



王丽

山东农业大学植物保护学院菌物系副教授，硕士生导师，目前主要研究方向为虫草资源的研究与开发和大型真菌中生物活性物质提取开发。主持国家自然科学基金、山东省自然科学基金等项目，在《Journal of Agricultural and Food Chemistry》《International Journal of Biological Macromolecules》等杂志发表多篇论文。曾获山东省第五届青年教师讲课比赛三等奖，第十三届泰安市青年科技人才标兵和山东农业大学青年岗位能手等荣誉称号。

从天然蛹虫草不同部位分离菌株特性比较

郭玉峰 周婷 肖子扬 王丽^{*}

山东农业大学植物保护学院 山东省农业微生物重点实验室 山东 泰安 271018

摘要：以采集自泰山地区的 6 株野生蛹虫草为研究对象，分别通过菌核、子座组织分离和子囊孢子分离法共获得 18 个菌株，经 ITS 鉴定均为蛹虫草菌株后，进一步对 18 个菌株进行了菌丝生长速度、菌落形态、出草试验、主要活性物质（虫草素、腺苷、虫草多糖、 β -类胡萝卜素、叶黄素）和交配型的测定分析。结果表明：在菌丝长势、出草产量和整齐度方面，从子囊孢子分离得到的菌株普遍优于组织分离菌株；而在活性物质含量方面，从子囊孢子和子座分离得到的菌株普遍优于菌核分离菌株。通过交配型测定发现，从菌核、子座和子囊孢子分离得到的 18 个菌株均不存在交配型缺失现象。

关键词：蛹虫草，组织分离，子囊孢子分离，培养性状，活性物质，交配型基因

[引用本文] 郭玉峰, 周婷, 肖子扬, 王丽, 2021. 从天然蛹虫草不同部位分离菌株特性比较. 菌物学报, 40(11): 2981-2994
Guo YF, Zhou T, Xiao ZY, Wang L, 2021. Variation of biological characteristics of *Cordyceps militaris* strains isolated from different parts of the natural samples. Mycosystema, 40(11): 2981-2994

基金项目：国家自然科学基金青年科学基金项目（31701976）；山东省现代农业产业技术体系食用菌创新团队建设（SDAIT-07-06）

Supported by the National Natural Science Foundation of China Youth Science Foundation Project (31701976) and Mushroom Technology System of Shandong Province (SDAIT-07-06).

^{*}Corresponding author. E-mail: haoyou0102@163.com

ORCID: GUO Yu-Feng (0000-0002-6241-6445), WANG Li (0000-0003-2693-770X)

Received: 2021-09-13, accepted: 2021-11-17

Variation of biological characteristics of *Cordyceps militaris* strains isolated from different parts of the natural samples

GUO Yu-Feng ZHOU Ting XIAO Zi-Yang WANG Li[✉]

Shandong Provincial Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

Abstract: Sclerotia, stromata and ascospores of six wild samples of *Cordyceps militaris* collected from Mount Tai were applied to isolate the fungus strains. The variations of mycelial growth rate, colony morphology, cultivation characteristics, active components (cordycepin, adenosine, polysaccharide, β -carotenoid, lutein) and mating-type genes of 18 strains obtained were measured. The results showed that mycelial growth, fruiting body yield and fruiting uniformity of the strains isolated from ascospores were superior; the content of active components of the strains isolated from ascospores and stromata were much higher than that from sclerotia. All tested strains contained both *MAT-1* and *MAT-2* mating type genes.

Key words: *Cordyceps militaris*, tissue separation, ascospore separation, cultivation characteristics, active components, mating type genes

蛹虫草 *Cordyceps militaris* (L.) Link 又名北虫草, 隶属于子囊菌门 Ascomycota、粪壳菌纲 Sordariomycetes、肉座菌目 Hypocreales、虫草菌科 Cordycipitaceae、虫草属 *Cordyceps* (梁宗琦 2007)。蛹虫草不仅营养丰富, 还富含多种活性物质, 如虫草素、 N^6 -(2-羟乙基)腺苷、虫草酸、虫草多糖、类胡萝卜素等, 具有抗肿瘤、抗衰老、抗病毒、调节免疫力等功效 (贾国军等 2017; Yan *et al.* 2020)。随着人民保健意识的增强, 对保健食品的需求日益增长, 促进了蛹虫草产业的迅速发展, 目前规模化人工栽培及其深加工产业已初步形成。据中国食用菌协会统计, 2018 年我国蛹虫草年产量已达到 9 万多吨, 产值达 100 多亿人民币 (刘晴等 2021)。蛹虫草在栽培过程中普遍存在菌种退化、产量降低或不能正常出草等问题, 成为其产业化发展的主要瓶颈, 选育高产优质菌株并确立优良菌种的

分离提纯方法, 成为蛹虫草产业发展亟待解决的关键技术问题。

野生蛹虫草分布广泛且遗传多样性丰富, 是新品种选育中一类重要的种质资源。目前蛹虫草纯菌种的获得仍借鉴担子菌的经验技术, 以组织分离为主。近些年研究发现, 不同部位分离的虫草菌株在菌丝长势和出草性状方面均存在显著差异 (袁源等 2021; 肇莹等 2021; 周绍琴等 2021), 如杨玉红等 (2012) 发现从靠近子座顶端分离的菌种易于萌发, 而子囊孢子分离得到的菌株出草性状更好; 郭俊霞等 (2015) 通过对不同部位分离菌株的成活率、污染率、菌丝长势方面比较得出, 靠近子座顶端分离的菌株要优于分离自子座下部的菌株; 吕延华等 (2016) 从西藏新鲜冬虫夏草不同部位分离菌株, 并进行固体培养, 通过比较分离自冬虫夏草不同部位的菌株的菌丝生长、分生孢子产生情

况及不同传代次数菌株的固体培养特性得出,子囊孢子分离获得的菌株在菌丝长势、出草能力和分生孢子产生量等方面显著高于组织分离菌株,而同为组织分离的菌株中,以子座来源的菌株产孢能力显著高于菌核来源的菌株。目前关于该方面的研究较少,且主要停留在菌丝长势和产量方面,关于不同部位分离菌株间营养成分差异等方面的研究较少。因此,立足各地野生蛹虫草资源,对从不同样本、不同部位分离获取菌株的综合性状开展评价分析,对蛹虫草优良菌株的选育和优良菌种的分离提纯具有指导意义。

基于此,本研究对分离自泰山地区 6 株野生蛹虫草标本不同部位(子座、菌核和子囊孢子) 18 个菌株的菌丝长势、出草特性及活性物质含量等方面开展综合评价,并对其交配型基因进行鉴定,探究不同野生型菌株、同一菌株不同分离部位的菌株间综合性状差异,以期为今后野生蛹虫草资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 本实验以采集分离自泰山地

区(117°7'9"E, 36°20'6"N, 海拔 750–850m)的 6 株野生蛹虫草子实体作为实验材料,分别通过子座、菌核组织分离和子囊孢子分离得到 18 个菌株,编号见表 1,经鉴定均为蛹虫草菌株,现保藏于山东农业大学菌物实训实践基地实验室。

