

# 湛江红树林可培养内生真菌多样性及 *Stemphyliums* sp. SCSIO 40436 次生代谢产物分离与鉴定

王璐<sup>1,2</sup>, 叶伟霞<sup>3</sup>, 赵梦冉<sup>1,2</sup>, 张庆波<sup>1,2</sup>, 张丽萍<sup>1</sup>, 张长生<sup>1,2</sup>, 张文军<sup>\*1,2</sup>

1 中国科学院南海海洋研究所 中国科学院海洋微生物研究中心 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广东省海洋药物重点实验室, 广东 广州 510301

2 中国科学院大学, 北京 100049

3 暨南大学药学院中药与天然药物研究所, 广东 广州 510632

王璐, 叶伟霞, 赵梦冉, 张庆波, 张丽萍, 张长生, 张文军. 湛江红树林可培养内生真菌多样性及 *Stemphyliums* sp. SCSIO 40436 次生代谢产物分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 2995-3007

Wang Lu, Ye Weixia, Zhao Mengran, Zhang Qingbo, Zhang Liping, Zhang Changsheng, Zhang Wenjun. Diversity of culturable endophytic fungi from Zhanjiang mangroves and secondary metabolites of the isolate *Stemphyliums* sp. SCSIO 40436[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 2995-3007

**摘要:**【背景】红树林生态系统位于陆地和海洋的交汇地带, 具有巨大的生态价值和经济效益。红树林内生真菌种类丰富, 次生代谢产物结构多样、活性优异, 是小分子天然产物和药物研发的重要来源。【目的】从湛江红树林植物样品分离、鉴定和筛选内生真菌, 分离筛选菌株 *Stemphyliums* sp. SCSIO 40436 次生代谢产物并进行活性筛选。【方法】基于 ITS 序列鉴定种属研究内生真菌多样性; 通过高效液相色谱和滤纸片扩散法筛选大米和燕麦固体培养基培养菌株的化学多样性及抑菌活性。应用硅胶、凝胶和反相色谱等色谱学方法分离纯化; 应用高分辨质谱、核磁、X 射线单晶衍射、圆二色谱等波谱手段确定化合物的平面结构与立体构型; 采用微量肉汤稀释法测定分离化合物的最小抑菌浓度。【结果】从湛江高桥红树林植物样品分离纯化获得 52 株内生真菌, 通过 ITS 序列比对归属于 29 个属。筛选到菌株 *Stemphylium* sp. SCSIO 40436, 从其发酵粗提物中分离得到 5 个聚酮化合物 stemphol (1)、macrosporin (2)、altersolanol A (3)、alterporriol E (4) 和 alterporriol D (5), 获得化合物 1 和 3 单晶结构。Stemphol (1) 对革兰氏阴性菌鲍曼不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 的最小抑制浓度达到 8  $\mu\text{g/mL}$ 。【结论】湛江红树林植物分离的多株内生真菌 ITS 比对相似度低, 为潜在新种, 丰富了红树林内生真菌的多样性; 红树林内生真菌 *Stemphylium* sp. SCSIO

基金项目: 国家自然科学基金(41676165); 国家重点研发计划(2019YFC0312503); 海南省重大科技计划(ZDKJ202018); 中国科学院前沿科学重点研究项目(QYZDJ-SSW-DQC004)

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (41676165); National Key Research and Development Program of China (2019YFC0312503); Key Science and Technology Project of Hainan Province (ZDKJ202018); Key Research Program of Frontier Sciences of Chinese Academy of Sciences (QYZDJ-SSW-DQC004)

\*Corresponding author: E-mail: wzhang@scsio.ac.cn

Received: 2021-12-24; Accepted: 2022-02-14; Published online: 2022-04-01

40436 产活性抗菌化合物 stemphol (1), 首次发现 stemphol 对革兰氏阴性菌鲍曼不动杆菌的良好抑制活性。

关键词: 红树林内生真菌; 匍柄霉属; 抑菌活性; 次生代谢产物

## Diversity of culturable endophytic fungi from Zhanjiang mangroves and secondary metabolites of the isolate

### *Stemphyliums* sp. SCSIO 40436

WANG Lu<sup>1,2</sup>, YE Weixia<sup>3</sup>, ZHAO Mengran<sup>1,2</sup>, ZHANG Qingbo<sup>1,2</sup>, ZHANG Liping<sup>1</sup>,  
ZHANG Changsheng<sup>1,2</sup>, ZHANG Wenjun<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, Key Laboratory of Tropical Marine Bio-Resources and Ecology, RNAM Center for Marine Microbiology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, Guangdong, China

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

<sup>3</sup> Institute of Traditional Chinese Medicine and Natural Products, College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong, China

**Abstract:** **[Background]** Mangroves, trees and shrubs adaptive to salt, grow along the coast at tropical or subtropical latitudes. Mangrove endophytic fungi are the second largest community of marine fungi, which are rich in secondary metabolites with diverse chemical structures and excellent bioactivities. Therefore, mangrove fungi have proven to be an essential source of natural products and novel drug leads. **[Objective]** To study the diversity of culturable endophytic fungi from Zhanjiang mangroves and to identify bioactive secondary metabolites from the isolate *Stemphyliums* sp. SCSIO 40436. **[Methods]** Endophytic fungi isolated from Zhanjiang mangrove forests were identified based on internal transcribed spacer (ITS) sequence. The production of secondary metabolites on rice and oat solid media was evaluated by HPLC-DAD and filter paper diffusion method. The crude extract was subjected to column chromatography with silica gel and Sephadex LH-20, medium-pressure liquid chromatography, or semi-preparative RP-HPLC. The metabolite structures including absolute configuration were determined by spectroscopic methods (HRESIMS, NMR), X-ray crystallographic analysis, and comparison of electronic circular dichroism. Antimicrobial activities were measured against four indicate strains via the broth microdilution method. **[Results]** A total of 52 strains of culturable endophytic fungi were isolated from the Zhanjiang mangrove forests and categorized into 29 genera. The strain *Stemphylium* sp. SCSIO 40436 was found to be prolific in metabolites. Extensive chromatographic separation of the ethyl acetate extracts afforded five polyketides: stemphol (1), macrosporin (2), altersolanol A (3), alterporriol E (4), and alterporriol D (5). The structures of 1 and 3 were confirmed by X-ray crystallographic analysis. Stemphol (1) exhibited a good activity against the Gram-negative bacterium *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 with a minimum inhibitory concentration (MIC) value of 8 µg/mL. **[Conclusion]** A total of 52 endophytic fungal strains are isolated from the Zhanjiang mangrove forests, among which several strains shared <95% similarity of ITS rDNA sequences, which enriches the diversity of mangrove endophytic fungi.

Stemphol (1) exhibits a moderate activity against the Gram-negative bacterium *A. baumannii*.

