



董彩虹

中国科学院微生物研究所研究员，博士生导师。现任中国菌物学会菌物产业分会会长；中国菌物学会虫草产业分会会长，中国中药协会茯苓产业分会副秘书长。从事珍稀食药菌生物学研究，采用正、反向遗传学手段，结合多组学分析，揭示食用菌生殖方式、子实体发育和逆境胁迫机制；基因编辑进行食用菌菌种改良。涉及类群包括冬虫夏草、蛹虫草、茯苓、羊肚菌和绣球菌等。发表论文 100 余篇，授权专利 8 项，参编《中国冬虫夏草》《食用菌栽培学》和《食用菌遗传育种学》。

蛹虫草菌株退化特征及鉴别方法

怀美玉^{1,2}，刘晴²，徐方旭^{3,4}，王升厚^{3,4*}，董彩虹^{2,4*}

1 沈阳师范大学生命科学学院，辽宁 沈阳 110034

2 中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室，北京 100101

3 沈阳师范大学实验教学中心，辽宁 沈阳 110034

4 辽宁省功能性蛹虫草重点实验室，辽宁 沈阳 110034

摘要：蛹虫草菌株在继代培养和低温长期保藏过程中极易退化导致子实体产量下降，对产业造成重大影响。本研究以正常菌株、PDA 斜面长期 4℃ 保藏导致退化的菌株和连续继代培养的菌株为材料，观察其子实体、菌落、菌丝形态和分生孢子数量，对菌丝细胞核、线粒体、活性氧积累和芽生孢子内脂滴进行染色观察；并对菌丝中虫草素、腺苷和麦角甾醇含量进行比较分析。结果表明 PDA 斜面长期 4℃ 保藏和连续继代培养导致的蛹虫草菌株退化表型大多数一致，即退化菌株较正常菌株子实体产量降低、菌丝粘连打结、分生孢子数量显著降低、菌丝活性氧含量升高、细胞内线粒体数量减少、芽生孢子脂滴由弥散的小脂滴融合为大脂滴。然而，在菌落见光转色方面，长期低温保藏退化菌株基本不转色，而继代培养退化菌株转色不稳定；长期保藏退化菌株菌丝细胞核数目无明显变化，继代培养退化菌株细胞核数量明显减少；长期保藏退化菌株菌丝中虫草素、腺苷和麦角甾醇含量较正常菌株降低 58%、41% 和 70%，继代培养退化菌株麦角甾醇含量无明显变化。因此，显微观察菌丝是否出现粘连打结及氮蓝四唑 NBT 检测菌丝活性氧含量，操作简单、用时较短，可用于大规模生产中蛹虫草菌株退化的检测手段；线粒体和脂滴染色也可作为退化菌株的鉴别方法；而生产中常用的通过菌落见光转色判断菌株优劣的方法需要慎重。继代培养菌株第 4 代开始出现明显的退化特征，因此在生产中使用的菌株最好控制在继代培养 3 代以内。

关键词：蛹虫草；退化；低温保藏；继代培养；活性氧

基金项目：国家自然科学基金(31872163)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31872163).

*Corresponding authors. E-mail: 1113243295@qq.com, dongch@im.ac.cn

ORCID: DONG Caihong (0000-0002-2558-3404), HUAI Meiyu (0000-0001-7510-307X)

Received: 2022-07-01, accepted: 2022-07-22

[引用本文] 怀美玉, 刘晴, 徐方旭, 王升厚, 董彩虹, 2022. 蛹虫草菌株退化特征及鉴别方法. 菌物学报, 41(11): 1819-1830
Huai MY, Liu Q, Xu FX, Wang SH, Dong CH, 2022. Characteristics and identification of *Cordyceps militaris* strain degeneration. Mycosystema, 41(11): 1819-1830

Characteristics and identification of *Cordyceps militaris* strain degeneration

HUAI Meiyu^{1,2}, LIU Qing², XU Fangxu^{3,4}, WANG Shenghou^{3,4*}, DONG Caihong^{2,4*}

1 College of Life Sciences, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, Liaoning, China

2 State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 Experimental Teaching Center, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, Liaoning, China

4 Liaoning Provincial Key Laboratory of Functional *Cordyceps militaris*, Shenyang 110034, Liaoning, China

Abstract: Strain degeneration occurs often in *Cordyceps militaris* during subculture and long-term storage at low temperature, resulting in a decrease in yield and a great loss in income. In this study, normal strains and degenerated strains due to long-term storage at 4 °C PDA slant and continuous subculture of *C. militaris* were observed to survey the morphological variation of fruiting bodies, colonies and mycelia and sporulation capacity of conidia. The nuclei, mitochondria, reactive oxygen species accumulation in cell, and lipid droplets in blastospore were observed by staining method, and the content of cordycepin, adenosine and ergosterol in mycelia was analyzed. The results showed that most of the phenotypical variation of degenerated strains caused by long-term storage at 4 °C PDA slant and continuous subculture were consistently displayed as: the decrease of fruiting body yield, the presence of adhesive and knotted hyphae, significant decrease of conidia, increased level of reactive oxygen species, reduction of mitochondria in the mycelia, mergence of dispersed and small lipid droplets in the blastospores into large droplets. There is no color change after being exposed to light for the colony of degenerated strains caused by long-term storage at 4 °C, whereas color change is unstable during the continuous subculture. The number of nuclei in the mycelia of degenerate strains undergoing continuous subculture is reduced whereas no change in that undergoing long-term storage at 4 °C. The content of cordycepin, adenosine and ergosterol in the mycelia of degenerated strains of long-term preservation was reduced by 58%, 41% and 70% as compared with that of the normal strains, but the ergosterol content of the degenerated strains of continuous subculture was unchanging. Microscopic observation of adhesive and knotted mycelia, and staining the mycelia by nitrogen blue tetrazolium (NBT) to detect the reactive oxygen species are easy to operate and not time-consuming. This method can be used to detect the degeneration of *C. militaris* strains on a large scale. Mitochondrial and lipid droplet staining can also be used to identify the degenerated strains. The commonly used method of judging the quality of spawn by color conversion after light irradiation needs to be cautious. Obvious degeneration of the strains usually appears in fourth generation during subculture, so the strains used for cultivation should be selected within three generations.

