

蛹虫草有性生殖研究

殷东林, 段鸿斌, 王锐丽

(信阳农林学院, 河南 信阳 464000)

摘要:从2种人工栽培的蛹虫草子实体上分离子囊单孢子,将单孢子单独培养和两两配对培养来诱导产生子实体,以研究蛹虫草有性生殖机理。结果表明:蛹虫草有性生殖方式存在多样化,除了具有典型的二极异宗配合外,还存在可孕单孢子。将单孢子对峙培养结果发现在两单孢子间有扇形杂交区的配对培养产生子实体的能力强,没有扇形杂交区的两单孢子配对培养产生子实体的能力弱。

关键词:蛹虫草;子囊单孢子;对峙培养;扇形杂交区;二极异宗配合

中图分类号:Q 93 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)03-0130-04

蛹虫草[*Cordyceps militaris* (L.) Link]无性世代为 *Paecilomyces militaris* Z. Q. Liang, 隶属于子囊菌纲肉座菌目麦角菌科虫草属,是虫草属的模式种^[1],是一种药食两用的名贵食用菌。冬虫夏草与人参、鹿茸齐名为中国传统的三大补品而驰名中外,而蛹虫草在药化、药理和临床实验方面被证明完全可以作为冬虫夏草的代用品。随着野生冬虫夏草资源的不断减少,对蛹虫草的需求量日益增加,蛹虫草在国内外倍受人们的关注。国外将冬虫夏草和蛹虫草作为功能食品开发而备受青睐,已有数十种产品投放市场^[2]。当前国内外对蛹虫草的研究多集中于人工栽培的营养条件^[3-5]、液体发酵条件^[6-8]与药用成分提取工艺的优化上^[9-11],并在这些方面积累了相当多的经验。但对蛹虫草原基形成机理、菌种退化机制

及优质菌种选育方面却鲜见报道^[12-14]。蛹虫草以子实体入药,而子实体是有性生殖的产物。在蛹虫草人工栽培过程中常出现菌种退化、子实体产生减少或不产生的现象。因此,子实体产生的数量和质量是生产中人们关注的问题。目前对蛹虫草的遗传、有性生殖过程和退化原因等还不清楚。该试验从人工栽培的蛹虫草子实体分离子囊孢子,对单孢子单独培养和两两配对培养来诱导产生子实体,旨在研究蛹虫草有性生殖的机理,通过虫草单孢子杂交和对峙培养选育出高产、优质和遗传稳定的蛹虫草新品种。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试2个蛹虫草菌种为虫草1号和虫草2号,为信阳农林学院实验室在大量分离纯化和筛选基础上获得的能成功培养出正常子实体的菌株。

培养基:子囊孢子分离和萌发所用培养基是琼脂含量为1.6% PDA 固体培养基,单孢子保存和对峙培养使

第一作者简介:殷东林(1983-),男,硕士,讲师,现主要从事生物技术的教学与科研工作。

基金项目:河南省科技攻关资助项目(132102110047)。

收稿日期:2013-10-22

Study on Clarification Effect of Pectinase on Blueberry Juice

LIU Bo

(Agricultural College, Liaodong University, Dandong, Liaoning 118003)

Abstract: Taking 'Beilu' blueberry as material, pectinase was used to clarify fruit juice, on the basis of single factor experiment, the optimum conditions of blueberry juice clarification was determined by orthogonal experiment. The results showed that under the condition of pectinase quantity 0.20~0.30 g/L, temperature of juice 40~50°C, pH of juice 3.5~4.5, clarification time 70~90 min, the blueberry juice had high transmittance with better clarification effect. The optimum conditions of blueberry juice clarification was pectinase quantity 0.25 g/L, temperature of juice 45°C, pH of juice 4.0, clarification time 80 min.

Key words: pectinase; blueberry; juice; clarification

用改良 PDA 固体培养基,子实体产生试验所用的原种培养基为改良 PDA 液体培养基,子实体形成使用栽培种用大米培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 子囊孢子的分离和培养 将新鲜、成熟的蛹虫草子实体悬于琼脂含量为 1.6%PDA 固体培养基上方,使子囊孢子自然弹射其上。22℃ 恒温培养 2~3 d 后,在体式解剖镜下挑取只有单个子囊孢子的琼脂小块转接至 PDA 斜面上,22℃ 恒温培养,待菌丝长满斜面后保存备用。观察其菌落颜色、形态、有无突变等培养性状。

