

竹黄伴生真菌对竹红菌甲素合成的调控作用

郑丽屏¹, 季红瑶², 周建芹², 王剑文^{2*}

1 苏州大学 金螳螂建筑学院, 江苏 苏州

2 苏州大学 药学院, 江苏 苏州

郑丽屏, 季红瑶, 周建芹, 王剑文. 竹黄伴生真菌对竹红菌甲素合成的调控作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(4): 1758-1773.

ZHENG Liping, JI Hongyao, ZHOU Jianqin, WANG Jianwen. *Shiraia* fruiting body-associated fungi regulate the biosynthesis of hypocrellin A[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(4): 1758-1773.

摘要: 竹黄是一种传统中药, 来源于寄生在竹子上的竹黄属(*Shiraia*)真菌子实体。竹红菌甲素(hypocrellin A, HA)是竹黄中的活性萜醌成分, 是一种具有抗肿瘤、抗菌作用的非卟啉类新型光敏剂。【目的】探讨竹黄菌子实体伴生真菌对宿主竹红菌甲素合成的影响, 并构建伴生菌-竹黄菌共培养方法以生产竹红菌甲素。【方法】从竹黄菌子实体中分离得到伴生真菌, 采用平板对峙法筛选能够影响竹黄菌竹红菌甲素合成的伴生菌株, 比较活性菌株胞内及胞外成分对竹红菌甲素的诱导作用, 并建立与优化伴生菌-竹黄菌共培养技术。【结果】从竹黄菌子实体中分离得到 34 株真菌, 包括 6 株竹黄菌和 28 株伴生真菌。镰孢菌(*Fusarium* sp.) SF12 及其胞外多糖具有促进竹红菌甲素合成的能力。镰孢菌 SF12 对竹黄菌(*Shiraia* sp.) S9 的生长无显著影响, 但可通过上调竹黄菌中竹红菌甲素合成的关键酶基因转录水平, 促进竹红菌甲素的合成。在竹黄菌培养 24 h 后加入镰孢菌 SF12 孢子(100 个/mL), 竹红菌甲素的总产量在第 8 天达到 209.46 mg/L, 是对照组的 1.93 倍。【结论】竹黄菌子实体中存在丰富的伴生真菌, 伴生镰孢菌 SF12 与宿主竹黄菌的共培养是一种提高竹红菌甲素生物技术生产的新型诱导技术。

关键词: 竹黄菌; 子实体; 伴生真菌; 竹红菌甲素; 共培养

资助项目: 国家自然科学基金(82073955, 81773696); 江苏省高校优势学科建设工程项目(PAPD)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82073955, 81773696) and the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (PAPD).

*Corresponding author. E-mail: jwwang@suda.edu.cn

Received: 2025-01-05; Accepted: 2025-02-19; Published online: 2025-03-07

Shiraia fruiting body-associated fungi regulate the biosynthesis of hypocrellin A

ZHENG Liping¹, JI Hongyao², ZHOU Jianqin², WANG Jianwen^{2*}

1 Gold Mantis School of Architecture, Soochow University, Suzhou, Jiangsu, China

2 College of Pharmaceutical Sciences, Soochow University, Suzhou, Jiangsu, China

Abstract: The fruiting bodies of fungi of genus *Shiraia* inhabiting bamboo have a medicinal use in traditional Chinese medicine. Hypocrellin A (HA), the main bioactive perylenequinone pigment from *S. bambusicola* fruiting bodies is a novel non-porphyrin photosensitizer with antitumor and antimicrobial properties. **[Objective]** To investigate the effects of *Shiraia* fruiting body-associated fungi on HA biosynthesis and develop a co-culture method for enhancing HA production. **[Methods]** *Shiraia* fruiting body-associated fungi were isolated and the strains influencing HA biosynthesis were screened by a plate confrontation assay. The effects of intracellular and extracellular metabolites of the strains on HA production were evaluated. A co-culture system for *Shiraia* sp. S9 and associated fungi was established and optimized for enhancing HA production. **[Results]** There were 34 fungal strains including 6 host *Shiraia* strains isolated from the fruiting bodies. Among them, *Fusarium* sp. SF12 and its extracellular polysaccharides significantly promoted HA biosynthesis. *Fusarium* sp. SF12 did not noticeably affect the growth of *Shiraia* sp. S9 but regulated HA synthesis by upregulating the transcription levels of key enzyme genes involved in HA biosynthesis. The total HA yield was enhanced to 209.46 mg/L on day 8 after adding spores (100 cell/mL) from *Fusarium* sp. SF12 to the *Shiraia* culture at the time point of 24 h, which was 1.93 times that of the control. **[Conclusion]** There are diverse fungi in *Shiraia* fruiting bodies. The co-culture of the associated fungus *Fusarium* sp. SF12 and the host *Shiraia* sp. S9 is a new technique to improve HA production.

Keywords: *Shiraia*; fruiting bodies; associated fungi; hypocrellin A; co-culture

竹黄属 (*Shiraia*) 真菌是侵染短穗竹属 (*Brachystachyum*) 植物的子囊菌, 竹黄菌发育形成的粉红色、瘤状龟裂的子实体(图 1A)又名竹黄、竹花^[1-2], 具活血化瘀、通经活络的功效, 民间常将其用于治疗虚寒胃痛、风湿性关节炎、气管炎等症, 是重要的中药资源。竹红菌甲素 (hypocrellin A, HA) (图 1B) 是竹黄菌的主要萜醌类成分^[3], 是我国科学工作者发现的一种新型非卟啉类天然光敏剂, 已成功研制为临床上使用的竹红菌素软膏, 治疗外阴白色病损等皮肤

病^[4-5]。HA 吸收光谱广, 光照下单线态活性氧产率高, 暗毒性低、代谢速率高。在致病真菌、病毒及肿瘤的光化学疗法以及光敏性生物农药的研发中具有重要的应用潜力^[6]。然而, 竹黄仅分布于我国云南、浙江、安徽等地, 其生长季节为每年的春夏季(3-6月), 且竹黄的人工栽培尚未见成功报道。另一方面, 竹红菌甲素在竹黄中含量较低, 其结构复杂导致化学合成步骤长、催化困难^[7]。目前, 采摘收集的野生竹黄仍是竹红菌甲素的主要来源, 其产量无法满足医

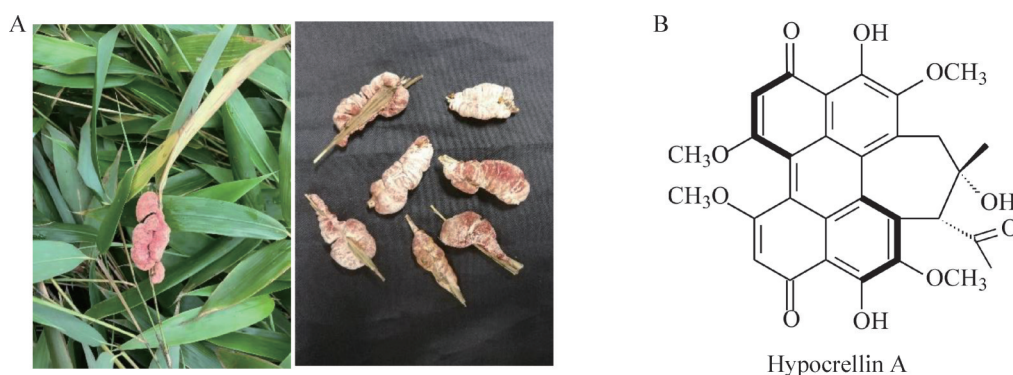


图1 生长在竹枝上的竹黄(A)及竹红菌甲素结构式(B)

Figure 1 The *Shiraia* stroma from the bamboo branches (A) and the chemical structure of hypocrellin A (B).