1.1.2 培养基: PPDA 培养基: 马铃薯 200g,葡萄糖 20g,蛋白胨 10g,琼脂 18g,磷酸二氢钾 1.5g,硫酸镁 0.5g,VB₁ 0.1g,去离子水 1 000mL, pH 自然。液体培养基: 马铃薯 200g,葡萄糖 20g,蛋白胨 10g,磷酸二氢钾 1.5g,硫酸镁 0.5g,VB₁ 0.1g,去离子水 1 000mL, pH 自然。出草培养基: 大米 38g,蚕蛹粉 2g,营养液 60mL(配方同液体菌种培养基)。水琼脂培养基: 去离子水 1 000mL,琼脂粉 16g。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离: (1) 菌核分离: 用灭菌手术刀剥开蛹体,用镊子挑取内菌核组织块接种至 PPDA 培养基,待菌丝萌发后及时转移至新的 PPDA 培养基上进行纯化。(2) 子座分离: 用灭菌手术刀切取蛹虫草子座顶端 1cm 大小子实体段,放入 30%过氧化氢中漂洗 20–30s,转移至无菌水中漂洗 30s,灭菌滤纸吸干子实体表面水分后用手术刀将子实体剥

表 1 菌株编号

Table 1 Accession number of strains

分离部位	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Separating part	Natural sample F1	Natural sample F2	Natural sample F4	Natural sample F4	Natural sample F6	Natural sample F6
菌核	F1-1	F2-1	F3-1	F4-1	F5-1	F6-1
Sclerotium	Isolated from F1 sclerotium	Isolated from F2 sclerotium	Isolated from F3 sclerotium	Isolated from F4 sclerotium	Isolated from F5 sclerotium	Isolated from F6 sclerotium
子座	F1-2	F2-2	F3-2	F4-2	F5-2	F6-2
Stroma	Isolated from F1 stroma	Isolated from F2 stroma	Isolated from F3 stroma	Isolated from F4 stroma	Isolated from F5 stroma	Isolated from F6 stroma
子囊孢子	F1-3	F2-3	F3-3	F4-3	F5-3	F6-3
Ascospore	Isolated from F1 ascospore	Isolated from F2 ascospore	Isolated from F3 ascospore	Isolated from F4 ascospore	Isolated from F5 ascospore	Isolated from F6 ascospore

开, 从中挑取一小块子实体接种至 PPDA 培养基, 待菌丝萌发后及时转移至新的 PPDA 培养基上进行纯化。(3) 孢子分离: 取子实体可孕部 1–1.5cm, 放入 30%过氧化氢中漂洗 20–30s, 转移至无菌水中漂洗 30s, 用灭菌滤纸吸干子实体表面水分后用细线将其绑住, 悬挂于制备好的水琼脂培养基的正上方, 22–23℃下过夜后, 取出虫草子实体继续培养, 待孢子萌发后立即转移至 PPDA 培养基上进行培养。

1.2.2 菌丝长势测定: 将 18 个蛹虫草菌株分别接种于 PPDA 培养基中, 22℃恒温避光培养, 待菌丝即将长满平板时, 用 7mm 打孔器取相同半径菌块接种于 PPDA 培养基中央, 从第 4 天开始采用十字划线法每隔两天测定菌丝长速, 共测定 16d, 培养结束时观察菌落形态、颜色并记录。每个处理 3 个重复。

1.2.3 栽培出草试验: 将活化好的菌株接种液体培养基制作液体菌种, 之后接种到出草培养基上进行出草试验。用 7mm 打孔器取 5 块活化好的菌块于液体培养基中, 23℃140r/min 避光培养 3–4d; 取 10mL 液体菌种接种于大米培养基中, 23℃避光培养 4–5d; 发菌结束后将培养基在 14℃下避光培养 6h 进行低温刺激; 最后将其转至 23℃下光照培养, 待子实体成熟后即可采收。

1.2.4 活性物质的提取及测定: (1) 虫草素的提取及测定: 参考张鑫喆等 (2018) 的方法并稍作调整, 采用超声波热水提取法 (刘春泉等 2007; Zhang *et al.* 2012)。将虫草子实体粉碎后过 80 目筛, 精确称取 2g 样品粉末, 用 50%的乙醇作为溶剂, 以 1:50 的料液比 80℃超声波处理 20min (功率 48W), 80℃水浴浸提 10min, 重复 4 次。离心后取上清液, 0.22μm 微孔滤膜过滤后取 20μL 样品进行高效液相色谱检测。色谱条件为: 色谱柱

Venusil MP C18 柱 (5μm, 4.6mm×250mm), 流动相为水 (A 相) - 甲醇 (B 相); 流速 1mL/min; 检测波长 254nm; 柱温 40℃; 进样量 20μL。洗脱程序为 0–5min: A-100%, B-0%; 5–10min: A-95%, B-5%; 10–30min: A-70%, B-30%; 30–45min: A-100%, B-0%。

(2) 腺苷的提取及测定: 参考张鑫喆等 (2018) 的方法并稍作调整, 采用超声波热水提取法 (刘春泉等 2007; Zhang *et al.* 2012)。称取蛹虫草子实体粉末 0.5g, 加入去离子水 80mL, 85℃提取 2h。待冷却至室温, 过滤、定容、离心, 0.22μm 微孔滤膜过滤上清液后, 取 20μL 样品进行高效液相色谱检测。色谱条件为: 色谱柱 Venusil MP C18 柱 (5μm, 4.6mm×250mm), 流动相为甲醇 (A 相) - 水 (B 相); 流速 1mL/min; 检测波长 260nm; 柱温 25℃; 进样量 20μL。洗脱程序为 0–10min: A-25%, B-75%。

(3) 粗多糖的提取及测定: 参考李小一等 (2019)、温文娟等 (2020) 的方法并稍作调整。采用热水-醇沉法, 将虫草样品充分研磨后, 过 80 目筛后精确称取 5g 样品于 100mL 离心管中, 加入 10 倍体积去离子水后沸水浴加热 1h。于 12 000r/min 离心 5min, 取 20mL 上清液于离心管中, 加入 3 倍体积无水乙醇, 4℃过夜, 离心弃上清, 于 50℃下烘干至恒重。采用蒽酮-硫酸法进行测定, 将样品溶液浓度调整至测定范围内, 精确吸取 2mL 置于干燥洁净的试管中, 立即加入 6mL 蒽酮试剂, 振荡混匀。所有处理样品于沸水浴中加热 15min, 取出后迅速浸于冰水浴中冷却 15min, 每个浓度 3 个重复。

(4) β-类胡萝卜素的提取及测定: 参考刘新艳等 (2017)、洪健等 (2019) 的方法并稍作调整, 采用超声波热水-醇提法, 将虫草样品充分研磨后, 过 80 目筛后精确称取 3g 样品于 100mL 离心管中, 加入 20 倍体积 60%

