

红豆杉内生放线菌的分离及活性菌株的筛选与鉴定

张曼¹, 解修超^{1,2}, 陈文强^{1,2}, 邓百万^{*1,2}, 张晓伟¹, 孔亚男¹

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723001)

摘要: 通过组织匀浆法分离红豆杉(*Taxus chinensis*)根、茎、叶 3 个部位的内生放线菌, 采用滤纸片法初步研究了内生放线菌发酵液的抑菌活性, 并对抑菌活性明显的菌株进行了分子鉴定。结果表明, 分离纯化得到内生放线菌 55 株, 抑菌活性试验中共有 21 株表现出了不同程度的拮抗作用, 占全部分离菌株的 38.2%, 其中 4 株具有明显的抑菌活性。经 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定 3 株为链霉菌属(*Streptomyces* sp.), 1 株为小单孢菌属(*Micromonospora* sp.)。

关键词: 红豆杉; 内生放线菌; 分离; 筛选; 鉴定

中图分类号: Q 939.9 文献标志码: A 文章编号: 1673-1689(2012)05-0549-06

Isolation, Screening and Identification of Endophytic Actinomycetes from *Taxus Chinensis*

ZHANG Man¹, XIE Xiu-chao^{1,2}, CHEN Wen-qiang^{1,2}, DENG Bai-wan^{*1,2},
ZHANG Xiao-wei¹, KONG Ya-nan¹

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723001, China; 2. Shaanxi Engineering Research Center of Edible and Medicated Fungi, Hanzhong 723001, China)

Abstract: In this manuscript, endophytic actinomycetes were isolated from the root, stem and leaf of *Taxus chinensis* by the method of tissue homogenate. Antimicrobial activities of endophytic actinomycetes fermentation broth were determined with filter paper and molecular identification of some potential strains were also carried out. The result indicated that 55 strains of endophytic actinomycetes were isolated, 21 of them have varied antimicrobial activity, accounting for 38.2% of all strains and 4 strains have higher antimicrobial activity. Results of 16S rDNA gene sequences analysis of the 4 strains showed that 3 of them belong to *Streptomyces* sp., 1 belongs to *Micromonospora* sp.

Key words: *taxus chinensis*, endophytic actinomycetes, isolation, screening, cation

植物与微生物之间存在着一种复杂的微生态关系, 在这个微生态中发挥重要作用的成员之一是植物内生菌, 主要包括真菌、细菌和放线菌。植物内生放线菌(*Endophytic Actinomycetes*)是指存活

于健康植物组织内部, 而又不引发(至少暂时不引发)宿主植物表现出明显感染症状的放线菌^[1]。这一类放线菌资源多样, 在与宿主植物长期的“协同进化”中可能会在为宿主提供保护, 抵御外来其它

收稿日期: 2011-05-11

基金项目: 陕西省重点实验室资助项目(08JZ21); 陕西省教育厅科研基金项目(08JK248, 08JK244); 陕西理工学院科研基金项目(SL-GQD0712, SLGQD0713)。

*通信作者: 邓百万(1963-), 男, 陕西汉中人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生物资源保护与开发利用研究。

E-mail: Dengbw2008@yahoo.com.cn

微生物的侵害等方面发挥作用,而且部分可以产生与宿主相同或相似的次生代谢产物。

近年来,国内外研究人员开展了大量有关植物内生放线菌的研究,发现其产生的活性物质种类极其丰富,主要包括抗生素、有机酸、氨基酸、维生素、甾体、酶及酶抑制剂、免疫调节剂等^[2-4]。Birber^[5]等从欧洲桉木根瘤分离到一株链霉菌可产生新的萘醌类抗生素,抑菌研究表明对革兰氏阳性菌有活性,对革兰氏阴性菌则无活性,对 k562 人白血病细胞有细胞毒性;Strobel^[3]等从肯尼迪黑质蛇纹树中分离到一株能产生广谱抗生素 Munumbicins 的链霉菌,对耐药性细菌及疟原虫有抑制作用。另外,我国的秦盛^[6]、古强^[7]等人也开展了植物内生放线菌在拮抗活性方面的研究。

