

郭 洁,袁洪水. 冬虫夏草产多糖菌株的筛选鉴定及多糖提取[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):240-243.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.078

冬虫夏草产多糖菌株的筛选鉴定及多糖提取

郭 洁,袁洪水

(河北农业大学生命科学学院,河北保定 071001)

摘要:为了得到多糖收率较高的冬虫夏草菌株,从西藏那曲地五高山草甸中采集的新鲜冬虫夏草子实体初步分离得到 50 株菌株,并对其进行形态观察和 18S rDNA-ITS 序列分析鉴定,采用超声辅助热水浸提法进行冬虫夏草多糖的提取。结果表明,CC-3 菌株 *Cladosporium* sp. 的模式菌株 JN084020 的 18S rDNA-ITS 同源相似性为 100%,初步确定为冬虫夏草的无性型,经过超声辅助热水浸提后多糖收率最高为 6.619%。

关键词:冬虫夏草;真菌;筛选;rDNA-ITS 序列;*Cladosporium* sp.

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0240-03

冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*)是中国传统的名贵中药材,系麦角菌科虫草属真菌寄生于蝙蝠蛾的幼虫所形成的菌虫复合体^[1]。2001 年统计,全球冬虫夏草种类已有 400 种,其中中国记载有 105 种左右^[2]。

冬虫夏草在中国传统医学里已经流传 1 300 多年,最早记载冬虫夏草的文献始于唐朝前期公元 710 年的《月王药诊》,记载冬虫夏草能治疗肺部疾病。公元 780 年《藏本草》记载的冬虫夏草具有润肺、补肾的作用;1765 年,赵学敏在《本草纲目拾遗》中记载冬虫夏草的作用是润肺、补肾、益精气,理诸虚百损;1757 年,吴仪洛所著《本草从新》中指出冬虫夏草保肺益肾,止化痰。其后,《黔囊》《文房肆考》《四川通志》《本草图说》等 100 多部古书都记载了冬虫夏草名贵药材^[3]。

目前,研究证实冬虫夏草有降血糖、免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗纤维化、抗炎等功效,对肺脏、肾脏、中枢神经系统、免疫系统、心脏、肝脏等均有较好的临床保护作用^[4]。由于冬虫夏草的生长环境及人们过于采挖,冬虫夏草已经远远不能满足医疗的需求,人们开始研究冬虫夏草成分与功能的关系,冬虫夏草多糖作为冬虫夏草的重要活性成分,具有抗疲劳、抗衰老、提高免疫力的作用^[5-6]。表明冬虫夏草多糖在新药开发方面有广阔的前景。

已报道的冬虫夏草的无性型菌株涉及 13 个属,22 个种名^[7],包括细脚拟青霉(*Paecilomyces tenuipes*)、虫草蚱蜱属(*Lecanicillium* sp.)、轮枝孢属(*Verticillium* sp.)、被毛孢属(*Hirsutella*)、头孢属(*Cephalosporium* sp.)等,其中部分冬虫夏草的无性型还有待进一步确定^[8]。冬虫夏草的无性型研究已成为研究热点。

本研究分离筛选了 50 株能够产多糖的菌株,分子生物学鉴定分别为虫草蚱蜱属、枝孢菌属、黑粉菌属。超声辅助热水浸提法提取冬虫夏草多糖,CC-3 菌株的多糖得率最高为

6.619%。研究结果为应用发酵方法生产冬虫夏草多糖替代冬虫夏草应用于医疗,以及进一步确定冬虫夏草多糖的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

新鲜冬虫夏草采自西藏那曲地五高山草甸。

1.2 培养基及试剂

PDA 加富培养基:土豆 200 g/L、葡萄糖 20 g/L、酵母膏 1 g/L、蛋白胨 1 g/L、KH₂PO₄ 1 g/L、琼脂 240 g/L、MgSO₄ 0.5 g/L、蚕蛹粉 1 g/L。pH 值 6.7,121 ℃蒸汽灭菌 30 min。

种子瓶液体培养基:KH₂PO₄ 3 g/L、MgSO₄ 1.5 g/L、蛋白胨 10 g/L、葡萄糖 20 g/L。pH 值 6.7,121 ℃蒸汽灭菌 30 min。

