

文章编号:1001-4829(2007)03-0547-04

## 不产子实体蛹虫草单孢子分离株的获得及 RAPD 分析

李闽锋<sup>1</sup>, 何劲<sup>1</sup>, 丁玲<sup>2</sup>, 康冀川<sup>1,3\*</sup>, 张桥<sup>1,4</sup>, 郑庆委<sup>1</sup>

(1. 贵州大学农业生物工程省级重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072; 3. 贵州大学贵州省生化工程中心, 贵州 贵阳 550025; 4. 长江大学, 湖北 荆州 434100)

**摘要:**对优势蛹虫草原始菌株 WWM04 进行单孢子分离, 共获得 9 个单孢子分离株, 采用米饭培养基培养验证并且获得 6 个完全不产子实体的单孢子分离株。利用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分子标记方法对菌落差异的 4 个菌落特征典型的不产子实体单孢子分离株 (SSP2、SSP7、SSP19 和 SSP21)、原始菌株以及由原始菌株 12 次转接后退化的菌株进行遗传多样性分析。结果表明, 引物 S37、S61 对 6 个菌株的扩增谱带具有非常明显的特异性, 该结果为蛹虫草退化分子标记奠定基础, 并且在一定程度上也印证了蛹虫草异核现象和准性生殖理论。

**关键词:**蛹虫草; 单孢子分离株; RAPD; 异核现象**中图分类号:** S567.3+5 **文献标识码:** A

### Single spore strains without producing fruit body isolated from *Cordyceps militaris* and their RAPD analysis

LI Min-feng<sup>1</sup>, HE Jing<sup>1</sup>, DING Ling<sup>2</sup>, KANG Ji-chuan<sup>1,3\*</sup>, ZHANG Qiao<sup>1,4</sup>, ZHENG Qing-wei<sup>1</sup>

(1. Guizhou Key Laboratory of Agricultural Biotechnology, Guizhou University, Guizhou Guiyang 550025; 2. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Hubei Wuhan 430072, China; 3. Guizhou Center of Biochemistry Engineering, Guizhou University, Guizhou Guiyang 550025, China; 4. Yangtze University, Hubei Jingzhou 434100, China)

**Abstract:** 6 single spore strains without producing fruit body were isolated from the original *Cordyceps militaris*, WWM04 with producing fruit body. The genetic diversity of SSP2, SSP7, SSP19 and SSP21 strains without producing fruit body, the original strain and the strain after 12 transferred from the original strain was analyzed by the RAPD method. The results show that the primers S37 and S61 are of apparently specific to the amplified bands of six strains, which establishes the basic for the degenerate molecular marker of *Cordyceps militaris* and confirms heterokaryosis and parasexuality of *Cordyceps militaris* to some extent.

**Key words:** *Cordyceps militaris*; single spore strain; RAPD; heterokaryosis

蛹虫草 (*Cordyceps militaris* (L.) Link) 在我国又叫北冬虫夏草<sup>[1]</sup>, 是一种能寄生多种鳞翅目昆虫蛹及幼虫的虫草菌。其在功能食品、医药和生物学技术方面具有很好的价值。近年国内外生产上市的一些名为冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc) 药品和功能食品相当部分实际都是用蛹虫草生产的。人工培养蛹虫草是解决野生虫草来源不足的良好途径, 而在人工培养过程中菌种退化现象严重是制约产业化开发的一大瓶颈。到目前为止, 有关蛹虫草菌种退化分析方面的研究报道不多<sup>[2,4,13]</sup>。

异核现象 (heterokaryosis) 及其所导致的准性生

殖 (parasexual reproduction) 是某些真菌遗传变异的重要原因之一<sup>[3]</sup>。梁宗琦等认为蛹虫草无性型蛹草拟青霉是一异核体真菌<sup>[4]</sup>, 并且对蛹草拟青霉单孢子分离株的形态多样性等方面做了相关研究<sup>[5]</sup>。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

优势蛹虫草原始菌株 WWM04 由四川省瓦屋山风景区采得的蛹虫草标本分离得到。单孢子分离株 SSP2、SSP3、SSP6、SSP7、SSP12、SSP19、SSP21 由贵州大学农业生物工程省级重点实验室通过单孢子分离获得。

