

冬虫夏草子座萌发阶段五种化合物的变化^{*}

谢放^{**} 周刚 张蓉蓉 陈照禾 夏樱霞 苏强军

(兰州交通大学生物与制药工程学院, 兰州 730070)

摘要 【目的】本研究以不同子座原基启动阶段的冬虫夏草为研究材料, 探究冬虫夏草菌 *Ophiocordyceps sinensis* 子座萌发过程中代表性化合物及菌丝形态的变化。【方法】选取子座萌发前(僵虫, 简称 S1)、萌发初期(菌丝突破虫体头部, 简称 S2)和已经萌发(形成子座, 子座<1 cm, 简称 S3)三个阶段的冬虫夏草, 采用比色法检测多酚、多糖、甘露醇和尿素 4 种物质含量, 通过超高效液相色谱检测腺苷含量, 并采用扫描电子显微镜观察三个阶段菌丝的形态差异。【结果】冬虫夏草子座萌发前后 3 个阶段菌丝形态差异显著, 表现为子座的萌发前菌丝开始融合, 突破虫体头部后菌丝疏松细长, 萌发后菌丝粗细均匀且表面微疣。在 S1 阶段, 多酚 (56.633 ± 2.312) mg/g 和尿素 (13.580 ± 1.112) mg/g 含量最高, 且显著高于 S2 和 S3 阶段 ($P<0.05$), 多糖含量为 (22.045 ± 1.341) mg/g, 且显著低于 S2 和 S3 ($P<0.05$) 阶段; 在 S2 和 S3 阶段, 多酚含量分别为 (39.608 ± 2.145) mg/g 和 (37.365 ± 1.972) mg/g, 且无显著差异 ($P>0.05$); 尿素含量分别为 (1.892 ± 0.345) mg/g 和 (2.322 ± 0.423) mg/g, 无显著差异 ($P<0.05$); S2 阶段甘露醇含量为 (42.099 ± 2.986) mg/g, 且显著高于 S1 和 S3 阶段 ($P<0.05$), 与 S3 阶段相比, S1 阶段多糖和甘露醇含量均较低, 但二者之间差异不显著 ($P<0.05$); 腺苷含量则随着冬虫夏草子座萌发而增加。【结论】冬虫夏草子座萌发前后菌丝形态差异显著, 且不同阶段多酚、尿素、多糖、甘露醇及腺苷的含量变化差异显著。

关键词 冬虫夏草; 冬虫夏草菌; 化学物; 菌丝形态

Changes of five compounds in the germination stage of Chinese cordyceps

XIE Fang^{**} ZHOU Gang ZHANG Rong-Rong CHEN Zhao-He
XIA Ying-Xia SUN Qiang-Jun

(School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Lanzhou Jiaotong University, Lanzhou 730070, China)

Abstract 【Objectives】 In this study, Chinese cordyceps at different stages of stroma initiation were used as the research materials to explore the changes in content of representative compounds and morphology of hyphae during the germination of *Ophiocordyceps sinensis*. 【Methods】 Chinese cordyceps at three stages before germination (muscardine worm cadaver S1), early germination (mycelium breaking through the head of the worm S2) and after germination (forming stroma S3) were selected. The changes of the contents of polyphenols, polysaccharides, mannitol and urea were detected by ultraviolet chromatometry and adenosine by ultra-high performance liquid chromatography. The morphological differences of the hyphae in three stages were observed by scanning electron microscopy. 【Results】 The morphological differences of the hyphae in the three stages during germination of Chinese cordyceps were significant. It was manifested that the hyphae began to fuse before germination (S1). After breaking through the head of the worm (S2) the hyphae were loose and slender. The hyphae are uniform in thickness and have micro warts on the surface after germination (S3). The content of polyphenols [56.633 ± 2.312 mg/g] and urea [13.580 ± 1.112 mg/g] was the highest in the S1 stage, which was significantly higher than that in the S2 and S3 stages ($P<0.05$), but the polysaccharide content was (22.045 ± 1.341) mg/g lower than that in the S2 and S3 stages significantly ($P<0.05$). There no significant difference in content of polyphenols (39.608 ± 2.145) mg/g, (37.365 ± 1.972) mg/g

^{*}资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31560003)

^{**}通讯作者 Corresponding author, E-mail: xfrankf@163.com

收稿日期 Received: 2022-05-04; 接受日期 Accepted: 2022-11-26

and urea (1.892 ± 0.345) mg/g, (2.322 ± 0.423) mg/g between the stage of S2 and S3 ($P < 0.05$). The mannitol content in the S2 stage (42.099 ± 2.986) mg/g was significantly higher than in S1 (33.660 ± 3.473) mg/g and S3 (36.113 ± 1.453) mg/g stages ($P < 0.05$). The content of polysaccharide and mannitol in S1 lower than that S3 stages but the difference was not significant ($P < 0.05$). The content of adenosine increased with the germination of stroma in Chinese cordyceps. **[Conclusion]** The morphological changes of mycelium and the contents of representative compounds were significantly different before and after the germination of stroma in Chinese cordyceps.

Key words Chinese cordyceps; *Ophiocordyceps sinensis*; compounds; hyphal morphology

冬虫夏草是我国青藏高原地区以及周边高海拔地区特有的珍稀中药材,其中多种化合物都具有较高的药理活性,主要以多糖、核苷、甾醇类、甘露醇和氨基酸等肽类物质相关研究居多,这些化合物在延缓衰老、抗氧化、肿瘤治疗及调节免疫系统等方面具有显著效果(Lo *et al.*, 2013; 丘雪红等, 2016)。目前,关于冬虫夏草化合物的研究主要集中在:(1)化合物种类的分离及鉴定;(2)野生冬虫夏草与人工栽培冬虫夏草化合物含量的差异;(3)冬虫夏草重要化合物在临床中的应用等方面(Yang *et al.*, 2009; 许峰等, 2014; 咎珂等, 2016; 付宝慧和王颖, 2018)。但关于冬虫夏草生长发育过程中原基的发生机理和涉及的代谢物变化鲜有报道。