发酵培养基:葡萄糖 9 g/L、麦芽糖 19 g/L、蛋白胨 10 g/L、KH₂PO₄ 0.5 g/L、MgSO₄ 1 g/L、MnSO₄ 0.5 g/L。pH 值 6.7,121 ℃蒸汽灭菌 30 min。

CTAB 提取液:NaCl 1.4 mol/L、EDTA 20 mmol/L、CTAB 20 g/L、Tris-Cl 100 mmol/L、巯基乙醇 2 g/L、pH 值 8.0。

苯酚:氯仿:异戊醇溶液=25:24:1。RNA 酶:1 mg/mL。真菌通用引物:ITS1 和 ITS4。

1.3 试验方法

1.3.1 冬虫夏草菌株的分离纯化 无菌条件下将新鲜的冬虫夏草用 1% HgCl₂ 溶液消毒,用无菌水冲洗干净,并用无菌的滤纸吸干表面的水分,分离冬虫夏草的蛹体和子座部分,分别研磨成粉,用无菌湿棉签蘸取粉末涂于加入氯霉素 1 g/L 的 PDA 加富平板上,倒置于 28 ℃培养箱中培养至单菌落出现。挑选菌丝色泽洁白、生长健壮、无杂菌污染的菌株,转接加入氯霉素 1 g/L 的 PDA 加富试管斜面中,28 ℃培养箱中培养 7~10 d,直至整个斜面都长满菌丝,选取生长健壮,无杂菌的菌株即为分离得到的菌株。

1.3.2 菌种的鉴定

1.3.2.1 菌体形态观察 将分离得到的菌株梯度划线接种于 PDA 平板中,用无菌镊子取无菌盖玻片,斜插入培养基中,每天观察并记录菌落生长情况,7 d 后,拔出插片,显微镜下

收稿日期:2014-11-26

作者简介:郭 洁(1988—),女,河北保定人,硕士,主要从事农业微生物研究。E-mail:809240009@qq.com。

通信作者:袁洪水,副教授,硕士生导师,主要从事微生物及生化学研究。E-mail:yhs526@126.com。

观察菌丝形态及产孢形式。

1.3.2.2 菌株的 ITS 序列测定 (1) 基因组 DNA 的提取。采用 CTAB 法^[9] 提取基因组 DNA。(2) ITS 序列分析。ITS 序列引物为真菌通用引物, ITS1 和 ITS4^[10]。ITS1: 5′ - TCCG-TAGGTGAACCTGCGG - 3′; ITS4: 5′ - TCCTCCGCTTATT-GATATGC - 3′。PCR 扩增反应体系 (25 μL): DNA 2 μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.3 μL、10 × *Taq* Buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL、ITS1 2 μL、ITS4 2 μL、dNTP 2 μL、ddH₂O 14.2 μL。PCR 扩增程序: 95 ℃ 预变性 10 min, 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 50 s, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。(3) 琼脂糖凝胶电泳及测序。PCR 产物扩增后进行琼脂糖凝胶电泳, 条带清晰, 用蛋白核酸测定仪测定后无蛋白和核酸残留, 送北京宝锐通生物技术有限公司测序。(4) ITS 测序数据分析。在 NCBI 中对菌株的 ITS 序列进行 BLAST 分析, 然后用 MEGA5 进行系统发育树的构建。

1.3.3 提取冬虫夏草多糖

1.3.3.1 冬虫夏草菌丝体的制备 在无菌条件下挖取 1 cm² 的分离菌株的培养菌苔接种于装有 100 mL 种子培养基的三角瓶 (容量 500 mL) 中, 180 r/min, 28 ℃ 摇床培养 7 d。按 10% 的接种量, 接种于装有 100 mL 发酵培养基的三角瓶 (容量 500 mL) 中, 180 r/min、28 ℃ 摇床培养 7 d。发酵液 8 000 r/min 离心 10 min。收菌丝体、80 ℃ 烘干、粉碎、过 80 目筛, 备用。将烘干的冬虫夏草菌丝体粉碎, 过 40 目筛, 备用。

