

Pseudogymnoascus roseus 的生物学特性及 液体发酵培养基的筛选

何苏琴* 金秀琳 罗进仓 王春明

(甘肃省农业科学院植物保护研究所 甘肃 兰州 730070)

摘要: 分离自冬虫夏草子座的子囊菌, 产生大量具网状包被的子囊果。其代表菌株 Pseu-F 经形态学及分子鉴定, 确定为 *Pseudogymnoascus roseus*。该菌株的适宜生长温度为 17.5 °C–20.0 °C; 用正交试验法对该菌株进行了液体发酵培养基筛选试验, 试验因素包括马铃薯、黄豆、蔗糖+葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、矿物盐、维生素等, 筛选出的优化液体发酵培养基为(g/L): 蔗糖 20+葡萄糖 10, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 黄豆 50, 马铃薯 100。

关键词: 玫红假裸囊菌, 冬虫夏草, 液体发酵培养

Morphological characteristics and submerged culture medium screening of *Pseudogymnoascus roseus*

HE Su-Qin* JIN Xiu-Lin LUO Jin-Cang WANG Chun-Ming

(Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Isolates from the stroma of *Ophiocordyceps sinensis*, produced generously ascocarps with reticulo-peridium. Morphological characteristics and molecular identification indicated that the representative strain Pseu-F was *Pseudogymnoascus roseus* Raillou. The optimum temperatures for mycelial growing were 17.5 °C–20.0 °C. Submerged culture media were screened by means of orthogonal design experiments. Test factors included sucrose, glucose, peptone, yeast extract, potato, soybean, mineral salt and Vitamins. Based on the results of tests, the optimized combinations of culture medium are sucrose 20 g, glucose 10 g, peptone 10 g, yeast extract 5 g, soybean 50 g, potato 100 g, in 1 L liquid medium.

Keywords: *Pseudogymnoascus roseus*, *Ophiocordyceps sinensis*, Submerged culture

2002 年, 我们从采自甘肃碌曲、玛曲的冬虫夏草子座上分离得到了 27 株产生大量锈红色子囊果

的真菌菌株, 其后对代表菌株 Pseu-F 进行了形态学和分子鉴定, 测定了该菌株的生长温度, 并采用

基金项目: 甘肃省科技厅科学事业费项目(No. QS051–C31–08)

* 通讯作者: Tel: 86-931-7617133; 信箱: gshesugin@sina.com

收稿日期: 2011-02-23; 接受日期: 2011-05-19

正交试验法对该菌株进行了液体发酵培养基筛选试验。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

试验菌株 2002 年 5 月分离自甘肃碌曲冬虫夏草子座, 菌株编号 Pseu-F。

1.2 培养基

SPPDA (g/L): 马铃薯 200, 风干高山草甸土 20, 蛋白胨 2, 葡萄糖 20, 琼脂 12, 自来水 1 L。

PDA (g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 12, 自来水 1 L。

PDB (g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 自来水 1 L。

1.3 形态学鉴定

将直径 5 mm 的菌丝块接种于 SPPDA 平板上, 置 20 °C–22 °C 黑暗下培养 50 d, 记录菌落形态。描述显微形态并测量孢子大小, 进行形态学鉴定。

1.4 分子鉴定

刮取 PDA 平板上 20 °C 培养 20 d 的菌丝和孢子, 利用 Universal Genomic DNA Extraction Kit (大连宝生物工程有限公司) 提取 DNA。选用真菌通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增 ITS 基因。反应体系包括 10×buffer 2.5 μL, 1.5 mmol/L MgCl₂ 2 μL, dNTPs 1 μL, 20 μmol/L 引物各 0.5 μL, Taq DNA polymerase (5 U/μL) 0.2 μL, 模板 1 μL, ddH₂O 补至 25 μL。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 52 °C 40 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖电泳检测。扩增

产物回收后送大连宝生物工程有限公司测序。测序结果在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 数据库进行 BLASTn 分析。