在对食药菌研究中发现,多糖含量的增加可能与平菇子实体的形成相关(Zhou *et al.*, 2016)。灵芝子实体形成过程中可溶性多糖总含量在原基发育成子实体后开始下降(Zhou *et al.*, 2018),这一结果与Nakagawa等(2018)关于灵芝生长过程中总多糖含量变化的研究相同。对糙皮侧耳菌的研究发现,原基期菌丝中鸟苷-5'-二磷酸-3'-二磷酸含量远高于幼菇期和成熟期菌丝,且低浓度的鸟苷-5'-二磷酸-3'-二磷酸对糙皮侧耳菌丝体的生长具有促进作用(黄涛等, 2017)。氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 在渗透胁迫条件下能够产生和积累甘露醇,并恢复细胞在渗透胁迫下的生长,改善的渗透压耐受性(Zahid and Deppenmeier, 2016)。Wyatt等(2014)发现甘露醇在费希新萨托菌 *Neosartorya fischeri* 的有性发育和子囊孢子形成过程中具有重要作用。在酵母中,多酚类物质白藜芦醇可在增加DNA稳定性的同时将酵母的寿命延长70%(Howitz *et al.*, 2003)。多酚类化

合物对香菇的生长也具有促进作用(Cabrera *et al.*, 2018)。不同氮源对巴西蘑菇菌丝生长速率的研究结果表明尿素是促进真菌生长的最佳氮源(Mantovani *et al.*, 2007)。尿素在双胞菇子生长过程中呈动态变化,在其实体初始阶段含有高水平的尿素,在随后的发育阶段尿素水平下降,到子实体收获阶段尿素水平又再次增加(Wagemaker *et al.*, 2006)。

综上所述,在真菌生物体中的化合物不仅在生物体生长过程中发挥着重要作用,也可以作为药物应用于临床医疗。冬虫夏草及其菌丝体培养物已被广泛利用,在疾病治疗、医疗保健等方面效果显著。但关于冬虫夏草中代谢产物对其生长发育的影响,以及在生长过程中的作用和功能还不清楚。

子座萌发是冬虫夏草由营养生长转为生殖生长的关键生长节点之一,因此,本研究以冬虫夏草的子座萌发前(僵虫期,简称S1)、初期(菌丝突破僵虫头部,简称S2)、已经萌发(形成子座,子座<1 cm,简称S3)三个阶段作为研究材料,通过检测冬虫夏草各阶段甘露醇、多糖、尿素、多酚及腺苷的含量,结合扫描电镜观察各阶段菌丝体生长的微观形态特征,为研究冬虫夏草子座发育机理提供一些有益探索。

1 材料与方法

1.1 供试材料

冬虫夏草由杭州明煦生物科技有限公司提供,僵虫(S1)置于低温培养箱,0℃下30 d获得子座萌发初期(S2)材料,进一步将S2继续培养25 d获得已经萌发(S3)样品,取样部位如图1所示。

1.2 多酚、多糖、甘露醇和尿素含量的测定

对不同生长阶段的冬虫夏草头部进行取样, 取样部位如图 1 所示。将样品置于 50 ℃烘箱中烘干, 研磨成粉, 置于 4 ℃冰箱中保存, 备用。

多酚含量的测定采用福林-酚比色法 (杨建

鑫等, 2020; 吴晓青等, 2021), 多糖含量的测定采用苯酚-硫酸法 (陈京津等, 2009; Wang *et al.*, 2009; 刘雨阳, 2016), 甘露醇含量的测定采用高碘酸钠比色法 (陈京津等, 2009; 谢放等, 2021a), 尿素含量的测定采用 PDAB 法 (李川江等, 2010; 焦姣等, 2017), 每组试验设置 3 个平行。



图 1 冬虫夏草子座萌发三个阶段取样部位
Fig. 1 Sampling parts of the three stages of Chinese cordyceps

A. 子座萌发前; B. 子座萌发初; C. 子座萌发后。
A. Before the germination of the stroma; B. At the beginning of the germination of the stroma;
C. After the germination of the stroma.

1.3 用超高效液相色谱法测定腺苷的含量

样品前处理: 称取不同生长阶段样品粉末各 0.05 g, 分别加入 2 mL 超纯水, 超声波 100 W、60 ℃处理 90 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 重复提取 3 次, 上清合并过 0.22 μm 滤膜后进行超高效液相色谱检测 (陈亚丽等, 2017)。

对照溶液的配制: 精确称取腺苷标准品 1.2 mg, 用超纯水溶液稀释并定容至 5 mL 容量瓶中, 制成腺苷质量浓度为 240 mg/L 的对照品储备液, 再用超纯水分别稀释 2 倍、4 倍、8 倍和 16 倍得到腺苷质量浓度分别为 240、120、60、30 和 15 mg/L 的标准工作溶液, 置于 4 ℃冰箱冷藏, 备用 (简利茹等, 2015; 钱正明等, 2016)。

色谱条件: 色谱柱为 Waters ACQUITY YPLC BEH C18 柱 (2.1 mm×100 mm, 1.7 μm), 流速为 0.25 mL/min, 柱温 30 ℃, 进样量 10 μL, 流动相为 0.05%甲酸水溶液与甲醇, 梯度洗脱程序见表 1 (张伟清等, 2017)。

表 1 超高效液相色谱梯度洗脱程序 Table 1 Ultra-high performance liquid chromatography gradient elution procedure		
时间 (min) Time (min)	流动相比 (%) Flow matching ratio (%)	
	0.05%甲酸-水溶液 0.05% Formic acid-aqueous solution	甲醇 Methanol
0.00	95	5
0.30	95	5
3.50	85	15
4.00	75	25
4.01	10	90
4.50	95	5
5.00	95	5

1.4 冬虫夏草子座萌发三个阶段扫描电镜观察

本研究采用扫描电子显微镜观察三个阶段头部形态。取样处 S1 为头壳内取样, S2 取突出菌丝体, S3 取子座芽。样品于 2.5%戊二醛中 4 ℃

固定 12 h; $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲液漂洗 3 次, 每次 15 min; 各体积分数梯度乙醇 (30%、50%、70%、90%、95%) 脱水 1 次后用 100% 乙醇脱水 2 次, 每次 20 min, 然后置于冷冻干燥机中处理 15 h; 处理后的菌块固定于样品台上进行喷金处理, 置于扫描电镜下观察、拍照。

1.5 数据分析

采用 SPSS (20.0 版) 软件对冬虫夏草头部不同生长阶段化合物含量进行单因素方差分析, 并采用 Origin 2018 绘制图像。

2 结果与分析

2.1 冬虫夏草子座萌发 3 个阶段的虫体及菌丝体形态观察

2.1.1 冬虫夏草子座萌发不同阶段的形态观察

冬虫夏草子座萌发前虫体呈乳白色、体表无菌丝, 头部呈枣红色、表面完整且具有光泽 (图 1: A); 子座萌发初期虫体呈米黄色、体表无菌丝,

头部破裂、菌丝纽结形成菌蕾于裂缝处生出 (图 1: B); 子座已经形成时, 虫体呈米黄色、体表局部被白色菌丝覆盖, 头部菌丝体形成子座原基 (图 1: C)。

2.1.2 冬虫夏草子座萌发三个阶段菌丝体形态

扫描电镜观察 S1 阶段菌丝粗短、弯曲度较低、菌丝间相互交联缠绕, 排列无规律、菌丝表面有褶皱, 菌丝粗细程度变化较大, 粗菌丝占大比例 (图 2: A)。

S2 阶段菌丝已经突破虫体头部, 形成针状原基。菌丝细长、弯曲度高、菌丝排列疏松、表面光滑扁平 (图 2: B)。

S3 阶段原基进一步发育成子座并开始生长。扫描电镜观察图所示, 子座表面菌丝粗细均匀, 排列较为密集。从标记位置可明显观察到菌丝表面的微疣颗粒 (图 2: C)。

