

## *A Review on Isolation and Identification of Endophytic Actinobacteria, Their Chemical Structure, Bioactive Compounds, and Potential Medical-Pharmaceutical Applications*

Yaser Delbari<sup>1</sup>,  
Yaser Mohassel<sup>2</sup>,  
Yadollah Bahrami<sup>3,4,5</sup>,  
Elham Kakaie<sup>6</sup>,  
Ali Mostafaie<sup>7</sup>

<sup>1</sup> MSc in Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

<sup>2</sup> MSc in Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Medical Biotechnology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

<sup>4</sup> Department of Medical Biotechnology, School of Medicine, College of Medicine and Public Health, Flinders University, Adelaide, Australia

<sup>5</sup> Pharmaceutical Sciences Research Center, Faculty of Pharmacy, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

<sup>6</sup> BSc in Nursing, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

<sup>7</sup> Professor, Medical Biology Research Center, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

(Received October 22, 2019 Accepted June 2, 2020)

### **Abstract**

Over recent years, nosocomial infections, and the morbidity and mortality associated with pathogenic bacteria have dramatically increased due to antibiotic resistance and imposed significant burdens on the global health system. Critical shortage of effective therapeutics against multidrug-resistant bacteria highlights the need for development of novel antibiotics. Actinobacteria are well-known sources of natural bioactive compounds, especially antibiotics. Nearly two-thirds of the antibiotics on the market have actinobacterial origins. Endophytic actinobacteria residing within plants contribute to the plant growth and survival by producing plethora of secondary metabolites. Therefore, isolation, cultivation, and identification of new strains, as well as their potential to produce antimicrobial compounds, are of great importance. Lack of published research in this field highlights the importance of this review in Iran. The aim of this review was to present the latest methods for the isolation and identification of endophytic actinobacteria and introducing relevant databases. We also studied the most recent isolated strains, chemical structure of 51 newly identified secondary metabolites, and their potential medical-pharmaceutical applications. This study revealed that endophytic actinobacteria are prolific sources of bioactive secondary metabolites with high levels of structural diversity and potent pharmaceutical and medicinal applications.

**Keywords:** actinobacteria, endophytes, bioactive compounds, drug resistance, nosocomial infections, hospital infections

**J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30 (186): 195-217 (Persian).**

\* Corresponding Author: Yadollah Bahrami - Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran (E-mail: bahramiyadollah@yahoo.com)

# مروری بر جداسازی و شناسایی اکتینوباکتری های اندوفیت؛ بررسی ساختار شیمیایی و فعالیت های بیولوژیکی ترکیبات و کاربردهای پزشکی - دارویی آنها

یاسر دلبری<sup>1</sup>

یاسر محصل<sup>2</sup>

یداله بهرامی<sup>3و4و5</sup>

الهام کاکائی<sup>6</sup>

علی مصطفایی<sup>7</sup>

## چکیده

در سال‌های اخیر به دلیل افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، عفونت‌های بیمارستانی و مرگ و میر ناشی از آنها افزایش چشمگیری داشته و هزینه‌های هنگفتی را بر سیستم بهداشت جهانی تحمیل کرده است. کمبود داروی موثر علیه باکتری‌های مقاوم، توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید را ضروری ساخته است. اکتینوباکتری‌ها یکی از اصلی‌ترین منابع ترکیبات زیست فعال طبیعی به ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشند. نزدیک به دو سوم آنتی‌بیوتیک‌های موجود در بازار منشاء اکتینوباکتریایی دارند. اکتینوباکتری‌های اندوفیت که به صورت همزیست درون گیاه زندگی می‌کنند با تولید طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه به رشد و بقا میزبان خود کمک می‌کنند. از این‌رو، شناخت و نحوه جداسازی، کشت و شناسایی سویه‌های جدید و همچنین بررسی پتانسیل آنها در تولید ترکیبات ضد میکروبی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. عدم پژوهش منتشر شده در این زمینه در ایران، اهمیت این مطالعه مروری را دو چندان می‌کند. هدف از این مطالعه ارائه جدیدترین شیوه‌های جداسازی اکتینوباکتری‌های اندوفیت، شناسایی سویه‌های جدید و معرفی پایگاه‌های اطلاعاتی مربوطه می‌باشد. همچنین جدیدترین سویه‌های جداسازی شده، ساختار شیمیایی 51 ترکیب جدید و متابولیت‌های ثانویه و کاربردهای پزشکی - دارویی آنها نیز مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعه نشان داد که اکتینوباکتری‌های اندوفیت منبع غنی از ترکیبات ثانویه فعال بیولوژیکی با ساختمان شیمیایی متنوع می‌باشند که پتانسیل قابل توجهی در تولید محصولات و فرآورده‌های بیوتکنولوژی، دارویی و پزشکی دارند.

**واژه های کلیدی:** اکتینوباکتری، متابولیت های ثانویه، ترکیبات زیست فعال، باکتری های اندوفیت، مقاومت آنتی بیوتیکی

## مقدمه

حال اثرات درمانی شگرف آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر بیماری‌های عفونی و ریشه کن کردن تعدادی از آنها نباید ما را از این مهم که باکتری‌ها توانایی بسیار بالایی

آنتی‌بیوتیک‌ها یکی از مؤثرترین ترکیبات دارویی هستند که طی چند دهه اخیر علیه طیف وسیعی از پاتوژن‌های میکروبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با این

E-mail: bahramiyadollah@yahoo.com

**مؤلف مسئول: یداله بهرامی** - کرمانشاه: دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

1. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
  2. کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
  3. استادیار، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
  4. گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، کالج پزشکی و بهداشت عمومی، دانشگاه فلیندرز، آدلاید، استرالیا
  5. مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
  6. کارشناس پرستاری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
  7. استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
- © تاریخ دریافت: 1398/7/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/9/5 تاریخ تصویب: 1399/3/13

گروه‌های باکتریایی هستند که به صورت اندوفیت با گیاهان زندگی می‌کنند و نه تنها هیچگونه اثر سوء برای میزبان خود ندارند بلکه با تولید بسیاری از ترکیبات زیست فعال علیه میکروارگانیسم‌های پاتوژن گیاه به تحریک و بهبود رشد گیاه نیز کمک می‌کنند (10). از این رو جستجو در میان گیاهان مختلف و در محیط‌های گوناگون برای جدا کردن این باکتری‌ها، به منظور کشف منابع جدید دارویی، در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (11). این تلاش‌ها با موفقیت‌هایی نیز همراه بوده است تا آن‌جا که امروزه خود را به عنوان منبع امیدوار کننده‌ای برای تولید ترکیبات زیست فعال معرفی کرده‌اند (12). به‌همین دلیل طراحی مناسب و بهینه از مراحل جداسازی، کشت و شناسایی گونه‌های جدید، می‌تواند ما را در رسیدن به هدف اصلی، یعنی کشف آنتی‌بیوتیک‌های شناخته نشده و مؤثر، کمک شایانی نماید. هدف از این مطالعه، مروری بر متابولیت‌های ثانویه جدید، ساختار شیمیایی، بررسی فعالیت بیولوژیکی و مکانیسم اثر و رابطه ساختار و عملکرد آن‌ها (SAR: Structure-Activity Relationship) در اکتینوباکتری‌های اندوفیت است. همچنین معرفی جدیدترین روش‌های استریلیزاسیون سطحی، جداسازی، شناسایی و تقسیم‌بندی گونه‌های اندوفیت اکتینوباکتری‌ها و میزبان‌های گیاهی آن‌ها از اهداف دیگر این مطالعه می‌باشد. به‌علاوه پایگاه‌های بیوانفورماتیک و نرم‌افزارهای مورد استفاده برای شناسایی گونه‌ها و ترکیبات جدید را مورد بررسی قرار می‌دهد. این مطالعه منابع موجود در سامانه‌ها و پایگاه‌های اطلاعاتی و استنادی پابمد (PubMed)، اسکوپوس (Scopus)، ساینس دایرکت (ScienceDirect) و وب اف نالج (Web of Knowledge) را در پنج سال اخیر دربر می‌گیرد.

تقسیم‌بندی اکتینوباکتری‌ها و میزبان‌های آن‌ها

اکتینوباکتری‌ها با وجود شباهت‌های مورفولوژیکی با قارچ‌ها به دلیل داشتن برخی ویژگی‌های اختصاصی

جهت سازگاری با شرایط جدید را دارند، غافل‌کنند (1). در سال‌های اخیر، افزایش عفونت‌های بیمارستانی و مرگ و میرهای ناشی از مقاومت باکتریایی (2). سبب توجه بیش تر محققان و دولت‌ها به این حوزه شده است. پمپ کردن آنتی‌بیوتیک‌ها به خارج از سلول، کاهش تولید پورین‌ها و تخریب و غیرفعال شدن آنتی‌بیوتیک‌ها توسط آنزیم‌ها (از جمله بتالاکتاماز) از اصلی‌ترین استراتژی‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد (3). از این رو به منظور جا نماندن از باکتری‌ها و پیشگیری از عود بیماری‌های عفونی فراگیر، محققین باید استراتژی‌های جدیدی را برای مقابله با این تهدیدها در پیش بگیرند (4). جستجو در میان میکروارگانیسم‌ها و بررسی ترکیبات زیست فعال آن‌ها، یکی از این استراتژی‌ها می‌باشد. میکروارگانیسم‌ها از چندین دهه قبل و بعد از کشف پنی‌سیلین، مهم‌ترین منبع برای ترکیبات ضد میکروبی بوده‌اند. با این وجود در سال‌های اخیر میزان اکتشافات دارویی از آن‌ها کاهش چشمگیری داشته است (5). از این رو محققان، جستجو در منابع و محیط‌های جدید و کم‌تر شناخته شده از جمله دریاها، کوهستان‌ها، جنگل‌ها، آتش‌فشان‌ها، بیابان‌ها و اندوفیت‌ها را به منظور یافتن میکروارگانیسم‌های جدید، به ویژه استرپتومایسس‌ها، انتخاب کرده‌اند تا بتوانند برای رفع مشکل مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی راه حل مناسبی بیابند (6). در میان میکروارگانیسم‌ها، اکتینوباکتری‌ها، به ویژه جنس استرپتومایسس (7)، با تولید بیش از دو سوم آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی مورد استفاده در درمان، همچون بتالاکتام‌ها و تتراسایکلین‌ها (8)، در طول چند دهه اخیر یکی از اصلی‌ترین منابع برای کشف و جداسازی ترکیبات دارویی با خواص ضد میکروبی بوده‌اند. یکی از محیط‌هایی که اخیراً توجه محققان را به خود جلب کرده است، محیط‌های اندوفیتی گیاهان است که مطالعات نشان داده است می‌توانند میزبان‌های جذابی برای میکروارگانیسم‌ها و علی‌الخصوص اکتینوباکتری‌ها باشند (9). اکتینوباکتری‌های اندوفیت، یکی از محدود

بالا و در نتیجه توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه منحصر به فرد است، می‌تواند دریچه‌های جدیدی را در حوزه‌های مختلف بیوتکنولوژی به روی ما باز کند. از این رو تلاش‌های زیادی برای جداسازی و شناسایی جوامع اکتینوباکتری‌های موجود در محیط‌های مختلف از جمله چشمه‌های آب گرم (۲۰،۱۹)، دریا و رسوبات آن‌ها (۲۲،۲۱)، گیاهان و رسوبات محیط‌های مانگرو (۲۴،۲۳)، غارها (۲۵)، بیابان‌ها (۲۶) و گیاهان دارویی (۲۷) انجام شده است. گیاهان به عنوان یکی از کاندیدها جهت جداسازی گونه‌های ناشناخته و جدید اکتینوباکتری‌ها دارای پتانسیل دارویی، صنعتی و کشاورزی، از جذاب‌ترین محیط‌ها برای محققان می‌باشند، چرا که نشان داده شده است گیاهان، به دلیل توانایی و به کارگیری این باکتری‌ها در تولید ترکیبات مورد نیاز خود، با آن‌ها وارد یک رابطه همزیستی شده‌اند (۲۸).

