

新疆远志内生真菌的分离及其代谢产物分析

付建红*, 熊东兰

(新疆师范大学生命科学学院, 新疆 乌鲁木齐 830054)

摘要: 采用组织块法从栽培新疆远志(*Polygala hybrida* DC)的根、茎、叶中分离内生真菌 32 株. 利用化学成分的系统预试验, 对部分菌株发酵液中代谢产物进行研究. 结果表明: 新疆远志内生真菌代谢产物的种类比较多, 主要是皂苷、内脂、香豆素、生物碱、蛋白质及糖类物质. 采用薄层层析(TLC)和紫外-可见分光光度法对内生真菌发酵液进行分析, 最终发现真菌 YZ-31 可代谢产生皂苷等成分. 经形态学初步鉴定该菌株为交链孢霉属(*Alternaria* Nees)真菌.

关键词: 新疆远志; 内生真菌; 分离; 生物活性物质

中图分类号: Q 939. 93

文献标志码: A

文章编号: 0438-0479(2012)05-0929-06

新疆远志(*Polygala hybrida* DC)系远志科(Polygalaceae)远志属(*Polygala*)多年生草本植物, 生于海拔 1 200~1 750 m 的山坡林下、草地或河漫滩沙质土上. 本种全草药用, 味苦, 性辛、温, 具有祛痰、利窍、益智、安神的功效^[1]. 远志属药用植物含有多种成分, 如皂苷、呋酮、香豆素、黄酮、生物碱及糖类衍生物, 主要药用成分是皂苷类化合物. 该属植物的皂苷为齐墩果烷型三萜皂苷, 结构较为复杂. 药理研究表明, 远志皂苷在降血糖、增强免疫力、镇静、祛痰镇咳及降压等方面有广泛的生物活性^[2-5]. 目前获得皂苷主要是从植物中提取, 在原料上受到很大限制^[4, 6-9]. 作为一种主产于我国新疆的药用植物, 国内外对新疆远志的研究较少.

植物内生真菌(endophytic fungus)是指生活在健康植物组织内部、但不引起植物体病害的真菌^[10], 这类菌资源十分丰富, 是目前开发较少的微生物类群^[11], 已经发现许多内生真菌能够产生与宿主植物相同或相似的具生物活性的次级代谢产物^[12-15]. 然而对于远志内生真菌的研究, 国内外仅有零星报道. 崔晋龙等^[16]2007 年从不同生长时期的野生宽叶远志中分离出内生真菌, 并研究了各菌株对 3 种指示菌的拮抗作用. 王玉君等^[17]2009 年比较了从栽培远志和野生远志中分离的内生真菌在属种、数量及抗菌活性上的不同.

有关远志内生菌产生药用成分的研究鲜见报道, 因此开展新疆远志内生真菌的分离及其代谢产物的研究, 有可能寻找到新的药理活性物质包括皂苷类物质, 为物种保护和天然活性成分的开发利用提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 材料、仪器与试剂

材料来源: 栽培新疆远志 2009 年 7 月采于新疆巴里坤白石头乡草牧场.

主要仪器及试剂: RE-52A 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); 3K30 台式冷冻离心机(Sigma 公司); UV-4802H 型紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司); SW-SJ-IFD 型超净工作台(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); ZHWY-200B 恒温培养振荡器(上海普城分析仪器制造有限公司); LRH-250 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); JY96-IIN 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); DI-220ASC-LED 双目生物显微镜. 香草醛、硅胶 GF254、CMC-Na 等均为分析纯; 齐墩果酸标准品(批号为 A0117)购自成都思科华生物技术有限公司, 纯度 98% 以上.

培养基: 真菌分离培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA), 另加质量分数为 3×10^{-5} 的链霉素; 发酵培养基为马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB).

1.2 内生真菌的分离

选取长势好、无病害栽培新疆远志植株的根、茎、叶, 先用自来水冲洗干净, 用滤纸吸干水分, 然后进行表面消毒处理. 将根、茎截成长约 1 cm 的小段, 叶剪成

收稿日期: 2011-11-24

基金项目: 新疆维吾尔自治区高校科研计划青年教师科研启动基金项目(XJEDU2009S68); 新疆师范大学博士科研启动基金项目(XJNUBS0905); 新疆师范大学校级重点实验室开放基金项目(XJKL10-9)

