

## 苹果枝条内生菌 longA 的鉴定及其抑菌作用机理初探

何姣<sup>1,2</sup> 张亮亮<sup>1,2</sup> 赵凌云<sup>1,2</sup> 康振生<sup>1,3</sup> 黄丽丽<sup>1,3\*</sup> 颜霞<sup>1,2\*</sup>

(1. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室 陕西 杨凌 712100)

(2. 西北农林科技大学生命科学院 陕西 杨凌 712100)

(3. 西北农林科技大学植物保护学院 陕西 杨凌 712100)

**摘要:**【目的】鉴定一株分离自苹果健康枝条的内生菌 longA, 对其抑菌作用机理进行初步探究。【方法】通过生理生化性质测定和 16S rRNA 基因序列分析对其进行鉴定; 采用平板对峙法检测 longA 对苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)菌丝生长的影响和对孢子萌发的抑制作用, 利用透射电镜观察苹果树腐烂病菌的细胞内部变化。【结果】16S rRNA 基因序列分析结果表明该菌株为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*; 菌株 longA 好氧, 可利用葡萄糖、蔗糖、甘露醇、乳酸、柠檬酸等碳源; 耐盐性差(不能耐受质量分数 7%的氯化钠); 接触酶反应呈阳性; 可还原硝酸盐; 能使明胶液化、水解淀粉; 不能利用柠檬酸盐; 乙酰甲基甲醇(V-P)试验为阴性。longA 能显著地降低苹果树腐烂病菌分生孢子的萌发率, 并导致其菌丝生长过程中分枝增多、顶端膨大及细胞质外渗。【结论】菌株 longA 能有效抑制苹果树腐烂病菌等, 具有一定的生防潜能。

**关键词:** 苹果内生菌, 拮抗作用, 抑菌机制, 鉴定

## Identification of the endophytic strain longA from apple twig and its antifungal mechanism against *Valsa mali*

HE Jiao<sup>1,2</sup> ZHANG Liang-Liang<sup>1,2</sup> ZHAO Ling-Yun<sup>1,2</sup> KANG Zhen-Sheng<sup>1,3</sup>  
HUANG Li-Li<sup>1,3\*</sup> YAN Xia<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(3. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** [Objective] To identify one endophytic strain longA which was isolated from healthy apple tree branches and study its antifungal mechanism. [Methods] Strain longA was identified

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (No. 31101476, 31171796); Science Technology Research and Development Program of Shaanxi province (No. 2013K01-45); Science and Technology Program of Yangling Demonstration Zone (No. 2014NY-41)

\*Corresponding authors: HUANG Li-Li: Tel: 86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn  
YAN Xia: Tel: 86-29-87092262; E-mail: luckyx@126.com

**Received:** November 17, 2015; **Accepted:** April 18, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 10, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31101476, 31171796); 陕西省科学技术研究发展计划项目(No. 2013K01-45); 杨凌示范区科技计划项目(No. 2014NY-41)

\*通讯作者: 黄丽丽: Tel: 86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

颜霞: Tel: 86-29-87092262; E-mail: luckyx@126.com

收稿日期: 2015-11-17; 接受日期: 2016-04-18; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-05-10

based on the biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. The inhibitory efficiency of longA on the hyphal growth and conidial germination of *V. mali* were investigated by confrontation culture on slides. [Results] Strain longA was defined as *Bacillus amyloliquefaciens*. It could reduce the germination rate of spore and induce changes of mycelia morphology of *V. mali* significantly, such as deformity, branch increasing and cytoplasm exosmosis. Strain longA was aerobic. It could use glucose, sucrose, mannitol, lactic acid and citric acid as carbon source. Tolerates concentrations of NaCl up to 7%. Catalase reaction was positive. It could reduce nitrate, liquefy gelatin and degrade starch. It could not use citrate as the sole carbon source for growth. V-P test was negative. [Conclusion] Strain longA showed a certain potential of bio-control in the inhibition of *V. mali*.

