

网络出版时间:2018-06-15 16:08
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180615.1606.034.html>

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2018.12.017

1 株药用纤孔菌的鉴定及其生物活性

金珊珊¹, 刘鑫^{2a}, 侯若琳^{2a}, 俞全明³, 王丹亭^{2b},
胡开辉^{1,2b}, 郑明锋^{2a}, 傅俊生^{1,2b}

(1 福建农林大学(古田)菌业研究院, 福建古田县食用菌研发中心, 福建 古田 352200;
2 福建农林大学 a 食品科学学院, b 生命科学学院, 福建 福州 350002;
3 宁夏回族自治区中卫市沃峰生物有机肥有限公司, 宁夏 中卫 755000)

[摘要] 【目的】对 1 株寄生于枣树的野生粗毛纤孔菌进行鉴定和系统发育分析, 探讨其深层发酵液的抗氧化与抗菌活性, 为进一步开发利用粗毛纤孔菌提供科学依据。【方法】通过形态学特征试验和 ITS rDNA 序列分析, 对野生粗毛纤孔菌进行鉴定; 基于 ITS1-5.8S-ITS2 序列的长度、碱基构成和变异程度, 对粗毛纤孔菌遗传多样性进行分析; 测定野生粗毛纤孔菌深层发酵液提取物对羟基和 DPPH 自由基的清除率, 以及其对肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞杆菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径, 以此分析其抗氧化、抗菌活性; 通过检测经一定温度和紫外照射处理的菌株发酵液提取物的抗氧化、抗菌活性, 分析其抗氧化、抗菌活性的稳定性。【结果】根据菌株形态学特征试验和 ITS rDNA 序列分析, 将野生菌株鉴定为粗毛纤孔菌(*Inonotus hispidus*)。不同地域的粗毛纤孔菌 ITS1-5.8S-ITS2 序列长度在 614~718 bp, GC 含量在 44.4%~51.8%, 序列总变异率达 52.70%, 表明其在自然界中具有丰富的遗传多样性。粗毛纤孔菌深层发酵液提取物具有一定的抗氧化和抗菌活性, 且活性与发酵液提取物质量浓度呈正相关, 当质量浓度为 2 mg/mL 时, 其对羟基自由基的清除率达到 65.96%, 对 DPPH 自由基清除率达 91.91%; 当质量浓度为 10 mg/mL 时, 其对铜绿假单胞杆菌和金黄色葡萄球菌表现出一定的抑制作用, 但对肺炎克雷伯菌和大肠杆菌未表现出抑制作用; 其抗氧化与抗菌活性具有较好的稳定性。【结论】获得了粗毛纤孔菌遗传多样性的基础信息, 其深层发酵液具有一定的抗氧化与抗菌活性。

[关键词] 粗毛纤孔菌; 遗传多样性; 深层发酵液; 生物活性
[中图分类号] S567.3⁺90.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2018)12-0130-10

Identification and biological activity of a medicinal *Inonotus*

JIN Shanshan¹, LIU Xin^{2a}, HOU Ruolin^{2a}, YU Quanming³, WANG Danting^{2b},
HU Kaihui^{1,2b}, ZHENG Mingfeng^{2a}, FU Junsheng^{1,2b}

(1 Institute of Fungi Industry, Fujian Agriculture and Forestry University, Gutian, Fujian 352200, China;
2 a College of Food Science, b College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;
3 The Ningxia Hui Autonomous Region Zhongwei City of Wofeng Biological Fertilizer Company
Limited, Zhongwei, Ningxia 755000, China)

Abstract: 【Objective】A wild *Inonotus hispidus* strain parasitized on Jujube tree was identified and analyzed phylogenetically and the antioxidant and antibacterial activities of its submerged fermentation broth were analyzed to provide basis for its further development and utilization. 【Method】The wild *I. hispidus*

〔收稿日期〕 2017-10-13
〔基金项目〕 国家自然科学基金项目(81503187); 福建省中青年教育科研项目(JA15177); 福建农林大学现代种业工程研究院建设经费支持项目; 福建省重大农技推广服务试点项目(KNJ-153011-4); 福建省食用菌产业技术重大研发平台项目(2014N2001)
〔作者简介〕 金珊珊(1988—), 女, 黑龙江肇东人, 硕士, 主要从事食用菌遗传育种研究。E-mail: 13305027599@163.com
〔通信作者〕 傅俊生(1981—), 男, 福建福州人, 副教授, 博士, 主要从事食药真菌功效物质分析与药效机理研究。
E-mail: fujunsheng81@163.com

was identified by morphological characteristics and ITS rDNA sequences. The length, base composition, variation degree of ITS1-5, 8S-ITS2 sequences were analyzed and compared to investigate the genetic diversity. The antioxidant activity of the submerged fermentation broth was determined by measuring its scavenging ability to hydroxyl radical and DPPH radical. The antibacterial activities against *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were determined by measuring the diameter of inhibition zone. 【Result】 The wild strain parasitized on jujube tree was identified as *I. hispidus*. The length variation range of *I. hispidus* ITS1-5, 8S-ITS2 sequence in different areas was 614—718 bp, the GC content was 44.4%—51.8% and the total variation rate was 52.70%, indicating that *I. hispidus* had abundant genetic diversity in natural world. The submerged fermentation broth of *I. hispidus* had antioxidant and antibacterial activities, and the antioxidant and antibacterial activities were positively correlated with concentration. When the concentration was 2 mg/mL, the hydroxyl radical scavenging rate reached 65.96% and DPPH radical scavenging rate reached 91.91%. When the concentration was 10 mg/mL, it showed inhibitory effect on *P. aeruginosa* and *S. aureus*, while it showed no inhibitory effect on *K. pneumoniae* and *E. coli*. The antioxidant and antibacterial activities had good stability. 【Conclusion】 The basic information of the genetic diversity of the parasitized species was obtained, and its deep fermentation liquid had good antioxidant and antibacterial activities.