### 1.2 单孢子分离

在 PDA 斜面上培养供试菌株。待长满菌丝后,

收稿日期: 2007-01-04

作者简介: 李闽锋 (1979-) 男, 在读硕士, 研究方向: 分子微生物学, E-mail: liminfeng02@163.com, \* 通讯作者。



图1 米饭培养基培养的6个完全不产子实体单孢子分离株

Fig. 1 6 single spore strains without producing fruit body on the rice medium

在试管中加 0.05 % Tween-80 的无菌水。用玻璃刮轻压菌苔表面洗下分生孢子(切忌刮动!以减少菌丝量)。将孢子悬液移于加有数粒玻璃珠的小三角瓶中,充分振荡使其分散,尔后用无菌玻璃棉过滤除去菌丝。梯度稀释。取 1 滴于光学显微镜下观察。视野中有 1~2 个孢子的浓度为最佳。将光学显微镜下检测的最适浓度的孢子悬液涂布于水琼脂上, 25 °C 培养,显微镜下观察,确定和标记出同心放射生长的单孢子微菌落,肉眼可见后,分离培养备用。

该单孢子分离方法综合参照梁宗琦等(1997)<sup>[6]</sup>和王艳娜等(2005)<sup>[7]</sup>的方法。

### 1.3 不产子实体单孢子分离株的鉴定

采用工业上人工培养蛹虫草比较通用的米饭培养基,配方参照裘维蕃等(1992)<sup>[8]</sup>的配方设计。培养过程与操作方法参照李琇(2002)<sup>[9]</sup>的方法。

设计 2 个平行实验,每个实验 5 次重复(共 10 次重复),培养分离得到的 9 个单孢子分离株和原始菌株 WWM04。以原始菌株 WWM04 为参照,确证完全不产子实体的单孢子分离株。

### 1.4 转接后退化的菌株

采用将原始菌株 WWM04 接种在 PDA 平板上,待平板长满菌丝后,再转接到新的 PDA 平板上。不断的转接 12 次后,将菌落整齐的菌株作为实验菌株,再将该菌株以原始菌株 WWM04 为参照,用米饭培养基进行培养,方法同上。

### 1.5 RAPD 分析

1.5.1 提取基因组 DNA 采用 CTAB 法<sup>[10]</sup>将提取出来的各个蛹虫草菌株的总 DNA 用 0.8% 的琼脂糖凝胶跑电泳,检测 DNA 质量;然后用蛋白/核酸分析仪检测 OD<sub>260 nm</sub> 和 OD<sub>280 nm</sub> 数据,分析纯度并且计算其浓度。

1.5.2 扩增反应组成(50 μl 体系) 模板 DNA (50 ng/μl) 3 μl; 10 mM dNTP(上海生工) 0.66 μl; 10 μM 随机引物(上海生工) 2 μl; 25 mM MgCl<sub>2</sub>(天

根公司) 5 μl; 10 × Buffer(天根公司) 5 μl; Taq 酶(天根公司) 0.66 μl; 重蒸水 33.68 μl。

1.5.3 反应程序 ①95 °C 1 min 预变性; ②94 °C 20 sec 变性; ③36 °C 1 min 退火; ④72 °C 1 min 延伸;再重复第②步到第④步 39 次(共 40 次循环); ⑤72 °C 7 min 延伸补齐; ⑥保持 4 °C 结束。

1.5.4 电泳检测 取 10 μl PCR 扩增产物于 1.5 % 琼脂糖凝胶中电泳,以 Fermentas 公司提供的 GeneRuler™ DNA Ladder Mix SM0331 作为 Marker,溴乙锭染色,凝胶成像系统检测并照相。

## 2 结果

### 2.1 不产子实体的单孢子分离株获取

9 个单孢子分离株中: 1 个是能产子实体的, 2 个有子座形成的迹象但是一直没有长出子实体, 6 个完全不产子实体。1 个能产子实体的单孢子分离株编号 SSP3, 具体表现为: 单瓶子实体数量少、子实体形状纤细、色泽暗淡、有好几瓶只长孢梗束不长子实体, 它们子实体干重约占原始对照菌株的 43%。

通过两次平行实验,采用米饭培养基培养确证的 6 个完全不产子实体的单孢子分离株,具体实验数据见表 1。6 个完全不产子实体的单孢子分离株,它们编号分别是 SSP2、SSP6、SSP7、SSP12、SSP19、SSP21,它们在米饭培养基培养后的形态见图 1。6 个完全不产子实体的单孢子分离株中菌落特征相似的有: SSP2 和 SSP6; SSP7 和 SSP12。在见光培养后, SSP7 和 SSP12 菌丝体颜色改变很少,除了中间有一两个点淡淡的米黄色外其余全是白色; SSP2 和 SSP6 菌丝体颜色改变也很少,除有几处泛黄星点外,主体为白色; SSP21 部分菌丝体颜色有点黄褐色; SSP19 它的菌丝体颜色变为米黄色; 而原始菌株菌丝体颜色变为橘黄色。



