

学校编号: 10384

分类号_____密级_____

学号: B200226008

UDC_____

厦门大学

博士学位论文

裸子植物内生真菌 *Xylaria* sp. NCY2 和 *Tubercularia* sp. TF5 次生代谢产物的研究

The Secondary Metabolites of *Xylaria* sp. NCY2 and
Tubercularia sp. TF5 Isolated from Gymnosperm plants

胡志钰

指导教师姓名: 苏文金 教授

沈月毛 教授

申请学位级别: 博士学位

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2008年7月18日

论文答辩日期: 2008年7月30日

学位授予单位: 厦门大学

学位授予日期: 年 月 日

答辩委员会主席: 黄培强

评 阅 人: 许平, 闵航

朱伟明, 陈向东, 韦革宏

2008年8月15日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(微生物药物)课题(组)的研究成果,获得(微生物药物)课题(组)经费或实验室的资助,在(微生物药物)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

摘 要	I
Abstract	III
常用英文缩写词.....	V
本论文所分离鉴定的新化合物.....	VII
前言：裸子植物内生真菌研究进展	1
1. 抗肿瘤活性化合物紫杉醇产生菌.....	2
2. 具有抗菌活性的内生真菌.....	6
3. 具有抗肿瘤活性的内生真菌	13
4. 具有免疫调节活性的内生真菌	17
5. 具有其他生物活性的内生真菌	17
6. 本课题研究目的、内容和意义	19
材料与amp;方法	21
1. 材料.....	21
2. 方法.....	25
结果与分析	34
1. 植物内生真菌的分离和活性筛选	34
1.1. 内生真菌的分离	34
1.2. 内生真菌的抗真菌活性	34
1.3. 内生真菌的抗肿瘤活性	35
1.4. NCY2 菌株的鉴定	36
2. 菌株 <i>Xylaria</i> sp. NCY2 的次生代谢产物的分离和结构测定	39
2.1. 发酵产物的提取	39
2.2. 发酵产物的分离纯化.....	39
2.2.1. 组分CY1 的分离纯化.....	39
2.2.2. 组分CY2 的分离纯化.....	46
2.2.3. 组分CY3 的分离纯化.....	51

2.2.4. 组分CY4 的分离纯化.....	57
2.2.5. 组分CY6 的分离纯化.....	60
2.3. 化合物的结构解析.....	61
2.3.1. 新倍半萜类化合物.....	62
2.3.1.1. 化合物H19.....	62
2.3.1.2. 化合物H21.....	64
2.3.1.3. 化合物NC.....	66
2.3.1.4. 化合物H53.....	68
2.3.1.5. 化合物H41.....	70
2.3.1.6. 化合物H59.....	71
2.3.1.7. 化合物H60.....	72
2.3.2. 新聚酮类化合物.....	74
2.3.2.1. 化合物hp2.....	74
2.3.2.2. 化合物H63.....	76
2.3.2.3. 化合物H50-2.....	76
2.3.2.4. 化合物H51-2.....	78
2.3.2.5. 化合物H51-1.....	78
2.3.2.6. 化合物H48.....	78
2.3.2.7. 化合物H40.....	80
2.3.2.8. 化合物hp7.....	80
2.3.3. 已知化合物.....	81
2.3.3.1 化合物N3.....	81
2.3.3.2. 化合物N5.....	83
2.3.3.3. 化合物H49.....	84
2.3.3.4. 化合物H61.....	84
2.3.3.5. 化合物NCYA.....	84
2.3.3.6. 化合物NCYB.....	84
3. 菌株 <i>Tubercularia</i> sp. TF5 次生代谢产物的分离和结构测定.....	85
3.1. 发酵产物的提取.....	85

