

蛹虫草表型多态性对子实体产生及虫草菌素的影响

李光荣^{1,2,3} 文庭池¹ 康冀川^{1,2,3*} 康超^{1,3} 雷帮星¹

- (1. 西南药用生物资源教育部工程研究中心 贵州 贵阳 550025)
- (2. 贵州大学贵州省农业生物工程重点实验室 贵州 贵阳 550025)
- (3. 贵州大学生命科学学院 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为选育高产子实体和虫草菌素的蛹虫草菌株, 从野生蛹虫草中分离单孢子并进行分型, 之后进行产子实体实验; 同时对蛹虫草子实体进行了产孢结构的观察, 并用高效液相色谱仪检测了子实体和培养基中的虫草菌素。结果表明, 菌落背面颜色为橙铬色的菌株容易产生子实体; 出发(原代)菌株所产子实体在形态上更接近野生蛹虫草, 而角变株的子实体畸形; 出发菌株产子实体能力要比该菌株未发生角变部分分离株和角变部分分离株都强。在虫草菌素的产量上也以出发菌株为高, 表明表型多态性对蛹虫草产子实体和虫草菌素有很大的影响。这对于优势菌种的筛选和生产实践有借鉴意义。

关键词: 蛹虫草, 表型多态性, 子实体, 虫草菌素

The effect of polymorphism on fruiting body and cordycepin production of *Cordyceps militaris*

LI Guang-Rong^{1,2,3} WEN Ting-Chi¹ KANG Ji-Chuan^{1,2,3*} KANG Chao^{1,3}
LEI Bang-Xing¹

- (1. The Engineering and Research Center for Southwest Bio-Pharmaceutical Resources, Ministry of Education, Guiyang, Guizhou 550025, China)
- (2. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Bioengineering, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)
- (3. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract: In order to screen and breed the strain with high fruiting body and cordycepin production, this study aims to investigate the effect of polymorphism on fruiting body and cordycepin production of *C. militaris*. Three progeny populations were isolated from wild fruitbody of *C. militaris*, cultural char-

基金项目: 贵州省科学技术基金项目(No. 黔科合 J 字[2008]2089); 贵州省教育厅自然科学研究项目[No. 黔教科(2009)0129 号]; 贵州大学研究生创新基金项目(No. 校研农 2009018)

* 通讯作者: Tel: 86-851-8298675; 邮箱: jichuank@yahoo.co.uk

收稿日期: 2010-09-02; 接受日期: 2010-11-29

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

acteristics of ascospores and fruitbody-producing ability were observed, and determined Cordycepin content in fruitbody and medium by HPLC. The results showed that the strains with colony reverse color of orange chrome could produce fruiting body easily. The sector mutation proportion of the strain produce few or no fruiting body. The shape and microstructure of fruiting body produced by original strain were similar to the wild strain in the nature. The original strain produced more fruiting body and cordycepin than the strains isolated from sector mutation proportion and the other parts without sector mutation. These results demonstrated the effect of polymorphism on fruiting body and cordycepin production of *C. militaris*.

Keywords: *Cordyceps militaris*, Polymorphism, Fruiting body, Cordycepin

蛹虫草 [*Cordyceps militaris*(L.) Link.] 是一种药食兼用虫生真菌, 是我国名贵的中药材之一, 具有很高的药用价值和营养价值。药用方面, 蛹虫草菌粉在我国作为一类新药(中药国药准字 Z20030034 和 Z20030035) 已获得国家食品药品监督管理局批准进入临床, 其有效成分主要是虫草多糖、核苷类物质(如虫草菌素和腺苷)、虫草酸、甾体等^[1]; 虫草菌素是蛹虫草产生的一种重要次生代谢产物, 具有抗菌^[2]、降血脂^[3]、减肥^[4]、抗肿瘤和抗癌的作用^[5-6]; 虫草多糖由于其显著的免疫活性和抗肿瘤作用已被国家食品药品监督管理局受理进入临床审评阶段(CXZL0700014, CXZL0700015)。在作为功能性食品方面, 国外已开发有数十种产品投放市场^[7]。

由于人们不合理的掠夺式采挖使得野生虫草资源不断减少, 但是国内外对虫草的需求量却日益增加, 在野生虫草供应不足的情况下人们自然想到通过寻找替代品或人工栽培来满足市场的需求。目前蛹虫草已实现大规模人工栽培, 但是菌种退化和优良菌种的选育一直是大规模生产的瓶颈, 目前的人工栽培技术尚未完全解决。菌落的角变现象是蛹虫草无性型多型现象的表现之一, 也是蛹虫草菌种退化的形态表现^[8-9]。多型现象(Polymorphism) 可指一种真菌同时具有有性型和无性型两种繁殖方式, 或能产生一种以上类型孢子的现象^[8]。真菌菌种遗传不稳定是影响真菌子实体和次生代谢产物生产的瓶颈。

本研究从野生蛹虫草子实体中分离单子囊孢子, 对其培养性状进行了观察并对其表型差异较大的菌株产子实体能力进行了考察, 比较了其固体发

酵虫草菌素的产量, 也对子实体及其产孢结构进行了显微观察, 旨在为选育蛹虫草高产虫草菌素菌株和子实体高产株提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 蛹虫草单子囊孢子菌株, 分别分离自四川省瓦屋山自然保护区采集的 082-1 号标本、贵州六盘水玉舍国家森林公园采集的 08Y₁ 号标本、贵州雷公山国家森林公园采集的 09CM₂ 号标本。均保存于贵州省生化工程中心真菌学与药用真菌研究室。

1.1.2 试剂: 虫草菌素(Cordycepin)标准品购于美国 Sigma 公司。其他实验用试剂均为分析纯。

1.1.3 培养基: (1) PDA: 马铃薯 200 g 切块, 水煮沸 30 min, 过滤取汁, 葡萄糖 20 g, 水 1 000 mL, pH 值自然。

(2) 液体培养基(g/L): 蛋白胨 20, 蔗糖 20, MgSO₄·7H₂O 0.05, KH₂PO₄ 0.1, pH 值自然。

(3) 蛹虫草固体发酵基质为大米(市售籼稻, 每个玻璃瓶装 20 g), 营养液为(g/L): 蛋白胨 5、蔗糖 10、MgSO₄·7H₂O 0.1, KH₂PO₄ 0.1; 基质: 营养液按 1:1.6 质量比比, pH 值自然, 无色玻璃瓶容积为 470 mL (内径 6.2 cm, 高度 15 cm), 用聚乙烯膜封口, 1×10⁵ Pa 灭菌 30 min。

1.1.4 设备: 1100 型分析 HPLC, Agilent Technology; CX41RF 型 OLMPUS 显微镜; SMZ-T2 连续变倍体视显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司; JA2003 电子天平, 上海天平仪器厂; ZK-82A 型真空干燥箱, 上海实验仪器总厂; SB2200 型超声波清洗

