

蛹虫草单孢菌株的生物学特性及稳定性

陈浩然[#], 李忻洋[#], 刘珍, 刘世红, 刘可欣, 董盈, 王玉龙^{*}

安徽农业大学微生物防治省重点实验室, 安徽 合肥 230036

摘要: 蛹虫草菌株在继代培养过程中极易退化。本研究选取 5 株蛹虫草菌株作为出发菌株, 基于单孢分离和显微技术从每株出发菌株中获得 50 株单孢菌株。通过 PCR 方法对单孢菌株进行交配型类型鉴定, 全部为单一交配型单孢菌株, 且不同出发菌株分离得到的 MAT1-1 和 MAT1-2 交配型单孢菌株比例差异较大, 分别为 27:23、34:16、42:8、28:22 和 7:43。从不同出发菌株获得的单孢菌株中随机选择 MAT1-1 和 MAT1-2 交配型单孢菌株各 5 株(共计 50 株), 进行菌落直径、产孢量和虫草素含量测定。与出发菌株相比较, 14 株单孢菌株菌落直径具有显著差异(其中 10 株显著减小), 24 株产孢量具有显著差异且全部下降, 29 株单孢菌株虫草素含量具有显著差异(其中 21 株显著下降)。进一步, 将 50 株单孢菌株连续继代培养, 测定菌株菌落直径、产孢量和虫草素含量, 计算第七代与第一代比值评估菌株性状稳定性。结果表明, 与出发菌株相比较, 14 株单孢菌株菌落直径比值具有显著差异且全部增加, 41 株单孢菌株产孢量比值具有显著差异(其中 40 株显著下降), 44 株虫草素含量比值具有显著差异且全部下降。本研究表明同一菌株中的不同单孢菌株个体之间, 在生长、产孢和次级代谢产物含量等方面存在差异, 且单孢菌株的继代培养性状稳定性比出发菌株差。

关键词: 蛹虫草; 单孢菌株; 交配型; 继代培养

[引用本文]

陈浩然, 李忻洋, 刘珍, 刘世红, 刘可欣, 董盈, 王玉龙, 2023. 蛹虫草单孢菌株的生物学特性及稳定性. 菌物学报, 42(9): 1918-1928

Chen HR, Li XY, Liu Z, Liu SH, Liu KX, Dong Y, Wang YL, 2023. Biological characteristics and stability of single conidial isolates of *Cordyceps militaris*. Mycosystema, 42(9): 1918-1928

资助项目: 国家自然科学基金(32102274); 安徽省教育厅自然科学科研项目(KJ2020A0129, YJS20210237); 安徽农业大学大学生创新训练计划(202110364240)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32102274), the Natural Science Foundation of the Anhui Higher Education Institutions (KJ2020A0129, YJS20210237), and the Anhui Agricultural University College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (202110364240).

*Corresponding author. E-mail: wyl2019@ahau.edu.cn

[#]Co-first author

Received: 2023-01-16; Accepted: 2023-03-09

Biological characteristics and stability of single conidial isolates of *Cordyceps militaris*

CHEN Haoran[#], LI Xinyang[#], LIU Zhen, LIU Shihong, LIU Kexin, DONG Ying, WANG Yulong^{*}

Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

Abstract: Strain degeneration occurs often in *Cordyceps militaris* during continuous subculture. In the present study, 5 strains were selected as original strains, and 50 single conidial isolates were obtained on the basis of single conidial isolation and microscopic techniques from each original strains. PCR was performed for mating-type identification of single conidial isolates. It was found that all the single conidial isolates were single mating type and the number proportion of MAT1-1 and MAT1-2 single conidial isolates obtained from different original strains varied greatly, being 27:23, 34:16, 42:8, 28:22, and 7:43, respectively. 5 MAT1-1 and 5 MAT1-2 single conidial isolates from different original strains (50 isolates in total) were randomly selected for the measurement of colony growth diameter, spore production and cordycepin content. Compared to the original strains, 14 single conidial isolates showed significant difference in colony diameter (of which 10 isolates were decreased), 24 isolates showed significant difference in conidial production (all were decreased), and 29 isolates showed significant difference in cordycepin content (of which 21 isolates were decreased). The 50 isolates were continuously subcultured, and the colony growth diameter, conidial production and cordycepin content were measured. The ratio of the data related of the seventh generation to those of the first generation was calculated to assess the biological characteristic stability of the isolates. The results showed that compared to the original strains, 14 single conidial isolates showed significant difference in the ratio of colony diameter and all were increased; 41 isolates showed significant difference in the ratio of conidial production (40 were decreased); 44 isolates showed significant difference in the ratio of cordycepin content and all were decreased. These findings indicate there are differences in growth, conidial production and secondary metabolite content among individual isolates from the same original strain, and culture characteristics of the single conidial isolates were less stable than those of the original strain during continuous subculture.

Keywords: *Cordyceps militaris*; single conidial strains; mating type; subculture

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Fr. 隶属虫草科 Cordycipitaceae, 是虫草属的模式种(Shrestha *et al.* 2012)。因富含多种生物活性物质(虫草素、虫草酸、虫草腺苷和虫草多糖等), 蛹虫草具有良好的抗菌、抗肿瘤、降血糖、降尿酸及抗炎等作用(Wu *et al.* 2019; Chen *et al.* 2020)。化学成分分析显示, 蛹虫草内含有的代谢产物与冬虫夏

草相似, 而蛹虫草分布广泛且易于规模化培养, 因此逐渐成为冬虫夏草的替代品(Chen *et al.* 2018; Liu *et al.* 2021)。然而, 与其他丝状真菌类似, 蛹虫草在保藏、继代培养和大规模生产过程中极易退化, 导致蛹虫草产业遭受巨大的经济损失(张姝等 2013)。当前研究表明, 保藏和培养条件可能是菌株退化的主要因素(周影等 2021)。