#### اکتینوباکتری‌های اندوفیت

"اندوفیت" به میکروارگانیسم‌هایی گفته می‌شود که درون سلول‌ها یا فضای بین سلولی بافت‌های گیاهی زندگی می‌کنند بدون آنکه تأثیر مخربی را بر میزبان خود تحمیل کنند (۳۰،۲۹). در دو دهه اخیر جنس‌های متنوعی از باکتری‌ها و قارچ‌ها که تمامی یا بخشی از زندگی خود را به عنوان اندوفیت درون گیاه سپری می‌کنند از طیف وسیعی از گیاهان جدا شده است (۳۲،۳۱). عمده‌ترین راه ورود باکتری‌های اندوفیت را ریزوسفر خاک عنوان کرده‌اند هر چند که این امکان نیز وجود دارد تا از طریق پراکنده شدن اسپور ها در هوا و سپس روزنه‌های هوایی وارد بافت‌های گیاهی شوند (۳۳). بیش‌ترین اندوفیت‌های گزارش شده، باسیلوس‌ها و اکتینوباکتری‌ها می‌باشند (۳۴). حضور اندوفیت‌های همزیست در گیاه، علاوه بر اینکه بستر مناسب و مواد غذایی را برای رشد میکروارگانیسم فراهم می‌آورد با امتیازاتی برای گیاه همراه بوده و برخی نیازهای گیاه را نیز برطرف می‌سازد (۳۳). باکتری‌های اندوفیت با تولید

باکتری‌ها از جمله ساختار دیواره سلولی، وجود پپتیدوگلیکان و محتوای ژنومی تک کروموزومی با درصد C+G بالا، جزء Domain باکتری‌ها محسوب می‌شوند (۱۳). به عنوان یکی از بزرگ‌ترین راسته‌های باکتریایی در جدیدترین تقسیم‌بندی‌های فیلوژنتیکی در 6 کلاس *Actinobacteria*، *Acidimicrobiia*، *Rubrobacteria*، *Nitriliruptoria*، *Coriobacteriia*، *Thermoleophilia* و 20 راسته ششامل *Actinomycetales*، *Acidothemales*، *Acidimicrobiales*، *Geodermatophilales*، *Frankiales*، *Bifidobacteriales*، *Nakamurellales*، *Micrococcales*، *Kineosporiales*، *Coriobacteriales*، *unassigned*، *Nitriliruptorales*، *Egicoccales*، *Egibacterales*، *Eggerthellales*، *Rubrobacterales*، *Gaiellales*، *Euzebyales*، *Solirubrobacterales* و *Thermoleophilales* به همراه 66 خانواده قرار گرفته‌اند (-/http://www.bacterio.net/aboveclass.html#actinobacteria). مهم‌ترین شناخته شده‌ترین جنس‌های اکتینوباکتری‌ها شامل *Nocardia*، *Mycobacterium*، *Corynebacterium* و *Rhodococcus* هستند که بعضاً به دلیل کاربردهای دارویی (۱۴)، پزشکی، بیوتکنولوژی و صنعتی (۱۶،۱۵) و در موارد کم‌تر به دلیل بیماری‌زایی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۷). اکتینوباکتری‌ها و مخصوصاً جنس استرپتومایسس از سالیان دور به دلیل پتانسیل‌های بالای آن‌ها در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه بوده‌اند. با توجه به توانایی بالای اکتینوباکتری‌ها در سازگاری و زندگی در محیط‌های مختلف و همچنین پیدایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها و کاهش روزافزون منابع جدید برای جداسازی ترکیبات دارویی، منابع و میزبان‌های ناشناخته‌ای که در گذشته اهمیت کم‌تری داشته‌اند توجه محققان را به خود جلب نموده‌اند تا بتوانند خلاء ایجاد شده را پر کنند (۱۸). شناسایی جوامع میکروبی در محیط‌های مختلف و درک چگونگی سازگاری این میکروارگانیسم‌ها که بیانگر غنای ژنتیکی

که منجر به رشد، حفاظت و افزایش محصول گیاه می‌شوند (35). جدیدترین جنس‌های اکتینوباکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاهان به همراه میزبان و محل مطالعه آن‌ها، طی پنج سال اخیر، در جدول شماره 1 خلاصه شده است.

طیف وسیعی از فیتوهورمون‌ها و ترکیبات مفیدی همچون سیدروفورها، تثبیت نیتروژن و جذب مواد معدنی را برای گیاه تسهیل می‌کنند و از طرفی با تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و برخی آنزیم‌های هیدرولیز کننده، دیواره قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا را تخریب می‌کنند

جدول شماره 1: جدیدترین جنس‌های اکتینوباکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاهان در طی پنج سال اخیر

ماین	کشور	گیاه میزبان	جزء گیاهی	خانواده	گونه
[39]	چین	<i>Sonchus oleraceus</i> L.	برگ	Micromonosporaceae	<i>Plantactinospora sonchi</i>
[40]	چین	<i>Veratrum nigrum</i> L.	ریشه	Micromonosporaceae	<i>Plantactinospora veratri</i>
[41]	چین	<i>Tripterygium wilfordii</i>	ساقه	Glycomycetaceae	<i>Stackebrandia endophytica</i>
[42]	چین	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> F.	ریشه	Jiangellaceae	<i>Phytoactinopolyspora endophytica</i>
[43]	تایلند	<i>Cosmos speciosus</i>	برگ	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora costi</i>
[44]	چین	halophyte	ساقه/ریشه	Cellulomonadaceae	<i>Actinotalea suaedae</i>
[45]	پرتغال	<i>Halmione portulacoides</i>	ریشه	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium proteolyticum</i>
[46]	چین	<i>Dianthus chinensis</i> L.	ریشه	Streptosporangiaceae	<i>Sphaerisporangium dianthi</i>
[47]	تایلند	Jambolan plum	ریشه	Streptosporangiaceae	<i>Nonomuraea sycygi</i>
[48]	تایلند	Jambolan plum	ریشه	Thermomonosporaceae	<i>Actinomadura sycygi</i>
[49]	چین	<i>Salsola affinis</i> C.	ریشه	Microbacteriaceae	<i>Okibacterium endophyticum</i>
[50]	چین	<i>Anabasis elatior</i>	ساقه	Microbacteriaceae	<i>Labellella endophytica</i>
[51]	چین	<i>Salsola ferganica</i> Drob	ساقه	Nocardioideae	<i>Marinactinospora endophytica</i>
[52]	چین	<i>Tamarix taklamakanensis</i>	ساقه	Pseudonocardiaceae	<i>Prauserella endophytica</i>
[53]	تایلند	<i>Oryza sativa</i> L.	ساقه	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces oryzae</i>
[54]	چین	Bryophyta	-	Thermomonosporaceae	<i>Actinoallomurus bryophytorum</i>
[55]	تایلند	<i>Oryza sativa</i>	برگ	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora endophytica</i>
[56]	چین	Bryophyta	-	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces bryophytorum</i>
[57]	چین	<i>Glycine max</i>	ریشه	Micromonosporaceae	<i>Plantactinospora soyae</i>
[58]	تایلند	<i>Phyllanthus amarus</i>	ساقه	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces phyllanthi</i>
[59]	چین	<i>Polygonatum odoratum</i>	ریشه	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces polygonati</i>
[60]	استرالیا	<i>Pittosporum angustifolium</i>	ساقه	Nocardioideae	<i>Kribbella pittospori</i>
[61]	مکزیک	<i>Prosopis laevis</i>	ریشه	Micrococcaceae	<i>Kocuria arsenatis</i>
[62]	چین	<i>Ocimum basilicum</i>	ریشه	Propionibacteriaceae	<i>Mariniluteococcus endophyticus</i>
[63]	چین	<i>Kandelia candel</i>	پوست	Nakamurellaceae	<i>Nakamurella endophytica</i>
[64]	تایلند	<i>Boesenbergia rotunda</i>	دندون	Micromonosporaceae	<i>Asanoa endophytica</i>
[65]	چین	<i>Bruguiera gymnorhiza</i>	پوست	Intrasporangiaceae	<i>Phycoccus endophyticus</i>
[66]	چین	<i>Ginkgo biloba</i> L.	ریشه	Nocardioideae	<i>Nocardioideis ginkgobilobae</i>
[67]	چین	Sweet Basil	برگ	Dermaococcaceae	<i>Flexivirga endophytica</i>
[68]	چین	<i>Paris polyphylla</i>	ریشه	Dermaococcaceae	<i>Yimella radidis</i>
[69]	چین	<i>Huperzia serrata</i>	یافت	Frankiaceae	<i>Jatrophihabitans huperziae</i>
[70]	پرتغال	<i>Halmione portulacoides</i>	ریشه	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium diaminoobutyricum</i>
[71]	چین	<i>Sonchus oleraceus</i>	برگ	Micromonosporaceae	<i>Verrucosipora sonchi</i>
[72]	چین	<i>Sonneratia apetala</i>	شاخه	Nocardioideae	<i>Nocardioideis someratiiae</i>
[73]	تایلند	<i>Stahlianthus campanulatus</i>	ساقه	Streptosporangiaceae	<i>Nonomuraea stahlianthi</i>
[74]	تایلند	<i>Terminalia mucronata</i>	ساقه	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora terminaliae</i>
[75]	تایلند	<i>Oryza sativa</i>	ساقه	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces roietensis</i>
[76]	چین	<i>Capparis spinosa</i> L.	میوه	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces capparisidis</i>
[77]	چین	<i>Psammosilene tunicoides</i>	ریشه	Streptomycetaceae	<i>Allostreptomyces psammosilenae</i>
[78]	چین	<i>Parathelypteris beddomei</i>	ریشه	Micromonosporaceae	<i>Micromonospora parathelypteridis</i>
[79]	چین	<i>Zea mays</i>	ساقه	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium zeae</i>
[80]	چین	<i>Huperzia serrata</i>	-	Propionibacteriaceae	<i>Naumamella huperziae</i>
[81]	چین	<i>Thespesia populnea</i>	شاخه	Nocardioideae	<i>Marmoricola endophyticus</i>
[82]	چین	<i>Aegiceras corniculatum</i>	شاخه	Microbacteriaceae	<i>Annibacterium endophyticum</i>
[83]	چین	<i>Anabasis aphylla</i> L.	ریشه	Glycomycetaceae	<i>Glycomyces anabasis</i>
[84]	آفریقای جنوبی	<i>Podocarpus latifolius</i>	برگ	Nocardioideae	<i>Kribbella podocarpi</i>
[85]	چین	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> F.	ریشه	Micrococcaceae	<i>Nesterenkonia endophytica</i>
[86]	تایلند	<i>Podochilus microphyllus</i> Lindl.	ریشه	Pseudonocardiaceae	<i>Actinomycetospira endophytica</i>
[87]	چین	<i>Populus adenopoda</i>	ریشه	Thermomonosporaceae	<i>Actinocorallia populi</i>
[88]	چین	<i>Populus adenopoda</i>	ساقه	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces populi</i>
[89]	چین	<i>Dioscorea bulbifera</i> L.	پیاز	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces dioscori</i>
[90]	چین	<i>Sophora alopecuroides</i>	ریشه	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces carminius</i>
[91]	چین	halophytes	-	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium halophytorum</i>
[92]	چین	<i>Solanum lycopersicum</i>	ریشه	Micromonosporaceae	<i>Plantactinospora solaniradicis</i>
[93]	چین	<i>Geranium carolinianum</i> L.	ریشه	Streptomycetaceae	<i>Streptomyces geranii</i>
[94]	چین	<i>Scutellaria baicalensis</i>	پوست	Dermabacteraceae	<i>Brachybacterium endophyticum</i>
[95]	چین	<i>Nerium indicum</i> Mill	پوست	Microbacteriaceae	<i>Annibacterium flavum</i>
[96]	چین	<i>Suaeda aralocaspica</i>	-	Microbacteriaceae	<i>Microbacterium suaedae</i>
[97]	تایلند	<i>Oryza sativa</i> L.	برگ	Kineosporiaceae	<i>Quadrishpaera oryzae</i>
[98]	تایلند	<i>Kaempferia elegans</i>	دندون	Jiangellaceae	<i>Jiangella endophytica</i>
[99]	چین	<i>Ferula songorica</i>	ریشه	Nocardioideae	<i>Nocardioideis ferulae</i>
[100]	چین	<i>Kandelia candel</i>	پوست	Nocardioideae	<i>Marmoricola mangrovicus</i>
[101]	چین	<i>Triticum aestivum</i>	ریشه	Streptosporangiaceae	<i>Microbispora tritici</i>
[102]	چین	<i>Triticum aestivum</i>	ریشه	Streptosporangiaceae	<i>Sphaerimonospora triticiradicis</i>
[103]	استرالیا	<i>Callitris preissii</i>	ریشه	Pseudonocardiaceae	<i>Actinomycetospira callitridis</i>

تاکنون جنس‌های مهمی که دارای پتانسیل‌های متنوعی در تولید ترکیبات زیست فعال طبیعی بوده‌اند شناسایی و به صنایع مختلف از جمله کشاورزی، پزشکی و داروسازی معرفی شده‌اند (۳۶، ۳۷).

