

一株冬虫夏草来源真菌的鉴定及抑菌活性检测

于帮红^{1,2}, 徐慧^{1,2}, 张传博^{1,2*}

(1. 贵州师范大学 生命科学学院, 贵阳 550001; 2. 贵州省农业生物技术重点实验室, 贵阳 550006)

[摘要] **目的:**对分离自青海省果洛州冬虫夏草子座内的一株真菌(*Cs-ZZ23*)进行鉴定,并对其抑菌活性作初步探究。**方法:**利用形态学和多基因系统分析相结合的方法进行鉴定,同时采用对峙法和改进的菌块法测定了该菌株对 6 株供试菌的抑制作用。**结果:**形态特征表明,该菌株与被孢霉属(*Mortierella* sp.)中的高山被孢霉(*Mortierella alpina*)的特征一致,多基因序列分析显示本菌株与多个高山被孢霉菌株同源性在 99%,因此确定该菌株为高山被孢霉,而且对大肠埃希菌(*Escherichia coli*),枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)有抑制作用。**结论:**菌株 *Cs-ZZ23* 为高山被孢霉,其次级代谢产物具有重要研究价值。

[关键词] 高山被孢霉; 多基因系统进化分析; 分类鉴定; 抑菌活性

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0036-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080036

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160311.1043.020.html>

[网络出版时间] 2016-03-11 10:43

Identification of Fungi from *Cordyceps sinensis* and Its Antibacterial Activity

YU Bang-hong^{1,2}, XU Hui^{1,2}, ZHANG Chuan-bo^{1,2*}

(1. College of Life Science, Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China;

2. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guiyang 550006, China)

[Abstract] **Objective:** To identify and explore the antimicrobial activity of the fungi (*Cs-ZZ23*) isolated from the *Cordyceps sinensis* collected from Guoluo, Qinghai province. **Method:** The morphology and multilocus phylogenetic analysis were used for identification of the fungi. Meanwhile, 6 strains were used as indicators to test the antimicrobial activity of this fungus using agar disk diffusion method and improved agar block method. **Result:** The morphological characteristics of this strain were similar to those of *Mortierella alpina* in *M. sp.*, and the polygenes sequence analysis showed that the sequence homology was 99% between strain *Cs-ZZ23* and the multiple strains of *M. alpina*. Therefore, this strain was determined as *M. alpina* and it exhibited antibacterial activity against *E. coli*, *Bacillus subtilis* and *Pythium aphanidermatum*. **Conclusion:** The strain *Cs-ZZ23* is a kind of *M. alpina* and its secondary metabolites deserve to be further developed.

[Key words] *Mortierella alpina*; multilocus phylogenetic analysis; classification and determination; antibacterial activity

冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 是由冬虫夏草菌 发育形成的真菌子座和充满菌丝的僵死幼虫的复合
Ophiocordyceps sinensis 侵染蝙蝠蛾 *Hepialus* 幼虫后 体。冬虫夏草是我国特有的传统名贵中药材,具有

[收稿日期] 20151105(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460585);贵阳市现代农业与农村科技计划项目(筑科合同[2012102]号)

[第一作者] 于帮红, 硕士, 从事植物学研究, Tel:18286140712, E-mail:550393607@qq.com

[通讯作者] * 张传博, 博士, 教授, 从事微生物学研究, Tel:0851-86702541, E-mail:Zhangchuanbo2004@163.com