1.5 适宜生长温度测定

设 5.0 °C、10.0 °C、15.0 °C、17.5 °C、20.0 °C、22.5 °C、25.0 °C、27.5 °C、30.0 °C、35.0 °C 共 10 个温度梯度, 将直径 5 mm 的菌丝块接种于 SPPDA 平板上, 置不同温度条件下培养, 测量培养 14 d 菌落直径, 试验重复 3 次。

1.6 液体发酵培养基筛选试验

用正交试验法对菌株 Pseu-F 进行液体发酵培养基筛选试验, 试验因素包括马铃薯、黄豆、蔗糖+葡萄糖、蛋白胨、酵母膏、矿物盐、维生素等 (表 1)。

利用 L₁₈(6¹×3⁶) 正交表确定试验方案安排试验。每种培养基配制 180 mL, 分 3 瓶装 (150 mL 三角瓶), 每瓶 60 mL, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min, 冷却后接种, 接种量为 5% (接种种子液: 在 PDB 液体培养基中 20 °C、120 r/min 培养 7 d), 置 20 °C、120 r/min 摇床上培养 93 h, 发酵液经 4 000 r/min 离心 30 min 后弃上清液, 将沉淀物 70 °C 烘干后称重。菌丝体干重收率为该配方下 3 瓶之平均值。

1.7 液体发酵培养时间的筛选

根据推导出的优化培养配方, 配制培养基 2 L, 每瓶装 50 mL (150 mL 三角瓶), 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min, 冷却后接种, 接种量 5% (接种种子液: 在 PDB 液体培养基中 20 °C、120 r/min 培养 7 d), 置 20 °C、120 r/min 摇床上培养, 每 24 h 取出 4 瓶 80 °C

表 1 正交试验因素水平表
Table 1 Factors and levels of the orthogonal design test

Factor	A Sucrose+ glucose (‰)	B Peptone (‰)	C Yeast extract (‰)	D Soybean (‰)	E Potato (‰)	F ZnSO ₄ ·7H ₂ O+ KH ₂ PO ₄ (‰)	G Co. V _B (‰)
Level 1	0+10	0	0	0	0	0	0
Level 2	0+20	5	5	25	100	0.2+0.3	0.1
Level 3	0+30	10	10	50	200	0.4+0.6	0.2
Level 4	20+0						
Level 5	10+10						
Level 6	20+10						

灭活 4 h。发酵液 4 000 r/min 离心 30 min, 沉淀物经 70 °C 干燥后称重测定菌丝体干重收率。根据菌丝体干重增长曲线的峰值确定菌株的最佳发酵时间。

2 结果与分析

2.1 形态特征

在 SPPDA 平板上 20 °C 培养 50 d, 气生菌丝白色, 绒羽状, 菌落表面生大量锈红色颗粒状物(即子囊果)及数个大小不等的琥珀色泌水珠(图 1)。子囊果具有红褐色网状包被菌丝, 子囊果大小为

(89.1–386.1) $\mu\text{m} \times$ (89.1–316.8) μm [av. (230.00 \pm 67.41) $\mu\text{m} \times$ (209.90 \pm 50.70) μm], 每个子囊果内包含子囊数十枚至数百枚或更多; 子囊近球形, 无色, (5.0–7.5) μm (av. 5.6 \pm 0.5 μm), 每个子囊内生子囊孢子 8 个, 子囊壁易消解; 子囊孢子单胞, 无色, 纺锤形, (1.5–3.7) $\mu\text{m} \times$ (1.3–2.0) μm [av. (2.6 \pm 0.5) $\mu\text{m} \times$ (1.4 \pm 0.3) μm]; *Geomyces* 无性时期同时发生, 产生分枝的分生孢子梗和梨形至不规则形的分生孢子, 分生孢子大小(1.5–4.5) $\mu\text{m} \times$ (1.3–3.0) μm 。依据形态特征, 将其鉴定为 *Pseudogymnoascus roseus* Raillo^[1–2]。

