

ARTICLES

ЭНДОФИТ МӨӨГӨНЦРИЙН ГАРАЛТАЙ АЛКАЛОИДЫН МИКРОБЫН ЭСРЭГ БА ЭЛЭГНИЙ ХАВДРЫН ЭСИЙГ ДАРАНГУЙЛАХ ИДЭВХ ТОДОРХОЙЛСОН ДҮН

М. Амарбаясгалан¹, М. Номин², Ж. Энх-Амгалан^{1*}

¹ Микробиологийн лаборатори, Ерөнхий болон Сорилын Биологийн Хүрээлэн,
Шинжлэх ухааны Академи, Монгол Улс

² Молекул Биологийн лаборатори, Ерөнхий болон Сорилын Биологийн Хүрээлэн,
Шинжлэх ухааны Академи, Монгол Улс

Хүлээн авсан: 2018.04.27; Хянасан: 2018.06.04; Хэвлэгдсэн: 2018.06.09

ХУРААНГУЙ

Бид судалгаанд Монгол орны алкалоид агуулдаг ургамлуудаас ялгасан эндофит мөөгөнцрийн 55 өсгөврийг сонгон авч, алкалоидын нийлэгжлийг нимгэн үеийн хроматографийн аргаар шинжилсний дүнд тэдгээрээс 5 өсгөвөр нь алкалоид нийлэгжүүлдэг болохыг тогтоов. Алкалоид нийлэгжүүлэгч өсгөврүүдийн төрлийн хамаарлыг морфологи бүтэц болон 28S rPHX генийн D1/D2 домейны нуклеотидын дараалал дээр тулгуурлан тодорхойлоход бүгд *Fusarium* төрөлд хамаарч байв. Цаашид уг 5 өсгөврийн нийлбэр алкалоидыг цэвэршүүлэн микробын эсрэг болон элэгний хавдрын эсийг дарангуйлах идэвхийг тодорхойлоход SFG-S1 ба 16T6-F3 өсгөврийн нийлбэр алкалоид дроожж болон мөөгөнцрийн эсрэг идэвхтэй, SFG-R3, 16T6-F3, 14R-1 өсгөврийн нийлбэр алкалоид элэгний хавдрын HerG2 эсийг дарангуйлах идэвхтэй байлаа.

Түлхүүр үг: Эндофит мөөгөнцөр; алкалоид; микробын эсрэг идэвх; элэгний хавдрын эсийг дарангуйлах идэвх;

ОРШИЛ

Эндофит нь Грекээр эндо = дотор, фит = ургамал гэсэн утгатай ба үүнд амьдралын мөчлөгийн нэг хэсэг эсвэл амьдралын туршид ургамлын эд дотор амьдрах чадвартай бичил биетнүүд багтдаг. Эндофитүүд нь эзэн ургамлынхаа өсөлтийг дэмжих, шим тэжээлийн бодис нийлэгжүүлэх болон абиотик хүчин зүйлд тэсвэрлэх, шавж, өвчин үүсгэгчид болон

өвсөн тэжээлтэн зэргийг эсэргүүцэх чадварыг дэмждэг байна [1]. Эндофитүүд ургамалтай адил биологийн идэвхт метаболитууд, иммуно-супресантууд, хавдрын эсрэг болон микроб, вирусын эсрэг үйлчилгээтэй нэгдлүүдийг нийлэгжүүлдэг ба тэдгээрийн заримыг шинэ эмийн бүтээгдэхүүний эх үүсвэр болгон анагаах ухааны салбарт ашигладаг

*corresponding author: enkh27@yahoo.com



The Author(s). 2018 Open access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

[2; 3]. Эндофитүүдийн нийлэгжүүлдэг нэгдлүүдэд терпеноид, алкалоид, алифатик нэгдлүүд, поликетид, пептид зэрэг нэгдлүүд багтдаг [4].

Уламжлалт анагаах ухаанд олон төрлийн эмийн ургамлыг хандалж өвчин намжаахад хэрэглэсээр ирсэн. Шинжлэх ухаан хөгжснөөр эмийн ургамлын биологийн идэвхт нэгдлүүдийг судлан, анагаах ухааны салбарт өргөнөөр ашигладаг байсан бол сүүлийн үед ургамлын эндофитүүд болон тэдгээрийн нийлэгжүүлдэг биологийн идэвхт нэгдлүүдийг судлан, биологийн идэвхт нэгдлүүдийн эх үүсвэр болгон

ашиглаж байна. Манай судлаачдын эндофит мөөгөнцрийн зарим судалгааны ажлаас дурдахад микробын эсрэг өндөр идэвхтэй мөөгөнцөр илрүүлсэн [5], мөн Шаргалдуу лидэрээс эндофит мөөгөнцөр ялган, хавдрын эсийг дарангуйлдаг алкалоидууд болох матрин, оксиматриныг нийлэгжүүлж болохыг тогтоосон байна [6]. Иймд бид энэ удаагийн судалгааны ажлаар алкалоид нийлэгжүүлдэг эндофит мөөгөнцрөөс алкалоид ялгаж аван, түүний микробын эсрэг идэвх болон элэгний хавдрын эс дарангуйлах идэвх тодорхойлох зорилго тавин ажиллаа.