无水乙醇进行热水浸提。离心后取上清液，0.22 μ m 滤膜过滤后取 20 μ L 样品进行高效液相色谱检测。色谱条件：色谱柱为 Venusil MP C18 柱（5 μ m，4.6mm $\times$ 250mm），流动相为乙腈（A 相）-丙酮（B 相）；流速 1.5mL/min；检测波长 450nm；柱温 30 $^{\circ}$ C；进样量 10 μ L。洗脱程序 0–10min：A-95%，B-5%；10–40min：A-40%，B-60%；40–60min：A-99%，B-1%。

（5）叶黄素的提取及测定：参考李秀鑫等（2020）的方法并稍作调整。采用超声波热水-醇提法，称取 1g 蛹虫草子实体粉末，加入 50 倍体积的无水乙醇，80 $^{\circ}$ C 下超声波（240W）浸提 2h。离心后取上清液用紫外分光光度计进行测定。将样品溶液浓度调整至指定范围内，于 447nm 测定吸光度值。

1.3 交配型基因的检测

参考鲍大鹏等（2017）报道的交配型基因 MAT-alpha 和 MAT-HMG 合成引物（表 2）。PCR 反应体系：2 $\times$ Taq Master Mix 12.5 μ L，交配型引物各 1 μ L，ddH₂O 10.5 μ L，模板 1 μ L。PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 3min，95 $^{\circ}$ C 变性 15s，60 $^{\circ}$ C 退火 15s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1min，35 个循环，72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 2 交配型引物序列

Table 2 Primers for amplifying mating genes

引物名称	序列
Primer	Primer sequence (5'-3')
MAT1-F	CGCGCAAAACGACCATTGAA
MAT1-R	ATATACCTTCGCGATCATTG
MAT2-F	ATGGATCTGCAACTGGATCGGACCA
MAT2-R	CTACATGATTGACTCCGGGCTCATTG

1.4 数据分析

参考朱丽娜等（2018）的最大-最小归一化算法 $a=(X-X_{\min})/(X_{\max}-X_{\min})$ ，对分离自 6 株野生蛹虫草不同部位的菌株的菌丝长速、

子实体产量和活性成分含量进行分析，综合各成分所得分值，绘制雷达图，进行品质综合评价。

本实验中数据均采用 SPSS 软件进行统计分析，采用单因素方差分析， $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 不同菌株在 PPDA 培养基上的菌丝长速测定和菌落形态观察

对分离得到的 18 个蛹虫草菌株进行菌丝长速测定和菌落形态观察（表 3）。菌丝长速方面，除菌株 F2-1、F4-1 和 F5-2 长速较慢外，其余 15 个菌株间无显著差异；菌落形态方面，菌株 F2-1、F3-3、F4-1 和 F5-1 为绒毛状，其余菌株菌落致密；色素产生方面，菌株 F1-1、F2-2、F3-1、F3-3、F4-3、F5-1、F5-2 和 F5-3 均产生黄色色素，其余菌株不产色素。

2.2 栽培出草试验

对分离到的 18 个菌株进行出草试验（图 1、图 2 和表 4）。菌核分离得到的菌株整体出草效果较差，菌株 F1-1、F2-1、F5-1 仅形成少量细小的、有子囊壳的子实体，而菌株 F3-1、F4-1 和 F6-1 仅扭结形成短小的子实体，无子囊壳；子座分离菌株的整体出草效果要优于菌核分离的菌株，其中菌株 F2-2、F4-2 和 F5-2 均能正常出草且形成大量子实体，F1-2 和 F6-2 形成少量细小的、有子囊壳的子实体，F3-2 仅扭结形成短小的子实体，无子囊壳；孢子分离得到的菌株整体出草效果最好，6 个菌株均能形成有子囊壳的子实体，子实体颜色更深，出草整齐，子实体数量显著优于子座和菌核部位分离的菌株；F2-3、F3-3、F6-3 产量显著高于菌核和子座分离的菌株，F4-2 和 F4-3、F5-2 和 F5-3 产量显著高于菌核分离的菌株，F1-1 和 F1-3 产量显

表 3 十八个蛹虫草菌株的菌丝长速和菌落特征

Table 3 The mycelial growth and colony characteristics of 18 *Cordyceps militaris* strains isolated

菌株	日均长速	菌落特征	菌株	日均长速	菌落特征
Strains	Mycelial growth rate (mm/d)	Characteristic of colony	Strains	Mycelial growth rate (mm/d)	Characteristic of colony
F1-1	2.028±0.048 bc	致密、淡黄色 Dense, light yellow	F4-1	1.222±0.048 c	绒毛状、白色 Fluffy, white
F1-2	2.417±0.289 ab	致密、白色 Dense, white	F4-2	2.222±0.048 abc	致密、白色 Dense, white
F1-3	2.472±0.481 ab	致密、白色 Dense, white	F4-3	2.306±0.127 ab	致密、淡黄色 Dense, light yellow
F2-1	1.958±0.191 bc	绒毛状、白色 Fluffy, white	F5-1	2.417±0.220 ab	绒毛状、淡黄色 Fluffy, light yellow
F2-2	3.222±0.419 ab	致密、淡黄色 Dense, light yellow	F5-2	1.694±0.127 bc	致密、淡黄色 Dense, light yellow
F2-3	3.722±0.127 a	致密、淡黄色 Dense, light yellow	F5-3	2.222±0.529 abc	致密、淡黄色 Dense, light yellow
F3-1	2.000±0.167 bc	致密、淡黄色 Dense, light yellow	F6-1	2.028±0.048 bc	致密、白色 Dense, white
F3-2	2.222±0.127 abc	致密、白色 Dense, white	F6-2	2.194±0.210 bc	致密、白色 Dense, white
F3-3	2.444±0.192 ab	绒毛状、淡黄色 Fluffy, light yellow	F6-3	2.500±0.464 ab	致密、白色 Dense, white

注：同一列不同字母表示显著性差异（ $P<0.05$ ）。下同
Note: The different letters on the same list mean significant difference ($P<0.05$). The same below.

