

紫外诱变选育北虫草新菌种的研究*

□张 鑫 唐 亮** 徐三妹

(上海国宝企业发展中心 上海 201203)
上海国宝生物工程研究所

摘 要:针对野生菌种在人工培养基上容易丢失产生子实体的能力,稳定性差,且野生型菌种虫草菌素等生理活性物质含量较低等影响北虫草规模化人工栽培的问题,本文探索利用紫外线对出发菌株 P 进行诱变处理,以生物转化率、虫草素、腺苷含量为指标,筛选出高产菌株 89,其有性子实体中虫草素含量和腺苷含量分别是出发菌株的 2.5 倍和 3.6 倍。进一步对其进行传代稳定性试验测试后,可用于大规模工厂化北虫草培育用菌种。

关键词:北虫草 紫外诱变 选育 虫草素 腺苷 遗传稳定性

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.03.026

北虫草[Cordyceps militaris (L.) Link], 隶属于囊菌门,核菌纲,麦角菌目,麦角菌科,虫草属的子囊真菌。与冬虫夏草在药化和药理上十分相似,在功能、食品、医药和生物学技术方面有很好的实用价值。药效成分主要有虫草素,腺苷,虫草酸,多糖等,且富含多种人体必需的氨基酸和微量元素^[1]。目前,北虫草虽已实现人工栽培,但由于野生菌种在人工培养基上容易丢失产生子实体的能力,稳定性差,从而影响北虫草规模化的人工栽培^[2],且野生型菌种虫草菌素等生理活性物质含量较低的问题。因而,开展提高北虫草子实体生理活性物质含量的育种工作就显得十分的必要^[3]。本实验探索利用紫外诱变对原出发菌株 P 进行诱变处理,筛选出高活性、稳定性强的北虫草菌株作为大规模工厂化北虫草培育用菌种。

一、材料和方法

1. 菌 株

出发菌株 P: 上海国宝生物研究保存。

2. 培养基^[4]

固体斜面培养基: 马铃薯汁 20%, 蔗糖 2%, 蛋白胨 1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, V_{B_1} 10mg · L⁻¹, 琼脂 2%, 自来水 1000mL, pH 6.8; 液体菌种培养基: 固体斜面培养基除去琼脂; 固体大米培养基: 固体培养基每瓶装量为: 优质大米 24g, 营养水 40mL, 蚕蛹粉 2g, pH 自然。

3. 方 法

(1) 孢子悬液的制备及计数。

无菌条件下, 经厚度为 0.5cm 的脱脂棉过滤, 制备孢子悬浮液, 并用血球计数板计数, 计算其浓度, 孢子悬液稀释为 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL。

(2) 紫外线诱变孢子菌悬液。

收稿日期: 2011-03-07

修回日期: 2011-04-21

* 科学技术部“十一五”国家 863 计划重点项目(2007AA021502): 北虫草人工替代品规模化生产关键技术, 负责人: 唐亮。

** 通讯作者: 唐亮, 博士, 主要研究方向: 工商管理, Tel: 021-53968185, E-mail: tl_sh@126.com。

二、结果与分析

①孢子菌悬液的紫外线诱变处理 取 5mL 上述孢子悬液用功率 15W 的紫外灯照射 0~180s,照射距离 30cm。照射后稀释,取 1mL 涂平皿,20~22℃遮光培养,待平板长出菌落后,计菌落数,计算孢子悬液紫外线诱变的半致死剂量。死亡率计算公式:死亡率=(照射前活菌数/mL-照射后活菌数/mL)/照射前活菌数/mL×100%。

②诱变效应曲线及紫外线诱变剂量的选择 取 6 个 9cm 平皿,每皿分别装有新制备的 10^6 个/mL 的北虫草孢子悬液 5mL。紫外灯功率 15W,照射距离 30cm,分别照射 0s、30s、60s、90s、120s、150s、180s。然后分别每皿取 1mL,分别稀释浓度为 10^{-4} ~ 10^{-7} 组,每组 4 个剂量,每个剂量 4 组平行涂平板。20~22℃遮光培养,待长出菌落后,计菌落数。以诱变时间为横坐标,以菌落数为纵坐标,绘制北虫草孢子悬液紫外诱变剂量效应曲线。

③北虫草诱变株的筛选 从各诱变剂量中各选取生长较快、色泽较好的饱满菌落,接种于试管斜面培养基上,20~22℃避光培养 7~8d。

④诱变菌株的复筛 人工诱变得到的菌株分别在米饭培养基上进行北虫草子实体的固体培养。培养条件:温度为 20~22℃、湿度为 60%~75%,根据其出草形态、生物转化率、有效成分含量,筛选优良菌株。