МАТЕРИАЛ, АРГА ЗҮЙ

Судалгаанд ашигласан материал

Судалгаанд ШУА, Ерөнхий болон сорилын биологийн хүрээлэн, Микробиологийн лабораторийн өсгөврийн санд хадгалагдаж буй алкалоид агуулдаг ургамлаас ялгасан эндофит мөөгөнцрийн 55 өсгөврийг сонгон, алкалоид нийлэгжүүлдэг эсэхийг тогтоох туршилтанд ашигласан.

Тэдгээрээс алкалоид нийлэгжүүлдэг болох нь тогтоогдсон 3, өмнөх судалгаагаар илрүүлсэн 2, нийт 5 өсгөврөөс (1-р хүснэгт) нийлбэр алкалоидыг ялган, алкалоидын дээжинд микробын эсрэг идэвх болон элэгний хавдрын эсийг дарангуйлах идэвх тодорхойлох туршилтуудыг хийж гүйцэтгэсэн.

Хүснэгт-1. Алкалоид нийлэгжүүлдэг өсгөврүүд

| № | Эзэн ургамал | Ялгасан он | Өсгөврийн дугаар |
|---|-------------------|------------|------------------|
| 1 | Долгионт гишүүнэ | 2015 | 14R-1 |
| 2 | Алаг цэцэгт башир | 2016 | 16T5-F2 |
| 3 | Байгал жаваа | 2016 | 16T6-F3 |
| 4 | Шаргалдуу лидэр | 2014 | SFG-S1 |
| 5 | Шаргалдуу лидэр | 2014 | SFG-R3 |

Мөөгөнцрийн өсгөврийн ханд бэлтгэх, дээжинд алкалоидын чанарын шинжилгээ хийх

Мөөгөнцрийг Potato Dextrose Agar (Biolab, Hungary) тэжээлт орчинд 7-10 хоног өсгөвөрлөсний дараа орчны гадаргуу дээрх мөөгөнцрийн агаарын мицеллийг хусч аван, эсийн биомассаас 2 дахин их 99.7%-ийн этанолаар 48 цаг, 2 удаа хандлав. Этанолон хандыг фильтрийн цаас (Advantec, Japan) ашиглан эсийн биомассаас ялгаж, нэрэгч аппаратанд 75°C-д нэрж өтгөрүүлсэн. Ханданд алкалоид байгаа эсэхийг Метанол:Хлороформ (8:2) системд

ялтсан нимгэн үеийн хроматографи тавьж, Драгендорффын урвалжаар илрүүлсэн [6]. Алкалоид илэрсэн мөөгөнцрийн хандыг цаашдын судалгаанд ашиглав.

Эндофит мөөгөнцрийн төрлийн хамаарлыг морфологи бүтэц болон молекул маркер ашиглан тодорхойлох

Эндофит мөөгөнцрийн төрлийг тодорхойлохдоо нүүрстөрөгчөөр ядмаг орчинд (глюкоз 1г/л, KH_2PO_4 1г/л, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2г/л, KCl 0.2г/л, $NaNO_3$ 2г/л, дрожжын ханд 0.2г/л, агар 20г/л,) 7-14 хоног өсгөвөрлөн, спор, мицель, морфологи бүтцийг нь Olympus CX41

гэрлийн микроскопоор 40х-500х өсгөлттэй харж, стандарт түлхүүр толь бичиг ашиглан тодорхойлсон [7].

Морфологи бүтцээр тодорхойлох боломжгүй мөөгөнцрийн геномын ДНХ-г “Prepman Ultra Sample Reagent” цомог ашиглан үйлдвэрлэгч компанийн зааврын дагуу бэлдэв. ITS хэсэг болон 28S рРНХ генийн D1/D2 домейныг хамтад нь ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3-') болон NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') гэсэн хос праймер ашиглан ПГУ хийж олшруулсан. ПГУ-г GoTaq цомгийг ашиглан, GeneAmp PCR System 9700 машинд 94°C-д 2 мин (1цикл); 98°C-д 10 сек; 56°C-д 30 сек; 68°C-д 90 сек (30 цикл), 4°C-д 5 мин горимын дагуу явуулсан. ПГУ бүтээгдэхүүнийг Accuprep® kit ашиглан цэвэршүүлж, нуклеотидын дарааллыг ZanaaSpex компаниар тодорхойлуулав. Нуклеотидын дарааллыг MEGA 7 программ ашиглан харьцуулалт хийсэн [8].