通过对三个阶段扫描电镜观察可以发现, 不同阶段菌丝表面、菌丝的粗细、弯曲度、膨大部分及菌丝间关系均具有较大差异。

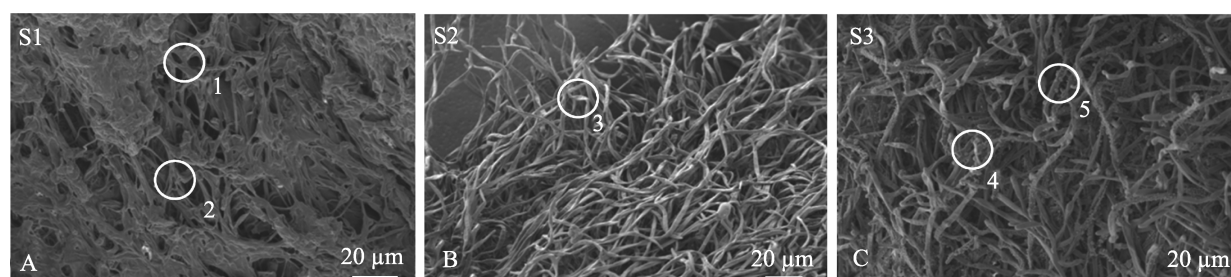


图 2 冬虫夏草子座萌发三个阶段扫描电镜图

Fig. 2 Hyphal morphology of the Chinese cordyceps in the three stages by using scanning electron microscopy

A. 子座萌发前; B. 子座萌发初; C. 子座萌发后。

1, 2: 菌丝发生融合; 3: 菌丝细长弯曲; 4, 5: 菌丝表面微疣颗粒。

A. Before the germination of the stroma; B. At the beginning of the germination of the stroma;

C. After the germination of the stroma.

1, 2: Fusion of hyphae; 3: Slender and curved hyphae; 4, 5: Microscopic particles on hyphal surface.

2.2 冬虫夏草子座萌发三个阶段中化合物的含量变化

2.2.1 5 种化合物标准曲线测定结果 回归方程如表 2 所示, 5 个回归方程均是标准品配置成 9 个浓度梯度所测得, 相关系数均大于 0.99,

这说明实验所得标准曲线线性关系良好, 均能为下一步实验所用。以腺苷峰面积 (y_1) 与对应的腺苷质量浓度 (x_1) 作标准曲线, 经计算其回归方程为 $y=23\ 629x+33\ 081$ ($R^2=0.999$), 表明腺苷标准品质量浓度在 15-240 mg/L 范围内线性关系

良好（表 2）。

表 2 5 种化合物的回归方程			
Table 2 Regression equations of the five compounds			
化合物 Compound	回归方程 Regression equation	R ²	波峰 (nm) Crest (nm)
多酚 Polyphenols	$y=2.846x+0.100$	0.996	760
多糖 Polysaccharide	$y=9.305x-0.0285$	0.994	620
甘露醇 Mannitol	$y=11.9358x-0.0108$	0.996	413
尿素 Urea	$y=0.97667x-0.0633$	0.995	435
腺苷 Adenosine	$y=23.629x+33.081$	0.999	760

2.2.2 5 种化合物含量测定结果 不同生长阶段各化合物含量变化如图 3 所示。

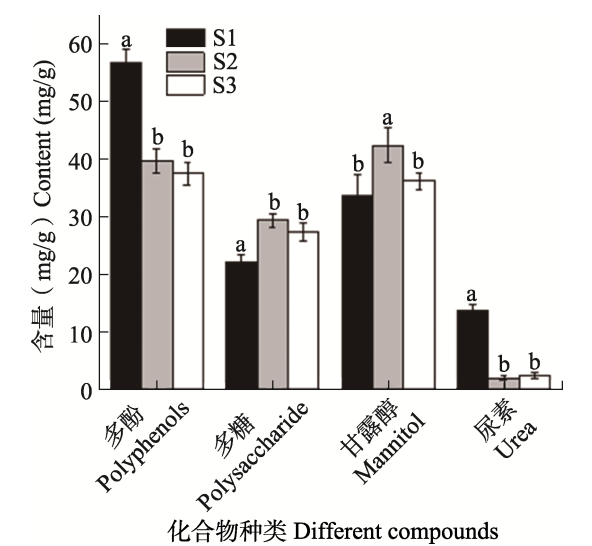


图 3 4 种化合物的含量
Fig. 3 Contents of four compounds in the three stages before and after the germination of the stroma

S1: 子座萌发前; S2: 子座萌发初; S3: 子座萌发后。
柱上标有不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$, T 检验)。
S1: Before the emergence of the stroma;
S2: At the beginning of the emergence of the stroma;
S3: After the emergence of the stroma. Histograms with different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$, T -test).

多酚: 不同生长阶段冬虫夏草多酚含量差异显著 ($P<0.05$)，其中 S1 阶段多酚含量为 (56.633 ± 2.312)mg/g，显著高于 S2 阶段 (39.608 ± 2.145) mg/g 和 S3 阶段 (37.365 ± 1.972) mg/g，而 S2 阶段 (39.608 ± 2.145) mg/g 与 S3 阶段

(37.365 ± 1.972) mg/g 之间差异不显著 ($P<0.05$)。

多糖: 随着冬虫夏草原基的生长发育，多糖含量也发生改变。S1 阶段、S2 阶段和 S3 阶段的多糖含量分别为 (22.045 ± 1.341)、(29.245 ± 1.267) 和 (27.175 ± 1.526) mg/g，其中 S1 阶段与 S2 阶段及 S3 阶段的多糖的含量均具有显著性差异 ($P<0.05$)，而 S2 阶段与 S3 阶段之间差异不显著 ($P<0.05$)，分别是 S1 阶段多糖含量的 1.3 倍和 1.2 倍。

