

## 北桑寄生内生真菌的分离及其次级代谢产物分析

卢丹丹,郑鼎玉,陈 婕,杨官娥\*

山西医科大学药学院,太原 030001

**摘要:**首次对药用植物北桑寄生叶片中的内生真菌进行分离纯化,从中筛选出具有较高生物活性的菌株,鉴定此菌株并对其次级代谢产物进行初步分离。采用组织块法分离内生真菌,对其进行抗氧化活性和抑菌活性筛选;通过形态学和分子生物学方法鉴定其种属;运用柱色谱、重结晶等方法分离次级代谢产物,波谱学鉴定其结构。从北桑寄生叶片中分离纯化得到 29 株内生真菌,检测得到一株具有较高抗氧化和抑菌活性的菌株,鉴定为 *Alternaria alternata*,从该菌次级代谢产物中首次分离得到 3 个单体化合物,分别为 alternariol-5-*O*-methyl ether (**1**)、alternariol (**2**)、cis, cis-9, 12-octadecadienoic acid (**3**)。化合物 **1** 和 **2** 具有较弱的抗氧化活性,化合物 **1** 和 **3** 表现出一定的抑菌活性。

**关键词:**北桑寄生;内生真菌;抗氧化活性;抑菌活性;次级代谢产物

中图分类号:R284.1;Q939.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)3-0447-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.3.014

## Isolation of endophytic fungi from *Loranthus tanakae* and analysis of its secondary metabolites

LU Dan-dan, ZHENG Ding-yu, CHEN Jie, YANG Guan-e\*

School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

**Abstract:** In this study, endophytic fungi were isolated and purified for the first time from the leaves of a medicinal plant, *Loranthus tanakae*. A strain with high biological activity was screened and identified, and its secondary metabolites were preliminarily isolated. Tissue inoculation culture was used for isolation of the endophytic fungi, and then anti-oxidant and bacteriostatic activities of the isolate were tested. The selected isolate was identified based on morphological analysis combined with molecular biological method. The secondary metabolites of the identified strain were isolated with column chromatography and recrystallization, and determined by spectroscopy. Among 29 strains isolated from *L. tanakae*, the BS27 had high antioxidant and antibacterial activities, which was identified as *Alternaria alternata*. Three compounds were isolated from its secondary metabolites and identified as alternariol-5-*O*-methyl ether (**1**), alternariol (**2**) and cis, cis-9, 12-octadecadienoic acid (**3**), respectively. Compound **1** and **2** displayed weak antioxidant activity, while compound **1** and **3** exhibited antibacterial activity.

**Key words:** *Loranthus tanakae*; endophytic fungi; antioxidant activity; antibacterial activity; secondary metabolites

植物内生真菌(Endophytic fungi)是指其生活周期某一阶段寄生在植物组织中,但是对植物不会造成明显病害症状的一类真菌<sup>[1]</sup>。内生真菌与宿主植物互利共生,共同进化,其次级代谢产物可能会与宿主植物具有相似或者相同的生物活性,且不同宿主植物中分离出的内生真菌次级代谢产物会存在多样性<sup>[2]</sup>。研究发现内生真菌的代谢产物在抗肿瘤、

抗病原微生物、抗氧化等方面具有很好的活性,并且可从中寻找到具有新颖结构或者新的生物活性的化合物<sup>[3,4]</sup>。目前已经发现植物内生真菌的次级代谢产物中含有生物碱、多肽、甾体、萜类等抗菌物质,以及黄酮类、酚酸类、香豆素类等抗氧化物质<sup>[5,6]</sup>。由此可见,植物内生真菌是潜力巨大的微生物新资源。

北桑寄生(*Loranthus tanakae* Franch. et Sav.)为桑寄生科桑寄生属药用植物,主要寄生于柞属、榆属、李属、桦属等植物上<sup>[7]</sup>。具有强健筋骨、祛风除湿、降血压等功效,其提取物具有抗肿瘤、抑菌、抗平滑肌细胞增殖等活性<sup>[8,9]</sup>。北桑寄生资源匮乏,对生境要求较高,是具有一定经济价值和空气污染指