菌株的退化主要表现为菌落形态和颜色变化、生长减慢、气生菌丝生长旺盛、分生孢子产量下降、产生畸形或者不产子实体、次生代谢产物含量减少等(李美娜 2003; 林清泉等 2010; Sun *et al.* 2017; Lou *et al.* 2019; 周思池等 2019; 姜宛岑等 2022)。此外, 菌株退化同时伴随着遗传物质的改变, 例如基因突变、染色体结构变异、核型和表观遗传修饰的改变等(Xin *et al.* 2019; Kontogiannatos *et al.* 2021; 姜宛岑等 2022)。事实上, 蛹虫草退化机制目前尚未明确, 仍是蛹虫草行业急需解决的难题。

蛹虫草为典型的异宗配合真菌, 完整的有性生活史由 2 种可亲和的交配型控制(Zheng *et al.* 2011)。其中, 一种交配型可编码 MAT- α 蛋白(MAT1-1), 另一种编码 MAT-HMG 盒式蛋白(MAT1-2), 只有当可亲和的同核菌丝体之间发生质配后形成含有 2 类交配型基因的异核体才能完成有性生活史(Shrestha *et al.* 2012)。交配型基因可作为蛹虫草退化的分子标记, 如蛹虫草菌株经过继代培养后不能产生子实体, 该退化菌株交配型发生明显偏分离, 表现为 MAT1-2 交配型比例显著增加, 退化菌株与 MAT1-1 单孢菌株共同栽培后能够产生子实体(尹昕等 2022)。蛹虫草 2 种交配型单孢株之间进行杂交, 产生子实体重量是单交配型菌株 5 倍以上(Zhang & Liang 2013)。冯德龙等(2023)基于交配型基因分子标记研究优良性状蛹虫草野生菌株的退化机制发现, 同时含有 2 种交配型基因的菌株具有发育为子实体的能力, 而含单一交配型基因的菌株则不能发育为子实体。此外, 交配型基因可以作为分子标记, 用以指导配对亲和性杂交组合和鉴定杂交菌株, 提高蛹虫草杂交育种的效率(鲍大鹏等 2017)。

已有的研究多集中于菌株的退化与交配型比例关系, 而不同交配型单孢株之间的生长性状及退化特征等差异, 这些还没有被研究。本研究选取 5 株优良性状的蛹虫草野生菌株, 采用单孢

子分离方法从每株野生型菌株中获得 50 株单孢菌株, 并对单孢菌株进行交配型鉴定。进一步, 每株野生型菌株中选择 10 株单孢菌株(MAT1-1 和 MAT1-2 各 5 株), 分别研究菌株的生长特性和继代培养性状稳定性。本研究为防止蛹虫草野生分离株退化, 及解决蛹虫草产业中的菌种退化现象提供新的研究思路。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

蛹虫草菌株(编号 CM1、CM2、CM3、CM4 和 CM5)保存于安徽农业大学微生物防治安徽省重点实验室, 栽培实验出草发现具有优良性状。菌株保藏于 -80°C 的 10%甘油中。活化的菌株接种于 PDA (potato dextrose agar)固体(Difco, 213200)平板上, 25°C 培养。

1.2 单孢菌株获得

配置水琼脂(琼脂粉 15 g, 纯水 1 000 mL)固体培养基, 将灭菌的直径为 1 cm 玻璃纸平铺于水琼脂平板中, 每个平板放置 20 个玻璃纸。

将菌株转接到 PDA 平板上避光 25°C 培养 15 d。利用 0.05%无菌吐温溶液收集 PDA 平板上的孢子, 经过过滤得到孢子悬浮液。利用血球计数板计数, 经过逐级稀释获得 200 个孢子/mL 的孢子悬浮液。吸取 5 μL 孢子悬浮液滴加到玻璃纸中间。分别在 0、6、12、18 和 24 h, 利用倒置式显微镜(Olympus IX70)观察并确认每个玻璃纸中有且仅有一个分生孢子。将带有单孢株的玻璃纸转移到新的 PDA 平板上培养。

1.3 菌株交配型鉴定

挑取 PDA 平板上培养的菌丝, 液氮研磨, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA。总 DNA 稀释至 100 ng/ μL 后为模板。采用 MAT1-1 引物(5'-TCCGCTGAGTTCGGAACAAC-3'; 5'-TCC CAAGGCTCGGCTAAAGA-3')和 MAT1-2 引物(5'-TTCTGCCAGAGTCATTTCCG-3'; 5'-ATATG

CCGCTGCTTTCATCC-3')对蛹虫草交配型基因进行扩增。扩增体系为:2× Rapid Taq Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司) 10 μL, 引物 (10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 7 μL。扩增条件: 95 °C预变性 3 min; 95 °C变性 30 s, 58 °C退火 30 s, 72 °C延伸 5 s, 30 个循环; 72 °C延伸 10 min, 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳并在凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)下检测。

1.4 菌株继代培养

将蛹虫草菌株 CM1-5 和单孢菌株接种到 PDA 平板,避光 25 °C培养 15 d,获得第一代菌株。将菌株转接到新的 PDA 平板并培养 15 d, 获得第二代菌株,以此类推,最终获得第七代菌株。

1.5 菌株生长、产孢统计

取蛹虫草菌株直径 1 mm 菌块转接于 PDA 平板中间,避光 25 °C培养 15 d, 十字交叉法测量菌落直径;将平板表面菌株全部刮取至装有 20 mL 0.05%吐温溶液的 50 mL 离心管中,充分涡旋振荡,利用血球计数板计数。

1.6 菌株虫草素含量检测

虫草素的测定参照 Chen *et al.* (2017)的方法。收取 PDA 平板上菌株菌丝,液氮研磨。取 1 g 粉末加入 50 mL 水,40 °C水浴超声 1 h, 12 000 r/min 离心 5 min 后,取上清进行滤膜(0.45 μm)。采用安捷伦 1100 HPLC 系统(Agilent Technologies)利用高效液相色谱法(色谱柱: Waters 公司 Sunfire C18 5 μm, 流动相: 10%甲醇, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 35 °C, 波长: 260 nm)检测虫草素含量。

