



产石杉碱甲内生真菌的复壮及产量提高研究

肖郑鹏^{1,2}, 朱亚婷^{1,2}, 张雨轩^{1,2}, 罗杰¹, 刘东波^{1,2,3,4}, 康信聪^{1,2,3,4*}

- 1 湖南农业大学园艺学院, 湖南 长沙 410128
- 2 国家中医药管理局亚健康干预技术实验室, 湖南 长沙 410128
- 3 湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室, 湖南 长沙 410128
- 4 湖南省植物功能成分利用协同创新中心, 湖南 长沙 410128

肖郑鹏, 朱亚婷, 张雨轩, 罗杰, 刘东波, 康信聪. 产石杉碱甲内生真菌的复壮及产量提高研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(11): 4372-4382.

XIAO Zhengpeng, ZHU Yating, ZHANG Yuxuan, LUO Jie, LIU Dongbo, KANG Xincong. Rejuvenation and yield improvement of a huperzine A producing endophytic fungus[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(11): 4372-4382.

摘要:【目的】千层塔中分离得到的内生真菌胶孢炭疽 Cg01 可合成石杉碱甲(huperzine A, HupA), 但产量较低, 且随着继代的增加, 产量下降, 菌株退化严重。研究表明, 表观遗传修饰与次生代谢产物的合成密切相关。本研究旨在提高 HupA 的产量, 改善退化菌株的品质, 并从表观遗传修饰的角度探讨次生代谢产物合成的机理。【方法】通过改变培养基碳源、添加生物诱导子, 根据胶孢炭疽 Cg01 的菌落形态、菌丝生长速度、生物量及 HupA 产量等筛选复壮培养基; 添加不同浓度的组蛋白甲基化转移酶抑制剂, 检测 HupA 的产量, 筛选提高 HupA 产量的小分子抑制剂; 检测相关表观遗传修饰基因的表达。【结果】添加同源刺激物千层塔茎叶汁, 对胶孢炭疽 Cg01 的菌落形态、生长速度、形态特征及生物量无显著影响, 但可提高 HupA 的产量, 传代至第 5 代时为对照组的 1.67 倍(125.7 μg/L)。添加千层塔茎叶汁能显著降低组蛋白甲基化转移酶 Cg12377、组蛋白去乙酰化酶 Cg15620、DNA 甲基化转移酶 Cg02440 基因的表达, 提高组蛋白去乙酰化酶 Cg02312 基因的表达。UNC0224 对内生真菌胶孢炭疽菌的 HupA 产量无显著影响; 2–15 μmol/L BRD4770 能显著提高 HupA 的产量(169.57–152.10 μg/L)。BRD4770 组处理后, 相关表观遗传基因 Cg12377、Cg02440、Cg02312 和 Cg15620 的表达量都显著下降。【结论】添加千层塔茎叶汁培养胶孢炭疽 Cg01 可维持其合成次生代谢产物的能力; 添加组蛋白甲基化转移酶抑制剂 BRD4770 可提高 HupA 的产量。本研究为解决内生真菌大规模生产过程中的菌株退化问题提供了参考, 并为组蛋白甲基化影响次生代谢产物的合成提供了依据。

资助项目: 湖南省自然科学基金(2020JJ5266)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ5266).

*Corresponding author. E-mail: kangxincong@163.com

Received: 2023-04-04; Accepted: 2023-06-12; Published online: 2023-06-15

关键词: 胶孢炭疽; 复壮; 组蛋白甲基化抑制剂; 甘露醇; 石杉碱甲

Rejuvenation and yield improvement of a huperzine A producing endophytic fungus

XIAO Zhengpeng^{1,2}, ZHU Yating^{1,2}, ZHANG Yuxuan^{1,2}, LUO Jie¹, LIU Dongbo^{1,2,3,4}, KANG Xincong^{1,2,3,4*}

1 College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 State Key Laboratory of Subhealth Intervention Technology, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410128, Hunan, China

3 Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, Hunan, China

4 Hunan Co-innovation Center for Utilization of Botanical Functional Ingredients, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: [Objective] The endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* Cg01, isolated from *Huperzia serrata*, can produce huperzine A (HupA) with a low yield. As the strain was subcultured for generations, the yield decreased and the strain degraded. Studies have shown that epigenetic modification is associated with the synthesis of secondary metabolites. This study aims to increase the yield of HupA, improve the quality of degraded strains, and decipher the mechanism of secondary metabolite synthesis from the perspective of epigenetic modification. [Methods] The carbon sources and biotic elicitors for the rejuvenation media were screened according to the colony morphology, mycelial growth rate, biomass, and HupA yield. The histone methyltransferase inhibitors UNC0224 and BRD4770 were screened to improve the HupA yield. The expression of genes involved in epigenetic modification was determined. [Results] The addition of the water extract of *H. serrata* did not significantly affect the growth rate, morphological characteristics, or biomass of *C. gloeosporioides* Cg01, while it increased the yield of HupA, which was 1.67 times (125.7 $\mu\text{g/L}$) that of the control group in the fifth generation. Furthermore, the addition significantly down-regulated the expression of the histone methyltransferase gene *Cg12377*, the histone deacetylase gene *Cg15620*, and the DNA methyltransferase gene *Cg02440*, while it up-regulated the expression of the histone deacetylase gene *Cg02312*. UNC0224 had no significant effect on the HupA production, while 2–15 $\mu\text{mol/L}$ BRD4770 increased the HupA yield (152.10–169.57 $\mu\text{g/L}$) and down-regulated the expression of *Cg12377*, *Cg02440*, *Cg02312*, and *Cg15620*. [Conclusion] The secondary metabolite production of *C. gloeosporioides* Cg01 could be maintained by adding the water extract of *H. serrata*. The addition of BRD4770, a histone methyltransferase inhibitor, could increase the yield of HupA. This study provides a reference for addressing the strain degradation during the large-scale production of endophytic fungi and studying the influence of histone methylation on the synthesis of secondary metabolites.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*; rejuvenation; histone methylation inhibitors; mannitol; huperzine A

