

蛹虫草退化梯度的建立及退化过程中 相关分子机制的变化

张同宇¹, 巫迪¹, 马杰钊¹, 陈杰豪¹, 方玉鸿², 陈柏雄¹, 魏韬^{1*}

(1. 华南农业大学食品学院, 广东省微生物生态制剂工程技术研究中心, 广东广州 510640)

(2. 江门市山海堂虫草有限公司, 广东江门 529000)

摘要: 该研究以实验室人工栽培模拟工业生产工艺, 对蛹虫草菌株 ZGCM 进行重复传代培养, 人为建立了 1 至 7 代的菌种退化梯度株系, 以探究蛹虫草退化过程中的形态变化规律及其内在分子机制的变化。实验结果表明, ZGCM 菌株自第 2 代开始退化, 至第 6 代基本不产生子实体。培养基残糖含量随退化梯度菌种代际数目的上升而呈下降趋势, 第 5 代与第 1 代相比下降了 62.40%。培养基残余蛋白质含量在第 2 代下降后出现回升, 提示蛹虫草菌株随着传代次数的上升, 吸收外界氮源的能力持续下降。以 qRT-PCR 法测定过往报道中发现的 14 个转录水平变化趋势与蛹虫草退化代际数目呈线性相关的基因, 结果表明仅有 CCM_04090 基因的表达量呈上升趋势, 第 5 代与第 1 代相比提高了 39.60%, 与过往报道一致。其他基因均无显著变化。以 HPLC 法测定静置液体发酵液中的虫草素含量, 发现其随着传代次数的上升而下降。静置发酵 30 d 时, 第 5 代与第 1 代相比虫草素产量下降了 74.56%。结果表明蛹虫草菌株退化会对子实体产量和虫草素含量等两大产品品质核心因素造成负面影响。

关键词: 蛹虫草; 退化梯度; 虫草素; 逆转录定量 PCR

文章编号: 1673-9078(2023)06-70-78

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.6.0722

Establishment of the *Cordyceps militaris* Degeneration Gradient and Variations in Related Molecular Mechanisms

ZHANG Tongyu¹, WU Di¹, MA Jiezhao¹, CHEN Jiehao¹, FANG Yuhong², CHEN Baixiong¹, WEI Tao^{1*}

(1. College of Food Science, Research Center for Micro-Ecological Agent Engineering and Technology of Guangdong Province, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China)

(2. Jiangmen Shanhaitang Cordyceps Co. Ltd., Jiangmen 529000, China)

Abstract: Repeated subculture of the *Cordyceps militaris* strain ZGCM was performed in the laboratory to simulate strain degeneration during industrial cultivation. A gradually degenerated strain line was built over seven generations to explore the morphological changes and internal molecular mechanisms of degeneration. The results showed that strain ZGCM degenerates from the second generation, with no fruiting bodies observed by the sixth generation. The residual sugar in the culture medium is reduced over each generation, with sugar content decreasing by 62.40 % in the fifth generation as compared to the first generation. Furthermore, the residual protein content of the medium increased after the second generation, suggesting that the ability of *C. militaris* to absorb nitrogen from external sources declines continuously. The transcription levels of 14 differentially expressed genes that were linearly related to *C. militaris* generation were measured using qRT-PCR. However, only the CCM_04090 gene showed increased expression with each generation, increasing by 39.60 % in the fifth generation as compared to the first generation, which is

引文格式:

张同宇, 巫迪, 马杰钊, 等. 蛹虫草退化梯度的建立及退化过程中相关分子机制的变化[J]. 现代食品科技, 2023, 39(6): 70-78.

ZHANG Tongyu, WU Di, MA Jiezhao, et al. Establishment of the *Cordyceps militaris* degeneration gradient and variations in related molecular mechanisms [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(6): 70-78.

收稿日期: 2022-06-07

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金项目 (2019A1515110609); 广东省教育厅科研平台项目 (2020KTSCX019); 江门市基础与应用基础重点项目 (2020030103450009103); 中国博士后科学基金项目 (2020M682731)

作者简介: 张同宇 (1997-), 女, 硕士生, 研究方向: 蛹虫草基因工程, E-mail: ztyscau@stu.scau.edu.cn

通讯作者: 魏韬 (1989-), 男, 博士, 研究方向: 蛹虫草基因工程, E-mail: weitao@scau.edu.cn

consistent with previous reports, and no significant changes were observed for other target genes. According to the HPLC results, cordycepin production exhibited a general decline over each generation and, after 30 days of fermentation, fifth generation cordycepin production decreased by 74.56 % as compared to the first generation. The results indicated that strain degeneration has a negative impact on not only the production of fruiting bodies, but also on cordycepin production, both of which are core quality indicators of *C. militaris* products.

Key words: *Cordyceps militaris*; degeneration gradient; cordycepin; quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 是一种有着长久食用历史的珍贵食药两用真菌, 在中国及周边东南亚国家被广泛使用^[1]。蛹虫草子实体含有丰富的虫草素、喷司他丁、虫草多糖^[2,3]、蛋白质、虫草酸、甾醇类、核苷类化合物、类胡萝卜素以及微量元素^[4]。其中, 虫草素是蛹虫草中特有的核心生物活性物质, 具有抗肿瘤、抗氧化等功效^[5,6]。对于新冠肺炎, 虫草素也有很好的抗病毒活性^[7]。人工培育的蛹虫草中含量较高^[8], 可以达到 12.82 mg/g^[9], 目前主要以固体发酵和液体静置发酵为主^[10]。此外, 蛹虫草所含有的虫草多糖具有免疫调节、抗肿瘤、抗氧化、抗炎等生物活性^[11], 且蛹虫草所含的氨基酸种类包含人体所有必需氨基酸^[12,13]。

