

## 蛇足石杉产石杉碱甲内生真菌 SNZ-12 的分离及鉴定

张宏庆,张 恬,张学智,徐文静,李浩东,刘 盼,张 鹏\*,宋发军

中南民族大学生命科学院 生物技术国家民委重点实验室

武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室,武汉 430074

**摘要:**为了获取具有应用价值的产石杉碱甲内生菌,本文从蛇足石杉分离得到 60 株内生真菌,采用高效液相色谱法和质谱法分别检测各个真菌的提取物,发现内生真菌 SNZ-12 的提取物具有与石杉碱甲标品相近的色谱特征峰和保留时间(8.994 min)以及相同的质谱特征峰( $(M+H)^+ = 243.1$ ),说明内生真菌 SNZ-12 可以产石杉碱甲,其石杉碱甲产量约为 1.01 mg/L;并通过结合内生真菌 SNZ-12 的形态特征和 18S rDNA 序列分析,将其鉴定为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)。本文结果为利用微生物发酵生产石杉碱甲研究提供了潜在的菌种资源。

**关键词:**蛇足石杉;内生真菌;石杉碱甲;尖孢镰刀菌

中图分类号:R284.1;Q93

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.12.015

## Isolation and Identification of Huperzine A-producing Endophytic Fungus SNZ-12 from *Huperzia serrata*

ZHANG Hong-qing, ZHANG Tian, ZHANG Xue-zhi,

XU Wen-jing, LI Hao-dong, LIU Pan, ZHANG Peng\*, SONG Fa-jun

National Committee Key Laboratory for Biotechnology, Hubei Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074

**Abstract:** To obtain Huperzine A-producing endophytes, sixty endophytic fungi were isolated from *Huperzia serrata* in this study, and the extract of each of the fungi was detected by HPLC technology and MS technology. The extract of one endophytic fungus numbered as SNZ-12 had the same chromatographic peak and retention time as that of authentic Huperzine A (8.994 min), as well as contained the same mass peak with authentic Huperzine A ( $(M+H)^+ = 243.1$ ), indicating that the endophytic fungus SNZ-12 could produce Huperzine A. The Huperzine A yield of the endophytic fungus SNZ-12 was about 1.01 mg/L. Based on the morphological characteristics and 18S rDNA sequence conservation of the endophytic fungus SNZ-12, it was identified as *Fusarium oxysporum*. Our results provided a potential strain for the production of Huperzine A through microbial fermentation.

**Key words:** *Huperzia serrata*; endophytes; Huperzine A; *Fusarium oxysporum*

石杉碱甲(Huperzine A)是治疗老年痴呆症(Alzheimer's disease, AD)的临床药物,其临床应用一般以口服的固体药片、胶囊为主,具有高度的选择性抑制乙酰胆碱酯酶活性和增强脑内胆碱能神经元的功能,且对多种实验性记忆损害均有改善作用,具有广泛的开发应用价值<sup>[1-3]</sup>。但其药源植物蛇足石

杉(*Huperzia serrata*)资源匮乏、生长缓慢,且石杉碱甲含量低<sup>[4,5]</sup>,仅依靠从蛇足石杉获取石杉碱甲无法满足市场需求。内生菌是具有极大开发价值的新的石杉碱甲药源途径之一<sup>[5,6]</sup>。目前,已有多株内生菌被报道可产石杉碱甲。Dong等<sup>[7]</sup>从蛇足石杉分离获得3株产石杉碱甲内生真菌,其中木霉菌(*Trichoderma* sp.)L44的石杉碱甲产量最高(37.63 μg/g)。Wang<sup>[8]</sup>和Zhu<sup>[6]</sup>等从蛇足石杉的根、茎和叶组织分离获得9株产石杉碱甲内生真菌,其中竹黄菌(*Shiraia* sp.)Slf14的石杉碱甲的产量为327.8 μg/L,王吉祥通过优化培养温度、接种量、培养基初始pH值、摇床转速等条件,将竹黄菌Slf14的石杉

收稿日期:2018-05-18 接受日期:2018-09-14

基金项目:国家自然科学基金(31370118,31770134);湖北省本科高校“生物技术专业综合改革”试点项目(GJZ15006);中南民族大学基本科研业务费专项(CZT18005,18006,18007);校企合作项目(HZY14024,HZY17029);中南民族大学大学生创新创业项目(GCX1725,SCX1725,XCX16098,SKYCX17020)