免疫调节、消炎、抗肿瘤、抗氧化等广泛药理作用^[1]。

冬虫夏草的无性型菌种是中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*)^[2-3]。野生冬虫夏草区系中除中国被毛孢之外,尚存在大量其他真菌^[4-6]。其中,从冬虫夏草样品中分离得到的蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali*) 由于其发酵菌丝体有着与冬虫夏草基本相似的主要化学成分和药理作用,已成为冬虫夏草常用代用品之一。迄今,分离自冬虫夏草和其无性型相关的真菌,已达几十个属的几百种真菌,真菌多样性极其丰富^[6-7]。分离自冬虫夏草子座的真菌产黄青霉 (*Penicillium chrysogenum*) 可以生产多种氨基酸、葡萄糖氧化酶及麦角固醇等,并且具有抗链格孢属真菌的活性^[8-10]。目前已经得到证实,对分离自冬虫夏草相关真菌的次生代谢产物分析,得到多种新结构化合物,具有抗菌、抗肿瘤、抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 等活性^[11-15]。在工业生产上,这些真菌还可以产生多种氨基酸类、脂类、核苷类等化学成分,油酸、亚油酸、花生四烯酸等有机酸,具有广泛的药理活性和实际应用价值^[16]。因此,冬虫夏草区系中的真菌物种是一类非常重要的生物资源,具有重要的开发潜力。

从青海省果洛藏族自治州的野生冬虫夏草上分离得到一株被孢霉属真菌 *Cs-ZZ23*, 该菌株与子座伴生,且在冬虫夏草菌核和菌膜上均分离得到过该菌株,确定为青海省果洛藏族自治州野生冬虫夏草微生态区系优势真菌。为研究其分类地位,对该菌株进行形态观察和多基因序列系统发育分析,并对其抑菌活性进行初步研究,而且通过平板对峙试验的方法对该菌株与蝙蝠蛾拟青霉之间的关系进行了探究,旨在为研究冬虫夏草相关菌种的开发利用和冬虫夏草的发生机制提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 冬虫夏草 样品采自青海省果洛藏族自治州附近海拔 4 000 ~ 4 500 m 的高山草甸,并用冰盒带回驻地,立即分离。

1.1.2 供试菌株 供试细菌指示菌为金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus* 1340), 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*), 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* 1005)。供试真菌指示菌为白色念珠菌 (*Candida albicans* 2005), 灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea* 3061), 瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum*), 蝙蝠蛾拟青霉 (*Paecilomyces hepiali* JM91), 以上菌株均为贵州师

范大学微生物学实验室保存菌种。

1.1.3 培养基 马铃薯培养基 (PDA, 杭州微生物试剂有限公司, 批号 20150505-00), 牛肉膏蛋白胨培养基按常规方法配制 (牛肉膏, 北京双旋微生物培养基制品厂, 批号 000429; 蛋白胨, 上海博微生物科技有限公司, 批号 130531; 氯化钠, 上海化学试剂总厂, 批号 20141018)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离 取新鲜野生冬虫夏草先用自来水冲洗,再用 75% 乙醇浸泡 30 s, 无菌水漂洗 2 次,5% 次氯酸钠浸泡 3 min, 无菌水漂洗 3 次,对剥去菌膜的冬虫夏草进行表面消毒。将消毒过的冬虫夏草从子座基部切成子座和虫体两部分,将子座部分切成 1 ~ 2 mm 厚的薄片,置于灭菌研钵中加少量无菌水进行研磨,将匀浆涂布 3 个 PDA 平板 (含 100 mg·L⁻¹ 链霉素和 100 mg·L⁻¹ 青霉素)。将平板置于 17 °C 黑暗培养。将平板上长出的真菌菌落及时转接到新的 PDA 平板上,并保种,其中,编号 *Cs-ZZ23* 的菌株为一株在子座高频出现的菌株。