药行业的需求。

与植物内生菌的研究相比,目前关于子实体内微生物菌群的报道还较为少见。野生竹黄菌子实体中存在着丰富多样的非宿主微生物, Ma 等^[8]分离得到芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)等 31 株伴生细菌。李强等^[9]从翘鳞肉齿菌子实体中分离得到属于 14 个属的 26 株真菌,其中假单胞菌属真菌约占分离总数的 26.9%。毛霉(*Mucor*)、赤霉(*Gibberellins*)、交链孢霉(*Alternaria*)、双足囊菌(*Dipodascus*)分离自干巴菌(*Thelephora ganbajun*)子实体^[10]。王冉等^[11]从昆明市嵩明县和楚雄彝族自治州禄丰县采集的 8 个干巴菌子实体中共分离得到 114 株真菌,其中 62% 的真菌属于子囊菌门(*Ascomycota*)。Yurkov 等^[12]从 2 种牛肝菌子实体中分离出 17 株酵母菌,这些伴生酵母菌会影响子实体的发育。灵芝菌丝可以与伴生真菌菌丝交织、扭结生长,表现出较为亲密的共生关系,且并无显著的排斥作用^[13]。猪苓菌[*Grifola umbellata* (Pers.) Pilat]与伴生真菌在共培养第 20 天后,相互接触形成拮抗线,阻止对方菌丝的侵入。然而,在蜜环菌(*Armillariella mellea*)侵染猪苓菌的过程中,伴生菌起到了一定的促进作用^[14]。此外, Ma 等^[15]将从竹黄子实体中分离得到 3 株假单胞菌加入

到竹黄菌菌丝培养体系中,均能显著促进竹红菌素的产量。目前,关于竹黄菌子实体内伴生真菌的研究尚未见报道,且子实体内伴生菌与宿主真菌在次生代谢上的关系研究也较为少见。本研究从野生竹黄中分离获得伴生真菌,并通过拮抗实验和共培养方法考察了伴生真菌与宿主竹黄菌在生长和竹红菌甲素合成上的关系,筛选获得能够诱导、刺激宿主竹红菌甲素合成的共培养方法以期子实体伴生真菌调控宿主真菌次生代谢能力提供线索,也为萆醌类光敏药物——竹红菌甲素的生物技术生产提供新的诱导技术。

1 材料与方法

1.1 材料

2016 年 6–7 月,于浙江省杭州市临安区天目山短穗竹(*B. densiflorum*)林地(3 个 100 m²)上随机采集竹黄子实体样本(30 个),并将其密封于冰袋中。在实验室中,对竹黄子实体进行表面灭菌,参照 Cheng 等^[16]的方法分离竹黄菌子实体内的真菌,并进行纯化培养,直至获得性状稳定的单一菌落(图 2A)。宿主竹黄菌菌株(*Shiraia* sp.) S9 的中国普通微生物菌种保藏管理中心编号为 CGMCC 16369。

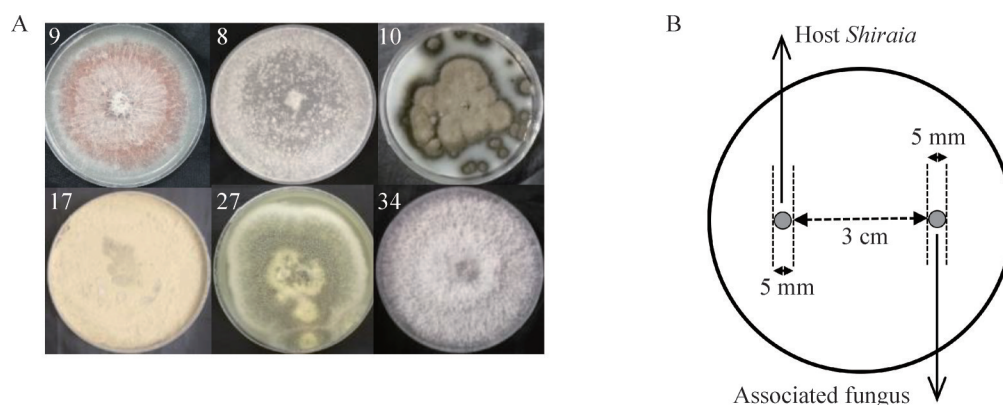


图2 竹黄菌子实体内伴生真菌及其与宿主真菌共培养图示。A: 从子实体中分离得到竹黄菌(No. 9)和部分伴生真菌菌株(No. 8、10、17、27和34); B: 宿主竹黄菌和伴生菌平板对峙法筛选图示。

Figure 2 The associated fungi isolated from *Shiraia* fruiting bodies and their co-cultures with host fungus. A: *Shiraia* strain (No. 9) and other samples of the associated fungi (No. 8, 10, 17, 27, and 34) isolated from the fruiting bodies; B: Scheme of the *in vitro* confrontation assay between *Shiraia* host and the associated fungus in the fruiting body.

1.2 菌株培养

1.2.1 固体培养

使用马铃薯-葡萄糖-琼脂(PDA)培养基进行平板培养, 平板放置在黑暗条件下 28 °C 培养 6 d。

1.2.2 液体培养

使用装有 50 mL 液体发酵培养基^[16]的 150 mL 锥形培养瓶, 28 °C、150 r/min 振荡培养 8–10 d。

1.3 菌株的形态观察和内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS) 序列鉴定

菌株在 PDA 平板上 28 °C 培养 6–8 d 后, 拍照记录菌落形态。使用真菌特异性引物 ITS-1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS 区, 采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树^[17]。

1.4 竹黄菌和伴生真菌的共培养

1.4.1 平板共培养

参考 Qian 等的平板对峙法^[18]构建共培养筛选平板(图 2)。将竹黄菌 S9 菌株与无菌琼脂块

分别接种于 PDA 平板, 作为空白对照。

1.4.2 液体发酵共培养

在竹黄菌培养 3 d 时, 将伴生真菌的孢子 (60 个/mL) 加入, 待竹黄菌培养 8 d 后, 检测生物量及 HA 产量。以加入等体积无菌双蒸水作为对照组。

1.5 伴生真菌诱导成分提取

参考王剑文等^[19]报道的内生菌诱导子制备方法提取伴生真菌诱导活性成分。分别收集胞内多糖(intracellular polysaccharides, IPS)和胞外多糖(exopolysaccharides, EPS)。用 3 倍体积的乙酸乙酯对真菌发酵液进行萃取, 得到胞外乙酸乙酯提取物(extracellular ethyl acetate extracts, EEa)。用 10 倍体积的乙酸乙酯、石油醚和乙醇对烘干菌丝进行超声提取(1 h), 分别得到菌丝石油醚提取物(petroleum ether extracts, IPe)、氯仿提取物(chloroform extracts, ICh)和乙醇提取物(ethanol extracts, EtOH)。竹黄菌液体摇瓶培养 3 d 后, 分别加入真菌 SF12 孢子(SP, 50 个/mL)及各提取物。竹黄菌培养 8 d 后, 收获菌丝。竹

黄菌单培对照组中加入等体积乙醇水溶液。

1.6 竹黄菌与伴生真菌共培养条件优化

1.6.1 孢子浓度筛选

竹黄菌液体培养的第3天,将镰孢菌 SF12 孢子按浓度 $(6-140) \times 10^4$ 个/L 加入到竹黄菌丝培养中,竹黄菌培养8 d后,收获菌丝。竹黄菌单培养中加入等体积无菌双蒸水作为对照组。

1.6.2 处理时间筛选

在竹黄菌液体培养过程中,分别在每天相同时间向竹黄菌单培养摇瓶中加入镰孢菌 SF12 孢子(100 个/mL),竹黄菌培养8 d后,收获菌丝。对照组为未加入镰孢菌 SF12 孢子的竹黄菌培养组。

1.7 菌丝培养 pH、残糖及竹红菌甲素含量测定

在竹黄菌菌丝液体培养过程中测定培养液的 pH 值,并根据硫酸-蒽酮法^[20]测定培养液中的残糖浓度。

采用高效液相色谱系统(安捷伦科技有限公司),根据 Sun 等^[21]报道的 HA 提取及高效液相色谱(HPLC)检测方法测定菌丝及培养液中的 HA 含量。

1.8 竹红菌甲素合成关键酶基因表达测定

将竹黄菌菌丝用液氮研磨成粉末,提取竹黄菌的总 RNA。根据 Lei 等^[22]的研究选择竹红菌甲素合成关键酶基因,利用实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)进行测定,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算基因表达相对量。

1.9 统计分析

实验对照组和处理组均为3次重复(每次重复至少3个平行组实验, $n \geq 3$)。实验数据以平均数 $\pm$ 标准差表示,采用 Student's *t*-test 检验分析实验结果,*表示 $P < 0.05$; **表示 $P < 0.01$ 。采用 one-way ANOVA 分析实验结果,小写字母表示

不同处理组之间的差异显著性($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 竹黄菌及其伴生菌的分离

从竹黄菌新鲜子实体中共分离出34株真菌菌株。通过 ITS 序列鉴定和显微形态观察发现,这些真菌分属2门7纲9目9科和9属(表1),其中子囊菌门为主要类群,约占73.5%。主要的真菌属为竹黄属,约占26.5%。表2中的1、3、9、14、24和25号为分离得到的6株竹黄属真菌。其中,产竹红菌素的竹黄菌(*Shiraia* sp.) S9 的分子鉴定及其竹红菌甲素合成能力已在本课题组 Ma 等^[15]的研究中进行了报道。本研究以该菌株为宿主菌,探讨子实体伴生菌对宿主竹红菌甲素合成的影响。其余28株为伴生真菌,其中隶属于子囊菌纲炭角菌目的节菱孢属(*Arthrrium*)约占11.8%。此外,本研究还分离出9株担子菌,包括3株平革菌属(*Phanerochaete*)、2株栓菌属(*Trametes*)和4株其他属的真菌(表1)^[23]。