甘露醇: S1 阶段、S2 阶段和 S3 阶段的甘露醇含量分别为 (33.660 ± 3.473)、(42.099 ± 2.986) 和 (36.113 ± 1.453) mg/g，其中 S2 阶段甘露醇含量最高且与 S1 阶段及 S3 阶段甘露醇含量差异显著 ($P<0.05$)。

尿素: S1 阶段尿素含量为 (13.580 ± 1.112) mg/g，S2 阶段尿素含量为 (1.892 ± 0.345) mg/g，S3 阶段尿素含量为 (2.322 ± 0.423) mg/g，其中 S1 阶段 (13.580 ± 1.112) mg/g 的尿素含量显著 ($P<0.05$) 高于 S2 阶段及 S3 阶段的尿素含量，S1 阶段尿素含量是 S2 阶段和 S3 阶段的 7.2 倍和 5.8 倍，S2 阶段及 S3 阶段之间差异不显著 ($P<0.05$)。

2.2.3 腺苷含量的变化 由图 4 可以看出，腺苷含量的变化与冬虫夏草的生长呈正相关，不同阶段腺苷含量呈梯度增加。S1 阶段腺苷含量为 119.720 mg/L，S2 阶段腺苷含量为 133.073 mg/L，S3 阶段腺苷含量为 152.816 mg/L。

3 结论与讨论

多酚类物质有助于机体对低温、低氧等胁迫的适应 (张燕等, 2006; 王忠猛等, 2007; Yin *et al.*, 2020; Guo *et al.*, 2021)。植物中的多酚是一种抗逆境物质，具有收敛性，通过与植食者消化道中的消化酶结合降低其消化能力，导致消化不良 (秦小玲和刘艳红, 2006)，从而建立化学防御系统抵御植食者的侵害，这说明植物在抵御逆境时可以分泌多酚类物质 (刘志芹, 2004)。研究表明，在实验室条件下培养的冬虫夏草菌丝体中也检出了多酚类物质，含量最高为 23.8 mg/g (刘雨阳, 2016; 查昱等, 2019)。本

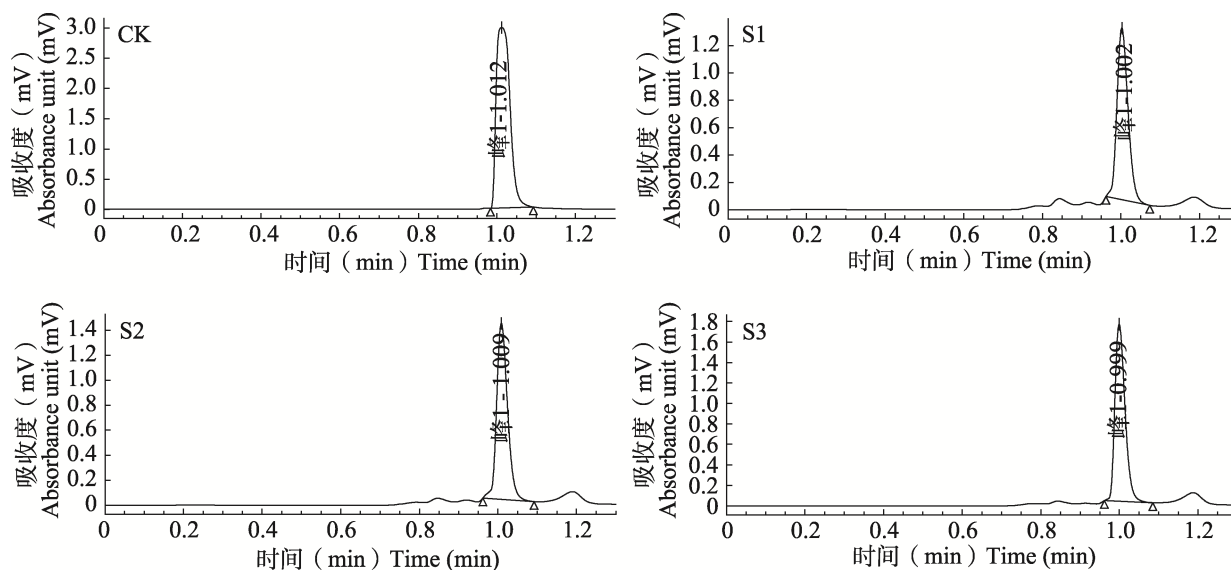


图 4 不同生长阶段腺苷的超高效液相色谱峰图

Fig. 4 Ultra-high performance liquid chromatography peaks of adenosine at different growth stages

S1: 子座萌发前; S2: 子座萌发初; S3: 子座萌发后。CK: 腺苷标准品。

S1: Before the emergence of the stroma; S2: At the beginning of the emergence of the stroma;

S3: After the emergence of the stroma; CK: Adenosine standard.

研究实验发现 S1 阶段多酚含量最高, 且显著高于 S2 阶段和 S3 阶段, 这可能与因为子座萌发前期冬虫夏草菌丝体入侵宿主幼虫相关, 在此过程中菌丝体为抵御虫体的免疫机制产生大量的多酚类物质 (咎立峰等, 2016)。S1 阶段为菌丝已经侵染成功, 宿主幼虫死亡僵化的时期, 入侵阶段产生的多酚还未降解。S2 和 S3 这两个阶段与原基的启动、发育相关, 菌丝体不再需要合成多酚类物质来对抗虫体的免疫机制 (Genzel *et al.*, 2021)。因此, 在子座萌发前期, 虫体头部的多酚含量处于比较高的水平, 而形成僵虫后 (S2), 免疫机制消失, 在子座萌发阶段 (S3), 菌体中的多酚含量随着子座的萌发和生长而显著下降。

尿素在生物体中合成代谢通路主要为鸟氨酸循环, 该循环的中间产物瓜氨酸是氮化物贮藏和转化的重要形式 (高煜珠, 1964)。在双孢菇的相关研究中发现尿素在子实体发育初期含量较高, 在随后的发育阶段下降。进一步研究发现双孢菇尿素含量随子实体发育而变化与脲酶基因的表达有关 (Wagemaker *et al.*, 2006)。本研究 S1 阶段尿素含量显著高于 S2 和 S3 阶段,

说明子座萌发前需要氮素积累, 后期尿素含量降低与子座的持续生长有关, 尿素作为子座发育的氮源, 被用于合成子座发育所需的化合物。

同时, 有研究表明在营养胁迫条件下, 植物体内的多酚类物质具有调节氮循环的作用 (Northup, 1999), 这表明生物体多酚与尿素的代谢可能存在一定的内在联系。在本研究中多酚和尿素含量变化趋势较为类似, 在前人 (谢放等, 2021a) 的研究中亦有此类现象。子座生长的营养来源于虫体, 随着子座的持续生长, 虫体所能提供的营养物质也随之减少。尿素作为储备氮源, 多酚则可以帮助机体减少营养流失以及调节氮循环。在子座萌发前后这两种化合物含量的变化是否相互影响, 有何种内在联系, 仍需进一步研究。