\*通信作者 E-mail:zhangpenghust@126.com

碱甲产量提高至 660  $\mu\text{g/L}$ <sup>[9]</sup>。Su 等<sup>[10]</sup>从蛇足石杉分离获得石杉碱甲产量为 21.0  $\mu\text{g/L}$  的内生真菌—纤姿拟青霉 (*Paecilomyces tenuis*) YS-13。汪涯等<sup>[11]</sup>从蛇足石杉分离获得石杉碱甲产量为 80.1  $\mu\text{g/g}$  的黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) LF40。

本研究从野生蛇足石杉共分离获得形态各异的内生真菌 60 株,通过 HPLC 和 MS 检测各个真菌的发酵物,发现只有编号为 SNZ-12 的菌株可以产石杉碱甲,其石杉碱甲产量约为 1.01 mg/L,并结合形态学观察和 18S rDNA 序列分析,将 SNZ-12 菌株初步鉴定为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

蛇足石杉植株采集自湖北省恩施州巴东县。真菌 SNZ-12 为分离自蛇足石杉的一株内生真菌。PDA 及 PDL 培养基的组成和配制参见文献<sup>[12]</sup>;石杉碱甲标品 (B21166;纯度  $\geq 98\%$ ) 购自上海源叶生物科技有限公司;其他试剂均为国产分析纯或色谱纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 内生真菌的分离和纯化

新鲜蛇足石杉用自来水清洗后,分别用 0.1% 升汞和 75% 酒精浸泡 20 min 和 5 min,经无菌水冲洗后,加入适量生理盐水,并轻柔研磨成浆,适当稀释并涂布在 PDA 平板上,25 ~ 28  $^{\circ}\text{C}$  静置培养。根据真菌生长情况,将其接至新的 PDA 平板继续培养,并采用菌丝顶端分离法多次纯化获得的单克隆。

#### 1.2.2 石杉碱甲的提取及分析

石杉碱甲的提取及 HPLC 分析参照<sup>[13]</sup>:(1)将纯化后的菌株接种至 100 mL PDL 培养基中,28  $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm 培养 15 天,用 3 层纱布过滤收集菌体,55  $^{\circ}\text{C}$  烘干并研磨成粉;(2)称取 1.0 g 菌粉,经 0.8% 稀硫酸浸泡 48 h、超声辅提 30 min 后,用氢氧化钠将其调至 pH = 10.0,再用 10 mL 氯仿抽提,12 000 rpm 离心 3 min,吸取下层有机相。抽提三次并合并抽提液,65  $^{\circ}\text{C}$  减压蒸干,用 1 mL 色谱级甲醇溶解蒸馏残余物,并用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后,用于 HPLC 和 MS 分析。(3)HPLC 初筛条件:ODS-C<sub>18</sub> 反相柱 (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 mm  $\times$  150 mm),流动相为甲醇:水 = 65:35;流速为 0.5 mL/min,紫外波长设定为 310 nm,柱温为 20  $^{\circ}\text{C}$ ,进样量为 20  $\mu\text{L}$ 。HPLC 复筛条件:流动相为甲醇:水 = 55:45,其它条件同 HPLC 初筛条件。根据石杉碱甲标品和真菌样品的相应峰面积比,计

算内生真菌的石杉碱甲产量。(4)MS 分析由中南民族大学分析测试中心采用 Agilent 1100 LC /MSD trap 系统完成,色谱柱、流动相、紫外波长、柱温和进样量同 HPLC 条件,流速为 2  $\mu\text{L}/\text{min}$ ,电压为 2.2 KV,离子源为 ESI<sup>+</sup>。

#### 1.2.3 菌株 SNZ-12 的形态特征观察及 18S rDNA 序列分析

将菌株 SNZ-12 接种于 PDA 平板,26  $^{\circ}\text{C}$  培养 6 ~ 10 天,培养过程中观察其菌落形态、颜色、质地等特征,并用接种针挑取少量菌丝于载玻片上,制作临时装片,在光学显微镜下观察其菌丝和孢子的形态特征,并根据《真菌鉴定手册》<sup>[14]</sup>对菌株进行初步鉴定。

