

文章编号:1674-7054(2012)01-0032-06

红树植物根内生放线菌的分离鉴定 及其生理活性的评价

唐依莉¹, 谢修超², 洪葵^{1,3}

(1. 海南大学农学院, 海南海口 570228; 2. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723003;
3. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海南海口 571101)

摘要: 采集海南文昌清澜港头苑村红树林保护区的18种红树植物和3种半红树植物的根部样品, 用1/10 ATCC 172培养基共分离到138株内生放线菌。经初步鉴定, 分离到的138株内生放线菌分别属于继生菌属、小单胞菌属和链霉菌属3个属。对分离到的内生放线菌进行体外细胞毒活性和抗菌活性检测, 结果表明, 对肝癌 SMMC-7721 细胞有细胞毒活性的菌株有40株, 抗 MRSA 活性的菌株有27株, 所有测试菌株均未检测到抗白色念珠菌活性。对88株菌进行耐盐性检测, 77株菌表现出耐盐或嗜盐特征, 其中2株最高耐盐质量浓度 $\rho(\text{NaCl}) = 150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 54株菌可在含有 $\rho(\text{NaCl}) = 33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养基上生长良好。

关键词: 红树植物; 内生放线菌; 生理活性

中图分类号: Q 939.99 **文献标志码:** A

放线菌是微生物中的重要类群, 可以产生大量具有各种抗菌活性的次级代谢产物, 目前报道的抗生素中约80%是由放线菌产生的^[1]。许多新次级代谢产物已从海洋放线菌中分离到^[2], Riedlinger 等从1株海洋疣孢菌 *Verrucosipora sp.* (AB-18-032) 中分离获得新的化合物 Abyssomicins^[3]。Buchanan 等从1株海洋 *Salinispora tropica* 中分离获得新的化合物 Sporolides A and B^[4]。我国利用红树植物作为药用已有较长的历史, 《全国中草药汇编》^[5] 收录的老鼠簕、海芒果和黄槿等, 具有清热解毒、消肿散结、止咳平喘之功效, 主治淋巴结肿大、急慢性肝炎、哮喘等疾病。目前, 国际上对药用红树植物活性物质的结构及其药理的研究进展迅速, 主要集中在真红树植物爵床科 (Acanthaceae)、大戟科 (Euphorbiaceae)、红树科 (Rhizophoraceae) 和半红树植物豆科 (Leguminosae) 的化学成分分析与药理研究方面, 这些植物大部分在我国均有分布^[6]。红树林处于热带亚热带海岸潮间带, 这种潮间带的红树植物遭受周期性潮汐及咸淡水交换的影响, 其盐度、水质、无机物及有机物成分受到潮汐和径流的季节性变化及气象因素等交互作用的影响, 使得红树林拥有适应这种环境的独特特征, 反过来也创造了红树林特殊的生态系统^[7]。作为海陆间缓冲带的热带红树林湿地, 蕴含的微生物资源既丰富又不失特色, 主要类群为细菌、真菌、放线菌及微藻等类型, 其中细菌和真菌占微生物资源总量的91%, 就研究最多的红树林真菌而言, 目前已分离鉴定的红树林真菌种类超过100种^[8]。相对于红树植物内生真菌和别的植物内生放线菌, 红树植物内生放线菌的系统研究还进行得很少。本研究对海南文昌不同红树品种根内生放线菌进行分离、鉴定, 并对其生理活性进行评价, 旨在探讨红树植物根内生放线菌对环境的适应性及其与环境的相关性, 希望能发现新的或具有良好活性的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 红树植物样品的采集 于2005年12月在海南省文昌头苑村红树林保护区, 选择树龄较高的18

收稿日期: 2011-11-25

基金项目: 国家自然科学基金(31170467)

作者简介: 唐依莉(1987-), 女, 广西桂林人, 海南大学农学院2008级硕士研究生。

通信作者: 洪葵, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所研究员. E-mail: kuihong31@whu.edu.cn

种红树林植物和 3 种半红树林植物,去掉植物根部土表覆盖物,将根系集中的层(5~20 cm)挖成剖面,采集主根的根皮和须根,将采集的样品迅速放入预装有冰的泡沫盒中带回实验室。

