

牡丹根部内生细菌的分离鉴定及脂肽类物质的拮抗活性研究

杨瑞先* 姬俊华 王祖华 刘萍 薛冬 王瓚杨

(洛阳理工学院 环境工程与化学系 河南 洛阳 471023)

摘要:【目的】从牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)根部组织中分离鉴定内生细菌,测定拮抗菌株脂肽类活性物质的体外抑菌活性。【方法】采用平板对峙法筛选对牡丹灰霉病菌(*Botrytis paeoniae* Oadem)、牡丹炭疽病菌(*Gloeosporium* sp.)、牡丹黑斑病菌(*Altenaria* sp.)、牡丹黄斑病菌(*Phyllosticta commonsii*)有拮抗作用的内生细菌。基于形态特征、生理生化特性和16S rRNA基因序列同源性鉴定拮抗菌株。根据脂肽类抗菌物质合成相关基因序列对拮抗菌株进行基因扩增检测,采用酸沉淀法提取拮抗菌株的脂肽类物质,平板对峙法测定脂肽类物质的体外抑菌活性。【结果】从牡丹根部组织中共分离获得62株内生细菌,其中菌株Md31和Md33对4种病原菌均有较明显的抑制作用。Md31和Md33被鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。通过对菌株Md31和Md33进行5个脂肽类合成功能基因***bmyB***、***fenD***、***ituC***、***srfAA***和***srfAB***的检测,序列同源性分析,表明两个菌株具有合成脂肽类物质的能力。菌株Md31和Md33的脂肽类粗提物对所测试的牡丹病原真菌均具有不同程度的抑制作用。【结论】获得了2株对牡丹病原菌有良好抑制效果的解淀粉芽孢杆菌Md31和Md33,2个菌株的脂肽类粗提物也具有较强的体外抑菌活性,该研究为牡丹内生细菌的进一步开发应用奠定了基础。

关键词: 牡丹, 内生细菌, 拮抗活性, 鉴定, 抗菌脂肽类物质

Isolation, indentification and inhibitory activity of lipopeptides of endophytic bacteria from the root of *Paeonia suffruticosa*

YANG Rui-Xian* JI Jun-Hua WANG Zu-Hua LIU Ping XUE Dong
WANG Zan-Yang

(Department of Environmental Engineering and Chemistry, Luoyang Institute of Science and Technology,
Luoyang, Henan 471023, China)

Abstract: [Objective] To isolate and identify endophytic bacteria from the roots of *Paeonia suffruticosa* and evaluate antifungal activity of secondary metabolites of antagonistic strains *in vitro*. [Methods] The endophytic bacteria were screened against *Botrytis paeoniae*, *Gloeosporium* sp., *Altenaria* sp., *Phyllosticta commonsii* through the method of dual culture. The strains were indentified based on characteristics in morphology, physiology, biochemistry and phylogenetic analysis of 16S

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 41101222); 河南省教育厅科技攻关计划项目(No. 14A180024)

*通讯作者: Tel: 86-379-65928271; ✉: fairy19790805@163.com

收稿日期: 2014-08-19; 接受日期: 2014-11-24; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-11-26

rRNA gene sequences. The lipopeptide biosynthetic genes fragments of antagonistic strains were amplified by polymerase chain reaction. The crude lipopeptides of strains were obtained through acid precipitate method. The inhibition ability of lipopeptides produced by antagonistic strains against pathogenic fungi was evaluated *in vitro*. **[Results]** The 62 endophytic bacterial isolates were isolated from the roots of *Paeonia suffruticosa*. The isolates Md31 and Md33 showed inhibitory activity against four pathogens. Md31 and Md33 were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The genes fragments of *bmyB*, *fenD*, *ituC*, *srfAA* and *srfAB* were obtained in genomic DNA of the two strains. The crude lipopeptides produced by Md31 and Md33 were isolated from culture supernatants and exhibited inhibitory activity on mycelium growth of peony pathogens. **[Conclusion]** Two antagonistic *B. amyloliquefaciens* strains Md31 and Md33 were obtained, and their crude lipopeptides showed inhibitory activity against four peony pathogens *in vitro*, which will be provided a basis for the further development and application of peony endophytes.