1.7 菌株菌落直径比、产孢比和虫草素含量比计算

为便于比较不同菌株的继代培养性状稳定性,对第七代菌株与第一代菌株的菌落直径比、产孢比和虫草素含量比进行统计:菌落直径比(colony diameter rate)=第七代菌株(直径)/第一代菌株(直径);产孢比(conidial yield rate)=第七代菌株(产孢量)/第一代菌株(产孢量);虫草素含量

比(cordycepin rate)=第七代菌株(虫草素含量)/第一代菌株(虫草素含量)。

1.8 数据分析

实验数据采用 GraphPad Prism 9 软件作图,数据结果以平均数±标准差(Standard Deviation, SD)表示,利用 SPSS(24.0)进行单因素方差分析,每个试验 3 个重复,统计显著性水平设定为 $P<0.05$ 。卡方检验用以进行交配型比例偏分离分析,确定单孢菌株 2 种交配型是否符合预期 1:1 之比(Zhang & Liang 2013)。

2 结果与分析

2.1 单孢菌株获得及交配型鉴定

PCR 方法鉴定 5 株菌株均能检测到 *MAT1-1* 和 *MAT1-2* 交配型基因,即同时含有 2 种类型的细胞核(图 1A)。为确保分离获得的单孢菌株是由一个分生孢子萌发形成的,利用倒置显微镜分别在 0、6、12、18 和 24 h 确认玻璃纸上面有且仅有一个分生孢子,最终获得真正的单孢菌株(图 1B)。从 5 株菌株分别分离大量单孢菌株,每株随机选择 50 株单孢菌株进行交配型基因检测。统计 PCR 鉴定结果可知,4 株菌株(CM1、CM2、CM3 和 CM4)中 *MAT1-1* 单孢菌株比 *MAT1-2* 单孢菌株数量多,其中 CM3 中仅检测出 8 株 *MAT1-2* 单孢菌株(图 1C)。而在 CM5 菌株中,*MAT1-2* 单孢菌株比 *MAT1-1* 单孢菌株数量多,仅检测出 7 株 *MAT1-1* 单孢菌株。交配型比例偏分离分析表明 CM2 ($\chi^2=6.84$), CM3 ($\chi^2=23.12$)和 CM5 ($\chi^2=25.92$)出现偏分离现象,而 CM1 ($\chi^2=0.32$)和 CM4 ($\chi^2=0.72$)并没有发生偏分离。值得注意的是,共计 250 株单孢菌株中未发现同时含有 *MAT1-1* 和 *MAT1-2* 交配型基因的菌株。

2.2 单孢菌株生长、产孢和虫草素含量比较

每株菌株随机选择 10 株单孢菌株(*MAT1-1* 和 *MAT1-2* 各 5 株)用于后续试验。

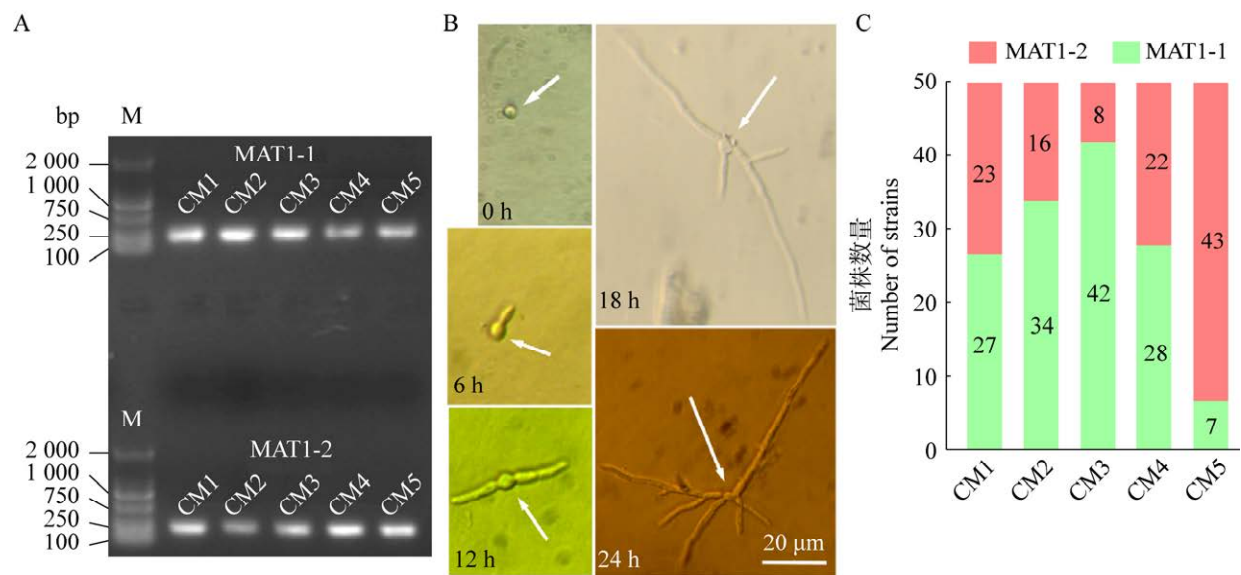


图 1 单孢分离及菌株交配型鉴定 A: 5 株出发菌株交配型基因类型 PCR 鉴定. M 为分子量标记. B: 不同时间分生孢子的萌发生长情况. 箭头指示分生孢子. C: 5 株菌株分离得到的单孢菌株交配型

Fig. 1 Single conidial isolation and mating-type gene identification of *Cordyceps militaris* strains. A: Mating-type gene identification of 5 original strains. M represents molecular ladder marker. B: Germination and growth characteristics of conidia at different time. Arrows indicate conidia. C: Mating-type of single conidial isolates obtained from 5 original strains.