**Keywords:** Apple endophyte, Antagonism, Antifungal mechanism, Identify

苹果树腐烂病是由黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)侵染所引起的一种病害。该病是我国苹果生产区域的毁灭性病害,它往往使树皮腐烂,造成枝干病疤累累或残缺不全,甚至整株死亡,严重影响苹果的产量<sup>[1]</sup>。多年来防治措施主要是采用化学药剂,但是化学药剂残留不仅危害人体健康、污染自然环境,也成为制约我国苹果出口及食用安全的关键问题。生物制剂因其有效的杀菌效果及其绿色无公害而逐渐被广泛使用。

目前越来越多的研究证明内生菌在生防中的有效性<sup>[2-4]</sup>。植物内生菌可以系统地分布在植物组织内,有充足的氮源和碳源,而且受到寄主植物的保护,比暴露于恶劣环境的菌具有更稳定的生存环境,更易发挥作用<sup>[5]</sup>,在植物病害生物防治中有广阔的应用开发前景。

目前对苹果内生菌的研究有了一些积累,苏静<sup>[6]</sup>从苹果树的不同部位分离获得内生细菌 118 株,从中筛选出 7 株对苹果斑点落叶病菌具有较强拮抗作用的菌株。孙洋<sup>[7]</sup>从苹果富士品种叶部和果皮共分离得到 83 株内生细菌,室内生测试验表明苹果叶部筛选得到的 BS-315 菌株对苹果斑点落叶病菌有较强的抑制作用。刘艳等<sup>[8]</sup>从苹果树木质部中分离到 1 株内生拮抗细菌 G23,该菌株可能分泌多种拮抗物质。徐涛等<sup>[9]</sup>从 25 年生富士苹果健康树皮中分离到 126 株内生真菌,对苹果树腐烂病菌的抑菌率在 40%以上的有 24 株。以上研究说明苹果植株内有丰富的内生菌资源,但迄今为止

对苹果内生防菌的筛选尚少,对生防菌作用机理的研究还不够深入。

本研究对苹果枝条内生菌 longA 进行了分离鉴定,并初步研究了 longA 对苹果树腐烂病菌的作用机理,以便为将来的应用提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试靶标菌株

苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*) 03-8 由西北农林科技大学植物保护学院植物病害综合防治实验室提供。菌株 longA 分离自健康苹果枝条。

### 1.2 培养基

分离培养基包括 LB 培养基、马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基;分类鉴定培养基(生理生化特征)包括碳源利用培养基、糖醇类发酵培养基、V-P 测定培养基、淀粉水解培养基、硝酸盐还原培养基、明胶液化培养基、柠檬酸盐利用培养基<sup>[10]</sup>。

苹果树腐烂病菌孢子萌发培养基:琼脂 10 g,蒸馏水 1 L。

### 1.3 分类鉴定

1.3.1 形态、培养特征:取固体 LB 平板上培养 48 h 的菌株进行革兰氏染色、芽孢染色、鞭毛染色,观察内生菌的形态特征。菌体扫描电镜制片:向 25 °C 培养 24 h 的 longA 平板内滴加 200 μL 无菌水,用边长≤5 mm 的无菌盖玻片盖在平板样品上,25 °C 静置 2 h,盖玻片翻面,再次 25 °C 静置 2 h,待样品附着在盖玻片上,用 2.5%戊二醛 4 °C 浸渍固定过夜,经一系列乙醇脱水、醋酸异戊酯置换、临界

点干燥及真空镀膜后,用 JSM-6360LV 型扫描电镜进行观察<sup>[11-12]</sup>。

**1.3.2 生理生化特征:**测定方法参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[13]</sup>。包括碳源利用、糖醇类发酵、V-P 测定、淀粉水解、硝酸盐还原、明胶液化、柠檬酸盐利用、耐盐性(NaCl 浓度为 2%、5%、7%、10%)、pH 耐受性。

