论文

中国知名大学及研究院所专栏 中国科学院烟台海岸带研究所专辑

耐盐菊芋块茎内生真菌次生代谢产物的分离与结构鉴定

王超之^{①②}, 季乃云^{①*}, 苗凤萍^①^① 中国科学院烟台海岸带研究所, 烟台 264003;^② 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: nyji@yic.ac.cn

收稿日期: 2016-02-20; 接受日期: 2016-03-29; 网络版发表日期: 2016-08-26

国家自然科学基金(批准号: 41106136, 41106137)资助

摘要 盐生植物菊芋(*Helianthus tuberosus*)是一种新型经济作物, 特殊生境可能会使其内生真菌产生特殊的次生代谢产物, 如结构新颖或活性显著的化合物. 为研究这种耐盐植物内生真菌的次生代谢产物以及植物宿主和内生真菌之间可能存在的关系, 本实验室从耐盐菊芋块茎中分离纯化出 10 株内生真菌, 对这 10 株内生真菌进行抗虫活性筛选, 初步筛选出 1 株抗虫活性良好的菌株 *Mucor* sp. ht-7, 规模发酵后通过提取分离技术得到 7 个化合物, 用波谱手段鉴定了 7 个化合物的结构, 对这株内生真菌和宿主次生代谢产物之间的关系进行分析探讨, 并对化合物生物活性加以分析.

关键词 耐盐菊芋, 内生真菌, 毛霉, 次生代谢产物, 生物活性

植物内生真菌是指在生活史的部分或全部时期生长在健康植物内部, 并且不会对植物本身产生明显伤害的一类真菌^[1]. 内生真菌能够产生结构新颖种类丰富的有机化合物, 这些化合物在食品、医药、化学、农业等领域都有潜在应用价值. 在过去的几十年中, 研究者已经从内生真菌中成功分离到多种具有生物活性的化合物, 生物活性包括抗细菌、抗真菌、杀虫、细胞毒性和抗肿瘤活性等, 化合物的种类包括生物碱、萜类、甾体、异香豆素衍生物、黄酮类、醌类、苯丙酯类、多肽类、酚酸类、脂肪族类化合物和含氯代谢物等^[2].

菊芋(*Helianthus tuberosus*), 又名洋姜、鬼子姜, 是菊科(Asteraceae)向日葵属(*Helianthus*)一年生草本植物, 从北美洲引入我国之后, 在我国温带地区广泛种植. 近几年, 菊芋已经被成功引种到莱州盐碱地中, 其土壤在深度 0~20 cm 范围, 盐度和 pH 值分别为 3.79 和 7.55 g/kg; 在深度 20~40 cm 范围, 盐度和 pH 值分别为 4.01 和 7.50 g/kg^[3]. 耐盐菊芋的生长环境具有盐胁迫和偏碱性的特点, 这种特殊生境为菊芋及其内生真菌产生新颖和活性次生代谢产物提供了可能. 本课题组以莱州盐碱地种植的菊芋为材料, 从耐盐菊芋块茎中分离得到 10 株内生真菌, 经初步

引用格式: 王超之, 季乃云, 苗凤萍. 耐盐菊芋块茎内生真菌次生代谢产物的分离与结构鉴定. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1101-1106
Wang C Z, Ji N Y, Miao F P. Isolation and identification of secondary metabolites from halophytic *Helianthus tuberosus* tuber-derived fungus. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 1101-1106, doi: 10.1360/N052016-00061

活性筛选发现,一株毛霉(*Mucor* sp.)ht-7 生物活性较好. 进一步研究其发酵产物,从中找到结构新颖或者活性良好的天然产物,以期丰富天然产物的结构类型并将有价值的天然产物应用到生产生活中.

1 材料与方法

1.1 菌种与培养

毛霉(*Mucor* sp.)ht-7 由本实验室分离自表面消毒的新鲜菊芋块茎,经形态学鉴定以及真菌核糖体 rDNA 基因 ITS 分子序列(包括 ITS1, 5.8S rDNA, ITS2)解析鉴定过,其序列数据保存于 GenBank 中,登记号码为 KP056546. 菌种保存在中国科学院烟台海岸带研究所生物资源实验室.