Keywords: *Paeonia suffruticosa*, Endophytic bacteria, Inhibitory activity, Identification, Antimicrobial lipopeptide metabolites

植物内生细菌(Endophyte)是指一类在其部分或全部生活史中存活于健康植物组织内部,而不使宿主植物表现出明显感染症状的微生物^[1]。近年来研究发现,内生细菌在与寄主共同进化的过程中,能够产生与寄主植物相同或相近的活性物质^[2]。药用植物内生菌代谢产物是一类尚未被完全开发的天然化合物资源,因此从药用植物内生菌中寻找生物活性成分已成为研究热点。芽孢杆菌是常见的植物内生细菌种类,也是一类重要的生物防治资源^[3]。芽孢杆菌产生的拮抗物质在生物防治中起着关键作用,脂肽类物质是其主要抗菌物质之一,主要包括枯草菌素(Subtilin)、伊枯草菌素(Iturins)、杆菌肽(Bacitracin)、丰原素(Fengycins)和表面活性素(Surfactin)等^[4],这些物质在植物内生菌防治植物病害的过程中发挥着重要的作用。

牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)为芍药科芍药属的多年生落叶灌木,是我国特有的传统花卉,具有极高的观赏价值和药用价值^[5]。牡丹的根可入药,中药名称为“丹皮”,丹皮在抗菌、消炎、降血糖、降血脂、抗癌等方面具有较好疗效,其药理作用广泛,具有广阔的应用前景^[6-8]。目前国内仅有何建清等^[9]对来自西藏地区大黄花牡丹的内生真菌和放线菌进行了分离;苗翠苹、吴少华和胡娟等对云南省嵩明县滇牡丹内生真菌进行了分离,并对其中的3株内生真菌交链孢霉属真菌(*Alternaria* sp.) PR-14、

长梗木霉(*Trichoderma longibrachiatum*) PR35 和高大毛壳(*Chaetomium elatum*) PR20 的次生代谢产物进行了分析和研究^[10-14],国内几乎没有关于牡丹内生细菌的研究报道。

本研究以传统药用植物牡丹根部组织为材料,进行内生细菌的分离,以期获得丰富的内生细菌资源库,同时以抗真菌活性为依据进行内生细菌的筛选工作,并对其产生的脂肽类粗提物进行初步分离和体外抑菌活性的评价,从而为牡丹内生菌的进一步开发应用提供基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试植物:牡丹根部组织分别采自洛阳市中国国花园、隋唐遗址植物园和洛阳理工学院校园牡丹种植区,采集时间为2014年3-4月份。

1.1.2 指示植物病原菌:牡丹灰霉病菌(*Botrytis paeoniae* Oadem)、牡丹炭疽病菌(*Gloeosporium* sp.)、牡丹黑斑病菌(*Alternaria* sp.)、牡丹黄斑病菌(*Phyllosticta commonsii*)均为本实验室分离保存。

1.1.3 培养基:牡丹根皮内生细菌的分离培养基为TSA培养基^[15],菌株液体培养用NB培养基(28 °C, 180 r/min, 48 h);病原真菌培养用PDA培养基^[15];菌株对病原真菌拮抗作用的测定用改良PDA培养基(其中加有蛋白胨5 g/L);拮抗菌株脂肽类粗提物

的分离用 Landy 培养基^[16]。

1.1.4 生化试剂: *rTaq* DNA 聚合酶、dNTP、DNA marker 和 pM18-T 载体等购自宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖购自 Spanish 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN Bacterial DNA Kit)和琼脂糖凝胶回收试剂盒(TIANGEN Gel Extraction Kit)购自北京天根生化科技公司; 其他均为常规试剂。PCR 扩增引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 丹皮内生细菌的分离纯化: 将采集的新鲜牡丹根部组织在自来水下冲洗干净晾干, 剥下外层根皮, 随机称取根皮 5 g, 表面消毒(70%酒精 1 min, 5%次氯酸钠 5 min)后, 无菌水冲洗 5 次晾干。每个样品加 3 mL 无菌水研碎, 静置 15 min 后, 取 0.1 mL 匀浆液涂布于 TSA 平板。样品以最后一次无菌水洗涤液为对照, 以检测表面消毒是否彻底。定期观察分离平板, 挑取菌落颜色、大小、突起特征、边缘特征、表面光滑与否和透明度等肉眼可辨的特征不同的单菌落在 NA 平板上纯化和保存。