#### جداسازی اکتینوباکتری‌های اندوفیت

جداسازی و شناسایی اکتینوباکتری‌ها و مخصوصاً جنس استرپتومایسس از سالیان دور به دلیل پتانسیل‌های بالای آن‌ها در تولید آنتی‌بیوتیک‌ها مورد توجه بوده‌اند. اولین مرحله در جداسازی اندوفیت‌های میکروبی، حذف تمام آلودگی‌های سطحی نمونه‌های گیاهی، اعم از گرد و خاک، شن و ماسه‌ها، بافت‌های خراب شده و در مرحله بعد حذف میکروارگانیسم‌های اپی‌فیت و ریزوسفر خاک است که همراه نمونه‌ها به آزمایشگاه آورده شده‌اند و به این فرایند، استریلیزاسیون سطحی (Surface sterilization) گفته می‌شود. بنابراین پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، اولین مرحله، شستشوی آن‌ها با جریان آب جهت حذف آلودگی‌های فیزیکی است. در مرحله استریلیزاسیون سطحی که به منظور حذف آلودگی‌های میکروبی غیر اندوفیت می‌باشد روش‌های متعددی در سال‌های اخیر به کار برده شده است که شستشوی نمونه‌ها با الکل و هیپوکلریت سدیم یکی از مراحل اصلی و ثابت آن است. در مطالعه‌ای که اخیراً انجام شده است، نمونه‌ها پس از شستشو با آب مقطر، ابتدا برای 30 ثانیه در توین 0/1 درصد شسته شده و سپس برای 5 دقیقه در اتانول 75 درصد و بعد از آن 5 دقیقه در سدیم هیپوکلرات 2 درصد غوطه‌ور شدند. در مرحله بعد به منظور مهار رشد قارچ‌ها به مدت 10 دقیقه در سدیم هیدروژن کربنات 10 درصد شسته شدند. در بین تمامی مراحل ذکر شده، نمونه‌ها را سه بار با آب مقطر استریل شستشو می‌دادند (38). Mondal و همکاران از روش مشابهی استفاده کردند بجز این‌که در بین مراحل ذکر شده، نمونه‌ها را دوبار با آب مقطر استریل شستشو می‌دادند (104). در مطالعه دیگری نمونه‌های

گیاهی جمع‌آوری شده ابتدا برای 10 ثانیه در اتانول 96 درصد و سپس به مدت 3 دقیقه در محلول سدیم هیپوکلرات 2 درصد غوطه‌ور شده و در انتها 3 بار و هر بار به مدت یک دقیقه با آب مقطر استریل شسته، تا استریل گردند (105). در حالی که Wei و همکارانش، ابتدا نمونه را توسط امواج اولتراسونیک به مدت 15 دقیقه شستشوداده و خشک کردند. سپس نمونه را در NaOCl 5 درصد به مدت 6 دقیقه غوطه‌ور کردند. در ادامه به مدت 10 دقیقه در  $2,5 \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  درصد و 5 دقیقه در اتانول 70 درصد به ترتیب شستشو دادند. بعد از آن، نمونه را 5 دقیقه در آب مقطر استریل شستشوداده و در نهایت به مدت 10 دقیقه در  $\text{NaHCO}_3$  10 درصد قرار دادند تا استریل گردد (106). جهت اطمینان از استریل شدن سطوح نمونه‌ها و تأیید مراحل انجام شده (استریلیزاسیون)، آخرین آب مقطر استفاده شده برای شستشو را کشت داد و رشد هرگونه باکتری را ردیابی کرد (38). عدم رشد هرگونه باکتری نشان‌دهنده آن است که مراحل استریلیزاسیون سطحی به درستی انجام گرفته و می‌توان اطمینان حاصل کرد باکتری‌هایی که در مراحل بعدی از نمونه جدا می‌شوند فقط اندوفیت می‌باشند. برای کشت نمونه‌های گیاهی روش‌های آماده سازی متفاوتی انجام می‌شود. نمونه‌ها به قطعات کوچک 1 تا 2 سانتی‌متری برش داده شده و مستقیماً بر روی محیط‌های کشت اضافه می‌شوند تا به مرور زمان و با رشد باکتری‌های اندوفیت، آن‌ها بتوانند وارد محیط کشت شده و تشکیل کلونی دهند (107). در این روش فقط تعداد محدودی از سویه‌های اندوفیت می‌توانند خود را به محیط کشت رسانده و رشد کنند. علاوه بر این احتمال رشد اسپورهای اکتینوباکتریایی که درون بافت گیاهی و دور از محیط کشت قرار دارند نیز کاهش یافته و به جداسازی و شناسایی تعداد محدودی از جنس‌ها منجر می‌شود. خرد کردن، له کردن نمونه‌ها در هاون و حل کردن آن‌ها در بافر (مانند فسفات) و تهیه رقت‌های مختلف روش دیگری است که برای رشد بهتر

دیگر بجز اکتینوباکتری‌ها فعال هستند، استفاده می‌کنند تا مانع رشد آن‌ها شوند. به این منظور معمولاً از نیستاتین ( $10-100 \mu\text{g/mL}$ )، آمفوتریسین B ( $25-75 \mu\text{g/mL}$ ) و سیکلوهاگزامید ( $50-100 \mu\text{g/mL}$ ) بر علیه قارچ‌ها و از نالیدیکسیک اسید ( $25-50 \mu\text{g/mL}$ ) بر علیه باکتری‌های غیر اکتینوباکتر استفاده می‌شود (110). همچنین در برخی مطالعات از بنومیل ( $50 \mu\text{g/mL}$ ) جهت جلوگیری از رشد قارچ‌ها استفاده شده است (111). رشد اکتینوباکتری‌ها در محیط‌های کشت و تشکیل کلونی فرایندی زمانبر است و معمولاً از 2 تا 4 هفته و گاهی تا 16 هفته در دمای 28 تا 30 درجه سانتی‌گراد به طول می‌انجامد (30).

اسپورها و سوبه‌هایی که مقادیر اندکی از آن‌ها در گیاه وجود دارد، استفاده می‌شود (109، 108). در این روش یک میلی‌لیتر از هر یک از سوسپانسیون‌ها را به محیط‌های کشت اختصاصی انتقال می‌دهند تا شانس جداسازی اکتینوباکتری‌ها افزایش یابد. انتخاب و آماده‌سازی محیط کشت مناسب یکی از مهم‌ترین بخش‌های جداسازی اندوفیت‌ها است. تاکنون محیط کشت‌های متنوعی توسط محققان برای جداسازی اکتینوباکتری‌های اندوفیت به کار گرفته شده است (جدول شماره 2). در تهیه محیط‌های کشت معمولاً از آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی و ضدباکتریایی که بر علیه میکروارگانسیم‌های

جدول شماره 2: اجزای تشکیل دهنده و نام محیط کشت‌های استفاده شده برای جداسازی اکتینوباکتری‌های اندوفیت

منبع	اجزاء محیط کشت (یک لیتر)	محیط کشت
(112)	پوئیتو اکسترکت 4 گرم، دکستروز 20 گرم، آگار 20 گرم	پوئیتو دکستروز آگار (PDA)
(113)	یست اکسترکت 0.25 گرم، دی پناسیم هیدروژن فسفات 0.5 گرم، آگار 18 گرم	ناب واتر یست اکسترکت (TWYE)
(114)	دکستروز 10 گرم، کازین هیدرولیز شده 4 گرم، دی پناسیم هیدروژن فسفات 0.5 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 0.2 گرم، کلیم کلرید دو آب 0.1 گرم، فیک سترات 10 میلی‌گرم، کبالت ( ) سولفات هفت آب 0.01 میلی‌گرم، مس سولفات پنج آب 0.1 میلی‌گرم، بوریک اسید 1.5 میلی‌گرم، منیزیم سولفات یک آب 0.8 میلی‌گرم، آمونیوم مولیبدات چهار آب 0.2 میلی‌گرم، روی سولفات هفت آب 0.6 میلی‌گرم	محیط S-آگار
(115)	نشاسته محلول 20 گرم، سدیم کلرید 0.5 گرم، پناسیم نترات 1 گرم، دی پناسیم هیدروژن فسفات سه آب 0.5 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 0.5 گرم، فروس سولفات هفت آب 0.01 گرم، آگار 20-15 گرم	Gause's synthetic agar
(115)	گلوتریک 10 گرم، مالت اکسترکت 4 گرم، یست اکسترکت 4 گرم، آگار 20-15 گرم	آگار YMG
(116)	یست اکسترکت 0.1 گرم، دی پناسیم هیدروژن فسفات 2 گرم، سدیم کلرید 0.2 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 0.005 گرم، کلیم کلرید 0.05 گرم، فروس سولفات هفت آب 0.01 گرم، نشاسته محلول 0.1 گرم، آگار 20 گرم	Low-Nutrient Mineral Salts-agar (LNMS)
(117، 116)	هیومیک اسید 1 گرم، سدیم هیدروژن فسفات 0.5 گرم، پناسیم کلرید 1 گرم، آمونیوم کلرید 1 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 0.05 گرم، فروس سولفات هفت آب 0.01 گرم، کلیم کلرید 0.02 گرم، کپلکس ویتامین B <sub>3</sub> ، سیکلوهاگزامید 50 نانوگرم، آگار 18 گرم	هیومیک ویتامین آگار (HVA)
(116)	سدیم هیدروژن فسفات 6 گرم، دی پناسیم هیدروژن فسفات 1 گرم، آمونیوم کلرید 1 گرم، سدیم کلرید 1 گرم، یست اکسترکت 0.05 گرم، کیتین کلونیدی 1% آگار 15 گرم	کیتین آگار
(119)	یست اکسترکت 5 گرم، پپتون 0.5 گرم، کازیمینو اسید 0.5 گرم، گلوتریک 0.5 گرم، نشاسته 0.5 گرم، سدیم پیروات 0.3 گرم، دی پناسیم هیدروژن فسفات 0.3 گرم، منیزیم سولفات 0.05 گرم، آگار 15 گرم	Reasoner's 2A
(119)	گلوتریک 1 گرم، یست اکسترکت 2 گرم، تریپتون 0.5 گرم، کلیم کلرید 1 گرم، نشاسته 1 گرم، بودو نیلوفر آبی 1 گرم، آگار 15 گرم	T5 اصلاح شده
(118)	یست اکسترکت 1 گرم، پروتاز پپتون 1 گرم، کازیمینو اسید 1 گرم، گلوتریک 1 گرم، نشاسته 1 گرم، سدیم پیروات 0.5 گرم، دی پناسیم هیدروژن فسفات 0.6 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 1 گرم، آگار 18 گرم	TR3A آگار
(111)	پروئین 10 گرم، آگار 15 گرم	واتر پروئین آگار (WPA)
(111)	کریو کسی متیل سلولز سدیم 10 گرم، L-آسپارژیناز 1 گرم، دی پناسیم هیدروژن فسفات 1 گرم، فروس سولفات هفت آب 0.001 گرم، منگنز ( ) کلرید چهار آب 0.001 گرم، روی سولفات هفت آب 0.001 گرم، آگار 15 گرم	CMC آگار
(119)	مالت 10 گرم، یست اکسترکت 4 گرم، گلوتریک 10 گرم	مالت یست اکسترکت گلوتریک (MYG)
(119)	گلوتریک 10 گرم، نشاسته محلول 20 گرم، یست اکسترکت 5 گرم، N-Z Amine نوع یک 5 گرم، کلیم کلرید 1 گرم، آگار 15 گرم	محیط ATCC 172 آگار
(119)	نشاسته محلول 10 گرم، گلیسرول 5 گرم، یست اکسترکت 5 گرم، پناسیم نترات 2 گرم، دی پناسیم هیدروژن فسفات 1 گرم، منیزیم سولفات 0.05 گرم، کلیم کلرید 3 گرم، فرو سولفات 0.01 گرم، آگار 22 گرم	استارچ - گلیسرول - نترات آگار (SGN)
(119)	-	سوکسیات - آرزین آگار (SAA)
(106)	پپتون 5 گرم، عصاره گوشت 3 گرم، سدیم کلرید 5 گرم، آگار 20 گرم	نوتریت آگار (NA)
(106)	کازین 17 گرم، کنجاله سویا هضم شده 3 گرم، سدیم کلرید 2.5 گرم، دکستروز 2.5 گرم، پناسیم هیدروژن فسفات 2.5 گرم، آگار 15 گرم	تریپتیک سوی آگار (TSA)
(120)	نشاسته محلول 10 گرم، کازین 0.3 گرم، پناسیم هیدروژن فسفات 2 گرم، پناسیم نترات 2 گرم، سدیم کلرید 2 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 0.05 گرم، کلیم کلرید 0.02 گرم، فروس سولفات هفت آب 0.01 گرم، آگار 17 گرم	استارچ کازین نترات آگار (SGN)
(120)	رفاینوز 10 گرم، L-جیستیدین 1 گرم، پناسیم هیدروژن فسفات 1 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 0.5 گرم، فروس سولفات هفت آب 0.01 گرم، آگار 17 گرم	رفاینوز جیستیدین آگار (RH)

شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی اکتینوباکتری‌های اندوفیت شناسایی اولیه و تأیید باکتری‌های جدا شده به عنوان جنس‌های اکتینوباکتری ابتدا توسط ویژگی‌های مورفولوژیکی و سپس توسط روش‌های مولکولی انجام و تأیید می‌گردند. از آنجایی که کشت‌های اولیه بدست آمده از اکتینوباکتری‌های اندوفیت ممکن است حاوی چندین کلونی از جنس‌های مختلف اکتینوباکتری‌ها، با ویژگی‌های مورفولوژیکی متفاوت باشند، ابتدا باید از آن‌ها کشت‌های خالص تهیه کرد. در این مرحله معمولاً برای رشد سریع‌تر کلونی‌ها از محیط‌های اختصاصی اکتینوباکتری‌ها استفاده می‌شود (121) که در جدول شماره 3 مورد بررسی قرار گرفته‌اند.

