



# 云南金铁锁根可培养放线菌多样性及其抗菌活性研究

王梦雨<sup>1#</sup>, 黄美娟<sup>1#</sup>, 李茜<sup>1</sup>, 李珊辉<sup>2</sup>, 肖敏<sup>2</sup>, 黄海泉<sup>1</sup>, 李文均<sup>2\*</sup>

- 1 西南林业大学园林园艺学院, 国家林业和草原局西南风景园林工程技术研究中心, 云南省功能性花卉资源及产业化技术工程研究中心, 西南林业大学园林园艺花卉研发中心, 云南 昆明 650224
- 2 中山大学生命科学学院, 广东省热带亚热带植物资源重点实验室, 广东 广州 510275

王梦雨, 黄美娟, 李茜, 李珊辉, 肖敏, 黄海泉, 李文均. 云南金铁锁根可培养放线菌多样性及其抗菌活性研究. 微生物学报, 2022, 62(5): 1905–1918.

Wang Mengyu, Huang Meijuan, Li Qian, Li Shanhui, Xiao Min, Huang Haiquan, Li Wenjun. Diversity and antimicrobial activities of culturable endophytic actinomycetes in the roots of *Psammosilene tunicoides* in Yunnan province. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1905–1918.

**摘要:**【目的】探索云南金铁锁根部可培养放线菌资源及筛选高抗病原菌活性菌株。【方法】以云南 4 个地方金铁锁的根为研究对象, 采用不同温度预处理及 14 种分离培养基对其进行放线菌分离; 选用 74 株内生放线菌菌株, 以 5 种病原菌为指示菌, 使用倒置法测定供试放线菌的抗菌活性。【结果】从金铁锁根部分离获得 121 株内生放线菌, 基于 16S rRNA 基因序列比对和系统发育分析, 将其归属于 10 个目、15 个科和 24 个属, 其中链霉菌(*Streptomyces*)为绝对优势菌群, 其后依次为诺卡氏菌属(*Nocardia*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)和分枝菌酸小杆菌属(*Mycolicibacterium*)。分离效果最好的培养基为 D4 (酵母粉 0.3 g, 干酪素 0.3 g, 葡萄糖 0.3 g, 骨粉 0.3 g); 最优的预处理温度为 80 °C; 74 株内生放线菌中的 37 株对至少一种指示病原菌具有抑制活性, 且活性强的主要类群为链霉菌属。【结论】金铁锁根部蕴藏着丰富的放线菌种质资源, 且蕴含着具有产次级代谢产物能力的菌株, 这将为后续的医药及农业生产提供了丰富的菌种资源, 同时为其栽植、保护、开发及应用提供了一定的基础数据和理论依据。

**关键词:** 金铁锁; 内生放线菌; 多样性; 抗菌活性

**基金项目:** 国家自然科学基金(31760001); 国家林业和草原局推广项目(2020133126); 云南省高校园林植物与观赏园艺科技创新团队及云南省中青年学术和技术带头人培养项目(2015HB046, 2018HB024)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31760001), by the Promotion Project of National Forestry and Grassland Administration (2020133126), by the Program for Innovative Research Team (in Science and Technology) in University of Yunnan Province and by the Young and Middle-aged Academic and Technical Leadership Training Project of Yunnan (2015HB046, 2018HB024)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: liwenjun3@mail.sysu.edu.cn

Received: 26 October 2021; Revised: 31 December 2021; Published online: 14 February 2022

# Diversity and antimicrobial activities of culturable endophytic actinomycetes in the roots of *Psammosilene tunicoides* in Yunnan province

WANG Mengyu<sup>1#</sup>, HUANG Meijuan<sup>1#</sup>, LI Qian<sup>1</sup>, LI Shanhu<sup>2</sup>, XIAO Min<sup>2</sup>, HUANG Haiquan<sup>1</sup>, LI Wenjun<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Landscape Architecture and Horticulture Sciences, Southwest Research Center for Engineering Technology of Landscape Architecture (State Forestry and Grassland Administration), Yunnan Engineering Research Center for Functional Flower Resources and Industrialization, Research and Development Center of Landscape Plants and Horticulture Flowers, Southwest Forestry University, Kunming 650224, Yunnan, China

<sup>2</sup> Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Resources, School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the diversity of culturable endophytic actinomycetes in the roots of *Psammosilene tunicoides* in Yunnan province and screen out the strains with high antimicrobial activities. [Methods] The roots of *P. tunicoides* from four different places in Yunnan province were pretreated at different temperatures, from which the culturable endophytic actinomycetes were isolated with 14 media. The antimicrobial activities of 74 isolates against 5 pathogens were evaluated with inverted plates. [Results] Totally 121 strains of endophytic actinomycetes were isolated from the roots of *P. tunicoides*. The results of 16S rRNA gene sequence alignments and phylogenetic analysis showed that the 121 strains could be categorized to 24 genera, 15 families of 10 orders. *Streptomyces* was the absolutely dominant genus, followed by *Nocardia*, *Micromonospora*, and *Mycolicibacterium*. D4 (0.3 g yeast powder, 0.3 g casein, 0.3 g glycose, 0.3 g bone meal) was the best medium for isolation among all the tested media and 80 °C was the optimal pretreatment temperature. Among 74 strains of endophytic actinomycetes, 37 strains showed inhibitory activities against at least one indicator pathogen, and the main genus with strong antimicrobial activity was *Streptomyces*. [Conclusion] The roots of *P. tunicoides* harbor rich actinomycetes and the functional strains with the ability to produce secondary metabolites, which can provide abundant strain resources for pharmaceutical and agricultural production in the future as well as basic data and a theoretical basis for the cultivation, protection, development, and application of *P. tunicoides*.

**Keywords:** *Psammosilene tunicoides*; endophytic actinomycetes; biodiversity; antimicrobial activity

放线菌适应性强，分布广泛，是重要的药物资源之一，以产生各种生物活性物质而备受人们的关注<sup>[1-7]</sup>。普通生境中的放线菌已被广泛研究，但特殊生态环境下微生物可能产生特殊的次生代谢产物<sup>[8-9]</sup>，所以研究者逐渐将目光转向特殊生境，如植物<sup>[9-10]</sup>、洞穴<sup>[11-12]</sup>、海洋<sup>[13]</sup>和热泉<sup>[14-15]</sup>等环境下的放线菌，尤其植物作为一种特

殊生境，已被证实存在着大量内生菌资源<sup>[16-20]</sup>。植物与内生菌互惠而得以长期共存，内生菌具有产生生长素、铁载体、解磷、解钾及抗菌素等的的能力，从而提高植物的抗逆性和适应性，而植物则为其提供能量和营养作为回报<sup>[21-25]</sup>，同时内生菌也是天然活性产物的主要来源<sup>[8,26]</sup>。特别是产紫杉醇衍生物内生菌的发现<sup>[27]</sup>，证实

了植物内生菌可以产生与宿主类似的天然活性物质, 这条获取药用物质的新途径得到了研究者的广泛关注, 而内生放线菌作为内生菌的重要组成部分已成为研究热点。迄今为止, 越来越多的药用植物内生放线菌及新物种被报道, 一批新的天然活性物质被挖掘<sup>[28-32]</sup>。但相对于土壤和水体放线菌研究, 植物内生菌研究较少, 获得内生放线菌资源非常有限, 而药用植物内生放线菌是新物种和天然产物的重要来源, 应得到研究者更多的关注。