1.2.2 拮抗细菌菌株的筛选: 采用平板对峙培养法, 在直径 9 cm 的改良 PDA 平板中央接直径为 5 mm 的牡丹病原菌菌丝块, 在距培养皿边缘 9 mm 处对称点接内生细菌菌株, 对照只接病原菌菌丝块, 28 °C 培养 7 d 后测量抑菌带的宽度, 计算抑菌率, 每个处理重复 3 次。

抑菌率=(对照菌落直径-处理组菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)×100%。

1.2.3 拮抗菌株的鉴定: (1) 菌株 Md31 和 Md33 的常规鉴定。菌体形态观察、菌株培养特征观察、需氧性和运动性测定、生长温度测定、耐盐试验、柠檬酸盐和丙二酸盐利用试验、接触酶和氧化酶试验、苯丙氨酸酶试验、甲基红和 V-P 试验、糖醇类发酵试验、硝酸盐还原试验、亚硝酸盐还原试验、淀粉水解、果胶水解、蛋白酶水解、纤维素水解、明胶液化和吡啶试验, 测定方法均参照

文献[17]。

(2) 菌株 Md31 和 Md33 的 16S rRNA 基因扩增检测及序列鉴定。内生细菌菌株 Md31 和 Md33 基因组 DNA 的提取及通用引物扩增 16S rRNA 基因的方法参考文献[18]。纯化扩增产物、克隆测序, 对测序获得的 16S rRNA 基因序列利用 GenBank 中的 BLAST 软件进行同源性分析, ClustalX 对排后, BioEdit 软件剪切后, MEGA 4.1 软件构建系统进化树, 使用 Neighbor-Joining 法进行 1 000 次步长计算, 距离模型为 Maximum Composite Likelihood Model。

1.2.4 拮抗菌株与脂肽类物质合成相关的功能基因分析: 采用扩增枯草芽孢杆菌功能基因 *bmyB*、*fenD*、*ituC*、*srfAA* 和 *srfAB* 的 5 对特异引物对拮抗菌株 Md31 和 Md33 的脂肽类物质合成功能基因进行分析, 引物序列及扩增条件均参考文献[19]。扩增产物的回收、克隆和测序与菌株 16S rRNA 基因序列的操作方法相同。

1.2.5 菌株脂肽类粗提物的制备: 将菌株在 NB 中活化培养, 取 3 mL 接种 Landy 培养基中(250 mL 三角瓶中装 80 mL Landy 培养基), 30 °C、160 r/min 条件下振荡培养 36 h, 培养结束后, 将培养物 10 000 r/min 离心 20 min 去除菌体细胞, 上清液用 6 mol/L HCl 调 pH 至 2.0, 4 °C 过夜, 12 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀。在沉淀物中加入甲醇抽提 2 次, 将两次抽提液合并, 用 2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 真空冷冻干燥机冷冻干燥抽提物, 加入甲醇溶解再次冷冻干燥, 获得脂肽类物质粗提物, 用磷酸盐缓冲液溶解备用^[20-21]。

1.2.6 脂肽类物质牡丹病原真菌的抑制作用: 采用牛津杯对峙培养法, 取培养好的 PDA 平板上直径为 5 mm 的牡丹灰霉病菌和炭疽病菌, 接种在 PDA 平板中央, 在距培养皿边缘 1.5 cm 处对称插入牛津杯, 在牛津杯中加入 200 μL 脂肽类物质粗提物, 对照只接病原真菌菌丝块, 28 °C 培养, 待各对照长满整个平板后测量抑菌带的宽度, 抑菌带宽度为菌饼与牛津杯之间的宽度, 每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 抑制牡丹病原真菌的内生细菌的筛选

