

## 冬虫夏草菌的动态产孢量及抗异能力

王 伟,杨 博,蔡世亮,陈湛昌,钟英长\*

(中山大学生命科学院,广东 广州 510275)

**摘要:**目的 研究冬虫夏草菌的生长速度和动态产孢量,揭示产孢规律和条件,探索人工繁殖的可能及评估其在对虫害生物防治中的应用潜力;测定它的抗异活性和抗菌谱,为对其活性产物的性质研究打下基础。方法 测量虫草菌株在真菌培养基生长时的菌落直径变化,用孢子计数法跟踪测定普通培养基和水琼脂上单菌落的动态产孢量并与相近虫草菌进行对比分析,用琼脂块法测定培养菌丝对致敏菌的抗异活性,测量比较抗菌圈大小和总结抗菌谱。结果 在 PDA 等 3 种常规真菌培养基上, CY-8202 的菌落扩展与时间呈线性关系。动态产孢量的测定表明,该菌株在适宜培养基上的单菌落产孢量可达  $10^7$  以上,并随着时间的延长而增长,大约 200 h 后增长趋于平缓。对 22 个致敏菌株的抗菌实验显示, CY-8202 培养菌丝对革兰氏阳性的枯草杆菌、四联球菌、白色葡萄球菌以及革兰氏阴性的普通变形杆菌、伤寒杆菌、产气杆菌和沙门氏菌等 7 株细菌有较强的抑制能力,对 3 株霉菌和 1 株放线菌有轻微抑制,对酵母菌未见抑制影响。结论 虫草菌丝的生长和产孢力是有效侵染寄主的两个重要因素,但菌丝生长速度不宜作为生长力强弱的唯一判断指标,菌丝的穿透力更加重要;具有超量产孢能力是虫草菌株强侵染力的一个重要标志。抗异活性表明冬虫夏草菌具有分泌比虫草菌素更广谱的抗生素的能力。

**关键词:**冬虫夏草;轮枝孢;动态产孢;抗异性;侵染力;虫草素

中图分类号: R282.32

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2002)01-0065-04

### Dynamic spore outputs and antibiotic activities of asexual fungi (strain CY-8202) isolated from *Cordyceps sinensis*

WANG Wei, YANG Bo, CAI Shi-liang, CHEN Zhen-chang, ZHONG Ying-chang

(School of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou Guangdong 510275, China)

**Abstract** **Object** To study the growth speed and dynamic spore production of CY-8202, which is an asexual strain of entomopathogenic fungi isolated from *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., to explore the method of artificial culture of CY-8202 strain, to assay its antibiotic activity and spectrum and to provide the experimental basis for studies of its active components. **Methods** Variations in colony diameter of the cordyceps hypha cultured on the fungi media were measured. The spore-count was used to determine the dynamic colony spore outputs of the hypha on several fungi media and water agar. The agar-piece method was used to test its antibiotic activity. **Results** There were linear relationships between the colony extensions and the culture times on common fungi media such as PDA medium, etc.. The amounts of spore produced by the single colony of the fungi were more than  $10^7$  and gradually increased, but the rates of increase tended to be gentle after 200 h. Antimicrobial tests against 22 microbial strains showed strong inhibition of gram positive bacteria including *Bacillus subtilis*, *Micrococcus tetragenus* and *Staphylococcus albus*, and to gram negative bacteria, including *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *Aerobacter aerogenes* and *Salmonella* sp., as well as weak inhibition of three mold strains and one actinomycetes strain, but no inhibition was observed in four yeast tested. **Conclusion** The growth activity and the spore-production ability of *Cordyceps hypha* are two important factors to infect validly its insect-host. For the growth activity, its strong penetration seems more important than its fast growth. The ability to product numerous spores of *Cordyceps hypha* may be an important mark of its strong infectivity to insect-host. The antimicrobial tests show that CY-8202 may secrete some metabolites which have a more broad-spectrum antibacterial activity than cordycepin isolated initially from *Cordyceps militaris*.

**Key words** *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.; *Verticillium* sp.; dynamic spore output; antibiotics; infectivity; cordycepin

中药冬虫夏草的真菌为中国虫草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc., 是虫草属 *Cordyceps* (Fr.)

