

一株黄精内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究

柏晓辉*,刘孝莲,刘 娣,汤 敏,孙春巧,胡长玉*

黄山学院生命与环境科学学院,黄山 245041

摘要:本研究采用组织块培养分离法从黄山地区健康的野生黄精根茎中分离得到 11 株内生菌。通过多种培养基对这些菌株进行发酵,并用乙酸乙酯萃取发酵产物进行纸片扩散法抑菌活性分析,最终筛选出 1 株能够稳定产生对绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)均具有显著抑菌效果的内生菌 HJ-1,且发酵产物的最低抑菌浓度为 0.06~0.10 mg/mL。结合形态学特征及细菌 16S rRNA 序列的系统进化分析表明该菌为芽孢杆菌属,该菌株为黄精内生细菌产抑菌活性物质的首次报道。本研究为开发黄精内生菌资源和筛选新型抑菌活性化合物奠定了良好的基础。

关键词:黄精;内生菌;发酵产物;抑菌活性;菌种鉴定

中图分类号:R284.1;Q946

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.5.009

Isolation and Identification of an Endophytic Bacterium from *Polygonatum cyrtonema* and Its Antibacterial Activity

BAI Xiao-hui*, LIU Xiao-lian, LIU Di, TANG Min, SUN Chun-qiao, HU Chang-yu*

College of Life and Environment Science, Huangshan University, Huangshan 245041, China

Abstract: Endophytes which live within the tissues of living plants can produce a wide variety of biological activity as host. Thus they become new resources for novel antimicrobial compounds screening. In this study, we isolated 11 endophytes from the healthy root of the wild *Polygonatum cyrtonema* of Huangshan area based on the tissue culturing. All these strains were used for fermentation by different mediums, and the fermented metabolites were then extracted with ethyl acetate to study the antibacterial activity with the scrip diffusion method. We finally screened an endophytic bacterium HJ-1 which generates stable metabolites that have significant antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Bacillus thuringiensis*, with the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of 0.06-0.10 mg/mL and was identified the *Bacillus* spp. by morphology characteristics analysis and 16S rRNA sequence. It was the first reported that can produce antibacterial activity metabolites of *Bacillus* spp. from *P. cyrtonema*. This study provided a new insight into the development of endophytes resources from *P. cyrtonema* and screening new antibacterial compounds from its metabolites.

Key words: *Polygonatum cyrtonema*; endophytes; metabolites; antibacterial activity; identification

黄精(*Polygonatum sibiricum*)又称鸡爪参、鸡头黄精等,为百合科黄精属(*Polygonatum* Mill)多年生草本植物;黄精是我国传统的中草药,以其根茎入药,具有补气养阴、润肺、健脾等功效。黄精属药用植物资源在我国分布广泛,约 20 余种可以入药^[1]。在我国分布的黄精有长梗黄精、多花黄精、滇黄精等^[1],其中以多花黄精的品质和药效最佳^[2]。多花

黄精产地主要集中在四川、湖南、湖北、安徽等省,其中安徽产药用黄精有 11 余种,主要分布在安徽南部的大别山和黄山山系^[3];安徽琅琊黄精、金寨黄精和黄山黄精更是安徽黄精的特有品种^[3]。

现有文献研究表明中药黄精的活性成分主要有黄精多糖、生物碱和萜醌类化合物、甾体皂苷等^[3,4],此外还含有多种人体所需的氨基酸和维生素等化合物^[5]。药理学研究表明,黄精具有多种生理功能,如抗衰老^[6]、降血糖血脂^[7]和防动脉粥样硬化^[8]、抗炎和抗肿瘤^[9]等;因此黄精具有良好的药用价值和开发前景。随着黄精市场需求量的增高、人类长期以来的过度采挖,加上黄精自然繁殖率

收稿日期:2018-01-29 接受日期:2018-04-25

基金项目:国家自然科学基金(31400628);黄山学院自然科学基金项目(2016xkj005);安徽省教育厅质量工程项目(2015sjjd022);国家大学生创新创业训练项目(201710375004,201710375022)