目前蛹虫草已实现人工栽培, 人工栽培的蛹虫草子实体与野生蛹虫草形态和有效成分一致, 且培养效率高, 技术难度小, 投资成本低, 产量高, 能够代替野生蛹虫草更好地满足市场对蛹虫草日益增长的需求^[14]。然而, 蛹虫草在人工继代培养和菌种保存过程中普遍存在退化现象, 严重制约了蛹虫草产业的发展, 并且带来巨大的经济损失和资源浪费^[15]。退化的蛹虫草菌种通常表现出气生菌丝旺盛^[16,17]、生长速度减慢^[18]、见光不转色^[19]、形成黄色渗出液^[20]、形成扇形突变区^[21]、分生孢子产生减少、原基数量减少、菌丝和分生孢子形态发生改变、次生代谢产物含量减少等现象^[22]。另外, 蛹虫草退化菌株的纤维素酶活性、淀粉酶活性以及胞外多糖含量都低于蛹虫草正常菌株, 但退化菌株的胞内多糖含量高于正常菌株^[18]。与未退化菌株相比, 退化菌株的脱色率下降、液体培养基的 pH 值升高^[23]。菌种退化是一个复杂, 由多因素作用下的过程。迄今为止, 蛹虫草退化这一难题尚未解决, 其退化的分子机制尚不清楚。其中遗传背景是决定因素, 表型变异和活性物质含量降低是菌种退化的主要表现形式^[18]。

本研究以实验室人工栽培模拟蛹虫草工业生产, 建立了实验室蛹虫草品种 ZGCM 的 1 至 7 代梯度退化菌种库。通过测定蛹虫草在退化过程中对培养基中糖类和蛋白质类的吸收和利用能力的变化, 14 种已报道与蛹虫草退化相关基因的表达水平变化, 以及虫草素产量的变化, 探究蛹虫草退化产生的表现现象及其内在机制, 为解决蛹虫草产业中的菌种退化现象提供新

的研究思路。

1 材料与方法

1.1 原料

ZGCM 菌株购自山东省宁阳县海鑫生物有限公司。

1.2 仪器与设备

T20 PCR 仪, 杭州朗基科学仪器有限公司; JJ1000Y 电子天平, 广州绿向生物科技有限公司; ME104E/02 电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; DYY-6C 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; GelDoc XR+凝胶成像仪, 美国伯乐 (BIO-RAD) 公司; MK-20 金属浴锅, 杭州奥盛生物科技有限公司; PB-10 pH 计, 德国赛多利斯; ND-1000 Nanodrop, 美国 Nanodrop 公司; XW-18DL 涡旋振荡器, 杭州齐威仪器有限公司; MICRO STAR 17R 小型冷冻离心机, 美国 VWR 公司; Eppendorf/5804R 大型台式冰冻离心, 德国艾本德生物科技有限公司; LTX-320 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; SKJH-1109 超净工作台, 上海苏坤实业有限公司; ULT1386-3-V6 -80 °C 冰箱, 美国赛默飞世尔 (ThermoFisher) 公司; YX-280D 手提式压力蒸汽灭菌锅, 合肥华泰医疗设备有限公司; LC-2030 高效液相色谱仪, 日本岛津制作所。

1.3 实验方法

1.3.1 退化梯度的建立

取 100 μ L 第一代的 ZGCM 菌株平板取得的孢子液涂布于 PPDA 平板, 暗培养 (25 °C) 2~3 d 后, 明暗交替培养 5~7 d (33%光照强度, 单个明暗培养循环包含 12 h 的光照培养和 12 h 的暗培养), 获得第二代菌株平板。取 200 μ L 孢子液于 PSDB 液体培养基震荡培养 4~5 d, 待液体呈粘稠状, 取 3 mL 接种至大米培养基栽培。25 °C 暗培养 2~3 d 后, 待平板表面覆盖一层白色菌丝, 转移至光照培养箱继续进行明暗交替培养 (25 °C, 33%光照强度, 单个明暗培养循环包含 12 h 的光照培养和 12 h 的暗培养)。3 周后获得第三代蛹虫草子实体。重复以上步骤, 得到蛹虫草全部 1~7 代的菌株平板和子实体。

1.3.2 蛹虫草子实体 RNA 的提取

用灭菌的剪刀剪取子实体, 加入液氮研磨后, 尽快用药勺取半勺子实体粉末至 1.50 mL 离心管。加入 300 μ L 抽提液 (10 \times STE Buffer, $m=10\%$ SDS, dd H₂O 按 2:1:7 的比例混合) 和 600 μ L PCI, 涡旋 30 s, 冷冻离心处理 (4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min, 5 min)。吸取 220 μ L 上清液至新的 1.50 mL 离心管, 加入等量 PCI, 涡旋 20 s, 冷冻离心 (4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min, 5 min)。吸取 200 μ L 上清液至新的 1.50 mL 离心管, 加入 20 μ L 的 NaAc, 轻轻混匀, 再加入 440 μ L 无水乙醇, 用移液枪吹打混匀, 于 -20 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min。沉淀结束后, 冷冻离心 (4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min, 5 min)。去上清, 加入 200 μ L $\varphi=70\%$ 乙醇进行洗涤, 冷冻离心 (4 $^{\circ}$ C, 14 000 r/min, 5 min)。去上清, 放置在空气中挥发乙醇, 加入适量超纯水溶解后, 通过琼脂糖凝胶电泳检测提取效果。

1.3.3 残余总糖测定

依照国标方法(GB/T 15672-2009)测定残余总糖: 将培养基放置在玻璃平板中, 置于 101~105 $^{\circ}$ C 烘箱中, 加热 1 h 后, 在干燥器中冷却 0.50 h。用剪刀剪成小块, 在 80 $^{\circ}$ C 干燥箱中烘至发脆, 冷却后立即粉碎。称取约 0.25 g 样品, 使其恒重, 计算其含水率。加入浓硫酸和水在 100 $^{\circ}$ C 中水解 3 h, 冷却过滤后将滤液和洗液用水定容至 250 mL 作为样品测试液。分别吸取 0、0.20、0.40、0.60、0.80、1 mL 的葡萄糖标准溶液补水至 1 mL。向试管加入 1 mL $m=5\%$ 苯酚溶液, 快速加入 5 mL 浓硫酸, 反应静置 10 min。涡旋混合后置于 30 $^{\circ}$ C

