

## 研究报告

## 川楝内生放线菌的分离及多样性研究

陈萌<sup>1,2</sup> 李小林<sup>1,3</sup> 李强<sup>4</sup> 张矛宇<sup>4</sup> 张波<sup>1</sup> 甘炳成<sup>3</sup> 张小平<sup>1\*</sup>

(1. 四川农业大学 资源环境学院 四川 成都 611130)

(2. 蒲江县农村发展局 四川 成都 611630)

(3. 四川省农业科学院 土壤肥料研究所 四川 成都 610041)

(4. 四川大学 生命科学学院 四川 成都 610065)

**摘要:**【目的】分离四川省各个地区川楝内生放线菌并研究其物种多样性。【方法】应用 7 种选择性分离培养基分离样品根、茎、叶、树皮和果实中的内生放线菌, 采用 16S rRNA 基因 RFLP 分析代表菌株多样性。【结果】研究共获得 403 株内生放线菌。不同地点、不同植株部位、不同培养基分离得到的内生放线菌数目均有差异。广元采集的样品分离得到的数目最多, 为 86 株; 最少的是绵阳, 仅有 12 株。从植物表皮中分离到 148 株放线菌, 占获得菌株总数的 36.7%; 而从果中分离到 31 株, 仅占获得菌株总数的 7.6%; 虽然从根部分离到的数量也很少, 但是其出菌率却是最高。5 号和 3 号培养基的分离效果最为理想。16S rRNA 基因 RFLP 分析结果显示所有供试菌株在 68% 的相似性上聚在一起, 在 84% 的相似水平上分成了 10 个遗传类型。代表菌株的 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析结果表明: 分离得到的放线菌包括 4 个属, 分别是链霉菌属(*Streptomyces*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、克里布所菌属(*Kribbella*)。其中, 链霉菌是优势类群, 占代表菌株数目的比例高达 91%, 而稀有放线菌的比例只有 9%。【结论】研究发现的川楝内生放线菌主要属于链霉菌属(*Streptomyces*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、克里布所菌属(*Kribbella*)。

**关键词:** 16S rRNA 基因, 川楝, 内生放线菌, 分离, 物种多样性

## Isolation and diversity of endophytic actinomycetes from *Melia toosendan*

CHEN Meng<sup>1,2</sup> LI Xiao-Lin<sup>1,3</sup> LI Qiang<sup>4</sup> ZHANG Mao-Yu<sup>4</sup> ZHANG Bo<sup>1</sup>  
GAN Bing-Cheng<sup>3</sup> ZHANG Xiao-Ping<sup>1\*</sup>

(1. Faculty of Forestry and Horticulture, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Rural Development Bureau of Pujiang County, Chengdu, Sichuan 611630, China)

(3. Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu, Sichuan 610041, China)

(4. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610065, China)

**Abstract: [Objective]** To investigate the diversity of endophytic actinomycetes isolated from Chinese

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2013AA102802)

\*通讯作者: Tel/Fax: 86-835-2882710; ✉: zhangxiaopingphd@126.com

收稿日期: 2014-06-07; 接受日期: 2014-09-30; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-09

medicinal plant *Melia toosendan* from different regions of Sichuan province. **[Methods]** Seven kinds of selective isolation media were used to isolate endophytic actinomycetes from the roots, stems, leaves, bark, and fruits of *Melia toosendan*. 16S rRNA gene-RFLP was used to analysis the diversity and community structure of endophytic actinomycetes. **[Results]** A total of 403 strains of endophytic actinomycetes were isolated and purified. The number of isolates was varied with different sampling sites, media and plant tissues. Eighty-six strains were obtained from the samples in Guangyuan, which was the highest. The least was the samples from Mianyang, only 12 strains. One hundred and forty-eight strains of actinomycetes were isolated from the bark, accounting for 36.7% of the total strains. Only 31 strains were isolated from the fruits, accounting for 7.6% of the total strains. Although the quantity of isolates from the roots was very low, the isolation frequency was the highest. The most ideal isolation media were numbers 5 and 3, indicating that this two media were most suitable for the growth of endophytic actinomycetes. The results of 16S rRNA gene PCR-RFLP analysis indicated that all of the strains were clustered together at the 68% similarity level and divided into 10 genetic types at the 84% similarity level. Thirty-seven representative strains were chosen for 16S rRNA sequencing. The results of 16S rRNA sequencing and phylogenetic tree ananlysis of 16S rRNA of endophytic actinomycetes showed that the tested strains belonged to *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Arthrobacter*, and *Kribbella*, among which *Streptomyces* was dominant, accounting for 91% of the representative strains. **[Conclusion]** The results presented above indicate that the main endophytic actinomycetes belong to *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Arthrobacter*, and *Kribbella* in Chinese medicinal plant *Melia toosendan* in Sichuan province.