金铁锁(*Psammosilene tunicoides* W. C. Wu et C. Y. Wu)为石竹科(*Caryophyllaceae*)金铁锁属(*Psammosilene*), 多年生, 中国特有的单种属草本植物<sup>[33]</sup>, 但其野生资源有限, 仅分布于云南、西藏和贵州等西南地区的南向坡地。金铁锁为珍贵的药用植物, 药用部位为根, 主要药用成分为皂甙、三萜等, 具除风湿、定痛和止血等功效。金铁锁是云南白药、贵州金骨莲胶囊和福建痛血康胶囊等中药的重要组成成分<sup>[34]</sup>。因市场需求量大, 其野生资源遭受侵略性的挖掘而濒临灭绝, 现被列为国家珍稀濒危二级保护植物<sup>[35]</sup>。如何采取有效手段保护、开发和利用金铁锁, 将是研究者需要攻克的难题<sup>[36]</sup>。金铁锁内生放线菌多样性及抗菌活性相关研究尚未见报道。本文以其为材料, 采用多种方法获取其内生放线菌资源, 并筛选抗菌能力强的菌株, 为进一步揭示药用植物内生放线菌群落的生态学意义以及挖掘功能菌

株提供参考, 同时为后续的农业生产及医药产业提供丰富的菌种资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集与预处理

野生金铁锁植株的根为 2014 年 6–8 月采自于云南个旧麒麟山、大理二南队、丽江和香格里拉 4 个地方。野外采样时, 随机选取生长健壮的野生植株 10 株, 整株放入无菌采样袋中, 低温保存运回实验室, 并在 24 h 内进行金铁锁根内生菌分离。其采样点信息见图 1。

### 1.2 培养基

#### 1.2.1 分离培养基

共采用了 14 种培养基。(1) D1 培养基<sup>[37]</sup>: 棉子糖 2 g, L-组氨酸 1 g, 丙酮酸钠 2 g, KNO<sub>3</sub> 1 g, NaCl 1 g, CaCO<sub>3</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g, (2) D2 培养基(丙酸钠-天冬酰胺-氯化钠培养基)<sup>[38]</sup>; (3) D3 培养基<sup>[37,39]</sup>: 纤维素 2.0 g, 脯氨酸 1.0 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.5 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01 g, KNO<sub>3</sub> 0.25 g; (4) D4 培养基: 酵母粉 0.3 g, 干酪素 0.3 g, 葡萄糖 0.3 g, 骨粉 0.3 g; (5) D5 培养基(HV 改良培养基)<sup>[40]</sup>; (6) D6 培养基<sup>[38]</sup>: NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.1 g, 丙酸钠 2 g, L-天冬酰胺 1.0 g, KCl 0.2 g, 植物浸汁 3 mL (将根和茎叶共 35 g 加水至 1 L, 煮沸 1 h 后将其捣碎并过滤, 最后得浓缩液 100 mL); (7) D7 培养基: 可溶性淀粉

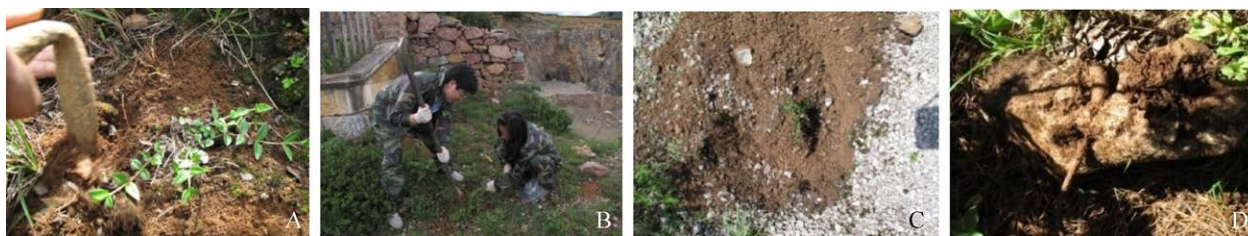


图 1 金铁锁生境及不同采样点

Figure 1 Habitat of *P. tunicoides* and different samples sites. A: GeJiu (N27°15'/E100°22'); B: XiangGeLiLa (N26°05'/E99°46'); C: DaLi (N26°13'/E100°01'); D: LiJiang (N26°57'/E100°12').

2 g, 脯氨酸 0.5 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8 g,  $\text{CaCl}_2$  0.5 g; (8) D8 培养基: 麦芽糖 2 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8 g,  $\text{CaCl}_2$  0.5 g; (9) D9 培养基: 棉子糖 2 g, L-组氨酸 1 g, 保险子 1 粒(取于云南白药瓶内), 丙酮酸钠 2 g,  $\text{KNO}_3$  1 g,  $\text{NaCl}$  1 g,  $\text{CaCO}_3$  0.5 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.8 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g; (10) D10 培养基:  $\text{CaCl}_2$  0.1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5 g, 根提取液(将金铁锁无菌根粉末 100 g 置于液氮中研磨, 然后放入 0.9% 的生理盐水中进行振荡, 静置 1 min, 最后取上清液),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g; (11) D11 培养基: 海藻糖 6 g, 脯氨酸 1.0 g,  $\text{KNO}_3$  0.5 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.2 g,  $\text{CaCl}_2$  0.5 g; (12) D12 培养基(P3); (13) D13 培养基(丁二酸钠-天冬酰胺培养基)<sup>[38]</sup>(14) D14 培养基<sup>[37]</sup>: 甘油 10 g, 天冬酰胺 1 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g, 微量盐 1 mL。

以上培养基均加入琼脂 15.0 g/L, pH 7.2–7.3, 加蒸馏水 1 L。并加入 25 mg/L 的萘啶酮酸抑制革兰氏阴性细菌的生长和 50 mg/L 的制霉菌素抑制内生真菌的生长。

### 1.2.2 纯化培养基

YIM 38#培养基<sup>[37]</sup>: 酵母膏 4 g, 麦芽浸膏粉 5 g, D-葡萄糖 4 g, 琼脂 15.0 g, pH 7.2–7.3, 加蒸馏水至 1 L。

## 1.3 内生细菌的分离、纯化和保藏

### 1.3.1 样品处理

样品预处理: 用自来水冲洗掉金铁锁的根表面的泥土, 再用超声波反复清洗直至最后清洗的水清澈为止。表面消毒<sup>[38]</sup>: 将金铁锁的根切成约 5 cm 的小段, 用 1% Tween-20 处理 1 min, 然后用 70% 酒精处理 1 min, 再用有效氯含量为 5% 的次氯酸钠溶液处理 5.0–6.5 min 后, 加入 2.5% 硫代硫酸钠溶液处理 10 min, 再用 10%  $\text{NaHCO}_3$  处理 10 min, 最后用无菌水清洗 4–5 次。最后清洗的水用于检测表面消毒是

否彻底, 分别取其 0.2 mL 涂布于以上分离和纯化培养基上, 然后将检测板放在培养箱(28 °C)中培养 20 d 以上, 观察检测板是否有菌落长出。将消毒后的金铁锁根切成薄片放入装有无菌硅胶的瓶中, 并置于干燥箱(30 °C)中使其干燥备用。

### 1.3.2 内生放线菌分离

用无菌搅拌器打碎已干燥的金铁锁根, 分别进行不同温度处理: 常温、50 °C (4 h)、80 °C (2 h) 和 110 °C (1 h), 然后用液氮进行研磨, 再采用无菌竹签挑取样品分撒在分离培养基上, 或用 10 倍稀释上清液进行涂布<sup>[38]</sup>。