1.1.2 培养基

1) 分离培养基(1/10 ATCC 172):葡萄糖 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 淀粉 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 酵母浸汁 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; CaCO_3 $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 琼脂 $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; N-Z-Amine A $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 陈海水 500 mL; pH 为 7.2~7.4。

2) 黄豆粉发酵培养基(SLM):可溶性淀粉 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 黄豆粉 $15.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 酵母粉 $5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; CaCO_3 $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 蛋白胨 $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; NaCl $4.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; pH 为 7.2~7.4。

1.1.3 测活靶标及阳性药 肝癌 SMMC-7721 细胞,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC 10231 和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 9551(MRSA)均购于海南省药检所。硫酸卡那霉素注射液,海南制药厂有限公司生产;注射用丝裂霉素,江苏恒瑞医药股份有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理 将样品放入加有洗洁精的水中浸泡 10 min,洗去样品表面的泥土,然后用自来水冲洗干净,用滤纸吸干表面的水分。将样品修剪后放入表面消毒器皿,用 $\varphi=75\%$ 的乙醇消毒 5 min,然后置于 $\varphi=0.1\%$ 的 HgCl 中消毒 15 min,无菌水浸洗 5 次,每次 5 min。所用清洗溶液均加入 $\varphi=1\%$ 吐温 80。

1.2.2 分离培养 选用 1/10ATCC 172 培养基,添加不同的抑制剂组合(新生霉素+制霉菌素+放线菌酮)和(甲氧苄氨嘧啶+制霉菌素+放线菌酮),抑制剂质量浓度均为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。取经表面消毒后的样品 5 g 置于研钵中,无菌条件下加 45 mL $\varphi=50\%$ 的无菌陈海水($V_{\text{无菌陈海水}}:V_{\text{无菌水}}=1:1$),充分研磨,取 200 μL 匀浆直接涂布于 1/10 ATCC 172 分离培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 30 d。取最后 1 次浸洗用的无菌水 200 μL 涂布于 1/10 ATCC 172 分离培养基上,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 30 d,检查表面消毒效果。

1.2.3 内生放线菌的纯化 根据稀有放线菌的菌落形态特征,挑取单菌落到 ATCC 172 培养基上进行划线分离培养,获得单菌落。将单菌落转接到 ISP 2 固体培养基上^[9],重复 3 次,28 $^{\circ}\text{C}$ 下培养,在接种后的第 5,15,30 d 时观察其基内菌丝、气生菌丝和菌落形态等培养特征。将筛选到的内生放线菌按菌落特征、培养特征做初步的归类,划分到不同的类群,在不同的类群中选取代表菌株作初步鉴定。

1.2.4 红树植物内生放线菌的系统发育分析 选取代表菌株提取 DNA,用细菌通用引物 27F/1492R 扩增 16S rRNA 基因序列。PCR 产物直接送国家人类基因组南方研究中心测序。用 EzTaxon (<http://www.Eztaxon.org>) 对该序列进行相似性分析,将菌株初步鉴定到属。选取不同树种的代表性菌株及与其相近的模式菌的 16S rRNA 基因序列,用 BioEdit 软件进行多序列比对,再用 MEGA 3.1 软件的 Neighbor-Joining 法进行聚类分析。

1.2.5 菌株的耐盐实验 在分离菌株生长良好的液体培养基(ISP 2)中分别添加 $\rho=33,60,100,150,200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl,接种待测菌株,于 28 $^{\circ}\text{C}$,200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养 7 d,每株菌设 3 个重复,观察其生长情况。

1.2.6 内生放线菌的发酵培养 将分离获得的内生放线菌接种于装有 20 mL 黄豆粉液体发酵培养基的 100 mL 试管中,在 28 $^{\circ}\text{C}$,200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下培养 7 d,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心,取上清,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。

1.2.7 细胞毒活性检测 用 MTT 法^[10]测定所得滤液对肝癌 SMMC-7721 细胞的细胞毒活性,测得 ID_{50} 值。当样品 ID_{50} 值相当于标准抗生素丝裂霉素 $\rho=4\sim6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ID_{50} 值时,活性强度定为“+”,当样品 ID_{50} 值相当于标准抗生素 $\rho=6\sim8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ID_{50} 值时,活性强度定为“++”,当样品 ID_{50} 值相当于标准抗生素 $\rho=8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上的 ID_{50} 值时,活性强度定为“+++”。

