

白木香内生真菌 *Hypoxylon* sp. HK-37 的次级代谢产物

何开磊^{1,2}, 戴好富², 吴妃², 袁靖喆², 谭志琼^{1*}, 陈惠琴^{2*}

1 海南大学生命健康学院, 海南 海口 570228

2 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南省黎药资源天然产物研究与利用重点实验室 沉香国际联合研究中心, 海南 海口 571101

摘要: 本文对 1 株白木香内生真菌 *Hypoxylon* sp. HK-37 的化学成分进行了研究。采用硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶层析、半制备 HPLC 和重结晶等分离方法从白木香内生真菌 *Hypoxylon* sp. HK-37 的大米固体发酵产物中分离得到 5 个单体化合物, 并利用波谱学方法结合文献数据对其结构进行鉴定, 分别为: methyl 8-hydroxy-1-oxo-1*H*-isochromene-3-carboxylate (**1**)、8-hydroxy-1-oxo-1*H*-isochromene-3-carboxylic acid (**2**)、1,8-dimethoxynaphthalene (**3**)、(-)-5-methylmellein (**4**) 和 (-)-6-hydroxymellein (**5**)。其中化合物 **1** 为新化合物, 化合物 **2** 为新天然产物, 化合物 **5** 为首次从该属菌中分离得到, 对分离所得的化合物进行体外乙酰胆碱酯酶抑制活性测试, 结果表明所有化合物均具有一定的抑制活性。本研究丰富了白木香内生真菌次级代谢产物的化学成分及生物活性, 也为其后续的综合开发及利用提供一定的理论依据。

关键词: 内生真菌; 白木香; 次级代谢产物; 乙酰胆碱酯酶

[引用本文]

何开磊, 戴好富, 吴妃, 袁靖喆, 谭志琼, 陈惠琴, 2025. 白木香内生真菌 *Hypoxylon* sp. HK-37 的次级代谢产物. 菌物学报, 44(6): 240351

He KL, Dai HF, Wu F, Yuan JZ, Tan ZQ, Chen HQ, 2025. Secondary metabolites of endophytic fungus *Hypoxylon* sp. HK-37 from *Aquilaria sinensis*. Mycosystema, 44(6): 240351

资助项目: 中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队(CATASCXTD202406); 国家中药材产业体系(CARS-21)
This work was supported by the Innovation Team of the National Tropical Agricultural Science Center of the Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences (CATASCXTD202406) and the Traditional Chinese Medicine Industry System (CARS-21).

*Corresponding authors. E-mail: TAN Zhiqiong, 990988@hainanu.cn; CHEN Huiqin, chenhuiqin@itbb.org.cn

Received: 2024-12-25; Accepted: 2025-01-24

Secondary metabolites of endophytic fungus *Hypoxylon* sp. HK-37 from *Aquilaria sinensis*

HE Kailei^{1,2}, DAI Haofu², WU Fei², YUAN Jingzhe², TAN Zhiqiong^{1*}, CHEN Huiqin^{2*}

¹ School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

² Key Laboratory of Natural Products Research and Development of Li Folk Medicine of Hainan Province, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Agarwood International Joint Research Center, Haikou 571101, Hainan, China

Abstract: Five compounds were isolated from the rice solid fermentation products of *Hypoxylon* sp. HK-37, an endophytic fungus from *Aquilaria sinensis* by various separation techniques including silica gel column chromatography, Sephadex LH-20 gel column chromatography, semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC), and recrystallization. The structures of these compounds were identified through spectroscopic methods in combined with consulting literature data. They were determined as methyl 8-hydroxy-1-oxo-1*H*-isochromene-3-carboxylate (**1**), 8-hydroxy-1-oxo-1*H*-isochromene-3-carboxylic acid (**2**), 1,8-dimethoxynaphthalene (**3**), (-)-5-methylmellein (**4**), and (-)-6-hydroxymellein (**5**). Among them, compound **1** is a new compound, compound **2** is a new natural product, and compound **5** is isolated from this genus for the first time. The isolated compounds were tested for their acetylcholinesterase inhibitory activity *in vitro*, and the results showed that all the compounds exhibited certain inhibitory activity. This research provides reference material for its further development and utilization.