Keywords: *Cordyceps militaris*; degeneration; cryopreservation; subculture; reactive oxygen species

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Fr., 隶属于子囊菌门 Ascomycota、肉座菌目 Hypocreales、虫草科 Cordycipitaceae、虫草属 *Cordyceps*, 是一种重要的食药真菌, 在我国形成了较大的产业。据中国食用菌协会统计, 2018 年我国蛹虫草年产量 90 559.7 t, 2019、2020 年维持在 10 万 t 左右。然而, 蛹虫草菌株在继代培养和保藏过程中极易发生退化, 产量降低甚至不产子实体, 对产业造成重大损失(王熙等 2011; 何晓红等 2012)。

关于蛹虫草菌株退化表型的研究较多, 如多种酶活性降低, 类胡萝卜素、胞外多糖、虫草素、腺苷和脂质含量变化(李美娜 2003; Sun *et al.* 2017; 周思池等 2019); 对合成染料溴麝香草酚蓝的脱色能力降低(林清泉等 2010); 细胞器和胞内有害物质含量明显变化, 并可观察到大量自噬现象(于群 2020; 姜宛岑等 2022); 线粒体结构和数量上的改变可能是蛹虫草退化的重要原因之一(姜宛岑等 2022); 菌株退化后分生孢子交配型发生明显偏分离, 随着继代培养次数的增加分生孢子交配型为 MAT1-2 的比率依次增加, 甲基化相关基因和交配型基因在退化过程中发挥协同作用(尹昕等 2022); 细胞自噬相关基因 *Atg13*、*Atg18*、*Atg22* 和 *Atg22-2* 表达量在退化菌株中上升(周思池等 2019)。

已有研究均集中于继代培养菌株的退化特征, 除多次继代培养之外, 菌株冰箱长期保存也会导致菌株退化。本研究对 PDA 斜面长期 4 °C 保藏和正常继代培养导致退化的菌株进行观察, 研究蛹虫草菌株的退化特征, 从继代培养和冰箱长期保藏导致菌株退化的稳定表型中寻找早期种源培养过程中鉴别菌株退化的方法, 避免在生产中造成损失, 并为探究蛹虫草退化机制提供思路。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

蛹虫草菌株 521 为企业生产用母种, 2016 年 6 月 20 日采用 10%甘油冻存管保藏于 -80 °C 超

低温冰箱, 2021 年 6 月 3 日取出活化, 菌株活化按照 Liu *et al.* (2018) 的方法进行, 活化的菌株栽培后子实体生长良好。菌株 521T 为栽培子实体发育良好的菌株, 于 2017 年 10 月采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)斜面, 4 °C 冰箱长期保藏, 2020 年 11 月活化后栽培, 发现菌株已经退化。用于继代培养的蛹虫草 1532A 为企业生产用母种, 将 1532A 菌丝块接种于 PDA 平板中心, 每隔 10 d 在菌落边缘用 0.9 mm 打孔器打孔接种至新的 PDA 培养基, 20 °C 避光继代培养, 共 6 代, 分别标记为 1532B、1532C、1532D、1532E、1532F 和 1532G。

1.2 菌落、子实体形态和生长速度

将菌株 521、521T 和继代培养的菌株 1532B–1532G 直径 0.9 mm 菌丝块接种于 PDA 平板中央, 20 °C 避光培养 20 d, 十字交叉法测量菌落直径并计算生长速度; 然后 500 lx 光照培养 3 d 观察菌落转色情况。参照 Guo *et al.* (2016) 的方法进行蛹虫草子实体栽培, 对整个栽培过程跟踪观察, 并统计不同菌株的子实体生长状况。

1.3 菌丝形态观察和分生孢子计数

将菌株 521、521T 和继代培养菌株 1532B–1532G 直径 0.9 mm 菌丝块接种于 PDA 平板中央, 在距离菌丝块 2 cm 处插入灭菌的盖玻片, 20 °C 避光培养, 待菌丝覆盖盖片 1/2 时, 取出进行显微结构观察(Nikon Eclipse 80i)。

将菌株 521、521T 和继代培养的菌株 1532B–1532G 直径 0.9 mm 菌丝块转接于 PDA 平板中央, 20 °C 避光培养 20 d 后, 500 lx 光照培养 3 d。10 mL 0.05%吐温冲洗平板菌丝, 菌丝和孢子悬液转移至 50 mL 离心管中, 加入 20 颗玻璃珠涡旋振荡 15 s, 3 层擦镜纸过滤后收集分生孢子滤液, 血球计数板计数, 每个菌株 3 个生物学重复。

1.4 菌丝线粒体、细胞核及芽生孢子脂滴染色观察

菌丝线粒体采用 Mito Tracker Green FM (碧

云天生物技术有限公司)进行染色。二甲基亚砜(DMSO)溶解 Mito Tracker Green FM, 配置浓度为 1 mmol/L 的储存液, 于-20 ℃保存备用, 磷酸盐缓冲溶液(PBS)稀释至 200 nmol/L 用于菌丝染色。插片培养附着菌丝的盖玻片浸没于染色液染色 30 min, PBS 缓冲液冲洗 2 次后荧光显微镜(Zeiss IMAGER A2)观察。

细胞核采用 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI) (北京鼎国昌盛生物技术有限公司)进行染色。0.01 mol/L pH 7.0 的 PBS 缓冲液溶解 DAPI, 配置浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 的工作液, 插片培养附着菌丝的盖玻片滴加 5 μL 染色液染色, 置于荧光显微镜观察。

芽生孢子脂滴采用尼罗红[生工生物工程(上海)股份有限公司]染色观察。取直径 0.9 mm 菌丝块接种于液体培养基内, 150 r/min 避光培养 4 d 后过滤获得芽生孢子悬浮液。丙酮溶解尼罗红, 配置浓度为 0.1 mg/mL 的工作液, 芽生孢子悬浮液与尼罗红染液 1:3 混合, 移液枪吹打混匀后, 荧光显微镜下观察。