3.2. 菌株发酵产物的分离纯化	85
3.2.1. 乙酸乙酯相提取物的分离纯化	85
3.2.2. 正丁醇相提取物的分离纯化	88
3.3. 化合物的结构解析	89
3.3.1. 化合物T1	90
3.3.2. 化合物T2	90
3.3.3. 化合物T3	90
3.3.4. 化合物T4	91
3.3.5. 化合物T5	91
3.3.6. 化合物T6	94
3.3.7. 化合物T7	94
3.3.8. 化合物T8	94
3.3.9. 化合物T9	96
4. 新化合物的生物活性	100
讨论与结论	102
1. 裸子植物内生真菌的分离与筛选	102
2. 内生真菌次生代谢产物	103
2.1. 内生真菌来源的倍半萜类化合物	103
2.2. 内生真菌来源的聚酮类化合物	105
2.3. 内生真菌来源的二萜苷类新化合物	106
3. 植物内生真菌次生代谢产物的分离策略	106
3.1. 菌株来源	107
3.2. 生物活性筛选和化学筛选	108
4. 化合物分离纯化手段的思考	109
5. 结论与展望	112
参考文献	115
致 谢	126

Table of Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract	III
List of Abbreviations	V
New Compounds Isolated In This Study	VII
Introduction: Advance on Endophytes from Gymnosperm Plants	1
1. Advance on Endophytic fungi Producing Taxol	2
2. Endophytic fungi with Antimicrobial Activity	6
3. Endophytic fungi with Antitumor Activity	13
4. Endophytic fungi with Immunomodulatory Activity	17
5. Endophytic fungi with Other Activities	17
6. Purpose of This Thesis	19
Materials and Methods	21
1 Materials	21
2 Methods	25
Results and Analysis	34
1 Isolation and Screening of Endophytic fungi	34
1.1 Isolation of Endophytic Fungi	34
1.2 Antifungi Activities of Endophytic Fungi	34
1.3 Antitumor Activities of Endophytic Fungi	35
1.4. Identification of Strain NCY2	36
2. Study on Secondary Metabolites from Xylaria sp. NCY2	39
2.1. Fermentation and Extraction	39
2.2 Isolation of Metabolites	39
2.2.1 Isolation of Fraction CY1	39
2.2.2 Isolation of Fraction CY2	46
2.2.3 Isolation of Fraction CY3	51

2.2.4 Isolation of Fraction CY4	57
2.2.5 Isolation of Fraction CY6	60
2.3 Structure of Compounds.....	61
2.3.1 New Sesquiterpenoids Compounds	62
2.3.1.1 Compound H19	62
2.3.1.2 Compound H21	64
2.3.1.3 Compound NC.....	66
2.3.1.4 Compound H53	68
2.3.1.5 Compound H41	70
2.3.1.6 Compound H59	71
2.3.1.7 Compound H60	72
2.3.2 New Polyketide Compounds.....	74
2.3.2.1 Compound hp2.....	74
2.3.2.2 Compound H63	76
2.3.2.3 Compound H50-2	76
2.3.2.4 Compound H51-2	78
2.3.2.5 Compound H51-1	78
2.3.2.6 Compound H48	78
2.3.2.7 Compound H40	80
2.3.2.8 Compound hp7	80
2.3.3 Known structure of compounds	81
2.3.3.1 Compound N3	81
2.3.3.2 Compound N5	83
2.3.3.3 Compound H49	84
2.3.3.4 Compound H61	84
2.3.3.5 Compound NCYA.....	84
2.3.3.6 Compound NCYB.....	84
3. Study on Secondary Metabolites from <i>Tubercularia</i> sp. TF5	85
3.1. Fermentation and Extraction.....	85
3.2 Isolation of Metabolites	85

3.2.1 Isolation of EtOAc Extract.....	85
3.2.2 Isolation of <i>n</i> -Butanol Extract.....	88
3.3 Structure of Compounds.....	89
3.3.1 Compound T1.....	90
3.3.2 Compound T2.....	90
3.3.3 Compound T3.....	90
3.3.4 Compound T4.....	91
3.3.5 Compound T5.....	91
3.3.6 Compound T6.....	94
3.3.7 Compound T7.....	94
3.3.8 Compound T8.....	94
3.3.9 Compound T9.....	96
4. Bioactivity of The New Compounds.....	100
Discussion and Conclusions.....	102
1. Isolation an Screen of endophytic fungi.....	102
2. Metabolites of Endophytic Fungi.....	103
2.1. Sesquiterpenoids from Endophytic Fungi.....	103
2.2. Polyketides from Endophytic fungi.....	105
2.3. Diterpene Glucoside from Endophytic fungi.....	106
3. Isolation Strategy of Secondary Metabolites from Endophytic fungi..	106
3.1 Strains.....	107
3.2. Bioactivity Screen and Chemical Screen.....	108
4. Artifice of Isolation.....	109
5. Conclusions and Prospect.....	112
References.....	115
Acknowledgements.....	126