经过组织表面消毒法,从牡丹根部组织中共分离获得 62 株内生细菌菌株,平板对峙培养筛选出 6 株对牡丹病原真菌均有不同程度抑制作用的拮抗菌株(表 1)。与对照牡丹病原菌相比,接种内生细菌的病原菌菌丝的生长均受到明显的抑制,其中菌株 Md31 和 Md33 的拮抗活性较高,抑菌效果较好,对牡丹 4 种病原菌的抑菌带宽度均在 4 mm 以上,抑制率均在 50%以上。菌株 Md10、Md15、Md44 和 Md53 抗菌谱也较广,但对 4 种牡丹病原真菌的抑制作用较弱。

2.2 内生细菌菌株的鉴定结果

2.2.1 常规鉴定: 菌株 Md31 在 NA 培养基上的表现为前期菌落平铺、干燥、白色,后期菌落中央形成褶皱(图 1A); 菌株 Md33 在 NA 培养基上的表现为前期呈水滴状、无色、边缘整齐、粘稠,后期呈不规则状,表面凹陷、有褶皱(图 1B)。经革兰氏染色后,均为阳性,菌体为杆状(图 1C)。生理生化测定结果表明,两个菌株均为兼性厌氧菌,生长温度范围广,在 20–55 °C 均可生长,最适生长温度

28–37 °C, 最适 pH 为 6.8, 能在 10% NaCl 中生长, 甲基红试验测定为阴性, V-P 反应为阳性, 氧化酶测定结果为阳性, 接触酶测定为阳性, 可利用多种单糖, 不能产生吡啶, 能水解淀粉, 但不能液化明胶, 苯丙氨酸脱氨酶反应呈阴性, 纤维素酶反应呈阳性, β -1,3-1,4 葡聚糖酶反应呈阳性。根据形态特征和生理生化特征, 初步将这 2 个菌株归于芽孢杆菌属。

2.2.2 16S rRNA 基因序列分析: 16S rRNA 基因的 PCR 扩增结果表明, 菌株 Md31 和 Md33 的扩增产物分别为 1 515 bp 和 1 513 bp, 委托上海生工生物工程公司测序, 获得菌株 Md31 和 Md33 的 16S rRNA 基因全序列, 序列登录号分别为 KP059105 和 KP059106。利用 GenBank 中的 BLAST 软件对 2 个菌株的 16S rRNA 基因序列进行分析, 菌株 Md31 和 Md33 的 16S rRNA 基因序列与解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 具有较高的同源性, 其相似性都高达 99%。从结果中选取与其序列同源性较高的菌株, ClustalX 对排后, BioEdit 软件剪切, 利用 MEGA 4.1 软件构建系统发育树(图 2)。结合形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析, 将 2 个菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。

表 1 内生细菌菌株对牡丹病原真菌的抑制作用
Table 1 Inhibitory activity against pathogenic fungi of peony by endophytic isolates

病原真菌 Pathogenic fungi	抑菌带宽度 Inhibition zone (mm)					
	Md10	Md15	Md31	Md33	Md44	Md53
牡丹灰霉病菌 <i>B. paeoniae</i>	6.5	8.0	12.0	15.0	7.5	5.5
牡丹炭疽病菌 <i>Gloeosporium</i> sp.	1.5	1.0	4.5	5.0	1.0	0.5
牡丹黑斑病菌 <i>Alternaria</i> sp.	4.0	5.0	9.0	11.0	3.0	2.0
牡丹黄斑病菌 <i>P. commonsii</i>	9.0	10.0	15.0	14.0	10.0	8.0

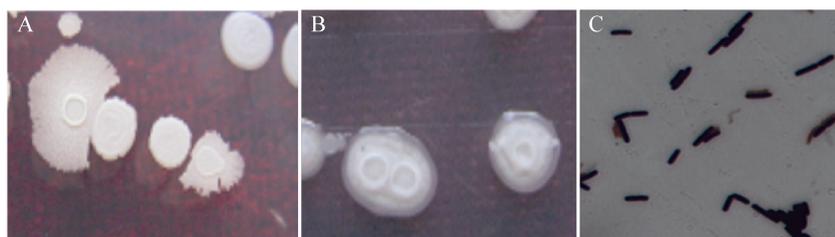


图 1 内生菌株 Md31 (A)和 Md33 (B)菌落特征及革兰氏染色反应(C)
Figure 1 Colony characters of Md31 (A) and Md33 (B) and Gram staining (C)