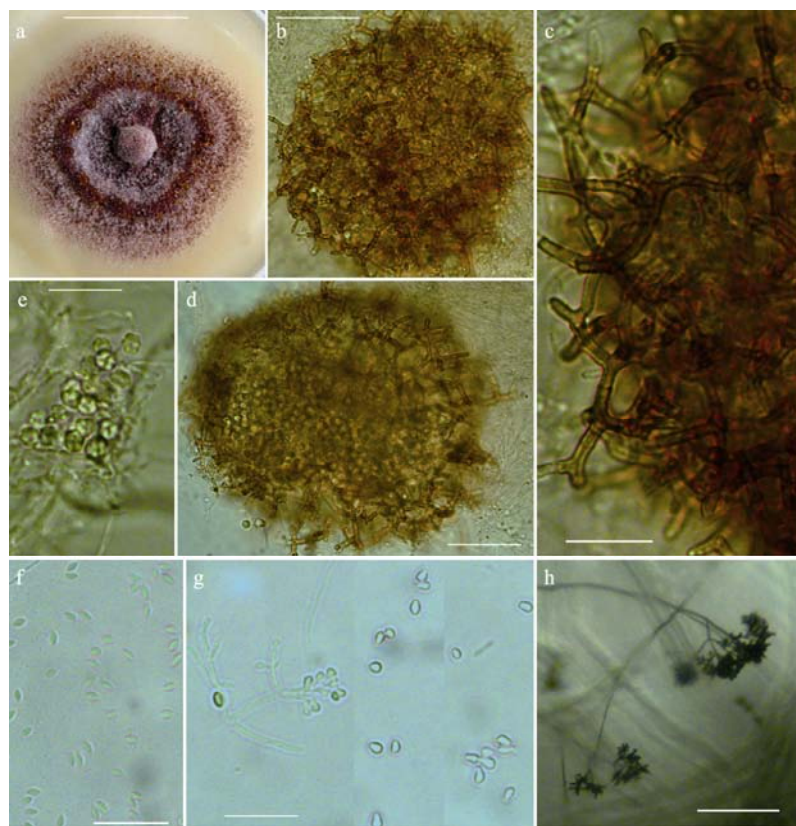


图 1 *Pseudogymnoascus roseus* 形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of *Pseudogymnoascus roseus*

注: a: 菌落形态, 在 SPPDA 平板上 20 °C–22 °C 黑暗培养 50 d; b–h: 光学显微形态, 在 SPPDA 平板上 20 °C–22 °C 黑暗培养. b: 具有红褐色网状包被菌丝的子囊果; c: 网状包被菌丝; d: 包被菌丝内含有大量发育中的子囊; e: 子囊中正在发育的子囊孢子; f: 成熟的纺锤形子囊孢子; g–h: 无性时期 *Geomyces*, 示分枝的分生孢子梗和梨形至不规则形的分生孢子. 标尺: a=3 cm; b, d=50 μm ; c, e–g=20 μm ; h=100 μm .

Note: a: Colony morpho cultured 50 d on SPPDA at 20 °C–22 °C in the dark; b–h: Light micrographs of *Pseudogymnoascus roseus* from cultures grown on SPPDA at 20 °C–22 °C in the dark. b: Ascocarp with red brown reticulated peridial hyphae; c: Reticulated peridial hyphae; d: Peridial hyphae with asci containing developing ascospores; e: Ascus containing developing ascospores; f: Fusiform mature ascospores; g–h: *Geomyces* anamorph with branched conidiophores, pyriform to irregular conidia. Scale: a=3 cm; b, d=50 μm ; c, e–g=20 μm ; h=100 μm .

2.2 分子鉴定

扩增出的 ITS 序列 (GenBank 登录号 JF320816) 测序后约 528 bp, BLASTn 分析结果表明该序列与 *Pseudogymnoascus roseus* (GenBank 登录号 HQ115715.1) 的 18S rRNA 部分序列, ITS1、5.8S rRNA、ITS 2 全序列, 及 28S rRNA 部分序列同源性达 100%, 分子鉴定与形态学鉴定结果一致。

