

红树林植物海莲内生真菌活性菌株筛选及次级代谢产物研究

冯 昭 张 旭 徐 静

海南大学材料与化工学院/海南大学热带生物资源教育部重点实验室,海口 570228

摘要 采用化学与生物学活性结合的二级组合筛选模型对红树林植物海莲内生真菌进行筛选,得到优势菌株 *Pestalotiopsis* sp.,从中分离得到 4 个甾体化合物,通过¹H NMR、¹³C NMR 及 MS 等现代波谱技术对其进行结构解析,并结合相关文献数据,鉴定化合物分别为:3β-(*E*)-feruloyllupeol、stigmastan-3-one、β-sitosterol 和 sitost-5-en-3β-ol acetate,其中化合物分别 3β-(*E*)-feruloyllupeol 为首次从红树林内生真菌中分离得到。对 4 个化合物进行清除 DPPH、ABTS 自由基以及抗菌活性测试,结果显示,所有化合物均无抗菌、抗氧化活性。

关键词 红树林;海莲;内生真菌;甾体化合物;生物活性

中图分类号 Q 946.92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)06-0086-06

红树林(mangrove)是热带和亚热带海岸常见的生态系统^[1]。红树林内生真菌作为海洋真菌第二大类群^[2],由于其生长环境的特殊性,必定会代谢出陆生源内生真菌无法比拟的新颖产物,其结构类型已远远超出它们的宿主植物,且具有良好的生物活性^[3-4]。红树林内生真菌代谢产物应用涉及诸多方面,如病虫害防治、抗氧化、抗菌抗炎、抗肿瘤等^[5-6],因此,被认为是人类的天然资源宝库,为新药筛选提供丰富的模式结构,为先导化合物的开发带来新的方向^[7-8]。

海莲(*Bruguiera sexangula*)是典型的红树林药用植物,民间有将它药用的实例,叶经常用来治疗痢疾等病症,其根、茎、叶、花等部位的乙酸乙酯提取物具有较强抗氧化活性,对 DPPH、ABTS 自由基均显示出良好的清除能力^[9-10]。近 10 年来,研究者从红树林内生真菌中分离出一系列毒性较小且具有抗菌、抗肿瘤和抗氧化等显著生物活性的代谢产物,使得红树林内生真菌代谢产物的研究成为国际热点^[11],但是有关海莲内生真菌次级代谢产物的抗菌、抗氧化作用鲜有报道。

本研究采用化学与生物学活性综合筛选的方式,从海莲内生真菌中筛选出能分泌结构类型丰富

且具有生物活性化合物的菌株,从其发酵粗提取物中分离得到次级代谢产物,并进行抗菌、抗氧化活性分析,旨在为海莲内生真菌的研究提供理论支持,为药物先导化合物的开发提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

供试菌株为从海莲中分离的 11 株内生真菌:*Pestalotiopsis* sp.(HL-1)、*Phyllosticta capitalensis*(HL-2)、*Fusarium verticillioides*(HL-3)、*Fusarium equiseti*(HL-4)、*Gelasinospora endodonta*(HL-5)、*Diaporthe tulliensis*(HL-6)、*Diaporthe eucalyptorum*(HL-7)、*Diaporthe phaseolorum*(HL-8)、*Alternaria brassicicola*(HL-9)、*Fusarium oxysporum*(HL-10)、*Nigrospora sphaerica*(HL-11)。

1.2 仪器与试剂

BCM-1300 型超净工作台购自苏州苏洁净设备有限公司,MP-160 型恒温培养箱(上海福马实验设备有限公司),旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司),真空泵(郑州长城科工贸有限公司),暗箱三用紫外分析仪(上海越众仪器设备有限公司),酶标仪(美国

收稿日期: 2019-04-09

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(81660584); 海南省重点研发计划项目(ZDYF2017099); 海南大学科研团队培育专项(hdkytg201705); 海南省教育厅重点项目(Hnky2019ZD-6); 海南省研究生创新科研课题(Hys2018-56)

冯 昭,硕士研究生,研究方向:天然药物化学. E-mail: fz329077397@163.com

通信作者: 徐 静,博士,教授,研究方向:天然药物化学. E-mail: happyjing3@163.com

BioTek 公司), 超导核磁共振波谱仪(瑞士 Bruker 公司), Agilent-1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies), 高分辨质谱仪(瑞士 Bruker 公司)。