菌种保存于 4℃ 的马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基上,接种到固体平板培养基上 28℃ 培养 5 天,将固体培养基分割成小块,无菌转移至液体培养基(1000 mL 三角瓶,每瓶装 300 mL 发酵液)中,根据相关文献^[4],按照一般真菌发酵培养方法,将真菌发酵液置于室内自然条件下室温发酵培养 30 天,使真菌充分生长并产生次级代谢物. 发酵培养基成分为葡萄糖 20 g,蛋白胨 5 g,酵母膏 3 g,陈海水 500 mL,菊芋块茎(200 g)煮汁 500 mL, pH 6.5~7.0, 121℃ 灭菌 20 min.

1.2 仪器与试剂

Bruker Avance III 500 NMR 型核磁共振仪(瑞士); EYELA OIL BATH OSB-2000 旋转蒸发仪(日本); Agilent Technologies 1260 Infinity 高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪(Eclipse SB-C18 柱, 5 μm, 9.4 mm×250 mm)(美国); GF-254 薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂); 100~200 目和 200~300 目柱色谱硅胶(青岛海洋化工厂); Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(GE Healthcare 公司, 瑞典); 显色剂为大茴香醛-硫酸溶液(国药集团化学试剂有限公司, 上海); 除高效液相色谱所用甲醇为色谱纯外,其他色谱分离和提取所用有机溶剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司, 上海); 薄层层析硅胶板购自青岛海洋化工厂.

1.3 抗卤虫活性测试

利用卤虫生物致死法^[4]对 10 株真菌发酵粗提物

进行生物活性检测. 卤虫(*Artemia salina*)事先陈海水室温孵化 48 h, 取 96 孔细胞培养板, 每孔加 195 μL 含大约 20 个卤虫的陈海水, 制成测试培养板. 空白对照组加 5 μL 溶剂二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO), 样品组加 5 μL 待测样品. 测试样品溶解于 DMSO, 最终浓度为 250 μg/mL. 室温培养 24 h 后, 在双目解剖镜下观测计数卤虫死亡个体数目. 卤虫生物致死活性以校正死亡率表示, 计算公式如下: 校正死亡率=((对照组存活率-处理组存活率)/对照组存活率)×100%.

1.4 次生代谢产物提取分离与鉴定

自然光下室温发酵 30 天的发酵产物用乙酸乙酯杀灭 2 天, 同时利用乙酸乙酯的溶解特性, 将真菌代谢产物溶解并萃取到乙酸乙酯中. 将菌丝体和发酵液过滤分离, 菌丝体粉碎后用二氯甲烷-甲醇(1:1, v/v)提取 3 次, 再用乙酸乙酯和水萃取, 得到乙酸乙酯萃取物, 发酵液用乙酸乙酯和水萃取, 得到乙酸乙酯萃取物, 合并两部分提取物得到总浸膏. 总浸膏以石油醚-乙酸乙酯(100:0 至 0:100, v/v, 下同)为洗脱剂梯度洗脱, 收集各段组分, 再经反复硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶柱层析、制备薄层层析、半制备高效液相色谱分离和重结晶等操作, 分离得到单体化合物. 综合运用现代波谱技术、核磁共振、高效液相色谱、化学显色以及文献报道等方法确定各单体化合物结构.

2 结果与分析

2.1 活性菌株筛选

如前所述, 菊芋植株少见虫害侵染, 其植株可能含有抗虫类化合物. 研究表明, 内生真菌可能与宿主产生相同或相似的生物活性物质^[5]. 为探究菊芋中内生真菌是否同样具有生物活性, 尤其是抗虫活性, 对分离到的 10 株内生真菌进行初步活性筛选, 利用 1.4 中提到的方法进行实验, 发现 ht-7 具有明显的抗虫活性(表 1).