中反应 20 min。取适量反应液在 490 nm 处测吸光度, 以葡萄糖质量浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 制定标准曲线。准确吸取样品测试液 0.20 mL, 补水至 1 mL, 按照以上步骤操作, 以空白溶液调零, 测得吸光度, 以标准曲线计算总糖含量。

样品中总糖含量以质量分数 W 计, 数值以百分率 (%) 表示, 按下式计算。

$$W = \frac{m_1 \times V_1 \times 10^{-6}}{m_2 \times V_2 \times (1 - \omega)} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

W ——总糖含量质量分数, %;

V_1 ——样品定容体积, mL;

V_2 ——比色测定时所移取样品测定液的体积, mL;

m_1 ——从标准曲线上查得样品测定液中的含糖量, μ g;

m_2 ——样品质量, g;

ω ——样品含水量, %。

1.3.4 残余总蛋白质测定

考马斯亮蓝 G250 法测定蛋白质的含量: 取 6 只试管, 分别加入浓度为 0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mg/mL 的标准蛋白质溶液 (0.50 mg/mL 牛血清白蛋白溶液) 0.10 mL, 然后加入 5 mL 考马斯亮试剂, 振荡混匀, 2 min 后于 595 nm 测定吸光值。以蛋白质浓度为横坐标, 光吸收值为纵坐标绘制标准曲线。再取 0.10 mL 样品溶液, 加入 5 mL 考马斯亮蓝, 振荡混匀, 2 min 后于 595 nm 处测定吸光值。从标准曲线中查出相应的浓度。

1.3.5 qRT-PCR

表 1 14 个差异表达基因及其表达产物

Table 1 14 differentially expressed genes and their expression products

基因	基因 ID	RNA 或蛋白质
CCM_04549 (内参基因)	18166572	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
CCM_00152	18162187	链丝菌素乙酰转移酶
CCM_00249	18162284	DNA 切除修复蛋白
CCM_02812	18164839	丝状蛋白 (Rhfl), 推定
CCM_03369	18165395	假设蛋白质
CCM_03489	18165515	胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶
CCM_04090	18166113	α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶, 推定
CCM_04231	18166254	α -1,3-甘露糖基转移酶 (Alg3), 推定
CCM_04567	18166590	DNA 双链断裂修复蛋白
CCM_04531	18166554	性发育激活因子 VeA
CCM_05237	18167256	Phosducin 家族蛋白
CCM_06821	18168832	30 kDa 热休克蛋白
CCM_07990	18170000	醋酸转运蛋白, 推定
CCM_08733	18170738	甘露糖苷酶
CCM_09220	18171223	假设蛋白质

Yin 等^[19]在用 HiSeq4000 测序系统对所种植的蛹虫草 F₁ 至 F₆ 代进行基因测序的实验中, 使用了 qRT-PCR 对部分差异表达基因 (Differentially Expressed Genes, DEGs) 进行了检测。参照其实验方法, 本研究在蛹虫草退化过程中, 以蛹虫草甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, GAPDH) 为内参基因^[24], 选取了可能会产生线性变化的 14 个差异表达基因 (见表 1) 作为基因位点进行检测。所有基因引物委托天一辉远基因科技有限公司合成。

表 2 靶基因 qRT-PCR 检测引物

Table 2 qRT-PCR primers for target genes

Primer 名称	序列(5'~3')	碱基数
Cm-GAPDH-1	GCCGAGGAAACAACAGAA	18
Cm-GAPDH-2	GCAGTCGTGGCAAGGAT	17
CCM_00152_F	CGACAGTGTACCACCATGAGC	22
CCM_00152_R	GGTATTGGCCGTGTTTGAAAGG	22
CCM_00249_F	ACCACCTACGACACCTACAAGAAC	24
CCM_00249_R	CGTGCCAGTCAGCCCAAT	18
CCM_02812_F	AGGTGGGCTGGTTGATGAGA	20
CCM_02812_R	TGGTTGGGTTGAAAGGTTGC	20
CCM_03369_F	TCGGGCAGCGGAGAACTA	18
CCM_03369_R	AGAACAGCGTCCAAAGACAAAA	22
CCM_03489_F	GCTCCCTCACCGAGACACCCAA	22
CCM_03489_R	ACCTTGCCGCCAGTCACCAGAG	22
CCM_04090_F	TACCAATGGAGCGACTGGGAGAA	23
CCM_04090_R	GCCCTTGATGTTGCCGAAGC	20
CCM_04231_F	GCCGCATCTACTACCCTGTCC	21
CCM_04231_R	CGTCACGTTATCGGTCGAGTTT	22
CCM_04567_F	GCGCCCGTCAAGGAGGAAGA	20
CCM_04567_R	CGAAGCCGTCGCTCTGTTG	20
CCM_04531_F	AAGCCTTGCTCTGCTGCC	19
CCM_04531_R	CGTGGGTTGCTCCTGTAGTG	20
CCM_05237_F	CCCCGTGTTTGCAACCTTAC	21
CCM_05237_R	TGATGTCGCCGCTACTCTTGC	20
CCM_06821_F	AAGAGCGACGTGAGCATCGAGTT	23
CCM_06821_R	CGACAGCGGGAATGGATACAG	21
CCM_07990_F	ATCGGTGCGTTTGCCACGAC	20
CCM_07990_R	CCACTGGGCGGAAATGAGG	19
CCM_08733_F	CCTGGCGGGGCTTCAACTC	19
CCM_08733_R	CTGGACGGGCGTGCATCG	19
CCM_09220_F	CAGCAACGCCGAGAAAGTCA	21
CCM_09220_R	GCGGTCGTCGCTCTGTGGATT	21

