

百部内生放线菌的分离、分类及次级代谢潜力

罗红丽^{1,2}, 林显钊^{1,3}, 张利敏¹, 刘宁¹, 黄英^{1*}

¹ 中国科学院微生物研究所, 微生物资源前期开发国家重点实验室, 北京 100101

² 西南大学药学院, 重庆 400715

³ 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029

摘要: 【目的】以对叶百部块根为材料分离内生放线菌, 并对分离菌株进行分类、抗菌活性和次级代谢产物合成基因研究。【方法】样品经过严格的表面消毒, 选用 4 种培养基分离百部内生放线菌; 分离菌株通过形态观察和 16S rRNA 序列分析进行分类鉴定; 采用琼脂移块法测试分离菌株的抗菌活性; 通过 PCR 检测分离菌株的 PKS/NPRS 和卤化酶基因; 使用 HPLC-UV/VIS-ESI-MS/MS 分析发酵产物。【结果】从 6 个样品中获得 18 株内生放线菌, 分属链霉菌属 (*Streptomyces*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*) 和甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)。分离菌株绝大部分具有抗菌活性和次级代谢产物合成基因, 其中 13 株对耐药金黄色葡萄球菌和/或绿脓杆菌有拮抗活性, 17 株具有 PKS/NRPS 基因, 8 株菌具有卤化酶基因, 且卤化酶阳性代表菌株的发酵产物具有抗菌活性和卤代化合物特征。【结论】百部作为一种传统中药, 其内生放线菌以链霉菌和小单孢菌为主, 在次级代谢产物合成方面具有很好的潜力, 可作为一类重要微生物资源进行活性产物开发。

关键词: 百部, 内生放线菌, 分类, 抗菌活性, 次级代谢基因

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0389-07

植物内生菌 (Endophytes) 是一类生活于健康植物组织内部、正常情况下不引发植物产生明显病症的微生物^[1-2]。放线菌是产生抗生素及其他生物活性物质的重要微生物资源, 一些放线菌以内生菌的形式生存于植物中, 可抵御其它微生物的侵害, 也可与宿主共同产生一些有用的活性物质^[3-4]。目前全世界的植物约有 30 万种, 从中分离得到内生菌的植物不过几百种, 分离到内生放线菌的就更少。研究植物内生菌不仅可以了解菌株与宿主的相互关系, 还可以开发天然活性产物。据统计, 从植物内生菌分离得到的活性物质中, 约 51% 是新化合物^[3]。

我国对中药的利用已有数千年的历史, 但对其内生放线菌的研究并不多。百部 (*Stemona*) 为百部科多年生草质藤本植物, 主要分布于云南、广西、四川等地, 具有润肺止咳、平喘和杀虫止痒的功能, 对百日咳、支气管炎等病症有较好的治疗作用, 是一类药用价值极高的传统中药植物。因此, 对百部内生放线菌进行研究具有重要意义。本文采集云南西双版纳百部块根作为实验材料, 对其进行内生放线菌分离、分类、抗菌活性和次级代谢产物合成潜力研究, 希望能为百部内生放线菌资源的进一步研究提供指导, 为从中寻找和开发新的生物活性产物奠定

基金项目: 微生物资源前期开发国家重点实验室开放课题

* 通信作者。Tel: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn

作者简介: 罗红丽 (1975-), 女, 重庆北碚人, 硕士, 实验师, 主要从事放线菌系统分类学研究。E-mail: hongli75@swu.edu.cn

收稿日期: 2011-09-04; 修回日期: 2012-01-11

基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 百部样品:6份对叶百部 (*Stemona tuberosa* Lour.) 块根样品,采自云南西双版纳,采样时间为2010年5月,样品于4℃密封保存。

1.1.2 培养基:①分离培养基:自来水酵母琼脂(TWYE)、腐植酸维生素琼脂(HV)、IMA-2琼脂粉和丙酸钠琼脂(SPA)^[5]。培养基中加入制霉菌素(Nystatin) 100 mg/L、萘啶酮酸(Nalidixic acid) 50 mg/L和重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$) 20 mg/L。②发酵培养基:甘露醇 10.0 g、燕麦片 5.0 g、大豆蛋白胨 5.0 g、酵母浸粉 2.0 g、NaCl 2.0 g、 K_2HPO_4 0.5 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、微量元素溶液 2.0 mL、蒸馏水 1000 mL, pH 自然。

