

Разработка штаммов *Cordyceps militaris* с высоким содержанием кордицепина

[Нару Кан](#) , ^{1,2} [Хён-Хи Ли](#) , ¹ [Инмён Пак](#) , ³ и [Ён Су Со](#) ¹

Аннотация

Cordyceps militaris , известный как Dong-Chong-Xia-Cao, производит больше всего кордицепина среди видов *Cordyceps*, и его можно культивировать искусственно. По этим причинам *C. militaris* широко используется в качестве трав или функциональной пищи в Восточной Азии. В этом исследовании мы разработали новый штамм *C. militaris*, который производит более высокое содержание кордицепина, чем родительские штаммы, благодаря половому размножению на основе спаривания. Двадцать родительских штаммов были собраны и идентифицированы как *C. militaris* на основании внутренних транскрипционных последовательностей спейсера и рДНК. Семь отдельных спор идиоморфа *MAT 1-1* и пять отдельных спор идиоморфа *MAT 1-2* были выделены из 12 родительских штаммов. Когда 35 комбинаций были скрещены на среде коричневого риса с изолированными одиночными спорами, восемь комбинаций образовали строму с нормальным перитецием и подтвердили скрещивание штаммов. Анализ жидкостной хроматографии высокого давления показал, что спарившийся штамм KSP8 продуцировал больше кордицепина во всех средах среди всех протестированных штаммов. Этот результат был обнаружен благодаря генетической рекомбинации, происходящей во время полового размножения *C. militaris* . Получение штамма *C. militaris* с повышенным содержанием кордицепина с помощью этого подхода может помочь не только в создании новых штаммов *C. militaris* , но и внести свой вклад в производство здорового питания или лекарственных препаратов.

Ключевые слова: кордицепин, *Cordyceps militaris* , Dong-Chong-Xia-Cao, ген *MAT* , спаривание.

Род *Cordyceps*, относящийся к разделу ascomycota, классу сордариомицетов, отряду hurocreales, семейству clavicipitaceae, является энтомопатогенными и эндопаразитарными грибами [1]. *Виды кордицепса* известны в Китае как Dong-Chong-Xia-Cao, потому что зимой он паразитирует в организме хозяина и образует строму, подобную траве, после убийства хозяина и поглощения питательных веществ хозяина летом. *Виды Cordyceps* в основном паразитируют на членистоногих, от личинок чешуекрылых и куколок до имаго, и предпочитают теплый и влажный климат. Таким образом, хозяева, инфицированные видами *кордицепса* , преимущественно наблюдаются в районах с жарким и влажным субтропическим климатом.

Многие виды *кордицепса* использовались в качестве здоровой пищи или лекарств в Китае и Юго-Восточной Азии, поскольку они содержат большое количество физиологически активных веществ [2 , 3]. В отличие от других видов *кордицепса* , *Cordyceps militaris* легко доступен для искусственного культивирования с более высоким производством кордицепина.

Содержание биологически активного вещества в *C. militaris* такое же высокое, как и у *C. sinensis*, производящей много ценных биологически активных компонентов [4].

Химическая структура кордицепина очень похожа на аденозин, за исключением того, что у него нет гидроксильной группы на углероде номер 3. Из-за этого структурного сходства он ингибирует полиаденилирование мРНК раковой клетки и, таким образом, проявляет противораковый эффект [5]. Кроме того, антитромботический эффект проявляется в снижении концентрации Ca^{2+} , а противовоспалительный эффект проявляется в снижении продукции воспалительных веществ [6]. Он проявляет различные эффекты физиологической активности, как описано выше [7 , 8]. Кроме того, поскольку период полураспада кордицепина составляет около 1 минуты и он быстро разлагается аденозиндезаминазой в организме, побочных эффектов мало. По этим причинам кордицепин является очень ценным материалом. Однако гены, участвующие в пути биосинтеза кордицепина, до сих пор неизвестны. Это только предположение, что путь биосинтеза кордицепина подобен пути биосинтеза аденозина из-за структурного сходства с аденозином. Существует способ химического синтеза кордицепина из аденозина и извлечения кордицепина из *Cordyceps* spp. Однако этого недостаточно для удовлетворения спроса на кордицепин. Таким образом, исследования по увеличению естественного содержания кордицепина в *C. militaris* проводились с помощью различных методов, таких как разведение путем спаривания или генетических манипуляций, а *C. militaris* с более высокой продукцией кордицепина очень ценен в индустрии здорового питания или лекарственных препаратов [9 , 10].