1.3.3.2 超声辅助热水浸提法提取冬虫夏草多糖 取干燥恒重的冬虫夏草菌丝粉 10 g, 提取溶液为去离子水 (首次加量料液比为 1 g : 20 mL, 浸泡 30 min 之后, 加水量料液比按前加量的 75% 递减)。提取条件: 温度 90 ℃、提取 4 次、每次浸提时间 90 min, 超声功率 150 W。

1.3.4 冬虫夏草多糖含量测定 采用苯酚 - 硫酸比色法^[11-12] 测定。

1.3.4.1 绘制葡萄糖标准曲线 取烘干至恒重的葡萄糖标准品配置成最终浓度为 0.1 mg/mL 的标准液, 取 9 支试管分别取葡萄糖标准液 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8 mL, 各补加蒸馏水至 1.0 mL, 然后加入 5% 苯酚 1.0 mL, 迅速加入浓硫酸 5.0 mL, 摇匀, 静置 10 min。于 40 ℃ 水浴中加热 30 min, 以蒸馏水替代葡萄糖标准液为空白对照, 于 *D*_{490 nm} 波长处测吸光度。

1.3.4.2 冬虫夏草多糖含量的测定 取冬虫夏草多糖提取

滤液, 稀释一定的倍数, 取 1 mL 稀释液, 加入 5% 苯酚溶液 1 mL, 摇匀、迅速加入 5 mL 浓硫酸, 摇匀、静置 10 min。于 40 ℃ 水浴中加热 30 min, 以蒸馏水作空白对照, 在 *D*_{490 nm} 处测定吸光度。按回归方程计算稀释液多糖含量。按下式计算多糖含量: 多糖含量 (mg/g) = 待测液中多糖浓度 (mg/mL) × 溶液体积 (mL) × 稀释倍数 / 原料质量 (g)。

2 结果与分析

2.1 冬虫夏草菌株的分离纯化

对分离出的 50 株生长健壮、无杂菌、菌丝洁白的菌株进行多糖的提取, 并测定多糖含量, 根据葡萄糖标准曲线得到的回归方程, 计算虫草多糖得率。回归方程为 *y* = 10.399*x* - 0.019 5, *r* = 0.998 7。根据计算得到, CC-3 菌株的多糖得率最高, 达 6.619%。不同菌株的多糖含量结果见表 1。

表 1 菌株的多糖含量

菌株	多糖得率 (%)	菌株	多糖得率 (%)	菌株	多糖得率 (%)
CC-1	5.351	CC-18	6.176	CC-35	3.017
CC-2	3.487	CC-19	5.321	CC-36	2.892
CC-3	6.619	CC-20	4.33	CC-37	2.001
CC-4	6.037	CC-21	2.913	CC-38	3.792
CC-5	5.796	CC-22	1.248	CC-39	3.336
CC-6	5.541	CC-23	2.876	CC-40	5.12
CC-7	4.889	CC-24	2.561	CC-41	4.016
CC-8	2.317	CC-25	3.412	CC-42	3.921
CC-9	4.754	CC-26	3.617	CC-43	2.314
CC-10	3.612	CC-27	3.691	CC-44	2.691
CC-11	5.002	CC-28	5.413	CC-45	0.096
CC-12	5.336	CC-29	3.667	CC-46	0.176
CC-13	4.456	CC-30	4.831	CC-47	2.13
CC-14	3.341	CC-31	4.116	CC-48	3.367
CC-15	4.991	CC-32	2.317	CC-49	2.041
CC-16	3.287	CC-33	1.178	CC-50	0.931
CC-17	1.696	CC-34	2.759		

2.2 菌种的鉴定

选取多糖得率最高的 CC-3 菌株进行鉴定。鉴定结果如下:

2.2.1 菌体的形态观察 菌落近圆形, 菌落直径 0.8 ~ 1.5 cm, 边缘发散, 菌落突出, 表面不光滑, 颜色由白色变为微黄色。菌丝着色较深, 有分支, 无隔。孢子成穗状, 子囊孢子, 单个孢子近圆形, 孢子直径为 1.85 ~ 2.45 μm (图 1)。