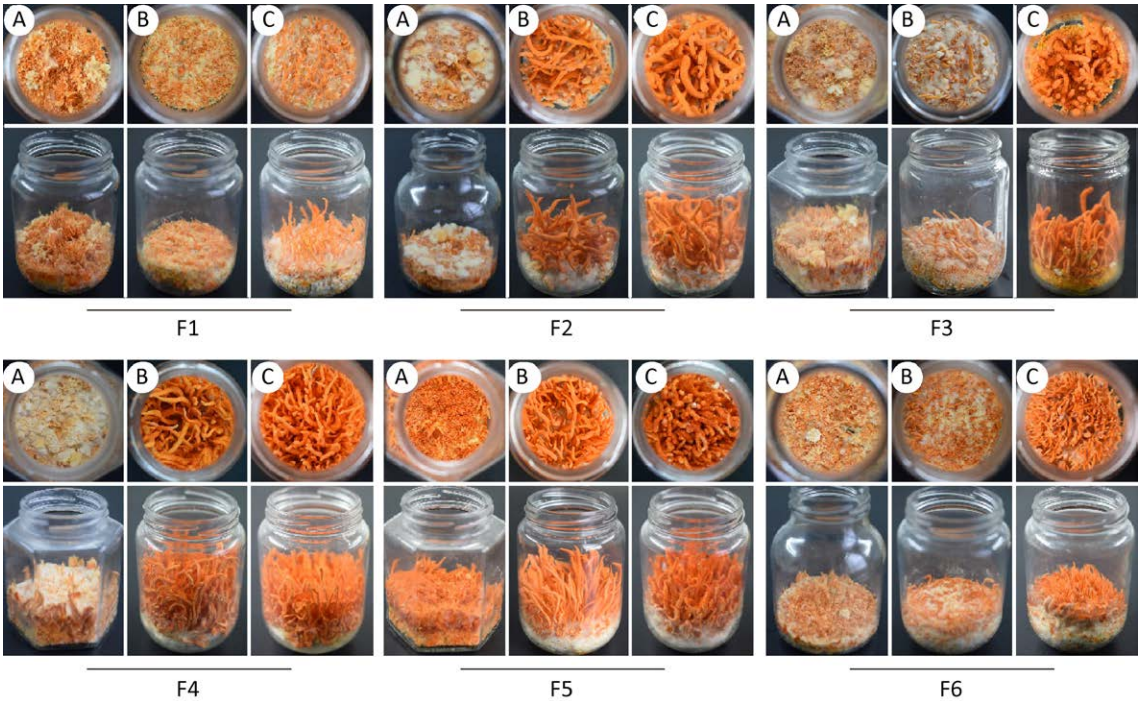


图 1 十八个蛹虫草菌株的出草图片 A：菌核分离；B：子座分离；C：孢子分离
Fig. 1 The morphology of fruiting bodies of 18 *Cordyceps militaris* strains isolated. A: Strains isolated from sclerotium; B: Strains isolated from stroma; C: Strains isolated from spore.

著高于 F1-2，子囊孢子分离得到的菌株产量相比于菌核和子座普遍较高。
不同菌株间进行比较发现，F2、F4 和 F5 的子座和孢子分离获得的菌株的出草效果较
好，产量和整齐度较高，其中菌株 F2-2 和 F2-3 的子实体粗长、圆头，且颜色较深，均为橘黄色，商品性状较优良，可进一步对其进行驯化栽培。

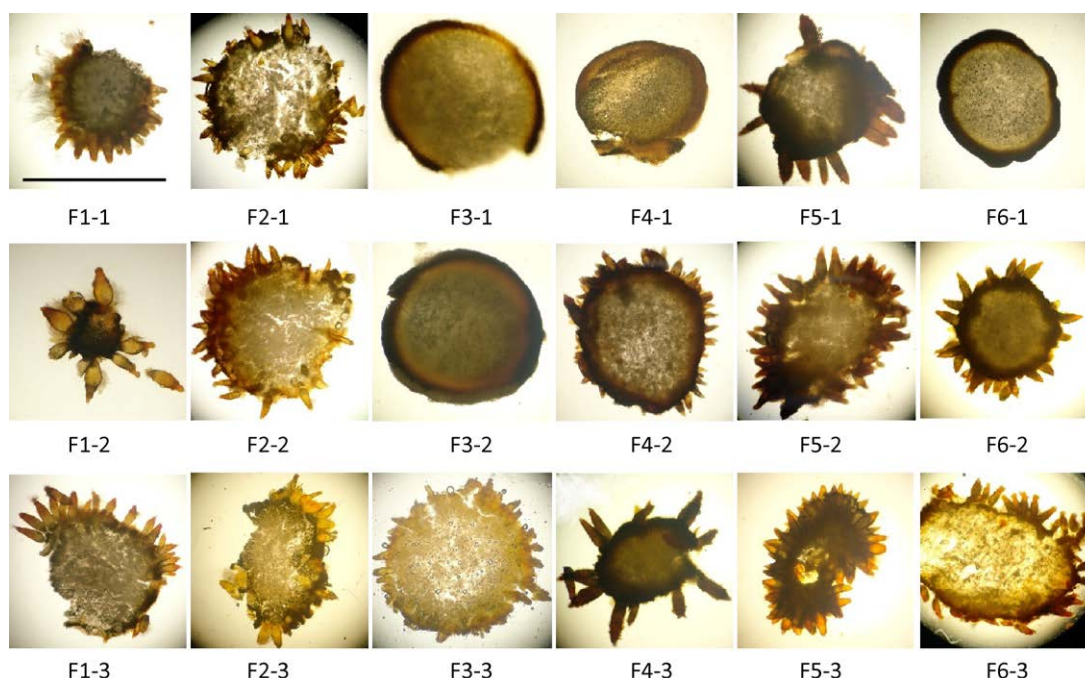


图 2 十八个菌株子实体横切面 标尺=5mm
Fig. 2 Cross section of fruiting bodies of 18 strains. Bar=5mm.

进一步将 18 个菌株的出草图片与 6 个野生蛹虫草的子实体图片进行比较发现，孢子分离的菌株的子实体形状、大小、颜色更接近野生子实体（图 3），其中菌株 F2、F3 和 F5 孢子分离菌株的子实体相比野生子实体更为粗壮、子囊壳更浓密。该结果可为优良菌种的提纯复壮提供一定的理论指导。

2.3 活性物质测定

为进一步探究蛹虫草不同部位分离菌株的活性物质含量，对出草菌株子实体样品进行多种活性物质的测定（表 5），除 F1 分离的 3 个菌株外，其他 5 个蛹虫草样本不同部位分离菌株的子实体中各活性成分含量都表现出相同的规律，即孢子和子座分离的菌株均显著高于菌核分离的菌株。进一步比较分析发现，18 个菌株的多糖含量在 14.500–131.983mg/g 之间，虫草素含量在 0.725–6.599mg/g 之间，两种活性成分含量表现出相同的趋势，含量均以 F5-2 最高，F4-1 最低，且分离自 F4、F5 和 F6 子座的子实体中两种物质含量均显著高

于其子囊孢子和菌核部位分离的菌株，而 F2 和 F3 中则以孢子分离的子实体中含量较高；N⁶-(2-羟乙基)腺苷含量在 0.177–0.571mg/g 之间，其中以分离自 F4 各菌株中普遍较高，分离自 F3 各菌株中含量较低；β-类胡萝卜素含量在 34.436–124.256μg/g 之间，其中以分离自 F2 各菌株中普遍较高；叶黄素含量在 0.094–0.397mg/g 之间，其中以分离自 F2 的各菌株中普遍较高。

2.4 交配型测定

Lu *et al.* (2016) 研究发现交配型的缺失会导致蛹虫草无法形成子实体，本实验中针对 18 个菌株的出草差异情况，进一步对各菌株的交配型基因进行了鉴定。经鉴定得出，18 个菌株均含有交配型基因 *MAT-1* 和 *MAT-2*（图 4）。

