

蓝光诱导蛹虫草虫草素含量和分生孢子数的变化

金华燕, 沈俊良, 付鸣佳*, 高雅, 黄妮娜 (江西师范大学生命科学学院, 江西南昌 330022)

摘要 [目的] 研究蓝光对蛹虫草菌丝体中虫草素含量和分生孢子量的影响。[方法] 以蛹虫草为材料, 在不同的蓝光照射时间取样, 以检测菌丝体中虫草素的含量, 并计数蛹虫草分生孢子的产生量。[结果] 蛹虫草受蓝光照射后, 其虫草素的产生受到了一定的抑制, 同时虫草素含量的变化也有一定的波动性; 在相同的时间点, 受蓝光照射的蛹虫草分生孢子数量比黑暗时的分生孢子数量要多, 同时在一定时间范围内分生孢子数均呈上升趋势。[结论] 该研究为系统性的研究蓝光对蛹虫草的影响奠定了基础。

关键词 蓝光; 蛹虫草; 虫草素; 分生孢子

中图分类号 S567.3*5 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)01-00409-02

Changes of Cordycepin Content and Conidia Amount of *Cordyceps militaris* by Blue Light Induction

JIN Hua-yan et al (College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022)

Abstract [Objective] The aim was to study the effects of blue light on cordycepin content and conidia amount of *Cordyceps militaris* mycelium. [Method] The cordycepin content of mycelium and amount of *Cordyceps militaris* conidia was detected at different blue light irradiation times by using *Cordyceps militaris* as materials. [Result] The production of cordycepin was inhibited to a certain degree and the changes of cordycepin content also had a certain fluctuation after the *Cordyceps militaris* was irradiated by blue light; the amount of conidia of *Cordyceps militaris* irradiated by blue light was more than its number in the darkness at the same sampling time, and the number of conidia had been on an upward trend during a definite period of time at the same time. [Conclusion] This study provided foundation for the system researches on the effects of blue light on *Cordyceps militaris*.

Key words Blue light; *Cordyceps militaris*; Cordycepin; Conidium

蛹虫草 (*Cordyceps militaris*) 又称北冬虫夏草, 属真菌子囊菌纲麦角菌科的一种昆虫病原真菌。近年研究证明蛹虫草除富含蛋白质、氨基酸、维生素及钙、铁、锰、锌、硒等微量元素外, 还含有虫草素 (cordycepin)、虫草酸 (cordycepic acid)、虫草多糖和 SOD 等生物活性物质, 具有扩张血管、镇静、抗菌、降血压等功效^[1]。卫生部于 2009 年 3 日发布公告批准蛹虫草为新资源食品。有研究发现, 蛹虫草菌丝体在受蓝光照射后, 其生长特性会发生改变, 其中产生的类胡萝卜素^[2]和虫草多糖^[3]含量会随蓝光光照强度和光照时间而发生变化。

现已知道蓝光对真菌的许多形态发育和生理生化有重要影响^[4]。例如, 已有研究表明, 蓝光可诱导多种真菌产生类胡萝卜素^[2,5-8]; 蓝光可诱导真菌无性孢子的形成, 代表性的研究是在布拉克须霉菌 (*Phycomyces blakesleeanus*) 上, 蓝光可诱导其大型孢子囊的产生, 而抑制小型孢子囊的产生^[8]; 对较高等的担子菌灰盖鬼伞 (*Coprinus cinereus*) 的研究显示, 其双核菌丝不产生粉孢子 (oidia), 仅在适宜的环境条件下分化成子实体, 而单核菌丝 (Monokaryotic mycelia) 在蓝光诱导下可大量形成粉孢子^[9]。蓝光可诱导一种拟盘多毛孢真菌 *F(Pestalotiopsis sp. F)* 产生分生孢子器^[10]。此外, 蓝光对真菌的菌丝体发育、趋光性和生理节律性等方面也有影响^[4]。在文中, 笔者以蛹虫草为材料, 研究了蓝光照射后对蛹虫草产虫草素和产分生孢子数量的影响。

1 材料与方法

1.1 培养基 马铃薯培养基: 马铃薯 200 g, 蔗糖 20 g, 琼脂

20 g, 水 1 L, pH 自然。产虫草素发酵培养液: 白砂糖 3%, 玉米粉 2.5%, 酵母膏 0.5%, MgSO₄ 0.05%, KH₂PO₄ 0.05%, pH 7.0。