Мөөгөнцрийн өсгөврийн ханднаас нийлбэр алкалоид цэвэршүүлэх

Нимгэн үеийн хроматографиар алкалоид илэрсэн ханднуудыг авч бэлдмэлийн нимгэн үеийн хроматографи ашиглан эсийн бусад хольцоос салгаж, нийлбэр алкалоидыг силикагель 60 (Merck KGaA, Germany) ашиглан цэврээр ялгав. Силикагель, кальцийн карбонат, ус зэргийг (1:1:2)-ийн харьцаатай зуурч бэлтгэсэн бэлдмэлийн нимгэн үеийн бэлдэцийн (2 мм, 20 х 60 мм) эхлэлийн шугаманд дээжээ тавьж, Этилацетат:Хлороформ:Ацетон:Метанол (4:4:1:1) системээр гүйлгэсний дараа хэт ягаан туяаны 254нм-т шалган, нийлбэр алкалоидтой хэсгийг нимгэн үеийн бэлдэцийн шилэн гадаргуунаас хусч аваад 99,8% этанолд уусгаж нийлбэр алкалоидыг силикагельнээс салгаж авав. Цэвэршүүлсэн нийлбэр алкалоидыг цаашдын туршилтанд ашигласан [6; 9].

Микробын эсрэг идэвх тодорхойлох

Диск диффуз болон микрошингэрүүлгийн арга ашиглан 5 тест организм буюу *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger*-ийн эсрэг идэвхийг тодорхойлов. 0.5 McFarland буюу барийн сульфатын уусмал ашиглан, урьдчилан 20 цаг 35°C-д өсгөвөрлөсөн бактерийн тест өсгөврийг 5×10^6 эс/мл, дрожж, мөөгөнцрийг 2×10^3 эс/мл байхаар тооцов. Нийлбэр алкалоидын дээжнээс 500мкг/мл концентрацитай (0.1% DMSO-д уусгасан) бэлдэж цаасан дискэнд (6мм диаметр) шингээн тест организмтай орчинд тавьж 48 цаг 35°C-д өсгөвөрлөсөн. Дээж шингээсэн дискийн эргэн тойронд үүссэн цэвэр зоныг хэмжиж, эерэг (канамицин сульфат 50мг/мл, Нистатин 1.2 мг/мл) хяналттай харьцуулан микробын эсрэг идэвхийг тодорхойлсон [10].

Мөн бактерийн тест өсгөврийг 5×10^6 эс/мл, дрожж, мөөгөнцрийг 2×10^3 эс/мл байхаар тооцон 96 үүрт хавтанд тарьсан. Нийлбэр алкалоидын 5 дээж тус бүрийг 200мкг/мл, 100мкг/мл, 50мкг/мл, 10мкг/мл (0.1% DMSO-д уусгасан) хүртэлх 4 өөр концентрацитайгаар тест өсгөврүүдийг 24 цаг үйлчлэн, спектрофотометрийн 620нм-т хэмжив. Хяналт болгон нийлбэр алкалоидоор үйлчлээгүй ижил тооны эсүүд болон эерэг хяналтаар канамицин сульфат (50мг/мл) болон Нистатин (1.2 мг/мл)-аар үйлчилсэн, сөрөг хяналтаар 0.1% DMSO-оор нэмсэн эсүүд, бланкаар нийлбэр алкалоидын 4 өөр концентраци тус бүрийг авсан. Концентраци тус бүрийн эсийг дарангуйлах идэвхийг дараах томьёо (1)-г ашиглаж тооцов [10; 11]. Микробын эсрэг идэвхтэй дээжний хамгийн бага дарангуйлах тунг (95%) Microsoft Excel програм ашиглан, шулууны тэгшитгэлээр тооцож гаргав.

$$\text{Дарангуйлах идэвх \%} = 100 - \left[\left(\frac{A_{\text{дээж}}}{A_{\text{сөрөг хяналт}}} \right) \times 100 \right], \quad (1)$$

Элэгний хавдрын эсийг дарангуйлах идэвх тодорхойлох

Нийлбэр алкалоидын хандны хавдрын эсийг дарангуйлах идэвхийг элэгний хавдрын эс HepG2 дээр туршив. Эсийн өсгөвөр хийхдээ нэг давхарга бүрэн ургасан эсийг фосфатын буферээр угааж, трипсин хийж 37°C бүхий CO₂ инкубаторт 5 минут инкубацласан. Трипсинтэй ижил хэмжээний тэжээлийн орчин хийж трипсиныг идэвхгүйжүүлж 1100 эрг/мин-д 5 минут центрифугдсэн. Дээд шингэн хэсгийг соруулан хаяж тэжээлийн орчин хийж сайтар пипеткээр холиод, трипан хөх будагчаар будаж, Фухс-Розенталын тор ашиглан 1мл-т агуулагдах эсийн тоог тоолж, хэрэгтэй хэмжээгээр үүрт хавтанд тарьж судалгаанд хэрэглэсэн [12].

