

# 北冬虫夏草菌种的选育及生物学特性研究

秦秀丽, 邢力, 尹锐, 范文忠

(吉林农业科技学院, 吉林 吉林 132101)

**摘要:**采用野生的北冬虫夏草虫体和子实体组织进行菌种分离, 筛选得到北冬虫夏草纯菌株, 并对该菌株生物学特性进行了试验鉴定。结果表明: 该菌株为北冬虫夏草的优良菌株, 栽培试验取得了较好的栽培效果。

**关键词:**北冬虫夏草; 分离; 菌株; 生长

**中图分类号:**S 567.35<sup>+</sup>5 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)09-0175-03

北冬虫夏草(*Cordyceps militaris*)又称蛹虫草, 是著名的食药两用真菌, 通过对北冬虫夏草化学成分和药理活性研究结果表明, 药理作用和药用成分与冬虫夏草极其相近, 其菌体内富含蛋白质、氨基酸、维生素及多种微量元素外, 还含有虫草素、虫草酸、过氧化物歧化酶(SOD)等生物活性物质, 具有显著提高免疫力、抗肿瘤、抗衰老、抗疲劳、补肺益肾、补虚损、益精气的作用, 对糖尿病、高血脂、心脑血管等疾病有很好的医疗保健功效<sup>[1-3]</sup>, 已成为野生冬虫夏草理想的代用品, 以其良好的医疗保健等功效深受市场及人们的青睐, 现已广泛用于食品、医药、保健等领域, 市场需求量极大。但人工培养过程中, 菌种极易退化, 常导致不出草、产量低、畸形草多等问题, 严重地影响了经济效益以及北虫草产业的发展。为此, 该研究采用野生的北冬虫夏草虫体和子实体进行了菌种的选育, 取得了较好的栽培效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 分离材料的采集及选择 左家自然保护区地处长白山脉的余脉, 海拔 50~400 m, 每年的 8~9 月气候温暖湿润, 具有北冬虫夏草子座形成的适宜条件, 是采集野生北冬虫夏草的最佳时期, 北冬虫夏草主要生长于阔叶林或混交林地上或者树皮内的昆虫蛹上。每次采集都及时进行分离。将采集来的野生北冬虫夏草进行筛选, 选择颜色橘黄色或橙黄色, 生长健壮, 没有病虫害的新鲜北冬虫夏草作为分离材料。

1.1.2 培养基 PDA 加富培养基: 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 蛋白胨 10 g, 琼脂 20 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4$

0.5 g,  $\text{H}_2\text{O}$  1 000 mL。选择性培养基: 在上述 PDA 加富培养基中加 40  $\mu\text{g}$  链霉素。栽培培养基: 大米、液体培养基(蛋白胨 2%, 葡萄糖 2%, 马铃薯汁 20%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1%,  $\text{MgSO}_4$  0.05%)。仪器设备: 电热恒温培养箱、超净工作台、手提式高压蒸汽灭菌锅、电热恒温振荡培养箱、电子分析天平、电光显微镜, 可调节光强的荧光灯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌种分离 北冬虫夏草的菌株分离包括组织分离和孢子分离 2 种。由于孢子分离得到的北冬虫夏草菌株性状不稳定, 不易操作, 而且生物转化率较组织分离低, 一般采用组织分离的方法获得野生北冬虫夏草菌株<sup>[2]</sup>。北冬虫夏草的组织分离又根据选择材料的不同, 分为蛹体组织分离和子座组织分离 2 种。一般操作方法, 在无菌条件下, 将筛选出新鲜的北冬虫夏草的蛹体组织及子座组织, 置于 75% 的酒精中表面消毒 2~3 min, 用无菌镊子取出蛹体和子座后, 以无菌水反复冲洗数次, 最后用无菌吸水纸吸干表面水分, 放入无菌培养皿中, 再用无菌解剖刀将消毒的北冬虫夏草的蛹体切开, 切取内部白色组织块 2~3 mm<sup>2</sup>, 子座剪成长度 3~5 mm 的小段, 接种于平板选择培养基上。每个平皿 4~5 块(段), 然后将平皿置于 22℃ 下培养 7 d, 挑选无污染、菌丝生长健壮的菌落, 挑取健壮的菌丝转接到 PDA 加富培养基上进行培养, 直到长满培养基斜面, 再挑选菌丝丝色洁白、生长健壮、气生菌丝匍匐生长、无杂菌污染的试管, 即为分离得到的菌株。