收稿日期:2019-10-29 接受日期:2020-04-01

基金项目:国家自然科学基金(30672621,81173473);山西省自然科学基金(2010011048-2);山西省国际合作项目(201803D421065);太原市科技项目人才专项明星专题(120247-08)

\*通信作者 Tel:86-351-3985190;E-mail:yangguane@aliyun.com

示的药用植物<sup>[10]</sup>。目前没有关于北桑寄生内生真菌的相关报道。本文首次对北桑寄生叶片中的内生真菌进行分离纯化,筛选抗氧化和抑菌活性较强的菌株,结合形态学和分子生物学对活性菌株进行鉴定,并对活性菌株的次级代谢产物进行分离和结构鉴定。为开发和利用北桑寄生内生真菌资源提供了参考依据。

## 1 材料

### 1.1 北桑寄生

北桑寄生植株于2018年9月采自陕西省凤县,经山西医科大学药学院白云娥副教授鉴定为北桑寄生 *Loranthus tanakae* Franch. et Sav, 标本编号 BS201809。

### 1.2 供试菌株

大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) ATCC33694、变形杆菌 (*Proteus species*) ATCC13315、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC25923、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) ATCC23857 由山西医科大学微生物教研室赠送。

### 1.3 培养基

PDA 培养基:新鲜去皮马铃薯 200 g 煮沸过滤,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水至 1 000 mL, pH 自然。PDB 培养基:新鲜去皮马铃薯 200 g 煮沸过滤,葡萄糖 20 g,蒸馏水至 1 000 mL, pH 自然。NA 培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 1 g,氯化钠 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.6。NB 培养基:牛肉膏 5 g,蛋白胨 1 g,氯化钠 5 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2~7.6。

## 2 方法

### 2.1 内生真菌的分离纯化

将采集的新鲜北桑寄生叶片自来水冲洗干净。在无菌操作条件下,用 75% 的乙醇漂洗 1 min, 无菌水漂洗 3 次,再用 5% 的次氯酸钠溶液漂洗 5 min, 无菌水漂洗 3 次,最后用 75% 乙醇漂洗 30 s, 无菌水漂洗 5 次,用无菌滤纸吸去表面水分。将叶片切割成 1 cm × 1 cm 左右的小块,平贴在 PDA 培养基上。置于 28 °C 生化培养箱中黑暗培养 3~7 天,待组织边缘长出菌丝,采用菌丝尖端挑取法将菌丝接种到新的 PDA 培养基中,分离纯化直到得到单一菌落为止,接种到 PDA 斜面培养基上保存备用。

北桑寄生内生真菌分离过程中设置对照实验,以检验表面消毒是否彻底,确保分离得到的是内生真菌。一是漂洗液检测:取最后一次漂洗后的无菌

水 0.2 mL 涂布在 PDA 培养基上,观察培养结果。二是组织印迹法:消毒后的叶片用无菌滤纸吸干表面水分,不经过切割直接放于培养基表面,使之与培养基表面接触 3~5 min,然后取出。观察培养结果。

### 2.2 内生真菌发酵液提取物的制备

北桑寄生内生真菌活化培养后,接种至 PDB 液体培养基中,28 °C, 150 rpm 培养 7 天。将发酵液减压浓缩,用两倍体积的乙酸乙酯萃取三次,合并萃取液,减压浓缩后得浸膏。

### 2.3 北桑寄生内生真菌抗氧化活性菌株的筛选

将内生真菌发酵液提取物用无水乙醇溶解,配制成 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2 mg/mL 的样品溶液。抗坏血酸作为阳性对照,用无水乙醇配制成和样品浓度相同的溶液。