1.1.3 测试菌:耐药金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) MRSA 1-1、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) EMBLs 4-1、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 5-1 和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 6-1 由潍坊医学院提供;烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) CGMCC 3.772 和白色念珠菌 (*Candida albicans*) CGMCC 2.538 购自中国普通微生物菌种保藏中心。

1.1.4 主要试剂和仪器:PCR 扩增相关试剂购自宝生物工程(大连)有限公司,引物由上海生物工程技术服务有限公司合成,其余试剂均为国产或进口分析纯。PCR 仪和凝胶成像仪分别为 LabCycler standard (德国 SensoQuest) 和 Bio-rad Gel-Doc2000;高压液相色谱仪为 Shimadzu SPD-M20A,色谱柱为 YMC ODS-A 4.6 × 150 - mm;质谱仪为 Thermo-Finnigan LCQ DECA XP。

1.2 内生放线菌的分离、纯化与保藏

按照参考文献[5],样品从冰箱取出后室温晾干24 h,进行表面消毒处理。将最后一次洗涤水涂布于ISP 2培养基上,28℃培养,检验表面消毒效果。

采用贴片法和匀浆酶法^[6],将消毒好的样品薄片和匀浆置于分离培养基上,28℃培养2-8周。挑单菌落至ISP 2培养基上,28℃培养纯化,并将纯培养物置于20%甘油中,-70℃保藏。

1.3 形态分类

根据培养特征、气丝、基丝、孢子丝的形态和颜色^[7],对分离菌株进行分群。

1.4 pH、温度、盐度生长范围测试

pH 耐受实验采用0.2 mol/L的磷酸盐(KH_2PO_4 和 K_2HPO_4)缓冲液与2倍浓度的ISP 2培养基混合,平板接种,28℃培养4 d。将分离菌株接种于ISP 2培养基上,培养7 d,进行生长温度测试。配制NaCl浓度为3%、5%、7%和10% (w/v)的ISP 2培养基,接种分离菌株,28℃培养4-7 d,观察结果。

1.5 总DNA的提取、16S rRNA基因扩增和电泳检测

按Chun等^[8]的方法提取基因组DNA和扩增16S rRNA基因,引物为通用保守引物27f和1492r。PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6 16S rRNA基因系统发育分析

PCR产物测序由北京博迈得公司完成。将拼接好的16S rRNA基因序列与GenBank数据库中的已知序列进行BLAST比对,确定分离菌株的分类地位,利用MEGA^[9]软件构建N-J系统发育树。

1.7 抗细菌和真菌活性测试

菌株活性采用琼脂移块法^[10]进行测试:取细菌和真菌菌液于ISP 2培养基中倒平板,将分离菌株琼脂块移至ISP 2平板上,分别培养1 d、3 d,观察抑菌圈。发酵产物活性采用滤纸片法进行测试:取5 μL产物滴于直径6 mm的无菌滤纸片上,置于含有耐药金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* MRSA 1-1)的平板上,培养过夜后观察抑菌圈。

1.8 次级代谢产物合成基因的检测

用K1f和M6r、KSAf和KSAr、A3f和A7r以及Halo-B4-FW和Halo-B7-RV四对引物分别对分离菌株的PKS I、PKS II、NRPS和卤化酶基因^[11-13]进行PCR扩增。PCR条件为:PKS I:95℃ 5 min;95℃ 1 min,56℃ 1.5 min,72℃ 2 min;PKS II:95℃ 5 min;95℃ 45 s,65℃ 45 s,72℃ 1 min;NRPS:95℃ 5 min;95℃ 45 s,57℃ 1 min,72℃ 1 min;卤化酶基因:94℃ 4 min;94℃ 1 min,58.5℃ 1.5 min,72℃ 1 min;每个PCR反应均为30个循环,扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.9 菌株发酵及代谢产物分析

1.9.1 菌株发酵:将平板培养的菌苔连同培养基切下1 cm²的小块,放入装有100 mL发酵培养基的

500 mL 锥形瓶内, 28℃ 摇床培养 7 d, 转速 180 r/min。

1.9.2 发酵产物提取: 发酵液经普通滤纸过滤后加入 HP-20 大孔径吸附树脂柱中, 滴速控制在 2 滴/s, 然后加入 50 mL 去离子水冲洗, 滴速为 1 滴/s, 最后用发酵液等体积的乙醇再次洗脱, 滴速为 2 滴/s。收集乙醇洗脱液, 将其减压蒸馏除去溶剂后用 2 mL 甲醇重新溶解样品后备用。