8*10³ эс/үүр байхаар тооцон 96 үүрт хавтанд тарьж 37°C бүхий CO₂ инкубаторт 24 цаг инкубацласан. НА-ын 5 дээж (0.1% DMSO-д уусгасан) тус бүрийг 250мкг/мл, 100мкг/мл, 50мкг/мл, 25мкг/мл, 10мкг/мл

хүртэлх 5 өөр концентрацитайгаар хавдрын шугаман эсүүдийг 24 цаг үйлчилсэн. Хяналт болгон НА-аар үйлчлээгүй ижил тооны эсүүдийг авсан. 24 цагийн дараагаар эсүүдийг фосфатын буферээр угааж, WST-8:тэжээлийн орчин (1:10) холимгоос үүр тус бүр 100мкл хэмжээтэйгээр хийж 37°C бүхий CO₂ инкубаторт 4 цаг инкубацлан, спектрофотометрийн 450нм-т хэмжиж тооцсон. Концентраци тус бүрийн эсийг дарангуйлах идэвхийг дараах томъёо (2)-г ашиглаж тооцов [13]. Элэгний хавдрын эсийг дарангуйлах идэвхтэй дээжний 50% дарангуйлах тунг Microsoft Excel програм ашиглан, шулууны тэгшитгэлээр тооцож гаргав. Эсийн митохондрын редуктаза энзимийн нөлөөгөөр WST-8 [2-(2-метокси-4-нитрофенил)-3-(4-нитрофенил)-5-(2,4-дисульфифенил)-2Н-тетразолийн давс]-аас формазан (улбар шар өнгөтэй) үүсч түүний өнгөний хувирлыг спектрофотометрийн 450нм-т хэмжиж хяналттай харьцуулан тооцсон [13].

$$\text{Эс дарангуйлах идэвх \%} = 100 - [(A_{\text{дээж}} - A_{\text{бланк}}) / (A_{\text{хяналт}} - A_{\text{бланк}})] \times 100, \quad (2)$$

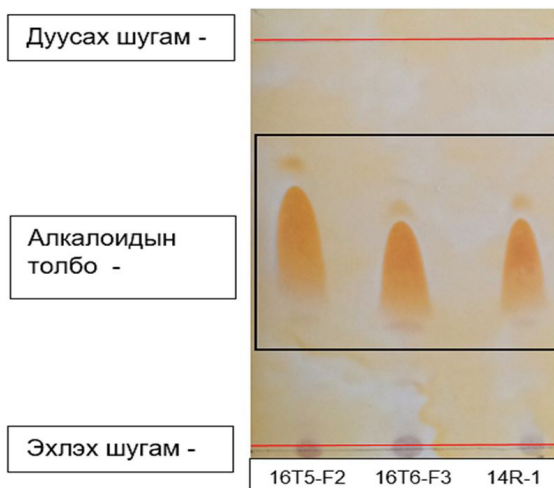
ҮР ДҮН БА ХЭЛЭЛЦҮҮЛЭГ

Мөөгөнцрийн өсгөврийн ханданд алкалоидын чанарын шинжилгээ хийсэн дүн

Алкалоид агуулдаг ургамлаас ялгасан 55 өсгөврийг эсийн ханд бэлтгэх арга зүйн дагуу хандалж, тэдгээрт ялтсан нимгэн үеийн хроматографиар алкалоидын шинжилгээ хийв. Үр дүнд 55 өсгөврөөс Долгионт гишүүнээс ялгасан 14R-1, Алаг цэцэгт башираас ялгасан 16T5-F2, Байгал

жаваас ялгасан 16T6-F3 гэсэн 3 өсгөврийн ханданд (1-р зураг) алкалоидын толбо илрэв.

Нимгэн үеийн хроматографиар толбо илэрсэн 14R-1, 16T5-F2, 16T6-F3 өсгөврүүд болон өмнөх судалгаагаар алкалоид нийлэгжүүлдэг нь тогтоогдсон Шаргалдуу лидэрээс ялгасан SFG-S1, SFG-R3 зэрэг өсгөврүүд дээр цаашдын туршилтуудыг хийж гүйцэтгэсэн.



Зураг-1. Мөөгөнцрийн хандны нимгэн үеийн хроматограмм

Эндифит мөөгөнцрийн төрлийн хамаарлыг морфологи бүтэц болон молекул маркер ашиглан тодорхойлсон дүн

Алкалоидын чанарын шинжилгээгээр алкалоид нийлэгжүүлдэг нь тогтоогдсон 3 өсгөврийн төрлийн хамаарлыг морфологи бүтцээр нь тодорхойлоход 16T5-F2 ба 16T6-F3 өсгөвөр *Fusarium* төрөлд хамаарч байв. Харин 14R-1 өсгөвөр спор үүсгээгүй учир молекул маркер ашиглан 28S рРНХ-н D1/D2 домейны нуклеотидын дараалал дээр тулгуурлан тодорхойлоход *Fusarium* төрөлд хамаарч байсан (2-р хүснэгт). Өмнөх судалгаагаар Шаргалдуу лидэрээс ялгасан SFG-S1, SFG-R3 өсгөврүүдийг

молекул маркер ашиглан *Fusarium* sp. болохыг тодорхойлсон [6]. Hidayat [14] нар *Fusarium* төрөлд хамаарах зүйлүүдийн нийлэгжүүлдэг хинин болон цинконидиний алкалоидыг судалсан байна. Mahmood [15] нар *Boletus*, *Fusarium*, *Psilocybe* төрлийн эндифит мөөгөнцрийн зүйлүүдийн нийлэгжүүлдэг алкалоидыг судалжээ. Уг судалгааны тоймдоо *Fusarium*-ийн төрөл илүү олон төрлийн биологийн идэвхт алкалоид нийлэгжүүлдэг болохыг дурдсан байна. Бидний судалгааны ажлаар алкалоид нийлэгжүүлж буй мөөгөнцрүүд бүгд *Fusarium* төрөлд хамаарч байгаа нь дээрх судалгааны ажлуудтай нийцэж байна.