* 通信作者: fjh_719@163.com

约 0.5 cm×0.5 cm 的小块,在经过紫外消毒的接种间内,把剪好的材料置于体积分数为 75% 的乙醇中浸泡 1~5 min(叶片 1 min,根、茎 5 min),并用无菌水冲洗 4 次,再用质量分数为 0.525% 次氯酸钠浸泡 7 min,最后用无菌水冲洗 5 次,用无菌滤纸吸干水分,用无菌刀片将表面消毒过的远志根、茎纵向切开,切面向下置于分离培养基上;也可小心刮除根、茎外皮,转接到分离培养基上,28 ℃ 避光培养。样品和对照各设 3 个重复,对照为 0.1 mL 最后一次冲洗的无菌水涂布于分离培养基上培养 48 h 以上,若不长菌可确定为表面消毒完全,分离得到的是内生菌。

接种物培养 2~3 d 后,其边缘长出菌丝,用接种针挑取边缘生长良好的菌丝,分别接种在新的固体培养基上,待新接种的菌丝长成菌落后,再挑取其边缘的菌丝培养,如此反复纯化,得到纯化的菌株。挑取纯化的产远志皂苷内生菌 YZ-31 尖端菌丝接种到 PDA 培养基上,在温度为 25~27 ℃ 条件下避光培养数日后观察菌落形态特征,利用印片法观察菌丝体和孢子的形态特征,内生真菌的分类鉴定参照文献[18]。

1.3 内生真菌的液体培养

挑取 2~3 块活化了的内生真菌接种于 PDB 培养基中,500 mL 三角瓶装液量为 120 mL。在 28 ℃,150 r/min 摇床振荡培养 6~7 d 后,发酵液在 6 000 r/min 下离心 30 min,取上清液进行化学成分系统预试验,以发酵初始(0 d)培养基中各组分的化学反应为对照。

各种内生真菌的液体发酵培养物用双层纱布过滤,滤取的菌丝体放入烧杯中,添加体积分数为 95% 乙醇进行超声波破壁,破壁后离心,取上清液。将发酵液上清和菌体破壁后的上清液分别转入旋转蒸发仪中 40 ℃ 减压浓缩,待浓缩至 15 mL 左右时,向其中添加等体积的丙酮和乙醚进行多次萃取,合并有机相,再进行减压浓缩,最后获得的淡黄色物质,冷冻干燥后加入适量甲醇溶解,即为待测样品溶液。

1.4 内生真菌发酵液中化学成分的系统预

试验

将发酵液离心,取上清液 2~3 mL 放入试管中,以检测氨基酸、蛋白质、糖类、酚类、有机酸、皂苷类物质、蒽醌类、黄酮类物质、内酯、香豆素、强心苷以及生物碱等物质,检测方法见文献[19]。

氨基酸、多肽、蛋白质检测:(i)双缩脲试验,发现溶液出现紫红色;(ii)茚三酮试验,在沸水上加热 5 min,放冷出现蓝色。

糖、多糖检测:(i)碱性酒石酸酮实验(Fehling 反

应),取检测液在沸水浴上加热 10 min,产生红色氧化亚铜沉淀;(ii) α -萘酚试验(Molish 反应),取检测液加入 α -萘酚乙醇溶液,缓慢加入硫酸,有紫红色出现。

酚类成分检测:(i)三氯化铁试验,取检测液加入质量分数为 1% 三氯化铁乙醇溶液,出现蓝绿色;(ii)明胶实验,取检测液加入氯化钠-明胶产生白色沉淀,表示含有鞣质。

有机酸检测:取检测液,pH 试纸检查,pH 值为 5。

皂苷检测:取检测液,置于试管中激烈摇荡,产生持续性泡沫,可能含有皂苷。

蒽醌类物质检测:取检测液加入质量分数为 10% 氢氧化钠溶液,产生红色,加入少量过氧化氢溶液,加热,红色不消失。

黄酮类化合物的检测:(i)取检测液加入数滴浓盐酸及少量镁粉,溶液出现红色;(ii)取检测液加入质量分数为 1% 三氯化铝后,溶液出现黄色。

内酯、香豆素的检测:取检测液加入质量分数为 1% 氢氧化钠溶液,在沸水中煮沸 5 min,得澄清溶液,再加少量稀盐酸酸化,溶液变浑浊,可能含内酯类化合物。

强心苷类的检测:取检测液加入碱性苦味酸试剂,放置 15 min,溶液呈现红色。

生物碱的检测:(i)取检测液加入碘化汞钾试剂,产生白色沉淀;(ii)取检测液加入碘化铋钾试剂,产生橘红色沉淀;(iii)取检测液加入硅钨酸试剂,产生灰白色沉淀。

1.5 远志皂苷的薄层层析(TLC)检测^[20-21]