اکتینوباکتری‌ها به واسطه میسلیوم‌های رویشی و زایشی، ساختار، تعداد و موقعیت اسپورها از دیگر باکتری‌ها به راحتی متمایز می‌شوند (122). در مرحله بعد برای شناسایی مولکولی سویه‌های جدا شده ابتدا باید DNA سویه‌ها را استخراج و سپس از آن برای شناسایی سویه‌ها استفاده کرد (123). روش‌های متعددی برای شناسایی باکتری‌ها بر پایه تکثیر DNA استفاده می‌شود که متداول‌ترین آن‌ها، شناسایی بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA می‌باشد (122). توالی‌های آغازگر (پرایمر) استاندارد برای ژن 16S rRNA باکتری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از تکثیر ژن 16S rRNA، قطعه‌ای به طول حدود 1/5 Kb توسط روش الکتروفورز شناسایی و برای توالی‌یابی مورد استفاده قرار می‌گیرد. داده‌های

حاصل از توالی‌یابی توسط پایگاه‌ها و نرم‌افزارهایی که برای بررسی روابط فیلوژنتیکی و شناسایی سویه‌های جدید توسعه یافته‌اند، آنالیز شده و نتایج معمولاً به صورت درخت فیلوژنتیک ارائه می‌گردد. بیش‌ترین پایگاه‌های مورد استفاده در مطالعات تاکسونومی بر پایه توالی‌یابی ژن 16S rRNA، EzBioCloud و Silva هستند (124، 125). باید به این نکته نیز توجه داشت که بسته به این که از کدام الگوریتم استفاده شود، نحوه سنجش شباهت بین توالی‌ها در هر پایگاه می‌تواند متفاوت باشد که متعاقباً منجر به حصول نتایج مختلفی می‌شود. MEGA7 نیز جدیدترین سری از مجموعه نرم‌افزارهای MEGA است که برای بررسی و شناسایی سویه‌های جدید و رسم درخت فیلوژنتیک بر پایه توالی‌های 16S rRNA مورد استفاده قرار می‌گیرد. بیش از 10000 توالی تأیید شده rRNA ریبوزومی در این پایگاه موجود است (126). با وجود تمام مزیت‌ها، یکی از چالش‌های استفاده از توالی‌های ژنومی برای تعیین مرز بین گونه‌ها و تاکسون‌ها این است که چند درصد شباهت توالی برای مرز بین دو گونه در نظر گرفته شود. چالش دیگر این است که در بین تعدادی از گونه‌های متفاوت درصد شباهت توالی‌های 16S rRNA به بیش از 99 درصد می‌رسد، از این رو آیا صرفاً بررسی این ژن برای تعیین حد و مرز بین گونه‌های پروکاریوتی کافی است؟ به منظور غلبه بر این مشکلات روش‌هایی چون DNA-DNA hybridization (DDH) و

جدول شماره 3: محیط کشت‌های اختصاصی اکتینوباکتری‌ها جهت تولید محصول (Production)

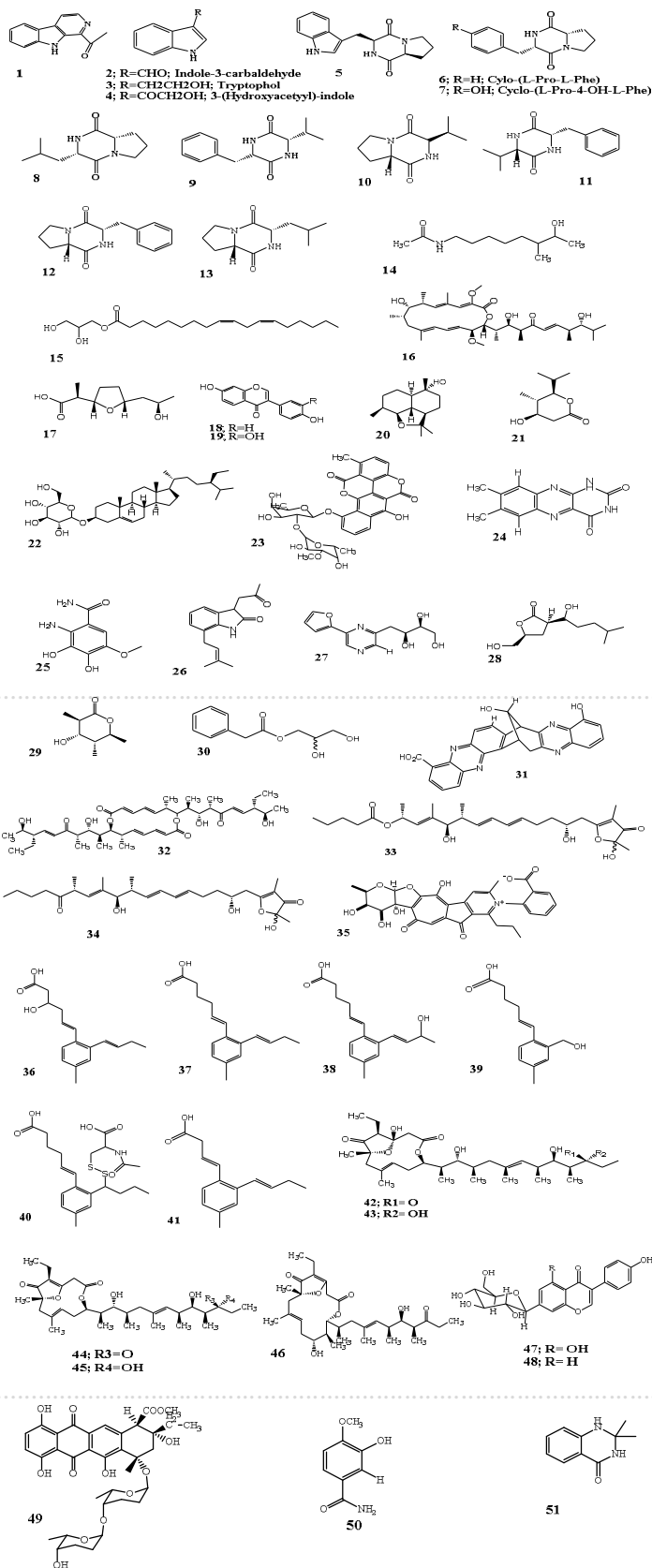
نام محیط کشت	اجزاء محیط کشت (بک لیت)
تریتون بست اکسترکت آگار (International Streptomyces Project)	کازین هیدرولیز شده 5 گرم، بست اکسترکت 3 گرم
بست اکسترکت مالت اکسترکت دکستروز آگار (ISP2)	بست اکسترکت 3 گرم، مالت اکسترکت 10 گرم، دکستروز 4 گرم، آگار 20 گرم
لوت میل آگار (ISP3)	لوت میل 20 گرم، آگار 18 گرم
محیط حاوی نشاسته و مواد معدنی آگار (ISP4)	پناسیم هیدروژن فسفات 1 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 1 گرم، سدیم کلرید 1 گرم، آمونیوم سولفات 2 گرم، کلسیم کرپات 2 گرم، محلول نمک های کمیاب 1 میلی لیتر، آگار 20 گرم
گلیسرول-آیمپارزین سالت آگار (ISP5)	L-آیمپارزیناز 1 گرم، گلیسرول 10 گرم، پناسیم هیدروژن فسفات 1 گرم، محلول نمک های کمیاب 1 میلی لیتر، آگار 20 گرم
پتون بست اکسترکت آهن آگار (ISP7)	پتون 15 گرم، پروتوز 5 گرم، فریک آمونیوم سترات 0.5 گرم، دی پناسیم فسفات 1 گرم، سدیم تیوسولفات 0.08 گرم، بست اکسترکت 1 گرم، آگار 15 گرم
نیروزین آگار (ISP7)	گلیسرول 15 گرم، L-نیروزین 0.5 گرم، L-آیمپارزیناز 1 گرم، پناسیم هیدروژن فسفات 0.5 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 0.5 گرم، سدیم کلرید 0.5 گرم، فرو سولفات هفت آب 0.01 گرم، محلول نمک های کمیاب 1 میلی لیتر، آگار 20 گرم
محیط مصرفی حاوی کرین (ISP9)	آمونیوم سولفات 2.64 گرم، پناسیم هیدروژن فسفات 2.38 گرم، پناسیم هیدروژن فسفات سه آب 5.65 گرم، منیزیم سولفات هفت آب 1 گرم، نمک های کمیاب Pridham و Cottlieb، منبع کرین 1% آگار 15 گرم



پتانسیل تولید ترکیبات زیست فعال و متابولیت های ثانویه در سال های اخیر تحقیقات بسیار چشمگیری در رابطه با جداسازی، شناسایی و بررسی پتانسیل های مختلف اکتینوباکتری های اندوفیت، به منظور کشف منابع دارویی جدید صورت گرفته است. این تحقیقات عمدتاً با شناسایی جنس ها و گونه های جدیدی همراه بوده که دارای ترکیبات متعدد با خواص متنوع همچون خواص ضد سرطانی، ضد میکروبی، ضد ویروسی و ضد التهابی بوده اند. ساختمان شیمیایی ترکیبات جدید جدا شده از اکتینوباکتری های اندوفیت در پنج سال اخیر در (تصویر شماره 1) نشان داده شده است.

معمولاً ترکیباتی که برای نخستین بار از محیط های زنده جداسازی می شوند جهت آزمون های مختلفی همچون سمیت سلولی، خواص ضد سرطانی، خواص ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و غیره مورد بررسی قرار می گیرند. به طور مثال Gos و همکارانش در مطالعه ای بر روی جمعیت اکتینوماست های اندوفیت گیاه *Vochysia divergens* در سال 2017 در برزیل توانستند 10 سویه اندوفیت را بر اساس مشخصات مورفولوژیکی و توالی یابی ژن 16S rRNA جدا کنند (133). ارزیابی های ضد میکروبی متابولیت های ثانویه آن ها منجر به معرفی سویه LGMB491 شد که متابولیت های آن دارای Minimum Inhibitory Concentration برابر با 04mg/mL علیه *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* بودند. این متابولیت ها شامل: Indole-3-carbaldehyde، 1-acetyl-b-carboline، Tryptophol، 3-(hydroxyacetyl)-indole، Brevianamide F، Cyclo-(L-Pro-L-Phe)، Cyclo-(L-Pro-L-Tyr)، Cyclo-(L-Pro-L-Leu) و Cyclo-(L-Val-L-Phe) بودند. Alshaibani و همکارانش نیز با ارزیابی اثرات ضد میکروبی *Streptomyces SUK 25*، توانستند چهار ترکیب Diketopiperazine (DKP) و یک ترکیب از مشتقات استامید با خواص ضد میکروبی شناسایی کنند.