1.5 菌丝活性氧染色观察

菌丝活性氧染色采用氮蓝四唑(NBT) (北京兰博利德生物技术有限公司)和 DCFH-DA 活性氧检测探针(南京建成生物工程研究所)两种方法。取平板培养基边缘直径 0.9 mm 菌丝块接种于液体培养基内, 150 r/min 避光培养 4 d, 过滤收集菌丝体并用 PBS 缓冲液冲洗 2 次, 浸没于 0.3 mmol/L NBT 染色剂中室温孵育 1 h, PBS 缓冲液冲洗 2 次终止反应后体视镜(Nikon SMZ18)观察并拍照; 使用 DCFH-DA 活性氧检测探针, 将探针与 PBS 缓冲液 1:1 000 稀释, -20 ℃避光保存备用。将附着菌丝的盖玻片浸没于染色液中室温染色 30 min, 置于荧光显微镜下观察。

1.6 菌丝虫草素、腺苷和麦角甾醇含量

虫草素和腺苷的测定参考标准 NY/T

2116-2012。取 0.5 g 菌丝体粉末加水 80 mL, 45 ℃超声提取 30 min 后加水定容至 100 mL。离心后取上清液过 0.45 μm 水相滤膜, HPLC 检测虫草素和腺苷含量, 检测条件: 色谱柱 Luna Omega 5 μm Polar C18 100A, 流动相: 10%甲醇, 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 35 ℃, 波长: 260 nm。

麦角甾醇测量参照霍理坚等(2021)的方法。取菌丝体粉末 0.1 g 于 10 mL 容量瓶中, 加甲醇约 8 mL, 置于超声仪中, 50 ℃超声提取 30 min, 取出后用甲醇定容, 有机相滤膜过滤, HPLC 检测麦角甾醇含量。检测条件: 流动相: 95%甲醇; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 40 ℃; 进样体积: 10 μL ; 检测波长: 282 nm。

1.7 数据分析

实验数据采用 SPSS 22.0 进行 ANOVA 统计分析, Graphpad 软件进行 *t* 检验并作图, 数据结果以平均数 $\pm$ 标准差表示, 每个试验 3 个重复, 统计显著性水平设定为 $P<0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 菌落、子实体形态及生长速度比较

菌株 521 和 521T 光照后, 菌落形态差异较大。521 菌落呈橘黄色, 521T 基本不转色(图 1A); 子实体颜色无差异, 但 521T 子实体矮小且相互粘连、聚集成簇, 出现形似掌形分叉, 不形成单根子实体, 子实体产量显著降低(图 1B、2A), 表现为明显的菌株退化。521T 菌丝生长速度显著大于正常菌丝($P<0.001$, 图 2B), 但分生孢子产量显著低于菌株 521, 仅为菌株 521 的 7% (图 2C)。

继代培养菌株 1532B 转色后呈深橘黄色, 1532C、1532D 菌落外周不转色, 1532D 仅中心为橘黄色, 1532E、1532F 为淡黄色, 1532G 为橘黄色(图 1A), 继代菌株光照后菌落颜色深浅不一, 不具规律。1532B 和 1532C 的子实体形态无差异, 1532D-1532G 的子实体高度逐渐

降低(图 1B)，子实体鲜重随着继代次数增加先增多，至 1532E 陡然下降并持续降低(图 2D)。1532B–1532D 菌丝生长速率无显著差异，从 1532E–1532G 生长速度显著增加(图 2E)。继代菌株分生孢子产量呈现先增加后减少的趋势，至 1532D 最大(3.0×10^7 个/平板)，之后随着继代次数增加产孢量逐步减少，到 1532G 减少至 3.3×10^6 个/平板(图 2F)。从子实体形态来看，1532D 已经表现出退化，而从子实体产量来看，1532E 开始表现出明显的菌株退化。

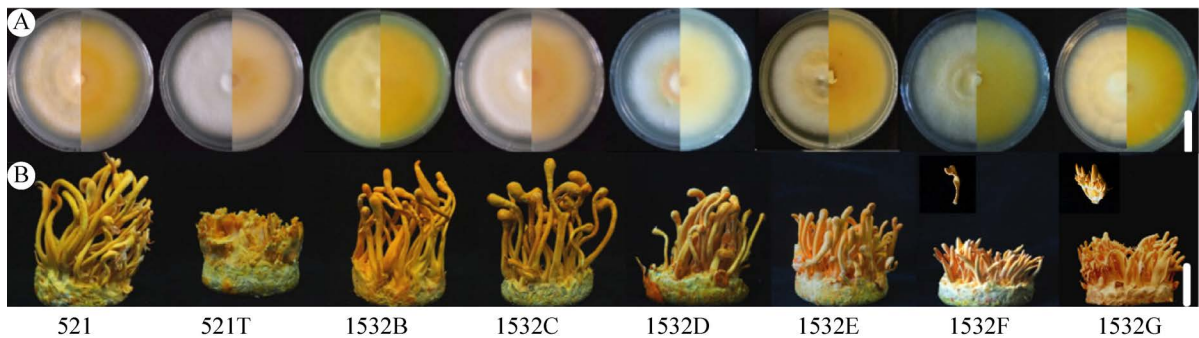


图 1 蛹虫草不同菌株菌落及子实体形态 A：菌落形态；B：子实体形态. 标尺=3 cm
Fig. 1 *Cordyceps militaris* colonies and fruiting bodies of different strains. A: Morphology of colonies; B: Morphology of fruiting bodies. Scale bars=3 cm.

