高产虫草素的蛹虫草新品种选育

林培捷[1,2]，陈柏雄[1,2]，陈乐涛[1,2]，叶志伟[1,2]，魏 韬[1,2]，
郑倩望[1,2]，林俊芳[1,2]，郭丽琼[*1,2]
（1. 华南农业大学 食品学院，广东 广州 510640；2. 广东省微生态制剂工程技术研究中心，广东 广州 510640）

摘要： 虫草素（3'-脱氧腺苷）具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、增强免疫力等多种生物活性功能，是蛹虫草（*Cordyceps militaris*）的核心生物活性物质。目前，蛹虫草中虫草素含量还偏低，且蛹虫草菌株易退化，急需选育高产优质的蛹虫草新菌株。作者以高产虫草素的蛹虫草 CM17 菌株和高产子实体的蛹虫草 ZGCM 菌株为亲本，从 ZGCM 菌株中分离只有 *MAT1-1* 基因的子囊孢子单孢菌株和从 CM17 中分离只有 *MAT1-2* 基因的分生孢子单孢菌株，将两种不同交配型的单孢菌株进行杂交，通过分子鉴定和生物特性筛选，获得子实体产量高且虫草素含量高的新菌株 ZA10-C4。菌株 ZA10-C4 子实体中虫草素产量达到（12.82±0.85）mg/g，为亲本 ZGCM 的 4.33 倍，并且保持 ZGCM 高产子实体的特性。同时，采用改良的基因快速提取与标记方法对孢子菌株和杂交菌株进行 *MAT* 交配型基因鉴定，提高了育种的效率。

关键词： 蛹虫草；虫草素；杂交育种；交配型基因
中图分类号：S 567.3　**文章编号：**1673-1689(2022)03-0059-07　**DOI：**10.3969/j.issn. 1673-1689.2022.03.008

Breeding of *Cordyceps militaris* with High Content of Cordycepin

LIN Peijie[1,2]，*CHEN Baixiong*[1,2]，*CHEN Letao*[1,2]，*YE Zhiwei*[1,2]，*WEI Tao*[1,2]，
ZHENG Qianwang[1,2]，*LIN Junfang*[1,2]，*GUO Liqiong*[*1,2]
（1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China; 2. Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, Guangzhou 510640, China）

Abstract: Cordycepin (3'-deoxyadenosine), which is the core bioactive ingredient of *Cordyceps militaris*, has various biological activities, such as anti-tumor, anti-bacterial, anti-virus and immunity enhancement. However, the content of cordycepin in *Cordyceps militaris* is low and the strain of *Cordyceps militaris* is easily degenerated. It is urgent to breed high-yield and high-quality *Cordyceps militaris* strains. In this study, *Cordyceps militaris* CM17 strain with high yield of cordycepin and *Cordyceps militaris* ZGCM strain with high yield of fruiting bodies were used as the parents. The ascospore monospora strain with *MAT1-1* genotype was isolated from ZGCM and the conidia monospora strain with *MAT1-2* genotype was isolated from CM17. Hybridization between the strains of single spore with different MAT genotype was studied through cross-breeding. A new strain ZA10-C4 with high yield of fruiting bodies and high content of cordycepin was successfully

收稿日期： 2021-02-16
基金项目： 国家自然科学基金项目（31772373，31901693）；广东省科技创新重点领域研发计划项目（2018B020205001，2018B020205003）；广东省农业科研项目和农业技术推广项目（2021KJ103，2022KJ103）。
*** 通信作者：** 郭丽琼（1963—），女，教授，博士研究生导师，主要从事食品微生物与健康的研究。E-mail：guolq@scau.edu.cn

obtained through molecular identification and biological characteristics screening. The yield of cordycepin in hybrid strain ZA10-C4 was as high as (12.82±0.85) mg/g in fruiting bodies, which was 4.33 times higher than that of parent strain ZGCM. And ZA10-C4 maintained the characteristics of ZGCM with high yield of fruiting bodies. At the same time, an improved rapid gene extraction and labeling method was used to identify the MAT gene of spore strain and hybrid strain, which improved the efficiency of breeding.