用甲醇配制质量浓度为 0.5 mg/mL 齐墩果酸标准品溶液。用微量点样器吸取标准品溶液和样品溶液,点样于薄层硅胶 G 板上。每次点样均须用电风吹干,将点好样品的薄层板放入层析缸中。采用不同的展开剂进行 TLC,展开剂分别为 V(三氯甲烷):V(甲醇):V(水)=26:14:3.5;V(三氯甲烷):V(丙酮):V(正己烷):V(乙酸)=8:4:0.2:0.5;V(三氯甲烷):V(甲醇):V(水)=65:35:10,研究不同展开剂的分离效果。当上行展开前沿距薄层板上端 1 cm 处时终止层析。将板取出吹干后,喷质量分数为 10% 硫酸溶液,用电风吹干显色约 5 min。然后置于波长为 365 nm 紫外线分析仪下观察荧光斑点,记录斑点位置、个数和颜色。

1.6 紫外-可见分光光度法检测远志皂苷

远志皂苷标准品溶液最大吸收波长的测定:参照文献[8]进行。准确量取齐墩果酸标准品溶液 50 μ L 置于 10 mL 具塞试管中,于 60 ℃ 水浴上挥发除去甲醇,

取质量分数为 5%香草醛溶于冰乙酸溶液 0.2 mL 和高氯酸 0.8 mL,摇匀,60 ℃水浴加热 15 min,取出后立即用流水冷却,加入 5 mL 冰乙酸稀释,以不加标准品溶液的平行样为空白,在紫外-可见分光光度计上进行扫描,确定最大吸收波长。

取硅胶 G 薄板上与标准品有相同斑点位置值的样品溶液,用 UV-4802H 型紫外-可见分光光度计在 200~700 nm 范围内扫描样品与标准品。

2 结果与分析

2.1 新疆远志内生真菌的分离

经过分离、筛选、纯化的反复过程,我们从新疆远志植株的不同组织部位获得内生真菌 32 株,其中 6 株由新疆远志根中分离得到,20 株由茎中分离得到,6 株由叶中分离得到。由此可知,内生真菌多共生于栽培新疆远志的茎部。以齐墩果酸为对照品,用 TLC 和紫外-可见分光光度法对分离到的 32 株内生真菌进行产皂苷类物质的能力鉴定,检测结果发现有 1 株菌能产生

皂苷类物质,将该菌命名为 YZ-31。

2.2 内生真菌发酵液中化学成分的系统预试验结果

为了明确新疆远志内生真菌的液体发酵培养物中含有何种化学成分,同时也是为了确定其中是否含有皂苷类化合物,对内生真菌的发酵液进行了比较系统的试验。测定结果见表 1,从表 1 结果可以看到,在初始情况下发酵培养基(对照)的有机酸和糖类的检测为阳性反应,因为 PDA 培养基成分中含有葡萄糖和淀粉,且配制好的培养基呈酸性。新疆远志内生真菌 YZ-31 在液体培养条件下可以产生蛋白质、皂苷类物质、生物碱、内脂及香豆素等多种活性成分。通过预试验初步判断内生真菌 YZ-31 可产生远志皂苷,要进一步确定 YZ-31 菌株的发酵代谢产物中是否含有皂苷,还需提取菌株代谢物中活性成分并采用 TLC 和紫外-可见分光光度法检测。

2.3 远志皂苷的 TLC 检测

对不同组成配比的展开剂进行比较,结果表明,展开剂的选择是以 V(三氯甲烷):V(甲醇):V(水)=

表 1 新疆远志内生真菌 YZ-31 发酵液中化学成分的分析结果
Tab.1 Analysis result of fermentation metabolites from strain YZ-31

检测物质	检测方法	现象											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
氨基酸	茚三酮试验	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
蛋白质	双缩脲试验	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
单糖	Fehling 试剂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
多糖	Molish 试剂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
酚类	FeCl ₃ 试验	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	明胶试验	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
有机酸	pH 试纸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
皂苷类物质	泡沫试验	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
蒽醌类物质	蒽醌检测法	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
黄酮类化合物	黄酮检测法	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
内脂、香豆素	内脂检测法	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
强心苷类	碱性苦味酸试剂	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
生物碱	碘化汞钾	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	碘化铋钾	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	硅钨酸	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

注:“+”表示阳性反应;“—”表示阴性反应,0~10 表示观察时间,单位:d。

26 : 14 : 3.5 的展开效果最佳. 在该条件下, 标准品和样品中皂苷的吸附作用力较强, 分离效果较好.