1.2.2 栽培试验 液体菌种的制备: 将 100 mL 液体培养基装入 300 mL 的三角瓶中, 经高压灭菌后接入分离得到的菌种, 然后放入恒温振荡培养箱中, 在转速 120 r/min 下培养 4 d, 既可得到液体菌种。出草试验: 取 500 mL 的罐头瓶, 装入 40 g 的大米, 注入 55 mL 的液体培养基, 用聚丙烯塑料袋封口后, 用线绳扎牢。经高压蒸汽灭菌后, 接入 5 mL 液体菌种, 在无菌条件下进行培

**第一作者简介:**秦秀丽(1966-), 女, 吉林永吉人, 硕士, 副教授, 现主要从事微生物及食药两用菌的教学及研究工作。

**基金项目:**吉林省科技厅发展计划资助项目(201105071)。

**收稿日期:**2012-02-16

养,观察菌丝的长势及出草情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同分离方法菌种长势的比较

将采集的同一北冬虫夏草的蛹体及子座分别进行分离,对2种方法菌种的污染率及菌丝的萌发情况进行了对比。由表1可知,用蛹体作为分离材料,菌丝萌发得较快,菌种的成活率较高。分析其原因,主要是蛹体组织相对于子座较大,表面消毒后是从内部取具有白色菌丝的组织块,杂菌较少,基内菌丝放到培养基后萌发较快,而北冬虫夏草的子座是棒状,菌肉较薄,难以完全取到内部的菌肉组织,而子座虽然进行了消毒,但达不到无菌状态,另外子座菌丝的再生能力没有基内菌丝强,因此,用蛹体作为分离材料菌种的成功率大。

表1 不同分离材料菌种长势的比较

分离材料	污染率 /%	污染菌 种类	菌丝萌发 时间/d	菌丝长势	成活率 /%
蛹体	68	细菌、霉菌	2	较好	28.8
子座	92	细菌、霉菌	4	一般	7.6

### 2.2 菌株表观性状的观察

对分离得到菌株直接观察其菌丝生长的特性。在培养的初期,菌丝为白色,菌丝生长浓密健壮,生长快,长势整齐,见光后菌丝分泌黄色素,菌丝逐渐变为黄色,颜色逐渐加深,后期变为橘黄色,菌丝的这些特性均符合北冬虫夏草的菌丝特性。

### 2.3 菌丝的形态学检验

在无菌条件下,用接种耙将分离得到的菌种管内的菌丝取出,用石炭酸复红进行染色,然后放到显微镜下,观察菌丝的形态。经观察证实,菌丝形态一致,为有隔菌丝,呈管状,并有分枝,说明菌种管内无任何杂菌污染,为北冬虫夏草纯菌丝体。

### 2.4 菌株生物学特性鉴定

2.4.1 菌丝体对温度的要求 为了检验菌株对温度的适应性,将分离得到的菌种接种到PDA加富平板培养基上,放置于5~35℃下进行培养,定时测菌丝长速。由图1可知,菌丝在5℃和35℃时没有生长,在10~30℃之间均可以生长,但在20~25℃时菌丝生长速度最快,超过25℃时菌丝生长速度减慢,达到35℃菌丝体不能生长,表明20~25℃是菌丝体生长的适宜温度。

