

# 九株蛹虫草菌株的生物学性状研究

刘 洋, 孙来玉, 陆云华, 韩志萍

(湖州师范学院 生命科学院, 浙江 湖州 313000)

**摘 要:**比较了 9 种蛹虫草菌株的生物学性状, 并对菌株的 ITS 序列, 菌丝体及发酵液的虫草素含量进行了测定。结果表明: 菌株‘GIM 5.502’、‘GIM 5.512’、‘GIM 5.270’、‘GIM 5.272’、‘GIM 5.266’5 个菌株可以正常转色, 其余 4 个菌株不能正常转色, 这 9 个菌株均未能正常发育形成子实体。9 个蛹虫草菌株的 ITS 序列分析表明, ITS 序列变异极小。菌株‘GIM 5.502’的菌丝体和发酵液中所含的虫草素最高, 分别为 6.971、8.461 mg/L, 而菌株‘GIM 5.267’、‘GIM 5.272’的菌丝体及发酵液中, 未检测到虫草素。

**关键词:**蛹虫草; 生物学性状; ITS; 虫草素

**中图分类号:**S 567 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)20-0140-04

蛹虫草(*Cordyceps militaris*), 又名北冬虫夏草, 与冬虫夏草同属真菌, 含有虫草素、虫草酸、虫草多糖等多种药用成分<sup>[1-2]</sup>, 是我国重要的传统中药材。蛹虫草与冬虫夏草具有相似的药用价值, 有些药用成分甚至超过冬虫夏草<sup>[3]</sup>, 野生冬虫夏草资源日益匮乏, 人工栽培蛹虫草是解决野生虫草资源不足的重要途径。在我国蛹虫草已进行了大量的人工栽培。秦秀丽等<sup>[4]</sup>、徐芳旭等<sup>[5]</sup>对蛹虫草液态发酵条件和栽培条件进行了优化。

**第一作者简介:**刘洋(1975-), 男, 新疆克拉玛依人, 博士, 讲师, 现主要从事微生物与生化药学等研究工作。E-mail: liuyang\_07@126.com.

**责任作者:**韩志萍(1954-), 女, 浙江平湖, 本科, 教授, 现主要从事应用微生物学等研究工作。E-mail: hzp@hutc.zj.cn.

**基金项目:**湖州市自然科学基金资助项目(2010C50128); 浙江省自然科学基金资助项目(Y5110067)。

**收稿日期:**2013-05-14

优良的菌种是获得蛹虫草规模化栽培的关键, 对于生产具有重要意义<sup>[4]</sup>。在正式引种进行大规模生产之前, 需要对菌种的性能进行确认, 以减少栽培风险。

该试验对 9 种蛹虫草菌株的生物学性状进行了比较, 并对菌株的 ITS 序列, 菌丝体及发酵液的虫草素含量进行了研究, 以期为进一步筛选和开发利用蛹虫草优良菌株奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 9 种蛹虫草菌株‘GIM 5.266’、‘GIM 5.267’、‘GIM 5.268’、‘GIM 5.269’、‘GIM 5.270’、‘GIM 5.272’、‘GIM 5.275’、‘GIM 5.502’、‘GIM 5.512’购买于广东微生物菌种保藏中心。

1.1.2 培养基 母种培养基(1 L): 马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、磷酸二氢钾 2 g、硫酸镁 0.5 g、维生素 B<sub>1</sub> 0.05 g、琼脂 20 g、pH 自然。液体培养基(1 L): 马铃薯 200 g、

## Study on the Planting Technology of *Dendrobium candidum*

LU Yan-yan

(Hangzhou West Lake Scenic Area Wushan Jing Area Management Office, Hangzhou, Zhejiang 310002)

**Abstract:** Taking *Dendrobium candidum* plantlets as material, the effect of different conditions transplant time, light intensity, temperature, humidity, ventilation condition on the growth of it were studied. The results showed that every year in mid-March to mid-June was the most suitable time for *Dendrobium candidum* transplanting; under the condition of 40%~60% shading it had the fastest growth; temperature 20~25℃, seedling growth was more appropriate; humidity should be controlled at 70%; ventilation was not ventilated environment relative growth rate big 50%; loose scale and pebbles as matrix it had the fastest growth, and in 6 cm×6 cm densities it grew the best.