### 1.3.3 内生放线菌纯化和保藏

纯化: 将全部平板放置于 28 °C 培养 3–12 周, 待菌落长出后, 根据菌落颜色、质地和形态特征等不同挑取放线菌单菌落不断进行纯化而获得纯培养物。保藏: 在已纯化培养平板上挑取单菌落接种在牛奶管中进行长久保存, 暂时保存的接种在培养基为 YIM38# 的斜面试管中。

## 1.4 总 DNA 提取、16S rRNA 基因的扩增及系统发育分析

内生放线菌 DNA 提取及 16S rRNA 基因的扩增参照 Li 等<sup>[41]</sup>的方法进行, 将 PCR 产物送至生工生物工程股份有限公司(上海)进行测序。将 16S rRNA 基因序列置于 EzBioCloud 数据库<sup>[42]</sup>和 GenBank<sup>[43]</sup>中并使用 BLAST 搜索软件进行相似性比对分析, 使用 MEGA 7.0<sup>[44]</sup>软件, 采用邻接法 neighbor-joining<sup>[45]</sup>进行系统发育树的构建。

## 1.5 金铁锁内生放线菌抗菌活性检测

### 1.5.1 试验菌株

从金铁锁内生放线菌中选取典型菌株 74 株。

### 1.5.2 病原指示菌

病原指示菌均由云南大学微生物研究所提供。分别为白色念珠菌(*Monilia albican*)、铜绿

假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。

### 1.5.3 菌株准备

待检测内生放线菌用纯化培养基培养,每个菌株接种两个平板,并于 28 °C 下培养 7 d 备用。在试管斜面上培养病原指示菌,立枯丝核菌和白色念珠菌用 PDA 培养基培养,其他病原指示菌用 LB 培养基培养,用无菌水制备对数生长期的指示菌孢子悬液或菌悬液。

### 1.5.4 抑菌活性检测方法

待检测内生放线菌的抑菌活性使用平板倒置法<sup>[38]</sup>。

将 PDA 和 LB 培养基冷却至 55 °C 以下,每 800 mL 加入 5.0 mL 病原指示菌悬液混合均匀,制成病原菌指示平板。将直径 0.5 cm 的待测放线菌圆形菌落倒置于病原指示菌平板上,设 3 个重复,将接种好的对置平板置于 28 °C 培养箱培养,5 d 后进行观察及测定抑菌圈的大小,抑菌活性强弱用透明圈直径与菌落直径的比值来衡量。

## 2 结果与分析

### 2.1 表面消毒检验结果

在表面消毒验证平板上未观察到菌落,证明金铁锁根表面消毒彻底,表明本试验分离得到的放线菌均为内生菌。

### 2.2 内生放线菌物种组成分析

由表 1 和图 2 可知,从金铁锁根中共分离得到 182 株放线菌,基因系列测定后并进行比对,去重复获得 121 株内生放线菌,为 84 种不同内生放线菌。它们隶属于放线菌门、放线菌纲的 10 个目、15 个科和 24 个属。其分别为栖植物放线菌属(*Actinophytocola*)、别样链霉菌属

(*Allostreptomyces*)(新属,已鉴定发表)、拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、迪茨氏菌属(*Dietzia*)、糖霉菌属(*Glycomyces*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)、考克氏菌属(*Kocuria*)、韩国生工菌属(*Kribbella*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、微球菌属(*Micrococcus*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、分枝菌酸小杆菌属(*Mycolicibacterium*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、类诺卡氏菌属(*Nocardioides*)、野野村菌属(*Nonomuraea*)、类节杆菌属(*Paenarthrobacter*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、拉氏杆菌

表 1 各属别放线菌的种及菌株数所占比例

Table 1 Proportion of different genus and strains

Genus	Species	Strains	Ratio of all strains/%
<i>Actinophytocola</i>	1	2	1.65
<i>Allostreptomyces</i>	1	1	0.83
<i>Amycolatopsis</i>	3	4	3.31
<i>Curtobacterium</i>	1	2	1.65
<i>Dietzia</i>	1	1	0.83
<i>Glycomyces</i>	1	1	0.83
<i>Kitasatospora</i>	1	2	1.65
<i>Kocuria</i>	1	1	0.83
<i>Kribbella</i>	1	1	0.83
<i>Microbacterium</i>	2	2	1.65
<i>Micrococcus</i>	1	1	0.83
<i>Micromonospora</i>	7	9	7.44
<i>Mycobacterium</i>	1	2	1.65
<i>Mycolicibacterium</i>	6	6	4.96
<i>Nocardia</i>	6	13	10.74
<i>Nocardioides</i>	1	1	0.83
<i>Nonomuraea</i>	1	1	0.83
<i>Paenarthrobacter</i>	2	3	2.48
<i>Promicromonospora</i>	2	2	1.65
<i>Rathayibacter</i>	1	1	0.83
<i>Rhodococcus</i>	2	3	2.48
<i>Streptomyces</i>	38	57	47.11
<i>Streptosporangium</i>	1	1	0.83
<i>Tsukamurella</i>	2	4	3.31