石油醚、环己烷、二氯甲烷、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇、75% 乙醇、次氯酸钠、环丙沙星、BHT、DMSO 均为分析纯。

1.3 样品制备

将分离得到的内生真菌在 PDA 培养基中进行发酵培养。乙酸乙酯浸泡提取后, 得到海莲内生真菌提取物, 用 DMSO 溶解, 配制成 10 mg/mL 的溶液。

1.4 TLC(thin-layer chromatography)筛选

将内生真菌提取物加入少量有机试剂进行溶解, 用点样毛细管点于硅胶板上, 于层析缸中进行展板, 在紫外分析仪中观察斑点位置后, 分别用硫酸香草醛显色剂、碘化铊钾显色剂、FeCl₃ 等显色剂进行显色反应。筛选出代谢产物类型最为丰富的 5 株内生真菌。

1.5 抗菌活性筛选

无菌条件下, 将 0.1 mL 5 × 10⁶ CFU/mL 的菌悬液稀释 1 000 倍。吸取 2 μL 待测样品溶液加入 96 孔板中, 再加入 198 μL 的指示菌菌悬液, 每组平行 3 次。培养过后, 观察指示菌菌悬液浑浊情况。

对具有抗菌活性的内生真菌进行 MIC(最小抑菌浓度)测定, 采用二倍稀释法对母液进行稀释, 以等体积的 DMSO 作为空白对照, 以等体积的环丙沙星作为阳性对照, 培养过后, 观察澄清的菌悬液行数。

1.6 抗氧化活性筛选

采用张旭等^[10]方法对海莲内生真菌粗提物进行抗氧化活性测定, 将 DPPH 粉末用无水乙醇进行溶解, 定容至 100 mL, 浓度为 120 μmol/L。采用 2 倍稀释法对样品母液进行稀释, 将 5 μL 稀释后的样品加入到 195 μL DPPH 溶液中, 等体积的 DMSO 溶液作为空白对照。避光静置 30 min, 于 517 nm

测吸光度, 计算清除率。

将 7 mmol/L ABTS 溶液与 2.45 mmol/L 过硫酸钾溶液等比例均匀混合, 避光条件下反应 16 h, 制备 ABTS⁺ ·, 使用前将 ABTS⁺ · 溶液进行稀释, 使其在 734 nm 处的吸光度为 0.70 左右。加样方法同清除 DPPH 自由基。避光静置 30 min, 于 734 nm 测吸光度, 计算清除率。以 BHT 为阳性对照。

1.7 发酵和提取

将目标菌株活化培养后, 接种到 PDA 液体培养基中, 28 °C 下置于摇床中(130 r/min)发酵培养 30 d, 待发酵完成后, 将过滤后的菌丝和培养液分别用乙酸乙酯浸泡提取 3 次, 减压浓缩后得到浸膏, 总质量为 42 g。

1.8 内生真菌代谢产物的分离与纯化

将得到的浸膏进行硅胶柱层析。经 TLC 检测后, 合并相同的流分, 将获得的组分利用正相硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、HPLC 等分离手段, 得到单体化合物, 采用¹H NMR、¹³C NMR 及 MS 等现代波谱解析技术并查阅文献进行对比分析, 鉴定化合物的结构式。

1.9 内生真菌代谢产物活性测试

采用本文“1.5”和“1.6”中的方法分别对化合物进行抗菌、抗氧化活性测定。

2 结果与分析

2.1 TLC 筛选

TLC 显色结果显示: 碘化铊钾、FeCl₃ 等特征显色剂对内生真菌发酵提取物无明显的显色反应; 硫酸香草醛的显色结果(图 1)显示, 发酵提取物化学成分较多, 显色特征较为丰富的 5 株内生真菌为 *Pestalotiopsis* sp.(HL-1)、*Gelasinospora endodonta*(HL-5)、*Diaporthe eucalyptorum*(HL-7)、*Diaporthe phaseolorum*(HL-8) 和 *Nigrospora sphaerica*(HL-11)。