本研究中 S2 阶段多糖含量 (29.245 mg/g) 最高, 是 S1 阶段多糖含量的 1.3 倍, 且与 S3 阶段多糖含量相比差异不显著。这与前人 (冯慧琴等, 2018) 关于不同生长阶段多糖含量的变化基本一致, 但在 S3 阶段多糖含量相比 S2 阶段有差异不显著下降。原因是冬虫夏草多糖类化合物主要由甘露糖、葡萄糖和半乳糖等单糖按不同比例

组成 (Wang *et al.*, 2010; Xiang *et al.*, 2016), 这些单糖都是菌体的主要贮能物质, 且可能在菌体组分的构成中发挥重要作用。子座发育的后期, 子囊壳及子囊孢子的产生标志着冬虫夏草由无性期转变为有性发育, 这是真菌繁衍后代的最关键步骤, 必然优先提供营养。本研究结果表明多糖含量随子座萌发整体呈现递增的关系, 这可能与后续发育储备能量相关, 而是否与多糖合成酶基因的表达有关 (冯辉, 2008), 还需进一步验证。

甘露醇含量在 S2 阶段最高, 这可能是因为甘露醇在 S2 阶段具有调节渗透压, 降低菌丝体内水势, 促进水分和养分的吸收, 减少营养物质的消耗等作用 (苏江, 2016), 同时可以为后续子座的萌发及生长提供能量。与之对应的是, 本研究中 S2 阶段多糖含量亦达到最大值, 印证了在 S2 阶段甘露醇含量最高, 可能是为后续生长发育储备营养物质这一观点。前人研究表明随着冬虫夏草的生长发育甘露醇含量随之增加 (王化远和唐心曜, 1996), 这与本研究 S2 阶段和 S3 阶段甘露醇含量变化趋势不一致, 主要原因是该研究所用样品为子座生长后期, 子座长度为虫体的 2 倍, 且已经出现子囊壳, 而本研究为子座萌发初期。因此, 只有对冬虫夏草整个生长过程中甘露醇含量进行测定才能说明甘露醇的变化规律。另外, 甘露醇在冬虫夏草菌体中除调节水势与渗透作用外, 是否具有和某些植物体中类似的调节生长作用 (黄萍等, 2011), 是否为抑制或诱导某些特定基因表达的信号物质, 还需要进一步深入研究。

冬虫夏草中腺苷的含量是药典规定衡量冬虫夏草质量控制最重要的指标之一 (国家药典委员会, 2005, 2010, 2015), 也是嘌呤代谢的主要代表性化合物。腺苷是由腺苷酸在核苷酶催化下产生, 然后核苷脱氨酶催化腺苷脱氨基变成肌苷, 肌苷在嘌呤核苷磷酸化酶的作用下转化为次黄嘌呤 (艾中等, 2016)。本研究对冬虫夏草不同子座生长阶段腺苷含量进行测定, 结果表明腺苷含量随着冬虫夏草的子座生长而逐渐累积。冬虫夏草子座形成以及有性发育都涉及到旺盛的

嘌呤代谢, 这与腺苷或腺苷的中间产物有关。且在前人 (王冰等, 2015; 杨小艳等, 2021) 的研究中发现冬虫夏草子座中腺苷含量明显高于全草和虫体, 说明腺苷主要富集于子座。因此, 子座萌发阶段腺苷含量的变化, 可以直接反映嘌呤代谢的变化, 间接暗示下一步有性发育的趋势。但如果能结合多种核苷酸和碱基的变化一起作为证据, 就更有说服力。

S1 阶段菌丝体交联缠绕发生“H”型融合, 这种菌丝融合、扭结的空间网格结构, 增加了菌丝对环境的适应性, 便于物质的运输、积累及信号分子的转导 (Giovannetti *et al.*, 2003)。这与上述尿素为主的氮素积累相联系, 同时亦可以为冬虫夏草菌丝体在蝙蝠蛾幼虫体内进一步生长发育奠定基础。S2 阶段菌丝体扭结突破虫体头部, 菌丝细长、弯曲且密度大, 该形态下的菌丝更容易相互凝聚扭结。在食用菌相关研究中, 刺芹侧耳受光照刺激后菌丝发生扭结形成原基, 进而分化成菇蕾 (叶豆等, 2019)。金针菇菌丝受到机械损伤后通过上调表达疏水蛋白来诱导菌丝的扭结进而形成子实体 (陶永新等, 2018)。形态上已经做好了子座萌发的准备, 而化合物多糖和甘露醇作为营养物质在该阶段含量达到了最高, 两者均为 S3 阶段的生长做好准备。S3 阶段子座已经形成, 由于本研究中冬虫夏草菌的生长唯一营养来源于虫体, 导致尿素、甘露醇和多糖含量在此过程中被消耗利用, 所以 S3 阶段两者含量均低于 S2 阶段。而菌丝体上的微疣颗粒是否来自营养胁迫所产生的分生孢子 (谢放等, 2021b), 还有待进一步确定。

综上所述, 本研究结果表明冬虫夏草子座不同生长阶段在菌丝形态和 5 种化合物含量上均具有显著差异, 推测这些差异可能与原基的启动相关。此外, 本研究结果为阐明冬虫夏草子座萌发阶段的化合物变化机制提供理论依据。

参考文献 (References)

- Ai Z, Qian ZM, Li WJ, Yang FQ, Chen SL, Li EW, 2016. Research progress on the analysis of nucleoside components in *Cordyceps sinensis*. *Journal of Mycology*, 35(4): 388–403. [艾中, 钱正明, 李文佳, 杨丰庆, 陈淑琳, 李二伟, 2016. 冬虫夏草核苷类成