**Keywords:** mangrove endophytic fungi; *Stemphyliums* sp.; antibacterial activity; secondary metabolite

红树林处于潮间带区域, 介于陆地生态系统和海洋生态系统之间, 蕴藏丰富多样的微生物群落, 是宝贵的微生物资源库。内生真菌是一类在植物内部定殖但对宿主植物无明显致病性的微生物<sup>[1]</sup>。红树林内生真菌处于高盐、低氧、强风、强紫外线的开放环境, 造就了独特的次生代谢产物合成途径, 这为产生结构独特的小分子天然产物提供了可能<sup>[2]</sup>。近几年的海洋天然产物研究也表明, 来源于红树林内生真菌的次生代谢产物既不同于陆生真菌, 也不同于海洋来源真菌, 因此将红树林来源真菌从海洋来源真菌中分离出来, 作为独立的真菌来源进行研究<sup>[3]</sup>。我国红树林资源丰富, 目前是分离鉴定红树林内生真菌种属最多的国家<sup>[4]</sup>, 从来源于红树林的内生真菌发现了多种骨架结构新颖的化合物。Bai 等<sup>[5]</sup>从南海红树植物木榄内生青霉 *Penicillium* sp. TGM112 分离得到含有 2 个独特螺环的 6/6/6/5 四环类帖 penicianstinoid C、6/6/6/6 四环类帖 penicianstinoid D 和具有五元醚环结构的 6/5/6/6/6/5 六环类帖 penicianstinoid E。Cai 等<sup>[6]</sup>从南海红树植物秋茄叶片内生曲霉 *Aspergillus* sp. SK-28 中分离得到一对新颖的 6/5/4/5/6 环二酮哌嗪生物碱对映异构体(-)和(+)-asperginulin A。国外的科学家也从红树林内生真菌中分离鉴定了一批新颖结构的化合物。Rönsberg 等<sup>[7]</sup>从海桑内生大豆拟茎点种腐病菌 *Phomopsis longicolla* 分离到多个四氢氧杂蒽酮二聚体, 其中 phomoxanthone A 表现出强免疫系统激活活性和促人体癌细胞凋亡活性; Chokpaiboon 等<sup>[8]</sup>从木果楝内生真菌发现独特的 nor-chamigrane 和 chamigrane 内过氧化物 merulins A-D, 其中 merulins C 具有抗血管生成活

性。仅 2014–2018 年科研人员已从红树林内生真菌中分离出具有抗肿瘤、抗菌、抗炎和抗虫害等多种生物活性的次生代谢产物约 630 个<sup>[9–12]</sup>, 为药物先导物的开发提供了研究基础, 同时也为加强红树林病虫害的防治、促进红树林的生态防护提供了可能。

长期以来, 本课题组从事海洋(如海泥、珊瑚、海绵)来源微生物次生代谢产物的研究, 分离鉴定了一些新颖结构的天然产物<sup>[13–14]</sup>。近期, 我们对湛江高桥红树林植物的内生真菌进行了研究, 从中分离纯化内生真菌 52 株, 自一株匍柄霉属 *Stemphylium* 真菌发酵产物分离得到聚酮类化合物 5 个, 其中化合物 stemphol 具有较好的抑菌活性(图 1)。本研究报道红树林内生真菌的分离、鉴定、筛选及对分离筛选菌株 *Stemphyliums* sp. SCSIO 40436 次生代谢产物的分离与鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 红树林植物样品

红树林植物样品采集自湛江高桥红树林保护区(东经 109°76', 北纬 21°57')。

#### 1.1.2 菌株及培养条件

从红树林植物样品分离内生真菌 52 株, 接种至 PDA 培养基或大米和燕麦培养基于 28 °C 培养 15 d, 保藏于中国科学院南海海洋研究所海洋微生物研究中心菌种保藏库。4 种指示菌: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* ATCC 29213)、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, MRSA ATCC 43300)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus* SCSIO ML01)和鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter*

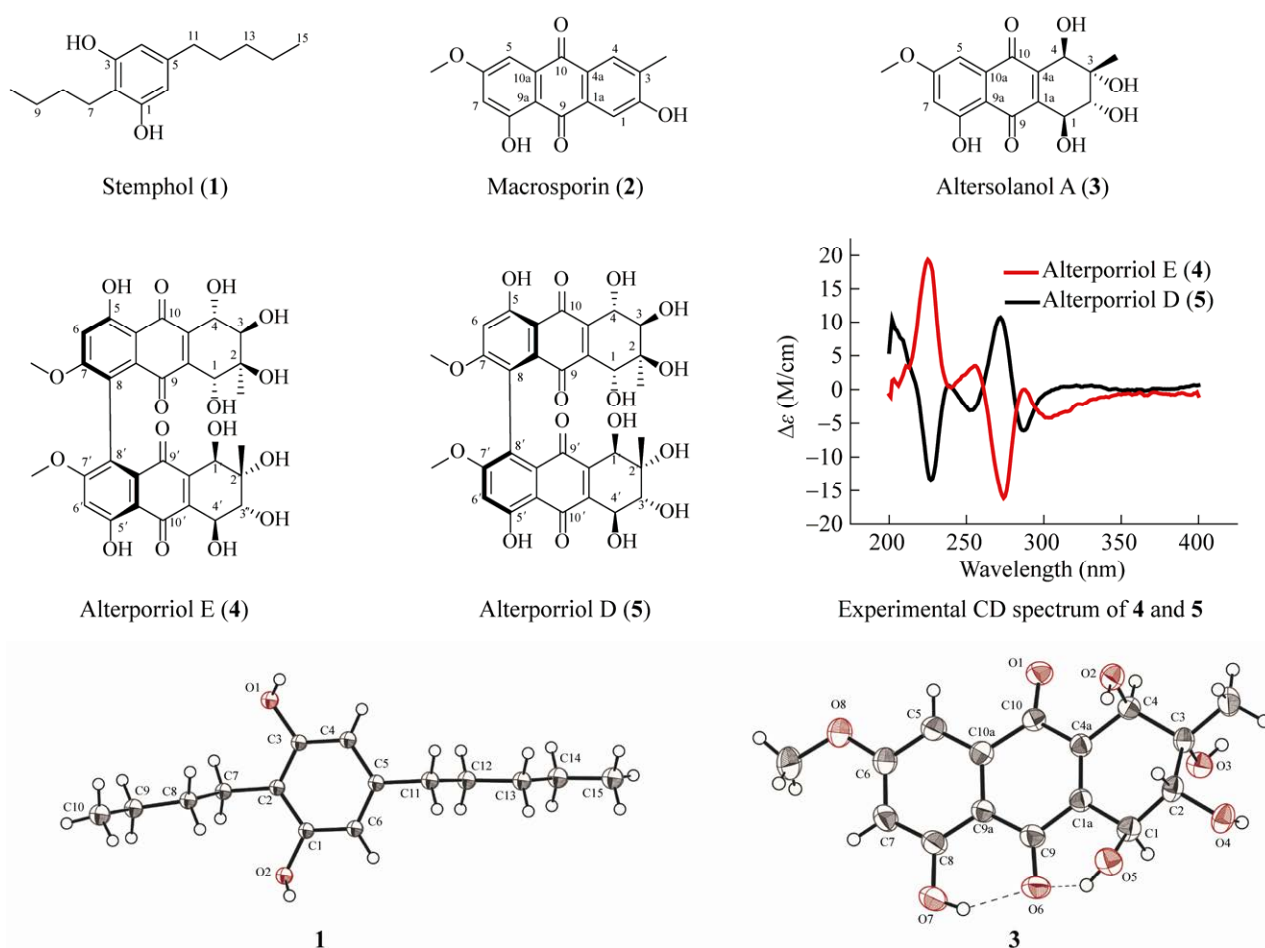


图 1 化合物 1-5 的化学结构与化合物 1 和 3 的单晶结构及化合物 4 和 5 的 CD 谱图

Figure 1 Chemical structures of compound 1-5 and crystal structures of compound 1 and 3; Experimental CD spectrums of 4 and 5.