1.2.8 抗真菌活性检测 用美蓝酶标仪法^[11]检测内生放线菌的抗白色念珠菌活性,将靶菌液稀释成菌落浓度为 $0.8 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^6/\text{mL}$,取无菌 96 孔板,以氟康唑加 100 μL 稀释后的靶菌液为阳性对照,将 96 孔板置于 200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养,28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

1.2.9 抗 MRSA 活性检测 采用文献^[12]的方法,检测内生放线菌的抗 MRSA 活性。将 MRSA 靶菌液稀释成菌落浓度为 $0.8 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^6/\text{mL}$,取无菌 96 孔板,加入牛肉膏蛋白胨培养基 200 μL 作为空白

对照,以 $\rho = 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 系列稀释度的卡那霉素加 $100 \mu\text{L}$ 稀释后的靶菌液为阳性对照,将 96 孔板置于 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 17 h 后将 96 孔板取出放在酶标仪上测定各孔液体在 570 nm 下的吸光值,与标准抗生素对应的吸光值和靶菌正常生长对照的吸光值作对比,根据公式

$$\text{抑制率} = \frac{ID_{50}(\text{待测样品}) - ID_{50}(\text{空白对照})}{ID_{50}(\text{阴性对照}) - ID_{50}(\text{空白对照})} \times 100\%$$

计算不同样品的抗 MRSA 的抑制率,当抑制率大于 50% 时,样品为阳性。

2 结果

2.1 不同红树植物根内生放线菌的分离结果 从 21 种红树植物样品中成功分离到 138 株放线菌,按菌落形态分,有气生菌丝的菌株有 16 株,无气生菌丝的菌株有 122 株。添加不同的抗生素组合的培养基的分离效果有差异,分别占总分离菌株的 55% (新生霉素 + 制霉菌素 + 放线菌酮) 和 45% (甲氧苄氨嘧啶 + 制霉菌素 + 放线菌酮)。加有新生霉素培养基的分离效果要优于加有甲氧苄氨嘧啶的培养基,出菌率相当的情况下,新生霉素能更好地抑制杂菌的生长,提高分离纯化的成功率。

从不同红树植物上分离的内生放线菌的数目也存在很大差异(见表 1),从红海榄树中分离到的菌株较多,为 13 株;卤蕨、红树及桐花树次之,各为 11 株;海南海桑、角果木、海莲中分离的较少,各为 2 株。

表 1 不同红树植物分离菌株数及活性菌株数

红树树种	总分离菌株数	细胞毒活性菌株数	抗 MRSA 菌株数	抗白色念珠菌株数
卤蕨	11	2	1	0
尖叶卤蕨	5	2	2	0
角果木	2	2	1	0
木榄	8	3	0	0
海莲	2	2	0	0
红海榄	13	1	0	0
红树	11	0	0	0
老鼠筋	5	2	1	0
榄李	7	2	2	0
海漆	6	2	3	0
木果楝	4	1	0	0
桐花树	11	4	3	0
杯萼海桑	4	3	1	0
海桑	8	4	3	0
海南海桑	2	0	0	0
拟叶海桑	9	1	4	0
银叶树	8	2	1	0
白骨壤	4	0	0	0
海芒果*	7	3	2	0
水黄皮*	6	2	1	0
黄槿*	5	2	2	0
合计	138	40	27	0

注: * 为半红树植物;其余为红树植物

2.2 红树植物内生放线菌的活性评价 采用 MTT 法对分离到的内生放线菌进行体外细胞毒活性检测,有 40 株内生放线菌对肝癌 SMMC-7721 细胞有不同程度的体外细胞毒活性,占总菌数的 30%,其中小单孢菌 32 株,继生菌 1 株,链霉菌 7 株。体外细胞毒活性强度为“+”,“++”,“+++”的菌株分别为 11, 14, 15 株。