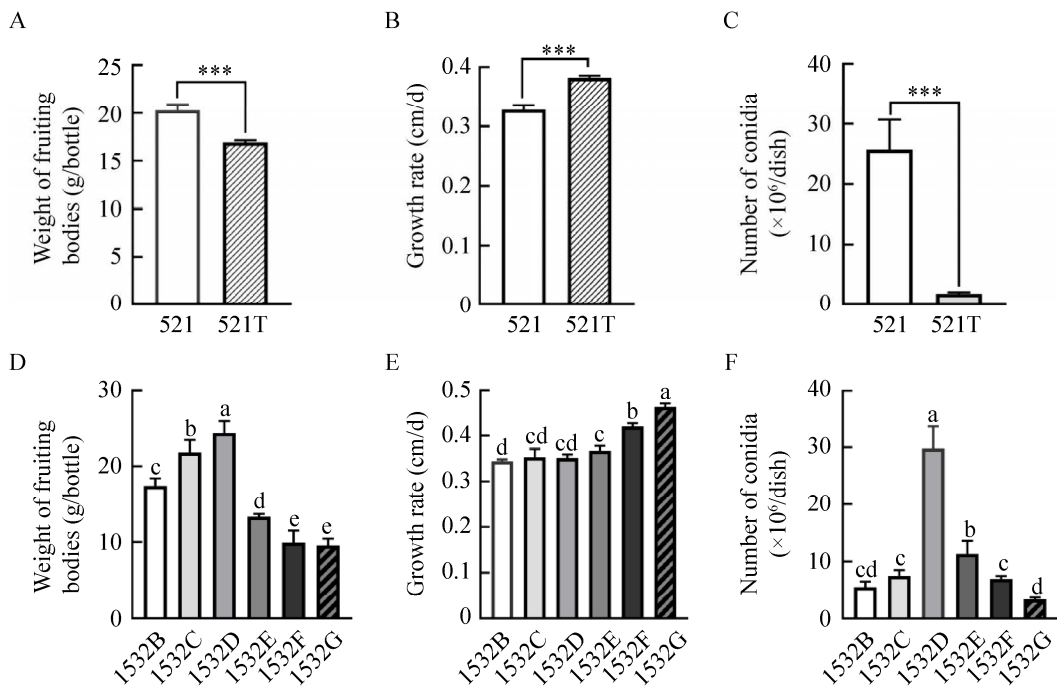


图 2 蛹虫草不同菌株子实体鲜重、菌丝生长速度和分生孢子数 A、D：子实体鲜重；B、E：菌丝生长速度；C、F：分生孢子数. * $P\leq0.05$ ；** $P\leq0.01$ ；*** $P\leq0.001$. 不同小写字母表示 $P=0.05$ 水平差异显著
Fig. 2 Weight of fruiting bodies average growth rate and number of conidia of different strains of *Cordyceps militaris*. A, D: Weight of fruiting bodies; B, E: Growth rate; C, F: Number of conidia. * $P\leq0.05$; ** $P\leq0.01$; *** $P\leq0.001$. Different lowercase letters indicate significant difference at $P=0.05$ level.

2.2 菌丝形态观察

菌株 521 菌丝大部分粗细均匀、分枝少、线条流畅, 菌丝间隔均匀、排列规律(图 3A); 521T 菌丝断裂(图 3B)、杂乱扭曲(图 3C)、相互粘连和菌丝打结(图 3E、3F), 菌丝崩裂溶解、细胞内容物流出(图 3D)。继代培养的菌株随着继代次数的增加菌丝粘连数目增多, 粘连面积增大, 少量菌丝扭结成团。菌丝相互粘连可能是子实体

畸形、不分化的前期表现(图 4A–4F)。

2.3 菌丝活性氧染色

NBT 与超氧化物反应生成甲腈, 通过颜色的深浅判断活性氧的积累情况(Lara-Ortiz *et al.* 2003)。染色结果发现菌株 521、1532B–1532D 菌丝体为淡紫色, 521T、1532E–1532G 呈深紫色, 表明退化菌株的菌丝体较未退化菌株的菌丝体内积累了更多活性氧(图 5)。

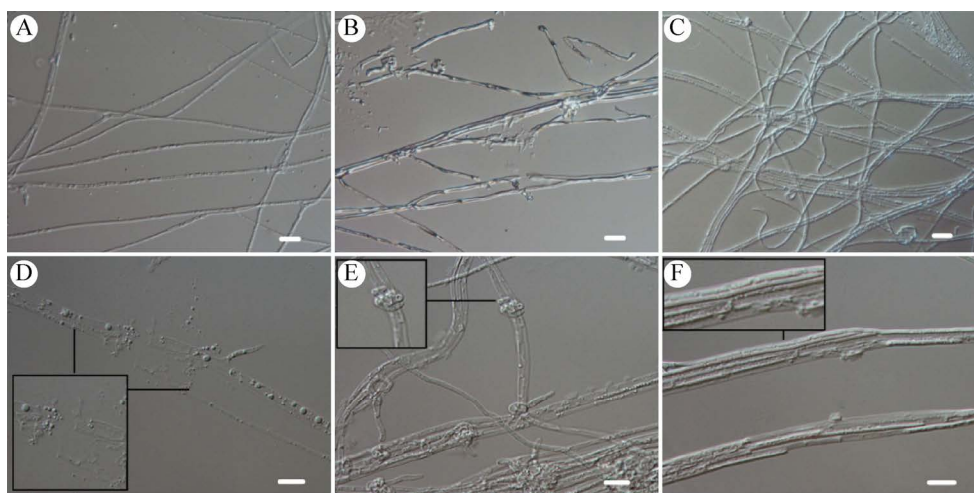


图3 菌株 521 和 521T 菌丝形态观察 A: 菌株 521; B–F: 菌株 521T; B、C: 菌丝断裂和杂乱扭曲; D: 菌丝内容物流出; E、F: 菌丝间相互粘连和打结. 标尺=10 μm

Fig. 3 Mycelial morphology of strains 521 and 521T. A: Strain 521; B–F: Strain 521T; B, C: The ruptured and twisted hyphae; D: Efflux of cell inclusion; E, F: Adhesive and knotted hyphae. Scale bars=10 μm.