**1.3.3 16S rRNA 基因序列测定及系统进化分析:**CTAB 法提取内生菌 longA DNA。16S rRNA 基因序列 PCR 扩增引物为细菌通用引物 27F (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')。25  $\mu$ L 扩增体系:10 $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0  $\mu$ L, 2.5 mmol/L dNTPs 0.4  $\mu$ L, 10.0  $\mu$ mol/L 引物各 0.5  $\mu$ L, 5.0 U/ $\mu$ L Taq 酶 0.2  $\mu$ L, 模板 DNA 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.4  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 10 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 34 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果在 GenBank 中进行 BLAST, 选取与目标菌株相似性较近的菌株序列, 使用 ClustalX 1.81 软件进行同源性比对; 利用 MEGA 6.0 软件对计算后的序列进行系统发育分析, 构建进化树(N-J 法, Bootstrap 重复 1 000 次, Kimura-2-parameter)<sup>[14]</sup>。

#### 1.4 对苹果腐烂病菌分生孢子萌发的影响

*Valsa mali* 菌株在 PDA 平板上 25  $^{\circ}$ C 培养 3 d, 用直径 5 mm 的打孔器在菌落的边缘截取菌饼, 接种在厚度为 4 mm 的 PDA 平板上, 25  $^{\circ}$ C 培养 20 d, 保持湿度和光照, 得到 *Valsa mali* 分生孢子器。取一带有成熟腐烂病菌分生孢子器且分生孢子角已溢出的培养基, 向其内加入 10 mL 无菌水, 轻挑孢子, 收集无菌水于 15 mL 离心管中, 振荡 2 min, 用内含脱脂棉的无菌注射器过滤, 得苹果树腐烂病菌孢子悬液。调节悬液浓度, 以 Leica DM LB 2 光学显微镜(40 $\times$ 物镜、10 $\times$ 目镜)下观察 150–200 个孢子为佳。将 longA 接种于 LB 液体培养基中, 28  $^{\circ}$ C、

150 r/min 培养 48 h, 将过滤后的发酵液按 1:1 的比例与 *Valsa mali* 孢子悬液混匀, 取 20  $\mu$ L 滴在水琼脂平板上, 每皿 5 个重复, 每处理 4 皿。以无菌水作为对照。25  $^{\circ}$ C 恒温保湿, 每隔 6 h 观察其萌发状况。

#### 1.5 对苹果树腐烂病菌菌丝形态的影响<sup>[15]</sup>

将活化的 longA 菌株接种于 PDA 平板中央, 活化的 *Valsa mali* 菌饼点接于四周, 与中心间隔 3 cm, 25  $^{\circ}$ C 恒温对峙暗培养, 观察在拮抗菌株菌落和苹果树腐烂病菌菌落之间的抑菌带, 4 d 后切取受抑制的 *Valsa mali* 边缘菌丝, 于光学显微镜下观察拮抗菌株对 *Valsa mali* 菌丝形态的影响, 用未接种拮抗菌的 *Valsa mali* 菌丝作为对照。参照康振生的方法进行扫描电镜样品加工处理及观察<sup>[12]</sup>。

#### 1.6 对离体枝条上病斑扩展的影响

将 longA 接种于 LB 液体培养基中, 28  $^{\circ}$ C、150 r/min 培养 48 h 后取发酵液备用。选取 2 年生健康的富士苹果枝条, 具体处理方法参考文献[16]。处理组用灭菌的毛笔蘸取 longA 发酵液涂抹于发病部位, 对照组则涂无菌水。26  $^{\circ}$ C 保湿暗培养, 14 d 后测量病斑大小, 按照椭圆面积公式计算病斑面积和防治效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 longA 形态、培养特征

在固体 LB 平板上 28  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后, 菌株 longA 形成乳白色不透明菌落, 菌落近似圆形, 边缘不整齐, 中间有小突起, 不分泌色素; longA 菌体细胞为短杆状(图 1); 革兰氏阳性, 有芽孢; 有鞭毛。