Key words: *Inonotus hispidus*; genetic diversity; submerged fermentation broth; biological activity

粗毛纤孔菌 *Inonotus hispidus* (Bull.:Fr.) P. Karst., 属于担子菌门 Basidiomycota、伞菌纲 Agaricomycetes、锈革孔菌目 Hymenochaetales、锈革孔菌科 Hymenochaetaceae、纤孔菌属 *Inonotus*^[1]。粗毛纤孔菌是兼性腐生菌,以寄生为主,寄主主要有水曲柳、榆树、杨树、日本槐和桑树,在东北地区以水曲柳上常见,在西北地区以桑树上常见^[2],其常常被误认为是桑黄。但桑黄及其相近种类往往对寄主树木具有专一性,且子实体为多年生,而粗毛纤孔菌没有这一特性^[3]。粗毛纤孔菌是一种药用真菌,国内外对粗毛纤孔菌的研究主要集中在其子实体的活性等方面,如抗病毒^[4]、抗衰老^[5]、降血脂^[6]、提高免疫力^[7]等生物活性。大型真菌的传统分类主要依据子实体的形态和孢子等特征进行,但有时受环境影响,同一物种的形态可能会表现出较大差异,给分类和鉴定带来了一定的困难;而分子生物学鉴定技术受环境影响较小,鉴定过程更容易,结果也更准确^[8]。目前,用于真菌分类研究的分子生物学技术主要包括 RAPD^[9]、ITS^[10-11] 和 AFLP^[12] 等,其中 ITS 序列具有进化速率快、稳定性好和测序方便的特点,已经应用于多种真菌种属水平的分类鉴定和遗传多样性等研究中^[13-18]。

目前,尚未见关于粗毛纤孔菌遗传多样性及其深层发酵液抗氧化、抗菌活性的研究报道。为此,本试验对 1 株野生粗毛纤孔菌进行了分类鉴定,并基于 ITS 序列对其进行了遗传多样性分析,初步探讨

了其深层发酵液的抗氧化、抗菌活性,以期为更好地开发利用这一珍稀菌种资源提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 粗毛纤孔菌菌株 C1 子实体采于宁夏中卫市的野生枣树树干(菌株 ITS 序列 NC-BI 登录号:MF183947),分离纯化培养的菌丝保存于福建农林大学生命科学学院微生物工程实验室。

1.1.2 主要仪器与试剂 主要仪器包括高压蒸汽灭菌锅(MJ-54A 型,上海施都凯仪器设备有限公司)、超净工作台(SW-CJ-2F 型,苏州净化设备有限公司)、高速冷冻离心机(ST16R 型,美国 Thermo 公司)和 PCR 扩增仪(Mycycler 型,美国 Bio-Rad 公司),主要试剂有真菌 DNA 提取试剂盒(Solarbio 公司)、二苯基苦味酰基苯肼(DPPH)(Sigma 公司),另有乙醇、硫酸亚铁、水杨酸等,均为国产分析纯。

马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB):马铃薯(去皮)200 g、葡萄糖 20 g,沸水煮沸 30 min,3 层纱布过滤,加水定容至 1 L,pH 自然;马铃薯葡萄糖固体培养基(PDA):1 L PDB 中加 18~20 g 琼脂,121 ℃ 高压灭菌 30 min 后制得。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化与形态学鉴定 用蘸有体积分数 75%酒精的脱脂棉球将供试菌株子实体表面擦净,用灭菌的手术刀将其纵向剖开,在切面的中

心部位切取一小块菌组织,用灭菌镊子夹取置于加抗生素的 PDA 平板培养基上,25 ℃ 培养,长出菌丝后再转入到 PDA 试管斜面培养基中保藏。

参照崔宝凯等^[19]和中国真菌志第 29 卷中有关粗毛纤孔菌的鉴定方法对菌株进行形态学鉴定。首先将试管菌株接入平板 PDA 培养基活化,待长满后用直径 0.6 cm 的打孔器制备菌饼,接种至 PDA 平板中央,25 ℃ 培养,每天观察菌落形态、颜色等性状。采用插片法观察菌株 C1 的菌丝形态,具体方法为:在距离菌饼 2 cm 处,将灭菌盖玻片倾斜 45° 插入培养基中,25 ℃ 培养 7 d 后用镊子取出盖玻片,有菌丝面朝上置于载玻片上,显微镜下观察菌丝形态特征;收集子实体中的孢子,置显微镜下观察。

1.2.2 菌株的分子鉴定与系统发育分析 (1) rDNA ITS 测序。将供试菌株接种到常规 PDA 斜面培养基^[20]上,25 ℃ 培养 7 d,得到菌丝备用。挑取少量菌丝,利用真菌 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,以 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 为引物^[21],扩增菌株 C1 的 rDNA ITS 序列。PCR 反应体系为:10 × Taq Buffer 2.5 μL, dNTP (10 mmol/L) 2 μL,模板 DNA 约 50 ng,ITS1 和 ITS4 各 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。PCR 扩增条件为:94 ℃ 预变性 10 min;94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 55 s,72 ℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 终延伸 10 min,4 ℃ 终止反应。将 PCR 产物送至上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

(2) 分子鉴定与系统发育分析。通过 Blastn 功能,将测序后的菌株 C1 rDNA 序列在 GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) 中进行同源比对;选取同源性较高的序列及其他种属真菌 rDNA ITS 序列^[22],用 DNAMAN version 6 和 Clustal X version 1.8 编辑后,采用 MEGA 6.0 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育进化树^[23],用樟芝 (*Antrodia camphorata*) 作为外群进行 1 000 次自展抽值,以检验分子进化树的可靠性^[24],判断菌株 C1 所处的分类学地位,并以 Kimura 2-parameter 模型计算菌株间的遗传距离^[25]。以 Gonzalez 等^[26]公布的 *Inonotus* 属真菌 rDNA ITS 序列为参照,对菌株 C1 与 NCBI 数据库收录的来自全球不同地域的 15 个粗毛纤孔菌 rDNA ITS 序列进行界定,除去 5' 端 18S rDNA 及 3' 端 28S rDNA 序列,保留 ITS1-5.8S-ITS2 序列。以 Clustal X version 1.8 进行序列两两比对及

多序列比对,对对比结果进行人工修正,对位排列结果中若有空位或缺失数据均作删除处理。

1.2.3 粗毛纤孔菌深层发酵液提取物的抗氧化与抗菌活性 (1) 深层发酵液提取物的制备。将试管菌种接到平板培养基上进行活化,活化完后将平板打孔,将菌片接入 PDB 液体培养基,于 25 ℃ 避光发酵培养 45 d。发酵完成后,收集并浓缩发酵液,用乙酸乙酯进行萃取,将萃取液减压蒸馏浓缩成干膏,用于抗氧化及抗菌试验。