2.2 活性菌株次生代谢产物提取分离

为寻找活性菌株 ht-7 有价值的次生代谢产物, 用 HPLC 分析 ht-7 菌株发酵提取物, 从色谱图(图 1)看出, ht-7 发酵产物含有丰富的次生代谢产物, 进一步对 ht-7 进行了规模发酵, 获得 ht-7 发酵产物.

表1 菊芋内生真菌乙酸乙酯粗提物卤虫致死率

编号	ht-1	ht-2	ht-3	ht-4	ht-5	ht-6	ht-7	ht-8	ht-9	ht-10	DMSO
致死率/%	27.7	17.6	13.7	37.5	26.3	16.0	87.5	78.3	21.4	42.8	0

图 1 ht-7 发酵产物 HPLC 分析

流动相: 甲醇-水, 色谱条件: 0~5 min, 40%甲醇; 5~45 min, 40%~100%甲醇; 45~60 min, 100%甲醇, 流速: 1 mL/min, 检测波长: 254 nm

菌株 ht-7 发酵共得菌丝体提取物 11.8 g, 发酵液提取物 8.4 g. 两种提取物经薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)和 HPLC 分析结果类似, 合并两部分得总浸膏 20.2 g. 总浸膏以石油醚-乙酸乙酯(100:0 至 0:100, v/v)为洗脱剂梯度洗脱, 经硅胶柱层析, 得到 11 个组分(Fr.1~Fr.11). Fr.5 经硅胶柱层析(石油醚-乙酸乙酯(2:1, 1:1)得到 2 个组分(Fr.5-1 和 Fr.5-2). Fr.5-1 经凝胶柱 Sephadex LH-20(二氯甲烷-甲醇, 1:1), 硅胶柱层析(石油醚-乙酸乙酯, 8:1), 以及半制备高效液相色谱(甲醇-水, 90:10~100:0)得到化合物 5(1.9 mg); Fr.5-2 经凝胶柱层析 Sephadex LH-20(二氯甲烷-甲醇, 1:1)半制备高效液相色谱(甲醇-水, 90:10)得到化合物 1(1.8 mg)和化合物 2(6.9 mg); Fr.7 经硅胶柱层析(二氯甲烷-甲醇, 20:1), 凝胶柱 Sephadex LH-20 层析(二氯甲烷-甲醇, 1:1)得到化合物 6(2.0 mg); Fr.8 经两次凝胶柱 Sephadex LH-20 层析(二氯甲烷-甲醇, 1:1)得到化合物 4(4.6 mg); Fr.11 经硅胶柱层析(石油醚-乙酸乙酯, 15~10:1)得到 2 个组分(Fr.11-1 和 Fr.11-2). Fr.11-1 经 Sephadex LH-20(二氯甲烷-甲醇, 1:1), 甲醇重结晶得到化合物 3(2.3 mg); Fr.11-2 经凝胶柱 Sephadex LH-20 层析(二氯甲烷-甲醇, 1:1)半制备高效液相色谱(甲醇-水, 95:5)得到化合物 7(1.5 mg). 所有化合物结构见图 2.

2.3 次生代谢产物结构鉴定

化合物 1: 白色无定形粉末, ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 3.96(1H, m, H-3), 6.50(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6), 6.24(1H, d, $J=8.5$ Hz, H-7), 0.81(3H, s, H-18), 0.88(3H, s, H-19), 0.99(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 5.14(1H, dd, $J=15.3, 8.3$ Hz, H-22), 5.22(1H, dd, $J=15.3, 7.6$ Hz, H-23), 0.81(3H, d, $J=6.9$ Hz, H-26), 0.83(3H, d, $J=7.1$ Hz, H-27), 0.90(3H, d, $J=6.9$ Hz, H-28). 以上波谱数据与文献报道的(22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -环氧麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇一致^[6], 鉴定其为(22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -环氧麦角甾-6, 22-二烯-3 β -醇.