**Keywords:** 16S rRNA genes, *Melia toosendan*, Endophytic actinomycetes, Isolation, Diversity

1993 年,美国蒙大拿州立大学 Strobel 等<sup>[1]</sup>从短叶红豆杉的韧皮部位分离到一株内生真菌,此菌能够产生新型抗癌物质紫杉醇,由此开启了植物内生菌研究的全新时代。迄今为止,在对楝科植物的研究中,苦楝和印楝(*Azadirachta indica*)等几种楝科植物杀虫特性的研究最为深入,成果也最为突出<sup>[2]</sup>。学者们对楝科植物的结构、作用范围、化学活性成分及加工使用等多方面作了研究,结果证明楝科植物的活性物质作用机制特殊,杀虫范围广,而且对动物及其天敌、人类、环境影响小,可以利用该资源生产出新型的生物杀虫剂推广开来。Verma 等<sup>[3]</sup>从印楝各个部位分离到 55 株放线菌,其中 32 株都表现出显著的广谱抗菌活性,4%表现出较强的抑制病原真菌和细菌的活性。

川楝为落叶乔木,生于平坝或丘陵地带湿润处,主要产于中国的南方各地。其内含川楝素(Toosendanin,  $C_{30}H_{38}O_{11}$ )、山柰醇、生物碱、树脂及鞣质等生物活性物质,是制作无污染无残毒的新型高效植物类农药的重要原料<sup>[4]</sup>。目前对川楝内生放线菌多样性研究鲜见报道,本文以四川地区采集

的川楝为研究材料,从中分离出内生放线菌,并对内生放线菌进行遗传多样性及系统发育研究,以期了解四川地区川楝内生放线菌的多样性情况,并为更深入地研究川楝内生放线菌打下基础,为抑制生物活性物质的筛选提供基础理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物样品采集

选取采自四川省雅安、绵阳、成都、攀枝花、西昌、宜宾、乐山、达州、广元 9 个地区的药用植物川楝不同部位样品,作为内生放线菌分离及多样性研究材料。

### 1.2 川楝的预处理

带土采集植物样品,装于无菌封口袋中,并保存于冰盒中带回实验室,放入 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用,在一切实验用品准备充分的情况下立即进行分离。为了防止污染,把从四川各地区采集的川楝植物样品首先进行简单处理:取出采集的样品,用自来水冲洗掉表面的泥土,难以清洗的地方可用软刷轻轻擦拭;用 75%乙醇擦拭植物,有切口的部位用 75%乙醇消毒,尽可

能避免外源微生物通过植物组织的伤口侵入到植物组织内部,也可以抑制腐生菌生长。最后用超声波清洗(150 W) 10 min,用滤纸吸干表面水分。

1.3 表面消毒及检测

称取样品的根、茎、叶、果各 5 g 左右,作适当的修剪后,先用 0.1% Tween 20 清洗 30 s,无菌水冲洗 3 次,75%乙醇浸泡 5 min,无菌水冲洗 3 次,有效氯含量 2%次氯酸钠溶液浸泡 3-5 min,无菌水冲洗 3 次;10% NaHCO<sub>3</sub> 浸泡 10 min<sup>[5]</sup>,无菌水清洗 3 次。将处理好的样品置于铺有无菌滤纸的无菌培养皿中,吸干植物组织表面的水分。同时取 0.2 mL 最后一遍清洗植物样品的水涂布于 ISP2 固体培养基上,28 °C 培养 3-7 d,观察是否有菌长出,进行消毒效果检测。

1.4 内生放线菌的分离培养

将经过表面消毒的植物样品放入无菌研钵中,加入一定量的无菌水,充分研磨,直至研磨成匀浆。用枪头吸取 100 μL 匀浆均匀涂布于分离培养基表面,28 °C 培养 30 d。3 d 后开始观察,一有放线菌长出,马上挑取,直到 30 d 后不再挑选。培养时,先将平板正放培养,让组织与培养基紧密结合,同时避免孢子污染培养皿。过一段时间后,再将平板倒置培养,挑菌时要进行放线菌菌落的观察和菌落计数。采用平板划线纯化法进行菌株纯化。