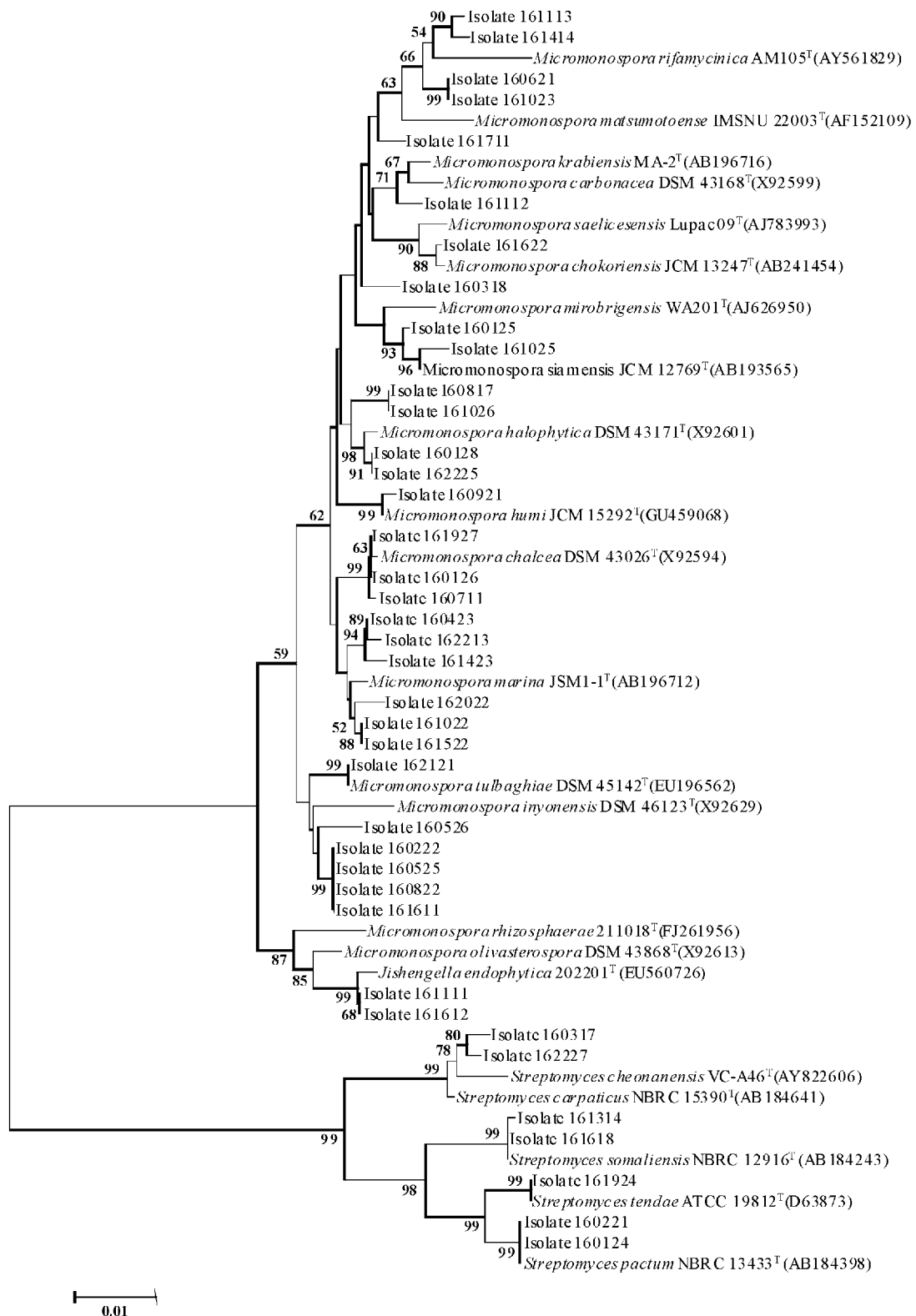


图 1 依据 16S rDNA 序列构建的 42 株代表菌株及其相关菌株的聚类分析图

采用美蓝酶标仪法,检测分离到的菌株抗 MRSA 和白色念珠菌的活性。共分离到抗 MRSA 活性菌株 27 株,活性比率为 19.6%,其中小单孢菌 24 株,链霉菌 3 株。所有测试菌株均未检测到抗白色念珠菌活性。不同红树植物上分离到的内生放线菌的菌株数存在差异,菌株的生物活性也存在一定的差异。从红树、海南海桑和白骨壤中分离到的内生放线菌菌株未检测到有细胞毒或抗 MRSA 活性;从木榄、海莲、红