**Key words:** *Dendrobium candidum*; planted seedling; cultivation techniques

磷酸二氢钾 2 g、硫酸镁 1 g、柠檬酸铵 1 g、葡萄糖 30 g、蛋白胨 3 g、维生素 B<sub>1</sub> 0.05。栽培培养基:30 g 大米,加入 50 mL 辅料溶液,辅料溶液与液体培养基相同。

1.1.3 主要仪器及试剂 日本岛津高效液相色谱仪 CTD-10AS 型,SPD-10A 紫外检测器,N2000 色谱工作站。虫草素标样购于中国生物制品检定所。DNA 提取、PCR 扩增所用酶和试剂购于 TaKaRa 公司,其它生物试剂均为国产分析纯。

## 1.2 试验方法

1.2.1 菌丝体及产孢结构观察 将 9 个不同蛹虫草菌株接种在母种培养基中 22℃ 避光培养 10 d 后,观察菌落形态,并用插片法观察菌株的产孢结构<sup>[6]</sup>。

1.2.2 菌株栽培试验 将 9 个不同蛹虫草菌株母种分别接种于装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,每瓶接种 0.5 cm<sup>2</sup> 菌块 5~6 块,22℃、150 r/min 振荡培养 7~8 d 后接种于固体栽培料培养基中,22℃ 避光培养 7~10 d 后,进行光照处理,刺激原基分化,并进行温湿度控制,刺激子实体生成,具体方法参考文献<sup>[7]</sup>。每个菌株接种 10 瓶。

1.2.3 菌株 ITS 序列分析 采用氯化苄法提取菌株基因组 DNA<sup>[8]</sup>,并对菌株的 ITS 序列进行 PCR 扩增。引物如下:ITS 1:5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',ITS 4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。引物由上海英俊生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体积为 25 μL,包括 2.5 μL 10×buffer,2.0 μL 2.5 mmol/μL dNTP,0.25 μL 20 pmol/μL 引物,0.25 μL ExTaq 酶(5 U/μL)(TaKaRa 公司),模板 0.5 μL,重蒸水。PCR

扩增程序为:94℃ 预变性 4 min,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 60 s,72℃ 延伸 60 s,30 循环,72℃ 延伸 10 min。菌株 ITS 序列扩增完成后,送上海英俊生物工程技术有限公司进行测序。将获得的菌株 ITS 序列提交 GenBank,利用 Blast 软件进行序列比对分析,并利用 DNAMAN 6.0 软件进行同源性分析。

1.2.4 虫草素含量测定 色谱柱:C18 (4.6 mm×250 mm, 5 mm);柱温 30℃;进样量 20 μL;流动相:水-甲醇(85:15),流速 1 mL/min;紫外检测器-检测器波长为 260 nm。

1.2.5 蛹虫草发育情况 将 9 个不同蛹虫草菌株接种于固体栽培料培养基中培养 55 d 后,观察菌丝生长、转色及子实体发育情况。

1.2.6 样品制备 蛹虫草发酵液 1 L,过滤取菌丝体,无菌水洗涤后,冷冻干燥。分别称取 0.20 g 蛹虫草菌丝体干粉置于 150 mL 锥形瓶中,分别加入 50 mL 提取溶剂,水-甲醇(1:3,V/V)、pH 7.0、微波功率 500 W,提取 3 min,浓缩液滤纸过滤,上清液过 0.22 μm 微孔滤膜后,进行高效液相色谱检测。蛹虫草发酵液 8 000 r/min,离心 10 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜压滤后检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌落形态及菌丝产孢结构

蛹虫草菌株接种在母种培养基后 22℃ 避光培养 10 d,进行菌落形态及产孢结构观察。由图 1 可以看出,菌株‘GIM 5.266’、‘GIM 5.268’、‘GIM 5.270’、