2.2 诱导宿主竹红菌甲素合成的伴生菌筛选

将28株伴生真菌分别与竹黄菌 S9 进行平板对峙筛选(表1,图3)。结果显示,伴生菌对竹红菌甲素合成的影响存在显著差异。其中,10株伴生真菌(7、10、17、18、19、20、21、24、27和31号)显著抑制了HA的合成。竹黄菌 S9 在与17号或19号真菌共培养时,HA合成则完全被抑制。其他伴生菌在平板上与竹黄菌 S9 共培养时,均显著促进了HA的积累。进一步选取具有诱导作用的11、12、15、16和30号伴生真菌进行液体发酵共培养实验,将伴生菌孢子(6×10^4 个/L)加入到已培养3 d的竹黄菌菌丝液体培养中,继续培养5 d。结果如图3所示,伴生真菌(11、12和15号)对竹黄菌生长无

表1 分离自竹黄菌子实体的伴生真菌及其对竹红菌甲素合成的影响

Table 1 The isolates from *Shiraia* fruiting bodies and the HA production in the plate inoculated with *Shiraia* host (No. 9) and the associated fungus respectively

Strain No.	Fungal species and accession number of the nearest match	Identity (%)	Query coverage (%)	Co-culture with No. 9 HA contents (mg/plate)
1	<i>Shiraia</i> sp. Z3 (JN198483.1)	99	97	–
3	<i>Shiraia</i> sp. A8 (FJ560594.1)	99	98	–
9	<i>Shiraia</i> sp. S9 (MF062656.1)	100	100	0.55±0.04
14	<i>Shiraia</i> sp. isolate TY1-2 (MH059549.1)	99	90	–
23	<i>Shiraia</i> sp. ML-2004 (AY425966.2)	99	99	–
25	<i>Shiraia</i> sp. isolate L34 (MH237669.1)	99	98	–
19	<i>Aspergillus niger</i> isolate SOS2 (MK543209.1)	98	100	ND
17	<i>Paecilomyces</i> sp. strain BCC84310 (MF780707.1)	99	100	ND
21	<i>Nigrospora chinensis</i> strain LC2696 (KX985947.1)	99	99	0.20±0.05**
24	<i>Colletotrichum</i> sp. JP163 (AB255291.1)	98	96	0.21±0.07**
7	<i>Pleosporeales</i> sp. zzz1429 (HQ696060.1)	99	99	0.33±0.05**
10	<i>Cladosporium</i> sp. strain AX17 (MH884140.1)	99	95	0.33±0.03**
18	<i>Arthrinium arundinis</i> isolate B106-17 (MN313263.1)	98	98	0.38±0.06*
20	<i>Arthrinium</i> sp. strain CS06 (KX015984.1)	99	97	0.38±0.03*
31	<i>Colletotrichum</i> strain MAFF 241876 (AB738858.1)	98	95	0.43±0.05*
27	<i>Talaromyces marneffei</i> isolate M7L (MF687277.1)	100	99	0.45±0.02*
2	<i>Trametes versicolor</i> isolate 5 (KC461299.1)	95	99	0.63±0.02**
6	<i>Arthrinium</i> sp. LH52 (HQ832803.1)	99	99	0.66±0.04*
33	<i>Phanerochaete sordida</i> isolate T8 (JN253600.1)	99	100	0.71±0.03*
28	<i>Pleosporeales</i> sp. DX-FOR1 (KC871044.1)	99	99	0.72±0.05*
26	<i>Xylariales</i> sp. GT2 (KJ636464.1)	99	98	0.76±0.02**
22	<i>Panus lecomtei</i> strain HHB-9614 (KP135329.1)	100	99	0.93±0.07**
34	<i>Arthrinium</i> sp. strain 2-1 (KX378907.1)	99	100	1.04±0.06**
5	<i>Penicillium</i> sp. BAB-5444 (KT355727.1)	99	99	1.07±0.33**
8	<i>Phanerochaete sordida</i> strain A0595 (KF494816.1)	99	98	1.13±0.37**
4	<i>Talaromyces marneffei</i> strain LCC17 (KF990134.1)	99	99	1.17±0.13**
13	<i>Lecanicillium psalliotae</i> (KR866082.1)	98	98	1.18±0.16**
29	<i>Nigrospora</i> sp. TPL17 (KJ863499.1)	99	99	1.28±0.20**
12	<i>Fusarium</i> sp. strain AX16 (MH884139.1)	98	97	1.39±0.38**
32	<i>Coprinellus radians</i> strain DUCC5167 (MH844772.1)	99	99	1.96±0.23**
15	<i>Trametes versicolor</i> (GQ411515.1)	99	98	1.99±0.15**
30	<i>Phanerochaete sordida</i> strain ASD (KP986963.1)	99	96	2.12±0.82**
16	<i>Bjerkandera</i> sp. PTY1 (KF208520.1)	99	99	2.52±0.14**
11	<i>Polyporus arcularius</i> strain OC31 (KR183787.1)	99	98	2.69±0.20**

Values are mean±SD from three independent experiments. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ND: No detected; –: No production of HA.

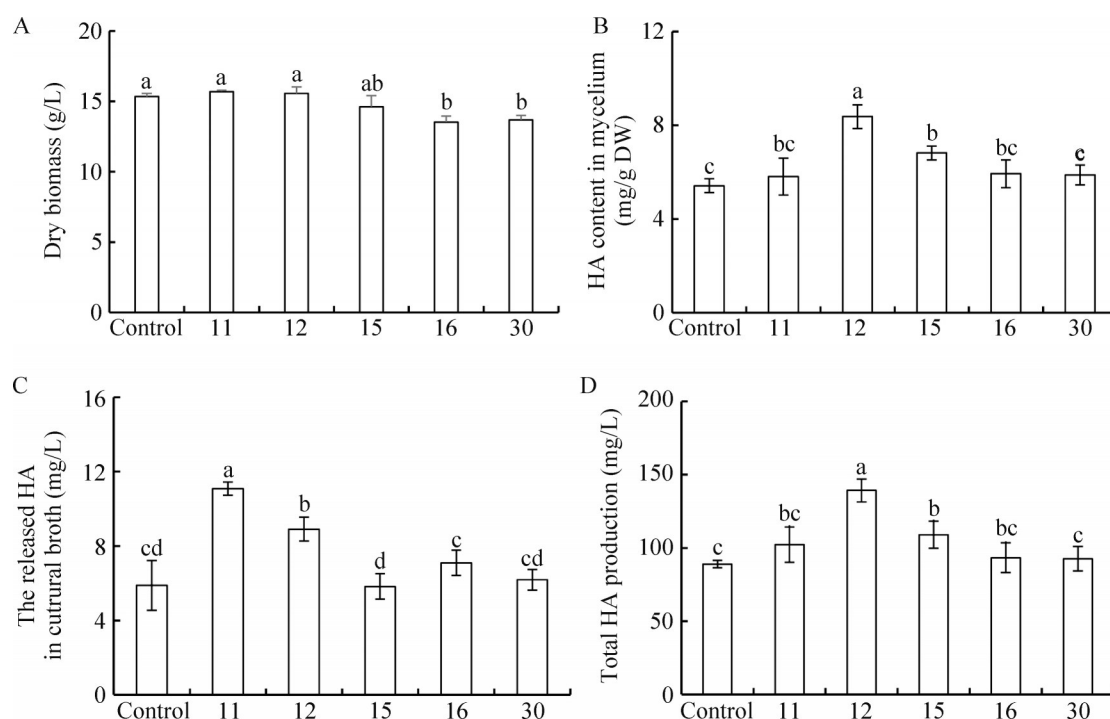


图3 伴生真菌对竹黄菌生长及HA合成的影响。A: 生物量; B: 菌丝HA浓度; C: 外泌HA浓度; D: HA总产量。

Figure 3 Effect of the associated fungi on fungal growth and HA production of *Shiraia* sp. S9. A: Effect on dry biomass; B: Effect on HA content in mycelium; C: Effect on the released HA in cultural broth; D: Effect on total HA production in mycelium culture. Different letters above the bars mean significant differences ($P < 0.05$).