与出发菌株相比较, CM1 中有 5 株单孢菌株(2 株 MAT1-1, 3 株 MAT1-2)菌落直径显著减小; CM2 中只有 1 株 MAT1-2 单孢菌株菌落直径显著减小; CM3 中有 2 株 MAT1-1 单孢菌株和 1 株 MAT1-2 单孢菌株菌落直径显著增加; CM4 菌株中单孢菌株长直径显著增加和减小各有 1 株; CM5 中有 1 株 MAT1-1 单孢菌株和 2 株 MAT1-2 单孢菌株菌落直径显著减小($P<0.05$, 图 2A)。整体分析发现, 与出发菌株相比较, 共计 6 株 MAT1-1 单孢菌株和 8 株 MAT1-2 单孢菌株菌落直径显著变化, 其中 4 株单孢菌株直径显著增加, 10 株单孢菌株直径显著减小。每株出发菌株分离得到的全部 MAT1-1 单孢菌株与 MAT1-2 单孢菌株之间, 菌落直径无显著差异。

与 5 株出发菌株分别相比较, 共有 24 株单孢菌株产孢量显著变化且全部下降, 其中含 12 株 MAT1-1 和 12 株 MAT1-2 单孢菌株($P<0.05$, 图 2B)。与出发菌株相比较, CM1 和 CM5 中产

孢量下降的单孢菌株数量较多, 分别为 8 株(4 株 MAT1-1, 4 株 MAT1-2)和 7 株(4 株 MAT1-1, 3 株 MAT1-2); CM2、CM3 和 CM4 中分别有 2 株(2 株 MAT1-2)、4 株(2 株 MAT1-1, 2 株 MAT1-2)和 3 株(2 株 MAT1-1, 1 株 MAT1-2)单孢菌株产孢量显著下降。每株出发菌株分离得到的全部 MAT1-1 单孢菌株与 MAT1-2 单孢菌株之间, 产孢量无显著差异。

与 5 株出发菌株分别相比较, 共有 29 株单孢菌株虫草素含量显著变化, 其中 8 株单孢菌株虫草素含量显著上升, 21 株单孢菌株含量显著下降($P<0.05$, 图 2C)。与出发菌株相比较, CM1 中 4 株单孢菌株虫草素含量显著上升, 仅 1 株单孢菌株虫草素含量显著下降; CM2 中 2 株单孢菌株虫草素含量显著上升, 2 株单孢菌株虫草素含量显著下降; CM3、CM4 和 CM5 中分别有 7、6 和 5 株单孢菌株虫草素含量显著下降。在虫草素含量显著变化的单孢菌株中, 15 株为 MAT1-1

交配型菌株，14 株为 MAT1-2 交配型菌株。

进一步分析表明，与出发菌株相比较，生长、产孢和虫草素含量全部发生显著变化的共有 4 株单孢菌株，分别为 CM1 中 MAT1-1 1 号和 MAT1-2 2 号、CM3 中 MAT1-1 4 号和 CM5 中 MAT1-2 1 号单孢菌株。整体分析发现，每株出发菌株分离得到的全部 MAT1-1 单孢菌株与 MAT1-2 单孢菌株之间，菌落直径、产孢量和虫草素含量都无显著差异。以上数据表明同一菌株中的不同单孢菌株个体之间，在生长、产孢和次