1.2.2 单孢子单独培养和两两配对培养诱导产生子实

表 1 单孢子的分离结果和菌落形态

Table 1 Results of single spore isolation and colony morphology

菌株编号 Strain code	分离的子囊孢子个数 Number of ascospore isolation/个	菌落颜色 Colony color			扇形突变 Sector mutation
		杏橙色 Apricot orange	淡柠檬黄色 Pale lemon yellow	白色 White	
虫草 1 号 <i>Cordyceps</i> No.1	10	⑦⑧⑨	①②③④⑤⑥⑩		②
虫草 2 号 <i>Cordyceps</i> No.2	5	B	B1、B2	B3、B4	—

1.2.4 两单孢子杂交的验证试验 为了验证两单孢子是否发生杂交,取两单孢子接触区的孢子与两亲本单孢子进行对峙培养,观察统计结果。

2 结果与分析

2.1 子囊孢子单孢分离结果和菌落形态

从人工栽培的虫草 1 号的子实体中分离得到 10 个子囊单孢子,从人工栽培的虫草 2 号子实体中分离得到 5 个子囊单孢子,将从虫草 1 号子实体中分离的单孢子编号为①~⑩号,从虫草 2 号分离的单孢子编号为 B~B4。其菌落形态见表 1。

2.2 单孢子单独培养和两两配对培养诱导产生子实体的结果

从虫草 1 号和虫草 2 号分离的单孢子中选择具有代表性的单孢子单独培养和两两配对培养,统计结果见表 2。从表 1 和表 2 可以看出,菌落颜色为杏橙色的单孢子一般是可孕的,能产生有丰富的子囊壳的子实体,而且产子实体的能力较强,两两配对后比单独培养时产子实体的能力更强。菌落颜色为淡柠檬黄色的单孢子一般是不可孕的,不能产生子实体或是只能产生没有子囊壳的子座,两两配对后一部分是可孕的,其中有些产子实体的能力也很强。菌落颜色为白色的单孢子为突变单孢子,也是不可孕的。

2.3 单孢子对峙培养的结果

为了研究单孢子的交配类型,对单孢子进行对峙培养,培养结果如图 1~4 和表 3。同型单孢子对峙培养时在菌落交界处形成线型融合带,如图 2 的①和④;不同型单孢子对峙培养时在菌落交界处形成有扇形结构的

体 将分离得到的单孢菌丝转接于改良 PDA 液体培养基中 25℃ 振荡培养 3~5 d,将所得接种于米饭培养基上培养以诱导产生子实体,液体单孢菌种单独接种于米饭培养基上培养以诱导产生子实体,即为单孢培养产子实体试验;将所得液体单孢菌种两两配对即为配对培养产子实体试验。每个培养样品 3 次重复,每隔一段时间观察统计结果。

1.2.3 单孢子对峙培养 为了研究单孢子的交配类型,在 PDA 平板培养基上均分 3 个区域,然后在每个区上接种 1 种单孢子菌种进行对峙培养,培养 1 周后观察三者的生长状况及其间的关系,并与配对出草试验进行对比,统计试验结果。

表 2 单孢子单独培养和两两配对培养诱导产生子实体的结果

Table 2 Results of the single spore isolated and two-two pairs culture to induce to fruiting body

虫草编号 Strain code	40 d 统计结果 40 d statistical results	50 d 统计结果 50 d statistical results
①	—	---
②	---	--
③	+	+
④	+	+
⑥	—	++
⑦	--	++
①×②	—	---
①×③	--	--
①×④	---	—
①×⑥	—	--
①×⑦	—	--
②×③	—	—
②×④	++	+
②×⑥	+	+
②×⑦	+	++
③×④	++	+
④×⑥	+	+++
④×⑦	+	+++
⑥×⑦	++	+++
⑨×B1	+++	++

注:出草情况分 6 个等级。最好:+++;好:++;较好:++;较差:—;差:—;最差:---。

Note:*Cordyceps* grass divided into six grades, Best:+++;Good:++;Better:++;Worse;-;Bad:—;Worst:---.

拮抗带,称之为扇形杂交区,如图2的④和⑦。由表3结合表2可以得知,在两单孢子间有扇形杂交区的配对培养产生子实体的能力强,如表2中的④和⑦杂交;没有扇形杂交区的两单孢子配对培养产生子实体的能力弱,如表2中的①和④杂交。由此可见,蛹虫草的有性生殖具有典型的异宗配合的习性。