Keywords: *Cordyceps militaris*, cordycepin, cross-breeding, MAT gene

蛹虫草(*Cordyceps militaris*),俗称北冬虫夏草、虫草花、迷力菌[1]等,在分类学上属于子囊菌亚门、麦角菌目、麦角菌科、虫草属,是我国最早实现大规模工厂化生产的虫生真菌。蛹虫草营养丰富、味道鲜美,于2009年被批准为新资源食品。虫草素(3'-脱氧腺苷)是蛹虫草的核心生物活性物质,具有抗肿瘤[2]、增强免疫力[3]、抗菌[4]、抗病毒[5]等多种生物活性功能。蛹虫草子实体的虫草素含量为0.5~5.1 mg/g[6],不同菌株之间的虫草素含量差异很大且蛹虫草菌株较易退化[7],较多菌株的虫草素丰度和子实体产量由于传代逐渐降低。因此,及时培育筛选出具有高产虫草素的优质蛹虫草新品种以保证蛹虫草产业的可续性发展是非常必要的。

许多技术已运用于蛹虫草新品种的选育,如原生质体融合[8]、单孢杂交育种[9]和诱变育种[10]。然而诱变育种存在刺激要求不明确、突变率低、萌发困难等缺点[11]。此外,食用菌诱变材料一般为菌丝体和孢子悬液,由于菌丝体为多细胞,孢子有细胞壁保护,都不适宜诱变[12];而对于原生质体融合,制备的原生质体失去细胞壁的保护,突变频率大大提高[13]。融合后的菌株可能已发生突变,且该育种较为不稳定。单孢杂交育种是通过模仿蛹虫草在自然界中的杂交,使不同配型的孢子菌丝形成杂交带,使其菌丝扭结进而形成异核体,达到基因交流,从而直观便捷地选育蛹虫草新品种。该育种方法能够有目的性地将菌株的亲本进行杂交,筛选目标菌株,但该方法由于缺乏筛选标记,工作量极大。蛹虫草是典型的二级性异宗配合真菌,含有相互不同源的两个交配型基因 *MAT1-1* 和 *MAT1-2*[14-15],交配型基因 *MAT1-1* 序列中 *α-Box*(Genbank ID:AB124614)和 *MAT1-2* 序列中 *HMG-Box*(Genbank ID:AB124626)具有高度保守性[16],所以这两个序列 *MATα* 和 *MATHMG* 被用作杂交育种的分子标记。

蛹虫草的子囊孢子是细胞经过核融合和减数分裂后产生的有性孢子,这一过程蛹虫草的基因产生了遗传重组、突变、缺失等变异,其子代性状出现分化,表型更加丰富,不同子实体或同一子实体产生的子囊孢子菌株在菌落生物学性状上都存在差异[17]。这种差异可为蛹虫草通过子囊孢子间进行杂交选育改善亲本优良性状和提高杂交种的丰富性提供亲本[18]。作者选用高产子实体的蛹虫草ZGCM菌株和高产虫草素的CM17菌株作为亲本,以期通过杂交获得高产子实体且高产虫草素的蛹虫草新菌株。两亲本菌株ZGCM和CM17,前者经过栽培产生子实体后分离单孢子囊孢子作为亲本,后者不能正常形成子实体无法产子囊孢子,因而从菌丝体中分离得到单孢无性分生孢子作为亲本。采用PCR技术对ZGCM子囊孢子菌株进行 *MAT* 基因型鉴定,获取仅含 *MAT1-1* 基因型的ZGCM子囊孢子菌株;用同样的方法对CM17分生孢子进行 *MAT* 基因型鉴定获得仅含 *MAT1-2* 基因型的分生孢子菌株。将这两种不同交配型基因的菌株进行杂交,并对杂交后的菌株进一步鉴定,期望选育出能保持两种亲本优良性状的新菌株。同时,建立一个高效快速的蛹虫草杂交育种方案。

1 材料与方法

1.1 材料与设备

蛹虫草ZGCM菌株:购于山东洲工生物科技有限公司;蛹虫草CM17菌株:购于山东高港食用菌有限公司;立式显微镜:购于麦克奥迪实业集团有限公司;荧光显微镜:购于徕卡显微系统公司。

1.2 供试试剂与培养基

细胞裂解缓冲液:Tris 0.121 5 g、NaCl 0.073 g、EDTA 0.036 5 g、SDS 0.025 g,蒸馏水定容至50 mL,pH为8.0,通过0.22 μm滤膜除菌。

洗涤缓冲液:Tris 0.060 5 g、Tween20 50 μL,蒸馏水定容至 50 mL,pH 8.0,通过 0.22 μm 滤膜除菌。

PDB 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、KH_2PO_4 3 g、$MgSO_4$ 1.5 g,自来水定容至 1 000 mL,自然 pH,灭菌(121 ℃、30 min)。