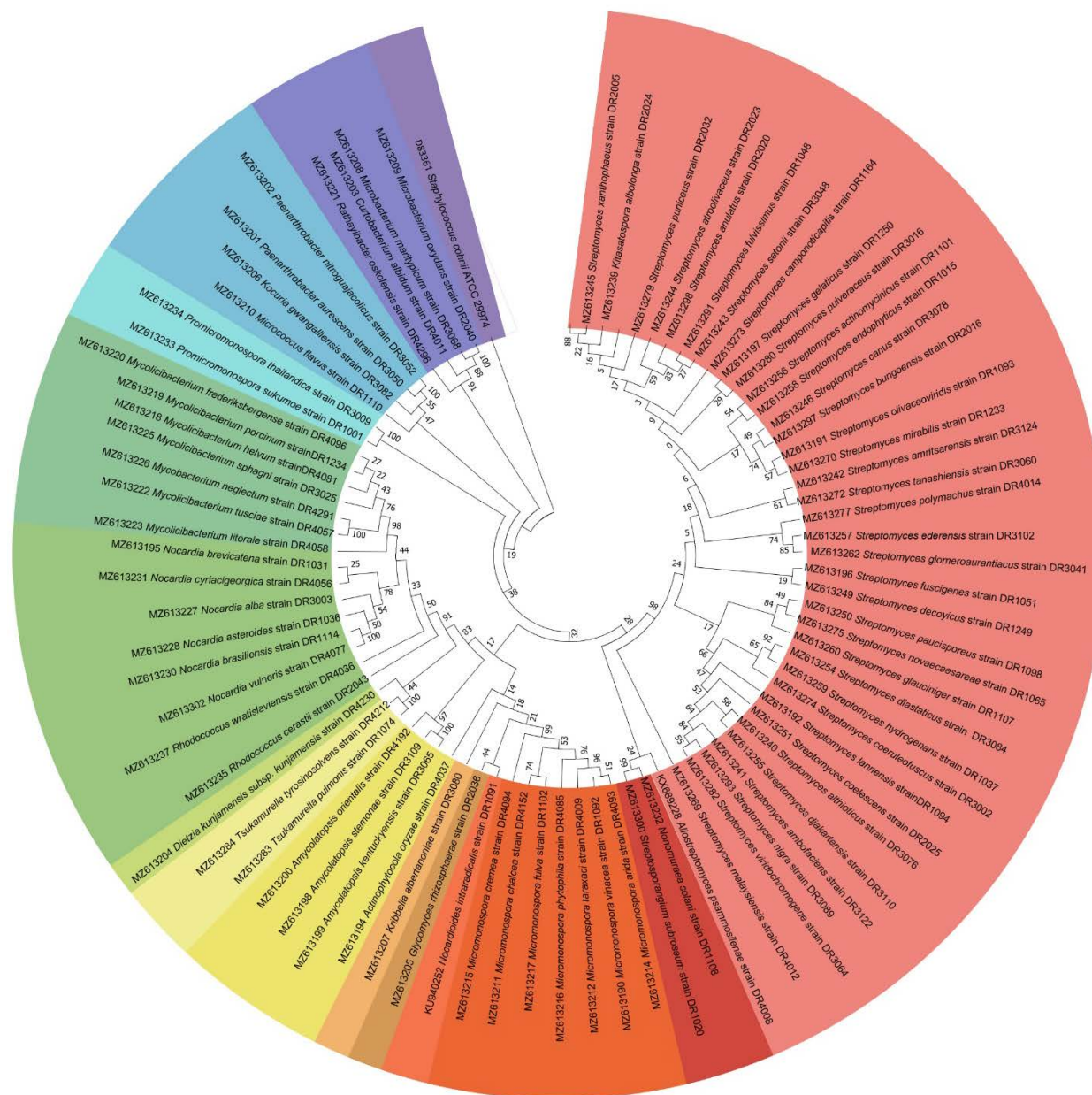


图2 金铁锁可培养放线菌类群系统发育树

Figure 2 The phylogenetic tree of culturable actinobacteria isolated from roots of *P. tunicoides*. *Staphylococcus cohnii* (ATCC 29974) was used as outgroup and bootstrap values were 1 000 replications in the neighbour-joining phylogenetic tree.

属(*Rathayibacter*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、链孢囊菌属(*Streptosporangium*)和冢村氏菌(*Tsukamurella*)。其中,链霉菌属(*Streptomyces*)为绝对优势属,占比为 47.11%,诺卡氏菌属(*Nocardia*)和小单孢菌属(*Micromonospora*)次之,分别占 10.74%

和 7.44%。共有 15 株放线菌的 16S rRNA 基因序列与典型菌株的序列相似性在 99%以下,并对其中的一个潜在新属(其代表种为 *Allostreptomyces psammosilenae* YIM4008)和一个潜在新种(*Nocardiodides intraradicalis* YIM DR1091)进行了分类鉴定及发表。

### 2.3 温度预处理对金铁锁内生放线菌分离效果的影响。

如图 3 所示, 不同温度对试验材料进行预处理对金铁锁内生放线菌分离效果较为显著, 常温至 80 °C 温度处理情况下分离得到的放线菌多样性和丰度均较高, 其中 80 °C 温度处理效果最佳。但当处理温度高达 110 °C 时, 严重影响其出菌率, 分离效果最差, 仅得到了 5 株菌, 但每株菌分布于不同的属。链霉菌属、小单孢菌属和原小单孢菌属在 4 个温度处理下均分离得

到, 且它们均为优势菌群; 同时优势菌群诺卡氏菌属在常温至 80 °C 均分离得到。虽不同的温度处理下均分离得到特有菌群, 但常温至 80 °C 温度处理中有效增加了纯培养放线菌的多样性。

### 2.4 不同的分离培养基对金铁锁内生放线菌分离效果的影响

基于各类放线菌对营养元素需求不同, 本次分离试验共采用了 14 种培养基, 如图 4 所示, 培养基营养成分比直接影响放线菌的分离效果。内生放线菌在含有酵母粉、干酪素、葡萄

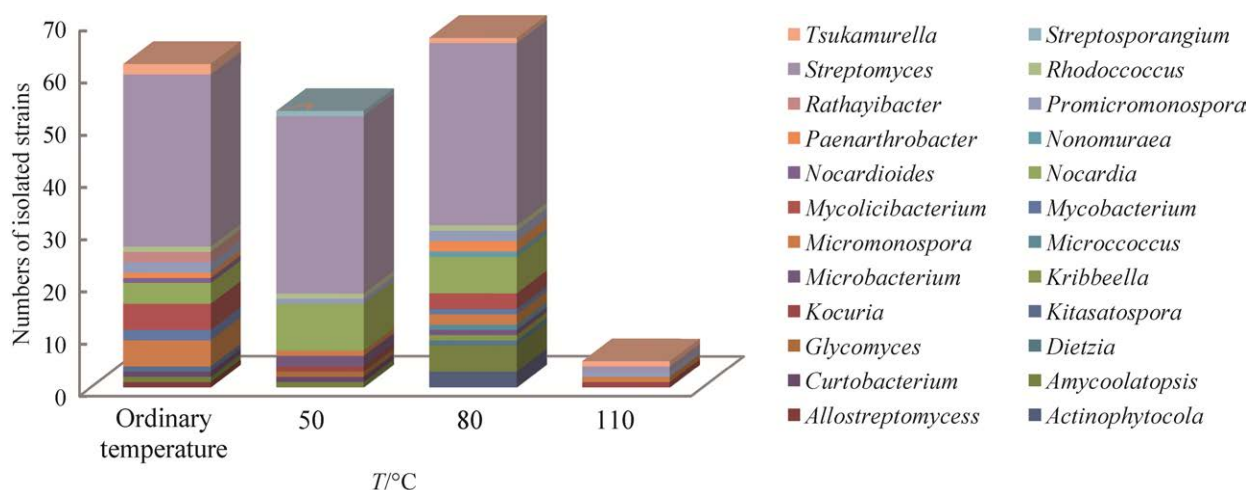


图 3 金铁锁内生放线菌于不同温度预处理中的分布情况

Figure 3 The effect of different pretreatment temperatures on the distribution of endophytic strains associated with roots of *P. tunicoides*.

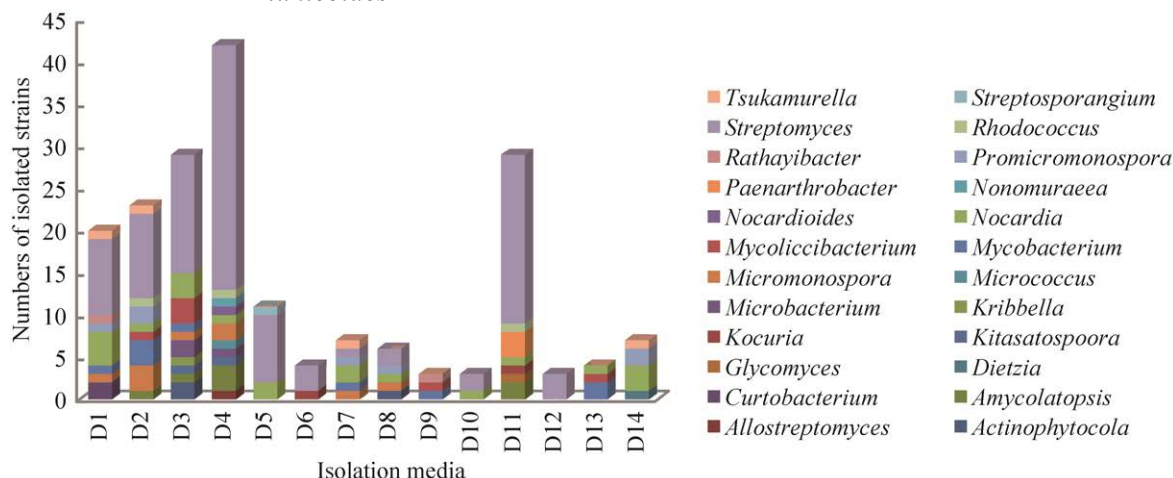


图 4 内生放线菌在不同分离培养基中的分布情况

Figure 4 Comparison of endophytic actinobacteria diversity isolated by different isolation media.