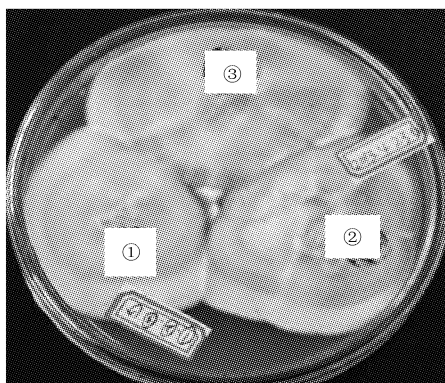


图1 ①、②和③对峙培养
Fig. 1 ①, ② and ③ confrontation culture



图2 ①、④和⑦对峙培养
Fig. 2 ①, ④ and ⑦ confrontation culture

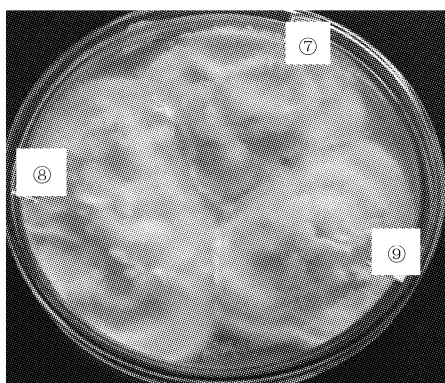


图3 ⑦、⑧和⑨对峙培养
Fig. 3 ⑦, ⑧ and ⑨ confrontation culture

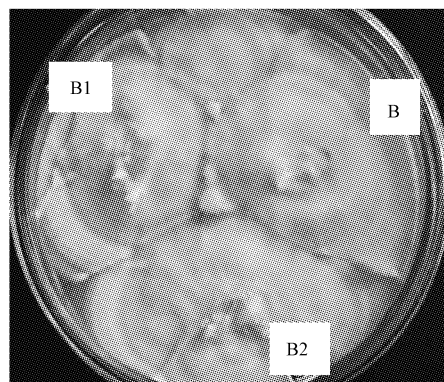


图4 B、B1和B2对峙培养
Fig. 4 B, B1 and B2 confrontation culture

表3 单孢子对峙培养结果

Table 3 Results of single spore confrontation culture

虫草菌株 编号 Strain code	交配型 Mating type	杂交区特征 Hybrid zones property
①	+	①和⑦接触部位形成扇形杂交区 Forming fan-shaped hybrid zone from the contact position of ① and ⑦
②	-	②发生突变 ② mutation
③	+	③和①形成线性带 ③ and ① forming linear belt
④	+	④和①形成线性带,和⑦形成扇形杂交区 ④ and ① forming linear belt, and ⑦ forming fan-shaped hybrid zone
⑦	-	⑦和⑧形成扇形杂交区 ⑦ and ⑧ forming fan-shaped hybrid zone
⑧	+	⑧和⑨形成扇形杂交区 ⑧ and ⑨ forming fan-shaped hybrid zone
⑨	-	⑨和⑦形成线性带 ⑨ and ⑦ forming linear belt
B	-	B和B1形成扇形杂交区 B and B1 forming fan-shaped hybrid zone
B1	+	B1和B2形成线性带 B1 and B2 forming linear belt
B2	+	B2和B形成扇形杂交区 B2 and B forming fan-shaped hybrid zone

注:定义①为+。

Note: Defined ① as +.

2.4 两单孢子杂交的验证试验结果

在单孢子⑦和⑧的扇形杂交区中挑取菌丝,分别与⑦和⑧进行对峙培养,结果如图5所示,其中A表示⑦和⑧的杂交的结果,由图5可知,A分别与⑦和⑧都有拮抗带,表明A既不同于⑦也不同于⑧,是两孢子的杂交的结果,用此方法便可证明两孢子是否发生杂交。

3 讨论

蛹虫草在有性生殖过程中往往会发生染色体水平和基因水平上遗传变异,染色体水平上的变异主要是因为虫草在有性生殖过程中发生质配、核配和减数分裂所致,而基因水平上的变异主要是由于蛹虫草在生长过程中受到营养条件和环境条件的诱变所致。所以,即使是

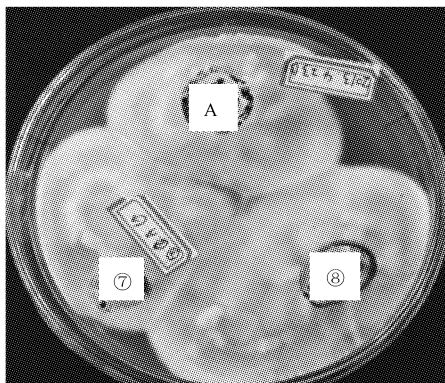


图5 ⑦、⑧和A对峙培养

Fig. 5 ⑦、⑧ and A confrontation culture

来自同一子实体的不同子囊孢子菌株间在菌落颜色、形态、生长速率等性状上也存在一定差异,各自产生子实体的能力也不尽相同。该试验表明,菌落颜色为杏橙色的单孢子一般是可孕的,而且产子实体的能力较强,两两配对后比单独培养时产子实体的能力更强;菌落颜色为淡柠檬黄色的单孢子一般是不可孕的,两两配对后一部分是可孕的,有些产子实体的能力也很强。将单孢子对峙培养后发现在两单孢子间有扇形杂交区的配对培养产生子实体的能力强,没有扇形杂交区的两单孢子配对培养产生子实体的能力弱。