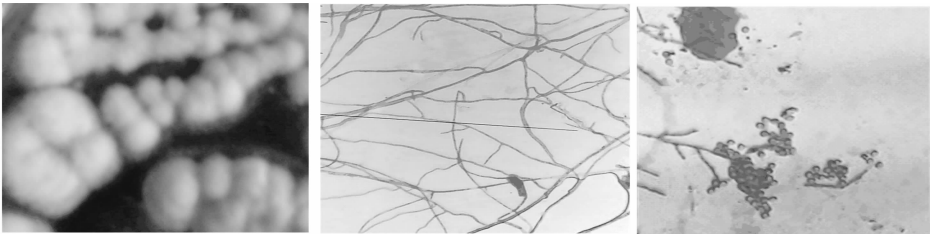


图 1 CC-3 菌株的菌落 (左)、菌丝 (中)、孢子 (右) 形态

2.2.2 菌株的 ITS 序列鉴定

2.2.2.1 琼脂糖凝胶电泳 将 PCR 产物扩增后进行琼脂糖凝胶电泳, 条带清晰、无拖尾, CC-3 菌株 ITS 区域电泳结果

见图 2。蛋白核酸测定仪测定后, 无蛋白、核酸及盐类等分子残留 (表 2)。

2.2.2.2 菌株系统发育树的构建 将 CC-3 菌株的 18S

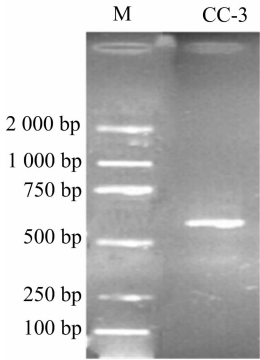


图2 CC-3 菌株 ITS 区域电泳图

表 2 核酸蛋白测定仪测定 CC-3 菌株

菌株	浓度 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$
CC-3	426	2.01	1.95

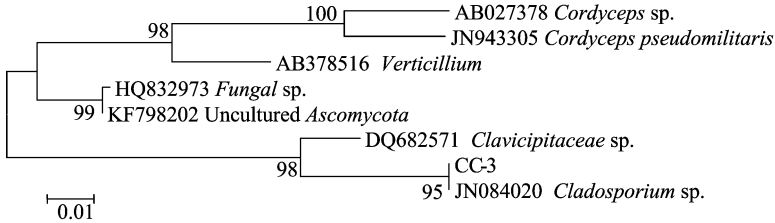


图3 CC-3 菌株 18S rDNA 序列的系统发育树

均为无性型阶段,因此,冬虫夏草无性型及菌种的鉴定至关重要。

最早人们判定冬虫夏草有性型和无性型的关系,依据假定无性型与虫草有性型子实体有相关性,用人工诱导虫草子实体的形成。人工诱导方法在人工诱导子实体长出子囊孢子非常困难,培养出的虫草子实体寥寥无几,人工诱导方法只能为虫草有性型和无性型的鉴定提供依据。

刘作易等从云南收集的新鲜冬虫夏草 (*Cordyceps sinensis*),利用微循环对其子囊孢子的产孢结构进行了观察,并与组织和子囊孢子分离的菌株的产孢结构进行比对,还与中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 的产孢结构进行比较。结果显示微循环的产孢结构与分离菌株和中国被毛孢的产孢结构相似,由此确定冬虫夏草的无性型为中国被毛孢^[13]。该方法虽操作简单,但必须先明确此菌株的种属关系,该方法在冬虫夏草无性型的鉴定上也还是一种辅助手段。

随着分子生物学的发展,RAPD-PCR 技术为确定虫草的无性型提供了可靠的分子生物学证据,但该方法不能很好地确定菌株的种和亚种。ITS 序列分析的发展,为菌株无性型与有性型关系及菌株的近缘关系方面提供了可靠证据。Kang 等报道,甘肃虫草和冬虫夏草具有相同的 ITS 序列,并认为甘肃虫草可能是冬虫夏草的分类异名^[14]。张泽文对古尼拟青霉菌种的完整的 rDNA 的 ITS 区进行序列测定并进行比对,结果表明,分离到菌种为古尼虫草的无性型,即古尼拟青霉 (*Paecilomyces gunnii*)^[15]。