* 通信作者 Tel:86-559-2546552; E-mail: hcy@hsu.edu.cn; bxh@hsu.edu.cn

低等因素的影响,目前野生药用黄精面临严重的资源匮乏问题。

植物内生菌在与植物共进化的过程中,与宿主植物形成了和谐的共生关系,产生与宿主植物相似或新颖的化合物,成为发现新的活性药物分子和先导化合物的重要资源^[10]。然而,目前仅有少量文献报道黄精内生菌的研究,如李艳玲等报道了泰山黄精内生真菌的抑菌活性研究^[11]和汪滢等报道了浙江多花黄精内生真菌的抗菌代谢产物研究^[12];目前尚未有文献报道安徽黄精内生菌的研究。本课题组从安徽牯牛降自然保护区野生多花黄精内分离获得1株具有抑菌活性的菌株,利用形态学观察结合分子生物学对其进行分类鉴定,并对其次级代谢产物进行抑菌活性研究,以期为黄精药用资源的综合开发和有效利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验植物样品

本课题所用黄精于2015年8月采自安徽省牯牛降自然保护区,经黄山学院方建新老师和潘健博士鉴定为多花黄精(*Polygonatum cyrtoneuma*)。样品采集后于4℃保存备用,并在24h内完成菌种分离。

1.1.2 受试菌株

抑菌实验所用菌株为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、变形杆菌(*Proteus vulgaris*)和苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),以上菌株均购于中国典型培养物保藏中心并保存于黄山学院生命与环境科学学院微生物学实验中心。

1.1.3 仪器

ZGP-2050型恒温培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司)、SW-CJ-ICU型超净工作台(上海新苗有限公司)、DSX-280B型高压蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械有限公司)、OSB-2100型旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司)、MQD-B2R型振荡培养箱(上海旻泉仪器有限公司)、S-3400N型扫描电镜(日本日立公司)。

1.1.4 试剂

基因组抽提试剂盒购于天根生化科技(北京)

有限公司;二甲基亚砜(DMSO)、乙酸乙酯、丙酮和75%酒精等试剂均为分析纯,购自上海国药集团;蛋白胨、酵母提取物、琼脂等生化试剂均购于上海生工生物工程有限公司。

1.1.5 培养基

内生菌分离PDA培养基(去皮马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂15g,加双蒸水定容至1000mL)和LB培养基(胰蛋白胨10g,酵母提取物5g,氯化钠10g,琼脂15g,调节pH值为7.2后加双蒸水定容至1000mL)。发酵培养基参考张应焰博士论文^[13]配方,主要有:麦芽培养基(ME)、马铃薯葡萄糖培养基(PD)、高氏一号培养基、改良的查氏培养基和改良的马丁培养基(MMB)。抑菌实验使用LB培养基。

1.2 内生菌的分离及纯化

黄精内生菌的分离及纯化参照Schulz等^[14,15]的方法并改善,简述如下:取新鲜根茎,用自来水洗净后,取直径约为5mm根茎用5%(v/v)次氯酸钠溶液处理5min;无菌水漂洗4次后用无菌滤纸吸去残留无菌水;再用75%(v/v)乙醇溶液处理根茎5min;然后用无菌水漂洗4次并吸去残留无菌水。用无菌刀片将处理后的根茎切成长度为3mm左右的片段,并分别种植在PDA和LB培养基上;同时随机选取切下的根茎片段,将其两端切口在酒精灯上烧一下后也种植于上述培养基作对照。将培养基于28℃恒温培养3~5天,待实验组黄精根茎切口处长出菌落后,用接种环挑取菌体转接至新鲜PDA和LB培养基上进行纯化,至3次纯化后的菌落均为纯种;将纯种菌转接到PDA和LB斜面培养基上保存备用。

1.3 内生菌发酵产物提取

取保藏的斜面菌种,挑取少量菌种到新鲜PDA培养基上划线并于28℃恒温活化3~5天。将活化的单菌落转接至新鲜配制的PD培养基中,于28℃恒温摇床中180rpm培养12小时得到种子液。分别移取10mL种子液至400mL新配制的ME、PD、高氏一号、改良的查氏和MMB培养基中并于28℃恒温摇床中180rpm培养7天,观察代谢产物的产生情况。