机, 上海 BRANSON 公司; YX400 高压蒸汽灭菌锅, 上海三申医疗器械有限公司; 其他为一般常规仪器。

1.2 方法

1.2.1 单子囊孢子分离与培养: 将新鲜、成熟的蛹虫草子实体用细线系住悬挂在水琼脂培养基平板上方, 放置 15 min 到数小时不等(依子实体的成熟度而定), 使子囊孢子自然弹射其上, 在体视显微镜下挑取只有单个子囊孢子的水琼脂小块, 置于 PDA 培养基上, 在 25 °C 的人工气候箱培养 30 d。观察其菌落颜色、形态、生长速度(培养 30 d 后是否长满平板)、有无角变等培养性状。

1.2.2 液体种的制作: 将活化好的菌株制成孢子悬液, 然后稀释。每瓶接入 1.5×10^{10} 个孢子到液体母种培养基中(装液量为 50 mL/250 mL 三角瓶), 于 25 °C 旋转摇床(150 r/min)培养 4 d, 待用。

1.2.3 蛹虫草固体发酵产子实体: 用活化好的斜面种接入液体培养基中, 于 23 °C 旋转摇床(150 r/min)培养 4 d。将 3 mL 液体菌种接到灭菌的大米培养基上, 然后放在人工气候室里黑暗培养, 培养的温度前 15 d 恒定在 23 °C, 15 d 后为刺激子实体的产生变为变温培养(白天 25 °C, 晚上 16 °C, 白光光照 12 h/d, 光照度 500 Lx); 培养 70 d 后收获子实体和培养基, 用于干重和虫草菌素的检测, 每组设 5 瓶重复, 取 5 瓶数据的平均值。

1.2.4 子实体及产孢结构的观察: 取新鲜、成熟的蛹虫草子实体, 徒手切成薄片置于清洁的载玻片上, 滴加少量棉兰染色液, 染色 3 min, 盖上盖玻片, 用铅笔的橡皮头部轻敲盖玻片使子囊壳破裂放出子囊, 用吸水纸从盖玻片边缘吸去多余染色剂, 封片,

供显微观察用。

1.2.5 样品中虫草菌素的测定: 将收获的子实体和培养基在 50 °C 烘箱里烘干, 再用高速粉碎机粉碎至 60 目; 称取 0.1 g 放入洁净的试管中, 加 10 mL 双蒸水, 超声破碎提取 30 min, 然后在 5 000 r/min 离心 15 min, 稀释后用 0.45 μm 的微孔滤膜过滤, 进样 10 μL, 紫外检测波长为 259 nm, 柱温 45 °C, 流速为 0.8 μL/min。参照康冀川等^[10]方法采用 HPLC 测定子实体和培养基中虫草菌素的含量。

2 结果与分析

2.1 单子囊孢子培养性状

从野生的蛹虫草子实体弹射的子囊孢子共分离到 3 个子囊孢子群体。对这 3 个子囊孢子群体的单子囊孢子菌株的培养性状进行考察。参考梁月等^[11]方法根据菌落颜色、形态、生长速度、有无角变进行分析, 分为 A-H 共 8 个组(图 1)。

从表 1 中可以看出, 3 个子囊孢子群体中菌落颜色为橙铬色、杏橙色和淡柠檬色或者白色, 且以杏橙色为主, 所占比例最大, 082-1、08Y1、09CM2 群体杏橙色所占比例分别为 68.42%、80.77%、61.68%。不同群体间的菌落生长速率存在的差异并不大, 绝大多数子囊孢子菌落生长速率正常, 082-1 群体生长缓慢的菌株所占比例稍微高于其他群体, 为 7.89%。3 个子囊孢子群体中菌落发生扇形角变的比例有明显的差异, 08Y1 号标本分离的单子囊孢子菌落发生角变的比例较大, 达到 63.08%, 而 082-1 和 09CM₂ 以未发生角变的单子囊孢子为多, 分别为 68.79%和 76.64%。

表 1 不同单子囊孢子菌落培养性状比较
Table 1 Comparison of cultured characteristics of different ascospore populations (%)

菌株编号 Strain No.	菌落颜色 Colony colour			生长速率 Growth rate		扇形角变 Sector mutation	
	橙铬色 Orange chrome	杏橙色 Apricot orange	淡柠檬色或白色 Pale lemon yellow or white	正常 Normal	缓慢 Slow	有 +	无 -
082-1	15.79	68.42	15.79	92.11	7.89	34.21	68.79
08Y ₁	5.38	80.77	13.85	96.92	3.08	63.08	36.92
09CM ₂	11.22	61.68	27.10	95.33	4.67	23.36	76.64

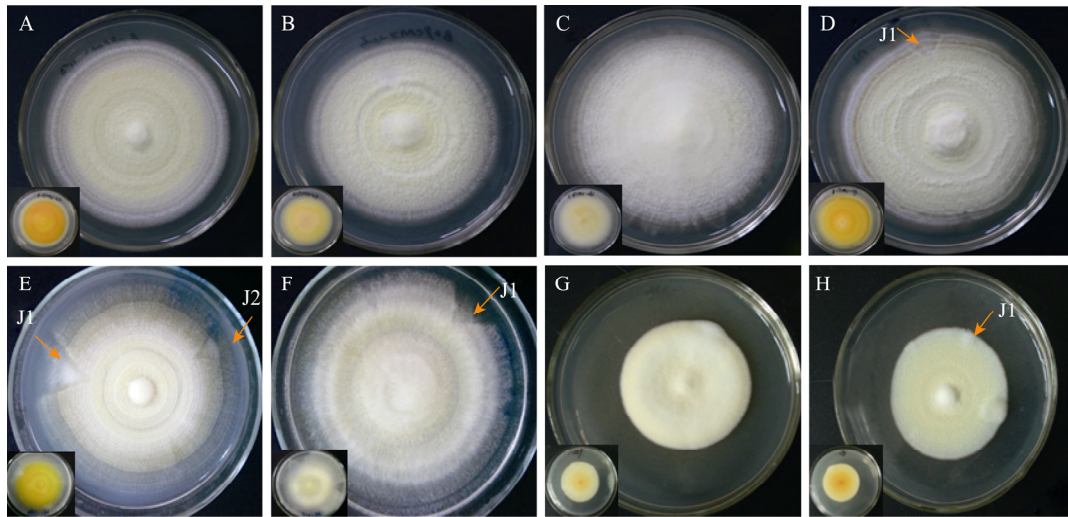


图 1 菌落表型

Fig. 1 The polymorphism of colony characteristic

注: A: 菌落背面为橙铬色, 生长正常, 无角变; B: 菌落背面为杏橙色, 生长正常, 无角变; C: 菌落背面为淡柠檬色或白色, 生长正常, 无角变; D: 菌落背面为橙铬色, 生长正常, 有角变; E: 菌落背面为杏橙色, 生长正常, 有角变; F: 菌落背面为淡柠檬色或白色, 生长正常, 有角变; G: 菌落生长缓慢, 无角变; H: 菌落生长缓慢, 有角变。

Note: A: Orange Chrome, normal growth, no mutation; B: Apricot Orange, normal growth, no mutation; C: Pale lemon yellow or white, normal growth, no mutation; D: Orange Chrome, normal growth, mutation; E: Apricot Orange, normal growth, mutation; F: Pale lemon yellow or white, normal growth, mutation; G: Slow growth, no mutation; H: Slow growth, mutation.