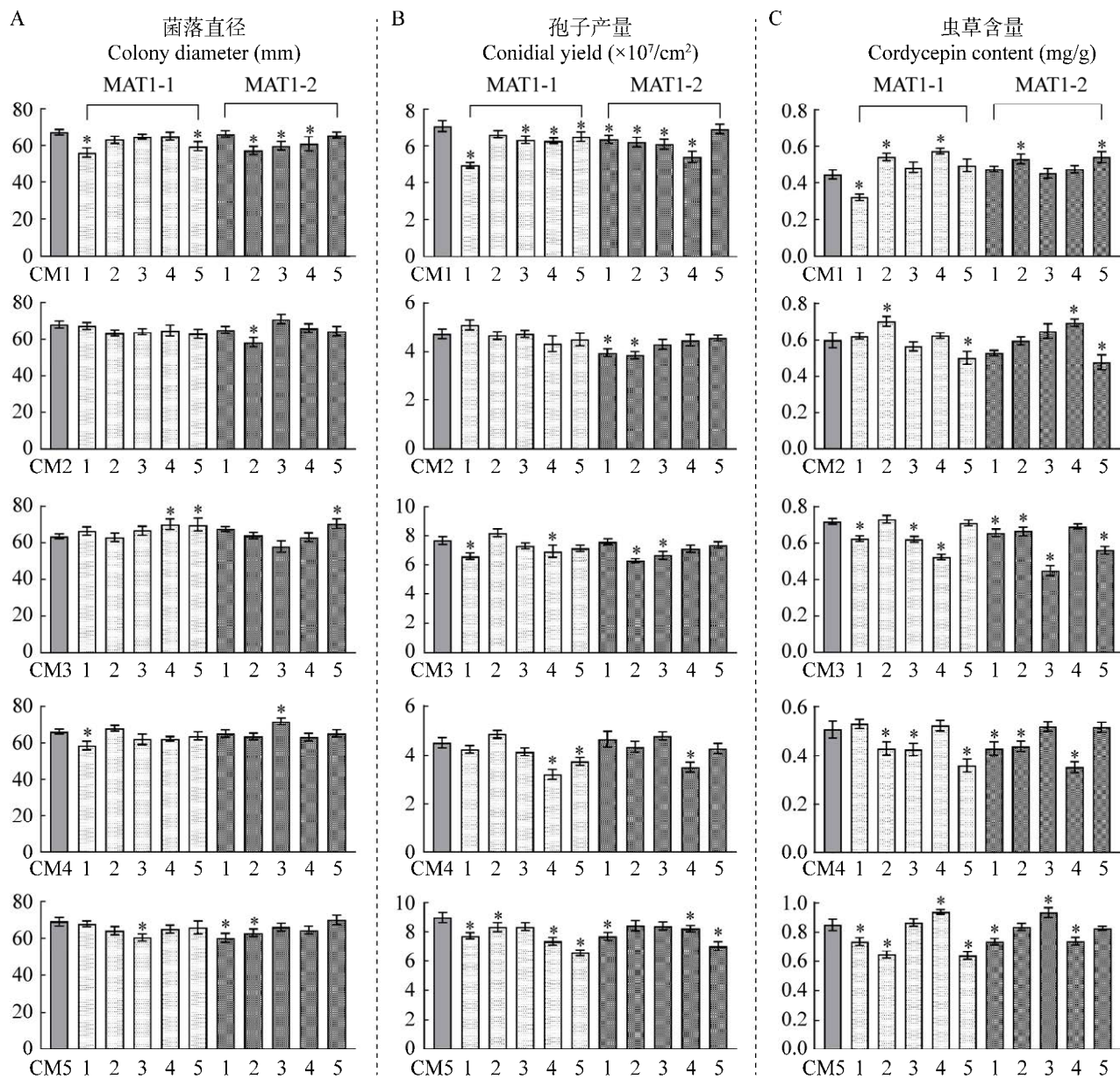


图 2 蛹虫草不同菌株菌落直径、孢子数量和虫草素含量 A: 菌落直径. B: 孢子数量. C: 虫草素含量. *表示与出发菌株比较具有差异显著, $P<0.05$. 下同

Fig. 2 The colony diameter, conidial yield and cordycepin content of different *Cordyceps militaris* strains. A: Colony diameter. B: Conidial yield. C: Cordycepin content. *Significantly different as compared with the original strain ($P<0.05$). The same below.

级代谢产物含量等方面存在差异。

2.3 单孢菌株继代培养性状

为研究单孢菌株在继代培养过程中的性状稳定性,测定了第七代单孢菌株生长、产孢和虫草素含量,性状稳定性通过第七代与第一代菌株

之间的比值展示(图 3)。

继代培养 7 代后,5 株出发菌株及分离的单孢菌株都呈现菌落直径增加,直径约为第一代菌株的 1.1–1.6 倍(图 3A)。与出发菌株相比较,CM1 中全部 MAT1-2 单孢菌株菌落直径比值无

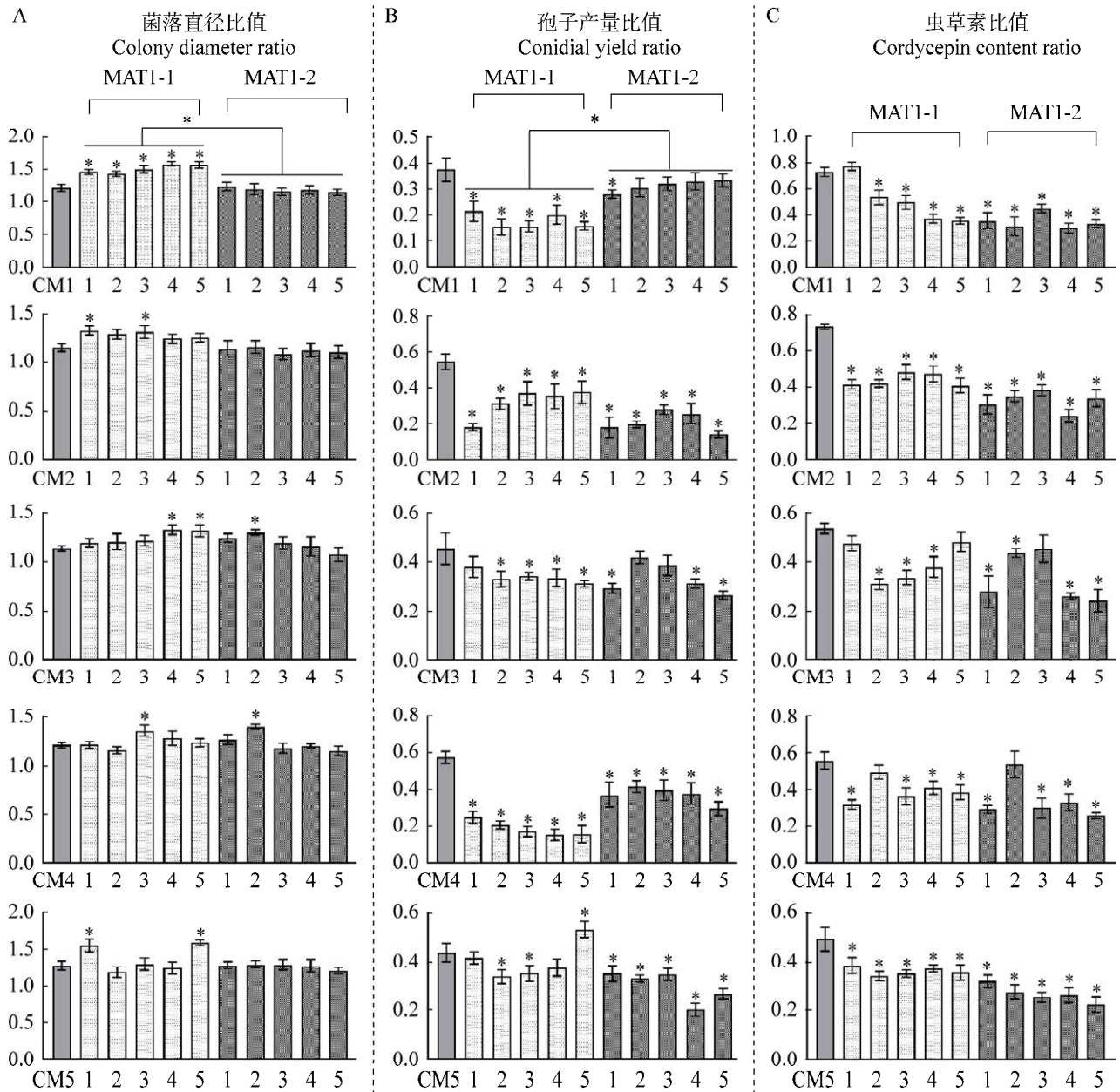


图 3 继代培养第七代与第一代菌株的菌落直径、孢子数量和虫草素含量比 A: 菌落直径比. B: 孢子数量比. C: 虫草素含量比

Fig. 3 The ratios of colony diameter, conidial yield and cordycepin content of the seventh generation to those of the first generation of *Cordyceps militaris* strains. A: Colony diameter ratio. B: Conidial yield ratio. C: Cordycepin content ratio.