取发酵7d后的培养液,用6~8层纱布过滤除去菌体后再用中速滤纸过滤,并按发酵液:乙酸乙酯为1:1.5(v/v)加入乙酸乙酯进行萃取,萃取3次;用旋转蒸发器浓缩萃取液得到发酵产物粗浸膏;用

丙酮洗脱粗浸膏并转至干净的小玻璃瓶内,将此发酵产物于通风橱内自然蒸发干燥,得到固态发酵产物。用 100% 二甲亚砜(DMSO)将上述粗发酵产物分别配成 100 mg/mL, 4 °C 保存备用。

1.4 内生菌发酵产物的抑菌活性

用新配制 LB 液体培养基将金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、绿脓杆菌、鼠伤寒沙门氏菌、变形杆菌和苏云金芽孢杆菌分别培养至 OD₆₀₀ 为 0.2~0.3, 分别移取 100 μL 菌液至新配制 LB 固体培养基上并涂布均匀;将此平板均分为 4 部分,并贴上直径 6 mm 的无菌滤纸片。用 DMSO 将保存的 100 mg/mL 发酵产物分别稀释至 3.00 mg/mL 并用 0.22 μm 无菌过滤器除菌,移取 10 μL 浓度为 3.00 mg/mL 的发酵产物分别滴加在上述无菌滤纸片上,以 DMSO 为对照,将此 LB 培养基于 37 °C 培养 12~14 h,检测不同发酵产物对上述 7 种受试菌的抑菌活性,重复 3 次。抑菌效果显著的发酵产物,用十倍稀释法将其分别稀释至 3.00、0.30 和 0.03 mg/mL,并用 0.22 μm 过滤除菌再次测试其抑菌活性,重复 3 次,测量并记录抑菌圈的大小,取其平均值;同时参考文献 16 的方法用 96 孔板进一步测定其最低抑菌浓度,将抑菌效果最好的 1 株内生菌编号为 HJ-1。

1.5 内生菌的分类及鉴定

依据常规方法对内生菌 HJ-1 进行菌落形态特征观察,并用扫描电镜进行菌体观察;同时利用染色和部分生理生化指标,结合东秀珠等编写的《常见细菌系统鉴定手册》进行初步鉴定。

用细菌基因组抽提试剂盒提取 HJ-1 菌株全基因组 DNA,并将其寄至苏州金唯智生物科技有限公司,利用细菌通用引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3' 和 1492R:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' 进行扩增和测序。将测得的序列在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对,检索其同源序列。选择与目标菌株同源性较高的菌株序列,用软件 Clustal X 2.1 进行比对,并用软件 MEGA 6.06^[17] 进行系统发育分析,以自展法(bootstrap)循环 1 000 次进行检测,构建系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 黄精内生菌的分离与纯化

利用组织块表面消毒法对黄精根茎内生菌进行分离并多次纯化,共得到内生细菌 5 株、内生真菌 6

株;其中 1 株内生菌 HJ-1 对受试菌抑菌效果明显,该菌株在 MMB 平板上形成的菌落干燥,类似荷包蛋状,菌落中间微黄、四周微白,且菌落边缘不圆润;利用扫描电镜进一步观察,该菌呈直杆状、圆端,菌体大小为 0.5~1.2 μm × 1.7~3.5 μm(图 1)。革兰氏染色显示该菌为阳性,且部分有芽孢。

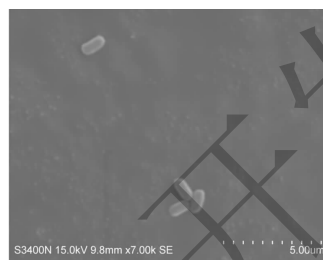


图 1 电镜下菌株 HJ-1 菌体形态(放大倍数为 7 000 倍)

Fig. 1 Morphology of HJ-1 bacteria under a scanning electron microscope(magnification factor:7 000)