药用植物中因含有多种活性成分而受到广泛关注,其中的内生菌可能与宿主植物之间存在着更为特殊的关系。刘宁^[8]等对云南西双版纳多种药用植物中的内生放线菌进行了抗菌和抗肿瘤研究,并从放线菌的发酵液中找到了 6 种化合物,其中 1 种为新化合物。2009 年郑法新^[9]等人从云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)根部分离到一株内生放线菌 TAR11,其发酵液对多种植物病原菌均有抑制作用。我国药用植物资源丰富,为寻找新的放线菌资源以及活性物质提供了极大的可能性。

红豆杉(*Taxus chinensis*)为红豆杉科(*Taxaceae*)红豆杉属(*Taxus*)植物,是含有抗癌药物紫杉醇的珍稀裸子植物,全世界共分布有 11 种,我国有 4 种和 1 个变种^[10]。目前,有关红豆杉内生菌的研究主要集中在内生真菌^[11-12]方面,而红豆杉内生放线菌的研究报道尚少。本研究以采自秦岭山区的红豆杉(*Taxus chinensis*)为材料,分离其内生放线菌,并对抗菌活性菌株进行筛选以及初步鉴定,以期对植物内生放线菌的利用与开发提供方法和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 红豆杉(*Taxus chinensis*)采自陕西佛坪国家自然保护区。

1.1.2 靶标菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、沙门氏菌(*Salmonella*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、白色念珠菌(*Monilia albican*),均由陕西省食药菌工程技术研究中心提供。

1.1.3 培养基 分离培养基:改良高氏一号培养基(可溶性淀粉 20.0 g, KNO₃ 1.0 g, NaCl 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, 琼脂粉 15.0 g, 加水至 1 000 mL, pH 7.2~7.4)、改良高氏二号培养基(葡萄糖 1.0 g, 蛋白胨 0.5 g, 胰蛋白胨 0.3 g, NaCl 0.5 g, 复合维生素 0.5 g, 琼脂粉 15 g, 加水至 1 000 mL, pH 7.2~7.4)、海藻糖-脯氨酸培养基(海藻糖 5.0 g, 脯氨酸 1.0 g, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g, NaCl 1.0 g, CaCl₂ 2.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.0 g, 琼脂粉 15 g, 加水至 1 000 mL, pH 7.2~7.4)和 1/10 ATCC172 培养基(葡萄糖 1.0 g, 可溶性淀粉 2.0 g, 酵母浸汁 0.5 g, CaCO₃ 1.5 g, N-Z-Amine A 0.5 g, 琼脂粉 15 g, 加水至 1 000 mL, pH 7.2~7.4)^[13]。各分离用培养基中均加入重铬酸钾 75.0 mg/L, 制霉菌素 100 mg/L, 萘啶酮酸 20 mg/L, 用以抑制杂菌生长^[14]。液体发酵培养基:酵母膏-麦芽汁培养基(酵母粉 4 g, 麦芽浸提物 5 g, 葡萄糖 4 g, 琼脂粉 15 g, 加水至 1 000 mL, pH 7.2~7.4)。

1.2 方法

1.2.1 分离 取新鲜的红豆杉组织,在加有洗涤剂的水中浸洗 10 min, 去除表面泥沙,然后自来水冲洗 2 h 左右。在超净工作台中,依次为无菌水冲洗 3 次,体积分数 75%乙醇浸泡 45 s, 无菌水冲洗 3 次,0.1% HgCl₂ 浸泡 5 min, 无菌水冲洗 5 次。无菌解剖刀取根、茎韧皮部组织以及叶片各约 5 g 分别剪碎置于研钵中,各加 45 mL 无菌水充分研磨,取 100 μL 匀浆涂布于各分离培养基,置于 28 °C 下培养 15~30 d。待有菌长出后,采用平板划线纯化直至为单菌落,挑取菌丝于甘油管中 4 °C 保存备用。