化合物 2: 白色无定形粉末, ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 4.01(1H, m, H-3), 6.59(1H, d, $J=7.6$ Hz, H-6), 6.29(1H, d, $J=7.5$ Hz, H-7), 5.43(1H, m, H-11), 0.74(3H, s, H-18), 1.09(3H, s, H-19), 1.00(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 5.16(1H, dd, $J=15.3, 8.4$ Hz, H-22), 5.24(1H, dd, $J=15.2, 7.6$ Hz, H-23), 0.81(3H, d, $J=6.8$ Hz, H-26), 0.83(3H, d, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.84(3H, d, $J=6.8$ Hz, H-28). 以上波谱数据与文献报道的(22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -环氧麦角甾-6, 9(11), 22-三烯-3 β -醇数据一致^[7], 故鉴定其为(22*E*, 24*R*)-5 α , 8 α -环氧麦角甾-6, 9(11), 22-三烯-3 β -醇.

化合物 3: 无色晶体, ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3)
 δ_{H} : 3.76(1H, m, H-3), 3.33(brs, H-6), 0.55(3H, s, H-18),
 0.91(3H, s, H-19), 1.00(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21),

5.17(1H, dd, $J=15.2, 8.1$ Hz, H-22), 5.24(1H, dd, $J=15.3, 7.2$ Hz, H-23), 0.82(3H, d, $J=7.2$ Hz, H-27), 0.92(3H, d, $J=6.8$ Hz, H-28). 以上波谱数据与文献报道的(22*E*, 24*R*)-麦角-7, 22-二烯-3 β , 5 α , 6 β -三醇一致^[8], 故鉴定其为(22*E*, 24*R*)-麦角-7, 22-二烯-3 β , 5 α , 6 β -三醇。

化合物 4: 无色晶体, ^1H NMR(500 MHz, acetone- d_6) δ_{H} : 3.96(1H, m, H-3), 5.51(1H, s, H-7), 0.67(3H, s, H-18), 0.99(3H, s, H-19), 1.06(3H, d, $J=7.5$ Hz, H-21), 5.24(1H, dd, $J=15.2, 8.0$ Hz, H-22), 5.29(1H, dd, $J=15.3, 7.3$ Hz, H-23), 0.84(3H, d, $J=7.0$ Hz, H-26), 0.86(3H, d, $J=7.0$ Hz, H-27), 0.94(3H, d, $J=6.8$ Hz, H-28). 以上波谱数据与文献报道的(22*E*, 24*R*)-3 β , 5 α , 9 α -三羟基-麦角-7, 22-二烯-6-酮一致^[9], 鉴定其为(22*E*, 24*R*)-3 β , 5 α , 9 α -三羟基-麦角-7, 22-二烯-6-酮。

化合物 5: 白色晶体, ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 3.53(1H, m, H-3), 5.35(1H, d, $J=2.3$ Hz, H-6), 0.68(3H, s, H-18), 1.01(3H, s, H-19), 0.92(3H, d, $J=6.6$ Hz, H-21), 0.84(3H, d, $J=1.9$ Hz, H-26), 0.82(3H, d, $J=3.9$ Hz, H-27), 0.86(3H, m, H-29). 化合物 5 经高效液相色谱和薄层色谱与标准品对照, 波谱数据与文献报道对照^[10], 鉴定为 β -谷甾醇。

化合物 6: 无色晶体, ^1H NMR(500 MHz, MeOD) δ_{H} : 7.90 (2H, dd, $J=4.7, 2.5$ Hz, H-2, H-6), 6.83 (2H, dd, $J=4.7, 2.5$ Hz, H-3, H-5). ^{13}C NMR(100 MHz, MeOD) δ_{C} : 121.5(C-1), 131.6(C-2, C-6), 114.6(C-3, C-5), 162.0(C-4), 168.7(C-7). 以上波谱数据与文献报道的对羟基苯甲酸一致^[11], 鉴定其为对羟基苯甲酸。