2.3 生长温度

生长温度测定结果显示 Pseu-F 为嗜低温菌, 该菌株的适宜生长温度为 17.5 °C–20.0 °C, 30 °C 和

35 °C 下菌丝不生长。在 30 °C 和 35 °C 培养 7 d 的培养物转放至 20 °C, 7 d 后 30 °C 的培养物可恢复正常生长, 35 °C 的培养物未再恢复生长(图 2)。

2.4 液体发酵培养基筛选

影响 Pseu-F 液体发酵产量的各因素重要性依次为 A>B>D>E>C, 优化培养基组合为 A6+B3+C2+D3+E2, 即: 蔗糖 20 g+葡萄糖 10 g, 蛋白胨 10 g, 酵母膏 5 g, 黄豆 50 g, 马铃薯 100 g (表 2)。

2.5 液体发酵培养时间筛选

在试验条件下(20 °C, 120 r/min)培养 4 d 的菌丝产量即达到最高峰, 第 6 天开始下降(图 3)。

表 2 $L_{18}(6^1 \times 3^6)$ 正交试验结果及极差分析 (20 °C, 93 h)
Table 2 $L_{18}(6^1 \times 3^6)$ test results and analyses of maximum margin (20 °C, 93 h)

Medium No.	A	B	C	D	E	F	G	Biomass (g/L)
1	1	1	3	2	2	1	2	6.52
2	1	2	1	1	1	2	1	4.99
3	1	3	2	3	3	3	3	10.13
4	2	1	2	1	2	3	1	7.62
5	2	2	3	3	1	1	3	11.57
6	2	3	1	2	3	2	2	10.95
7	3	1	1	3	1	3	2	5.17
8	3	2	2	2	3	1	1	13.43
9	3	3	3	1	2	2	3	9.48
10	4	1	1	1	3	1	3	6.78
11	4	2	2	3	2	2	2	11.45
12	4	3	3	2	1	3	1	9.38
13	5	1	3	3	3	2	1	11.10
14	5	2	1	2	2	3	3	11.52
15	5	3	2	1	1	1	2	11.74
16	6	1	2	2	1	2	3	14.25
17	6	2	3	1	3	3	2	12.93
18	6	3	1	3	2	1	1	24.69
Level 1	7.21	8.57	10.68	8.92	9.52	12.46	11.87	
Level 2	10.05	10.98	11.44	11.01	11.88	10.37	9.79	
Level 3	9.36	12.73	10.16	12.35	10.89	9.46	10.62	
Level 4	9.20							
Level 5	11.45							
Level 6	17.29							
Maximum margin	10.08	4.16	0.75	3.43	2.36	-3.00	-2.08	

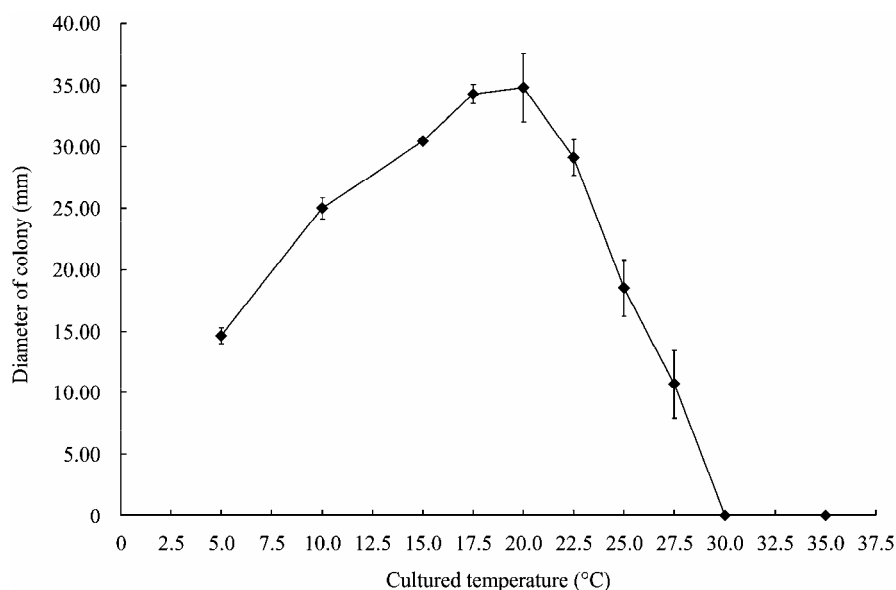


图2 温度对 Pseu-F 菌丝生长的影响(培养 14 d, SPPDA 平板)