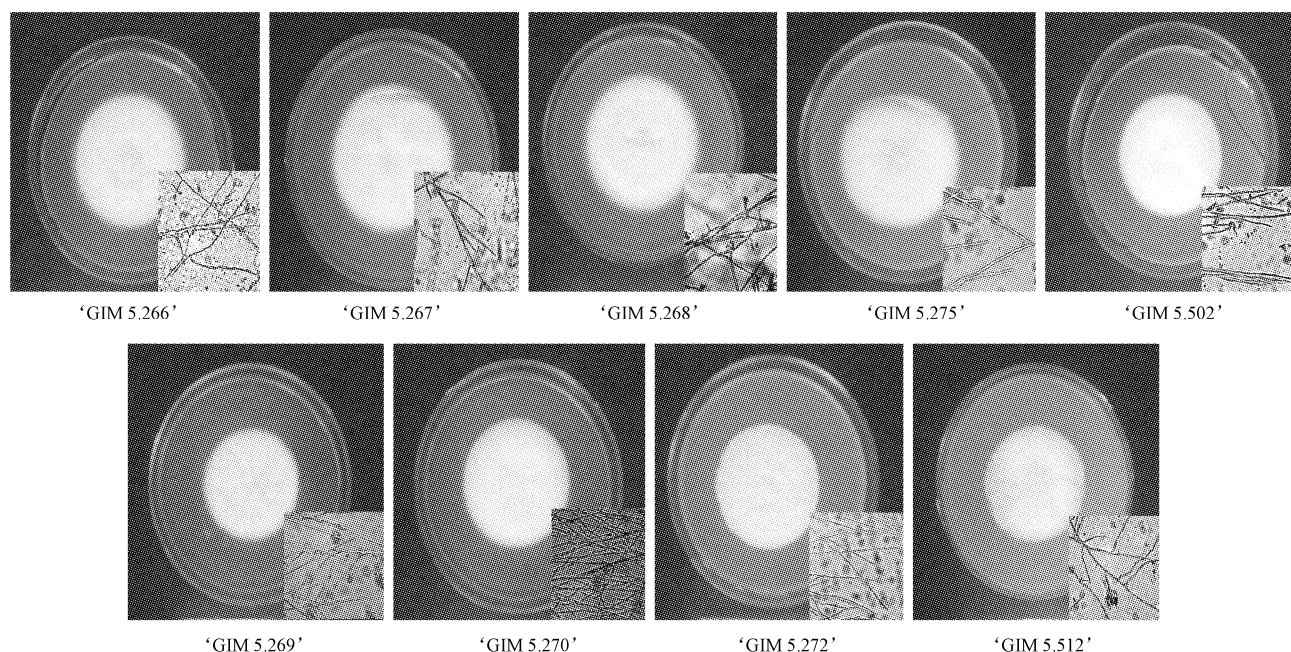


图 1 9 种不同蛹虫草菌株的菌落及菌丝形态



‘GIM 5.275’菌落呈绒毛状,白色,有同心圆状或射线状纹,菌丝体观察到了卵圆形、聚头状或瓶梗状的产孢结构。菌株‘GIM 5.267’、‘GIM 5.269’、‘GIM 5.272’菌落呈绒毛状,白色或浅黄色,有射线状或脐状纹,菌丝未观察到产孢结构。菌株‘GIM 5.502’、‘GIM 5.512’菌落呈绒毛状,浅桔黄色或橘黄色,菌丝有卵圆形,球状,曲线状产孢结构。

## 2.2 菌株子实体发育情况

由表1可知,菌株‘GIM 5.502’、‘GIM 5.512’转色较快,为橘黄色,菌株‘GIM 5.270’、‘GIM 5.272’为浅黄色,菌株‘GIM 5.266’和‘GIM 5.267’部份转色为浅黄色,其余3个菌株不能正常转色,但这9个均未有子实体形成。

表1 不同蛹虫草菌株子实体发育情况

菌株	菌丝生长情况	满瓶时间/d	转色时间/d	子实体发育情况
‘GIM 5.266’	++++	20	23	—
‘GIM 5.267’	++	22	23	—
‘GIM 5.268’	++	22	—	—
‘GIM 5.269’	++	21	—	—
‘GIM 5.270’	++++	20	—	—
‘GIM 5.272’	+++	18	22	—
‘GIM 5.275’	++	21	22	—
‘GIM 5.502’	++++	19	23	—
‘GIM 5.512’	+++	19	23	—

注:++++茂盛;+++良好;++较好;—无转色或无子实体发育。

## 2.3 菌株 ITS 序列分析

从图2可以看出,用引物 ITS 1 和 ITS 4 成功地扩增出菌株 ITS 区段,在菌株中扩增出大约 600 bp 左右条带。对菌株的 ITS 序列进行测序,通过软件 DNA-MAN 6.0 对 9 个菌株的 ITS 序列进行分析,结果表明,‘GIM 5.266’、‘GIM 5.268’在 ITS 序列的第 421 的碱基为 C,其它菌株均为 T;‘GIM 5.269’、‘GIM 5.275’在 ITS 序列的第 456 的碱基为 T,其它菌株均为 G。9 个菌株的 ITS 变异很小。ITS 同源性分析表明,9 种蛹虫草菌株的同源性高达 99.62%。