1.2.2 菌种的分类鉴定 菌落的形态观察 将纯化的 *Cs-ZZ23* 菌株接种于 PDA 培养基上,25 °C 培养 7 d 观察菌落的形态特征。显微观察:将已纯化的菌株点种于 PDA 平板表面,倒置于 28 °C 培养箱常规培养,并对预培养的菌丝进行诱导产孢^[17]。在干净的载玻片中央滴一点蒸馏水,挑取适量菌丝置于水滴中央,盖好盖玻片,用棉签轻压盖玻片使菌丝展开,置于显微镜下观察菌丝形态,并拍照。真菌基因组 DNA 的提取及多基因序列的扩增、测序:取培养好的菌丝,利用改良十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取真菌基因组 DNA^[18],电泳检测后进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增。PCR 反应体系为 (50 μL): 10 × PCR 缓冲液 5.0 μL, dNTPs (10 mmol·L⁻¹) 1.0 μL, 引物 (100 μmol·L⁻¹) 各 1.0 μL, 模板 DNA (100 mg·L⁻¹) 1.0 μL, *Taq* 酶 (2.5 U·μL⁻¹) 1.0 μL, 补超纯水至 50 μL。本实验共对 3 个 DNA 序列位点进行扩增和测序,包括内转录间隔区 (*ITS*), 大亚基 (*nrLSU*) 及延伸因子-1α (*tef-1α*), 使用 3 对引物对不同位点进行扩增。见表 1。

扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测,观察检测其纯度。扩增产物的纯化及测序由 Invitrogen 公司 (上海英俊生物技术有限公司) 完成。测序引物同 PCR 扩增引物相同。将所得序列与 GenBank 核酸数据库中序列进行 Nucleotide Blast 比对分析,并选取被毛孢属及与被毛孢属亲缘关系相近的代表菌株的相

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 Primers for PCR amplification

基因	引物	序列(5'-3')	片段大小 /bp
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	600
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
nrLSU	LROR	ACCCGCTGAACCTTAAGC	900
	LR5	TCCTGAGGGAACTTCG	
tef-1 α	EF1-2218R	ATGACACCRACRGCRCRGTGTYT	1 235
	EF1-983F	GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT	

应基因序列,用 MEGA 5.0 软件进行多重序列匹配排列(multiple alignments)分析,构建系统进化树。Bootstrap(1 000 次)重复检验。

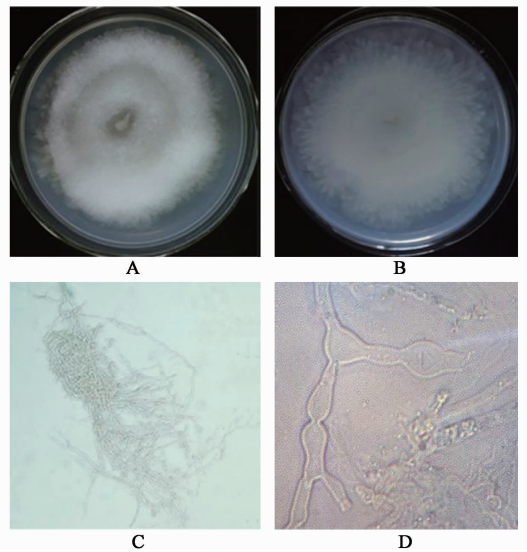
1.2.3 抑菌活性测定对供试植物病原真菌的拮抗作用检测 采用平板对峙培养法^[19-21],对供试指示细菌和白色念珠菌的拮抗作用检测采用改进的菌块法^[22-23],检测菌株 *Cs-ZZ23* 对供试指示菌的抑菌活性。

1.2.4 与蝙蝠蛾拟青霉的平板对峙试验 将活化好的菌种和蝙蝠蛾拟青霉分别用点种法接种在 PDA 培养基中相距 2 cm 的位置,25 ℃ 培养,每个处理设置 3 个重复,观察记录对峙结果。