海榄和木果楝上分离的放线菌只表现出细胞毒活性而无抗 MRSA 活性;其他红树植物上分离的放线菌不同程度地表现出细胞毒和抗 MRSA 活性(见表1)。

2.3 代表菌株的 16S rRNA 基因序列分析 将分离到的内生放线菌按菌落形态特征划分为不同的类群,在不同的类群中选取 42 株代表菌株,经 16S rRNA 基因序列分析,结果显示(见图 1)它们分别属于继生菌属、小单孢菌属和链霉菌属,其中继生菌属 2 株,小单孢菌属 33 株,链霉菌属 7 株,小单孢菌占代表菌株的 78.6%,属优势类群。将测得的菌株序列提交 GenBank (EF527827 - EF527868),在 EzTaxon 上比对,菌株 161414 (EF527853)、161023 (EF527845)及 160621 (EF527839)与 *Micromonospora siamensis* TT2-4^T 序列相似性分别为 98.907%、98.813%、98.935%;菌株 161113 (EF527850)与 *Micromonospora matsumotoense* IMSNU 22003^T 序列相似性为 98.984%,菌株 160817 (EF527841)与 *Micromonospora aurantiaca* ATCC 27029^T 序列相似性为 98.781%,菌株 160526 (EF527838)与 *Micromonospora echinospora* ATCC 15837^T 序列相似性为 98.981%,这 6 株小单孢菌与模式菌株的相似性低于 99%,可能为新种。

2.4 菌株的耐盐性测试 针对红树林生境的特殊性,对 88 株内生放线菌进行耐盐性测试。表 2 结果显示,耐 $\rho(\text{NaCl}) = 150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的有 2 株;耐 $\rho(\text{NaCl}) = 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的有 10 株,其中 2 株菌在高盐质量浓度下比在低盐质量浓度下生长得好;耐 $\rho(\text{NaCl}) = 60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的有 11 株,其中 1 株菌在高盐质量浓度下比在低盐质量浓度下生长得好;耐 $\rho(\text{NaCl}) = 33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (相当于海水盐质量浓度)的有 54 株,其中 5 株菌比在不含盐的条件下生长得好;有 11 株不能在 $\rho(\text{NaCl}) = 33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上的条件下生长。耐 $\rho(\text{NaCl}) = 100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上的菌,除 1 株为小单孢菌外,其余均为链霉菌。表 2 为部分菌株的耐盐度测试结果。

表 2 部分菌株的耐盐测试结果

菌株	属	$\rho(\text{NaCl})/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$					
		0	33	60	100	150	200
160121	<i>Micromonospora</i>	++	-	-	-	-	-
160123	<i>Micromonospora</i>	+++	-	-	-	-	-
160212	<i>Micromonospora</i>	++++	-	-	-	-	-
160127	<i>Micromonospora</i>	+++	+	-	-	-	-
160813	<i>Micromonospora</i>	++++	++	-	-	-	-
160319	<i>Micromonospora</i>	++++	+++	-	-	-	-
160421	<i>Micromonospora</i>	++++	++++	-	-	-	-
160122	<i>Micromonospora</i>	+++	++++	-	-	-	-
162023	<i>Micromonospora</i>	+	++	-	-	-	-
160126	<i>Micromonospora</i>	++	+++	-	-	-	-
161023	<i>Micromonospora</i>	++	++++	-	-	-	-
161222	<i>Micromonospora</i>	+++	+++	-	-	-	-
160315	<i>Micromonospora</i>	++++	++	+	-	-	-
160521	<i>Micromonospora</i>	++++	++++	+	-	-	-
161929	<i>Micromonospora</i>	++++	++++	++++	-	-	-
162024	<i>Streptomyces</i>	++	++	+++	-	-	-
161022	<i>Micromonospora</i>	+++	++	++	+	-	-
161217	<i>Streptomyces</i>	++++	++++	++	++	-	-
162222	<i>Streptomyces</i>	++	++	+++	+++	-	-
161619	<i>Streptomyces</i>	++	+++	+++	+++	-	-
162227	<i>Streptomyces</i>	++	+++	+++	+	-	-
161614	<i>Streptomyces</i>	+++	++++	++++	++	-	-
161618	<i>Streptomyces</i>	++	++++	++++	+++	-	-
161211	<i>Streptomyces</i>	++	++	++	+++	-	-
161511	<i>Streptomyces</i>	++++	++++	++	++	++	-
160317	<i>Streptomyces</i>	+++	++++	++++	++	++	-