1.5 16S rRNA 基因 PCR-RFLP 分析

内生放线菌总 DNA 的提取参考 Nie 等<sup>[6]</sup>的方法,然后以提取的 DNA 为模板,选用 PA (5'-AGAG TTTGATCCTGGCTCAG-3')和 PB (5'-AAGGAGGT GATCCAGCCGCA-3')两段引物扩增内生放线菌的 16S rRNA 片段,PCR 反应体系及条件参考赵珂<sup>[7]</sup>。扩增产物经检测后,选取 2 种限制性内切酶 *Hae* III、*Hha* I 进行酶切反应<sup>[8-9]</sup>,酶切体系和反应条件参考文献[10],酶切产物经 2%琼脂糖凝胶检测,80 V 水平电泳 3.5 h,凝胶成像系统记录成像。

1.6 数据处理及系统发育研究

16S rRNA 基因 PCR-RFLP 指纹图谱分析方法参照李小林等<sup>[10]</sup>。根据 UPGMA 聚类树状图结果选择部分菌株作为代表菌株送上海生工生物工程技术服务有限公司进行测序,将获得的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行比对,同时选择 GenBank 中相似性较高的序列作为参比,用 MEGA 5.0 进行系统进化树构建。

2 结果与分析

2.1 内生放线菌分离结果

利用 7 种选择性分离培养基(表 1),对从四川省 9 个不同地区采集到的根、茎、叶、树皮和果实样品进行放线菌分离培养,共获得了 403 株内生放线菌(表 2)。不同地点、不同植株部位、不同培养基分

表 1 川楝内生放线菌的分离培养基及其组分	
Table 1 Isolation media for endophytic actinomycetes in <i>Melia toosendan</i>	
培养基 Medium	组成 Composition
1	1.5 g Chitin, 2.0 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.5 g KCl, 1.0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.1 g CaCl <sub>2</sub> , 0.7 g MgSO <sub>4</sub> , 0.5 g Yeast powder, 0.5 g NaCl, 20 g Agar in 1 L of distilled water, pH 7.0 <sup>[11]</sup>
2	0.3 g L-arginine, 1.0 g Glucose, 1.0 g Glycerol, 0.3 g K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0.2 g MgSO <sub>4</sub> , 0.3 g NaCl, 20 g Agar in 1 L of distilled water, pH 7.0 <sup>[11]</sup>
3	1 g Casein, 1 g Soluble starch, 0.2 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.2 g MgSO <sub>4</sub> , 20 g Agar in 1 L of distilled water, pH 7.0 <sup>[11]</sup>
4	Asparagine medium: 10 g Glucose, 0.5 g Asparagine, 0.5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 15 g Agar in 1 L of distilled water, pH 7.2-7.4 <sup>[5]</sup>
5	Calcium malate medium: 20 g Glucose, 0.5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 10 g Calcium malate, 0.5 g NH <sub>4</sub> Cl, 15 g Agar in 1 L of distilled water, pH 7.2-7.4 <sup>[5]</sup>
6	Gause No. 1: 20 g Soluble starch, 0.5 g NaCl, 1 g KNO <sub>3</sub> , 0.01 g FeSO <sub>4</sub> , 0.5 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.5 g MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 15 g Agar in 1 L of distilled water, pH 7.2-7.4 <sup>[7]</sup>
7	Modified Gause No. 2: 1 g Glucose, 0.5 g Peptone, 0.3 g Tryptone, 0.5 g NaCl, 1 g Vitamins mixture, 20 g Agar in 1 L of distilled water, pH 7.2 <sup>[7]</sup>

表 2 内生放线菌的分离结果						
Table 2 Number of strains isolated from <i>Melia toosendan</i>						
地点 Position	叶 Leaf	茎 Stem	果 Fruit	皮 Bark	根 Root	总数 Total
雅安 Ya'an	16	13	12	—	—	41
绵阳 Mianyang	6	0	6	—	—	12
温江 Wenjiang	4	14	0	—	—	18
攀枝花 Panzhihua	21	11	5	10	—	47
西昌 Xichang	0	7	1	31	—	39
宜宾 Yibin	33	13	—	22	—	68
乐山 Leshan	11	8	—	28	—	47
达州 Dazhou	12	5	—	1	27	45
广元 Guangyuan	14	9	7	56	—	86
总数 Total	117	80	31	148	27	403

注：—：没有该分离部位。  
Note: —: No isolation from this tissue.