2 结果与分析

2.1 菌株的形态学观察 菌株 *Cs-ZZ23* 在 PDA 琼脂培养基上接种 3 d 后生长旺盛,菌落圆形,直径达 2.0 cm,气生菌丝呈白色,且辐射状蔓延,四周有白色菌丝隆起,7 d 后菌丝呈高山状向四周扩展,几乎铺满整个培养皿,菌丝向上蔓延直达皿盖,菌落表面有无色水珠渗出,基内菌丝多层重叠。背面菌丝白色,呈白色玫瑰花瓣状蔓延(图 1A,1B)。在显微镜下,*Cs-ZZ23* 菌丝呈管状,无隔,无色透明,菌丝发达,生长繁密,PDA 培养基上很少产生孢子,在光学显微镜下很难观察到,后期菌丝不规则膨大(图 1C,1D)。*Cs-ZZ23* 菌株在 PDA 培养基上所显示的形态特征与魏景超著《真菌鉴定手册》^[24] 所述的被孢霉属特征相符。

2.2 序列测定及系统进化树分析 通过 PCR 方法扩增菌株 *Cs-ZZ23* 的 ITS 区,LSU 区及 *tef-1 α* 基因片段,获得的目的基因片段分别为 606,985,953 bp。采用 Nucleotide Blast 程序与 GenBank 数据库中相应序列做比对,结果显示 *Cs-ZZ23* 菌株属于被孢霉属(*Mortierella* sp.),而且与高山被孢霉同源性最高,同源性为 99%。分别基于 ITS,LSU,*tef-1 α* 序列采用



A. 菌株 *Cs-ZZ23* 在 PDA 培养基上生长 7 d 菌丝形态;B. 背面照片;C, D. *Cs-ZZ23* 菌丝体在光学显微镜下形态特征(C. $\times 400$;D. $\times 2 000$)

图 1 菌株 *Cs-ZZ23* 形态特征

Fig. 1 Morphology characteristics of strain *Cs-ZZ23*

MAGE 6.0 软件构建了单基因 NJ(neighbor-joining)系统进化树(图 2~4)。结果表明,*Cs-ZZ23* 均与高山被孢霉(*Mortierella alpina*)聚在同一分支上,结合形态学特征,鉴定该菌株为高山被孢霉。

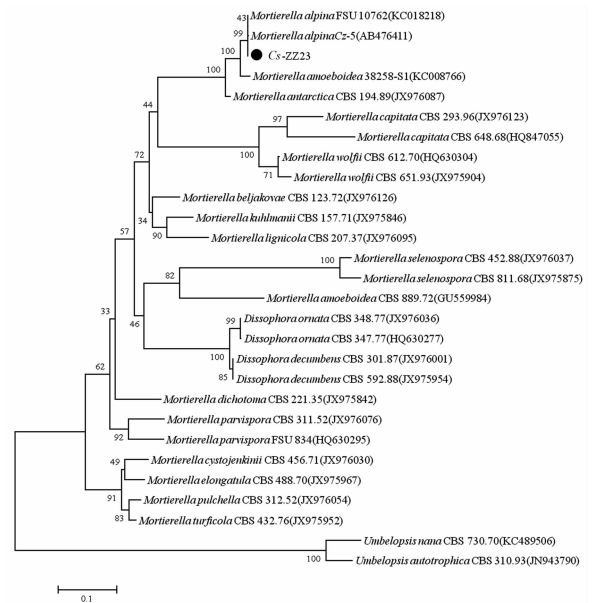


图 2 *Cs-ZZ23* 与参考菌株 ITS rDNA 序列构建的 NJ 树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on ITS gene sequence and *Cs-ZZ23* sequence

2.3 抑菌试验 采用对峙法和改进的菌块法对菌株 *Cs-ZZ23* 进行抑菌试验(图 5)。可以看出,该菌株对所测定的 6 株病原菌中的大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、瓜果腐霉表现出抑菌活性,说明该菌株产生

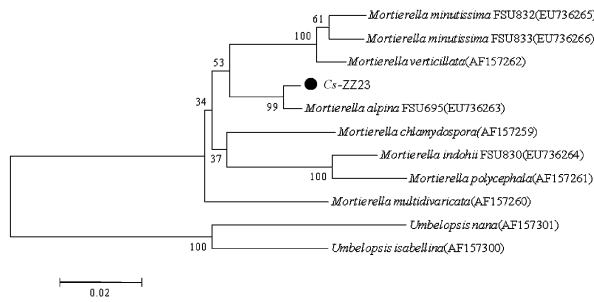


图 3 *Cs-ZZ23* 与参考菌株 *tef-1α* 序列构建的 NJ 树
Fig. 3 Phylogenetic tree based on *tef-1α* gene sequence and *Cs-ZZ23* sequence

