

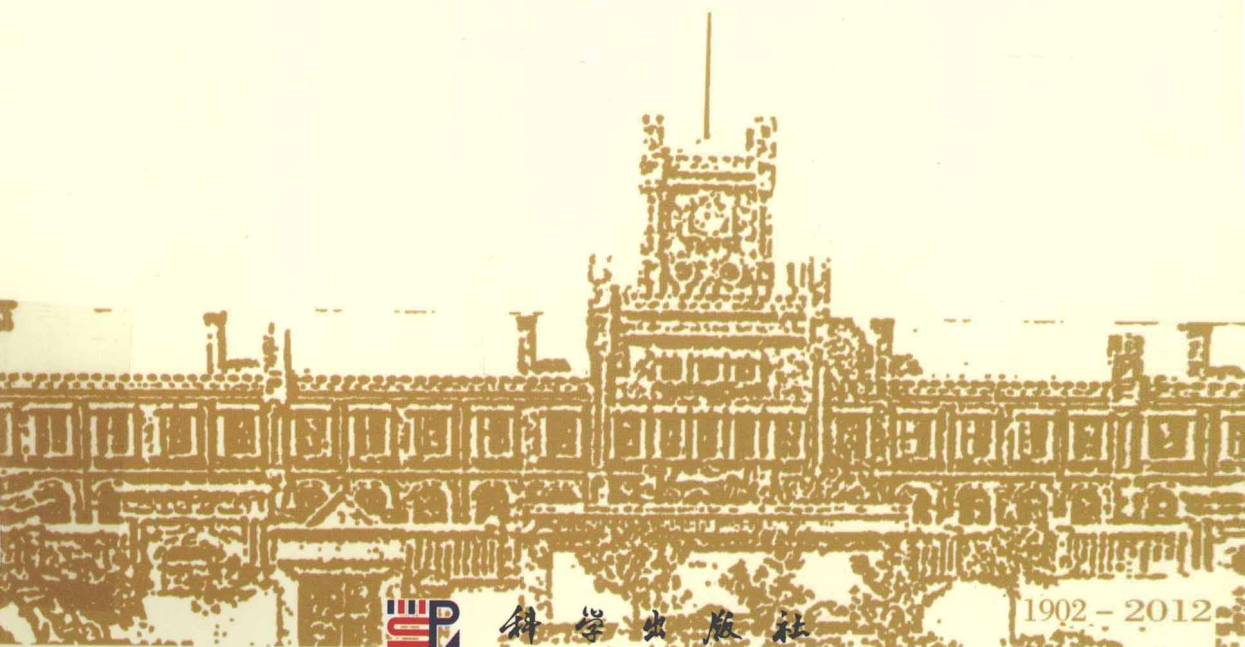


山西大学建校 110 周年学术文库

冬虫夏草菌的生物学研究

Biology of the Chinese Caterpillar Fungus
Ophiocordyceps sinensis

张永杰 著



山西大学建校 110 周年学术文库

冬虫夏草菌的生物学研究

Biology of the Chinese Caterpillar Fungus *Ophiocordyceps sinensis*

张永杰 著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

冬虫夏草是我国的传统名贵中药,是由冬虫夏草菌侵染青藏高原高山草甸土中的蝙蝠蛾幼虫而形成的菌虫复合体。冬虫夏草菌的资源分布十分有限,价格昂贵,尚未实现人工栽培。开展冬虫夏草菌生物学的研究,对保护冬虫夏草野生资源、促进人工栽培早日实现,以及对冬虫夏草菌进行深度开发等具有重要意义。本书是我国第一部关于冬虫夏草菌生物学的研究专著,汇集了作者近期在冬虫夏草菌分子生物学、群体遗传学及冬虫夏草真菌群落等方面的研究成果,代表了我国冬虫夏草研究的当代水平。本书主要包括以下内容:冬虫夏草概况;冬虫夏草菌株的分离和培养;冬虫夏草菌丝氨酸蛋白酶基因的克隆、表达及功能分析;冬虫夏草菌交配型基因的克隆与分析;冬虫夏草菌的遗传分化;冬虫夏草真菌群落的研究。

本书多学科知识交叉,知识层次由浅入深,图文并茂,学术性、理论性与实用性并举,适用范围广,可读性强,是反映冬虫夏草菌生物学研究最新水平的一部著作。本书适合综合性大学、农业院校、医药院校等有关微生物学专业、植物保护专业、中药学专业的大学生和研究生学习,也可供从事菌物教学和研究的老师及科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

冬虫夏草菌的生物学研究 / 张永杰著. —北京:科学出版社, 2012
(山西大学建校 110 周年学术文库)

ISBN 978-7-03-034072-6

I. ①冬… II. ①张… III. ①冬虫夏草菌-生物学-研究 IV. ①Q949.327.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 070945 号

责任编辑:马 俊 付 聪 / 责任校对:朱光兰

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:李恒东 耕者设计工作室

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码 100717

<http://www.sciencep.com>

装 订 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

2012 年 4 月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2012 年 4 月第一次印刷 印张: 8 插页: 4