2.5 不同部位分离的蛹虫草菌株品质的综合评价

在以上各测定指标的基础上，为了更全面评价不同部位分离的菌株的综合品质，分

别对分离自相同样本不同部位的蛹虫草菌株的菌丝长速、子实体产量和活性成分含量等进行归一化算法，并绘制雷达图。除 F1 外，其余 5 个样本分离的菌株中孢子和子座分离

的菌株各组分均匀度均高于其菌核分离的菌株，进一步比较得出 F1、F2 和 F3 样本分离的各菌株中，孢子分离的菌株各组分均匀度均高于其子座分离的菌株（图 5）。

表 4 出草菌株的生长指标统计

Table 4 The growth index statistics of different strains isolated

菌株 Strains	子实体颜色 Fruiting body color	子囊壳密度 Perithecium density	产量 Yield (mg)	子实体形态 Fruiting body morphology
F1-1	淡黄色 Light yellow	++	4.67±0.57 a	细短圆头 Thin, short, orbicular head
F1-2	橙黄色 Orange	+	0.70±0.70 b	细短圆头 Thin, short, orbicular head
F1-3	橙黄色 Orange	++	5.70±0.50 a	粗长圆头 Thick, long, orbicular head
F2-1	橙黄色 Orange	+++	1.63±0.45 b	细长圆头 Thin, long, orbicular head
F2-2	橘黄色 Rich orange	+++	6.70±0.87 b	粗长圆头 Thick, long, orbicular head
F2-3	橘黄色 Rich orange	++	15.53±1.84 a	粗长圆头 Thick, long, orbicular head
F3-1	淡黄色 Light yellow	-	1.03±0.25 b	细长尖头 Thin, long, sharp head
F3-2	淡黄色 Light yellow	-	1.17±0.32 b	粗短尖头 Thick, short, sharp head
F3-3	橘黄色 Rich orange	+	13.70±1.20 a	粗长圆头 Thick, long, orbicular head
F4-1	淡黄色 Light yellow	-	0.37±0.38 b	粗短尖头 Thick, short, sharp head
F4-2	橘黄色 Rich orange	++	13.3±1.31 a	细长尖头 Thin, long, sharp head
F4-3	橘黄色 Rich orange	+	13.43±0.70 a	细长尖头 Thin, long, sharp head
F5-1	橙黄色 Orange	+	10.50±0.70 b	细长尖头 Thin, long, sharp head
F5-2	橘黄色 Rich orange	+++	15.47±1.46 a	细长尖头 Thin, long, sharp head
F5-3	橘黄色 Rich orange	++	13.43±1.01 a	粗长圆头 Thick, long, orbicular head
F6-1	淡黄色 Light yellow	-	1.60±0.70 b	粗短尖头 Thick, short, sharp head
F6-2	橘黄色 Rich orange	+	2.87±0.31 b	细长圆头 Thin, long, orbicular head
F6-3	橘黄色 Rich orange	++	7.23±0.75 a	粗长圆头 Thick, long, orbicular head

注： -：无；+：稀疏；++：浓密；+++：很浓密
Note: -: None; +: Sparsity; ++: Dense; +++: Very dense.



图 3 六个野生蛹虫草子实体与 18 个菌株中出草菌株的单个子实体图 A: 菌核分离; B: 子座分离; C: 孢子分离; 标尺=1.5cm

Fig. 3 The morphology of fruiting bodies of 6 wild and 18 isolated strains of *Cordyceps militaris*. A: Strains isolated from sclerotium; B: Strains isolated from stroma; C: Strains isolated from spore. Bar=1.5cm.

表 5 出草菌株活性物质测定结果

Table 5 Determination of active substances of the isolated strains

菌株 Strains	多糖 Polysaccharides (mg/g)	虫草素 Cordycepin (mg/g)	腺苷 Adenosine (mg/g)	β-类胡萝卜素 β-carotene (μg/g)	叶黄素 Xanthophyll (mg/g)
F1-1	71.117±1.079 a	3.556±0.054 a	0.263±0.008 b	50.137±2.156 b	0.108±0.004 b
F1-2	34.600±1.744 c	1.730±0.087 c	0.282±0.006 b	41.477±0.628 c	0.136±0.001 a
F1-3	42.367±1.150 b	2.118±0.058 b	0.359±0.019 a	61.210±0.968 a	0.131±0.012 a
F2-1	43.967±2.059 c	2.198±0.103 c	0.332±0.016 c	88.889±1.413 c	0.168±0.007 b
F2-2	47.907±0.372 b	2.395±0.019 b	0.423±0.009 a	124.256±1.800 a	0.173±0.018 b
F2-3	97.203±0.486 a	4.860±0.024 a	0.379±0.004 b	93.302±2.594 b	0.334±0.023 a
F3-1	24.300±0.625 c	1.215±0.031 b	0.132±0.016 b	55.177±1.455 c	0.200±0.028 b
F3-2	31.767±0.666 b	1.588±0.033 b	0.177±0.006 a	65.105±1.679 b	0.218±0.010 b
F3-3	51.833±2.040 a	2.441±0.358 a	0.197±0.003 a	72.056±0.464 a	0.397±0.016 a
F4-1	14.500±0.656 c	0.725±0.033 c	0.264±0.021 b	44.229±1.875 b	0.094±0.004 c
F4-2	94.133±0.569 a	4.708±0.028 a	0.571±0.040 a	55.116±1.380 a	0.137±0.001 a
F4-3	41.817±1.475 b	2.091±0.074 b	0.563±0.007 a	55.255±0.591 a	0.117±0.003 b
F5-1	45.300±1.603 c	2.265±0.080 c	0.123±0.003 c	43.400±0.484 c	0.132±0.001 b
F5-2	131.983±2.935 a	6.599±0.147 a	0.247±0.009 b	52.762±1.280 b	0.180±0.004 a
F5-3	74.900±0.608 b	3.745±0.030 b	0.298±0.008 a	55.055±1.243 a	0.126±0.009 b
F6-1	43.200±1.706 c	2.160±0.085 c	0.206±0.007 b	34.436±0.490 c	0.136±0.003 b
F6-2	114.250±1.693 a	5.780±0.212 a	0.444±0.017 a	69.187±0.607 a	0.152±0.004 b
F6-3	96.833±1.604 b	4.642±0.415 b	0.221±0.002 b	64.821±2.363 b	0.330±0.026 a

注：不同部位分离菌株间进行差异显著性分析

Note: The significant differences between isolates from different parts were analyzed.