(2) 羟基自由基清除率的测定。羟基自由基清除能力测定参照白生文等^[27]的方法,采用水杨酸-硫酸亚铁法测定。在试管中依次加入 9 mmol/L 的水杨酸-乙醇溶液、9 mmol/L 的 FeSO₄ 溶液、不同质量浓度 (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL) 的样品溶液和 8.8 mmol/L 的 H₂O₂ 溶液各 1 mL,最后加蒸馏水补至 15 mL,摇匀,置于 37 ℃ 水浴中反应 15 min,在波长 510 nm 处测定吸光度 A_x,以蒸馏水 1 mL 替代样品溶液测定吸光度 A₀,以蒸馏水 1 mL 替代 H₂O₂ 测定吸光度 A_{x0},根据下式计算清除率。重复 3 次,取平均值。

$$\text{清除率} = \frac{A_0 - (A_x - A_{x0})}{A_0} \times 100\%$$

(3) DPPH 自由基清除率的测定。DPPH 自由基清除能力的测定参照 Saiga 等^[28]的方法。取不同质量浓度 (0.2, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, 2.0 mg/mL) 的样品溶液 2 mL 和 2 × 10⁻⁴ mol/L 的 DPPH 无水乙醇溶液 2 mL,加入试管中摇匀,室温下密闭静置 30 min,于波长 517 nm 处测得吸光度 A_i,再于波长 517 nm 处测 2 mL DPPH + 2 mL 蒸馏水的吸光度 A_c 和 2 mL 样品 + 2 mL 无水乙醇的吸光度 A_j。根据下式计算 DPPH 自由基清除率。重复 3 次,取平均值。

$$\text{清除率} = 1 - \frac{A_i - A_j}{A_c} \times 100\%$$

1.2.4 粗毛纤孔菌深层发酵液提取物的抗菌活性^[29-32] 采用双倍稀释法,将粗毛纤孔菌发酵液提取物浸膏配制成质量浓度分别为 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 mg/mL 的抑菌液,备用;在超净工作台上,用一次性无菌注射器吸取 100 μL 指示菌 (分别为肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌) 悬液 (浓度约 2.3 × 10⁶ CFU/mL),注入培养基中,并用无菌三角涂布棒将其涂布均匀后备用;使用三点接种法用镊子分别将浸有不同质量浓度粗毛纤孔菌抑菌液、2 mg/mL 链霉素水溶液

(阳性对照)和二甲基亚砷水溶液(阴性对照)的滤纸片(直径 8 mm),放在测试菌平板上,各重复 3 次。将以上平板倒置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h,测量抑菌圈直径,取平均值。

1.2.5 粗毛纤孔菌深层发酵液提取物抗氧化和抗菌活性的稳定性^[33] 取 6 份 2 mg/mL 的粗毛纤孔菌发酵液提取物样品溶液,分别置于 0,20,40,60,80,100 ℃ 下处理 30 min,按照 1.2.3 节的方法,测定 DPPH 自由基清除率;同理,以金黄色葡萄球菌为指示菌,按照 1.2.4 节的方法,测抑菌圈直径。取 6 份 2 mg/mL 的粗毛纤孔菌样品溶液,分别用紫外光照射 0,1,2,3,4,5 h,按照 1.2.3 节的方法,测定 DPPH 自由基清除率;取 6 份 20 mg/mL 的粗毛纤孔菌发酵液提取物样品溶液,分别用紫外光照射 0,1,2,3,4,5 h,以金黄色葡萄球菌为指示菌,按照 1.2.4 节的方法,测抑菌圈直径。根据试验结果,判断该菌抗氧化和抗菌活性的稳定性。

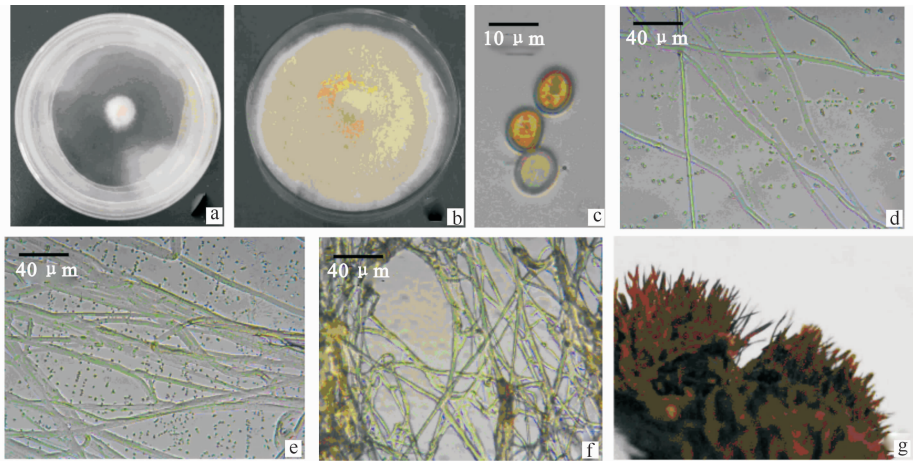
1.2.6 数据处理及分析 试验数据用“平均值±标

准差($\bar{x} \pm s$)”表示,用 SPSS 13.0 统计软件分析处理。两组间的均数比较采用 t 检验法, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 粗毛纤孔菌的形态学鉴定

菌株 C1 的菌落为圆形,初期菌丝白色,呈绒毛状沿着接种块向外辐射状生长(图 1-a),后期菌丝变成黄色,无明显环纹(图 1-b);显微镜下菌丝生长初期无色透明,极少分枝,菌丝有不明显的分隔(图 1-d,e);老熟菌丝细胞液变成淡黄色(图 1-f);菌丝在 Melzer 和棉蓝试剂中均无变色反应。子实体表面有大量褐色粗毛(图 1-g);担孢子椭圆形,金黄褐色,明显厚壁,在 Melzer 试剂中无变色反应,大小为 $(8.5 \sim 10) \mu\text{m} \times (6.3 \sim 8.6) \mu\text{m}$,平均长 $9.25 \mu\text{m}$,平均宽 $7.45 \mu\text{m}$ (图 1-c)。以上特征与中国真菌志第 29 卷中对粗毛纤孔菌特征的描述相吻合,初步判断菌株 C1 为粗毛纤孔菌(*Inonotus hispidus*)。



a. 生长初期菌落;b. 生长后期菌落;c. 担孢子;d. 初始阶段菌丝;e. 旺盛期菌丝;f. 老熟菌丝;g. 褐色粗毛
a. Colony at early stage of growth;b. Colony at later stage of growth;c. Spore bearing;d. Initial stage hyphae;
e. Vigorous hypha;f. Mature mycelium;g. Brown shag

图 1 菌株 C1 的形态学鉴定

Fig. 1 Biological identification of strain C1

2.2 粗毛纤孔菌的分子鉴定与系统发育分析

通过 PCR 扩增和测序发现,菌株 C1 的 rDNA ITS 序列与 GenBank 中粗毛纤孔菌 KP446596 的 rDNA ITS 序列最为接近(相似度为 98%),结合形态学鉴定结果,可确定该菌株为粗毛纤孔菌(*I. hispidus*)。选取 9 株同源性较高的纤孔菌属 rDNA ITS 序列用 Neighbor-Joining 法构建系统发育进化树,以樟芝(*A. camphorata*)为外群,结果见图 2,菌株间的遗传距离结果见表 1。