\* 收稿日期: 2001-04-25

作者简介: 王伟 (1962-),男,讲师,博士,主要从事真菌生理、代谢和产物的研究。E-mail: ls30@zsu.edu.cn

Link 中一个产于高海拔雪线附近的中国特有种 (endemic species) 虫生真菌,是传统的名贵药材,现代药理研究发现具提高机体免疫功能、抗肿瘤、促生血、降血压、血脂、平喘祛痰、中枢镇静、抗病原微生物及改善肾功能等多种作用<sup>[1]</sup>,因而近十多年来,围绕冬虫夏草药用价值和保健目的的应用研究十分活跃,文献甚多。与此同时,在形态、分类、发育以及寄主和生境等方面的基础研究也有一定的开展。近两年,一些分子生物学的手段已开始用于种属鉴别和研究种属间的遗传分化。但是另一方面,冬虫夏草的培育技术一直没有突破,客观上制约了冬虫夏草分离菌与它的天然有性态之间的同一性确定,从冬虫夏草有性态分离到无性型菌株一度多达十余种<sup>[2]</sup>,成为在生物多样性和遗传多样性方面最具有代表性的物种之一<sup>[3,4]</sup>。冬虫夏草的这种生物多样性也构成一个内含丰富的资源宝库,有望从中发掘出传统药物价值之外的新用途以及新的功能性代谢产物。

本文对一株采自云南丽江高寒山地的冬虫夏草分离菌株 (编号为 CY-8202) 进行分生孢子的动态产孢量统计,同时以多个属的细菌、放线菌、酵母菌和丝状真菌测定其培养生长中的抗异活性,以期为进一步揭示其动态产孢规律和抗菌谱,评估其在人工侵染昆虫、人工繁殖及虫害生物防治中的应用潜力,以及对其活性产物的性质研究提供科学依据。

## 1 材料和方法

1.1 菌种: 冬虫夏草供试菌株 CY-8202 系重复分离该虫草所得的一株丝状真菌,是轮枝孢型 (*Verticillium* sp.) 昆虫病原菌的无性株

其余测定用的 22 株包括细菌、放线菌、酵母菌和丝状真菌的致敏菌株,均为本室保存菌种。

1.2 培养基: PDA 查氏 (Czapek's), 萨氏 (Sabouraud's) (以上用于培养真菌)、高氏 (Gause's) 1 号琼脂 (培养放线菌) 和葡萄糖牛肉膏蛋白胨培养基 (培养细菌) 按常规方法配制,水培养基按 1.8% (W/V) 浓度加琼脂。以上培养基经 121℃ 灭菌处理。

1.3 单菌落培养及生长速度测定: 取培养皿的 2 次活化菌丝,用接种环挑取少量在另一 PDA 平板上作划线分离,于 22.5℃ 最适温度下培养 2 d 至形成单菌落,然后用刮铲取单菌落转移到供试的培养基平板中央,于 22.5℃ 下培养并每隔 24 h 测量记录菌落直径,观察菌落形态。

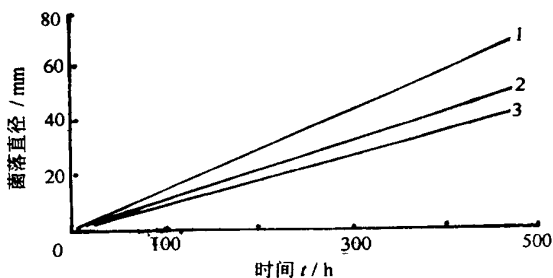
1.4 动态孢子量测定: 挑取同步萌发的多个单菌落,分别转至试管斜面供试培养基上,22.5℃ 统一条件下培养,每隔 24 h 分取各培养基试管 2 支,用

定量的无菌蒸馏水冲洗斜面,充分洗脱混匀成孢子悬浮液,通过显微计数板统计各管孢子液中单位容积的孢子量,取平均数,从而得出单菌落在相应发育时间内的总孢子数及连续时间内孢子量的增长变化。

1.5 抗异性测定: 切取边长约 5 mm 带有 CY-8202 供试菌丝的琼脂块于无菌空培养皿中 22.5℃ 下保湿培养,至整个琼脂块长满菌丝。另用无菌移液管吸取各致敏菌液 (或孢子悬浮液) 0.2 mL 分别涂布培养基平板,然后将长满供试菌丝的琼脂块移入,每皿均匀放 4 块,24℃~30℃ 下培养,2 d 后开始观察,记录拮抗情况,测量比较各抗菌圈的大小。用于涂布的平板琼脂培养基选用适合各致敏菌生长的牛肉膏蛋白胨琼脂、高氏 1 号琼脂及 PDA 培养基。