字数: 200 000

定价: 48.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

总 序

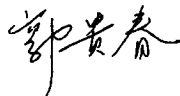
2012年5月8日，山西大学将迎来110年校庆。为了隆重纪念母校110年华诞，系统展现近年来山西大学创造的优秀学术成果，我们决定出版这套《山西大学建校110周年学术文库》。

山西大学诞生于“三千年未有之变局”的晚清时代，在“西学东渐，革故鼎新”中应运而生，开创了近代山西乃至中国高等教育的先河。百年沧桑，历史巨变，山西大学始终与时代同呼吸，与祖国共命运，进行了可歌可泣的学术实践，创造了令人瞩目的办学业绩。百年校庆以来，学校顺应高等教育发展潮流，以科学的发展理念引领改革创新，实现了新的跨越和腾飞，逐步成长为一所学科门类齐全、科研实力雄厚的具有地方示范作用的研究型大学，谱写了兴学育人的崭新篇章，赢得社会各界的广泛赞誉。

大学因学术而兴，因文化而繁荣。山西大学素有“中西会通”的文化传统，始终流淌着“求真至善”的学术血脉。不论是草创之初的中西两斋，还是新时期的多学科并行交融，无不展现着山大人特有的文化风格和学术气派。今天，我们出版这套丛书，正是传承山大百年文脉，弘扬不朽学术精神的身体力行之举。

《山西大学建校110周年学术文库》的编撰由科技处、社科处组织，将我校近10年来的优秀科研成果辑以成书，予以出版。我们相信，《山西大学建校110周年学术文库》对于继承与发扬山西大学学术精神，对于深化相关学科领域的研究，对于促进山西高校的学术繁荣，必将起到积极的推动作用。

谨以此丛书献给历经岁月沧桑，培育桃李芬芳的山大母校，祝愿母校在新的征程中继往开来，永续鸿猷。



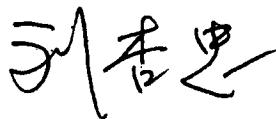
二〇一一年十一月十日

序 言

意大利白块菌被认为是世界上最贵的真菌，也被称为真菌之王，平均每磅（1磅 $\approx$ 0.45kg）2500美元。一位香港人曾经用160787美元购买了一个1.51kg的白块菌。然而冬虫夏草的价格堪比黄金，上等冬虫夏草每千克可卖到70万元。由于主要分布于我国，具有重要的医药、经济及学术价值，因此，冬虫夏草菌最近被称为中国的“国菌”。尽管近年来对冬虫夏草的研究成为了一个热点，但是有关冬虫夏草的一些基础的生物学问题，如冬虫夏草菌的交配型及有性生殖、侵染循环、人工栽培相关的关键技术环节等，目前还没有解决。

张永杰博士从攻读博士学位时就开始从事冬虫夏草的研究工作，积累了丰富的研究材料和经验。这些年，他先后在青藏高原70多个县（自治县）采集了逾千号冬虫夏草样品，分离了300多株冬虫夏草菌中国被毛孢菌株；围绕制约冬虫夏草人工栽培的瓶颈问题，研究了冬虫夏草菌的侵染相关因子和有性生殖；通过冬虫夏草菌的遗传多样性研究，提出冬虫夏草菌起源及传播的新观点；使用培养方法和非培养方法对天然冬虫夏草的真菌群落结构进行了深入研究，揭示了天然冬虫夏草群落中丰富的真菌物种多样性，为开发利用冬虫夏草群落中的真菌资源奠定了基础。

目前，市场上有关冬虫夏草的书籍虽然很多，但大都是科普或综述性质的，关于冬虫夏草研究的学术著作还很少见。今张博士整理其全部资料，写作成书，并付梓出版，该书将对促进冬虫夏草知识的传播和研究的深入，起到不可估量的作用，为此乐予为序。



2012年2月20日

注：刘杏忠，中国科学院微生物研究所研究员，真菌学国家重点实验室主任，亚洲菌物协会主席，中国菌物学会理事长。

前 言

冬虫夏草是由冬虫夏草菌 (*Ophiocordyceps sinensis*, 曾用名 *Cordyceps sinensis*) 侵染蝙蝠蛾幼虫而形成的菌虫复合体。作为一种名贵中药材,冬虫夏草仅在青藏高原高海拔地区才有分布。近年来,由于过度采挖,冬虫夏草野生资源锐减;我国已将冬虫夏草列为“国家二级保护物种”。迄今为止,冬虫夏草的规模化人工培育尚未取得成功,其中缺乏对冬虫夏草菌的许多重要生物学信息的理解是阻碍这一进程的重要因素。