Keywords: endophytic fungus; *Aquilaria sinensis*; secondary metabolites; acetylcholinesterase

内生真菌是指在植物健康器官或组织内度过全部或部分生命周期,而通常不使寄主表现出明显感染症状的一类真菌(李聪等 2023; 唐官美等 2024; 张佩璇等 2024)。内生真菌普遍存在于植物的各个组织器官中,包括根、茎、叶、花、果实或种子(Araujo *et al.* 2001)。内生真菌在与宿主植物长期进化过程中互惠共生(Jia *et al.* 2016; 王生萍等 2022; 胡雨娟等 2024),植物为内生真菌提供营养物质与生存环境,而内生真菌能够合成与宿主植物相同或相似的次级代谢产物,具有调节植物生长、代谢以及抵御逆境等功能(Verma *et al.* 2009; 李露莹等 2020; Devi *et al.* 2023)。内生真菌既是植物微生态系统的重要组成部分,也是一类非常重要的微生物资源。目前,从中分离得到的次级代谢产物结构类型包括聚酮类、萜类、肽类和生物碱类等,具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤和抗氧化等多种生物活性(Zheng

et al. 2021),是发现天然药物先导化合物的重要资源之一(Zhang *et al.* 2024)。本研究从白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 植物样品中分离获得一株内生真菌,鉴定为 *Hypoxylon* sp. HK-37,对其进行大米固体发酵培养,并对发酵产物乙酸乙酯萃取物的化学成分进行分离鉴定和生物活性研究。结果不仅丰富了白木香内生真菌来源次级代谢产物的化学结构和生物活性的多样性,而且也能为白木香内生真菌的资源开发提供一定的科学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

菌株 *Hypoxylon* sp. HK-37 分离自白木香 *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg 健康树干部位,保藏于中国热带农业科学院热带生物技术研究所。

1.1.2 培养基

PDA 培养基:马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 15.0 g,蒸馏水 1.0 L, pH 自然; PDB 培养基:马铃薯 200.0 g,葡萄糖 20.0 g,蒸馏水 1.0 L, pH 自然; 大米培养基:大米 100.0 g,蒸馏水 110 mL,置于 1 L 锥形瓶中,121 °C 高压灭菌 30 min。

1.1.3 主要仪器和试剂

超净工作台(苏州净化设备有限公司); 高压蒸汽灭菌锅(厦门市致微仪器有限公司); 恒温培养箱(上海市昕仪仪器仪表有限公司); 恒温摇床(上海市智城分析仪器制造有限公司); GF₂₅₄ 薄层色谱硅胶板、柱层析硅胶(60–80、200–300 目)(青岛海洋化工有限公司); 高效液相色谱仪、C₁₈ 半制备色谱柱(Agilent); 旋转蒸发器(上海爱朗仪器有限公司); Bruker AV-500 型超导核磁共振波谱仪(Bruker); ODS 反相材料、Sephadex LH-20 凝胶、氘代试剂(Merck); 乙酰胆碱酯酶、硫代乙酰胆碱、5,5-二硫代硝基苯甲酸、他克林(Sigma); 磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、二甲基亚砜(西陇科学股份有限公司); 高效液相试剂为色谱纯(天津市康科德科技有限公司); 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离和鉴定

采用稀释平板法对白木香样品中的内生真菌进行分离,用 75%乙醇将白木香组织表面消毒后再用少量无菌水清洗 3 遍,用无菌剪刀将其剪切成小块后转移至研钵中,加入 1 mL 无菌水充分研磨,将磨好的匀浆液,用无菌水依次配制成浓度为 10^{-1} 、 10^{-2} 不同浓度梯度的组织悬液,依次分别取 100 μ L 的原浓度组织悬液以及稀释浓度为 10^{-1} 、 10^{-2} 的组织悬液涂布在 PDA 平板中,于 28 °C 恒温倒置培养 5–10 d,待平板上长出菌落后用接种针挑取,以平板划线法接种于 PDA 培养基上,多次划线分离纯化直至获得单菌落,将纯化菌株接入含有 30% 甘油的 PDB 培养基甘油保藏管,28 °C 恒温培养后于–80 °C 冰箱进行甘油管低温保藏(王惠芳等 2022)。

参照基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行 DNA 的提取。以菌株基因组 DNA 为模板,使用 ITS1/ITS4 通用引物(O'Donnell *et al.* 2009),进行 PCR 扩增,将扩增纯化后的产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序获得的 ITS rDNA 序列在 NCBI 的 GenBank 数据库中进行 Blast 同源性分析,利用 Mega7.0 构建系统发育树,确定菌株的亲缘关系及分类地位。