Fig. 2 Effects of temperature on Pseu-F mycelial growth (Cultured 14 d, on SPPDA plate)

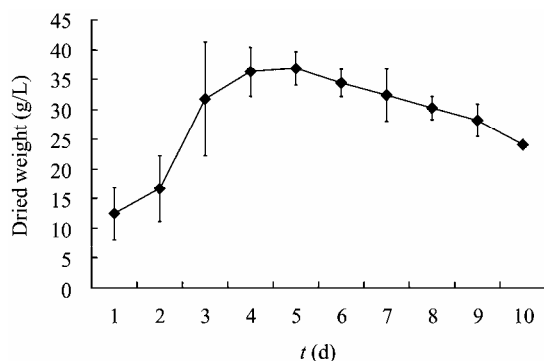


图3 培养时间对 Pseu-F 菌丝产量的影响(20 °C)

Fig. 3 Effects of culture time on Pseu-F mycelial yield (20 °C)

3 讨论

玫红假裸囊菌 *Pseudogymnoascus roseus* Raillou 是分布范围极广的一种子囊菌, 隶属于甲爪团囊菌目 Onygenales, 粘丝裸囊菌科 Myxotrichaceae, 是假裸囊菌属 *Pseudogymnoascus* 的模式种。常发现于土壤、泥炭、植物根、腐木和其它有机物质^[2-7], 甚至存在于 Kara Sea 海底泥中^[8], 从四川、云南和西藏的冬虫夏草的菌核、菌膜和子座上也分离到该菌^[9-10]。

中国被毛孢 *Hirsutella sinensis* 是可以确认的冬

虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 无性型, 在沈南英等研究中, 中国被毛孢的部分菌落上多次形成了类似于天然冬虫夏草的子座^[11], 但冬虫夏草子实体的培育却是一个难题^[12]。

一些分离自冬虫夏草的真菌, 如中国金孢霉 *Chrysosporium sinense*、中国弯颈霉 *Tolyposcladium sinense* 等可以产生与冬虫夏草相似的化学成分^[13-15]。有人认为, 在天然冬虫夏草中除了中国被毛孢外还存在着内寄生菌、伴生菌或共生菌^[16]。

2002 年我们对采自甘肃碌曲的 48 枚和玛曲的 38 枚冬虫夏草的子座进行了常规组织分离, *Pseudogymnoascus roses* 的分出率分别达 14.6% 和 15.8%, 是该批次标样中除中国被毛孢外分出率最高的真菌种类(中国被毛孢的分出率分别为 87.5% 和 68.4%)。