石杉碱甲(huperzine A, HupA)是从中药千层塔中提取出来的石松类生物碱,是我国自主研发的一种乙酰胆碱酯酶抑制剂,可用于阿尔兹海默症的治疗,其效果仅次于多奈哌齐,有效时间长,口服利用率高^[1]。目前 HupA 大多从石杉科植物中提取,但石杉科植物生长缓慢,野生资源匮乏;且 HupA 在植物体内含量低下,肆意采挖导致物种濒临灭绝^[2]。近年来,越来越多的学者研究 HupA 的合成与生产,但是化学合成过程繁琐、成本高昂^[3];体外组织培养存在消毒困难等多种问题^[4]。

内生真菌可产生与宿主植物相同或相似的次生代谢产物,因其发酵周期短、可再生性强等特性已成为解决药用植物资源短缺的重要途径。例如,红豆杉内生真菌能够生产紫杉醇,长春花内生真菌可合成长春新碱,喜树内生真菌产物中含有喜树碱,水稻内生真菌中分离出花青素和灰蒿素等^[5-7]。然而,许多关键的障碍制约了内生真菌工业化生产次生代谢产物,其中内生真菌的稳定性是目前领域内面临的最大挑战之一^[8]。本课题组前期研究从福建南平的千层塔中分离得到产 HupA 的胶孢炭疽 *Cg01* (*Colletotrichum gloeosporioides* *Cg01*),在连续传代培养过程中,胶孢炭疽 *Cg01* 出现了菌株退化的现象,石杉碱甲产量从 556.2 $\mu\text{g/L}$ 下降至 75 $\mu\text{g/L}$ ^[9]。而有研究表明,以海藻糖、甘露醇等作为碳源、外源添加赖氨酸等氨基酸可有效复壮草菇等食用菌^[10-11];培养基中加入不同比例平贝母药材能有效提高平贝母内生真菌合成西贝碱的能力,并具有遗传稳定性^[12]。因此,改变培养基碳源、及外源添加宿主刺激物可能是有效复壮胶孢炭疽 *Cg01* 的有效措施之一。

丝状真菌的次生代谢生物合成与其基因簇

所处的表观遗传状态密切相关。通过表观遗传操作可激活真菌中沉默的天然产物生物合成基因或基因簇,提高已知次生代谢产物的产量^[13]。化学表观遗传修饰,即通过加入外源的化学表观遗传酶抑制剂来调控生物合成基因的表达、诱导真菌的次生代谢行为,以操作简单、技术成本低及菌株遗传背景要求低等优点而被广泛使用^[14-15]。例如,添加组蛋白去乙酰化酶抑制剂(丁酸钠、伏立诺他)可提高金龟子绿僵菌次生代谢产物的产量^[16],增加红树林土壤真菌和深海真菌次生代谢产物的种类^[17]。添加 DNA 甲基化转移酶抑制剂(5-氮杂胞苷)可增加深海来源真菌的次生代谢产物多样性^[18]。本课题组在前期研究中通过转录组学筛选出一系列表观遗传修饰基因,并通过基因敲除与回补试验发现组蛋白甲基化转移酶 *Cg12377*、DNA 甲基化转移酶 *Cg02440*、组蛋白去乙酰化酶 *Cg02312* 和 *Cg15620* 与 HupA 合成密切相关^[19]。

本研究通过改变碳源、添加生物诱导子来恢复内生真菌合成 HupA 的能力,添加组蛋白甲基化转移酶抑制剂来诱导 HupA 的合成,同时,检测相关表观遗传修饰基因的表达,为解决内生真菌大规模生产过程中的菌株退化、产量有限的问题提供参考,并探讨组蛋白甲基化修饰对次生代谢产物合成的影响。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料和试剂

1.1.1 试验材料

供试菌株蛇足石杉内生真菌胶孢炭疽 *Cg01* (盘长孢状刺盘孢 *C. gloeosporioides*, 菌株编号: CCTCC No. AF2018024), 现保存于国家中医药管理局亚健康干预技术实验室。

1.1.2 主要试剂

石杉碱甲对照品, 纯度大于 98%, 上海源叶生物科技有限公司; 葡萄糖、甘露醇、氯仿、二甲基亚砷, 国药集团化学试剂有限公司; 甲醇(默克)、乙酸铵(天津市科密欧化学试剂有限公司)为色谱纯。NC0224 购自索莱宝生物公司, BRD4770 购自源叶生物公司。

1.2 培养基的配制

菌株活化采用马铃薯葡萄糖液体培养基(potato dextrose broth, PDB): 马铃薯(去皮) 200 g, 葡萄糖 20 g, 加蒸馏水定容至 1 L。

液体发酵采用 PDB 加富培养基: 马铃薯(去皮) 200 g, 葡萄糖 20 g, 酵母粉 2 g, 蛋白胨 2 g, KH_2PO_4 1.5 g, MgSO_4 0.5 g, NaCl 0.3 g, 加蒸馏水定容至 1 L, 自然 pH。