1.2.2 菌株发酵

将–80 °C 保藏的菌株接种至 PDA 培养基中活化,在 28 °C 条件下培养 3–5 d,待菌落长满平板后,挑取平板内单一菌落,接种到含有 250 mL PDB 培养基的 500 mL 三角瓶中,在恒温摇床 28 °C、180 r/min 条件下培养 3 d,得到菌株发酵种子液,将菌株发酵种子液接种到大米发酵培养基中,每瓶大米发酵培养基中加入 10 mL 种子培养液,共 200 瓶,室温环境下静置培养 30 d(王惠芳等 2022)。

1.2.3 提取和分离

待菌株发酵结束,用破壁机破碎菌体后的发酵液经乙酸乙酯萃取 3 次,合并乙酸乙酯相,减压浓缩获得乙酸乙酯提取物(329.2 g)。加入适量 95% 甲醇水溶液将乙酸乙酯提取物制成悬浮液,以等体积的石油醚萃取 3 次,甲醇水部分经减压浓缩得到提取物(191.3 g)。

甲醇相提取物经减压硅胶柱层析以石油醚/乙酸乙酯(1:0→0:1)和氯仿/甲醇(1:0→0:1)进行极性递增梯度洗脱,经薄层色谱(TLC)点样分析,合并相似流分,得到 16 个组分(Fr.1–Fr.16)。

Fr.1 (2.1 g)经硅胶柱色谱以石油醚/乙酸乙酯(100:1→5:1)为流动相梯度洗脱,经薄层色谱(TLC)点板分析合并后共获得 5 个流分(Fr.1.1–Fr.1.5),Fr.1.2 (354.7 mg)经葡聚糖 Sephadex LH-20 凝胶柱层析以纯甲醇为流动相洗脱后,获得化合物 **3** (18.2 mg); Fr.1.5 (320.5 mg)经硅胶柱色谱以石油醚/乙酸乙酯(60:1→5:1)为流动相梯度洗脱,经薄层色谱(TLC)点板分析合并后共获得 4 个流分(Fr.1.5.1–Fr.1.5.4),Fr.1.5.4 (105.5 mg)经半制备高效液相色谱(甲醇-水 45:55)纯化获得化合物 **4** (7.4 mg, t_R 21.5 min)。

Fr.3 (9.8 g)经重结晶获得化合物 **1** (118.3 mg)。Fr.6 (23.2 g)经 ODS 反相硅胶柱色谱以甲醇-水 (1:5→0:1)为流动相梯度洗脱,经薄层色谱(TLC)点样分析合并后共获得 18 个流分(Fr.6.1–Fr.6.18),其中 Fr.6.1 (215.5 mg)经硅胶柱色谱以氯仿/甲醇 (80:1→0:1)为流动相梯度洗脱,经薄层色谱(TLC)点板分析合并后共获得 6 个流分(Fr.6.1.1–Fr.6.1.6), Fr.6.1.1 (62.0 mg)经半制备高效液相色谱(乙腈-水 35:65)纯化获得化合物 **2** (5.4 mg, t_R 18.0 min)。Fr.6.1.2 (48.5 mg)经半制备高效液相色谱(乙腈-水 30:70)纯化获得化合物 **5** (5.6 mg, t_R 15.5 min) (图 1)。

1.2.4 体外活性测试

参照王子鹏等(2023)的方法,采用 Ellman 法(Ellman *et al.* 1961)对单体化合物的乙酰胆碱酯酶抑制活性进行测定。分别设置实验组、阴性对照组、阳性对照组和空白组,以他克林和 DMSO 作为阳性和阴性实验对照组,每组 4 个重复,化合物均用 DMSO 进行溶解,制成待测样品(4 mmol/L)。取 150 μ L PBS 缓冲液(pH 8.0), 10 μ L 待测样品和 20 μ L 乙酰胆碱酯酶溶液 (0.2 U/mL)于 96 孔板中,在 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中温育 15 min 后,除空白组外各组均加入 10 μ L 硫代乙酰胆碱(5 mmol/L)和 10 μ L 5,5-二硫二硝基苯甲酸(1 mmol/L)。空白组加入 10 μ L PBS 缓冲液和 10 μ L DTNB 溶液(1 mmol/L),反应总体系为 200 μ L。置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中温育

30 min,用酶标仪于 412 nm 波长下测量每孔的 OD 值,计算化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制率。

计算公式如下:

$$\frac{OD_2 - OD_1}{OD_2 - OD_3} \times 100\%$$

OD_1 为待测样品吸光值, OD_2 为阴性对照组吸光值, OD_3 为空白对照吸光值。

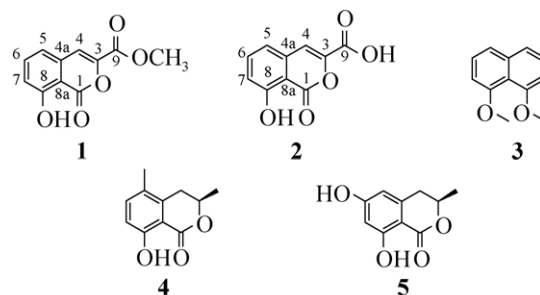


图 1 化合物 1–5 的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1–5.

