

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 200326041

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

红树植物内生真菌生物活性及菌株
A-1-2-3 次级代谢产物的初步研究

Study on Bioactivity of Endophytic Fungi from Mangrove
Plants and Secondary Metabolites Produced
by Fungus A-1-2-3

杨 丽 珊

指导教师姓名: 黄 耀 坚 教授

专业名称: 微 生 物 学

论文提交日期: 2006 年 7 月 3 日

论文答辩日期: 2006 年 7 月 30 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 沈月毛

评 阅 人: _____

2006 年 7 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士

目 录

摘要	I
英文摘要	III
前言	1
一、红树植物内生真菌及其聚酮类次级代谢产物	1
1. 红树植物及红树植物内生真菌简介	1
2. 红树植物内生真菌聚酮类次级代谢产物	2
二、拟茎点霉次级代谢产物	8
三、异苯并呋喃酮类化合物	11
1. 植物来源的异苯并呋喃酮类化合物	11
2. 真菌来源的异苯并呋喃酮类化合物	12
四、本课题研究目的，内容和意义	15
材料与amp;方法	17
一、材料	17
二、方法	22
结果及amp;分析	31
一、红树植物内生真菌的种群动态研究	31
1. 内生真菌的数量的季节变化	31
2. 内生真菌优势种群的季节变化	31
二、红树植物内生真菌的生物活性	32
1. 抗菌活性测定	32
2. 抗肿瘤活性测定	33
3. 生物活性菌株的分类	35
三、A-1-2-3 菌株次级代谢产物的研究	37
1. 菌株的发酵及培养物的处理	37
2. 发酵产物的分离纯化	37
四、化合物的结构解析	41
1. 异苯并呋喃酮类化合物	41
1.1 化合物 Y6	41
1.2 化合物 A4	42

1.3 化合物 A3	44
1.4 化合物 Y29	45
2. 真菌环氧二烯及其衍生物	47
2.1 化合物 A5	47
2.2 化合物 Y10	49
2.2.1 Y10 晶体的 <i>X-Ray</i> 单晶衍射分析及结构解析	49
2.2.2 Y10 的 NMR 数据分析及结构解析	52
3. 松胞菌素类化合物	54
3.1 化合物 Y9	54
3.2 化合物 A1	57
4. 大环内酯 (化合物 SRS39)	60
五、化合物的生物活性检测	62
1. 化合物 Y10 和 A5 的生物活性分析	63
2. 化合物 Y9 的生物活性	69
3. 化合物 A1 的生物活性	70
4. 化合物 SRS39 的生物活性	71
5. 化合物 Y6 的生物活性	71
6. 化合物 A4 的生物活性	72
六、A-1-2-3 菌株的鉴定	72
讨论与结论	74
一、红树植物内生真菌的生物活性及种群动态	74
1. 红树植物内生真菌的生物活性	74
2. 红树植物内生真菌的种群动态	74
二、A-1-2-3 菌株的次级代谢产物及其生物活性	75
1. 化合物 Y10 和 A5	75
2. 化合物 Y9	77
3. 化合物 A1	77
4. 化合物 SRS39	77
4. 化合物 A3	78
4. 化合物 Y29	78
5. 化合物 Y6	78
6. 化合物 A4	78
三、结论与展望	79

参考文献 81

致谢 89

附录 90

厦门大学博硕

CONTENTS

Abstract	I
Abstract in English	… III
Introduction	1
I.Mangrove plants endophytic fungi and their Polyketides Metabolites	1
1. Mangrove plants and their endophytic fungi.....	1
2. Polyketides from mangrove plants endophytic fungi...2	
II.The metabolites from <i>phomopsis</i> sp.	8
III.Isobenzofuranone derivatives	11
1. Isobenzofuranone derivatives from plants.....	11
2. Isobenzofuranone derivatives from fungi.....	12
IV.Purpose,contents and significance of this thesis	15
Materials and Methods	17
I.Materials	17
II.Methods	22
Results	31
I.Population fluctuation of endophytic fungi from mangrove plants	31
1. The temporal variations in numbers.....	31
2. The temporal variations in dominant genuses.....	31
II.The bioactivities of endophytic fungi from mangrove plants	32
1. Testing of antimicrobial activities of fungi.....	32
2. Testing of antitumor activities of fungi.....	33
3. Classification of the activated fungi.....	35
III.The study of metabolites from fungus A-1-2-3	37
1. Cultivation and extraction of fungus A-1-2-3.....	37
2. The isolation of metabolites.....	37