由图 2 和表 1 可见,粗毛纤孔菌与安德松纤孔菌(*I. andersonii*)亲缘关系较近,遗传距离为 0.061;剖氏纤孔菌(*I. patouillardii*)与里克纤孔菌(*I. rickii*)聚为一族,遗传距离为 0.004,两者亲缘关系非常近;拟栎核纤孔(*I. subdryophila*)与桤柳核纤孔菌(*I. tamaricis*)聚为一族,遗传距离为 0.072;薄壳纤孔菌(*I. cuticularis*)与桦纤孔菌(*I. obliquus*)未聚为一族,其遗传距离为 0.123,亲缘关系较远。

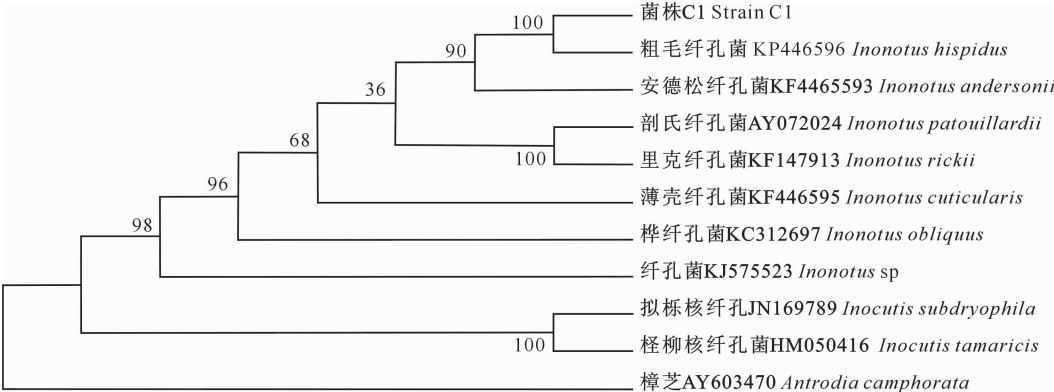


图 2 10 株纤孔菌 rDNA ITS 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of 10 *Inonotus* strains based on rDNA ITS sequence

表 1 10 株纤孔菌菌株间的遗传距离

Table 1 Genetic distances between 10 *Inonotus* strains

菌株 Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2	0.045									
3	0.210	0.209								
4	0.228	0.222	0.072							
5	0.061	0.057	0.212	0.220						
6	0.091	0.072	0.212	0.228	0.061					
7	0.170	0.168	0.233	0.229	0.149	0.174				
8	0.163	0.158	0.253	0.272	0.155	0.123	0.202			
9	0.097	0.084	0.213	0.234	0.059	0.063	0.164	0.146		
10	0.097	0.084	0.218	0.234	0.059	0.063	0.164	0.146	0.004	
11	0.307	0.292	0.269	0.294	0.290	0.290	0.300	0.329	0.276	0.278

注:1. 菌株 C1;2. 粗毛纤孔菌;3. 拟栎核纤孔;4. 桤柳核纤孔菌;5. 安德松纤孔菌;6. 薄壳纤孔菌;7. 纤孔菌;8. 桦纤孔菌;9. 剖氏纤孔菌;10. 里克纤孔菌;11. 樟芝。

Note:1. Strain C1;2. *Inonotus hispidus*;3. *Inocutis subdryophila*;4. *Inocutis tamaricis*;5. *Inonotus andersonii*;6. *Inonotus cuticularis*;7. *Inonotus* sp.;8. *Inonotus obliquus*;9. *Inonotus patouillardii*;10. *Inonotus rickii*;11. *Antrodia camphorata*.

基于 ITS1-5.8S-ITS2 序列对菌株 C1 与 NCBI 纤孔菌进行遗传多样性分析,结果见表 2。

数据库中收录的来自全球不同地域的 15 株粗毛纤

表 2 粗毛纤孔菌 rDNA ITS 序列长度及 GC 含量变异分析

Table 2 rDNA ITS sequences and GC content of *Inonotus hispidus*

菌株 ITS 登录号 Strain ITS login number	ITS1		5.8S		ITS2		总 ITS Total ITS	
	长度/bp Length	GC 含量/% GC content	长度/bp Length	GC 含量/% GC content	长度/bp Length	GC 含量/% GC content	长度/bp Length	GC 含量/% GC content
MF183947(C1)	272	43.4	158	47.5	288	47.9	718	46.1
EU282482	266	43.6	158	47.5	291	45.0	715	45.0
EU918126	262	43.1	158	47.5	291	44.3	711	44.6
EU918125	263	43.7	158	47.5	288	45.1	709	45.1
EU918124	263	45.2	154	52.6	293	50.5	710	49.0
EU918123	266	43.6	158	47.5	291	45.0	715	45.0
EU918122	266	44.0	158	47.5	290	45.2	714	45.2
KY654742	281	47.3	158	46.8	263	47.5	702	47.3
KF446596	266	43.6	158	47.5	290	44.5	714	44.8
AB811856	264	42.4	158	47.5	280	46.1	702	45.0
JX501315	238	52.1	158	46.8	218	55.0	614	51.8
FR686562	263	43.7	158	47.5	291	44.3	712	44.8
AY558602	262	43.1	158	47.5	291	44.3	711	44.6
GU068592	263	43.0	158	47.5	284	44.0	705	44.4
AY624993	202	43.6	158	47.5	290	45.5	650	45.4
AM269784	280	44.3	158	47.5	191	42.4	629	44.5

表 2 显示,不同地域的粗毛纤孔菌 ITS 总序列长度变异较大,为 614~718 bp,相差 104 bp;ITS1 序列长度为 202~281 bp,5.8S 序列长度多为 158 bp,ITS2 序列长度为 191~293 bp。对 ITS1-5.8S-ITS2 序列的碱基构成进行分析发现,ITS1 与 ITS2 区域 GC 含量明显相异,ITS1-5.8S-ITS2 的 GC 含量为 44.4%~51.8%,ITS2 比 ITS1 的 GC 含量变化稍大,分别为 42.4%~55.0%和 42.4%~52.1%,5.8S 区的 GC 含量为 46.8%~52.6%,这与序列长度变异结果相一致。