### 2.2 16S rRNA 基因序列测定及系统进化分析

longA 的 16S rRNA 基因序列含 1 495 个碱基 (GenBank 登录号 KX057379), 选择相似性最高的菌株进行比对, 结果它与 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CBMB205 相似性最高, 达到 99.8%。所以 longA 可归为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。根据 16S rRNA 基因序列建立系统发育树, 如图 2 所示。

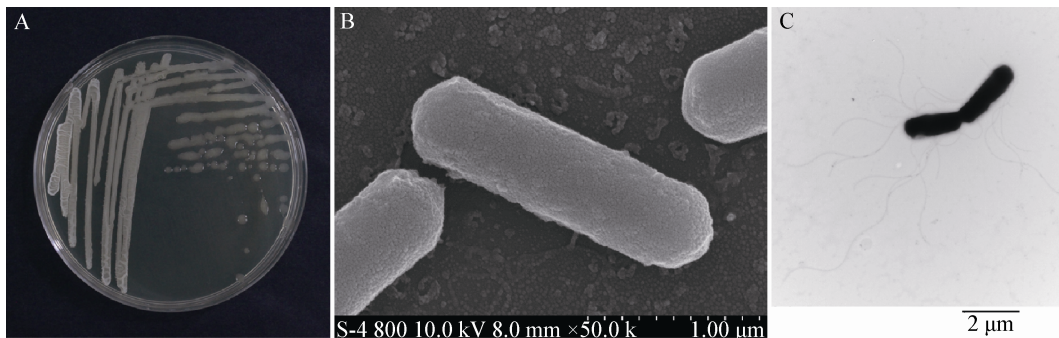


图1 菌株 longA 菌落(A)和菌体形态(B、C)  
Figure 1 Colony (A) and micrograph (B, C) of bacteria longA

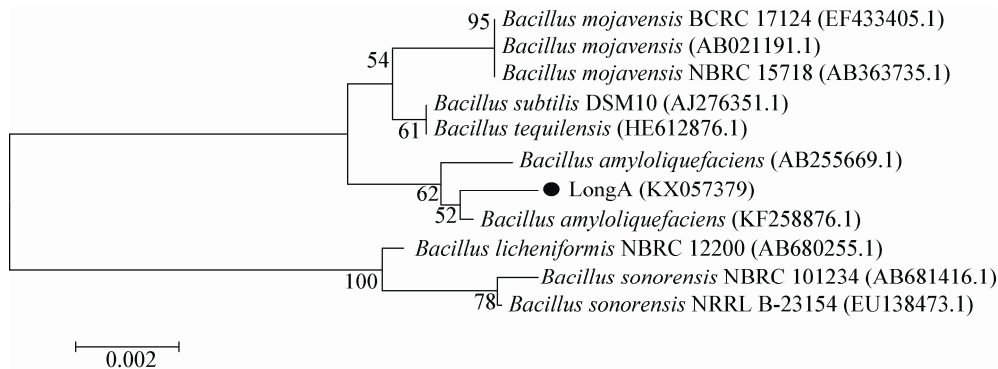


图2 根据 longA 菌株 16S rRNA 基因序列为基础构建的系统发育树

Figure 2 The constructed phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequence analysis of the longA strain

注: 括号中的序号代表菌株的 GenBank 登录号; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率; 标尺刻度代表 0.2% 的序列差异。

Note: The sequence number in the bracket means the GenBank accession number of the strain; The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees; The scale bar means 0.2% sequence difference.