#### 2.3.1 DPPH 自由基清除测定

取不同浓度样品溶液各 2 mL,加入 0.025 mg/mL DPPH 乙醇溶液 2 mL,混匀,避光静置 30 min,取 0.2 mL 于 96 孔板中,在 517 nm 处测得吸光度,记为  $A_1$ ,样品 2 mL + 无水乙醇 2 mL 吸光度为空白,记为  $A_2$ ,以无水乙醇 2 mL + DPPH 2 mL 吸光度为对照,记为  $A_0$ 。重复三次。

$$\text{清除率} = [1 - (A_1 - A_2) / A_0] \times 100\%$$

#### 2.3.2 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除测定

将 7 mmol/L 的 ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 的过硫酸钾溶液混合,避光室温反应 12~14 小时,形成 ABTS<sup>+</sup> 母液。将 ABTS<sup>+</sup> 母液用无水乙醇稀释,使其在 734 nm 处测得吸光度值为  $0.70 \pm 0.002$ 。取不同浓度的样品溶液 0.2 mL,分别加入稀释后的 ABTS<sup>+</sup> 液体 0.8 mL,混匀,避光反应 10 min,取 0.2 mL 于 96 孔板中,在 734 nm 处测得吸光度,记为  $A_1$ ,以无水乙醇 0.2 mL + ABTS<sup>+</sup> 液体 0.8 mL 吸光度为对照,记为  $A_0$ 。重复三次。

$$\text{清除率} = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100\%$$

### 2.4 北桑寄生内生真菌抑菌活性菌株的筛选

采用滤纸片琼脂扩散法对活性菌株进一步筛选。将内生真菌发酵液提取物用适量的 DMSO 配制成浓度为 50 mg/mL 的溶液。培养皿中加入 200  $\mu$ L 供试细菌菌液 ( $10^6 \sim 10^8$  CFU/mL) 和灭菌后的营养琼脂培养基,制成含菌平板。取 20  $\mu$ L 的样品溶液滴于无菌滤纸片上(直径 6 mm),平贴在含菌平板上,37 °C 培养 24 小时测量抑菌圈大小,重复三次。DMSO 溶液为阴性对照,青霉素钾 (500  $\mu$ g/mL) 和硫酸链霉素 (500  $\mu$ g/mL) 分别作为革兰阴性

菌和革兰阳性菌的阳性对照。

采用 96 孔板法进行最小抑菌浓度 (MIC) 以及最小杀菌浓度 (MBC) 的测定。取无菌 96 孔板, 1~7 孔中分别加入 100  $\mu\text{L}$  的 NB 培养基, 取样品溶液 (50 mg/mL) 100  $\mu\text{L}$  加到 1 号孔中, 混匀 (浓度为 25 mg/mL), 从中取出 100  $\mu\text{L}$  加到 2 号孔中, 混匀, 依次稀释到 7 号孔, 7 号孔中取出 100  $\mu\text{L}$  弃去。1~7 号孔中样品浓度依次为 25、12.5、6.25、3.125、1.563、0.781 5、0.390 75 mg/mL, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 小时。同一块 96 孔板上不加样品只加菌液的小孔作为阳性对照, 以不加菌液只加培养基的小孔作为阴性对照。观察孔中培养液澄清的最低浓度为 MIC, 取观察后澄清的孔液 50  $\mu\text{L}$  液体涂布到 NA 培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 24 小时, 重复三次, NA 培养基上完全没有细菌生长的最低浓度为 MBC。

## 2.5 内生真菌 BS27 的鉴定

### 2.5.1 形态学鉴定

将具有较高生物活性的菌株 BS27 接种在新鲜的 PDA 培养基上, 28  $^{\circ}\text{C}$  暗培养 7 天, 观察菌落的生长速度、菌落颜色、质地等变化。挑取菌丝, 用乳酸棉兰染色液染色, 在显微镜下观察记录。