2.3 拮抗菌株 Md31 和 Md33 脂肽类物质合成基因分析

利用 5 对合成脂肽类物质的特异引物, 可以从 Md31 和 Md33 菌株中扩增到 *bmyB*、*fenD*、*ituC*、*srfAA* 和 *srfAB* 基因簇片段, 而对照菌株枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 168 不能扩增获得这些基因片段(图 3), 结果表明菌株 Md31 和 Md33 具有合成脂肽类物质的基因片段。扩增获得的特异条带回收纯化, 克隆测序后分别获得 *bmyB*、*fenD*、*ituC*、*srfAA* 和

srfAB 基因片段序列。利用 BLASTx 将获得的各个基因片段序列与 NCBI 数据库中非冗余蛋白质序列进行比对, 结果发现, 两个菌株与解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的脂肽类物质合成基因的蛋白质序列相似性在 92% 以上, 与芽孢杆菌属其他种类脂肽类物质合成基因的蛋白质序列相似性在 70% 以上, 说明利用特异引物所扩增到的基因片段为相应的脂肽类物质合成基因序列, 表明拮抗菌株 Md31 和 Md33 具有合成脂肽类物质的能力。

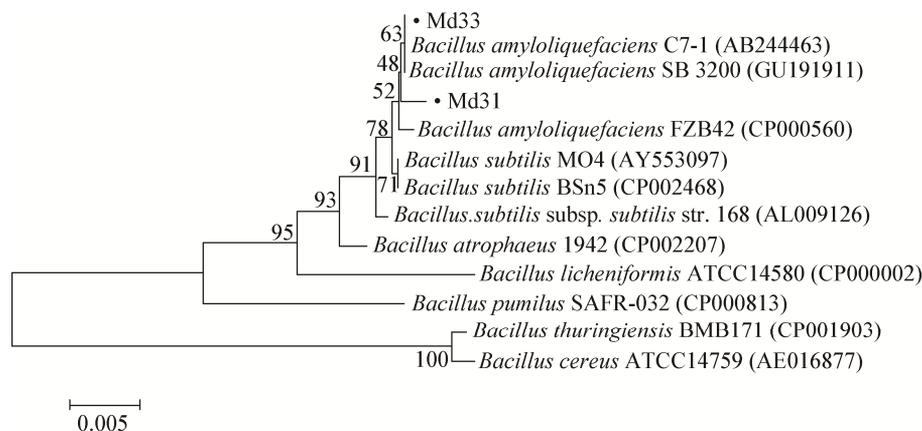


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的内生细菌系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of endophytic bacteria based on 16S rRNA gene sequences

注: 系统发育树采用邻接法构建; 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支上的数值表示经 1 000 次计算后的置信度值; 比例尺表示遗传距离。

Note: Phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Joining method. The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain. Numbers at branching points refer to bootstrap values after 1 000 times calculation. Scale indicates genetic distance.

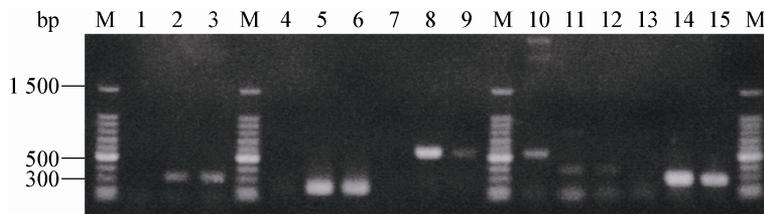


图 3 解淀粉芽孢杆菌 Md31 和 Md33 脂肽类物质合成基因扩增结果

Figure 3 Amplification of lipopeptides biosynthetic genes from strains Md31 and Md33 with specific primers

注: M: 100 bp DNA ladder marker; 1、4、7、10、13 分别代表菌株 *B. subtilis* 168 *srfAB*、*srfAA*、*ituC*、*bmyB* 和 *fenD* 基因的扩增结果; 2、5、8、11、14 分别代表菌株 Md31 *srfAB*、*srfAA*、*ituC*、*bmyB* 和 *fenD* 基因的扩增结果; 3、6、9、12、15 分别代表菌株 Md31 *srfAB*、*srfAA*、*ituC*、*bmyB* 和 *fenD* 基因的扩增结果。