## 2 结果

### 2.1 生长速度: 图 1

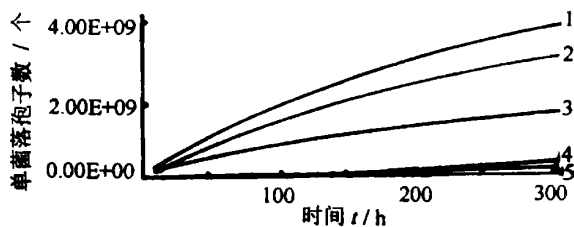


1-PDA 2-查氏 3-萨氏

图 1 CY-8202 的生长速度及在不同培养基上的长速变化

结果显示, CY-8202 菌落的扩展与时间基本呈线性关系。表明在一定时间内, CY-8202 菌落生长呈匀速增长态势。在 3 种培养基上的生长速度由快到慢依次是: PDA> 查氏> 萨氏。该菌株在 PDA 培养基上生长最快,在萨氏培养基上生长最慢,但致密度却最高。

### 2.2 不同培养基条件下分生孢子的动态产孢量: 图 2



1-PDA 2-查氏 3-萨氏 4-自来水 5-蒸馏水

图 2 CY-8202 产分生孢子的动态产孢量曲线 (2.00E+09=2.00×10<sup>9</sup>,其余数据以此类推)

该菌株单菌落的分生孢子产孢量在适宜培养基上可达 10<sup>7</sup> 以上 (表略),并随时间的增长而增长,但后期的增长曲线趋于平缓,增长速率逐渐有所降低,尤见菌株于 PDA 培养基上的产孢量在 200 h

左右时增长曲线开始趋于平缓(图2)。从不同培养基曲线比较可以看出不同营养成分对产孢量的影响, PDA培养基有利于产孢总量提高, 查氏培养基稍次, 萨氏培养基则较弱, 这表明相对丰富和比较完整的营养条件(糖、氨基酸、蛋白胨、维生素和金属阳离子)是维持和促进产孢所必需的, 寡营养的条件不利于大量形成分生孢子。同时, 自来水比纯蒸馏水稍有利于孢子形成。这可能是由于自来水中矿物质和无机盐所促进的结果。CY-8202在天然材料培养基上的产孢量高于完全配制型培养基, 揭示其在自然生境中能产生超量的孢子, 能有效的感染宿主。

2.3 抗异能力: CY-8202对四大类微生物的抗菌效能:  
细菌( $G^+$ ): 白色葡萄球菌(+), 苏云金杆菌(-), 枯草杆菌(++), 四联球菌(+)

细菌( $G^-$ ): 产气杆菌(++), 大肠杆菌(-), 普通变形杆菌(+++), 伤寒杆菌(++), 沙门氏菌(++), 灵杆菌(-)

酵母菌: 膜酞毕赤酵母(-), 酿酒酵母(-), 热带假丝酵母(-), 深红酵母(-)

霉菌: 宛氏拟青霉(+), 黄曲霉(-), 球孢毛霉(-), 黑根霉(-), 串珠镰孢霉(-), 黄绿青霉(+), 绿色木霉(+)

放线菌: 细黄放线菌(+)

“+”表示抑菌,“-”表示没有抑菌或抑菌表现不明显

CY-8202对10种细菌(4种革兰氏阳性菌及6种革兰氏阴性菌)、4种酵母菌、7种霉菌和1种放线菌共22株致敏菌的活性抗菌实验表明, 该菌种对细菌的抗异性比较突出, 对霉菌和放线菌的部分种类有轻微抑制, 对酵母菌则基本未见抑制影响。其中对革兰氏阳性的枯草杆菌、四联球菌、白色葡萄球菌, 以及革兰氏阴性的普通变形杆菌、伤寒杆菌、产气杆菌和沙门氏菌的生长表现出比较强的抑制能力, 表明CY-8202具有比较广谱的抗菌活性, 其抗菌的有效活性物为分泌型产物。