*baumannii* ATCC 19606)由中国科学院南海海洋研究所提供,用肉汤培养基于 37 °C 培养。

### 1.1.3 主要试剂和仪器及培养基

Fast *Pfu* DNA 聚合酶、dNTPs、核酸电泳分子量 Marker,北京全式金生物技术有限公司; ZYMO Research 公司; 色谱乙腈,安徽时联特种溶剂股份有限公司; 甲醇、氯仿、丙酮、丁酮、无水乙醇,广东广试试剂科技有限公司; 氘代试剂, CIL 公司; 硅胶薄层板,烟台江友硅胶开发有限公司; 凝胶 Sephadex LH-20, Amersham Pharmacia Biotech 公司。高效液相色谱仪、半制备高效液相色谱仪、高效液相半制备

色谱柱, Phenomenex 公司; 超导核磁共振仪、高分辨飞行时间质谱, Bruker 公司; 单晶衍射仪, Rigaku 公司; 圆二色谱仪, AppliedPhotophysics 公司。

培养基参照文献[15]配制:分离培养基为马铃薯葡萄糖培养基; 发酵培养基为大米培养基, 燕麦培养基; 抑菌活性培养基为 LB 培养基和 MH 培养基。

### 1.2 红树林植物样品消毒处理

新鲜植物样品用自来水洗净泥土, 然后进行严格的表面消毒程序: 依次浸泡在 75%酒精 1 min、3%-5%有效氯的次氯酸钠溶液 3 min、

75%的酒精 0.5 min, 然后用无菌水冲洗 3 次, 将根、茎、叶、花、果实、气生根等组织分别剪成约 0.5 cm×0.5 cm 小片铺于已添加氯霉素与链霉素(各 50 μg/mL)的真菌 PDA 培养基上于 28 °C 培养, 待长出单克隆后挑取划线培养。

### 1.3 真菌基因组的提取和 ITS 序列的扩增与鉴定

用灭菌竹签刮取绿豆大小菌丝体, 根据真菌/细菌 DNA 小量提取试剂盒的说明书提取基因组 DNA。以通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGG TGAACCTGCGC-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3')对目的 DNA 片段进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20.0 μL): ddH<sub>2</sub>O 13.0 μL, Fastbuffer 4.0 μL, 引物(10 μmol/L)各 0.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.2 μL, 模板(1 ng/μL) 0.4 μL, Fast *Pfu* (5 U/μL) 0.4 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 40 s, 55 °C 35 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经凝胶电泳检测扩增产物后送至广州擎科生物科技有限公司测序。测序结果提交 GenBank 数据库并进行 BLAST 比对, 确定菌株的分类地位, 将已鉴定的菌株标记后放置-80 °C 保藏。

### 1.4 菌株 *Stemphyliums* sp. SCSIO 40436 的发酵与产物分离

以 PDB 培养基(含 2%海盐)作为种子发酵液, 每 50 mL 离心管中加入 20 mL 培养基, 用灭菌竹签挑取适量菌丝体到培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 3 d 得到种子液。将 20 mL 种子液分别接入到含 15 g 大米和 15 g 燕麦发酵瓶中, 静置培养 32 d 收集得到发酵粗提物。将大米、燕麦发酵粗提物合并后用凝胶 Sephadex LH-20 柱层析(氯仿:甲醇的体积比为 1:1)作为洗脱液, 根据薄层层析(thin layer chromatography, TLC)和高效液相色谱(high pressure liquid chromatography, HPLC)检测结果分析合并, 得

到 4 个组分 Fr.1-4, 组分 Fr.3 进一步用 Sephadex LH-20 凝胶柱层析(氯仿:甲醇的体积比为 1:1), 得到 4 个亚流份 Fr.3-A-Fr.3-D。Fr.3-C 利用半制备高效液相色谱制备(Phenomenex C18 柱, 5 μm, 150.0 mm×4.6 mm)分离纯化, 得到化合物 1 和 2; Fr.3-D 利用半制备高效液相色谱制备(Phenomenex C18 柱, 5 μm, 150.0 mm×4.6 mm)分离纯化, 得到化合物 3。组分 Fr.4 经中压正相色谱分离(石油醚:丙酮的体积比在 0-120 min 内从 100:0 变为 0:100)得到 9 个亚流份 Fr.4-A-Fr.4-I, Fr.4-E 利用半制备高效液相色谱制备(Phenomenex C18 柱, 5 μm, 150.0 mm×4.6 mm)分离纯化, 得到化合物 4 和 5。

### 1.5 抑菌活性检测

依照文献[16]活性检测方法, 用滤纸片扩散法粗测菌株 SCSIO 40436 燕麦发酵粗提物对供试的 4 株指示菌 MRSA、藤黄微球菌、金黄色葡萄球菌和鲍曼不动杆菌的生长抑制活性, 以甲氧苄啶(trimethoprim)作为阳性对照, 以二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)作为阴性对照。采用微量肉汤稀释法测定化合物 1-5 对供试 4 株指示菌的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。每个样品重复 3 次。在二级生物安全实验室的无菌超净台上进行 4 种指示菌的接种培养和抗菌活性的实验操作。用 DMSO 作为溶剂, 将化合物 1-5 配制成浓度为 2.56 mg/mL 的母液, 于-80 °C 保存备用。将 MH 液体培养基加入 96 孔板中, 在第 1 列中每孔加入 200 μL, 第 2 列中加入 195 μL, 剩余每列加入 100 μL, 然后在第 2 列加入化合物母液 5 μL, 吹吸混匀, 再从第 2 列吸取 100 μL 液体置于第 3 列, 吹吸混匀, 以此类推, 依次倍比稀释至第 12 列, 最后一列取 100 μL 液体弃去。按照同样的方法分别加入万古霉素(vancomycin)和环丙沙星(ciprofloxacin)作为阳性对照。用无菌的

MH 液体培养基将培养好的菌液稀释 1 000 倍, 除第 1 列外每孔加 100  $\mu\text{L}$ , 使化合物的终浓度分别为 32.0、16.0、8.0、4.0、2.0、1.0、0.5、0.25 和 0.125  $\mu\text{g/mL}$ 。以上实验每组做 3 个重复。37  $^{\circ}\text{C}$  培养 16–20 h 后, 观察菌株在含有不同浓度化合物孔中的生长情况, 判断能够有效抑制菌株生长的化合物最小浓度值, 即为最小抑菌浓度值。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生真菌多样性

将 52 株内生真菌的 ITS 序列结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 结果表明分布在 2 个门 4 个纲 29 个属(图 2, 表 1), 相似性在 82%–100% 之间(表 1)。其中, 菌株 WH27、WH35、WH44、WH45、WH47、WH51 和 WH56 (表 1, 加粗标出) BLAST 比对最高相似性小于 95%, 可能是潜在的新物种, 需进一步研究确定。