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

菌株 HK-37 的 ITS rDNA 序列长度 613 bp, 将其提交至 GenBank 数据库, 获得序列登录号为 PQ451697.1。利用 Blast 对该序列进行同源比对, 选取相似度高的序列构建系统发育树(图 2)。结果表明, 菌株 HK-37 的 ITS-rDNA 序列与 *Hypoxylon* sp. 聚为一支, 序列同源性为 99%, 因此将该菌株鉴定为炭团菌属 *Hypoxylon* sp.。

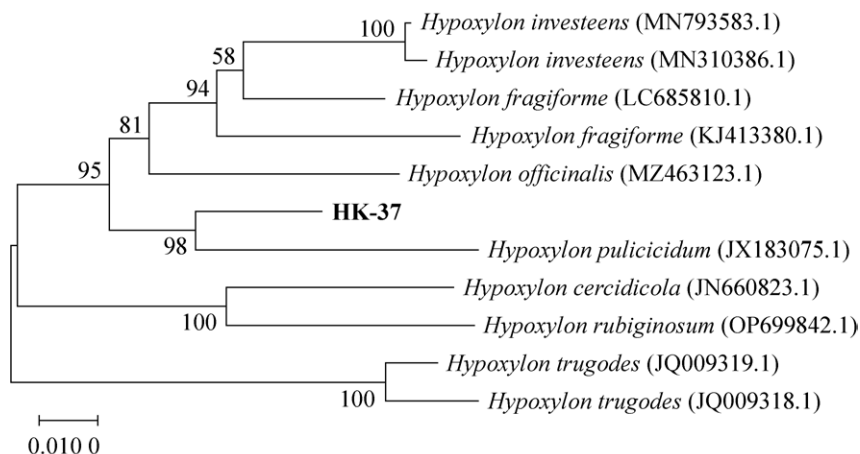


图 2 菌株 HK-37 的系统发育分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of *Hypoxylon* sp. HK-37.

2.2 结构鉴定

化合物 **1**: 白色粉末; HR-ESI-MS m/z 243.025 9 $[M+H]^+$ 。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据推测其分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$ 。分析化合物 **1** 的 ^1H -NMR 数据, 提示存在 3 个邻位耦合芳香质子信号[7.08 (1H, dd, $J=8.0, 0.9$ Hz, H-5), 7.69 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-6), 7.14 (1H, dd, $J=8.0, 0.9$ Hz, H-7)], 1 个取代双键的烯烃质子信号[7.49 (1H, s, H-4)], 1 个甲氧基信号[δ_{H} 3.95 (3H, s, OCH_3)]和 1 个羟基质子信号[δ_{H} 10.87 (1H, s, OH)]。 ^{13}C -NMR 显示化合物 **1** 中存在 2 个酯羰基(δ_{C} 164.9, 160.5), 4 个季碳信号(δ_{C} 162.0, 142.6, 135.3, 107.7), 4 个次甲基信号(δ_{C} 137.8, 118.6, 118.5, 113.8)和 1 个甲氧基信号(δ_{C} 53.2)。以上数据结合 HMBC 谱(图 3)中 H-4 与 C-3、C-5 和 C-9 之间的相关信号, H-5 与 C-4、C-7 和 C-8a 之间的相关信号, H-6 与 C-4a 和 C-8 之间的相关信号, 以及 H-7 与 C-5 和 C-8a 之间的相关信号提示化合物 **1** 为异香豆素(Arunpanichlert *et al.* 2010)。进一步对比化合物 **1** 和已知化合物 penicilisorin (Arunpanichlert *et al.* 2010)的 ^1H 和 ^{13}C -NMR 数据, 两者具有十分相似的核磁数据。化合物 **1** 与已知化合物的结构不同在于化合物 **1** 中 C-6 位少了一个甲氧基,

综上所述, 化合物 **1** 结构鉴定为 methyl 8-hydroxy-1-oxo-1*H*-isochromene-3-carboxylate, 通过文献检索其结构未见报道, 因此化合物 **1** 为新化合物。

