

北虫草菌丝体诱变及优良菌株的筛选

周晓东, 李明, 田景花, 李守勉, 孙雅洁, 刘俊波

(河北农业大学 园艺学院, 河北 保定 071001)

摘 要:以北虫草‘CM016’为出发菌株,将液体培养的菌丝体片段用生理盐水稀释 10^4 倍,在20 W紫外灯下32 cm处照射100 s,研究了紫外线诱变对北虫草优良菌株筛选的影响。结果表明:经紫外线诱变共获得了31个菌丝体长势较好的菌株;拮抗试验表明,其中15株诱变菌株与出发菌株存在拮抗线,对其进一步采用脂酶同工酶电泳鉴定亲缘关系,筛选出了与出发菌株有明显差异的诱变新菌株11个,将其进行出草试验及统计产量和虫草素含量测定,有8个菌株具有出草能力,其中C16菌株子实体产量极显著高于出发菌株,C6菌株子实体虫草素的含量极显著高于出发菌株。

关键词:北虫草;紫外诱变;拮抗试验;脂酶同工酶;产量;虫草素

中图分类号:S 567.3⁺5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)08-0154-03

北虫草(*Cordyceps militaris*)是食药兼用菌,别名蛹虫草、北冬虫夏草、蛹草、蛹虫草等^[1]。作为冬虫夏草的理想替代品,北虫草广泛的生物活性和药理作用已经越来越受到人们的关注,其有效药用成分虫草素,具有镇静、镇痛、抗疲劳、增强免疫力、抑制肿瘤等功效^[2-5]。随着人们对北虫草需求的不断增加,天然北虫草已经不能满足市场需要,这就需要大量人工种植的北虫草。目前,人工栽培的北虫草品种较少,特别是优良菌株更少,迫切需要选育新的优良品种,以满足人工栽培的需要。该研究采用紫外线诱变北虫草菌丝体,使其产生遗传变异,从而筛选出高产、优质的新菌株,对推动北虫草人工栽培具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:‘CM016’(编号为C1)引自中国农业大学食用菌研究室。培养基:平板培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g, KH_2PO_4 3 g, MgSO_4 3 g,琼脂20 g,水1 000 mL。液体培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g, KH_2PO_4 3 g, MgSO_4 3 g,水1 000 mL。米饭培养基:在罐头瓶中装入大米50 g,60 mL的营养液。营养液配方:葡萄糖10 g,蛋白胨5 g, KH_2CO_3 2 g, MgSO_4 1.0 g,维生素 B_1 20 mg,蚕蛹粉2.0 g,自来水1 000 mL。

第一作者简介:周晓东(1987-),男,河北唐山人,在读硕士,研究方向为食用菌生物技术与遗传育种。

责任作者:李明(1961-),男,河北故城人,教授,硕士生导师,现主要从事食用菌生物技术与遗传育种等研究工作。

收稿日期:2012-12-10

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝体的诱变 参照卢翠文^[6]的方法,略加改动。将出发菌株接种于液体培养基中,25℃下静置培养5 d后,170 r/min充分摇碎菌丝,经0.5 cm厚度的灭菌脱脂棉过滤,获得菌丝悬液。将用生理盐水稀释 10^4 倍的菌丝体片段0.2 mL涂平板,将平板在20 W紫外灯、距离为32 cm的条件下照射100 s。诱变后用黑布包好,置于25℃恒温条件下避光培养4 d,初步挑选出菌丝发育良好的菌株转接到斜面培养基上继续培养。

1.2.2 拮抗试验 在平板培养基上分别接种出发菌株和诱变后初步筛选的菌株菌种块,二者相距4 cm,25℃恒温培养,7 d后观察是否有明显拮抗线产生。

1.2.3 酯酶同工酶电泳分析 菌丝的培养:采用液体发酵培养,将与出发菌株产生拮抗线的诱变新菌株接种于液体培养基中,25℃下静置12 h后,在25℃,170 r/min的条件下震荡培养7 d。样品制备:将培养好的诱变菌种过滤发酵液,菌球用蒸馏水冲洗干净,滤纸吸干水分,在-20℃下冷冻24 h,称取0.5 g放入研钵中,加入0.5 mL的样品提取液,充分研磨后用离心管分装,4℃、8 000 r/min离心10 min,取上清液于4℃下保存备用。电泳:采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳进行同工酶分析,参考唐利华等^[7]、王俊玲等^[8]的方法进行。