Pseudogymnoascus roses 发酵产物的成分和功能正在研究测试中, 该菌与中国被毛孢的关系及其在冬虫夏草子实体形成中的作用值得做更多的深入研究。

致谢: 甘肃出入境检验检疫局文朝慧女士帮助进行试验菌株的分子鉴定, 特致谢忱。

参考文献

- [1] Tsuneda A. Scanning electron microscopy of *Pseudogymnoascus roseus*[J]. Mycologia, 1982, 74(5): 844–847.
- [2] Sigler L, Lumley TC, Currah RS. New species and records of saprophytic ascomycetes (Myxotrichaceae) from decaying logs in the boreal forest[J]. Mycoscience, 2000, 41(5): 495–502.
- [3] Sierota Z, Kwaśna H. Changes in fungal communities in abandoned farmland soil enriched with pine sawdust[J]. Folia Forestalia Polonica Seria A: Leśnictwo, 1998, 40: 85–94.
- [4] Rice AV, Currah RS. Two new species of *Pseudogymnoascus* with *Geomyces* anamorphs and their phylogenetic relationship with *Gymnostellatospora*[J]. Mycologia, 2006, 98(2): 307–318.
- [5] 梁晨, 吕国忠. 辽宁省农田作物根围的真菌 I [J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(3): 185–187.
- [6] Sogonov MV. Fungi from North-West Caucasus: from the mountains to the molecular level. The 7th International Mycological Congress, 2002, Oslo Norway, IMC7 Main Congress Theme I: Biodiversity and conservation, Book of Abstracts: 178–179.
- [7] Hirose D, Shirouzu T, Hirota M, et al. Species richness and species composition of fungal communities associated with cellulose decomposition at different altitudes on the Tibetan Plateau[J]. Journal of Plant Ecology, 2009, 2(4): 217–224.
- [8] Bubnova EN. Fungal diversity in bottom sediments of the Kara Sea[J]. Botanica Marina, 2010, 53(6): 595–600.
- [9] Jiang Y, Yao YJ. ITS sequence analysis and ascomatal development of *Pseudogymnoascus roseus*[J]. Mycotaxon, 2005, 94: 55–73.
- [10] 张永杰, 孙炳达, 张姝, 等. 分离自冬虫夏草可培养真菌的多样性研究[J]. 菌物学报, 2010, 29(4): 518–527.
- [11] 魏鑫丽, 印象初, 郭英兰, 等. 冬虫夏草及其相关类群的分子系统学分析[J]. 菌物学报, 2006, 25(2): 192–202.
- [12] 李春如, 南圣姬, 耿德贵, 等. 十七种虫草的子实体培育研究[J]. 菌物学报, 2006, 25(4): 639–645.
- [13] 梁宗琦. 一个分离自冬虫夏草的金孢霉新种[J]. 真菌学报, 1991, 10(1): 50–56.
- [14] 李兆兰. 中国弯颈霉新种及产环孢菌素的研究[J]. 真菌学报, 1988, 7(2): 93–98.
- [15] 方焕谋, 谭树明, 詹松. 中国弯颈霉培养物的化学成份分析[J]. 菌物系统, 1998, 17(1): 46–50.
- [16] 梁宗琦, 韩燕峰, 梁建东, 等. 冬虫夏草 *Ophiocordyceps sinensis* 研究中几个值得关注的问题[J]. 微生物学通报, 2010, 37(11): 1692–1697.

稿件书写规范

高校教改纵横栏目简介及撰稿要求

“高校教改纵横”栏目,原“高等院校教学”,是中国微生物学会主办的科技期刊中唯一的教学类栏目,也是中国自然科学核心期刊中为数不多的教学栏目。该栏目专为微生物学及其相关学科领域高校教师开辟,一方面为高校微生物学科的教师提供一个发表论文的平台,同时微生物关联学科的一部分确实优秀的论文也可以在此发表,是微生物学及相关领域教学研究、交流、提高的园地。

本栏目的文章有别于其他实验类研究报告,特色非常鲜明。要求作者来自教学第一线,撰写的稿件内容必须要有新意、要实用,不是泛泛地叙述教学设计与过程,而是确实有感而发,是教学工作中的创新体会,或者在教学中碰到的值得商榷的、可以与同行讨论的有价值的论题。在内容选材上应该有鲜明的特点和针对性,做到主题明确、重点突出、层次分明、语言流畅。教师的教学思路应与时俱进,注意将国内外新的科技成果和教学理念贯穿到教学之中,只有这样才能真正起到教与学的互动,促进高校生物学教学的发展,更多更好地培养出国家需要的高科技创新人才。这也是本栏目的目的所在。

同时,为了给全国生物学领域的教学工作者提供一个更广阔更高层次的交流平台,本栏目还开辟了“名师名课”版块,邀约相关生命科学领域,如微生物学、分子生物学、生物医学、传染病学、环境科学等的教学名师、知名科学家就教学和学生培养发表观点,推荐在教学改革、教学研究、引进先进教学手段或模式以及学生能力培养等方面有突出成绩的优秀论文,为高校教师以及硕士、博士研究生导师提供一个可资交流和学习的平台,促进高校教学和人才培养水平的提高。

欢迎投稿! 欢迎对本栏目多提宝贵意见!