离得到的内生放线菌数目均有差异。广元采集的样品分离得到的数目最多，最少的是绵阳。

内生放线菌在同种植物不同部位的分布极不平衡(图 1)，从皮中分离到 148 株放线菌，占获得菌株总数的 36.7%；而从果实中分离到 31 株，仅占获得菌株总数的 7.6%。由于川楝是高大乔木，仅在达州采集到了根部样品，虽然从根部分离到的数量也很少，但其出菌率却是最高的。

7 种不同的培养基对内生放线菌培养分离的结果表明，分离放线菌数量最多的是 5 号培养基和 3 号培养基，分别为 94 株和 73 株，其次是 6 号培养基 67 株，最少的是 4 号培养基，只有 22 株(图 2)。

2.2 16S rRNA 基因的 PCR-RFLP 分析

供试菌株在 68%的相似性上聚在一起。在 84%的相似水平上分成了 10 个遗传类型(图 3)。在整个图谱中，第 1 个和第 2 个遗传类型分别包含 28 株和 19 株菌。同一遗传群内包含有不同地方和不同植物组织来源的菌株，如菌株 SAUE51-17 和 SAUE57-43，分别分离自乐山的川楝皮和达州的川楝茎。分离自同一地点植物同一部位的菌株却分布

在不同的遗传群中，如 SAUE57-16 和 SAUE57-48，都是分离自达州川楝叶中，但却在不同的遗传群中。此结果表明四川各个地区药用植物川楝内生放线菌系统发育上的差异性。

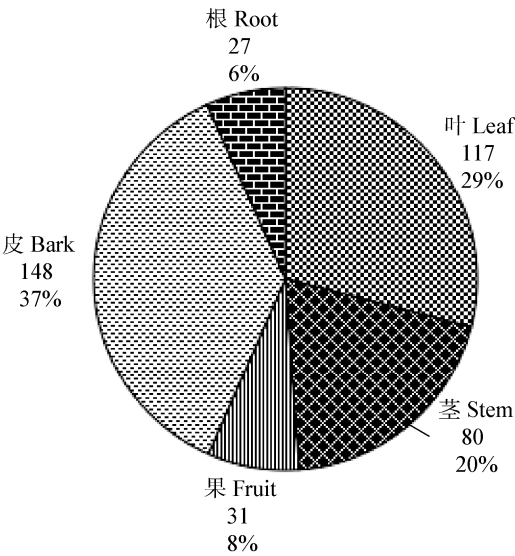


图 1 植物不同组织部位的分离情况  
Figure 1 Number of isolates of endophytic actinomycetes from different tissue parts