显著影响, 而 16 号和 30 号真菌则显著抑制了竹黄菌的生长(图 3A)。同时, 12 号和 15 号真菌显著促进了胞内 HA 的合成(图 3B), 而 11 号和 12 号真菌显著提高了竹黄菌 S9 外排 HA 到培养基的能力(图 3C)。综合考虑对竹黄菌生长及竹红菌甲素合成和分泌的影响, 12 号真菌对 HA 总产量的促进效果最好, 可使 HA 产量提高至对照组的 1.56 倍。12 号真菌为镰孢菌(*Fusarium* sp.) SF12, 后续研究针对该菌进行诱导活性成分的研究和液体菌丝共培养技术的优化。

2.3 伴生菌诱导成分及调控作用

为了进一步探讨镰孢菌(*Fusarium* sp.) SF12 对宿主竹黄菌竹红菌甲素合成的诱导成分及机制, 提取了镰孢菌 SF12 的菌丝多糖以及小极性

溶液(乙酸乙酯、石油醚提取物及氯仿)提取物, 比较这些提取物成分和活菌共培养(SP)对竹黄菌 HA 产量的影响。结果显示, 各处理对竹黄菌的生物量无显著影响(图 4A)。EPS 处理、镰孢菌 SF12 活菌共培养(SP)和菌丝乙酸乙酯提取物(IEa)能显著促进竹黄菌胞内 HA 的产量, 而培养液乙酸乙酯提取物(EEa)则抑制了 HA 的合成(图 4B)。同时, 镰孢菌 SF12 共培养(SP)、EPS 和菌丝氯仿提取物(ICH)促进了 HA 向胞外的分泌, 而 EtOH、EEa 和 IPe 则显著抑制了 HA 的分泌(图 4C)。结合生物量、胞内合成和外泌的变化, 镰孢菌 SF12 活菌共培养和胞外多糖对 HA 总产量具有显著的促进作用(图 4D), 镰孢菌 SF12 活菌共培养可使 HA 的总产量提高至 157.23 mg/L, 比竹黄菌单培养对照提高了

45.95%。

在培养过程中, 培养液 pH 值维持在 6.0–8.0, 竹黄菌菌丝培养液的 pH 值未有显著变

化(图 5 A)。同时, 共培养也未影响竹黄菌培养基中糖的利用, 镰孢菌 SF12 共培养后的残糖浓度与单培养对照无显著差异(图 5B)。

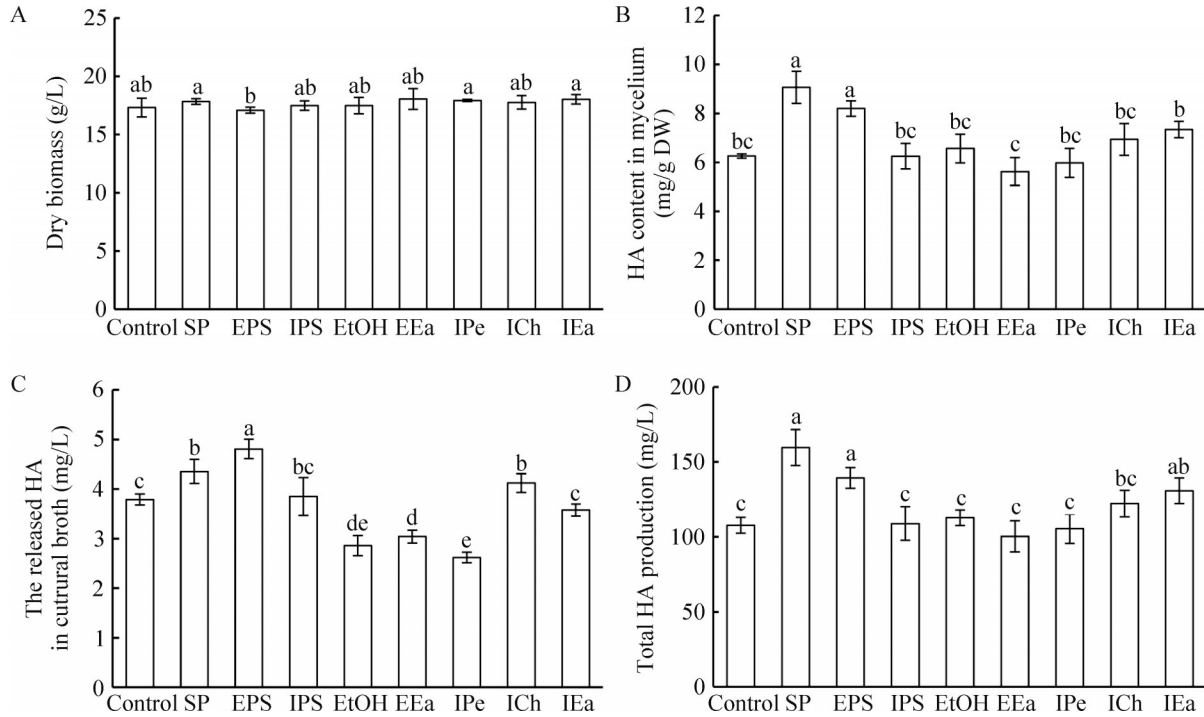


图4 镰孢菌SF12不同成分对竹黄菌生长及HA合成的影响。A: 竹黄菌生物量; B: 菌丝HA合成浓度; C: HA外泌浓度; D: HA总产量。

Figure 4 Effects of different fractions from *Fusarium* sp. SF12 on growth and HA biosynthesis of *Shiraia* sp. S9. A: Effect on fungal biomass; B: Effect on mycelial HA contents; C: Effect on the released HA in cultural broth; D: Effect on total HA production in mycelium culture. Values are mean±SD from three independent experiments. Different letters above the bars mean significant differences ($P<0.05$).

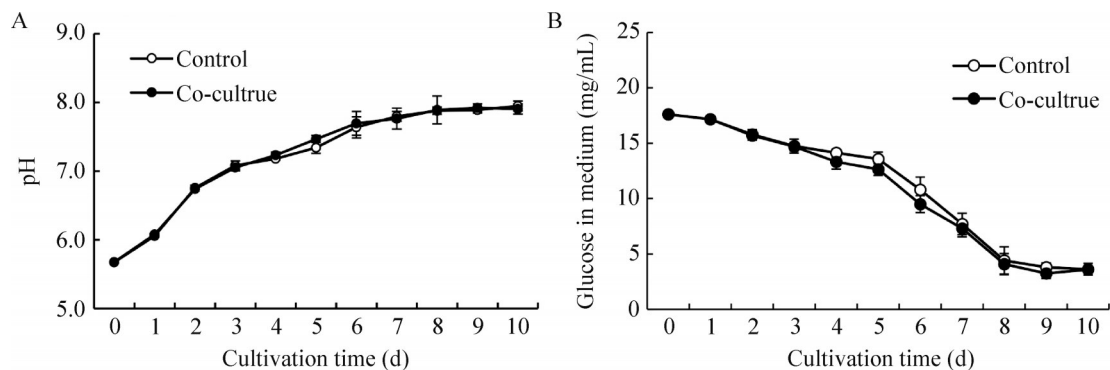


图5 镰孢菌SF12共培养对竹黄菌S9培养基pH值(A)和残糖浓度(B)的影响

Figure 5 Effect of the inoculation of *Fusarium* sp. SF12 on pH value (A) and residue glucose content (B) in the cultural medium of *Shiraia* sp. S9. Values are mean±SD from triple independent experiments.

为了探讨共培养促进 HA 合成的机制, 选择了前期通过转录组分析^[22]和基因组分析^[24-25]挖掘出的 HA 合成关键酶基因: FAD 氧化还原酶(*FAD*)、聚酮合酶(*PKS*)、MFS 转运蛋白(*MFS*)、单加氧酶(*Mono*)、氧甲基转移酶(*OmeF*)、多铜氧化酶(*MCO*)和锌指转录因子(*ZFTF*)基因(图 6A), 并考察了共培养对其表达的影响。结果显示, 镰孢菌 SF12 处理(48 h)上调了 HA 合成相关酶基因的表达水平(2.25–3.34 倍)(图 6B), 表明镰孢菌 SF12 可通过基因转录水平调控竹黄菌 HA 的合成。

2.4 伴生菌液体共培养诱导的优化

为了优化镰孢菌 SF12 与竹黄菌 S9 共培养促进 HA 合成的条件, 首先筛选了接入镰孢菌 SF12 的孢子数量。第 3 天加入镰孢菌 SF12 的孢子, 对竹黄菌的生长无显著影响(图 7A)。镰孢菌 SF12 孢子数量达到 20–100 个/mL 时, 显著促进了竹黄菌菌丝 HA 的合成(图 7B), 同时, 竹黄菌增加了 HA 向菌丝外分泌(图 7C)。当接入的孢子数量为 100 个/mL 时, HA 的总产量达到 156.12 mg/mL, 是对照组的 1.43 倍(图 7D)。

当接入镰孢菌 SF12 孢子浓度为 100 个/mL 时, 探讨了不同接入时间点对竹黄菌 S9 合成 HA 的影响。在竹黄菌培养开始时加入镰孢菌 SF12 孢子(图 8A, 第 0 天), 竹黄菌的初始生长被显著抑制了; 而从培养 24 h 后开始加入镰孢菌 SF12 孢子(图 8A, 第 1–7 天), 竹黄菌的生长并未受到镰孢菌 SF12 的影响。然而, 竹黄菌胞内 HA 的合成则受到镰孢菌 SF12 孢子加入(第 1–3 天)的显著促进(图 8B)。同时, 镰孢菌 SF12 孢子的加入还能促进 HA 的菌丝外分泌(图 8C)。综合生物量、HA 合成和外泌情况, 选择在竹黄菌培养 1 d 后加入 SF12 孢子, 此时 HA 的总产量可达 191.62 mg/mL (图 8D)。因此, 镰孢菌 SF12 与竹黄菌 S9 共培养时孢子接入的优化条件

为: 在竹黄菌培养 24 h 后加入镰孢菌 SF12 孢子(100 个/mL)。在 10 d 的培养过程中(图 9), 镰孢菌 SF12 孢子的加入显著促进了 HA 的产量(包括胞内产量和胞外产量), 竹黄菌 S9 与镰孢菌 SF12 的共培养使 HA 的总产量在第 8 天达到 209.46 mg/L, 是竹黄菌 S9 单培养对照组的 1.93 倍。