以提取的 RNA 作为起始模板, 在同一反应体系中合成第一链 cDNA。RT-qPCR 实验步骤参照

TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 高特异性方法, 合成引物, 引物序列如, 按照配方进行 qPCR 液的混合 (20 μ L): 2 \times TransStart Top 10 mL, 各基因引物 1.20 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 7.80 μ L。振荡混匀或使用移液枪吸打均匀, 42 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。针对其高特异性, 实验选择两步法进行 qPCR。

1.3.6 虫草素含量测定

取孢子液 200 μ L 接种到装有 70 mL Basal 培养基 (蛋白胨 20 g/L, 维生素 B1 10 mg/L, 蔗糖 24.70 g/L, MgSO₄ 7H₂O 1.11 g/L, KH₂PO₄ 3H₂O 0.90 g/L) 的 250 mL 三角瓶中, 置于 25 $^{\circ}$ C (150 r/min) 摇床中震荡培养 8 d, 得到菌丝球。将 1 mL 移液枪枪头嘴部约三分之一剪去, 灭菌, 取 5 mL 含菌丝球菌液接种到装有 50 mL addition 培养基 (Basal 培养基中加入 8 g/L L-丙氨酸) 的 250 mL 组培瓶中。将发酵瓶置于 25 $^{\circ}$ C 黑暗培养箱中, 静置发酵 30 d。每隔 10 d 时间进行取样, 用移液枪从菌丝饼的边缘深入发酵液中, 吸取 2 mL 发酵液转移到 2 mL 离心管中, 做好标记并保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

HPLC 条件: 色谱柱采用月旭 (Welch) 公司的 Ulimite® AQ-C18, 流动相 (甲醇:水=80:20), 流速为 1 mL/min, 检测波长为 260 nm, 进样体积为 20 μ L, 柱温为 30 $^{\circ}$ C。样品先经过离心 (8 000 \times g, 5 min), 将上清液过膜处理至样品瓶待用。将发酵液进行 HPLC 检测, 测定虫草素产量。精确称取 10 mg 虫草素标品 (Sigma-Aldrich, USA), 溶于 10 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 即为 1 mg/mL 虫草素溶液。再分别取 0.40、0.60、0.80、1 mL 上述溶液于 10 mL 容量瓶中, 定容至刻度, 经 0.20 μ m 微孔滤膜压滤后进行测定。以虫草素标准溶液质量浓度 (μ g/mL) 为 X 轴, 峰面积为 Y 轴, 绘制标准曲线。样品经 0.20 μ m 微孔滤膜压滤后进行测定。从标准曲线中查出相应的浓度。

1.3.7 数据分析

数据使用 Graphpad Prism 9 绘图及 SPSS 24 进行单因素方差分析 (Duncan Test, $P < 0.05$)。

2 结果与讨论

2.1 建立蛹虫草菌种退化梯度

以同样温度、相等培养时长传代培养蛹虫草菌株 ZGCM, 获得包含母本 (D1) 和子代 (D2 至 D7) 共 7 代的传代培养菌株, 建立了蛹虫草 ZGCM 菌株的梯度退化菌种库。如图 1 所示, 蛹虫草在 D1 代生长状态良好, 其菌孢子实体长势较为均匀和密集, 颜色鲜

艳。然而，自 D2 起，菌株出现退化。与 D1 对比，D2 子实体数量急剧减少，出现形态畸形的子实体，并且个别子实体头部出现分叉，部分表面出现“白脸”和绒状菌丝。D5、D6 代菌株与 D4 代相比，子实体几不可见，培养基表面大部分泛白。D7 代菌株无子实体形成，培养基表面泛黄。这一整体趋势与 Juan 等^[19]的报

道是基本一致的。然而，子实体仅能在完成菌丝体扩大培养等步骤后出现，属于生产末端的可检测参数，对生产计划的指导意义相对滞后。因此，获得可在菌丝期测定的与子实体形成状况强关联的检测参数，才是解决蛹虫草菌种在子实体形成方面不稳定的问题的前期可行研究方向。

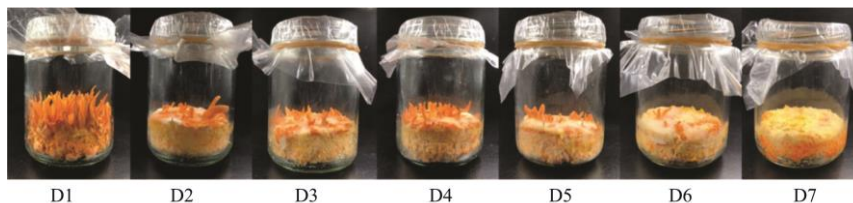


图1 蛹虫草 D1 至 D7 梯度退化菌种子实体培养情况

Fig.1 Fruiting body of D1-D7 *C. militaris* degeneration gradient

2.2 发酵液虫草素产量测定

配置浓度分别为 40、60、80、100 μg/mL 的虫草素标准溶液，通过 HPLC 测定，以峰面积对虫草素的浓度作标准曲线，得出回归方程为 $y=60\ 663x-157\ 516$ ，回归系数为 0.99。对 D1~D7 代进行静置液体发酵。通过 HPLC 分别测定 D1 至 D7 菌株虫草素含量变化。结果如图 2 所示。随着菌株所经历的传代次数的上升，其虫草素含量曲线整体下移。其中发酵 10 d 的 D5 代菌株的虫草素产量出现了回升可能是因为发酵时间太短，虫草素产量还在上升阶段。静置发酵 30 d 时，第 5 代与第 1 代相比虫草素产量下降了 74.56%，符合前期研究的结果^[25]。