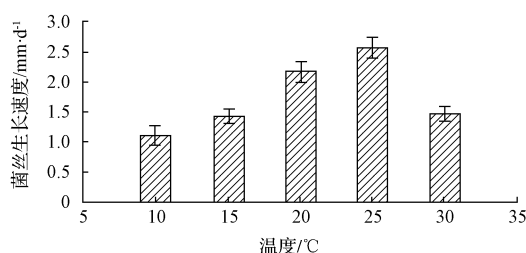


图1 不同温度下菌丝生长速度

2.4.2 出草试验 子实体原基分化对光照条件的要求:光照是北冬虫夏草子实体原基分化的重要因素<sup>[5]</sup>,为了检验该菌株子实体原基形成对光照强度的要求,当菌丝长满培养基后,将罐头瓶(每个处理40瓶)放置在22℃,空气湿度为80%~90%条件下,给予不同强度的光照条件,每天光照12h,在培养期间适当调整瓶与光源的相对方向,使光照均匀,共15d,在7d后,每天给予5℃的温差刺激10h,观察菌丝的长势及原基的形成情况。由表2可知,在无光条件下菌丝体的气生菌丝较多,菌丝不能转色,没有原基的分化,随着光线的增强,菌丝逐渐转色,颜色逐渐加深,由浅黄色逐渐变为橘黄色,匍匐菌丝增多,原基开始分化,在150~200 lx的光照下,原基分化得较多,达到92%以上,并且分布均匀。而250~300 lx的光照条件下,原基分化达到95%,但原基过密,由于营养不足,有的原基在生长过程中枯萎死亡。因此,该菌株在150~200 lx的光照下,有利于原基的分化。子实体原基分化对温度的要求:为了确定该菌株子实体原基分化适宜的温度范围,当菌丝长满培养基后,将罐头瓶(每个处理40瓶)放在150~200 lx的光照条件下,空气湿度为80%~90%条件下,在15~25℃的温度下进行培养,培养7d后每天给予5℃温差刺激10h,观察原基的形成情况。由图2可知,在15℃条件下,原基只有10%的分化率,随着温度的升高,原基分化率逐渐升高,当温度达到20℃左右时,原基的分化率最高,达到90%以上,当温度达到23℃以上时,原基的分化率迅速下降。因此,该菌株原基分化的适宜温度为18~23℃。子实体生长对光照条件的要求:为了确定该菌株子实体生长对光照条件的要求,当子实体原基形成后,将罐头瓶(每个处理40瓶)放室温为20℃,空气湿度为80%~90%条件下,给予不同强度的光照条件,每天光照时间为12h,在培养期间适当调整瓶与光源的相对方向,使光照均匀,观察子实体的生长情况,培养20d进行采收,将子实体

表2 不同光照条件下菌丝长势及原基形成情况

处理/lx	菌丝长势	菌丝颜色	原基分化/%
无光	浓密,气生菌丝旺盛	洁白	无
50~100	浓密,气生菌丝较旺	浅黄色	40%,分布不均匀
150~200	较密,匍匐菌丝多	黄色	92%,分布均匀
250~300	较密,匍匐菌丝多	橘黄色	95%,过密

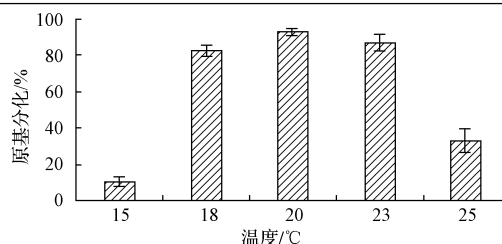


图2 不同温度原基分化情况

取出测定子实体的长度。由表 3 可知,光照的强度对子实体的生长速度影响不大,但对子实体的品质有较大的影响,光照不足,子实体生长不够健壮,颜色较浅,当光照为 300~500 lx 时,子实体生长健壮,色泽较深,呈橘黄色,由于光照强,耗电量也增加,因此,在子实体生长阶段给予 300 lx 的光照条件是最适宜的。子实体生长对温度的要求:为了确定该菌株子实体生长适宜的温度范围,当子实体原基形成后,将罐头瓶(每个处理 40 瓶)放在 300 lx 的光照,每天光照时间为 12 h,空气湿度为 80%~90%条件下,在培养期间适当调整瓶与光源的相对方向,使光照均匀,在 15~25℃ 的温度下进行培养,观察子实体的生长情况,培养 20 d 进行采收,将子实体取出测定子实体的长度。由图 3 可知,在 15℃ 条件下,子实体的生长速度较慢,随着温度的升高,子实体生长速度逐渐加快,当温度达到 23℃ 左右时,子实体生长速度最快,超过 23℃ 时,子实体生长速度逐渐减慢,因此,确定该菌株子实体生长的适宜温度为 20~23℃。