Note: M: 100 bp DNA ladder marker; 1, 4, 7, 10, 13 is corresponding to gene *srfAB*, *srfAA*, *ituC*, *bmyB* and *fenD* of the strain *B. subtilis* 168, respectively; 2, 5, 8, 11, 14 is corresponding to gene *srfAB*, *srfAA*, *ituC*, *bmyB* and *fenD* of the strain Md31, respectively; 3, 6, 9, 12, 15 is corresponding to gene *srfAB*, *srfAA*, *ituC*, *bmyB* and *fenD* of the strain Md31, respectively.

2.4 脂肽类粗提物对牡丹病原菌的平板抑制作用

Md31 和 Md33 脂肽类粗提物对所测试的牡丹病原真菌均具有不同程度的平板抑制作用(表 2)。菌株 Md33 的脂肽类粗提物能够显著抑制牡丹灰霉病菌和炭疽病菌菌丝的生长,其抑菌带的宽度分别达到了 10.0 mm 和 9.7 mm,菌株 Md31 的脂肽类粗提物对这两种病原菌菌丝生长的抑制作用也较为显著,其抑菌带的宽度分别为 9.0 mm 和 10.5 mm (图 4)。2 个菌株的脂肽类粗提物对牡丹黑斑病菌和黄斑病菌菌丝的生长也具有一定的抑制作用。

表 2 Md31 和 Md33 脂肽类粗提物对牡丹病原真菌的抑制作用

Table 2 Inhibition ability produced by lipopeptides compounds of Md31 and Md33 against pathogenic fungi of peony

病原真菌 Pathogenic fungi	抑菌带宽度 Inhibition zone (mm)	
	Md31	Md33
	牡丹灰霉病菌 <i>B. paeoniae</i>	9.0
牡丹黑斑病菌 <i>Alternaria</i> sp.	0.5	1.5
牡丹黄斑病菌 <i>P. commonsii</i>	4.3	6.0
牡丹炭疽病菌 <i>Gloeosporium</i> sp.	10.5	9.7

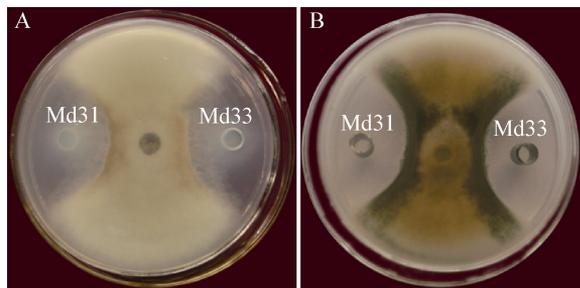


图 4 菌株 Md31 和 Md33 脂肽类粗提物对牡丹病原真菌的平板拮抗作用

Figure 4 Inhibition ability produced by lipopeptides compounds of Md31 and Md33 against pathogenic fungi of peony

注: A: 牡丹灰霉病菌; B: 牡丹炭疽病菌。

Note: A: *Botrytis paeoniae*; B: *Gloeosporium* sp..

3 讨论

尽管国内研究者已经对一些药用植物进行了内生菌的分离,并获得了一定的成果,但相对于我国丰富的药用植物资源来说,所研究的植物类群仅有数百种,相对于数量庞大的内生菌种类来说,仅涉及了其中很小一部分,因此开展更多种类药用植物内生菌的研究,丰富植物内生细菌资源库,从而为内生细菌的开发应用提供更多的资源。目前有一些研究者对药用植物如平卧菊三七(*Gynura procumbens*)^[22]、青蒿素(*Artemisia annua*)^[23]、甘草(*Glycyrrhiza* spp.)^[24]、羽芒菊(*Tridax procumbens* Linn)^[25]、猪笼草(*Nepenthes* spp.)^[26]、沉香(*Aquilaria* spp.)^[27]等进行了内生细菌的分离工作,但几乎没有关于牡丹内生细菌的研究。本研究以传统药用植物牡丹为材料,从牡丹根部组织中共分离获得了 62 株内生细菌菌株,表明牡丹内生细菌具有丰富的种群多样性,为牡丹内生细菌的后续开发利用奠定了基础。