摘 要

植物内生菌指定殖在植物组织内部而又不引起直接和明显病症的一类微生物，是植物微生态系统中的天然组成成分。植物内生菌在进化过程中与宿主建立了和谐的关系，其次生代谢产物十分丰富，是强生理活性和新结构类型天然产物的丰富来源。

裸子植物是地球上最古老的木本植物，其中不乏药用植物，我国是裸子植物种类最多，资源最丰富的国家。对其内生真菌的研究将有利于我国微生物药物的开发和珍稀植物资源的保护。本文以福建省两种珍稀药用裸子植物红豆杉和长叶榧为对象，对其内生真菌次生代谢产物进行研究，旨在发现具有较高生物活性的结构新颖的化合物，为开发新的微生物药物奠定基础。

从福建邵武和沙县的南方红豆杉和长叶榧树皮中分离得到内生真菌 92 株。采用抗菌活性筛选模型和细胞毒筛选模型对这些真菌的发酵液进行检测，抑菌实验显示，48.9%的菌株对一种或多种指示菌有抑制作用，19.6%的菌株具有高抗菌活性；抗肿瘤实验显示，16.3%的菌株对 HeLa, KB 或 HL-60 细胞有抑制作用 ($ID_{50} \leq 1 : 50$)， ID_{50} 在 200 或 200 倍以上的高活性菌株占总供测菌株的 5.4%，表明植物内生真菌中存在着广泛的抗真菌和抗肿瘤化学成分资源。

通过使用形态学和分子生物学方法，将 NCY2 菌株鉴定为炭角菌 (*Xylaria* sp. NCY2)。

基于发酵产物的活性筛选和 TLC 分析结果以及菌株的分类学地位，从 92 株内生真菌中选择了两株 NCY2 和 TF5，进行了较详尽的次生代谢产物研究。从 NCY2 菌株 PD 培养基液体静置发酵产物中分离鉴定了 21 个化合物，其中新化合物 15 个，包括 H19、H21、NC、H53、H41、H59、H60 七个新倍半萜化合物和 hp2、H63、H50-2、H51-1、H51-2、H48、H40、hp7 八个新聚酮化合物。从 TF5 菌株 PDA 培养基发酵产物中分离鉴定了一个新二萜苷化合物 T9 和 8 个已知化合物，包括两个二萜和三个松孢菌素类化合物。

对分离得到的 16 个新化合物进行了抗菌和抗肿瘤活性测定，结果表明，他们只有微弱的抗菌和抗肿瘤的活性，10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时对一种或几种指示菌的

抑制率大约为 20%-40%，对肿瘤细胞株抑制率大约为 20%-30%，深入的活性研究值得进一步开展。

本论文的研究结果表明，裸子植物内生真菌是结构新颖和新的生理活性物质的重要来源，是开发新药的宝贵资源。

关键词：裸子植物；内生真菌；次生代谢产物；南方红豆杉；长叶榧；

Xylaria sp. NCY2； *Tubercularia* sp. TF5

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Endophytes are the microbes that colonize living, internal tissues of plants without causing any immediate, overt negative effects. They are natural constituent of microecosystem inside plants and have established a harmonious relationship with their hosts in the long-term evolution process. Endophytes represent a dependable source of bioactive and chemically novel compounds since their secondary metabolites are abundant.