### 2.5.2 分子生物学鉴定

采用真菌柱式 DNA 提取试剂盒提取真菌 DNA, 真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  复性 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min, 34 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物送至上海生工进行测序, 测序结果在 NCBI 的 Gen Bank 数据库中进行 BLAST 比对分析。利用 MEGA 5.0 软件和邻接法 (neighbor-joining methods) 进行聚类分析鉴定种属。

## 2.6 内生真菌 BS27 的次级代谢产物研究

内生真菌 BS27 发酵培养后, 菌丝于 40  $^{\circ}\text{C}$  烘箱干燥, 以 75% 乙醇 (W/V: 1: 20) 超声萃取两次, 萃取液经 50  $^{\circ}\text{C}$  减压浓缩后, 得菌丝体浸膏 (8.5 g)。发酵液经 40  $^{\circ}\text{C}$  减压浓缩至原体积的 1/10, 以两倍体积的乙酸乙酯萃取三次, 合并萃取液减压浓缩, 得发酵液浸膏 (3.2 g)。

菌丝体浸膏经硅胶柱以石油醚-乙酸乙酯 (15: 1  $\rightarrow$  1: 1) 梯度洗脱得到 5 个组分 (A ~ E), 组分 D 经重结晶得到化合物 1 (4.3 mg), 组分 E 经硅胶柱以石油醚-乙酸乙酯 (2: 1) 洗脱得到化合物 2 (25.6

mg)。发酵液浸膏经硅胶柱以石油醚-乙酸乙酯 (7: 1  $\rightarrow$  1: 1) 梯度洗脱得到 4 个组分 (F ~ I), 其中组分 G 为化合物 3 (47 mg)。

对单体化合物进行抗氧化活性和抑菌活性分析, 抗氧化实验具体操作同本文 2.3 部分。抑菌实验其中 1 号孔样品终浓度为 0.1 mg/mL, 其余具体操作同本文“2.4”部分的 96 孔板法。

## 3 结果与分析

### 3.1 北桑寄生内生真菌分离

经过组织块法和菌丝尖端挑取法分离得到北桑寄生内生真菌共计 29 株, 依次编号为 BS01 ~ BS29, 表明北桑寄生中存在丰富的内生真菌资源。在对照实验中, 漂洗液检测法和组织印记法的培养平板上均未出现菌落生长现象, 表明实验过程中表面消毒彻底, 分离得到的是北桑寄生的内生真菌。

### 3.2 北桑寄生内生真菌抗氧化活性菌株的筛选

通过 DPPH 自由基清除实验和 ABTS 自由基清除实验测定了 29 株内生真菌发酵产物的抗氧化能力, 研究结果表明, 有 3 株内生真菌 BS06、BS07 和 BS27 对 DPPH 自由基有较好的清除能力 (图 1), 对 ABTS 自由基清除能力较弱 (图 2), 且随着发酵产物

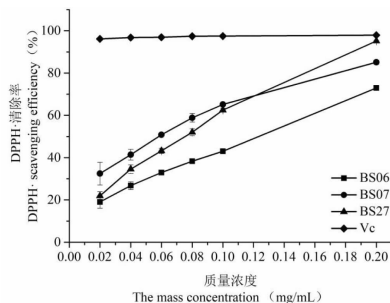


图 1 内生真菌发酵产物对 DPPH 自由基的清除活性  
Fig. 1 DPPH radical scavenging efficiency of fermentation products of endophytic fungi

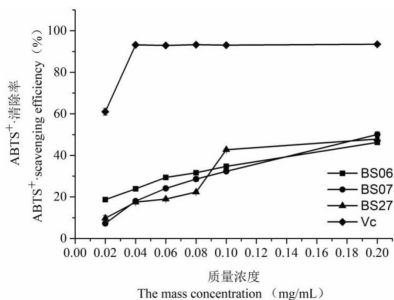


图 2 内生真菌发酵产物对 ABTS 自由基的清除活性  
Fig. 2 ABTS radical scavenging efficiency of fermentation products of endophytic fungi