生物转化率计算公式:生物转化率(%)=虫草干品重量/投入的干物料重量×100%。

⑤活性成分虫草素及腺苷的检测

腺苷含量的测定 按照高效液相色谱法(药典 2000 版附录 VI D)^[5]。

色谱条件:色谱柱 XB-C₁₈, 5μm, 4.6mm×250mm;检测波长 260nm;流速 1.0mL·min⁻¹;进样量 20μL;流动相:磷酸盐缓冲液(pH6.5):甲醇(17:3, V/V)体系。

腺苷平均加样回收率为 100.23%, RSD=1.35%。

虫草素的测定方法 依照高效液相色谱法(药典 2000 版附录 VI D)^[5]。

色谱条件:色谱柱 XB-C₁₈, 5μm, 4.6mm×250mm;检测波长 258nm;流速 1.0mL·min⁻¹;进样量 20μL;流动相:含 0.5%乙酸的水-甲醇(95/5, V/V)体系。

虫草素平均加样回收率为 99.72%, RSD=1.43%。

⑥遗传稳定性试验 分别将上述挑选出的诱变菌株和出发菌株连续传代转接试管斜面培养基,每代均进行子实体的培养跟踪试验。

1. 紫外诱变时间与孢子存活率之间的关系和诱变剂量的选择

北虫草孢子悬液紫外诱变剂量效应曲线,如图 1 所示。经紫外线照射后,从 0~180s 其存活率呈下降趋势,而从 0~90s 下降趋势特别明显,即孢子悬液对紫外线的较敏感;从 100~180s 曲线趋于平缓,对紫外线的敏感度降低。菌落数逐渐减少。因此北虫草孢子悬液紫外线辐射至半致死率的照射剂量约为 60s。根据试验需要及诱变后的初筛结果将诱变致死率确定在 85%左右,即紫外线照射时间为 90s。

2. 诱变株的初、复筛

以 90s 作为照射剂量诱变北虫草出发菌株孢子悬液,连续诱变 10 批,每批稀释后涂 10 个平皿。平皿上长出菌落后,取优先生长出来、菌落直径最大、生长最旺盛的菌落,接入斜面。据此从 100 个平皿中总共选出 50 株诱变株,接入固体培养基经子实体跟踪培养。

3. 诱变菌株和出发菌株的有效成分含量检测

经固体跟踪培养,挑选出草形态好,生物转化率≥8%的菌株共筛选出 35 株诱变菌株。以原始出发菌株子实体出草情况、有效成分含量为对照,分别测定其成熟后子实体中虫草素、腺苷含量,结果见表 1。根据有效成分含量和菌丝生长状况,筛选出 8 株诱变菌株,编号为 25、38、39、55、74、78、82、89,分别进行遗传稳定性检测。

从上表 1 可看出,紫外诱变产生的菌株 74、82、89 从出草情况和成分含量都优于原出发菌株,其中 89 各项指标最好。

4. 诱变菌株的遗传稳定性分析

将 3 株诱变菌株分别连续传代 5 次,以子实体重、虫草菌素和腺苷含量为指标来评价其遗传稳定性。一般认为连续传代 10~15 代后各项指标相对于未传代菌株的变化率在≤±5%为遗传稳定的菌株^[6-7]。表 2 显示,3 个诱变株传代 5 代后其子实体重量变化很小,最大变化率为 2.86%;子实体虫草菌素及腺苷含量的变化也不大,变化率最大分别为 1.62%及 7.69%。由此表明,这 3 株诱变株能稳定合成虫草菌素和腺苷,具有很好的遗传稳定性,其中 89 株稳定性最好。

三、结果与讨论

对北虫草原生质体进行紫外线诱变,随着紫外线照射时间的延长,菌落数逐渐递减,北虫草孢子悬液紫外线辐射至半致死率的照射时间约为 60s。

根据菌株初,复筛选出 100 株北虫草紫外线诱变菌株,以出发菌株为对照,分别对它们进行了有效成分含量测定,从中筛选出 3 株虫草有效成分含量高于原始出发菌株的诱变菌株,编号为 74、82、89。

将 3 株诱变菌株及原始出发菌株分别连续传代

表 1 8 株诱变株的生长性能、生物转化率和有效成分含量的比较

菌株	P	25	38	9	55	74	78	82	89
出草周期/d	15	14	14	13	15	14	13	13	12
子实体重/g	12.4	16.8	17.4	16.9	16.2	17.5	17.8	14.7	17.8
生物转化率/(%)	8.26	11.2	11.6	11.3	10.8	11.7	11.8	9.80	11.8
虫草素/(%)	0.52	0.80	0.89	0.62	0.98	1.24	0.87	1.23	1.33
腺苷/(%)	0.05	0.06	0.6	0.07	0.06	0.10	0.06	0.15	0.18