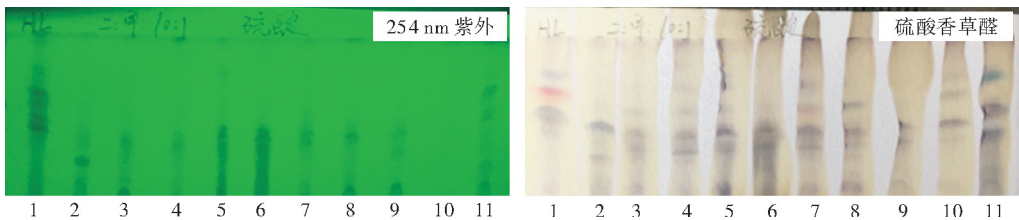


图 1 海莲内生真菌发酵粗提物 TLC 板

Fig.1 TLC of the endophytic fungi from *Bruguiera sexangula*

2.2 抗菌活性筛选

对筛选得到的 5 株海莲内生真菌发酵粗提物进行抗菌活性测试,结果如表 1 所示,有 4 株内生真菌发酵产物的粗提物对 1 种或多种指示菌具有抑制作用。其中,有 4 株内生真菌对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)的生长有抑制作用。*Pestalotiopsis* sp. 和 *Gelasinospora endodonta* 2 株内生真菌发酵产物的粗提物对 3 种指示菌的生长有抑制作用,*Pestalotiopsis* sp. 发酵产物的粗提物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)的生长表现出良好的抑制作用,MIC 值分别为 0.50、0.50、0.25 mg/mL。

表 1 海莲内生真菌发酵产物抑制指示菌的 MIC 值
Table 1 The MIC value of antimicrobial activity of the endophytic fungi from *Bruguiera sexangula*

菌株名称 Strains	MIC/(mg/mL)			
	M.A.	S.A.	P.A.	E.C.
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	—	0.50	0.50	0.25
<i>Gelasinospora endodonta</i>	1.00	1.00	—	1.00
<i>Diaporthe eucalyptorum</i>	—	1.00	—	—
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	—	—	—	—
<i>Nigrospora sphaerica</i>	1.00	1.00	—	—
CIP	—	+	+	+

注 Note; M.A.: 白色念珠菌 *Monilia albican*; S.A.: 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; P.A.: 铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*; E.C.: 大肠杆菌 *Escherichia coli*; “+” 表示 MIC 值 < 0.001 mg/mL “+” means MIC value < 0.001 mg/mL; “—” 代表无抗菌活性 “—” means no antimicrobial activity.下同 The same as follows.

2.3 抗氧化活性筛选

对 5 株海莲内生真菌发酵粗提物进行清除 DPPH 和 ABTS 自由基测试,当粗提物质量浓度为 10 mg/mL、自由基的清除率达到 50% 以上时,则视内生真菌具有清除自由基的能力,结果显示,除 *Gelasinospora endodonta* 外,其余 4 株内生真菌都具有清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力。

对具有清除自由基能力的内生真菌进行复筛,其粗提物清除 DPPH 和 ABTS 自由基结果(图 2)显示,粗提物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的能力与其质量浓度呈正相关,随着粗提物质量浓度的增大,其清除自由基的能力也随之增强,但当粗提物的浓度增大到一定程度时,清除自由基的能力趋于稳定。

内生真菌粗提物清除 DPPH 和 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值(表 2)显示,菌株清除自由基能力从强到弱依次是 *Pestalotiopsis* sp.、*Diaporthe eucalyptorum*、*Nigrospora sphaerica*、*Diaporthe phaseolorum*。其中 *Pestalotiopsis* sp. 粗提物表现出良好的抗氧化活性,其清除 DPPH 和 ABTS 自由基的 IC₅₀ 值分别为 (0.751±0.017) 和 (1.031±0.015) mg/mL。

表 2 海莲内生真菌发酵产物抗氧化 IC₅₀ 值
Table 2 The IC₅₀ value of antioxidant activity of the endophytic fungi from *Bruguiera sexangula*

菌株名称 Strains	IC ₅₀ / (mg/mL)	
	DPPH	ABTS
<i>Pestalotiopsis</i> sp.	0.751±0.017	1.031±0.015
<i>Gelasinospora endodonta</i>	—	—
<i>Diaporthe eucalyptorum</i>	1.122±0.031	1.383±0.027
<i>Diaporthe phaseolorum</i>	3.081±0.087	2.648±0.073
<i>Nigrospora sphaerica</i>	2.256±0.041	1.641±0.021
BHT	0.173±0.010	0.166±0.011