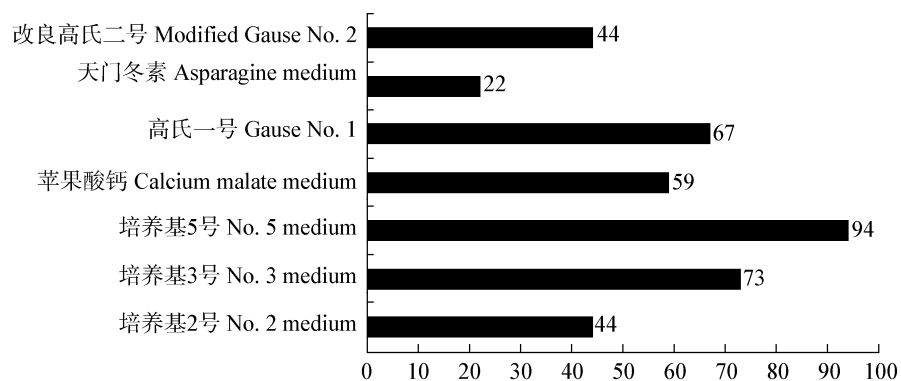


图2 不同培养基内生放线菌分离情况

Figure 2 Endophytic actinomycete isolated from different medium

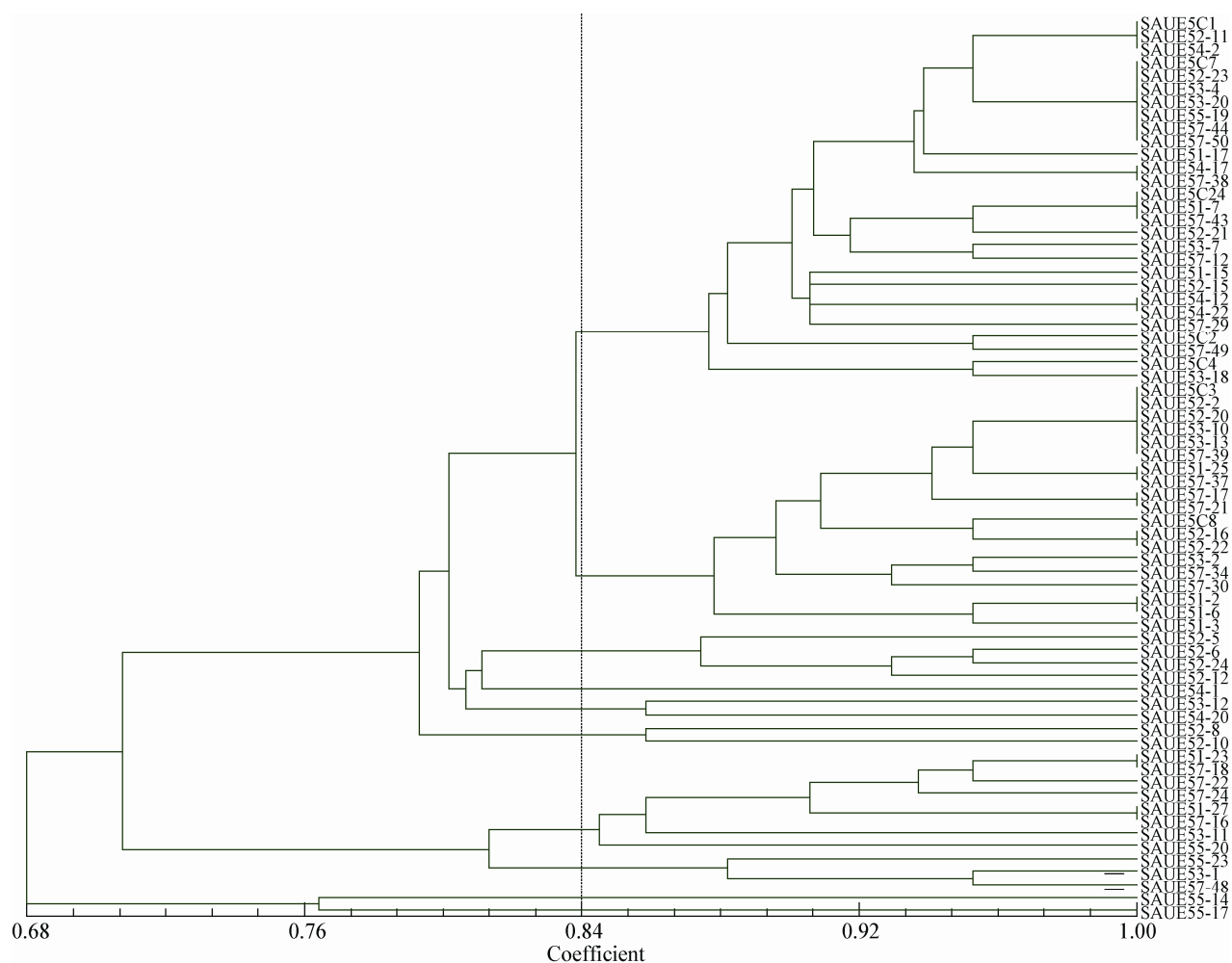


图3 内生放线菌 16S rDNA PCR-RFLP 聚类树状图

Figure 3 Dendrogram of UPGMA obtained from 16S rDNA PCR-RFLP of endophytic actinomycetes



### 2.3 菌株 16S rRNA 序列及系统发育地位分析

根据 16S rRNA 酶切图谱及聚类树状图分析, 从 10 个遗传类群中选取了 37 株代表菌株进行 16S rRNA 序列测定, 序列结果在 NCBI 上用 BLAST 进行检索和同源性比较, 找到与其相似性最高且有效发表的菌株和其最高相似度值。根据同源性由高到低从 GenBank 数据库中收集 26 株相关菌属的 16S rRNA 序列, 通过 MEGA 5 软件构建系统发育树(图 4)。

根据 16S rRNA 基因的系统发育分析, 供试菌株属于 3 个亚目, 3 个科中的 4 个属, 包括链霉菌属(*Streptomyces*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、克里布所菌属(*Kribbella*)。其中, 链霉菌是优势种群, 占代表菌株数目的比例高达 91%, 而稀有放线菌的比例只有 9% (图 4)。在链霉菌属中, 不同种之间形成不同的分支, 说明药用植物川楝内生放线菌在链霉菌属内的多样性高。通过分析内生放线菌 16S rRNA 基因 RFLP 聚类树状图及系统发育树可以发现这些链霉菌属菌株至少可分为 13 个种, 分属于灰褐赤链霉菌(*Streptomyces griseorubiginosus*)及嗜热一氧化碳链霉菌(*Streptomyces thermocarboxydus*)等。同时有些菌株如 SAUE55-14、SAUE54-1 等, 与其他菌株遗传距离较远, 可能是未报道的新种, 值得进行更深入的研究。同时, 从系统发育树可以看出, 药用植物川楝包含了 3 种不同属的稀有放线菌, 表明药用植物川楝内生放线菌具有丰富的多样性。