Разведение путем спаривания - это метод, основанный на пути полового размножения гриба. *C. militaris* размножается не только по бесполому циклу, но и по половому циклу, производя аскоспоры. *C. militaris* является гетероталлическим и биполярным видом в том смысле, что два локуса типа спаривания, состоящие из идиоморфа противоположного типа спаривания *MAT1-1* и *MAT1-2*, существуют дискретно в двух разных отдельных спорах в половом репродуктивном пути. Спаривание может начаться, когда встречаются две отдельные споры с разными идиоморфами *MAT*.

Локус *MAT1-1* состоит из *MAT1-1-1* и *MAT1-1-2*, тогда как локус *MAT1-2* состоит из *MAT1-2-1* [11 , 12 , 13]. Идиоморф *MAT* кодирует фактор транскрипции, который регулирует ген, связанный с половым воспроизводством [14]. Каждый из факторов транскрипции, кодируемых *MAT1-1* и *MAT1-2*, содержит ДНК-связывающий мотив. *MAT1-1* представляет собой фактор транскрипции, содержащий хорошо консервативный α -домен в качестве ДНК-связывающего мотива. *MAT1-2* - фактор транскрипции, содержащий НМГ-домен в качестве ДНК-связывающего мотива [15].

Многие новые штаммы *C. militaris* с высоким содержанием кордицепина были разработаны в результате генных мутаций, вызванных облучением или ультрафиолетовым облучением [16 , 17]. В этом исследовании мы попытались создать новые штаммы *C. militaris* с повышенным содержанием кордицепина путем естественного скрещивания без мутаций. Штаммы *C. militaris* были скрещены с другими штаммами, чтобы получить новые штаммы, чтобы производить больше кордицепина, чем родительские штаммы. Двенадцать штаммов *C. militaris* использовали для родительских штаммов и скрещивали друг с другом после отделения отдельных спор от 12 штаммов *C. militaris*. Содержание кордицепина во всех штаммах анализировали с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ВЭЖХ). В результате мы разработали новые штаммы *C. militaris*, которые продуцировали больше кордицепина, чем родительские штаммы.

[Перейти к:](#)

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы грибов и состояние культуры.

В этом исследовании использовались двенадцать штаммов *C. militaris* ([Таблица 1](#)). Каждый штамм был получен из Корейской коллекции сельскохозяйственных культур (КАСС) или из Лаборатории системной микробиологии растений Пусанского национального университета (SPNU). Все штаммы находятся в состоянии мицелия. Штаммы грибов поддерживали на картофельном агаре с декстрозой (КПК) при 25 °С. Для выделения геномной ДНК из мицелия мицелий культивировали в течение 7 дней в бульоне с картофельной декстрозой (PDB) 50 мл в фотобиореакторе встряхиваемого типа (PBR) (150 об / мин) при 25 °С в течение 7 дней на свету.

Таблица 1

Штамм *Cordyceps militaris*, использованный в этом исследовании

[Открыть в отдельном окне](#)

КАСС, Коллекция корейских сельскохозяйственных культур, Национальный институт сельскохозяйственных наук и технологий, Суwon, Корея; СПНУ, Лаборатория системной микробиологии растений. Пусанского национального университета, Корея; EFCC, Коллекция энтомопатогенных грибковых культур, Кангвонский национальный университет, Корея; МПНУ, Микологическая лаборатория. Пусанского национального университета, Корея.

ПЦР участка рДНК, охватывающего ген ITS1, ITS2 и 5.8S рРНК.

Геномную ДНК *C. militaris* экстрагировали из свежего мицелия с использованием метода бромидом цетилтриметиламмония [[18](#)]. Праймеры ITS4R и ITS5F были использованы для амплификации участка рДНК, охватывающего ген ITS1, ITS2 и 5.8S рРНК [[19](#)]. Реакционная смесь для ПЦР состояла из 10 × Taq буфера для ПЦР 2 мкл, 1,6 мкл dNTP (2,5 мМ исходный), 1 мкл праймера 1 (10 пмоль / мкл), 1 мкл праймера 2 (10 пмоль / мкл), 0,1 мкл Taq. ДНК-полимераза (Такара, Токио, Япония), 1 мкл диметилсульфоксида и 50 нг / мкл матрицы. ПЦР выполняли с использованием термоциклера Sure Cyler 8800 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) в следующих условиях: один цикл продолжительностью 5 минут при 96 °С, затем 30 циклов при 96 °С в течение 40 секунд, 48 °С в течение 40 секунд, и 72 °С в течение 40 секунд, и завершение с расширением при 72 °С в течение 10 минут.