浓度的增加清除能力也增强。其中内生真菌 BS27 的发酵产物对 DPPH 自由基的清除能力较好,浓度为 0.2 mg/mL 时,清除率达到 95.17%,接近于同等浓度下 Vc 对 DPPH 自由基的清除能力。

### 3.3 北桑寄生内生真菌抑菌活性菌株的筛选

对具有较好抗氧化活性的 3 株内生真菌测定其抑菌能力,结果表明 3 株内生真菌 BS06、BS07 和 BS27 对 4 种供试细菌中的革兰阳性细菌均有一定的抑菌能力,对革兰阴性细菌无明显的抑菌能力。其中内生真菌 BS27 的抑菌能力最强,对金黄色葡萄球菌的抑菌圈达到 15.60 mm,对枯草芽孢杆菌的抑菌圈达到 14.35 mm。金黄色葡萄球菌阳性对照的抑菌圈为 20.10 mm,枯草芽孢杆菌的阳性对照抑菌圈为 18.40 mm。采用 96 孔板法进一步对内生真

菌 BS27 进行 MIC 和 MBC 的测定,其对金黄色葡萄球菌的 MIC 值为 12.5 mg/mL, MBC 值为 25 mg/mL;对枯草芽孢杆菌的 MIC 值为 6.25 mg/mL, MBC 值为 12.5 mg/mL。

### 3.4 内生真菌 BS27 的鉴定

内生真菌 BS27 接种在 PDA 培养基上,生长速度快,无可溶性色素产生。3 天后菌落直径可达 2.5 cm,表面呈白色丝状绒毛,较蓬松;5 天后菌落铺满整个平板,表面中间呈现为灰黑色,外周呈现为白色,背面中间黑褐色,外周白色,菌落呈明显同心圆形。(图 3A 和 B)。乳酸棉兰染色液对其菌丝染色后观察,菌丝呈管状,有分枝,有横隔膜,部分菌丝膨大,在菌丝的侧边有囊状突起,无孢子产生。(图 3C)初步确定为链格孢属内生真菌。

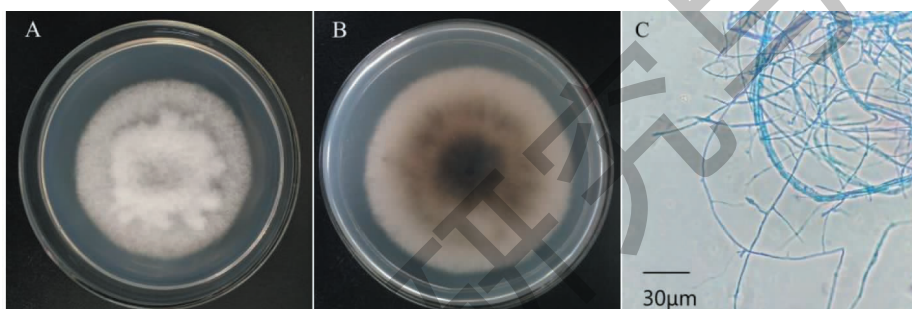


图 3 内生真菌 BS27 的形态特征及显微形态图

Fig. 3 Morphological characteristics and micromorphology of strain BS27

注:A:BS27 菌株正面特征;B:BS27 菌株反面特征;C:BS27 菌株显微形态图。Notes:A:Positive characteristics of strain BS27;B:Reverse characteristics of strain BS27;C:Micro morphology of BS27 strain.