表 2 诱变菌株的遗传稳定性分析

菌株 代数	74			82			89		
	子实体重 (g)	虫草素 (%)	腺苷 (%)	子实体重 (g)	虫草素 (%)	腺苷 (%)	子实体重 (g)	虫草素 (%)	腺苷 (%)
1	17.5	1.24	0.13	14.7	1.23	0.15	17.8	1.33	0.18
2	17.2	1.24	0.13	14.5	1.23	0.15	17.9	1.33	0.18
3	17.3	1.23	0.13	14.3	1.23	0.15	17.6	1.33	0.18
4	17.2	1.23	0.12	14.4	1.22	0.14	17.4	1.33	0.18
5	17.0	.22	0.12	14.3	1.21	0.14	17.6	1.32	0.18
最大变化率 (%)	2.86	1.61	7.69	2.72	1.62	6.67	2.78	0.75	0

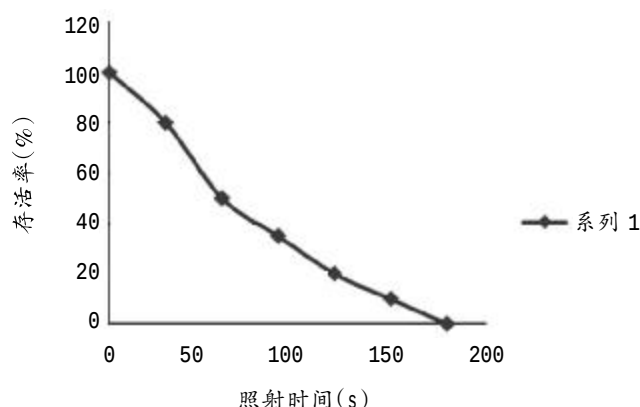


图 1 紫外诱变照射时间效应曲线

5 次,以出发菌株为对照,分别连续测定它们的有效成分含量和生物转化率,通过比较,从中筛选出稳定性强,活性含量更高的诱变菌株,作为规模化生产用菌株即编号为 89。目前,有报道研究发现组织细胞产生的脱氢酶与细胞活力成正比,所以,可以考虑从遗传方面入手,通过基因重组方法,结合四红氮唑法测试液体菌种脱氢酶含量来选育^[8]。

北虫草野生型菌株菌种的遗传变异显著,优良性状不能完全稳定遗传,且极易老化或退化^[9]。且通过自然选育的筛选方法筛选出的菌株其自发突变率低,突变幅度小,因此,单纯依靠自然选育法从野生菌株中筛选菌种进行工业化育种有很大的局限性。此外,车振明等^[10]应用原生质体诱变技术对原菌种进行了紫外诱变选育,但是原生质体的制备成功率较低,因此,通过紫外诱变北虫草孢子悬液来选育新菌种无疑是一种经济、有效的育种技术。

参考文献

- 1 梁宗琦主编. 中国真菌志. 北京: 科学出版社, 2007:1~190.
- 2 李亚洁,王鹤,孟楠,等. 蛹虫草菌种复壮技术的研究. 食用菌, 2006(2):18~19.
- 3 邢来君,李明春. 普通真菌学. 北京: 高等教育出版社, 2001:231~232.
- 4 李昊,吴百昌,李春兰. 虫草人工栽培与深度开发. 北京: 科学技术文献出版社, 2003:64~67.
- 5 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2000 版附录 VI D.
- 6 So-Young W, Eun-Hee P. Anti-inflammatory and related pharmacological activities of cultured mycelia and fruiting bodies of *Cordyceps militaris*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 96(3): 555~561.
- 7 Eui C J, Ki D K, Ju C K, et al. A mushroom lectin from ascomycete *Cordyceps militaris*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2007, 1770 (5): 833~838.
- 8 刘淑琴, 宫文超, 李春燕, 等. TTC 法细胞酶活力测试技术在北虫草选育种中应用. 食用菌, 2005(2):12~13.
- 9 诸葛建, 李华钟, 王正祥. 微生物遗传育种学. 北京: 化工出版社, 2009:1~208.
- 10 车振明, 王燕, 周黎黎, 等. 原生质体紫外诱变选育蛹虫草新菌种的研究. 食品与发酵工业, 2004, (8):35~38.

Investigation on Breeding of *Cordyceps militaris* (L.) Strain by Ultraviolet Mutagenesis

Zhang Xin, Tang Liang, Xu Sanmei

(Shanghai Guobao Enterprise Development Center, Shanghai 201203, China;

Shanghai Guobao Bioengineering Institute, Shanghai 201203, China)

Abstract: Based on problems existed in the cultivation of *Cordyceps militaris* (L.) strain, ultraviolet ray was used to mutate original thallus P. Biological conversion rate, content of cordycepin and adenosine were evaluated as indexes. The amount of screened high output strain was 89. The content of cordycepin and adenosine were 2.5 times and 3.6 times than before, respectively. Genetic stability experiments indicated the strains were stable and can be used as parent thallus in large-scale.

Keywords: *Cordyceps militaris*, ultraviolet mutagenesis, breeding, cordycepin, adenosine, genetic stability

(责任编辑:李沙沙,责任译审:王 晶)