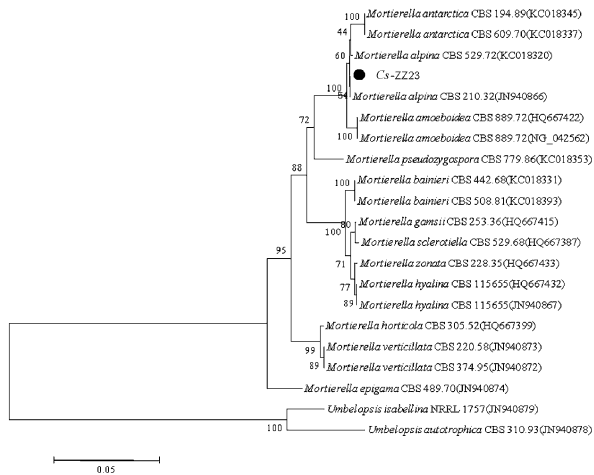
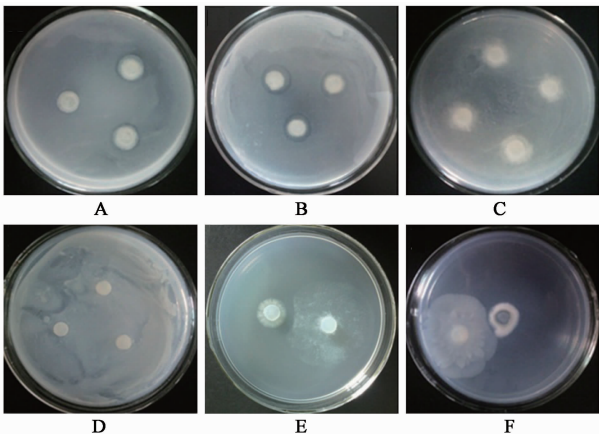


图 4 *Cs-ZZ23* 与参考菌株 *LSU* 序列构建的 NJ 树
Fig. 4 Phylogenetic tree based on *LSU* gene sequence and *Cs-ZZ23* sequence

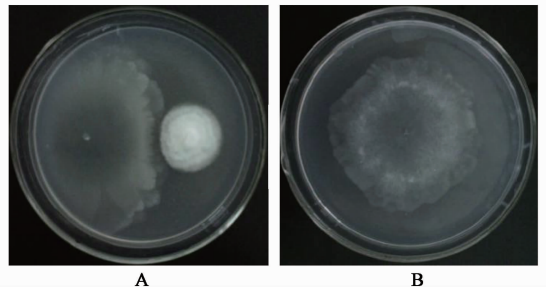


A. 大肠埃希菌; B. 枯草芽孢杆菌; C. 金黄色葡萄球菌; D. 白色念珠菌; E. 瓜果腐霉; F. 灰葡萄孢
图 5 菌株 *Cs-ZZ23* 对指示菌的抑制作用
Fig. 5 Inhibitory activity of strain *Cs-ZZ23* against pathogens

了具有抑菌活性的代谢产物。

2.4 与蝙蝠蛾拟青霉平板对峙试验结果 菌株 *Cs-ZZ23* 与蝙蝠蛾拟青霉平板对峙试验结果 (图 6), 菌

株 *Cs-ZZ23* 菌落生长表现出偏心现象, 说明蝙蝠蛾拟青霉对菌株 *Cs-ZZ23* 有抑制作用。



A. 菌株 *Cs-ZZ23* (左) 与蝙蝠蛾拟青霉 (右) 生长 7 d; B. 菌株 *Cs-ZZ23* 生长 7 d

图 6 平板对峙试验中蝙蝠蛾拟青霉对菌株 *Cs-ZZ23* 的影响
Fig. 6 Effect of *Paecilomyces hepiali* on strain *Cs-ZZ23* in agar disk diffusion method