### 2.3 生理生化特征

菌株 longA 好氧, 可利用葡萄糖、蔗糖、甘露醇、乳酸、柠檬酸等碳源; 耐盐性差(不能耐受质量分数 7% 的氯化钠); 接触酶反应呈阳性; 可还原硝酸盐; 能使明胶液化、水解淀粉; 不能利用柠檬酸盐; 乙酰甲基甲醇(V-P)试验为阴性。

### 2.4 对苹果树腐烂病菌分生孢子萌发的影响

对照处理 6 h 时分生孢子吸水膨胀, 12 h 时吸胀率为 25%, 18 h 时呈梭形, 吸胀率为 60%; 而经 longA 发酵液处理过的苹果树腐烂病菌分生孢子膨胀的速率明显变缓, 吸胀率只有 22%; 24 h 对照组孢子膨胀呈球形, 吸胀率达到 100%, 且个别开始

萌发, 而经发酵液处理过的孢子吸胀率为 50%, 处于较低水平, 出现部分畸形孢子, 如图 3 所示; 30 h 对照组孢子萌发率达 13%, 芽管平均长度为 15  $\mu\text{m}$ , 而处理组的萌发率为 2%, 显著低于对照组。显微观察芽管受到抑制, 粗细不均, 产生畸形。

### 2.5 对苹果树腐烂病菌菌丝形态的影响

2.5.1 光镜观察: 平板对峙皿内抑制结果显示(图 4), 对峙生长 4 d 后, 拮抗细菌 longA 对苹果树腐烂病菌有明显的抑制作用, 且形态异常。对照组腐烂病菌菌丝粗细均匀, 分枝少, 顶端菌丝笔直生长且较细; 而经过菌株 longA 对峙培养 4 d 后的腐烂病菌, 有相当一部分菌丝粗细不均, 分枝明

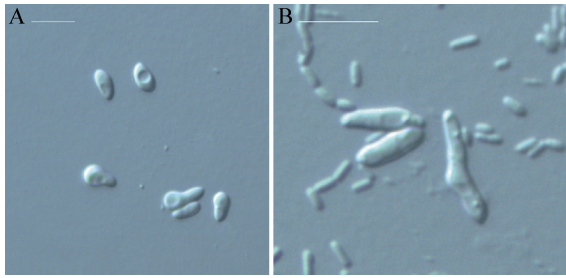


图3 菌株 longA 发酵液对苹果树腐烂病菌分生孢子萌发的影响(标尺: 10  $\mu\text{m}$ )

Figure 3 Inhibiting effect of LongA fermentation on conidia germination of *V. mali* (bar: 10  $\mu\text{m}$ )

注: A: 24 h 后正常萌发的分生孢子; B: 经 longA 发酵液培养 24 h 后的畸形孢子。

Note: A: Normal mycelia of *V. mali*; B: Deformed mycelia of *V. mali* inhibited by longA.

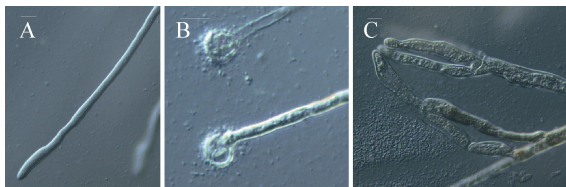


图4 菌株 longA 对苹果树腐烂病菌菌丝形态的影响(标尺: 10  $\mu\text{m}$ )

Figure 4 Inhibiting effect of strains longA on mycelial morphology of *V. mali* (bar: 10  $\mu\text{m}$ )

注: A: 正常菌丝; B, C: longA 处理后的畸形菌丝。

Note: A: Normal mycelia of *V. mali*; B, C: Deformed mycelia of *V. mali* inhibited by longA.

显增多,且顶端膨大,有的菌丝细胞质外渗,甚至部分多条菌丝集聚融合在一起。表明拮抗菌株 longA 产生的拮抗物质对苹果树腐烂病菌菌丝形态具有很大的影响。

2.5.2 透射电镜观察:如图5所示,4 d 对峙培养后,经过 longA 处理过的苹果树腐烂病菌细胞部分凝聚,期间有光亮区和不规则空腔。

## 2.6 对离体枝条上病斑扩展的影响

如表1所示,苹果离体枝条烫伤接种 14 d 后,经 longA 发酵液处理后的枝条病斑长度及病斑面积显著小于对照组,防治效果可达 83.37%,且优于经 0.05 mg/L 苯醚甲环唑药液处理过的枝条。