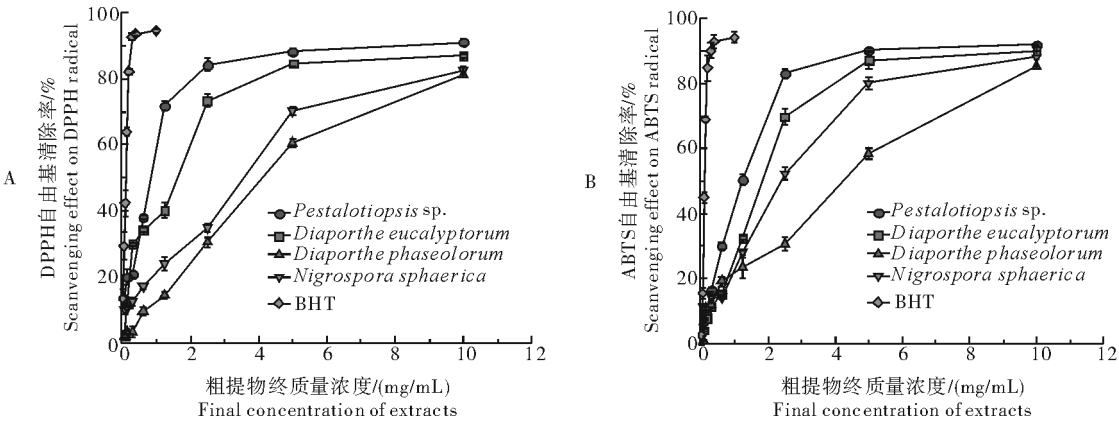


图 2 海莲内生真菌发酵粗提物对 DPPH(A) 和 ABTS(B) 自由基的清除能力

Fig.2 Scavenging DPPH(A) and ABTS(B) radical ability of extracts from *Bruguiera sexangula* endophytic fungi

2.4 化合物分离纯化与结构鉴定

将得到的浸膏进行硅胶柱层析,以石油醚、乙酸乙酯为溶剂进行梯度洗脱。经 TLC 检测后,合并相同流分,最终获得 8 个组分(Fr.1-Fr.8)。将 Fr.1 进行硅胶柱层析,以石油醚和乙酸乙酯为溶剂进行梯度洗脱,合并相同流分后得到 7 个组分(Fr.1.1-Fr.1.7);对 Fr.1.3 进行硅胶柱层析,以石油醚、丙酮为溶剂梯度洗脱,得到化合物 1(18.6 mg)。将 Fr.2 进行硅胶柱层析,以二氯甲烷和乙酸乙酯为溶剂,对其进行梯度洗脱,经 TLC 检测后,合并相同流分后得到 7 个组分(Fr.2.1-Fr.2.7),以甲醇为溶剂对 Fr.2.2 进行凝胶柱层析,最后以石油醚、丙酮为溶剂进行硅胶柱层析得到化合物 2(15.8 mg)。将 Fr2.3 进行硅胶柱层析,以石油醚、丙酮为溶剂梯度洗脱,得到化合物 3(17.5 mg)和化合物 4(20.2 mg)。