对内生真菌的发酵提取物进行 TLC 检测, 结果只有 1 株菌株(YZ-31)的发酵提取物与标准品齐墩果酸有显色相同、迁移率相当的荧光斑点, 其 TLC 图谱如图 1 所示. 菌株 YZ-31 的发酵液有 3 条紫罗兰色层析带斑点, 相对迁移率斑点位置值分别为 0.92, 0.27 和 0.08. 其中有 1 条层析带与齐墩果酸的层析带迁移率相当, 初步表明菌株 YZ-31 可能发酵产生远志皂苷.

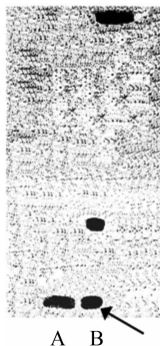


图 1 标准品(A)和菌株 YZ-31 样品(B)的 TLC 图谱
Fig. 1 TLC chromatogram of standard (A) and sample YZ-31 (B)

2.4 紫外-可见分光光度法测定结果

最大吸收波长的确定: 取远志皂苷标准品溶液和样品溶液, 经显色后进行光谱扫描, 结果表明, 标准品溶液与样品溶液在 568 nm 处均有最大吸收峰, 多次重复, 峰形一致, 且阴性对照无干扰. 因此, 可选择 568 nm 作为样品测定的波长.

利用结构类似物紫外光谱相似的特性, 用紫外-可见分光光度法进一步分析菌株 YZ-31 的代谢粗提物, 结果见图 2 所示. 与标准品齐墩果酸出峰位置相比较, YZ-31 菌株样品也存在相同波长的吸收峰, 由此可以进一步判定菌株 YZ-31 的发酵产物与标准品齐墩果酸有相同的发色团, 菌株 YZ-31 可能产生远志皂苷成分.

2.5 YZ-31 菌株的形态观察

内生真菌 YZ-31 菌株在 PDA 培养基上呈绒状, 灰黑色至黑色(图 3A). 显微镜下观察菌丝暗至黑色, 有隔膜. 以分生孢子进行无性繁殖. 分生孢子梗较短, 单生或丛生, 大多数不分枝, 与营养菌丝几乎无区别. 分生孢子呈纺锤状或倒棒状, 顶端延长成喙状, 多细胞, 有壁砖状分隔, 分生孢子常数个成链, 一般为褐色(图3B). 尚未发现有性世代. 经菌落形态以及菌丝、分

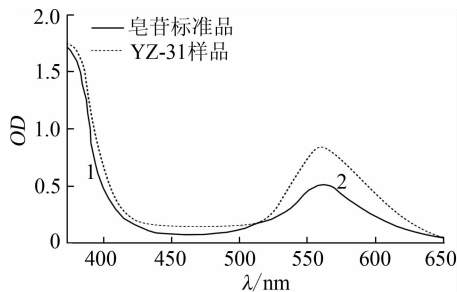
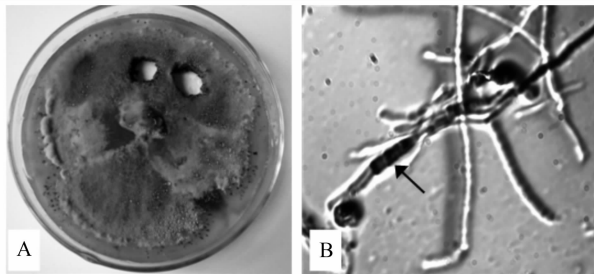


图 2 皂苷标准品和 YZ-31 样品的吸收光谱图
Fig. 2 The absorption spectrum of the standard saponins and the sample YZ-31



A. 菌落形态; B. 分生孢子显微结构(10×40).

图 3 远志皂苷产生菌 YZ-31 的形态学观察
Fig. 3 Morphologic observation of *Polygala* saponins-producing endophytic fungus YZ-31

生孢子显微形态观察, 参照《真菌鉴定手册》, 将菌株 YZ-31 初步鉴定归属为交链孢霉属(*Alternaria* Nees) 真菌.