化合物 7: 白色粉末, ^1H NMR(500 MHz, DMSO- d_6) δ_{H} : 1.77(3H, d, $J=1.1$ Hz, 5- CH_3), 7.69(1H,

d, $J=1.2$ Hz, H-6), (1H, dd, $J=7.4, 1.3$ Hz, H-1'), 2.06(2H, m, H-2'), 4.23(1H, d, $J=2.5$ Hz, H-3'), 3.76(1H, dd, $J=6.8, 3.8$ Hz, H-4'), 3.56(2H, m, H-5'). 以上波谱数据与文献报道的胸腺嘧啶脱氧核苷一致^[12], 鉴定其为胸腺嘧啶脱氧核苷。

3 讨论

内生真菌长期生活在植物宿主体内, 会与宿主植物形成一种互利共生的关系. 宿主植物在生长过程中、应对外界环境产生应激耐受性(包括抗旱、抗病虫害及对病原体拮抗等)以及代谢产生有效活性成分时, 内生真菌也会参与并影响宿主的这些生理生化过程^[13], 因此有些内生真菌产生的次生代谢产物会与宿主的次生代谢产物结构相同或相似. 文献报道, 化合物 1~6 在不同种类内生真菌中都有发现^[7,14~17]. 另外, 化合物 1, 2 在菊芋枝叶中发现过, 化合物 5 在菊芋块茎中发现过^[1]. 本课题组在研究一株长枝木霉的化学成分时, 同样发现了化合物 5 的存在, 然而当发酵培养基不含菊芋块茎成分时, 未从发酵产物中获得此化合物^[14]. 本研究中, 菌株 ht-7 分离自菊芋块茎, 发酵培养基中含有菊芋块茎煮汁成分, 因此推测化合物 5 可能来源于菊芋块茎。

菊芋作为经济作物种植过程中很少虫害, 其叶片乙酸乙酯提取物对棉铃虫有明显的杀灭作用^[5], 对菌株进行活性初步筛选时, 发现菌株 ht-7 具有良好的抗虫活性(表 1), 据文献报道, 化合物 1 和 3 具有微弱的乙酰胆碱酯酶活性, 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率分别为 8.1% 和 0.4%^[18]. 乙酰胆碱酯酶简称 AchE, 具有羧肽酶和氨肽酶的活性, 乙酰胆碱酯酶参与细胞的

图 2 化合物 1~7 的结构

发育和成熟, 能促进神经元发育和神经再生, 抑制乙酰胆碱酯酶的活性会影响生物正常生理代谢, 从而导致生物体死亡, 有机磷、氨基甲酸类等农药就是通过这种原理发挥作用^[19]. 化合物 6 是一种化感物质, 能够抑制细菌、真菌和某些酶的活性, 并且对产生水华的藻类也有抑制活性^[20], 在环境、生态和食品领域有潜在的应用价值. 化合物 7 可作为抗病毒药物的前体^[21], 应用在医药领域. 总之, 本研究从耐盐菊芋内

生真菌 *Mucor* sp. ht-7 发酵产物分离得到 7 个化合物, 部分化合物具有生物活性. 结合发酵产物 HPLC 分析结果(图 1), 推测部分微量次生代谢物由于产量较少无法进行分离检测, 这一菌株仍然存在活性良好的次生代谢产物有待发掘. 进一步增大菌株发酵规模, 优化检测手段和分离技术, 有望从菌株 ht-7 中分离得到结构新颖或活性显著的化合物, 为活性天然产物的开发和应用提供参考.