表 2 082-1 菌株表型多态性对子实体产量及培养基干重的影响

Table 2 The effect of polymorphism on fruit body production and substrate weight of 082-1

菌株编号 Strain No.	子实体湿重/干重		培养基湿重/干重	
	Fresh/Dry weight of fruitbody (g/bottle)		Fresh/Dry weight of medium (g/bottle)	
A082-1-197	10.94±0.41/1.82±0.11		38.77±0.31/10.16±0.11	
B082-1-122	9.95±0.33/1.22±0.16		34.48±0.25/10.02±0.20	
C082-1-94	0		48.70±0.77/11.58±0.29	
082-1-155	10.69±0.55/1.35±0.18		42.61±0.48/12.63±0.31	
D082-1-155	11.51±0.22/1.85±0.14		35.17±0.36/11.31±0.28	
D082-1-155J ₁	0		49.76±0.83/11.78±0.38	
D082-1-155J ₂	8.27±0.61/1.22±0.14		45.77±0.66/12.54±0.31	
082-1-220	0		49.32±0.80/10.85±0.33	
E082-1-220	0		50.89±0.55/13.92±0.34	
E082-1-220J ₁	0		48.73±0.30/9.44±0.39	
082-1-200	0		51.67±0.32/11.80±0.15	
F082-1-200	0		46.68±0.95/9.57±0.14	
F082-1-200J ₁	0		48.08±0.94/9.78±0.31	
082-1-328	0		48.72±0.87/9.83±0.44	
082-1-2	0		50.44±0.81/12.86±0.22	
H082-1-2	0		49.85±0.71/13.65±0.32	
H082-1-2J ₁	0		48.84±0.32/10.86±0.42	

注: 082-1-155: 出发菌株; D082-1-155: 菌株未角变部分分离株; D082-1-155J₁ 和 D082-1-155J₂: 菌株角变部分分离株; 0: 菌株未长子实体。

Note: 082-1-155: The original strain; D082-1-155: The proportion of the strain without sector mutation; D082-1-155J₁ and D082-1-155J₂: The proportion of the strain with sector mutation; 0: The strain without fruiting body production.

2.2 表型多态性对蛹虫草产子实体的影响

2.2.1 表型多态性对子实体产量的影响: 由表 2、表 3、表 4 可知, 菌落背面颜色为橙铬色的菌株(A 型和 D 型)比较容易产子实体, 菌落背面颜色为杏橙色的菌株(B 型和 E 型)产子实体较少, 菌落背面颜色为淡柠檬色或白色的菌株(C 型和 F 型)不能产子实体, 生长缓慢的菌株(G 型和 H 型)均不能产子实体。出发(原代)菌株子实体的产量要比该菌株未角变部分和角变部分子实体产量都高, 有些角变部分分离株不

能产子实体, 但极少数角变部分分离株的子实体产量要比该菌株未角变部分的子实体产量高。09CM₂-120 和 08Y1-5-85 号菌株菌落背面为淡柠檬色或白色的菌株, 生长正常, 有角变, 不管是出发菌株还是该菌株未角变部分都不能长出子实体, 但角变部分分离株却能够产子实体。在所有菌株中, 长子实体的菌株培养基的湿重和干重均相对较小, 没长子实体的菌株培养基的湿重和干重均相对较大, 说明大米被蛹虫草充分发酵之后重量会减轻。

表 3 08Y1 菌株表型多态性对子实体产量及培养基干重的影响
Table 3 The effect of polymorphism on fruiting body production and substrate weight of 08Y1

菌株编号 Strain No.	子实体湿重/干重 Fresh/Dry weight of fruitbody (g/bottle)	培养基湿重/干重 Fresh/Dry weight of medium (g/bottle)
A08Y ₁ -5-200	9.95±0.23/1.34±0.05	35.08±0.83/8.84±0.20
B08Y ₁ -5-16	9.85±0.42/1.58±0.22	40.09±0.32/10.46±0.24
C08Y ₁ -5-25	0	46.40±0.54/10.98±0.47
C08Y ₁ -5-128	0	47.03±0.75/11.22±0.34
08Y ₁ -5-180	9.06±0.372/1.52±0.18	39.29±0.54/8.41±0.47
D08Y ₁ -5-180	0	49.79±0.27/14.31±0.58
D08Y ₁ -5-180J ₁	0	49.96±0.82/12.73±0.25
08Y ₁ -5-42	11.07±0.31/1.75±0.23	35.95±0.12/10.23±0.11
E08Y ₁ -5-42	5.88±0.29/1.14±0.34	42.75±0.25/11.19±0.33
E08Y ₁ -5-42J ₁	0	48.81±0.19/10.16±0.37
E08Y ₁ -5-42J ₂	7.79±0.39/0.94±0.05	43.52±0.37/10.58±0.30
08Y ₁ -5-176	9.59±0.62/1.43±0.07	40.87±0.63/11.65±0.47
E08Y ₁ -5-176	7.05±0.28/0.87±0.20	43.24±0.84/11.62±0.14
E08Y ₁ -5-176J ₁	5.33±0.09/0.87±0.19	44.79±0.56/11.70±0.41
08Y ₁ -5-85	0	47.06±0.28/11.43±0.23
F08Y ₁ -5-85	0	47.47±0.63/11.49±0.42
F08Y ₁ -5-85J ₁	6.09±0.31/0.83±0.08	41.00±0.43/11.30±0.17
G08Y ₁ -5-62	0	44.56±0.38/10.34±0.55
08Y ₁ -5-227	0	44.26±0.45/10.11±0.40
H08Y ₁ -5-227	0	45.50±0.54/11.01±0.49
H08Y ₁ -5-227 J ₁	0	46.52±0.94/7.91±0.56

注: 08Y1-5-180: 出发菌株; D08Y1-5-180: 菌株未角变部分分离株; D08Y1-5-180J₁: 菌株角变部分分离株; 0: 菌株未长子实体。

Note: 08Y1-5-180: The original strain; D08Y1-5-180: The proportion of the strain without sector mutation; D08Y1-5-180J₁: The proportion of the strain with sector mutation; 0: The strain without fruiting body production.