3 讨论

相比于单基因系统进化树, 多基因系统进化树更能准确反映各菌株的亲缘关系^[25]。利用单基因构建的系统发育树, 在鉴定菌株分类地位时具有局限性, 利用多个相互独立 DNA 片段构建的基因树更能反映物种真正的系统发育关系。本研究在形态学鉴定的基础上, 采用多基因谱系分析对菌株 *Cs-ZZ23* 的 *ITS* 区, *LSU* 区及 *tef-1α* 基因片段进行研究, 分别构建系统发育树, 结果表明, *Cs-ZZ23* 均与高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 聚在同一分支上, 支持该菌株为高山被孢霉。

高山被孢霉具有资源丰富、油脂含量高、生长周期短、碳源利用广、不受气候限制等特点, 被认为是最佳的花生四烯酸生产菌株, 已经广泛应用于花生四烯酸的发酵生产中。花生四烯酸是一种人体必需的多不饱和脂肪酸, 具有提高免疫能力, 促进新陈代谢, 降低血脂、血糖、胆固醇等功能, 特别是对婴儿的发育非常重要^[26]。本试验对菌株 *Cs-ZZ23* 进行抑菌活性初步研究, 发现其对大肠埃希菌和枯草芽孢杆菌有抑制作用, 对其他指示菌作用不敏感, 分析是菌株 *Cs-ZZ23* 产生少量具有抑菌活性的物质, 但不足以具有广谱抑菌效果。高山被孢霉在发酵过程中会产生少量挥发性代谢产物, 经分析为倍半萜化合物, 其中, 倍半萜内酯具有抗炎、解痉、抑菌、降血脂、抗原虫和抗肿瘤等活性^[27]。

蝙蝠蛾拟青霉是野生冬虫夏草重要伴生菌, 冬虫夏草的医疗功效要归因于中国被毛孢、蝙蝠蛾拟青霉及其他内寄生菌的不同代谢产物^[28]。在平板对峙试验中, 蝙蝠蛾拟青霉对菌株 *Cs-ZZ23* 的生长具有抑制作用, 该菌株与蝙蝠蛾拟青霉等真菌共生,

会相互刺激产生次级代谢产物,对冬虫夏草活性成分的形成具有诱导作用。

长期生活在同一环境中的生物会产生结构类似的代谢产物^[6]。与普通环境微生物相比,野生冬虫夏草区系微生物所处环境特殊,由于长期的选择进化,形成了独特的环境适应机制、特殊的生理结构和独特的基因类型,必然会产生某些具有独特化学结构和生物学活性的代谢产物。冬虫夏草是传统中草药,高山被孢霉作为冬虫夏草子座伴生真菌,其次生代谢产物与冬虫夏草药理活性相关。冬虫夏草相关真菌的鉴定和研究对阐述冬虫夏草的发生机制和药物活性成分的开发具有重要意义。

[参考文献]

[1] 陈东河. 冬虫夏草的药理功能研究进展[J]. 中国城乡企业卫生, 2008(1):92-94.

[2] 刘锡璠, 郭英兰, 俞永信, 等. 冬虫夏草菌无性阶段的分离和鉴定[J]. 真菌学报, 1989, 8(1):35-40.

[3] Xiao W, Yang J L, Zhu P, et al. Non-support of species complex hypothesis of *Cordyceps sinensis* by targeted rDNA-ITS sequence analysis[J]. Mycosystema, 2009, 28(5):724-730.

[4] 梁宗琦. 虫草的无性型及其鉴定[J]. 西南农学报, 1991, 4(4):1-8.