以菌株 SNZ-12 的基因组 DNA 为模板,采用引物 18S-F1 (5'-GATCCTGCCAGTAGTCATATGC-3') 和 18S-ITS2 (5'-GCTGCGTTCATCGATGC-3') 扩增其 18S rDNA 序列。扩增条件为:96  $^{\circ}\text{C}$  5 min,93  $^{\circ}\text{C}$  30 s,53  $^{\circ}\text{C}$  30 s,68  $^{\circ}\text{C}$  50 s,共 30 个循环;然后,68  $^{\circ}\text{C}$  再反应 5 min。扩增产物测序后,经 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) 在线比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 产石杉碱甲内生真菌的筛选

本研究共分离获得 60 株形态各异的内生真菌。采用 HPLC 初筛条件检测各个真菌的提取物,发现只有编号为 SNZ-12 菌株的提取物 (4.277 min) 具有与石杉碱甲标品 (4.279 min) 相近的特征峰及其保留时间 (Fig. 1A、B);通过改变流动相,采用 HPLC 复筛条件再次检测内生真菌 SNZ-12 提取物,发现其 (8.900 min) 依然具有与石杉碱甲标品 (8.994 min) 相近的特征峰及其保留时间 (Fig. 1C、D),初步表明内生真菌 SNZ-12 可以产石杉碱甲,其石杉碱甲产量约为 1.01 mg/L。之后,对内生真菌 SNZ-12 提取物进行质谱分析,结果表明: H<sup>+</sup> 轰击后,内生真菌 SNZ-12 提取物中含有与石杉碱甲标品 ((M + H)<sup>+</sup> = 243.1) 相同的质谱特征峰,进一步证明内生真菌 SNZ-12 可以产石杉碱甲。

### 2.2 产石杉碱甲内生真菌 SNZ-12 的鉴定

内生真菌 SNZ-12 于 26  $^{\circ}\text{C}$  条件下在 PDA 平板上培养 7 天后,其菌落直径约为 8 cm,初生菌丝为白色,气生菌丝不发达并紧贴培养基 (Fig. 3A);菌落背面初为乳白色,随着培养时间延长逐渐转为浅紫色 (Fig. 3B);菌丝光滑无色、分枝、有隔 (Fig. 3C);

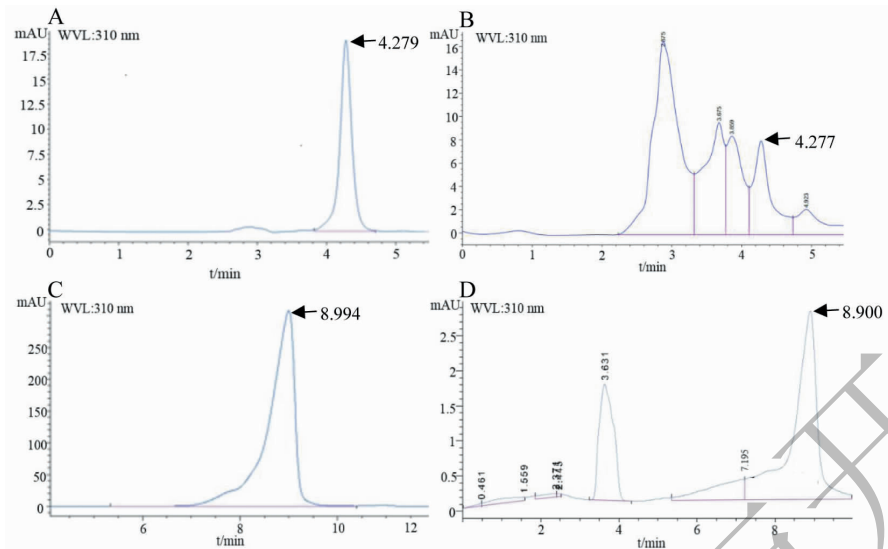


图 1 石杉碱甲标品 (A,C) 及内生真菌 SNZ-12 提取物 (B,D) 的 HPLC 分析

Fig. 1 HPLC analysis of authentic Huperzine A (A,C) and the extract of endophytic fungus SNZ-12 (B,D)