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基即在 PDB 培养基的基础上加入 2% 的琼脂。

含千层塔茎叶汁培养基: 在 200 mL PDA 中加 10 mL 千层塔茎叶汁。

马铃薯甘露醇琼脂培养基: 基于 PDA 培养基, 使用甘露醇代替葡萄糖。121 °C 灭菌 20 min。

1.3 千层塔茎叶汁的制备

将新鲜的千层塔茎叶用蒸馏水洗净, 用滤纸吸除植株上的水分, 称重; 将植株切成小块并打成浆汁, 按 1:10 的质量体积比加入蒸馏水, 用 100 目筛过滤, 去除滤渣, 最后再加蒸馏水定容至过滤前体积, 小管分装, 于 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min, -20 °C 冰箱冷冻备用。

1.4 复壮培养基的筛选

将供试菌种胶孢 $\text{Cg}01$ 用无菌牙签挑取 1 cm^2 菌块分别接种于普通 PDA 培养基(对照组, Control)、含千层塔茎叶汁的 PDA 培养基(茎叶汁组, HSE)、马铃薯甘露醇琼脂培养基(甘露醇组, Mannitol), 连续传代 5 代, 菌丝长满整个培

养皿传下一代。

观察记录供试菌株每代在不同培养基的气生菌丝的生长状况^[11]。参考安学明等^[20]的方法测量每代供试菌株 72 h 的菌落直径, 计算供试菌株菌丝生长速度, 每代设 3 个重复。将每代供试菌株避光培养后, 抽滤分离的菌丝 60 °C 烘干至恒重, 计算供试菌株生物量。

1.5 小分子抑制剂的筛选

组蛋白甲基化转移酶抑制剂 UNC0224 和 BRD4770 以二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)为溶剂根据各自分子量配制成一定浓度的母液, 并经 0.22 μm 过滤膜过滤除菌后, -20 °C 保存备用。试验组浓度梯度设置如下:

(1) UNC0224 (5、15、50 和 250 nmol/L)

(2) BRD4770 (2、5、15 和 100 $\mu\text{mol/L}$)

1.6 摇床发酵培养

参考沈鹏原等^[21]的方法, 将不同固体培养基上的菌株活化做成种子液。取 1 mL 种子液接入 100 mL PDB 加富培养基中, 于 28 °C、160 r/min 的摇床上避光培养 5 d 后, 再加入 5 mL 千层塔茎叶汁, 继续摇瓶培养 7 d。此外, 另取 5 mL 千层塔茎叶汁加入 100 mL PDB 加富培养基中, 与试验组同时摇瓶作为对照。

筛选小分子抑制剂时, 根据组别设置, 在接种种子液时加入不同浓度的 UNC0224、BRD4770 1 mL, 设置 DMSO 对照组(以 DMSO 代替抑制剂)与空白对照组(不加抑制剂与 DMSO)。

1.7 石杉碱甲的检测

用真空泵分离菌液和菌丝, 菌丝液氮速冻待用。菌液减压浓缩至体积 30 mL, 于分液漏斗中加入等体积 30 mL 氯仿萃取一次, 再用 15 mL 氯仿再次萃取 1 次, 弃水层, 合并 2 次氯仿萃取液, 室温放置挥发。挥干后加入 2 mL 色谱甲醇溶解, 超声 10 min, 混匀后过膜(0.45 μm)装瓶并编号。

采用高效液相色谱仪检测, 检测条件 Agilent Eclipse plus-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 0.015 mol/L 乙酸铵-甲醇溶液(70:30), 流速 1 mL/min, 柱温 35 °C, 进样量 10 μL, 波长 308 nm。

在浓度为 2.5–100 μg/mL 范围内, 用标准曲线($Y=14.484X-7.4656$, $R^2=0.9998$)计算 HupA 含量。菌株的 HupA 产量=发酵液 HupA 含量-对照组 HupA 含量

1.8 基因相对表达量的测定

提取第 5 代 HSE 组与对照组、5 μmol/L BRD 处理组与 DMSO 组菌丝体 RNA, 并通过 RT-qPCR 技术检测相关表观遗传修饰基因的表达量。

菌丝体液氮研磨成粉, 使用植物 RNA 提取试剂盒(SteadyPure Plant RNA Extraction Kit, AG)提取总 RNA, 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, Nanodrop 测定 RNA 的纯度($OD_{260/280}$ 、 $OD_{230/260}$ 比值), Qubit 精确定量 RNA 的浓度。使用 TaKaRa 反转录试剂盒(PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser), 参照使用说明书进行 RNA 的反转录, 采用 TaKaRa 的 2×T5 Fast qPCR Mix (SYBRGreen)进行 RT-qPCR 检测(Roche LightCycler 96)。以 *Cg01 beta-tubulin* 为内参基因, 并按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 *Cg12377*、*Cg02440*、*Cg02312* 和 *Cg15620* 基因的表达量。

1.9 数据分析

通过 Primer Premier 6 软件对基因进行 RT-qPCR 引物设计, 引物由擎科生物技术有限公司合成, 引物序列见表 1。采用 IBM SPSS Statistics 25 软件(International Business Machines Corporation)对试验数据进行单因素分析, 采用 Origin2019b (EA)、Prism8 (GraphPad)软件进行数据作图。