Амплифицированные продукты ПЦР очищали с помощью набора для очистки ПЦР (GeneAll Biotech, Сеул, Корея) и секвенировали с помощью анализатора ДНК 3730xl (Macrogen, Сеул, Корея). Филогенетическое древо было создано среди 12 штаммов *C. militaris*, включая *Cordyceps bassinia*. Все последовательности были выровнены с помощью MUSCLE и курировались Gblocks. Филогенетическое древо создано MEGA ver. 6.06 с использованием максимального правдоподобия. Анализ начальной загрузки был проведен с 2 000 повторов.

Выделение одной споры и идентификация идиоморфа *MAT*.

Для выделения одиночных аскоспор применяли метод сброса / выброса спор. Строму с перитециями прикрепляли к внутренней стороне чашки Петри, содержащей 2% водный агар (WA), при 25 °С и освещении в течение 5 дней. После этого отдельные споры проросли из стромы, а затем мицелий культивировали в 50 мл PDB в 250-мл колбе Эрленмейера, содержащей стеклянную бусину, в инкубаторе с встряхиванием, кондиционированном со скоростью 150 об / мин в течение 7 дней при 25 °С и под светом для облегчения роста конидий. Супернатант культуральной среды собирали центрифугированием при $14000 \times g$ в течение 10 минут и фильтровали через фильтровальную бумагу (ADVANTEC 2, Токио, Япония) для удаления мицелия. После серийного разбавления надосадочной жидкости, имеющей конидии, водой до 10^5 , 200 мкл суспензии спор размазывали в среде WA. Планшет WA культивировали при 25 °С на свету в течение 5 дней. Чтобы подтвердить идиоморф *MAT* одиночной споры, *MAT*-PCR выполняли с использованием праймеров *MAT1-1-1* и *MAT1-2-1*, установленных для нацеливания *MAT1-1-1* и *MAT1-2-1* (*MAT1-1-1-F*, 5' - ATGGAACACAGATCGAGCGACAC-3' и *MAT1-1-1-R*, 5'-ATATACCTTCGCGATCA TTGCCAG-3'; *MAT1-2-1-F*, 5'-TGTTTTGTCGCGATGGTTCTGG-3' и *MAT1-2-1-R*, 5' - CCTCTGGAGGTTCTGCATTCCA-3') [20]. Поскольку идиоморф *MAT* MPNU8001-1 и MPNU8001-2 был подтвержден с помощью ПЦР *MAT* и секвенирования, MPNU8001-1 и MPNU8001-2 использовались для контроля штамма (Таблица 1). Реакционная смесь для ПЦР была такой же, как описано выше. ПЦР типа *MAT* выполняли следующим образом: 95 °С в течение 1 мин, затем 30 циклов при 95 °С в течение 30 секунд, 58 °С в течение 30 секунд и 72 °С в течение 40 секунд, и завершали удлинением при 72 °С в течение 5 минут.

Брачный эксперимент и индукция стромы.

Спарившийся штамм индуцировали с образованием стромы в коричневом рисе, куколках тутового шелкопряда и среде PDB. Посевной материал с отдельными спорами готовили в PDB. Инокулят культивировали в PBR встряхиваемого типа (120 об / мин) при 25 °С в течение 7 дней. Среду для куколок бурого риса и шелкопряда готовили путем смешивания 40 г коричневого риса, 4 г куколок шелкопряда и 20 г коричневого риса, 40 г куколок шелкопряда в 64 мл жидкой среды (20 г сахарозы, 20 г пептона, 1 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 г KH_2PO_4 и 1 л дистиллированной воды в полипропиленовой бутылке со стромой грибов. От 15 до 20 мл инокулята с концентрацией 12 г / л сухой массы клеток (DCW), состоящего из двух спор, происходящих от разных родительских штаммов, инокулировали во все среды. Двенадцать родительских штаммов также индуцировали образование стромы в коричневом рисе, куколках тутового шелкопряда и среде PDB. Инокулят готовили в 50 мл PDB путем посева мультиспор. От 15 до 20 мл мультиспорового инокулята с концентрацией 12 г / л в DCW инокулировали во все три среды.

После инкубирования в течение 7 дней в темноте при 25 °С для стимулирования вегетативного роста все среды инкубировали при 20 °С в течение 50 дней в камере для выращивания (JEIO TECH, Тэджон, Корея) при 12-часовом цикле свет / темнота при 500–1000 люкс и высокой влажности (90%). Все спарившиеся штаммы со стромой фотографировали с помощью фотоаппарата (Nikon, Токио, Япония).