2.2 内生菌的发酵产物的提取

分别用 1000 mL 的 ME、PD、高氏一号、查氏和 MMB 对内生菌 HJ-1 进行发酵,发酵 7 d 后发现 ME 和 MMB 发酵液呈现浅粉红色,PD 培养液呈现浅黄色,表明发酵液已积累代谢产物。用乙酸乙酯分别对不同培养基中的发酵产物进行萃取,结果如表 1 所示。由表 1 结果可知,PD 培养基发酵产物最多为 0.2516 g;ME 和 MMB 培养基发酵产物次之,分别为 0.2393 g 和 0.2240 g;高氏一号和改良的查氏培养基发酵产物较少,分别为 0.1536 g 和 0.1546 g。从发酵产物产量分析可以发现,发酵培养基的种类对内生菌 HJ-1 发酵产物的产量有较大影响。

2.3 发酵产物的抑菌活性

2.3.1 发酵产物对 7 种受试菌体的抑菌活性

将上述提取的发酵产物分别稀释至 3.00 mg/mL,检测其对 7 种受试菌体的抑菌活性,结果如图 2 所示。从图 2 的检测结果可知,该内生菌在 ME、MMB 和 PD 培养基中产生的发酵产物对绿脓杆菌(图 2A)、鼠伤寒沙门氏菌(图 2B)和苏云金芽孢杆菌(图 2C)的抑菌效果非常明显;而高氏一号和查氏培养基中产生的发酵产物对上述 7 种受试菌体没有明显的抑菌活性。因此,选取 ME、MMB 和 PD 培养基产生的发酵产物进一步探究其抑菌浓度。

2.3.2 发酵产物抑菌浓度的测定

将 ME、MMB 和 PD 培养基产生的发酵产物分别稀释至 3.00、0.30 和 0.03 mg/mL 检测其对绿脓杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和苏云金芽孢杆菌的抑菌活

表 1 黄精内生菌 HJ-1 发酵产品的质量

Table 1 Quality of the fermented metabolites of strain HJ-1 from *P. cyrtonema*

培养基种类 Media	玻璃瓶的质量 Quality of the glass bottles (g)	玻璃瓶和发酵产 物的总质量 Quality of the glass bottles and metabolites(g)	发酵产品的质量 Quality of the metabolites (g)
高氏一号 Gauze's Medium No. 1	13.1357	13.2893	0.1536
麦芽 Malt Extract Medium	10.3130	10.5523	0.2393
改良的马丁 Modified Martin Broth	15.5651	15.7891	0.2240
改良的查氏 Modified Czapek - Dox Medium	10.1691	10.3237	0.1546
土豆 Potato Dextrose	10.2952	10.5468	0.2516

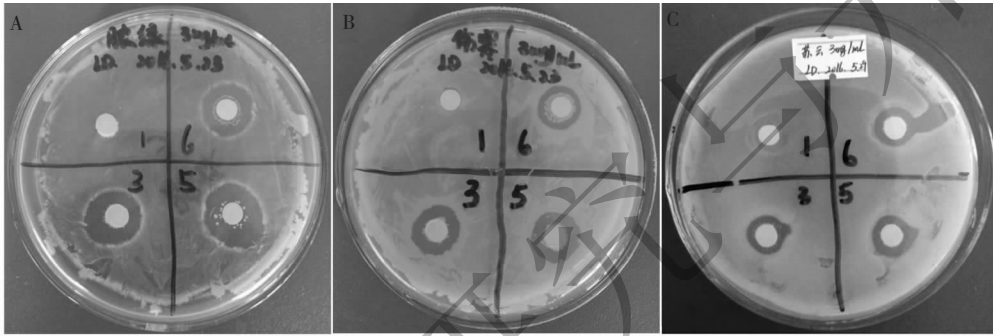


图 2 不同培养基发酵产物对受试菌的抑菌活性

Fig. 2 Antibacterial activity of the fermented metabolites from different media against the tested bacteria