3 讨论与结论

内生真菌在植物寄主的生长发育过程中发挥着重要作用, 能够促进植物生长、提高植物抗逆、抗病性^[26]。由于与植物长期共存并协同进化, 许多内生真菌还具备产生与宿主植物相同或相似次生代谢物的能力^[27-28]。目前, 对大型真菌子实体内部菌群的生理功能的研究鲜有报道。许多食用和药用真菌的生活史复杂, 在其生长过程, 有特定的环境或伴生、寄生的生物种类要求。掌握它们的伴生菌群落多样性及分布, 可为野生真菌的人工栽培提供重要线索。近年来, 许多大型食用和药用真菌子实体中的伴生真菌陆续被发现并报道, 例如影响宿主生长的干巴菌和牛肝菌中的伴生真菌^[11-12]。冬虫夏草的伴生菌——皮落青霉(*Penicillium crustosum*)能够合成具有抗菌活性的苯二氮卓类、吲哚二萜类和喹诺酮类生物碱^[29]。Splivallo 等^[30]从松露(*Tuber borchii*)子实体中分离出的 α -和 β -变形菌可以将一些非挥发性前体物质转化为松露子实体香气中的噻吩衍生物。本研究从竹黄菌子实体中分离得到的 34 株伴生真菌主要属于节菱孢属(约占 11.8%)和平革菌属(约占 8.8%) (表 2)。Shen 等^[31]从毛竹(*Phyllostachys edulis*)种子中分离出 350 株真菌, 其中分布较多的属为枝孢属(*Cladosporium*)、链格孢属(*Alternaria*)、竹黄菌属(*Shiraia*)、弯孢霉属(*Curvularia*)、镰孢菌属(*Fusarium*)和节菱孢属

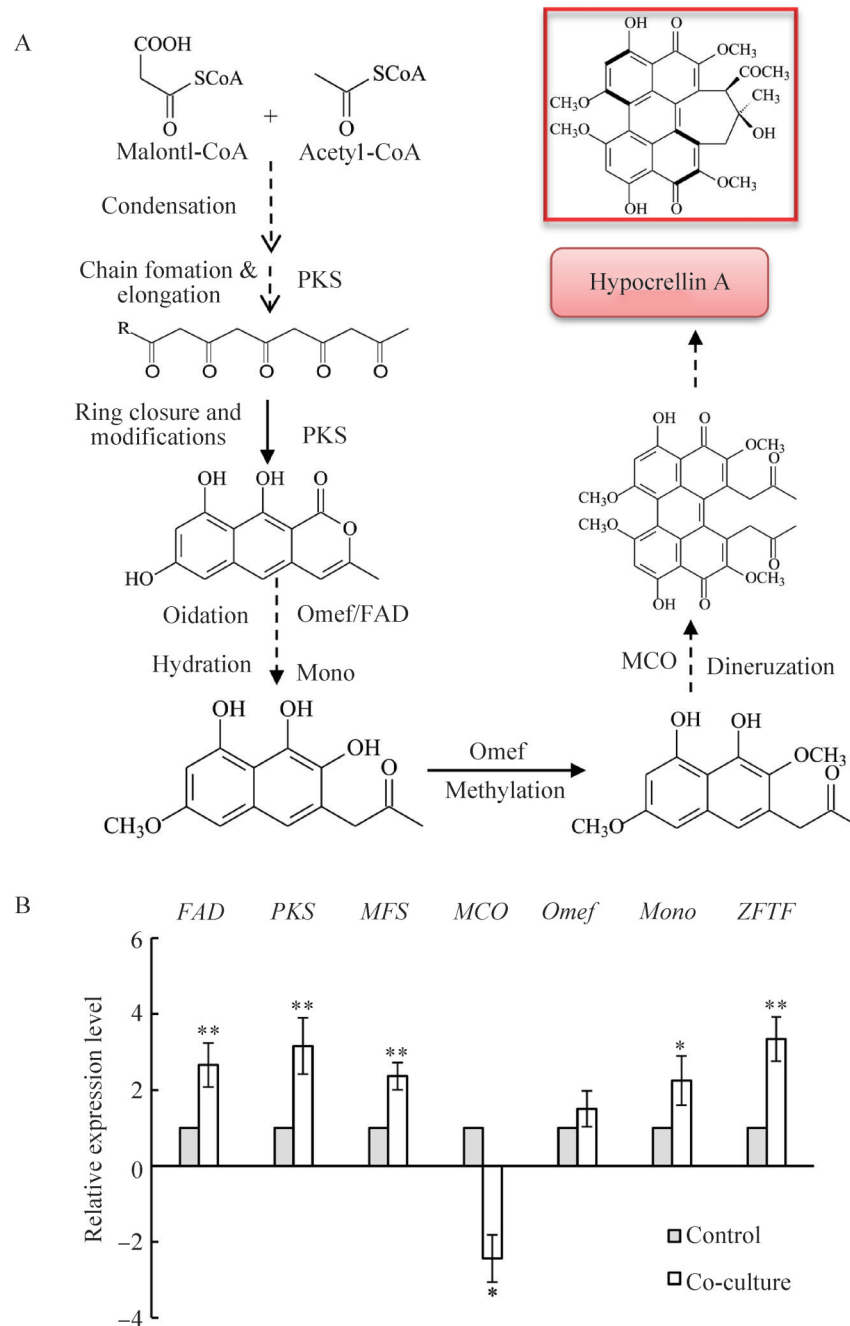


图6 镰孢菌SF12共培养对竹黄菌S9竹红菌甲素合成的影响。A: 竹红菌甲素合成路径示意图; B: HA合成酶基因表达。

Figure 6 Effect of the inoculation of *Fusarium* sp. SF12 on the biosynthesis of hypocrellin A of *Shiraia* sp. S9. A: Schematic representation of *Shiraia* hypocrellin A biosynthesis (PKS: Polyketide synthase; Omef: O-methyltransferase; FAD: FAD/FMN-dependent oxidoreductase; Mono: Monooxygenase; MCO: Multicopper oxidase); B: The expression levels of key genes for HA biosynthesis of *Shiraia* sp. S9 with co-culture of *Fusarium* sp. SF12. Values are mean $\pm$ SD from triple experiments. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$.

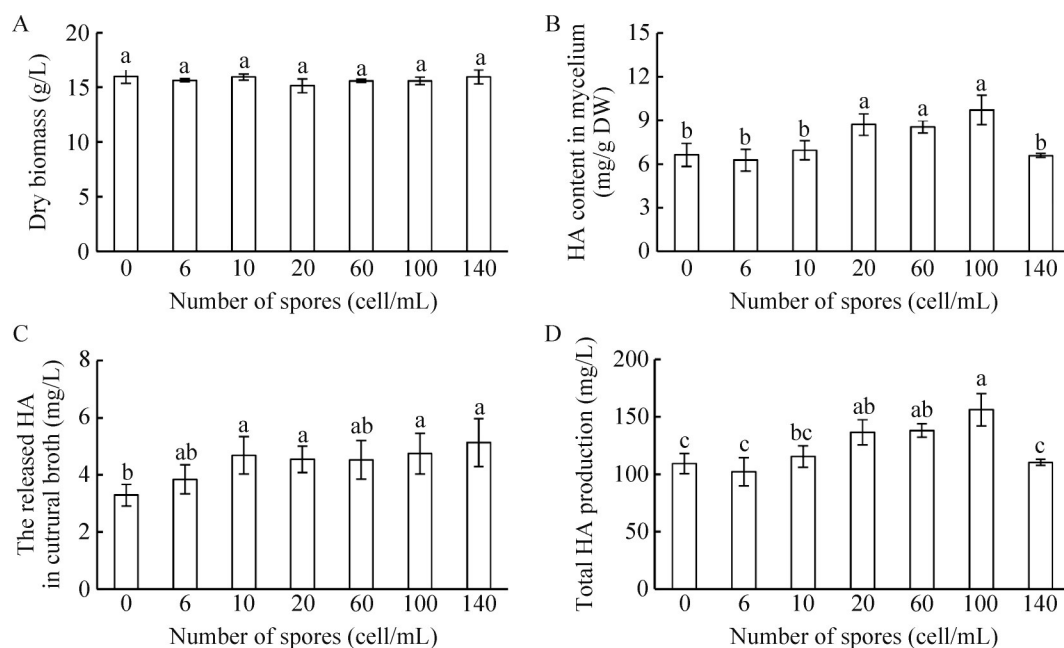


图7 镰孢菌SF12孢子浓度对竹黄菌生长及HA合成的影响。A: 竹黄菌生物量; B: HA胞内合成浓度; C: 胞外分泌HA浓度; D: HA总产量。

Figure 7 Effects of *Fusarium* sp. SF12 at different inoculation concentrations on growth and HA biosynthesis of *Shiraia* sp. S9. A: Effect on mycelium dry biomass; B: Effect on HA content in mycelium; C: Effect on released HA in culture broth; D: Effect on total HA production in mycelium culture. Different letters above the bars indicate significant differences ($P < 0.05$).