Анализ кордицепина с помощью ВЭЖХ.

При индуцировании стромы через 50 дней измеряли содержание кордицепина. Строма и склероций спарившихся штаммов и родительских штаммов в среде куколок бурого риса и тутового шелкопряда были разделены. В случае мицелия в PDB количество кордицепина измеряли путем разделения внеклеточного кордицепина в культуральной среде и внутриклеточного кордицепина в мицелии. Образец сушили вымораживанием и измельчали в порошок (диаметр приблизительно 50 меш) вместе с жидким азотом, за исключением культуральной среды PDB. все образцы нагревали при 110 ° С в течение 1 часа в Н₂ О. Образец фильтровали с использованием шприцевого фильтра 0,22 мкм (Chromdisc, Daegu, Korea).

ВЭЖХ-анализ выполняли на HPLC Shiseido Nanospace SI-2 (Shiseido, Tokyo, Japan) с колонкой Shiseido CAPCELL PAK C18 AQ (250 × 4,6 мм, 5 мкм; Shiseido). Стандарт кордицепина был приобретен у Sigma Chemical Corp. (Сент-Луис, Миссури, США) и введен пять раз из расчета 7,8125–500 мкг / мл для калибровки. Детектирование выполняли при условии, что соотношение состава подвижной фазы составляло вода: ацетонитрил = 91: 9 (об. / Об.), А скорость потока составляла 500 мкл / мл при 30 ° С. Объем инъекции составлял 10 мкл. Длина волны детектирования 260 нм.

[Перейти к:](#)

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Идентификационное и филогенетическое дерево 12 штаммов.

Поскольку скрещивание возможно в пределах одного и того же вида *Cordyceps* , идентификация 12 штаммов была проведена с использованием последовательностей внутреннего транскрибируемого спейсера (ITS), включая 5,8S рРНК. Последовательности ITS, включающие 5,8S рРНК 12 штаммов *C. militaris* , были успешно амплифицированы с праймерами ITS4F и ITS5R ([Рис. 1А](#)). Амплифицированная целевая последовательность составляла примерно 530–560 п.н. Поскольку последовательности всех штаммов имеют 98% или более идентичности с последовательностью ITS, включая 5.8S рРНК *C. militaris* ([AF153264](#)), уже зарегистрированную в NCBI. ITS-последовательности, включающие 5.8S рРНК всех штаммов, зарегистрированы в NCBI. Филогенетическое дерево было создано с использованием 12 штаммов *C. militaris* и других *Cordyceps bassiana* с помощью MEGA 6.06 с использованием филогенетического анализа максимального правдоподобия ([Рис. 1В](#)). Филогенетическое древо среди тринадцати штаммов *C. militaris* и *Cordyceps bassiana* показало, что все протестированные штаммы принадлежат к *C. militaris* и генетически далеки от *C. bassiana* .

[Открыть в отдельном окне](#)
[рисунок 1](#)

ПЦР и филогенетическое дерево показывают, что отношения между *Cordyceps* spp. (*C. takaomontana* , *C. japonica* и *C. sinensis*). Положительным контролем был *C. militaris* (EFCC-C738). А. Внутренние транскрибируемые спейсерные последовательности, включая 5,8S рРНК, амплифицировали из штаммов *C. militaris* ; В, Филогенетическое

древо на основе максимальной вероятности было создано среди *Cordyceps* spp. программой MEGA 6.06. Число на узлах соответствует процентам начальной загрузки на основе 2000 псевдорепликатов.

Выделение одной споры и идентификация идиоморфа MAT .

Отдельные споры были выделены из 12 штаммов *C. militaris* . Изолированные споры прорастали в WA через 5 дней ([Рис. 2А и 2В](#)). Поскольку выделение одной споры для всех штаммов повторяли пять раз, были выделены всего ($5 \times 12 = 60$) отдельные споры *C. militaris* . MAT ПЦР с амплификацией частичных генов *MAT1-1-1* и *MAT1-2-1* привела к тому, что *MAT1-1-1* был 457 п.н., а *MAT1-2-1* - 368 п.н. Исследование 60 отдельных спор с помощью MAT -PCR показало, что было выделено семь отдельных спор с *MAT1-1* и пять отдельных спор с *MAT1-2* ([Рис. 2С и 2D](#)). Название отдельной споры определяли путем добавления номера идиоморфа MAT к названию родительского штамма.