表 3 粗毛纤孔菌菌株 ITS 序列的变异情况
Table 3 ITS sequences variation of *Inonotus hispidus*

区域 Regions	位点总数/bp Total number of sites compared	可变位点/bp Number of variable sites	信息位点/bp Number of parsim-informative sites	插入缺失/bp Insertions or deletions	变异率/% Rate of sequence variation
ITS1	306	164	36	142	53.60
5.8S	165	59	7	11	35.80
ITS2	317	192	48	160	60.53
ITS(ITS1+5.8S+ITS2)	788	415	91	313	52.70

在上述分析的基础上,进一步探究粗毛纤孔菌遗传差异与地域的相关性,将上述 16 株粗毛纤孔菌序列进行聚类分析,结果见图 3 和表 4。图 3 和表 4 数据表明,不同地域的粗毛纤孔菌之间存在一定的遗传分化,遗传距离在 0~0.778;在遗传距离 0.2 处可将其划分为 A 和 B 两个类群,类群 A 在遗传距

为进一步探究粗毛纤孔菌 ITS1-5.8S-ITS2 的序列变异程度,使用 MEGA 6.0 将表 2 中 16 株粗毛纤孔菌的 ITS1-5.8S-ITS2 序列对位排列,共测得 788 个碱基位点,其可变位点、信息位点和序列变异率见表 3。从表 3 可知,ITS1-5.8S-ITS2 总变异率为 52.70%,其中 ITS2 较 ITS1 变异率高,达到了 60.53%,5.8S 序列比较保守,其变异率为 35.80%,这与基于序列的长度变异和碱基构成分析的结果一致。综上可知,粗毛纤孔菌在自然界中具有丰富的遗传多样性。

离 0.1 处又可划分为 2 个亚群,亚群 1 包含菌株 C1、EU282482、EU918126、EU918125、EU918124、EU918123、EU918122、KF446596、AB811856、FR686562、AY558602、GU068592、AY624993 和 AM269784 菌株,亚群 2 仅有 KY654742 菌株,类群 B 仅有 JX501315 菌株。

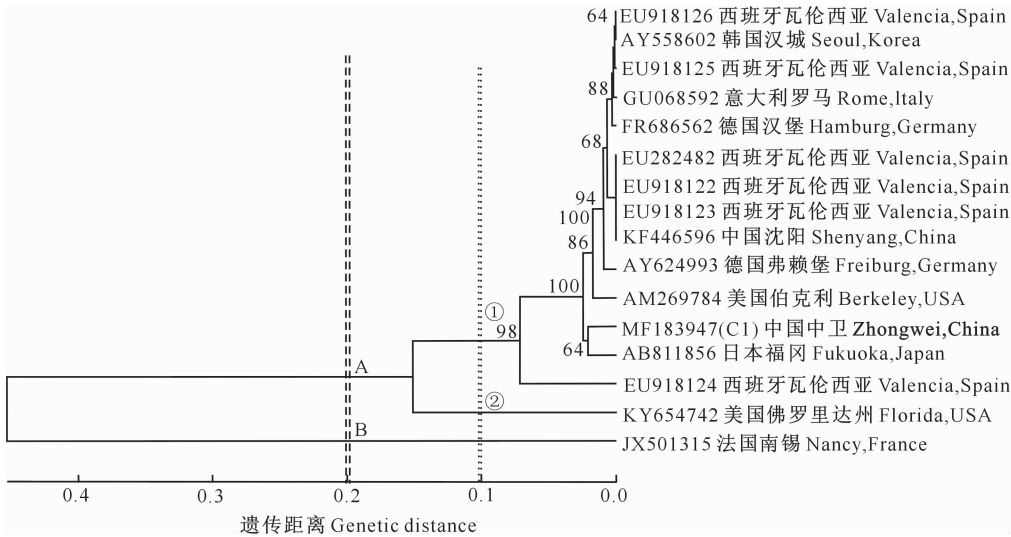


图 3 基于 16 株粗毛纤孔菌 rDNA ITS 序列的聚类分析结果
Fig. 3 Cluster analysis of 16 *Inonotus hispidus* rDNA ITS sequences

由图 3 和表 4 可知,来自韩国的 AY558602 粗毛纤孔菌和来自西班牙的 EU918126 粗毛纤孔菌遗传距离为 0.000;来自美国的 2 个粗毛纤孔菌菌株 AM269784 和 KY654742 分别属于类群 A 的 2 个亚群,遗传距离为 0.221;来自西班牙的 6 株粗毛纤孔

菌属于类群 A 的亚群 1,聚类较集中,遗传距离为 0.000~0.126,但来自德国和中国的 2 个菌株也都属于亚群 1。由此可见,全球不同地区粗毛纤孔菌的遗传差异与地域性无明显的相关性,区域性特征不明显。

表 4 16 株粗毛纤孔菌菌株间的遗传距离
Table 4 Genetic distances between 16 *Inonotus hispidus* strains

菌株 Strain	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
2	0.043														
3	0.466	0.013													
4	0.048	0.011	0.002												
5	0.162	0.126	0.118	0.116											
6	0.043	0.000	0.013	0.011	0.126										
7	0.043	0.000	0.013	0.011	0.126	0.000									
8	0.284	0.254	0.236	0.239	0.277	0.254	0.254								
9	0.043	0.000	0.013	0.011	0.126	0.000	0.000	0.254							
10	0.041	0.046	0.048	0.046	0.162	0.046	0.046	0.298	0.046						
11	0.537	0.532	0.537	0.532	0.633	0.532	0.532	0.778	0.532	0.532					
12	0.050	0.013	0.004	0.002	0.118	0.013	0.013	0.242	0.013	0.048	0.528				
13	0.046	0.013	0.000	0.002	0.118	0.013	0.013	0.236	0.013	0.048	0.537	0.004			
14	0.048	0.015	0.002	0.004	0.121	0.015	0.015	0.239	0.015	0.046	0.541	0.006	0.002		
15	0.048	0.017	0.017	0.019	0.131	0.017	0.017	0.251	0.017	0.055	0.554	0.021	0.017	0.019	
16	0.057	0.039	0.026	0.028	0.144	0.039	0.039	0.221	0.039	0.062	0.537	0.030	0.026	0.028	0.037

注 (Note): 1. MF183947 (C1); 2. EU282482; 3. EU918126; 4. EU918125; 5. EU918124; 6. EU918123; 7. EU918122; 8. KY654742; 9. KF446596; 10. AB811856; 11. JX501315; 12. FR686562; 13. AY558602; 14. GU068592; 15. AY624993; 16. AM269784。