### 3 讨论

3.1 自然野生状态下, 虫草菌丝的生长力和繁殖产孢力是有效侵染寄主的两个重要因素。本实验菌株在PDA培养基上生长最快, 暗示着自然基质或者接近天然的培养材料可能更有助于冬虫夏草菌的生长发育。实验中丰富的氮源(萨氏培养基)并未使生长速度提高, 似乎没有起到明显的促进生长效应, 但丰富氮源下的生长菌丝往往具有较高的致密度和穿透力, 这对虫草菌所必须具备的侵染力而言似乎

也是一种菌丝强势的表现。这一结果至少表明, 反映虫草菌丝生长力的指标目前仍未确立, 不宜单纯依据生长速度来判定冬虫夏草菌丝的生长力并由此而来研究它的影响因子。

冬虫夏草菌的寄主以蝙蝠蛾属(*Hepialus* spp.)昆虫为主, 具有相对严格的寄主专一性。由于对冬虫夏草进行人工培育的努力多次失败, 推测虫草菌在虫体内的正常发育并得以向有性阶段过渡, 必须依赖其专一性寄主体内外的某些特殊成分, 而这些独特的促进成分在其它的昆虫品种中可能比较罕见, 由此认为该菌必须而且也只能在此类专化性的寄主体内才能完成整个世代交替。但同样不能忽视的是, 寄主专一性的事实是建立在大量昆虫种在冬虫夏草原产地高海拔的恶劣条件下已难以存活这一生态情形之上的<sup>[5]</sup>, 因而造成寄主专一性的事实可能是因为环境选择而不是真菌本身生长选择的结果, 这或许暗示着冬虫夏草菌在昆虫体内的发育和转性仍然是昆虫体内常规的多因子协同促进的结果(尤其是一些小分子物质的作用), 并非某个特殊的寄主才有, 只是由于生境生态的限制使寄主的专化性凸现出来。由此推测, 冬虫夏草菌在人工条件下感染其它昆虫并实现无性阶段和有性阶段的互变应是可能的, 只是实现这种转变的条件目前还不清楚。

就产孢力而言, CY-8202的表现似乎不错, 有比较高的产孢量和增长量, 但增长的速率随培养时间的延长有放缓的趋势, 这倒可能是菌株侵染力的一个真正的制约因素。我们在粤北发现一株新种虫草 *Cordyceps ruyuanensis* Wang sp. nov., 寄主是一种体形很大的枯叶蛾 *Lasio campidae* 或灯蛾 *Arctiidae* 类的幼虫, 金黄色的子座布满整个虫体多达百余个, 其菌种的侵染力和繁殖力均十分旺盛。研究该虫草无性分离菌株(CR-9511)的产孢量, 发现其初始产孢量绝对值稍低于CY-8202, 但培养中后期却呈现产孢量加速上升的趋势, 初步表明这种先缓而后加速的超量产孢能力可能是反映该菌株强侵染力的一个重要标志。我们推测, 冬虫夏草菌在寒带高海拔条件下的存在并维持一个相当高的产孢量, 以及同样条件下仅存的少量冬眠昆虫的抵御力弱, 可能是该菌在野生状态下得以有效侵染昆虫的两个彼此相关的先决条件和内在原因, 是虫和菌长期地相互适应与进化的结果; 而在低海拔地区产孢优势的削弱及各昆虫种相对强的抵抗力, 就成为目前一般人为条件下有效侵染的制约因素。如是, 则实现人工侵染和冬虫夏草人工繁殖, 应在探索促进产孢力的条

件上下功夫

另一方面,本实验中菌株的产孢情况及长速情况在几种培养基上并没有显著的差异,提示我们要改善菌丝生长力和产孢力以达到一个较大的飞跃,可能要跳出常规培养寻求特殊培养条件才行。本实验中 CY-8202 所显示的巨量产孢和良好传代繁殖能力,仍有可能成为虫害生物防治的一个潜在优势菌株