表 3 子实体在不同光照条件生长情况的比较

处理/lx	长势	色泽	生长速度/mm·d <sup>-1</sup>
200	棒状,生长一般,	黄色	2.27
300	棒状,生长健壮	橘黄色	2.33
400	棒状,生长健壮	橘黄色	2.28
500	棒状,生长健壮	橘黄色	2.38

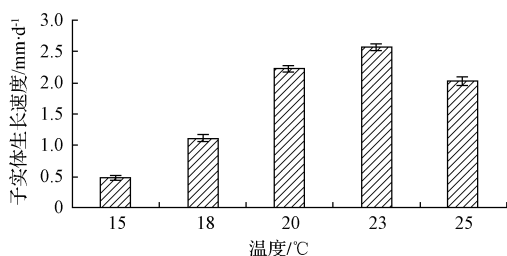


图 3 不同温度子实体生长速度

2.4.3 栽培试验 为了检验该菌株的栽培性状,在单因素试验的基础上进行了栽培试验。将接种后的 200 个罐头瓶放在培养室中,室温保持在 23~25℃,空气湿度为 60%~70%条件下,菌丝体萌发快、生长健壮,培养

15 d 后给予 150~200 lx 的光照条件,每天 10 h 以上,菌丝体 21 d 长满培养基,然后将温度控制在 20~21℃,空气湿度为 80%~90%条件下,并给予 5~10℃ 的温差,原基 3~4 d 形成,原基均匀整齐。原基形成后,增强光照,每天给予 300 lx 的光照 10 h 以上,每天通风 2 次,每次 1 h,在子实体生长期温度保持在 20~23℃,子实体长势整齐,生长健壮。当子实体顶端出现许多小刺不再生长时进行采收。从原基形成到采收为 15 d。生物转化率为 92%。

### 3 结论与讨论

试验证明,以野生北冬虫夏草用蛹体作为材料选育菌种的方法简单易行、成活率高、成功率大,易得到纯菌种,是分离北冬虫夏草菌种首选方法。

通过单因素试验确定选育出的菌株菌丝体生长的适宜温度为 20~25℃,原基分化的适宜温度为 18~23℃,适宜的光照条件为 150~200 lx;子实体生长的适宜温度为 20~23℃,适宜光照条件为 300 lx。通过栽培试验证明该菌株菌丝萌发快,生长健壮,转色能力强,原基均匀整齐;子实体长势整齐,颜色为橘黄色,生长健壮,生物转化率达到 90%以上,是优良菌株。

北冬虫夏草的栽培方式分为用培养基人工培养和寄主体人工培养,该菌株的出草试验和栽培试验都是在栽培培养基上进行的,通过试验鉴定为优良菌株。对于该菌株在寄主体上的出草情况该试验没有涉及,在以后的出草试验中将进一步进行深入研究。

### 参考文献

- [1] 彭国平,李红阳,袁永泰.冬虫夏草与人工蛹虫草的成分比较[J].南京中医药大学学报,1996(12):26-28.
- [2] 王刚,麻兵继,刘吉开.人工蛹虫草化学成分研究[J].中草药,2004,35(5):493-495.
- [3] 廖春丽,方改霞,王莲哲,等.蛹虫草主要有效成分分析[J].安徽农业科学,2008,36(12):5050-5052.
- [4] 李翠新,张国庆,何永珍,等.野生蛹虫草的分离与高产菌株的筛选[J].中国食用菌,2007,26(2):20-21.
- [5] 肖波,韦会平,胡开治.蛹虫草人工培养料高产培育技术[J].食用菌,2004(5):36-37.

## Study on the Breeding and Biological Characteristics of *Cordyceps* Strains

QIN Xiu-li, XING Li, YIN Rui, FAN Wen-zhong

(Jilin Agriculture Science and Technology College, Jilin, Jilin 132101)

**Abstract:** Using wild *Cordyceps parasites* and fruiting body tissue, the cordyceps pure strain was selected, the biological characteristics of the strains were identified. The results showed that it was an excellent strain of *Cordyceps*, and good cultivation effect was achieved by cultivation text.

**Key words:** *Cordyceps*; isolate; strain; growing