(*Arthrinium*)。相比之下,从水竹(*P. heteroclada*)的枝叶中分离出属于14个属的127个真菌菌株,优势菌为节菱孢属和拟盘多毛孢属(*Pestalotiopsis*)^[32]。由此可见,竹黄菌子实体的伴生菌与竹子内生真菌之间存在一定相关性。尽管部分子实体伴生菌对竹红菌甲素合成具有抑制作用,但在本研究分离的伴生菌中,有18株伴生菌在平板对峙实验中表现出对竹黄菌竹红菌甲素合成的促进作用(表2),结合伴生菌对竹黄菌生长和竹红菌甲素菌丝外泌的影响(图3),筛选出对竹红菌甲素产量具有显著诱导作用的伴生菌——镰孢菌(*Fusarium* sp.) SF12。本研究报道了竹黄菌子实体中伴生真菌的多样性和对竹红菌甲素合成的调控作用。

本研究提取了活性镰孢菌SF12的胞内及胞

外几种不同极性的提取物,发现对HA合成诱导效果显著的是镰孢菌SF12活菌共培养及其胞外多糖(图4),真菌菌丝及胞外多糖作为诱导子调控植物次生代谢物已有报道^[33]。Du等^[34]发现黑曲霉(*Aspergillus niger*)菌丝寡糖(50 $\mu\text{g/mL}$)可以促进竹黄菌(*S. bambusicola*)竹红菌素的生产。苎麻疫霉(*Phytophthora boehmeriae*)胞外蛋白PB90(5 nmol/L)可以将竹黄菌(*S. bambusicola*)竹红菌素的产量提高2.5–4.5倍^[35]。在本课题组Zhou等^[36]和Li等^[37]的研究中,竹黄伴生细菌黄褐假单胞菌(*P. fulva*) SB1可以通过胞外多糖(EPS)和细胞壁脂多糖(LPS)促进竹黄菌S9竹红菌甲素的生物合成。具有诱导活性的黄褐假单胞菌胞外多糖EPS-1的分子量为92.1 kDa,其主链由 $\rightarrow 2$ - α -D-Manp-(1 $\rightarrow$ 组成,支链包含 α -D-Manp-

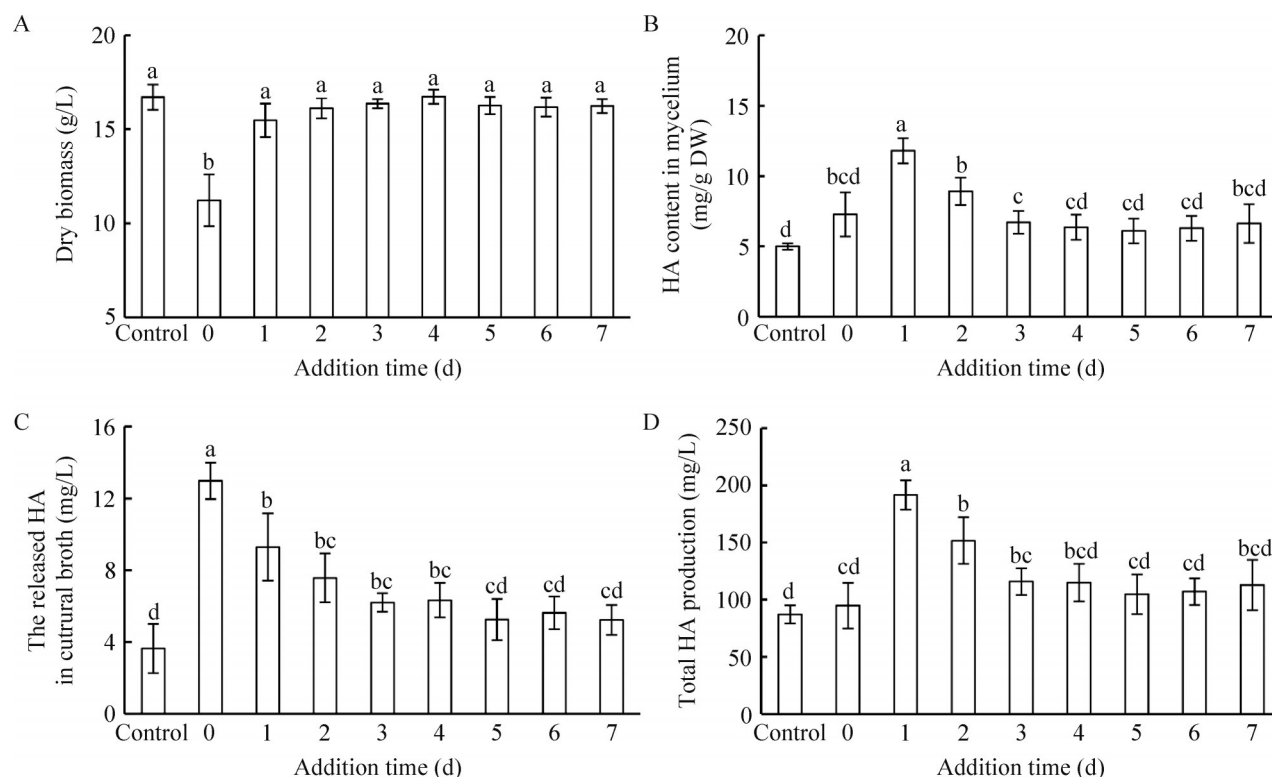


图8 镰孢菌SF12接入时间对竹黄菌生长及HA合成的影响。A: 竹黄菌生物量; B: HA胞内合成浓度; C: 胞外分泌HA浓度; D: HA总产量。

Figure 8 Effects of the addition time of *Fusarium* sp. SF12 on growth and HA biosynthesis of *Shiraia* sp. S9. A: Effect on mycelium biomass; B: Effect on HA content in mycelium; C: Effect on released HA in culture broth; D: Effect on total HA production in mycelium culture. Different letters above the bars mean significant differences ($P<0.05$).

(1→和 α -D-Manp-(1→6)- β -D-Glcp-(1→6)- α -D-Manp-(1→, 含有 37 个重复单元, 与其他假单胞菌分离的胞外多糖结构不同^[36]。活性脂多糖中 O 多糖的分子量为 282.8 kDa, 其主链由→3)- α -L-Rhap-(1→、→2)- α -L-Rhap-(1→、→3)- β -D-Galp-(1→和→3,4)- α -L-Rhap-(1→组成, 具有 1 个支链结构, 支链连接在→3,4)- α -L-Rhap-(1→的 O-4 位置, 含有→2)- α -L-Rhap-(1→和→3)- β -D-GalpNAc-(1→^[37]。脂多糖类脂 A 的脂肪酸组成主要为十六烷酸、3-羟基癸酸、顺式-9-十八碳烯酸、十五烯酸、十八烷酸和十四烷酸^[37]。镰孢菌 SF12 胞外多糖的结构值得进一步解析, 并与上述报道的具有诱导活性的细菌多糖进行

构效比较。除了具有诱导活性的胞外多糖, 镰孢菌 SF12 菌丝乙酸乙酯提取物(IEa)和氯仿提取物(ICH)也能促进竹黄菌 HA 的产量(图 4D), 表明镰孢菌 SF12 还可以合成一些极性较小的代谢物来调节 HA 的合成。镰孢菌 SF12 共培养处理促进了 HA 生物合成过程相关的关键酶基因的表达(图 6)。已有的报道表明, 竹红菌素合成基因簇受到非生物(如超声^[21]和表面活性剂^[22])及生物诱导(如伴生细菌^[8]、胞外多糖^[36]和脂多糖^[37])的调控, 构成基因簇的这些关键酶基因对诱导因子响应各不相同, 镰孢菌 SF12 可能通过胞外多糖诱导竹红菌甲素合成关键酶基因的表达, 从而促进 HA 的合成产量。多铜氧化酶(MCO)可能