3.2 对于虫草类真菌所产生的抗生素,一直以来研究并不多,主要有虫草素(cordycepin)<sup>[6]</sup>、环孢菌素(cyclosporin)<sup>[7]</sup>、蛇形虫草素(ophiocordin)<sup>[8]</sup>及另外的三两个腺苷类抗菌素<sup>[9]</sup>。其主要抗细菌的是分离自蛹虫草 *Cordyceps militaris*, 成分为 3'-脱氧腺苷的虫草素(六七十年代亦报道过虫草素的抗癌作用)。虫草素以抑制枯草杆菌、鸟结核杆菌和牛型结核杆菌为特点,但不能抑制金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、大肠杆菌、魏氏芽孢杆菌、变形芽孢杆菌、溶血链球菌、粪链球菌或败血巴斯德氏菌等细菌的生长<sup>[6]</sup>。在冬虫夏草<sup>[10,11]</sup>及其培养菌丝<sup>[12]</sup>的醇提物中已分离到腺嘌呤和腺苷,但至今未有得到虫草素的报道<sup>[13]</sup>。本实验菌株除具备对枯草杆菌的抗菌活性外,还对多个革兰氏阳性和阴性的细菌菌株有强力抗性,具有相对广泛的抗菌谱,而且抗菌物为分泌型。初步表明,这株冬虫夏草分离菌除了可能具有产虫草菌素的活性以外,还具有分泌产出其它更广谱抗生素的能力。

关于 CY-8202 菌株的活性广谱抗菌机制,及其抗菌有效成分与虫草素的异同,正在深入研究之中。

参考文献:

- [1] 中药辞海编审委员会. 中药辞海 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1993.
- [2] 王伟, 陈特灿, 李琼英, 等. 中国虫草研究 II. 无性型问题及无性型检索表的建立 [J]. 食用菌学报, 1998, 5 (4): 17-22.
- [3] 王伟, 钟英长, 周世宁, 等. 中国虫草 *Cordyceps sinensis* 的研究 III. 多样性初探 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 1997, 36 (1): 126-128.
- [4] 陈永久, 王文, 杨跃雄, 等. 冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* 的随机扩增多态 DNA 及其遗传分化 [J]. 遗传学报, 1997, 24 (5): 410-416.
- [5] 杨大荣. 滇西北昆虫区系特点 [J]. 动物学研究, 1992, 13 (4): 333-341.
- [6] Cunningham K G, Hutchinson S A, Manson W., et al. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris*. Part I. isolation and characterization [J]. J Chem Soc, 1951, 2299-2300.
- [7] 李兆兰. 中国弯颈霉新种及产环孢菌素的研究 [J]. 真菌学报, 1988, 7 (2): 93-98.
- [8] 李廷宝, 肖志明, 陈华荣, 等. 关于虫草的研究 [J]. 中草药, 1981, 12 (11): 45-48.
- [9] R J 苏哈道尼克著, 谢其明, 王恕蓉译. 核苷类抗菌素 [M]. 北京: 科学出版社, 1982.
- [10] 吕瑞绵, 杨永春, 杨云鹏, 等. 冬虫夏草化学成分的研究 [J]. 药学通报, 1981, 16 (9): 55.
- [11] 徐文豪, 薛智, 马建民. 冬虫夏草的水溶性成分——核苷类化合物的研究 [J]. 中药通报, 1988, 13 (4): 34-36.
- [12] 徐飞. 我国深层培养虫草菌丝体的药用研究 [J]. 中国药理学杂志, 1992, 27 (4): 195-198.
- [13] Shiao M S, Wang Z N, Lin L Jet al. Profiles of nucleosides and nitrogen bases in Chinese medicinal fungus *Cordyceps sinensis* and related species [J]. Botanical Bulletin of Academia Sinica (Taipei), 1994, 35 (4): 261-267.

## 良种银杏幼苗叶质量分析 (II)

杨义芳, 夏野鹰, 王 晖, 陈优生\*  
(江西省药物研究所, 江西 南昌 330029)

摘要: 目的 进行良种银杏幼苗叶质量分析。方法 采用 RP-HPLC-ELSD 法测定良种银杏幼苗叶内酯含量。结果 总内酯含量, 6 月份高于 8 月份, 11 月份含量明显下降; 嫁接苗高于实生苗, 雄性高于雌性。结论 活性成分含量与生长季节、树龄、培育方式、生长环境、立地条件等诸因素有关。由主要活性成分 BB 与 GB 综合评价: 江西良种银杏幼苗叶优于文献报道的银杏叶的质量。

关键词: 良种银杏幼苗叶; 银杏内酯; RP-HPLC-ELSD; 质量分析

中图分类号: R282.6 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2002)01-0068-05

\* 收稿日期: 2000-04-09

作者简介: 杨义芳 (1949-), 男, 江西省兴国县人, 江西省药物研究所研究员, 主要从事新药研究工作, 主持国家级新药研究项目多项, 在省级以上刊物发表论文 30 余篇。Tel 079-8106314

\* 江西中医学院药学系 94 药学实习生