1.9.3 产物分析: 使用 HPLC-UV/VIS-ESI-MS/MS 进行化学分析。HPLC 采用 Shimadzu SPD-M20A (PDA 检测器, 190–800 nm), 梯度程序采用 15 min 内甲醇浓度从 50% 升至 100%, 色谱条件是: Xbridge ODS C18 柱, 4.6 × 150 nm, Shimadzu 保护柱; 流动相使用甲醇 (色谱纯)、水 (色谱纯), 流速 1.0 mL/min; 柱温为室温; 进样量 20 μL。ESI-MS/MS 分析采用 Thermo-Finnigan LCQ DECA XP 质谱仪, 正/负离子模式检测。

2 结果

2.1 内生放线菌的分离和分群

经过严格的表面消毒处理, 最后一次洗涤水涂布的平板上无菌落生长, 说明表面消毒彻底。从贴片和匀浆样品的平板上共获得内生放线菌 18 株。将其分为 3 个类群即: 白孢类群、灰褐类群和黄色类群。其中白孢类群和灰褐类群的菌落较为干燥、坚实, 黄色类群的菌落略显湿软。

2.2 pH、温度、盐度生长范围

有 10 株菌在 pH 4.0–10 均可生长, 具有比较广泛的 pH 生长范围, 为后续研究提供基础。生长温度范围测试表明, 菌株存在一定的差异, 具有较好的多样性, 但均易于进行常规发酵培养。所有分离菌株在 3% NaCl 浓度的培养基中都均能良好生长; 5%、7% 和 10% 分别有 1、4 和 12 株不生长。见表 1。

表 1 分离菌株抗菌活性、次级代谢基因及 pH、温度、盐度生长范围

Table 1 The tests of the isolates for antimicrobial activity, secondary metabolite genes and growth ranges

| Strain No. | SA | PA | PKS I | PKS II | NRPS | Halogenase | Growth range | | |
|------------|----|----|-------|--------|------|------------|--------------|-------|---------------------|
| | | | | | | | pH | T/℃ | c(NaCl) / (% , w/v) |
| FXJ3.001 | - | - | + | - | - | + | 4-10 | 10-37 | 0-10 |
| FXJ3.002 | - | + | + | - | - | + | 4-9 | 10-37 | 0-10 |
| FXJ3.003 | + | - | + | - | + | - | 4-10 | 10-40 | 0-7 |
| FXJ3.004 | - | - | - | - | + | + | 4-10 | 10-40 | 0-7 |
| FXJ3.005 | - | - | - | - | + | + | 4-10 | 4-40 | 0-7 |
| FXJ3.006 | - | - | - | - | - | + | 4-10 | 4-40 | 0-7 |
| FXJ3.007 | + | + | + | - | - | + | 4-10 | 10-40 | 0-10 |
| FXJ3.008 | + | - | - | - | + | - | 4-10 | 10-40 | 0-7 |
| FXJ3.009 | - | + | + | - | + | - | 4-10 | 10-45 | 0-5 |
| FXJ3.010 | - | + | + | - | + | - | 7 | 10-45 | 0-3 |
| FXJ3.011 | - | + | + | - | - | - | 4-7 | 15-37 | 0-10 |
| FXJ3.012 | - | + | + | - | - | - | 7-8 | 15-45 | 0-10 |
| FXJ3.013 | - | - | - | + | - | + | 4-10 | 10-40 | 0-7 |
| FXJ3.014 | - | + | + | + | + | - | 4-8 | 37-45 | 0-7% |
| FXJ3.015 | - | + | + | + | + | - | 6-8 | 37-45 | 0-5% |
| FXJ3.016 | - | + | + | + | + | - | 4-8 | 15-45 | 0-5% |
| FXJ3.017 | + | - | - | + | + | + | 4-10 | 10-40 | 0-7% |
| FXJ3.021 | - | + | + | - | + | - | 5-8 | 15-37 | 0-10% |

SA, *Staphylococcus aureus*; PA, *Pseudomonas aeruginosa*; +, Positive; -, negative.