糖和骨粉营养成分较为复杂的 D4 培养基上分离效果最好, D3 培养基次之。而在土壤分离效果最好的培养基 D12(P3)和 D14(M7)及加入植物成分的特设培养基 D6、D9 和 D10 上的分离效果较差。在 11 种培养基中均分离得到链霉菌和诺卡氏菌属放线菌菌株, 小单孢菌属和分枝杆菌属放线菌在 6 种, 原小单孢菌属在 5 种培

养基上分离得到。每种培养基均分离得到特有放线菌属, 所以分离培养基种类的多样化是获得内生放线菌多样性的有效手段, 且培养基的设计要根据试验材料而定。

## 2.5 内生放线菌抑菌活性

供试抑菌活性的内生放线菌分布于 11 个属, 共 74 株。如表 2 和图 5 所示, 37 株放线

表 2 74 株内生放线菌对 5 种病原菌的抑制情况

Table 2 Actipathogenic activities of 74 endophytic actinobacteria against 5 pathogens

Strains	Genus	1	2	3	4	5	Strains	Genus	1	2	3	4	5
DR1104	<i>Actinophytocola</i>	—	—	—	—	—	DR1233	<i>Streptomyces</i>	1.67	2.17	—	—	—
DR4092	<i>Amycolatopsis</i>	1.38	1.64	—	—	—	DR1107	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	2.80	—
DR1099	<i>Amycolatopsis</i>	1.17	5.00	—	—	—	DR1100	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR4011	<i>Curtobacterium</i>	—	1.05	—	—	1.57	DR1119	<i>Streptomyces</i>	—	1.20	2.20	—	—
DR4018	<i>Curtobacterium</i>	—	—	—	—	—	DR1051	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR4152	<i>Micromonospora</i>	—	—	—	—	—	DR3016	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR4093	<i>Micromonospora</i>	—	—	—	—	—	DR1048	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	3.57	—
DR1102	<i>Micromonospora</i>	—	—	—	—	—	DR1023	<i>Streptomyces</i>	—	1.88	—	2.67	—
DR4085	<i>Micromonospora</i>	—	—	—	5.83	—	DR2009	<i>Streptomyces</i>	—	1.56	—	4.44	—
DR4040	<i>Micromonospora</i>	—	1.00	—	1.33	—	DR1073	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR1092	<i>Micromonospora</i>	—	—	—	—	—	DR1094	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR4094	<i>Micromonospora</i>	—	—	—	—	—	DR1097	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR1234	<i>Mycolicibacterium</i>	—	1.10	—	—	—	DR3086	<i>Streptomyces</i>	—	2.50	—	—	—
DR3025	<i>Mycolicibacterium</i>	—	—	—	—	—	DR3087	<i>Streptomyces</i>	—	1.44	—	2.25	—
DR4058	<i>Mycolicibacterium</i>	—	—	3.30	—	—	DR3089	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR1036	<i>Nocardia</i>	—	—	—	—	—	DR3062	<i>Streptomyces</i>	—	3.2	2.60	—	—
DR1031	<i>Nocardia</i>	—	—	—	—	—	DR3060	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	1.71	—
DR4077	<i>Nocardia</i> '	—	2.11	—	—	—	DR3102	<i>Streptomyces</i>	—	1.33	—	—	—
DR1057	<i>Nocardia</i>	—	1.67	—	2.50	—	DR3096	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR4056	<i>Nocardia</i>	—	—	—	—	—	DR3120	<i>Streptomyces</i>	—	1.80	—	4.60	—
DR2012	<i>Nocardia</i>	—	—	—	—	—	DR3118	<i>Streptomyces</i>	—	2.20	—	—	—
DR1113	<i>Nocardia</i>	—	—	—	—	—	DR3119	<i>Streptomyces</i>	—	2.00	—	—	—
DR4149	<i>Nocardia</i>	—	—	—	—	—	DR3083	<i>Streptomyces</i>	—	2.63	1.89	—	—
DR1091	<i>Nocardioides</i>	—	—	—	—	—	DR3106	<i>Streptomyces</i>	—	1.88	1.67	—	—
DR1076	<i>Promicromonospora</i>	—	—	—	—	—	DR3114	<i>Streptomyces</i>	—	1.33	—	—	—
DR4155	<i>Promicromonospora</i>	—	—	—	—	—	DR3122	<i>Streptomyces</i>	—	2.00	2.00	4.40	1.89
DR4036	<i>Rhodococcus</i>	—	—	—	—	—	DR2020	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	3.13	—
DR2004	<i>Streptomyces</i>	1.41	1.13	—	3.79	—	DR2022	<i>Streptomyces</i>	—	3.00	—	5.50	—
DR1028	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—	DR2016	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	6.00	—
DR2032	<i>Streptomyces</i>	1.1	1.18	—	—	—	DR2026	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR1015	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—	DR2028	<i>Streptomyces</i>	—	1.75	—	—	—
DR4012	<i>Streptomyces</i>	3.13	6.88	—	1.25	1.64	DR1098	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR1003	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—	DR3078	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—
DR1065-1	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—	DR3097	<i>Streptomyces</i>	—	2.80	—	—	—
DR1010	<i>Streptomyces</i>	—	2.80	1.33	—	—	DR3044	<i>Streptomyces</i>	—	2.13	—	—	—
DR3021	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—	DR1202	<i>Tsukamurella</i>	—	—	—	—	—
DR1037	<i>Streptomyces</i>	—	—	—	—	—	DR4090	<i>Tsukamurella</i>	—	—	—	—	—

1: *Rhizoctonia solani*; 2: *Pseudomonas aeruginosa*; 3: *Monilia albican*; 4: *Staphylococcus aureus*; 5: *Escherichia coli*. —: no activity; The above data are the size (cm) of bacteriostatic circle.



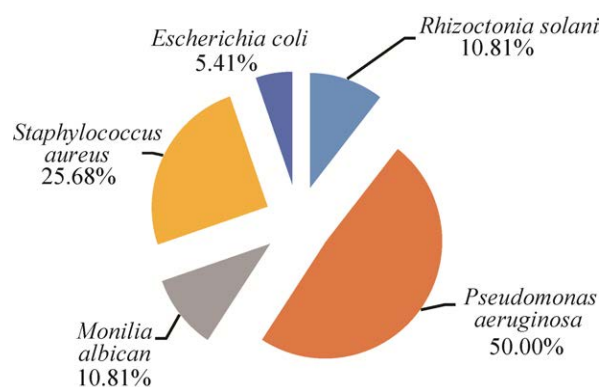


图 5 具抑制病原指示菌活性的金铁锁内生放线菌株百分比

Figure 5 The percentage of endophytic actinobacteria isolated from *P. tunicoides* showing positive results in antimicrobial activities.