2.3 粗毛纤孔菌深层发酵液提取物的抗氧化与抗菌活性

粗毛纤孔菌深层发酵液提取物的抗氧化活性测定结果如图 4 所示,在所选质量浓度范围内,粗毛纤孔菌深层发酵液提取物对羟基自由基和 DPPH 自由基均有一定的清除能力,且清除自由基的能力与质量浓度呈正相关。当深层发酵液提取物质量浓度为 2 mg/mL 时,羟基自由基清除率达 65.96%,DP-PH 自由基清除率达到 91.91%。

从表 5 可知,粗毛纤孔菌深层发酵液提取物对铜绿假单胞杆菌和金黄色葡萄球菌具有一定的抑制作用,且抑菌圈直径大小与质量浓度呈正相关性,但对肺炎克雷伯菌和大肠杆菌未表现出抑制作用。

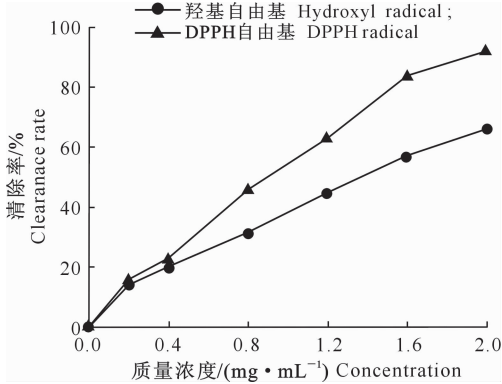


图 4 粗毛纤孔菌深层发酵液提取物对 2 种自由基的清除活性

Fig. 4 Scavenging activities of extracts from *Inonotus hispidus* submerged fermentation broth on two free radicals

表 5 粗毛纤孔菌深层发酵液提取物的抑菌活性

Table 5 Antibacterial activities of extracts from fermentation broth of *Inonotus hispidus*

质量浓度/(mg · mL ⁻¹) Concentration	抑菌圈直径/cm Antibacterial circle diameter			
	肺炎克雷伯菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	铜绿假单胞杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
阳性对照 Positive control	2.51±0.03	1.26±0.02	3.89±0.09	3.16±0.02
阴性对照 Negative control	—	—	—	—
0.625	—	—	—	—
1.25	—	—	—	0.85±0.02
2.5	—	—	—	0.88±0.04
5	—	—	—	0.94±0.03
10	—	0.82±0.02	—	0.97±0.02
20	—	1.00±0.02	—	1.13±0.02

注:“—”表示无抑菌作用。
Note:“—” means no bacteriostatic action.

粗毛纤孔菌深层发酵液提取物的抗氧化与抗菌活性稳定性试验结果(图 5 和图 6)显示,经过不同

温度和一定时长紫外光照处理后,粗毛纤孔菌发酵液提取物的抗氧化和抗菌活性未呈现出较大变化,

与原有的活性基本相当,表明粗毛纤孔菌发酵液提取物的抗氧化与抗菌活性具有一定的稳定性。

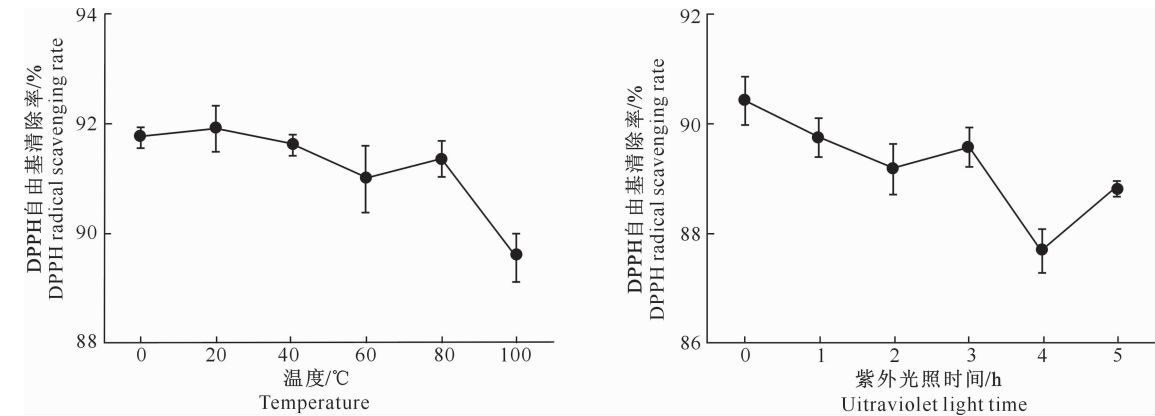


图 5 温度和紫外光照时间对粗毛纤孔菌发酵液提取物抗氧化活性的影响
Fig. 5 Effect of temperature and UV irradiation time on antioxidant activity of extracts from fermentation broth of *Inonotus hispidus*

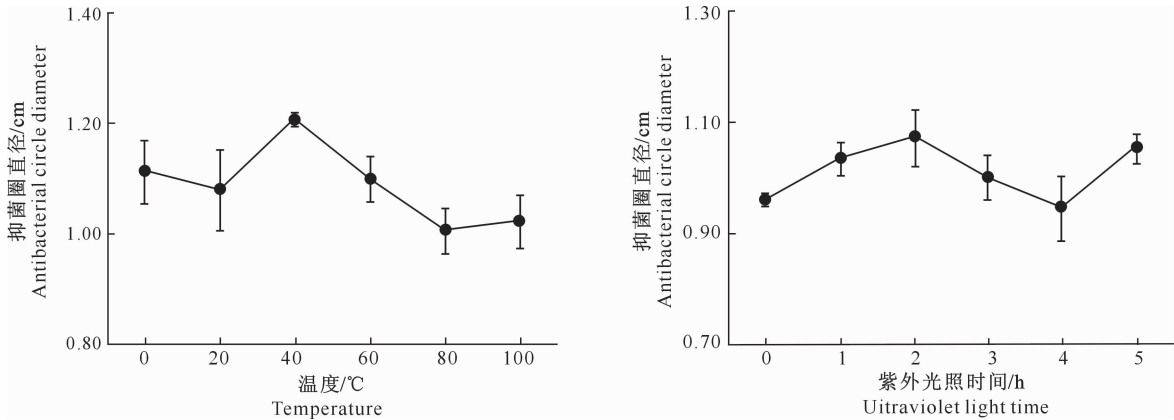


图 6 温度和紫外光照时间对粗毛纤孔菌发酵液提取物抗菌活性的影响
Fig. 6 Effect of temperature and UV irradiation time on antibacterial activity of extracts from fermentation broth of *Inonotus hispidus*