图 2 米饭培养基培养的转接退化菌株

Fig. 2 Transferred strains with degeneration on the rice medium

## 2.2 12 次转接后退化的菌株

经 12 次转接后退化的菌株(图 2)也能形成子实体,只不过它产子实体的能力较原始菌株差,具体的表现为:单瓶子实体数量较原始菌株少,子实体纤细、色泽与较原始菌株比较很暗淡,收割的子实体干重只占原始对照菌株的 60%。

## 2.3 RAPD 分析

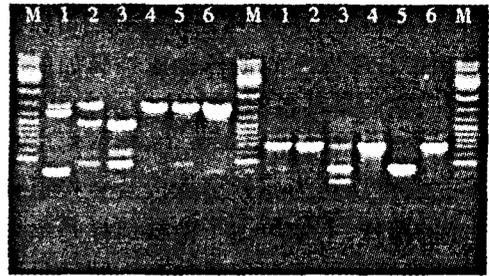
采用上海生物工程公司合成的 15 条随机引物分别对 4 个菌落特征典型的不产子实体的单孢子分离株(SSP2、SSP7、SSP19、SSP21)、转接退化菌株、原始菌株 WWM04 进行了 AP-PCR 扩增。结果发现,随机引物 S37、S61 具有较丰富的扩增条带并且具有较好的多态性。利用随机引物 S37、S61 对 6 个菌株的 DNA 进行 RAPD 分析,结果如图 3 所示。

从图 3 可以看出,每一菌株可扩增出 4~8 条 DNA 片段,分子量大小在 200~2500 bp,不同菌株的扩增谱带模式存在明显的差异,从而体现出菌株间的基因组 DNA 的碱基序列存在明显的差异性。在引物 S37 扩增谱带中我们可以看到菌株之间彼此的差异都很大,其中大约 250、350、410、2500 的扩增条带可以作为退化的标记,而约 650、1200 bp 的扩增条带可以作为高产子实体的标记。在引物 S61 扩增谱带中,其中大约 350、550、900、1200 bp 的扩增条带可以作为不产子实体的标记。

由于采用凝胶成相系统拍摄,有些肉眼能够分辨的较弱片段在照片中显示不清晰。

## 3 讨 论

蛹虫草退化现象是制约其生产的最主要问题,在生产过程中,随着菌种传代、转接次数的增加或保藏时间的延长,菌种资源极易退化,表现在子实体产量和品质的下降,畸形率上升,甚至不形成子座<sup>[11]</sup>。在生产上通常菌种转管次数不宜超过 3 次<sup>[12]</sup>。针对蛹虫草退化方面的研究,目前报道的不多。薛建娥等<sup>[13]</sup>对蛹虫草人工培养种的分离与复壮进行了研



泳道 1~6 依次为:原始菌株、转接退化菌株、SSP19、SSP2、SSP7、SSP21;M: marker

The original strain, transferred strain with degeneration, SSP19, SSP2, SSP7 and SSP21 (from 1 to 6); M: marker

图 3 引物 S37、引物 S61 的 RAPD 电泳图谱

Fig. 3 The RAPD electrophoretic map of the primers S37 and S61

究;高新华等<sup>[14]</sup>研究了蛹虫草单孢子菌株配对后对子实体形成的影响与无性型产孢结构关系;梁宗琦等<sup>[5]</sup>报道了蛹虫草无性型的多型现象方面的研究;李美娜等<sup>[2]</sup>人工培养蛹虫草退化现象的分子分析。它们从不同的某一方面表明或者解释蛹虫草退化现象。梁宗琦等<sup>[4]</sup>提出蛹虫草无性型蛹草拟青霉不仅是一种异核体,而且有可能是一种异粒体(Heteroplasmidon),这一独到的见解对于蛹虫草退化机理的解释是一大创举。

本实验是建立在前人的研究基础上,利用同一来源的不同菌株其遗传背景具有一致性的优点,采用对单孢子分离株、经多次转接后退化菌株与原始菌株之间独立的差异分析方法,系统分析它们菌落形态改变和遗传物质的分子差异,实验结果印证了梁宗琦等<sup>[4]</sup>提出的理论。