交配型分析中单核体和双核体的鉴定十分重要,不同食药菌种类的鉴定方法不同,在多数担子菌中,可根据菌丝是否形成锁状联合来进行鉴定^[15]。子囊菌没有锁状联合,研究菌株的交配特性通常只能靠是否需要通过菌丝交配完成有性生活史来判断,难度较大。该试验利用已能够在人工条件下培养子实体(子囊果和子囊孢子)的蛹虫草菌株研究其交配特性,首次报道了蛹虫草有性生殖过程中除了有二极性异宗配合习性,还存在

可孕单孢子。其原因可能是单孢子在弹射前在子囊壳里已经完成配对融合形成双核体,也可能是本身就存在可孕单孢子,其中的真正原因还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Belloneik S, Parent N. Toxicity of entomogenous fungus, *Cordyceps militaris*, for culicid larvae[J]. *Entomophaga*, 1976(21):343-347.
- [2] 梁宗琦. 蛹虫草无性型—蛹草拟青霉的确定[J]. *食用菌学报*, 2001, 8(4):28-32.
- [3] 陈顺志, 吴佩杰. 蛹草瓶栽技术简介[J]. *食用菌*, 1990(4):31.
- [4] 张显科, 刘文霞. 不同培养料栽培蛹虫草实验研究[J]. *中国食用菌*, 1997, 16(2):21-22.
- [5] 代君君, 范涛, 吴传华, 等. 人工栽培蛹虫草研究的概述[J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(18):5469-5471.
- [6] Kim H O, Yun J W. A comparative study on the production of exo-polysaccharides between two entomopathogenic fungi *C. militaris* and *C. sinensis* in submerged mycelial cultures[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2005, 99:728-738.
- [7] 邵爱娟, 戴如琴, 兰红丽, 等. 虫草菌丝的生理研究[J]. *中国中医药科技*, 1994, 1(5):22-24.
- [8] 李宗军, 温琼英. 蛹虫草无性型的研究II. 液体发酵培养菌丝体及胞外多糖的提纯[J]. *湖南农业大学学报*, 1998, 24(5):375-379.
- [9] 秦秀丽, 李凤林. 超声波法提取蛹虫草多糖的工艺研究[J]. *江苏农业科学*, 2011, 39(5):378-380.
- [10] 邹超, 张永刚, 崔荣敏, 等. 蛹虫草菌丝体内多糖最佳提取工艺研究[J]. *现代农业科技*, 2012(11):277-280.
- [11] 钟艳梅, 高榆亮, 曾宪录. 超声波-浸提结合法提取蛹虫草培养残基甘露醇[J]. *广东农业科学*, 2011(15):70-72.
- [12] 李美娜, 吴谢军, 李春燕, 等. 人工栽培蛹虫草退化现象的分子分析[J]. *菌物系统*, 2003, 22(2):277-282.
- [13] 梁月, 张国珍, 安沫平, 等. 蛹虫草子囊孢子萌发及后代群体培养性状观察[J]. *菌物学报*, 2005, 24(4):525-532.
- [14] 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.
- [15] 张树庭, 林芳灿. 蕈菌遗传与育种[M]. 北京:中国农业出版社, 1997:70-84.

Study on the Sexual Reproduction of *Cordyceps militaris*

YIN Dong-lin, DUAN Hong-bin, WANG Rui-li

(Xinyang College of Agriculture and Forestry, Xinyang, Henan 464000)

Abstract: Ascomycetous single spores were isolated from the entity of *Cordyceps militaris* by two kinds of artificial cultivation, the single spore isolated and two-two pairs culture to induce to fruiting body, in order to study the mechanism on sexual reproduction of *Cordyceps militaris*. The results showed that *Cordyceps* sexual reproduction could be diversified, in addition to the typical bipolar heterothallism, there was fertile spores. The single spore confrontation culture results found that the ability of two single spore with fan-shaped hybrid zone pairing culture to produce fruiting body was strong, the ability of no fan-shaped hybrid zone two single spore mating to produce fruiting body was weak.

Key words: *Cordyceps militaris*; ascomycetes spores; confrontation culture; fan-shaped hybrid zone; bipolar heterothallism