本研究以抗菌活性为指标,从牡丹根部内生细菌中筛选获得了具有广谱抗菌活性的菌株 Md31 和 Md33,经鉴定 2 个菌株均为解淀粉芽孢杆菌。内生芽孢杆菌防治植物病害的机制之一,就是利用微生物的代谢产物直接抑制植物病原菌的扩展或者生长。内生细菌代谢产生的抑菌物质种类多样,成分复杂,脂肽类物质是其主要抗菌物质之一,主要包括枯草菌素(Subtilin)、伊枯草菌素(Iturins)、杆菌肽(Bacitracin)、丰原素(Fengycins)等^[28-29]。一般认为伊枯草菌素和丰原素具有强烈的抗真菌作用,可以作为农用杀菌剂应用于植物病害的生物防治。生物表面活性素(Surfactin)是有效的生物表面活性剂之一,由芽孢杆菌产生的生物表面活性素不具备直接的抗真菌能力,但可以加强枯草菌素的抗真菌能力,生物表面活性素主要在植物的根部形成一层生物膜(Biofilm),保护植物根部免受病原菌的入侵^[30]。本研究通过基因检测发现 2 个生防菌株 Md31 和 Md33 均具有合成脂肽类物质的基因簇片段,其中

fenD 基因主要合成丰原素、*srfAA* 和 *srfAB* 基因主要合成表面活性素、*bmyB* 基因主要合成细菌素、*ituC* 基因主要合成伊草枯菌素。通过酸沉淀法获得的脂肽类粗提物对牡丹病原真菌也具有较好的抑制活性。菌株 Md31 和 Md33 对病原菌的抑菌活性主要是依靠菌株多种脂肽类物质的共同作用, 还是一种脂肽类物质在起主要作用, 需进一步通过薄层层析和高效液相色谱等手段分析菌株脂肽类物质的成分, 并逐一验证各个脂肽类物质的抑菌作用。