Хүснэгт-2. Мөөгөнцрийг морфологи бүтэц болон молекул маркер ашиглан тодорхойлсон дүн

| № | Өсгөврийн дугаар | Арга зүй | Төрлийн хамаарал |
|---|------------------|-------------------|------------------|
| 1 | 16T5-F2 | Морфологи бүтцээр | <i>Fusarium</i> |
| 2 | 16T6-F3 | | <i>Fusarium</i> |
| 3 | 14R-1 | Молекул маркераар | <i>Fusarium</i> |

Мөөгөнцрийн өсгөврийн ханднаас нийлбэр алкалоид ялгасан дүн

Алкалоид нийлэгжүүлдэг дээрх 5 өсгөврийн ханднаас нийлбэр алкалоидыг арга зүйн дагуу бусад хольцоос цэвэрлэн ялгав. Нийлбэр алкалоидыг туршилтанд

хэрэглэхдээ 0.1% DMSO-д уусган ашигласан ба SFG-S1 өсгөврөөс 7700мкг/мл, SFG-R3 - 7700мкг/мл, 16T5-F2 - 5300мкг/мл, 16T6-F3 - 11200мкг/мл, 14R-1 - 12200мкг/мл тус тус нийлбэр алкалоид ялгав.

Микробын эсрэг идэвх тодорхойлсон дүн

Нийлбэр алкалоидын дээжнүүдэд микробын эсрэг идэвхийг *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* зэрэг 5 тест организмд диск диффузын аргаар туршихад SFG-S1, SFG-R3, 16T6-F3, 14R-1 мөөгөнцрийн нийлбэр алкалоид Грам эрэг бактери, дрожж, мөөгөнцрийн эсрэг идэвх үзүүлсэн. Харин антибиотикийн

хяналттай харьцуулж 60%-иас дээш идэвхийг тооцоход SFG-S1-ийн нийлбэр алкалоид *S. aureus*-ийн эсрэг 17.6±0.5мм (72.7%), *B. subtilis*-ийн эсрэг 15.3±1.15мм (71.5%), SFG-R3-ын нийлбэр алкалоид *S. aureus*-ийн эсрэг 17.3±1.5мм (71.5%), *B. subtilis*-ийн эсрэг 15.6±1.15мм (72.9%), 16T6-F3-ын нийлбэр алкалоид *S. cerevisiae*-ийн эсрэг 13.7±0.6мм (74%) идэвхтэй байв (3-р хүснэгт).

Хүснэгт-3. Микробын эсрэг идэвх тодорхойлсон дүн

| № | Өсгөврийн дугаар | Микробын эсрэг идэвх, мм (диаметр) | | | | |
|--|------------------|------------------------------------|------------------|--------------------|----------------------|-----------------|
| | | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>S. cerevisiae</i> | <i>A. niger</i> |
| | | НА | НА | НА | НА | НА |
| 1 | SFG-S1 | - | 17.6±0.5 | 15.3±1.15 | 7.7±0.6 | 10.3±0.6 |
| 2 | SFG-R3 | - | 17.3±1.15 | 15.6±1.15 | 7.3±0.6 | 8.7±0.6 |
| 3 | 16T5-F2 | - | - | - | - | - |
| 4 | 16T6-F3 | - | 12.3±1.5 | 9.7±0.6 | 13.7±0.6 | 8.3±0.6 |
| 5 | 14R-1 | - | - | 7.7±0.6 | - | - |
| Хяналт (Канамицин сульфат 50мг/мл), (Нистатин 1.2 мг/мл) | | 22±0.5 | 24.2±0.2 | 21.4±0.7 | 18.5±1 | 16.5±1 |

Тайлбар: НА-нийлбэр алкалоид

Хяналттай харьцуулахад 60%-иас дээш идэвх үзүүлсэн SFG-S1, SFG-R3, 16T6-F3-ын нийлбэр алкалоидын дээжинд микробын эсийг дарангуйлах хамгийн бага тун (ХБДТ) тогтоох туршилтыг хийж гүйцэтгэв. Үр дүнд SFG-S1 өсгөврийн нийлбэр алкалоид *S. cerevisiae*-ийн эсрэг 244.8мкг/мл, *A. niger*-

ийн эсрэг 256.2мкг/мл концентрацитай (1-р графикт үзүүлэв) байна. Мөн 16T6-F3 өсгөврийн нийлбэр алкалоидын хамгийн бага дарангуйлах тун нь *S. cerevisiae*-ийн эсрэг 213.8мкг/мл, *A. niger*-ийн эсрэг 209.9мкг/мл концентрацитай (2-р графикт үзүүлэв) байлаа.