IV. The structure of compounds	41
1. Isobenzofuranone derivatives.....	41
1.1 Compound Y6.....	41
1.2 Compound A4.....	42
1.3 Compound A3.....	44
1.4 Compound Y29.....	45
2. Mycoepoxydiene and its derivative.....	47
2.1 Compound A5.....	47
2.2 Compound Y10.....	49
2.2.1 The <i>X-Ray</i> diffraction analysis of Y10.....	49
2.2.2 The NMR analysis of Y10.....	52
3. Cytochalasins.....	54
3.1 Compound Y9.....	54
3.2 Compound A1.....	57
4. Macrocyclic ring lactone (Compound SRS39).....	60
V. Testing of activities of compounds	62
1. The analysis for activities of Y10 & A5.....	63
2. The activities of compound Y9.....	69
3. The activities of compound A1.....	70
4. The activities of compound SRS39.....	71
5. The activities of compound Y6.....	71
6. The activities of compound A4.....	72
VI. The identification of fungus A-1-2-3	72
Discussion and Conclusion	74
I. The bioactivities and population fluctuation of endophytic fungi from mangrove plants	74
1. The bioactivities of endophytic fungi from mangrove plants.....	74
2. Population fluctuation of endophytic fungi from mangrove plants.....	74
II. The metabolites of A-1-2-3 and their activities	75
1. compound Y10 and A5.....	75
2. compound Y9.....	77

3. compound A1	77
4. compound SRS39	77
4. compound A3	78
4. compound Y29	78
5. compound Y6	78
6. compound A4	78
III. Conclusion and expectation	79
References	81
Acknowledgements	89
Appendix	90

廈門大學博碩

摘 要

近年来,随着研究热点的转移,新药的研究开发已突破了陆生资源的束缚,拓展到了生态和物种远比陆地生境复杂多样的海洋。红树植物生长于海岸潮间带,其独特的生存环境赋予它丰富的微生物资源,是当前倍受重视的药用新资源。

本文对福建省九龙江口浮宫镇草埔头红树林区木榄 (*Bruguiera gymnorrhiza*) 和秋茄 (*Kandelia candel*) 2 种红树植物的内生真菌资源进行为期 1 年的种群动态调查并对这些菌株的抗菌、抗肿瘤、乙酰胆碱酯酶及胰蛋白酶抑制剂活性进行了初步研究。对活性菌株 A-1-2-3 的代谢产物进行分离纯化并对分离得到的化合物进行结构鉴定和生理活性研究,为深入开发和保护红树植物内生真菌药用资源提供理论依据,并期望得到有开发前景的候选药物先导化合物。

从 2 种红树植物的树叶、树皮和树根样品中分离到 290 株内生真菌。对其种群动态进行初步考察,结果显示,木榄和秋茄内生真菌数量高峰期分别为 4 月份和 10~12 月份;青霉 (*Penicillium*)、交链孢 (*Alternaria*)、*Diaporthe* 和无孢目 (the nonsporulating groups) 是秋茄中的主要优势属;木榄内生真菌主要优势属为头孢霉 (*Cephalosporium*)、交链孢、青霉等。不同宿主对内生真菌的季节分布有重要的影响。以枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、白色假丝酵母(*Candida albicans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)为指示菌,采用琼脂扩散法对这些菌株进行抗菌活性检测,共筛选得到活性菌株 40 株,占总菌株数的 13.8%;采用 MTT 法对其体外抗肿瘤活性进行检测,发现 17 株内生真菌对 KB (人口腔上皮癌) 和 / 或 Raji (人 B 淋巴瘤) 细胞具有抑制作用,占总菌株数的 5.9%。生物活性菌株分布于青霉、交链孢、拟青霉、无孢目等 10 个不同的分类单元中,2 种宿主植物内生真菌抗菌及抗肿瘤活性均有不同程度的季节差异性。