### 2.2 内生真菌在寄主中的分布

利用 PDA 培养基从湛江高桥红树林植物分离得到形态差异的内生真菌 52 株。从分离植物种类看, 秋茄分离菌株数量最多, 占 17.31%

(9 株), 木榄占 13.46% (7 株), 阔苞菊和黄槿各占 11.54% (6 株), 拉关木、苦郎树和无瓣海桑分离菌株数量各占 9.62% (5 株), 红海榄和卤蕨各占 5.77% (3 株), 海漆占 3.85% (2 株), 海桑分离菌株数量最少, 占 1.92% (1 株)(图 3)。从分离组织看, 从各种红树植物的根、茎、叶、花、果实和气生根分离真菌的比例依次是 5.77% (3 株)、50.00% (26 株)、26.92% (14 株)、7.69% (4 株)、5.77% (3 株) 和 3.85% (2 株), 大部分真菌分离自植物的茎和叶(图 3)。

### 2.3 分离菌株的化学多样性筛选及活性筛选

以次生代谢产物化学多样性和生物学活性为导向筛选菌株, 发现菌株 WH2 (*Stemphylium* sp. SCSIO 40436) 的次级代谢产物丰富, 而且粗提物抑菌活性检测结果显示其对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(methicillin-resistant *S. aureus* MRSA ATCC 43300)、藤黄微球菌 SCSIO ML01、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 和革兰氏阴性菌鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 均有不同程度的抑制活性。因此选择 *Stemphylium* sp. SCSIO 40436 作为目标菌株进行次生代谢产物分离研究。

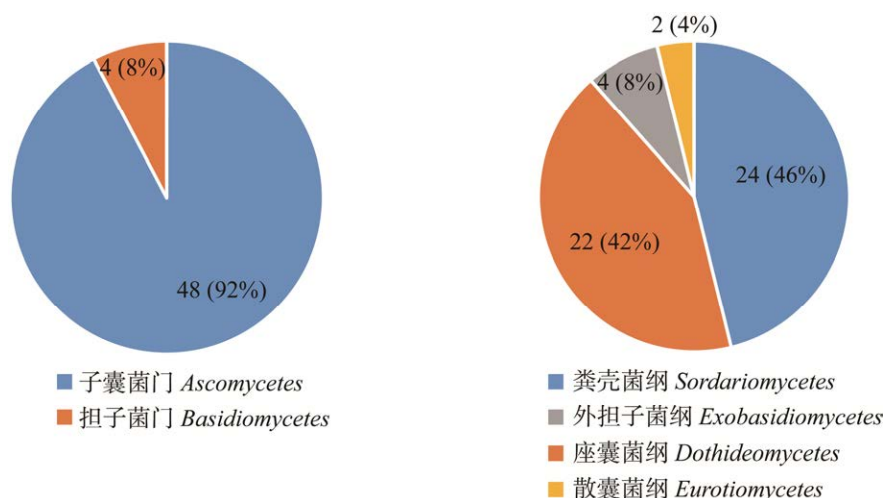


图 2 52 株红树林内生真菌隶属的门和纲及其所占比例

Figure 2 The phyla and classes of 52 mangrove endophytic fungi and their proportions.

表 1 52 株红树林内生真菌来源及种属鉴定结果

Table 1 Source and taxonomy of 52 mangrove endophytic fungi

Strain No.	GenBank accession No.	ITS identity (%)	Taxon (BLAST)	Host	Tissue
WH1	OK270823	98.21	<i>Aureobasidium</i> sp. (NR_147337.1)	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Stem
WH2	OK270824	99.43	<i>Stemphylium</i> sp. (NR_155002.1)	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Leaf
WH3	OK270825	100.00	<i>Purpureocillium</i> sp. (NR_165946.1)	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Root
WH4	OK270826	99.61	<i>Alternaria</i> sp. (NR_163686.1)	<i>Clerodendrum inerme</i>	Stem
WH5	OK270827	100.00	<i>Phyllosticta</i> sp. (NR_147316.1)	<i>Kandelia obovata</i>	Leaf
WH6	OK270828	99.82	<i>Aspergillus</i> sp. (NR_131276.1)	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Leaf
WH7	OK270829	99.45	<i>Alternaria</i> sp. (NR_137143.1)	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Leaf
WH8	OK270830	97.76	<i>Nigrograna</i> sp. (NR_153469.1)	<i>Acrostichum aureum</i>	Stem
WH9	OK270831	97.97	<i>Diaporthe</i> sp. (NR_111848.1)	<i>Excoecaria agallocha</i>	Stem
WH10	OK270832	98.32	<i>Allophoma</i> sp. (NR_158276.1)	<i>Clerodendrum inerme</i>	Leaf
WH11	OK270833	99.81	<i>Aspergillus</i> sp. (NR_131291.1)	<i>Kandelia obovata</i>	Flower
WH12	OK270834	99.44	<i>Cladosporium</i> sp. (NR_119730.1)	<i>Sonneratia caseolaris</i>	Leaf
WH13	OK270835	99.52	<i>Quambalaria</i> sp. (NR_156526.1)	<i>Laguncularia racemosa</i>	Stem
WH14	OK270836	100.00	<i>Cercospora</i> sp. (NR_147294.1)	<i>Pluchea indica</i>	Leaf
WH15	OK270837	99.59	<i>Cladosporium</i> sp. (NR_152296.1)	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Leaf
WH16	OK270838	99.79	<i>Cercospora</i> sp. (NR_147294.1)	<i>Pluchea indica</i>	Leaf
WH18	OK270839	99.67	<i>Quambalaria</i> sp. (NR_156526.1)	<i>Laguncularia racemosa</i>	Stem
WH19	OK270840	99.25	<i>Diaporthe</i> sp. (NR_111843.1)	<i>Excoecaria agallocha</i>	Stem
WH20	OK270841	98.81	<i>Daldinia</i> sp. (NR_147519.1)	<i>Rhizophora stylosa</i>	Stem
WH22	OK270842	96.26	<i>Hypoxylon</i> sp. (NR_166287.1)	<i>Kandelia obovata</i>	Stem
WH23	OK270843	99.58	<i>Fusarium</i> sp. (NR_171059.1)	<i>Pluchea indica</i>	Stem
WH24	OK270844	100.00	<i>Fusarium</i> sp. (NR_163754.1)	<i>Clerodendrum inerme</i>	Fruit
WH25	OK270845	99.36	<i>Fusarium</i> sp. (NR_171097.1)	<i>Pluchea indica</i>	Flower
WH26	OK270846	99.67	<i>Quambalaria</i> sp. (NR_156526.1)	<i>Sonneratia apetala</i>	Stem
<b>WH27</b>	<b>OK270847</b>	<b>91.42</b>	<b><i>Thyronectria</i> sp. (NR_155902.1)</b>	<b><i>Kandelia obovata</i></b>	<b>Stem</b>
WH28	OK270848	99.41	<i>Fusarium</i> sp. (NR_111889.1)	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Fruit
WH29	OK270849	100.00	<i>Colletotrichum</i> sp. (NR_120140.1)	<i>Pluchea indica</i>	Leaf
WH30	OK270850	100.00	<i>Nigrospora</i> sp. (NR_153472.1)	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Flower
WH31	OK270851	98.50	<i>Fusarium</i> sp. (NR_171097.1)	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Stem
WH32	OK270852	98.95	<i>Phaeosphaeria</i> sp. (NR_156557.1)	<i>Kandelia obovata</i>	Stem
WH33	OK270853	100.00	<i>Fusarium</i> sp. (NR_163754.1)	<i>Clerodendrum inerme</i>	Stem
WH34	OK270854	99.81	<i>Alternaria</i> sp. (NR_163686.1)	<i>Laguncularia racemosa</i>	Leaf
<b>WH35</b>	<b>OK270855</b>	<b>94.08</b>	<b><i>Acremonium</i> sp. (NR_159618.1)</b>	<b><i>Rhizophora stylosa</i></b>	<b>Leaf</b>
WH36	OK270856	99.81	<i>Colletotrichum</i> sp. (NR_171186.1)	<i>Clerodendrum inerme</i>	Flower
WH37	OK270857	100.00	<i>Neopestalotiopsis</i> sp. (NR_163670.1)	<i>Kandelia obovata</i>	Stem
WH38	OK270858	100.00	<i>Phaeosphaeria</i> sp. (NR_145123.1)	<i>Bruguiera gymnorrhiza</i>	Stem
WH41	OK270859	99.35	<i>Medicopsis</i> sp. (NR_130697.1)	<i>Pluchea indica</i>	Stem
WH43	OK270860	96.86	<i>Biatriospora</i> sp. (NR_158296.1)	<i>Rhizophora stylosa</i>	Leaf
<b>WH44</b>	<b>OK270861</b>	<b>94.09</b>	<b><i>Acremonium</i> sp. (NR_159618.1)</b>	<b><i>Acrostichum aureum</i></b>	<b>Stem</b>
<b>WH45</b>	<b>OK270862</b>	<b>87.87</b>	<b><i>Leptosillia</i> sp. (NR_166330.1)</b>	<b><i>Bruguiera gymnorrhiza</i></b>	<b>Root</b>