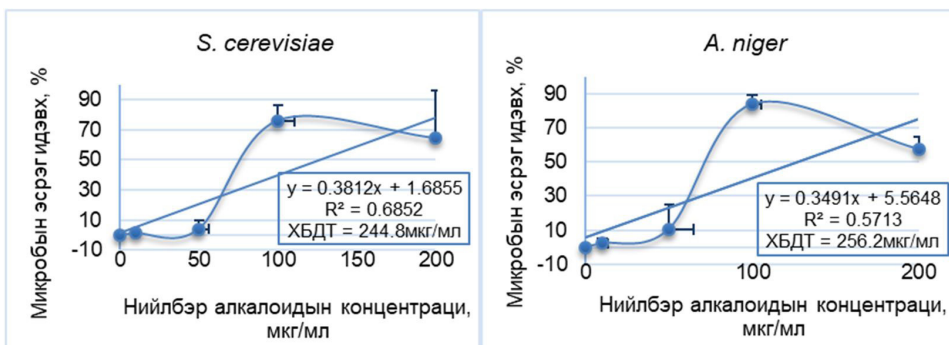


График-1. SFG-S1 өсгөврийн нийлбэр алкалоидын микробын эсийг дарангуйлах идэвхийн жиших муруй

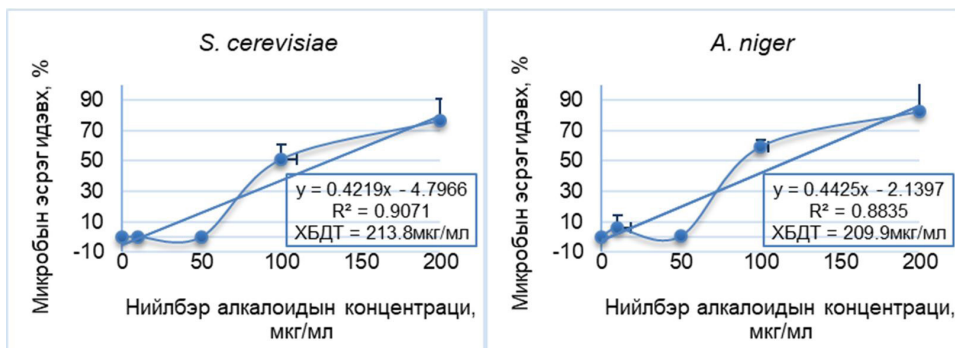


График-2. 16Т6-Ү3 өсгөврийн нийлбэр алкалоидын микробын эсийг дарангуйлах идэвхийн жиших муруй

Эндофит мөөгөнцрийн нийлэгжүүлдэг алкалоидын талаарх тойм өгүүлэлд [16] алкалоидын микробын эсийг дарангуйлах хамгийн бага тунг тогтоох судалгаагаар асперфумоид *C. albicans*-ийн эсрэг 75мкг/мл концентрациар, 7-амин-4-метилкумарин *C. albicans*-ийн эсрэг 15мкг/мл, *A. niger*-ийн эсрэг 25мкг/мл концентрациар үйлчлэхэд микробын эсийг дарангуйлах идэвхтэй байсныг дурджээ. Тоймд дурдсан эдгээр алкалоид нь 1 төрлийн цэвэр алкалоид юм. Бидний судалгаагаар SFG-S1, 16Т6-Ү3-ын нийлбэр алкалоидын хамгийн бага дарангуйлах тун 200мкг/мл-ээс дээш

буюу өндөр тунтай байгаа учир микробын эсрэг үйлчлэлтэй алкалоидыг нийлбэр алкалоидоос дан байдлаар ялган микробын эсийг дарангуйлах идэвхийг тодорхойлох нь зүйтэй юм.

Элэгний хавдрын эсийг дарангуйлах идэвх тодорхойлсон дүн

SFG-S1, SFG-R3, 16Т5-Ү2, 16Т6-Ү3, 14R-1 өсгөврүүдийн нийлбэр алкалоидын дээжийг 5 өөр концентрациар элэгний хавдрын эс HepG2-д үйлчлэв. Үр дүнд SFG-R3, 16Т6-Ү3, 14R-1 өсгөврийн нийлбэр алкалоид элэгний хавдрын эс HepG2-ийг дарангуйлах идэвхтэй (3-р график) байсан.