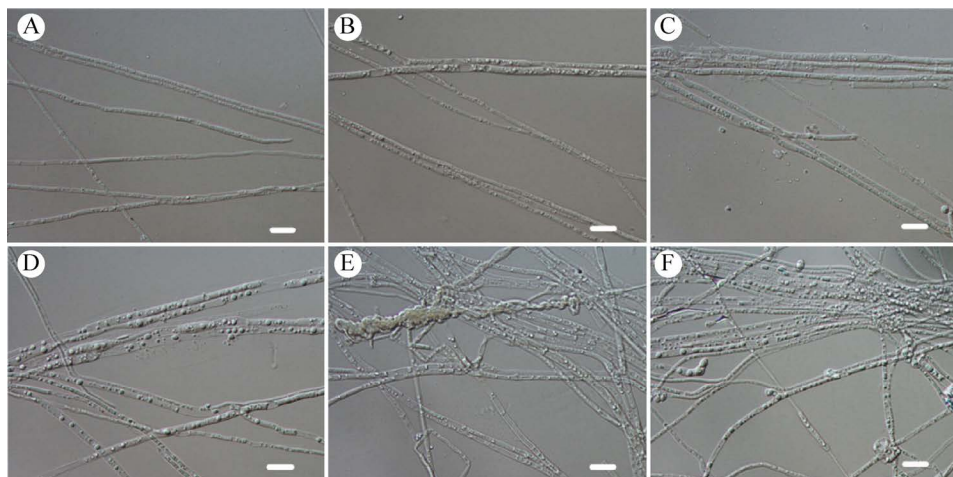


图4 继代培养菌株菌丝形态 A–F: 1532B–1532G 菌丝形态. 标尺=10 μm

Fig. 4 Mycelial morphology of different strains of subcultured *Cordyceps militaris*. A–F: Strains 1532B–1532G. Scale bars=10 μm.

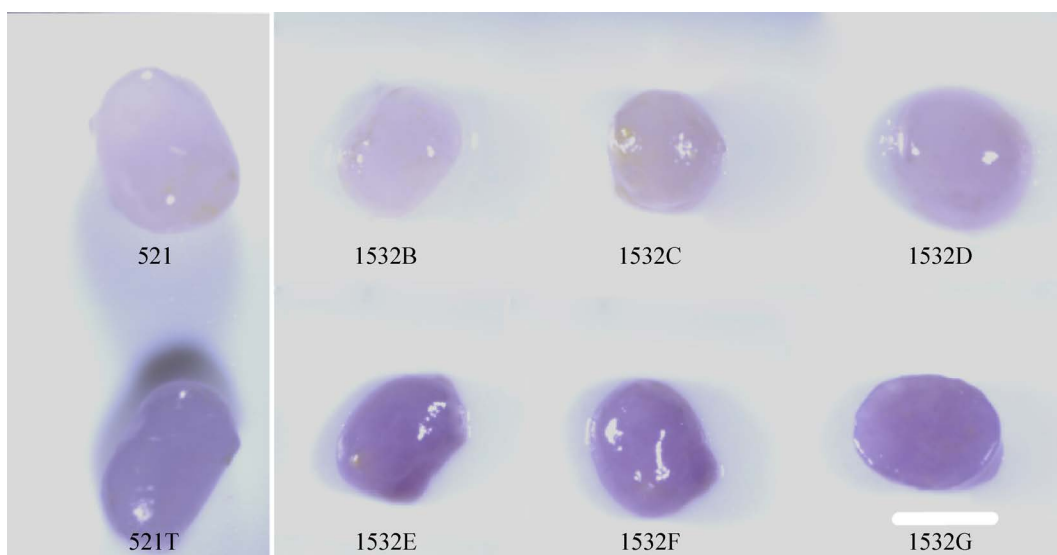


图 5 蛹虫草菌丝 NBT 染色 标尺=1.5 mm

Fig. 5 NBT staining of *Cordyceps militaris* mycelia. Scale bars=1.5 mm.

DCFH-DA 是通用的氧化应激指示剂, 染色后绿色荧光强度与活性氧含量成正比(朴英实和林贞花 2015)。菌丝染色发现绿色荧光在菌株 521 菌丝中呈现点状分布, 而在 521T 菌丝中连续分布, 呈现较强的荧光, 表明较高的活性氧含量。继代菌株菌丝活性氧含量随着继代次数增加逐渐增多, 1532E、1532F 和 1532G 的菌丝已经呈现出较强的连续绿色荧光(图 6A)。DCFH-DA 探针染色与 NBT 染色呈现出相同的变化趋势。可见, 退化后菌株的菌丝活性氧含量明显多于正常菌株的活性氧含量。

2.4 线粒体染色

菌株 521 菌丝细胞尖端线粒体数量充盈, 而 521T 的菌丝线粒体分布稀疏。继代培养菌株 1532B–1532D 菌丝内线粒体无明显差异, 1532E、1532F 可见线粒体数量明显减少, 1532G 线粒体数量大幅减少, 随着退化程度加剧, 线粒体受损程度也相应增加, 两种方式的退化菌株菌丝内线粒体数量均减少(图 6B)。

2.5 细胞核染色

菌株 521 和 521T 菌丝内细胞核分布间隔都很均匀, 继代菌株 1532B–1532D 细胞核未见差

异, 从 1532E 开始可见分布不均, 1532F 菌丝细胞核明显减少(图 6C), 细胞核的变化较活性氧和线粒体更难观察, 退化程度增加至一定水平才能观察到明显的细胞核变化。

2.6 脂滴染色

脂滴经尼罗红染色后呈红色, 菌株 521 芽生孢子的脂滴数量多、分布密集、均匀布满整个芽生孢子细胞质, 留出的空隙较小; 521T 芽生孢子内弥散的小脂滴融合为大脂滴, 中间空腔面积较大(图 7), 继代菌株 1532B–1532D 的脂滴未见差异, 1532E–1532G 脂滴数量逐渐减少, 由分散变为聚集成团(图 7), 蛹虫草退化后芽生孢子内的脂滴发生明显变化, 且长期保藏和继代培养引起退化的脂滴变化趋势相同。

2.7 菌丝虫草素、腺苷和麦角甾醇含量测定

521 菌丝中虫草素、腺苷和麦角甾醇含量均显著高于 521T, 521 菌丝中虫草素含量为 521T 的 2 倍以上(图 8A)。521 菌丝中腺苷和麦角甾醇平均含量分别为 1.45 mg/g 和 0.53 mg/g, 而 521T 菌丝中腺苷和麦角甾醇平均含量分别为 0.86 mg/g 和 0.16 mg/g (图 8B、8C), 退化菌株