表 4 09CM₂ 菌株表型多态性对子实体产量及培养基干重的影响
Table 4 The effect of polymorphism on fruiting body production and substrate weight of 09CM₂

菌株编号 Strain No.	子实体湿重/干重 Fresh/Dry weight of fruitbody (g/bottle)	培养基湿重/干重 Fresh/Dry weight of medium (g/bottle)
A09CM ₂ -150	2.22±0.28/0.38±0.04	42.87±1.60/11.95±0.11
B09CM ₂ -43	2.09±0.13/0.48±0.07	41.35±0.94/10.97±0.59
C09CM ₂ -181	7.88±0.36/1.37±0.07	36.16±0.47/9.46±0.29
09CM ₂ -173	8.17±0.29/1.31±0.07	36.69±0.34/11.23±0.24
D09CM ₂ -173	2.03±0.25/0.67±0.14	48.73±0.70/12.74±0.27
D09CM ₂ -173J ₁	3.31±0.30/0.76±0.05	38.95±0.52/12.66±0.84
09CM ₂ -163	0	43.14±0.54/8.60±0.78
E09CM ₂ -163	0.99±0.17/0.22±0.03	48.61±2.08/11.95±0.43
E09CM ₂ -163 J ₁	1.40±0.026/0.32±0.10	43.47±0.22/12.47±0.71
09CM ₂ -120	0	44.01±0.79/14.30±0.15
F09CM ₂ -120	0	43.83±0.75/13.67±0.11
F09CM ₂ -120 J ₁	7.06±0.80/1.46±0.15	40.27±0.29/11.27±0.87
09CM ₂ -78	0	45.57±0.90/9.67±0.82
G09CM ₂ -78	0	43.46±0.29/10.88±0.23

注: 09CM₂-173: 出发菌株; D09CM₂-173: 菌株未角变部分分离株; D09CM₂-173J₁: 菌株角变部分分离株; 0: 菌株未长子实体。09CM₂号菌株单子囊孢子群体无 H 型。

Note: 09CM₂-173: The original strain; D09CM₂-173: The proportion of the strain without sector mutation; D09CM₂-173J₁: The proportion of the strain with sector mutation; 0: The strain without fruiting body production. There is no H group in ascospore populations of 09CM₂.

2.2.2 表型多态性对蛹虫草子实体表现形态的影响: 菌落背面颜色为橙铬色的 A 型和 D 型(图 2 和图 3)较容易长子实体, 但是也有 A 型不能产子实体或者产的子实体较少的情况(图 4), 绝大多数出发菌株子实体生长茂盛, 大小均一, 但子实体较细且较短, 子实体顶部有橙黄色的子囊壳; 未角变部分分离株子实体较少(图 4 的 D 型), 但子实体粗而长, 子实体顶部有橙黄色的子囊壳; 角变部分分离株的子实体较少, 子实体长短相差较大, 子实体较细, 子实体畸形, 顶部没有子囊壳或者较少(图 2 的 E 型、图 3 的 D 型、图 4 的 D 型和图 5)。菌落背面为淡柠檬色或白色的 09CM₂-120 号菌株无论是出发菌株还是该菌株的未角变部分分离株都没有长出子实体, 而角变部分分离株能够长出发育良好的子实体, 子实体

的顶部有丰富的橙黄色的子囊壳, 但是子实体大小不均一(图 4 的 F 型和图 5)。

2.2.3 表型多态性对子实体及产孢结构的影响: 野生蛹虫草成熟子实体的可孕部分有丰富的子囊壳, 子囊壳大小形状均一, 子囊壳近锥形(图 6A); 人工栽培的蛹虫草(包括出发菌株, 该菌株未角变部分和角变部分)成熟子实体的可孕部分少数有子囊壳(图 7—图 12A 和图 14—图 15A), 多数有很少的子囊壳或者没有子囊壳(图 13), 且子囊壳大小差别较大, 形状各异, 或近锥形, 或长瓶形, 或椭圆形(图 7—图 12B 和图 14—图 15B); 野生蛹虫草的子囊中有发育良好的子囊孢子, 子囊孢子多数(图 6E); 人工栽培的蛹虫草子囊中多数没有发育良好的子囊孢子, 有些甚至没有子囊孢子(图 9C、图 12C 和图 15C)。

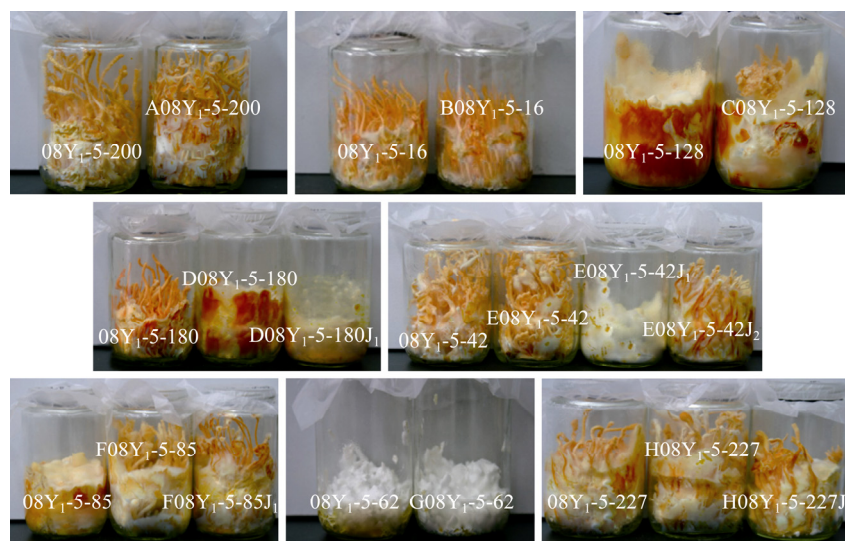


图 2 08Y1 菌株不同单子囊孢子群体子实体产生情况比较

Fig. 2 Fruiting body production of different types of single-ascospore population of 08Y1

注: A: 菌落背面为橙铬色, 生长正常, 无角变; B: 菌落背面为杏橙色, 生长正常, 无角变; C: 菌落背面为淡柠檬色或白色, 生长正常, 无角变; D: 菌落背面为橙铬色, 生长正常, 有角变; E: 菌落背面为杏橙色, 生长正常, 有角变; F: 菌落背面为淡柠檬色或白色, 生长正常, 有角变; G: 菌落生长缓慢, 无角变; H: 菌落生长缓慢, 有角变. 08Y1-5-180: 出发菌株; D08Y1-5-180: 菌株未角变部分分离株; D08Y1-5-180J₁: 菌株角变部分分离株.