Average Nucleotide Identity (ANI) که بر اساس توالی یابی کل ژنوم صورت می گیرد، برای بررسی مطالعات فیلوژنی مورد استفاده قرار می گیرند. Kim و همکاران (127) پیشنهاد می کنند که 95-96 درصد شباهت بر اساس ANI و 98/65 درصد شباهت بر اساس 16S rRNA می تواند مرز مناسبی برای بین گونه های پروکاریوتی باشد. بر همین اساس پایگاه Microbial Genomes Atlas (MiGA) بر پایه ANI و Amino Acid Identity (AAD) به کلاسه بندی تاکسون های باکتریایی می پردازد (128). یکی دیگر از مشکلات مهم در مورد شناسایی جمعیت باکتری های یک محیط از جمله اندوفیت ها، احتمال از دست رفتن گونه هایی است که به دلیل عدم توانایی رشد در محیط کشت و یا به دلیل تعداد اندک جمعیت اولیه و تهیه کشت خالص از آن ها، قابل شناسایی نیستند. از این رو در سال های اخیر جداسازی و شناسایی جمعیت های باکتریایی بر اساس روش های مستقل از کشت توسعه یافته اند (129). Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) یکی از پرکاربردترین روش های بر پایه PCR است که برای شناسایی پلی مورفیسم ژن ها، مخصوصاً 16S rRNA در جمعیت های باکتریایی، استفاده می شود (130). در مورد جداسازی اکتینوباکتری های اندوفیت، DNA مورد استفاده برای این تکنیک به طور مستقیم از بافت گیاهی استریل شده به دست می آید و در ادامه ژن 16S rRNA توسط پرایمرهای مخصوص تکثیر می شود. سپس محصولات PCR توسط ژل الکتروفورز که حاوی شیبی از ماده احیا کننده است، از هم جدا می شوند (27). این جداسازی بر اساس تفاوت در میزان بازهای G+C و حذف باندهای هیدروژنی میان آن ها در غلظت های متفاوتی از شیب، که باعث ایجاد تفاوت سرعت حرکت آن ها در ژل می شود، انجام می گوی لرد. ب لرای اطلاعات بیش تر می توانید به مطالعات آقایان Strathee و Muyzer رجوع کنید (131، 132).



تصویر شماره 1: ساختار شیمیایی ترکیبات جدید جدا شده از اکتینوباکتری های اندوفیت

ترکیبات زیست فعالی هستند که معمولاً از ترکیب دو اسید آمینه با پیوندهای آمیدی به وجود آمده و دارای پتانسیل‌های دارویی قابل توجهی می‌باشند. ترکیبات جداشده عبارت بودند از: Cyclo-(L-Val-L-Pro)، Cyclo-(L-Leu-L-Pro)، Cyclo-(L-Phe-L-Pro) و Cyclo-(L-Val-L-Phe)-N-(7-hydroxy-6-methyl-octyl) (134). Chandrakar و همکاران در سال 2018 توانستند از *Streptomyces sp. Av-R5* جداشده از گیاه آلوئه ورا، اکتینومایسین‌های D و X0 $\beta$  را جدا و با تکنیک‌های اسپکتوفتومتری، HPLC و NMR خالص‌سازی و ساختار آن‌ها را شناسایی کنند. آن‌ها همچنین با بهینه‌سازی شرایط تخمیر و تولید انبوه این سویه توانستند محیط مناسب با بازدهی و راندمان بالا جهت تولید این دو آنتی‌بیوتیک در مقیاس صنعتی فراهم نمایند. این گروه آنتی‌بیوتیک‌ها را علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و منفی از جمله *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Staphylococcus epidermidis* و *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*

ترکیبات زیست فعالی هستند که معمولاً از ترکیب دو اسید آمینه با پیوندهای آمیدی به وجود آمده و دارای پتانسیل‌های دارویی قابل توجهی می‌باشند. ترکیبات جداشده عبارت بودند از: Cyclo-(L-Val-L-Pro)، Cyclo-(L-Leu-L-Pro)، Cyclo-(L-Phe-L-Pro) و Cyclo-(L-Val-L-Phe)-N-(7-hydroxy-6-methyl-octyl) (134). Chandrakar و همکاران در سال 2018 توانستند از *Streptomyces sp. Av-R5* جداشده از گیاه آلوئه ورا، اکتینومایسین‌های D و X0 $\beta$  را جدا و با تکنیک‌های اسپکتوفتومتری، HPLC و NMR خالص‌سازی و ساختار آن‌ها را شناسایی کنند. آن‌ها همچنین با بهینه‌سازی شرایط تخمیر و تولید انبوه این سویه توانستند محیط مناسب با بازدهی و راندمان بالا جهت تولید این دو آنتی‌بیوتیک در مقیاس صنعتی فراهم نمایند. این گروه آنتی‌بیوتیک‌ها را علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و منفی از جمله *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Staphylococcus epidermidis* و *Pseudomonas aeruginosa* *Staphylococcus aureus*

روش‌های نوین تولید متابولیت‌های ثانویه

علاوه بر روش جداسازی سویه‌های جدید از منابعی که کم‌تر مورد بررسی قرار گرفته‌اند، استراتژی‌های دیگری نیز برای شناسایی سویه‌ها و تولید متابولیت‌های ثانویه جدید به کار برده می‌شوند. از این میان می‌توان به روش کشت همزمان (Co-culture)، یک سویه چند ترکیب (One strain many compounds) و کشت در محل (in situ cultivation) اشاره کرد. در کشت همزمان دو سویه (که می‌توانند قارچ یا باکتری باشند)، به دلیل رقابتی که بین آن‌ها شکل می‌گیرد

جدول شماره 4: جدیدترین ترکیبات شناسایی شده از اکتینوباکتری‌های اندوفیت در طی پنج سال اخیر

نام ترکیب	سویه اندوفیت	گیاه میزبان	فعالیت	منبع
1-monolinolein(15) Bafilomycin D(16) Nonactic acid(17) Daidzein(18) 3'-hydroxydaidzein(19) 5,11-epoxy-10-cadinanol(20) Preactone B(21) Daucosterol(22)	<i>Streptomyces cavourensis</i> YBQ59	<i>Cinnamomum cassia</i>	فعالیت ضد میکروبی	(135)
Chartreusin(23) Lumichrome(24)	<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i> SKHI-2	<i>Musa</i>	فعالیت ضد میکروبی	(136)
2-amino-3,4-dihydroxy-5-methoxybenzamide(25)	<i>Streptomyces sp.</i> YIM 67086	<i>Dysophylla stellate</i>	فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانت	(137)
3-acetylidene-7-prenylindolin-2-one(26)	<i>Streptomyces sp.</i> Neau-D50	<i>Soybean</i>	فعالیت سایتوتوکسیک و ضد قارچی	(138)
2-(furan-2-yl)-6-(2S,3S,4-trihydroxybutyl)pyrazine(27)	<i>Jishengella endophytica</i> 161111	<i>Xylocarpus granatum</i>	فعالیت ضد ویروسی	(139)
(2R*,4S*)-2-((1S*)-hydroxy-4'-methylpentyl)-4-(hydroxymethyl)butanolide(28) (3R*,4S*,5R*,6S*)-tetrahydro-4-hydroxy-3,5,6-trimethyl-2-pyranone(29) 1-O-(phenylacetyl)glycerol(30)	<i>Streptomyces albospinus</i> RL7	<i>Lychophora ericoides</i>		(140)
Diastaphenazine(31)	<i>Streptomyces diastaticus</i>	<i>Artemisia annua</i>	فعالیت ضد میکروبی و سایتوتوکسیک	(141)
Efomycins M(32)	<i>Streptomyces sp.</i> BCC72023	<i>Oryza sativa</i>	فعالیت ضد میکروبی، ضد قارچی و سایتوتوکسیک	(142)
Linfuranone B(33) Linfuranone C(34) Rubrolone B(35)	<i>Sphaeromonospora mesophila</i>	<i>Clinacanthus siamensis</i> Bremek	فعالیت تانیزایی	(143)
Lomeic acid E-J(36-41)	<i>Streptomyces sp.</i> KIB-H033	<i>Camellia sinensis</i>	فعالیت سایتوتوکسیک	(144)
Actinoalloxide A-E(42-46)	<i>Streptomyces KIB-H1289</i>	<i>Betula mandshuric</i>	مهارکننده تروزیناز	(145)
7-O- $\beta$ -D-glucosyl-genistein(47) 7-O- $\beta$ -D-glucosyl-daidzein(48)	<i>Actinoallomurus fulvus</i> MK10-036	<i>Capsicum frutescens</i>	فعالیت ضد انگلی	(146)
Misamycin(49)	<i>Microbacterium sp.</i> LGMB471	<i>Vochysia divergens</i>	فعالیت ضد قارچی	(147)
3-hydroxy-4-methoxybenzamide(50) 2,3-dihydro-2,2-dimethyl-4(1H)-quinazolinone(51)	<i>Streptomyces sp.</i> YIM66403	<i>Isodon eriocalyx</i>	فعالیت ضد میکروبی و سایتوتوکسیک	(148)
	<i>Streptomyces sp.</i>	<i>Lychophora ericoides</i>	فعالیت ضد میکروبی، سایتوتوکسیک و ضد انگلی	(149)

میکروارگانسیم‌ها رشد کند. این سویه‌ها سپس با روش‌های مختلف توالی‌یابی شده و شناسایی می‌شوند (155). به کمک روش کشت در محل تنوع گسترده‌تری از ترکیبات شیمیایی و سویه‌های مختلف قابل شناسایی شده‌اند به طوری که می‌توان امیدوار بود سویه‌هایی که تاکنون شناسایی نشده‌اند، این قابلیت را پیدا کنند تا بتوان آن‌ها را در آزمایشگاه‌ها کشت داد (156).

## بحث

افزایش عفونت‌های بیمارستانی و مرگ و میرهای ناشی از مقاومت باکتریایی یکی از معضلات بزرگ کشورهای جهان در سال‌های اخیر می‌باشد. به منظور غلبه بر این مشکل و تهیه آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر و کارا، منابع متعددی مور بررسی قرار گرفته‌اند. اکتینوباکتری‌ها و به طبع سویه‌های اندوفیت یکی از مهم‌ترین، متنوع‌ترین و جذاب‌ترین محیط‌هایی است که به منظور کشف و شناسایی آنتی‌بیوتیک‌های ناشناخته توجه محققین را به خود جلب کرده است. با توجه به تنوع زیاد ساختار ترکیبات جدا شده از اکتینوباکتری‌ها و فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع و فراوان آن‌ها، در این مطالعه استریلیزاسیون سطحی نمونه‌ها، محیط‌های کشت اختصاصی جداسازی (Isolation) و تولید ترکیبات ثانویه (Production) اکتینوباکتری‌ها را به صورت گسترده مورد بررسی قرار دادیم. در تمامی مقالات بررسی شده، الکل یکی از مواد اصلی استریلیزاسیون سطحی نمونه‌ها بود. همچنین به منظور جلوگیری از رشد قارچ‌ها در تهیه محیط کشت برای جداسازی اکتینوباکتری‌ها عموماً از ترکیبات ضد قارچی استفاده می‌شود. به علاوه روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی پیشرفته شناسایی اکتینوها مورد بحث قرار گرفت که می‌توان جهت شناسایی اکتینوهای قابل کشت (Culturable) و غیرقابل کشت (Non-Culturable Bacteria) استفاده شوند. علاوه بر موارد ذکر شده در این مطالعه، عوامل متعددی در جداسازی اندوفیت‌ها از گیاهان از جمله: نوع

می‌توان انتظار داشت که سویه‌ها شروع به تولید ترکیبات و آنتی‌بیوتیک‌هایی جدید کنند که در شرایط معمول آزمایشگاهی رخ نمی‌دهد. به عبارتی شرایط به وجود آمده سبب می‌شود تا میکروارگانسیم ژن‌های بیوسنتتیک خود را که تاکنون خاموش بودند را فعال کرده و شروع به تولید متابولیت‌های ثانویه برای ایجاد برتری بر رقیب خود کند. به عنوان مثال در مطالعه‌ای که به منظور بررسی تنوع متابولیتی قارچ *Aspergillus versicolor* KU258497 انجام شد، از روش کشت همزمان با باکتری *Bacillus subtilis* 168 استفاده شد که منجر به شناسایی ترکیبات متعدد با خصوصیات سایتوتوکسیک شدند (۱۵۰، ۱۵۱). به علاوه، این موضوع نیز به اثبات رسیده است که روش‌های معمول مانند محیط کشت‌های سنتی نمی‌توانند تمام ظرفیت میکروارگانسیم‌ها را فعال کرده و از این رو بسیاری ترکیبات آن‌ها ناشناخته می‌ماند. روش جدیدی که در این خصوص به کار گرفته می‌شود، تکنیک یک سویه چند ترکیب است که در آن سعی می‌شود با بهینه کردن متغیرهای مؤثر در رشد سویه‌های مختلف و تولید متابولیت‌های ثانویه، تنوع ترکیبات شیمیایی استخراج شده از میکروارگانسیم را افزایش دهد (152). این روش که مختصراً با عنوان One Strain Many Compounds (OSMAC) شناخته می‌شود شامل استراتژی‌هایی مانند تغییر ترکیب محیط کشت، دما، pH، منبع کربن و نیتروژن و یا استفاده از آنزیم‌های مختلف است (154). یکی دیگر از راه حل‌هایی که برای رشد محدود میکروارگانسیم‌ها با استفاده از روش‌های سنتی ارائه شده، کشت در محل (in situ cultivation) می‌باشد (154). یکی از شیوه‌های انجام این روش، این است که میکروارگانسیم را درون سوسپانسیونی مشابه با محیط طبیعی خود قرار داده و با استفاده از محفظه‌های حاوی منافذ بسیار ریز که تنها یک سلول را در برمی‌گیرند، گیر انداخته و میکروارگانسیم اجازه می‌یابد که به درون غشاء‌های نفوذپذیری از جنس آگار که در اطراف محفظه‌ها تعبیه می‌شوند بدون رقابت با دیگر

محیط‌هایی کم‌تر شناخته شده هستند که هر یک از مراحل جمع‌آوری تا تولید تجاری متابولیت‌های ثانویه ارزشمند آن نیازمند تحقیق و بهبود فرایندها برای بهبود عملکردهای مربوطه هستند. فراوانی و تنوع سویه‌های اکتینوباکتری‌های اندوفیت که منجر به تولید متابولیت‌های ثانویه متنوعی با ساختارهای شیمیایی و فعالیت‌های بیولوژیکی و عملکرد متفاوت می‌شوند، یکی از مهم‌ترین منابع قابل دسترس برای توسعه محصولات بیوتکنولوژی می‌باشد که دریچه‌ای جدید در توسعه، کشف و تولید فراوردهای پزشکی - دارویی و بهبود سلامتی جامعه بشری باز نموده است.