2.3 分离菌株的多样性

16S rRNA 基因序列 (>1360 bp) 分析表明: 18 株分离菌株分属链霉菌属 (*Streptomyces*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*) 和甲基杆菌属 (*Methylobacterium*) 属, 其中 10 株为链霉菌。

基于 16S rRNA 基因序列构建的 N-J 系统发育树如图 1。由图可见, 10 株链霉菌分成明显不同的两簇, 分别与 *Streptomyces narbonensis* (相似性 99.0%–98.7%) 和 *Streptomyces pactum* (相似性 99.9%–99.6%) 的亲缘关系最近, 各簇内菌株的进化距离较短 (<0.01)。6 株小单孢菌规则地聚在

一起,与 *Micromonospora echinofusca* 的进化距离最短

(< 0.01)。

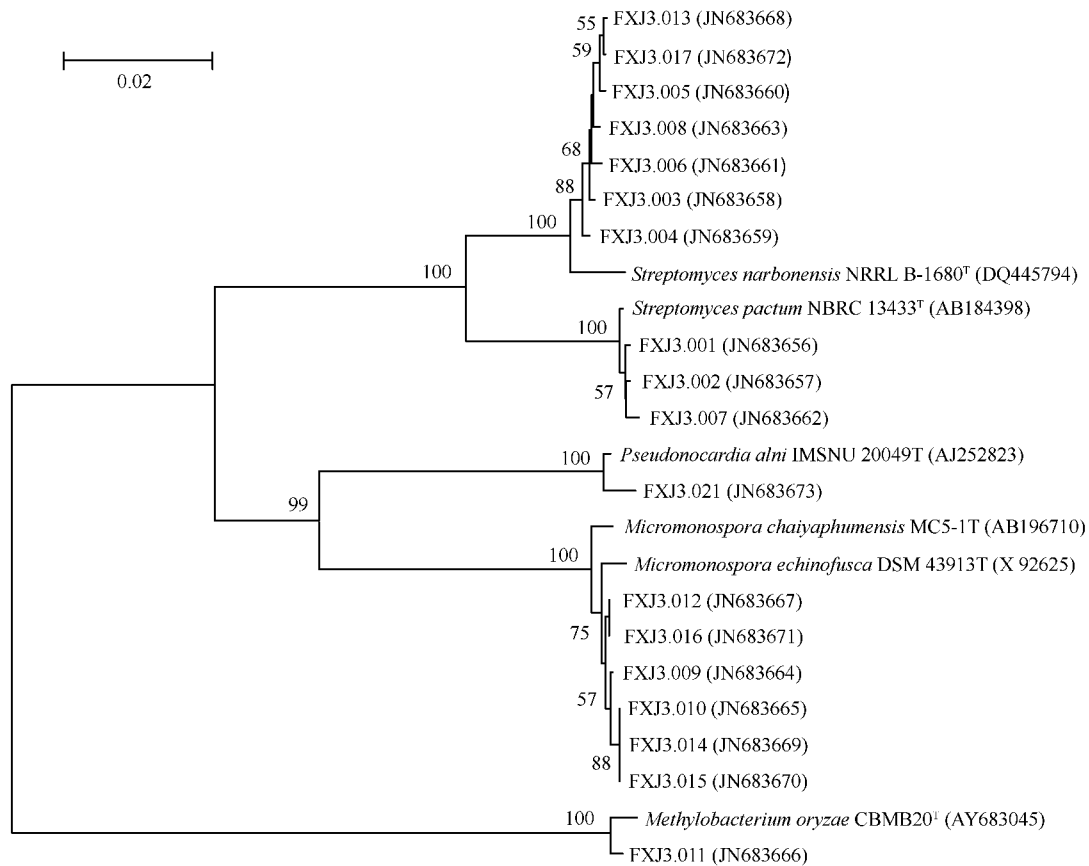


图1 分离菌株 16S rRNA 基因序列的系统发育 N-J 树

Fig.1 Phylogenetic N-J tree based on 16S rRNA gene sequences showing the positions of isolates. Bootstrap values (%) based on 1000 resampled data sets are shown at the nodes; only values above 50% are given. The scale bar represents 0.02 substitutions per site.