521T 菌丝中的虫草素、腺苷和麦角甾醇含量较正常菌株分别下降了 58%、41%和 70% (图 8A–8C)。

继代菌株 1532D 菌丝中虫草素含量较前两代大幅增加, 随后呈逐渐降低趋势, 第 6 代降低

至 0.25 mg/g (图 8D), 腺苷含量整体来看为下降趋势(图 8E), 第 6 代菌丝虫草素和腺苷含量较第 1 代分别下降了 48%和 66%, 但麦角甾醇含量呈增加趋势(图 8F)。

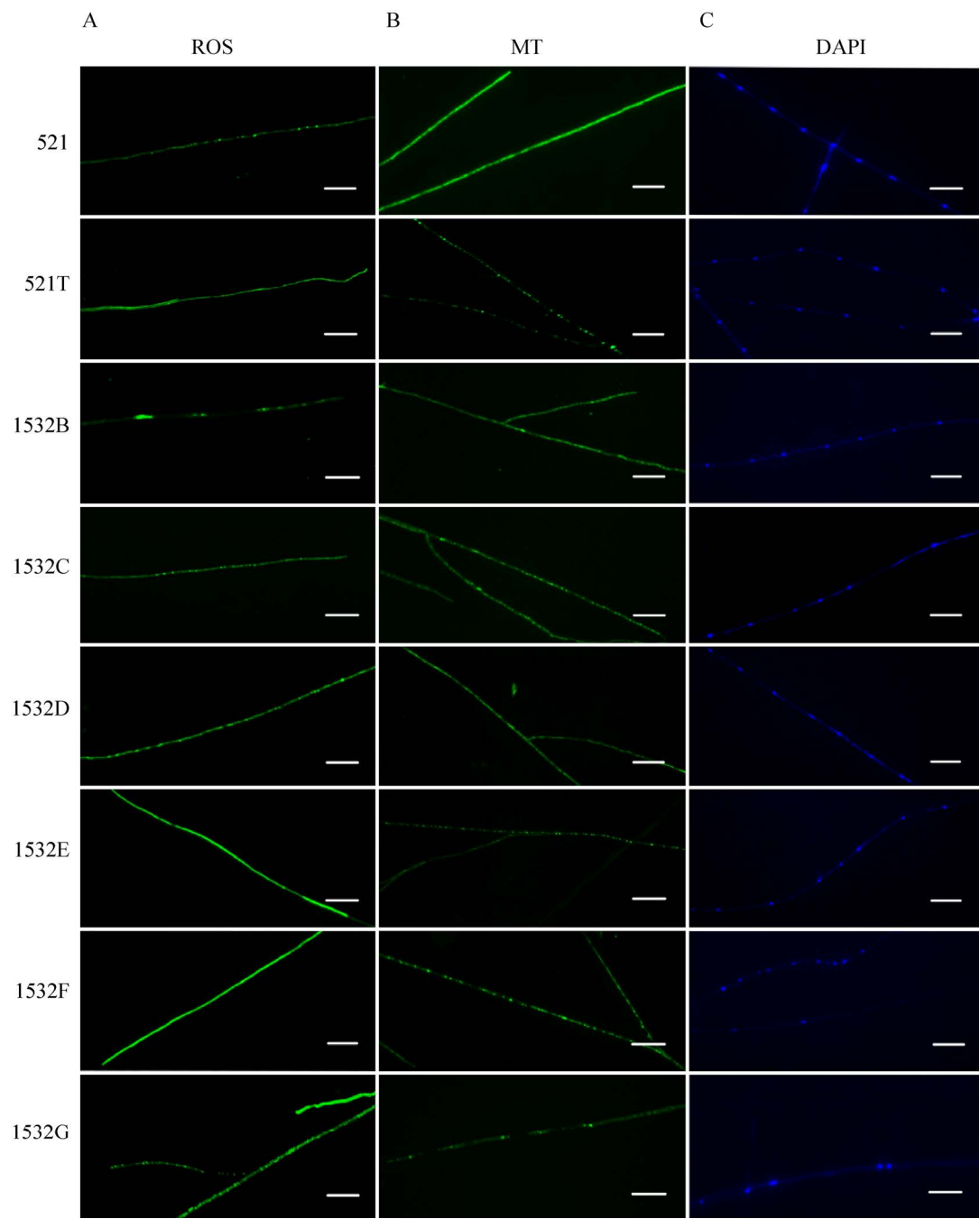


图 6 菌丝活性氧、线粒体和细胞核染色观察 A: 菌丝内活性氧; B: 菌丝线粒体; C: 菌丝细胞核. 标尺=30 μm

Fig 6 Fluorescence staining of reactive oxygen species (ROS), mitochondria and nuclei. A: ROS in mycelium; B: Mitochondria in mycelium; C: Nuclei in mycelium. Scale bars=30 μm .

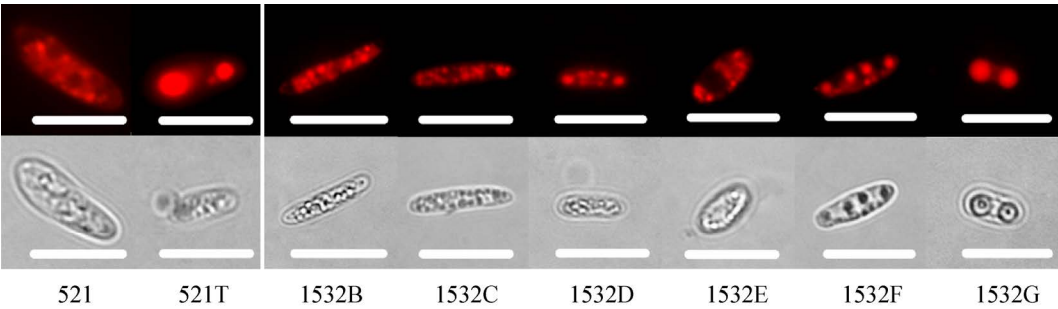


图 7 蛹虫草不同菌株脂滴染色观察 标尺=10 μm
Fig. 7 Lipid droplets of blastospore of different *Cordyceps militaris* strains. Scale bars=10 μm .