1.2 菌种和菌种活化 蛹虫草菌种由实验室保存, 将保存于 4 °C 冰箱内的斜面菌种取出, 室温放置 1 h, 划线接入培养皿中, 26 °C 活化 5 d。

1.3 蛹虫草菌丝体培养和蓝光照射 将马铃薯培养基上的蛹虫草菌丝体用镊子撕下来, 直接加入装于 250 ml 锥形瓶的 150 ml 产虫草素发酵培养液中, 于 200 r/min、26 °C 下进行摇瓶培养, 3 d 后再次扩大培养, 按接种量 10% 接入含 150 ml 发酵液的 250 ml 锥形瓶中, 再于 200 r/min、26 °C 下摇瓶培养 2 d。将所得菌液分装至直径 150 mm 的培养皿内, 用锡箔纸包裹, 经 3 d 的黑暗静置培养, 菌丝体已长在培养基表面, 然后将蓝光组放置在蓝光下诱导培养, 黑暗组依然用锡箔纸包裹培养。

1.4 虫草素的提取 每隔 12 h 取一次样, 并保持每个培养基取完样后放在同一位置, 以便保持同样的采光率, 将所取样品转入 2 ml 离心管中, 置于 -70 °C 下保存, 待整个取样完成后一并处理。经 10 次取样后, 将所有样品取出处理。样品中虫草素的提取采用张嘉等^[11]的醇热回流方法, 并进行了适当改进, 每 0.1 g 菌丝粉末加 1 000 μl 70% 乙醇, 加热 0.5 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 取 650 μl 上清液移入试管, 每支试管加入 4 ml 70% 乙醇。虫草素在 259 nm 处有吸收峰, 在此波长处用 7200 型紫外-可见分光光度计测定吸光值。考虑到虫草素的含量与吸光值成正相关, 试验通过比较吸光值的变化来比较不同样品中虫草素含量的变化。

1.5 蓝光诱导蛹虫草分生孢子数变化的测定 设定单一变量, 即蓝光照射时间, 黑暗为对照组。将活化好的菌种通过划线接种到马铃薯培养基中, 在黑暗条件下于 26 °C 无菌培

基金项目 国家自然科学基金资助项目 (No. 31060004, 31260010); 江西省自然科学基金资助项目 (No. 2010GZ0115); 江西省教育厅科技项目 (No. GJJ11387)。

作者简介 金华燕 (1987-), 女, 浙江余杭人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化工。* 通讯作者, E-mail: mingjiafu@yahoo.com.cn。

收稿日期 2012-11-13

养箱中培养4 d。从培养好的菌种中挑选出长势良好且相同的菌分成2组:黑暗组和光照组,其中光照组放置于蓝光下进行蓝光照射处理(注意蓝光照射时尽量保持培养皿不移动位置,或移动以后按原样放回)。将以上2组分时段取样,分别在光照1、2、4、8、24、48、72和96 h时在超净台上用打孔器取样,打孔器孔径8 mm。将所取样品装入灭菌过的1.5 ml离心管中,生理盐水洗脱分生孢子,并用生理盐水按一定比例稀释后用血球计数板在显微镜下计数,通过计算获得不同蓝光照射时间下的每组分生孢子量,3次重复。

2 结果与分析

2.1 蓝光诱导下蛹虫草虫草素的变化

蓝光是影响真菌生理和生化过程的重要因素,该试验采用醇热回流法提取了虫草素,且由于对于较稀的溶液,吸光度和浓度成正比,因此研究中采用吸光度进行了蓝光照射组与黑暗组中蛹虫草虫草素含量的比较。从图1可看出,虫草素含量在2实验组中都呈上升趋势,并且随时间有一个波动性的变化。同时从图1中还可看出,在相同的检测时间点蓝光处理比黑暗对照时虫草素的产生量要少。因此,初步可确定蓝光对蛹虫草虫草素的产生有一定的抑制作用。另外,从研究中还可看出,无论是否用蓝光照射,虫草素的含量都有一个24 h的周期变化,目前机制还不明确。

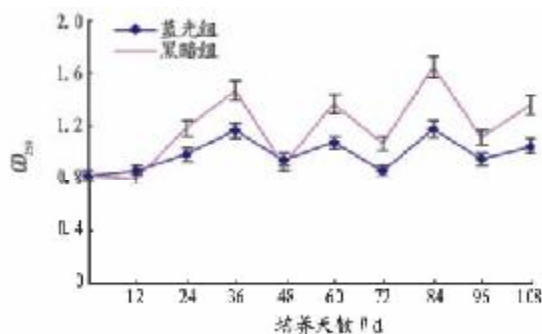


图1 蓝光照射对蛹虫草虫草素含量的影响

2.2 蓝光诱导下蛹虫草分生孢子数的变化

由图2可看出,试验中蛹虫草分生孢子量随时间变化,无论是蓝光组还是黑暗组,蛹虫草分生孢子量随时间均逐渐呈递增的趋势,并在一定时间后开始趋向平稳,且与黑暗组相比,蓝光照射显然对蛹虫草分生孢子量有较大影响,促进了蛹虫草分生孢子的产生。