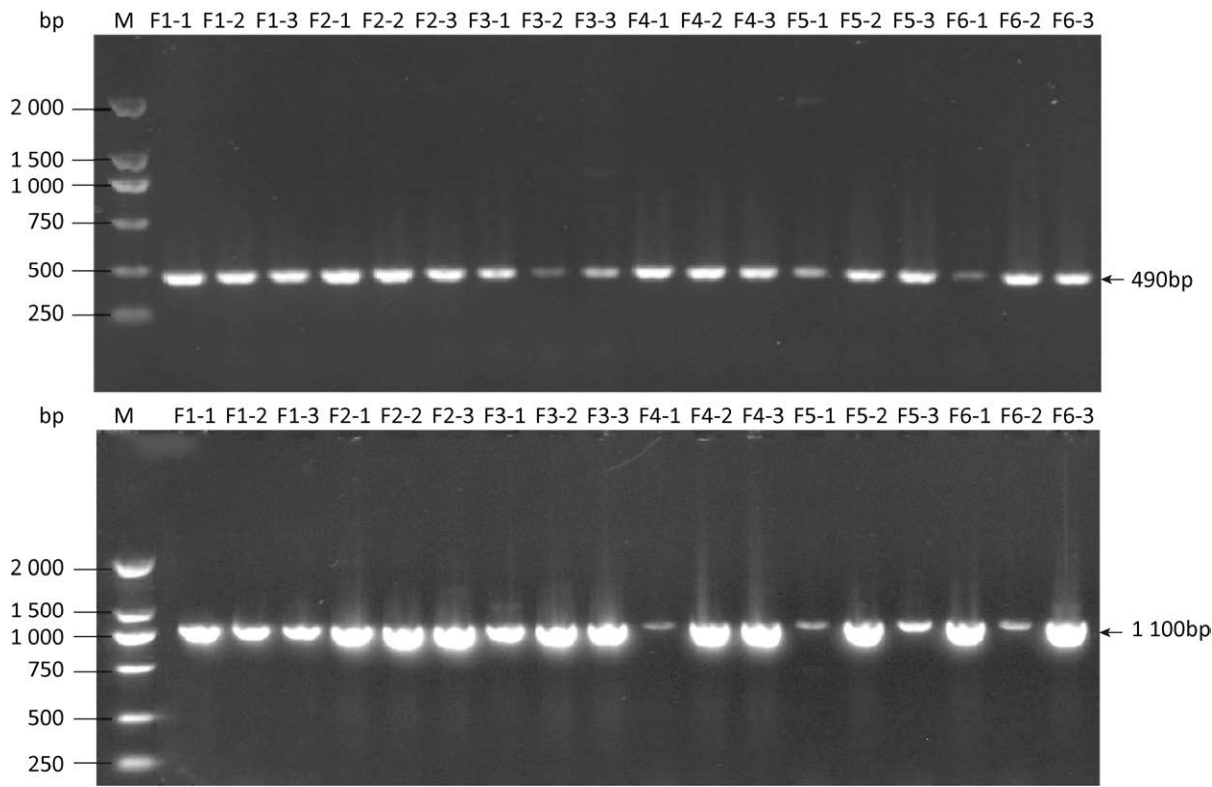


图 4 交配型基因 PCR 扩增图谱 上图为 *MAT-1* 基因，下图为 *MAT-2* 基因；M：DL2000 marker；F1-1–F6-3：菌株

Fig. 4 PCR amplification of mating type genes of 18 strains isolated. *MAT-1* gene is shown in the upper picture, and *MAT-2* gene is shown in the lower picture; M: DL2000 marker; F1-1–F6-3: Strains.

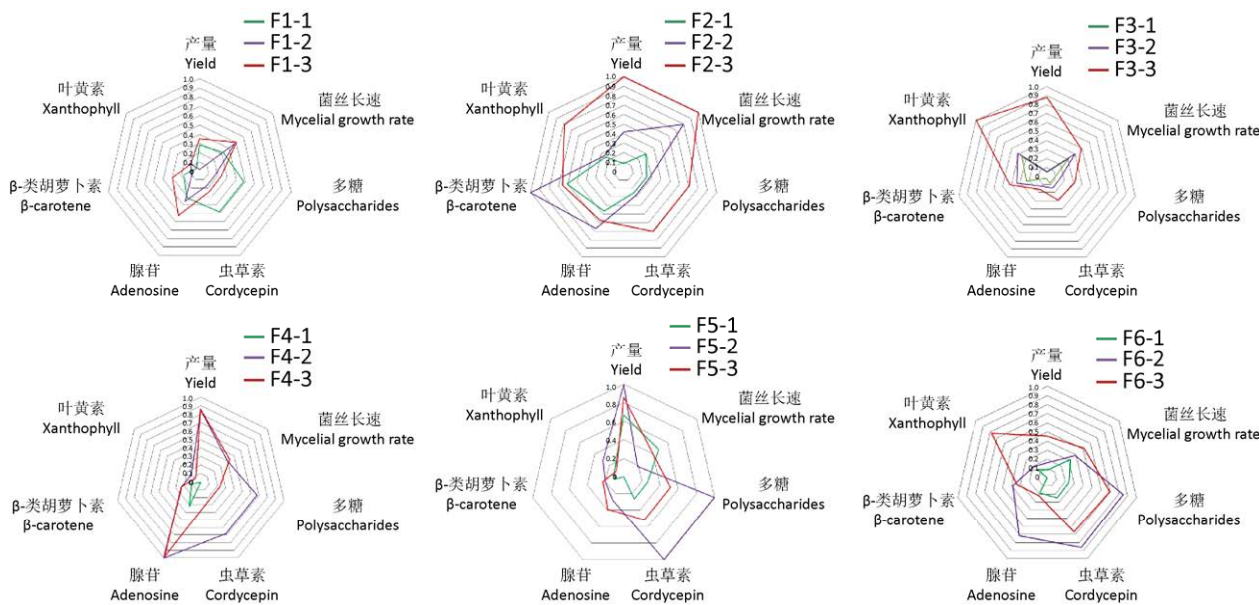


图 5 不同部位分离虫草菌株品质的综合评价

Fig. 5 Comprehensive evaluation of quality of *Cordyceps militaris* strains isolated from different parts of wild samples.

3 讨论

本研究对分离自 6 株野生蛹虫草不同部位的 18 个菌株进行菌丝长速、菌落形态特征、出草试验和活性物质含量检测发现,不同部位分离的菌株之间以上各项测定指标均存在显著差异,其中子囊孢子分离的菌株与子座和菌核分离的菌株相比,其菌丝长速普遍较快,出草整齐且产量高;子囊孢子和子座分离菌株的子实体中活性物质含量显著高于菌核分离的菌株。进一步比较野生蛹虫草与分离菌株的子实体形态,可以看出子囊孢子分离的菌株与菌核和子座分离的菌株相比,其子实体粗壮,子囊壳浓密,更接近野生子实体。此研究结果与杨玉红等(2012)和吕延华等(2016)的研究结果较为一致,也进一步证实了子囊孢子分离法能够使子代更好地遗传亲本的优良性状这一结论,为更好地指导蛹虫草优良菌株的选育及野生菌株的驯化栽培提供了理论依据。

出草试验发现,18 个菌株均可以形成子实体,其中子囊孢子分离的菌株的子实体产量普遍高于菌核和子座分离的菌株;子座分离的菌株次之;菌核分离的菌株产量最低。郑庆委等(2018)和郭尚等(2020)对于蛹虫草的菌落特征进行了研究,得出致密型菌落出草较好,绒毛状菌落不出草或出草产量低。结合出草结果,进一步对本实验出草效果不好的菌株进行菌落形态分析发现,菌落呈绒毛状的菌株(F2-1、F3-3、F4-1、F5-1)出草效果确实较差,但菌落呈致密型的菌株(F1-1、F1-2、F3-1、F3-2)也不出草或出草产量低。由此得出,菌落形态可以用于出草菌株的初步筛选,但不能作为后期出草与否的判定指标。