2005年,我有幸进入中国科学院微生物研究所攻读博士学位,师从刘杏忠研究员,开始研究冬虫夏草。冬虫夏草虽然非常重要,但其基础研究却很薄弱。直到2005年,学术界才最终就冬虫夏草菌的无性型问题达成共识;该问题的解决显著促进了冬虫夏草菌的科学研究和开发应用。任何时候回想起来,我都感觉自己能够从事冬虫夏草的研究非常幸运。虽然开展冬虫夏草研究的起步阶段有许多困难,但一步步走来,却发现冬虫夏草有太多的问题值得深入研究。因此,即便在博士毕业后,我仍没有放弃对冬虫夏草的研究。总结这几年的研究工作,我们主要在冬虫夏草菌的分子生物学、群体遗传学和冬虫夏草真菌群落等方面做了一些研究工作。目前,我们对冬虫夏草的研究工作已发表学术论文12篇(附录I),其中6篇发表于SCI收录刊物。本书就是在总结近几年研究成果的基础上完成的,书中内容绝大多数都是我们的第一手研究资料。

全书共分6章。第一章介绍了冬虫夏草相关的基础知识。第二章介绍了冬虫夏草菌株分离和培养的具体技术。第三章至第六章分别介绍了我们在冬虫夏草菌分子侵染机制、有性生殖、遗传分化及冬虫夏草真菌群落结构等方面的研究结果。在此,我将第三章至第六章的主要内容作一简要介绍。

1) 对冬虫夏草菌侵染机制的了解有助于解决人工栽培实践中遇到的侵染率低的问题。我们首次报道了冬虫夏草菌参与侵染寄主昆虫的两个丝氨酸蛋白酶基因(*csp1*和*csp2*)。*csp1*和*csp2*编码的丝氨酸蛋白酶是蛋白酶S8A亚家族的新成员。利用毕赤酵母表达系统对*csp1*和*csp2*进行异源表达,发现两个基因的表达产物Csp1和Csp2均为胰凝乳蛋白酶,最适pH是7.0,最适温度是40℃(Csp1)或50℃(Csp2)。生物测定结果显示,Csp1和Csp2能够降解蝙蝠蛾幼虫的表皮蛋白,是参与冬虫夏草菌穿透寄主昆虫体壁过程的重要致病因子。本研究促进了对冬虫夏草菌侵染机制的理解,为构建冬虫夏草菌高毒力工程菌株奠定了理论基础。

2) 真菌的有性生殖可通过同宗配合或异宗配合来完成。人工培育冬虫夏草时难以由僵虫发育出子座,这是由于我们对冬虫夏草菌的有性生殖方式缺乏认识。我们首次克隆到冬虫夏草菌的交配型基因 *MAT1-2-1*, 基因全长 857 bp, 编码 249 个氨基酸。在该基因下游约 3 kb 处存在 DNA 裂解酶的编码序列。在 *MAT1-2-1* 上、下游各约 4 kb 序列中没有 *MAT1-1* 的基因片段。我们对 66 个组织分离菌株和 132 个单子囊孢子菌株用 *MAT1-2-1* 的特异引物进行测试, 发现这些菌株全部含有 *MAT1-2-1*。研究结果暗示冬虫夏草菌以同宗配合方式进行有性生殖; 同宗配合对生长于极端环境下的冬虫夏草菌可能有着特殊的意义。

3) 为了增加对冬虫夏草菌起源和扩散的认识, 以及有效地保护冬虫夏草野生资源, 我们开展了冬虫夏草菌种群遗传学的研究。通过对采自青藏高原不同地域的 56 个冬虫夏草样品的 nrDNA ITS 序列和交配型基因 *MAT1-2-1* 序列进行分析, 我们发现冬虫夏草菌在青藏高原上表现出明显的南北分化特征。南部种群的多样性指数显著高于北部种群, 且在一个南部样品中存在 ITS 异质性现象。根据这些研究结果, 我们初步推测西藏林芝地区是冬虫夏草菌的起源中心, 冬虫夏草菌由此向其他地区扩散。本研究证明, 地理因素是冬虫夏草菌演化的重要原因之一; 在制定冬虫夏草保护措施时, 应着力于对青藏高原南部尤其是西藏林芝地区的资源保护。

4) 形成冬虫夏草的真菌虽然只是一个物种, 但天然冬虫夏草及其微环境中存在许多种类的真菌。部分真菌菌种具有与冬虫夏草相同或相似的化学成分和药理作用, 已被开发成菌丝体产品。但是, 目前缺乏对冬虫夏草真菌群落结构的系统研究。我们通过常规分离培养方法得到 572 个真菌菌株, 隶属于 92 种不同的分类单元 (OTU)。基于非培养的分子方法, 我们找到 118 种不同的 OTU, 其中 60% 以上为未知种类。中国科学院微生物研究所车永胜课题组对分离到的部分真菌菌株进行次生代谢产物分析, 发现了多种具有抗菌、抗肿瘤和抗 HIV (人类免疫缺陷病毒) 等活性的新结构化合物。该研究结果不仅增加了我们对冬虫夏草群落中真菌多样性的认识, 丰富了我国的药用真菌资源, 而且对冬虫夏草的人工规模化培育和深度开发具有重要意义。

本书内容的研究虽已历经 6 年, 但真正动笔成书仍显十分仓促。尽管我们做出了很大努力, 但错误和疏漏在所难免, 望读者指正。本书虽然出版, 但是冬虫夏草菌生物学的工作才刚刚开始。我们今后会继续开展此方面的研究。本书旨在抛砖引玉, 希望更多的科研人员加入冬虫夏草的研究, 期待更多新的研究成果早日出现。