- 分分析研究进展. 菌物学报, 5(4): 388–403.]
- Cabrera R, Damian L, Asaff A, 2018. Bioavailability of compounds susceptible to enzymatic oxidation enhances growth of shiitake medicinal mushroom (*Lentinus edodes*) in solid-state fermentation with vineyard prunings. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(3): 291–303.
- Chen JJ, Wei KL, Zhang SX, Xie F, 2009. Comparative study on polysaccharide and mannitol content of *Cordyceps sinensis* in Gansu. *Guangzhou Chemical Industry*, 37(7): 135–137, 148. [陈京津, 魏孔, 张生香, 谢放, 2009. 甘肃虫草多糖和甘露醇含量的比较研究. 广州化工, 37(7): 135–137, 148.]
- Chen YL, Hong Y, Li JP, Shi ZQ, Chen Y, Xue ZY, Liu HB, Feng SL, 2017. Determination of nucleosides in *Cordyceps Sinensis* by HPLC. *West North Pharmaceutical Journal*, 32(4): 403–406. [陈亚丽, 洪妍, 李继平, 师志强, 陈宇, 薛志远, 刘慧彬, 封士兰, 2017. HPLC 法测定冬虫夏草中核苷类成分的含量. 西北药学杂志, 32(4): 403–406.]
- Feng H, 2008. Construction of cDNA library of wild *Cordyceps sinensis*, sequencing of expressed sequence tags and analysis of some functional genes. Master dissertation. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine. [冯辉, 2008. 野生冬虫夏草 cDNA 文库构建、表达序列标签测序及部分功能基因分析. 硕士学位论文. 北京: 北京中医药大学.]
- Feng HQ, Qian ZM, Wu J, Yi Q, Li WJ, Yang XT, 2018. Analysis of total sugar, α -1,3 glucan content and stimulated Dectin-1 activity in *Cordyceps sinensis* breeding products at different parts and developmental stages. Chinese Society of Mycology Proceedings of the 2018 Academic Annual Conference. 184. [冯慧琴, 钱正明, 吴君, 衣琴, 李文佳, 杨晓彤, 2018. 不同部位和发育阶段的冬虫夏草繁育品总糖、 α -1,3 葡聚糖含量和刺激 Dectin-1 活性分析. 中国菌物学会 2018 年学术年会论文汇编. 184.]
- Fu BH, Wang Y, 2018. Comparative study on chemical constituents of cordyceps sinensis mycelia and natural *Cordyceps sinensis*. *Chinese Community Doctors*, 34(30): 7, 9. [付宝慧, 王颖, 2018. 虫草菌丝体与天然虫草化学成分比较研究. 中国社区医师, 34(30): 7, 9.]
- Gao YZ, 1964. Some physiological and biochemical basis of urea utilization by plants. *Bulletin of Biology*, 1964(3): 8–11. [高煜珠, 1964. 植物对尿素利用的若干生理生化基础. 生物学通报, 1964(3): 8–11.]
- Genzel F, Dicke MD, Junker-Frohn LV, Neuwohner A, Thiele B, Putz A, Usadel B, Wormit A, Wiese-Klinkenberg A, 2021. Impact of moderate cold and salt stress on the accumulation of antioxidant flavonoids in the leaves of two capsicum cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(23): 6431–6443.
- Giovannetti M, Sbrana C, Strani P, Agnolucci M, Rinaudo V, Avio L, 2003. Genetic diversity of isolates of *glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. *Applied & Environmental Microbiology*, 69(1): 616
- Guo Q, Sun Y, Shi M, Han X, Lai H, 2021. *Pseudomonas koreensis* promotes tomato growth and shows potential to induce stress tolerance via auxin and polyphenol - related pathways. *Plant and Soil*, 462(1/2): 141–158
- Howitz KT, Bitterman, KJ, Cohen HY, Lammung DW, Sinclair DA, 2003. Small molecule activators of sirtuins extend *saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425(6954): 191–196.
- Huang P, Ma CH, Yan Q, 2011. Effects of mannitol on the growth and effective storage period of potato seedlings. *Southwest Agricultural Journal*, 24(6): 2446–2448. [黄萍, 马朝宏, 颜谦, 2011. 甘露醇对马铃薯试管苗生长和有效保存期的影响. 西南农业学报, 24(6): 2446–2448.]
- Huang T, Zhang J, Gao XY, Ding YT, Gao YQ, Qiu LY, 2017. Changes in the content of guanosine-5'-diphosphate-3'-diphosphate in *Pleurotus chinensis* and its effect on mycelial growth. *Journal of Edible Fungi*, 24(4): 25–28. [黄涛, 张君, 郜熙阳, 丁亚通, 高玉千, 邱立友, 2017. 糙皮侧耳中鸟苷-5'-二磷酸-3'-二磷酸的含量变化及其对菌丝生长的影响. 食用菌学报, 24(4): 25–28.]
- Jian LR, Ji XP, Du ST, 2015. Effects of light conditions on the yield, cordycepin and adenosine of artificially cultured *Cordyceps militaris*. *Journal of Northwest Agriculture*, 24(4): 163–167. [简利茹, 纪晓鹏, 杜双田, 2015. 光条件对人工培养蛹虫草子座产量及虫草素和腺苷的影响. 西北农业学报, 24(4): 163–167.]
- Jiao J, Zhang WC, Wei LT, Fang MD, 2017. Exploration of influencing factors in the determination of ultraviolet absorption of p-Aminobenzoic acid. *Journal of Yuncheng University*, 35(6): 32–35. [焦姣, 张稳婵, 卫莉婷, 方明德, 2017. 对氨基苯甲酸的紫外吸收测定中影响因素的探究. 运城学院学报, 35(6): 32–35.]
- Li CJ, Li K, Qiao S, Wang CC, Ran M, 2010. Improvement of colorimetric determination of trace urea by p-dimethylaminobenzaldehyde. *Journal of Sichuan Normal University*, 33(3): 410–413. [李川江, 李珂, 乔澍, 王聪聪, 冉鸣, 2010. 对二甲氨基苯甲醛比色法测定微量尿素的改进. 四川师范大学学报, 33(3): 410–413.]
- Liu YY, 2016. Extraction and biological activity of polyphenols from *Cordyceps sinensis* mycelium. Master dissertation. Kunming: Kunming University of Science and Technology. [刘雨阳, 2016. 冬虫夏草菌丝体多酚的提取及生物活性研究. 硕士学位论文. 昆明: 昆明理工大学.]
- Liu ZQ, 2004. Determination and antibacterial properties of total polyphenols in different plant materials. Master dissertation. Beijing: Beijing Forestry University. [刘志芹, 2004. 不同植物材料总多酚的测定及抑菌特性研究. 硕士学位论文. 北京: 北京林业大学.]