注: A. 绿脓杆菌, B. 鼠伤寒沙门氏菌, C. 苏云金芽孢杆菌; 1. DMSO 对照组, 3. 麦芽 (ME), 5. 改良的马丁 (MMB), 6. 马铃薯葡萄糖 (PD) 培养基

Note: A. *P. aeruginosa*, B. *S. typhi* and C. *B. thuringiensis*. 1. Negative control (DMSO), 3. ME mediums, 5. MMB mediums, 6. PD mediums

性, 结果如图 3 所示。从图 3A 结果可知, 从 MMB、ME 和 PD 培养基提取的发酵产物浓度为 3.00 mg/mL 时对绿脓杆菌的抑菌效果非常明显, 抑菌圈直径可达 15 ~ 18 mm; 当发酵产物浓度降至 0.30 mg/mL 时抑菌圈直径仍可达 12 mm 左右, 其中 ME 培养基发酵产物抑菌活性较好; 当发酵产物浓度降至 0.03 mg/mL 时抑菌效果则不明显。

图 3B 结果显示以上三种培养基发酵产物对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌活性与绿脓杆菌类似, 当发酵产物浓度为 3.00 mg/mL 时对鼠伤寒沙门氏菌的抑菌圈直径可达 16 mm 左右, 其中 ME 培养基发酵产物抑菌效果最佳; 当发酵产物浓度降至 0.30 mg/mL 时抑菌圈直径可达 10 mm 左右, 其中仍是 ME 培养基发酵产物抑菌活性最好; 而当发酵产物浓度降至 0.03 mg/mL 时抑菌效果非常微弱。

图 3C 结果显示以上发酵产物对苏云金芽孢杆菌的抑菌活性与绿脓杆菌、鼠伤寒沙门氏菌略有不同, 当发酵产物浓度为 3.00 mg/mL 时对苏云金芽

孢杆菌的抑菌圈直径只有 14 mm 左右, 其中 MMB 培养基发酵产物抑菌效果最佳; 当发酵产物浓度降至 0.30 mg/mL 时抑菌圈直径仅达 9 mm 左右, 抑菌效果减弱明显; 而当发酵产物浓度降至 0.03 mg/mL 时抑菌效果很弱。参照文献^[16]方法进一步测得上述发酵产物的最低抑菌浓度介于 0.06 ~ 0.10 mg/mL 之间。

2.4 内生菌 HJ-1 的菌种鉴定及系统进化分析

将 16S rRNA 测序获得的序列在 NCBI 数据库上做 BLAST 序列比对分析发现, 菌株 HJ-1 与菌株 *Bacillus tequilensis* strain10b (序列号 NR_104919.1) 及菌株 *Bacillus subtilis* strain JCM 1465 (序列号 NR_113265.1) 序列的相似度均高达 99.93%。利用软件 MEGA6.06 中的 Kimura 2-Parameter 模型计算进化距离, 用邻接法 Neighbor-Joining 构建系统进化树, 随机抽样 1 000 次, 自展法 (bootstrap) 计算自引导值评估系统进化树的置信度, 得到其系统发育树 (图 4), 进化分析显示菌株 HJ-1 与 *Bacillus subtilis*

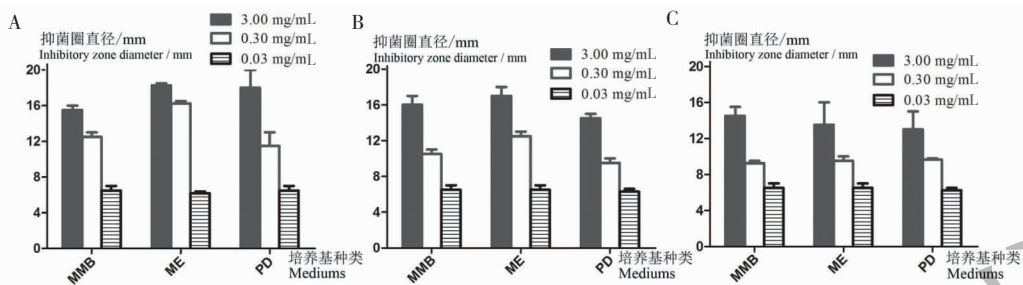


图3 不同培养基发酵产物对三种受试菌的抑菌浓度

Fig. 3 The Bacteriostatic concentration of the fermented metabolites from different mediums against the tested bacteria