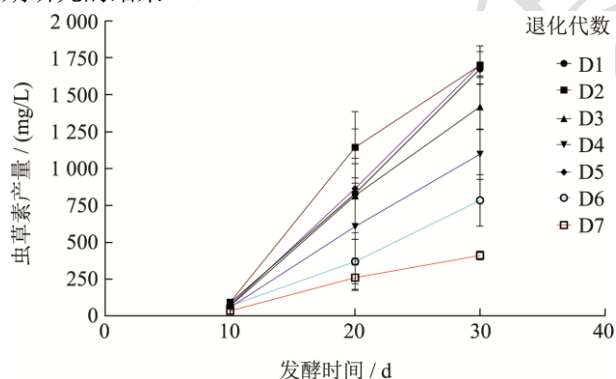


图2 HPLC 测定 ZGCM D1 至 D7 发酵虫草素 10、20、30 d 的产量

Fig.2 The yield of cordycepin fermented by strains ZGCM D1 to D7 for 10, 20, 30 days

2.3 初步测定培养基残余总糖及残余总蛋白质

由于 D6、D7 代无法形成子实体，对培养 D1 至 D5 代中的大米谷物培养基的残糖量进行测定。结果如图 3 所示。表示蛹虫草退化菌株 D1 至 D4 的大米谷物培养基的残糖含量的 OD₄₉₀ 值分别为 1.79、0.86、0.75 和 0.67，呈显著下降趋势。D4 与 D1 相比，OD₄₉₀ 值

下降 62.40%。而 D5 的残糖含量较 D4 却略有回升，吸光值达 0.73。除 D5 略有回升外，其总体趋势为下降。推测该现象可能是细胞对糖转化实现细胞生长的效率下降，导致需要通过增加糖类代谢量来代偿。蛹虫草在自然界主营腐生，具备对多种单糖的主动运输载体蛋白。因此，菌丝培养基的残糖含量和单糖转运蛋白的表达水平可能被开发为判断菌种退化程度的前置靶点。

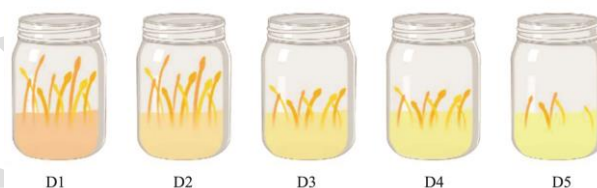


图3 不同退化代数蛹虫草菌株培养基中残糖和残蛋白的含量

Fig.3 Contents of residual sugars and proteins in the media of different *C. militaris* degeneration strains

注：D1：残糖含量为 13.05%，残蛋白含量为 1.23%；D2：残糖含量为 6.09%，残蛋白含量为 0.66%；D3：残糖含量为 5.32%，残蛋白含量为 8.39%；D4：残糖含量为 4.72%，残蛋白含量为 1.09%；D5：残糖含量为 5.17%，残蛋白含量为 1.10%。

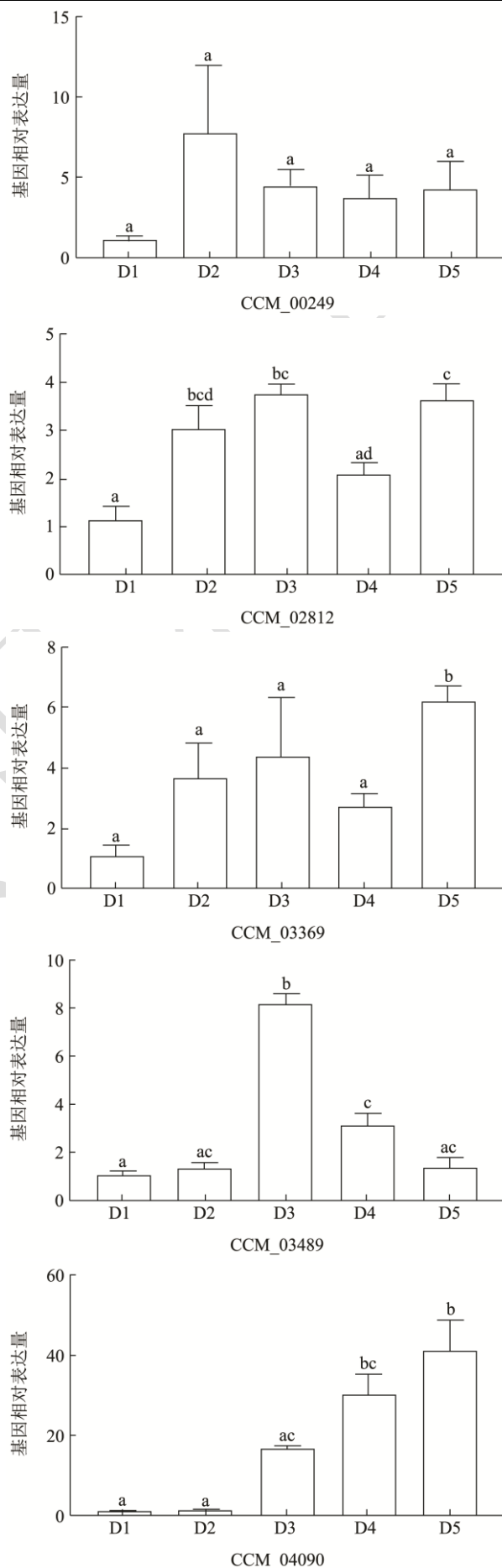
另一方面，对培养 D1 至 D5 代菌株的大米谷物培养基的残蛋白量进行测定，结果如图 2 所示，蛹虫草 ZGCM 五代菌株的培养基含蛋白量差异明显，呈 U 型曲线。D1 代含量较高，D2 代含量显著下降，为各代菌株中的最低值。D3 至 D5 代残蛋白量出现回升，其中 D4 与 D5 的含量无显著差异，与预期的线性变化趋势不符。前期总残蛋白含量大幅下降可能是由于退化而导致细胞对蛋白质的利用率降低，需要通过增加蛋白质代谢量来代偿；后期总残蛋白含量的回升则可能是由于蛹虫草菌株退化导致酶的表达量减少，从而导致蛋白质的消耗量减少。在侵染初期，蛹虫草主要通过菌丝生长的物理侵入和虫草素合成及分泌的胃毒性