张永杰

2012 年 2 月

凡 例

1. 本书共 6 章，除第一章为文献综述外，其余各章均是作者近年来对冬虫夏草研究成果的总结。

2. 在许多中文文献中，“冬虫夏草”一词既用于指代“天然冬虫夏草”，也用于指代构成冬虫夏草的真菌（即“冬虫夏草菌”）。为避免混淆，作者尽可能对“冬虫夏草”和“冬虫夏草菌”的概念加以区分。在本书中，冬虫夏草指在传统中药中使用的由冬虫夏草菌侵染蝙蝠蛾幼虫所形成的菌虫复合体，目前全部来自野外采挖。冬虫夏草菌指形成冬虫夏草的真菌，其拉丁学名为 *Ophiocordyceps sinensis*，曾用名 *Cordyceps sinensis*。

3. 基因名称用斜体，如 *csp1*、*csp2* 和 *MAT1-2-1*；蛋白质名称用正体，如 Csp1、Csp2 和 MAT1-2-1。

4. 本书共有表格 25 张，图片 41 幅（包括图版 7 幅），均为本书涉及的研究内容。

5. 在参考文献部分，中文文献在前，英文文献在后。中文文献按作者姓氏的汉语拼音顺序排列；英文文献按作者姓氏的英文字母顺序排列。中国人撰写的英文文章，视同英文文献处理。

6. 在本书中，我国省级行政单位的名称省略“省”或“自治区”等字样，而地级及以下行政单位的名称则使用全称。各级行政区划均使用最新的名称。

目 录

总序	i
序言	iii
前言	v
凡例	xi
第一章 冬虫夏草概况	1
一、什么是冬虫夏草	1
二、冬虫夏草的分布及资源	2
三、冬虫夏草菌的生活史	3
四、冬虫夏草菌的寄主昆虫	4
五、冬虫夏草相关真菌的开发利用	5
六、冬虫夏草的药理作用和化学成分	6
七、冬虫夏草的人工培育	7
八、采挖冬虫夏草对青藏高原生态环境的破坏	8
九、冬虫夏草研究中需要解决的问题	9
第二章 冬虫夏草菌株的分离和培养	11
一、冬虫夏草样品采集	11
二、冬虫夏草菌的组织分离技术	12
三、冬虫夏草菌单子囊孢子菌株的分离技术	12
四、培养物的鉴定	14
五、冬虫夏草菌子座的分化	15
六、讨论	15
第三章 冬虫夏草菌丝氨酸蛋白酶基因的克隆、表达及功能分析	16
一、冬虫夏草菌丝氨酸蛋白酶基因的扩增与分析	16
二、冬虫夏草菌丝氨酸蛋白酶基因在毕赤酵母中的表达	24
(一) 表达载体的构建	24
(二) 重组表达载体转化毕赤酵母和转化子的诱导表达	25
三、冬虫夏草菌丝氨酸蛋白酶的物理化学性质分析	27
(一) 最适底物的确定	27

(二) 最适温度和温度稳定性	27
(三) 最适 pH 和 pH 稳定性	28
(四) 金属离子对酶活性的影响	28
(五) 抑制剂对酶活性的影响	30
(六) 化学物质对酶活性的影响	30
四、冬虫夏草菌丝氨酸蛋白酶的生物测定	31
五、讨论	32
第四章 冬虫夏草菌交配型基因的克隆与分析	33
一、冬虫夏草菌交配型基因的扩增与分析	34
二、冬虫夏草菌 <i>MAT1-2-1</i> 上、下游序列的扩增与分析	39
三、利用 <i>MAT1-2-1</i> 特异引物对冬虫夏草菌样品的 PCR 扩增	40
四、 <i>MAT1-2-1</i> 的系统发育分析	42
五、讨论	42
(一) 冬虫夏草菌交配型基因的扩增及交配方式的探讨	42
(二) 交配型基因的组织结构	44
第五章 冬虫夏草菌的遗传分化	45
一、研究材料与基因扩增	46
二、冬虫夏草菌 ITS 和 <i>MAT1-2-1</i> 的序列变异	50
三、冬虫夏草菌的单元型	50
四、系统发育分析	52
五、种群遗传结构	55
六、通过 PCR-SSCP 分析 ITS 异质性	57
七、讨论	60
(一) 冬虫夏草菌 ITS 序列的变异	60
(二) 交配型基因用于真菌遗传多样性的分析	61
(三) 冬虫夏草菌的起源与扩散	61
(四) 冬虫夏草菌遗传分化研究的重要意义	62
第六章 冬虫夏草真菌群落的研究	63
一、真菌群落结构研究的策略	64
二、基于培养方法的冬虫夏草真菌群落结构研究	65
(一) 形态鉴定结果	65
(二) 基于分子序列的鉴定结果	67
(三) 不同部位检测的 OTU 的比较	74
三、基于非培养方法的冬虫夏草真菌群落结构研究	75