(待续)

(续表 1)

WH46	OK270863	100.00	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp. (NR_137994.1)	<i>Sonneratia apetala</i>	Stem
<b>WH47</b>	<b>OK270864</b>	<b>82.28</b>	<b><i>Tintelnotia</i> sp. (NR_147684.1)</b>	<b><i>Sonneratia apetala</i></b>	<b>Aerial root</b>
WH49	OK270865	98.40	<i>Toxicocladosporium</i> sp. (NR_111765.1)	<i>Sonneratia apetala</i>	Stem
<b>WH51</b>	<b>OK270866</b>	<b>86.33</b>	<b><i>Stachybotrys</i> sp. (NR_154083.1)</b>	<b><i>Sonneratia apetala</i></b>	<b>Aerial root</b>
WH52	OK270867	99.81	<i>Chaetomium</i> sp. (NR_144851.1)	<i>Acrostichum aureum</i>	Stem
WH54	OK270868	99.84	<i>Quambalaria</i> sp. (NR_156526.1)	<i>Laguncularia racemosa</i>	Stem
WH55	OK270869	99.79	<i>Cladosporium</i> sp. (NR_119730.1)	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Fruit
<b>WH56</b>	<b>OK270870</b>	<b>84.51</b>	<b><i>Daldinia</i> sp. (NR_159877.1)</b>	<b><i>Kandelia obovata</i></b>	<b>Stem</b>
WH57	OK270871	99.26	<i>Halorosellinia</i> sp. (NR_166289.1)	<i>Kandelia obovata</i>	Stem
WH58	OK270872	96.73	<i>Hypoxylon</i> sp. (NR_166287.1)	<i>Kandelia obovata</i>	Stem
WH59	OK270873	98.96	<i>Phaeosphaeria</i> sp. (NR_156557.1)	<i>Hibiscus tiliaceus</i>	Leaf
WH60	OK270874	100.00	<i>Cladosporium</i> sp. (NR_152267.1)	<i>Laguncularia racemosa</i>	Stem

注：加粗表示该菌株 ITS 序列在 BLAST 的 ITS 数据库中比对相似性小于 95%

Note: Strains that the similarity of ITS sequences in BLAST ITS database were less than 95% were marked in bold.

## 2.4 菌株 SCSIO 40436 化合物分离鉴定

菌株 SCSIO 40436 的大米燕麦培养基发酵粗提物合并后经硅胶柱、凝胶柱和半制备高效液相色谱分离纯化，得到 5 个已知化合物(图 1)，分别为二烷基间苯二酚 stemphol (**1**) (CCDC 2143987)及 4 个蒽醌类化合物 macrosporin (**2**)、altersolanol A (**3**) (CCDC 2143988)、alterporriol E (**4**)和 alterporriol D (**5**)。化合物 **1-5** 的平面结构通过 HRESIMS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和 X-ray 单晶衍射及与文献[17]比对确定，化合物 **3** 的绝对构型通过 X-ray 单晶衍射确定，化合物 **4** 和 **5** 的绝对构型通过与文献比较 CD 及旋光确定。

Stemphol (**1**): 无色晶体，HRESIMS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 237.185 4 (C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub> 计算值为 237.184 9)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, methonal-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ <sub>H</sub>: 6.16 (1H, s, H-4/6), 2.59 (2H, t, *J*=7.46, H-11), 2.44 (2H, t, *J*=7.40, H-7), 1.62 (2H, m, H-12), 1.53 (2H, m, H-8), 1.42 (6H, m, H-9/13/14), 0.97 (6H, overlapping, H-10/15) ppm。<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, methonal-*d*<sub>4</sub>)  $\delta$ <sub>C</sub>: 155.6 (C-1/3), 140.8 (C-5), 113.1 (C-2), 106.4 (C-4/6), 35.3 (C-11), 31.3 (C-13), 31.2 (C-8),

30.8 (C-12), 22.5 (C-7), 22.3 (C-9), 22.2 (C-14), 13.1 (C-15), 13.0 (C-10) ppm。波谱数据与文献[18]报道基本一致，化合物 **1** 的 X-ray 单晶衍射进一步确定其为 stemphol。

Macrosporin (**2**): 红棕色固体，HRESIMS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 285.075 9 (C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub> 计算值为 285.075 9)。<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> TFA 0.2%)  $\delta$ <sub>H</sub>: 7.94 (1H, s, H-4), 7.59 (1H, s, H-1), 7.18 (1H, d, *J*=2.56, H-5), 6.84 (1H, d, *J*=2.50, H-7), 3.93 (3H, s, H-OMe-6), 2.28 (3H, s, Me-3) ppm。<sup>13</sup>C NMR (175 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> TFA 0.2%)  $\delta$ <sub>C</sub>: 187.0 (C-9), 180.9 (C-10), 166.4 (C-8), 165.0 (C-6), 162.1 (C-2), 135.5 (C-10a), 132.5 (C-3/1a), 130.6 (C-4), 125.4 (C-4a), 111.5 (C-1/9a), 107.6 (C-5), 106.2 (C-7), 56.6 (C-OMe-6), 16.6 (C-Me-3) ppm。化合物 **2** 的波谱数据与文献[19]报道基本一致，化合物 **2** 的 X-ray 单晶衍射进一步确定其为 macrosporin。

Altersolanol A (**3**): 黄色固体，HRESIMS  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> 337.091 9 (C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>O<sub>8</sub> 计算值为 337.091 8)。<sup>1</sup>H NMR (700 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub> TFA 0.2%)  $\delta$ <sub>H</sub>: 7.03 (1H, d, *J*=2.37, H-5), 6.84