[Открыть в отдельном окне](#)

[Рис. 2](#)

Идентификация идиоморфа MAT в единичных спорах, выделенных из *Cordyceps militaris* . А. Суспензию конидий из мицелия размазывали, и через 5 дней в чашке с водяным агаром (WA) проращивали одиночные споры, отмеченные кружком; В: стромы с перитециями была прикреплена к крышке чашки WA, и отдельные споры, отмеченные кружком, прорастали в чашке WA через 5 дней; С, *MAT1-1-1* частичный ген *MAT1-1* и *MAT1-2-1* частичного гена *MAT1-2* амплифицировали. Продукты ПЦР подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле. М, маркер размера молекулы ступенчатой ДНК 100 п.н. Положительный контроль и отрицательный контроль использовали отдельные споры, которые идиоморф MAT были известны путем секвенирования. *MAT1-1-1* был успешно амплифицирован в семи отдельных спорах идиоморфа *MAT1-1* . *MAT1-1-1* не амплифицировался в пяти отдельных спорах идиоморфа *MAT1-2* ; D, *MAT1-2-1* был успешно амплифицирован в пяти отдельных спорах идиоморфа *MAT1-2* . *MAT1-2-1* не амплифицировался в семи отдельных спорах идиоморфа *MAT1-1* .

Спаривание и индукция стромы родительского штамма.

Спаривание было выполнено с 12 отдельными спорами, состоящими из семи отдельных спор с *MAT1-1* и пяти отдельных спор с *MAT1-2* путем индукции стромы в коричневом рисе, куколках *тутового* шелкопряда и среде PDB. Спаривание 35 комбинаций проводили путем индукции стромы во всех средах. Строма индуцировалась примерно через 50 дней. Восемь комбинаций из 35 комбинаций были успешно скрещены с образованием стромы с перитециями в среде бурого риса. Были получены вновь спарившиеся штаммы ([Рис. 3](#)). Некоторые комбинации вообще не производили строму, а другие комбинации производили аномальную строму без перитеций ([Рис. 4А и 4В](#)). Штаммы с аномальной стромой без перитеций не спаривались, являясь фертильными. Хотя были спаренные штаммы, имеющие нормальную строму с перитециями в среде из коричневого риса (KSP1, KSP2, KSP3, KSP4, KSP5, KSP6, KSP7, KSP7 и KSP8) ([Рис. 4С](#)), эти штаммы не могли продуцировать нормальную строму в куколке *тутового* шелкопряда и среде PDB.

[Открыть в отдельном окне](#)

[Рис. 3](#)

Комбинации спаривания на основе разделенных 12 отдельных спор в среде коричневого риса. Матываются только восемь комбинаций. Спарившиеся штаммы были выделены серым цветом и названы.

[Открыть в отдельном окне](#)

[Рис. 4](#)

Восемь скрещенных штаммов *Cordyceps militaris* в среде коричневого риса. А - строма с перитением в спарившейся штамме; В - строма без перитений у неместного штамма; С. Восемь скрещенных штаммов *Cordyceps militaris* в этом исследовании.

Содержание кордицепина в среде коричневого риса.

Измеряли содержание кордицепина в родительских и спаренных штаммах, культивируемых в среде коричневого риса. Величина времени удерживания стандартного кордицепина составляла 12,23 мин при оптимальных хроматографических условиях. Калибровочную кривую построили с данными стандартного образца, которые измеряли в трех повторностях от 7,8125 до 500 мкг / мл. Установленная стандартная кривая кордицепина и R-квадрат составила $Y = 3,24E + 10X - 794,785,435$ ($R^2 = 0,9998$). Содержание кордицепина в двадцати родительских штаммах и восьми скрещенных штаммах измеряли в трех повторностях. Рассчитывали содержание кордицепина на 1 г ДСВ. Среднее содержание кордицепина в стромах и склероции было установлено равным содержанию кордицепина в каждом штамме. Содержание кордицепина в склероции было установлено на уровне содержания кордицепина в штаммах, у которых не образовывалась строма. Среднее содержание кордицепина в 12 родительских штаммах составляло 3,06 мг / г. Среди трех лидирующих штаммов родительских штаммов (КАСС44461, КАСС40226 и SPNU1006) КАСС44461 продуцировал наибольшее количество кордицепина (4,89 мг / г), за ним следует SPNU1006 (4,22 мг / г) (по ANOVA) ([Рис. 5А](#)). Среднее содержание кордицепина в восьми скрещенных штаммах составляло 2,85 мг / г. Штамм, продуцирующий наибольшее количество кордицепина, был KSP8 (6,63 мг / г), вторым по величине штаммом был KSP7 (3,8 мг / г) (по ANOVA) ([Рис. 5В](#)). Сравнение содержания кордицепина в трех верхних спариваемых штаммах и трех верхних родительских штаммах на основе результатов по содержанию кордицепина во всех штаммах показало, что KSP8 продуцирует наибольшее количество кордицепина среди трех верхних скрещенных штаммов и трех верхних родительских штаммов (по ANOVA) ([Рис. 6А](#)). Штамм KSP8 продуцировал больше всего кордицепина. Следовательно, KSP8, продуцирующий больше всего кордицепина среди всех штаммов, был создан путем скрещивания. Содержание кордицепина в KSP8 увеличилось на 35% от содержания кордицепина в родительском штамме КАСС44461, продуцирующем больше всего кордицепина в коричневом рисе.