1.2.2 表面消毒可靠性的检验 取最后一次冲洗用的无菌水 100 μL 涂布于各分离培养基,28 °C 下培养 30 d,检查消毒效果。

1.2.3 发酵培养 将纯化好菌株接种于 50 mL 酵母膏-麦芽汁培养基中,28 °C,160 r/min 发酵 7 d。10 000 r/min 离心 20 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后将所得滤液 4 °C 保存备用。

1.2.4 抗菌活性测定 采用滤纸片扩散法^[15]测

定全部分离菌株发酵液对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌的拮抗作用。

1.2.5 菌株鉴定 在 1/10 ATCC172 培养基上, 28 °C 培养抗菌活性明显的菌株 10 d, 观察其菌落形态及培养特征。采用溶菌酶-SDS 法^[16] 提取抗菌活性明显菌株的总 DNA。以细菌通用引物 27F: (5'-AGA GTTTGATC-CTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增其 16S rDNA 序列。PCR 反应体系 (25.0 μL): 2×Taq PCR Mix 12.0 μL, 10.0 μmol / mL 的引物各 1.0 μL, DNA 模板 2.0 μL, 灭菌双蒸水 9.0 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。用 1.0 g/dL 的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物, 由上海桑尼生物科技有限公司进行双向测序。将所测序列提交到 NCBI 进行 Blast 检索, 下载同源性较高的数据, 生成 Fasta 格式的文件。用 Clusta-X 软件对所得序列进行人工校正及比对分析。利用 Mega5, 按照 N-J 法聚类, 选择 1 00 个重复做 Bootstrap 值分析, 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 表面消毒的可靠性

在用最后一次冲洗用无菌水涂布的平板上, 28 °C 下培养 30 d, 未见有放线菌菌落长出。由此证明, 经分离并多次纯化后得到的放线菌均为红豆杉内生放线菌。

2.2 红豆杉内生放线菌的分离

经表面消毒、采用组织匀浆法进行了 4 次内生放线菌, 经过纯化, 按菌落形态, 借助显微镜, 排除重复, 共得到放线菌 55 株(如表 1)。

表 1 红豆杉不同组织部位分离得到的内生放线菌

Tab. 1 Different tissues of endophytic actinomycete from *Taxus chinensis*

| 组织部位 | 内生放线菌数目 | 分离比率 | 菌株编号 |
|---------|---------|-------|-----------|
| 根(Root) | 32 | 58.2% | TA01-TA32 |
| 茎(Stem) | 15 | 27.3% | TA33-TA47 |
| 叶(Leaf) | 8 | 14.5% | TA48-TA55 |

表 1 结果所示, 红豆杉 3 个部位中内生放线菌

的分布数量依次为根>茎>叶, 可见根为红豆杉内生放线菌分布最多的部位。从根中分离到 32 株, 占分离菌株总数的 58.2%; 茎中分离到 15 株, 占分离菌株总数的 27.3%; 叶中仅分离到 8 株, 占分离菌株总数的 14.5%。