表 1 检测基因和引物

Table 1 Experimental genes and primers

No.	Gene name	Sequence (5'→3')
1	<i>beta-tubulin</i>	F: GCAACAACCTGGGCAAGG R: GCGGACAACATCGAGAACCT
2	<i>Cg12377</i>	F: AGAGTCGGCGAGCAAGTC R: GAATCGGCGGATCTGGCA
3	<i>Cg02440</i>	F: ACGCTACATCTACGATACAG R: TTGCTCTTGGTCTATCTTCA
4	<i>Cg02312</i>	F: CTGCCGTGAGGAATTACC R: ACCTTGCCAGAAGAGTGA
5	<i>Cg15620</i>	F: AATAATGAGTGCTGCTACGA R: CACCATGACAGAGTATCCAA

2 结果与分析

2.1 甘露醇与千层塔茎叶汁对胶孢炭疽 Cg01 菌落形态的影响

菌落形状呈扇形、表面粗糙、边缘整齐、不透明, 且各组之间无显著差别(图 1)。对照组胶孢炭疽 Cg01 菌落颜色第 1、2 代为白色, 从第 3 代由中间开始出现黄棕色, 色素逐代增加并向边缘扩散, 菌丝体颜色加深(图 1)。甘露醇组菌落从第 1 代到第 5 代均为白色(图 1), 而千层塔茎叶汁组第 1 代为白色, 从第 2 代开始中间出现黄棕色, 并逐代向边缘扩散、颜色加深(图 1)。结果表明, 添加千层塔茎叶汁复壮对胶孢炭疽 Cg01 菌丝体生长性状无显著影响, 而改变碳源用甘露醇培养基复壮培养, 菌株不产生色素沉积。

2.2 甘露醇与千层塔茎叶汁对胶孢炭疽 Cg01 菌丝生长速度的影响

甘露醇组第 1–5 代胶孢炭疽 Cg01 的生长速度均显著高于对照组, 其平均生长速度为 1.33 cm/d, 是对照组的 1.2 倍, 且第 4 代生长速度最快, 达 1.47 cm/d (图 2); 而千层塔茎叶汁组的生长速度为 1.13 cm/d, 与对照组无显著差异($P>0.05$, 图 2)。由此可知, 改变碳源用甘露醇培养胶孢炭疽 Cg01 能有效促进菌丝的生长。

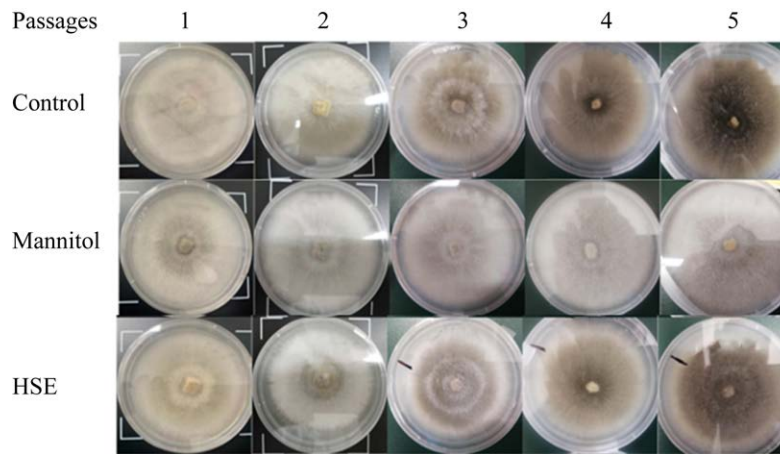


图 1 胶孢炭疽 *Cg01* 在不同培养基中培养的菌落形态

Figure 1 Different culture-medium hyphal growth traits. The number represents the number of passages colonial morphology of *Colletotrichum gloeosporioides* Cg01 on different media. The number represents the number of passages.

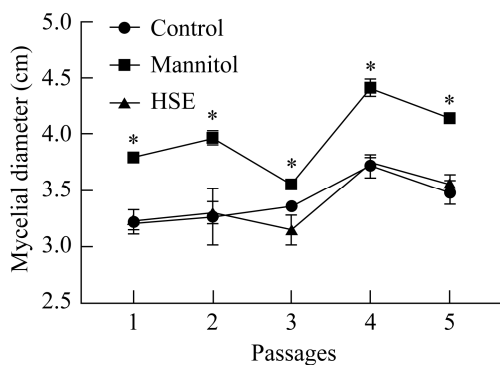


图 2 胶孢炭疽 *Cg01* 在不同培养基中培养的菌落直径

Figure 2 Colonial diameter of the *Colletotrichum gloeosporioides* Cg01 cultured on different media. The number represents the number of passages. *: Showing significant differences mannitol vs. control ($P < 0.05$).

2.3 甘露醇与千层塔茎叶汁对胶孢炭疽 *Cg01* 菌丝生物量的影响

甘露醇组的菌丝生物量随着代数的增加逐渐降低再趋于平缓, 第 1 代菌丝生物量为 15.1 g/L, 是对照组的 1.4 倍, 培养至第 3 代, 生物量为 8.5 g/L, 与对照组无差异(图 3)。而千层塔茎叶汁组的菌丝生物量与对照组相比, 均无显著性差异(图 3)。

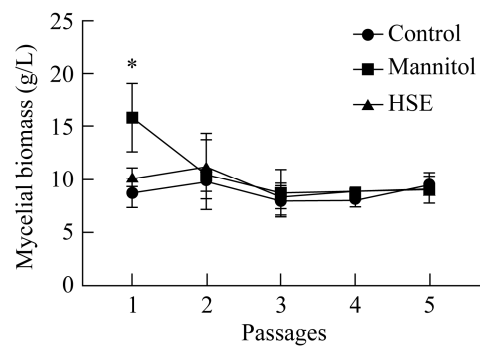


图 3 胶孢炭疽 *Cg01* 在不同培养基中培养的菌丝生物量

Figure 3 Biomass of *Colletotrichum gloeosporioides* Cg01 cultured on different media. *: Showing significant differences mannitol vs. control ($P < 0.05$).