作用而杀死虫蛹^[26]。这两种途径都需要合成大量的蛋白，但这与退化菌株的培养基残蛋白质含量随传代数上升而快速下降的前期趋势不符，提示背后的代偿机制可引入蛋白组分析以深入挖掘内在机制。

由于退化后期的菌种出现严重的污染，本研究未能获得所有退化梯度菌株的三次重复数据，因此此部分数据仅为初步探索，后续仍需重复该部分实验，从而获得具有生物学重复的测定数据。

2.4 实时荧光定量 qPCR 结果

由于 D6、D7 代无法形成子实体，因此同样只选取 D1 至 D5 代菌株的子实体样品进行 qRT-PCR 实验。由图 4 可知，14 种目标基因在 D1 至 D5 菌株的转录水平各有差异。只有 CCM_04090 基因转录水平随代际数目上升而连续上升，第 5 代与第 1 代相比提高了 39.60%。根据过往生信分析研究报道，CCM_04090 基因编码 α -N-乙酰氨基葡萄糖苷酶^[27]。该酶主要在生物体中催化碳水化合物水解^[28]。该反应在蛹虫草的生命过程中起重要作用。因此，CCM_04090 基因的转录水平与代际数目的关系提示，蛹虫草种质退化过程中，可能发生菌体代谢紊乱，导致碳源利用率下降。相似的是，CCM_07990 基因编码醋酸转运蛋白^[27]。该蛋白与碳源的转运密切相关。由于在本研究中，随着代际数目的增加，蛹虫草菌株不但子实体产量显著下降，且其培养基残糖水平也呈下降趋势。现有生化研究已知，醋酸（乙酸）一般经活化变成乙酰辅酶 A 进入三羧酸途径，因此也被部分微生物作为碳源利用^[29]。因此，CCM_07990 基因的转录水平与代际数目的关系提示，蛹虫草退化菌种的碳源充分转化利用能力可能随代际数目增加而下降，使得单个细胞需要从培养基获取更多的碳源物质，进一步导致培养基中残糖含量随代际数目增加而下降。编码热休克蛋白的 CCM_06821 基因转录水平同样随代际数目上升而上升，但其样本中的最高值远低于 CCM_04090 基因，提示热休克蛋白的表达水平可能并不是蛹虫草菌种退化的核心因素。