3 讨 论

长期以来,主要依据子实体形态特征对真菌进行鉴定,但大型真菌子实体形态易受生长环境和生长时期等客观因素的影响,且形态性状的判断也易受主观因素的影响,具有一定的局限性。近年来,AFLP、RAPD、ITS 序列分析等分子手段在真菌及植物的鉴定中得到了广泛应用,但是,AFLP 对技术要求较高,且在一些物种的鉴定中灵敏性不够,RAPD 的重复性和可靠性都较差,而 ITS rDNA 区域进化速率较快,表现出广泛的序列多态性,对大型真菌的鉴定有更高的准确度和灵敏度,适用于不同分类水平的物种鉴定及系统发育研究,因此在遗传多样性研究、遗传分化、物种鉴定等方面得到了广泛应用^[34-35]。本试验结果表明,ITS 序列是可用来鉴

定粗毛纤孔菌及研究其遗传变异的有效方法。菌株 C1 与 KP446596 粗毛纤孔菌(*Inonotus hispidus*)的 rDNA ITS 序列最为接近(相似度为 98%),结合形态学鉴定结果,确定菌株 C1 为粗毛纤孔菌(*Inonotus hispidus*);基于 ITS 序列构建的系统发育进化树表明,粗毛纤孔菌与安德松纤孔菌(*Inonotus andersonii*)亲缘关系较近,遗传距离为 0.061。遗传多样性是生物多样性的核心,可反映物种的遗传背景和潜在利用价值。遗传多样性降低会导致物种适应能力降低,最终导致物种退化;丰富的遗传多样性意味着较高的适应生存能力和进化潜能,所以针对遗传多样性的研究对物种保护具有重要的理论意义和实际价值^[36-38],本试验基于 ITS1-5.8S-ITS2 序列对菌株 C1 与 NCBI 数据库收录的来自全球不同地域的 15 株粗毛纤孔菌进行遗传多样性分

析,研究表明,不同地域的粗毛纤孔菌 ITS1-5.8S-ITS2 序列长度、碱基构成和变异程度差异较大,序列长度在 614~718 bp,GC 碱基含量在 44.4%~51.8%,序列可变位点 415 bp,信息位点 91 bp,插入缺失 313 bp,变异率达 52.70%,可知粗毛纤孔菌在自然界中具有丰富的遗传多样性;不同地域的粗毛纤孔菌之间存在一定的遗传分化,但菌株间的遗传多样性与地域分布关系并不明显。本试验结果还表明,粗毛纤孔菌深层发酵液具有一定的抗氧化和抗菌活性,且活性比较稳定,这为充分利用粗毛纤孔菌提供了新的思路。

[参考文献]

[1] 戴玉成,杨祝良. 中国药用真菌名录及部分名称的修订 [J]. 菌物学报,2008,27(6):801-824.
Dai Y C, Yang Z L. A revised checklist of medicinal fungi in China [J]. Mycosystema, 2008, 27(6): 801-824.

[2] 王 婷,包海鹰,图力古尔,等. 寄生于蒙古黄榆上的粗毛纤孔菌生物学特性及驯化栽培 [J]. 菌物学报,2016,35(6):694-704.
Wang T, Bao H Y, Bao Tolgor, et al. Biological characteristics and cultivation of *Inonotus hispidus* parasitizing on *Ulmus macrocarpa* var. *Mongolica* [J]. Mycosystema, 2016, 35(6): 694-704.

[3] 吴声华,黄冠中,陈愉萍,等. 桑黄的分类及开发前景 [J]. 菌物研究,2016,14(4):187-200,185.
Wu S H, Huang G Z, Chen Y P, et al. Taxonomy and development prospects of *Sanghuang* (*Sanghuangporus sanghuang*) [J]. Journal of Fungal Research, 2016, 14(4): 187-200, 185.

[4] Awadh Ali N A, Mothana R A A, Lesnau A, et al. Antiviral activity of *Inonotus hispidus* [J]. Fitoterapia, 2003, 74(5): 483-485.

[5] Zan L F, Qin J C, Zhang Y M, et al. Antioxidant hispidin derivatives from medicinal mushroom *Inonotus hispidus* [J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 2011, 6(59): 770-772.

[6] Benarous K, Bombarda I, Iriepa I, et al. Harmaline and hispidin from *Peganum harmala* and *Inonotus hispidus* with binding affinity to *Candida rugosa* lipase: *in silico* and *in vitro* studies [J]. Bioorganic Chemistry, 2015, 62: 1-7.

[7] Gründemann C, Arnhold M, Meier S, et al. Influence of *Inonotus hispidus* on function of human immune cells [J]. European Journal of Integrative Medicine, 2016, 8: 54.

[8] 贺字典,高增贵,高玉峰,等. 蔬菜保护地木霉菌 rDNA-ITS 序列和 UP-PCR 遗传多样性分析 [J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 459-465.
He Z D, Gao Z G, Gao Y F, et al. ITS sequence of *Trichoderma* species in soilplanted vegetables in the greenhouse and UP-PCR analysis on genetic diversity [J]. Acta Phytopylacica Sinica, 2010, 37(5): 459-465.

[9] 李海波,吴学谦,魏海龙,等. 森林保护学几种森林大型真菌纯

培养菌种的 RAPD 及 ITS 分子标记鉴定 [J]. 林业科学, 2007, 43(12): 52-53.

Li H B, Wu X Q, Wei H L, et al. Identification of pure culture for macrofungi with RAPD and ITS molecular markers [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2007, 43(12): 52-53.

[10] 奚彦霞,彭 雄,余佳敏,等. 中国烟草根黑腐病菌根串珠霉菌群及 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 菌物学报, 2012, 31(4): 531-539.
Dou Y X, Peng X, Yu J M, et al. Grouping and rDNA-ITS sequence analysis of *Thielaviopsis basicola* on tobacco in China [J]. Mycosystema, 2012, 31(4): 531-539.

[11] Zhou L W, Dai Y C. Phylogeny and taxonomy of *Phylloporia* (Hymenochaetales): new species and a worldwide key to the genus [J]. Mycologia, 1900, 104(1): 211-222.

[12] 张福光,杨志辉,朱杰华,等. 河北省马铃薯早疫病菌群体遗传结构的研究 [J]. 菌物学报, 2012, 31(1): 40-49.
Zhang F G, Yang Z H, Zhu J H, et al. Population structure of *Alternaria solani* on potato in Hebei province [J]. Mycosystema, 2012, 31(1): 40-49.

[13] Bruns T D, And T J W, Taylor J W. Fungal molecular systematics [J]. Annual Review of Ecology & Systematics, 1991, 22(22): 525-564.

