1009)

征 稿 简 则

3 写作要求

来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.1 图表

文中的图表须清晰简明, 文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm (占半栏), 大图的宽度应小于 17 cm (通栏)。

3.2 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出, 多于 3 人时列出前 3 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前、名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Marcella C, Claudia E, Pier GR, et al. Oxidation of cystine to cysteic acid in proteins by peroxyacids as monitored by immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 1991, 12(5): 376-377
- [2] Wang BJ, Liu SJ. Perspectives on the cultivability of environmental microorganisms[J]. Microbiology China, 2013, 40(1): 6-17 (in Chinese)
王保军, 刘双江. 环境微生物培养新技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2013, 40(1): 6-17
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

脚注(正文首页下方):

基金项目: 基金项目(No.)

*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 2015-00-00; 接受日期: 2015-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-00-00

(下转 p.1088)