Note: A: Orange Chrome, normal growth, no mutation; B: Apricot Orange, normal growth, no mutation; C: Pale lemon yellow or white, normal growth, no mutation; D: Orange Chrome, normal growth, mutation; E: Apricot Orange, normal growth, mutation; F: Pale lemon yellow or white, normal growth, mutation; G: Slow growth, no mutation; H: Slow growth, mutation. 08Y1-5-180: The original strain; D08Y1-5-180: The proportion of the strain without sector mutation. D08Y1-5-180J₁: The proportion of the strain with sector mutation.

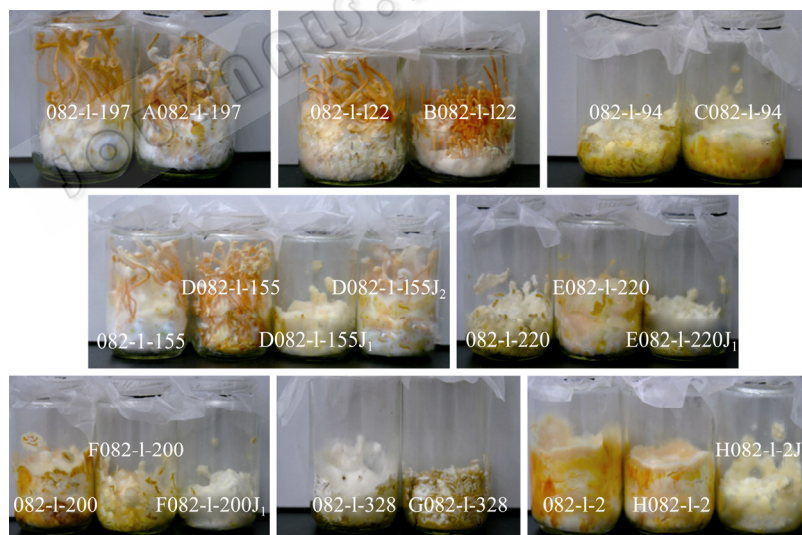


图 3 082-1 菌株不同单子囊孢子群体子实体产生情况比较

Fig. 3 Fruiting body production of different types of single-ascospore population of 082-1

注: A: 菌落背面为橙铬色, 生长正常, 无角变; B: 菌落背面为杏橙色, 生长正常, 无角变; C: 菌落背面为淡柠檬色或白色, 生长正常, 无角变; D: 菌落背面为橙铬色, 生长正常, 有角变; E: 菌落背面为杏橙色, 生长正常, 有角变; F: 菌落背面为淡柠檬色或白色, 生长正常, 有角变; G: 菌落生长缓慢, 无角变; H: 菌落生长缓慢, 有角变. 082-1-155: 出发菌株; D082-1-155: 菌株未角变部分分离株; D082-1-155J₁ 和 D082-1-155J₂: 菌株角变部分分离株.

Note: A: Orange Chrome, normal growth, no mutation; B: Apricot Orange, normal growth, no mutation; C: Pale lemon yellow or white, normal growth, no mutation; D: Orange Chrome, normal growth, mutation; E: Apricot Orange, normal growth, mutation; F: Pale lemon yellow or white, normal growth, mutation; G: Slow growth, no mutation; H: Slow growth, mutation. 082-1-155: The original strain; D082-1-155: The proportion of the strain without sector mutation; D082-1-155J₁ and D082-1-155J₂: The proportion of the strain with sector mutation.

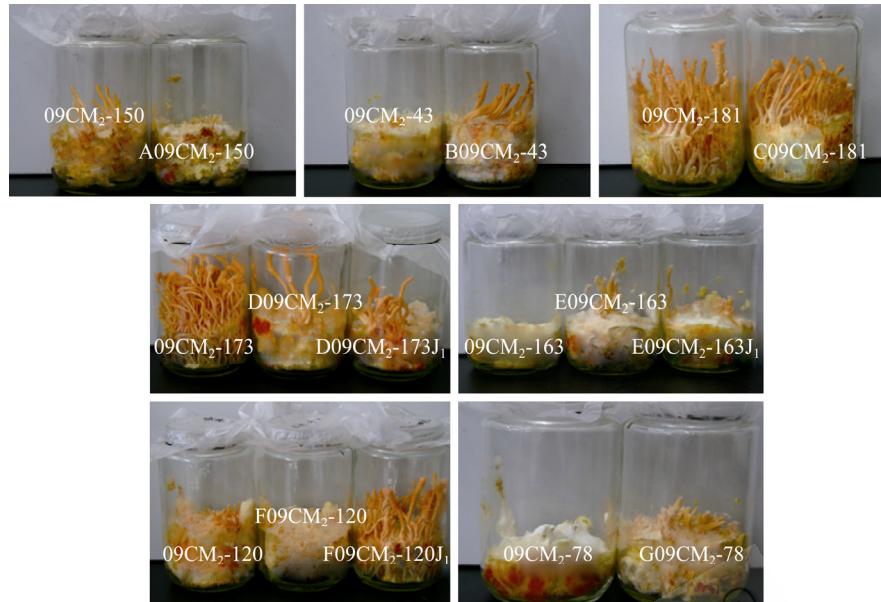


图 4 09CM₂ 菌株不同单子囊孢子群体子实体产生情况比较

Fig. 4 Fruiting body production of different types of single-ascospore population of 09CM₂

注: A: 菌落背面为橙铬色, 生长正常, 无角变; B: 菌落背面为杏橙色, 生长正常, 无角变; C: 菌落背面为淡柠檬色或白色, 生长正常, 无角变; D: 菌落背面为橙铬色, 生长正常, 有角变; E: 菌落背面为杏橙色, 生长正常, 有角变; F: 菌落背面为淡柠檬色或白色, 生长正常, 有角变; G: 菌落生长缓慢, 无角变; H: 菌落生长缓慢, 有角变. 09CM₂-173: 出发菌株; D09CM₂-173: 菌株未角变部分分离株; D09CM₂-173J₁: 菌株角变部分分离株. 09CM₂号菌株单子囊孢子群体无 H 型.

Note: A: Orange Chrome, normal growth, no mutation; B: Apricot Orange, normal growth, no mutation; C: Pale lemon yellow or white, normal growth, no mutation; D: Orange Chrome, normal growth, mutation; E: Apricot Orange, normal growth, mutation; F: Pale lemon yellow or white, normal growth, mutation; G: Slow growth, no mutation; H: Slow growth, mutation. 09CM₂-173: The original strain; D09CM₂-173: The proportion of the strain without sector mutation. D09CM₂-173J₁: The proportion of the strain with sector mutation. There is no H group in ascospore populations of 09CM₂.