1.2.4 诱变新菌株出菇试验 子实体产量的比较:将筛选出的新菌株接种于米饭培养基上,每个菌株接10瓶,在人工气候箱中避光20℃下培养,待菌丝长满培养基后在膜上打通风孔,培养温度调至22℃,见光培养,光照强度500 lx,光照时间14 h/d,控制湿度65%,子实体原基出现后,待虫草长到1 cm左右,将湿度调节到85%,光

照时间改为 12 h/d,待子囊座上出现子囊孢子时采收,称取重量。

1.3 项目测定

子实体中虫草素含量的测定参照孙军德等^[9]、王陶等^[10]的紫外分光光度计法进行。

2 结果与分析

2.1 诱变后优良菌株的筛选

通过对诱变后各菌株生长情况的观察和比较,共筛选出菌丝生长浓密,菌丝边缘整齐,长势好的菌株 31 个。

2.2 拮抗线检测

拮抗试验结果表明,有 15 个诱变菌株与出发菌株有明显拮抗线产生(图 1),说明有变异产生,随机编号为 C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16。其它 16 个诱变菌株与亲本能融合生长,无拮抗线产生(图 2),说明没有产生变异或变异较小。

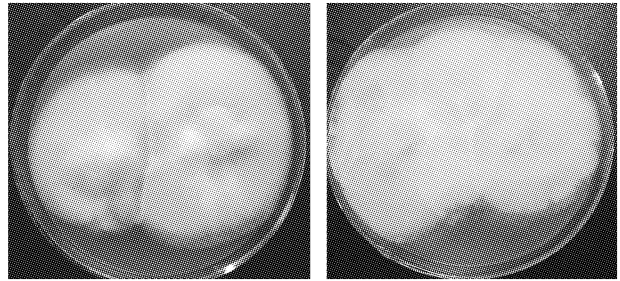


图 1 明显拮抗线

图 2 无拮抗线

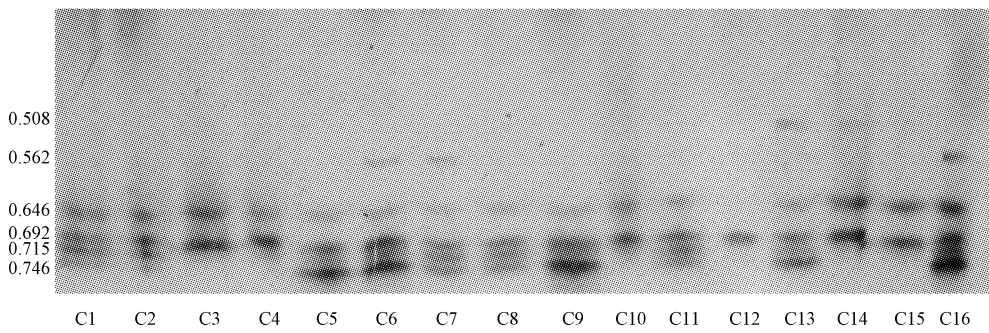


图 3 出发菌株与诱变菌株酯酶同工酶电泳图谱

菌株变异不明显。菌株 C6、C7、C16 比出发菌株 C1 新增 1 条 Rf 0.562 的酶带,菌株 C13、C14 比出发菌株新增 1 条 Rf 0.508 的酶带,菌株 C3、C4、C10、C12、C14、C15 与出发菌株 C1 比较,酶带数目均减少。该试验结果表明,诱变菌株 C3、C4、C6、C7、C10、C12、C13、C14、C15、C16 这些诱变菌株与出发菌株在酯酶同工酶谱上存在差异,说明诱变菌株发生了明显变异。