PDA 培养基:PDB 培养基中加入 20.0 g 琼脂,自来水定容至 1 000 mL,自然 pH,灭菌(121 ℃、30 min)。

大米培养基:大米 20.0 g(粒度 10 目)放入一个组培瓶并加入 30 mL 营养液。营养液的配方为:葡萄糖 20 g、$MgSO_4$ 1.5 g、KH_2PO_4 3 g、蚕蛹粉 6 g、蛋白胨 6 g、维生素 B_1 10 mg,纯水定容至 1 000 mL,自然 pH,灭菌(121 ℃、30 min)。

1.3 蛹虫草单孢分离

1.3.1 单子囊孢子分离及菌株培养 将已栽培好的蛹虫草 ZGCM 进行子囊孢子分离。准备 1.5 mL 离心管,管内加 1 mL 蒸馏水,在 121 ℃灭菌 20 min 后备用。然后用镊子夹取虫草子实体顶部,涂抹一点凡士林,粘贴在离心管盖,倒悬在无菌水上方,闭盖于 25 ℃光照条件下培养 36 h,诱发虫草子实体上的孢子弹落水中形成孢子悬浮液。将孢子液涂布于事先倒好的 PDA 平板上,培养 4 d,最后将平板上长出来的孢子菌丝用立式显微镜单独挑出接种在 PDA 斜面上于 25 ℃避光培养 15 d,获得蛹虫草子囊孢子菌株。

1.3.2 蛹虫草子囊孢子菌丝荧光染色 为确定蛹虫草的子囊孢子菌丝的菌核,需将蛹虫草子囊孢子菌丝进行荧光染色,染色方法在 Lou 等方法上略有修改[19]。将斜面上的菌株接种至 PDA 平板后,分别在平板各方位插入盖玻片,25 ℃避光培养,待菌丝布满盖玻片后取出放到甲醛溶液(体积分数 10%)浸泡固定 1 h。取出盖玻片自然晾干,然后分别加 100 μL FB28(2.5 μg/mL)与 100 μL DAPI(5 μg/mL)染色约 30 min。染色结束后,用 10×PBS 泡洗约 1 min。泡洗结束后,盖到含有甘油、10×PBS(各 50 μL)的载玻片上,然后用荧光显微镜进行观察。

1.3.3 单分生孢子分离及菌株培养 蛹虫草 CM17 菌株接种于 PDA 斜面于 25 ℃避光条件下培养 5 d。挑取菌株接种于装有 100 mL PDB 培养基的锥形瓶中,于 25 ℃避光摇瓶振荡(150 r/min)培养 8 d。用灭菌后的脱脂棉填充过滤器,在无菌条件下将发酵液过滤,滤取孢子,用显微镜进行镜检,确定无残留菌丝片段后,将孢子菌悬液用无菌生理盐水适当稀释。然后将稀释的孢子液涂布于事先倒好的 PDA 平板上,培养 4 d,最后将平板上长出来的孢子菌丝,用立式显微镜单独挑出接种在 PDA 斜面于 25 ℃避光培养 15 d,获得蛹虫草分生孢子菌株。

1.4 蛹虫草单孢子菌株基因标记

1.4.1 基因快速提取 基因快速提取的方法在 Zou 等的方法上略有修改[20]。将斜面上的菌株接种于 50 mL PDB 培养基中,25 ℃避光摇瓶振荡(150 r/min)培养 4 d。用剪过的大枪头吸取 2 mL 菌液于离心管中,8 000 r/min 离心 2 min。去除离心管中的上清液,加入 1 mL ddH_2O,吹打均匀,8 000 r/min 离心 2 min,去除上清液。向 2 mL 离心管中加入 500 μL 细胞裂解缓冲液,2~3 个玻璃珠,涡旋振动约 8 s。将纤维素试纸切成 44 mm×2 mm 的矩形,其中 40 mm×2 mm 为疏水区,4 mm×2 mm 为纤维素与核酸的结合区,将矩形纤维素试纸的核酸结合区浸入细胞裂解液中结合核酸,上下浸泡 5~6 次。然后,浸入提前分装好的洗涤缓冲液离心管中,上下浸泡 5~6 次。最后,直接浸入 PCR 反应体系中,上下浸泡 5~6 次。PCR 体系包括 2×PCRMix12.5 μL、引物各 1 μL、ddH_2O 10 μL。

1.4.2 PCR 分析 通过 PCR 分析 *MAT* 基因的情况,其中 PCR 的引物分为 *MATα-F*(GAGCCTACTATGGAACCC)、*MATα-R*(CAGGACTGATACCAGCAAA)、*MATHMG-F*(GCATCAACCCATTTGTGAAAGTTCT)和 *MATHMG-R*(CCTGTCATAATGGTGCTGT)[21]。PCR 的参数为:94 ℃运行 3 min,然后 94 ℃下 30 s,60 ℃下 30 s,72 ℃下 44 s,共 25 个循环,之后 72 ℃下 5 min,4 ℃下 40 min。PCR 体系通过琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.5 蛹虫草单孢菌株对峙培养