化合物 1,白色无定型粉末(氯仿);HRESIMS m/z 603.1020 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{40}H_{59}O_4$, 603.441 3),因此该化合物分子式为 $C_{40}H_{58}O_4$, $[\alpha]_D^{20} -22.9$ (c 0.5, $CDCl_3$); UV (MeOH) λ_{max} 207, 240, 505 nm; 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.58 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-7'), 7.06 (1H, dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 1.5$ Hz, H-6'), 7.03 (1H, s, H-2'), 6.91 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 6.28 (1H, d, $J = 15.9$ Hz, H-8'), 5.93 (1H, s, 5-OH), 4.69 (brs, H-29), 4.62 (1H, dd, $J = 10.6$ Hz, $J = 5.0$ Hz, H-3), 4.57 (brs, H-29), 3.72 (3H, s, 3'-OCH₃), 2.37 (1H, m, H-19), 1.69 (3H, s, H-30), 1.04 (3H, s, H-26), 0.95 (3H, s, H-27), 0.92 (3H, s, H-25), 0.89 (3H, s, H-23), 0.88 (3H, s, H-24), 0.79 (3H, s, H-28); ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ 167.3 (C-9'), 151.0 (C-20), 147.9 (C-4'), 146.8 (C-3'), 144.5 (CH-7'), 127.2 (C-1'), 123.2 (CH-6'), 116.3 (CH-8'), 114.8 (CH-5'), 109.5 (CH₂-29), 109.4 (CH-2'), 81.0 (CH-3), 56.1 (3'-OCH₃), 55.5 (CH-5), 50.5 (CH-9), 48.4 (CH-18), 48.1 (CH-19), 43.1 (C-17), 43.0 (C-14), 41.0 (CH-8), 40.1 (CH₂-22), 38.5 (CH₂-1), 38.2 (C-4), 38.1 (CH-13), 37.2 (C-10), 35.7 (CH₂-16), 34.3 (CH₂-7), 29.9 (CH₂-21), 28.1 (CH₃-23), 27.6 (CH₂-15), 25.2 (CH₂-12), 24.0 (CH₂-2), 21.1 (CH₂-11), 19.4 (CH₃-30), 18.3 (CH₂-6), 18.1 (CH₃-28), 16.8 (CH₃-25), 16.3 (CH₃-24), 16.1 (CH₃-26), 14.6 (CH₃-27)。经与文献报道的数据^[12]比较,鉴定化合物 1 为 3 β -(*E*)-feruloyllupeol。

化合物 2,白色无定型粉末(氯仿);分子式为 $C_{29}H_{50}O$, $[\alpha]_D^{20} + 32$ (c 0.02, MeOH), UV (MeOH) λ_{max} 207, 240, 505 nm。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 和 ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) 的数据见表 3。经与文献报道的数据^[13-14]比较,鉴定化合物 2 为 stig-mastan-3-one。

化合物 3,白色无定型粉末(氯仿);分子式为 $C_{29}H_{50}O$, $[\alpha]_D^{20} + 32$ (c 0.02, MeOH), UV (MeOH) λ_{max} 207, 240, 505 nm。 1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 和 ^{13}C -NMR (125 MHz, $CDCl_3$) 的数据见表 3。经与文献的数据^[15]对比,鉴定化合物 3 为 β -sitosterol。

表 3 化合物 2~4 的 1H NMR 和 ^{13}C NMR 的数据

Table 3 1H NMR and ^{13}C NMR data for compound 2-4

位置 Position	化合物 2 Compound 2		化合物 3 Compound 3		化合物 4 Compound 4	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1		38.5		37.2		36.7
2		38.1		31.6		27.9
3		212.0	3.55, m	71.7	4.56-4.63, m	73.6
4		44.7	2.30, m	42.2	2.31, m	39.4
5		46.6		140.7		139.3
6		28.9	5.38, br s	121.7	5.37, br s	122.3
7		31.7		31.9		31.5
8		35.3		31.9		31.5
9		53.7		50.1		49.7
10		35.6		36.5		36.2
11		21.4		21.1		20.7
12		39.9		39.7		37.8
13		42.5		42.3		41.9
14		56.1		56.7		56.3
15		24.2		24.3		23.9
16		28.2		28.2		27.4
17		56.2		56.0		55.7
18	0.66, s	12.0	0.71, s	11.8	0.67, s	11.6
19	0.99, s	11.4	1.09~2.00, m	18.7	1.09~2.00, m	18.4
20		36.1		36.1		35.8
21	0.89, d, 6.5	18.7	0.95, d, 8.0	19.0	0.91, d, 7.9	18.7
22		33.8		33.9		33.6
23		26.0		26.0		25.7
24		45.8		45.8		45.5
25		29.1		29.1		28.8
26	0.81, d, 7.0	19.8	0.86, d, 9.3	19.4	0.83, d, 9.6	19.5
27	0.79, d, 6.8	19.0	0.84, d, 10.5	19.8	0.80, d, 10.0	18.9
28		23.0		23.0		22.7
29	0.83, t, 8.4	11.9	0.84, t, 7.2	11.9	0.84, t, 9.1	11.5
1'						170.1
2'					2.02, s	21.1

化合物 4,白色无定型粉末(氯仿);分子式为 $C_{31}H_{52}O_2$, $[\alpha]_D^{20} + 32$ (c 0.02, MeOH), UV (MeOH) λ_{max} 207, 240, 505 nm。 1H NMR (500