显著变化,但是全部 MAT1-1 单孢菌株菌落直径比值显著高于出发菌株和 MAT1-2 单孢菌株。CM2、CM3、CM4 和 CM5 中分别有 2、3、2 和 2 株单孢菌株菌落直径比值显著增加,其中有 7 株 MAT1-1 和 2 株 MAT1-2 单孢菌株。

继代培养 7 代后,与出发菌株相比较,共有 41 株单孢菌株产孢量比值发生显著变化,其中 40 株表现为产孢量比值显著下降(图 3B)。CM1 中全部 MAT1-1 单孢菌株产孢量比值显著低于出发菌株和 MAT1-2 单孢菌株;CM2 和 CM4 中全部单孢菌株产孢量比值显著低于出发菌株,但是 MAT1-1 和 MAT1-2 单孢菌株之间并无显著差异。CM3 和 CM5 中分别有 7 和 7 株单孢菌株产孢量比值显著低于出发菌株。

继代培养 7 代后,与出发菌株相比较,共有 44 株单孢菌株虫草素含量比值发生显著变化,全部表现为虫草素含量比值显著下降(图 3C)。CM1 出发菌株虫草素含量比值为 0.72, MAT1-2 单孢菌株虫草素含量比值在 0.37–0.43 之间,显著低于出发菌株;CM2 和 CM5 中全部单孢菌株虫草素含量比值显著低于出发菌株;CM3 和 CM4 中分别有 7 和 8 株单孢菌株虫草素含量比值显著低于出发菌株。

进一步分析表明,与出发菌株相比较,生长、产孢和虫草素含量比值全部发生显著变化的共有 9 株单孢菌株,分别为 CM1 中 4 株、CM2 中 2 株、CM3、CM4 和 CM5 中各有 1 株,全部为 MAT1-1 菌株。以上数据表明同一菌株中的不同单孢菌株个体,在继代培养后,生长、产孢和虫草素含量等性状稳定性方面存在差异。

3 讨论

菌株的退化一直是食用菌规模化生产中所面临的普遍问题,探究并明确菌株退化的形态变化规律对于食用菌产业发展具有重要意义。蛹虫草是一种双极性异宗配合子囊真菌,已有报道表

明蛹虫草菌株的退化与所含 MAT1-1 和 MAT1-2 菌的比例失调相关(Lou *et al.* 2019; Lin *et al.* 2021)。本研究发现 5 株出发菌株中有 4 株所含 MAT1-1 菌的比例高于 MAT1-2 菌,与尹昕等(2022)报道的野外采集分离的蛹虫草结果一致,这可能是 MAT1-1 菌株在固有遗传上更适合生存。同时,研究中发现 CM5 菌株中 MAT1-2 菌的比例高达 86% (43/50),表明在个别蛹虫草菌株中 MAT1-2 菌也可以占据优势比例。5 株菌株只有 2 株菌株中 MAT1-1 和 MAT1-2 菌比例接近 1:1 (27:23; 28:22),没有发生交配型比例的偏分离,另外 3 株菌株交配型比例出现了偏分离现象,且不同菌株存在较大差异。谭琦等(2011)对蛹虫草栽培菌株分离得到 MAT1-1 和 MAT1-2 单孢菌株比例为 75:60,鲍大鹏等(2017)对蛹虫草 CM-H07 菌株分离得到 MAT1-1 和 MAT1-2 单孢菌株比例为 44:39,因此,尽管研究表明 2 种交配型菌的比例失调可能导致蛹虫草菌株的退化,但是以 2 种交配型菌的比例作为判断菌株优劣的方法需要慎重。

大量的研究通过单孢分离方法得到了同时含有 MAT1-1 和 MAT1-2 交配型基因的单孢菌株(Zheng *et al.* 2011; Shrestha *et al.* 2012; Wen *et al.* 2012; Kang *et al.* 2017; 李小凤等 2021; 冯德龙等 2023)。本研究为确保获得单孢菌株的准确性,在不同时间点利用显微镜确认单孢菌株由单一孢子萌发生长形成。在检测获得的 250 株单孢菌株中,全部仅含有一种交配型基因。也有报道存在同时含有 MAT1-1 和 MAT1-2 交配型基因的单孢菌株,推测主要原因为:分生孢子黏附一起,在制备孢子悬浮液过程中并未完全分开,使得分离的单孢菌株可能是多孢菌株。本研究通过显微镜观察发现滴加的孢子悬浮液中大约 1/2 以上存在 2 个或多个分生孢子。因此,在实际单孢分离试验过程中,需要借助显微镜观察等技术进一步验证。

蛹虫草不同菌株之间生长速度、产孢量和代谢产物含量等存在较大差异,针对同一菌株分离的单孢菌株间差异少有报道(Sung *et al.* 2006; Kang *et al.* 2017; 马婕馨等 2019; 郭玉峰等 2021)。李闽锋(2007)通过研究 9 个单孢菌株发现不同单孢菌株之间产子实体能力、菌落形态等具有明显差异。本研究发现同一菌株中的不同单孢菌株个体之间,在生长、产孢和次级代谢产物含量等方面存在差异。与出发菌株相比较,24 株单孢菌株产孢量显著变化且全部下降,可能是 MAT1-1 和 MAT1-2 菌共同存在有利于蛹虫草菌株的产孢。

在继代培养过程中性状稳定性方面,我们发现与出发菌株相比较,82%的单孢菌株表现为产孢量比值显著下降,88%的单孢菌株虫草素含量比值显著下降。因此,在产孢和虫草素合成能力方面,继代培养对于单孢菌株影响要大于出发菌株。蛹虫草菌株在继代培养 5 代即可出现明显退化现象,同时菌丝生长速度增加、产孢能力和虫草素含量下降是退化菌株的重要特点(王熙等 2011; 怀美玉等 2022)。相对于出发菌株,第七代菌株菌丝生长速度增加、产孢能力和虫草素含量显著下降,说明本研究中所有菌株继代培养 7 代菌株已经退化。以上结果表明单孢菌株的退化速率比出发菌株退化速率快。CM1 中全部 MAT1-1 单孢菌株产孢量比值显著低于 MAT1-2 单孢菌株,但是菌落直径比值呈现相反的趋势,说明不同交配型菌株在退化速率上可能存在差异,其中具体原因和机制有待进一步研究。