2.4 甘露醇与千层塔茎叶汁对胶孢炭疽 *Cg01* 的 HupA 产量的影响

甘露醇组石杉碱甲产量显著降低, 平均产量为 25.9 $\mu\text{g/L}$, 是对照组平均产量的 1/3 (图 4)。添加千层塔茎叶汁连续传代后 HupA 产量总体呈上升趋势, 第 5 代达到最高, 为 125.7 $\mu\text{g/L}$, 相比对照组提高 67% (图 4)。结果表明, 添加千层塔茎叶汁复壮胶孢炭疽 *Cg01* 能有效维持并提高其次生代谢产物石杉碱甲的产量。

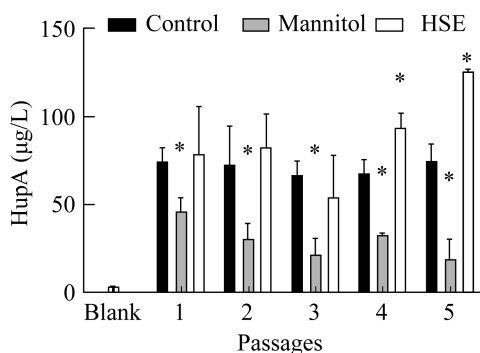


图 4 胶孢炭疽 *Cg01* 在不同培养基中培养的石杉碱甲产量

Figure 4 Huperzine A production of *Colletotrichum gloeosporioides* Cg01 cultured on different media. The blank is the HupA content in 100 mL PDB enrichment broth+5 mL *H. serrata* extract. *: Showing significant vs. control ($P<0.05$).

2.5 添加千层塔茎叶汁对胶孢炭疽 *Cg01* 的表观遗传基因的影响

本研究检测了千层塔茎叶汁的添加对胶孢炭疽 *Cg01* 中表观遗传修饰基因相对表达量的影响。结果显示,相比于对照组,加入千层塔茎叶汁促进了组蛋白去乙酰化酶 *Cg02312* 基因的表达,抑制了组蛋白甲基化转移酶 *Cg12377*、DNA 甲基化转移酶 *Cg02440*、组蛋白去乙酰化酶 *Cg15620* 基因的表达,相对表达量分别下降了

53%、39%和 38% (图 5)。

2.6 组蛋白甲基化转移酶抑制剂 UNC0224、BRD4770 对胶孢炭疽 *Cg01* 合成石杉碱甲的影响

DMSO 组与对照组相比, HupA 产量无显著差异,说明 DMSO 对胶孢炭疽 *Cg01* 合成 HupA 无影响。加入不同浓度的 UNC0224, HupA 产量亦无显著性变化(图 6A)。2–15 $\mu\text{mol/L}$ BRD4770

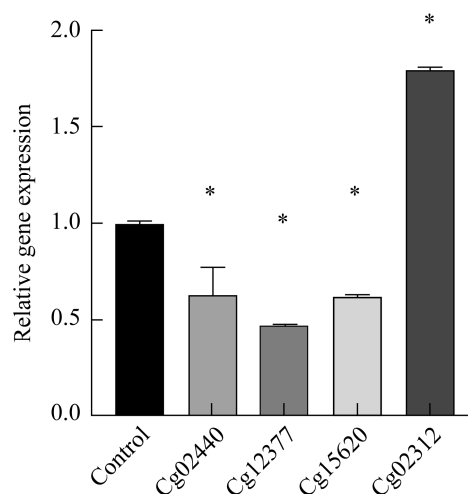


图 5 添加千层塔茎叶汁后表观遗传修饰基因的相对表达量

Figure 5 Relative expression of epigenetic modification genes after adding HSE. *: Showing significant differences vs. control ($P<0.05$).

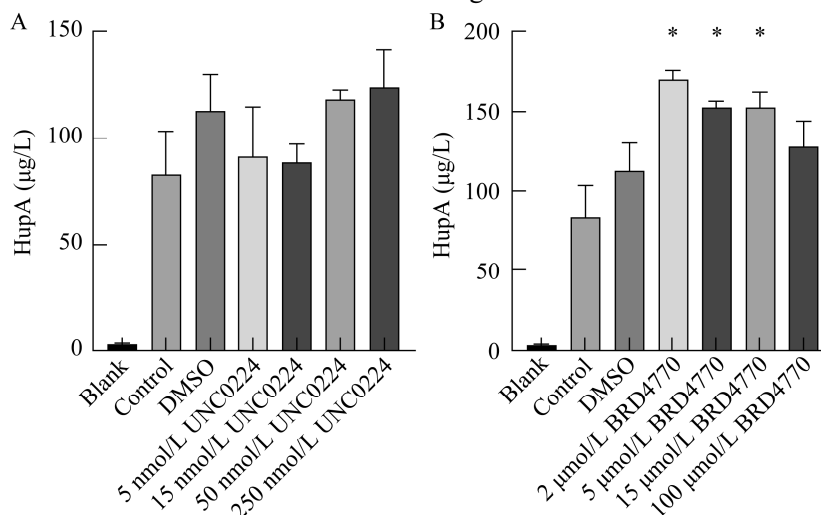


图 6 不同浓度的 UNC0224 (A)和 BRD4770 (B)对石杉碱甲产量的影响

Figure 6 Effects of different concentrations of UNC0224 (A) and BRD4770 (B) on the yield of HupA. The blank is the HupA content in 100 mL PDB enrichment broth+5 mL *Huperzia serrata* extract. *: Showing significant differences vs. DMSO ($P<0.05$).