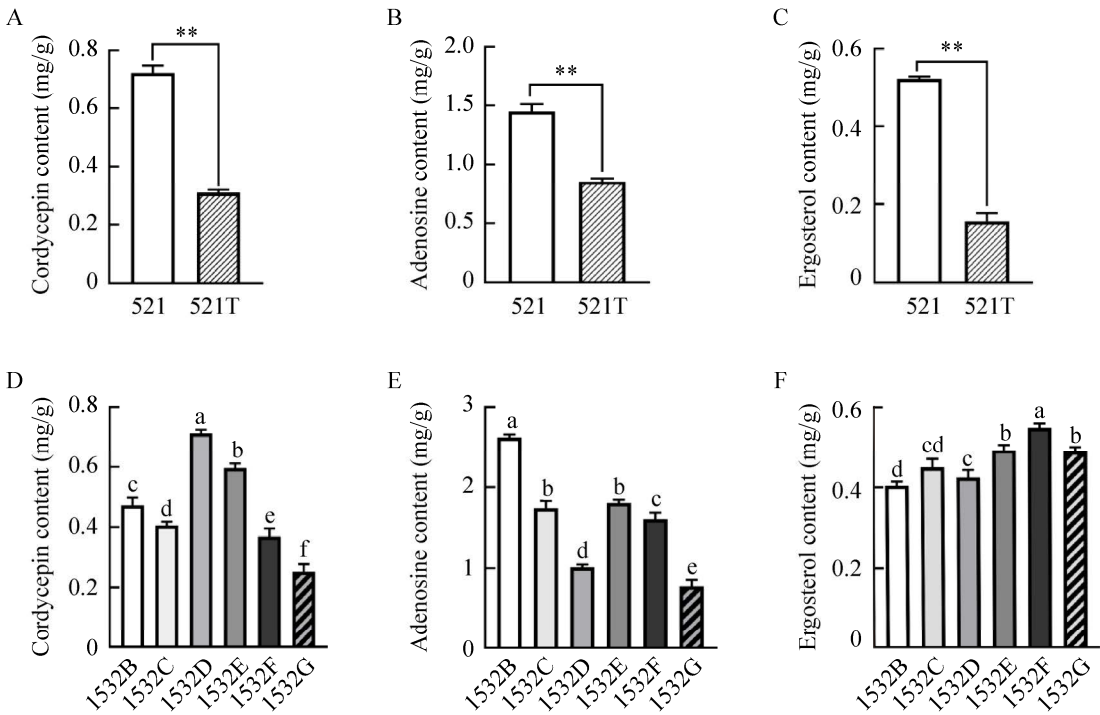


图 8 菌丝虫草素、腺苷和麦角甾醇含量 A、D: 虫草素; B、E: 腺苷; C、F: 麦角甾醇
Fig. 8 The content of cordycepin, adenosine and ergosterol in mycelia of different *Cordyceps militaris* strains. A, D: Cordycepin; B, E: Adenosine; C, F: Ergosterol.

3 讨论

菌株退化是食用菌栽培中普遍存在的现象, 蛹虫草在低温保藏和继代培养过程中易发生退化且这种退化是可遗传的, 导致产量严重下降致使产业遭受重大损失。已有关于蛹虫草菌株退化的研究大多集中在继代培养的退化菌株中, 但继代培养导致的退化表型不稳定, 不同的研究中继

代培养的部分表型结果不同。根据菌株退化后产生稳定变化的表型特征进行蛹虫草菌株早期退化的鉴别, 对避免菌株退化导致大规模损失具有重要作用。

本研究发现长期低温保藏和继代培养导致的退化菌株菌丝均观察到分枝增多、菌丝粘连和打结的现象(图 3、图 4), 周思池等(2019)和姜宛岑等(2022)也观察到退化菌株菌丝分枝增多的

现象,菌丝粘连和打结为本研究首次报道,在退化菌株菌丝中非常明显,并随着继代培养代数的增加,粘连数目增多,粘连面积增大(图 3、图 4),因此,在有光学显微镜的情况下,通过观察菌丝是否出现粘连和打结可以作为退化菌株的鉴别方法之一。在菌落转色方面,低温保藏菌株表现为菌落见光不转色或颜色较浅、色素积累减少,但继代菌株在继代培养过程中转色情况不稳定,虽然有报道继代培养的菌落颜色随着代数增大逐渐变淡(王熙等 2011),我们认为见光不转色的菌落一定产生了退化,但是见光颜色正常的菌落也可能产生了退化(图 1B, 1532G),因此生产中常用的通过见光转色判断菌株优劣的方法需要慎重。两种退化菌株菌丝生长速度均加快,与于群(2020)的研究相一致,但在李闽锋(2007)和王熙等(2011)的研究中退化的蛹虫草菌株较正常菌株生长速度慢,可能是不同蛹虫草退化菌株具有特异性,菌丝生长速度的变化不宜作为退化菌株的判断标准。退化菌株菌丝中虫草素、腺苷和麦角甾醇含量明显降低(殷娟 2018; 刘娟等 2020),在本研究的低温保藏退化菌株中有相同的结果,继代培养的退化菌株虫草素、腺苷含量呈现减少的趋势,但麦角甾醇含量并没有随着退化程度增加而降低(图 8F)。两种退化菌株的线粒体数量明显减少(图 6B),与姜宛岑等(2022)在继代培养第五代菌株中线粒体数量明显减少的结果相同;继代菌株从第五代可见细胞核分布不均,而长期保藏的退化菌株细胞核分布未见明显变化;芽生孢子的脂滴在正常菌株细胞质内均匀分布,而退化菌株中则呈聚集分布,因此线粒体和脂滴染色可以用于退化菌株的鉴别。

正常生理条件下活性氧的生成和清除处于动态平衡,活性氧的过量积累造成不受控的氧化还原应激则可能导致严重的细胞损伤(Zorov *et al.* 2000)。线粒体作为活性氧产生的主要来源,尤其容易受到活性氧损害,使线粒体 DNA