本研究从采摘的新鲜冬虫夏草子实体中分离得到 CC-3 菌株,运用插片法对该菌株的菌丝形态和孢子结构进行显微观察,初步判断菌株的菌属关系,通过 RAPD-PCR 技术,用

rDNA 序列与 NCBI 比对,相似性见表 3,系统发育树见图 3。

3 讨论与结论

冬虫夏草的生活史分为有性型的子囊孢子阶段和无性型的分生孢子阶段。而人工培养、液体发酵菌丝体的冬虫夏草

表 3 CC-3 菌株与几种菌株的相似性比较

登录号	种名	菌种号	相似性 (%)
DQ682571	<i>Clavicipitaceae</i> sp.	IBL0.147	99.76
JN084020	<i>Cladosporium</i> sp.	KNUC255	100.00
HQ832973	<i>Fungal</i> sp.	BMP2899	97.03
KF798202	Uncultured <i>Ascomycota</i>	223	97.54
AB378516	<i>Verticillium</i> BTCC-F36	93.17	
AB027378	<i>Cordyceps</i> sp.	97009	88.67
JN943305	<i>Cordyceps pseudomilitaris</i>	NBRC101409	90.34

通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增出 18S rDNA 片段,进行序列比对,最后确定该菌株的种属关系。

多糖提取方法很多,如水提醇沉法提取多糖,在醇沉过程中会损失大量多糖;酶解法提取多糖,条件温和、质量好,但是经济价值高;热水浸提法提取多糖,方法简单易行,但效率较低。超声波产生的强烈振动和空化效应,使细胞破碎程度增大,加速了多糖的溶出,有利于多糖的提取。本试验采取超声波辅助热水浸提法提取虫草多糖。

多糖测定方法也很多,通常采用硫酸-蒽酮法、苯酚-硫酸法测定多糖的含量。硫酸-蒽酮法由于糖与蒽酮试剂的显色深度不同,糖混合时,常因不同糖类比例造成一定的误差。而苯酚-硫酸法测定多糖,方法简单、灵敏度高、不受蛋白质存在的影响,产生的颜色稳定。

从西藏新鲜的冬虫夏草中初步分离得到 50 株菌株,经过多糖含量测定,CC-3 菌株多糖得率最高,为 6.619%,多糖含量高达 6.619 mg/g。对 CC-3 菌株进行形态学观察、分子生物学 18S rDNA 序列分析,初步鉴定 CC-3 菌株为 *Cladosporium* sp. 菌株。

参考文献:

[1] 于洪飞. 冬虫夏草无性型鉴定的几种方法[J]. 安徽农业科学学报,2006,34(12):2763-2787.
[2] Kirk P M, Cannon P F, David J C, et al. Ainsworth & Bisbys: dictionary of the fungi[M]. 9th ed. Wallingford, UK: CAB International, 2001.
[3] 郭文场,刘颖,冯贺林,等. 冬虫夏草的研究[J]. 特产研究,1981(4):1-5.

尹红新,雷秀娟,宋娟,等.我国药用植物原生质体培养的研究进展[J].江苏农业科学,2015,43(3):243-245.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.079

我国药用植物原生质体培养的研究进展

尹红新,雷秀娟,宋娟,姚春林,王英平

(中国农业科学院特产研究所,吉林长春 130112)

摘要:对近年来药用植物原生质体的制备、培养、融合以及植株再生进行了综述,阐明了起始材料、酶解条件、培养方法等对原生质体培养的影响,并对今后药用植物原生质体的重点研究方向作了讨论。

关键词:药用植物;原生质体;酶解条件;培养;研究进展

中图分类号:Q942 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)03-0243-03

原生质体(protoplast)是指植物细胞中除去细胞壁后有生命活性的部分,除去细胞壁的原生质体能够直接摄入外源的细胞器、DNA、病毒、质粒等,是进行遗传转化研究的理想受体,对其进行细胞融合可获得杂种细胞^[1]。因此,植物原生质体在品种改良和生物学基础理论研究中有着广泛的应用前景,备受国内外研究学者的关注。1892年,Klercker首次用机械法进行原生质体的分离研究,但是原生质体获得量很少^[2]。1960年,Cocking采用酶解法从高等植物细胞中分离获得原生质体^[3]。随着纤维素酶和果胶酶的推行,植物原生质体培养逐渐成为一个热门话题^[4]。1971年,Takebe等首次从烟草叶片中分离出原生质体并获得再生植株,原生质体的培养进入一个新的阶段^[5]。在此基础上,药用植物原生质体的培养也有了一定的发展。目前,药用植物原生质体的培养已经扩展到夹竹桃科、五加科、紫草科、菊科、龙胆科、葫芦科、茄科、玄参科、天南星科等数十科。本文就近年来药用植物原生质体的制备、培养、融合以及植株再生进行综述,为今后药用植物原生质体培养的研究寻求切入点和突破点,提供新的