菌对至少一种病原菌具有抑制作用, 其中 *Streptomyces malaysiensis* DR4012 对 *Rhizoctonia solani*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus* 和 *Escherichia coli*, *Streptomyces ambofaciens* DR3122 对 *Pseudomonas aeruginosa*、*Monilia albican*、*Staphylococcus aureus* 和 *Escherichia coli* 4 种病原菌均具有抑制作用。总体来说, 链霉菌抗菌活性强于稀有放线菌, 在具有抑菌活性的放线菌菌株中, 抑菌活性最强为链霉菌属, 其次为拟无枝酸菌属和小单孢菌属。值得一提的是, 拟无枝酸菌中对植物病原菌立枯丝核菌具有较强的抑制作用, 而链霉菌对立枯丝核菌抑制作用较弱。金铁锁内生放线菌抗铜绿假单胞菌能力最强, 占比高达 50%, 而其中链霉菌就占活性菌株的 76.67%; 而内生放线菌对大肠杆菌抗性最弱, 仅占比 5.41%。

### 3 讨论与结论

濒危药用植物金铁锁作为一种特殊生境, 确实存在丰富的内生放线菌资源。在本研究中,

链霉菌属为绝对优势菌群, 小单孢菌属为优势菌属之一, 与其他研究者的报道较为一致。而诺卡氏菌属和分枝菌酸小杆菌属在本研究中也为高频率分离菌群, 与他人的研究结果存在较大的差异性。如秦盛等<sup>[37]</sup>从滇南美登木中获得 312 株内生放线菌, 分离频率最高是链霉菌, 其次为拟诺卡氏菌和小单孢菌。李洁等<sup>[38]</sup>以黄花蒿全株为材料, 获 228 株内生放线菌, 链霉菌为绝对优势菌群, 原小单孢菌次之。Zhao 等<sup>[46]</sup>与 Qiu 等<sup>[31]</sup>分别从 26 和 13 种药用植物中分离得到 560 株和 119 株内生放线菌, 其中链霉菌分别占比高达 85%和 67.2%。2018 年, Sharma 等<sup>[47]</sup>从西藏长叶松(*Pinus roxburghii*)中分离得到的优势菌属为链霉菌属、北里孢菌属, 马杜拉放线菌属和小单孢菌属。至 2014 年, 据郑有坤等<sup>[48]</sup>统计, 研究者先后以老鼠 (*Acanthus ilicifolius*)、灯台树(*Alstonia scholar*)、沉香树(*Aquilaria crassna*)、印楝(*Azadirachta indica*)、喜树(*Camptotheca acuminata*)和百部(*Stemona tuberosa*)等 330 多种药用植物为研究对象, 从中分离出大量的内生放线菌, 其绝对优势菌群均为链霉菌。但在免培养检测中, 金铁锁根内生放线菌最大优势菌属为假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)而非链霉菌属, 进一步验证了链霉菌在自然界中并非最大放线菌类群<sup>[37,49-51]</sup>。纯培养和免培养所得放线菌的多样性存在如此大的差异, 究其原因可能是目前纯培养的培养基设置及分菌技术尚处于摸索阶段, 仍有很大的改进空间。此外, 从金铁锁分离得到一些稀有菌属, 如短小杆菌属、迪茨氏菌属、糖霉菌属、考克氏菌属、韩国生工菌属、分枝菌酸小杆菌属、拟诺卡氏菌属、野村菌属、类节杆菌属、拉氏杆菌属和冢村氏菌属等鲜有报道。

适当高温进行预处理可有效提高放线菌的出菌率和多样性, 同时发现不同温度处理均获

得特有菌群,因而多温度设置有利于内生菌的分离,表明内生菌对温度的适生性存在较大差异。培养基的多样性可有效增加可培养放线菌的多样性。在本次试验中,14种培养基分离效果虽然不同,但每种培养基均获得特有菌群,且分离培养基的分离效果因材料性质而异,分离放线菌效果最好的金铁锁根际土培养基D12和D14在本试验中表现非常差,可能是由于内生放线菌从植物组织过渡到培养基需要较长时间,其出菌时间需20–60 d,而土壤放线菌的仅需7–15 d,且两种培养基营养极为丰富,芽孢、假单孢等细菌生长迅速,很快覆盖分离平板,内生放线菌生长缓慢大多没有出菌机会或难以纯化。添有植物组分的特设培养基D6、D9和D10对金铁锁内生放线菌分离未取得预期效果,与李洁等<sup>[38]</sup>试验结果相反,表明内生放线菌因宿主不同而具有其独特性,所以分离培养基的设计要因植物材料而异。

对于内生放线菌的分离,植物样品适当干燥处理有利于出菌,传统的处理方法大多将外部消毒后植物材料放入超净工作台上进行风干,这种方法易引起二次污染,且植物干燥程度不够不利于后期植物体的碾碎等处理,这在较硬、吸水力较强的材料中显得尤为明显。本文对材料干燥方法进行了改进,利用无菌硅胶对植物体进行干燥,效果较为显著,可有效提高出菌率。

放线菌生境多样,次级代谢产物极为丰富,其生物活性物质已超过10 000种,其中70%的天然抗生素由放线菌产生,45%的活性物质从链霉菌中分离得到<sup>[5,52]</sup>。Akshatha等<sup>[30]</sup>从药用植物绣球防风(*Leucas ciliata*)和萝芙木赤松(*Rauwolfia densiflora*)中分离得到一株*Streptomyces longisporoflavus* (JX965948)和一株链霉菌新种*Streptomyces* sp. (JQ926174),该

内生链霉菌提取物具有抗糖尿病活性的潜力。张盼盼等<sup>[53]</sup>从南方红豆杉分离出18株内生放线菌对肿瘤细胞株SGC-7901和NCI-H460抑制率均达到80%以上。Salam等<sup>[10]</sup>从龙血树(*Dracaena cochinchinensis* Lour.)中分离的3株放线菌对癌细胞生长具有抑制作用,随后田守征等<sup>[54]</sup>又从剑叶龙血树(*D. cochinchinensis*)分离得到内生放线菌*Streptomyces* sp. S04,其发酵提取物对肝癌Hep G2抑制率可高达100%。王新位等<sup>[55]</sup>发现刺五加(*Acanthopanax senticosus*)植物内生放线菌CWJ-256的次级代谢产物对体外培养的人乳腺癌细胞MDA-MB-231的增殖具有抑制作用;2019年,Ameen等<sup>[56]</sup>从长叶薄荷(*Mentha longifolia*)、小花锦葵(*Malva parviflora*)和无头公乌(*Pulicaria undulata*)分离出的内生放线菌代谢产物,在体外检测显著抑制耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌(*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),Girão等<sup>[57]</sup>在海带(*Laminaria ochroleuca*)中分离得到90株放线菌,50%的菌株具有抑制白色念珠菌(*Candida albicans*)和金黄色葡萄球菌的作用,有7种放线菌的次级代谢产物可影响整个癌细胞的生存能力,可见植物尤其是药用植物内生放线菌因其特殊的性质已成为替代药源和新活性物质的重要来源<sup>[26,58–60]</sup>。

虽然放线菌的研究已取得了一定的进展,但由于分离方法、培养基设置等限制,目前分离得到的放线菌种类仍非常有限,不及自然界的1%,因而发掘放线菌资源对农药和医药的研制等具有重要意义。金铁锁内生放线菌具有较强的抗菌活性,抗铜绿假单胞菌的效果尤为突出,74株供试菌株中有37株放线菌可有效抑制铜绿假单胞菌,其中抗菌活性最强为链霉菌,而铜绿假单胞菌为伤口感染的主要病原菌,在