## 3 讨论

### 3.1 药用植物内生放线菌分离

分离方法和培养基的选择对分离可培养的植物内生放线菌非常重要<sup>[11]</sup>。放线菌偏好干燥、微碱的生长环境<sup>[12]</sup>, 同时在培养基中加入适量抑菌剂, 可以有效抑制真菌和细菌的生长<sup>[13-15]</sup>。5 号培养基中的可溶性淀粉是放线菌、尤其是链霉菌偏爱的营养物质, 且作为氮源的干酪素有吸湿性且溶于稀碱液中, 更为内生放线菌提供了良好的生长环境, 辅以其他微量元素, 所以比传统的放线菌培养基——高氏一号培养基分离得到更多的菌株。而分离得到放线菌最少的是天门冬素培养基, 这种培养基营养

物质较少, 虽然放线菌可以在营养物质浓度较低的培养基中生长, 但对分离数量却有一定影响。

本实验中仅仅分离到 9% 的稀有放线菌, 可能有以下原因: 药用植物中稀有放线菌在生长方面和数量上都不占优势; 采用传统的平板分离培养法不能完全模拟植物内生放线菌所固有的生长环境。因此, 增加可培养放线菌的种类及数量和建立有效的分离方法是重点, 建议尽量去模拟内生放线菌的自然生长环境, 稀有放线菌在接近自然的条件下可能生长更具有竞争优势, 从而以期获得更多类群的放线菌<sup>[16]</sup>。

植物不同组织部位菌株的分离情况: 树皮>叶>茎>果>根, 这与通常的情况不符合。川楝的果实期是 11 月份到 12 月份, 所以在选择春季采样的地点就没有川楝的果实。再者川楝属于高大乔木, 树根难以采集, 只有达州的样品采到了根, 根分离的菌株虽最少, 但分离率却是最高的, 这也与 Hallmann 等<sup>[17]</sup>的结论相似。内生放线菌在宿主植物中的分布受到多种因素的影响, 如宿主植物的年龄、来源、组织类型、所处的环境等。有学者对番茄内生放线菌的研究发现, 宿主植物的品种、生理状态及生长位置都会影响菌种的组成<sup>[18]</sup>。

### 3.2 遗传多样性及系统发育

限制性内切酶片段长度多态性分析是目前广泛应用于微生物多样性和系统发育分析的方法之一。有学者采用两种不同的限制性内切酶对放线菌进行研究, 结果可以实现属一级的鉴定水平<sup>[19]</sup>。本实验对从药用植物川楝中分离得到的内生放线菌在用形态学方法初步去掉重复后, 选取了部分代表菌株进行 PCR-RFLP 分析。通过聚类, 发现所有菌株被聚成了 10 个遗传类群, 有的不同植物来源的菌株被聚在一起, 而有的相同植物来源的菌株却被聚在不同的类群中。这表明内生放线菌分类聚群与地区、宿主之间没有明确的一一对应关系, 而是有一定的差异的。

植物内生放线菌主要在红树林、热带多年生树木及一些药用作物中研究较多, 主要为链霉菌属(*Streptomyces*), 其次是小双孢菌属(*Microbispora*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、小单孢菌属(*Micromonospora*)<sup>[20]</sup>。链孢囊菌属(*Streptosporangium*)