2.3 分离菌株的抗菌活性

采用滤纸片扩散法对 55 株内生放线菌的发酵液进行抗菌活性研究, 有 21 株表现出了不同程度的拮抗活性, 占全部分离菌株的 38.2%(如表 2)。

表 2 红豆杉内生放线菌对靶标菌的拮抗作用

Tab. 2 Antagonistic action of endophytic actinomycete from *Taxus chinensis*

| 菌株编号 | 枯草芽孢杆菌 | 金黄色葡萄球菌 | 大肠杆菌 | 沙门氏菌 | 铜绿假单胞菌 | 白色念珠菌 |
|------|--------|---------|------|------|--------|-------|
| TA03 | ++ | ++ | + | - | - | - |
| TA04 | - | - | + | - | - | - |
| TA09 | + | + | - | - | - | - |
| TA11 | + | + | + | - | - | + |
| TA13 | + | + | - | - | - | - |
| TA17 | +++ | +++ | ++ | + | - | + |
| TA20 | ++ | ++ | + | - | - | - |
| TA21 | + | + | - | - | - | - |
| TA25 | +++ | +++ | ++ | + | - | ++ |
| TA27 | + | + | + | - | - | - |
| TA32 | ++ | ++ | - | - | - | + |
| TA35 | ++ | ++ | - | - | - | + |
| TA36 | - | - | + | - | - | - |
| TA38 | + | + | - | - | - | - |
| TA42 | +++ | +++ | - | - | - | +++ |
| TA44 | ++ | ++ | - | - | - | + |
| TA45 | +++ | +++ | ++ | + | - | + |
| TA47 | + | + | - | - | - | - |
| TA48 | + | + | - | - | - | + |
| TA52 | ++ | ++ | + | + | - | + |
| TA54 | + | + | - | - | - | - |

注: +: 抑菌直径为 8-12mm; ++: 抑菌直径为 13-20mm; +++: 抑菌直径为 21-28mm; -: 无抑菌活性

表 2 结果所示, 在具有抗菌活性的分离菌株中, 以 TA17、TA25 和 TA45 的抗菌谱最广, 对枯草

芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、沙门氏菌和白色念珠菌均有活性,其中对前两种靶标菌的抑制作用明显,抑菌圈直径达 27.0 mm。此外,实验中发现,TA42 除了对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌有抑制活性之外,对白色念珠菌的拮抗活性属所有菌株发酵液中最强,抑菌圈直径为 21.0 mm。能拮抗沙门氏菌活性菌株最少,仅为 4 株,占全部活性菌株总数的 7.3%,所有菌株均对铜绿假单胞菌不表现抗菌活性。

2.4 抗菌活性菌株的鉴定

经过抗菌活性测定,55 株内生放线菌中共有 21 株表现出了不同程度的拮抗作用,依据抑菌圈直径大小,筛选出 4 株具有较强抗菌活性的菌株进行了形态特征观察和 16S rDNA 基因序列分析,菌株编号分别为:TA17、TA25、TA42 和 TA45。

2.4.1 形态特征观察 在 1/10 ATCC172 培养基上,28 °C 培养 10 d 后,菌落形态、基内菌丝体生长、气生菌丝体及可溶性色素各有不同(如表 3)。

表 3 4 株内生放线菌的形态分类

Tab. 3 Morphological classification of 4 endophytic actinomycetes

| 菌株编号 | 菌落及孢子丝形态 | 基内菌丝 | 气生菌丝 | 可溶性色素 |
|------|--|------|------|-------|
| TA17 | 淡黄色,有突起,菌落较规则,表层呈粉状,近圆形,边缘无晕圈;菌丝螺旋状,直径 0.7 μm | 黄褐色 | 淡黄色 | 无 |
| TA25 | 桔橙色后变为亮桔橙色,有突起,菌落直径 2.3 mm,皱褶,湿润油状;菌丝直径 0.4 μm,有分支,不断裂 | 橙色 | 无 | 无 |
| TA42 | 灰色,有褶皱状突起,菌落规则,表层呈粉状,近圆形,边缘无晕圈;菌丝波曲状,直径 0.8 μm | 灰褐色 | 灰色 | 黑色 |
| TA45 | 灰白色,菌落紧密,无突起,表层呈粉状,近圆形,边缘有晕圈;菌丝螺旋状,直径 0.7 μm | 褐色 | 灰白色 | 淡黄色 |

依据《放线菌分类基础》^[17]进行形态分类,初步将菌株 TA17、TA42 和 TA45 归为链霉菌属 (*Streptomyces*); TA25 归为小单孢菌属 (*Micromonospora*)。

2.4.2 16S rDNA 基因序列分析 对菌株 TA17、TA25、TA42 和 TA45 进行总 DNA 的提取、16S rDNA 基因的 PCR 扩增和双向测序。根据 16S rDNA 基因序列,利用 Mega5,按照 N-J 法聚类,选择 1 000 个重复做 Bootstrap 值分析,构建了系统发育树(如图 1)。