以引物 ITS1 和 ITS4 对内生真菌 BS27 的 ITS 序列进行 PCR 扩增,BS27 的 ITS 序列的长度为 544 bp,序列如下:

TGGGCATCATATGAGGCGGGCTGGACCTCTCG  
GGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGCTTT  
TTGCGTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGTTTCGCCAC  
CACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAAT  
CAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCA  
ACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA  
CGCAGCGAAATGCCATAAGTAGTGTGAATTGCAG  
AATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATT  
GCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCG  
AGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTTC  
GGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTT  
AAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGC  
GCAGACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCT  
AGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTC

GGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCAT  
ATCAATAAACGGAGGAAAA

将此序列与 NCBI 的 Gen Bank 数据库中的已知序列进行比对,选取相似度较高的序列,利用 MEGA 5.0 软件和邻接法(neighbor-joining methods)构建系统发育树(图 4)。结合 BS27 的形态学特征和系统发育树分析,鉴定 BS27 为 *Alternaria alternata* 内生真菌。

### 3.5 单体化合物结构鉴定

通过硅胶柱色谱、重结晶等方法从北桑寄生内生真菌 BS27 的发酵产物中得到 3 个化合物。经过<sup>1</sup>H NMR 和<sup>13</sup>C NMR 波谱技术,参考相关文献,对其结构进行鉴定,其结构如图 5 所示。

**化合物 1** 白色粉末;ESI-MS: $m/z$  271.2 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR(400 MHz, pyridine-*d*<sub>5</sub>) δ: 12.54(1H, s, 3-OH), 7.31(1H, d, *J* = 2.2 Hz, H-6), 7.02(2H, q, *J* = 2.5 Hz, H-10, H-12), 6.79(1H, d, *J* = 2.2 Hz,

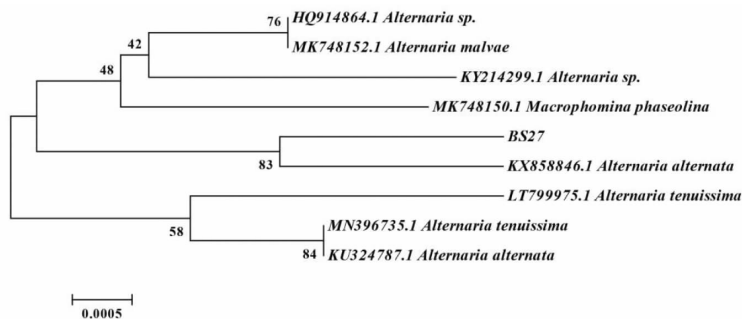


图4 内生真菌 BS27 的 ITS 序列系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the ITS sequences of endophytic fungus strain BS27

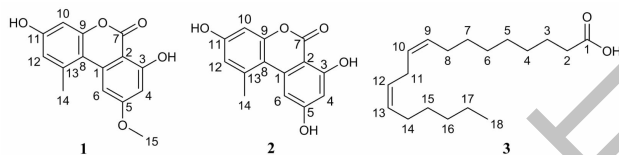


图5 化合物 1~3 的结构式

Fig. 5 Structures of compounds 1-3

H-4), 3.82 (3H, s, H-15), 2.71 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 166.6 (C-5), 165.7 (C-7), 165.3 (C-3), 160.0 (C-11), 153.6 (C-9), 138.7 (C-13), 138.6 (C-1), 118.4 (C-12), 109.6 (C-8), 103.9 (C-6), 102.4 (C-10), 99.5 (C-2), 99.2 (C-4), 55.5 (C-15), 25.2 (C-14)。以上数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致,故确定化合物 **1** 为 alternariol-5-O-methyl ether。

**化合物 2** 淡黄色粉末;ESI-MS: $m/z$  257.2 [M-H] $^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 12.57 (1H, s, 3-OH), 7.45 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-6), 7.00 (1H, d,  $J=2.6$  Hz, H-12), 6.96 (1H, d,  $J=2.4$  Hz, H-10), 6.90 (1H, d,  $J=2.0$  Hz, H-4), 2.55 (3H, s, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz, pyridine- $d_5$ )  $\delta$ : 167.6 (C-7), 166.6 (C-5), 166.3 (C-3), 160.6 (C-11), 154.5 (C-9), 139.9 (C-13), 139.4 (C-1), 126.3 (C-8), 119.1 (C-12), 110.7 (C-6), 105.9 (C-10), 103.2 (C-2), 102.6 (C-4), 26.0 (C-14)。以上数据与文献<sup>[12]</sup>报道基本一致,故确定化合物 **2** 为 alternariol。