[5] 蒋毅, 姚一建. 冬虫夏草无性型研究概况[J]. 菌物系统, 2003, 22(1):161-176.

[6] 张永杰, 孙炳达, 张姝, 等. 分离自冬虫夏草可培养真菌的多样性研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(4):518-527.

[7] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*[J]. Science, 1993, 260(5105):214-216.

[8] 王周圆, 别小妹, 吕凤霞, 等. 产黄青霉 A4 产胞外葡萄糖氧化酶发酵工艺优化[J]. 生物工程, 2015, 36(16):217-221.

[9] 张鹏荣, 郭育涛, 杨琴. 产黄青霉固体发酵提取麦角固醇及其生物量测定的研究[J]. 安徽农学通报, 2015, 15(8):23-26.

[10] Gao S S, Li X M, Du F Y, et al. Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S [J]. Marine Drugs, 2011, 9:59-70.

[11] Chen Y L, Guo H J, Du Z Y, et al. Ecology-based screen identifies new metabolites from a *Cordyceps*-colonizing fungus as cancer cell proliferation inhibitors and apoptosis inducers[J]. Cell Proliferation, 2009, 42

(6):838-847.

[12] Guo H J, Hu H J, Liu S C, et al. Bioactive p-terphenyl derivatives from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Gliocladium* sp. [J]. J Nat Prod, 2007, 70(9):1519-1521.

[13] Guo H J, Sun B D, Gao H, et al. Diketopiperazines from the *Cordyceps*-colonizing fungus *Epicoccum nigrum* [J]. J Nat Prod, 2009, 72(11):2115-2119.

[14] Zhang Y G, Liu S C, Che Y S, et al. Epicoccins A-D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum* [J]. J Nat Prod, 2007, 70(9):1522-1525.

[15] Zhang Y G, Liu S C, Liu H W, et al. Cycloaspeptides F and G, cyclic pentapeptides from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Isaria farinose* [J]. J Nat Prod, 2009, 72(7):1364-1367.

[16] 孙娜, 崔建美, 李继安, 等. 冬虫夏草的化学成分与药理作用分析研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(4):65-67.

[17] 郭春秋, 罗永兰, 张志元. 几种真菌的诱导产孢实验[J]. 海南大学学报:自然科学版, 2003, 21(1):74-77.

[18] 苏俊. 新疆几种大型真菌的分类鉴定及其生物学特征研究[D]. 乌鲁木齐:新疆大学, 2008.

[19] 袁保红, 杜青平, 邓祖军. 小连翘内生真菌种群分布及其抗菌性研究[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(3):307-311.

[20] 张苗苗, 张蓉, 王生荣. 高寒草地植物内生真菌的分离及其抑菌活性初探[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7):3072-3075.

[21] 毕江涛, 何萍, 吕雯, 等. 桃儿七内生真菌分离及其抑菌活性初步探究[J]. 中草药, 2013, 43(12):1667-1672.

[22] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安:世界图书出版公司, 2000:372-374.

[23] 孙奎, 苏印泉. 无花果内生真菌的抑菌活性研究[J]. 菌物研究, 2010, 8(2):103-106.

[24] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:科学出版社, 1979:84-86.

[25] 王萌, 殷幼平, 王中康, 等. 10株绿僵菌菌株分类地位的多基因系统进化分析[J]. 植物保护, 2014, 40(5):14-21.

[26] 袁成凌, 余增亮, 汪志明, 等. 新型营养强化剂——花生四烯酸[J]. 中国食品添加剂, 2001, 17(4):27-30.

[27] 刘欣, 马小琛, 黄和, 等. 高山被孢霉挥发性次生代谢产物分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(29):13985-13986.

[28] 杨金玲, 肖薇, 何惠霞, 等. 蝙蝠蛾拟青霉与冬虫夏草关系的分子系统学研究[J]. 药学学报, 2008, 43(4):421-426.

[责任编辑 邹晓翠]