化合物 **2**: 白色粉末; HR-ESI-MS m/z 207.153 4 $[M+H]^+$ 。结合 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据推测其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_5$ 。分析化合物 **2** 的 ^1H -NMR 数据, 提示存在 3 个邻位耦合芳香质子信号[7.33 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-5), 7.78 (1H, t, $J=8.0$ Hz, H-6), 7.14 (1H, d, $J=8.3$ Hz, H-7)], 1 个取代双键的烯烃质子信号[7.48 (1H, s, H-4)], 1 个羟基质子信号[δ_{H} 10.80 (1H, s, OH)]。 ^{13}C -NMR 显示化合物 **2** 中存在 2 个羰基信号(δ_{C} 164.1, 160.9), 4 个季碳信号(δ_{C} 160.5, 142.9, 135.8, 107.4), 4 个次甲基信号(δ_{C} 137.7, 118.8, 117.6, 112.9)。以上数据与化合物 **1** 相似, 为异香豆素(Arunpanichlert *et al.* 2010)。进一步对比化合物 **2** 和 **1**, 发现化合物 **2** 结构中的甲氧基被羟基取代, 综上所述, 化合物 **2** 结构鉴定为 8-hydroxy-1-oxo-1*H*-isochromene-3-carboxylic acid, 其结构曾被人工合成(Adler *et al.* 1960), 但未从自然界中分离获得, 因此化合物 **2** 为新天然产物。

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 数据
Table 1 ^1H -NMR and ^{13}C -NMR data of compounds **1** and **2**

NO.	1 ^a		2 ^b	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	164.9		164.1	
3	142.6		142.9	
4	113.8	7.48 (s)	112.8	7.48 (s)
4a	135.3		135.8	
5	118.5	7.08 (dd, $J=8.0, 0.9$ Hz)	118.8	7.33 (d, $J=7.6$ Hz)
6	137.8	7.69 (t, $J=8.0$ Hz)	137.8	7.78 (t, $J=8.0$ Hz)
7	118.6	7.14 (dd, $J=8.0, 0.9$ Hz)	117.7	7.14 (d, $J=8.3$ Hz)
8	162.0		160.5	
8a	107.7		107.4	
9	160.5		160.9	
OCH_3	53.2	3.95 (s)		
OH		10.87 (s)		10.80 (s)

注: **1**^a CDCl_3 和 **2**^b $\text{DMSO}-d_6$ 为溶剂 500 MHz 测量氢谱和 125 MHz 测量碳谱

Note: **1**^a The ^1H -NMR was measured at 500 MHz in CDCl_3 , and ^{13}C -NMR was measured at 125 MHz in CDCl_3 . **2**^b The ^1H -NMR was measured at 500 MHz in $\text{DMSO}-d_6$, and ^{13}C -NMR was measured at 125 MHz in $\text{DMSO}-d_6$.

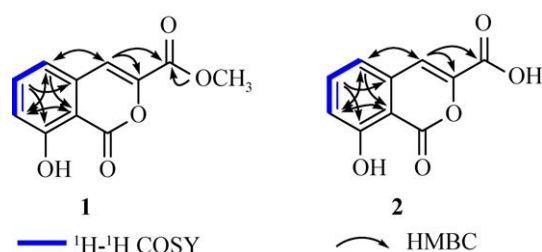


图3 化合物1和2的 ^1H - ^1H COSY和HMBC关键信号

Fig. 3 The key ^1H - ^1H COSY and HMBC correlations of compounds 1 and 2.

化合物3: 黄色粉末; HR-ESI-MS m/z 189.114 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。结合 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据推测其分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{O}_2$ 。 ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ_{H} 7.39 (2H, br d, $J=8.2$ Hz, H-4, 5), 7.36 (2H, t, $J=8.2$ Hz, H-3, 6), 6.85 (2H, dd, $J=7.4$, 1.1 Hz, H-2, 7), 3.98 (1H, s, 1, 8- OCH_3); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 56.6 (1, 8- OCH_3), 157.2 (C-1, 8), 106.3 (C-2, 7), 126.5 (C-3, 6), 121.0 (C-4, 5), 137.5 (C-4a), 117.7 (C-8a)。化合物3的核磁数据与Allport & Bu'Lock (1960)的基本一致, 因此鉴定为1,8-dimethoxynaphthalene。