比核 DNA 更容易受到氧化损伤(Yakes & van Houten 1997; Kim *et al.* 2007)。低温保藏和继代培养退化菌株菌丝内的活性氧含量均高于正常菌株,这可能是退化菌株线粒体数量明显减少的原因。在禾谷镰刀菌、稻瘟病菌和尖孢镰刀菌等丝状真菌中脂滴积累对于宿主产生的活性氧具有抵抗作用(刘娜 2018)。脂滴的减少可能是与活性氧对抗的结果,而活性氧作为细胞信号分子可诱导自噬发生,自噬通过清除受损细胞器又能够减少活性氧的积累(Li *et al.* 2015)。研究发现在蛹虫草继代培养的菌株中第三代可见自噬现象,第五代自噬现象多发,细胞逐渐凋亡,退化菌株中多个自噬基因处于高表达状态(周思池 2020; 姜宛岑等 2022)。活性氧过量积累、自噬调节紊乱是否为导致蛹虫草退化的原因,或二者是蛹虫草退化后才产生的生理变化,这其中因果关系和联系有待进一步研究。而蛹虫草退化菌株中活性氧明显积累,可以用于退化菌株的早期检测。采用 NBT 对液体培养菌丝球染色,操作简单、用时较短,可以用于蛹虫草大规模生产中退化菌株筛选的简便方法。活性氧作为细胞代谢的正常产物在未退化菌株内也存在,随着培养时间延长活性氧含量增加(刘娟等 2020),在采用 NBT 染色法筛选退化菌株时应注意培养时间、菌丝球洗涤次数和染色时间,在蛹虫草培养过程中清除或减少活性氧的产生可能会对延缓菌株退化产生作用。

总之,显微观察菌丝是否出现粘连和打结、NBT 对液体培养菌丝球染色,操作简单、用时较短,可以用于蛹虫草大规模生产中退化菌株筛选的简便方法;有条件的情况下线粒体、脂滴染色也可以作为退化菌株的鉴别方法。另外,本研究发现继代菌株从第四代开始有明显的退化特征,从子实体形态到菌丝、细胞器都发生相应的变化,因此生产用菌株应控制在继代培养 3 代以内。

[REFERENCES]

- Guo MM, Guo S, Y HJ, Bu N, Dong CH, 2016. Comparison of major bioactive compounds of the caterpillar medicinal mushroom, (Ascomycetes), fruiting bodies cultured on wheat substrate and pupae. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 18(4): 327-336
- He XH, Zhao HH, Liu F, Wu XL, Sun Q, 2012. Research progress on the degradation mechanism and preventive measures of *Cordyceps militaris* strains. *Edible Fungi*, 34(6): 1-3 (in Chinese)
- Huo LJ, Feng ZR, Lin YL, 2021. Rapid extraction of ergosterol from fungi by ultrasonic cell disruption. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 44(6): 1090-1096 (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)
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ, 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2): 245-253
- Lara-Ortiz T, Riveros-Rosas H, Aguirre J, 2003. Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Microbiology*, 50(4): 1241-1255
- Li L, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q, 2015. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(5): 615-621
- Li MF, 2007. Molecular biology studies on the different phenotypes of fruiting-body forming 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)
- 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 J, Zhou Y, Wang Q, Zhang CY, Xue Q, Zhu CJ, 2020. Variation of active substance of stroma in subculture of *Cordyceps militaris* on *Antheraea pernyi*. *Mycosystema*, 39(12): 2328-2337 (in Chinese)
- Liu N, 2018. Regulatory mechanism of lipid droplet synthesis in *Fusarium sraminearum*. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. 1-109 (in Chinese)
- Liu Q, Wang F, Liu KB, Dong CH, 2018. Influence of strain preservation methods on fruiting body growth and metabolite production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(10): 1003-1011
- Piao YS, Lin ZH, 2015. Molecular pathobiology experiment technical guide. People's Military Medical Press, Beijing. 1-282 (in Chinese)
- 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
- 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)
- Yakes FM, van Houten B, 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(2): 514-519
- Yin J, 2018. Study on the degradative mechanism of *Cordyceps militaris* in subculture. Master Thesis, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang. 1-76 (in Chinese)
- 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)
- Yu Q, 2020. Study on the biological characteristics of the degenerated strain of *Cordyceps militaris*. Master Thesis, Shenyang Agricultural University, Shenyang. 1-57 (in Chinese)
- Zhou SC, 2020. Study on degradation mechanism and construction of efficient gene-editing technology in *Cordyceps militaris*. Master Thesis, Changchun University of Technology, Changchun. 1-56 (in Chinese)
- 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)
- Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ, 2000. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 192(7): 1001-1014

[附中文参考文献]

- 何晓红, 赵欢欢, 刘飞, 伍晓丽, 孙全, 2012. 蛹虫草菌株退化机理及预防措施研究进展. 食用菌, 34(6): 1-3
- 霍理坚, 冯祖睿, 林雅铃, 2021. 超声细胞粉碎法快速提取真菌中的麦角甾醇. 南京农业大学学报, 44(6): 1090-1096
- 姜宛岑, 王晨露, 朱正州, 赵英明, 王蒴, 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
- 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
- 刘娟, 周影, 王芹, 张春杨, 薛强, 祝长杰, 2020. 柞蚕蛹虫草继代培育其活性物质变化规律. 菌物学报, 39(12): 2328-2337
- 刘娜, 2018. 禾谷镰刀菌中脂滴合成调控机制的研究. 浙江大学博士论文, 杭州. 1-109
- 朴英实, 林贞花, 2015. 分子病理生物学实验技术指南. 北京: 人民军医出版社. 1-282
- 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
- 殷娟, 2018. 继代培养蛹虫草菌株退化机制的探讨. 江苏科技大学硕士论文, 镇江. 1-76
- 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
- 于群, 2020. 蛹虫草退化菌株生物学特性的研究. 沈阳农业大学硕士论文, 沈阳. 1-57
- 周思池, 2020. 蛹虫草菌株退化机制初探与高效基因编辑技术的构建. 长春工业大学硕士论文, 长春. 1-56
- 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