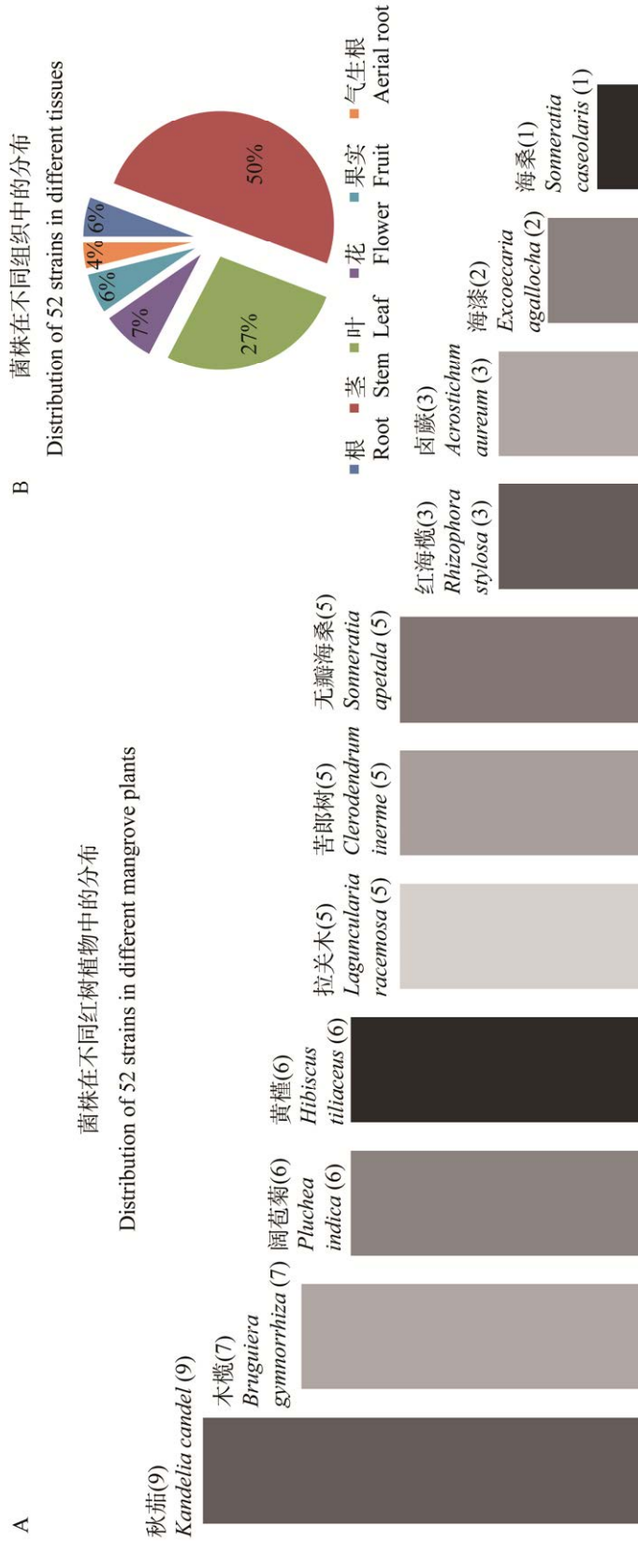


图 3 52 株菌株在不同红树林植物(A)及不同组织(B)中的分布  
Figure 3 Distribution of 52 strains in different mangrove plants (A) and in different tissues (B).

(1H, d,  $J=2.58$ , H-7), 4.50 (1H, d,  $J=7.22$ , H-1), 4.32 (1H, s, H-4), 3.91 (3H, s, OMe-6), 3.64 (1H, d,  $J=7.16$ , H-2), 1.25 (3H, s, Me-3) ppm。  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$  TFA 0.2%)  $\delta_{\text{C}}$ : 189.0 (C-9), 184.2 (C-10), 166.0 (C-8), 163.7 (C-6), 145.1 (C-1a), 142.6 (C-4a), 133.8 (C-10a), 110.0 (C-9a), 107.2 (C-5), 106.4 (C-7), 74.3 (C-2), 73.3 (C-3), 68.99 (C-1), 68.95 (C-4), 56.75 (C-OMe-6), 22.75 (C-Me-3) ppm。波谱数据与文献[20]报道基本一致, 确定化合物 **3** 为 altersolanol A。

Alterporriol E (**4**): 橙红色固体, HRESIMS  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  671.163 7 ( $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{O}_{16}$  计算值为 671.160 7)。 $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$  TFA 0.2%)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.90 (1H, s, H-6), 4.48 (1H, d,  $J=7.07$ , H-4), 4.08 (1H, s, H-1), 3.71 (3H, s, H-OMe-6), 3.56 (1H, d,  $J=7.07$ , H-3), 1.15 (3H, s, Me-3) ppm。  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$  TFA 0.2%)  $\delta_{\text{C}}$ : 189.2 (C-10/10'), 184.3 (C-9/9'), 164.1 (C-7/7'), 163.5 (C-5/5'), 143.9 (C-4a/4a'), 143.3 (C-1a/1a'), 130.3 (C-9a/9a'), 121.9 (C-8/8'), 109.8 (C-10a/10a'), 104.7 (C-6/6'), 74.2 (C-3/3'), 73.4 (C-2/2'), 68.9 (C-4/4'), 68.6 (C-1/1'), 57.3 (C-OMe-6/C-OMe-6'), 22.7 (C-Me-3/C-Me-3') ppm。波谱数据与文献[17]报道基本一致, 进一步结合化合物 **4** 的 CD 光谱数据和相关文献[17]比对确定其为 alterporriol E (图 1)。

Alterporriol D (**5**): 橙红色固体, HRESIMS  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  671.161 6 ( $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{O}_{16}$  计算值为 671.160 7)。 $^1\text{H}$  NMR (700 MHz, DMSO- $d_6$  TFA 0.2%)  $\delta_{\text{H}}$ : 6.95 (1H, s, H-6), 4.48 (1H, d,  $J=7.20$ , H-4), 4.08 (1H, s, H-1), 3.71 (3H, s, H-OMe-6), 3.57 (1H, d,  $J=7.15$ , H-3),

1.15 (3H, s, Me-3) ppm。  $^{13}\text{C}$  NMR (175 MHz, DMSO- $d_6$  TFA 0.2%)  $\delta_{\text{C}}$ : 189.2 (C-10/10'), 184.3 (C-9/9'), 165.2 (C-7/7'), 163.5 (C-5/5'), 143.9 (C-4a/4a'), 143.3 (C-1a/1a'), 129.3 (C-9a/9a'), 122.9 (C-8/8'), 109.7 (C-10a/10a'), 104.2 (C-6/6'), 74.2 (C-3/3'), 73.4 (C-2/2'), 68.9 (C-4/4'), 68.6 (C-1/1'), 57.3 (C-OMe-6/C-OMe-6'), 22.7/20.9 (C-Me-3/3') ppm。波谱数据与文献[17]报道基本一致, 进一步结合化合物 **5** 的 CD 光谱数据和相关文献[17]比对确定其为 alterporriol D (图 1)。