根据上述基因型的鉴定结果,选择含有 *MAT1-1* 型的 ZGCM 子囊孢子和 *MAT1-2* 型的 CM17 分生孢子,两两配对。将大米培养基划分成两个区域,分别将两种类型的孢子菌株接种于两个区域,避光条件下培养 5 d 后,光照条件下培养 30 d,诱导其长出子实体。挑取中间杂交的子实体接种于 PDA 平板上,25 ℃避光条件下培养 15 d,得到假定杂交菌株。

1.6 假定杂交种的鉴定

1.6.1 假定杂交种的基因鉴定 将 1.5 中在 PDA 平板上正常生长的菌株切块接种至 50 mL PDB 培

养基中,25 ℃避光摇瓶振荡(150 r/min)培养 4 d。然后运用 1.4 的方法,检测假定杂交种的 *MAT* 基因。

1.6.2 荧光染色菌核鉴定 为进一步确定杂交菌株的特性,将杂交菌株的菌丝进行荧光染色,方法同 1.3.2。

1.7 杂交种及亲本生物学特性鉴定

1.7.1 蛹虫草子实体的栽培 为了观察杂交菌株的栽培情况,将蛹虫草亲本和杂交种接种至 PDB 培养基,25 ℃避光摇瓶(150 r/min)振荡培养 4 d,获得液体菌种。取 5 mL 液体菌种接种至大米培养基于 25 ℃避光培养 5 d,然后 25 ℃光照培养 60 d,观察其生长情况。之后将栽培好的蛹虫草杂交菌株中的子实体和基质于烘箱中烘干 36 h,并对烘干样品进行称重。

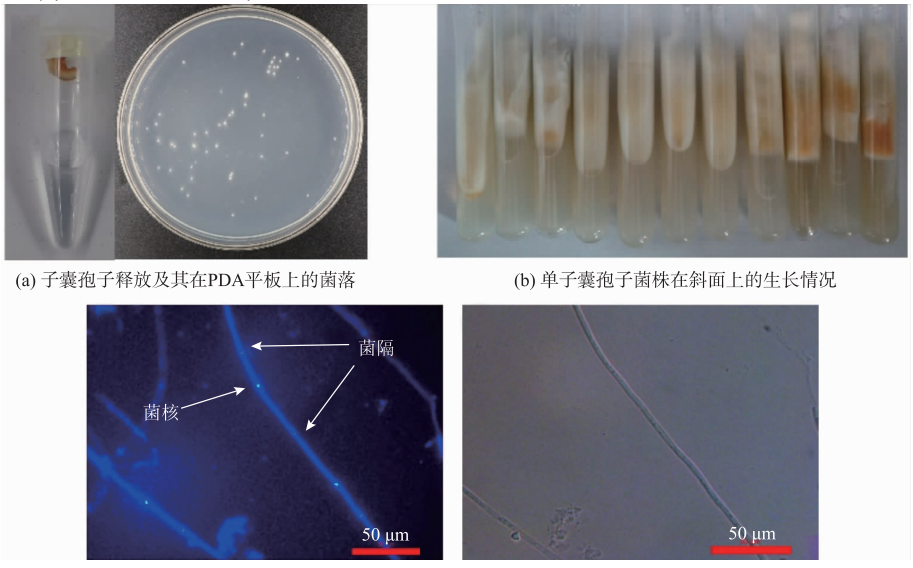
1.7.2 蛹虫草子实体及基质的虫草素测定 将 1.7.1 中已烘干的子实体及基质研磨后过 60 目筛网,获得子实体和基质的粉末样品。分别称取 0.02 g 蛹虫草子实体粉末和 0.04 g 蛹虫草基质粉末放入 10 mL 离心管,加入 2 mL 超纯水。置于 95 ℃水浴 2 h,转移到超声仪水浴振荡 1 h,重复 3 次,使虫草素被充分提取。剧烈振荡涡旋后将悬浮液转移至 2 mL 离心管中,在 25 ℃下以 10 000 r/min 离心 10 min,去除沉淀,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤于进样瓶中。之后进行 HPLC 测量,HPLC 的分析条件为:色谱柱采用 AQ-C18,流动相为 85% ddH_2O 和 15%甲醇(均为体积分数),流量 1 mL/min,检测波长 260 nm,进样体积 20 μL,虫草素标准曲线为 0.025~0.625 μg/mL,柱温 30 ℃,出峰时间 14~15 min。通过标准曲线对实验结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 蛹虫草的单孢分离