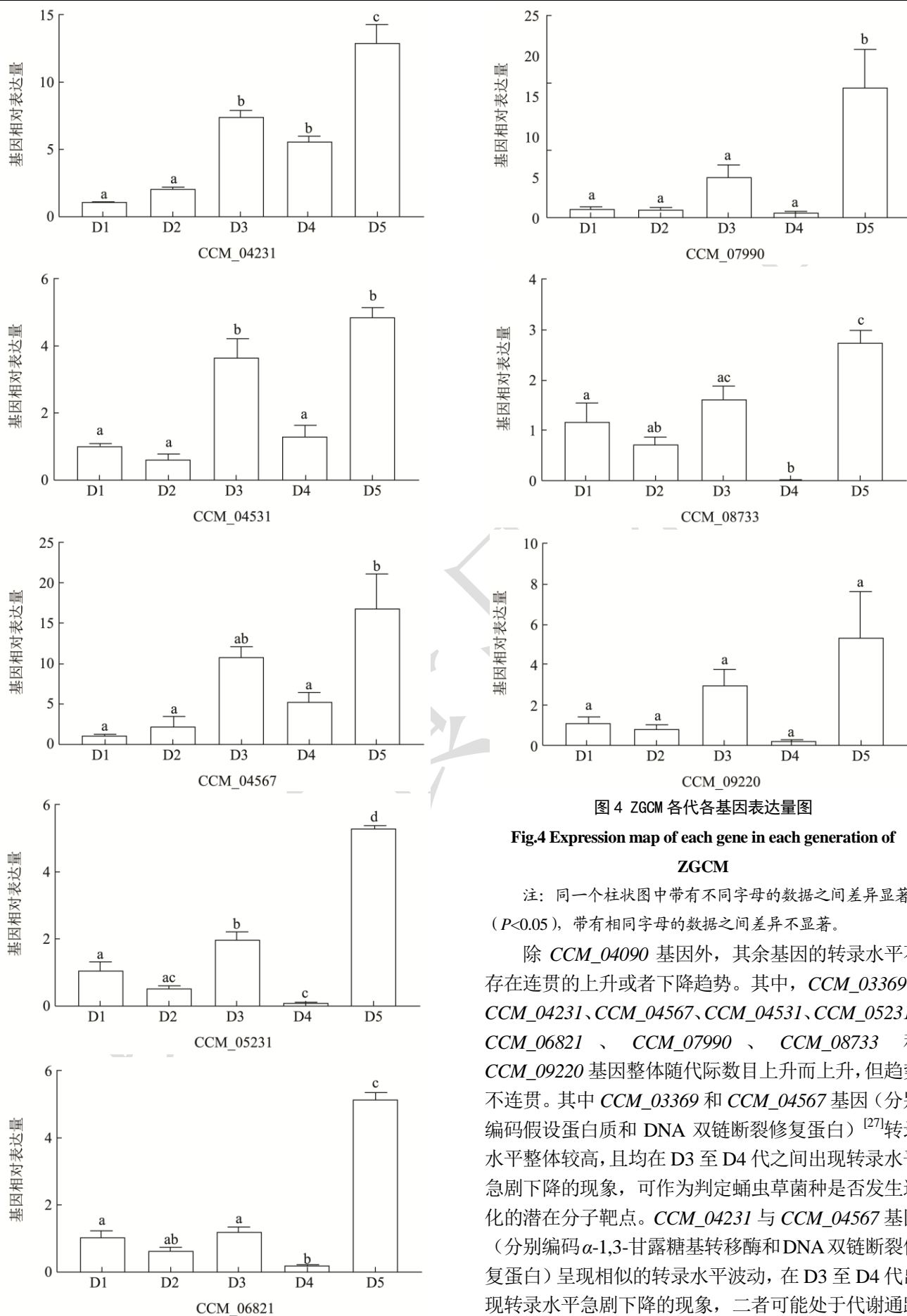


图4 ZGCM 各代各基因表达量图

Fig.4 Expression map of each gene in each generation of ZGCM

注：同一个柱状图中带有不同字母的数据之间差异显著 (P<0.05)，带有相同字母的数据之间差异不显著。

除 CCM_04090 基因外，其余基因的转录水平不存在连贯的上升或者下降趋势。其中，CCM_03369、CCM_04231、CCM_04567、CCM_04531、CCM_05231、CCM_06821、CCM_07990、CCM_08733 和 CCM_09220 基因整体随代数数目上升而上升，但趋势不连贯。其中 CCM_03369 和 CCM_04567 基因（分别编码假设蛋白质和 DNA 双链断裂修复蛋白）^[27]转录水平整体较高，且均在 D3 至 D4 代之间出现转录水平急剧下降的现象，可作为判定蛹虫草菌种是否发生退化的潜在分子靶点。CCM_04231 与 CCM_04567 基因（分别编码 α -1,3-甘露糖基转移酶和 DNA 双链断裂修复蛋白）呈现相似的转录水平波动，在 D3 至 D4 代出现转录水平急剧下降的现象，二者可能处于代谢通路

上下游基因的关系。*CCM_00152*、*CCM_04531*、*CCM_05231*、*CCM_06821* 和 *CCM_08733* 基因(分别编码乙酰基转移酶、性发育激活因子 VeA、Phosducin 家族蛋白、30 ku 热休克蛋白、甘露糖苷酶 MsdS) 转录水平远低于整体受检测基因的平均水平, 同样提示其可能并不是蛹虫草菌种退化的核心因素。基因 *CCM_03489* 编码胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶, 其转录水平先升后降, 未呈现出线性的变化趋势。

蛹虫草工业化大规模栽培工艺已在我国多个省份推广, 如能获得可在种子液阶段预测菌种产能的靶点基因, 将有助于规避蛹虫草自然菌种退化特性对工业生产中的影响。与 Yin 等^[19] 研究报道相比, 本研究在 q-PCR 上做了 3 次重复的情况下, 所测定的 14 个靶基因的转录水平中仅有 *CCM_04090* 基因转录水平变化趋势相对一致, 其余靶基因转录水平变化趋势差别较大。这一结果既提示 *CCM_04090* 基因的潜在研究价值, 也反映解析蛹虫草菌种退化机制的技术难度。靶基因测得结果与预期的不一致性, 可能由 4 方面的因素造成: (1) 菌株差异性; (2) 菌丝形态结构及纠缠模式可能影响靶基因的转录水平; (3) 单核的分生孢子难以与双核的子实体细胞区分, 对 mRNA 含量测定造成叠加干扰; (4) mRNA 易自发降解, 影响低丰度 mRNA 分子的测定结果。然而, 随着蛹虫草基因组代谢网络的深入解析^[30] 及合成生物学研究工具^[31-33] 的开发, 通过开发基于荧光蛋白偶联表达的对靶基因表达水平的可视化跟踪技术, 有望更为高效地破译子实体产能预测靶点, 解析蛹虫草退化分子机制。

3 结论

本研究对蛹虫草菌株 ZGCM 进行重复传代培养, 人为建立了 1 至 7 代的梯度退化菌种库, 以探究蛹虫草退化过程中的形态变化规律及其内在分子机制。实验结果表明, ZGCM 菌株自第 2 代开始退化, 至第 6 代基本不产生子实体。子实体作为目前蛹虫草的主要产品形态, 随着菌种传代数目的上升, 其具体形状畸变严重, 形成率显著下降。而作为核心活性成分的虫草素, 以 HPLC 法测定静置液体发酵液中的含量, 发现其随着传代次数的上升而下降, 与子实体产生趋势相似。提示菌株退化在子实体形成和虫草素合成方面均会发生负面变化, 因此对蛹虫草生产确实是致命的。培养基残糖含量随退化梯度菌种代际数目的上升而呈下降趋势。培养基残余蛋白质含量在第 2 代下降后出现回升, 提示蛹虫草菌株随着传代次数的上升, 吸收外界营养物质的能力持续下降。以 qRT-PCR 法测定过往报道中发现的 14 个转录水平变化趋势与蛹虫草退

化代际数目呈线性相关的基因, 结果表明仅有 *CCM_04090* 的表达量呈上升趋势。其他基因均无显著变化。蛹虫草工厂化栽培已在我国绝大部分省份实现, 是我国产量和消费量较大的人工栽培食用菌品种之一。然而, 蛹虫草菌种在传代过程中易退化的特点, 严重制约了其种质资源的深度开发, 使得大部分蛹虫草产品停留在子实体浅加工的状态, 不利用该行业的长远发展。本研究通过建立梯度退化菌种库, 并对其子实体生长、培养成分消耗、核心化合物产量变化、关键靶基因转录水平进行分析测定, 为蛹虫草菌种退化分子机制的揭示打下了基础。