[Рис. 5](#)

Содержание кордицепина во всех штаммах *Cordyceps militaris* в среде коричневого риса. Содержание кордицепина в 12 родительских штаммах (А) и восьми скрещенных штаммах (В) в среде коричневого риса. Планки погрешностей указывают на стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Различные буквы над полосой содержания кордицепина означают значительную разницу в зависимости от штамма ($p < 0,001$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Дункана).

[Рис. 6](#)

Сравнение содержания кордицепина между тремя ведущими родительскими и спаренными штаммами. А - содержание кордицепина в трех верхних родительских штаммах и скрещенных штаммах в среде коричневого риса; В. Влияние среды на продукцию кордицепина. Содержание кордицепина в трех верхних спариваемых и родительских штаммах определяли по трем средам (коричневый рис, куколки тутового шелкопряда, бульон с картофельной декстрозой). Планки погрешностей указывают на стандартное отклонение содержания кордицепина. Различные буквы над полосой содержания кордицепина означают значительную разницу в зависимости от штамма и указаны независимо от среды ($p < 0,001$, однофакторный дисперсионный анализ с последующим тестом Дункана).

Влияние среды на продукцию кордицепина.

Содержание кордицепина во всех штаммах, культивируемых в среде PDA и тутового шелкопряда, сравнивали с содержанием кордицепина во всех штаммах, культивируемых в среде коричневого риса. Кордицепин в PDB измеряли отдельно для мицелия и супернатанта. Содержание кордицепина в шести ведущих штаммах среди всех штаммов было представлено в [Рис. 6В](#). Шесть лучших штаммов были определены путем расчета среднего содержания кордицепина для всех штаммов, каждый из которых культивировался во всех средах. Спаренный штамм KSP8 продуцировал больше кордицепина, чем KACC44461, во всех испытанных средах. Кроме того, результаты анализа содержания кордицепина по данным СМИ показали, что штаммы *C. militaris* продуцировали наибольшее количество кордицепина в среде куколок тутового шелкопряда и второе по величине кордицепин в среде коричневого риса независимо от штаммов, тогда как *C. militaris*, культивируемый в PDB, продуцировал наименьшее количество кордицепина (по ANOVA) ([Таблица 2](#)).

Таблица 2

Содержание кордицепина в различных носителях

PDB, картофельный бульон с декстрозой.

F-значение = 85,907, $p = 0,000$.

[Перейти к:](#)

ОБСУЖДЕНИЕ

C. militaris - наиболее полезный вид *Cordyceps* . так как он содержит не только много биологически активных веществ, но и самое высокое содержание кордицепина среди *Cordyceps* spp. Кордицепин проявляет различные эффекты физиологической активности, включая противоопухолевые, противозрастные, антивирусные и антилейкемические. В этом исследовании новый штамм *C. militaris* был разработан путем скрещивания двух штаммов *C. militaris* . Комбинация двух *C. militaris* увеличивает продуктивность кордицепина не сообщается. Комбинацию произвольно проводили между двумя отдельными спорами *C. militaris* и получали новый *C. militaris* с большим количеством кордицепина.

Спаривание осуществляли путем инокуляции изолированных единичных спор в среду из коричневого риса. Восемь комбинаций были успешно матированы из 35 комбинаций. Причина получения около 23% спариваемых штаммов - это не только сочетание отдельных спор разных типов спаривания, но и другие факторы, которые, по-видимому, необходимы для индукции полового цикла путем спаривания. Снижение активности грибов может быть связано со снижением экспрессии генов, связанных с индукцией стромы и половым циклом [[21](#) , [22](#)]. Возможно, что есть спаривающиеся штаммы, которые не продуцировали строму из-за дегенерации. Однако это не может быть подтверждено невооруженным глазом, и нет никаких признаков, вызывающих спазм, как у других грибов, принадлежащих к Basidiomycota.