可显著提高胶孢炭疽 Cg01 的 HupA 产量。2 $\mu\text{mol/L}$ BRD4770 组的 HupA 产量为 169.6 $\mu\text{g/L}$, 提高 51% (图 6B); 5 $\mu\text{mol/L}$ 和 15 $\mu\text{mol/L}$ BRD477 组的 HupA 产量与对照组(DMSO 组)相比均提高 36% (图 6B)。

2.7 组蛋白甲基化转移酶抑制剂 BRD4770 处理后表观遗传修饰基因的表达量变化

加入 5 $\mu\text{mol/L}$ BRD4770 后, 相比于对照组, 组蛋白甲基化转移酶 *Cg12377*、DNA 甲基化转移酶 *Cg02440*、组蛋白去乙酰化酶 *Cg02312* 与 *Cg15620* 的基因表达量均显著下降, 分别下降了 90%、38%、54%和 58% (图 7)。

3 讨论与结论

菌种退化主要是指在实验室条件下, 营养不良、无限连续传代、保存不当等原因导致的菌丝生长速度减缓、生长态势变弱、在平板上生长不均匀、色素异常增多或减少以及次生代谢产物产量下降等^[22]。在本研究中, 以甘露醇作碳源在前期能有效地恢复菌丝生长性能, 可能是因为

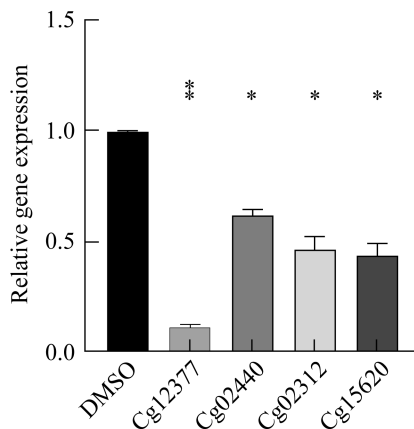


图 7 5 $\mu\text{mol/L}$ BRD4770 处理后表观遗传修饰基因的相对表达量

Figure 7 Relative expression of epigenetic modification genes after treatment of 5 $\mu\text{mol/L}$ BRD4770. *: Showing significant differences vs. control ($P < 0.05$).

长期在传统 PDA 培养基上传代, 使菌株对葡萄糖的吸收能力减弱^[23]。但传代至第 5 代时菌丝生长速度下降, 说明对甘露醇的吸收能力可能也在发生变化。因此, 在培养原始菌种时应交叉使用不同成分配比的培养基进行扩大培养, 避免培养基的营养不足或过于丰富而带来的培养问题, 创造适宜的培养条件才能使得菌株生长健壮、避免退化。

次生代谢产物对于微生物本身的生长和繁殖并不是必需的, 但却能提高微生物在环境中的生存能力, 帮助微生物在有限的资源条件下具有较强的竞争力^[24]。微生物通常在营养耗尽、诱导剂添加、生长速率降低的条件下才会激活次级代谢产物合成基因簇, 产生次生代谢产物^[25]。内生真菌胶孢炭疽 Cg01 产生与宿主植物相同的次生代谢产物——石杉碱甲, 这可能是其生存策略或耐受有毒宿主代谢物的抗性机制^[26]。在培养基中加入同宿主刺激物——千层塔茎叶汁, 使得胶孢炭疽 Cg01 保持着这种宿主的刺激, 从而持续产生次生代谢产物——石杉碱甲, 连续传代 5 次后, 石杉碱甲含量增加。而在以甘露醇为碳源的培养基中, 营养丰富, 胶孢炭疽 Cg01 生长条件良好, 生长速率增加, 而次生代谢产物石杉碱甲产量减少^[27]。

组蛋白 H3K9 甲基化修饰一般与基因转录抑制及异染色质形成相关。G9a 是一类能够催化 H3K9 残基位点发生甲基化的酶。H3K9 残基位点甲基化发挥生物学功能的主要方式是抑制 RNA 聚合酶 II 结合到染色质上, 从而抑制基因的表达^[28]。UNC0224 和 BRD4770 分别为 H3K9 甲基化转移酶 G9a 的苯并咪唑类底物竞争性抑制剂和喹唑啉类 SAM (S-adenosyl methionine, S-腺苷甲硫氨酸)竞争性抑制剂^[29]。2–15 $\mu\text{mol/L}$ BRD4770 可能就是通过竞争 SAM 的结合位点, 抑制 H3K9 的甲基化, 促进了 RNA 聚合酶 II 与