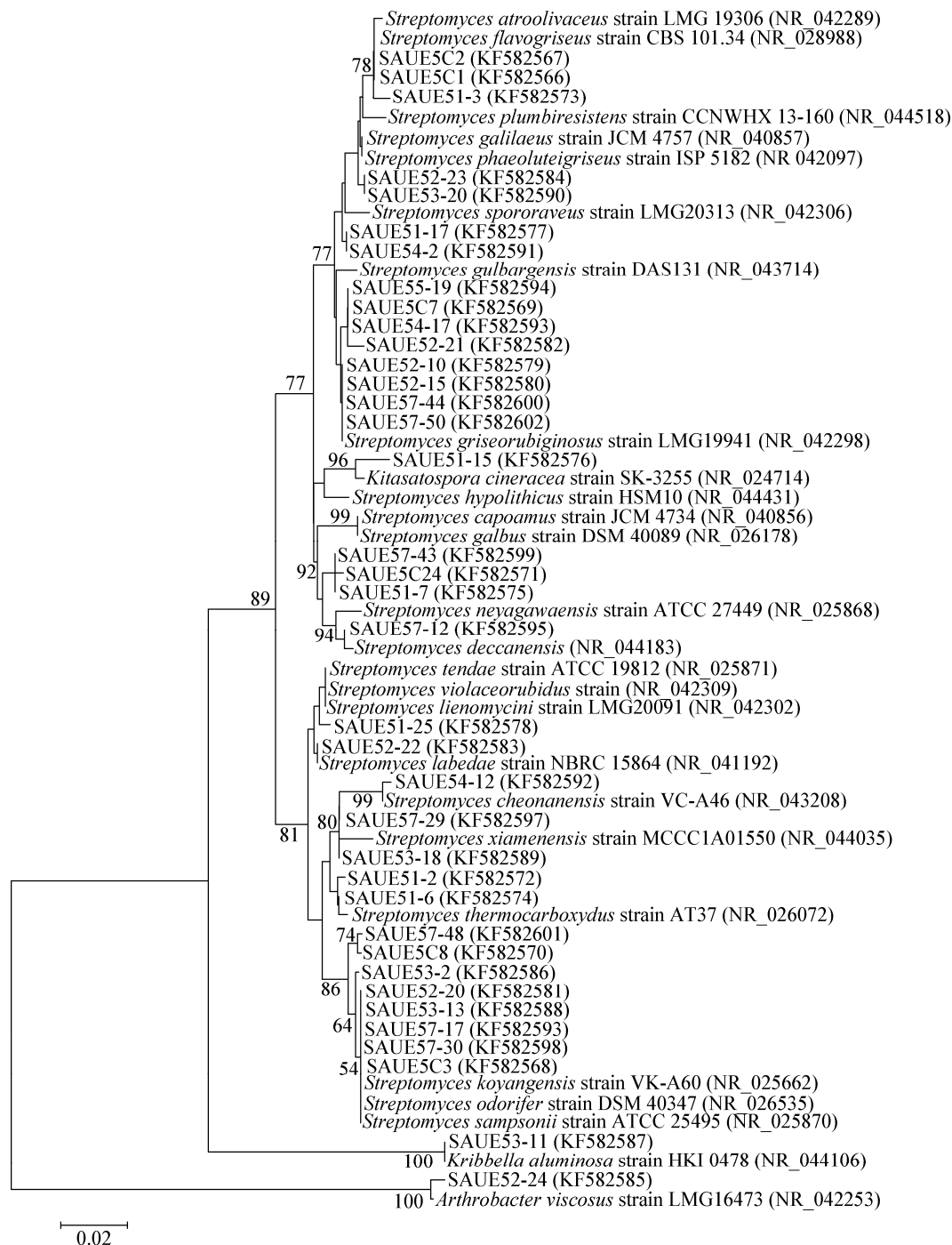


图4 内生放线菌 16S rRNA 序列系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree of 16S rRNA of endophytic actinomycetes

和拟诺卡氏菌属(*Nocardiosis*)也较为常见<sup>[21]</sup>。本实验的结果也与很多研究结果一致,发现川楝植物内生放线菌中链霉菌占绝对优势。同时,链霉菌也是很多活性次生代谢产物的重要来源,显示出川楝内生链霉菌具有良好的研究前景。另一方面,也可以看出川楝内生放线菌也具有一定的特殊性,因为北里孢菌属、节杆菌属以及克里布所菌属这3种稀有放线菌属都很少在关于药用植物的研究中分离到,除了北里孢菌属是链霉菌属的亲缘菌属外,节杆菌属和克里布所菌属在植物内生菌的分离中都不常见。这在某种意义上表明药用植物川楝的内生放线菌资源是非常丰富的。