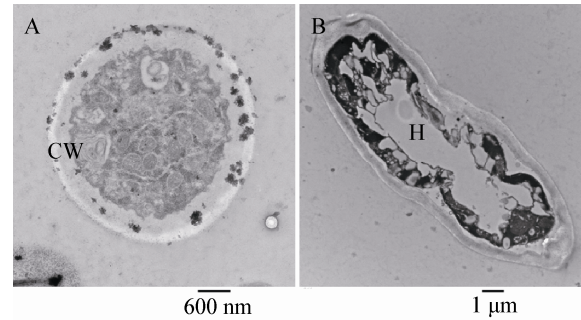


图5 longA 处理对菌丝细胞的影响

Figure 5 Mycelial cells treated with longA

注: A: 对照; B: longA 处理; CW: 细胞壁; H: 空腔。

Note: A: CK; B: Treated with longA; CW: Cell wall; H: Cavum.

表1 拮抗菌 longA 对苹果离体枝条腐烂病的防治效果

Table 1 Control efficiency of antagonistic bacteria LongA on detached twigs inoculated with *V. mali*

处理 Treatment	病斑长度 Lesion length (cm)	病斑面积 Lesion area (cm <sup>2</sup> )	防治效果 Control efficiency (%)
longA 发酵液 Fermentation	1.79±0.58	1.87±1.05	83.37±5.12
苯醚甲环唑 Difenoconazole	4.76±0.81	8.94±2.09	19.12±9.31
无菌水 CK	5.23±0.45	10.97±1.46	—

## 3 讨论

由黑腐皮壳菌引起的苹果树腐烂病,是苹果最致命的病害之一,它严重限制了苹果的产量<sup>[17]</sup>。进行病斑刮除并涂抹福美砷是以前的主要治病措施,但自从该高毒药剂禁用以来,寻找防治腐烂病的替代药剂已经成为目前生产上亟待解决的重要问题<sup>[18]</sup>。

本研究从健康苹果枝条分离得到一株对苹果树腐烂病菌具有拮抗活性的菌株 longA,经形态学观察及 16S rRNA 基因序列分析,将其鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。解淀粉芽孢杆菌是一种与枯草芽孢杆菌相似性很高的细菌,在其自身生长过程中可产生一系列的代谢产物,这些代谢产物使得解淀粉芽孢杆菌能够具有广泛抑制真菌和细菌的活性<sup>[19]</sup>,此外,解淀粉芽孢杆



菌也可作为根围细菌促进植物生长<sup>[20]</sup>。王军华等<sup>[21]</sup>从土壤分离得到一株解淀粉芽孢杆菌 Q-12, 发现其在生长过程中产生的抗菌活性物质能够强烈抑制镰刀菌、曲霉、青霉、毛霉等能引起食品腐败的真菌。崔文艳等<sup>[22]</sup>研究得出解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 不仅对玉米小斑病及茎基腐病具有良好的防治效果, 而且还可消除病害对植株生长的影响, 从而增加植株的生物量。

longA 发酵液能显著抑制苹果树腐烂病菌分生孢子的萌发, 并导致其菌丝形态等产生畸形, 这符合多数拮抗细菌对病原真菌的作用方式<sup>[23]</sup>。此外, 它对苹果树离体枝条腐烂病斑扩展也具有极强的防效。生物防治具有高效、环保等优点, 是植物病害防治的发展趋势。植物内生菌是生物防治中重要的生物资源, 对许多作物病害显示出良好的控制效果, 而且具有多种生物学功能, 已成为了植物病理学、微生物学、植物学等众多学科的研究热点<sup>[24]</sup>。

鉴于拮抗菌株 longA 对苹果树腐烂病菌的良好抑制效果, 后期将对其抑菌机理进行更进一步的探索, 包括对抑菌物质的分离等, 旨在开发出能有效防止苹果树腐烂病的生物制剂。