## 2.5 菌株 SCSIO 40436 的化合物抑菌活性

用滤纸片扩散法检测化合物活性, 结果显示化合物 stemphol (**1**)对供试革兰氏阳性菌 MRSA、金黄色葡萄球菌 ATCC 29213、藤黄微球菌 SCSIO ML01 及革兰氏阴性菌鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 均有明显抑菌圈(图 4); 进一步采用 MIC 法检测显示化合物 stemphol (**1**)对 MRSA ATCC 43300 和金黄色葡萄球菌 ATCC 29213 有中等强度的生长抑制活性, MIC 为 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 对藤黄微球菌 SCSIO ML01 有显著的生长抑制活性, MIC 为 0.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 强于阳性对照万古霉素(MIC 0.250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); 此外, 化合物 **1**对革兰氏阴性菌鲍曼不动杆菌 ATCC 19606 也有中等强度的生长抑制活性, MIC 为 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (表 2)。化合物 **2-5** 对供试指示菌无明显抑制活性。

## 3 讨论与结论

红树林生态系统是由红树植物、土壤及其共附生微生物构建的复杂、独特的生态系统。红树林生态系统共附生着丰富的微生物种群<sup>[4,21]</sup>。这些微生物长期处于特殊的生境条件下, 寄生或共生于红树植物之中, 从而与红树植物之间产生特殊的交流方式。红树林共附生微生物物种

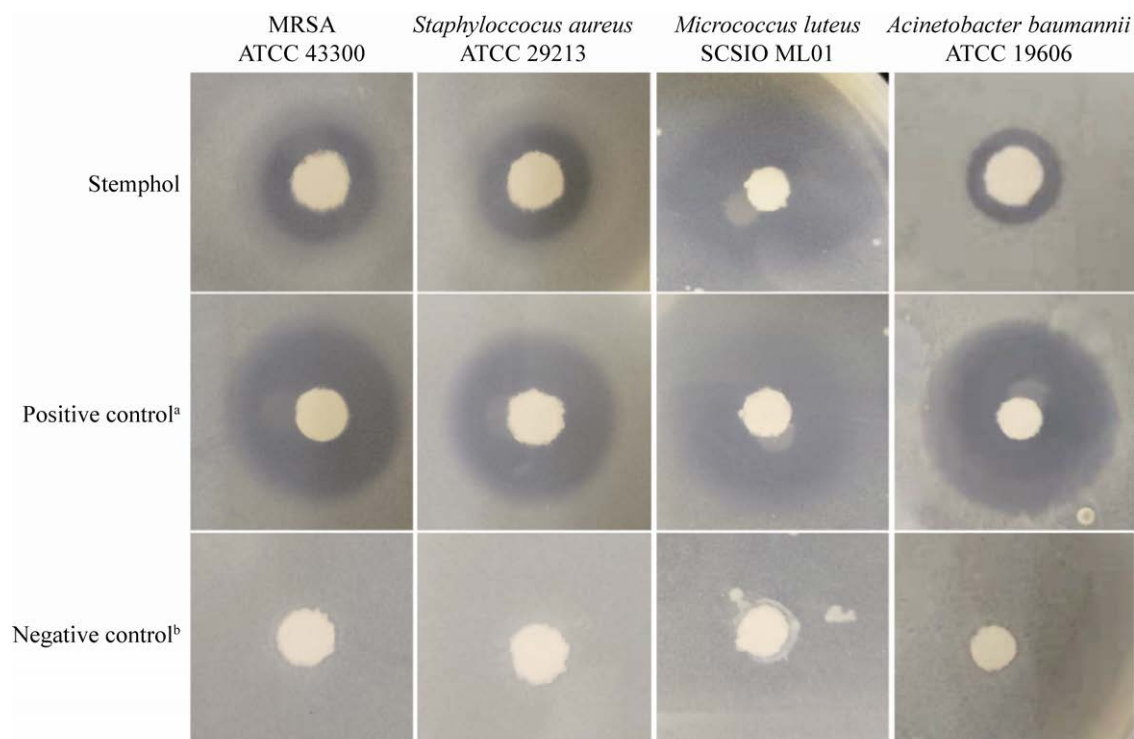


图 4 化合物 stemphol (1)的抑菌活性结果

Figure 4 The antibacterial activities of stemphol (1). <sup>a</sup>: Trimethoprim was used as positive control for Gram-positive bacteria. Ciprofloxacin was used as positive control for *A. baumannii* ATCC 19606. <sup>b</sup>: DMSO was used as negative control.

表 2 化合物 1–5 对供试指示菌的生长抑制活性

Table 2 Antibacterial activity of compound 1–5

Compounds	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MRSA ATCC 43300	<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	<i>M. luteus</i> SCSIO ML01
1	4.000	4.000	8.000	0.125
2	>64	>64	>64	>64
3	>64	>64	>64	>64
4	>64	>64	>64	>64
5	>64	>64	>64	>64
Vancomycin <sup>a</sup>	0.50	0.50	–	0.25
Ciprofloxacin <sup>b</sup>	–	–	0.125	–

Note <sup>a</sup>: Vancomycin was used as positive control for Gram-positive bacteria; <sup>b</sup>: Ciprofloxacin was used as positive control for *A. baumannii* ATCC 19606.

多样性、生存环境特殊性为代谢产生结构独特的天然小分子化合物奠定了基础<sup>[21]</sup>。本研究分离的 52 株红树林内生真菌分布于 29 个属，其种属分布具有多样性。另外，在分离得到的 52 株真菌中，7 株菌与已知种属的 ITS 序列对

相似性较低(小于 95%)，为潜在新种，其种属有待进一步研究确定。红树林内生真菌的多样性与独特性为研究源于真菌的次生代谢产物提供了资源。Macrosporin 和 altersolanol A 及其二聚体 alterporriols 是一类常见萜醌类化合物，广

泛分布在包括链格孢属(*Alternaria*)、拟茎点霉属(*Phomopsis*)和匍柄霉属(*Stemphylium*)等多种真菌中<sup>[21-24]</sup>。有研究发现, macrosporin 对污损鳃弧菌具有抑制作用, 而 altersolanol A 是一种激酶抑制剂, 不仅能够诱导 30 多种肿瘤细胞凋亡, 还能抑制肿瘤坏死因子 NF- $\kappa$ B 的激活并影响肿瘤细胞的转移和增殖, 作为潜在的抗肿瘤药物具有广泛的应用前景<sup>[25-26]</sup>。Stemphol 是间苯二酚类化合物, 已报道对革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌、白喉棒杆菌、MRSA 和白色念珠菌均有显著的生长抑制活性, 但未见显著抑制革兰氏阴性菌的报道<sup>[27]</sup>。本研究在对 stemphol 活性筛选中发现 stemphol 对藤黄微球菌的生长抑制活性显著, 其活性较阳性对照万古霉素强, 在对革兰氏阴性菌的筛选中发现 stemphol 对革兰氏阴性菌鲍曼不动杆菌具有较好的生长抑制活性。

综上所述, 我们对红树林样品内生真菌进行分离和鉴定, 发现其种属分布多样且独特。从红树林内生真菌 *Stemphylium* sp. SCSIO 40436 产物中分离鉴定间苯二酚类和蒽醌类化合物(1-5)。在对分离化合物的活性筛选中首次发现 stemphol (1)对革兰氏阴性菌鲍曼不动杆菌具有良好的生长抑制活性, 这为发掘 stemphol 的应用提供了研究基础, 同时本研究也为进一步利用和开发红树林真菌资源提供了基础。