化合物4: 白色粉末; HR-ESI-MS m/z 193.078 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。结合 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据推测其分子式为 $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_3$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3): δ_{H} 11.02 (1H, s, 8-OH), 7.30 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6), 6.84 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-7), 4.71 (1H, m, H-3), 2.97 (1H, dd, $J=16.6$, 3.4 Hz, H-4 α), 2.69 (1H, dd, $J=16.6$, 11.6 Hz, H-4 β), 2.22 (3H, s, 5- CH_3), 1.57 (3H, d, $J=6.3$ Hz, 3- CH_3); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ_{C} 170.5 (C-1), 160.6 (C-8), 138.1 (C-4a), 137.2 (C-6), 125.0 (C-5), 115.8 (C-7), 108.2 (C-8a), 75.6 (C-3), 32.1 (C-4), 21.1 (3- CH_3), 18.2 (5- CH_3)。化合物4的核磁数据与陈苹等(2008)的基本一致, 因此鉴定其为(-)-5-methylmellein。

化合物5: 白色粉末; HR-ESI-MS m/z 195.062 3 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。结合 ^1H -NMR和 ^{13}C -NMR数据推测其分子式为 $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$ 。 ^1H -NMR (500 MHz, CD_3OD): δ_{H} 6.21 (1H, br s, H-5), 6.20 (1H, br s, H-7), 4.66 (1H, m, H-3), 2.90 (1H, dd, $J=16.4$, 3.5 Hz, H-4 α), 2.81 (1H, dd, $J=16.4$, 11.1 Hz, H-4 β), 1.46 (3H, d, $J=6.3$ Hz, 3- CH_3); ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz): δ_{C} 171.7 (C-1), 166.2 (C-6), 165.6 (C-8), 143.5 (C-4 α), 107.8 (C-5), 102.1 (C-8 α), 101.4 (C-7),

77.2 (C-3), 35.5 (C-4), 20.9 (3- CH_3)。化合物5的核磁数据与 Abdel-Hameed *et al.* (2016)的基本一致, 因此鉴定其为(-)-6-hydroxymellein。

2.3 生物活性测试

对分离得到的5个化合物进行乙酰胆碱酯酶抑制活性评价, 结果显示所有化合物均具有一定的乙酰胆碱酯酶抑制活性。在终浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 抑制率分别为(44.95 $\pm$ 2.13)%、(32.97 $\pm$ 1.42)%、(22.40 $\pm$ 2.69)%、(30.28 $\pm$ 2.38)%和(34.54 $\pm$ 2.13)%, 阳性对照他克林的抑制率为(95.11 $\pm$ 1.45)% (表2)。

表2 化合物对乙酰胆碱酯酶的抑制率

Table 2 AChE inhibitory activity of compounds

化合物 Compounds	抑制率 Inhibition rate (%)
1	44.95 $\pm$ 2.13
2	32.97 $\pm$ 1.42
3	22.40 $\pm$ 2.69
4	30.28 $\pm$ 2.38
5	34.54 $\pm$ 2.13
他克林 ¹ Tacrine ¹	95.11 $\pm$ 1.45

注: ¹ 阳性对照

Note: ¹ Positive control.

3 讨论

迄今, 关于白木香内生真菌生物多样性及微生物诱导结香的研究较多, 但对其次级代谢产物及生物活性的研究鲜有报道。内生真菌是活性天然产物的重要来源之一, 能够产生骨架新颖、活性丰富的次级代谢产物(程璐等 2021)。异香豆素化合物是一类重要的天然骨架和生物活性分子, 其种类繁多, 且广泛存在于自然界中(Saddiq *et al.* 2017)。研究发现其衍生物具有明显的抗癌、抗菌、抗氧化、抑制蛋白酶和除草等生理和生物活性(Saeed 2016)。Meepagala *et al.* (2018)从植物病原真菌 *Diaporthe eres* 的液体发酵物中分离得到化合物4, Cimmino *et al.* (2013)从藜茎点霉 *Phoma chenopodiicola* 中分离纯化得到化合物5, 在生物活性的验证下, 均表现出显著的除草活性。

白木香中富含内生真菌资源,其功能及代谢产物蕴藏巨大的开发潜力和应用价值(黄颖等 2024)。本研究对一株分离自白木香的内生真菌 *Hypoxylon* sp. HK-37 进行次级代谢产物研究,采用不同分离手段从其大米固体发酵产物中共分离鉴定出 5 个化合物,对分离所得的化合物进行体外乙酰胆碱酯酶抑制活性测试,结果表明均具有微弱的乙酰胆碱酯酶抑制活性。本研究在一定程度上丰富了白木香内生真菌的生物多样性,同时也对 *Hypoxylon* 属真菌的化学成分和乙酰胆碱酯酶抑制活性的研究提供了参考意义。