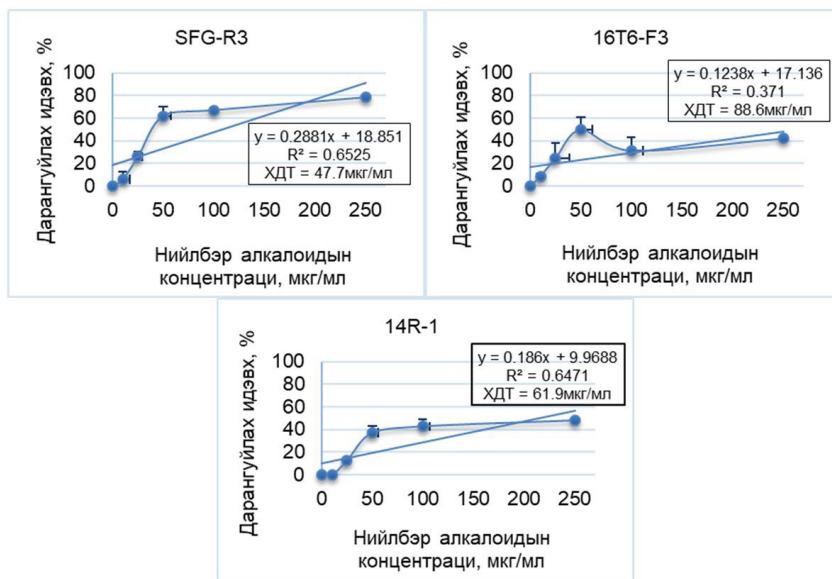


График-3. Мөөгөнцрийн нийлбэр алкалоидын элэгний хавдрын эс HepG2-ийг дарангуйлах идэвхийн жиших муруй

Элэгний хавдрын эс НерG2-ийг хагас дарангуйлах тунг (ХДТ) тогтооход SFG-R3-ийн НА 47.7мкг/мл, 16Т6-F3-ийн НА 88.6мкг/мл, 14R-1-ийн НА 61.9 мкг/мл концентрацид үйлчлэлтэй байв. Хавдрын шугаман эсээс хамаарч харилцан адилгүй ч алкалоидын идэвхийг өндөр идэвхтэй (IC50<20мкг/мл), дундаж идэвхтэй (20мкг/мл<IC50<100мкг/мл) гэж үздэг [17].

SFG-R3, 16Т6-F3, 14R-1 өсгөврүүдийн нийлбэралкалоиднь НерG2 элэгний хавдрын эсийг дарангуйлах дундаж идэвхтэй болох нь туршилтаар тогтоогдлоо. Shao нарын [18] судалгааны ажилд *Penicillium sp.*-ээс

шинэ пирролын бүлгийн пеницинолин алкалоид ялган, хүний уушигний хавдрын эс (95-D) болон элэгний хавдрын эсийг (НерG2) дарангуйлах идэвхийг тогтооход хагас дарангуйлах тун нь 95-D эсэд 0.57мкг/мл, НерG2 эсэд 6.5мкг/мл тус тус байжээ. Харин Wang нар [19] *Penicillium sp.*-ээс асперфумоид алкалоид ялгаж, элэгний хавдрын эсийг хагас дарангуйлах тун нь 15мкг/мл болохыг тогтоосон байна. Иймээс цаашид SFG-R3, 16Т6-F3, 14R-1-ийн нийлбэр алкалоидоос элэгний хавдрын эсэд үйлчлэлтэй алкалоидыг цэврээр ялгах нь зүйтэй гэж үзлээ.

ДҮГНЭЛТ

Алкалоид агуулдаг ургамлаас ялгасан эндофит мөөгөнцрийн өсгөврүүд дээр хийсэн алкалоид нийлэгжлийн скринингээр алкалоид нийлэгжүүлдэг нь тогтоогдсон 5 өсгөвөр бүгд *Fusarium* төрөлд хамаарч байгаа нь энэ төрлийн мөөгөнцрүүд алкалоид нийлэгжүүлэх чадвараар илүү болохыг харуулж байна. Тэдгээрээс ялгасан нийлбэр алкалоидын микробын эсрэг болон элэгний хавдрын эсийг дарангуйлах идэвхийг тодорхойлоход SFG-S1, SFG-R3, 16Т6-F3 өсгөврийн нийлбэр алкалоид микробын эсрэг идэвхтэй, SFG-R3, 16Т6-F3, 14R-1 өсгөврийн нийлбэр алкалоид элэгний хавдрын эсийг дарангуйлдаг болох нь тогтоогдлоо. Цаашид нарийвчлан

судалснаар микробын болон элэгний хавдрын эсэд үйлчлэлтэй алкалоидыг гарган авах боломжтой юм.

Талархал: Энэхүү судалгааны ажлыг ШУТСангийн санжүүжилттэй ШУА-ийн “Монгол орны зарим зүйл эмийн ургамлын эндофит мөөгөнцрийн биологийн идэвх” грант төслийн хүрээнд хийж гүйцэтгэв. Захиалагч, санхүүжүүлэгч байгууллагууд болон элэгний хавдрын НерG2 эсийг дарангуйлах идэвх тодорхойлох ажлыг хийж гүйцэтгэхэд туслалцаа үзүүлсэн Ерөнхий болон сорилын биологийн хүрээлэнгийн Молекул биологийн лабораторийн эрхлэгч доктор Д. Гантулга нарт талархал илэрхийлье.