参考文献

- 1 Wilson D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos*, 1995, 73: 274–276
- 2 Tan R X, Zou W X. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*, 2001, 18: 448–459
- 3 Li X D, Miao F P, Ji N Y. Two new epoxysteroids from *Helianthus tuberosus*. *Molecules*, 2011, 16: 8646–8653
- 4 Miao F P, Li X D, Liu X H, et al. Secondary metabolites from an algicolous *Aspergillus versicolor* strain. *Mar Drugs*, 2012, 10: 131–139
- 5 刘海伟, 刘兆普, 刘玲. 菊芋叶片提取物对棉铃虫生长发育的影响. *植物保护*, 2007, 33: 90–93
- 6 Shang Z, Li X, Meng L, et al. Chemical profile of the secondary metabolites produced by a deep-sea sediment-derived fungus *Penicillium commune* SD-118. *Chin J Oceanol Limnol*, 2012, 30: 305–314
- 7 Cateni F, Doljak B, Zacchigna M, et al. New biologically active epidioxysterols from *Stereum hirsutum*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17: 6330–6334
- 8 Li F, Li K, Li X, et al. Chemical constituents of marine algal-derived endophytic fungus *Exophiala oligosperma* EN-21. *Chin J Oceanol Limnol*, 2011, 29: 63–67
- 9 Xiong H Y, Fei D Q, Zhou J S, et al. Steroids and other constituents from the mushroom *Armillaria lueo-virens*. *Chem Nat Comp*, 2009, 45: 759–761
- 10 Zhang X, Geoffroy P, Miesch M, et al. Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol: synthesis and characterization of β -sitosterol oxides. *Steroids*, 2005, 70: 886–895
- 11 李云秋, 柴兴云, 孙见凡, 等. 紫稍花化学成分研究. *中药材*, 2010, 1: 60–61
- 12 张力新, 范晓, 韩丽君. 罗氏海盘车中几种化合物的提取分离和结构鉴定. *天然产物研究与开发*, 2005, 17: 35–36
- 13 姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展. *生态环境学报*, 2010, 19: 1750–1754
- 14 纪珍玲, 马德顺, 苗凤萍. 刺松藻内生真菌长枝木霉的化学成分研究. *沈阳大学学报*, 2014, 26: 276–280
- 15 陶美华, 颜健, 魏孝义, 等. 白木香内生真菌 *Fimetiariella rabenhorstii* 的甾体类代谢产物. *热带亚热带植物学报*, 2011, 19: 75–78
- 16 李想, 姚燕华, 郑毅男, 等. 红树植物内生真菌 GT6105 发酵产物的化学成分. *中国天然药物*, 2007, 5: 20–23
- 17 魏景, 戴好富, 郁蕾, 等. 白木香内生真菌 R7 抗菌活性代谢产物. *中国抗生素杂志*, 2011, 36: 576–580
- 18 Qiao M F, Ji N Y, Liu X H, et al. Asporierygosterol, a new steroid from an algicolous isolate of *Aspergillus oryzae*. *Nat Prod Commun*, 2010, 5: 1575–1578
- 19 顾颖, 王雨轩, 王斌, 等. 六种农药对乙酰胆碱酯酶活性的体外毒性效应. *农村生态环境*, 2005, 21: 70–73
- 20 张庭廷, 何梅, 吴安平, 等. 对羟基苯甲酸对铜绿微囊藻的化感效应以及对鲤鱼的毒性作用. *环境科学学报*, 2008, 28: 1887–1893
- 21 朱宝华. 胸苷 5'位修饰物的合成, 表征及抗 HIV 活性. *南京大学学报: 自然科学版*, 1998, 34: 478–482

Isolation and Identification of Secondary Metabolites from Halophytic *Helianthus tuberosus* Tuber-Derived Fungus

WANG ChaoZhi^{1,2}, JI NaiYun¹ & MIAO FengPing¹

¹ Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Salt-tolerant *Helianthus tuberosus* is a new economic crop and special habitats may have an effect on this plant's metabolites, specifically secondary metabolites, such that novel or bioactive compounds are produced. The secondary metabolites of endophytic fungi derived from salt-tolerant *Helianthus tuberosus* as well as the relationship between the host and the fungi are worth investigating. Our group isolated 10 endophytic fungi from salt-tolerant *Helianthus tuberosus* tubers. Brine shrimp lethality experiment showed that one strain, *Mucor* sp. ht-7 has remarkable bioactivity. Seven compounds were obtained after scaled fermentation, extraction, and separation. The structures of these compounds were established using modern spectroscopic techniques. In addition, the bioactivity and relationship of secondary metabolites between endophytic fungus and host are discussed.

***Helianthus tuberosus*, endophytic fungi, *Mucor* sp., secondary metabolites, bioactivity**

doi: 10.1360/N052016-00061