- Lo HC, Hsieh C, Lin FY, Hsu TH, 2013. A systematic review of the mysterious caterpillar fungus *Ophiocordyceps sinensis* in Dong-ChongXiaCao and related bioactive ingredients. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 3(1): 16–32.
- Mantovani TRD, Linde GA, Colauto NB, 2007. Effect of the addition of nitrogen sources to cassava fiber and carbon-to-nitrogen ratios on agaricus brasiliensis growth. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(1): 139–143.
- Nakagawa T, Zhu Q, Tamrakar S, Amen Y, Mori Y, Suhara H, 2018. Changes in content of triterpenoids and polysaccharides in ganoderma lingzhi at different growth stages. *Journal of Natural Medicines*, 72(3): 734–744.
- Northup DRR, 1999. Evolution of soil properties and plant communities along an extreme edaphic gradient. *European Journal of Soil Biology*, 35(1): 31–38.
- Qian ZM, Li WQ, Wang CX, Zhou MX, Sun MT, Gao H, Li WJ, 2016. Quantitative analysis and comparison of nucleoside components of four kinds of insect herbal medicines by high performance liquid chromatography. *China Journal of Traditional Chinese Medicine*, 41(13): 2493–2499. [钱正明, 李文庆, 王传喜, 周妙霞, 孙敏甜, 高昊, 李文佳, 2016. 高效液相色谱定量分析比较 4 种虫草药材的核苷类成分. 中国中药杂志, 41(13): 2493–2499.]
- Qin X, Liu Y, 2006. Research and application of vegetable tannin in water treatment. *Industrial Water Treatment*, 2006(3): 8–11. [秦小玲, 刘艳红, 2006. 植物单宁在水处理中的研究与应用. 工业水处理, 2006(3): 8–11.]
- Qiu XH, Cao L, Han RC, 2016. The progress, issues and perspectives in the research of *Ophiocordyceps sinensis*. *Journal of Environmental Entomology*, 38(1): 1–22. [丘雪红, 曹莉, 韩日畴, 2016. 冬虫夏草的研究进展、现存问题与研究展望. 环境昆虫学报, 38(1): 1–22.]
- State Pharmacopoeia Commission, 2005. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2005 Edition. Chemical Industry Press. 75. 国家药典委员会, 2005. 中华人民共和国药典: 2005 年版. 北京: 化学工业出版社. 75.]
- State Pharmacopoeia Commission, 2010. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2010 Edition, No. 1. China Pharmaceutical Science and Technology Press. 106. [国家药典委员会, 2010. 中华人民共和国药典: 2010 年版, 一部. 北京: 中国医药科技出版社. 106.]
- State Pharmacopoeia Commission, 2015. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: 2015 Edition, No. 1. China Pharmaceutical Science and Technology Press. 115. [国家药典委员会, 2015. 中华人民共和国药典: 2015 年版, 一部. 北京: 中国医药科技出版社. 115.]
- Su J, 2016. The effect of medium osmotic pressure on the growth and polysaccharide content of *Dendrobium officinale* protocorm. *Fujian Agricultural Journal*, 31(5): 475–479. [苏江, 2016. 培养基渗透压对铁皮石斛原球茎生长和多糖含量的影响. 福建农业学报, 31(5): 475–479.]
- Tao YX, Li X, Chen RL, Yan JJ, Huang QH, Zhu J, Xie BG, 2018. Molecular mechanism of primordium formation of *Flammulina velutipes* induced by mechanical damage. Proceedings of the 2018 Annual Academic Conference of the Chinese Society of Mycology. 81. [陶永新, 李肖, 陈仁良, 严俊杰, 黄千慧, 朱坚, 谢宝贵, 2018. 机械损伤诱导金针菇原基形成的分子机理. 中国菌物学会 2018 年学术年会论文汇编. 泰安: 81.]
- Wagemaker M, Eastwood DC, Drift C, Jetten M, Burton K, Griensven L, Camp H, 2006. Expression of the urease gene of agaricus bisporus: A tool for studying fruit body formation and post-harvest development. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(4): 486–492.
- Wang B, Li Ning, Dong TX, Zhan HQ, 2015. Determination of nucleosides and HPLC fingerprints of Cordyceps. *Chinese Herbal Medicines*, 38(5): 952–956. [王冰, 李宁, 董婷霞, 詹华强, 2015. 冬虫夏草中核苷类成分含量测定及 HPLC 指纹图谱研究. 中药材, 38(5): 952–956.]
- Wang HY, Tang XY, 1996. Comparison of mannitol content in different growth stages and worms of wild *Cordyceps sinensis* in Sichuan. *West China Journal of Pharmacy*, 1996(1): 58–59. [王化远, 唐心曜, 1996. 川产野生冬虫夏草不同生长期子座、虫体中甘露醇含量比较. 华西药学杂志, 1996(1): 58–59.]
- Wang Y, Wang M, Ling Y, Fan W, Yin H, 2009. Structural determination and antioxidant activity of a polysaccharide from the fruiting bodies of cultured *Cordyceps sinensis*. *American Journal of Chinese Medicine*, 37(5): 977–989.
- Wang Y, Yin H, Lv X, Wang Y, Gao H, Wang M, 2010. Protection of chronic renal failure by a polysaccharide from *Cordyceps sinensis*. *Fitoterapia*, 81(5): 397–402.
- Wang ZM, Xie JH, Yang XH, Hu YL, Wang JL, 2007. Progress in the isolation, detection and application of plant polyphenols in the field of resistance. *Guangdong Agricultural Science*, 2007(6): 69–73. [王忠猛, 谢江辉, 杨晓红, 胡玉林, 王军玲, 2007. 植物多酚的分离、检测及其在抗性领域的应用进展. 广东农业科学, 2007(6): 69–73.]
- Wu XQ, Sun YL, Zhong BP, 2021. Determination of total polyphenols in sandalwood olives by Folin phenol method. *Fujian Traditional Chinese Medicine*, 52(6): 22–24. [吴晓青, 孙燕丽, 钟碧萍, 2021. 福林酚法测定檀香橄榄中总多酚含量的研究. 福建中医药, 52(6): 22–24.]
- Wyatt TT, Leeuwen MV, WSten H, Dijksterhuis J, 2014. Mannitol is essential for the development of stress-resistant ascospores in *neosartorya fischeri* (*Aspergillus fischeri*). *Fungal Genetics and Biology*, 64: 11–24.
- Xiang F, Lin L, Hu M, Qi X, 2016. Therapeutic efficacy of a polysaccharide isolated from *Cordyceps sinensis* on hypertensive rats. *Int. J. Biol. Macromol.*, 82: 308–314.