(一) 文库中冬虫夏草菌克隆与其他物种克隆的数量	75
(二) 其他真菌克隆的多样性分析	76
(三) 文库中优势 OTU 分析	86
四、培养方法与非培养方法研究结果的比较	87
五、讨论	88
(一) 野生冬虫夏草外围的菌膜由冬虫夏草菌的菌丝体组成	88
(二) 区分不同 OTU 的阈值	88
(三) 培养法得到的真菌菌株与前人所报道真菌的比较	89
(四) SSCP 方法与其他分析方法的比较	89
(五) 冬虫夏草真菌群落研究的重要意义	91
参考文献	92
附录 I 本书作者发表的冬虫夏草相关的论文	101
附录 II <i>csp1</i> 在 GenBank 中的登录序列	102
附录 III <i>csp2</i> 在 GenBank 中的登录序列	105
附录 IV <i>MAT1-2-1</i> 及其旁侧序列在 GenBank 中的登录序列	108
后记	114
图版 I 冬虫夏草采样地点图	
图版 II 冬虫夏草菌的组织分离与单子囊孢子分离	
图版 III 冬虫夏草菌分化的子座原基和子座	
图版 IV 冬虫夏草组织分离菌株 XZ08-26 分化的子座	
图版 V 推测的冬虫夏草菌在青藏高原上的起源与扩散图	
图版 VI 天然冬虫夏草样品	
图版 VII 部分真菌菌株和克隆的 SSCP 图谱	

第一章 冬虫夏草概况

一、什么是冬虫夏草

冬虫夏草是我国的一味传统名贵中药材，与人参、鹿茸并称“中药三大宝”。它是由冬虫夏草菌侵染青藏高原高山草甸土中的蝙蝠蛾科昆虫的幼虫而形成的幼虫尸体与真菌子座的复合体（许亮等，2011）。国内外部分学者和普通民众经常把各种由虫草属 [*Cordyceps* (Fr.) Link] 真菌寄生并产生子座的菌虫结合体都称为冬虫夏草。但实际上，冬虫夏草菌只是虫草属中的一个物种；由虫草属其他物种形成的虫草不能称作冬虫夏草。目前，全世界已知的虫草属真菌有 400 余种（Stensrud *et al.*，2005），中国已知有约 120 种（梁宗琦，2007）。长期以来，冬虫夏草菌归属于子囊菌门（Ascomycota）、子囊菌纲（Ascomycetes）、粪壳菌亚纲（Sordariomycetidae）、肉座菌目（Hypocreales）、麦角菌科（Clavicipitaceae）、虫草属，其拉丁名为 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. (Kirk *et al.*，2001)。近年来，基于表型和基因型相结合的系统发育系统学研究结果，真菌学家发现曾被归入广义麦角菌科虫草属的约 400 个分类群实际并非单系类群，亦即并非同一祖先的后代。它们当中的大部分成员现被划分到 3 科 4 属^①中，即 Cordycipitaceae（包含 *Cordyceps* 1 个属），Ophiocordycipitaceae（包含 *Ophiocordyceps* 和 *Elaphocordyceps* 2 个属）及 Clavicipitaceae（包含 *Metacordyceps* 1 个属）（Sung *et al.*，2007；郭英兰等，2010）。近年来，真菌的高等分类阶元也有了新的变化（Hibbett *et al.*，2007），并得到了学术界的普通认可。冬虫夏草菌在现行分类系统中的分类地位如下所示。

界 (kingdom): Fungi

亚界 (subkingdom): Dikarya

门 (phylum): Ascomycota

亚门 (subphylum): Pezizomycotina

纲 (class): Sordariomycetes

^① 这些科、属尚无统一的中文名称。

亚纲 (subclass): Hypocreomycetidae

目 (order): Hypocreales

科 (family): Ophiocordycipitaceae

属 (genus): *Ophiocordyceps*

种 (species): *Ophiocordyceps sinensis* (Berk.)