MHz, CDCl_3) 和 ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) 的数据见表 3。经与文献报道的数据^[16]比较, 鉴定化合物 4 为 sitost-5-en- β -ol acetate。

2.5 化合物生物活性

对 4 个化合物进行清除 DPPH、ABTS 自由基活性测定, 结果表明: 当化合物质量浓度为 10 mg/mL 时, DPPH 和 ABTS 自由基的清除率均小于 20%, 均无抗氧化活性。

对 4 个化合物进行抗菌活性测试, 结果表明: 随着溶度的增加, 菌悬液浑浊程度无明显变化, 所有化合物均无抗菌活性。

3 讨 论

红树林植物内生真菌在宿主的生存、进化和化学防御中扮演着重要角色, 某些内生真菌的代谢产物能显著地影响宿主植物, 在共生菌-宿主-环境相互作用过程中有着多种生理和生态作用^[17-18]。研究表明, 感染内生菌的植物宿主由于具有抗逆境、抗病害等优势, 往往比未感染内生菌的植物宿主更具生存竞争力^[19-20]。

本研究以海莲内生真菌作为研究对象, 采用化学与生物学结合的二级组合筛选模型对内生真菌进行筛选, 得到次级代谢产物结构类型丰富且具有生物活性的内生真菌 *Pestalotiopsis* sp., 丰富了红树林植物海莲活性内生真菌的种质资源, 为天然抗菌、抗氧化活性物质的生产提供了备选菌种。对其进行抗菌活性测试, 结果显示, 内生真菌粗提物对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的生长表现出良好的抑制作用, MIC 值分别为 0.50、0.50、0.25 mg/mL; 对其进行抗氧化活性测试, 结果显示, 内生真菌粗提物具有一定的 DPPH 和 ABTS 自由基清除能力, IC_{50} 值分别为 (0.751 ± 0.017) 和 (1.031 ± 0.015) mg/mL。

本研究从内生真菌 *Pestalotiopsis* sp. 发酵产物中分离得到 4 个化合物: β - (E) -feruloyllupeol、stigmastan-3-one、 β -sitosterol 和 sitost-5-en- β -ol acetate。化合物 β - (E) -feruloyllupeol 为首次从红树林植物海莲内生真菌中分离得到, 拓展了海莲内生真菌的次级代谢产物。Xu 等^[21]从海莲拟盘多毛孢属内生真菌中分离得到 1 个新化合物 (1R, 4R, 5R, 8S)-8-hydroxy-4, 8-dimethyl-2-oxabicyclo[3.3.

1]nonan-3-one 和 1 个已知化合物 (2R)-2-[(1R)-4-methylcyclohex-3-en-1-yl]propanoic acid, 2 个化合物对烟草疫霉菌 (*Phytophthora nicotianae*) 和灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 均表现出较强的抑制活性, MIC 值分别为 6.3 和 3.1 $\mu\text{g/mL}$, 化合物 (2R)-2-[(1R)-4-methylcyclohex-3-en-1-yl]propanoic acid 对白色念珠菌有弱抑制活性, MIC 值为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。崔秀春^[22]从拟盘多毛孢属内生真菌中分离得到已知化合物 1', 2'-epoxy-3', 4'-didehydropenicillide, 其具有清除 DPPH 自由基能力。本研究中海莲内生真菌 *Pestalotiopsis* sp. 粗提物抗菌、抗氧化活性优于其化合物, 说明其中还有更好的活性物质, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] ARFI Y, CHEVRET D, HENRISSAT B, et al. Characterization of salt-adapted secreted lignocellulolytic enzymes from the mangrove fungus *Pestalotiopsis* sp. [J/OL]. Nature communications, 2014, 4(5): 1810 [2019-04-09]. <https://www.nature.com/articles/ncomms2850>. DOI:10.1038/ncomms2850.
- [2] 徐静. 红树林微生物天然产物化学研究 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 29-30.
- [3] CUI J L, GUO T T, REN Z X, et al. Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from alpine plants of *Rhodiola crenulata*, *R. angusta*, and *R. sachalinensis* [J/OL]. PLoS One, 2015, 10(3): e0118204 [2019-04-09]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118204>.
- [4] DENG C M, LIU S X, HUANG C H, et al. Secondary metabolites of a mangrove endophytic fungus *Aspergillus terreus* (No. GX7-3B) from the South China Sea [J]. Marine drugs, 2013, 11(7): 2616-2624.
- [5] DEBBAB A, ALY A H, PROKSCH P, et al. Mangrove derived fungal endophytes: a chemical and biological perception [J]. Fungal diversity, 2013, 61(1): 1-27.
- [6] 徐志勇, 冯昭, 徐静. 红树林微生物抗菌活性成分研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2017, 42(4): 241-254.
- [7] ELISSAWY A M, EL-SHAZLY M, EBADA S S, et al. Bioactive terpenes from marine-derived fungi [J]. Marine drugs, 2015, 13: 1966-1992.
- [8] GOPAL B, CHAUHAN M. Biodiversity and its conservation in the sundarban mangrove ecosystem [J]. Aquatic sciences, 2006, 68(3): 338-354.
- [9] 易杨华, 焦炳华. 现代海洋药理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2016: 1107-1111.
- [10] 张旭, 李静, 徐静. 红树林植物海莲不同部位提取物抗氧化活性研究 [J]. 热带作物学报, 2017, 38(5): 849-853.
- [11] MOUSSA M, EBRAHIM W, EL-NEKETI M, et al. Tetra-