在作者分离的 9 个单孢子分离株中,既有产子实体的也有不产子实体的。即使产子实体的单孢子分离株,其菌落形态与原始菌株的差异也很大;不产子实体的单孢子分离株,菌丝体见光培养之后,菌丝体颜色不但都不像原始菌株那样渐变为橘黄色(实际生产和实验上,能产子实体的菌株见光培养之后的颜色都是渐变为橘黄色的),而且其内部分离株间的菌丝颜色也不一致。这些结果用梁宗琦等<sup>[4]</sup>提出的理论可以很好的解释:同一来源的不同单孢子分离株,即使在同一条件下培养也表现为不同表型(也就是多型现象)。

在 RAPD 分析上,从引物扩增谱带中可以发现不产子实体的单孢子分离株扩增的条带,不光和原始菌株以及多次转接后退化的菌株间有明显的差异,而且其内部的差异条带也很多。S37 总的差异条带为 10 条,单孢子菌株间的差异有 9 条;S61 总的差异条带为 7 条,单孢子菌株间的差异有 7 条。菌株间遗传物质差异如此之大,以常规的遗传规律

来解释显然是行不通的。然而现在我们可以做如下推理:单孢子分离株之间遗传物质差异如此之大能很好的说明它们是具备不同的核型的;原始菌株和转接退化菌株的谱带比较一致,而与单孢子菌株谱带差异很大,可以认为原始菌株以及转接退化菌株是多核型的菌株,不像单孢子菌株那样是单一的核型;而这些高频率的多型现象的产生则就是因为其采用准性生殖所引起的。这为梁宗琦等<sup>[4]</sup>提出的理论在遗传物质的分子分析中找到很好的证据。

异核现象广泛地存在于半知菌亚门的真菌中,这种现象的存在不仅增加了真菌对生存环境的适应能力,同时也是准性和有性生殖进行基因重组的前提。真菌的多型现象正是这类丢失、钝化、交换和/或重组过程的外在形态表现。从基因水平上研究证实与单孢子株间形态多样性的联系,研究与各种生理特性及子实体形成的差异,说明具多型现象真菌的生物学本质(功能),有着十分重要的科学意义;同时,筛选和确定有效接种体也将对虫草无性型在生物防治和子实体人工培养研究提供重要的科学依据。不少研究表明,外界因素特别是营养成分影响着真菌异核体核的配比及异核体的分解。在虫草无性型菌种的保存和移植过程中,如何选择合适的培养基等条件,以防止异核体分解和不利于子实体形成的同核体累积,这在虫草人工培养的实际工作中,是至关重要的。

#### 参考文献:

- [1] 江苏医学院. 中药大词典[M]. 上海:上海人民出版社,1975. 767-768.
- [2] 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.
- [3] Ponlecorvo G. The parasexual cycle in fungi [J]. Annu Rev Microbiol, 1956, 10:393-400.
- [4] 梁宗琦. 蛹虫草无性型及其子实体人工培养研究[J]. 西南农业学报,1990,3(2):1-6.
- [5] 梁宗琦, Roland T. V. Fox. 蛹虫草无性型的多型现象[J]. 菌物系统,1998,17(1):57-62.
- [6] 梁宗琦, R. T. V. 福克斯. 粉被虫草无性型单孢子株间和单孢子株内的营养亲和性[J]. 菌物系统,1997,16(3):216-223.
- [7] 王艳娜,汪来发,朴春根,等. 淡紫拟青霉种内异核现象的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(增刊1):157-160.
- [8] 裘维蕃. 菌物学大全[M]. 北京:科学出版社,1998.
- [9] 李 琇. 人工培养蛹虫草[J]. 微生物学,2002,22(6):56-57.
- [10] 林加涵,魏文玲,彭宣宪. 现代生物学实验(下册)[M]. 北京:高等教育出版社,2001. 98-103.
- [11] 王升厚,王尊生,宋玉宏. 蛹虫草人工栽培技术的改进[J]. 沈阳农业大学学报,1998,4(2):144-147.
- [12] 俞孕珍,刘志恒. 北冬虫夏草菌种分离与培养的初步研究[J]. 中国食用菌,1995,14(2):20-21.
- [13] 薛建娥,冉翠香. 蛹虫草人工栽培种的分离与复壮[J]. 中国食用菌,2002,24(2):17-18.
- [14] 高新华,吴 畏,钱国琛等. 北冬虫夏草单孢菌株配对后对子实体形成的影响与无性型产孢结构关系[J]. 上海农业学报,2000,16(增刊):85-92.

(责任编辑 杨 林)