研究方法和有力的论证依据。

1 原生质体的分离

原生质体分离是进行原生质体培养的第1步,直接影响原生质体培养能否成功。其中,原始材料的生理状态,原生质体的分离、预处理方法以及游离纯化方法等都是影响原生质体分离的重要因素。原生质体的分离方法主要有机械法和酶解法2种。机械法存在产量低等缺陷,因此多采用酶解法进行原生质体的分离。

1.1 原始材料的选择

原始材料及其生理状态对原生质体的制备及其活力有很大的影响^[6]。生长旺盛、生命力强的组织和细胞是获得高活性原生质体的关键,并对原生质体的复壁、愈伤组织的形成以及植株再生有重要的影响。原生质体分离的原始材料有很多,只要选用的酶类型及用量合适,就可以在植物的任何部位获得游离的原生质体^[2]。据有关原生质体培养的报道,叶片是分离原生质体试验中常用的原始材料^[7]。张晓丽等以青天葵新鲜叶片为试验材料获得制备青天葵原生质体的理想条件与参数^[8]。愈伤组织和悬浮细胞生长迅速稳定,受环境条件影响比较小,更易获得大量高质量的原生质体。但是,长期培养的愈伤组织和悬浮细胞容易引起植株丧失再生能力,这就须要选择胚性状态的细胞团,这是再生植株所必需的^[9-10]。同时,基因型也会影响植物原生质体的培养,不同

收稿日期:2014-05-07

基金项目:吉林省青年科研基金(编号:20140520165JH)。

作者简介:尹红新(1988—),女,硕士研究生,研究方向为药用植物栽培学。E-mail:yinhongxin2008@126.com。

通信作者:王英平,男,博士,研究员,博士生导师。E-mail:yingpingw@126.com。

[4] Paterson R R. Cordyceps: a traditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69 (7): 1469-1495.

[5] Qiao D L, Luo J G, Ke C L. Immunostimulatory activity of the polysaccharide from *Hyriopsis cumingii* [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47: 657-680.

[6] 任健,张倩落,郑丽.人工虫草多糖对免疫低下小鼠免疫功能的影响[J].第四军医大学学报,2007,28(21):1967-1969.

[7] Schildkraut J J. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence [J]. *Am J Psychiatry*, 1965, 12: 509-522.

[8] 李春如. 35种虫草及其无性型鉴定、活性筛选和细脚拟青霉提取物的抗抑郁作用及相关机制[D].合肥:安徽医科大学,2006.

[9] 马明,杨克强,郭启荣.改良CTAB法提取林木树种基因组DNA的研究[J].生物技术,2007,17(3):36-37.

[10] 王洪凯,张天宇,张猛.应用5.8S rDNA及ITS区序列分析链格孢种级分类[J].菌物系统,2001,20(2):168-173.

[11] 宁慧青.不同食用菌多糖含量的比较研究[J].山西化工,2007(3):44-45.

[12] 荆留萍,杜双田,金凌云,等.8种物质对蛹虫草液体发酵中虫草素及多糖含量的影响[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2010,38(11):156-160.

[13] 刘作易,梁宗琦,刘爱英.冬虫草孢子囊孢子萌发及其无性型观察[J].贵州农业科学,2003,31(1):3-5.

[14] Kang J C, Liang Z Q, Liu A Y, et al. Molecular evidence of polymorphism in cordyceps based on 5.8S rDNA and ITS sequences [J]. *Mycosystema*, 2000, 19(4): 492-497.

[15] 张泽文,傅岚,陈作红.古尼虫草无性型的分子鉴别[J].菌物学报,2005,24(3):344-348.