hydroanthraquinone derivatives from the mangrove-derived endophytic fungus *Stemphylium globuliferum* [J]. Tetrahedron letters, 2016, 57(36): 4074-4078.

[12] CHANITA P, PAKAKRONG T. Lupane-triterpene esters from the leaves of *Ceriops decandra* (Griff.) Ding Hou [J]. Australian journal of chemistry, 2005, 58(8): 615-618.

[13] 傅建, 梁光义, 张建新, 等. 茸毛木蓝化学成分研究 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(3): 265-268.

[14] 赵友兴, 李承森, 罗晓东, 等. 上新世华山松化石中的甾体化合物 [J]. 有机化学, 2005, 25(9): 1100-1102.

[15] CHATURVEDULA V S P, PRAKASH I. Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavisissimus* [J]. International current pharmaceutical journal, 2012, 1(9): 239-242.

[16] 李硕果, 杨茵, 叶文才, 等. 三桠苦的化学成分研究 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1052-1056.

[17] ALY A H, DEBBAB A, PROKSCH P, et al. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises [J]. Applied microbiology & biotechnology, 2011, 90(6): 1829-1845.

[18] SONG Y L, WU P, LI Y F, et al. Effect of endophytic fungi on the host plant growth, expression of expansin gene and flavonoid content in *Tetrastigma hemsleyanum* Diels & Gilg ex Diels [J]. Plant and soil, 2017, 417(1/2): 393-402.

[19] 周婧, 杨琦, 李钢, 等. 红树属植物内生真菌多样性及其代谢产物研究进展 [J]. 林业科学, 2019, 55(1): 89-102.

[20] 秦晶, 张清华, 杨龙, 等. 油菜内生真菌黄柄曲霉 CanS-34A 对核盘菌的拮抗性 [J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 26-32.

[21] XU D, ZHANG B Y, YANG X L. Antifungal monoterpene derivatives from the plant endophytic fungus, *Pestalotiopsis foedan* [J]. Chemistry & biodiversity, 2016, 13(10): 1422-1425.

[22] 崔秀春. 三株真菌次级代谢产物研究 [D]. 保定: 河北大学, 2013.

Screening active endophytic fungi from *Bruguiera sexangula* and studying its secondary metabolites

FENG Zhao ZHANG Xu XU Jing

Ministry of Education Key Laboratory of Tropical Biological Resources/
College of Materials and Chemical Engineering, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract The active endophytic fungi from the mangrove *Bruguiera sexangula* were screened with secondary combination screening model combining chemical and biological activities. The *Pestalotiopsis* sp. was obtained, from which four steroids were isolated and identified. The four compounds were identified as 3 β -*E*-feruloyllupeol, stigmastan-3-one, β -sitosterol, sitost-5-en-3 β -ol acetate based on spectral data and literature comparison. Among them, 3 β -(*E*)-feruloyllupeol was first isolated from the mangrove endophytic fungus. The four compounds were tested for DPPH, ABTS free radical and antibacterial activity. The results showed that all compounds had no antibacterial and antioxidant activities.

Keywords mangrove; *Bruguiera sexangular*; endophytic fungi; steroids; biological activities

(责任编辑: 张志钰)