参 考 文 献

- [1] Zou WX, Tan RX. Recent advances on endophyte research[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(9): 881-892 (in Chinese)
邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌的研究新进展[J]. *植物学报*, 2001, 43(9): 881-892
- [2] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(4): 491-502
- [3] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(3): 115-125
- [4] Jacques P. Surfactin and other lipopeptides from *Bacillus* spp.[J]. *Biosurfactants*, 2011, 20: 57-91
- [5] Lan BQ, Li JJ, Duan QX. China Tree Peony Encyclopedia[M]. Beijing: Science Press, 2002: 23 (in Chinese)
蓝保卿, 李嘉珺, 段全绪. 中国牡丹全书[M]. 北京: 中国科学出版社, 2002: 23
- [6] Lau CH, Chan CM, Chan YW, et al. Pharmacological investigations of the anti-diabetic effect of cortex moutan and its active component paeonol[J]. *Phytomedicine*, 2007, 14(11): 778-784
- [7] Sun GP, Wan X, Xu SP, et al. Anti proliferation and apoptosis induction of paeonol in human esophageal cancer cell lines[J]. *Diseases of the Esophagus*, 2008, 21(8): 723-729
- [8] Choi HS, Seo HS, Kim JH, et al. Ethanol extract of *Paeonia suffruticosa* Andrews (PSE) induced AGS human gastric cancer cell apoptosis via fas-dependent apoptosis and MDM2-p53 pathways[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2012, 19(1): 82-93
- [9] He JQ, Zhang GJ, Chen ZL, et al. Isolation and identification of endophyte from *Paeonia ludlowii* and screening of their antimicrobial activities[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(12): 2539-2544 (in Chinese)
何建清, 张格杰, 陈芝兰, 等. 大花黄牡丹内生菌的分离鉴定及其抗菌活性菌株的筛选[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(12): 2539-2544
- [10] Miao CP, Yu Y, Chen YW, et al. Study on isolation of endophytic fungi from *Paeonia delavayi* and their antimicrobial activity[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2011, 46(10): 738-740 (in Chinese)
苗翠苹, 余莹, 陈有为, 等. 滇牡丹内生真菌的分离及其抑菌活性研究[J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(10): 738-740
- [11] Wu SH, Chen YW, Li ZY, et al. Metabolites of the endophytic fungus *Alternaria* sp. PR-14 of *Paeonia delavayi*[J]. *Natural Product Research and Development*, 2011, 23(5): 850-852 (in Chinese)
吴少华, 陈有为, 李治滢, 等. 滇牡丹内生真菌 *Alternaria* sp. PR-14的代谢产物研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2011, 23(5): 850-852
- [12] Hu J, Wang J, Miao CP, et al. Identification and secondary metabolites of endophytic fungal strain PR35 from *Paeonia delavayi*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2012, 37(11): 1602-1606 (in Chinese)
胡娟, 王皎, 苗翠苹, 等. 滇牡丹内生真菌 PR35的鉴定及次生代谢产物的研究[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(11): 1602-1606
- [13] Wu SH, Zhao LX, Chen YW, et al. Sesquiterpenoids from the endophytic fungus *Trichoderma* sp. PR-35 of *Paeonia delavayi* [J]. *Chemistry & Biodiversity*, 2011, 8(9): 1717-1723
- [14] Miao CP, Hu J, Zhai YZ, et al. Identification and secondary metabolites of endophytic fungus PR20 from *Paeonia delavayi* [J]. *Natural Product Research and Development*, 2012, 24(10): 1339-1342 (in Chinese)
苗翠苹, 胡娟, 翟英哲, 等. 滇牡丹内生真菌 PR20的鉴定及次生代谢产物的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(10): 1339-1342
- [15] 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
- [16] Landy M, Warren GH. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi[J]. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1948, 67(4): 539-541
- [17] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001: 349 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349
- [18] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703
- [19] Joshi R, McSpadden Gardener BB. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*[J]. *Phytopathology*, 2006, 96(2): 145-154
- [20] Li BQ, Lu XY, Guo QG, et al. Isolation and identification of lipopeptides and volatile compounds produced by *Bacillus subtilis* strain BAB-1[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(17): 3547-3554 (in Chinese)
李宝庆, 鹿秀云, 郭庆港, 等. 枯草芽孢杆菌 BAB-1产脂肽类及挥发性物质的分离和鉴定[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(17): 3547-3554
- [21] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes[J]. *Biophysical Journal*, 2008, 94(7): 2667-2679
- [22] Bhore SJ, Ravichantar N, Loh CY. Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of *Sambung nyawa* [*Gynura procumbens* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds[J].

- Bioinformation, 2010, 5(5): 191-197
- [23] Li J, Zhao GZ, Huang HY, et al. Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L.[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2012, 101(3): 515-527
- [24] Li L, Sinkko H, Montonen L, et al. Biogeography of symbiotic and other endophytic bacteria isolated from medicinal *Glycyrrhiza* species in China[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2012, 79(1): 46-68
- [25] Preveena J, Bhole SJ. Identification of bacterial endophytes associated with traditional medicinal plant *Tridax procumbens* Linn[J]. *Ancient Science Life*, 2013, 32: 173-177
- [26] Bhole SJ, Komathi V, Kandasamy KI. Diversity of endophytic bacteria in medicinally important *Nepenthes* species[J]. *Journal of Natural Science, Biology, and Medicine*, 2013, 4(2): 431-434
- [27] Bhole SJ, Preveena J, Kandasamy KI. Isolation and identification of bacterial endophytes from pharmaceutical agarwood-producing *Aquilaria* species[J]. *Pharmacognosy Research*, 2013, 5(2): 134-137
- [28] Cameotra SS, Makkar RS. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2004, 7(3): 262-266
- [29] Wang J, Liu J, Chen H, et al. Characterization of *Fusarium graminearum* inhibitory lipopeptide from *Bacillus subtilis* IB[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(4): 889-894
- [30] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(3): 115-125

(上接 p.1051)

征 稿 简 则

3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 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。

3.3.2 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。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, 作者登陆我刊系统也可查看。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系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

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。

6 联系方式

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/wswxtbcn>