НОМ ЗҮЙ

1. Arnold, A. E. (2007). Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biol. Rev.* 21: 51–66.
2. Strobel, G. & Daisy. B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67(4), p491–502.
3. Yan, X.N., Sikora, I.R., Zheng, J. W. (2011). Potential use of cucumber (*Cucumis sativus* L.) endophytic fungi as seed treatment agents against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *J. Zhejiang Univ.-Sci. B. (Biomed. & Biotechnol.)*, 12(3):219-225. [doi:10.1631/jzus. B1000165]
4. Pinheiro EA, Carvalho JM, dos Santos DC, Feitosa Ade O, Marinho PS, Guilhon GM. (2013). Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus sp.* EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. *Nat Prod Res*; 27(18): 1633-1638.
5. Enkh-Amgalan. J. (2013). Isolation and antimicrobial activity of endophytic fungi from medicinal

- plants in Mongolia. Proceeding of the Institute of Biology №29, MAS. p35-37.
6. Ж. Энх-Амгалан, Б. Мөнгөншагай, Т. Адъяадолгор, Ж. Сарантуяа, Х. Дэлгэр, Д. Сэлэнгэ. (2016). Шаргалдуу лидэр (*Sophora flavescens* Ait)-ээс ялгасан эндофит мөөгөнцрийн өсгөврүүдийг тодорхойлж, тэдгээрт матрин, оксиматрин илрүүлсэн дүнгээс. Эрдэм шинжилгээний бүтээл. Ерөнхий болон Сорилын Биологийн Хүрээлэн №32, ШУА. Х282-287
 7. Katsuhiko Ando. (2014). Identification of mitosporic fungi. Biological resource center. National Institute of Technology and Evaluation. Japan.
 8. Arbefeville, S., Harris A., Ferrieri. P. (2017). Comparison of Sequencing the D2 Region of the Large Subunit Ribosomal RNA Gene (MicroSEQ®) Versus the Internal Transcribed Spacer (ITS) Regions Using Two Public databases for Identification of Common and Uncommon Clinically Relevant Fungal Species. *Journal of Microbiological Methods*, S0167-7012 (17) 30165-3, doi: 10.1016/j.mimet.2017.06.015.
 9. Józwiak, G. W., Waksmundzka – Hajnos, M. (2007). Preparative-layer chromatography of an extract of alkaloids from *Fumaria officinalis*. *Acta chromatographica*, No.18.
 10. Mounyr, B., Moulay, S., Saad, K. I. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6: 71–79
 11. Wayne, PA. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. 41-42pp.
 12. Dojindo Molecular Technologies, Inc. (2016). Cell Proliferation Protocol Colorimetric: 4-15
 13. Dojindo Molecular Technologies, Inc. (2016). “Cell Counting Kit-8”: 4-15
 14. Hidayat, I., Radiastuti, N., Rahayu, G., Achmadi, S., Okane, I. (2016). Three Quinine and Cinchonidine producing *Fusarium* species from Indonesia. *Current Research in Environmental and Applied Mycology* 6 (1) ISSN 2229-2225: 20–34
 15. Mahmood, Z. A., Ahmed, S.W., Azhar, I., Sualeh, M., Baig, M. T., Zoha, M. (2015). Bioactive alkaloids produced by fungi I. Updates on alkaloids from the species of the genera *Boletus*, *Fusarium* and *Psilocybe*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. <http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2018.41>
 16. Zhang, Y., Hana, T., Ming, Q., Wua, L., Rahman, K., Qin, L. (2012). Alkaloids Produced by Endophytic Fungi: A Review. *Natural Product Communications* Vol. 7 No. 7: 963 – 968
 17. Stevigny C., Bailly C., Quetin-Leclercq J. (2005). Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, Vol. 5, No. 2.173-182.
 18. Shao C-L, Wang C-Y, Gu Y-C, Wei M-Y, Pan J-H, Deng D-S, She Z-G, Lin Y-C. (2010). Penicoline, a new pyrrolyl 4-quinolinone alkaloid with an unprecedented ring system from an endophytic fungus *Penicillium* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20: 3284-3286.
 19. Wang FW, Hou ZM, Wang CR, Li P, Shi DH. (2008) Bioactive metabolites from *Penicillium* sp., an endophytic fungus residing in *Hopea hainanensis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24, 2143-2147.

ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF ALKALOIDS PRODUCED BY ENDOPHYTIC FUNGI

Amarbayasgalan M.¹, Nomin M.², Enkh-Amgalan J.^{1}*

¹Laboratory of Microbiology, Institute of General and Experimental Biology,
Mongolian Academy of Sciences, Mongolia

²Laboratory of Molecular Biology, Institute of General and Experimental Biology,
Mongolian Academy of Sciences, Mongolia

* corresponding author: e-mail: enkh27@yahoo.com

Abstract: In this study, 55 endophytic fungal strains isolated from alkaloid containing plants in Mongolia were screened for their production of alkaloids. TLC analysis of ethanolic crude extracts revealed the presence of alkaloids in 5 endophytic fungal strains.

The alkaloid producing strains were identified based on their morphological characteristics and/or the D1/D2 domain sequences of 28S rRNA gene. The results showed that they all belong to the genus of *Fusarium*. Further, total alkaloid compounds of the 5 fungal strains were isolated and examined for their antimicrobial and cytotoxic activities.

As results, alkaloid compounds of SFG-S1 and 16T6-F3 strains were active against yeast and fungi, and alkaloid compounds of SFG-R3, 16T6-F3, 14R-1 strains exhibited cytotoxic activity against HepG2 liver cancer cells.

Keywords: Endophytic fungi; alkaloid; antimicrobial activity; cytotoxic activity;