注: - 表示不生长; + 表示生长程度

3 讨论

从采集的 21 种红树植物样品中均分离到内生放线菌,分别为小单孢菌属、链霉菌属和继生菌属,其中小单孢菌为优势类群,这可能与选用的针对性分离稀有放线菌的分离方法有关。WU R Y^[13] 的研究表明,从红树林土壤中分离到链霉菌属、小单孢菌属、链轮丝菌属、诺卡氏菌属和红球菌属,其中链霉菌和小单孢菌在数量上占绝对优势。在土壤中占优势的链霉菌跟小单孢菌更容易入侵到植物根内,入侵的数量

大,更容易被分离获得。刘志恒等^[14]的研究表明,在水生环境中,小单孢菌是优势菌。本研究中的分离结果与上述文献报道结果一致。

有研究表明,药用植物中一些内生菌能产生与宿主植物相同或相似的生理活性成分以及其他特殊的生理活性物质,这为解决植物的资源危机提供了新的途径^[15]。微生物由于其代时短、数量大,培养条件容易控制,因此其代谢产物容易获得。利用内生菌发酵生产植物中的活性成分是极具潜力、且有可能在短期内实现的有效途径。本研究对分离到的红树林植物内生放线菌进行细胞毒和抗菌活性检测,有32.3%的菌株对肝癌 SMMC-7721 细胞有不同程度的体外细胞毒活性,其中有11.5%的菌株对肝癌 SMMC-7721 细胞有非常强的体外细胞毒活性,对这些菌株值得做进一步研究;有22.3%的菌株对 MRSA 有抗性;未检测到对白色念珠菌有抗性的菌株。红树、海南海桑和白骨壤属于药用红树植物,从红树、海南海桑和白骨壤中分离到的内生放线菌菌株却未检测到有细胞毒或抗 MRSA 活性,这可能与发酵条件及检测方法有关。

菌株的耐盐性测试结果显示,有61.4%的菌株耐 $\rho(\text{NaCl}) = 33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,相当于海水盐度,有5株菌在 $\rho(\text{NaCl}) = 33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 下比在不含盐的培养基上生长得好,能在 $\rho(\text{NaCl}) = 33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的盐度以上生长的少部分菌株表现出嗜盐性,这些菌在高盐条件下比在低盐条件下生长要好。这表明从红树植物根内部分离到的放线菌具有海洋适应性。除1株小单孢菌外,所有能在高于 $\rho(\text{NaCl}) = 33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 生长的菌株均为链霉菌, Tresner 等^[16]研究了约1300株链霉菌的 NaCl 耐受性测试,仅有1.8%的链霉菌不能在 $\rho(\text{NaCl}) = 40 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下生长,有71.3%的链霉菌能在 $\rho(\text{NaCl}) = 70 \sim 130 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 条件下生长良好,本研究结果也表明了链霉菌的耐盐性相对较高。

参考文献:

- [1] JÁNOS BÉRDY. Bioactive microbial metabolites, a personal review[J]. J Antibiot, 2005, 58(1): 1-26.
- [2] KIN S LAM. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes[J]. Ecol Ind Microbiol, 2006, 9: 245-251.
- [3] RIEDLINGER J, REICKE A, ZAHNER H, et al. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine Verrucospora strain AB-18-032[J]. J Antibiot (Tokyo), 2004, 57: 271-279.
- [4] BUCHANAN G O, WILLIAMS P G, FELING R H, et al. Sporolides A and B: structurally unprecedented halogenated macrolides from the marine actinomycete Salinispora tropica[J]. Org Lett, 2005, 7: 2731-2734.
- [5] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1975.
- [6] 王友绍, 何磊, 王清吉, 等. 药用红树植物的化学成分及其药理研究进展[J]. 中国海洋药物, 2004(2): 26-31.
- [7] DAVIS S M, OGDEN J C. Everglades: The Ecosystem and Its Restoration [M]. CRC Press, 1994.
- [8] ANORLD A E, MAYNARD Z, GILBERT G S, et al. Are tropical fungal endophytes hyper-diverse[J]. Ecol Lett, 2000, 3: 267-274.
- [9] SHIRLING E B, GOTTLIEB D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. Int J Syst Bacteriol. 1966, 16: 313-340.
- [10] 尤迎春, 从文铭, 王一, 等. MIT 比色分析法快速检测肝癌细胞株对化疗药物敏感性的方法研究[J]. 癌症, 1996, 15(3): 219-221.
- [11] 洪葵, 肖春. 一种抗酵母类真菌抗生素的快速检测方法. 中国, 03128096[P], 2004-12-08.
- [12] HONG K, GAO A H. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China[J]. Marine Drugs, 2009, 7: 24-44.
- [13] WU R Y. Studies on the microbial ecology the Tansui Estuary[J]. Bot Bull Acad Sin, 1993, 34: 13-30.
- [14] 刘志恒, 姜成林. 放线菌现代生物学与生物技术[M]. 北京:科学出版社, 2004.
- [15] SCHULZ B, ROMMERT A K, DAMMANN U, et al. The endophyte-host interaction; a balanced antagonism[J]. Ta Mvcol Res, 1999, 103: 1275-1283.
- [16] TRESNER H D, HAYES J A, BACKUS E J. Differential tolerance of streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic aid [J]. Appl. Microbiol, 1968, 16(8): 1134-1136.

(下转第41页)

Effects of exogenous hormones on the accumulation of alkaloids in *Catharanthus roseus* (L.)

ZOU Dong-mei¹, FENG Xin-ping², WANG Jian-rong¹, PANG Yu-xin¹, JIANG Chang-shun¹

(1. Tropical Crop Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, 571737, China;

2. Tropical Agricultural Products Quality Supervision and Testing Centre of Ministry of Agriculture, Haikou, 571101, China)

Abstract: Four chemical reagents, jasmonic acid (JA), ethe-rel, Aspirin and tryptophan, were used as exogenous hormones to treat pot plants of *Catharanthus roseus* grown in green house to determine the contents of medicinal components, alkaloids, in *C. roseus* leaves. The pot plants at the age of 2 and 5 months were treated with the reagents at different concentrations. Two days after treatment, the contents of catharanthine, vinblastine and vindoline in leaves were determined by using HPLC. All the reagents under trial obviously improved the accumulation of indole alkaloids including catharanthine and vinblastine in the leaves of *C. roseus*, and the optimum treatment concentrations of these reagents were determined. These reagents apparently promote the accumulation of total indole alkaloids in the leaves of *C. roseus*.

Key words: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don; exogenous hormone; jasmonic acid (JA); indole alkaloids

(上接第 37 页)

Identification and evaluation of physiologically active root endophytic actinomycetes from mangrove plants in Hainan Province

TANG Yi-li¹, XIE Xiu-chao², HONG Kui^{1,3}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China;

2. College of Biological Science and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723003, China;

3. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: A total of 138 root endophytic actinomycete strains were successfully isolated using 1/10ATCC 172 medium from the roots of 18 mangrove plants and 3 semi-mangrove plants in Hainan Province. Analysis of 16S rRNA gene sequences of these isolates showed that the isolates belonged to members of the genera *Jishengella*, *Micromonospora* and *Streptomyces*. Bioactivity tests were carried out on all the isolated endophytic actinomycete fermentation liquids. Of all the isolates forty strains showed cytotoxicities to hepatocarcinoma cell line SMMC-7721 cell, and twenty seven strains were active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 9551 (MRSA). The strains isolated from the mangroves showed no bioactivity against *Candida albicans* ATCC 10231. Sodium chloride tolerance test for 88 isolates indicated that 77 isolates were halo-tolerant or halophilic, 2 isolates of which exhibited the highest tolerance to $\rho(\text{NaCl}) = 150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and 54 isolates grew well on the medium containing $\rho(\text{NaCl}) = 33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Key words: mangrove plant; endophytic actinomycetes; physiologically active