Результаты сравнения содержания кордицепина во всех протестированных штаммах показали, что KSP8 продуцирует больше всего кордицепина. Вероятно, рекомбинация генов вызвана половым размножением. Спаривание двух отдельных спор вызывает кариогамию и мейоз, провоцируя рекомбинацию гена, связанного с синтезом кордицепина. Таким образом, содержание кордицепина в спариваемом штамме не связано напрямую с содержанием кордицепина в родительском штамме. Производство кордицепина в различных средах показало, что содержание кордицепина в среде куколок тутового шелкопряда было самым высоким среди трех сред. Однако заболеваемость стромой в среде куколок тутового шелкопряда была ниже, чем в среде из коричневого риса. Предположительно, это связано с тем, что среда куколки тутового шелкопряда не подходит для образования стромы [[23](#) , [24](#)].

Новые штаммы *C. militaris* , KSP8, продуцирующие наибольшее количество кордицепина среди 12 родительских штаммов и восьми скрещенных штаммов, были получены путем скрещивания. Промышленная ценность новых штаммов *C. militaris* возрастает с увеличением содержания кордицепина. Этот результат означает, что при спаривании будет получен новый штамм с более высоким уровнем продукции кордицепина, чем у известных штаммов.

[Перейти к:](#)

БЛАГОДАРНОСТИ

Это исследование было поддержано Исследовательским фондом 2017 года через Университет Янгсан, Пусан, Южная Корея.

[Перейти к:](#)

Ссылки

1. Сун Г.Х., Хиуэл-Джонс Н.Л., Сун Дж.М., Луангса-ард Дж.Дж., Шреста Б., Спатафора Дж.В. Филогенетическая классификация *кордицепса* и ключичных грибов. *Stud Mycol.* 2007; 57 : 5–59. [[Бесплатная статья PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Масуда М., Урабе Э., Хонда Х., Сакураи А., Сакакибара М. Повышенное производство кордицепина путем поверхностного культивирования с использованием лекарственного гриба *Cordyceps militaris* . *Enzyme Microb Technol.* 2007; 40 : 1199–1205. [[Google Scholar](#)]
3. Нур Н. Химические ингредиенты *Cordyceps militaris* . *Микобиология.* 2008; 36 : 233–235. [[Бесплатная статья PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Лю И, Ван Дж, Ван В., Чжан Х, Чжан Х, Хань С. Химические составляющие и фармакологические действия *Cordyceps sinensis* . *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015 : 575063. [[Бесплатная статья PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Тиан Х, Ли У, Шен У, Ли Q, Ван Q, Фэн Л. Апоптоз и ингибирование пролиферации раковых клеток, индуцированные кордицепином. *Oncol Lett.* 2015; 10 : 595–599. [[Бесплатная статья PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Чо Х. Дж., Чо Дж. Й., Ри М. Х., Лим Ч. Р., Пак Х. Дж. Кордицепин (3'-дезоксаденозин) ингибирует агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную U46619, аналогом ТХА2. *J Pharm Pharmacol.* 2006; 58 : 1677–1682. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Рамеш Т., Ю С.К., Ким С.В., Хван С.И., Сон С.Х., Ким И.В., Ким С.К. Кордицепин (3'-дезоксаденозин) ослабляет возрастной окислительный стресс и улучшает антиоксидантную способность у крыс. *Exp Gerontol.* 2012; 47 : 979–987. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Мюллер В.Е., Вейлер Б.Е., Чарубала Р., Пфлейдерер В., Лезерман Л., Соболев Р.В., Суходольник Р.Дж., Шредер Х.С. Аналоги 2', 5'-олигоаденилата кордицепина ингибируют инфицирование вирусом иммунодефицита человека посредством ингибирования обратной транскриптазы. *Биохимия.* 1991; 30 : 2027–2033. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Zhou X, Cai G, He Y, Tong G. Отделение кордицепина от супернатанта ферментации *Cordyceps militaris* с использованием препаративной ВЭЖХ и оценка его антибактериальной активности как NAD (+) - зависимого ингибитора ДНК-лигазы. *Exp Ther Med.* 2016; 12 : 1812–1816. [[Бесплатная статья PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Линь Кью, Лонг Л., Ву Л., Чжан Ф., Ву С., Чжан В., Сун Х. Оценка различных сельскохозяйственных отходов для производства плодовых тел и биологически активных соединений лекарственным грибом *Cordyceps militaris* . *J Sci Food Agric.* 2016 Oct 17; DOI: 10.1002 / jsfa.8097. [Epub] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Чжэн П., Ся И, Сяо Г, Сюн Ц, Ху Х, Чжан С., Чжэн Х, Хуанг И, Чжоу И, Ван С. и др. Последовательность генома насекомого-патогенного гриба *Cordyceps militaris* , известного традиционного китайского лекарства. *Genome Biol.* 2011; 12 : R116. [[Бесплатная статья PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Шреста Б., Ким Х. К., Сун Г. Х., Спатафора Дж. В., Сун Дж. М.. Биполярный гетероталлизм, основная система скрещивания *Cordyceps militaris in vitro* . *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2004; 9 : 440–446. [[Google Scholar](#)]
13. Йокояма Э., Аракава М., Ямагиши К., Хара А. Филогенетический и структурный анализ локусов брачного типа у Clavicipitaceae. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 264 : 182–191. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Бенхали Дж. А., Коппин Э., Брун С., Пераза-Рейес Л., Мартин Т., Дикселиус К., Лазар Н., ван Тилберг Х., Дебучи Р. Сеть факторов транскрипции HMG-бокса регулирует половой цикл у гриба *Podospora anserina* . *PLoS Genet.* 2013; 9 : e1003642. [[Бесплатная статья PMC](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