参考文献

- [1] 林群英, 宋斌, 李泰辉. 蛹虫草研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 4(33): 154-157.
- [2] 汪宇, 杨光照, 康万军, 等. 高效液相色谱法测定天然冬虫夏草和蛹虫草及其人工培养物中 3 个核苷类化合物含量[J]. 中国医院药学杂志, 2015, 35(9): 805-808.
- [3] 文庭池, 查岭生, 康冀川, 等. 蛹虫草研究和开发过程中的一些问题和展望[J]. 菌物学报, 2017, 36(1): 14-27.
- [4] YIN Yalin, YU Guojun, CHEN Yijie, et al. Genome-wide transcriptome and proteome analysis on different developmental stages of *Cordyceps militaris* [J]. PloS One, 2012, 7(12): e51853.
- [5] XIA Yongliang, LUO Feifei, SHANG Yanfang, et al. Fungal cordycepin biosynthesis is coupled with the production of the safeguard molecule pentostatin [J]. Cell Chemical Biology, 2017, 24(12): 1479-1489.
- [6] 周啟林, 孙永健. 虫草素的分离纯化研究进展[J]. 食用菌, 2020, 42(4): 9-12.
- [7] Verma A K. Cordycepin: a bioactive metabolite of *Cordyceps militaris* and polyadenylation inhibitor with therapeutic potential against COVID-19 [J]. J Biomol Struct Dyn, 2020: 1-8.
- [8] WU Weiding, HU Zhiming, SHANG Minjie, et al. Cordycepin down-regulates multiple drug resistant (MDR)/HIF-1 α through regulating AMPK/mTORC1 signaling in GBC-SD gallbladder cancer cells [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(7): 12778-12790.
- [9] 林培捷, 陈柏雄, 陈乐涛, 等. 高产虫草素的蛹虫草新品种选育[J]. 食品与生物技术学报, 2022, 41(3): 59-65.
- [10] 赵星月, 李倩, 刘文静, 等. 蛹虫草菌生物合成虫草素的研究进展[J]. 生物工程学报, 2020, 36(7): 1293-1304.
- [11] ZHANG Jixian, WEN Chaoting, DUAN Yuqing, et al.

- Advance in *Cordyceps militaris* (Linn) link polysaccharides: isolation, structure, and bioactivities: a review [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 132: 906-914.
- [12] 施新琴,乔鹏,李化秀,等.不同菌株及培养基质对蛹虫草氨基酸组成的影响[J].蚕业科学,2019,45(4):614-619.
- [13] Hur H. Chemical ingredients of *Cordyceps militaris* [J]. Mycobiology, 2018, 4(36): 233-235.
- [14] 刘佳慧,刘毓婷,崔明辉,等.蛹虫草人工栽培技术研究进展[J].南方农业,2021,15(27):17-18.
- [15] YIN Juan, XIN Xiangdong, WENG Yujie, et al. Genotypic analysis of degenerative *Cordyceps militaris* cultured in the pupa of *Bombyx mori* [J]. Entomological Research, 2018, 48(3): 137-144.
- [16] 尹昕,李晓玲,邹根,等.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[J].食用菌学报,2022,29(2): s1-12.
- [17] Kontogiannatos D, Koutrotsios G, Xekalaki S, et al. Biomass and cordycepin production by the medicinal mushroom *Cordyceps militaris* - A review of various aspects and recent trends towards the exploitation of a valuable fungus [J]. Journal of Fungi, 2021, 7(11): 986.
- [18] XIONG Chenghui, XIA Yongliang, ZHENG Peng, et al. Increasing oxidative stress tolerance and subculturing stability of *Cordyceps militaris* by overexpression of a glutathione peroxidase gene [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(5): 2009-2015.
- [19] YIN Juan, XIN Xiangdong, WENG Yujie, et al. Transcriptome-wide analysis reveals the progress of *Cordyceps militaris* subculture degeneration [J]. Plos One, 2017, 12(10): e186279.
- [20] SUN Shujing, DENG Changhuan, ZHANG Liaoyuan, et al. Molecular analysis and biochemical characteristics of degenerated strains of *Cordyceps militaris* [J]. Archives of Microbiology, 2017, 199(6): 939-944.
- [21] 姜宛岑,王晨露,朱正州,等.蛹虫草继代中菌株退化早期外部识别标志研究[J].园艺学报,2022,49(4):851-860.
- [22] 周影,王芹,张俊辉,等.蛹虫草退化菌株的研究进展[J].北方蚕业,2021,42(1):1-5.
- [23] 李美娜,吴谢军,李春燕,等.人工栽培蛹虫草退化现象的分子分析[J].菌物系统,2003,2:277-282.
- [24] 高银雪,庞震国,常亚青,等.基于实时荧光定量 PCR 对刺参内参基因稳定性的分析[C]//“全球变化下的海洋与湖沼生态安全” 学术交流会论文摘要集.中国江苏南京,2014:150.
- [25] 周思池.蛹虫草菌株退化机制初探与高效基因编辑技术的构建[D].长春:长春工业大学,2020.
- [26] Kato T, Nishimura K, Suparmin A, et al. Effects of cordycepin in *Cordyceps militaris* during its infection to silkworm larvae [J]. Microorganisms, 2021, 9(4): 681.
- [27] ZHENG Peng, XIA Yongliang, XIAO Guohua, et al. Genome sequence of the insect pathogenic fungus *Cordyceps militaris*, a valued traditional Chinese medicine [J]. Genome Biol, 2011, 12(11): R116.
- [28] Shimada Y, Watanabe Y, Wakinaka T, et al. α -N-Acetylglucosaminidase from *Bifidobacterium bifidum* specifically hydrolyzes α -linked N-acetylglucosamine at nonreducing terminus of O-glycan on gastric mucin [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015, 99(9): 3941-3948.
- [29] 阮红.谷氨酸棒状杆菌乙酸代谢调控的研究[D].杭州:浙江大学,2001.
- [30] Vongsangnak W, Raethong N, Mujchariyakul W, et al. Genome-scale metabolic network of *Cordyceps militaris* useful for comparative analysis of entomopathogenic fungi [J]. Gene, 2017, 626: 132-139.
- [31] LOU Haiwei, YE Zhiwei, YUN Fan, et al. Targeted gene deletion in *Cordyceps militaris* using the split-marker approach [J]. Mol Biotechnol, 2018, 60: 380-385.
- [32] CHEN Baixiong, WEI Tao, YE Zhiwei, et al. Efficient CRISPR-cas9 gene disruption system in edible-medicinal mushroom *Cordyceps militaris* [J]. Front Microbiol, 2018, 12(9): 1157.
- [33] LYU Mengdi, ZENG Jiapeng, ZHOU Yue, et al. Overlapping promoter library designed for rational heterogenous expression in *Cordyceps militaris* [J]. Microb Cell Fact, 2022, 21: 107.