3 讨 论

远志是中国传统中药, 富含三萜皂苷、寡糖多酯、生物碱、香豆素等多种成分, 其中主要药效成分是皂苷. 实验结果表明: 皂苷除了具有镇静、祛痰活性之外, 还具有防止脑萎缩、增加脑重量的作用; 可明显拮抗小鼠学习记忆功能障碍; 并且能减轻氧自由基的产生, 以减少氧自由基对脑组织的损伤^[22]. Kou 等^[23]报道了瓜子金的水提物中分离的三萜皂苷类化合物有明显的抗炎活性. 此外, 皂苷对肝损伤有非常明显的治疗作用. 徐康平等^[24]研究表明: 黄花倒水莲的总皂苷具有明显的降血脂、降甘油三酯作用. 皂苷是一类结构复杂、且性质特殊的分子, 在同一植物中大多结构相近(有时仅为一个羟基的差别), 因此皂苷的分离一直是富有挑战性的课题. 1971 年 Pelletier 等^[25]首次报道了从远志中得到细叶远志皂苷(*tenuifotin*), 并鉴定了其结构为 2 β -27-二羟基-23-羧基齐墩果酸-3 β -O-葡萄糖苷^[25]. 日本学者 Sakuma 等^[26]于 1981 年报道了从远

志中分离到原生苷远志皂苷 G、F 和 A、B、E。此后,国内外学者对远志属的多种植物进行了化学成分的研究。目前已分离到近 90 多种皂苷成分。吴志军等^[27]从云南产黄花远志茎皮的乙醇提取物中分离得到 4 个新的黄花远志皂苷(arillatanoside)A~D,并通过波谱方法推定了它们的结构。周凡蕊等^[28]采用乙醇回流提取,运用一系列分离方法和现代谱学方法从西南远志中分离并鉴定了 4 个齐墩果酸型皂苷类化合物,但是不能将它们有效地分开。姜艳艳等^[29]首次从卵叶远志中分离得到黄花倒水莲皂苷 A。

本研究通过 TLC 分析结果发现有 1 株内生真菌 YZ-31 与皂苷标准品有相同的迁移位点和相似的斑点颜色,紫外-可见分光光度法进一步分析后观察到菌株 YZ-31 的发酵粗提物与标准品有相同波长的吸收峰。综合以上试验结果确定菌株 YZ-31 可能具有产皂苷类化合物的能力,这一结论与人们提出的“内共生理论”以及内生真菌能够产生与宿主植物相同或相似的生物活性物质是一致的。深入研究开发有望实现大规模工业化发酵生产,从而为皂苷类化合物生产开辟新的途径。

本研究通过对栽培新疆远志植物体内生真菌的分离,共获得 32 株不同形态的内生真菌,其普遍存在于植株的根、茎、叶器官中,但茎中含菌株数高于根和叶。菌株 YZ-31 分离自新疆远志根部,其在常规的 PDB 培养基中易于培养、生长迅速,表明该菌是一株优良的远志皂苷产生菌,具有潜在的应用前景。对菌株 YZ-31 发酵培养条件进行优化和诱变育种,进一步提高其皂苷含量研究将成为下一步工作的重点。另外,通过分子生物学方法来确认 YZ-31 菌株的种属分类也有待进一步研究。

致谢:衷心感谢厦门大学生命科学学院陈清西教授对该文的指导和修改。

参考文献:

- [1] 陈书坤. 中国远志属植物的分类研究[J]. 植物分类学报, 1991, 29: 193-229.
- [2] 宋成芝, 吴章康, 华燕. 远志属药用植物化学成分和生物活性研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2008(3): 28-29.
- [3] 傅品, 张东明, 陈若芸. 远志属植物的皂苷类成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2006, 37(1): 144-146.
- [4] 姜博, 季伟鑫, 盛宝英. 远志木部及皮部总皂苷含量比较分析[J]. 黑龙江医药科学, 2009, 32(1): 24-25.
- [5] 张晓萍. 远志总皂苷的提取分离及鉴定[J]. 黑龙江医药, 2004, 17(3): 170-171.
- [6] 刘友平, 万德光, 刘涛, 等. 分光光度法测定不同产地远志总皂甙的含量[J]. 成都中医药大学学报, 2000, 23(2): 46-47.
- [7] 吴晓斌, 任凤莲, 邱昌桂, 等. 百合皂苷的提取、纯化及其鉴定[J]. 广州化学, 2005, 30(2): 36-40.
- [8] 魏静, 张春红, 刘长江. 比色法测定大豆总皂甙的研究[J]. 粮油加工, 2006, 10: 60-62.
- [9] 李波, 祁宏英, 刘泽辉, 等. 苜蓿中总皂甙的提取与比较研究[J]. 高师理科学刊, 2007, 27(6): 46-48.
- [10] 何劲, 刘蕴哲, 康冀川. 植物内生菌及其在农业和医学上的用途[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(3): 113-115.
- [11] Miroslava K, Martina F. Mycological flora on tree fruits, crust, leaves and pollen *Sorbus domestica* L[J]. Ann Agric Environ Med, 2007, 14(2): 229-232.
- [12] 张玲琪, 郭波, 李海燕. 长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究[J]. 中草药, 2000, 31(11): 805-807.
- [13] 张玲琪, 谷苏, 邵华. 发酵产鸢尾酮真菌的分离鉴定及生香特性的初步研究[J]. 菌物系统, 1999, 18(1): 49-54.
- [14] Findlay J A, Buthelezi S, Li G Q, et al. Insect toxins from an endophytic fungus from wintergreen[J]. J Nat Pro, 1997, 60: 1214-1215.
- [15] Zhang B, Salituro G, Szalkowski D, et al. Discovery of small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice[J]. Science, 1999, 284: 974-981.
- [16] 崔晋龙, 郭吉刚, 范黎. 远志内生真菌分离鉴定及活性筛选[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5): 839-842.
- [17] 王玉君, 崔晋龙, 苏红, 等. 远志内生真菌抑菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 404-411.
- [18] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 566-571.
- [19] 赵永昕. 新疆天山花楸黄酮类化合物的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆大学, 2006: 19-21.
- [20] 孙文基, 沙振方, 向红红. 远志及其制剂中远志皂甙元的薄层扫描法测定[J]. 中成药, 1990, 12(5): 15-17.
- [21] 郭一敏, 郭希圣. 远志的薄层分离和分光光度测定[J]. 中草药通讯, 1975, 6(3): 19-21.
- [22] 陈勤, 曹炎贵, 张传惠. 远志皂苷对 β -淀粉样肽和鹅膏蕈氨酸引起胆碱能系统功能降低的影响[J]. 药学学报, 2002, 37(12): 913-917.
- [23] Kou J P, Si M D, Dai G F, et al. Antiinflammatory activity of *Polygala japonica* extract[J]. Fitoterapia, 2006, 77(6): 411-415.
- [24] 徐康平, 黄伟, 谭健兵, 等. 黄花倒水莲降血脂活性成分研究[J]. 中药材, 2006, 29(1): 16-19.
- [25] Pelletier S W, Nakamura S, Soman R. Constituents of *Polygala* species the structure of tenuifolin, a prosapogenin from *P. Senega* and *P. Tenuifolia*[J]. Tetrahed-

- ron, 1971, 27: 4417-4427.
- [26] Sakuma S, Sho J. Studies on the constituents of the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow. I. Isolation of saponins and the structures of onjisaponins G and F[J]. Chem Pharm Bull, 1981, 29(9): 2431-2441.
- [27] 吴志军, 欧阳明安, 杨崇仁. 黄花远志的新齐墩果烷型三萜皂甙[J]. 云南植物研究, 1999, 21(3): 1-6.
- [28] 周凡蕊, 王军民, 周潇, 等. 西南远志中皂苷类成分的分离与鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2011, 23: 670-674, 725.
- [29] 姜艳艳, 段以以, 刘洋, 等. 远志化学成分分离与结构鉴定[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(2): 122-125.

Isolation of Endophytic Fungus from *Polygala hybrida* DC Cultivated and the Study on Its Bioactive Metabolites

FU Jian-hong^{*}, XIONG Dong-lan

(College of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China)

Abstract: Thirty-two endophytic fungal strains were isolated from roots, stems and leaves of *Polygala hybrida* DC cultivated. Their metabolites were studied by preliminary tests of chemical constituents. The results indicated that the endophytes could produce multi-kinds of metabolites, including saponins, lactone, coumarin, alkaloids, proteins and polysaccharide. Their fermentation metabolites of the above-mentioned fungal strains were studied using TLC and the ultraviolet-visible spectrophotometry. It was found that one strain YZ-31 maybe produce saponins and other components. Through initial characterization of its morphology, this fungus belongs to the genus of *Alternaria* Nees.

Key words: *Polygala hybrida* DC; endophytic fungi; isolation; bioactive metabolites