通过比较不同部位分离的各菌株活性物质的含量发现,虫草素、多糖、N⁶-(2-羟乙基)

腺苷、 β -类胡萝卜素和叶黄素等活性物质含量在各菌株间差异显著,但都表现出相同的规律,即子囊孢子和子座分离的菌株中各物质含量显著高于菌核分离的菌株,且在不同菌株中,虫草素和多糖的含量均表现出相同的趋势。前人关于不同部位分离菌株的研究主要集中在菌丝萌发速度、生长速度和出草性状等方面(于海洋等 2017;郭尚等 2020;柯轶等 2021),关于不同部位分离菌株的活性成分方面未见报道。本研究发现,子囊孢子和子座分离的菌株综合性状优于菌核分离的菌株,但对子囊孢子和子座分离的菌株进行比较发现,虽然子囊孢子分离的菌株在出草实验中普遍表现较优,但在活性成分含量方面,尤其是虫草素和多糖这两种主要的活性成分,子座分离菌株普遍表现较优。蛹虫草子实体中活性成分含量受多种因素影响,如子实体大小、形状和成熟度等(孙叶等 2017;刘敏祥等 2018),本研究所采用的样本量较少,且各菌株间子实体大小均不一致,所以本研究中活性成分的测定结果虽有一定参考性,但可能无法作为不同菌株间特性差异的评价指标。

交配型基因是控制真菌有性生殖的关键因子,蛹虫草属于二极性异宗配合真菌,交配型位点存在两类不同源的交配型 *MAT-1* 和 *MAT-2*,研究发现单一交配型基因菌株无法形成子实体或子座上不产生子囊壳(Lu *et al.* 2016)。本实验的 18 个菌株虽然都可以形成子实体,但不同菌株间差异较大,且菌株 F3-1、F3-2、F4-1 和 F6-1 无子囊壳的形成。经交配型鉴定发现本实验中所有菌株均含有两种交配型基因,因此推测,除交配型基因外,子囊壳的形成还受多种因素影响,如出草时间过晚、营养供应不足或菌株分离后发生退化等,具体原因还需要进一步研究。

[REFERENCES]

- Bao DP, Liu MX, Wang Y, Yang RH, Mao WJ, He HQ, 2017. Application of mating type gene molecular markers to assist affinity pairing of *Cordyceps militaris*. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 31(11): 2113-2120 (in Chinese)
- Gou JX, Li QM, Wang XY, Cao L, Shu GM, 2015. Comparative study on that growth of isolate hyphae from fruiting body tissue of *Cordyceps militaris*. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 26(7): 1759-1760 (in Chinese)
- Guo S, Xu LN, Li YT, Zhou W, Chen N, Zhang SW, Li YS, 2020. Screening of excellent strains of *Cordyceps militaris*. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition), 40(1): 17-21 (in Chinese)
- Hong J, Wang HM, Xiang XQ, Lei C, 2019. Study on the composition and characteristics of carotenoids in *Cordyceps militaris* fruiting body. Guangxi Agricultural Mechanization, 6: 79-82 (in Chinese)
- Jia GL, Xu SY, Wang JH, Zhao FW, 2017. Review on the research progress of *Cordyceps militaris* breeding technology. Edible and Medicinal Mushrooms, 25(5): 313-316 (in Chinese)
- Ke Y, Wang N, Wei Y, Zhou Y, Yu BZ, Zhang GH, Chen YS, 2021. Screening of *Cordyceps militaris* produced high-yield active ingredients. Fujian Agricultural Science and Technology, 51(2): 14-18 (in Chinese)
- Li XX, Wu HY, Yu XD, Zhai LP, 2020. Study on factors affecting the stability of lutein. The Food Industry, 41(10): 71-74 (in Chinese)
- Li XY, Liu MQ, Dou QH, Liu YQ, Han W, 2019. Recent progress on methods of extraction and separation of *Cordyceps militaris* polysaccharide. Shandong Chemical Industry, 48(18): 53-54, 56 (in Chinese)
- Liang ZQ, 2007. Flora fungorum sinicorum. Vol. 32. *Cordyceps*. Science Press, Beijing. 1-190 (in Chinese)
- Liu CQ, Song JF, Li DJ, Jin BQ, 2007. Research progress review on cordycepin extraction and determination methods. Food Science, 11: 596-599 (in Chinese)
- Liu MX, Bao DP, He HQ, Wang R, Wang Y, 2018. Comparison on the main agronomic traits of two typical *Cordyceps militaris* with round head or pointed head fruiting body. Acta Agriculture Shanghai, 34(6): 1-6 (in Chinese)
- Liu Q, Wang F, Xu FX, Xu YY, Dong CH, 2021. Pathogenic fungi of artificially cultivated *Cordyceps militaris*. Mycosystema, 40(8): 1-19 (in Chinese)
- Liu XY, Lü J, Liu ZX, Li LY, Zhang YG, Zheng SN, Xu DH, 2017. Analysis of carotenoid content in vegetables and fruits and their products by high performance liquid chromatography. Quality and Safety of Agro-Products, 2: 39-43, 65 (in Chinese)
- Lu YZ, Xia YL, Luo FF, Dong CH, Wang CS, 2016. Functional convergence and divergence of mating-type genes fulfilling in *Cordyceps militaris*. Fungal Genetics and Biology, 88: 35-43
- Lü YH, Liang GH, Zhu ZG, Liang L, Li QP, Zhang ZY, 2016. The solid fermentation of *Ophiocordyceps sinensis* strains isolated from different parts of specimen and different generations. Mycosystema, 35(4): 433-439 (in Chinese)
- Sun Y, Bao JZ, Liu H, Ma H, Zhang T, Chen XL, 2017. Research on influencing factor on yield and the main active substances of *Cordyceps militaris*. Edible Fungi of China, 36(2): 47-51 (in Chinese)
- Wang XP, Liu Q, Dong CH, 2021. The effect of Cmku70 disruption on the growth and fruiting body development in *Cordyceps militaris*. Mycosystema, 40(7): 1-14 (in Chinese)
- Wen WJ, Liu S, Huang YL, 2020. Comparison of phenol sulfuric and anthrone sulfuric method for determination of lentinan. Modern Food, 21: 177-179 (in Chinese)
- Yan X, Li WZ, Zhou L, 2020. Study on industrial cultivation technology of *Cordyceps militaris*. Theory and Practice of Science and Technology,