### سپاسگزاری

از معاونت محترم تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه برای فراهم آوردن امکانات انجام و تأمین هزینه‌های این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

میزبان، فصل نمونه‌گیری و منطقه جغرافیایی دخیل هستند (110) که نیاز به تحقیق بیش‌تری دارند. جداسازی، شناسایی و بررسی پتانسیل تولید ترکیبات زیست‌فعال اکتینوباکتری‌های اندوفیت با گیاهان دارویی فرایندی مهم در مطالعات دارویی می‌باشد. بررسی مولکولی مسیرهای متابولیسمی این باکتری‌ها و شناسایی گروه‌های ژنی بیوسنتتیک (Biosynthetic Gene Clusters) مؤثر در تولید متابولیت‌های ثانویه به همراه ترکیبات مهارکننده یا تحریک‌کننده آن‌ها نیز از دیگر حوزه‌های جذاب اکتینوباکتری‌های اندوفیت است که نیازمند مطالعه گسترده‌ای می‌باشد (157). جداسازی و شناسایی اندوفیت‌های جدید و به‌کارگیری روش‌های نوین در تولید متابولیت‌های ثانویه و فعال‌سازی ژن‌های خاموش آن‌ها، احتمال کشف و توسعه آنتی‌بیوتیک‌های جدید برای درمان عفونت‌های مقاوم بیمارستانی، بیماری‌های نوظهور و سرطان را افزایش دهد. محیط‌های اندوفیت،

### References

1. Bérdy J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot Res* 2012; 65(8): 385.
2. Islam S, Aldstadt J, Aga D. Global antimicrobial resistance: A complex and dire threat with few definite answers. *Tropi Med Int Health* 2019; 24(6): 658-662.
3. Docquier JD, Mangani S. An update on  $\beta$ -lactamase inhibitor discovery and development. *Drug Resist Updat* 2018; 36:13-29.
4. Rigali S, Anderssen S, Naômé A, van Wezel GP. Cracking the regulatory code of biosynthetic gene clusters as a strategy for natural product discovery. *Biochem Pharmacol* 2018; 153: 24-34.
5. Radlinski L, Conlon B. Antibiotic efficacy in the complex infection environment. *Curr Opin Microbiol* 2018; 42: 19-24.
6. Kemung HM, Tan LTH, Khan TM, Chan KG, Pusparajah P, et al. Streptomyces as a prominent resource of future anti-MRSA drugs. *Folia Microbiol* 2018; 9: 2221
7. Genilloud O. Actinomycetes: still a source of novel antibiotics. *Natural Product Reports* 2017; 34(10): 1203-1232.
8. Rateb ME, Ebel R, Jaspars M. Natural product diversity of actinobacteria in the Atacama Desert. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2018; 111(8):1467-1477.
9. Masand M, Jose PA, Menghani E, Jebakumar SRD. Continuing hunt for endophytic actinomycetes as a source of novel biologically active metabolites. *World J Microbiol Biotechnol* 2015; 31(12): 1863-1875.
10. Vurukonda SSK, Giovanardi D, Stefani E. Plant growth promoting and biocontrol

- activity of *Streptomyces* spp. as endophytes. *Int J Mol Sci* 2018; 19(4): 952.
11. Nalini M, Prakash H. Diversity and bioprospecting of actinomycete endophytes from the medicinal plants. *Lett Appl Microbiol* 2017; 64(4): 261-270.
  12. Chandrakar S, Gupta AK. Actinomycin-Producing Endophytic *Streptomyces parvulus* Associated with Root of *Aloe vera* and Optimization of Conditions for Antibiotic Production. *Probiotics Antimicro* 2018; 11(3): 1055-1069
  13. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P, et al. Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016; 80(1): 1-43.
  14. Fernández-Cabezón L, Galán B, García JL. New insights on steroid biotechnology. *Folia Microbiol* 2018; 9: 958.
  15. Viana Marques D, Machado S, Ebinuma V, Duarte C, Converti A, Porto A. Production of  $\beta$ -lactamase inhibitors by *Streptomyces* species. *Antibiotics* 2018; 7(3):61.
  16. Anteneh YS, Franco CM M. Whole Cell Actinobacteria as Biocatalysts. *Front Microbiol* 2019; 10: 77.
  17. Vázquez Boland JA, Meijer WG. The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi*: What's in a name? *Mol Microbiol* 2019; 112(1): 1-15.
  18. Dhakal D, Pokhrel AR, Shrestha B, Sohng JK. Marine rare actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. *Front Microbiol* 2017; 8: 1106.
  19. Liu L, Salam N, Jiao JY, Jiang HC, Zhou EM, Yin YR, et al. Diversity of culturable thermophilic Actinobacteria in hot springs in Tengchong, China and studies of their biosynthetic gene profiles. *Microb Ecol* 2016; 72(1): 150-162.
  20. Panda AK, Bisht SS, Rana M, De Mandal S, Kumar NS. Biotechnological Potential of Thermophilic Actinobacteria Associated With Hot Springs. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 155-164): Elsevier; 2018.
  21. Meena B, Anburajan L, Vinithkumar NV, Kirubakaran R, Dharani G. Biodiversity and antibacterial potential of cultivable halophilic actinobacteria from the deep sea sediments of active volcanic Barren Island. *Microb Pathog* 2019; 132: 129-136.
  22. Dholakiya RN, Kumar R, Mishra A, Mody KH, Jha B. Antibacterial and Antioxidant Activities of Novel Actinobacteria Strain Isolated from Gulf of Khambhat, Gujarat. *Front Microbiol* 2017; 8: 2420.
  23. Jiang Z, Tuo L, Huang D, Il'yaA PO, Tyurin A, Liu S, et al. Diversity, Novelty and Antimicrobial Activity of Endophytic Actinobacteria from Mangrove Plants in Beilun Estuary National Nature Reserve of Guangxi, China. *Front Microbiol* 2018; 9: 868.
  24. Law JWF, Ser HL, Ab Mutalib NS, Saokaew S, Duangjai A, Khan TM, et al. *Streptomyces monashensis* sp. nov., a novel mangrove soil actinobacterium from East Malaysia with antioxidative potential. *Sci Rep* 2019; 9(1): 3056.
  25. Demain AL, Gómez-Ortiz B, Ruiz-Villafán B, Rodríguez-Sanoja R, Sánchez S. Recent findings of molecules with anti-infective activity: screening of non-conventional sources. *Curr Opin Pharmacol* 2019; 48: 40-47.
  26. Goodfellow M, Nouioui I, Sanderson R, Xie F, Bull AT. Rare taxa and dark microbial

- matter: novel bioactive actinobacteria abound in Atacama Desert soils. *Anton Van Leeuw JG* 2018; 111(8): 1315-1332.
27. Purushotham N, Jones E, Monk J, Ridgway H. Community Structure of Endophytic Actinobacteria in a New Zealand Native Medicinal Plant *Pseudowintera colorata* (Horopito) and Their Influence on Plant Growth. *Microb Ecol* 2018; 76(3): 729-740.
  28. Vijayabharathi R, Gopalakrishnan S, Sathya A, Srinivas V, Sharma M. Deciphering the tri-dimensional effect of endophytic *Streptomyces* sp. on chickpea for plant growth promotion, helper effect with *Mesorhizobium ciceri* and host-plant resistance induction against *Botrytis cinerea*. *Microb pathog* 2018; 122: 98-107.
  29. Schulz B, Boyle C. What are endophytes? *Microbial root endophytes*. New York: Springer, 2006.
  30. Golinska P, Wypij M, Agarkar G, Rathod D, Dahm H, Rai M. Endophytic actinobacteria of medicinal plants: diversity and bioactivity. *Anton Van Leeuw JG* 2015; 108(2): 267-289.
  31. Monggoot S, Pichaitam T, Tanapichatsakul C, Pripdeevech P. Antibacterial potential of secondary metabolites produced by *Aspergillus* sp., an endophyte of *Mitrephora wangii*. *Arch Microbiol* 2018; 200(6): 951-959.
  32. de Medeiros AG, Savi D C, Mitra P, Shaaban KA, Jha AK, Thorson JS, Glienke C. Bioprospecting of *Diaporthe terebinthifolii* LGMF907 for antimicrobial compounds. *Folia Microbiol* 2018; 63(4): 499-505.
  33. Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 2008; 16(10): 463-471.
  34. Ek-Ramos MJ, Gomez-Flores R, Orozco-Flores AA, Rodriguez-Padilla C, Gonzalez-Ochoa G, Tamez-Guerra P. Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. *Folia Microbiol* 2019; 10: 463.
  35. Passari AK, MishraVK, Gupta VK, Yadav MK, Saikia R, Singh BP. In vitro and in vivo plant growth promoting activities and DNA fingerprinting of antagonistic endophytic actinomycetes associates with medicinal plants. *PLoS one* 2015; 10(9): e0139468.
  36. Sahur A, Ala A, Patandjengi B, Syam'un E. Effect of Seed Inoculation with Actinomycetes and Rhizobium Isolated from Indigenous Soybean and Rhizosphere on Nitrogen Fixation, Growth, and Yield of Soybean. *Int J Agronomy* 2018; 8: 1-7.
  37. Zhao K, Li J, Zhang X, Chen Q, Liu M, Ao X, et al. Actinobacteria associated with *Glycyrrhiza inflata* Bat. are diverse and have plant growth promoting and antimicrobial activity. *Sci Rep* 2018; 8(1):13661.
  38. Zhao H, Yang A, Zhang N, Li S, Yuan T, Ding N, et al. Insecticidal endostemonines A-J produced by endophytic streptomyces from *Stemona sessilifolia*. *J Agric Food Chem* 2020; 68(6): 1588-1595.
  39. Ma Z, Liu C, Fan J, He H, Li C, Li J, et al. *Plantactinospora sonchi* sp. nov., an actinobacterium isolated from the leaves of common sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65(12): 4895-4901.
  40. Xing H, Liu C, Zhang Y, Zhao J, Li C, Liu H., et al. *Plantactinospora veratri* sp. nov., an actinomycete isolated from black false hellebore root (*Veratrum nigrum* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65(6): 1799-1804.
  41. Xiong ZJ, Miao CP, Zheng YK, Liu K, Li WJ, Liu WH, et al. *Stackebrandtia endophytica* sp nov., an actinobacterium isolated from *Tripterygium wilfordii*. *Int J Syst Evol*