作者贡献

何开磊: 论文构思与撰写、数据管理、调查;戴好富: 实验进程及质量把控监督;吴妃: 实验方法验证;袁靖喆: 提供实验设备及技术平台;谭志琼: 实验思路指导;陈惠琴: 论文修改。

利益冲突

作者声明,该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Abdel-Hameed M, Bertrand RL, Piercey-Normore MD, Sorensen JL, 2016. Identification of 6-hydroxymellein synthase and accessory genes in the lichen *Cladonia uncialis*. *Journal of Natural Products*, 79(6): 1645-1650
- Adler E, Magnusson R, Berggren B, 1960. Periodate oxidation of phenols. 4. structure of the periodate oxidation product of a dimeric 3-methoxy-ortho-quinone. *Acta Chemica Scandinavica*, 14(3): 539-549
- Allport DC, Bu'Lock JD, 1960. Biosynthetic pathways in *Daldinia concentrica*. *Journal of the Chemical Society*, 1960: 654-662
- Araujo WL, Maccheroni JW, Aguilar-Vildoso CI, Barroso PA, Saridakis HO, Azevedo JL, 2001. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(3): 229-236
- Arunpanichlert J, Rukachaisirikul V, Sukpondma Y, Phongpaichit S, Tewtrakul S, Rungjindamai N, Sakayaroj J, 2010. Azaphilone and isocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Penicillium sclerotiorum* PSU-A13. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(8): 1033-1036
- Chen P, Wu J, Dai HF, Xie XC, Mei WL, 2008. Chemical constituents from endophytic fungus S26 of *Cephalotaxus hainanensis*. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 84(4): 279-283 (in Chinese)
- Cheng L, Chai YN, Sun LY, 2021. Research progress on bioactive secondary metabolites of lichens and endolichenic fungi. *Mycosystema*, 40(1): 14-30 (in Chinese)
- Cimmino A, Andolfi A, Zonno MC, Avolio F, Berestetskiy A, Vurro M, Evidente A, 2013. Chenopodolans A–C: phytotoxic furopyrans produced by *Phoma chenopodiicola*, a fungal pathogen of *Chenopodium album*. *Phytochemistry*, 96: 208-213
- Devi R, Verma R, Dhalaria R, Kumar A, Kumar D, Puri S, Thakur M, Chauhan S, Chauhan PP, Nepovimova E, Kuca K, 2023. A systematic review on endophytic fungi and its role in the commercial applications. *Planta*, 257(4): 70
- Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2): 88-95
- Hu YJ, Hu JX, Zhang CG, Chang XY, Chen MJ, 2024. Two new endophytic fungal species of *Diaporthe* in the leaves of *Camellia oleifera*. *Mycosystema*, 43(6): 240037 (in Chinese)
- Huang Y, Meng H, He X, Yang Y, 2024. Research progress on diversity and functions of endophytic fungi in *Aquilaria* genus. *Chinese Herbal Medicines*, 55(4): 1397-1406 (in Chinese)
- Jia M, Chen L, Xin HL, Zheng CJ, Rahman K, Han T, Qin LP, 2016. A friendly relationship between endophytic fungi and medicinal plants: a systematic review. *Frontiers in Microbiology*, 7: 906
- Li C, Wu YH, Yao QZ, 2023. Composition and diversity of culturable endophytic fungal community in roots of two larch species in Inner Mongolia. *Mycosystema*, 42(5): 1045-1062 (in Chinese)
- Li LY, Wang YD, Liu ZL, Sun BD, Yu M, Niu SB, Ding G, 2020. Resorcylic acid analogs from the desert plant endophytic fungus *Rhinoctadiella similis*. *Mycosystema*, 39(3): 589-598 (in Chinese)
- Meepagala KM, Briscoe WE, Tehen N, Johnson RD, Clausen BM, Duke SO, 2018. Isolation of a phytotoxic isocoumarin from *Diaporthe eres*-infected *Hedera helix* (English ivy) and synthesis of its phytotoxic analogs. *Pest Management Science*, 74(1): 37-45
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM, 2009. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human

- pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(12): 3851-3861
- Saddiqa A, Çakmak O, Usman M, 2017. Isocoumarins and 3,4-dihydroisocoumarins, amazing natural products: a review. *Turkish Journal of Chemistry*, 41(2): 153-178
- Saeed A, 2016. Isocoumarins, miraculous natural products blessed with diverse pharmacological activities. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 116: 290-317
- Tang GM, Zhang L, Wei Y, Fu J, Chen HQ, Zhang XQ, Mei WL, Dai HF, Guo ZY, 2024. Alkaloid secondary metabolites from a plant endophytic fungus *Purpureocillium lilacinum*. *Mycosystema*, 43(4): 230282 (in Chinese)
- Verma VC, Kharwar RN, Strobel GA, 2009. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Natural Product Communications*, 4(11): 1934578X0900401114
- Wang HF, Mei WL, Gai CJ, Dai HF, Wang P, Tan ZQ, 2022. Secondary metabolites of marine-derived fungus *Penicillium* sp. WP-13. *Mycosystema*, 41(5): 782-791 (in Chinese)
- Wang SP, Zhuo MQC, Chen J, Jiang XZ, Wang M, 2022. Difference of endophytic fungal communities between highland barley cultivars resistant and susceptible to powdery mildew. *Mycosystema*, 41(12): 1950-1959 (in Chinese)
- Wang ZP, Li FF, Xie QY, Ma QY, Yang L, Dai HF, Luo DQ, Zhao YX, 2023. Study on the chemical constituents from the marine-derived actinomycete *Actinoplanes* sp. M416. *Journal of Tropical Oceanography*, 42(5): 38-44 (in Chinese)
- Zhang J, Lu J, Zhu Y, Shen X, Zhu B, Qin L, 2024. Roles of endophytic fungi in medicinal plant abiotic stress response and TCM quality development. *Chinese Herbal Medicines*, 16(2): 204
- Zhang PX, Han YR, Chang XY, Hu JX, Liu YJ, Chen MJ, 2024. Three new endophytic species of *Neosetophoma* in the roots of *Polygonatum cyrtoneura*. *Mycosystema*, 43(5): 230358 (in Chinese)
- Zheng R, Li S, Zhang X, Zhao C, 2021. Biological activities of some new secondary metabolites isolated from endophytic fungi: a review study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2): 959
- [附中文参考文献]
- 陈苹, 吴娇, 戴好富, 解修超, 梅文莉, 2008. 海南粗榧内生真菌 S26 化学成分研究. *中国药物化学杂志*, 84(4): 279-283
- 程璐, 翟亚楠, 孙立彦, 2021. 地衣及其内生真菌活性次级代谢产物研究进展. *菌物学报*, 40(1): 14-30
- 胡雨娟, 胡江昕, 张春光, 常晓云, 陈名君, 2024. 油茶叶内生真菌间座壳属 *Diaporthe* 两个新种. *菌物学报*, 43(6): 240037
- 黄颖, 孟慧, 何欣, 杨云, 2024. 沉香属植物内生真菌多样性及功能研究进展. *中草药*, 55(4): 1397-1406
- 李聪, 乌有汗, 姚庆智, 2023. 内蒙古地区两种落叶松根系可培养内生真菌群落组成与多样性. *菌物学报*, 42(5): 1045-1062
- 李露莹, 王彦多, 刘振亮, 孙炳达, 于猛, 牛树彬, 丁刚, 2020. 一株特殊生境荒漠药用植物沙蓬内生真菌 *Rhinocladiella similis* 中苯甲酸大环内酯化合物. *菌物学报*, 39(3): 589-598
- 唐官美, 张丽, 韦媛, 付姣, 陈惠琴, 张雪晴, 梅文莉, 戴好富, 郭志勇, 2024. 植物内生真菌 *Purpureocillium lilacinum* 的生物碱类次级代谢产物. *菌物学报*, 43(4): 230282
- 王慧芳, 梅文莉, 盖翠娟, 戴好富, 王佩, 谭志琼, 2022. 海洋真菌 *Penicillium* sp. WP-13 次级代谢产物研究. *菌物学报*, 41(5): 782-791
- 王生萍, 卓玛曲措, 陈娟, 蒋先芝, 旺姆, 2022. 抗感白粉病青稞的内生真菌群落差异分析. *菌物学报*, 41(12): 1950-1959
- 王子鹏, 李芬发, 谢晴宜, 马青云, 杨理, 戴好富, 罗都强, 赵友兴, 2023. 海洋放线菌 *Actinoplanes* sp. M416 化学成分研究. *热带海洋学报*, 42(5): 38-44
- 张佩璇, 韩一人, 常晓云, 胡江昕, 刘玉军, 陈名君, 2024. 多花黄精根茎内生真菌新棘壳孢属 *Neosetophoma* 三个新种. *菌物学报*, 43(5): 230358