图 5 蛹虫草子实体长于子囊壳与否的比较

Fig. 5 Comparison of perithecial stromata produced by *C. militaris*

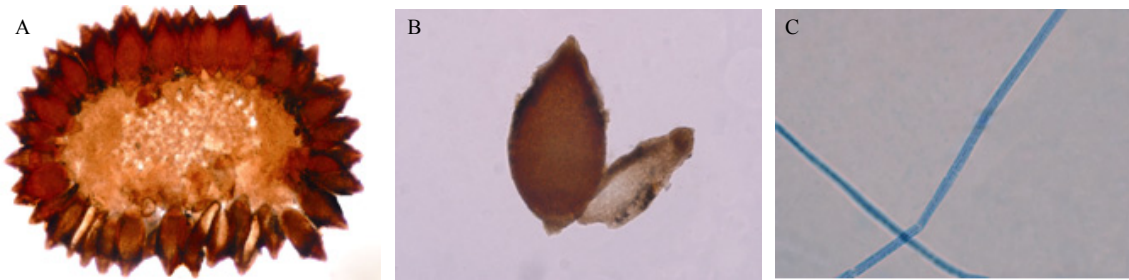


图 6 野生型子实体子囊孢子产孢结构

Fig. 6 Fruiting body structure of wild *Cordyceps militaris*

注: A: 子座(×40); B: 子囊壳(×400); C: 子囊(×1 000).

Note: A: Stromata (×40); B: Perithecial (×400); C: Ascus (×1 000).



图 7 09CM₂-173 子实体子囊孢子产孢结构

Fig. 7 Fruiting body structure of 09CM₂-173

注: A: 子座(×40); B: 子囊壳(×400); C: 子囊(×1 000).

Note: A: Stromata (×40); B: Perithecial (×400); C: Ascus (×1 000).



图 8 D09CM₂-173 子实体子囊孢子产孢结构

Fig. 8 Fruiting body structure of D09CM₂-173

注: A: 子座(×40); B: 子囊壳(×400); C: 子囊(×1 000).

Note: A: Stromata (×40); B: Perithecial (×400); C: Ascus (×1 000).

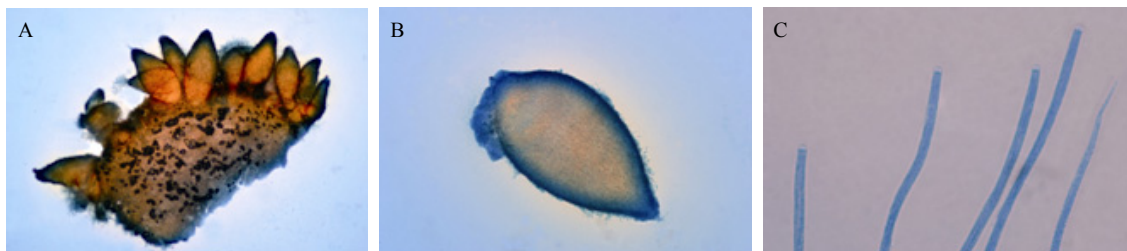
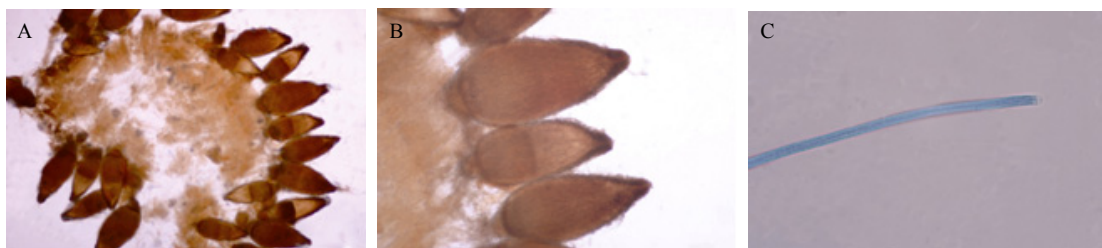


图 9 D09CM₂-173 J₁ 子实体子囊孢子产孢结构

Fig. 9 Fruiting body structure of D09CM₂-173 J₁

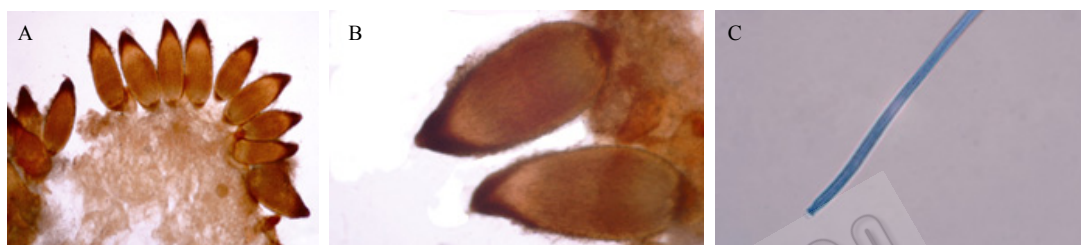
注: A: 子座(×40); B: 子囊壳(×400); C: 子囊(×1 000).

Note: A: Stromata (×40); B: Perithecial (×400); C: Ascus (×1 000).

图 10 08Y₁-5-42 子实体子囊孢子产孢结构Fig. 10 Fruiting body structure of 08Y₁-5-42

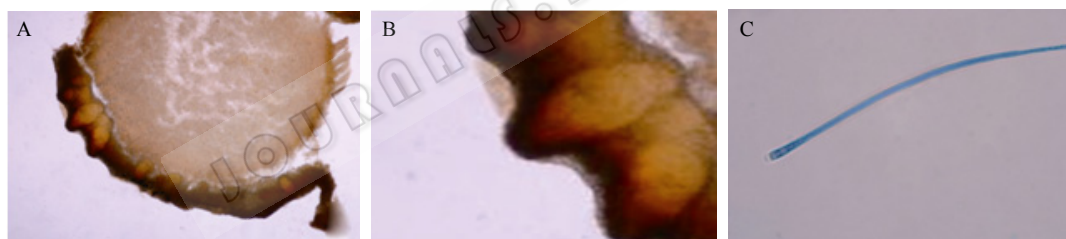
注: A: 子座(×40); B: 子囊壳(×400); C: 子囊(×1 000).

Note: A: Stromata (×40); B: Perithecial (×400); C: Ascus (×1 000).

图 11 E08Y₁-5-42 子实体子囊孢子产孢结构Fig. 11 Fruiting body structure of E08Y₁-5-42

注: A: 子座(×40); B: 子囊壳(×400); C: 子囊(×1 000).

Note: A: Stromata (×40); B: Perithecial (×400); C: Ascus (×1 000).

图 12 E08Y₁-5-42J₂ 子实体子囊孢子产孢结构Fig. 12 Fruiting body structure of E08Y₁-5-42J₂

注: A: 子座(×40); B: 子囊壳(×400); C: 子囊(×1 000).