## 参 考 文 献

- [1] Wang CX, Zhang QM, Li GF, et al. Identification of the antagonistic bacteria BJ1 and its antifungal activity against *Valsa ceratosperma*[J]. *Acta Phytopythologica Sinica*, 2012, 39(5): 431-437 (in Chinese)  
王彩霞, 张清明, 李桂舫, 等. 苹果树腐烂病拮抗细菌菌株 BJ1 的鉴定及其抑菌作用[J]. *植物保护学报*, 2012, 39(5): 431-437
- [2] Haggag WM. Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases[J]. *Life Science Journal*, 2010, 7(2): 57-62
- [3] Kusari P, Kusari S, Spitteller M, et al. Biocontrol potential of endophytes harbored in *Radula marginata* (liverwort) from the New Zealand ecosystem[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2014, 106(4): 771-788
- [4] Abraham A, Philip S, Kuruvilla Jacob C, et al. Novel bacterial endophytes from *Hevea brasiliensis* as biocontrol agent against *Phytophthora* leaf fall disease[J]. *BioControl*, 2013, 58(5): 675-684
- [5] Zhou XY, Zhu HJ, Lei XH, et al. Research progress in application of endophytic actinomycetes in plant[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2010, 22(12): 87-90 (in Chinese)  
周鑫钰, 朱宏建, 雷湘华, 等. 植物内生放线菌应用研究进展[J]. *江西农业学报*, 2010, 22(12): 87-90
- [6] Su J. Isolation of endophytic bacteria from apple tree and biocontrol on apple spot leaf drop[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2007 (in Chinese)  
苏静. 苹果内生细菌的分离及其对苹果斑点落叶病的生物防治研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2007
- [7] Sun Y. Prevention effect of endophytic bacteria BS-315 against *Alternaria mali* on apple[D]. Baoding: Master's Thesis of Agricultural University of Hebei, 2010 (in Chinese)  
孙洋. 内生细菌 BS-315 对苹果斑点落叶病菌的防治作用研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2010
- [8] Liu Y, Zhang BJ, Han JC, et al. Identification of endophytic bacterium strain G23 and the research of its inhibition to some phytopathogens[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2012, 28(4): 163-166 (in Chinese)  
刘艳, 张宝俊, 韩巨才, 等. 苹果树内生细菌 G23 的鉴定及其抑菌活性的研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(4): 163-166
- [9] Xu T, Hu TL, Wang YN, et al. Isolation of endophytic fungi from apple bark and their potential for biological control of *Valsa ceratosperma*[J]. *Acta Phytopythologica Sinica*, 2012, 39(4): 327-333 (in Chinese)  
徐涛, 胡同乐, 王亚南, 等. 苹果树皮内生真菌的分离及其对腐烂病的生物防治潜力[J]. *植物保护学报*, 2012, 39(4): 327-333
- [10] Buchanan RE, Gibbens NE. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*[M]. 8th Edition. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)  
布坎南 RE, 吉本斯 NE. *伯杰细菌鉴定手册*[M]. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
- [11] Huang XH, Zhang QY. Improve on cell sample preparing method for SEM[J]. *Journal of Chinese Electron Microscopy Society*, 2003, 22(6): 671-672 (in Chinese)  
黄晓红, 张奇亚. 扫描电镜细胞样品制备方法的改进[J]. *电子显微学报*, 2003, 22(6): 671-672
- [12] Kang ZS. *Ultrastructure of Plant Pathogenic Fungi*[M]. Beijing: Science and Technology of China Press, 1996: 1-29 (in Chinese)  
康振生. *植物病原真菌的超微结构*[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1996: 1-29
- [13] Dong XZ, Cai MY. *Common bacterial System Identification Manual*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 349-384 (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: 349-384
- [14] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39(4): 783-791
- [15] Zhang QM, Wang CX, Wang HY, et al. Identification of antagonistic endophytic actinomycetes A-2 and evaluation of its activity against *Valsa mali*[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2013, 15(3): 286-292 (in Chinese)  
张清明, 王彩霞, 王海艳, 等. 苹果树腐烂病内生拮抗放线菌 A-2 的鉴定及其活性评价[J]. *农药学报*, 2013, 15(3): 286-292
- [16] Gao ZP. Control efficacy of apple tree *Valsa* canker by endophytic actinomycetes and chemicals[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2009 (in Chinese)  
郜佐鹏. 利用植物内生放线菌及化学药剂防治苹果树腐烂病的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2009
- [17] Yin ZY, Liu HQ, Li ZP, et al. Genome sequence of *Valsa* canker pathogens uncovers a potential adaptation of colonization of woody bark[J]. *New Phytologist*, 2015(208): 1202-1216
- [18] Wang L, Gao ZP, Huang LL, et al. Screening fungicide for pathogen inhibition and disease control of apple tree *Valsa* canker[J]. *Acta Phytopythologica Sinica*, 2009, 39(5): 549-554 (in Chinese)  
王磊, 郜佐鹏, 黄丽丽, 等. 防治苹果树腐烂病杀菌剂的室内筛选[J]. *植物病理*, 2009, 39(5): 549-554
- [19] Che XX, Li XK. The research on development of *Bacillus*