G. H. Sung, J. M. Sung, Hywel-Jones & Spatafora, 2007

二、冬虫夏草的分布及资源

冬虫夏草分布于青藏高原海拔 3000~5000 m 的高寒草甸中。从全世界范围来看,冬虫夏草只在中国、尼泊尔、不丹和印度 4 个国家有分布 (Winkler, 2008)。一些文献中提到的冬虫夏草分布于其他的国家或地区都是错误的,可能指的是其他种类的虫草 (Shrestha *et al.*, 2010; 杨大荣等, 2010)。在有冬虫夏草分布的 4 个国家中,中国是冬虫夏草最主要的分布地,占全世界冬虫夏草分布面积的 90% 以上。冬虫夏草在我国的分布北起祁连山、南至滇西北高山、东自川西高原山地、西达喜马拉雅山脉的大部分地区,占我国国土面积的 10% 左右,涉及青海、西藏、四川、云南和甘肃 5 省 (自治区) (杨大荣, 1999)。其中,青海和西藏是中国冬虫夏草最主要的分布地,占全国冬虫夏草产量的 80% 以上 (章力建等, 2010a)。西藏那曲地区的那曲县、比如县、索县、巴青县等地,昌都地区的丁青县、边坝县、洛隆县、芒康县等地,林芝地区的林芝县、工布江达县、波密县等地;青海玉树藏族自治州的玉树县、杂多县、称多县、囊谦县等地,果洛藏族自治州的玛沁县、甘德县等地;四川阿坝藏族羌族自治州的壤塘县等地,甘孜藏族自治州的理塘县、巴塘县、德格县等地;云南迪庆藏族自治州的德钦县、香格里拉县以北一带,甘肃甘南藏族自治州玛曲县以西一带,是中国冬虫夏草的核心分布区 (杨大荣等, 2010)。近年来,随着全球气候和青藏高原生态环境变化及冬虫夏草的过度采挖,冬虫夏草的分布格局发生了明显的变化。与 30 年前相比,核心分布区内冬虫夏草的分布海拔不断上升;边缘分布区冬虫夏草的分布海拔明显下移,部分种群已经分布到暗针叶林和高山灌丛带中 (杨大荣等, 2010)。

尽管冬虫夏草野生资源十分有限,产量也已经有明显的减少 (陈仕江等, 2010),但目前全国冬虫夏草的年采集量仍可达到 100~200 t (章力建等, 2010a)。在中国,青海冬虫夏草的产量最高,接近 100 t;玉树藏族自治州和果洛藏族自治州是最主要的产区,约占青海总量的 80% (蔡佩云和孙世英,

2010)。西藏每年冬虫夏草的产量保持在 40 t 左右；那曲地区和昌都地区是最主要的产区，约占西藏总量的 80%（徐百志等，2010）。除青海和西藏外，我国其他冬虫夏草产区的产量由高到低依次为四川（15~30 t）、甘肃（4~9 t）和云南（0.3~1 t）（Winkler, 2010）。尼泊尔、印度和不丹的冬虫夏草产量加起来只有 3.2~7 t（Winkler, 2010）。

三、冬虫夏草菌的生活史

每年夏、秋季，冬虫夏草菌开始侵染营地下生活的蝙蝠蛾幼虫。冬虫夏草菌进入虫体后在幼虫体腔内生长，逐渐使虫体内充满真菌菌丝体。被感染的幼虫初期行动迟缓，后期其体内充满冬虫夏草菌的菌丝体，在进入冬季时成为僵虫（即所谓的“冬虫”），并在当年土壤冻结前从虫体头部长出短小的子座芽。到第二年春夏时分、土壤解冻后，冬虫夏草的子座继续生长并伸出地面，状似嫩草，故称“夏草”。到 6 月中下旬，子座头部渐渐膨大，子囊壳和子囊孢子逐渐成熟。成熟的子囊孢子从子囊壳口弹射出来，散落到土壤中，在适宜的条件下又去侵染其他的幼虫（Buenz *et al.*, 2005）。

冬虫夏草菌在其生活史中既有有性阶段（产生子囊孢子）又有无性阶段（产生分生孢子）。在人工培养、液体发酵等实际生产中使用的菌种均为无性阶段，其菌种的正确鉴定至关重要。为了明确冬虫夏草菌的无性型，科研人员从 20 世纪 80 年代开始分离并报道了许多真菌。蒋毅和姚一建（2003）总结了截至 20 世纪末从冬虫夏草上分离并报道的真菌，共涉及 13 个属 22 个不同的名称，其中既包括一些合格发表的新种名称，也包括一些不合格发表或应作为异名的真菌名称。此后，科研人员还从冬虫夏草上分离并报道了一些其他真菌（Jiang and Yao, 2006；张永杰等，2010）。在分离到的众多真菌中，只有中国被毛孢（*Hirsutella sinensis* Liu, Guo, Yu & Zeng, 1989）才是冬虫夏草菌真正的无性型（刘锡琚等，1989），这已得到生物学和分子系统学的证据支持（莫明和等，2001；魏鑫丽等，2006）。在此值得一提的是，利用沈南英分离的一个菌株曾先后报道了 3 个名称，分别是中华束丝孢（*Synnematium sinense*）、冬虫夏草头孢（*Cephalosporium dongchongxiacae*）和蝙蝠蛾被毛孢（*Hirsutella hepiali*）。分子系统学分析结果表明，沈南英的菌株与中国被毛孢为同一物种。由于符合国际植物命名法规的名称是中国被毛孢，因此，基于沈南英的菌株报道的 3 个名称，现均被处理为中国被毛孢的同物异名（魏鑫丽等，2006）。中国被毛孢是一种嗜低温真菌（最适生长温度为 15~20℃），生长非常缓慢（Dong and Yao, 2010；郭英兰等，2010）。目前，在实验室条件下，我们可以较容易地分离冬虫夏草菌