- Xie F, Su QJ, Xia YX, Li JY, Chen ZH, Zhou GH, 2021a. Effects of light treatment on the growth and metabolism of *Cordyceps sinensis* strains. *Northwest Agricultural Journal*, 30(7): 1060–1070. [谢放, 苏强军, 夏樱霞, 李佳莹, 陈照禾, 周刚, 2021. 光照处理对冬虫夏草单孢菌株生长代谢的影响. 西北农业学报, 30(7): 1060–1070.]
- Xie F, Xia YX, Su QJ, Vestine U, Chen ZH, Zhou G, 2021b. Ultramicroscopic observation of three hyphal morphologies of *Trichospora* in China. *Zhejiang Agricultural Journal*, 33(5): 855–860. [谢放, 夏樱霞, 苏强军, UWITUGABIYE Vestine, 陈照禾, 周刚, 2021. 中国被毛孢三种菌丝形态的超显微特征观察. 浙江农业学报, 33(5): 855–860.]
- Xu F, Wu LF Lin Shan, Wang HY, Teng Y, Liu ZQ, Zheng YG, 2014. Detection and structural identification of caterpillar in *Cordyceps*. *Genomics & Applied Biology* 33 (6): 1294–1302. [许峰, 吴玲芳, 林善, 王鸿艳, 滕毅, 柳志强, 郑裕国, 2014. 发酵冬虫夏草菌丝体中虫草多糖含量的检测及结构鉴定. 基因组学与应用生物学, 33(6):1294–1302.]
- Yang FQ, Ge L, Yong JW, Tan SN, Li SP, 2009. Determination of nucleosides and nucleobases in different species of *Cordyceps* by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 50(3): 307–314.
- Yang JX, Nian YQ, Duan YB, Xin YY, Zhu L, Liu GQ, Li XY, 2020. Determination of *Cordyceps polysaccharides* in fermented *Cordyceps sinensis* powder and its anti-radiation effect. *Chinese Journal of Plateau Medicine and Biology*, 41(1): 53–59. [杨建鑫, 年永琼, 段雅彬, 辛元尧, 朱琳, 刘贵琴, 李向阳, 2020. 发酵冬虫夏草菌粉中虫草多糖的含量测定及其抗辐射作用初探. 中国高原医学与生物学杂志, 41(1): 53–59]
- Yang XY, Luo X, Lei L, 2021. Analysis and comparison of adenosine content in different parts of *Cordyceps sinensis*. *Strait Pharmacy*, 33(2): 48–50. [杨小艳, 罗霄, 雷蕾, 2021. 冬虫夏草不同部位腺苷含量分析比较. 海峡药学, 33(2): 48–50.]
- Yang FQ, Ge L, Yong J, Tan SN, Li SP, 2009. Determination of nucleosides and nucleobases in different species of *cordyceps* by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 50(3): 307–314.
- Ye D, Du F, Zou YJ, Zhang HJ, Hou ZS, Hu QX, 2019. Effects of light quality on the differentiation and physiological effects of the primordia of *Pleurotus eryngii*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 25(5): 1107–1112. [叶豆, 杜芳, 邹亚杰, 张海军, 侯占山, 胡清秀, 2019. 光质对刺芹侧耳原基发生期分化及生理效应的影响. 应用与环境生物学报, 25(5): 1107–1112.]
- Yin H, Zhou H, Wang W, Tran LP, Zhang B, 2020. Transcriptome analysis reveals potential roles of abscisic acid and polyphenols in adaptation of *onobrychis viciifolia* to extreme environmental conditions in the Qinghai-Tibetan Plateau. *Biomolecules*, 10(6): 967.
- Zahid N, Deppenmeier U, 2016. Role of mannitol dehydrogenases in osmoprotection of *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(23): 9967–9978.
- Zan LF, Bao HY, Li DH, 2016. Review on polyphenol components from medicinal fungi “*Sanghuang*” and their biological activity. *Research and Development of Natural Products*, 28(1): 147–155. [咎立峰, 包海鹰, 李丹花, 2016. “桑黄”类真菌中多酚物质及其生物活性研究进展. 天然产物研究与开发, 28(1): 147–155.]
- Zan K, Su R, Liu J, Zheng J, JG, Ma SC, Qian ZM, Li WJ, 2016. *Cordyceps sinensis* artificial breeding goods and wild *Cordyceps sinensis* in adenosine content. *China Pharmacy*, 30(6): 598–603. [咎珂, 苏蕊, 刘杰, 郑健, 过立农, 马双成, 钱正明, 李文佳, 2016. 冬虫夏草人工繁育品与野生冬虫夏草中腺苷含量的比较研究. 中国药事, 30(6): 598–603.]
- Zha Y, Zhang ZH, Li XZ, Xu HF, Liu X, Li YL, 2019. A preliminary study on the extraction process of polyphenols from *Cordyceps sinensis* mycelium. *Qinghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 49(5): 10–17. [查昱, 张宗豪, 李秀璋, 徐海峰, 刘欣, 李玉玲, 2019. 冬虫夏草菌丝体多酚提取工艺初探. 青海畜牧兽医杂志, 49(5): 10–17.]
- Zhang CR, Tian ZY, Fan Q, Li DD, Wang YB, Huang LD, 2021. Development status and sustainable utilization of *Cordyceps sinensis* resources. *China Edible Fungi*, 40(10): 79–88. [张成瑞, 田泽园, 范琪, 李丹丹, 王元兵, 黄罗冬, 2021. 冬虫夏草资源发展现状及可持续利用分析. 中国食用菌, 40(10): 79–88.]
- Zhang WQ, He H, Luo JY, Cao J, 2017. Application of ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography in screening and content determination of cordycepin in artificial cordyceps mycelium. *Food Safety Quality Chinese Journal of Testing*, 8(7): 2516–2522. [张伟清, 何欢, 罗娇依, 曹进, 2017. 超高效液相色谱-质谱联用法及高效液相色谱法在人工虫草菌丝体中虫草素筛查及含量测定中的应用. 食品安全质量检测学报, 8(7): 2516–2522.]
- Zhang Y, Zhang GQ, Zhang PF, Zhang J, Fan HW, 2006. Relationship between phenolic substances and fruit tree tissue culture, fruit quality and stress resistance. *Hebei Forest and Fruit Research*, 2006(3): 311–315. [张燕, 张国强, 张鹏飞, 张进, 范宏伟, 2006. 酚类物质与果树组织培养、果实品质及抗逆性的关系. 河北林果研究, 2006(3): 311–315.]
- Zhou S, Ma F, Zhang X, Zhang J, 2016. Carbohydrate changes during growth and fruiting in *pleurotus ostreatus*. *Fungal Biology*, 120: 852–861.
- Zhou S, Tang Q, Tang C, Liu Y, Ma F, Zhang X, Zhang JS, 2018. Triterpenes and soluble polysaccharide changes in *Lingzhi* or *Reishi* medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), during fruiting growth.. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 20(9): 859–871.