图 1 结果所示,4 个菌株与相应模式菌株的相似度均在 98% 以上。其中 TA17、TA25 和 TA45 分别与已发表菌株 *Streptomyces flaveus*、*Micromonospora endolithica* 和 *Streptomyces carpathicus* 聚类在同一个分支上,相似度最高;TA42 与 *Streptomyces chryseus*、*Streptomyces roseogriseus* 的亲缘关系最为相近。基于形态特征和 16S rDNA 序列分析,初步确定 TA17、TA42 和 TA45 为链霉菌属 (*Streptomyces* sp.) 的已知种,TA25 为小单孢菌属 (*Micromonospora* sp.) 的已知种。

3 结语

从植物中分离放线菌,材料消毒与杂菌抑制剂的选择是决定分离成败的关键步骤,植物表面及组织内通常附着有比较多的真菌和细菌,培养时会快速布满整个平板,不利于放线菌的分离。实验表明,本实验确定的消毒时间及抑制剂浓度能有效阻止杂菌污染,当然这也跟植物材料的树龄及致密程度有关。

由于植物内生放线菌来自独特的生存环境而成为人们寻找新的放线菌资源和活性物质的重要来源,目前关于此类微生物的分离与拮抗菌株筛选已成为抗生素、生物防治等领域研究与开发的一项重要工作。本研究共分离得到 55 株内生放线菌,自根部所分离到的菌株有 32 株,占分离菌株总数的 38.2%,明显高于茎部和叶部,与 Thongchai Taechowisan^[18]等人从不同组织中内生放线菌的分离数量与所占比例基本一致,这可能与根部最为接近放线菌的大本营-土壤有关,为放线菌入侵植物皮层提供了便利。活性实验显示,(1)55 株内生放线

菌发酵液中有 38.2% 的分离菌株显示出了不同程度的抗菌活性,略高于朱文勇^[19]等人对喜树内生放线菌的抗菌活性测定结果,可见利用植物内生放线菌在筛选新颖抗生素方面具有较强的潜在价值。(2)数据统计表明,能拮抗细菌的内生放线菌比拮抗真菌的多,其中拮抗革兰氏阳性菌(G⁺)的内生放线菌明显比拮抗革兰氏阴性菌(G⁻)的多,这与大

多数土壤放线菌的总体活性结果一致。另外有 3 株链霉菌(*Streptomyces* sp.)和 1 株小单孢菌(*Micromonospora* sp.)的发酵液对供测试的 4 种靶标细菌和 1 种靶标真菌均表现出了较强的抑制作用,具有作为抗生素生产菌的潜力,但其产生的抗生素类物质结构与作用机理有待进一步研究。