Note: A: Stromata (×40); B: Perithecial (×400); C: Ascus (×1 000).

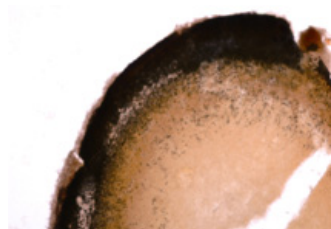


图 13 082-1-155 子实体子囊孢子产孢结构

Fig. 13 Fruiting body structure of 082-1-155

注: 子座横切面(×40); 没有子囊壳。

Note: Microstructure of stromata (×40); No perithecial.

2.3 表型多态性对蛹虫草固体发酵产虫草菌素的影响

对比较选取的有代表性的 4 株单孢子菌株的不同分离株研究后表明(表 5), 无论是培养基中还是子实体中虫草菌素含量都是出发菌株的高。但是也有例外, 如 08Y₁-5-42 号菌株的角变 2 培养基中的虫草菌素含量和子实体中的虫草菌素含量分别高出 26.90%和 12.86%。

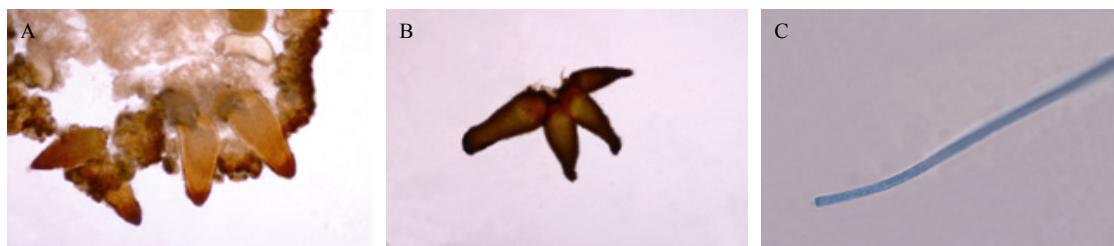


图 14 D082-1-155 子实体子囊孢子产孢结构

Fig. 14 Fruiting body structure of D082-1-155

注: A: 子座($\times 40$); B: 子囊壳($\times 400$); C: 子囊($\times 1\ 000$).Note: A: Stromata ($\times 40$); B: Perithecial ($\times 400$); C: Ascus ($\times 1\ 000$).图 15 D082-1-155J₂ 子实体子囊孢子产孢结构Fig. 15 Fruiting body structure of D082-1-155J₂注: A: 子座($\times 40$); B: 子囊壳($\times 400$); C: 子囊($\times 1\ 000$).Note: A: Stromata ($\times 40$); B: Perithecial ($\times 400$); C: Ascus ($\times 1\ 000$).

表 5 表型多态性对蛹虫草固体发酵产虫草菌素的影响

Table 5 The effect of polymorphism on cordycepin production by solid-state fermentation

菌株编号 Strain No.	培养基中虫草菌素含量 Cordycepin content in medium (%)	子实体中虫草菌素含量 Cordycepin content in fruitbody (%)	总的虫草菌素产量(mg/瓶) Total cordycepin yield (mg/bottle)
082-1-155	0.25 \pm 0.04	0.43 \pm 0.08	37.72 \pm 0.74
D082-1-155	0.04 \pm 0.01	0.27 \pm 0.04	9.892 \pm 0.11
D082-1-155J ₁	0.15 \pm 0.02	0	17.79 \pm 0.44
D082-1-155J ₂	0.24 \pm 0.04	0.29 \pm 0.04	34.04 \pm 0.21
08Y ₁ -5-42	0.17 \pm 0.01	0.51 \pm 0.01	25.96 \pm 0.16
E08Y ₁ -5-42	0.16 \pm 0.02	0.49 \pm 0.03	34.59 \pm 0.54
E08Y ₁ -5-42J ₁	0.15 \pm 0.01	0	14.86 \pm 0.30
E08Y ₁ -5-42J ₂	0.21 \pm 0.03	0.57 \pm 0.09	27.82 \pm 0.23
09CM ₂ -173	0.09 \pm 0.01	0.24 \pm 0.03	13.01 \pm 0.20
D09CM ₂ -173	0.05 \pm 0.01	0.17 \pm 0.04	8.015 \pm 0.13
D09CM ₂ -173J ₁	0.03 \pm 0.01	0.17 \pm 0.01	5.211 \pm 0.11
09CM ₂ -120	0.08 \pm 0.01	0	12.01 \pm 0.14
F09CM ₂ -120	0.06 \pm 0.03	0	7.847 \pm 0.18
F09CM ₂ -120J ₁	0.07 \pm 0.01	0.34 \pm 0.01	12.54 \pm 0.14

注: 总的虫草菌素产量=子实体干重 \times 子实体中虫草菌素含量+培养基干重 \times 培养基中虫草菌素含量.Note: Total cordycepin yield=(Dry weight of fruit body \times Cordycepin content in fruit body)+(Dry weight of medium \times Cordycepin content in medium).

3 讨论

梁宗琦^[8]推论: 在人工培养条件下, 蛹虫草等虫草无性型为适应生存条件的改变, 一方面通过某些营寄生性基因的丢失或钝化, 另一方面也可通过孢子自身菌丝间的原生质、细胞颗粒(如线粒体和病毒颗粒等)和核的交换和/或重组而得到调整。真菌的多型性正是这类丢失、钝化、交换或重组过程的表现。本研究对来自同一子实体的子囊孢子群体中单子囊孢子菌株的培养性状进行培养观察, 发现不同来源的子囊孢子后代群体不但群体之间在培养性状上有不同程度的差异, 即使是来自同一子实体的不同子囊孢子菌株间在菌落颜色、质地、生长速率等性状上也存在一定差异, 各自产生子实体能力表型也不尽相同。通过对菌落表型及产子实体能力表型的观察发现, 菌落背面颜色为橙铬色的菌株容易产生子实体, 这与梁月等^[16]的研究结果相似。

子囊菌需要两个交配型的个体完成有性世代, 它们分别被处于同一相同交配型基因(*MAT*)位点的等位基因控制^[12-13]。后来的研究发现蛹虫草单子囊孢子菌株不能产生子实体或者产生异常的子实体, 具有明显的双极性异核现象, 只有通过两种交配型的菌株交配才能产生正常的子实体, 有少数单子囊孢子菌株能够产生正常的子实体, 表现出自交现象^[14]。本研究通过对单子囊孢子产子实体能力表型的观察发现很多菌株不能长子实体, 产子实体的菌株在产量上也有明显的差异。子实体表现形态的差异结果可以看出有些菌株能够长出发育正常的子实体, 子实体的可孕部分有丰富的子囊壳, 多数子实体的可孕部分仅有少数或没有子囊壳。野生型蛹虫草子座的电镜观察结果显示子囊内有 1-8 个子囊孢子^[15], 人工栽培蛹虫草角变株的子实体子囊内多数没有看到子囊孢子。是否由于遗传物质的改变或培养条件改变导致子实体不能产生子囊孢子还有待进一步的研究。