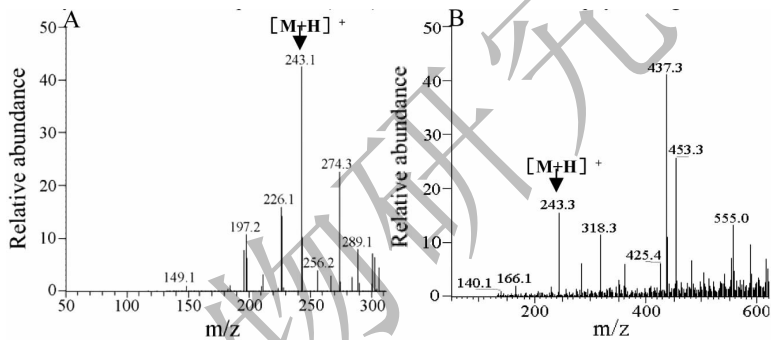


图 2 石杉碱甲标品 (A) 及内生真菌 SNZ-12 提取物 (B) 的质谱分析

Fig. 2 Electrospray mass spectra of authentic Huperzine A (A) and the extract of endophytic fungus SNZ-12 (B)

分生孢子无色、多胞、有隔、略弯曲，两端细胞稍尖 (Fig. 3D)。参照《真菌鉴定手册》<sup>[14]</sup> 发现内生真菌

SNZ-12 与尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的形态特征相似。

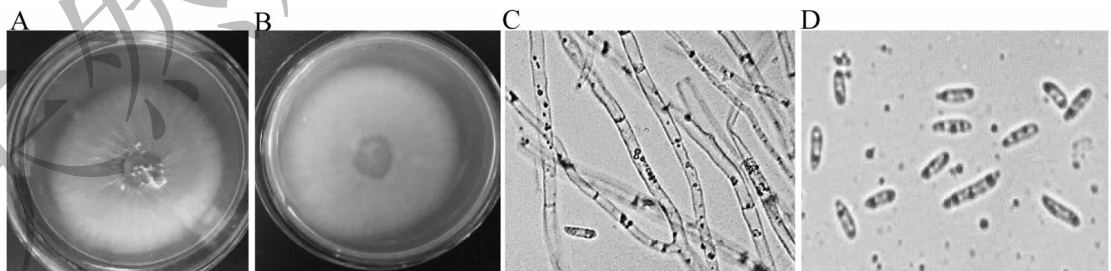


图 3 内生真菌 SNZ-12 的菌落 (A,B)、菌丝体 (C) 和分生孢子 (D) 的形态特征

Fig. 3 Morphological observation of the colony (A), colony reverse (B), hyphae (C) and conidiophores (D) of endophytic fungus SNZ-12 (Magnification with 400 ×)

内生真菌 SNZ-12 的 18S rDNA 序列分析结果 (Fig. 4) 表明, 其与 *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* 的 18S rDNA 序列 (GenBank no. LT841236. 1)、*F.*

*oxysporum* f. sp. *cumini* 的 18S rDNA 序列 (GenBank no. LT841208. 1)、*F. proliferatum* 的 18S rDNA 序列 (GenBank no. LT841264. 1)、*Fusarium* sp. LL-X4 的

18S rDNA 序列(GenBank no. EF397557.1)分别具有 99% 的一致性(identity)。结合内生真菌 SNZ-12 的

形态特征,将其初步鉴定为尖孢镰刀菌。

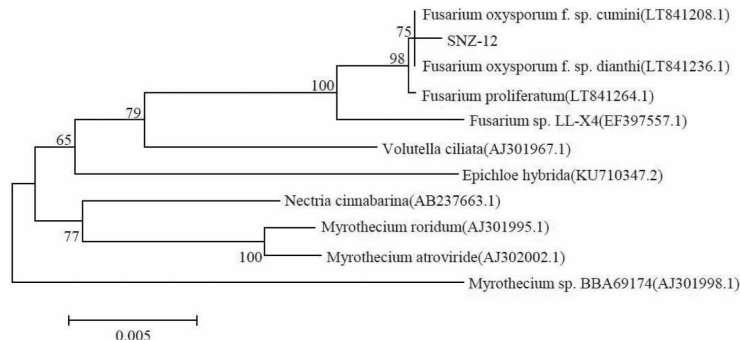


图 4 内生真菌 SNZ-12 的 18S rDNA 系统进化分析

Fig. 4 The phylogenetic analysis of the 18S rDNA sequences of endophytic fungus SNZ-12