[14] Alaei H, Backer M D, Nuytinck J, et al. Phylogenetic relationships of *Puccinia horiana* and other rust pathogens of *Chrysanthemum morifolium* based on rDNA ITS sequence analysis [J]. Mycological Research, 2009, 113(6/7): 668-683.

[15] Li Z H, Feng X M, Lu S Q, et al. Molecular phylogeny of pneumocystis based on 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers of rRNA gene sequences [J]. Science in China (Life Sciences), 2008, 51(5): 445-452.

[16] Geml J, Laursen G A, Timling I, et al. Molecular phylogenetic biodiversity assessment of arctic and boreal ectomycorrhizal *Lactarius* Pers. (Russulales; Basidiomycota) in Alaska, based on soil and sporocarp DNA [J]. Molecular Ecology, 2009, 18(10): 2213-2227.

[17] Tedersoo L, Suvi T, Jairus T, et al. Revisiting ectomycorrhizal fungi of the genus *alnus*: differential host specificity, diversity and determinants of the fungal community [J]. New Phytologist, 2009, 182(3): 727-735.

[18] 司二静,杨淑莲,李葆春,等. 甘肃省大麦条纹病病原菌致病力分化、rDNA-ITS 及遗传多样性分析 [J]. 植物保护学报, 2017, 44(1): 84-92.
Si E J, Yang S L, Li B C, et al. Pathogenic analysis, rDNA-ITS and genetic diversity of *Pyrenophora garminae* in Gansu province [J]. Acta Phytopylacica Sinica, 2017, 44(1): 84-92.

[19] 崔宝凯,戴玉成,杨 宏. 药用真菌粗毛纤孔菌概述 [J]. 中国食用菌, 2009, 28(4): 6-7.
Cui B K, Dai Y C, Yang H. Notes on the medicinal fungus of *Inonotus hispidus* [J]. Edible Fungi of China, 2009, 28(4): 6-7.

[20] 林戎斌,张 慧,陈济琛,等. 姬松茸种质资源多样性 SRAP 分析 [J]. 热带作物学报, 2012, 33(3): 472-474.

- Lin R B, Zhang H, Chen J C, et al. SRAP analysis of *Agaricus blazei* murill cultivars [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2012, 33(3): 472-474.
- [21] Tao G, Lui K D. Whole rDNA analysis reveals novel and endophytic fungi in *Bletilla ochracea* (Orchidaceae) [J]. Fungal Diversity, 2008, 33(12): 101-122.
- [22] 董世豪, 巩 婷, 朱 平. 相似蜂海绵相关真菌杂色曲霉 F62 活性代谢产物研究 [J]. 菌物学报, 2011, 30(4): 636-643.
- Dong S H, Gong T, Zhu P. The bioactive metabolites of *Aspergillus versicolor* F62 isolated from *Haliclona simulans* [J]. Mycosystema, 2011, 30(4): 636-643.
- [23] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [24] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [25] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [26] Gonzalez V, Sanchez Torres P H R, Tuset J J. *Inonotus hispidus* fruiting bodies on grapevines with esca symptoms in mediterranean areas of Spain [J]. Journal of Plant Pathology, 2009, 91(2): 465-468.
- [27] 白生文, 汤 超, 田 京, 等. 沙棘果渣总黄酮提取工艺及抗氧化活性分析 [J]. 食品科学, 2015, 36(10): 59-64.
- Bai S W, Tang C, Tian J, et al. Extraction and antioxidant activity of total flavonoids from sea buckthorn pomace [J]. Food Science, 2015, 36(10): 59-64.
- [28] Saiga A, Tanabe S, Nishimura T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(12): 3661-3667.
- [29] 孟庆龙, 潘景芝, 陈 丽, 等. 桑黄发酵产物的抑菌作用 [J]. 食品科学, 2011, 32(3): 56-59.
- Meng Q L, Pan J Z, Chen L, et al. Antibacterial activity evaluation of fermentation supernatant and mycelia of *Phellinus igniarius* [J]. Food Science, 2011, 32(3): 56-59.
- [30] 马利华, 秦卫东, 陈学红, 等. 牛蒡提取物抑菌活性的研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(21): 24-27.
- Ma L H, Qin W D, Chen X H, et al. Antimicrobial activity of various solvent extracts from burdock (*Arctium lappa*) roots and peel [J]. Food Science, 2009, 30(21): 24-27.
- [31] 吐尔逊娜依·迪力夏提, 穆拉丁·库热西, 阿不都拉·阿巴斯. 菊苣茎乙醇提取物抑菌活性研究 [J]. 食品科学, 2009, 30(11): 80-82.
- Tursunay Dilxat, Muradil Kurax, Abdulla Abbas. Antimicrobial activities of ethanol extract from *Cichorium intybus* L stems [J]. Food Science, 2009, 30(11): 80-82.
- [32] 郑 艳, 戴婧婧, 管玉鑫, 等. 凤丹内生菌的分离鉴定及抑菌活性研究 [J]. 中国中药杂志, 2016, 41(1): 45-50.
- Zheng Y, Dai J J, Guan Y X, et al. Isolation, identification and inhibition activity of endophytes in Fengdan [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2016, 41(1): 45-50.
- [33] 侯美珍, 韦红群, 潘英明. 紫草不同溶剂提取物抑菌活性研究 [J]. 食品工业科技, 2006(11): 52-54.
- Hou M Z, Wei H Q, Pan Y M. Study on the antimicrobial activity of the extracts from different solvents puccoon [J]. Science and Technology of Food Industry, 2006(11): 52-54.
- [34] 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407-416.
- Wang J B, Zhang W J, Chen J K. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms [J]. Journal of Systematics and Evolution, 1999, 37(4): 407-416.
- [35] Agarwal M, Shrivastava N, Padh H. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences [J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(4): 617-631.
- [36] 王峥嵘, 葛学军. 不仅仅是遗传多样性: 植物保护遗传学进展 [J]. 生物多样性, 2009, 17(4): 330-339.
- Wang Z F, Ge X J. Not only genetic diversity: advances in plant conservation genetics [J]. Biodiversity Science, 2009, 17(4): 330-339.
- [37] 杜 萍. 中国野生毛木耳遗传多样性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2011.
- Du P. Genetic diversity of wild *Auricularia ploytricha* in China [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2011.
- [38] 陈奕欣, 陈小麟, 吕良炬, 等. 家鸭资源利用及优良品种培育 [J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(2): 642-646.
- Chen Y X, Chen X L, Lü L J, et al. Research for domestic duck resources and the strain breeding [J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2001, 40(2): 642-646.