综上所述,本研究从 5 株蛹虫草出发菌株分离得到 250 株单孢菌株,其中 138 株 MAT1-1 和 112 株 MAT1-2 单孢菌株。同一菌株中的不同单孢菌株个体之间,在生长、产孢和次级代谢产物含量等方面存在差异,且单孢菌株的继代培养退化速率比出发菌株快。研究结果为蛹虫草菌种退化分子机制的揭示提供了基础。

[REFERENCES]

- Bao DP, Liu MX, Wang Y, Yang RH, Mao WJ, He HQ, 2017. The compatible crosses assisted by the molecular marker of the mating genes of *Cordyceps militaris*. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 31(11): 2113-2120 (in Chinese)
- Chen A, Wang Y, Shao Y, Huang B, 2017. A novel technique for rejuvenation of degenerated caterpillar medicinal mushroom, *Cordyceps militaris* (Ascomycetes), a valued traditional Chinese medicine. International Journal of Medicinal Mushrooms, 19(1): 87-91
- Chen B, Sun Y, Luo F, Wang C, 2020. Bioactive metabolites and potential mycotoxins produced by *Cordyceps* fungi: a review of safety. Toxins, 12(6): 410
- Chen L, Liu Y, Guo Q, Zheng Q, Zhang W, 2018. Metabolomic comparison between wild *Ophiocordyceps sinensis* and artificial cultured *Cordyceps militaris*. Biomedical Chromatography, 32(9): e4279
- Feng DL, Hu HP, Yong TQ, Liu YC, Xiao C, Huang LH, Xie YZ, Wu QP, 2023. Induction of sexual fruiting-body formation by pairing the opposite mating-type isolates of *Cordyceps militaris*. Mycosystema, 42(1): 344-352 (in Chinese)
- Guo YF, Wang Q, Wang XF, Zhou T, Yang XJ, Wang QJ, Wang L, 2021. Screening of superior strains isolated from wild *Cordyceps militaris* in mountain Tai. Biotechnology Bulletin, 37(11): 125-133 (in Chinese)
- Huai MY, Liu Q, XU FX, Wang SH, Dong CH, 2022. Special issue of *Cordyceps*: Characteristics of strain degeneration and its identification in *Cordyceps militaris*. Mycosystema, 41(11): 1819-1830 (in Chinese)
- Jiang WC, Wang CL, Zhu ZZ, Zhao YM, Wang S, Fan WL, Li TL, 2022. Study on early external identification mark of strain degeneration during successive transfer culture of *Cordyceps militaris*. Acta Horticulturae Sinica, 49(4): 851-860 (in Chinese)
- Kang N, Lee HH, Park I, Seo YS, 2017. Development of high cordycepin-producing *Cordyceps militaris* strains. Mycobiology, 45(1): 31-38
- Kontogiannatos D, Koutrotsios G, Xekalaki S, Zervakis GI, 2021. Biomass and cordycepin production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris*—a review of various aspects and recent trends towards the exploitation of a valuable fungus. Journal of Fungi, 7(11): 986
- Li MF, 2007. Molecular biology studies on the different