某种程度上也能说明金铁锁作为外伤药的原因。研究表明无枝酸菌属菌群具有较大的开发价值<sup>[61-62]</sup>, 本试验也发现两株拟无枝酸菌属菌株具有较强的抗真菌立枯丝核菌的能力。因而, 这些抗菌活性强的放线菌菌株为筛选相应活性物质或挖掘新的生物活性物质提供了丰富的菌种资源。同时, 金铁锁根内可培养放线菌的研究对内生放线菌多样性的认识和寻找金铁锁替代药源具有积极的意义。

## 参考文献

- [1] Agbessi S, Beauséjour J, Déry C, Beaulieu C. Antagonistic properties of two recombinant strains of *Streptomyces melanosporofaciens* obtained by intraspecific protoplast fusion. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62(2/3): 233–238.
- [2] Manivasagan P, Kang KH, Sivakumar K, Li-Chan ECY, Oh HM, Kim SK. Marine actinobacteria: an important source of bioactive natural products. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 38(1): 172–188.
- [3] Braña AF, Fiedler HP, Nava H, González V, Sarmiento-Vizcaino A, Molina A, Acuña JL, García LA, Blanco G. Two *Streptomyces* species producing antibiotic, antitumor, and anti-inflammatory compounds are widespread among intertidal macroalgae and deep-sea coral reef invertebrates from the central Cantabrian Sea. *Microbial Ecology*, 2015, 69(3): 512–524.
- [4] Abdelmohsen UR, Grkovic T, Balasubramanian S, Kamel MS, Quinn RJ, Hentschel U. Elicitation of secondary metabolism in actinomycetes. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(6): 798–811.
- [5] Azman AS, Othman I, Fang CM, Chan KG, Goh BH, Lee LH. Antibacterial, anticancer and neuroprotective activities of rare actinobacteria from mangrove forest soils. *Indian Journal of Microbiology*, 2017, 57(2): 177–187.
- [6] Castronovo LM, Vassallo A, Mengoni A, Miceli E, Bogani P, Firenzuoli F, Fani R, Maggini V. Medicinal plants and their bacterial microbiota: a review on antimicrobial compounds production for plant and human health. *Pathogens: Basel, Switzerland*, 2021, 10(2): 106.
- [7] Uzair B, Menaa F, Khan BA, Mohammad FV, Ahmad VU, Djeribi R, Menaa B. Isolation, purification, structural elucidation and antimicrobial activities of kocumarin, a novel antibiotic isolated from actinobacterium *Kocuria marina* CMG S2 associated with the brown seaweed *Pelvetia canaliculata*. *Microbiological Research*, 2018, 206: 186–197.
- [8] Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 2002, 106(9): 996–1004.
- [9] Sarang H, Rajani P, Vasanthakumari MM, Kumara PM, Siva R, Ravikanth G, Shaanker RU. An endophytic fungus, *Gibberella Moniliformis* from *Lawsonia inermis* L. produces lawsone, an orange-red pigment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2017, 110(7): 853–862.
- [10] Salam N, Khieu TN, Liu MJ, Vu TT, Chu-Ky S, Quach NT, Phi QT, Narsing Rao MP, Fontana A, Sarter S, Li WJ. Endophytic actinobacteria associated with *Dracaena cochinchinensis* Lour.: isolation, diversity, and their cytotoxic activities. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 1308563.
- [11] Hamed J, Kafshnouchi M, Ranjbaran M. A study on actinobacterial diversity of Hampoel cave and screening of their biological activities. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, 26(7): 1587–1595.
- [12] 张万芹, 房保柱, 韩明贤, 李帅, 董雷, 蒋宏忱, 李文均. 贵州兴义喀斯特洞穴可培养放线菌多样性及抗菌活性初筛. *微生物学报*, 2020, 60(6): 1063–1073.
- [12] Zhang WQ, Fang BZ, Han MX, Li S, Dong L, Jiang HC, Li WJ. Diversity and antibacterial activity of culturable actinobacteria in Karst cave soil in Xingyi, Guizhou. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(6): 1063–1073. (in Chinese)
- [13] Bhatnagar I, Kim SK. Immense essence of excellence: marine microbial bioactive compounds. *Marine Drugs*, 2010, 8(10): 2673–2701.
- [14] Jardine J, Mavumengwana V, Ubomba-Jaswa E. Antibiotic resistance and heavy metal tolerance in cultured bacteria from hot springs as indicators of environmental intrinsic resistance and tolerance levels. *Environmental Pollution*, 2019, 249: 696–702.
- [15] Amin A, Ahmed I, Salam N, Kim BY, Singh D, Zhi XY, Xiao M, Li WJ. Diversity and distribution of thermophilic bacteria in hot springs of Pakistan. *Microbial Ecology*, 2017, 74(1): 116–127.
- [16] Manter DK, Delgado JA, Holm DG, Stong RA. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microbial Ecology*, 2010, 60(1): 157–166.

- [17] Passari AK, Mishra VK, Saikia R, Gupta VK, Singh BP. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 273.
- [18] Wagner MR, Lundberg DS, Del Rio TG, Tringe SG, Dangel JL, Mitchell-Olds T. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. *Nature Communications*, 2016, 7: 12151.
- [19] 孙红敏, 魏玉珍, 方晓梅, 余利岩, 张玉琴. 蛇足石杉内生细菌多样性. *微生物学报*, 2016, 56(4): 614–628.  
Sun HM, Wei YZ, Fang XM, Yu LY, Zhang YQ. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Huperzia serrata*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(4): 614–628. (in Chinese)
- [20] Levy A, Salas Gonzalez I, Mittelviefhaus M, Clingenpeel S, Herrera Paredes S, Miao JM, Wang KR, Devescovi G, Stillman K, Monteiro F, Rangel Alvarez B, Lundberg DS, Lu TY, Lebeis S, Jin Z, McDonald M, Klein AP, Feltcher ME, Rio TG, Grant SR, Doty SL, Ley RE, Zhao BY, Venturi V, Pelletier DA, Vorholt JA, Tringe SG, Woyke T, Dangel JL. Genomic features of bacterial adaptation to plants. *Nature Genetics*, 2018, 50(1): 138–150.
- [21] Berg G, Krechel A, Ditz M, Sikora RA, Ulrich A, Hallmann J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 51(2): 215–229.
- [22] Almeida CV, Andreote FD, Yara R, Tanaka FAO, Azevedo JL, Almeida M. Bacteriosomes in axenic plants: endophytes as stable endosymbionts. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(10): 1757–1764.
- [23] Francis I, Holsters M, Vereecke D. The Gram-positive side of plant-microbe interactions. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(1): 1–12.
- [24] Durán P, Thiergart T, Garrido-Oter R, Agler M, Kemen E, Schulze-Lefert P, Hacquard S. Microbial interkingdom interactions in roots promote *Arabidopsis* survival. *Cell*, 2018, 175(4): 973–983.e14.
- [25] Giaque H, Connor EW, Hawkes CV. Endophyte traits relevant to stress tolerance, resource use and habitat of origin predict effects on host plants. *The New Phytologist*, 2019, 221(4): 2239–2249.
- [26] Dinesh R, Srinivasan V, Sheeja TE, Anandaraj M, Srmbikkal H. Endophytic actinobacteria: diversity, secondary metabolism and mechanisms to unsilence biosynthetic gene clusters. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43(5): 546–566.
- [27] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, 260(5105): 214–216.
- [28] 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.
- [29] Qin S, Xing K, Jiang JH, Xu LH, Li WJ. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(3): 457–473.
- [30] Akshatha VJ, Nalini MS, D'Souza C, Prakash HS. Streptomycete endophytes from anti-diabetic medicinal plants of the Western Ghats inhibit alpha-amylase and promote glucose uptake. *Letters in Applied Microbiology*, 2014, 58(5): 433–439.
- [31] Qiu P, Feng ZX, Tian JW, Lei ZC, Wang L, Zeng ZG, Chu YW, Tian YQ. Diversity, bioactivities, and metabolic potentials of endophytic actinomycetes isolated from traditional medicinal plants in Sichuan, China. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2015, 13(12): 942–953.
- [32] 廖萍, 赵 , 张瀚能, 刘茂柯, Petri Penttinen, 张小平, 赵珂. 川楝内生放线菌多样性及抗菌活性筛选. *微生物学通报*, 2016, 43(11): 2374–2384.  
Liao P, Zhao C, Zhang HN, Liu MK, Penttinen P, Zhang XP, Zhao K. Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. *Microbiology China*, 2016, 43(11): 2374–2384. (in Chinese)
- [33] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草-6. 上海: 上海科学技术出版社, 1999.
- [34] 金虹, 谭克勤. 西南民族药金铁锁的研究现状及展望. *中医药导报*, 2005, 11(12): 66–67, 73.  
Jin H, Tan KQ. Study actuality and prospect on tuniclike *Psammosilene* root of southwestern national herbs. *Guiding Journal of TCM*, 2005, 11(12): 66–67, 73. (in Chinese)
- [35] 朱常成, 徐士奎, 钱子刚, 张军, 张帆, 杨耀文. 金