唐晓庆等^[16]研究了球孢白僵菌在继代培养中的菌落角变现象, 认为菌种退化与菌落角变有着直接关系。李琳等^[17]的研究发现在人工培养基上, 丝状

真菌会发生高频率的退化现象。他们以金龟子绿僵菌不同菌株为对象进行研究发现: (1) 过氧化氢能够提高真菌菌落的退化频率; (2) 菌株去氧胁迫的能力与继代培养稳定性正相关; (3) 角变子 *mtDNA* 中的鸟嘌呤 G 发生了非酶化作用的糖基化修饰; (4) 线粒体膜电势下降、功能发生紊乱; (5) *DNA* 糖基化改变了 *DNA* 的结构与功能; (6) 使用过氧化氢处理野生型菌株能够导致发生如角变子一样的 *mtDNA* 糖基化修饰。这些结果进一步证明, 真菌角变显示出老化相关的典型特征, 为真菌菌落退化研究指明了新的研究方向。本研究对蛹虫草菌落形态的多样性与产子实体能力表型的观察结果显示, 菌落背面颜色为橙铬色的菌株容易长出发育良好的子实体; 有些角变株能够长出子实体, 但子实体形态上不像出发菌株那么均一, 而是在长短、直径、长子囊壳与否上表现出了很大的差异。角变株在子实体产量上往往没有出发菌株高。有些群体的出发菌株不能长出子实体的而角变株却能够长出子实体, 只是子实体在形态上差异较大。角变株在产子实体能力表型上没有出发菌株强, 但是有些角变株在虫草菌素的产量上却比出发菌株高出很多。因此根据表型多样性或者采用诱变等选育方法来获得高产虫草菌素菌株是可行的。胡海燕^[18]等人对虫生真菌蝉拟青霉及其角变株的比较研究发现, 在胞外多糖、SOD、POD 含量以及对蚜虫致病率也是角变株 JZD3 菌株最佳; 而蛋白酶和蛋白质含量则分别是角变株 JZD3-C 和角变株 JZD3-M 较高。

菌落背面颜色为橙铬色的菌株容易产子实体, 因此在蛹虫草的规模化生产上可以通过菌落表型进行高产子实体菌株标记。蛹虫草的表型多态性不仅对蛹虫草产子实体能力有影响, 对产次生代谢产物虫草菌素也会造成一定的影响。因此在蛹虫草的人工栽培上所使用的菌种应该尽量减少转接次数, 因为在转接时可能接到的是角变部分, 这样就会使得产量较少进而造成经济损失。角变部分分离株在子实体的产量、子实体质量和虫草菌素的产量上都不及出发菌株好, 当然有些角变部分分离株可能会比出发菌株好, 但是得到这样的角变部分分离株的概

率是很低的。角变部分分离株在产子实体能力和虫草菌素能力上都不及出发菌株。有些角变部分分离株能够长子实体,有些却不能长子实体,可以作为研究蛹虫草遗传的良好材料。

致谢:感谢贵州省雷公山国家森林公园的工作人员在标本采集中给予的帮助!

参 考 文 献

- [1] 文庭池, 康冀川, 李光荣, 等. 固体培养条件对蛹虫草产子实体和虫草菌素的影响[J]. 贵州农业科学, 2008, 36(4): 92-94.
- [2] Cunningham KG, Manson W, Spring FS, et al. Cordycepin, a metabolic product from cultures of *Cordyceps militaris* (Linn.) Link. Part I. *Isolation and characterisation*[J]. J Chem Soc, 1951, 2: 2299-2300.
- [3] 朱平, 朱海波, 朱慧新, 等. 3'-脱氧腺苷在制备降血脂药物中的应用[P]. 中国, 200310101650. 7. 2003-10-27.
- [4] Kim SK, Kim SW, Lee SC, et al. A pharmaceutical composition comprising cordycepin for the treatment and prevention of obesity[P]. WO/2008/038973. 2009-07-15.
- [5] Overgaard-Hansen K. The inhibition of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate formation by cordycepin triphosphate in extracts of Ehrlich ascites tumor cells[J]. Biochim Biophys Acta, 1964, 80: 504-507.
- [6] Kodama EN, McCaffrey RP, Yusa K, et al. Antileukemic activity and mechanism of action of cordycepin against terminal deoxynucleotidyl transferase-positive (TdT⁺) leukemic cells[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(3): 273-281.
- [7] 梁宗琦. 蛹虫草无性型——蛹草拟青霉的确证[J]. 食用菌学报, 2001, 8(4): 28-32.
- [8] 梁宗琦, Roland TVF. 蛹虫草(*Cordyceps militaris*)无性型的多型现象[J]. 菌物系统, 1998, 17(1): 57-62.
- [9] 李闽峰. 蛹虫草形成子实体表型差异的分子生物学研究[D]. 贵州大学硕士学位论文, 2007.
- [10] 康冀川, 文庭池, 雷帮星, 等. 红曲协同发酵提高蛹虫草子实体和虫草菌素产量的方法: 中国, ZL200810068734. 8[P]. 2009-09-16.
- [11] 梁月, 张国珍, 安沫平, 等. 蛹虫草子囊孢子萌发及其后代群体培养性状观察[J]. 菌物学报, 2005, 24(4): 525-532.
- [12] Nelson MA. Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac[J]. Trends Genet, 1996, 12(2): 69-74.
- [13] Kronstad JW, Staben C. Mating type in filamentous fungi[J]. Annu Rev Genet, 1997, 31: 245-276.
- [14] Shrestha B, Kim HK, Sung GH, et al. Bipolar heterothallicism, a principal mating system of *Cordyceps militaris in vitro*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2004, 9(6): 440-446.
- [15] 丁彦怀, 李玉, 朱继红, 等. 蛹虫草人工培养条件下的显微观察[J]. 食用菌学报, 1995, 2(2): 48-52.
- [16] 唐晓庆, 樊美珍. 球孢白僵菌继代培养中菌落局变现象及环境影响因素的研究[J]. 真菌学报, 1996, 15(3): 188-196.
- [17] Li L, Pischetsrieder M, St Leger RJ, et al. Associated links among mtDNA glycation, oxidative stress and colony sectorization in *Metarhizium anisopliae*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(9): 1300-1306.
- [18] 胡海燕, 刘爱英, 邹晓, 等. 虫生真菌蝉拟青霉及其角变株的比较研究[J]. 植物保护, 2008, 34(2): 21-25.