蛹虫草的单孢分离是蛹虫草杂交育种的重要步骤。蛹虫草 ZGCM 的子囊孢子被适当稀释后涂布于 PDA 平板上(见图 1(a)),然后从 PDA 平板上挑取孢子菌丝接种至斜面(见图 1(b))。经过培养后,子囊孢子菌株间性状存在差异,子囊孢子菌株的菌丝有的颜色偏黄,有的为白色,且菌丝厚实程度也有差异,说明蛹虫草子囊孢子基因重组后产生性状分离。为了进一步确定蛹虫草子囊孢子的菌核情况,选取蛹虫草的子囊孢子菌丝进行荧光染色(见图 1(c))。根据荧光染色的情况可知,蛹虫草的子囊孢子为单核菌丝。

CM17 的分生孢子悬浊液的显微镜观察结果见图 2(a)。图中显示分生孢子均无蛹虫草菌丝杂质,可以进行单孢分离。分生孢子适当稀释后接种到 PDA 平板进行观察(见图 2(b)),然后从 PDA 平板中挑取孢子菌丝接种至斜面,见图 2(c)。结果显示分生孢子菌株间性状均匀,没有差异,说明分生孢子保留了亲本的特性。由 Lou 等的研究可知,蛹虫草的分生孢子均为单核[19],因此分生孢子菌株也均为单核。

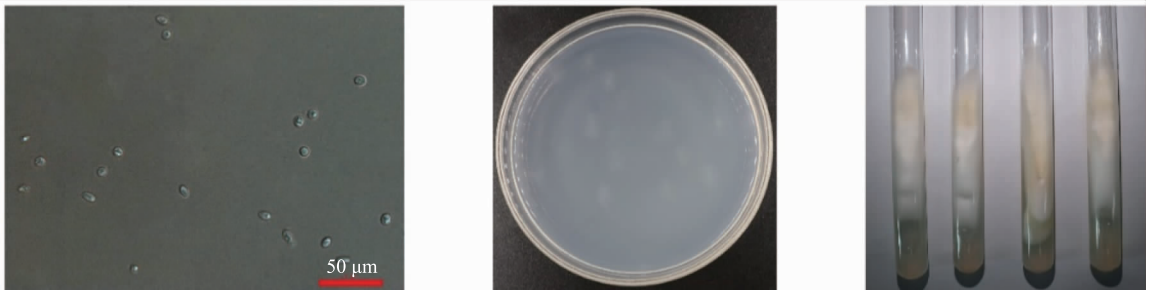


(a) 子囊孢子释放及其在PDA平板上的菌落　(b) 单子囊孢子菌株在斜面上的生长情况

(c) 单子囊孢子菌丝荧光显微镜图

图 1 蛹虫草单子囊孢子的分离

Fig. 1 Isolation of ascospores from the friuting body of *Cordyceps militaris*



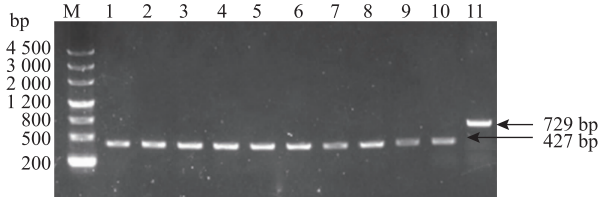
(a) 单分生孢子的显微镜图　(b) 单分生孢子在PDA平板上的菌落　(c) 单分生孢子菌株在斜面上的生长情况

图 2　蛹虫草分生孢子的分离

Fig. 2　Isolation of conidia from the hypha of *Cordyceps militaris*

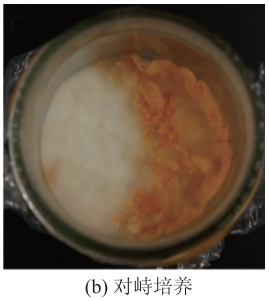
2.2　蛹虫草的单孢菌株基因鉴定和对峙培养

运用基因的快速提取与鉴定的方法,对两种蛹虫草的孢子菌株进行基因鉴定与分类。根据 *MAT* 基因型,选取两种类别的蛹虫草孢子进行杂交育种,一类为带有 *MAT*–*α* 交配型的 ZGCM 子囊孢子菌株(共 42 株,分别命名为 ZGCMA1~A42),另一类为带有 *MATHMG* 交配型的 CM17 分生孢子菌株(共 5 株,分别命名为 CM17C1~C5)。*MAT* 基因的条带单一(见图 3(a))。分生孢子无基因重组过程,因此,只需挑选一株分生孢子 CM17C4 和其他 42 株蛹虫草的子囊孢子(ZGCMA1~A42)进行对峙培养。诱导对峙线处长出子实体(见图 3(b))后,将对峙线的子实体接种于 PDA 平板上。