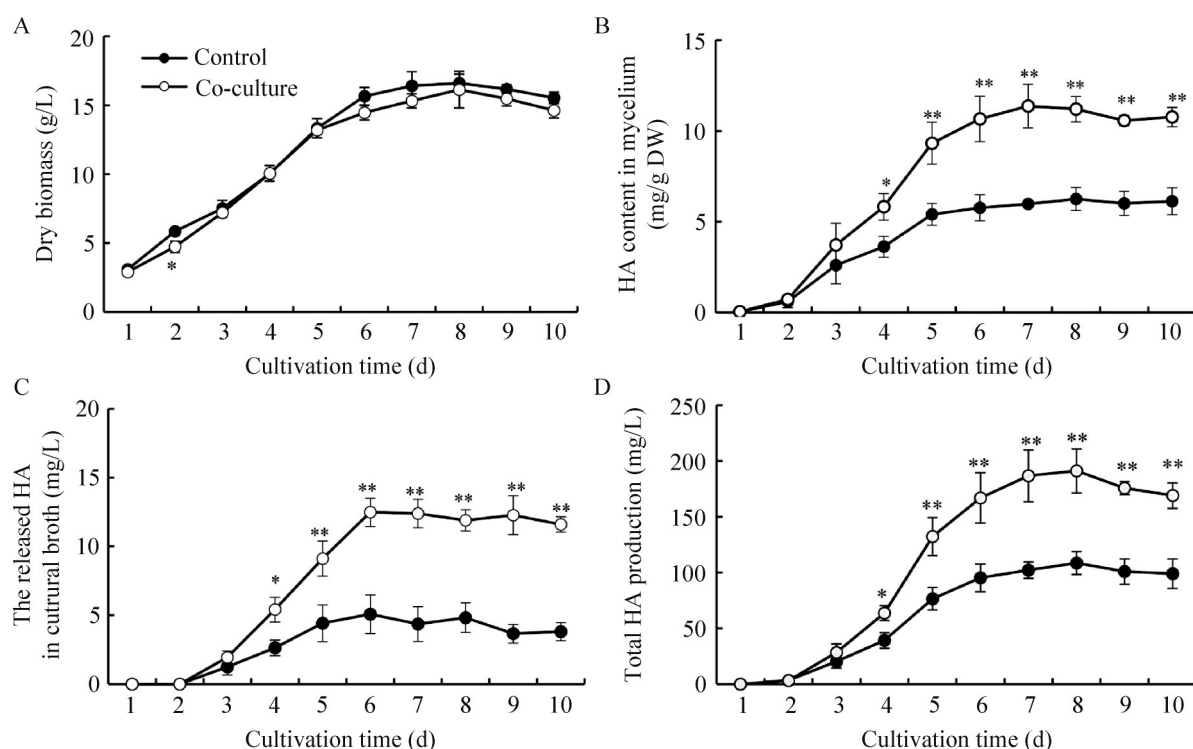


图9 镰孢菌SF12与竹黄菌S9共培养时竹黄菌生长及HA合成的变化。A: 竹黄菌生物量; B: HA胞内合成浓度; C: 胞外分泌HA浓度; D: HA总产量。

Figure 9 The changes of the growth and HA biosynthesis of *Shiraia* sp. S9 in the co-culture with *Fusarium* sp. SF12. A: The change of mycelium biomass; B: The change of HA content in mycelium; C: The change of released HA in culture broth; D: The change of total HA production (D). Values are mean $\pm$ SD from triple experiments. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$.

通过催化蒽醌类前体的聚合参与竹红菌甲素的合成。Deng 等^[38]在竹黄菌(*Shiraia* sp.) SUPER-H168 中过表达 *MCO*, 提高了该菌株的 HA 产量。尽管镰孢菌 SF12 共培养处理抑制了 *MCO* 的表达量, 但竹红菌甲素代谢基因簇中其他关键酶基因的转录水平均受到诱导促进, 有关 *MCO* 与其他基因的协同作用机制尚需进一步探讨。

微生物共培养是一种将 2 种或多种微生物放在一起共同培养的方法。该方法试图模拟微生物在群落中共存的生态环境, 通过微生物间的互作关系来刺激、促进或沉默生物合成基因的表达, 从而提高活性次生代谢产物的产量或

产生新的代谢物, 属于通过改变微生物生长条件或培养基以实现单菌株多产物的策略之一^[39]。青霉菌 *Penicillium commune* GHAI86 与白腐真菌 *Funalia floccosa* LPSC 232 共培养可以提高漆酶的产量^[40]; 黑曲霉(*Aspergillus niger*)与米曲霉(*A. oryzae*)共培养可以提高胞外酶(β -葡萄糖苷酶、 β -半乳糖苷酶和 α -纤维素二糖水解酶)的产量^[41]。Yan 等^[42]比较了分离自苦竹(*Pleioblastus amarus*)的 17 株内生真菌对竹黄菌菌丝发酵培养中竹红菌素产量的影响, 筛选出具有显著活性的菌株——节菱孢霉属真菌 *Arthrinium* sp. AF-5。本研究筛选并优化了竹黄子实体伴生镰孢菌(*Fusarium* sp.) SF12 与竹黄菌(*Shiraia* sp.) S9 的共

培养方法(图 7、图 8), HA 的总产量达到 209.46 mg/L(图 9)。与已报道的提高竹黄菌菌丝培养中竹红菌素产量的方法(如光照、表面活性剂处理、超声诱导等)相比^[43], 真菌共培养方法无须增加任何物理或化学处理设备, 是一种简单易行且高效的诱导方法, 能够显著促进竹红菌甲素的生物技术生产。本研究通过筛选竹黄子实体伴生真菌, 不仅为了解子实体伴生菌与宿主在次生代谢上的相互调节提供了线索, 而且以伴生菌作为新型生物诱导子, 显著提高了蒽醌类光敏药物 HA 的产量。后续研究中, 我们将结合生物反应器技术, 探索伴生菌——竹黄菌的大规模共培养生产方法, 为新型真菌类光敏药物的开发提供丰富的药物资源。

作者贡献声明

郑丽屏: 研究构思和设计、数据收集和处理、论文撰写和修改; 季红瑶: 实验操作、数据收集、处理和论文撰写; 周建芹: 论文讨论、技术支持、论文撰写和修改; 王剑文: 方案设计、项目指导。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] DIWU Z. Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins[J]. *Photochemistry and Photobiology*, 1995, 61(6): 529-539.
- [2] 贾小明, 徐晓红, 庄百川, 林海萍. 药用竹黄菌的生物学研究进展[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(3): 147-150.
JIA XM, XU XH, ZHUANG BC, LIN HP. The progress of biological research of medicinal fungus *Shiraia bambusicola*[J]. *Microbiology China*, 2006, 33(3): 147-150 (in Chinese).
- [3] 王景祥, 张黎明, 朱丽青, 肖光. 竹黄化学成分的研究[J]. *中草药*, 1990, 21(7): 4-5, 46.
WANG JX, ZHANG LM, ZHU LQ, XIAO G. Studies on the chemical constituents of Zhu Huang (*Shiraria bambusicola*) [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 1990, 21(7): 4-5, 46 (in Chinese).
- [4] 靳爱华, 王丽菊. 竹红菌素软膏加光疗治疗外阴白色病变 65 例[J]. *陕西医学杂志*, 2005, 34(6): 725-726.
JIN AH, WANG LJ. Treatment of 65 cases of vulvar white lesions with hypocrellin ointment and phototherapy[J]. *Shaanxi Medical Journal*, 2005, 34(6): 725-726 (in Chinese).
- [5] 薛东运, 李华, 滕学洲. 竹红菌素加用黑光灯照射治疗增生性疤痕 127 例[J]. *皮肤病与性病*, 2006, 28(2): 35-36.
XUE DY, LI H, TENG XZ. Treatment of 127 cases of hypertrophic scar with hypocrellin and black light irradiation[J]. *Journal of Dermatology and Venereology*, 2006, 28(2): 35-36 (in Chinese).
- [6] ZHANG X, WEI QL, TIAN LW, HUANG ZX, TANG YB, WEN YD, YU FQ, YAN XX, ZHAO YC, WU ZQ, TIAN XF. Advancements and future prospects in hypocrellins production and modification for photodynamic therapy[J]. *Fermentation*, 2024, 10(11): 559.
- [7] O'BRIEN EM, MORGAN BJ, MULROONEY CA, CARROLL PJ, KOZLOWSKI MC. Perylenequinone natural products: total synthesis of hypocrellin A[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 2010, 75(1): 57-68.
- [8] MA YJ, ZHENG LP, WANG JW. Bacteria associated with *Shiraia* fruiting bodies influence fungal production of hypocrellin A[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2023.
- [9] 李强, 李树红, 李小林, 陈诚, 黄文丽, 熊川, 杨志荣, 郑林用. 野生翘鳞肉齿菌子实体内生菌多样性[J]. *应用与环境生物学报*, 2015, 21(4): 629-634.
LI Q, LI SH, LI XL, CHEN C, HUANG WL, XIONG C, YANG ZR, ZHENG LY. Diversity of endophytic microorganisms in fresh fruiting bodies of *Sarcodon imbricatus*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2015, 21(4): 629-634 (in Chinese).
- [10] 杨大智, 朱启顺, 杨正斌, 段焰青. 干巴菌子实体内生真菌的研究[J]. *中国食用菌*, 1997, 16(2): 8-9.
YANG DZ, ZHU QS, YANG ZB, DUAN YQ. Study on the accompany fungi in *Thelephora ganbajun*'s fruit-body[J]. *Edible Fungi of China*, 1997, 16(2): 8-9 (in Chinese).
- [11] 王冉, 于富强. 云南干巴菌子实体内可培养微生物[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(5): 1112-1119.
WANG R, YU FQ. Culturable microorganisms associated with basidiocarps of *Thelephora ganbajun*[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(5): 1112-1119 (in Chinese).
- [12] YURKOV A, KRÜGER D, BEGEROW D, ARNOLD N, TARKKA MT. Basidiomycetous yeasts from boletales fruiting bodies and their interactions with the mycoparasite *Sepedonium chrysospermum* and the host fungus *Paxillus*[J]. *Microbial Ecology*, 2012, 63(2): 295-303.
- [13] 佟曦然, 郭豪杰, 罗丽, 张昭, 齐耀东, 张本刚. 柬埔寨民间习用灵芝与伴生真菌拮抗特性评价[J]. *中国现代中药*, 2017, 19(9): 1221-1227.
TONG XR, GUO HJ, LUO L, ZHANG Z, QI YD,