- Microbiol 2015; 65(Pt 6): 1709-1713.
42. Li L, Ma JB, Mohamad OA, Li SH, Osman G, Li YQ, et al. *Phytoactinopolyspora endophytica* gen. nov., sp. nov., a halotolerant filamentous actinomycete isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* F. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65(8): 2671-2677.
  43. Thawai C. *Micromonospora costi* sp. nov., isolated from a leaf of *Costus speciosus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65(5): 1456-1461.
  44. Zhao S, Li L, Li SH, Wang HF, Hozzein WN, Zhang YG, et al. *Actinotalea suaedae* sp. nov., isolated from the halophyte *Suaeda physophora* in Xinjiang, Northwest China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015; 107(1):1-7.
  45. Alves A, Riesco R, Correia A, Trujillo M E. *Microbacterium proteolyticum* sp. nov. isolated from roots of *Halimione portulacoides*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65(6): 1794-1798.
  46. Xing J, Liu C, Zhang Y, He H, Zhou Y, Li L, et al. *Sphaerisorangium dianthi* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from a root of *Dianthus chinensis* L. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015; 107(1): 9-14.
  47. Rachniyom H, Matsumoto A, Indananda C, Duangmal K, Takahashi Y, Thamchaipenet A. *Nonomuraea syzygii* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a jambolan plum tree (*Syzygium cumini* L. Skeels). *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65(4): 1234-1240.
  48. Rachniyom H, Matsumoto A, Indananda C, Duangmal K, Takahashi Y, Thamchaipenet A. *Actinomadura syzygii* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the roots of a jambolan plum tree (*Syzygium cumini* L. Skeels). *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 65(6): 1946-1949.
  49. Wang HF, Zhang YG, Li L, Liu WH, Hozzein WN, Chen JY, et al. *Okibacterium endophyticum* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from roots of *Salsola affinis* CA Mey. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015; 107(3): 835-843.
  50. Wang HF, Zhang YG, Cheng J, Hozzein WN, Liu WH, Li L, et al. *Labeledella endophytica* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from stem of *Anabasis elatior* (C.A. Mey.) Schischk. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2014; 107(1): 95-102.
  51. Liu MJ, Khieu TN, Gao R, Hozzein WN, Wang HF, Yang W, et al. *Marinactinospora endophytica* sp. nov., isolated from a medicinal plant. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015; 107(6): 1577-1582.
  52. Liu JM, Habden X, Guo L, Tuo L, Jiang ZK, Liu SW, et al. *Prauserellaendophytica* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Tamarix taklamakanensis*. *Anton Van Leeuw JG* 2015; 107(6): 1401-1409.
  53. Mingma R, Duangmal K, Thamchaipenet A, Trakulnaleamsai S, Matsumoto A, Takahashi Y. *Streptomyces oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from stems of rice plant. *J Antibiot Res* 2015; 68(6): 368.
  54. Li C, Wang H, Jin P, Zheng W, Chu L, Liu C, et al. *Actinoallomurus bryophytorum* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from moss (Bryophyta). *Anton Van Leeuw JG* 2015; 108(2): 453-459.
  55. Thanaboripat D, Thawai C, Kittiwongwattana C, Laosinwattana C, Koohakan P, Parinthawong N. *Micromonospora endophytica* sp. nov., an endophytic actinobacteria of Thai upland rice (*Oryza sativa*). *J Antibiot* 2015; 68(11): 680-684.
  56. Li C, Jin P, Liu C, Ma Z, Zhao J, Li J, et al. *Streptomyces bryophytorum* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from moss (Bryophyta). *Anton Van Leeuw JG* 2016; 109(9): 1209-1215.



57. Guo X, Guan X, Liu C, Jia F, Li J, Jin P, et al. *Plantactinosporasoyae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from soybean root [*Glycine max* (L.) Merr]. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(7): 2578-2584.
58. Klykleung N, Phongsopitanun W, Pittayakhajonwut P, Ohkuma M, Kudo T, Tanasupawat S. *Streptomyces phyllanthi* sp. nov., isolated from the stem of *Phyllanthus amarus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(10): 3923-3928.
59. Guo S, Liu C, Liu S, Guan X, Guo L, Jia F, et al. *Streptomyces polygonati* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from a root of *Polygonatum odoratum* (Mill.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(3): 1488-1493.
60. Kaewkla O, Franco CMM. *Kribbella pittospori* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of an Australian native apricot tree, *Pittosporum angustifolium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(6): 2284-2290.
61. Roman-Ponce B, Wang D, Vásquez-Murrieta MS, Chen WF, Estrada-de los Santos P, Sui XH, Wang ET. *Kocuria arsenatis* sp. nov., an arsenic-resistant endophytic actinobacterium associated with *Prosopis laevis* grown on high-arsenic-polluted mine tailing. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(2): 1027-1033.
62. Liu BB, Chen W, Chu X, Yang Y, Salam N, Hu WY, et al. *Mariniluteicoccus endophyticus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from root of *Ocimum basilicum*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(3): 1306-1310.
63. Tuo L, Li FN, Pan Z, Lou I, Guo M, Lee S MY, et al. *Nakamurella endophytica* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from the bark of *Kandelia candel*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(3): 1577-1582.
64. Niemhom N, Chutrakul C, Suriyachadkun C, Thawai C. *Asanoa endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of *Boesenbergia rotunda*. *Int J System Evol Microbiol* 2016; 66(3): 1377-1382.
65. Liu SW, Xu M, Tuo L, Li XJ, Hu L, Chen L, et al. *Phycococcus endophyticus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Bruguiera gymnorhiza*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(3): 1105-1111.
66. Xu H, Zhang S, Cheng J, Asem MD, Zhang MY, Manikprabhu D, et al. *Nocardioides ginkgobilobae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the root of the living fossil *Ginkgo biloba* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; 66(5): 2013-2018.
67. Gao R, Liu B-B, Yang W, Song P-F, Chen W, Salam N, Li W-J. *Flexivirga endophytica* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a leaf of Sweet Basil. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(9): 3388-3392.
68. Yang LL, Jiang Z, Tang SK, Chu X, Xu LH, Zhi XY. *Yimella radices* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the root of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(10): 4191-4196.
69. Gong ZL, Ai MJ, Sun HM, Liu HY, Yu LY, Zhang YQ. *Jatrophihabitans huperziae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from surface-sterilized tissue of the medicinal plant *Huperzia serrata* (Thunb.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(10): 3972-3977.
70. Fidalgo C, Riesco R, Henriques I, Trujillo ME, Alves A. *Microbacterium diaminobutyricum* sp. nov., isolated from *Halimione portulacoides*, which contains diaminobutyric acid in its cell wall, and emended description

- of the genus *Microbacterium*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(11): 4492-4500.
71. Ma Z, Zhao S, Cao T, Liu C, Huang Y, Gao Y, et al. *Verrucosipora sonchi* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from the leaves of common sowthistle (*Sonchus oleraceus* L.). *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(12): 5430-5436.
  72. Li F, Tuo L, Su ZW, Wei XQ, Zhang XY, Gao CH, et al. *Nocardioides sonneratae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from a branch of *Sonneratia apetala*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67(8): 2592-2597.
  73. Niemhom N, Chutrakul C, Suriyachadkun C, Thawai C. *Nonomurea stahlianthi* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the stem of *Stahlianthus campanulatus*. *Int J System Evol Microbiol* 2017; 67(8): 2879-2884.
  74. Kaewkla O, Thamchaipinet A, Franco CMM. *Micromonospora terminaliae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of the medicinal plant *Terminalia mucronata*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67(2): 225-230.
  75. Kaewkla O, Franco CMM. *Streptomyces roietensis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of jasmine rice, *Oryza sativa* KDML 105. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67(11): 4868-4872.
  76. Wang HF, Li QL, Xiao M, Zhang YG, Zhou XK, Rao MPN, et al. *Streptomyces capparidis* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from fruits of *Capparis spinosa* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67(1): 133-137.
  77. Huang MJ, Rao MPN, Salam N, Xiao M, Huang HQ, Li WJ. *Allotrestreptomyces psammosilenae* gen. nov., sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the roots of *Psammosilene tunicoides* and emended description of the family Streptomycetaceae [Waksman and Henrici (1943) AL] emend. Rainey et al. 1997, emend. Kim et al. 2003, emend. Zhi et al. 2009. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67(2): 288-293.
  78. Zhao S, Liu C, Zheng W, Ma Z, Cao T, Zhao J, et al. *Micromonospora parathelypteridis* sp. nov., an endophytic actinomycete with antifungal activity isolated from the root of *Parathelypteris beddomei* (Bak.) Ching. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67(2): 268-274.
  79. Gao J, Sun P, Wang XM, Lv FY, Sun JG. *Microbacterium zeae* sp. nov., an endophytic bacterium isolated from maize stem. *Anton Van Leeuw JG* 2017; 110(5): 697-704.
  80. Sun Y, Chen HH, Sun HM, Ai MJ, Su J, Yu LY, Zhang YQ. *Naumannella huperziae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Huperzia serrata* (Thunb.) *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67(6): 1867-1872.
  81. Jiang ZK, Pan Z, Li FN, Li XJ, Liu SW, Tuo L, et al. *Marmoricola endophyticus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Thespesia populnea*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2017; 67(11): 4379-4384.
  82. Walitang DI, Kim CG, Kim K, Kang Y, Kim YK, Sa T. The influence of host genotype and salt stress on the seed endophytic community of salt-sensitive and salt-tolerant rice cultivars. *BMC Plant Biol* 2018; 18(1): 51.
  83. Zhang YG, Wang HF, Alkhalifah DHM, Xiao M, Zhou XK, Liu YH, et al. *Glycomyces anabasis* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from roots of *Anabasis aphylla* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 2018; 68(4): 1285-1290.
  84. Curtis SM, Norton I, Everest GJ, Meyers PR. *Kribbella podocarpi* sp. nov., isolated from the leaves of a yellowwood tree (*Podocarpus*

- latifolius). Anton Van Leeuw JG 2018; 111 (6): 875-882.
85. Li L, Li YQ, Fu YS, Zhang H, Alkhalifah D HM, Salam N, et al. *Nesterenkonia endophytica* sp. nov., isolated from roots of *Glycyrrhiza uralensis*. Int J Syst Evol Microbiol 2018; 68(8): 2659-2663.
86. Sakdapetsiri C, Ngaemthao W, Suriyachadkun C, Duangmal K, Kitpreechavanich V. *Actinomycetospora endophytica* sp. nov., isolated from wild orchid (*Podochilus microphyllus* Lindl.) in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol 2018; 68(9): 3017-3021.
87. Li X, Wang Z, Lu F, Zhang H, Tian J, He L, Tian Y. *Actinocorallia populi* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from a root of *Populus adenopoda* (Maxim.). Int J Syst Evol Microbiol 2018; 68(7): 2325-2330.
88. Wang Z, Jiang B, Li X, Gan L, Long X, Zhang Y, Tian Y. *Streptomyces populi* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from stem of *Populus adenopoda* Maxim. Int J Syst Evol Microbiol 2018; 68(8): 2568-2573.
89. Wang Z, Tian J, Li X, Gan L, He L, Chu Y, Tian Y. *Streptomyces dioscori* sp. nov., a Novel Endophytic Actinobacterium Isolated from Bulbil of *Dioscorea bulbifera* L. Curr Microbiol 2018; 75(10): 1384-1390.
90. Wang Y, Xia Z, Liu Z, Wan C, Luo X, Zhang L. *Streptomyces carminius* sp. nov., a novel actinomycete isolated from *Sophora alopecuroides* in Xinjiang, China. Antonie Van Leeuwenhoek 2018; 111(10): 1807-1814.
91. Li YR, Zhu ZN, Li Y Q, Xiao M, Han MX, Wadaan MA, et al. *Microbacterium halophytorum* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from halophytes. Int J Syst Evol Microbiol 2018; 68(12): 3928-3934.
92. Li W, Guo X, Shi L, Zhao J, Yan L, Zhong X, et al. *Plantactinospora solaniradicis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from the root of a tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.). Anton Van Leeuw JG 2018; 111(2): 227-235.
93. Li X, Lai X, Gan L, Long X, Hou Y, Zhang Y, et al. *Streptomyces geranii* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from root of *Geranium carolinianum* L. Int J Syst Evol Microbiol 2018; 68(8): 2562-2567.
94. Tuo L, Yan XR, Li FN, Bao YX, Shi HC, Li HY, Sun CH. *Brachybacterium endophyticum* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from bark of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Int J Syst Evol Microbiol 2018; 68(11): 3563-3568.
95. Tuo L, Yan XR, Li FN, Yang C, An MB, Sun CH. *Amnibacterium flavum* sp. nov., a novel endophytic actinobacterium isolated from bark of *Nerium indicum* Mill. Int J Syst Evol Microbiol 2018; 69(1): 285-290.
96. Zhu ZN, Li YR, Li YQ, Xiao M, Han MX, Wadaan MA, et al. *Microbacterium suaedae* sp. nov., isolated from *Suaeda aralocaspica*. Int J Syst Evol Microbiol 2018; 69(2): 411-416.
97. Muangham S, Lipun K, Matsumoto A, Inahashi Y, Duangmal K. *Quadrisphaera oryzae* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from leaves of rice plant (*Oryza sativa* L.). J Antibiot 2019; 72(2): 93-98.
98. Niemhom N, Chutrakul C, Suriyachadkun C, Tadtong S, Thawai C. *Jiangella endophytica* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the rhizome of *Kaempferia elegans*. Int J System Evol Microbiol 2018; 69(2): 454-459.