**化合物 3** 淡黄色油状;ESI-MS: $m/z$  279.1 [M-H] $^-$ ;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5.34 (4H, m, H-9, H-10, H-12, H-13), 2.77 (2H, t,  $J=6.4$  Hz, H-11), 2.34 (1H, t,  $J=7.5$  Hz, H-2), 2.03 (4H, m,  $J=6.7$  Hz, H-8, H-14);  $^{13}\text{C}$  NMR (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 180.3 (C-1), 130.2 (C-12), 130.0 (C-10), 128.1 (C-

13), 127.9 (C-9), 34.1 (C-2), 31.9 (C-16), 29.7 (C-7), 29.4 (C-15, C-6), 29.2 (C-4), 29.1 (C-5), 27.2 (C-8, C-14), 25.7 (C-11), 24.7 (C-3), 22.7 (C-17), 14.1 (C-18)。以上数据与文献<sup>[13]</sup>报道基本一致,故确定化合物 **3** 为 cis,cis-9,12-octadecadienoic acid。

### 3.6 单体化合物活性检测

对单体化合物进行抗氧化活性和抑菌活性检测。3个单体化合物的抗氧化活性较弱,其中化合物 **1** 和 **2** 对 ABTS 自由基有较弱的清除能力,在 0.2 mg/mL 的浓度下,化合物 **1** 对 ABTS 自由基清除率为 16.15%,化合物 **2** 对 ABTS 自由基清除率为 21.49%。抑菌活性检测结果表明化合物 **1** 和 **3** 具有一定抑菌活性,阳性对照组细菌正常生长,阴性对照组无细菌生长,结果见表 1。

## 4 结论

利用组织块法从药用植物北桑寄生的叶片中首次分离纯化得到 29 株内生真菌,表明北桑寄生中内生真菌资源丰富,从中筛选得到一株具有较好抗氧化活性和抑菌活性的内生真菌,经过形态学和分子生物学鉴定为 *Alternaria alternata*,对其次级代谢产物进行研究,分离得到 3 个单体化合物。相关文献报道,化合物 **3** 有较好的清除 DPPH 自由基和 ABTA $^+$  自由基的能力<sup>[14]</sup>,化合物 **1** 和 **3** 对大肠埃希菌等多种耐药菌具有抑菌活性<sup>[15]</sup>,化合物 **1** 和 **2** 有一定的细胞毒性,对敏感细胞有致畸、致癌、致突变作

表1 化合物1~3 抑菌活性结果( $n=3, \mu\text{g/mL}$ )  
Table 1 Antibacterial activity of compounds 1-3 ( $n=3, \mu\text{g/mL}$ )

化合物 Compound	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>		变形杆菌 <i>P. species</i>		金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>		枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
1	250	500	250	500	250	500	250	500
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	500	1 000	-	-	250	500	250	500

注:“-”表示化合物无抑菌活性

Note:“-” indicated that the compound has no bacteriostatic action

用<sup>[16]</sup>。目前链格孢属内生真菌的次级代谢产物已经成为药物或其先导化合物的重要资源<sup>[17]</sup>。本研究并未分离得到与北桑寄生化学成分结构相似或结构新颖的化合物,可能是由于培养基成分单一,导致菌株的沉默基因未被激活,后期将考虑在内生真菌培养过程加入小分子物质激活沉默基因簇,对代谢产物进一步进行分离纯化和单体化合物活性筛选,从而得到结构新颖、复杂的活性化合物。