## REFERENCES

- [1] Hriday M, Gorapi MZH, Noor S, Chowdhury NS, Rahman MM, Muscari I, Masia F, Adorisio S, Delfino DV, Mazid MA. Putative anticancer compounds from plant-derived endophytic fungi: a review[J]. *Molecules*: Basel, Switzerland, 2022, 27(1): 296
- [2] Chen SH, Cai RL, Liu ZM, Cui H, She ZG. Secondary metabolites from mangrove-associated fungi: source, chemistry and bioactivities[J]. *Natural Product Reports*, 2022, 39: 560-595
- [3] Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MHG, Prinsep MR. Marine natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2014, 31(2): 160
- [4] Cadamuro RD, Da Silveira Bastos IMA, Silva IT, Da Cruz ACC, Robl D, Sandjo LP, Alves S Jr, Lorenzo JM, Rodríguez-Lázaro D, Treichel H, et al. Bioactive compounds from mangrove endophytic fungus and their uses for microorganism control[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(6): 455
- [5] Bai M, Zheng CJ, Chen GY. Austins-type meroterpenoids from a mangrove-derived *Penicillium* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2021, 84(8): 2104-2110
- [6] Cai RL, Jiang HM, Xiao ZE, Cao WH, Yan T, Liu ZM, Lin SE, Long YH, She ZG. (-)- and (+)-asperginulin A, a pair of indole diketopiperazine alkaloid dimers with a 6/5/4/5/6 pentacyclic skeleton from the mangrove endophytic fungus *Aspergillus* sp. SK-28[J]. *Organic Letters*, 2019, 21(23): 9633-9636
- [7] Rösberg D, Debbab A, Mándi A, Vasylyeva V, Böhler P, Stork B, Engelke L, Hamacher A, Sawadogo R, Diederich M, et al. Pro-apoptotic and immunostimulatory tetrahydroxanthone dimers from the endophytic fungus *Phomopsis longicolla*[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2013, 78(24): 12409-12425
- [8] Chokpaiboon S, Sommit D, Bunyapaiboonsri T, Matsubara K, Pudhom K. Antiangiogenic effect of chamigrane endoperoxides from a Thai mangrove-derived fungus[J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(10): 2290-2294
- [9] 王庆琳, 陈水浩, 陈冬妮, 刘岚, 余志刚, 陆勇军. 中国南海海洋真菌资源及其活性次级代谢产物研究评述[J]. *生物资源*, 2020, 42(5): 505-514  
Wang QL, Chen SH, Chen DN, Liu L, She ZG, Lu YJ. Review on the research of marine fungus resources and their bioactive secondary metabolites from the South China Sea[J]. *Biotic Resources*, 2020, 42(5): 505-514 (in Chinese)
- [10] Guo ZK, Gai CJ, Cai CH, Chen LL, Liu SB, Zeng YB, Yuan JZ, Mei WL, Dai HF. Metabolites with insecticidal activity from *Aspergillus fumigatus* JRJ111048 isolated from mangrove plant *Acrostichum speciosum* endemic to Hainan Island[J]. *Marine Drugs*, 2017, 15(12): 381
- [11] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2019, 36(1): 122-173

- [12] Carroll AR, Copp BR, Davis RA, Keyzers RA, Prinsep MR. Marine natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2020, 37(2): 175-223
- [13] Zhang XY, Chen SQ, Zhang LP, Zhang QB, Zhang WJ, Chen YC, Zhang WM, Zhang HB, Zhang CS. Dassonmycins A and B, polycyclic thioalkaloids from a marine sponge-derived *Nocardioopsis dassonvillei* SCSIO 40065[J]. *Organic Letters*, 2021, 23(8): 2858-2862
- [14] Xu HX, Yang T, Zhang LP, Liu W, Zhang HB, Zhang QB, Zhang CS, Zhang WJ. Ocauxarthrol A from *Auxarthron umbrinum* SCSIO 40432 and configurational reassignment of chrysoqueen and auxarthrols[J]. *Tetrahedron Letters*, 2021, 66: 152842
- [15] 叶伟霞, 赵梦冉, 王璐, 蒋晓东, 张文军, 张长生, 田海妍. 南海珊瑚来源真菌 *Aspergillus* sp. SCSIO 40435 的分离鉴定及其次级代谢产物研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(5): 1819-1831  
Ye WX, Zhao MR, Wang L, Jiang XD, Zhang WJ, Zhang CS, Tian HY[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(5): 1819-1831 (in Chinese)
- [16] 黄艳冰, 蒋晓东, 刘威, 黄春帅, 张丽萍, 诸晗宁, 张长生, 张文军. 叶状蔷薇珊瑚来源真菌 *Parengyodontium album* SCSIO 40430 次级代谢产物研究[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(9): 1881-1888  
Huang YB, Jiang XD, Liu W, Huang CS, Zhang LP, Zhu HN, Zhang CS, Zhang WJ. Chromanones from *Montipora foliosa*-derived *Parengyodontium album* SCSIO 40430[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(9): 1881-1888 (in Chinese)
- [17] Kanamaru S, Honma M, Murakami T, Tsushima T, Kudo S, Tanaka K, Nihei KI, Nehira T, Hashimoto M. Absolute stereochemistry of altersolanol A and alterporriols[J]. *Chirality*, 2012, 24(2): 137-146
- [18] Zhou XM, Zheng CJ, Chen GY, Song XP, Han CR, Tang XZ, Liu RJ, Ren LL. Two new stemphol sulfates from the mangrove endophytic fungus *Stemphylium* sp. 33231[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2015, 68(8): 501-503
- [19] Rikisaku S, Sano T, Yamamoto M, Arimoto Y, Morimatsu F, Nabeshima T. Structural elucidation of alterporriol B, a novel metabolic pigment produced by *Alternaria porri* (Ellis) ciferri[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48(10): 2611-2613
- [20] Okamura N, Mimura K, Haraguchi H, Shingu K, Miyahara K, Yagi A. Altersolanol-related compounds from the culture liquid of *Alternaria solani*[J]. *Phytochemistry*, 1996, 42(1): 77-80
- [21] Xu J. Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes[J]. *RSC Advances*, 2015, 5(2): 841-892
- [22] Suemitsu R, Sano T, Yamamoto M, Arimoto Y, Morimatsu F, Nabeshima T. Studies of the metabolic products of *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48(10): 2611-2613
- [23] Suemitsu R, Horiuchi K, Ohnishi K, Yanagawase S. High-performance liquid chromatographic determination of macrosporin, altersolanol A, alterporriol A, B and C in fermentation of *Alternaria porri* (Ellis) Ciferri[J]. *Journal of Chromatography*, 1988, 454: 406-410
- [24] Teiten MH, Mack F, Debbab A, Aly AH, Dicato M, Proksch P, Diederich M. Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF- $\kappa$ B activity[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2013, 21(13): 3850-3858
- [25] Mishra PD, Verekar SA, Deshmukh SK, Joshi KS, Fiebig HH, Kelter G. Altersolanol A: a selective cytotoxic anthraquinone from a *Phomopsis* sp.[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60(4): 387-391
- [26] 冯世秀, 许静, 陈涛. 四氢蒽醌类化合物结构及其生物活性研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2019, 31(4): 731-739  
Feng SX, Xu J, Chen T. The structure and biological activity of tetrahydroanthraquinone compounds[J]. *Natural Product Research and Development*, 2019, 31(4): 731-739 (in Chinese)
- [27] Marumo S, Hattori H, Katayama M. Stemphol from *Pleospora herbarum* as a self-inhibitor[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1985, 49(5): 1521-1522