M:Marker;1~10:ZGCMA1、ZGCMA10、ZGCMA11、ZGCMA13、ZGCMA16、ZGCMA17、ZGCMA19、ZGCMA27、ZGCMA32、ZGCMA42;11:CM17C4。

(a) 交配型基因鉴定



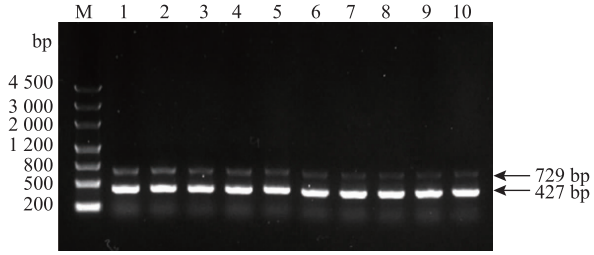
(b) 对峙培养

图 3　蛹虫草单孢菌株基因鉴定和对峙培养

Fig. 3　Gene identification and dural culture of the spore strains from *Cordyceps militaris*

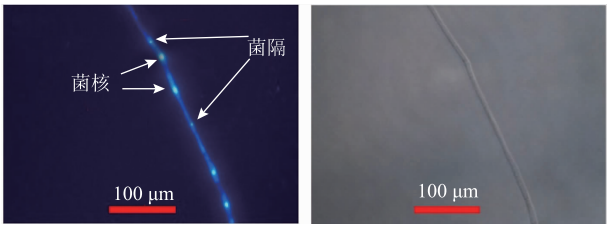
2.3　假定杂交种的鉴定

为鉴定出杂交种,运用基因的快速提取和双重 PCR 进行鉴定,得到 10 株杂交菌株(ZGCMA17–C4、ZGCMA27–C4、ZGCMA10–C4、ZGCMA16–C4、ZGCMA19–C4、ZGCMA42–C4、ZGCMA32–C4、ZGCMA1–C4、ZGCMA13–C4、ZGCMA11–C4)均含有 *MAT*–*α* 和 *MATHMG* 两种基因(见图 4(a))。因此,该 10 株菌株为杂交成功的菌株。同时对杂交菌株进行荧光染色并将其与孢子菌株的荧光染色结果进行对比,发现杂交菌株经荧光染色后呈现双核状态(见图 4(b)),说明蛹虫草菌株经对峙培养后诱导形成子实体时,两种孢子菌株相互缠绕进行基因交流,进一步形成了双核菌株。



M: Marker;1~10:ZA1-C4、ZA10-C4、ZA11-C4、ZA13-C4、ZA16-C4、ZA17-C4、ZA19-C4、ZA27-C4、ZA32-C4、ZA42-C4。

(a) 交配型基因鉴定



(b) 蛹虫草杂交菌株菌丝荧光显微镜观察情况

图 4　蛹虫草假定杂交菌株的鉴定

Fig. 4　Identification of the hybrids of *Cordyceps militaris*

2.4 杂交种和亲本的生物学特性

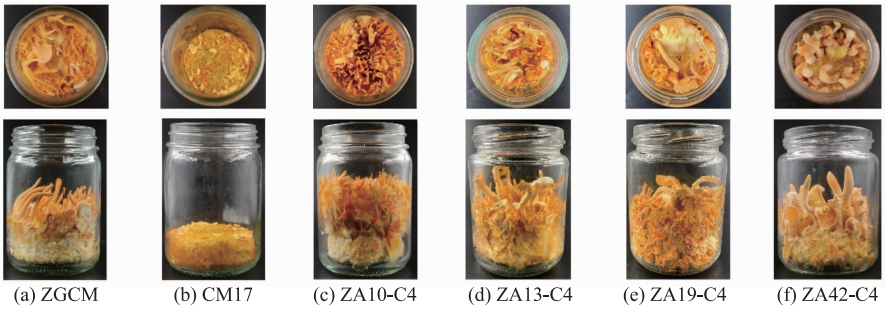
如表 1 所示,将蛹虫草杂交菌株子实体烘干称重对比。其中 ZA10-C4、ZA13-C4、ZA19-C4 和 ZA42-C4 的子实体产量与子实体中虫草素产量均高于亲本 ZGCM。其中 ZA42-C4 的子实体产量(每瓶(3.24±0.08) g)最高为亲本 ZGCM 子实体产量(每瓶 (1.83±0.00) g) 的 1.77 倍。利用标准曲线 y=6×10^7x+350 636(R^2=0.999 6)测得杂交种和亲本的子实体和培养基中虫草素质量分数。子实体的虫草素产量中,杂交种子实体虫草素质量分数大多高于亲本。其中,ZA10-C4 子实体中虫草素产量 (每瓶 (12.82±0.85) mg/g) 最高为亲本 ZGCM 子实体中虫草素产量(每瓶(2.96±0.18) mg/g)的 4.33 倍。对培养基中虫草素质量分数进行分析,杂交种虫草素质量分数均低于亲本。同时,通过对子实体的生长情况进行观察(见图 5),ZA10-C4、ZA13-C4、ZA19-C4 和 ZA42-C4 的子实体生长密度比亲本 ZGCM 高。但 ZA13-C4、ZA19-C4 和 ZA42-C4 的子实体生长一致性较差, 存在子实体高低不一致的情况。而 ZA10-C4 的子实体长势较一致,子实体均为细长状态,生长密度较高。经过对比,蛹虫草 ZA10-C4 的子实体质量相对较高(见图 6)。