染色质的结合,从而解除了 H3K9 甲基化对 HupA 合成的抑制作用,提高了 HupA 的产量。

表观修饰之间并不是独立存在的,它们之间存在着或相互拮抗或相互促进的关系,这种相互影响对染色质修饰和基因表达起着关键的调控作用。在真核生物中,组蛋白 H3K9 甲基化和 DNA 甲基化均与基因沉默密切相关,且相互调控^[30]。在本研究中,加入组蛋白甲基化抑制剂后,组蛋白甲基化转移酶基因 *Cg12377* 的相对表达量下降,同时 DNA 甲基化转移酶基因 *Cg02440* 和组蛋白乙酰化转移酶基因 *Cg02312* 和 *Cg15620* 的相对表达量也显著下降,说明组蛋白 H3K9 甲基化在调控次生代谢产物 HupA 合成时,组蛋白甲基化与乙酰化和 DNA 甲基化之间确实存在相互调控的作用。而添加千层塔茎叶汁也能使胶孢炭疽 *Cg01* 的组蛋白甲基化转移酶基因 *Cg12377* 的相对表达量下降,它可能通过抑制 H3K9me2 来阻止基因沉默,从而提高石杉碱甲的产量,并且其中组蛋白甲基化与乙酰化和 DNA 甲基化之间的相互调控与添加组蛋白甲基化抑制剂中的调控有所区别。

本研究表明,用甘露醇代替葡萄糖作为碳源可以有效提高胶孢炭疽 *Cg01* 的生长速度,但会降低次生代谢产物石杉碱甲的产量;外源添加千层塔茎叶汁组对胶孢炭疽 *Cg01* 的生长无显著影响,但能维持且提高石杉碱甲的产量,这可能与表观遗传修饰有关。2–15 $\mu\text{mol/L}$ 的组蛋白甲基化转移酶抑制剂 BRD4770 可通过抑制组蛋白甲基化转移酶基因的表达提高内生真菌胶孢炭疽 *Cg01* 的石杉碱甲产量,且这种组蛋白甲基化可与组蛋白乙酰化、DNA 甲基化相互作用。但是,在改变基因转录的过程中,这 3 种修饰方式之间是如何进行的,其调控 HupA 合成的具体机制仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] QIAN ZM, KE Y. Huperzine A: is it an effective disease-modifying drug for alzheimer's disease?[J]. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2014, 6: 216.
- [2] YANG Y, DAI LF, WU DC, DONG LM, TU YS, XIE JK, LUO XD. *In vitro* propagation, huperzine A content and antioxidant activity of three genotypic *Huperzia serrata*[J]. *Plants (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(6): 1112.
- [3] DING R, SUN BF, LIN GQ. An efficient total synthesis of (–)-huperzine A[J]. *Organic Letters*, 2012, 14(17): 4446-4449.
- [4] ISHIUCHI K, PARK JJ, LONG RM, GANG DR. Production of huperzine A and other *Lycopodium* alkaloids in *Huperzia* species grown under controlled conditions and *in vitro*[J]. *Phytochemistry*, 2013, 91: 208-219.
- [5] VASUNDHARA M, KUMAR A, REDDY MS. Molecular approaches to screen bioactive compounds from endophytic fungi[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1774.
- [6] NISA H, KAMILI AN, NAWCHOO IA, SHAFI S, SHAMEEM N, BANDH SA. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2015, 82: 50-59.
- [7] ZHENG RH, LI SJ, ZHANG X, ZHAO CQ. Biological activities of some new secondary metabolites isolated from endophytic fungi: a review study[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(2): 959.
- [8] YAN RM, ZHANG ZB, WANG Y, YANG HL, ZENG QG, ZHU D. Efficient strategy for maintaining and enhancing the huperzine A production of *Shiraia* sp. S1f14 through inducer elicitation[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2014, 41(7): 1175-1179.
- [9] 康信聪. 千层塔内生真菌合成石杉碱甲关键基因的功能分析[D]. 长沙: 湖南农业大学博士学位论文, 2018. KANG XC. Functional analysis of the key genes in huperzine A biosynthesis of endophytic fungi in *Huperzia serrata*[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [10] 刘小霞, 安学明, 俞建民, 包瑞星, 叶晨光, 赵风云. 改变培养基碳源复壮草菇退化菌种[J]. *菌物学报*, 2020, 39(7): 1312-1321. LIU XX, AN XM, YUN JM, BAO RX, YE CG, ZHAO FY. Rejuvenation of *Volvariella volvacea* degeneration