**致谢:**感谢中国科学院微生物研究所微生物病原与免疫重点实验室刘雪婷副研究员给予本文的修改意见。

## 参 考 文 献

- [1] Strobel G, Stierle A, Stierle D, et al. *Taxomyces andreanae*, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*)[J]. Mycotaxon, 1993, 40(7): 71-81
- [2] Zhang X. Insecticidal properties of chinaberry bark extracts against imported cabbage worm[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 1989(3): 205-210 (in Chinese)  
张兴. 几种川楝素提制品对菜青虫的生物活性[J]. 植物保护学报, 1989(3): 205-210
- [3] Verma V, Gond S, Kumar A, et al. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and antimicrobial activity[J]. Microbial Ecology, 2009, 57(4): 749-756
- [4] Shan SF. The diversity and its biological activity of endophytic fungi in *Melia azedaeach*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2009 (in Chinese)  
单淑芳. 苦楝内生真菌生物多样性及其代谢产物生物活性的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2009
- [5] Ruan JS, Liu ZH, Liang LN, et al. Application and Research of Actinomycetes[M]. Beijing: Science Press, 1990: 251-321 (in Chinese)  
阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究及应用[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 251-321
- [6] Nie M, Zhang X, Wang J, et al. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2009, 41(12): 2535-2542
- [7] Zhao K. Study on diversity and antibiotic activity of endophytic and rhizospheric actinomycetes from medicinal plants in Panxi region[D]. Ya'an: Doctoral Dissertation of Sichuan Agricultural University, 2010 (in Chinese)  
赵珂. 攀西地区药用植物内生及根际放线菌的多样性与抗菌活性研究[D]. 雅安: 四川农业大学博士学位论文, 2010
- [8] Zhang HT. The identification and diversity of actinomycetes in *Marine sponge*[D]. Dalian: Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2006 (in Chinese)
- [9] Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U, et al. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes[J]. FEMS Microbial Ecology, 2002, 39(1): 23-32
- [10] Li XL, Yuan HM, Qi SS, et al. Isolation and genetic diversity of the endophytic actinomycetes from *Salvia miltiorrhiza* bge. and *Polygonatum sibiricum* red[J]. Microbiology China, 2010, 37(9): 1341-1346 (in Chinese)  
李小林, 袁红梅, 戚珊珊, 等. 丹参、黄精内生放线菌的分离及遗传多样性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(9): 1341-1346
- [11] Lin L, Tan Y, Chen FF, et al. Diversity of culturable actinomycetes in Sea deposit of Tiger beach at Bohai bay, Dalian, China[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(2): 262-269 (in Chinese)  
林灵, 谭亿, 陈菲菲, 等. 大连渤海老虎滩海域沉积物可培养放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(2): 262-269
- [12] Goodfellow M, Williams S. Ecology of actinomycetes[J]. Annual Review of Microbiology, 1983, 37: 189-216
- [13] Khaled A, Sivasithamparam K. Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2006, 38(7): 1505-1520
- [14] Luo HL, Huang Y, Wang LM, et al. Study on population diversity and antimicrobial activity of actinomycete from acidic soil in Xizang area[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(5): 724-727 (in Chinese)  
罗红丽, 黄英, 王黎明, 等. 西藏地区土壤放线菌种群多样性及拮抗活性研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 724-727
- [15] Qin S, Li J, Chen H, et al. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(19): 6176-6186
- [16] Tang YL, Wang R, Hong K. Isolation and environmental adaptation of endophytic Actinomycetes in *Acanthus ilicifolius* of different mangrove[J]. Microbiology China, 2012, 39(1): 25-32 (in Chinese)  
唐依莉, 王蓉, 洪葵. 不同红树林地区老鼠簕内生放线菌的分离及其环境适应性[J]. 微生物学通报, 2012, 39(1): 25-32
- [17] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(8): 895-914
- [18] Tan H, Cao L, He Z. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 22(12): 1275-1280
- [19] Zhang HT, Jin Y, Yu XJ, et al. 16S rDNA-RFLP analysis of actinomycetes associated with marine sponge *Hymeniacidon perleve*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(6): 12-15 (in Chinese)  
张海涛, 靳艳, 虞星炬, 等. 16S rDNA-RFLP 分析繁茂膜海绵可培养放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2005, 45(6): 12-15
- [20] Wang YY, Han LB, Zeng HM, et al. The summarize about recent research process on gramineae endophytes symbiosis[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(3): 33-38 (in Chinese)  
王瑶瑶, 韩烈保, 曾会明, 等. 禾本科植物内生菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(3): 33-38
- [21] Huang RH, Liu HQ, Dilbar Tohty, et al. Survey of endophytes and host plants[J]. Journal of Xinjiang Normal University (Natural Science Edition), 2008(1): 76-79 (in Chinese)  
黄瑞虎, 刘会强, 迪丽拜尔·托乎提, 等. 植物内生菌及其宿主植物研究概况[J]. 新疆师范大学学报: 自然科学版, 2008(1): 76-79