99. Liu YH, Fang BZ, Mohamad OAA, Zhang YG, Jiao JY, Dong ZY, et al. *Nocardioidea ferulae* sp. nov., isolated from root of an endangered medicinal plant *Ferula songorica* Pall. ex Spreng. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019; 69(5): 1253-1258.
100. Li FN, Jiang ZK, Liu SW, Tuo L, Lee SMY, Sun CH. *Marmoricola mangrovicus* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Kandelia candel*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2019; 69(5): 1343-1345.
101. Han C, Zhao J, Yu B, Shi H, Zhang C, Guo X, Wang X. *Microbispora tritici* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a root of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Anton Van Leeuw JG* 2019; 112(8): 1137-1145.
102. Han C, Hu J, Zhao J, Tian Y, Jiang S, Guo X, Wang X. *Sphaerimonospora triticiradicis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a root of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Anton Van Leeuw JG* 2019; 112(3): 401-407.
103. Kaewkla O, Franco CMM. *Actinomycetospira callitridis* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilised root of an Australian native pine tree. *Anton Van Leeuw JG* 2019; 112(3): 331-337.
104. Mondal S, Rai RV. Molecular Profiling of Endophytic *Streptomyces Cavourensis* MH16 Inhabiting *Millingtonia Hortensis* Linn. And Influence of Different Culture Media on Biosynthesis of Antimicrobial Metabolites. *Naturwissenschaften* 2019; 106(9-10): 51.
105. Wicaksono WA, Jones EE, Monk J, Ridgway HJ. The bacterial signature of *Leptospermum scoparium* (Manuka) reveals core and accessory communities with bioactive properties. *PLoS ONE* 2016; 11(9): e0163717.
106. Wei W, Zhou Y, Chen F, Yan X, Lai Y, Wei C, et al. Isolation, Diversity, and Antimicrobial and Immunomodulatory Activities of Endophytic Actinobacteria From Tea Cultivars Zijuan and Yunkang-10 (*Camellia sinensis* var. *assamica*). *Front Microbiol* 2018; 9: 1304.
107. Qin S, Li J, Chen HH, Zhao GZ, Zhu WY, Jiang CL, et al. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(19):6176-6186.
108. Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W, Kloepper J. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can J Microbiol* 1997; 43(10): 895-914.
109. Gohain A, Gogoi A, Debnath R, Yadav A, Singh BP, Gupta VK, et al. Antimicrobial biosynthetic potential and genetic diversity of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants. *FEMS Microbiol Lett* 2015; 362(19): 158.
110. Passari A K, Mishra VK, Gupta V K, Singh BP. Methods Used for the Recovery of Culturable Endophytic Actinobacteria: An Overview. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 1-11): Elsevier; 2018.
111. Matsumoto A, Takahashi Y. Endophytic actinomycetes: promising source of novel bioactive compounds. *J Antibiot* 2017; 70(5): 514.
112. Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H, Jensen JB, Teplow DB. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscansa*. *Microbiology* 2002; 148(9): 2675-2685.
113. Coombs JT, Franco CM. Isolation and identification of actinobacteria from surface-sterilized wheat roots. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(9): 5603-5608.

114. Verma VC, Gond SK, Kumar A, Mishra A, Kharwar RN, Gange AC. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. *Microbial Ecology* 2008; 57(4): 749-756.
115. Wu Y, Lu C, Qian X, Huang Y, Shen Y. Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants. *Curr Microbiol* 2009; 59(4): 475-482.
116. Zhao K, Penttinen P, Guan T, Xiao J, Chen Q, Xu J, et al. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China. *Curr Microbiol* 2011; 62(1): 182-190.
117. Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol* 1987; 65(5): 501-509.
118. Beiranvand M, Amin M, Hashemi-Shahraki A, Romani B, Yaghoubi S, Sadeghi P. Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medical plants of Iran. *Iran J Microbiol* 2017; 9(1): 11-18.
119. Shan W, Zhou Y, Liu H, Yu X. Endophytic Actinomycetes from Tea Plants (*Camellia sinensis*): Isolation, Abundance, Antimicrobial, and Plant-Growth-Promoting Activities. *Biomed Res Int* 2018.
120. Girão M, Ribeiro I, Ribeiro T, Azevedo IC, Pereira F, Urbatzka R, Carvalho MF. compounds. *Folia Microbiol* 2019; 10: 683.
121. Shirling E T, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 1966;6(3):313-340.
122. Passari AK, Mishra VK, Singh BP. Molecular Markers Used for Identification and Genomic Profiling of Plant Associated Endophytic Actinobacteria. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier; 2018. p:43-65.
123. Arasu MV, Duraipandiyan V, Ignacimuthu S. Antibacterial and antifungal activities of polyketide metabolite from marine *Streptomyces* sp. AP-123 and its cytotoxic effect. *Chemosphere* 2013; 90(2): 479-487.
124. Park SC, Won S. Evaluation of 16S rRNA Databases for Taxonomic Assignments Using Mock Community. *Genomics Inform* 2018; 16(4): e24.
125. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013; 41(D1): D590-D596.
126. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 2016; 33(7): 1870-1874.
127. Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014; 64(2): 346-351.
128. Rodriguez RL M, Gunturu S, Harvey WT, Rosselló-Mora R, Tiedje JM, Cole JR. The Microbial Genomes Atlas (MiGA) webserver: taxonomic and gene diversity analysis of Archaea and Bacteria at the whole genome level. *Nucleic Acids Res* 2018; 46(W1): W282-W288.
129. Murdini L A, Solihin DD, Lestari Y. The Existence of Endophytic Actinobacteria from *Rhododendron zoeleeri* Revealed by Culture-

- Dependent and Culture-Independent Approaches. HAYATI J Biosci 2018; 25(2): 54-62.
130. Janatiningrum I, Solihin DD, Meryandini A, Lestari Y. Comparative study on the diversity of endophytic actinobacteria communities from *Ficus deltoidea* using metagenomic and culture dependent approaches. Biodiversitas Journal of Biological Diversity 2018; 19(4): 1514-1520.
131. Strathdee F, Free A. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). DNA Electrophoresis 2013; 1054: 145-147.
132. Muyzer G, Smalla K. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek 1998; 73(1): 127-141.
133. Gos FM, Savi DC, Shaaban KA, Thorson JS, Aluizio R, Possiede YM, et al. Antibacterial activity of endophytic actinomycetes isolated from the medicinal plant *Vochysia divergens* (Pantanal, Brazil). Folia Microbiol 2017; 8: 1642.
134. Alshaibani M, Zin MN, Jalil J, Sidik NM, Ahmad SJ, Kamal N, et al. Isolation, purification, and characterization of five active diketopiperazine derivatives from endophytic *Streptomyces* SUK 25 with antimicrobial and cytotoxic activities. J Microbiol Biotechnol 2017; 27(7): 1249-1256.
135. Vu HNT, Nguyen DT, Nguyen HQ, Chu HH, Chu SK, Van Chau M, Phi QT. Antimicrobial and Cytotoxic Properties of Bioactive Metabolites Produced by *Streptomyces cavourensis* YBQ59 Isolated from *Cinnamomum cassia* Prels in Yen Bai Province of Vietnam. Curr Microbiol 2018; 75(10): 1247-1255.
136. Kuncharoen N, Fukasawa W, Iwatsuki M, Mori M, Shiomi K, Tanasupawat S. 2019. Characterisation of Two Polyketides from *Streptomyces* sp. SKH1-2 Isolated from Roots of *Musa* (ABB) cv. 'Kluai Sao Kratuep Ho'. Int Microbiol 2019; 22(4): 451-459.
137. Yang X, Peng T, Yang Y, Li W, Xiong J, Zhao L, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of a new benzamide from endophytic *Streptomyces* sp. YIM 67086. J Nat Prod 2015; 29(4): 331-335.
138. Jin H, Yang XY, Yan ZQ, Liu Q, Li XZ, Chen JX, et al. Characterization of rhizosphere and endophytic bacterial communities from leaves, stems and roots of medicinal *Stellera chamaejasme* L. Syst Appl Microbiol 2014; 37(5): 376-385.
139. Wang P, Kong F, Wei J, Wang Y, Wang W, Hong K, Zhu W. Alkaloids from the Mangrove-Derived Actinomycete *Jishengella endophytica* 161111. Mar Drugs 2014; 12(1): 477-490.
140. Chagas FO, Caraballo-Rodríguez AM, Dorrestein PC, Pupo MT. Expanding the Chemical Repertoire of the Endophyte *Streptomyces albospinus* RLe7 Reveals Amphotericin B as an Inducer of a Fungal Phenotype. J Nat Prod 2017; 80(5): 1302-1309.
141. Li Y, Han L, Rong H, Li L, Zhao L, Wu L, et al. Diastaphenazine, a new dimeric phenazine from an endophytic *Streptomyces diastaticus* subsp. *ardesiacus*. J Antibiot 2015; 68(3): 210-212.
142. Supong K, Thawai C, Choowong W, Kittiwongwattana C, Thanaboripat D, Laosinwattana C, et al. Antimicrobial compounds from endophytic *Streptomyces* sp. BCC72023 isolated from rice (*Oryza sativa* L.). Res Microbiol 2016; 167(4): 290-298.
143. Akiyama H, Indananda C, Thamchaipenet A, Motojima A, Oikawa T, Komaki H, et al. Linfuranones B and C, furanone-containing polyketides from a plant-

- associated *Sphaerimonospora mesophila*. *J Nat Prod* 2018; 81(7): 1561-1569.
144. Yan Y, Ma YT, Yang J, Horsman GP, Luo D, Ji X, et al. Tropolone ring construction in the biosynthesis of rubrolone B, a cationic tropolone alkaloid from endophytic *Streptomyces*. *Org Lett* 2016; 18(6): 1254-1257.
145. Yang R, Yang J, Wang L, Huang JP, Xiong Z, Luo J, et al. Lorneic acid analogues from an endophytic actinomycete. *J Nat Prod* 2016; 80(10): 2615-2619.
146. Inahashi Y, Iwatsuki M, Ishiyama A, Matsumoto A, Hirose T, Oshita J, et al. Actinoallolides A–E, new anti-trypanosomal macrolides, produced by an endophytic actinomycete, *Actinoallomurus fulvus* MK10-036. *Org Lett* 2015; 17(4): 864-867.
147. Savi DC, Shaaban KA, Gos FM, Thorson JS, Glienke C, Rohr J. Secondary metabolites produced by *Microbacterium* sp. LGMB471 with antifungal activity against the phytopathogen *Phyllosticta citricarpa*. *Folia Microbiol* 2019; 64(3): 453-460.
148. Li W, Yang X, Yang Y, Zhao L, Xu L, Ding Z. A new anthracycline from endophytic *Streptomyces* sp. YIM66403. *J Antibiot* 2015; 68(3): 216.
149. Conti R, Chagas FO, Carballo Rodriguez AM, Melo WGdP, do Nascimento AM, Cavalcanti B C, et al. Endophytic actinobacteria from the Brazilian medicinal plant *Lychnophora ericoides* Mart. and the biological potential of their secondary metabolites. *Chem Biodivers* 2016; 13(6), 727-736.
150. Abde wahab MF, Kurtán T, Mándi A, Müller W E, Fouad M A, et al. Induced secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* through bacterial co-culture and OSMAC approaches. *Tetrahedron Lett* 2018; 59(27): 2647-2652.
151. Ebada SS, El-Neketi M, Ebrahim W, Mándi A, Kurtán T, Kalscheuer R, et al. Cytotoxic secondary metabolites from the endophytic fungus *Aspergillus versicolor* KU258497. *Phytochemistry Lett* 2018; 24: 88-93.
152. Bode HB, Walker M, Zeeck A. Structure and biosynthesis of mutolide, a novel macrolide from a UV mutant of the fungus F-24707. *Eur J Org Chem* 2000; (8):1451-1456.
153. Wei H, Lin Z, Li D, Gu Q, Zhu T. OSMAC (one strain many compounds) approach in the research of microbial metabolites--a review. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2010; 50(6): 701-709.
154. Nichols D, Cahoon N, Trakhtenberg EM, Pham L, Mehta A, Belanger A, et al. Use of ichip for high-throughput in situ cultivation of “uncultivable” microbial species. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(8): 2445-2450.
155. Gavrish E, Bollmann A, Epstein S, Lewis K. A trap for in situ cultivation of filamentous actinobacteria. *J Microbiol Methods* 2008; 72(3): 257-262.
156. Acuña JJ, Marileo LG, Araya MA, Rilling JI, Larama GA, Mora ML, et al. In Situ Cultivation Approach to Increase the Culturable Bacterial Diversity in the Rhizobiome of Plants. *J Soil Sci Plant Nutr* 2020:1-16.
157. Tyurin A, Alferova V, Korshun V. Chemical Elicitors of Antibiotic Biosynthesis in Actinomycetes. *Microorganisms* 2018; 8(2): 52.