菌株 A-1-2-3 分离自秋茄植物的叶子,经分子鉴定为一株拟茎点霉 (*Phomopsis* sp.)。本文采用固体培养、有机溶剂提取、分相萃取、柱层析、和重结晶等分离纯化方法从其发酵产物中分离到 9 个纯的化合物 (Y6, A4, A3, Y29, Y10, A5, Y9, A1 和 SRS39), 并采用核磁共振 (NMR) 波谱解析结合电喷雾质谱 (ESI-MS) 的方法鉴定其结构,经数据库搜索,发现有 5 个结构

(A3, Y29, Y10, Y9 和 SRS39) 未见文献报道, 为新化合物。发现上述 9 个化合物都属于聚酮类化合物, 包括真菌环氧二烯类化合物 (Y10, A5)、松胞菌素类化合物 (Y9, A1)、异苯并呋喃酮类化合物 (Y6, A4, A3, Y29) 以及大环内酯 (SRS39) 4 种类型。采用单晶衍射 X-ray 的解析的方法对其中 1 个新结晶化合物 Y10 进行晶体结构研究, 确定该化合物为去乙酰基环氧二烯 (Deacetylmycoepoxydiene), 未见文献报道其晶体结构。

对上述化合物中的 7 个量较多的化合物进行抗菌、抗肿瘤、乙酰胆碱酯酶及胰蛋白酶抑制剂活性检测。结果表明, 7 个化合物对 Raji 细胞都具有不同程度的抑制作用, 其中化合物 Y10, A5, Y9 和 A1 具有很强的抑制活性, IC_{50} 分别为 $3.0 \mu\text{g/mL}$ 、 $5.6 \mu\text{g/mL}$ 、 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 和 250 ng/mL , 而没有检测到其他活性, 这个结果也与出发菌株 A-1-2-3 初筛结果相吻合, 是否具有其它生物活性还有待进一步研究。

新化合物 Y10(Deacetylmycoepoxydiene)与已知化合物 A5(mycoepoxydiene) 结构骨架新颖, 且都具有很强的体外抗肿瘤活性, 本文采用流式细胞仪测定其对细胞周期的影响, 结合单细胞凝胶电泳和 DNA 片断化 “DNA ladder” 检测方法初步研究其作用机理。结果表明, Deacetylmycoepoxydiene 和 mycoepoxydiene 可能不是通过诱导细胞凋亡机制作用于肿瘤细胞的, 其确切机制还有待进一步研究。

本文结果表明, 红树植物内生真菌中蕴藏着较丰富的抗菌和抗肿瘤活性物质产生菌, 同时也蕴藏着较丰富的结构新颖的活性物质, 是开发抗菌抗肿瘤等药物的潜在资源。

关键词: 红树植物、内生真菌、次级代谢产物、拟茎点霉

Abstract

The hot spot for searching novel drugs has been focused on the much more complex marine resources instead of the traditional terrene habitat in recent years. Mangrove plants as important new resources for potential pharmaceutical because of their ecosystems that straddled the land and the sea, from freshwater to seawater, often with distinct microorganism species, have gradually attracted more and more attention of natural products chemists.

In this study, the population fluctuation in the endophytic fungi of *Bruguiera gymnorhiza* and *Kandelia candel*, collected from Fugong in Fujian Province, were studied for one year. And the antitumor, antimicrobial, AChE and Trypsin inhibition activities of their metabolites were investigated.

290 strains endophytic fungi were isolated from 2 kinds of mangroves. The results showed the number fastigium of endophytic fungi from *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza* were in April and October to December respectively. *Penicillium*, *Alternaria*, *Dothiorell* and the nonsporulating groups were the dominant genres of the endophytic fungi from *Kandelia candel*, while the endophytic fungi from *Bruguiera gymnorhiza* mainly belonged to *Cephalosporium*, *Alternaria*, *Penicillium*, and so on. The differences of the host played an important role in the attribution of the temporal variations of different endophytic fungi. In the investigation of antimicrobial activities, 40 strains (about 13.8% of the total isolates) which showed antimicrobial activities against one or more sensitive microbes (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*) were screened out by using the agar diffusion assay. Using the method of MTT (Methyl Thiazolyltetrazolium), the isolates were screening for antitumor strains *in vitro*. The results show that 17 strains (5.9% of the total isolates) can inhibit the growth of Raji and/or KB tumor cell lines. The active strains obtained mostly belonged to *Penicillium*, *Alternaria*, *Paecilomyces* and other 7 genres. The endophytic fungi from 2 mangrove plants also displayed seasonal variations in

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.

廈門大學博碩