### 3 讨论

镰刀菌(*Fusarium* sp.)是常见植物内生真菌之一,分布范围广、种类繁多,已报道的镰刀菌有 500 多种<sup>[15]</sup>。目前,已有多篇关于从蛇足石杉植物分离到镰刀菌的报道,例如,贺乐等从蛇足石杉分离到一株内生镰刀菌 JSM10<sup>[16]</sup>;孙勇等自蛇足石杉等植物分离到 62 株内生镰刀菌,分属 6 个种,包括尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、串珠镰刀菌(*F. proliferatum*)、砖红镰刀菌(*F. lateritium*)、木贼镰刀菌(*F. equiseti*)等<sup>[17]</sup>;韩文霞等从蛇足石杉分离到产石杉碱甲的尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) NSG-1<sup>[18]</sup>和轮枝镰孢菌(*F. verticillioides*) NSH-5<sup>[19]</sup>;闵长莉等自蛇足石杉中分离到产石杉碱甲的镰刀菌(*Fusarium* sp.) WX13<sup>[20]</sup>。这些结果表明,镰刀菌不仅是蛇足石杉的代表性内生菌,也是重要的产石杉碱甲内生菌资源之一。

根据文献报道,尖孢镰刀菌 NSG-1<sup>[18]</sup>和轮枝镰孢菌 NSH-5<sup>[19]</sup>在 PDL 培养基于 28 °C 培养 5 天后,该菌株的发酵液(去除菌体的上清液)中石杉碱甲产量分别为 11.1 mg/L 和 117.6 mg/L;这应是目前报道的石杉碱甲产量最高的菌株,而且达到该产量所需的发酵时间仅为 5 天,并且石杉碱甲都是分泌在培养基中(该文献没有报道菌丝体的石杉碱甲含量)。镰刀菌 WX13 在 PDB(potato-dextrose broth)培养基培养 7 天后,收集菌丝体并检测发现其含有石杉碱甲,但没有报道具体产量,也没有报道发酵液中是否含有石杉碱甲<sup>[20]</sup>。本研究分离的尖孢镰刀菌 SNZ-12 在 PDL 培养基中培养 5 天时,其菌丝体较少,发酵液中没有石杉碱甲;培养 15 天后,菌丝体中

可以检测到石杉碱甲,产量约为 1.01 mg/L,但培养 15 天的发酵液(去除菌体的上清液)中依然检测不到石杉碱甲,说明尖孢镰刀菌 SNZ-12 合成的石杉碱甲主要存在于细胞内。通过比较不同产量以及不同石杉碱甲合成特性的镰刀菌,比如高产且分泌型合成石杉碱甲的尖孢镰刀菌 NSG-1 以及产量较低且胞内型合成石杉碱甲的尖孢镰刀菌 SNZ-12,有助于揭示不同镰刀菌的石杉碱甲的合成及调控机制,而本文所报道菌株为该研究提供了菌种资源。

### 参考文献

- Damar U, Gersner R, Johnstone JT, et al. Huperzine A, a promising anticonvulsant, disease modifying, and memory enhancing treatment option in Alzheimer's disease [J]. *Med Hypotheses*, 2017, 99:57-62.
- Zhang H(张寰), Su GY(苏国阳), Liang Q(梁倩), et al. Effect of huperzine A tablet on clinical symptoms and negative emotions of patients with Alzheimer's disease [J]. *J Int Psychiatry* (国际精神病学杂志), 2017, 44:857-860.
- Xu HB(徐红冰), Wang XP(王晓平), Liu GL(刘皋林). Pharmacological studies and clinical application of huperzine A [J]. *World Clinical Drugs* (世界临床药物), 2014, 35(1):60-63.
- Qi YD(齐耀东), Wang DL(王德立). Population structure and resource reducing factors of *Huperzia serrata* (Thunb. ex Murray) Trevis. in China [J]. *Mod Chin Med* (中国现代中药), 2017, 19:96-102, 106.
- Dong LH(董丽辉), Fan SW(范三微), Ling QZ(凌庆枝), et al. Study on huperzine A-producing endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2014, 5:650-655.