2.4 子实体产量及虫草素含量的比较

出菇试验表明,供试的 11 个菌株中,诱变新菌株 C4、C10、C12 均无子实体产生,说明不具备出草能力,其它菌株均有子实体产生。由表 2 可以看出,供试菌株子

2.3 出发菌株与诱变菌株的酯酶同工酶电泳分析

将出发菌株 C1 与 15 个诱变新菌株进行酯酶同工酶电泳分析,结果见图 3 和表 1。表 1 显示,出发菌株 C1 及 15 个诱变菌株中共检测到 6 条迁移率不同的酶带, Rf 值在 0.508~0.746 之间,出发菌株和诱变菌株均有迁移率为 0.692 的酶带,表明该酶带为北虫草的特征酶带。诱变菌株 C2、C5、C8、C9、C11 与出发菌株 C1 相比较,酶带数目基本相似,各个酶带迁移率相同,说明这些

表 1 出发菌株与诱变菌株酯酶同工酶电泳相对迁移率

菌株	谱带 (Rf)					
	1	2	3	4	5	6
C1			0.646	0.692	0.715	0.746
C2			0.646	0.692	0.715	0.746
C3			0.646	0.692		
C4			0.646	0.692		
C5			0.646	0.692	0.715	0.746
C6		0.562	0.646	0.692	0.715	0.746
C7		0.562	0.646	0.692	0.715	0.746
C8			0.646	0.692	0.715	0.746
C9			0.646	0.692	0.715	0.746
C10			0.646	0.692		
C11			0.646	0.692	0.715	0.746
C12				0.692		
C13	0.508		0.646	0.692	0.715	0.746
C14	0.508		0.646	0.692		
C15			0.646	0.692		
C16		0.562	0.646	0.692	0.715	0.746

实体平均产量范围在 18.1~31.2 g/瓶,其中菌株 C7、C16 的产量高于出发菌株,且菌株 C16 产量极显著高于

表 2 不同菌株产量与虫草素含量的比较

菌株	平均产量/g·瓶 ⁻¹	虫草素含量/mg·g ⁻¹
C1	24.2 B	11.5 B
C3	18.1 C	11.7 AB
C6	19.7 C	12.5 A
C7	25.3 B	10.4 CD
C13	24.1 B	10.9 BC
C14	18.5 C	9.8 D
C15	20.5 C	11.6 AB
C16	31.2 A	11.2 AB

注:数据处理采用 Duncan 氏新复极差法,同一列数字后的不同字母表示差异极显著($P<0.01$)。

出发菌株,比出发菌株增产 28.9%;菌株 C13 的产量与出发菌株产量接近,其它菌株的产量均极显著低于出发菌株。从虫草素含量来看,供试菌株子实体中虫草素的含量范围在 9.8~12.5 mg/g,其中菌株 C3、C6、C15 虫草素含量高于出发菌株,且菌株 C6 含量极显著高于出发菌株,其它菌株虫草素含量均极显著低于出发菌株。

3 结论

该试验共筛选出了 2 个优良的北虫草诱变新菌株 C16 和 C6。其中 C16 菌株菌丝生长浓密,边缘整齐,长势好,子实体产量高,较出发菌株增产达 28.9%,可作为高产菌株进行生物学特性等方面的研究。C6 菌株虽然产量较出发菌株低,但最有效的药用成分虫草素含量高,较出发菌株增加 8.7%,可作为较好的种质资源,为杂交筛选高产优质新菌株提供亲本材料。

参考文献

[1] 国家医药管理局. 中华本草[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999: 898-899.

[2] 吴征镒. 新华本草纲要[M]. 上海:上海科学技术出版社,1990: 731-732.

[3] Siu K M, Mak D H, Chiu C Y, et al. Pharmacological basis of 'Yin-nourishing' and 'Yang-invigorating' actions of Cordyceps, a Chinese tonifying herb [J]. Life Sci, 2004, 76(4): 385-395.

[4] 宾文,宋丽艳,于荣敏,等. 人工培养蛹虫草多糖的抗炎及免疫作用研究[J]. 时珍国医国药, 2003, 14(1): 1-2.