2.4 抗菌活性和次级代谢产物合成基因

18 株分离菌株中有 13 株 (72%) 对耐药金黄色葡萄球菌 MRSA 和/或绿脓杆菌表现出拮抗活性, 其中抗绿脓杆菌的菌株数量较多 (10 株), 6 株小单孢菌分离菌株全部具有抗绿脓杆菌活性 (表 1)。所有分离菌株对耐药大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、烟曲霉和白色念珠菌均无抗菌活性。

PCR 筛选结果表明, 18 株分离菌株中有 17 株 (94.4%) 含有 PKS 和/或 NRPS 基因, 其中 12 株具有 PKS I 基因, 5 株具有 PKS II 基因, 11 株具有 NRPS 基因; 8 株 (44.4%) 分离菌株具有卤化酶基因, 且均为链霉菌 (表 1)。

2.5 代谢产物分析

选取同时具有抗菌活性、PKS/NRPS 和卤化酶基因的代表性分离菌株 FXJ3.017 进行发酵产物分析。发酵产物的 HPLC 图谱显示, 出峰时间 $R_t =$

12.4 min 处有一主要吸收峰; 活性测试表明该主峰具有抗 MRSA 活性 (图 2)。对该主峰化合物进行了质谱分析 (图 3), 根据质谱数据 $[M-H]^- = 321$, 可推断出其主要由化合物的分子量为 322; 质谱图还显示出明显的卤素吸收峰特征, 即分子量 321 的同位素峰 323 的强度是 321 峰强度的 70%, 表明产物结构中应含有两个 Cl 原子。

3 讨论

本实验从 6 个百部样品中分离得到 18 株内生放线菌, 这与 Taechowisan 等^[14] 报道的 2% - 10% 的内生菌出菌率 (分离菌株数与样品数量的比例) 相当, 但分离效率并不高。通过改进分离方法、选择性培养基和培养条件等因素, 出菌率还可能有较大提高。分离菌株中链霉菌数量占 55.6%, 这与土壤生

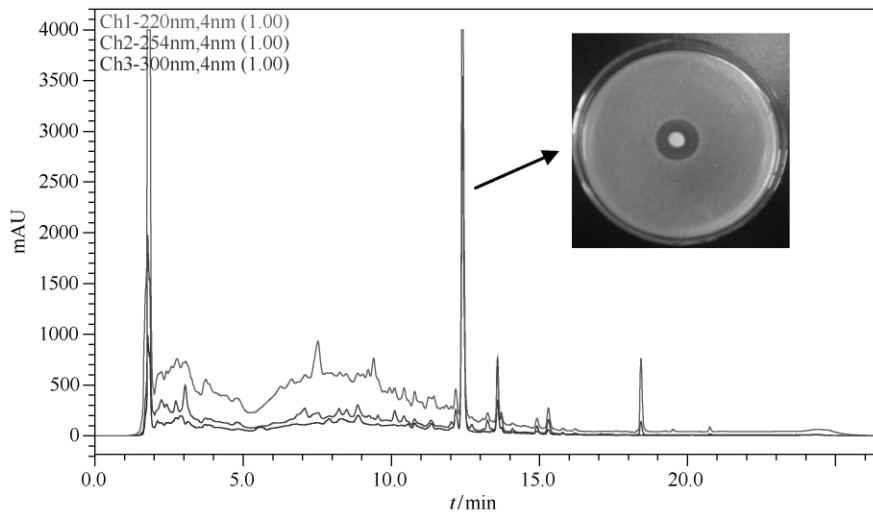


图2 菌株 FXJ3.017 发酵产物的 HPLC 分析和主产物峰活性

Fig.2 HPLC analysis of secondary metabolites produced by strain FXJ3.017 and bioactivity of the primary peak.