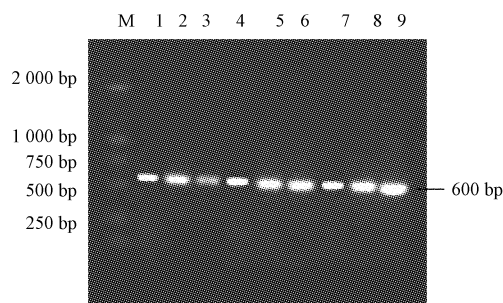


图2 引物 ITS1、ITS4 的 PCR 扩增结果

注:M:DL 2 000 DNA Marker;1:阴性对照;2~10:‘GIM 5.266’、‘GIM 5.267’、‘GIM 5.268’、‘GIM 5.269’、‘GIM 5.270’、‘GIM 5.272’、‘GIM 5.275’、‘GIM 5.502’、‘GIM 5.512’。

## 2.4 菌株菌丝体及发酵液虫草素含量

从图3可以看出,其中菌株‘GIM 5.502’菌丝体中的虫草素含量最高,其浓度为 6 971  $\mu\text{g/mL}$ ,其次是菌株‘GIM 5.275’其浓度为 1 896  $\mu\text{g/mL}$ ,按菌丝体虫草素含量由高到低的先后顺序为:‘GIM 5.502’、‘GIM 5.275’、‘GIM 5.512’、‘GIM 5.268’、‘GIM 5.270’、‘GIM 5.266’、‘GIM 5.269’,菌株‘GIM 5.267’和‘GIM 5.272’菌丝体中未检测到虫草素。在 9 种蛹虫草菌株发酵液中,菌株‘GIM 5.502’中的虫草素含量最高,其浓度为 8 461  $\mu\text{g/mL}$ ,其次是菌株‘GIM 5.270’,其浓度为 8 218  $\mu\text{g/mL}$ ,按发酵液中虫草素含量由高到低的先后顺序为:‘GIM 5.502’、‘GIM 5.270’、‘GIM 5.275’、‘GIM 5.512’、‘GIM 5.268’、‘GIM 5.266’、‘GIM 5.272’,菌株‘GIM 5.267’和‘GIM 5.272’的发酵液中未检测到虫草素。

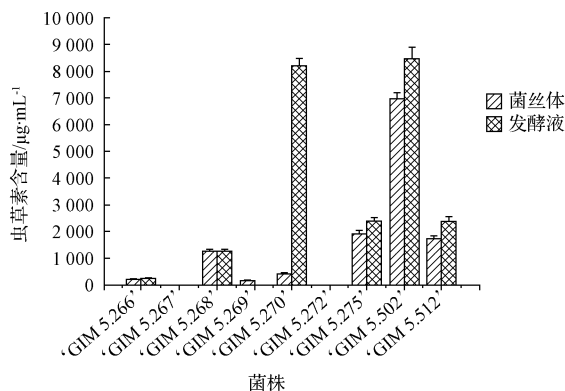


图3 9种不同蛹虫草菌株菌丝体及发酵液虫草素含量

## 3 讨论与结论

### 3.1 菌落菌丝形态与子实体发育

研究表明,菌落形态、色泽和产孢结构与菌株的子实体发育有一定关系。梁月等<sup>[7]</sup>研究发现菌落为橙棕色或杏橙色,生长速率正常,无突变的菌株产生子实体的可能性较大。高新华<sup>[9]</sup>研究发现,具有子实体形成能力的野生蛹虫草菌株,同时具有拟青霉型和轮枝型2种产孢结构。该试验发现9株蛹虫草菌株中‘GIM 5.502’和‘GIM 5.512’菌落为橘黄色,生长速率正常,发现‘GIM 5.267’、‘GIM 5.512’2个菌株仅具有轮枝状产孢结构,另外2个菌株‘GIM 5.256’、‘GIM 5.268’具有拟青霉型产孢结构,这4个菌株均未能长出子实体。仅具有1种产孢结构的蛹虫草菌株往往不能正常发育形成子实体,这与高新华<sup>[9]</sup>研究结果一致,说明子实体发育与菌落颜色及产孢结构之间有一定的联系。生产上也常用菌株培养后进行光照处理,把菌落形态及能否快速转色作为优良菌种的判定标准之一<sup>[9]</sup>。但该试验研究

发现可以正常转色的蛹虫草菌株却未能正常发育形成子实体。蛹虫草子实体是否可以正常发育与菌种、培养基成分、温度、光照、湿度等培养条件等多种因素有关<sup>[9]</sup>。