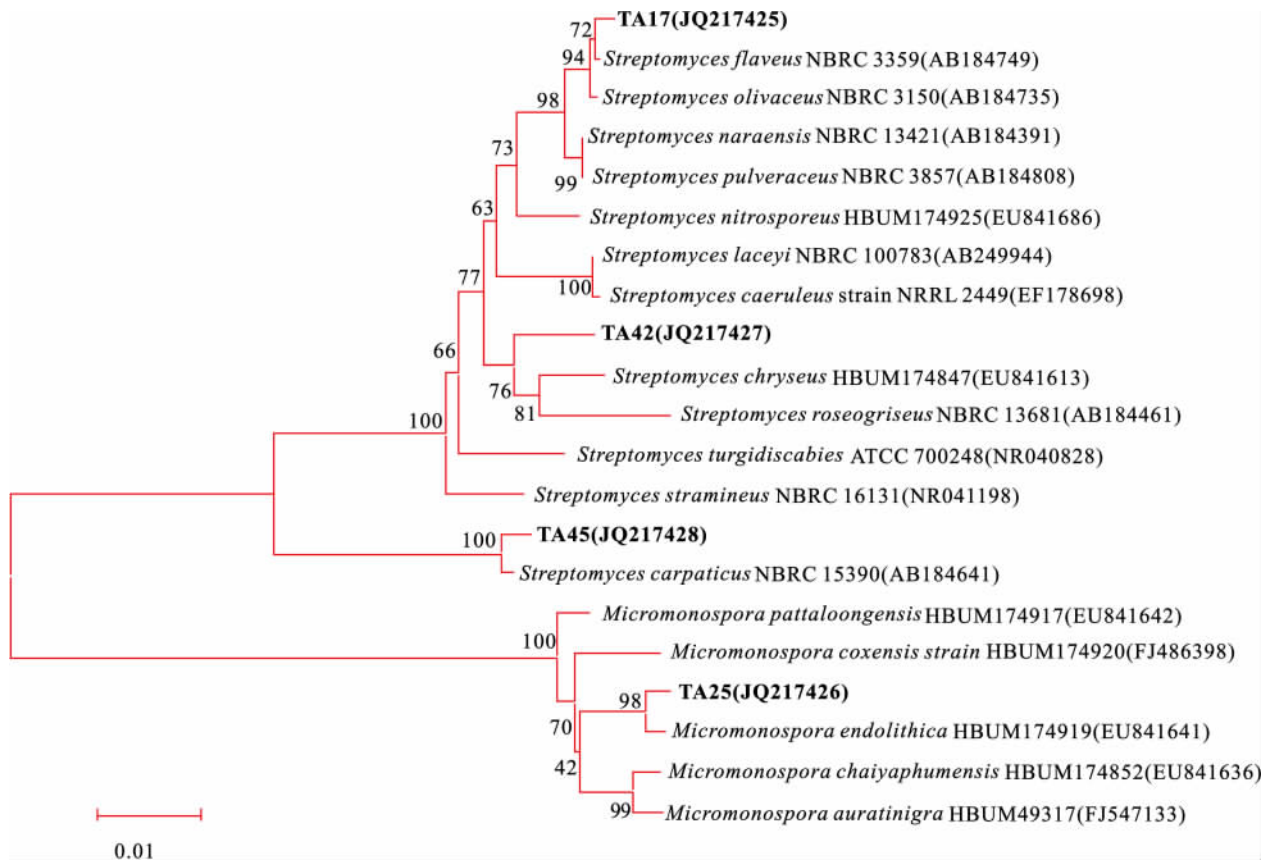


图 1 4 株内生放线菌的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 1 The phylogenetic tree of 4 endophytic actinomycetes on 16S rDNA sequences

参考文献(References):

[1] Herre EA, Mejia LC, Kyllö DA, et al. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and my-corrhizae[J]. **Ecology**, 2007, 88 (3): 550—558.

[2] Igarashi Y. Screening of novel bioactive compounds from plant-associated actinomycetes[J]. **Actinomycetologica**, 2004, 18: 63—66.

[3] Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*[J]. **Microbiology**, 2002, 148: 2675—2685.

[4] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. **Microbiol Mol Biol Rev**, 2003, 67 (4): 491—502.

[5] Birber B, Nuske J, Ritzau M, et al. Alnumycin, a new naphthoquinone antibiotic produced by an endophytic *Streptomyces* sp. [J]. **J. Antibiotics**, 1998, 51: 381—382.