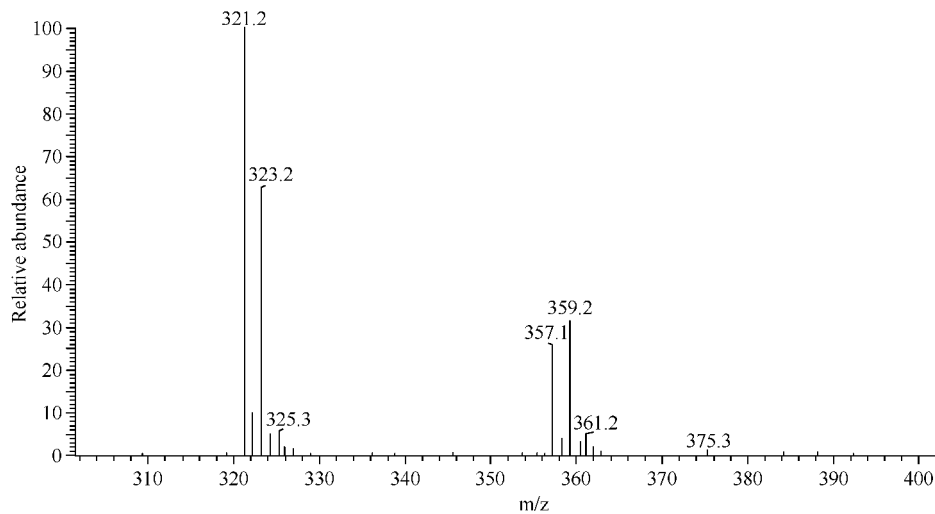


图3 菌株 FXJ3.017 主产物峰的质谱图 (负离子模式质谱 -c MS)

Fig.3 MS analysis of the primary peak produced by strain FXJ3.017 (negative mode).

境中链霉菌占优势的情况相似,与相关的研究结果一致^[14-15],说明链霉菌也是药用植物中的优势内生放线菌。

对分离菌株的抗菌活性进行研究,有望获得具有重要价值的生物活性产物。从抗菌活性结果分析得出:抗 G^- 菌的分离菌株数量是抗 G^+ 菌的 2.5 倍,对真菌没有抗菌活性,这与刘宁、古强等的研究结果正好相反^[16-17]。他们的结果显示植物内生菌抗 G^+ 菌的效果比 G^- 菌要好很多,对真菌也具有较好的抗菌活性,但他们没有研究百部内生菌,也未见其他学者报道百部内生放线菌。由此我们推测,百部内生放线菌的多样性、次级代谢产物的种类和活

性可能与其他植物内生菌有所不同。所以百部作为一种有价值的传统中药植物,对其内生放线菌进行研究是很有必要的。

次级代谢产物合成基因筛选作为一种发现新药先导化合物的方法已被广泛使用^[18-19],它可以大大提高发现先导化合物的效率。从本研究的结果来看,百部分离菌株的次级代谢产物合成基因的检出频率高达 99.4%,是相当显著的。其中卤化酶基因的阳性率为 44.4%,高出文献报道^[13]一倍,亦高于我们研究过的其它生境放线菌^[20],特别是本研究得到的百部内生链霉菌的卤化酶基因阳性率(80%),高于此前报道过最高的海洋链霉菌卤化酶基因阳性

率(69%)^[20]。结合高比例(72%)的抗细菌活性菌株数,以及代表菌株发酵产物中的活性卤代化合物信息,说明百部内生放线菌具有很好的次级代谢产物合成潜力,可能产生百部的特色活性物质,值得进一步开展产物研究。