表 1 杂交种与亲本的生物学特性

Table 1 Biological characteristics of the hybrids and their parents

菌种名称	每瓶子实体干质量/g	培养基中虫草素质量分数/(mg/g)	子实体中虫草素质量分数/(mg/g)
ZGCM	1.83±0.00^{bc}	5.20±0.33^{c}	2.96±0.18^{a}
CM17	–	2.97±0.49^{bcd}	–
ZA1-C4	1.64±0.06^{abc}	3.54±0.29^{d}	4.83±0.20^{b}
ZA10-C4	2.04±0.22^{cd}	2.35±0.38^{abc}	12.82±0.85^{e}
ZA11-C4	1.41±0.03^{f}	2.98±0.03^{bcd}	5.16±0.13^{b}
ZA13-C4	2.71±0.08^{e}	4.47±0.15^{e}	9.09±0.26^{d}
ZA16-C4	1.73±0.16^{abc}	2.62±0.19^{abc}	6.53±0.17^{c}
ZA17-C4	1.37±0.09^{ab}	2.15±0.28^{ab}	2.83±0.08^{a}
ZA19-C4	2.65±0.58^{de}	2.67±0.44^{abcd}	8.46±0.08^{d}
ZA27-C4	1.33±0.18^{a}	1.91±0.17^{a}	2.91±0.23^{a}
ZA32-C4	1.76±0.07^{abc}	3.15±0.28^{cd}	3.28±0.14^{a}
ZA42-C4	3.24±0.08^{f}	3.04±0.25^{cd}	6.93±0.33^{c}

注:同一列中不同字母表示显著差异(P<0.05),* 表示在 P<0.05 水平上显著差异。



(a) ZGCM (b) CM17 (c) ZA10-C4 (d) ZA13-C4 (e) ZA19-C4 (f) ZA42-C4

图 5 蛹虫草亲本与杂交种栽培情况

Fig. 5 Cultivation of the parents and hybrids of *Cordyceps militaris*

3 结 语

蛹虫草作为一种新资源食品,高品质且富含虫草素的蛹虫草子实体更受市场青睐。作者建立了一种高效快速的蛹虫草杂交育种方案,选育出子实体生长状况良好且虫草素产量高的优质蛹虫草菌株。

虽然运用交配型基因作为分子标记指导蛹虫草进行杂交配对,能够提高到蛹虫草亲和性杂交的成功率[9]。但是,在已有的研究中,基因的分子标记需要用 CTAB 等传统方法进行基因提取和鉴定较为麻烦。作者结合 Zou 等的方法进行改良[20],使蛹虫草的基因能够被快速提取和鉴定。*MAT*α 和



图 6　蛹虫草 ZA10–C4 的子实体生长情况

Fig. 6　Growth of fruiting body from the hybrid ZA10–C4

MATHMG 具有高度保守性,根据其特点,在鉴定时尝试采用双重 PCR 进行鉴定,从而减少鉴定时间,提高鉴定的效率。所鉴定的基因条带单一,且条带大小与 *MAT* 基因条带大小对应一致。该方法也被用于鉴定杂交种基因。结果表明,该方法可运用于蛹虫草的高效筛选与鉴定,鉴定效果准确。

同时,为探索蛹虫草单孢杂交时菌核的变化,对蛹虫草子囊孢子菌株的菌丝及杂交种菌株的菌丝进行荧光染色,对其菌核进行鉴定。能初步得出蛹虫草单孢菌株在进行杂交时,不同交配型蛹虫草单孢菌株的菌丝间会相互缠绕,形成双核菌丝的观点。