注:A. 绿脓杆菌, B. 鼠伤寒沙门氏菌, C. 苏云金芽孢杆菌

Note: A. *P. aeruginosa*, B. *S. typhi*, C. *B. thuringiensis*

strain JCM 1465 在系统发育树上处于同一个分支。将该菌株鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)。综合菌落、菌体形态和 16S rRNA 序列分析等结果,

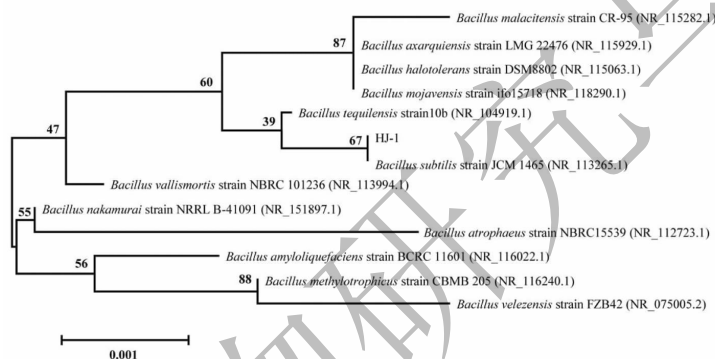


图4 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 HJ-1 与芽孢杆菌属相关菌株的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of HJ-1 and representatives. The sequences accession number in GenBank marked in the bracket. The number of each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.001 sequence divergence.

3 结论

本文首次报道从安徽特有黄精品种的根茎筛选出 11 株内生菌,与李艳玲等^[11]的研究类似。通过不同培养基发酵提取发酵产物和纸片扩散法抑菌实验筛选到 1 株对绿脓杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和苏云金芽孢杆菌均具有显著抑菌效果的内生菌 HJ-1,通过分子鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.),这是首次发现中药黄精中存在着可产生较好抑菌效果的内生细菌,表明黄精中存在着具有药用价值的内生菌。而根据 16S rRNA 测序结果在 NCBI 数据库中的比对,菌株 HJ-1 与 Joshua WG *et al.*^[18]发现的芽孢杆菌新种 *Bacillus tequilensis* strain10b 具有很高的同源性,这暗示菌株 HJ-1 值得进一步的研究。

本文同时发现内生菌 HJ-1 在 MMB、ME 和 PD

培养基中发酵的产物浓度降至 0.30 mg/mL 时对绿脓杆菌、鼠伤寒沙门氏菌和苏云金芽孢杆菌仍保持较高的抑菌活性(图 3),说明发酵产物可能对一些革兰氏阴性和阳性菌均具有抑菌效果;值得注意的是,该发酵产物是混合物,且最低抑菌浓度可达 0.06 ~ 0.10 mg/mL,表明发酵产物中存在一些具有药物开发潜力的化合物,该化合物的组成及结构值得进一步探究。本课题组正尝试不同方法对该发酵产物进行分离和结构测定,以便为筛选及研发新型抗生素提供一些理论依据。

参考文献

- 1 Lin L(林琳), Lin SQ(林寿全). Cluster analysis of polygonatum medicinal plants[J]. *Chin Med Mat(中药材)*, 1994, 17:12-18 + 54.