致谢 感谢中国科学院上海药物研究所叶阳研究员提供百部样品,感谢潍坊医学院赵乃昕教授提供耐药测试菌。

参考文献

- [1] 曹理想,田新莉,周世宁. 香蕉内生真菌、放线菌类群分析. 中山大学学报 (*Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*) 2003 42(2):70-73.
- [2] Bacon CW, White JF. *Microbial Endophytes*. New York: Marcel Dekker Inc, 2000.
- [3] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and Infection* 2003 5(6):535-544.
- [4] Shimizu M, Furumai T, Igarashi Y, Onaka H, Nishimura T, Yoshida R, Kunoh H. Association of induced disease resistance of *Rhododendron* seedlings with inoculation of *Streptomyces* sp. R-5 and treatment with Actinomycete D and Amphotericin B to the tissue-culture medium. *The Journal of Antibiotics* 2001 54(6):501-505.
- [5] Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, Xu LH, Li WJ. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and Environmental Microbiology* 2009 75(19):6176-6186.
- [6] Jiao JY, Wang HX, Zeng Y, Shen YM. Enrichment for microbes living in association with plant tissues. *Journal of Applied Microbiology* 2006 100(4):830-837.
- [7] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京:科学出版社, 1975.
- [8] Chun J, Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 1995 45(2):240-245.
- [9] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 2004 5(2):150-163.
- [10] 张帆, 岳莹玉, 陶天申. 神农架林区及自然保护区链霉菌拮抗性的研究. 华中农业大学学报 (*Journal Huazhong Agricultural University*) 1996 22:58-62.
- [11] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology* 2005 49(1):10-24.
- [12] Metsä-Ketela M, Salo V, Halo L, Hautala A, Hakala J, Mantsala P, Ylihonko K. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters* 1999 180(1):1-6.
- [13] Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, Schneider K, Welzel K, Wohler SE, Holzenkämpfer M, Nicholson GJ, Bechthold A, Sussmuth RD, Vente A, Pelzer S. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources. *A European Journal of Chemical Biology* 2007 8(7):757-766.
- [14] Taechowisan T, Peberdy JF, Lumyong S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2003 19(4):381-385.
- [15] Kizuka M, Enokita R, Takahashi K, Okamoto Y, Otsuka T, Shigematsu Y, Inoue Y, Okazaki T. Studies on actinomycetes isolated from plant leaves. *Actinomycetologica* 1998 12(2):89-91.
- [16] 刘宁, 张辉, 郑文, 黄英, 王海彬. 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 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2007 47(5):80-85.
- [17] 古强, 刘宁, 邱旦恒, 刘志恒, 黄英. 植物叶片内生放线菌的分离、分类与拮抗活性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2006 46(5):778-782.
- [18] Metsä-Ketela M, Halo L, Munukka E, Hakala J, Mantsala P, Ylihonko K. Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species. *Applied Environmental Microbiology* 2002 68(9):4472-4479.
- [19] Liu W, Ahlert J, Gao QJ, Wendt-Pienkowski E, Shen B, Thorson JS. Rapid PCR amplification of minimal enediyne polyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 2003 100(21):11959-11963.
- [20] 高鹏, 郝丽君, 朴玉华, 阮继生, 黄英. 不同生境放线菌的卤化酶基因分析及其对卤代产物筛选的意义. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*) 2009 49(10):1367-1373.

Isolation , classification and biosynthetic potential of endophytic actinomycetes from *Stemona*

Hongli Luo^{1 2} , Xianzhao Lin^{1 3} , Limin Zhang¹ , Ning Liu¹ , Ying Huang^{1*}

¹ State Key Laboratory of Microbial Resources , Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100101 , China

² College of Pharmaceutical Sciences , Southwest University , Chongqing 400715 , China

³ College of Life Science and Technology , Beijing University of Chemical Technology , Beijing 100029 , China

Abstract: [Objective] To isolate endophytic actinomycetes from earthnut samples of *Stemona tuberosa* Lour. collected from Xishuangbanna , Yunnan Province , and to study the classification , antimicrobial activity and secondary metabolic potential of the isolates. [Methods] Samples were treated by a well-established surface-sterilized procedure , and plated on four selective media. The isolates were identified by morphology and 16S rRNA gene sequence analysis. Antimicrobial activity of the isolates was tested using agar diffusion method. Secondary metabolite genes of PKS/NRPS and halogenase were detected by PCR amplification. HPLC-UV and VIS-ESI-MS/MS were used to analyze the fermentation product. [Results] We obtained 18 actinomycete isolates from 6 *Stemona* earthnut samples. The isolates belonged to 4 genera , *Streptomyces* , *Pseudonocardia* , *Micromonospora* and *Methylobacterium* , and 10 of them were streptomycetes. The isolates also showed distinguish positive rates of antibacterial activity and secondary metabolite genes. Of them 13 strains showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and/or *Pseudomonas aeruginosa*. Of them 17 isolates were positive for PKS/NRPS genes , and 8 strains were positive for halogenase gene. Moreover , the representative halogenase gene-positive strain produced metabolites that had typical MS peaks of halogen absorption. [Conclusion] Based on the results of this study , the endophytic actinomycetes from *Stemona* , dominant by *Streptomyces* and *Micromonospora* , have good secondary metabolic potential and could serve as a promising resource for bioactive metabolite discovery in the future.

Keywords: *Stemona* , endophytic actinomycetes , classification , antimicrobial activity , secondary metabolite gene

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Open Foundation of State Key Laboratory of Microbial Resources

* Corresponding author. Tel: +86-10-64807311; E-mail: huangy@im.ac.cn

Received: 4 September 2011 / Revised: 11 January 2012