- [6] 秦盛, 赵立兴, 陈云, 等. 药用植物内生放线菌的分离、筛选及活性菌株 YIM61470 鉴定[J]. 微生物学通报, 2009, 36 (11): 1693—1699.
QIN Sheng, ZHAO Li-xing, CHEN Yun, et al. Endophytic actinomycetes associated with medicinal plants: isolation, antimicrobial activity and identification[J]. **Microbiology**, 2009, 36 (11): 1693—1699. (in Chinese)
- [7] 古强, 刘宁, 邱旦恒, 等. 植物叶片内生放线菌的分离、分类与拮抗活性[J]. 微生物学报, 2006, 46 (5): 778—782.
GU Qiang, LIU Ning, QIU Dan-heng, et al. Isolation, classification and antimicrobial activity of endophytic actinomycetes from plant leave[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2006, 46 (5): 778—782. (in Chinese)
- [8] 刘宁, 张辉, 郑文, 等. 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[J]. 微生物学报, 2007, 47 (5): 823—827.
LIU Ning, ZHANG Hui, ZHENG Wen, et al. Bioactivity of endophytic actinomycetes from medicinal plants and secondary metabolites from strain D62[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2007, 47 (5): 823—827. (in Chinese)
- [9] 郑法新, 程璐, 李侠, 等. 云南红豆杉内生放线菌 TAR11 活性代谢产物的初步研究[J]. 生物技术通讯, 2009, 20 (4): 538—540.
ZHENG Fa-xin, CHENG Lu, LI Xia, et al. Preliminary study on bioactive metabolite of endophytic actinomycetes TAR11 in *Taxus yunnanensis* Cheng et L. K. Fu[J]. **Letters In Biotechnology**, 2009, 20 (4): 538—540. (in Chinese)
- [10] 中国科学院植物研究所编辑委员会. 中国植物志第七卷[M]. 北京: 科学出版社, 1978, 438—443.
- [11] 陈淑娟, 刘佳佳, 龚汉祥, 等. 红豆杉内生真菌次生代谢物的分离鉴定及其抗菌活性分析[J]. 生物工程学报, 2009, 25 (3): 368—374.
CHEN Shu-juan, LIU Jia-jia, GONG Han-xiang, et al. Identification and antibacterial activity of secondary metabolites from *Taxus* endophytic fungus[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2009, 25 (3): 368—374. (in Chinese)
- [12] 靳瑞, 康冀川, 文庭池, 等. 一株产紫衫醇内生真菌液体发酵工艺的优化[J]. 菌物学报, 2011, 30 (2): 235—241.
JIN Rui, KANG Ji-chuan, WEN Ting-chi, et al. A study on optimal fermentation of an endophytic fungus producing taxol [J]. **Mycosystema**, 2011, 30 (2): 235—241. (in Chinese)
- [13] 彭云霞, 姜怡, 段淑蓉, 等. 稀有放线菌的选择性分离方法[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2007, 29 (1): 86—89.
PENG Yun-xia, JIANG Yi, DUAN Shu-rong, et al. Selective isolation methods of rare actinomycetes[J]. **Journal of Yunnan University: Natural Science**, 2007, 29 (1): 86—89. (in Chinese)
- [14] 姜怡, 段淑蓉, 唐蜀昆, 等. 稀有放线菌分离方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33 (1): 181—183.
JIANG Yi, DUAN Shu-rong, TANG Shu-kun, et al. Isolation methods of rare actinomycetes[J]. **Microbiology**, 2006, 33 (1): 181—183. (in Chinese)
- [15] 张煜玲, 张利平, 石楠. 产抑菌活性物质放线菌菌株的筛选[J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (12): 6971—6974.
ZHANG Yu-ling, ZHANG Li-ping, SHI Nan. Screening of strains of actinomycetes with antibacterial activity[J]. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**, 2011, 39 (12): 6971—6974. (in Chinese)
- [16] 闫莉萍, 洪葵, 胡申才, 等. 海南近海 30 株抗 B16 细胞活性放线菌的 16S rDNA 多样性分析[J]. 微生物学报, 2005, 45 (2): 185—190.
YAN Li-ping, HONG Kui, HU Shen-cai, et al. 16S rDNA diversity analysis of 30 *Streptomyces* isolates displaying significant cytotoxic activity B16 cell from near-shore sediments of Hainan Island[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2005, 45 (2): 185—190. (in Chinese)
- [17] 阮继生. 放线菌分类基础[M]. 北京: 科学出版社, 1977.
- [18] Thongchai Taechowisan, John F. Peberdy, Saisamorn Lumyong. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 2003, 19: 381—385.
- [19] 朱文勇, 李洁, 赵国振, 等. 喜树内生放线菌多样性及抗菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2010, 37 (2): 57—62.
ZHU Wen-yong, LI Jie, ZHAO Guo-zhen, et al. Diversity and Antimicrobial Activities of Endophytic Actinomycetes Isolated from *Camptotheca acuminata* Decne. [J]. **Microbiology**, 2010, 37 (2): 57—62. (in Chinese)