[5] 贡成良,潘中华,郑小坚,等. 家蚕蛹虫草的延缓衰老作用研究[J]. 苏州大学学报(工科版), 2005, 25(2): 24-27.

[6] 卢翠文. 北冬虫草菌丝体片段诱变育种[J]. 生物技术, 2008, 18(5): 23-26.

[7] 唐利华,郭倩,王瑞娟,等. 中国黑木耳主要栽培菌株酯酶同工酶的研究[J]. 食用菌学报, 2007, 14(4): 37-40.

[8] 王俊玲,李明,田景花,等. 6 个杏鲍菇菌株及其杂交子代的酯酶同工酶分析[J]. 河北农业大学学报, 2004, 27(3): 29-32.

[9] 孙军德,白立红,房琳琳,等. 蛹虫草中虫草素测定方法的比较[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(2): 212-215.

[10] 王陶,李文,陈宏伟,等. 虫草素的微波-超声波协同提取[J]. 食品科学, 2010, 31(10): 86-90.

Mutagenesis of Mycelial of *Cordyceps militaris* and Selection of Fine Strains

ZHOU Xiao-dong, LI Ming, TIAN Jing-hua, LI Shou-mian, SUN Ya-jie, LIU Jun-bo
(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract: Taking *Cordyceps militaris* 'CM106' as material, the fragments from the mycelia of *C. militaris* 'CM016' were diluted to 10^4 times by using physiological saline cultured in liquid medium. Under a 20 W UV lamp, the fragments were mutated for 100 seconds with a distance of 32 cm. The effect of mutagenesis on selection of fine strains were studied. The results showed that 31 *C. militaris* strains whose mycelia had better morphological characteristics were obtained. Somatic incompatibility analysis indicated that 15 mutagenic *C. militaris* strains of all had antagonistic lines with the original strain. Further isozyme analysis showed that 11 of the 15 strains above had obvious differences with the original strain in genetic relationships. Of the 11 mutagenic strains above, 8 were able to produce normal stromas. The results of the weight of production and content of cordycepin according to the statistics were that *C. militaris* C16 had a significantly higher production than the original strain, and *C. militaris* C6 had a significantly higher content of cordycepin than the original strain, respectively.

Key words: *Cordyceps militaris*; mutagenesis; antagonism; esterase isozyme; yield; cordycepin

黄瓜的贮藏方法

缸贮:将缸洗刷干净,加入 10~12 cm 深的清水,距水面 3~4 cm 处放置木架,架上铺木板,木板上再铺 1 层洗净的麻袋片;然后将选好的黄瓜沿着缸边转圈摆放。瓜柄应朝外,一直摆到离缸口 9~10 cm 处,使缸中心形成一个洞,以利上下通气。缸口用牛皮纸封严,并用绳子捆好,放在阴凉处存放。天气变冷时可用草帘围缸防寒。用这种方法,一般可贮藏 20~30 d 不变质。缸贮的另一种方法是,在缸底铺 1 层湿润细沙,放上黄瓜。这样放 2 层黄瓜铺 1 层细沙,将缸放满为止。然后封严缸口,放在阴凉处存放。

窖贮:窖藏用永久性菜窖或土窖。将选好的黄瓜装入筐或纸箱,每箱约 15 kg,垛在窖内;或在窖底铺层秫秸,再把黄瓜一层层摆上,每层之间用 2 根秫秸隔开。黄瓜堆高不超过 60~70 cm,码好后用塑料薄膜密封。入窖后,每隔 5~7 d 倒 1 遍窖,把烂瓜和变色瓜挑出,以免感染好瓜。管理关键是,利用通风道和窗门通风,降低窖温。

大白菜包埋贮藏:将大白菜心叶摘去,把成熟适中的黄瓜埋放在大白菜心叶的位置,用外叶覆盖封严,放入白菜窖中和白菜同窖贮藏。这种贮藏方法,能很好地保持黄瓜的水分、色泽和品味,是一种较好的家庭贮藏方法但不适于大量贮藏。