#### 参考文献

- Andnale NB,Shahnawaz M,Ade AB,Andhale,Mohd, et al. Fungal endophytes of *Plumbago zeylanica* L. enhances plumbagin content[J]. Bot Stud,2019,60:1-9.
- Liang YM,Yu Y,Sun YP, et al. Secondary metabolites of endophytic fungus *Stagonosporopsis oculihominis* from *Dendrobium huoshanense*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:783-788.
- Yang ZJ,Deng Y,Man Q, et al. Progress in search for endophytes associated with natural medicine [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志),2018,34:593-596.
- Xu Yanchao,Wang Cong,Liu Haishan, et al. Meroterpenoids and isocoumarinoids from a myrothecium fungus associated with *Apocynum venetum*[J]. Mar Drugs,2018,16:363.
- Huang JY,Zhang CJ,Yao YL, et al. Progress in antimicrobial substances of endophytes[J]. Chin J Biotechnol(生物工程学报),2017,33:178-186.
- Chen JY,Lu RH,Wang L, et al. Recent progress in study on anti-oxidant activity of endophytes in medicinal plants[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2016,47:3720-3727.
- Yan HY,Hu JL,Bi L, et al. Effects of *Loranthus tanakae* extracts on growth of *Rhodopseudanonas palustris* [J]. Chin J Microecol(中国微生态学杂志),2016,28:1002-1004.
- Deng HH,Gen ZY,Yan HY, et al. Biotransformation research of *Loranthus tanakae* extract by *Rhodopseudanonas palustris* [J]. Chin J Clin Res(中国临床研究),2014,27:1033-

- 1037.
- 9 Kim Young-Kyoon,Kim Young Sup,Choi Sang Un, et al. Isolation of flavonol rhamnosides from *Loranthus tanakae* and cytotoxic effect of them on human tumor cell lines[J]. Arch Pharm Res,2004,27:44-47.
- 10 Zhang L,Wang XA,Liu P, et al. Life table and survival analysis of *Loranthus tanakae* population in mount Ziuling[J]. Chin J Plant Ecol(植物生态学报),2014,38:687-693.
- 11 Jieyin Sun,Takayoshi Awakawa,Hiroshi Noguchi, et al. Induced production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium* L. [J]. Bioorg Med Chemlett,2012,22:6397-6400.
- 12 Xiao J,Zhang Q,Gao YQ, et al. Secondary metabolites from the endophytic *Botryosphaeria dothidea* of *Melia azedarach* and their antifungal, antibacterial, antioxidant, and cytotoxic activities[J]. J. Agr Food Chem,2014,62:3584-3590.
- 13 Hu YP,Zhang BQ,Zhang JX, et al. Chemical constituents of fruiting bodies of *Coprinus comatus* and their activities against diabetes [J]. Mycosystema(菌物学报),2018,37:371-378.
- 14 Zhen MR,Lv XL,Wang JX, et al. Main components and antioxidant activity of three kinds of seabuckthorn oil (*Hippophae rhamnoides* L.) [J]. Food Res Dev(食品研究与开发),2018,39:24-29.
- 15 Liu J,Zhang CL,Zhang QY, et al. Anti-resistant bacteria components from the metabolites of endophytic *Alternaria tenuissima* PC-005 [J]. Centr South Pharm(中南药学),2018,16:741-744.
- 16 Zhen ZH,Liu YY,Fan Y. Antioxidant activity and structure identification of metabolites of an endophytic fungus *Alternaria sp.* N. SBA10 isolated from *Scutellaria baicalensis*[J]. Mycosystema(菌物学报),2012,31:917-923.
- 17 Wang Ying,Liu Hong-Xin,Chen Yu-Chan, et al. Two new metabolites from the endophytic fungus *Alternaria sp.* A744 derived from *Morinda officinalis* [J]. Molecules,2017,22:765.