### 3.2 菌株子实体不发育与 ITS 序列

菌种退化是造成蛹虫草子实体不能正常形成的主要原因,李美娜等<sup>[10]</sup>发现退化菌株的 ITS 序列发生了明显的突变,该试验对 9 种蛹虫草菌株的 ITS 序列进行测试和比对分析,发现这 9 株蛹虫草菌株的 ITS 序列变异很小,只有‘GIM 5.268’、‘GIM 5.269’在 ITS 序列有一个碱基 T 变异为 C,另外菌株‘GIM 5.270’、‘GIM 5.275’的 ITS 序列也有一个碱基 G 变异为 T,未发生 ITS 变异的菌株也未形成子实体。说明退化菌株变异,不一定体现在 ITS 序列差异上。

### 3.3 不同菌株虫草素含量

该试验对 9 种蛹虫草菌株菌丝体及发酵液的虫草素进行测定,发现不同菌株的虫草素产生能力差异较大。其中‘GIM 5.502’菌株的菌丝体及发酵液中所含的虫草素最高,‘GIM 5.267’、‘GIM 5.272’不产虫草素。蛹虫草菌株退化与其虫草素合成之间是否存在必然联系,尚不确定。该试验对 9 种蛹虫草菌株的菌落形态、产孢结构、子实体形成情况、虫草素产量做了比较,为进一步筛选优良菌株和开发利用奠定了基础。

该试验比较了 9 种蛹虫草菌株的生物学性状,并对菌株的 ITS 序列,菌丝体及发酵液的虫草素含量进行了

测定和分析,结果表明,其中菌株‘GIM 5.502’等 5 个菌株可以正常转色,这 9 个菌株菌不能发育形成子实体;菌株‘GIM 5.502’的菌丝体和发酵液中所含的虫草素最高,而菌株‘GIM 5.267’、‘GIM 272’的菌丝体及发酵液中,未检测到虫草素。

### 参考文献

- [1] Paterson R R. Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory? [J]. Phytochemistry, 2008, 69(7): 1469-1495.
- [2] Das S K, Masuda M, Sakurai A, et al. Medicinal uses of the mushroom *Cordyceps militaris*: current state and prospects [J]. Fitoterapia, 2010, 81(8): 961-968.
- [3] 彭国平, 李红阳, 袁永泰. 冬虫夏草与人工蛹虫草的成分比较[J]. 南京中医药大学学报, 1996(5): 27-28, 65.
- [4] 秦秀丽, 杨国会, 李凤林. 蛹虫草液体深层发酵的研究[J]. 北方园艺, 2010(23): 167-170.
- [5] 徐芳旭, 刘诗扬, 王升厚. 蛹虫草液体菌种培养基的优化[J]. 北方园艺, 2011(4): 199-201.
- [6] 周德庆. 微生物学实验教程[M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006: 56-63.
- [7] 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.
- [8] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34-40.
- [9] 高新华. 蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 的交配型研究[J]. 食用菌学报, 2008, 15(1): 1-5.
- [10] 李美娜, 吴谢军, 李春燕, 等. 人工栽培蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 性状变异的遗传学分析[J]. 菌物系统, 2003, 22(2): 277-282.

## Study on the Biological Characteristics of Nine *Cordyceps militaris* Strains

LIU Yang, SUN Lai-yu, LU Yun-hua, HAN Zhi-ping

(School of Life Sciences, Huzhou Normal University, Huzhou, Zhejiang 313000)

**Abstract:** The biological characteristics of nine *Cordyceps militaris* strains were studied. The ITS sequence of the nine strains were analyzed and the cordycepin concentration in the mycelium and fermentation broth were also determined. The results showed that strain ‘GIM 5.502’, ‘GIM 5.512’, ‘GIM 5.270’, ‘GIM 5.272’, ‘GIM 5.266’ could change color in mycelium normally, but they could not develop fruit body regularly, the other four strains could neither change color in mycelium normally, nor form fruit body. The ITS sequence analysis showed that it had little change between different *Cordyceps militaris* strains. The cordycepin concentration in the mycelium and fermentation broth of the strain ‘GIM 5.502’ were the highest among that of the other strains, which was up to 6.971 mg/L, 8.461 mg/L respectively. However, the cordycepin could not be assayed in that of strain ‘GIM 5.267’, ‘GIM 5.272’.

**Key words:** *Cordyceps militaris*; biological characteristics; ITS; cordycepin