- 2 Wang K(王坤), Yue YD(岳永德), Shang F(汤锋), *et al.* Sequential extraction and structural analysis of polysaccharides from *Polygonatum cyrtoneuma* HUA [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26:364-369.
- 3 Dong ZC(董治程), Xie ZM(谢昭明), Huang D(黄丹), *et al.* Research progress on resource, chemical constituents and pharmacological effects of polygonati rhizoma [J]. *Central South Pharmacy*(中南药理学), 2012, 10:450-453.
- 4 Li Y(李莺), Zhao B(赵兵), Chen KK(陈克克), *et al.* Progress of research on *Polygonatum sibiricum* [J]. *Chin Wild Plant Res*(中国野生植物资源), 2012, 31:9-13.
- 5 Pang YX(庞玉新), Zhao Z(赵致), Yuan Y(袁媛), *et al.* The advances of chemical compositions and pharmacology effect on *Polygonatum* [J]. *J Moun Agric & Biol*(山地农业生物学报), 2003, 22:547-550.
- 6 Zhu HY(朱红艳), Xu JJ(许金俊). Research progress on anti-aging of *Polygonatum cyrtoneuma* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1999, 30:795-797.
- 7 Zhang H(张红), Li J(李娟). Curative effect observation of Single Chinese medicine *Polygonatum cyrtoneuma* on diabetes II [J]. *Xinjiang J Tradit Chin Med*(新疆中医药), 2007, 25:41-42.
- 8 He HM(何慧明), Liu Y(刘宇). The experiment research of polygonatic rhizome on hyperlipidemia and anti-atherosclerosis [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*(辽宁中医杂志), 2005, 32:168-169.
- 9 Zhang F(张峰), Gao Q(高群), Kong LL(孔令雷), *et al.* Anti-tumor effect of polysaccharides isolated from *Polygonatum cyrtoneuma* [J]. *Chin Pract Med*(中国实用医药), 2007, 2:95-96.
- 10 Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2004, 67:491-502.
- 11 Li YL(李艳玲), Wang DC(王德才), Shi RJ(史仁玖), *et al.* Isolation and identification of endophytic fungi from *Polygonatum sibiricum* in Mountain Tai and study on their antimicrobial activity [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2013, 44:1490-1494.
- 12 Wang Y(汪滢), Wang GP(王国平), Wang LW(王丽薇), *et al.* Isolation and identification of an endophytic fungus of *Polygonatum cyrtoneuma* and its antifungal metabolites [J]. *Acta Microbiol Sin*(微生物学报), 2010, 50:1036-1043.
- 13 Zhang YL(张应烙). Investigation on novel bioactive metabolites procuced by fungi residing in insect gut [D]. Nanjing: Nanjing University(南京大学), 2008.
- 14 Schulz B, Wanke U, Draeger S, *et al.* Endophytes from herbaceous plants and shrubs; effectiveness of surface sterilization methods [J]. *Mycol Res*, 1993, 97:1447-1450.
- 15 He FL(何福林), Chen XM(陈小明), Zhang R(张瑞), *et al.* Isolation and identification of two flavonoid-producing endophytic fungi from *Ginkgo biloba* Linn [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2017, 29:1141-1147.
- 16 Shuai li MS. Phytotoxic and antibacterial metabolites from *Fusarium proliferatum* ZS07 isolated from the gut of longhorned grasshoppers [J]. *J Agric Food Chem*, 2014, 62:8997-9001.
- 17 Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6. 0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30:2725-2729.
- 18 Joshua WG, Bruce FB, Chandrasekaran C, *et al.* *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis* [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2006, 56:1475-1484.
- (上接第 772 页)
- 20 Manic G, Obrist F, Sistigu A, *et al.* Trial Watch: Targeting ATM-CHK2 and ATR-CHK1 pathways for anticancer therapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 2(4):e10129761-17.
- 21 Shieh SY, Ahn J, Tamai K, *et al.* The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate P53 at multiple DNA damage-inducible sites [J]. *Genes Dev*, 2000, 14:289-300.
- 22 Zhao T, Tang X, Channakeshava sokke umeshappa, *et al.* Simulated microgravity promotes cell apoptosis through suppressing Uev1A/TICAM/TRAF/NF- κ B-regulated anti-apoptosis and P53/PCNA- and ATM/ATR-Chk1/2-controlled DNA-damage response pathways [J]. *J Cell Biochem*, 2016, 17:2138-2148.
- 23 Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of P53 [J]. *CSH Perspect Biol*, 2009, 1(5):a001883.
- 24 Jiang YJ(江越菁), Zang Y(臧奕). The roles of 53BP1 in DNA double-strand breaks repair [J]. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2016, 32:1279-1285.