Gymnosperm plants are the most ancient xylophyte, many of them are pharmaceutical plants. China has very rich gymnosperm plants. Studies on endophytic fungi will promote the development of microbial medicine and help the protection of the valuable and rare plants. We have studied the secondary metabolites of the endophytic fungi from gymnosperm plants in Fujian province, *Taxus mairei* and *Torreya jackii* Chun, in order to discover the structure novel compounds with potential for new drugs.

92 strains of endophytic fungi were obtained from the bark of *Taxus mairei* and *Torreya jackii* Chun collected in Shaowu and Sha countries, Fujian province. The antitumor and antimicrobial activities of the fermentation broths of these endophytic fungi were tested. The results showed that the fermentation broths of 45 strains (about 48.9% of the total strains isolated) show noticeable growth inhibition against one or more indicator fungi, and about 19.6% of them have high activities against fungi; 15 (about 16.3%) of them have inhibition activities against HeLa, KB and/or HL-60 tumor cells with the $ID_{50} \leq 1:50$, and 5 (about 5.4%) of them have the high activities with the $ID_{50} \leq 1:200$.

The strain NCY2 was identified by morphological and molecule biological methods to be *Xylaria* sp.

According to the results of bioactivity screening, TLC analysis and Phylogeny among the isolates, two strains namely NCY2 and TF5, were chosen for further chemical research. Seven new sesquiterpenoids (H19, H21, NC, H53, H41, H59, H60) and eight new polyketides (hp2, H63, H50-2, H51-1, H51-2, H48, H40, hp7), along with 6 known compounds were isolated from liquid still culture of strain NCY2. A new diterpene glucoside compound (T9) and 8 known compounds were isolated from the fermentation culture of the strain TF5 on agar medium.

The antitumor and antimicrobial activities of the 16 new compounds were measured and they showed weak activities, the further researches on their bioactivities were valuable.

The results of this study indicated that endophytic fungi from gymnosperm plants are important source of novel chemically compounds, they are precious resources with potential for exploitation new drugs.

Keywords: gymnosperm plants; endophytic fungi; secondary metabolites;
Taxus mairei; *Torreya jackii* Chun; *Xylaria* sp. NCY2;
Tubercularia sp. TF5

常用英文缩写词

缩写式	全称
A	丙酮 (acetone)
AFLP	扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism)
C	氯仿 (chloroform)
COSY	Correlated spectroscopy
d	二重峰 (doublet) 化学位移 (chemical shift)
dd	doublet of doublet
DEPT	distortionless enhancement by polarlization transfer
DPPH	二苯代苦味酰自由基 (2,2-diphenyl-1,4-phthalazinedione)
drop/min	drop per minute
drop/tube	drop per tube
EA	乙酸乙酯 (ethyl acetate)
EC ₅₀	median (or half-maximal) effective concentration
ESI-MS	电喷雾质谱 (Electrospray ionization mass spectrometry)
h	hour
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
IC ₅₀	半数抑制浓度 (concentration giving 50% of maximal inhibition)
IR	Infra-red
ITS	(核糖体)基因转录间隔区 (Internal transcribed spaces)
m	多重峰 (multiplet)
M	甲醇 (methanol)
mg	milligram
μg	microgramme

MIC	最小抑制浓度 (Minimum inhibitory concentrations)
mM	millimolar
MS	Mass spectrometry
MTT	甲基四唑蓝 (Methyl Thiazolytetrazolium)
NCEs	新化学实体 (New chemical entities)
NMR	Nuclear magnetic resonance
PE	石油醚 (petroleum ether)
PBS	磷酸缓冲液 (phosphate-buffered saline)
ppm	part per million
q	四重峰 (quartet)
r/min	revolutions per minute
RAPD	随机扩增多肽性 (Randomly amplified polymorphic DNA)
Rf	Relative mobility
RFLP	限制性片断长度多肽性 (Restriction fragment length polymorphism)
RP-18	Reversed-phase octadecyl silica gel
s	单重峰 (singlet)
s/tube	second per tube
SDS	十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfonate)
t	三重峰 (triplet)
TLC	Thin layer chromatography
UV	ultraviolet
UV	紫外 (Ultraviolet)

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库