- amyloliquefaciens*[J]. Beijing Agriculture, 2010(3): 7-10 (in Chinese)  
车晓曦, 李校堃. 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的研究进展[J]. 北京农业, 2010(3): 7-10
- [20] Deng JL, Liu HY, Liu YX, et al. Identification of the antifungal substances from *Bacillus amyloliquefaciens* strain YN-1[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2010, 40(2): 202-209 (in Chinese)  
邓建良, 刘红彦, 刘玉霞, 等. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质鉴定[J]. 植物病理学报, 2010, 40(2): 202-209
- [21] Wang JH, Quan CS, Xu HT, et al. Antifungal characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* Q-12[J]. Food and Fermentation Industries, 2006, 32(6): 47-50 (in Chinese)  
王军华, 权春善, 徐洪涛, 等. 解淀粉芽孢杆菌 Q-12 抗真菌特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(6): 47-50
- [22] Cui WY, He PJ, Shang J, et al. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* B9601-Y2 on diseases control and growth-promotion of maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2015, 23(5): 153-158 (in Chinese)  
崔文艳, 何朋杰, 尚娟, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B9601-Y2 对玉米的防病促生长效果研究[J]. 玉米科学, 2015, 23(5): 153-158
- [23] Liu R, Han JJ, You CP, et al. Identification and action mode of antagonistic bacterium bio-2 against *Magnaporthe grisea*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2011, 38(1): 91-92 (in Chinese)  
刘任, 韩静君, 游春平, 等. 稻瘟病菌拮抗细菌 bio-2 的抑菌作用及其鉴定[J]. 植物保护学报, 2011, 38(1): 91-92
- [24] Pan ZB, Li QL, Mo JY, et al. Screening, identification and control efficacy of antagonistic bacteria against *Colletotrichum gloeosporioides* on mango[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2013, 40(6): 517-522 (in Chinese)  
潘朝勃, 李其利, 莫贱友, 等. 芒果炭疽菌拮抗细菌的筛选鉴定及其防病效果[J]. 植物保护学报, 2013, 40(6): 517-522

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业微生物学、海洋微生物学、环境微生物学、基础微生物学、农业微生物学、食品微生物学、兽医微生物学、药物微生物学、医学微生物学、病毒学、酶工程、发酵工程、代谢工程等领域的最新研究成果, 产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究和改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、显微世界、专栏、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

### 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 参考文献

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

#### 3.2 脚注(正文首页下方)

Foundation item:

\*Corresponding author: Tel: ; Fax: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(No. )

\*通讯作者: Tel: ; Fax: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-00-00; 接受日期: 20xx-00-00; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 20xx-00-00

(下转 p.2285)