- ZHANG BG. Evaluation of antagonistic effect between *Ganoderma isolates* and companion fungi from Cambodia[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2017, 19(9): 1221-1227 (in Chinese).
- [14] 邢晓科, 郭顺星. 猪苓、伴生菌及蜜环菌共培养的形态学研究[J]. *菌物系统*, 2003, 22(4): 653-660.
- XING XK, GUO SX. Morphological studies on dual and triple culture of *Grifola umbellata*, an unnamed companion fungus and *Armillariella mellea*[J]. *Mycosystema*, 2003, 22(4): 653-660 (in Chinese).
- [15] MA YJ, ZHENG LP, WANG JW. Inducing perylenequinone production from a bambusicolous fungus *Shiraia* sp. S9 through co-culture with a fruiting body-associated bacterium *Pseudomonas fulva* SB1[J]. *Microbial Cell Factories*, 2019, 18(1): 121.
- [16] CHENG TF, JIA XM, MA XH, LIN HP, ZHAO YH. Phylogenetic study on *Shiraia bambusicola* by rDNA sequence analyses[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2004, 44(5): 339-350.
- [17] PEREZ VERA OA, YANEZ MORALES MJ, ALVARADO ROSALES D, CIBRIAN TOVAR D, GARCIA DIAZ SE. Fungi associated to *Eucalyptus*, *Eucalyptus grandis* hill: maid[J]. *Agrociencia*, 2005, 39(3): 311-318.
- [18] QIAN LB, CHEN BL. Enhanced oxidation of benzo[a]pyrene by crude enzyme extracts produced during interspecific fungal interaction of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(9): 1639-1646.
- [19] 王剑文, 郑丽屏, 谭仁祥. 促进黄花蒿发根青蒿素合成的内生真菌诱导子的制备[J]. *生物工程学报*, 2006, 22(5): 829-834.
- WANG JW, ZHENG LP, TAN RX. The preparation of an elicitor from a fungal endophyte to enhance artemisinin production in hairy root cultures of *Artemisia annua* L.[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22(5): 829-834 (in Chinese).
- [20] EBELL LF. Variation in total soluble sugars of conifer tissues with method of analysis[J]. *Phytochemistry*, 1969, 8(1): 227-233.
- [21] SUN CX, MA YJ, WANG JW. Enhanced production of hypocrellin A by ultrasound stimulation in submerged cultures of *Shiraia bambusicola*[J]. *Ultrasonics Sonochemistry*, 2017, 38: 214-224.
- [22] LEI XY, ZHANG MY, MA YJ, WANG JW. Transcriptomic responses involved in enhanced production of hypocrellin A by addition of Triton X-100 in submerged cultures of *Shiraia bambusicola*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(10): 1415-1429.
- [23] 季红瑶. 蓝光和真菌诱导对竹红菌素生产的调节作用研究[D]. 苏州: 苏州大学硕士学位论文, 2020.
- JI HY. The regulation of blue light and fruiting-body associated fungi on hypocrellin production of *Shiraia bambusicola*[D]. Suzhou: Master's Thesis of Soochow University, 2020 (in Chinese).
- [24] YANG HL, WANG Y, ZHANG ZB, YAN RM, ZHU D. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Shiraia* sp. strain Sif14, a novel endophytic fungus producing huperzine A and hypocrellin A[J]. *Genome Announcements*, 2014, 2(1): e00011-14.
- [25] ZHAO N, LI D, GUO BJ, TAO X, LIN X, YAN SZ, CHEN SL. Genome sequencing and analysis of the hypocrellin-producing fungus *Shiraia bambusicola* S4201[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 643.
- [26] SAIKKONEN K, WÄLI P, HELANDER M, FAETH SH. Evolution of endophyte-plant symbioses[J]. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(6): 275-280.
- [27] 赵凯, 平文祥, 周东坡. 内生真菌发酵生产紫杉醇的研究现状与展望[J]. *微生物学报*, 2008, 48(3): 403-407.
- ZHAO K, PING WX, ZHOU DP. Recent advance and prospect on taxol production by endophytic fungus fermentation-a review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(3): 403-407 (in Chinese).
- [28] 肖郑鹏, 朱亚婷, 张雨轩, 罗杰, 刘东波, 康信聪. 产石杉碱甲内生真菌的复壮及产量提高研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(11): 4372-4382.
- XIAO ZP, ZHU YT, ZHANG YX, LUO J, LIU DB, KANG XC. Rejuvenation and yield improvement of a huperzine A producing endophytic fungus[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(11): 4372-4382 (in Chinese).
- [29] 巨凤, 罗凡, 冯丹, 郭大乐, 任波, 邓赞. 冬虫夏草内生菌 *Penicillium crustosum* 的化学成分研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(7): 1147-1155.
- JU F, LUO F, FENG D, GUO DL, REN B, DENG Y. Study on the chemical constituents of *Penicillium crustosum*, an endophytic fungus from *Ophiocordyceps sinensis*[J]. *Natural Product Research and Development*, 2021, 33(7): 1147-1155 (in Chinese).
- [30] SPLIVALLO R, DEVEAU A, VALDEZ N, KIRCHHOFF N, FREY-KLETT P, KARLOVSKY P. Bacteria associated with truffle-fruiting bodies contribute to truffle aroma[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(8): 2647-2660.
- [31] SHEN XY, CHENG YL, CAI CJ, FAN L, GAO J, HOU CL. Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi isolated from moso bamboo seeds[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95838.
- [32] ZHOU YK, SHEN XY, HOU CL. Diversity and antimicrobial activity of culturable fungi from fishscale bamboo (*Phyllostachys heteroclada*) in China[J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33(6): 104.
- [33] WANG JW, WU JY. Effective elicitors and process strategies for enhancement of secondary metabolite production in hairy root cultures[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2013, 134: 55-89.
- [34] DU W, LIANG JD, HAN YF, YU JP, LIANG ZQ. Nitric oxide mediates hypocrellin accumulation induced by

- fungus elicitor in submerged cultures of *Shiraia bambusicola*[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(1): 153-159.
- [35] DU W, SUN CL, WANG BG, WANG YM, DONG B, LIU JH, XIA JB, XIE WJ, WANG J, SUN JK, LIU XH, WANG HG. Response mechanism of hypocrellin colorants biosynthesis by *Shiraia bambusicola* to elicitor PB90[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 146.
- [36] ZHOU LL, SHEN WH, MA YJ, LI XP, WU JY, WANG JW. Structure characterization of an exopolysaccharide from a *Shiraia*-associated bacterium and its strong eliciting activity on the fungal hypocrellin production[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 226: 423-433.
- [37] LI XP, SHEN WH, ZHOU LL, HUANG QY, CONG RP, ZHENG LP, WANG JW. Lipopolysaccharides from a *Shiraia* fruiting body-associated bacterium elicit host fungal hypocrellin A biosynthesis through nitric oxide generation[J]. Carbohydrate Polymers, 2024, 324: 121498.
- [38] DENG HX, GAO RJ, CHEN JJ, LIAO XR, CAI YJ. An efficient polyethylene glycol-mediated transformation system of lentiviral vector in *Shiraia bambusicola*[J]. Process Biochemistry, 2016, 51(10): 1357-1362.
- [39] BODE HB, BETHE B, HÖFS R, ZEECK A. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity[J]. ChemBioChem, 2002, 3(7): 619-627.
- [40] RODRÍGUEZ RD, HEREDIA G, SILES JA, JURADO M, SAPARRAT MCN, GARCÍA-ROMERA I, SAMPEDRO I. Enhancing laccase production by white-rot fungus *Funalia floccosa* LPSC 232 in co-culture with *Penicillium commune* GHAE86[J]. Folia Microbiologica, 2019, 64(1): 91-99.
- [41] HU HL, van den BRINK J, GRUBEN BS, WÖSTEN HAB, GU JD, de VRIES RP. Improved enzyme production by co-cultivation of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* and with other fungi[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2011, 65(1): 248-252.
- [42] YAN XX, WEN YD, HU MH, WU ZQ, TIAN XF. Promotion of the hypocrellin yield by a co-culture of *Shiraia bambusicola* (GDMCC 60438) with *Arthrrium* sp. AF-5 fungus[J]. Fermentation, 2021, 7(4): 316.
- [43] LI XP, SHEN WH, WANG JW, ZHENG LP. Production of fungal hypocrellin photosensitizers: exploiting bambusicolous fungi and elicitation strategies in mycelium cultures[J/OL]. Mycology, 2024. <https://doi.org/10.1080/21501203.2024.2430726>.