- phenotypes of fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*. Master Thesis, Guizhou University, Guiyang. 1-82 (in Chinese)
- Li MN, 2003. Genetic analysis of character variation of *Cordyceps militaris* in artificial cultivation. Master Thesis, Liaoning Normal University, Dalian. 1-42 (in Chinese)
- Li XF, Hu BY, Chen QJ, Xu SY, Wang QY, Zhang GQ, 2021. Single ascospore strains isolation and mating-type gene identification of *Cordyceps militaris*. Journal of Beijing University of Agriculture, 36(2): 1-5 (in Chinese)
- Lin PJ, Ye ZW, Wei T, Wu JY, Zheng QW, Chen BX, Guo LQ, Lin JF, 2021. Cross breeding of novel *Cordyceps militaris* strains with high contents of cordycepin and carotenoid by using *MAT* genes as selectable markers. Scientia Horticulturae, 290: 110492
- Lin QQ, Qiu XH, Zheng ZL, Xie CH, Xu ZF, Han RC, 2010. Characteristics of the degenerate strains of *Cordyceps militaris*. Mycosystema, 29(5): 670-677 (in Chinese)
- Liu Y, Xiao K, Wang Z, Wang S, Xu F, 2021. Comparison of metabolism substances in *Cordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris* cultivated with tussah pupa based on LC-MS. Journal of Food Biochemistry, 45(6): e13735
- Lou H, Lin J, Guo L, Wang X, Tian S, Liu C, Zhao Y, Zhao R, 2019. Advances in research on *Cordyceps militaris* degeneration. Applied Microbiology and Biotechnology, 103(19): 7835-7841
- Ma JX, Cai CS, Gao S, Fang YC, Zhao GZ, 2019. Screening and fermentation optimization of *Cordyceps militaris* having high SOD activity. Food and Fermentation Industries, 45(10): 122-128 (in Chinese)
- Shrestha B, Zhang W, Zhang Y, Liu X, 2012. The medicinal fungus *Cordyceps militaris*: research and development. Mycological Progress, 11(3): 599-614
- Sun SJ, Deng CH, Zhang LY, Hu KH, 2017. Molecular analysis and biochemical characteristics of degenerated strains of *Cordyceps militaris*. Archives of Microbiology, 199(6): 939-944
- Sung JM, Park YJ, Lee JO, Han SK, Lee WH, Choi SK, Shrestha B, 2006. Selection of superior strains of *Cordyceps militaris* with enhanced fruiting body productivity. Mycobiology, 34(3): 131-137
- Tan Q, Cai T, Wang H, Wei J, Feng AP, Lin N, Bao DP, 2011. Molecular identification of mating-type genes of asexual spores from *Cordyceps militaris*. Acta Agriculturae Shanghai, 27(3): 5-8 (in Chinese)
- Wang X, Zhang J, Zhang GZ, 2011. The biological characteristics of *Cordyceps militaris* during successive transfer culture. Edible Fungi of China, 30(5): 27-29 (in Chinese)
- Wen T, Li M, Kang J, He J, 2012. A molecular genetic study on fruiting-body formation of *Cordyceps militaris*. The Korean Society of Mycology, 21(2): 76-95
- Wu F, Zhou LW, Yang ZL, Bau T, Li TH, Dai YC, 2019. Resource diversity of Chinese macrofungi: edible, medicinal and poisonous species. Fungal Diversity, 98: 1-76
- Xin X, Yin J, Zhang B, Li Z, Zhao S, Gui Z, 2019. Genome-wide analysis of DNA methylation in subcultured *Cordyceps militaris*. Archives of Microbiology, 201(3): 369-375
- Yin X, Li XL, Zou G, Zheng TT, Li B, Wang Y, 2022. Role of methylation-related genes and mating-type genes in degradation of *Cordyceps militaris*. Acta Edulis Fungi, 29(2): 1-12 (in Chinese)
- Zhang G, Liang Y, 2013. Improvement of fruiting body production in *Cordyceps militaris* by molecular assessment. Archives of Microbiology, 195(8): 579-585
- Zhang S, Zhang YJ, Shrestha B, Xu JP, Wang CS, Liu XZ, 2013. *Ophiocordyceps sinensis* and *Cordyceps militaris*: research advances, issues and perspectives. Mycosystema, 32(4): 577-597 (in Chinese)
- Zheng P, Xia Y, Xiao G, Xiong C, Hu X, Zhang S, Zheng H, Huang Y, Zhou Y, Wang S, Zhao GP, Liu X, St Leger RJ, Wang C, 2011. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine. Genome Biology, 12(11): 1-22
- Zhou SC, Zou G, Yang ZS, Bao DP, Yao WW, Yang J, Wang Y, Li XL, 2019. Physiological and biochemical characteristics of a degraded strain of *Cordyceps militaris*. Acta Edulis Fungi, 26(4): 23-28 (in Chinese)
- Zhou Y, Wang Q, Zhang JH, Liu J, Qian K, Wang DY, 2021. Research progress on *Cordyceps militaris* degeneration strains. North Sericulture, 42(1): 1-5 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 鲍大鹏, 刘敏祥, 汪滢, 杨瑞恒, 茅文俊, 何华奇, 2017. 运用交配型基因分子标记辅助蛹虫草亲和配对. 核农学报, 31(11): 2113-2120
- 冯德龙, 胡惠萍, 雍天乔, 刘远超, 肖春, 黄龙花, 谢意

- 珍, 吴清平, 2023. 互补交配型配对诱导蛹虫草有性子实体形成. 菌物学报, 42(1): 344-352
- 郭玉峰, 汪乔, 王祥锋, 周婷, 杨晓君, 王庆佶, 王丽, 2021. 泰山野生蛹虫草优良菌株的筛选. 生物技术通报, 37(11): 125-133
- 怀美玉, 刘晴, 徐方旭, 王升厚, 董彩虹, 2022. 虫草专刊: 蛹虫草菌株退化特征及鉴别方法. 菌物学报, 41(11): 1819-1830
- 姜宛岑, 王晨露, 朱正州, 赵英明, 王蒨, 范文丽, 李天来, 2022. 蛹虫草继代中菌株退化早期外部识别标志研究. 园艺学报, 49(4): 851-860
- 李美娜, 2003. 人工栽培蛹虫草(*Cordyceps militaris*)性状变异的遗传学分析. 辽宁师范大学硕士论文, 大连. 1-42
- 李闽锋, 2007. 蛹虫草形成子实体表型差异的分子生物学研究. 贵州大学硕士论文, 贵阳. 1-82
- 李小凤, 胡渤海, 陈青君, 徐诗毅, 王秋颖, 张国庆, 2021. 蛹虫草子囊孢子单孢分离与交配型基因鉴定. 北京农学院学报, 36(2): 1-5
- 林清泉, 丘雪红, 郑壮丽, 谢翠红, 许再福, 韩日畴, 2010. 蛹虫草退化菌株的特征研究. 菌物学报, 29(5): 670-677
- 马婕馨, 蔡程山, 高苏, 方晔晨, 赵国柱, 2019. 蛹虫草 SOD 高活性菌株筛选及液体培养条件优化. 食品与发酵工业, 45(10): 122-128
- 谭琦, 蔡涛, 汪虹, 魏静, 冯爱萍, 林楠, 鲍大鹏, 2011. 蛹虫草无性孢子的交配型基因类型的分子鉴定. 上海农业学报, 27(3): 5-8
- 王熙, 张佳, 张国珍, 2011. 蛹虫草继代培养后主要生物学性状的变化. 中国食用菌, 30(5): 27-29
- 尹昕, 李晓玲, 邹根, 郑婷婷, 李波, 汪滢, 2022. 甲基化相关基因和交配型基因在蛹虫草退化过程中的作用. 食用菌学报, 29(2): 1-12
- 张姝, 张永杰, Shrestha Bhushan, 徐建平, 王成树, 刘杏忠, 2013. 冬虫夏草菌和蛹虫草菌的研究现状、问题及展望. 菌物学报, 32(4): 577-597
- 周思池, 邹根, 杨占山, 鲍大鹏, 姚威威, 杨杰, 汪滢, 李晓玲, 2019. 蛹虫草退化菌株的生理生化特征. 食用菌学报, 26(4): 23-28
- 周影, 王芹, 张俊辉, 刘娟, 钱琨, 王大雨, 2021. 蛹虫草退化菌株的研究进展. 北方蚕业, 42(1): 1-5