的子囊孢子, 并进行培养得到分生孢子, 但是, 培养分生孢子获得子囊孢子还很困难。

四、冬虫夏草菌的寄主昆虫

在自然条件下, 冬虫夏草菌需要侵染蝙蝠蛾科昆虫的幼虫才能形成冬虫夏草, 但冬虫夏草菌的寄主昆虫种类具体存在多少种, 我们并不清楚。许多作者对冬虫夏草菌的寄主昆虫种类进行了统计, 但得到的结果差别较大, 从 30 多种到 60 多种不等 (杨大荣等, 1996; 刘飞等, 2006)。其中很关键的一个问题是, 随着调查的进行, 不断有新的寄主昆虫种类被发现 (张古忍等, 2007; 涂永勤等, 2009; Maczey *et al.*, 2010)。最近, Wang 和 Yao (2011) 对文献中涉及的与冬虫夏草菌相关的 13 个属的 91 个昆虫名称进行了总结和分析, 认为有 57 个昆虫名称可能是冬虫夏草菌的寄主昆虫, 26 个被排除掉, 另有 8 个无法确定与冬虫夏草菌的关系。

冬虫夏草菌的寄主昆虫除种类数不确定外, 其分类体系也不稳定。近年来, 研究人员对冬虫夏草菌寄主昆虫的分类体系提出了一些新的看法。长期以来, 蝠蛾属 (*Hepialus*) 被认为是冬虫夏草菌寄主昆虫最主要的属 (杨大荣等, 1996)。但是, Nielsen 等 (2000) 建议将中国科学家 1984 年以后报道的几乎所有蝠蛾属的昆虫物种都组合到钩蝠蛾属 (*Thitarodes*) 中。最近, 邹志文等 (2010) 以蝠蛾雄性生殖器抱器瓣结构特征为依据, 对中国蝠蛾属昆虫的分类系统重新进行了修订。他们在建立拟蝠蛾属 (*Parahepialus*) 和无钩蝠蛾属 (*Ahamus*), 并在引入钩蝠蛾属的基础上, 将中国蝠蛾属的 60 个种分别归入拟蝠蛾属 (1 种)、无钩蝠蛾属 (18 种)、蝠蛾属 (1 种) 和钩蝠蛾属 (40 种)。在这 4 个属中, 除蝠蛾属外的其他 3 个属都有冬虫夏草菌的寄主昆虫。然而, 令人遗憾的是, 目前冬虫夏草菌寄主昆虫分子系统学的研究还很薄弱。在 GenBank (公共的 DNA 序列数据库) 中, 目前仅有 28 条冬虫夏草菌寄主昆虫的基因序列。

冬虫夏草菌的寄主昆虫分布十分狭窄, 常是不同地区或不同山脉, 甚至是同一山脉不同坡向和海拔就分布完全不同的种类 (杨大荣等, 1996)。寄主昆虫的幼虫阶段营地下生活, 以植物的嫩根为食, 其取食的植物涉及 19 个科 (朱弘复和王林瑶, 2004)。寄主昆虫在自然条件下完成其生活史需要 2~6 年 (因昆虫种类而异) (尹定华等, 2004; 徐海峰, 2004), 其幼虫期占据了生活史中 90% 以上的时间 (李玉玲等, 2010)。人工饲养可明显缩短幼虫的历期 (可缩短 1 年以上), 同时还能提高卵的孵化率、蛹羽化率和成虫交配率 (彭艳琼和杨大荣, 2010)。目前, 人们已经对多种寄主昆虫进行了人工饲养的研究, 包括白马蝠蛾

(*Hepialus baimaensis*)、人支蝠蛾 (*Hepialus renzhiensis*)、云南蝠蛾 (*Hepialus yunnanensis*)、剑川蝠蛾 (*Hepialus jianchuanensis*)、贡嘎蝠蛾 (*Hepialus gonggaensis*)、拉脊蝠蛾 (*Hepialus lagii*)、比如蝠蛾 (*Hepialus biruensis*) 及斜脉蝠蛾 (*Hepialus oblifurcus*) 等 (陈健等, 1991; 陈仕江等, 1995, 2002; 徐海峰, 2004; 彭艳琼和杨大荣, 2010)。