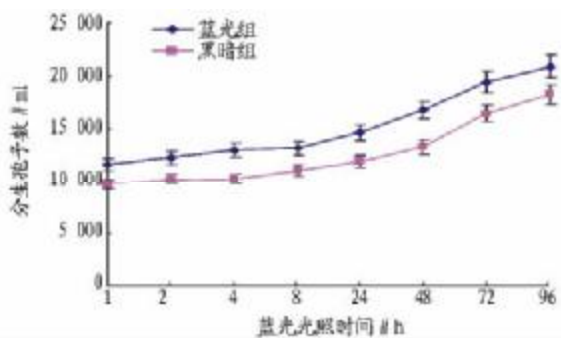


图2 蓝光照射对蛹虫草分生孢子数量的影响

3 讨论

蓝光对真菌的生长发育和生理生化具有重要的调控作用。该研究表明,蓝光对蛹虫草虫草素的产生有一定抑制作用,说明蓝光是蛹虫草虫草素产生的负调控因素。另外,在研究中可看到虫草素在菌丝体中的含量随时间呈24 h的波动性变化,尽管其机制尚不明确,但也可推测蛹虫草虫草素的产生似是一个有生物钟控制的行为。

蓝光对真菌的形态有重要影响,通过研究蓝光对真菌分生孢子量的影响,可研究真菌发育过程中的相关影响因素。该研究中以蛹虫草为材料,检测了蓝光对蛹虫草产生分生孢子量的影响,结果表明,蓝光对蛹虫草产生分生孢子有较为明显的影响,从图2可看出,蓝光组和黑暗组随时间产生的分生孢子量曲线几乎是平行线。因此,蓝光对蛹虫草产生分生孢子量的影响是一个较为恒定的过程,只要光照量不发生变化(培养皿始终放在同一个位置受蓝光照射,因此受光照的强度没有变),蛹虫草产生的分生孢子量与黑暗对照组的差异也基本是恒定的。

蛹虫草是重要的资源性真菌,对人体有很多功能性影响。而蛹虫草中许多成分的产生受到环境因素的影响,而蓝光是其中一种很重要的环境因素,因此,该研究主要研究了蓝光对蛹虫草虫草素的产生量的影响,并研究了蓝光对蛹虫草发育方面的影响,旨在为系统性研究蓝光对蛹虫草的影响奠定基础。在笔者最近的研究中,已克隆了蛹虫草的蓝光受体基因(相关结果将在以后发表),表明蛹虫草中存在一个蓝光信号系统,这也从一个侧面反映蛹虫草中包括虫草素在内的许多成分可能会受到蓝光的影响。

参考文献

- [1] AN D, ZHU B W. Optimization of enzyme extraction conditions of cordycepin polysaccharide using response surface methodology [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(9): 1977-1981.
- [2] 付鸣佳, 王小菁, 黄文芳. 蓝光诱导蛹虫草菌丝类胡萝卜素的积累[J]. 微生物学通报, 2005, 32(5): 24-28.
- [3] 付鸣佳. 蓝光对蛹虫草多糖含量的影响[J]. 食品科学, 2009, 30(3): 239-242.
- [4] 付鸣佳, 查美玲, 王舒, 等. 真菌发育过程中的蓝光诱导[J]. 激光生物学报, 2012, 21(1): 76-82.
- [5] MITZKA U, RAU W. Composition and Photoinduced Biosynthesis of the Carotenoids of a Protoplast-like *Neurospora crassa* "Slime" Mutant [J]. Arch Microbiol, 1977, 111(3): 261-263.
- [6] HARDING R W, TURNER R V. Photoregulation of the Carotenoid Biosynthetic Pathway in Albino and White Collar Mutants of *Neurospora crassa* [J]. Plant Physiol, 1981, 68(3): 745-749.
- [7] 付鸣佳, 王小菁. 蓝光诱导的胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) 类胡萝卜素积累[J]. 微生物学报, 2005, 45(5): 795-797.
- [8] CORROCHANO L M, CERDA-OLMEDO E. Sex, Light and Carotenoids: the Development of *Phycomyces* [J]. Trends Genet, 1992, 8(8): 268-274.
- [9] KERTESZ-CHALOUPOVA K, WALSER P J, GRANADO J D, et al. Blue Light Overrides Repression of Asexual Sporulation by Mating Type Genes in the Basidiomycete *Coprinus cinereus* [J]. Fungal Genet Biol, 1998, 23(1): 95-109.
- [10] 付鸣佳, 邹峰嵘. 蓝光诱导拟盘多毛孢菌分生孢子器产生和类胡萝卜素的积累[J]. 食品科学, 2009, 30(7): 118-121.
- [11] 张嘉, 李多伟, 任静, 等. 正交试验提取虫草素的工艺研究[J]. 中国新医药, 2004, 3(2): 34-35.