- 6 Zhu D, Wang J, Zeng Q, *et al.* A novel endophytic Huperzine A-producing fungus, *Shiraia* sp. Slf14, isolated from *Huperzia serrata* [J]. *J Appl Microbiol*, 2010, 109:1469-1478.
- 7 Dong LH, Fan SW, Ling QZ, *et al.* Identification of huperzine A-producing endophytic fungi isolated from *Huperzia serrata* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2014, 30: 1011-1017.
- 8 Wang Y, Zeng QG, Zhang ZB, *et al.* Isolation and characterization of endophytic huperzine A-producing fungi from *Huperzia serrata* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, 38:1267-1278.
- 9 Wang JX(王吉祥). Study on isolation and fermentation condition of a huperzine A-producing endophytic fungus, *Shiraia* sp. Slf14, from *Huperzia serrata* [D]. Nanchang: Jiangxi Normal University(江西师范大学), 2010.
- 10 Su J, Yang M. Huperzine A production by *Paecilomyces tenuis* YS-13, an endophytic fungus isolated from *Huperzia serrata* [J]. *Nat Prod Res*, 2015, 29:1035-1041.
- 11 Wang Y(汪涯), Yan RM(颜日明), Zeng QG(曾庆桂), *et al.* Producing huperzine A by an endophytic fungus from *Huperzia serrata* [J]. *Mycosystema*(菌物学报), 2011, 30:255-262.
- 12 Zhang P(张鹏), Liu B(刘博), Zhou PP(周蓬蓬), *et al.* Isolation and identification of a taxol-producing endophytic fungus YN6[J]. *Chin J Biochem Mol Biol*(中国生物化学与分子生物学报), 2011, 27:961-967.
- 13 Zhao XM(赵昕梅). Research on the hupA-producing endophyte *Colletotrichum gloeosporioides* ES026 isolated from *Huperzia serrata* [D]. Hubei: Huazhong Agricultural University(华中农业大学), 2013.
- 14 Wei JC(魏景超). Fungal identification manual(真菌鉴定手册) [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979.
- 15 Kirk PM, Cannon PF, David JC, *et al.* Ainsworth & Bisby's dictionary of the fungi:9th[M]. CABI publishing, 2001.
- 16 He L(贺乐), Liu ZX(刘祝祥), Zhu J(朱杰), *et al.* Isolation and molecular identification of endophytic fungi JSM 10 from *Huperzia crispata* [J]. *J Jishou Univ: Nat Sci*(吉首大学学报: 自科版), 2011, 32(3):78-81.
- 17 Sun Y(孙勇), Liao Q(缪倩), Sun Y(孙颖), *et al.* Isolation and identification of endophytic *Fusarium* from six kinds of plants [J]. *Jiangsu Agric Sci*(江苏农业科学), 2010, 5:437-439.
- 18 Han WX(韩文霞), Li WZ(李伟泽), Li XF(李小峰), *et al.* Detection and identification of high producing huperzine A by an endophytic fungus from *Huperzia serrata* [J]. *Int J Pharm Res*(国际药学研究杂志), 2016, 43:1112-1116.
- 19 Han WX(韩文霞), Li WZ(李伟泽), Li XF(李小峰), *et al.* Isolation and identification of endophytic fungus producing huperzine A from *Huperzia serrata* [J]. *Microbiology China*(微生物学通报), 2017, 44:2153-2160.
- 20 Min CL(闵长莉), Wang XJ(汪学军). Isolation and identification of a huperzine A-producing endophytic fungi from *Huperzia serrata* [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2013, 25:590-593.

(上接第 2156 页)

- 9 Yu XH(余响华), Jiang QF(蒋琼凤), Shao JH(邵金华). Optimization of extraction of camptothecin from *Camptotheca acuminata* fruits by response surface methodology [J]. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2014, 26: 1858-1863.
- 10 Montoro P, Maldini M, Piacente S, *et al.* Metabolite fingerprinting of *Camptotheca acuminata* and the HPLC-ESI-MS/MS analysis of camptothecin and related alkaloids [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 51:405-415.
- 11 Wang CC(王程成), Su JY(苏嘉炎), Cai JY(蔡继炎), *et al.* Response surface analysis for the optimization of extraction condition for polysaccharides from *Epimedium polysaccharides* and studies on its tumor immune activities [J]. *Acta Pharm Sin*(药学学报), 2016, 51:1464-1471.
- 12 Ma XR(马旭荣). Drug microbial test handbook(药品微生物学检验手册) [M]. Beijing: People House, 2001:50-53.
- 13 Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. *Anal Biochem*, 1996, 239(1):70-76.
- 14 Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity [J]. *LWT Food Sci Technol*, 1995, 28(1):25-30.
- 15 Re R, Pellegrini N, Proteggente A, *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay [J]. *Free Radical Biol Med*, 1999, 26:1231-1237.