- 铁锁的地理分布及分布区的初步分析. 中国现代应用药学, 2007, 24(1): 28–31.
- Zhu CC, Xu SK, Qian ZG, Zhang J, Zhang F, Yang YW. Study on the geographic distribution of *Psammosilene tunicoides* W.C.Wu et C.Y.Wu. *Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy*, 2007, 24(1): 28–31. (in Chinese)
- [36] 王笑尘. 中国野生药用植物资源现状与思考. 中国现代中药, 2006, 8(3): 37–38.
- [37] 秦盛. 滇南美登木内生放线菌多样性及生物活性初步研究. 云南大学博士学位论文, 2009.
- [38] 李洁. 黄花蒿内生放线菌资源及其对黄花蒿生长和青蒿素生物合成的影响. 云南大学博士学位论文, 2010.
- [39] 李旭东. 羽毛针禾共生菌的分离鉴定及其植株表型多样性的研究. 石河子大学硕士学位论文, 2019.
- [40] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65(5): 501–509.
- [41] Li WJ, Xu P, Schumann P, Zhang YQ, Pukall R, Xu LH, Stackebrandt E, Jiang CL. *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(7): 1424–1428.
- [42] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613–1617.
- [43] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 1990, 215(3): 403–410.
- [44] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [45] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [46] Zhao K, Penttinen P, Guan TW, Xiao J, Chen Q, Xu J, Lindström K, Zhang LL, Zhang XP, Strobel GA. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Current Microbiology*, 2011, 62(1): 182–190.
- [47] Sharma P, Baunthiyal M. Endophytic actinobacteria from *Pinus roxburghii*: isolation, diversity and antimicrobial potential against human pathogens. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2018, 7: 3021–3027.
- [48] 郑有坤, 刘凯, 熊子君, 李文均, 徐丽华, 赵立兴. 药用植物内生放线菌多样性及天然活性物质研究进展. 中草药, 2014, 45(14): 2089–2099.
- Zheng YK, Liu K, Xiong ZJ, Li WJ, Xu LH, Zhao LX. Research progress on biodiversity of endophytic actinobacteria in medicinal plants and their bioactive substances. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014, 45(14): 2089–2099. (in Chinese)
- [49] Ulrich K, Ulrich A, Ewald D. Diversity of endophytic bacterial communities in poplar grown under field conditions. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 63(2): 169–180.
- [50] 曹艳茹. 动物粪便放线菌多样性及生物活性研究. 西北农林科技大学博士学位论文, 2012.
- [51] 苗翠苹. 三七根际土壤微生物的群落特征. 云南大学博士学位论文, 2015.
- [52] Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 2005, 58(1): 1–26.
- [53] 张盼盼, 秦盛, 袁博, 陈永强, 曹小迎, 蒋继宏. 南方红豆杉内生及根际放线菌多样性及其生物活性. 微生物学报, 2016, 56(2): 241–252.
- Zhang PP, Qin S, Yuan B, Chen YQ, Cao XY, Jiang JH. Diversity and bioactivity of actinomycetes isolated from medicinal plant *Taxus chinensis* and rhizospheric soil. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(2): 241–252. (in Chinese)
- [54] 田守征, 黄之镨, 赵玉瑛, 赵庆, 张晓梅. 剑叶龙血树内生放线菌活性菌株的筛选和鉴定. 广西植物, 2020, 40(5): 727–734.
- Tian SZ, Huang ZP, Zhao YY, Zhao Q, Zhang XM. Bioactivity and identification of endophytic actinomycetes from *Dracaena cochinchinensis*. *Guihaia*, 2020, 40(5): 727–734. (in Chinese)
- [55] 王新位, 郭文强, 赵建元, 余利岩, 席楠, 何宁, 王珊珊, 袁丽杰, 解云英. 刺五加内生放线菌 *Streptomyces* sp. CWJ-256 次生代谢产物研究. 中国医药生物技术, 2018, 13(5): 404–411.
- Wang XW, Guo WQ, Zhao JY, Yu LY, Xi N, He N, Wang SS, Yuan LJ, Xie YY. Study on the secondary metabolites of an endophytic *Streptomyces* sp. CWJ-256 isolated from *Acanthopanax senticosus*. *Chinese Medicinal Biotechnology*, 2018, 13(5): 404–411. (in Chinese)



- [56] Ameen F, Reda SA, El-Shatoury SA, Riad EM, Enany ME, Alarfaj AA. Prevalence of antibiotic resistant mastitis pathogens in dairy cows in Egypt and potential biological control agents produced from plant endophytic actinobacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, 26(7): 1492–1498.
- [57] Girão M, Ribeiro I, Ribeiro T, Azevedo IC, Pereira F, Urbatzka R, Leão PN, Carvalho MF. Actinobacteria isolated from *Laminaria ochroleuca*: a source of new bioactive compounds. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 683.
- [58] 张超群, 戴建荣. 放线菌的研究现状与展望. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(1): 110–113, 122.  
Zhang CQ, Dai JR. Status of and prospects for research on actinomycetes. *Journal of Pathogen Biology*, 2019, 14(1): 110–113, 122. (in Chinese)
- [59] Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, Rai M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2015, 108(2): 267–289.
- [60] Passari AK, Mishra VK, Singh G, Singh P, Kumar B, Gupta VK, Sarma RK, Saikia R, Donovan AO, Singh BP. Author correction: insights into the functionality of endophytic actinobacteria with a focus on their biosynthetic potential and secondary metabolites production. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 4650.
- [61] Adamek M, Alanjary M, Sales-Ortells H, Goodfellow M, Bull AT, Winkler A, Wibberg D, Kalinowski J, Ziemert N. Comparative genomics reveals phylogenetic distribution patterns of secondary metabolites in *Amycolatopsis* species. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 426.
- [62] Schwarz PN, Roller L, Kulik A, Wohlleben W, Stegmann E. Engineering metabolic pathways in *Amycolatopsis japonicum* for the optimization of the precursor supply for heterologous brasilicardin congeners production. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2018, 3(1): 56–63.

(本文责编 张晓丽)