15. Хун В., Цзин В., Нань Л., Айпин Ф., Минг Жи С., ДаПенг Б. Распределение генов типа спаривания у плодовых и неплодоносных форм *Cordyceps militaris*. Ши Юн Цзюнь Сюэ Бао. 2010; 17 : 1–4. [[Google Scholar](#)]
 16. Che Z, Wang Y, Zhou L, Tang C. Исследование селекции нового сорта *Cordyceps militaris* путем мутации под действием ультрафиолетового излучения. Food Ferment Ind. 2004 ; 30 : 35–38. [[Google Scholar](#)]
 17. Дас С.К., Масуда М., Хаташита М., Сакураи А., Сакакибара М. Новый подход к повышению продуктивности кордицепина в поверхностной жидкой культуре *Cordyceps militaris* с использованием ионно-лучевого облучения высокой энергии. Lett Appl Microbiol. 2008; 47 : 534–538. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
 18. Дойл Дж. Протоколы ДНК для растений. В: Hewitt GM, Johnston AW, Young JP, редакторы. Молекулярные методы в таксономии. Берлин: Springer; 1991. С. 283–293. [[Google Scholar](#)]
 19. Ван Л., Чжан В.М., Ху Б., Чен Ю.К., Цюй Л.Х. Генетическая изменчивость *Cordyceps militaris* и его союзников на основе филогенетического анализа данных последовательностей ITS рДНК. Грибные ныряльщики. 2008; 31 : 147–155. [[Google Scholar](#)]
 20. Тан Кью, Цай Т., Вэй Дж., Фэн А., Мао В., Бао Д. Молекулярная идентификация генов типа спаривания в бесполом споре *Cordyceps militaris*; Материалы 7-й Международной конференции по биологии грибов и грибным продуктам; 2011 4-7 октября; Аркашон, Франция. Париж: Национальный институт агрономических исследований (INRA); 2011. С. 52–56. [[Google Scholar](#)]
 21. Шреста Б., Пак Й.Дж., Хан С.К., Чой С.К., Сун Дж.М. Нестабильность плодоношения *Cordyceps militaris in vitro*. J Mushroom Sci Prod. 2004; 2 : 140–144. [[Google Scholar](#)]
 22. Батт Т.М., Ван Ч., Шах Ф.А., Холл Р. Дегенерация энтомогенных грибов. В: Эйленберг Дж., Хокканен Х.М., редакторы. Экологический и социальный подход к биологическому контролю. Дордрехт: Спрингер; 2006. С. 213–226. [[Google Scholar](#)]
 23. Чо С.М., Пак Х.Дж., Со Г.С., Хун Дж. Д.. Влияние состава *medis* на кордицепин и состав пищевых компонентов *Cordyceps militaris*. Kor J Mycol. 2009; 37 : 161–166. [[Google Scholar](#)]
 24. Вэнь Т.С., Кан Дж.С., Хайд К.Д., Ли Г.Р., Кан Ч., Чен Х. Фенотипическая маркировка плодовых тел *Cordyceps militaris* и их производство кордицепина. Chiang Mai J Sci. 2014; 41 : 846–857. [[Google Scholar](#)]
-

Здесь представлены статьи по микобиологии , любезно предоставленные **Корейским обществом микологов.**