- 1(5): 4-8
- Yang YH, Liu F, Kang ZL, Duan YX, 2012. Research on different parts of the *Cordyceps militaris* tissue isolation and continuous culture. *Edible Fungi of China*, 31(1): 11-12 (in Chinese)
- Yu HY, Wang YF, Shi L, Wang JH, Pan CL, Sheng CG, Liu ZT, Zhang P, Dong XM, 2017. Screening on fine *Cordyceps militaris* strains. *Edible Fungi of China*, 36(5): 17-20 (in Chinese)
- Yuan Y, Qi M, Zhang FP, Liu Z, Liu K, Wu XP, Zhang JL, Fu JS, 2021. Evaluation of the biological activities of four species of *Cordyceps* (*Isaria*, *Beauveria*) mycelial crude polysaccharides. *Mycosystema*, 40(6): 1446-1457 (in Chinese)
- Zhang H, Wang JW, Dong SZ, Xu FX, Wang SH, 2012. The optimization of extraction of cordycepin from fruiting body of *Cordyceps militaris* (L.) Link. *Advanced Materials Research*, 1535: 1024-1028
- Zhang XZ, Zhao LL, Xu FX, Liu YF, Wang SH, 2018. Comparison of determination of cordycepin and adenosine in *Cordyceps militaris* by HPLC with different mobile phases. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, 4: 130-132 (in Chinese)
- Zhao Y, Ma XY, Chen X, Xiao J, 2021. Correlation analysis between nutrient composition and enzyme activity of *Cordyceps militaris* cultivated in different substrates. *Northern Horticulture*, 4(8): 99-105 (in Chinese)
- Zheng QW, Zhang T, Guan JC, Yao PP, Ci DZ, Yu ZC, Yuan JT, Feng XF, 2018. Study on hyphae growth characteristics and polysaccharide yield of *Cordyceps militaris* from different genetic resources genomics and applied biology. *Genomics and Applied Biology*, 37(4): 1526-1530 (in Chinese)
- Zhou SQ, Wang LL, Wu YM, Zhou Y, Yuan DD, 2021. Effect of different solid media on the quality of *Cordyceps militaris* fruit body. *China Brewing*, 40(4): 100-104 (in Chinese)
- Zhu LN, Liu YF, Zhang HX, Zhou S, Zhang Z, Li CH, Gao XH, Tang QJ, 2018. Comparison of the active components in fruit bodies of different strains of *Cordyceps militaris*. *Mycosystema*, 37(12): 1695-1706 (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
- 郭俊霞, 李青苗, 王晓宇, 曹柳, 舒光明, 2015. 北虫草子实体组织分离菌丝生长比较研究. *时珍国医国药*, 26(7): 1759-1760
- 郭尚, 徐莉娜, 李艳婷, 周伟, 陈楠, 张生万, 李银生, 2020. 蛹虫草优良菌株的筛选. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 40(1): 17-21
- 洪健, 王化梅, 向晓琴, 雷灿, 2019. 蛹虫草子实体中类胡萝卜素的组成与特性研究. *广西农业机械化*, 6: 79-82
- 贾国军, 徐盛燕, 王剑虹, 赵凤舞, 2017. 蛹虫草育种技术的研究进展综述. *食药菌*, 25(5): 313-316
- 柯轶, 王娜, 魏瑜, 周昀, 余宝珍, 张贵和, 陈玉舜, 2021. 高产活性成分蛹虫草菌株的筛选. *福建农业科技*, 51(2): 14-18
- 李秀鑫, 吴红艳, 于晓丹, 翟丽萍, 2020. 影响叶黄素稳定性的因素. *食品工业*, 41(10): 71-74
- 李小一, 刘美岐, 窦启航, 刘雅琦, 韩伟, 2019. 蛹虫草多糖提取分离方法的研究进展. *山东化工*, 48(18): 53-54, 56
- 梁宗琦, 2007. 中国真菌志. 第 32 卷. 虫草属. 北京: 科学出版社. 1-190
- 刘春泉, 宋江峰, 李大婧, 金邦荃, 2007. 虫草素的提取纯化及测定方法研究进展. *食品科学*, 11: 596-599
- 刘敏祥, 鲍大鹏, 何华奇, 王荣, 汪滢, 2018. “圆头”和“尖头”两种典型蛹虫草主要农艺特征比较. *上海农业学报*, 34(6): 1-6
- 刘晴, 王芬, 徐方旭, 徐岩岩, 董彩虹, 2021. 人工栽培蛹虫草的病原真菌. *菌物学报*, 40(8): 1-19
- 刘新艳, 吕军, 刘中笑, 李凌云, 张延国, 郑姝宁, 徐东辉, 2017. 高效液相色谱法分析蔬菜水果及其制品中类胡萝卜素含量的研究. *农产品质量与安全*, 2: 39-43, 65

- 吕延华, 梁关海, 朱志钢, 梁蕾, 李全平, 张宗耀, 2016. 冬虫夏草不同部位来源的菌株及多次传代固体发酵特性. 菌物学报, 35(4): 433-439
- 孙叶, 包建忠, 刘红, 马辉, 张甜, 陈秀兰, 2017. 蛹虫草产量及主要活性物质的影响因素研究. 中国食用菌, 36(2): 47-51
- 王徐萍, 刘晴, 董彩虹, 2021. Cmku70 基因敲除对蛹虫草生长发育的影响. 菌物学报, 40(7): 1723-1736
- 温文娟, 刘珊, 黄远丽, 2020. 苯酚硫酸法与蒽酮硫酸法测定香菇多糖含量比较. 现代食品, 21: 177-179
- 杨玉红, 刘芳, 康宗利, 段玉玺, 2012. 北虫草菌种人工分离的研究. 中国食用菌, 31(1): 11-12
- 于海洋, 王延锋, 史磊, 王金贺, 潘春磊, 盛春鸽, 刘姿彤, 张鹏, 董雪梅, 2017. 蛹虫草优良菌株的筛选. 中国食用菌, 36(5): 17-20
- 袁源, 戚梦, 张凤培, 刘钊, 刘昆, 吴小平, 张君丽, 傅俊生, 2021. 4 种虫草相关真菌菌丝体粗多糖的生物活性评价. 菌物学报, 40(6): 1446-1457
- 张鑫喆, 赵琳琳, 徐方旭, 柳叶飞, 王升厚, 2018. HPLC 不同流动相测定蛹虫草中虫草素和腺苷的比较. 黑龙江农业科学, 4: 130-132
- 肇莹, 马晓颖, 陈珣, 肖军, 2021. 不同基质栽培蛹虫草营养成分与酶活的相关性分析. 北方园艺, 4(8): 99-105
- 郑庆委, 张涛, 管俊昌, 姚苹苹, 慈大正, 余子辰, 袁静涛, 冯翔飞, 2018. 不同种质资源蛹虫草菌丝生长特性及其多糖产量的研究. 基因组学与应用生物学, 37(4): 1526-1530
- 周绍琴, 王乐乐, 吴映梅, 周艳, 袁丹丹, 2021. 不同固态培养基对蛹虫草子实体品质的影响. 中国酿造, 40(4): 100-104
- 朱丽娜, 刘艳芳, 张红霞, 周帅, 张忠, 李传华, 高新华, 唐庆九, 2018. 不同来源的蛹虫草子实体活性成分的比较. 菌物学报, 37(12): 1695-1706

(本文责编: 韩丽)