五、冬虫夏草相关真菌的开发利用

生活在同一生境中的生物在长期的进化过程中会发生基因交流, 产生某些结构类似的代谢产物 (Stierle *et al.*, 1993; Strobel *et al.*, 1996)。存在于天然冬虫夏草上的部分真菌具有与冬虫夏草相同或相似的化学成分和药理作用, 已被开发成发酵菌丝体产品 (表 1.1)。对于中国被毛孢 (即冬虫夏草菌), 目前国内已有至少 3 家企业正在进行该菌菌丝体发酵产品的生产。利用中国被毛孢开发的百令胶囊于 1988 年被批准为国家级一类新药, 可用于治疗慢性肾衰、II 型糖尿病、尿路感染、肝脏疾病、哮喘、结核及辅助治疗肿瘤等 (刘丽娟等, 2004)。由蝙蝠蛾拟青霉开发的金水宝胶囊于 1987 年被批准为全国第一个中药一类新药, 在临床上用于治疗慢性支气管炎、高脂血症, 以及阳痿、早泄、月经不调、性功能低下等病症 (钟丽萍, 2001; 金成等, 2005)。由蝙蝠蛾被孢霉开发的至灵胶囊于 1985 年批准生产, 1997 年被卫生部批准列入国家二级中药保护品种, 在临床上治疗支气管炎、哮喘的疗效较好, 能使慢性肾功能衰竭、慢性肾炎、贫血患者的血色素及红血球明显上升, 对肝硬化也有一定的疗效 (杨光等, 1998; 郭宏春等, 2003)。由虫草头孢开发的宁心宝胶囊用于治疗缓慢性心律失常, 能改善窦房结及房室传导功能, 提高窦性心律, 具有抗炎、免疫及治疗肝炎的作用, 同时能改善睡眠及食欲 (史美瑶, 1985; 郭宏春等, 2003)。由粉红胶霉开发的心肝宝胶囊于 1987 年批准生产, 临床用于心律失常、慢性肝炎、肾病综合征、呼吸系统疾病、血液病和神经衰弱, 并可作为抗肿瘤药物的辅助用药 (杜中惠, 2003)。此外, 中国拟青霉、中国弯颈霉和一种圆柱菌也曾被开发成菌丝体产品 (郭宏春等, 2003)。近年来, 中国科学院微生物研究所还对从冬虫夏草上分离的真菌资源进行了大规模的次生代谢产物分析, 发现了大量的新结构化合物; 这些化合物具有抗微生物、抗 HIV 和抗肿瘤等生物活性 (Guo *et al.*, 2007, 2009a, 2009b; Zhang *et al.*, 2007, 2009a; Chen *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2011)。因此, 从天然冬虫夏草上分离的真菌资源是开发创新药物非常重要的生物来源。

表 1.1 自冬虫夏草分离并被开发成产品的真菌

真菌	代表产品	备注
中国被毛孢 (<i>Hirsutella sinensis</i>)	百令胶囊	1988 年批准生产, 2005 年被药典收录
蝙蝠蛾拟青霉 (<i>Paecilomyces hepiali</i>)	金水宝胶囊	1987 年批准生产, 2000 年被药典收录
蝙蝠蛾被孢霉 (<i>Mortierella hepiali</i>)	至灵胶囊	1985 年批准生产, 2010 年被药典收录
虫草头孢 (<i>Cephalosporium sinensis</i>)	宁心宝胶囊	1985 年批准生产
粉红胶霉 (<i>Gliocladium roseum</i>)	心肝宝胶囊	1987 年批准生产
中国拟青霉 (<i>Paecilomyces sinensis</i>)	虫草菌胶囊	2001 年起禁止生产
圆柱菌 (<i>Scydaliium</i> sp.)	虫草胶囊	
中国弯颈霉 (<i>Tolytocladium sinense</i>)	博奥虫草口服液	

不同的真菌产品使用的质量控制标准不同 (Yang *et al.*, 2010)。例如, 百令胶囊以总氨基酸含量为标准; 金水宝胶囊以腺苷含量为标准; 至灵胶囊以甘露醇和腺苷含量为标准; 宁心宝胶囊和心肝宝胶囊以含氮量为标准。

六、冬虫夏草的药理作用和化学成分

冬虫夏草的药用价值据说最早是约 1500 年前由放牧者发现的, 当时他们发现牦牛取食冬虫夏草后会变得非常有活力 (Hollobaugh, 1993)。然而由于冬虫夏草非常稀缺和昂贵, 长期以来, 只有皇室、贵族才用得起冬虫夏草。冬虫夏草在文献中最早的出处: 在藏语文献中可追溯到 15 世纪藏医药西南派创始人宿喀·娘尼多吉所著的《藏医千万舍利》; 在汉语文献中可追溯到 1694 年清朝汪昂所著的《本草备要》(Winkler, 2008)。《本草备要》记载: “冬虫夏草, 甘平、保肺益肾, 止血化痰, 已劳嗽。四川嘉定府所产者最佳。冬在土中, 形似老蚕, 有毛能动, 至夏则毛出土上, 连身俱化为草。若不取, 至冬则复化为虫” (汪昂, 1694)。更多的古书籍中对冬虫夏草的记载可参阅《中国冬虫夏草研究》(柯传奎, 2005) 和《中国虫草: 历史·资源·科研》(中国科学院西北高原生物研究所和青海省药品检验所, 2008)。冬虫夏草从 1963 年起就被《中华人民共和国药典》所收录。最新的《中华人民共和国药典》(2010 年版) 中记载冬虫夏草“补肾益肺, 止血化痰。用于肾虚精亏, 阳痿遗精, 腰膝酸痛, 久咳虚喘, 劳嗽咳血”。现代医学研究证实了冬虫夏草的多种治疗和滋补作用。大量研究表明, 冬虫夏草可作用于人体免疫、循环、呼吸、消化、泌尿、生殖等多个系统, 具有镇静、扩张气管、止血、改善心肌供血、抗衰老、抗器官移植免疫排斥反应、调节人体免疫和雄激素样及对肝脏和肾脏损伤的保护等多种药理作用 (冬虫夏草研究