实验结果表明,蛹虫草杂交菌株 ZA10–C4 的子实体虫草素产量与子实体品质均优于亲本。且由于亲本 CM17 菌株退化,无法生长子实体,该方法能够使其恢复子实体高产虫草素的性状,提供了改善蛹虫草易退化的新思路。综上所述,所设计的育种技术体系能够高效快速选育出所需菌株,且成功选育出优质蛹虫草新品种。

参考文献:

[1] 林俊芳,郭丽琼,刘聪,等. 一种高产类胡萝卜素的迷力菌菌质培养方法及其产品和制备方法:CN107475122B[P].2021-1-26.
[2] LEE J H,YOON J Y,MYOUNG H,et al. Anti-cancer effects of cordycepin on oral squamous cell carcinoma proliferation and apoptosis *in vitro*[J]. **Oral Oncology**,2011,47(1):75.
[3] ZHOU X X,MEYER C U,SCHMIDTKE P,et al. Effect of cordycepin on interleukin-10 production of human peripheral blood mononuclear cells[J]. **European Journal of Pharmacology**,2002,453(2):309-317.
[4] AHN Y J,PARK S J,LEE S G,et al. Cordycepin:selective growth inhibitor derived from liquid culture of *Cordyceps militaris* against *Clostridium* spp[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,2000,48(7):2744-2748.
[5] 周艳丽,许剑怡,王宏娟,等. 虫草素的药理作用及应用前景[J]. 中国医药导报,2020,17(8):39-42.
[6] 唐晓双,陈和平,宋林洧,等. 不同产地的蛹虫草、虫草花与冬虫夏草中虫草素含量对比[J]. 航天医学与医学工程,2016,29(2):116-119.
[7] 林清泉,丘雪红,郑壮丽,等. 蛹虫草退化菌株的特征研究[J]. 菌物学报,2010,29(5):670-677.
[8] 周洪英,边银丙. 蛹虫草虫草素高产原生质体融合子鉴定与筛选[J]. 食用菌学报,2007(2):65-70.
[9] 鲍大鹏,刘敏祥,汪滢,等. 运用交配型基因分子标记辅助蛹虫草亲和配对[J]. 核农学报,2017,31(11):2113-2120.
[10] 汤佳鹏,汪建雄. 紫外 - 硫酸二乙酯复合诱变高通量筛选虫草素高产蛹虫草突变株[J]. 食品工业科技,2018,39(3):97-100.
[11] MASUDA M,DAS S K,HATASHITA M,et al. Efficient production of cordycepin by the *Cordyceps militaris* mutant G81-3 for practical use[J]. **Process Biochemistry**,2014,49(2):181-187.
[12] 李守勉,李明,邢蕾,等. 食用菌原生质体技术应用的研究[J]. 安徽农业科学,2007(25):7770-7771.
[13] 刘士旺,刘爱英,梁宗琦. 原生质体诱变技术在丝状真菌育种中的应用[J]. 贵州农业科学,1997(4):60-63.
[14] YOKOYAMA E,YAMAGISHI K,HARA A. Structures of the mating-type loci of *Cordyceps takaomontana*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**,2003,69(8):5019-5022.
[15] ZHENG P,XIA Y,XIAO G,et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*,a valued traditional chinese medicine[J]. **Genome Biology**,2011,12(11):1-22.
[16] LU Y,XIA Y,LUO F,et al. Functional convergence and divergence of mating-type genes fulfilling in *Cordyceps militaris*[J]. **Fungal Genetics and Biology**,2016,88:35-43.
[17] 梁月,张国珍,安沫平,等. 蛹虫草子囊孢子萌发及其后代群体培养性状观察[J]. 菌物学报,2005(4):55-62.
[18] 潘迎捷,汪昭月,白韵琴,等. 食用菌育种中的有性杂交与无性杂交[J]. 食用菌,1994(1):2-3.
[19] LOU H,YE Z,YU Y,et al. The efficient genetic transformation of *Cordyceps militaris* by using mononuclear protoplasts[J]. **Scientia Horticulturae**,2019,243:307-313.
[20] ZOU Y,MASON M G,WANG Y,et al. Nucleic acid purification from plants,animals and microbes in under 30 seconds[J]. **PLOS Biology**,2017,15(11):1-22.
[21] FENG Y,ZHU Y,LI Y,et al. Effect of strain separated parts,solid-state substrates and light condition on yield and bioactive compounds of *Cordyceps militaris* fruiting bodies[J]. **CyTA:Journal of Food**,2018,16(1):916-922.