- strains by changing medium carbon source[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(7): 1312-1321 (in Chinese).
- [11] 孔梓璇, 王巧莉, 程志虹, 俞建民, 张素玮, 赵风云. 外源氨基酸对草菇退化菌种复壮的影响[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(20): 30-36.
KONG ZX, WANG QL, CHENG ZH, YUN JM, ZHANG WW, ZHAO FY. Effect of exogenous amino acids on the rejuvenation of degraded strains of *Volvariella volvacea*[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(20): 30-36 (in Chinese).
- [12] 崔迎, 张志强, 赵昕, 陈佳丽, 殷红. 产西贝碱内生真菌的复壮[J]. *菌物研究*, 2010, 8(1): 41-43.
CUI Y, ZHANG ZQ, ZHAO X, CHEN JL, YIN H. Rejuvenation of a sipeimine-producing endophytic fungus[J]. *Journal of Fungal Research*, 2010, 8(1): 41-43 (in Chinese).
- [13] RAMESHA KP, CHANDRA MOHANA N, CHANDRA NAYAKA S, SATISH S. Epigenetic modifiers revamp secondary metabolite production in endophytic *Nigrospora sphaerica*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 730355.
- [14] FOX EM, HOWLETT BJ. Secondary metabolism: regulation and role in fungal biology[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(6): 481-487.
- [15] 周锐, 廖国建, 胡昌华. 丝状真菌次级代谢产物生物合成的表观遗传调控[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(8): 1142-1148.
ZHOU R, LIAO GJ, HU CH. Epigenetic regulation of secondary metabolite biosynthesis in filamentous fungi: a review[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27(8): 1142-1148 (in Chinese).
- [16] 黄永芳, 陈元元, 刘庆荣, 尉杰, 赵铖, 陆瑞利, 胡丰林. 表观遗传的化学干预对金龟子绿僵菌次级代谢产物影响的研究[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(11): 4221-4231.
HUANG YF, CHEN YY, LIU QR, YU J, ZHAO C, LU RL, HU FL. The effect of chemical intervention of epigenetics on secondary metabolites of *Metarhizium anisopliae*[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(11): 4221-4231 (in Chinese).
- [17] 李梦杰. 化学表观遗传刺激增加深海真菌 *Aspergillus* sp. SCS1OW2 次级代谢产物多样性的研究[D]. 深圳: 深圳大学硕士学位论文, 2016.
LI MJ. Activation of secondary metabolites biosynthesis stimulated by chemical epigenetic inducer from deep marine fungi *Aspergillus* sp. SCS1OW2[D]. Shenzhen: Master's Thesis of Shenzhen University, 2016 (in Chinese).
- [18] 唐建强. 添加 SBHA 及 5-AC 刺激下深海来源真菌 *Aspergillus* sp. SCS1OW3 化学成分的研究[D]. 深圳: 深圳大学硕士学位论文, 2016.
TANG JQ. Secondary metabolites from deep marine-derived fungi, *Aspergillus* sp. SCS1OW3, cultivated with SBHA and 5-AC[D]. Shenzhen: Master's Thesis of Shenzhen University, 2016 (in Chinese).
- [19] KANG XC, LIU CC, SHEN PY, HU LQ, LIN RM, LING J, XIONG XY, XIE BY, LIU DB. Genomic characterization provides new insights into the biosynthesis of the secondary metabolite huperzine a in the endophyte *Colletotrichum gloeosporioides* Cg01[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3237.
- [20] 安学明, 陈超, 刘小霞, 俞建民, 李彦虎, 赵风云. 草菇继代培养中菌种退化对子实体营养成分的影响[J]. *菌物学报*, 2020, 39(2): 390-397.
AN XM, CHEN C, LIU XX, YUN JM, LI YH, ZHAO FY. Effects of degeneration of cultivated strains on fruiting body nutrients of *Volvariella volvacea* during subculture[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(2): 390-397 (in Chinese).
- [21] 沈鹏原, 康信聪, 胡莉琴, 张家银, 刘东波. 组蛋白甲基化与去乙酰化对蛇足石杉内生真菌盘长孢状刺盘孢合成石杉碱甲的影响[J]. *菌物学报*, 2019, 38(2): 242-253.
SHEN PY, KANG XC, HU LQ, ZHANG JY, LIU DB. Effects of histone methylation and deacetylation on the biosynthesis of huperzine A in the endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Mycosystema*, 2019, 38(2): 242-253 (in Chinese).
- [22] 丁湖广. 菌种退化与老化原因及应对措施[J]. *当代蔬菜*, 2004(8): 26-27.
DING HG. Causes and countermeasures of strain degradation and aging[J]. *Modern Vegetable*, 2004(8): 26-27 (in Chinese).
- [23] 李旻向, 刘尔伦, 周湘丹, 曾光熙. 菌种培养及保存过程中菌种退化的研究进展[J]. *现代农业科技*, 2022(12): 30-34.
LI MX, LIU EL, ZHOU XD, ZENG GX. Research progress of strain degradation during strain culture and preservation[J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2022(12): 30-34 (in Chinese).
- [24] 刘文. 微生物次级代谢产物的生物合成[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(7): 2295-2297.
LIU W. Biosynthesis of microbial secondary metabolites[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(7): 2295-2297 (in Chinese).

- [25] ZHOU L, JIANG HX, SUN S, YANG DD, JIN KM, ZHANG W, HE YW. Biotechnological potential of a rhizosphere *Pseudomonas*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(3): 50.
- [26] SANG X, YANG MH, SU JQ. Research on endophytic fungi for producing huperzine A on a large-scale[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2020, 46(6): 654-664.
- [27] 苏文华, 张光飞, 李秀华, 欧晓昆. 植物药材次生代谢产物的积累与环境的关系[J]. *中草药*, 2005, 36(9): 1415-1418.
- SU WH, ZHANG GF, LI XH, OU XK. Relationship between accumulation of secondary metabolism in medicinal plant and environmental condition[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2005, 36(9): 1415-1418 (in Chinese).
- [28] TACHIBANA M, SUGIMOTO K, FUKUSHIMA T, SHINKAI Y. Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(27): 25309-25317.
- [29] 王楚慧, 赵铜鑫, 陈维琳, 湛云鹏, 张涵煦, 尤启冬, 郭小可. 组蛋白甲基转移酶 G9a 抑制剂的研究进展[J]. *药学进展*, 2018, 42(4): 284-293.
- WANG CH, ZHAO TX, CHEN WL, ZHAN YP, ZHANG HX, YOU QD, GUO XK. Research progress in inhibitors of histone methyltransferase G9a[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2018, 42(4): 284-293 (in Chinese).
- [30] FAN J, KRAUTKRAMER KA, FELDMAN JL, DENU JM. Metabolic regulation of histone post-translational modifications[J]. *ACS Chemical Biology*, 2015, 10(1): 95-108.